

國立臺灣大學生物資源暨農學院動物科學技術學系

碩士論文

Department of Animal Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

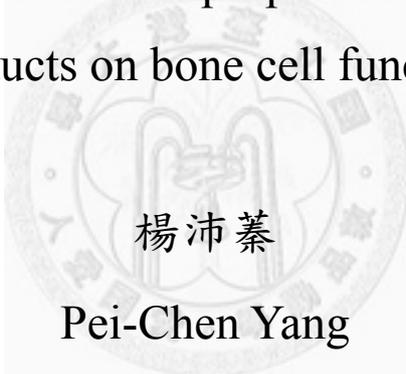
National Taiwan University

Master Thesis

蛋殼膜膠原蛋白水解液、蛋黃水解液及蛋殼粉對預

防骨質疏鬆機能性之評估

Evaluation of functional properties of egg-derived  
products on bone cell function



楊沛蓁

Pei-Chen Yang

指導教授：蘇和平 博士

Advisor: Hou-Pin Su, Ph.D.

中華民國 101 年 6 月

June, 2012

## 致 謝

本論文承蒙恩師 蘇和平博士兩年來悉心指導與策勵，恩師於論文題目、試驗設計、年會發表及論文之撰寫、修改，耐心指導並提供寶貴意見。也要感謝口試委員 黃英豪博士、陳億乘博士與林詠凱博士詳細審閱與撥冗修正，特此敬致謝忱。

在台北這兩年的就學期間，首先要感謝 蘇和平老師於論文研究上之指導與做人做事觀念的指引，以及系上老師於學業與研究上所提供的意見與協助；林慶文老師及 陳明汝老師在學業及做人做事上的身教與言教；感謝 陳億乘老師大方的讓我去他們實驗室學習實驗技巧。

更感謝加工室這個大實驗室的小家長:阿伯學長，不只常常關心大夥的日常生活，也常常在待人處事上教導與分析給我們聽，讓我了解到很多不同事情處理的角度該如何去拿捏，除此之外也感謝學長在實驗上的幫助與指導；另外也要謝謝聖耀學長、偉盛學長、廷宇學長、月玲學姐以及之儀學姊，雖然跟妳們相處的時間很短暫，但在懵懵懂懂的碩一小菜鳥階段，很謝謝你們願意跟剛進這個大家庭的我分享所有點滴，以及許多做人處事之道理，甚至還策勵我。也很感謝馨慧學姐、姿利學姐、雅婷學姐、昱婷學姐及庭羽學長，很謝謝你們在我手忙腳亂面臨第一次的專討時，大家絞盡腦汁教我如何選擇 paper 讓架構更完整，以及如何讓自己的專討更有故事性。

還有加工室的戰友們:汪婷、賴床、英林、Pink；謝謝汪小婷陪我挑燈夜戰，不只課業上的問題甚至在要結報時，還連續好幾天陪我練稿、改 ppt，改到凌晨 3.4 點；謝謝賴床在我剛來台北完全人生地不熟的時候，帶我融入這個大家庭，甚至之後還一起加入壁球社，在實驗閒暇之餘一起去運動還有玩樂，除此之外，常常在做實驗時也給我建議與幫忙；更難忘大夥一起走跳校園、平溪放天燈祈求實驗順利以及到處去吃美食，也要感謝偉大的助理 彥霖，謝謝你在我剛接觸細胞實驗的時候，願意幫助協助我，有些東西雖然我們都不是很熟悉，可是我們

兩個一起想辦法解決，真的是太感謝你了~同時也要感謝景銘、芳芳、吳婕、白白還有 BoA 要不是沒有你們的吱吱喳喳與打鬧，想必碩班生活必定相當枯燥乏味，謝謝你們讓我擁有許多美好回憶。也要謝謝怡伶學姊、宜岑、奕賢與林真還有大 A，謝謝你們大方教導與分享我許多實驗技巧。謝謝分生室的楊舖舖、大鳥、小幼、乃霸與慧卉，陽明山採海芋、九份老街吃吃喝喝，互相抱怨、互相扶持，許許多多歷歷在目，謝謝你們。

接著我要謝謝大葉大學生物產業科技學系的 吳建一老師以及陪我細數許多日子的學長姐們還有夥伴們，帶我進入研究這個神聖的領域，我不會忘記實驗室每年一定會有忘年會以及聖誕趴踢還有實驗室上山下海出征研討會，當然還有實驗室一年一度的大夥集體出遊，每次出門總是很壯觀。謝謝在大學的這段期間，大夥一起做實驗、翻 paper over night，因為有你們，讓我更圓滿。在心情低落與頹廢時，幸好有空空、哈哈、佳佳、阿曼、好兄弟毛毛、凱軍、秉洋及昱玲學姊你們的加油打氣與鼓勵；尤其感謝我大學的好室友兼第二個男友 空空，在我心情難過時，都被我打電話煩；在我煩悶時，要來接送我去他家大鬧；也很謝謝我的工工朋友們：老大、史瑞克、阿昌、小飛，謝謝你們的義氣相挺與義不容辭!!! 小女子真的超感動，一切盡在不言中。還有北科電機的朋友們，在台北的生活，因為有你們的幫忙與參與，更增添在這邊的多彩多姿。

還有我的高中好姊妹們：佳凌、阿串、詩琦、阿嬪、昀紋、糖糖、彩虹及阿丁，謝謝你們一路的互相扶持與陪伴，謝謝你們的兩肋插刀，每年的姊妹聚會是一定不會忘的，因為我們說好，就算到了七老八十，還是要當一輩子隨 call 互相扶持的好姊妹。還要謝謝另一重要的好兄弟兼好姊妹：飛機，謝謝你的關心與陪伴，我想很多話你我不用多說都了解。

再來最感謝我親愛的家人、小阿姨一家人與我的女兒小胖子，謝謝你們在我碩班這兩年台北的生活中，不論我遇到任何困難或挫折，都是最挺我的，謝謝爸爸與媽咪的溫馨接送、糧食接濟以及無私的照顧與栽培；謝謝小姨一家子的大力相挺，你們就像我第二個家；謝謝妹妹的貼心，雖然我們吵吵鬧鬧，但在我

最需要的時候，你一定會第一個衝過來陪我。也謝謝我家女兒小胖子，在台北這兩年也身兼我的室友，雖然不停地搞破壞，但不論在我高興難過還是沮喪，都是這個小傢伙陪伴在我身旁，在我心中佔有非常重要的地位。也謝謝遠在北投上班的大胖子，謝謝你在我碩班這兩年的陪伴與幫助，謝謝你在我生病時的細心照顧，謝謝你照顧我生活上的點點滴滴，謝謝你就連我現在要畢業了，明明工作上已經忙翻掉了，還幫我擔心工作的問題，不時的給我建議與經驗分享，謝謝你。

好快，碩士兩年一轉眼就過去了，還記得當初進來的青澀，還記得當初來到台北的不安與恐懼，還記得不適應台北的快步調、擁擠的人潮與壞天氣，漸漸地我已經要離開這裡了，謝謝在我生命中的每個人，不論是過客、恩人、啟蒙老師甚至不時的在我最需要的時候拉我一把的朋友們，謝謝你們，因為你們我才能走到這裡。



沛蓁 貳零壹貳 艷夏

# 目 錄

口試委員會審定書

誌謝

目錄.....	I
表目錄.....	IV
圖目錄.....	V
中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
壹、緒論.....	1
貳、文獻檢討.....	3
一、蛋殼.....	3
二、蛋殼膜.....	7
三、蛋黃.....	10
四、膠原蛋白簡介.....	15
(一)、分布及來源.....	21
(二)、應用.....	21
(三)、對人體之功能.....	22
五、骨質疏鬆.....	24
(一)、骨質疏鬆症簡介.....	24
(二)、骨質疏鬆症之成因.....	28
六、目前臨床預防與治療骨質疏鬆之方法.....	29
(一)、鈣劑.....	29
(二)、賀爾蒙代替治療 (hormone replacement therapy ; HRT).....	30
(三)、抑鈣素.....	30
(四)、活性維生素 D.....	30

(五)、雙磷酸鹽類藥物 (bisphosphate) .....	31
七、骨細胞.....	31
(一)、骨細胞簡介 .....	31
(二)、骨母細胞 (Osteoblast) 簡介 .....	35
(三)、骨重塑作用 .....	36
(四)、MG-63 細胞及類骨母細胞 .....	39
(五)、研究細胞增生之方法 .....	39
(六)、研究骨細胞分化作用之方法 .....	43
參、材料與方法.....	46
試驗設計.....	47
實驗材料及細胞株.....	47
實驗方法.....	48
第一節    ：雞蛋殼膜之膠原蛋白萃取及分析 .....	48
(一)、實驗流程 .....	48
(二)、蛋殼膜之分離.....	48
(三)、蛋殼膜膠原蛋白之萃取.....	49
第二節    ：蛋殼膜膠原蛋白及蛋黃粉之水解 .....	50
(一)、蛋殼膜膠原蛋白之水解.....	50
(二)、市售蛋黃粉之水解.....	50
(三)、胜肽類濃度測定 .....	50
第三節    ：蛋殼膜膠原蛋白水解液、蛋黃水解液和蛋殼粉與 MG-63 類骨母細胞培 養之功能評估.....	52
(一)、細胞培養 .....	53
(二)、繼代培養 .....	55
(三)、細胞計數.....	57
(四)、細胞存活率測試.....	57

(五)、細胞型態之觀察.....	58
(六)、鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase ; ALP) 含量測定.....	58
(七)、骨礦化節點分析.....	59
(八)、茜素紅染色.....	59
(九)、統計分析.....	60
肆、結果與討論.....	61
第一節：蛋殼膜膠原蛋白及蛋黃水解物之製備與分析.....	61
(一)、蛋殼膜膠原蛋白之萃取及酵素水解過程之變化.....	61
(二)、胜肽含量.....	64
第二節：蛋殼膜膠原蛋白水解液、蛋黃水解液和蛋殼粉與 MG-63 類骨母細胞培養之功能評估.....	67
(一)、細胞存活率測試.....	67
(二)、細胞型態之觀察.....	75
(三)、鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase ; ALP) 活性測定.....	78
(四)、骨礦化節點分析.....	84
(五)、茜素紅染色.....	86
(六)、未來展望.....	89
伍、結論.....	90
陸、參考文獻.....	91
柒、作者小傳.....	98

## 表目錄

表 1-1 雞蛋蛋殼部之一般組成 .....	6
表 1-2 雞蛋蛋殼各部分之有機物化學組成 .....	6
表 1-3 深色及淺色卵黃之成分組成 .....	11
表 1-4 蛋黃蛋白質之組成 .....	12
表 1-5 蛋黃脂質之組成 .....	13
表 1-6 膠原蛋白類型之組成及其在組織中之分佈 .....	20
表 1-7 世界衛生組織 (WTO) 對於骨質疏鬆症的分級方式 .....	26



## 圖目錄

圖 1-1 雞蛋之構造 .....	4
圖 1-2 蛋殼之構造 .....	5
圖 1-3 內殼膜之電子顯微鏡圖 .....	9
圖 1-4 蛋黃成分之概要圖 .....	14
圖 1-5 膠原蛋白之參股螺旋結構 .....	16
圖 1-6 膠原蛋白之特殊胺基酸序列示意圖 .....	17
圖 1-7 膠原蛋白單體之產生與交互連結 .....	18
圖 1-8 膠原蛋白型態分類 .....	19
圖 1-9 骨母細胞表型之發展 .....	22
圖 1-10 骨質轉換之機制 .....	34
圖 1-11 MTT 之結構圖 .....	38
圖 1-12 存活細胞代謝產生 formazan 之反應 .....	41
圖 1-13 鹼性磷酸酶之反應圖 .....	42
圖 2-1 實驗之研究架構 .....	44
圖 2-2 實驗流程及酵素水解條件 .....	47
圖 2-3 實驗流程及膠原蛋白之萃取條件 .....	48
圖 2-4 MG-63 細胞生長情況.....	52
圖 2-5 MG-63 細胞生長情況.....	54
圖 3-1 酵素水解蛋殼膜膠原蛋白之水解液外觀 .....	56
圖 3-2 胃蛋白酶及胰蛋白酶水解蛋黃之水解液外觀 .....	62
圖 3-3 水解期間胃蛋白酶水解蛋殼膜膠原蛋白之胜肽含量變化 .....	65
圖 3-4 水解期間胃蛋白酶及胰蛋白酶水解蛋黃粉之胜肽含量變化 .....	66
圖 3-5 以細胞增生試驗觀察不同濃度經胃蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋殼膜膠	

原蛋白與 MG-63 細胞反應 24 小時對細胞增生之影響 .....	68
圖 3-6 以細胞增生試驗觀察不同濃度經胃蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋黃粉與 MG-63 細胞反應 24 小時對細胞增生之影響 .....	69
圖 3-7 以細胞增生試驗觀察不同濃度經胰蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋黃粉與 MG-63 細胞反應 24 小時對細胞增生之影響 .....	70
圖 3-8 以細胞增生試驗觀察不同濃度經胃蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋殼膜膠原 蛋白與 MG-63 細胞反應 48 小時對細胞增生之影響 .....	72
圖 3-9 以細胞增生試驗觀察不同濃度經胃蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋黃粉與 MG-63 細胞反應 48 小時對細胞增生之影響 .....	73
圖 3-10 以細胞增生試驗觀察不同濃度經胰蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋黃粉與 MG-63 細胞反應 48 小時對細胞增生之影響 .....	74
圖 3-11 以染色方式觀察添加不同處理組水解液反應 24 小時對 MG-63 細胞生 長之影響 .....	76
圖 3-12 以染色方式觀察添加不同處理組水解液反應 48 小時對 MG-63 細胞生 長之影響 .....	77
圖 3-13 鹼性磷酸酶活性觀察低濃度時之經胃蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋殼 膜膠原蛋白對 MG-63 細胞分化之影響 .....	80
圖 3-14 鹼性磷酸酶活性觀察低濃度時之經胃蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋殼 膜膠原蛋白添加 0.1% 蛋殼粉之處理組對 MG-63 細胞分化之影響 .....	81
圖 3-15 鹼性磷酸酶活性觀察低濃度時之經胰蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋黃 粉對 MG-63 細胞分化之影響 .....	82
圖 3-16 鹼性磷酸酶活性觀察低濃度時之經胰蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋黃 粉添加 0.1% 蛋殼粉之處理組對 MG-63 細胞分化之影響 .....	83
圖 3-17 添加不同處理組之蛋殼粉與 MG-63 共培養觀察其骨礦化結點之影響 ..	85
圖 3-18 不同劑量之水解液及蛋殼粉與 MG-63 類骨母細胞共培養觀察其茜素紅染 色之影響 .....	87

圖 3-19 不同劑量之水解液及蛋殼粉與 MG-63 類骨母細胞共培養，於茜素紅染色  
下觀察骨礦化結節之形成..... 88



## 中文摘要

全世界之液蛋廠、餐廳及蛋品加工廠，每年會產生六百五十五萬噸之廢棄蛋殼，目前廢棄蛋殼之應用，主要以作為廢棄垃圾丟棄或加入鳥禽類飼料中，添加其鈣質營養量，其利用性值得深入探討 (Suguro *et al.*, 2000)。最早於 1962, Baker 及 Balch 發現將蛋殼溶於酸性溶液中，其粗萃取物中發現含有大量羧脯胺酸，最後鑑定確定為第 I 及 V 型膠原蛋白。而目前已有相關研究指出利用不同來源之膠原蛋白 (牛皮、雞、魚與豬) 進行水解後，進行骨質疏鬆相關之細胞與動物實驗，結果發現不論在細胞或動物實驗方面，與控制組相比皆有正面之效果。

骨質疏鬆症 (Osteoporosis) 為一種常見的全身性骨骼代謝異常的疾病，主要是因為在骨骼的代謝過程中骨形成作用與骨吸收作用之間不平衡所導致，使骨密度減少進而造成骨質中鈣質的流失，導致骨骼支撐力降低，所以骨骼容易碎裂 (Fanny *et al.*, 2010)。

本篇研究主要探討蛋殼粉、蛋殼膜膠原蛋白水解液以及蛋黃水解液在骨母細胞上之影響，實驗材料主要利用蛋殼膜萃取膠原蛋白，而後利用 1% 之胃蛋白酶進行酵素水解；蛋黃粉部分則利用胃蛋白酶及胰蛋白酶兩種酵素進行水解試驗，兩者試驗皆於 37°C 下，水解時間 0-10 小時。再將此三種不同水解液進行胜肽含量測試。選出最佳胜肽含量後，額外添加類骨母細胞 (MG-63) 中進行共培養。而後進行細胞增生試驗、鹼性磷酸酶活性測試、骨礦化節點分析等功能評估。

實驗結果顯示，添加於 MG-63 類骨母細胞進行培養後，其中以經胰蛋白酶水解 6 小時之蛋黃水解液以及經胃蛋白酶水解 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液不論在細胞增生與鹼性磷酸酶活性都有顯著差異。而在細胞增生之結果顯示，當水解液濃度高於 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時，對於 MG-63 之增生有抑制之效果。因此，不論蛋殼膜膠原蛋白水解液或蛋黃水解液與 MG-63 細胞進行培養時，若要有效刺激類骨母細胞生長，其濃度在 0-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  與控制組相比有顯著之效果。本實驗結果也證實經胃蛋白酶水解 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液與經胰蛋白酶水解 6 小時

之蛋黃水解液在鹼性磷酸酶試驗與控制組相比有顯著之效果，其又以額外添加0.1%蛋殼粉效果更為顯著。而在茜紅素染色試驗方面，同時添加經胃蛋白酶水解8小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液與經胰蛋白酶水解6小時與0.1%蛋殼粉之處理組時，與控制組相比其礦化效果更為顯著。因此我們可以知道就述實驗條件下，會增加骨細胞中之鹼性磷酸酶活性與骨礦化效果，進而促進類骨母細胞之生長。

綜合上述，膠原蛋白水解液對刺激類骨母細胞其生長確實有一定的效果，未來在骨骼發展及預防骨質疏鬆上深具潛力。



## Abstract

Eggshell is a major byproduct of liquid egg industry and consists of collagen I, V and X in its membrane. Some studies suggest that hydrolyzed collagen-enriched diet improves bone collagen metabolism and BMD (bone mineral density). Using osteoblast-like MG-63 cells as a model system capable of partial osteoblastic differentiation, the effect of purified collagen on growth and morphological change were examined. The objective of this study was to investigate the effect of eggshell powder, collagen hydrolysate and egg yolk hydrolysate on bone cell function. The samples were prepared by hydrolyzing eggshell membrane collagen and egg yolk using pepsin and trypsin, at 37°C for 1 to 10 hours. The hydrolysates of eggshell membrane collagen, egg yolk and eggshell powder were co-incubated with MG-63 cells then evaluated by the assays of proliferation, osteoblast differentiation and matrix mineralization using MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide), alkaline phosphatase (ALP) activity and alizarin red staining, respectively. The results obtained from MG-63 cells *in vitro* test demonstrated that the egg yolk hydrolyzed by trypsin for 6 hours (ET6) and the collagen hydrolyzed by pepsin for 8 hours (CP8) were able to stimulate cell growth and ALP activity. The results of MTT assay indicated that the growth of MG-63 was inhibited by the samples at concentration higher than 200 µg/ml. In contrast, the proliferation of MG-63 was only stimulated at low concentration (0-100 µg/ml) of hydrolyzed egg yolk and collagen. The result also demonstrated that the CP8 and ET6 revealed a highest ALP activity, especially the hydrolysates of collagen and egg yolk to added 0.1% eggshell powder. Furthermore, the alizarin red staining indicated that the mineralization was slightly enhanced when stimulated by the sample prepared by incorporating ET6 within CP8 and eggshell powder. It is concluded that the ET6 · CP8

and 0.1% of eggshell powder can increase significantly osteoblast activity, which acts on bone remodeling.

**Key Words:** Osteoblast, Eggshell Membranes, Collagen Hydrolysate, Egg Yolk Hydrolysate, Eggshell Powder



## 壹、緒論

就台灣而言，每年約有兩億六千萬的雞隻生產約一億六千萬顆雞蛋；由於餐廳、液蛋工廠與滷蛋加工廠之關係，全世界每年則會產生六百五十五萬噸之廢棄蛋殼，就目前此大量廢棄蛋殼之處理，除了丟棄外，還會把廢棄蛋殼加入鳥禽類飼料中，增加其鈣質攝取量；或者做為樹植物之堆肥，增加其營養。但大量之廢棄蛋殼普遍餐廳與工廠其處理，主要以花錢處理丟棄。因此此些大量廢棄蛋殼不只會造成環境之汙染，因蛋殼容易腐敗與腐壞，造成異味、蟲害孳生及垃圾問題。此外也會造成餐廳及工廠之成本增加，因此希望能有效之利用此廢棄蛋殼，增加其經濟效益成本，其利用性很值得深入探討。骨質疏鬆 (osteoporosis) 是一種因骨質量減少或骨密度降低而使骨骼微細結構發生破壞的疾病，導致骨骼脆弱，使骨折的危險性明顯增高。根據台灣地區流行病統計調查結果發現：65 歲以上之台灣城市婦女，19.8%以上之脊椎體壓迫性骨折；男性則為 12.5%。而停經後婦女骨質疏鬆症的盛行率更高達 30%。由以上數據得知骨質疏鬆對台灣國民健康之危害。有關骨質疏鬆症與膠原蛋白間之關聯性始終具爭議性，但 Shuster (2005) 提出女性老化過程中，皮膚與骨骼之膠原蛋白每年約流失 1%，並造成骨密度降低，且可能是骨質疏鬆症之直接原因。

由於目前醫學界還未有安全而有效方法來治療骨質疏鬆，因此，預防保健非常重要 (Wade *et al.*, 2001)。目前，在臨床治療骨質疏鬆上仍以藥物治療為主。如雙磷酸鹽類 (Bisphosphonates)、抑鈣素 (Calcitonin ; CT)、副甲狀腺激素 (Parathyroid hormone ; PTH)、雌激素 (Estrogen)、活性型維生素 D ( $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ )、維生素 K (Vitamin K)、氟化鈉 (Sodium fluoride ; NaF) 等，皆是臨床上用來治療骨質流失及骨質疏鬆之藥物 (Stuart *et al.*, 1997)。然而藥物治療無可避免會產生副作用。例如：投與抑鈣素後，注射部位會有疼痛感及噁心、心悸等症狀，而雌激素除了對骨骼作用外會造成不正常性出血、噁心、嘔吐，甚至併發子宮內膜癌及乳癌等副作用 (Barrett *et al.*, 1996 ; Birt *et al.*, 2001)，卻可減少心血管疾病之

死亡率及改善更年期症狀 (Potter *et al.*, 1998)；雙磷酸鹽類則具有很強之骨吸收抑制作用但仍會有噁心、嘔吐及下痢等副作用 (Stuart *et al.*, 1997)。

因此本實驗主要探討自蛋殼膜中製備膠原蛋白，並將不同濃度之蛋殼膠原蛋白水解液、蛋黃水解液及蛋殼粉水解液培養於類骨母細胞 (osteoblast)，並觀察其對類骨母細胞 (MG-63) 之增生曲線、鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性與礦物化反應 (mineralization) 等成骨作用參數之影響。藉此實驗之結果將可充分利用廢棄蛋殼，並瞭解蛋殼鈣粉及蛋殼膜膠原蛋白水解物是否能刺激體外成骨作用，開發減緩骨質流失並預防骨質疏鬆症之食品。



## 貳、文獻檢討

### 一、蛋殼

通常禽蛋可大略分為蛋殼、蛋白及蛋黃等三部分，而所占比例以雞蛋為例蛋殼約為 10-12%、蛋白 55-63%以及蛋黃 26-33% (George, J. M. and R. P. Carmen, 1984)。雞蛋之構造如圖 1-1 所示，從蛋的外殼來看，由外而內，為蛋殼、外及內蛋殼膜、蛋白、中央則為蛋黃。蛋殼上有許多細孔，一般稱之為氣孔或呼吸孔 (pore)。且蛋之胚經由此細孔來呼吸，而蛋內產生之二氧化碳亦由此排出 (張，1999)。通常蛋殼部的厚度為 250-370  $\mu\text{m}$ ，且蛋殼的厚度會隨著季節及雞隻營養而異 (張，1999)。

如圖 1-2 所示為蛋殼之構造，由海綿狀層 (spongy layer) (有機物的海綿狀間質 (matrix) 中為無機物) 以及乳頭層 (mamillary layer) (其由乳頭節 (mamillary knob) 及乳頭核 (mamillary core) 所構成) (張，1999)。而蛋殼主要成分為無機物 (inorganic matter) 約 95%，而其他組成成分，如碳酸鈣約 98.4%、碳酸鎂 0.8%、磷酸鈣 0.7%，如表 1-1 所示。蛋殼除無機物外，含 2-3%蛋白質，其他則為水分；然而蛋殼之有機物除了蛋白質以外還有多醣類 (張，1999)。

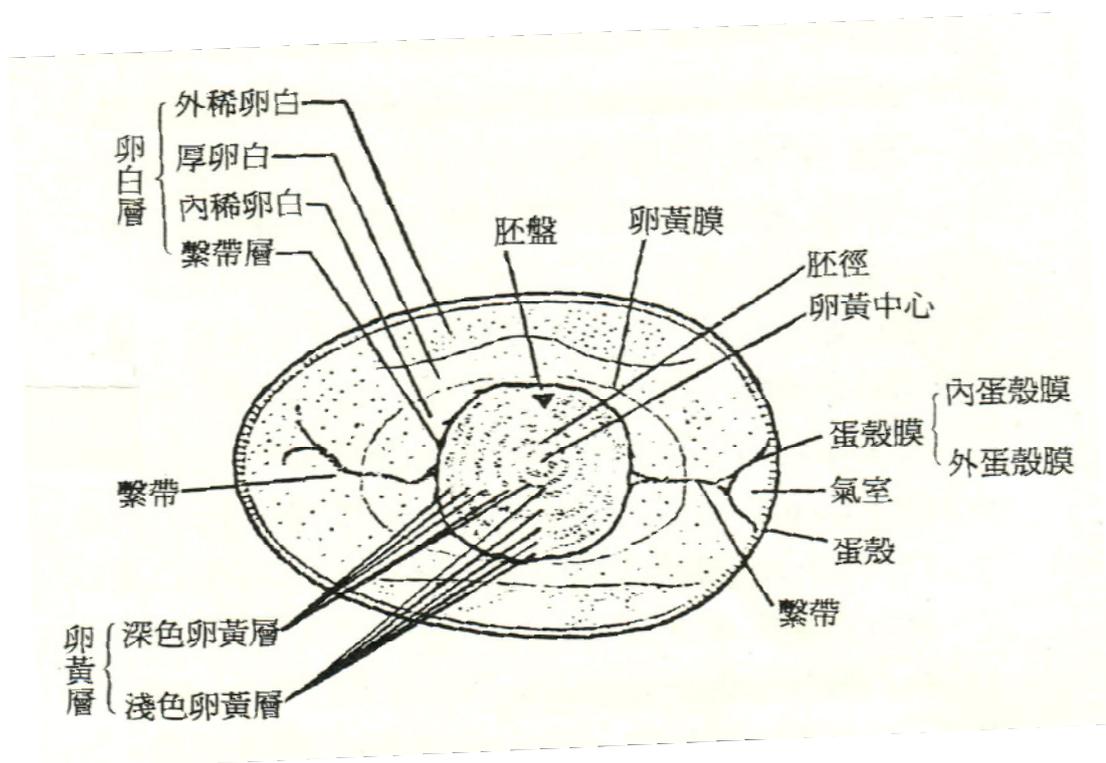
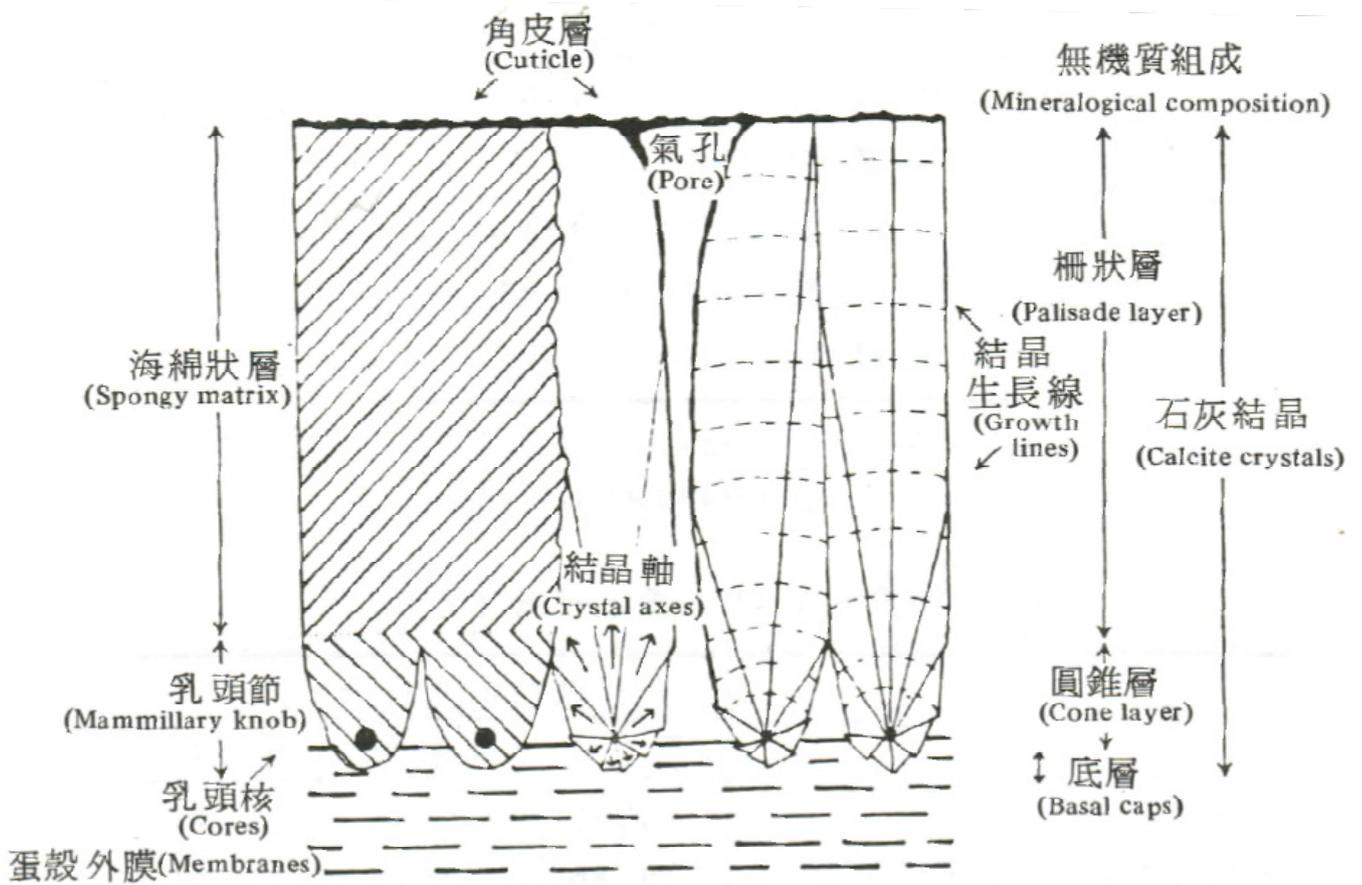


圖 1-1 雞蛋之構造。(張，1999)

Figure 1-1 The structure of hen egg.



(張，1999)

圖 1-2 蛋殼之構造。

Figure 1-2 The structure of eggshell.

表 1-1 雞蛋蛋殼之一般組成

Table 1-1 The general composition of eggshell.

成分	組成 (%)
水分	1.6
有機物	3.3
蛋白質	3.3
脂質	0.03
無機物	95.1

(張，1999)

表 1-2 雞蛋蛋殼各部分之有機物組成

Table 1-2 Organic chemical composition of each constituent layer of the eggshells hen.

成分	全有機物中之百分率 (%)		
	蛋殼	蛋殼膜	角皮層
全氮	15.01	15.54	15.94
己醯胺 (hexosamine) 態氮	0.46	0.11	0.24
其他氮	14.55	15.43	15.7
中性醣 (以半乳糖計)	3.57	1.97	2.87
醣醛酸	1.45	0	0
酯類	1.1	微量	0
己醯胺	5.83	1.45	3.06

(張，1999)

## 二、蛋殼膜

蛋殼膜分為兩層:蛋殼內膜與蛋殼外膜二層，即外殼膜 (outer shell membrane) 與內殼膜 (inner shell membrane)，內殼膜包圍蛋白，而外殼膜與蛋殼密黏合著。蛋殼內外膜合起來之厚度一般為 50-70  $\mu\text{m}$ 。通常蛋殼薄者其蛋殼膜較厚，以保護蛋白內容物。內外蛋殼膜皆在峽部形成。當卵進入峽部內，蛋殼膜即形成。而外蛋殼膜之形成則是因卵在峽部停留期間會復於內蛋殼膜上。且內外蛋殼膜皆由峽部所分泌之網狀角質蛋白質 (keratin) 組成 (林，2000)。

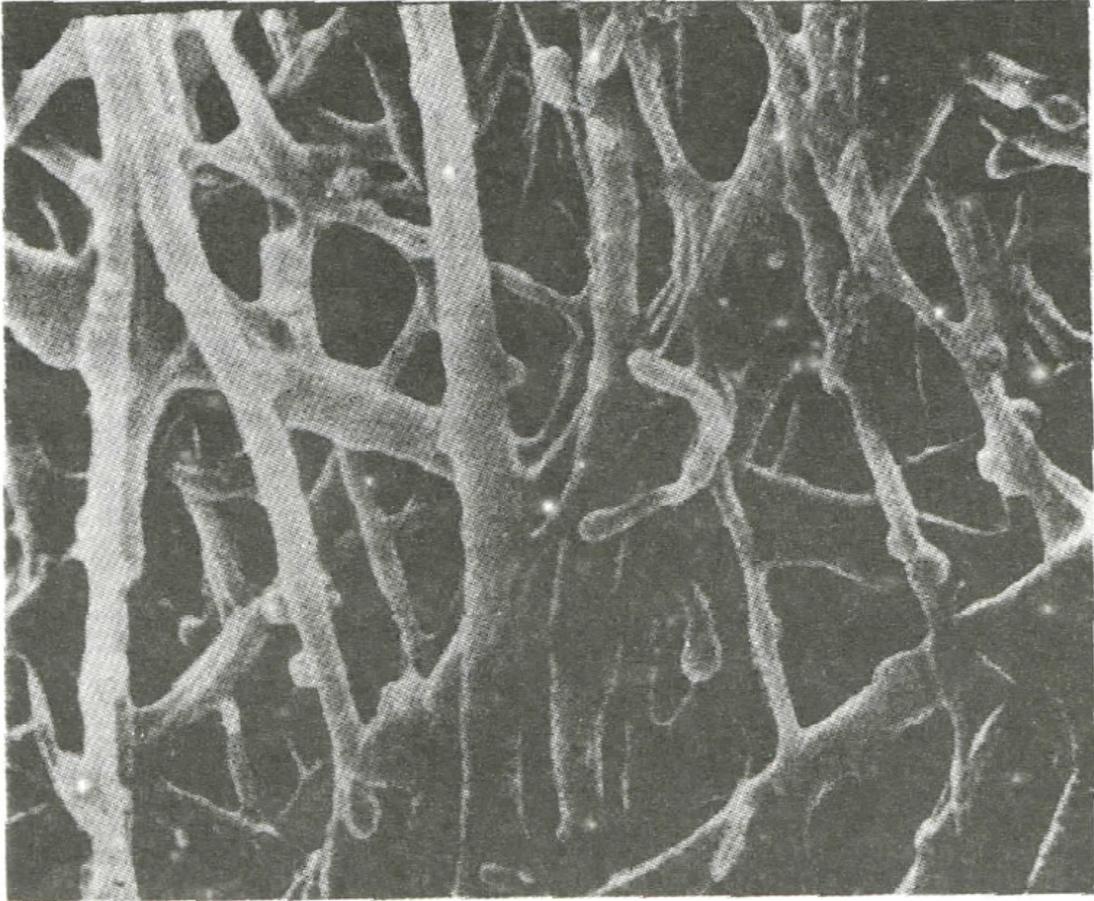
外蛋殼膜係由蛋殼之乳頭節嵌入且與乳頭核相接，其外殼膜厚度約 50  $\mu\text{m}$ ，內殼膜則約為 20-22 $\mu\text{m}$ 。而內殼膜構成纖維與外殼膜相似，係由三層重疊而成。且纖維間隙存在著薄葉層 (lammeller)，使其具有彈性且相互以纖維連接。其由蛋殼之乳頭節嵌入而與乳頭核相接。而內殼膜厚度則約為 20-22  $\mu\text{m}$ ，其構成纖維與外殼膜相似，皆由三層重疊而成，且纖維間隙存在薄葉層 (lammeller)，以使纖維相互連接以呈具有彈性之構造，內殼膜之電子顯微鏡像如圖 1-3 所示。蛋殼膜主要成分為蛋白質，約含 20%水分，70%蛋白質以及 10%灰分，而蛋殼膜之蛋白質主要成分又為角質素 (keratin)。蛋殼膜、角皮層以及蛋殼其三者之蛋白質，又以蛋殼膜中所含胺基酸較多，其為組胺酸 (histidine)、胱胺酸 (cystine)、脯胺酸 (proline) 等。

最早由 Baker and Balch (1962) 於實驗中發現，將雞蛋殼膜利用酸性溶液進行萃取，其粗萃取物中發現含有大量羥脯胺酸 (hydroxylysine)、羥基離胺酸 (hydroxylysine) 以及鎖鏈素 (desmosine)，其中鎖鏈素是一種特殊之胺基酸，為離胺酸之衍生物，只存在於纖維蛋白質-彈性蛋白質 (elastin) 中。因此 Baker and Balch (1962) 推測其蛋殼膜中之蛋白質可能含有類膠原蛋白 (collagen-like) 或類彈力蛋白 (elastin-like) 之存在。而 Haris 等人 (1980) 亦以酸性溶液萃取蛋殼膜，同樣在萃取物中含有大量羥基脯胺酸、羥基離胺酸、鎖鏈素及一些離胺酸之殘基。

Wong 等人於 1984 年，利用醋酸溶液溶解蛋殼膜，並額外添加胃蛋白酶

(pepsin) 切斷膠原蛋白之間之交叉鍵結，藉此提高萃取出膠原蛋白之溶解度且經電泳分析後，於萃取物中發現第一型及第五型膠原蛋白之存在。





(Nesheim *et al.*, 1979)

圖 1-3 內殼膜之電子顯微鏡圖。

Figure 1-3 The electron microscopy of eggshell membrane.

### 三、蛋黃

卵黃可區別為深色卵黃、淺色卵黃，如表 1-3 所示。但於加工時並不將此二者分開處理。又欲檢討卵黃組成或其性狀時，往往以此兩者混合物為實驗。蛋黃約含有 50% 固形物，而蛋白質、脂質、無機成分、碳水化合物各為 16、32、2 及 1%；其主要又為脂質與蛋白質，卵黃中蛋白質之大部分為磷蛋白質，其組成概括於表 1-4。其脂質與蛋白質之比例約為 2:1。脂質主要為三酸甘油酯、磷脂質以及膽固醇，其比例如表 1-5。新鮮蛋黃之 pH 約為 6.0，蛋黃有較多之蛋白質、灰分，而尤以脂肪含量特別多。蛋黃含有約 50% 之固形物，其組成如圖 1-4。卵黃之成分組成，亦如前述，依種種條件而變化。一般而言，卵黃之成分組成變異較卵白為小。但卵黃一般比卵白容易腐敗、變質，此乃成分中含有不安定之脂質及脂蛋白質之緣故 (林，2000)。

Kim 等人則於 2011 年，將蛋黃進行水解成可溶性蛋黃胜肽 (egg yolk water-soluble peptide)，簡稱 YPEP。而後將可溶性蛋黃胜肽稀釋成 250-1000  $\mu\text{g/mL}$  與 MC3T3-E1 細胞進行培養，觀察對細胞生長之影響；實驗以測定細胞增殖以及鹼性磷酸酶活性試驗來進行觀察。當骨母細胞逐漸成熟分化時，則會分泌鹼性磷酸酶，因此可利用其活性高低來判定其骨母細胞之生長。

結果發現在細胞增殖及鹼性磷酸酶活性實驗方面，濃度 250-1000  $\mu\text{g/mL}$  與對照組相比，皆隨著濃度的增加而有更佳的效果。其中就細胞增殖實驗，又以濃度 500 及 1000  $\mu\text{g/mL}$  與對照組相比，有顯著之差異；而在鹼性磷酸酶活性試驗部分，則以濃度 1000  $\mu\text{g/mL}$  與對照組相比較有顯著之差異。因此我們可以知道，蛋黃經由水解後，在適當的濃度下與類骨母型細胞進行培養，會刺激其細胞之增殖及生長。

表 1-3 深色及淺色卵黃之成分組成

Table 1-3 The composition of light and dark egg yolk

	種類	
	淺色卵黃	深色卵黃
水分 (%)	86.0	45.4
粗蛋白質 (%)	4.6	15.0
脂質 (%)	3.50	36.40

(林，2000)

表 1-4 卵黃蛋白質之組成

Table 1-4 The composition of egg yolk protein

項目	組成 (%)	分子量 (1,000)
lipovitellenin	30-31	340
lipovitellin	43-44	320
livetin	10	$\alpha$ : 42 $\beta$ : 80 $\gamma$ : 15-22
phosvitin	14-15	21-33

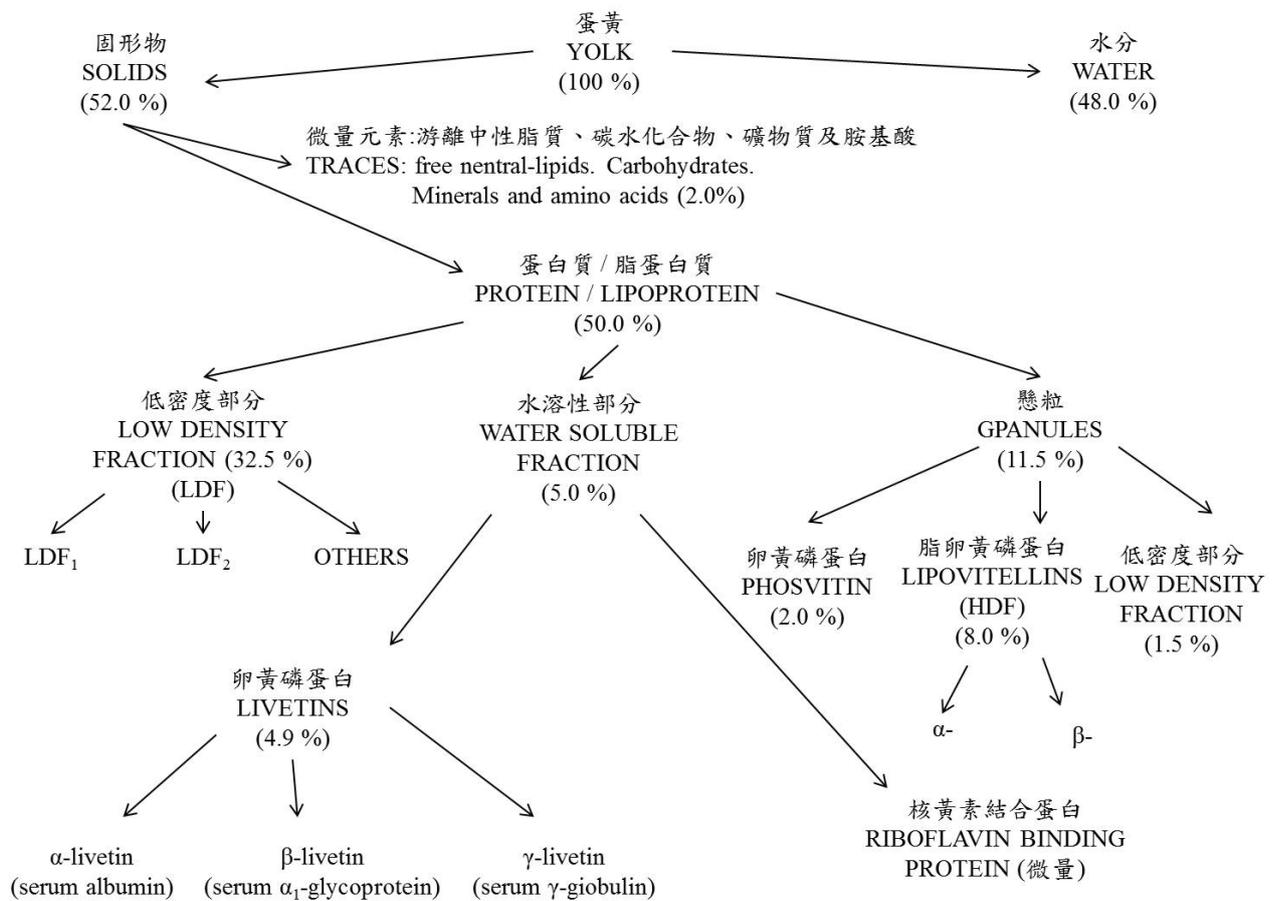
(林，2000)

表 1-5 蛋黃脂質之組成

Table1-5 The compositions of yolk lipid

脂質 (%)		磷脂質 (%)	
膽固醇酯	6	磷醯膽鹼	69
三酸甘油酯	71	神經磷脂	3
磷脂質	23	磷醯乙醇胺	24

(張，1999)



(林，2000)

圖 1-4 蛋黃成分之概要圖。

Figure 1-4 The schematic diagram of egg yolk composition.

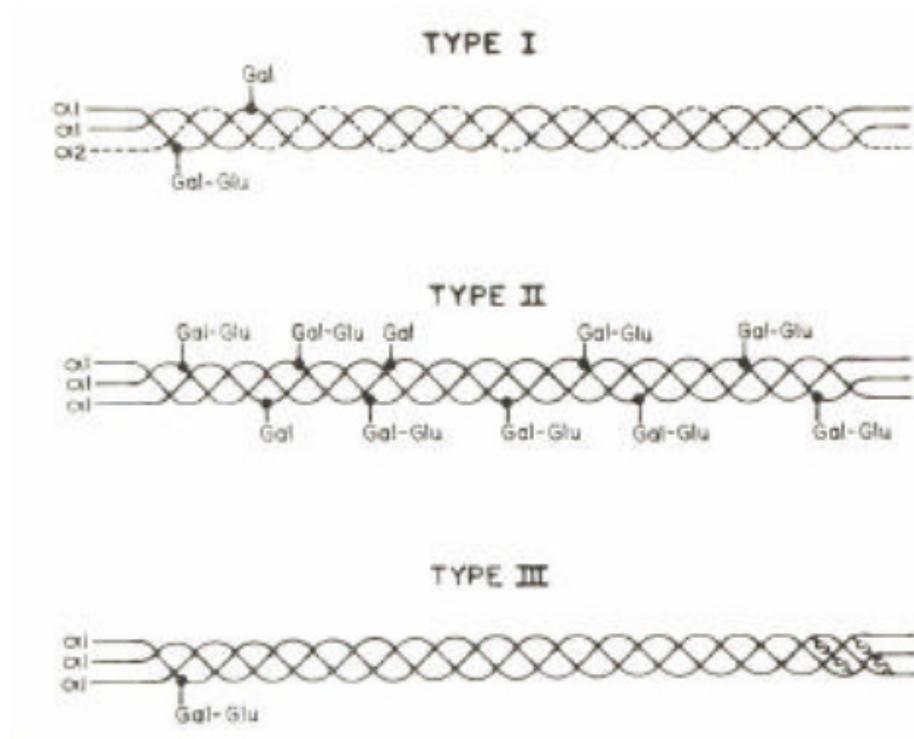
#### 四、膠原蛋白簡介

膠原蛋白之簡介膠原蛋白在人體與脊椎動物中，扮演重要角色亦是不可或缺的蛋白質，其分布於肌膚、肌肉及各類器官中。約佔人體總蛋白質含量的 25~33%，相當於人體重量的 6%。其為結締組織重要的蛋白質外，在動物結締組織 (Connective Tissue) 中亦為最主要之構造型纖維蛋白質。就人體及脊椎動物方面，主要功能為維持皮膚和組織器官的型態及結構，扮演整體支架的功能，用來提供組織張力藉以保護並連結各種組織，也是修復各種損傷組織的重要原料物質 (Angele *et al.*, 2004)。

此外，膠原蛋白屬於蛋白質類的生物性高分子聚合物，又稱作膠原質 (Collagen)，主要以不溶性纖維蛋白存在，由於此種特殊特性因此有許多生化功能，包括參與凝血反應、促進傷口癒合和組織修復、調控細胞與組織的生理功能 (Lee, Singla and Lee, 2001)。

膠原蛋白種類至少有 27 種，如表 1-6 所示。其結構由許多膠原纖維糾結纏繞而成，分子量為 283 kDa (283,000 daltons)。其最基本的單位為膠原分子，是由三條多胜肽鏈 (polypeptides) 所組成 (圖 1-5)，此三條多胜肽鏈彼此平行，並且鏈與鏈之間以氫鍵緊密的結合在一起，形成穩定的三股螺旋結構 (triple-helical structure)。由多個三股螺旋形成膠原蛋白分子，膠原蛋白分子在形成束形的膠原蛋白微纖維，在形成纖維束 (Werkmeister and Ramshaw, 2000)。並藉由分子內氫鍵形成左旋的  $\alpha$ -螺旋 ( $\alpha$ -helix)，又稱為  $\alpha$  鏈 ( $\alpha$ -chains)。而每條  $\alpha$  鏈又由重複的胺基酸單元 (Glycine-X-Y) 所構成，其中 X、Y 代表任何的胺基酸，但 X 通常代表脯胺酸 (proline)，Y 通常代表羥脯胺酸 (hydroxyproline) 如圖 1-6 所示。第 I、II、III、V 以及 IX 型膠原蛋白，會自我排組 (selfassemble) 成有週期性 (periodic) 的交纏纖維 (cross-striated fibrils)。

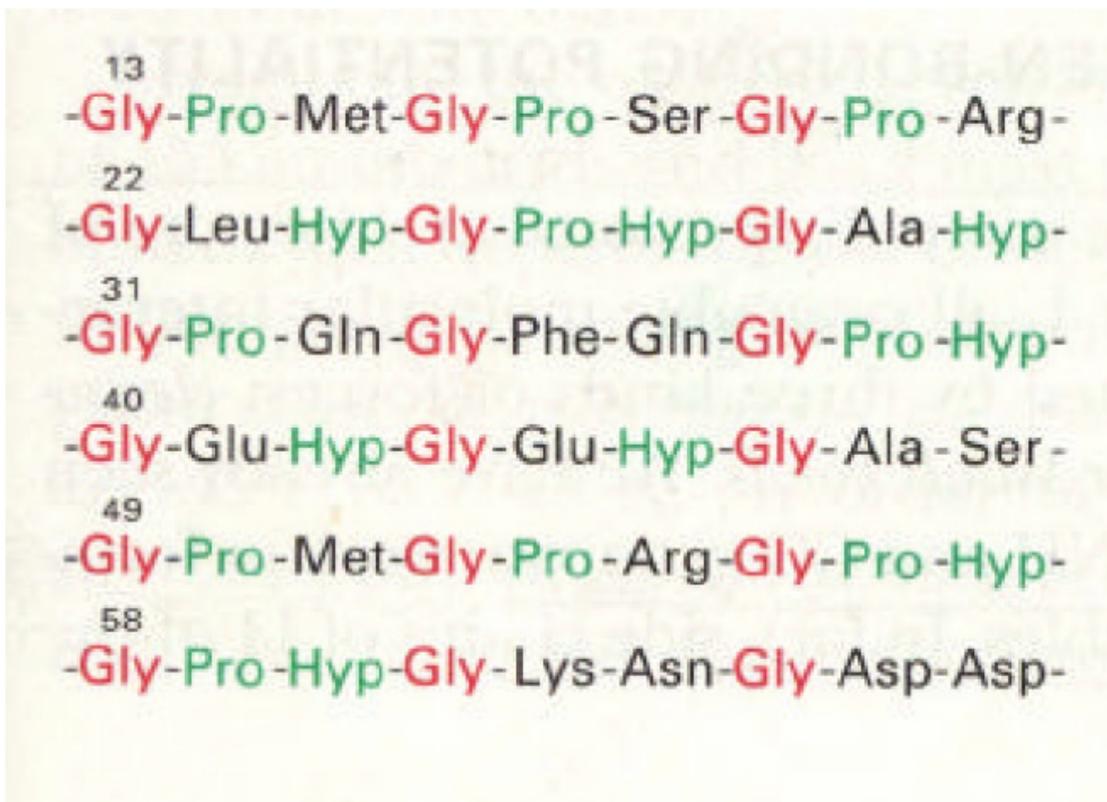
不同種類型的膠原蛋白來源與強度皆有差異。第一型之膠原蛋白含量最豐富，存在於多種結締組織中，其他膠原蛋白則呈組織特異性分佈 (圖 1-8)。



(Karl *et al.*, 1996)

圖 1-5 膠原蛋白之參股螺旋結構。

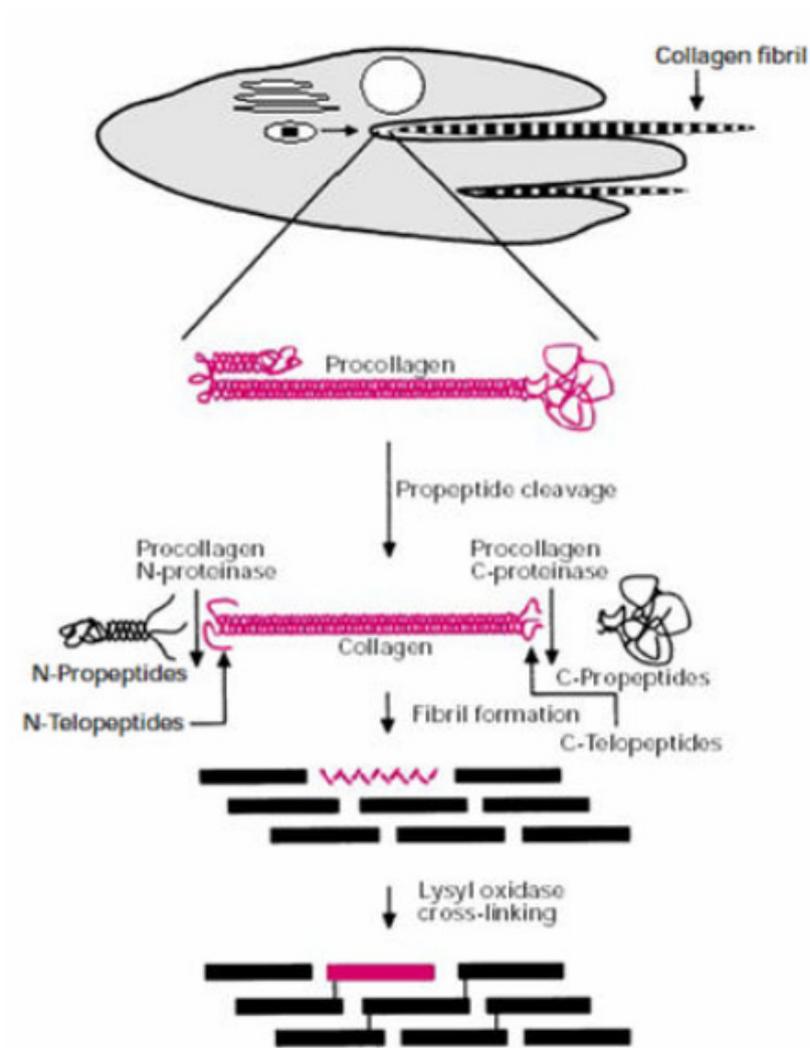
Figure 1-5 The triple helix structure of collagen.



(Karl *et al.*, 1996)

圖 1-6 膠原蛋白之特殊胺基酸序列示意圖。

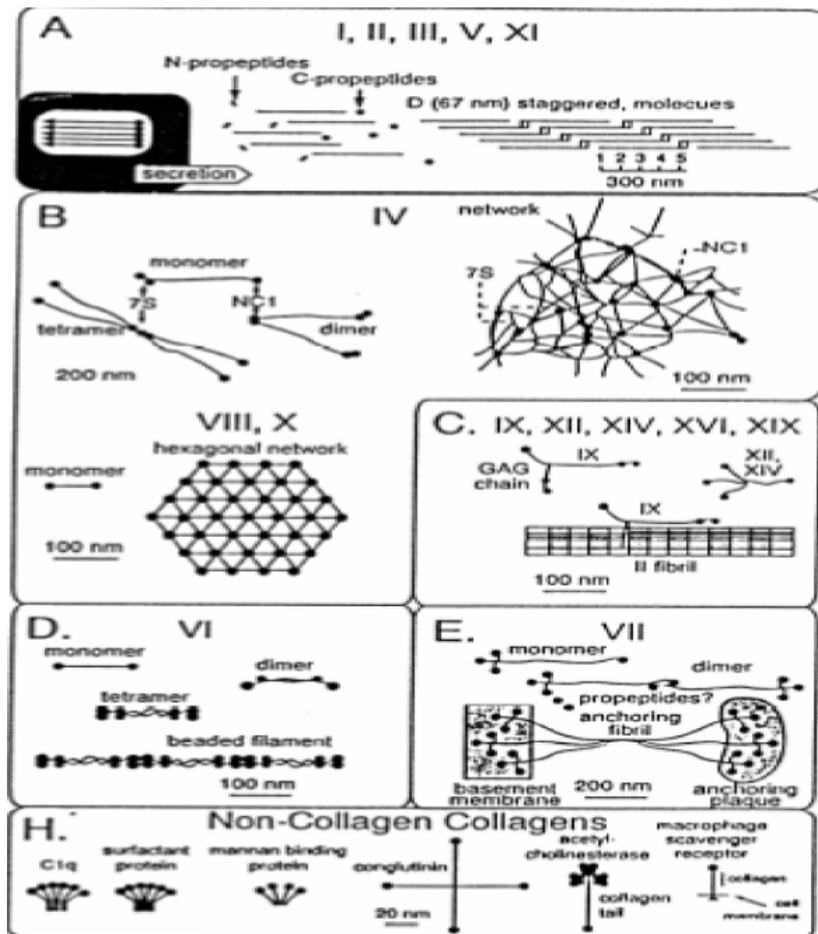
Figure 1-6 The amino acid sequence of collagen.



(Karl *et al.*, 1996)

圖 1-7 膠原蛋白單體之產生與交互連結。

Figure 1-7 Product of monomer and cross-link of collagen.



(Deyl and Mikšik, 2000)

圖 1-8 膠原蛋白型態分類。

Figure 1-8 The pattern classification of collagen.

表 1-6 膠原蛋白類型之組成及其在組織中之分佈

Table 1-6 The composition and distribution of collagen type in the organization

形式	各單鍵分子量	組織分佈
I	≐100 kDa	皮膚、骨骼、血管等多數結締組織
H-trimer	≐100 kDa	細胞培養、腫瘤
III	≐100 kDa	軟骨
IV	≐100 kDa	血管、皮膚、肉芽組織
V	≐175、185 kDa	細胞基底膜
VI		透明軟骨外之大部分細胞周圍組織
VII		子宮、胎盤與皮膚
VIII		表皮細胞基底膜
IX	≐180 kDa	主動脈血管細胞、角膜內細胞
X	≐69、85 kDa	軟骨、眼後房水
XI	≐59 kDa	肥厚組織、軟骨
XII		皮膚、筋、軟骨
XIII		表面組織、小腸黏膜
XIV		軟骨、皮膚、筋、胎盤
XV		纖維母細胞
XVI		立方羊膜表皮之下
XVII		大水疱性類疱疹

(洪，2004)

### (一)、 分布及來源

膠原蛋白主要是提供組織張力，連結以及保護各種組織，支撐人體的結構 (Guillerminet *et al.*, 2010)，存在於動物細胞以及各類組織中。同時，膠原蛋白是細胞外基質最重要的成分。人體膠原蛋白和動物膠原蛋白結構類似，因此可藉由生化科技的處理，可從牛、豬、魚等取得膠原蛋白。膠原蛋白依照溶解性又可分為原肽膠原蛋白 (procollagen)、酸溶性膠原蛋白 (ASC)、水溶性膠原蛋白 (PSC) 與變性後之膠原蛋白 (亦稱明膠)。原肽膠原蛋白、酸溶性膠原蛋白與水溶性膠原蛋白主要應用在醫療用生醫材料方面，如人工皮膚、止血劑、人工血管、以及護膚化妝品等，因此價位較高。而明膠不具三股螺旋結構，製造較為簡易，是一種由真皮或其他組織以酸、鹼、熱或酵素水解後的產物，分子量小，價位較低。

### (二)、 應用

膠原蛋白具有非抗原性、生物降解性、生物相容性、生物吸收性、不具毒性、與生物活性物質協同作用、止血、可轉化成不同形式、生物降解的可調性等優異的特性，使其在醫學上可廣為應用，且效果非常好，其中最主要的應用領域是生醫材料。以膠原蛋白作為傷口的敷料，可使血液凝固，具有止血功能，未來在此一方面的開發潛力無限。

這種傷口敷料，主要是基於膠原蛋白能夠與傷口緊密結合，併入新生組織當中，並作為細胞生長時的基質。研究顯示，膠原蛋白創傷覆蓋材，對傷口的治療具有下列優點:傷口較清潔、減緩細菌感染現象、減少傷口流膿、增加肉芽組織的形成、癒合的傷口不會產生收縮、協助壓力褥瘡傷口的癒合，不致產生免疫反應 (洪，2004)。

### (三)、 對人體之功能

#### 1. 使皮膚具保護、適當彈性

表皮的基底膜與真皮中的膠原蛋白緊密結合，而膠原蛋白在真皮中緊緊包住毛根皮脂腺及細胞，使基底膜得以與真皮緊密結合。皮膚老化後會失去彈性，主要也與膠原蛋白有關，隨年紀增加，膠原蛋白纖維開始變得細小，伴隨膠原蛋白存在的彈性蛋白之彈性也會減低，使原先真皮中膠原蛋白與彈性蛋白交互構成有規則的網目結構逐漸崩解，導致含水量減少及皺紋生成。坊間含膠原蛋白之保養品宣稱補充膠原蛋白能使皮膚保持年輕，道理即在於此。

#### 2. 骨骼堅硬具彈性，不致疏鬆脆弱

膠原蛋白能使鈣質與骨細胞結合不致流失，所以骨骼中膠原蛋白流失時會使骨中含鈣量降低。骨骼中膠原蛋白含量約占 20%，因為含有膠原蛋白，所以骨骼與牙齒在堅硬中同時還帶有彈性。

骨骼與肌肉能夠互相連接也是靠膠原蛋白，而此處的膠原蛋白特稱之為肌腱。骨與骨相連接部分，如膝蓋、關節等軟骨組織主要成分也是膠原蛋白，使得運動時筋骨可保持柔軟而具彈性。

#### 3. 使眼睛透光，眼角膜保持透明

眼角膜是眼睛重要結構之一，其中所含膠原蛋白纖維呈現規則排列，此種結構不但可讓光線透過，也因為此種膠原蛋白纖維特殊的排列方式，眼角膜呈現透明。

#### 4. 於肌肉細胞連結並具彈性與光澤

肌肉主要使由肌凝蛋白與肌動蛋白所構成，而細胞與細胞之間是利用膠原蛋白進行黏合。膠原蛋白分子所形成的立體骨架可使身體保持良好姿勢，並呈現適當柔軟度。

#### 5. 保護及強化內臟功能

人體主要的內臟器官及組織都含有膠原蛋白，在這些臟器表皮結構下方即是膠原蛋白，最大功能在於保護及強化臟器，例如胃或腸。

#### 6. 生物科技上應用與潛力

由於膠原蛋白具有下列特殊性質，因此能發揮多種生物功能，包括：

- (1) 組織與架構
- (2) 支持與保護
- (3) 生物力學特性-強韌性及延展性
- (4) 控制分子通透性
- (5) 促進傷口癒合與組織修復
- (6) 調節細胞與組織的生物功能



膠原蛋白生物高分子化合物目前用途很廣泛，遍及醫藥、化工、食品等相關領域。產品有各種不同形狀及用途，並依其形狀配合各項用途。其中生醫材料與藥品方面的應用則是近年來熱門研究的課題。

生醫材料廣泛的應用於所有醫療器材中，像注射針筒、血袋、引流插管及植入體 (implant)、人工臟器等。生醫材料必備的特性有：

- (1) 具生體機能
- (2) 無毒性
- (3) 可殺菌消毒性
- (4) 機械學性質
- (5) 生體不排斥性

但依使用目的，各種特性的重要性有很大的不同。其中膠原蛋白由於具有下列作為生醫材料之優點，所以成為研究與關注的焦點：

- (1) 止血
- (2) 低免疫性
- (3) 優良生體適合性
- (4) 適度分解速率
- (5) 供給修復原料
- (6) 調控生長因子與藥物釋放



膠原蛋白產品除了生醫相關之產品，也可作為化工材料、化妝品用途、食品工業及研究用途等。

## 五、骨質疏鬆症

### (一)、 骨質疏鬆症簡介

骨質疏鬆症 (osteoporosis) 為一種常見的全身性骨骼代謝異常的疾病，主要是因為在骨骼的代謝過程中骨形成作用與骨吸收作用之間不平衡所導致，使得骨質密度減少，組織型態參數降低，骨組織惡化和骨質中鈣質的流失 (姚跟吳，1994)，骨質結構因而佈滿了孔隙，骨小樑變單薄，呈現中空疏鬆的現象。若嚴重至某種程度時，骨小樑縮小且骨板變薄，骨骼的支撐力降低，所以骨骼容易碎裂，因此

很容易發生骨折 (張, 1998), 且未來屢換碎裂性骨折的機會將大大地增加。所以, 罹患骨質疏鬆症不但容易造成骨折, 更會引起各種併發症, 危害人類的生命健康, 且目前無法經由 X 光來做早期診斷以即早治療。隨著世界人口老化的增加, 未來骨質疏鬆症將更為普遍, 骨質疏鬆症所導致的骨折最常見的部位是肩部、脊椎、髖部及腕部, 其中約有 1/5 的患者會在一年內死亡, 而存活者其骨折後恢復情形往往不良, 造成需長期臥床調養, 形成病人與家人的沈重負擔 (林, 1995; 林, 1994; 林, 1993)。

骨骼是一種活組織, 會持續不斷的改變, 主要是透過造骨細胞之骨質生成作用與蝕骨細胞之骨質再吸收作用的骨質再塑 (bone remodeling) 機制以維持骨質代謝之恆定。骨骼中由膠質所構成的網狀組織, 以及分佈其中的骨髓、血管與細胞, 也會不斷地更新。人體在二十至三十歲時, 骨質密度會達到高峰, 但之後會卻逐漸流失 (Tortora, 1999)。而且隨著年齡的增長, 骨質流失的速度也越來越快。骨骼的空隙越來越大, 因此骨骼也會越來越脆弱 (Mundy, 1999)。

骨基質 (bone matrix) 與骨鹽 (bone mineral) 是骨最主要的兩種構成成分, 兩者在骨中具有一定的比例。當兩者之比例不變但量同時減少時, 即為廣義之骨質疏鬆症 (osteoporosis) 或骨質流失 (osteopenia) (Mundy, 1999)。

1993 年 Osteoporosis Consensus Development Conference 研討會將骨質疏鬆症定義為一系統性之骨骼疾病, 其特徵為骨密度降低及骨組織之顯微退化, 增加了骨質脆弱性及骨折之機會。1994 年世界衛生組織 (WHO) 的學者專家依骨密度及骨折情形, 對於骨質疏鬆症診斷標準訂定為: 體內任何一處骨骼之骨密度 (bone mineral density, BMD) 與正常年輕婦女之骨密度 (即顛峰骨質密度) 參考值相比。

女性在 30-35 歲時其骨量會達到峰值, 此後每年以 0.2-0.5% 的速度流失。停經後骨量更加速地流失, 每年約 2%-3%, 持續 10-15 年。世界衛生組織 (WHO) 對於骨質疏鬆症的分級方式 (Cameron *et al.*, 1963; Takahashi *et al.*, 1993; Huiying *et al.*, 1998) 如表 1-7:

1. 正常骨密度 (normal)：與正常年輕人平均值相比在 1 個標準差 (Standard Deviation, SD) 之內。
2. 骨質減少症 (low bone mass or osteopenia)：低於正常年輕人平均值 1 個標準差，但不超過 2.5 個標準差，即骨量不足 (osteopenia)。
3. 骨質疏鬆症 (osteoporosis)：低於正常年輕人平均值 2.5 個標準差，但不一定發生過骨折。
4. 嚴重骨質疏鬆症：有過骨質疏鬆症且合併一個部位以上之骨折，或稱為確定性骨質疏鬆症 (established osteoporosis)。

表 1-7 世界衛生組織 (WTO)對於骨質疏鬆症的分級方式

Table 1-7 World Health Organization (WTO) for the classification of osteoporosis

<b>Definition</b>	<b>Category</b>	<b>QUI/ Stiffness T-score</b>
Within 1SD of the young adult reference mean	Normal	$T > -1.0$
More than 1SD below young adult mean, but less than 2.5 SD below this value	Low Bone Mass (Osteopenia)	$-1.0 > T > -2.5$
2.5 SD or more below the young adult mean	Osteoporosis	$T < -2.5$
More than 2.5 SD below young adult mean in the presence of one or more fragility fractures	Severe Osteoporosis (established osteoporosis)	$T < -2.5$

骨折在骨質減少 (osteopenia, low bone density) 之臨床上為常見而嚴重之併發症，相似於高血壓與中風，高血脂症與心肌梗塞。骨質疏鬆本身雖非引起骨折唯一及必須因子，但無可否認扮演著十分重要之角色，而且其可以預防及治療的。臨床上引起骨折之原因，除了骨質低以外，尚加上創傷 (trauma) 才行。創傷之力量必須大於骨質之強度才會引起骨折，而骨骼之強度又與骨質密度有關。因此，較低之骨質密度在正常骨骼壓力下也可能出現骨折。但人體對跌倒創傷之保護作用也扮演相當重要之角色，例如老人家反應差，加上因老化導致男性激素之減少而使肌肉萎縮及失去協調力，加上視力不良及可能服用影響判斷及反應力之藥物，一旦跌倒，骨骼所受之壓力極大，因此，老年人較易發生骨折。骨質之密度高低，也是造成骨折之重要因素。

1987 年，Nordin 提出「骨折閾值」(Fracture threshold) 之觀念：骨質如果在正常年輕成人之平均值兩個標準差以下，則甚易產生骨折。1982 年 Riggs 亦發現如果骨質在閾值以上，骨質不易發生，1989 年 Huiying 提出如果骨質下降一個標準差，則其骨折之危險度上升 2 倍，由此可見骨質密度對骨折之影響甚鉅。而骨質密度是由兩個因素來決定：第一個為尖峰骨質 (peak bone mass) 之高低，另一個則是其骨質流失速度之快慢。人類骨骼密度隨著生長發育而增加，其尖峰約在 20-35 歲間並且受到遺傳基因之控制，因此有骨質疏鬆症之家族史者，也比正常人較易罹患骨質疏鬆症。此外如前所述，適度之負重運動，在骨骼之生長期是骨質增加之重要因素。其他如營養狀況，包括足夠之鈣質及養份，在骨骼之成長期中也扮演重要之角色，在骨骼重塑作用 (bone remodeling) 中之任何過程中如果受到干擾，將使骨吸收作用 (bone resorption) 大於骨形成作用 (bone formation) 而產生骨質流失。骨質流失之速率男女有異。由於老化使造骨細胞之功能下降，故骨質將因老化而每年下降 0.75%。這在男女並無差別，此種因老化而減少之骨質速度慢，稱為 slow loss；但在女性方面，一旦缺乏女性雌激素 (例如自然停經、早發性停經、手術切除卵巢、過量運動或嚴重壓力下所致之無月經症、神經性厭食症及高泌乳

激素症等) 均會使蝕骨細胞 (osteoclasts) 之活性大增進而增加骨吸收作用之深度，使骨小樑加速破孔並斷裂，斷裂後骨小樑更不易產生新生骨，故小樑之間分隔越遠，連結力越差，更不易承受壓力而產生骨折。這種缺乏雌激素所導致的骨質流失，速率甚快，每年約 3-6% 甚至更高，稱為 rapid bone loss。近年來發現蝕骨細胞與造骨細胞 (osteoblasts) 均含有雌激素之接受器  $E_2$ ，除了促進蝕骨細胞之活性外，尚可影響造骨細胞或其他單核細胞內細胞激素 (cytokines) 之分泌，例如使 TGF- $\beta$  上升，IL-1、IL-6 及 PGE<sub>2</sub> 下降。TGF- $\beta$  可抑制蝕骨細胞之召集及分化，而 IL-1、IL-6 及 PGE<sub>2</sub> 則促進其作用活性。此外， $E_2$  尚能促進副甲狀腺素 (PTH) 及骨鈣蛋白質 (osteocalcin) 之活性，故其對骨質密度之影響是相當複雜的，而其機制是為防止骨質之快速流失。

## (二)、 骨質疏鬆症之成因

目前骨質疏鬆症之病因尚未確立，推測與下列幾點有關：

### 1. 骨母細胞其功能減退

一旦骨骼中之舊組織代謝掉，就會長出新的，如此反覆的新陳代謝。隨著年齡之增加，約在二十五歲，其骨頭之代謝開始產生變化，此時骨母細胞之活動降低，而蝕骨細胞之活動增加，導致舊骨質依舊代謝，然而新骨質之生長機能卻開始降低，於是兩者間無法平衡，骨骼質量降低因而造成骨質疏鬆。

### 2. 鈣吸收不良

維生素 D 為人體吸收鈣質之重要媒介，控制消化道對鈣之吸收，隨著年紀增長，腎機能逐漸衰退，使維生素 D 活化能力變差，進而降低小腸對鈣之吸收 (Henry, 1995)。

### 3. 賀爾蒙之變化

因生理代償現象如維生素 D 代謝不良，而使鈣易吸收不良，進而造成副甲狀腺機能亢進欲增加消化道對鈣之吸收，但副甲狀腺素 (PTH) 亦可增加蝕骨細胞的

數目及活性，反而加速骨骼之分解，因而增高血鈣濃度，而引起骨骼代謝增加，造成骨質流失 (Henry, 1995)。

#### 4. 停經

因停經後，卵巢功能會明顯降低，使得雌激素亦明顯下降，而雌激素減少會使得副甲狀腺素敏感性增加，因而引起骨骼代謝增加，造成骨質流失。

#### 5. 運動

骨骼承受較大壓力如肌肉之拉力與重力如負重運動，會刺激骨母細胞 (osteoblast) 之活性增加造骨效率，故骨骼會較為堅硬。所以沒有適度的運動，骨質也會流失。

### 六、目前臨床預防與治療骨質疏鬆之方法

世界衛生組織曾宣稱骨質疏鬆症為僅次於心臟血管疾病之第二大難題。台灣目前老年人口之增加，骨質疏鬆症之預防與治療亦將成為一個重要之課題。目前臨床上預防與治療骨質疏鬆症有下列幾種方法：

#### (一) 鈣劑

鈣質之補充和攝取與骨質疏鬆有很大之關聯。過去一些研究顯示鈣質之補充與骨質密度之相關性。只單純使用鈣質，有些臨床試驗之研究發現，可預防停經後婦女之骨質流失，尤其對於日常生活鈣質攝取量低於 400 毫克的人。也有研究發現鈣質對皮質骨 (cortical bone) 之流失有減緩的作用，但對於骨小樑 (trabecular bone) 沒有效果。其副作用包括胃腸道的症狀；有的人會有高血鈣、高尿鈣之情形。對低鈣飲食者有效，若與動情素合併使用效果更好。通常一次補充鈣不宜超過 600 毫克，每日不超過 1.5 克，而且服用時不宜與含有植物酸之食物、可樂、菠菜、麥片與麵包等食用。不是每個人都適宜服用鈣劑，在使用前應先與醫生討論後再服用 (Weaver, 1998)。

#### (二) 賀爾蒙代替治療 (hormone replacement therapy ; HRT)

此為目前最常用之治療方式，對女性來說，在停經後由於動情激素之缺乏，導致骨質流失快速，賀爾蒙之補充可阻止骨質繼續流失。由於口服劑型會由肝臟代謝，有活動性肝臟疾病的人要小心；對於之前有子宮肌瘤、子宮內膜異位者，動情激素會刺激其復發；高血壓患者或吸菸者也有特別注意。服用後，短期副作用包括頭痛、煩悶、憂慮的情況（因為黃體素之因素），此外仍有子宮之婦女會有像月經週期般的出血。若長期服用，則會增加子宮內膜癌發生之危險性，不過配合黃體素的使用則可避免所增加之危險性。更年期之女性及卵巢切除之婦女，適當的補充雌激素，能有效地防治骨質疏鬆症，並可減少心血管疾病之發生。然而以肝疾、高血壓、高血脂、乳癌、子宮肌瘤、中風等患者，則不宜採用。一般之副作用包括噁心、嘔吐、腹脹、乳房腫痛、頭痛、頭暈與陰道出血等。使用 HRT 療法需按醫師指示服藥，定期回診追蹤，才能使醫師根據個人之需要及症狀，調整給藥方式與劑量，並對一些副作用與警訊做適切之處理 (Gallagher, 1999)。

### (三) 抑鈣素

抑鈣素可防止骨組織的吸收進而避免骨質流失，然而由於無法經由口服方式吸收，必須經由注射或鼻內噴劑之方式給予。現在的抑鈣素多由鮭魚提煉，其缺點是使用一段時間後人體內會產生抗體，而減低其效果。即使使用人類的抑鈣素，也會因受體的 down-regulation 而失去效用。或許給予抑鈣素必須嘗試間歇性給予，有關這方面仍需進一步之研究來證明其效果。其副作用為頭痛、頭暈、噁心及便秘等；若以鼻內方式給予則可能刺激鼻黏膜分泌、打噴嚏，此外並無其他嚴重之副作用。可於無法補充女性荷爾蒙者使用。其能抑制骨質之分解，並能達到止痛，目前有鮭魚和鰻魚抑鈣劑，由於價格昂貴，所以無法廣泛運用 (Louis, 1997)。

### (四) 活性維生素 D

維生素 D 實際上是一種賀爾蒙。可在接受充分的日曬後，為人體自行合成。人體內有去氫膽固醇 (dehydroxycholesterol)，其同時也是膽固醇的前驅物質。當皮膚受到紫外線照射，去氫膽固醇會轉換成前趨維生素 D<sub>3</sub> (previtamin D<sub>3</sub>)，此

物質對溫度很敏感，很快就會成維他命 D<sub>3</sub> (Vitamine D<sub>3</sub>)，又稱為 cholecalciferol。接下來經過循環進入肝臟和腎臟，代謝成具有活性維生素 D (1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>; 1 $\alpha$ ,25[OH<sub>2</sub>]D<sub>3</sub>)，或稱為 calcitriol。由食物或健康食品所補充維生素 D，從小腸吸收後，也會進入肝臟，走同樣的代謝路徑。一般而言，維生素 D 之天然食物來源不多，包含有某些魚類肝臟油脂及脂肪多之魚肉，以及雞蛋 (尤以維生素 D 強化之飼料餵飼之)，這也是大多數民眾缺乏維生素 D 原因之一；一些歐美國家也會採取食品中添加鈣或維生素 D 之方式，如營養穀片中添加 400 毫克鈣和 50 I.U.之維生素 D，以補充一般民眾之攝取不足 (Harold *et al.*, 2004)。Calcitriol 是目前功能最受了解之活化行維他命 D<sub>3</sub>，其功能主要是維持血中鈣質之穩定:有助於小腸吸收鈣質。一些疾病像肝病、腎臟病或藥物像類固醇都會影響其合成作用。一般促進維生素 D 之吸收、調節鈣磷平衡，可達到防治骨質疏鬆的效果 (Michael, 2004)。

#### (五) 雙磷酸鹽類藥物 (bisphosphate)

如 Etidronate 與 Alendronate 等，可抑制蝕骨細胞之活性，但對更年期之其他症狀並無改善之效果。由於 bisphosphate 同時具有抗骨質吸收及抗骨質礦化 (mineralization)的作用，所以須要間歇性的方式給予已獲得抗骨質吸收而避免抗骨質礦化的效果 (Angel *et al.*, 1997)。目前第二代的雙磷酸鹽類治療骨質疏鬆症藥物：福善美 FOSAMAX<sup>®</sup> (Alendronate sodium, MSD) 則可以持續給予，在日前已經由美國 FDA 核准上市 (Im *et al.*, 2004)。

## 七、骨細胞

### (一) 骨細胞簡介

骨細胞在醫學上的研究以骨母細胞與蝕骨細胞居多，此二細胞在生理上的作用，與許多生長因子或賀爾蒙息息相關。目前已知雌激素 (estrogen) 與 Vitamin D<sub>3</sub> 會促進骨母細胞的分化，使鈣質由血液轉移到骨頭的建構上，而副甲狀腺素

(Parathyroid hormone, PTH) 則是促進蝕骨細胞將鈣質由骨頭在吸收釋放回血液中，以維持血鈣平衡。而這些生長因子或賀爾蒙的接受器 (receptor) 分布在哪些細胞上，研究發現骨母細胞的細胞膜上有 estrogen receptor (ER) 及 Vitamin D<sub>3</sub> receptor (VDR) 會接收 estrogen 與 Vitamin D<sub>3</sub> 的刺激，將訊息傳導至細胞內，使細胞執行骨頭形成的相關步驟 (Gennari L *et al.*, 2002)。骨骼是一種特殊的結締組織，它以鈣化的網狀膠質作為人體的骨架。其中礦物質 (mineral) / 有機物 (organic) = 3/1，而礦物質的主要成份是磷酸鈣化合物 (hydroxyapatite ; HAP ;  $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ )，有機物則為膠原蛋白 (collagen)。骨骼中含有三種形式的細胞：骨母細胞 (osteoblast, O.B.)、蝕骨細胞 (osteoclast, O.C.)和成骨細胞 (osteocyte) (Huether and McCance., 2000 ; Sikavitsas *et al.*, 2001)。

O.B.是由骨生成 (osteogenic) 的間葉 (mesenchymal) 基 (stromal) 細胞演變而來 (Aubin *et al.*, 1995)，其主要的功能是形成骨骼和第 I 型膠原蛋白 (type I collagen)。O.B.能對 PTH 產生反應且在 1,25-dihydroxyvitamin D 的刺激下能產生骨鈣蛋白質 (osteocalcin)。

骨細胞具有調節骨質密度的作用，其中又以造骨細胞主宰骨質生成的調控最為重要。造骨細胞的分化及不受氧化傷害是骨質生成中很重要的步驟，一旦分化不足或受到傷害的細胞數目過多，骨質的生成與骨質密度 (bone mineral density)將會降低，對骨折後骨骼的再生重建或骨質疏鬆的病患是最不希望發生的事情。

在骨微環境中 (bone microenvironment)中，IL-1 可促進前驅蝕骨細胞分化，並活化成熟的蝕骨細胞，誘導造骨細胞分泌其他促進骨蝕作用的細胞激素，如 IL-6、IL-11、M-CSF 等等。IL-6 則為蝕骨作用調節因子，是與骨吸收作用相關之細胞激素。由巨噬細胞或單核細胞在 IL-1、TNF- $\alpha$  等誘導下產生的一種細胞激素，可促進蝕骨細胞成熟。有學者在停經期骨質疏鬆症婦女的細胞培養中，發現 IL-6 的含量比正常停經婦女多，認為可能是雌激素下降之關係，而造成 IL-6 含量增加，進

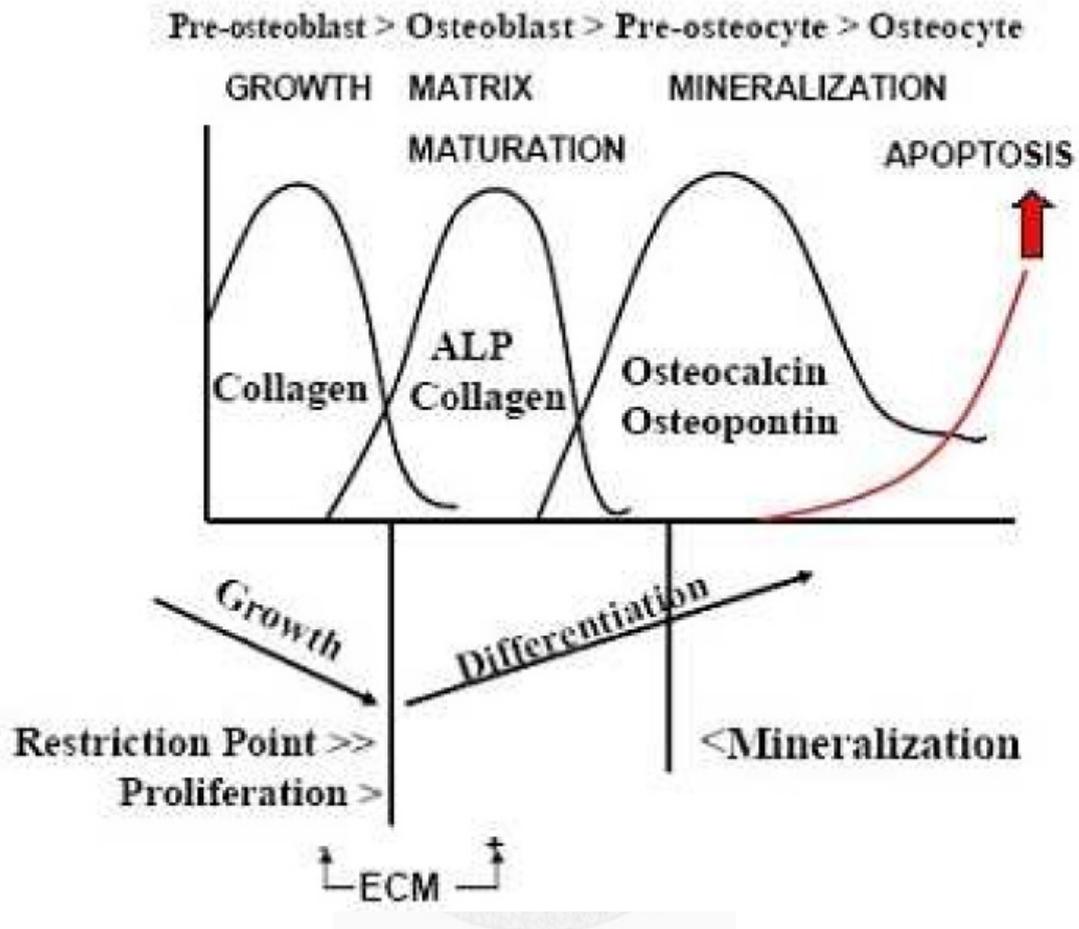
而促進骨蝕作用引起骨質疏鬆症 (Dai, 2000 ; Kimble *et al.*, 1995)。

骨骼是脊椎動物體的重要器官，它可以支持軟組織以使身體維持外型及直立，且藉由骨骼與肌肉相互間的合作得以執行運動，此外骨骼還有保護重要器官、儲存礦物質以及骨髓更可製造血液細胞等重要功能。骨骼組織不同於大多數的組織由緻密的細胞構成，而是由較大量的骨基質及較少數的骨細胞 (osteocyte) 構成，循一定的規則排列，細胞外包圍著骨基質，骨基質由有機基質 (organic matrix)，其礦物質構成。有機基質又分膠原蛋白 (collagen) 及非膠原蛋白 (non-collagen)，其中膠原蛋白佔有有機基質之 90%，膠原蛋白至目前所知大約有 27 種 (Liu *et al.*, 1995)。在骨組織中最主要的為第一型膠原蛋白 (type I collagen)，是由三條多肽鏈 (polypeptide) 緊緊繫結著而形成三股螺旋之立體結構。這是骨骼用來抵抗張力 (tensile force) 的主要成份，非膠原蛋白包括骨鈣蛋白質 (osteocalcin)、骨橋蛋白 (osteonectin)、骨鈣素 (osteopontin) 等其功能可能與骨質礦化 (mineralization) 有極大關係，目前有很多學者正努力在研究其功能 (Skjodt, 1992)。

骨骼中礦物質主要由鈣質和磷酸根離子以一定的比例形成氫氧基磷灰石 (hydroxyapatite)，其化學式為  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (Posner, 1987)。加上少量的鈉、鉀、鎂、碳酸根離子及微量金屬離子所形成。這些骨礦物質為存積在有機基質中，為骨骼抵抗壓縮力 (compressional force) 及剪力 (shear force) 的主要成份。

造骨細胞乃由間質幹細胞 (multipotent stromal stem cells) 或骨髓中間質細胞前驅物 (stromal cell precursors) 分化而成之細胞，這些細胞可分化為軟骨、脂肪、肌肉。造骨細胞之形成過程，如圖 1-9。

造骨細胞之特色為可分泌鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase ; ALP)，bone Gla protein (BGP)，大量的第一型膠原蛋白 (type I collagen)，及其他基質蛋白 (matrix proteins) (如 osteonectin, osteopontin) (張, 1998 ; 林, 1995 ; 林, 1994 ; 林, 1993 ; Yao, 1999)。



(Stein *et al.*, 1996)

圖 1-9 骨母細胞表型之發展 (in vitro development of osteoblast phenotype)。

Pre-osteoblast 為骨母細胞之前驅細胞，其主要負責細胞增生且會分泌膠原蛋白質，當前驅細胞逐漸成熟分化，生長速率逐漸下降便進入第二個時期骨髓成熟期，此時骨母細胞主要分泌鹼性磷酸酶與膠原蛋白；細胞分化之末期為礦化時期，骨母細胞開始逐漸礦化成為成骨細胞 (osteocyte)，分泌 osteocalcin 及 osteopontin 等髓質蛋白質，最後細胞老化，步入死亡 (apoptosis)。

## (二)、 骨母細胞 (osteoblast) 簡介

骨的細胞成分包括骨母細胞 (osteoblast)、骨細胞 (osteocyte)、破骨細胞 (osteoclast)。骨母細胞的來源為骨髓中基質細胞的前趨 (stromal cell precursors)，它在形在骨的早期，含有豐富的鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase)。在骨母細胞分泌骨基質 (Bone matrix)的過程中，自身被包埋在其陷窩 (lacunar) 之中而成為骨細胞。骨細胞除了參與骨合成外，也可能參與骨的吸收。破骨細胞來自單核巨噬細胞 (macrophage)，為一種多核巨細胞，含有豐富的酸性磷酸酶 (acid phosphatase ; ACP)、膠原蛋白酶 (collagenase) 和蛋白多醣酶 (proteoglycanase)等，具有吸收和鈣化軟骨的功能 (Zheng *et al.*, 1992)。

骨母細胞的特色是分泌鹼性磷酸酶、骨鈣蛋白質 (Osteocalcin)、大量的第 I 型膠原蛋白 (type I collagen) 及其他的基質蛋白 (matrix proteins)，如骨聯蛋白 (osteonectin)和骨橋蛋白 (osteopontin)。並且會受許多激素、生長因子的影響，如骨母細胞會受甲狀腺激素 (Parathyroid Hormone ; PTH)，像三碘甲狀腺原氨酸 (triiodothyronine ; T3)、甲狀腺素 (thyroxin ; T4)，前列腺素 E<sub>2</sub> (ProstaglandinE<sub>2</sub> ; PGE<sub>2</sub>)，轉化生長因子 (transforming growth factor-β; TGF-β) 及骨化三醇 (1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> ; 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) 等刺激 (Viguet-Carrin *et al.*, 2006)，例如當低劑量之甲狀腺激素時，會有效的促進骨母細胞活性，增加骨質，並可顯著增加骨質密度；而 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 會刺激骨頭吸收 (bone resorption)、抑制骨膠原蛋白合成和增進骨的形成 (bone formation) (Young, 2003)。

骨母細胞的胞漿 (cytoplasm)內，有豐富粗面內質網 (rough endoplasmic reticulum)和核糖體 (ribosomal)，前膠原蛋白 (procollagen)經高基氏體 (Golgi apparatus)加工後，釋出細胞外，進一步形成膠原纖維 (collagen fiber)，並且合成與分泌出蛋白多醣 (proteoglycans)。一旦有機骨基質形成，鈣化即開始，骨母細胞中有大量粒腺體 (mitochondrion)，其基質中含有豐富的鈣磷顆粒。骨母細胞富鹼性磷酸酶，具有焦磷酸酶 (pyrophosphatase)的活性，可以水解焦磷酸鹽

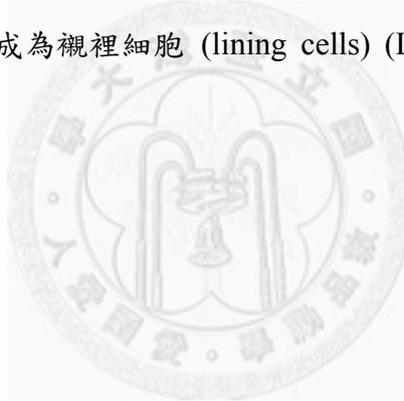
(pyrophosphate)，還可以水解磷酸酯，提高局部鈣和磷酸鹽的濃度，形成過飽和狀態，而促進鈣化過程。骨母細胞的大小、型態與其功能有關，在造骨細胞活躍時，骨母細胞成肥碩、呈立方或柱狀；當骨造骨時期停止時，則變為扁平或梭形 (Linkhant *et al.*, 1996)。在骨母細胞分化的晚期，培養細胞進入礦化期 (mineralization)，細胞內的鹼性磷酸酶活性會下降，而與細胞外基質中羥基磷灰石 (calcium hydroxyapatite ; HA) 沈積，並且相關的基因表現量達到高峰，如骨鈣蛋白質 (osteopontin)、骨鈣蛋白質 (osteocalcin) 及骨涎蛋白 (bone sialoprotein) 等基因。(McCabe *et al.*, 1996)。

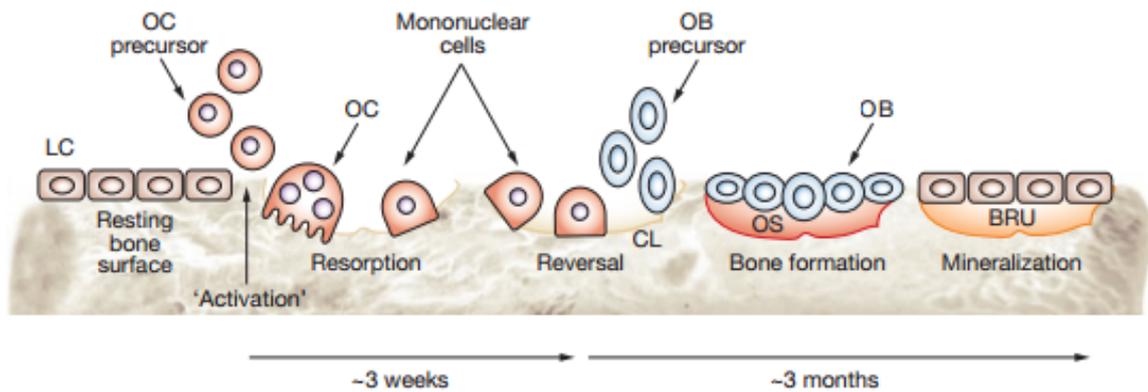
### (三)、骨重塑作用

人體之骨骼在形成後，骨骼仍會繼續進行吸收與生成作用，不斷更新、調整本身之需要，來應付環境之變化。所以正常人之骨骼會不斷地進行增生與修復，使成熟之骨骼維持在一動態之平衡下，由蝕骨與造骨細胞在骨小樑之表面與哈佛氏系統內不斷地進行破壞與修復的功能。因此，骨重塑之機制 (Bone remodeling) 即一連串由蝕骨與造骨細胞不斷地重複進行骨吸收與骨形成作用，骨重塑主要可分為五階段：活化、吸收、逆轉、形成與休止期，如圖 1-10。

1. 活化期 (activation phase)：在持續進行之骨重塑作用中第一個步驟即是蝕骨細胞之活化。在休止期之骨表面上，造骨細胞以扁平狀並排，當接受刺激後，造骨細胞便變形為立方體狀，細胞間即出現空隙，此時由骨髓中之血液幹細胞而來之前蝕骨細胞 (preosteoclast) 便分化而遊走至骨表面之空隙 (Baylink and Wergedal, 1971)。
2. 吸收期 (resorption phase)：蝕骨細胞活化後即會開始持續約 10 天之骨吸收作用。骨表面亦同時變形為刷狀緣 (ruffled border)，使前蝕骨在骨表面附著以後，前蝕骨細胞便分化成多核之蝕骨細胞 (osteoclast)。活化後之蝕骨細胞便開始在骨表面進行溶解、消化與吸收。

3. 逆轉期 (reversal phase): 當蝕骨細胞吸收至一定量後便開始分裂, 有可能分裂而形成單核蝕細胞 (MNP), 單核蝕細胞便會在骨之吸收表面清除骨破壞後之殘骸, 同時骨吸收面會合成一種膠著性填充劑之成分。
4. 形成期 (formation phase): 當骨吸收面被膠著性填充劑補填後, 單核蝕細胞便從骨表面離開, 之後造骨細胞會聚集在進行骨吸收作用之骨缺損並開始製造新生骨。此過程會持續約 3 個月之時間。在形成期之初期, 造骨細胞之前驅細胞藉由單向之遷移至骨缺損處, 開始進行細胞之增生, 並分化為成熟之造骨細胞 (Eriksen and Kassem, 1992)。
5. 休止期 (resting phase): 新生骨質內補充被吸收掉之骨量後, 骨表面便回到從前之休止狀態。造骨細胞一部分被埋進骨內, 成為骨細胞 (osteocyte), 其他之造骨細胞便扁平化成為襯裡細胞 (lining cells) (Lee, 1997 ; Ganong, 1997 ; Christenson, 1997)。





(Lee, 1997)

圖 1-10 骨質轉換之機制。

Fig 1-10 The sequence of bone remodeling in healthy individuals. Remodeling is initiated when osteoclasts are activated, resorb bone and create resorption cavities. Resorption is followed by osteoblast activation and formation of osteoid, which then fills in the resorption cavity. The active process is the target of pharmaceutical agents that affect bone resorption and formation. Abbreviations: BRU, bone remodeling unit ; CL, cement line ; LC, lining cells ; OB, osteoblast ; OC, osteoclast ; OS, osteoid.

#### (四)、 MG-63 細胞及類骨母細胞

當無法使用人體或動物進行試驗時，可另外選擇使用骨母細胞的培養來做骨質相關之研究。然而在 *in vitro* 的研究上，細胞要由活體組織取出做初代培養 (primary culture) 所需處理的步驟複雜，在培養上也不易生長，且如果未經轉型 (transformation) 為細胞株 (cell line)，也會在數次分裂後走向死亡，因此在此細胞培養部分，就以往的文獻中 (Manolagas *et al.*, 1981 ; Majeska and Rodan, 1982) 大多利用骨母型細胞 (osteoblast-like cells) 來做研究。骨母型細胞在過去的研究中發現，其相同外來刺激的表現，能和骨母細胞相同或相似之反應，且經轉型可以做續代培養，目前已有數株細胞用於取代骨母細胞來做實驗，如本實驗所用之 MG-63 cells，是由人類骨癌細胞 (osteosarcoma) 衍生出一種細胞 (Heremans *et al.*, 1978)，在前人研究中 (Franceschi *et al.*, 1985) 發現 MG-63 和骨母細胞一樣對  $1,25-(OH)_2D_3$  有高度的反應性。另外像老鼠的骨細胞 MC3T3-E1 及 ROS 17/2，也都是常用於實驗的骨母型 (Shing *et al.*, 2002)。在 Coelho 等人研究中發現細胞培養所用之培養基或其他培養基其組成份不同，對骨母型細胞之增生或分化具影響。在 Boyan 等人於研究中則發現， $1,25-(OH)_2D_3$  會提高 MG-63、MC3T3-E1 及 ROS 17/2 鹼性磷酸酶活性 (alkaline phosphatase, ALP) 之表現，亦促進此三種細胞之分化。

#### (五)、 研究細胞增生之方法

##### 1. 細胞計數

計算細胞為測量細胞生長最直接之方法，以細胞計數器 (Nucleo Counter) (Marienfeld, Germany) 來計算細胞數，方法為將細胞稀釋成  $2 \times 10^4$ ，取 30  $\mu$ L 之細胞與曲利苯蘭 (trypan-blue, Sigma) 以 1:1 比例混合，注入細胞計數器中，且在顯微鏡下觀察應紀錄細胞個數。由於死細胞會被曲利苯蘭染色成暗藍色，而活細胞則顯示亮圈狀，藉由觀察紀錄細胞計數器上之亮圈數目後，可換算以求得細胞之數目。此方法雖最直接，但費時費力，不適於用在大量實驗及快速檢測。

## 2. [3H] thymidine incorporation

DNA 主司細胞生理，是活細胞中必存在之物質，因此藉由計算 DNA 之數量亦可作為表示活細胞數的方法。由於 DNA 之結構中包含 adenosine、guanosine、thymidine 及 cytosine 四種 nucleoside，將以放射線 [3H] 標記之 thymidine 和細胞一起反應一段時間後，藉由測量細胞中 [3H] 的放射線量可間接推算出細胞之數目。雖 [3H] 具放射線且較昂貴，但此方法適用於大量實驗分析使用。

## 3. MTT assay

MTT ( 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide ) 是一種黃色水溶性染劑 (dye)，其結構如圖 1-11 所示，其會被活細胞中之粒腺體還原成藍色的 formazan (Berridge and Tan, 1993)。原理為利用 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide 黃色水溶性固體，可被細胞內粒腺體 (mitochondria) 中之去氫酶 (dehydrogenase) 代謝將 tetrazolium 切斷，還原產生紫色不溶性之沉澱物 formazan (2-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-formazan) 堆積在細胞中，如圖 1-12。再以 DMSO 溶解此結晶物質，以波長 570-620nm 之濾鏡偵測其吸光值。而 MTT 添加於細胞使其被粒腺體還原，因此藉由還原的 formazan 量可間接推算細胞數目，此方法可利用於細胞增生或細胞毒性之試驗來定量細胞數目，和用 [3H] thymidine incorporation 所作出結果相似，且無放射性之危險，因方便、快速又安全，因此為目前普遍用於測量細胞增生或毒殺試驗之方法。

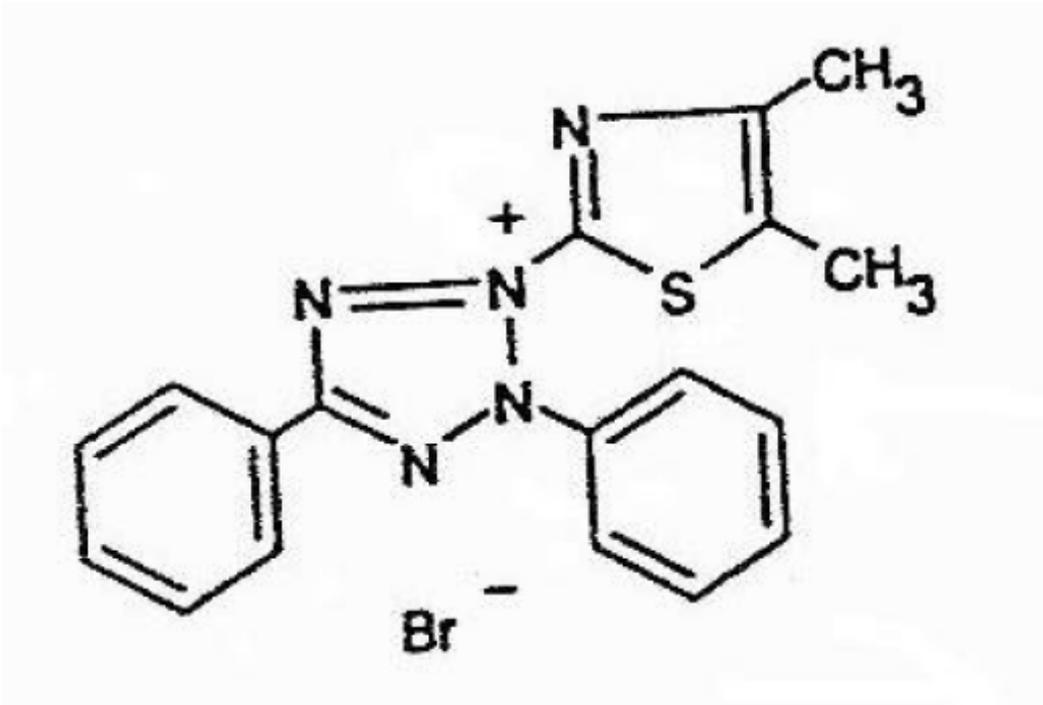


圖 1-11 MTT 之結構圖。

Figure 1-11 The structure of MTT.

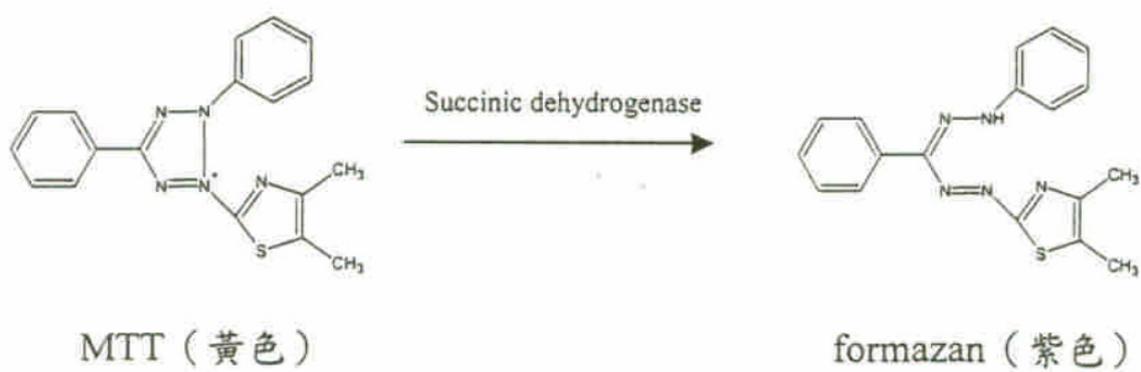


圖 1-12 存活細胞代謝產生 formazan 之反應。

Figure 1-12 The formazan reaction of surviving cells metabolized.

#### 4. Crystal violet assay

結晶紫 ( crystal violet ) 也是會被細胞代謝之物質，其原理與 MTT assay 相似，但其準確性比 MTT assay 或 [3H] thymidine incorporation 差，因此較少用來作為測量細胞數目之方法。

#### (六)、 研究骨細胞分化作用之方法

##### 1. Activity of alkaline phosphatase (ALP)

鹼性磷酸酵素 ( alkaline phosphatase , ALP ) 是骨細胞在分化時會大量表現之細胞酵素之一，可作為骨細胞分化初期之指標。測定鹼性磷酸酶活性多採 Bowers 及 McComb 所創之酵素動力學測定法(Bowers *et al.*, 1966)。由於鹼性磷酸酶會催化分解  $\rho$ -nitrophenyl phosphate 成為黃色之  $\rho$ -nitrophenol (圖 1-14)，可藉由分光光度計或酵素免疫分析自動判讀機讀取之吸光值來測定鹼性磷酸酶 (ALP) 之活性。此方法能快速檢測骨細胞分化程度，且花費較低，許多測量骨細胞分化之實驗多採用此法。

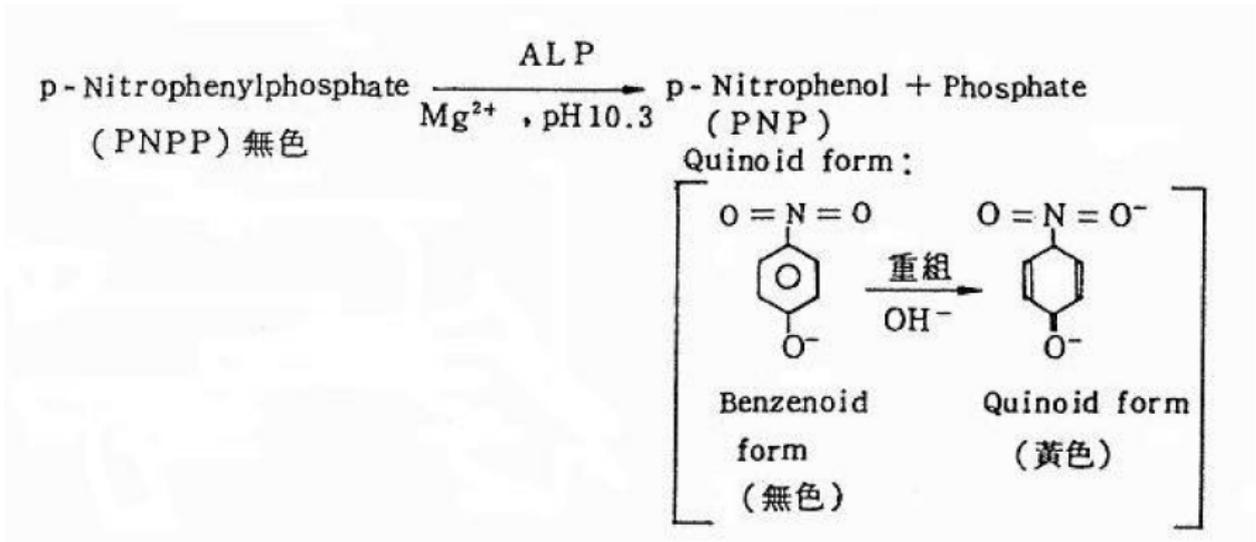


圖 1-13 鹼性磷酸酶之反應。

Figure 1-13 The reaction catalyzed by alkaline phosphatase.

## 2. 膠原蛋白之合成 (Collagen synthesis)

骨細胞在分化中期時會產生骨頭基質以利礦物質沈澱，建構骨頭基質之物質正是膠原蛋白 ( collagen )，因此膠原蛋白之合成量與骨細胞分化具有相關性。可藉由 [3H] 標定膠原蛋白中含量高的 proline，之後測定 [3H] 放射量來代表膠原蛋白之生成量 (Ganta *et al.*, 1997)，藉以表示分化之程度。

## 3. 骨礦化節點分析 (Calcium phosphate deposits (von Kossa assay))

磷酸鈣 ( calcium phosphate ) 在骨頭基質 ( bone matrix ) 沈積所造成的礦物質質化 ( mineralization ) 是骨頭分化的重要步驟之一，因此碳酸鈣的沈積量可作為骨細胞分化後期之指標。研究磷酸鈣之沈積目前多以 histochemical staining 來測量，其中以 von Kossa method 最為方便，其原理為用硝酸銀 ( silver nitrate ) 將細胞覆蓋並固定，給予紫外光 (UV light) 照射後，加入 sodium thiosulphate 將磷酸鈣沈積染成黑色，藉由染色顏色深淺測定分化之程度。此方法亦是簡單測量骨頭礦物質化之方法。

## 4. 骨鈣素之生成 (Osteocalcin production)

骨鈣蛋白質 (Osteocalcin) 為骨細胞在分化時大量製造之蛋白質，可經由放射性免疫分析法 ( radioimmunoassay ) 加以分析定量 (Boyan *et al.*, 1998)。由於骨鈣蛋白質 (osteocalcin) 很少由骨細胞以外的細胞製造，所以可作為分析骨細胞分化的良好指標。

## 5. 前列腺素之生成 (PGF<sub>2</sub> production)

PGF<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>) 為體內二十碳烯酸 ( eicosanoids ) 之一種，骨細胞在分化時會大量產生 PGE<sub>2</sub> 以作為細胞間訊息傳導之物質。可用酵素免疫分析法或放射性免疫分析法加以定量分析。

## 參、材料與方法

### 一、試驗設計

本試驗主要分成二部分，第一部分利用廢棄蛋殼分離出蛋殼膜，利用 0.5M 乙酸 (acetic acid, glacial, J.T. Baker<sup>®</sup>, Philipsburg, New Jersey) 及 1% 胃蛋白酶 (pepsin, Sigma, Saint, Louis, Missouri, USA) 萃取殼膜中之膠原蛋白，而後進行水解試驗；另取蛋黃粉進行水解試驗，對上述兩種水解物之胜肽含量進行測試。

第二部分則是將蛋殼膜膠原蛋白水解物、蛋黃粉水解物以及蛋殼粉與 MG-63 類骨母細胞 (Homo sapiens, MG-63 cells, 60279, Cell Lines Service, Hsinchu, Taiwan) 進行共培養，測其細胞增生 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide ; MTT assay)、細胞型態之觀察 (Morphological investigation)、鹼性磷酸酶活性 (alkaline phosphatase activity) 以及骨礦化節點分析 (Von Kossa assay)、茜素紅染色 (Alizarin red staining) 等試驗，並觀察水解物及蛋殼粉對細胞生長之影響。實驗架構如下圖 2-1 所示。

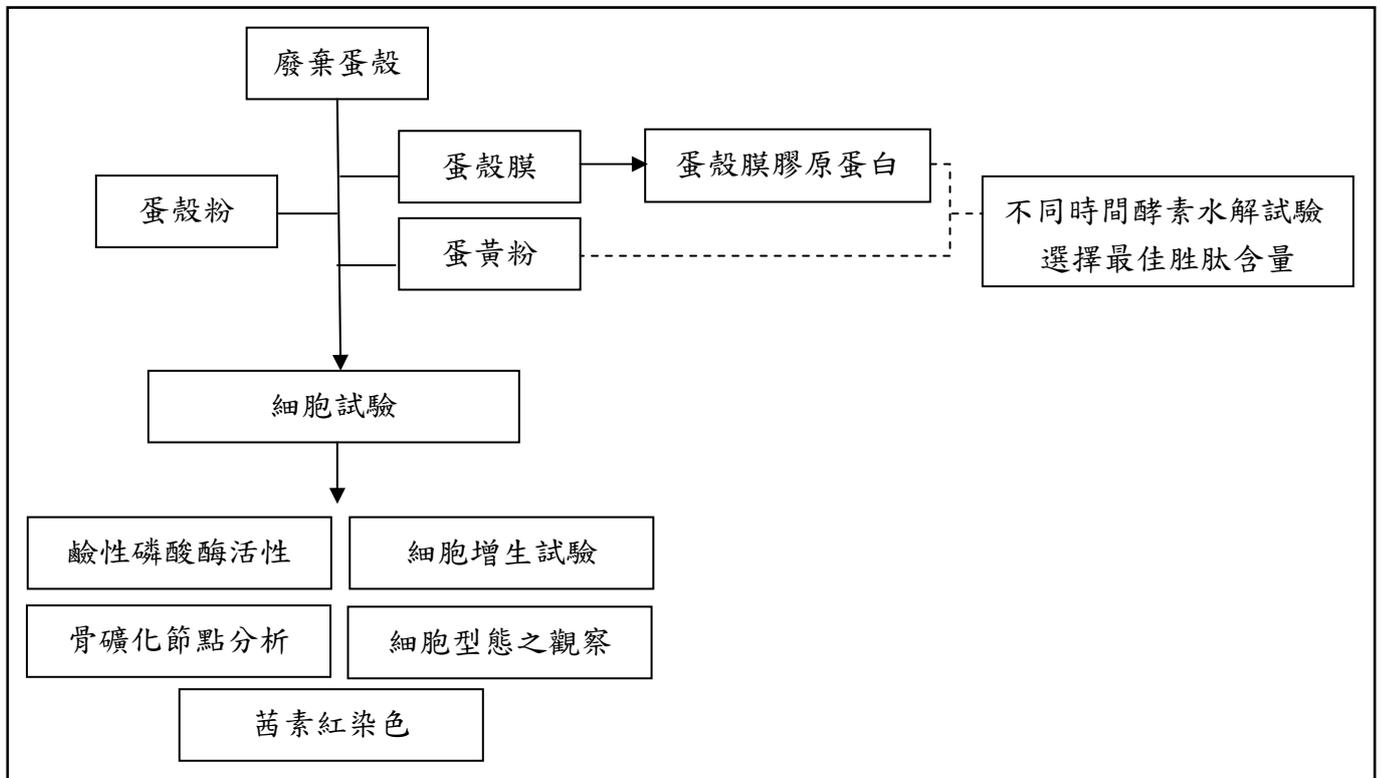


圖 2-1 實驗流程。

Figure 2-1 Experimental flowchart.

## 二、實驗材料及細胞株

### (一) 材料

1. 廢棄蛋殼：桃園乙同蛋品股份公司所提供 (Taoyuan, Taiwan)。
2. 蛋黃粉：勤憶蛋品科技公司所提供 (Chia Yi, Taiwan)。
3. 蛋殼粉：勤憶蛋品科技公司所提供 (Chia Yi, Taiwan)。

### (二) 細胞體外試驗 (*In vitro* test) 之細胞株 (MG-63 類骨母細胞)

MG-63 類骨母細胞：購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (Hsinchu, Taiwan)。

### 三、實驗方法

#### 第一節：雞蛋殼膜之膠原蛋白萃取及分析

##### (一)、實驗流程

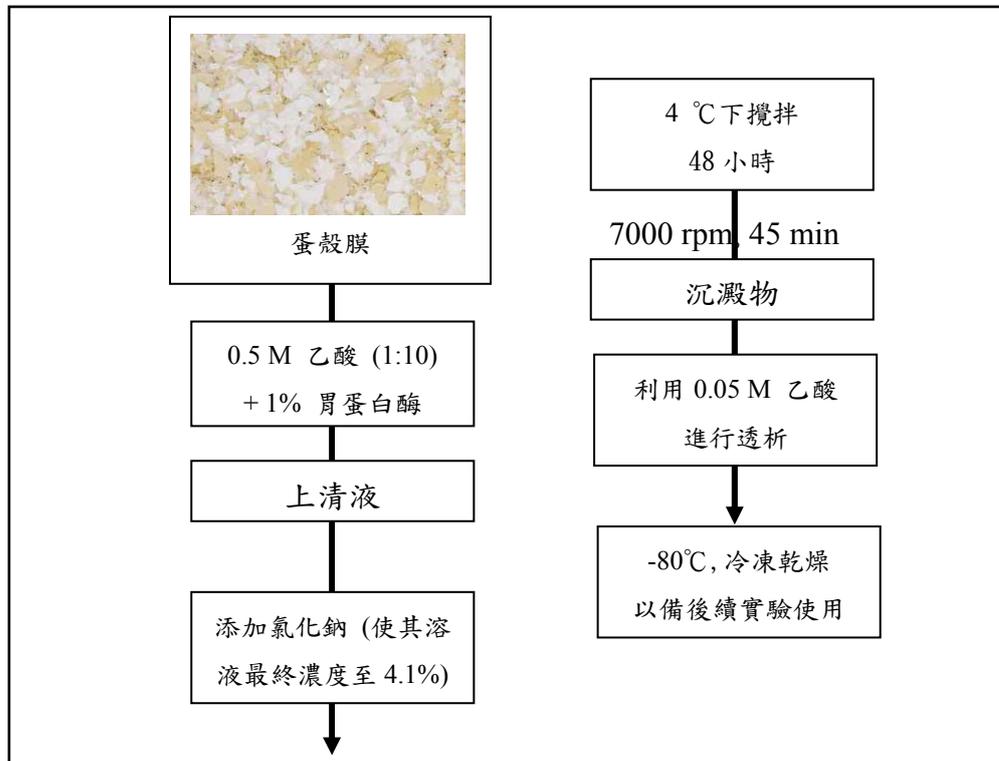


圖 2-2 實驗流程及膠原蛋白之萃取條件。

Figure 2-2 Flowchart of research scheme and the extraction of collagen condition.

##### (二)、蛋殼膜之分離

參考 Suguro 等人 (2000) 之方法如圖 2-2 所示，將廢棄蛋殼以均質機 (Cube & Slope Blenders, Oster, Boca Raton, Florida) 將廢棄蛋殼粉碎，加入蒸餾水清洗、攪拌，將攪拌中之混合溶液以篩網過濾水分，使其蛋殼與膜分離；而蛋殼碎片因比重較重故仍會留在燒杯中，比重較輕的蛋殼膜碎片會先被倒出，即可分離出蛋殼膜碎片。而後將蛋殼膜於-80°C 冰箱 (REVCO, Asheville, North. Carolina, USA) 一日，帶完全冰凍後，再經冷凍乾燥機 (Kingmech Co., Ltd., Taipei, Taiwan) 脫水，以備後續實驗使用。

### (三)、蛋殼膜膠原蛋白之萃取

參考 Wong 等人 (1984) 之方法，將分離好之蛋殼膜溶於 (w/v 1:10) 0.5M 乙酸，而後加入 1% (w/v) 胃蛋白酶，於 4°C 冰箱 (Marupin CR-520, Taipei, Taiwan) 下攪拌 48 小時。將上述混合溶液以超高速離心機 (High speed refrigerated centrifuge, Kubota KR-20000T, Osaka, Japan) 4°C，7500 rpm 轉速下離心 45 分鐘後，收集上清液，再緩慢加入氯化鈉 (sodium chloride, Riedel-deHaën, Seelze, Germany) 使溶液中之氯化鈉濃度達 4.1%，並於 4°C 下攪拌 12 小時，使其溶液中之膠原蛋白鹽析 (salting out) 出來。將攪拌好之混合溶液再以超高速離心機於 4°C，7000 rpm 轉速下離心 40 分鐘，其沉澱物即為此實驗所萃取出之蛋殼膜膠原蛋白。而後利用 0.5 M 乙酸將此沉澱物回溶，將其覆溶物裝於透析袋中，以 0.05 M 乙酸作為透析液進行 48 小時透析 (每 24 小時換一次透析液)，最後將透析後之樣品冷凍乾燥即可得到蛋殼膜膠原蛋白粗萃取物，以備後續實驗使用。



## 第二節 蛋殼膜膠原蛋白水解物及蛋黃水解物之製備及分析

### (一) 蛋殼膜膠原蛋白之水解

本實驗探討 1% 之胃蛋白酶、pH2、水解溫度 (37 °C) 以及水解時間 (0、2、4、6、8、10 小時) 等水解條件對蛋殼膜膠原蛋白找其最佳水解條件。參考 Kim 等人 (2001) 之方法，取膠原蛋白粗萃取物 1 g，溶於 10 mL 去離子水 (1:10)，用酸鹼測定儀 (LonLab pH Level 1, WTW, Weilheim, Germany) 並以 0.1 N 鹽酸溶液或氫氧化鈉溶液調整其 pH 值，而後添加 1% 胃蛋白酶 (w/w)，置於恆溫水浴槽於 37°C 下進行水解反應 (0-10 小時)，最後以 90 °C 加熱 20 分鐘以終止水解反應，而後以濾紙 (Adventec NO1.) 利用真空抽氣過濾器 (S101, Firstek, Taipei, Taiwan) 進行過濾，於 -80°C 冰箱下冷凍一日後，進行冷凍乾燥，於 4°C 冰箱保存，以備後續實驗使用。

### (二) 蛋黃粉之水解

本實驗利用 2 種不同水解酵素胰蛋白酶 (trypsin, Sigma) 及胃蛋白酶工蛋黃粉水解。首先取 1% 之胰蛋白酶於 pH8、水解溫度 (37 °C) 以及水解時間 (0、2、4、6、8、10 小時) 之水解條件下對蛋黃粉進行水解；另一方面則取 1% 胃蛋白酶於 pH2、水解溫度 (37 °C) 以及水解時間 (0、2、4、6、8、10 小時) 之水解條件下對蛋黃粉進行水解，各別找其最佳水解條件。首先取市售蛋黃粉 1 g，溶於 100 mL 之去離子水 (1:100)，並以 0.1 N 鹽酸溶液或氫氧化鈉溶液調整 pH 值，而後各別添加 1% 酵素 (w/w)，置於恆溫水浴槽 37 °C 下進行水解反應 (0-10 小時)，之後以 90 °C 加熱 20 分鐘以終止水解反應，而後以濾紙 (Adventec NO1.) 利用真空抽氣過濾器進行過濾，於 -80°C 冰箱下冷凍一日後，進行冷凍乾燥，於 4°C 冰箱保存，以備後續實驗使用。

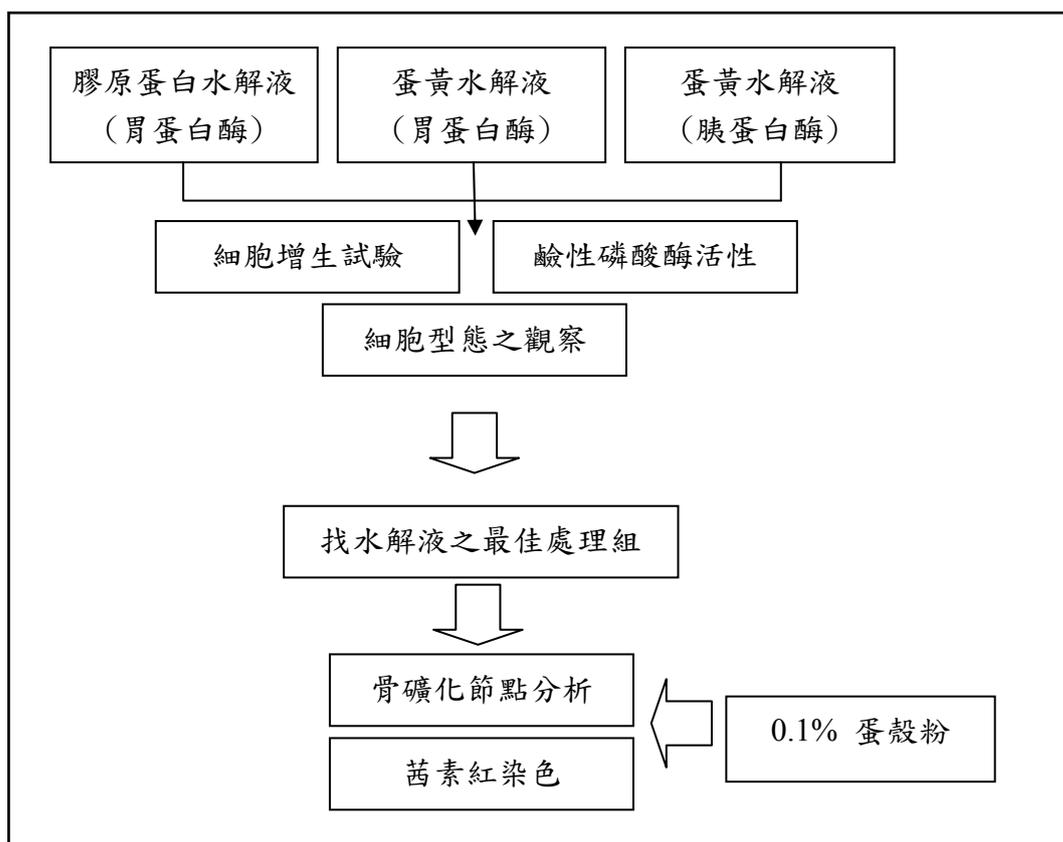
### (三) 胨肽濃度測定

參考 Church 等人 (1983) 之方法，利用鄰苯二甲醛 (o-phthaldialdehyde, OPA) 試劑測定水解液之胜肽含量，且以 99% 之甘胺酸-白胺酸 (Glycine-Leucine, Sigma) 作為標準曲線，以換算酵素水解液中胜肽含量，其標準品單位為 mg/mL。取鄰苯二甲醛 (o-phthaldialdehyde, sigma) 40 mg 溶於甲醇 1 mL 中，加入 100 mM 四硼酸鈉溶液 (sodium tetraborate, Sigma) 25 mL、20% 十二基硫酸鈉 (sodium dodecyl sulfate; SDS, Sigma) 2.5 mL 以及乙基硫醇 ( $\beta$ -mercaptoethanol, Sigma) 100 $\mu$ L，混合後定量至 50 mL 即為 OPA 試劑，需每次實驗現配現用。取 20  $\mu$ L 水解液樣本加入 OPA 試劑 1.5 mL 反應 2 分鐘後，立即以分光光度計測定波長 340 nm 之吸光值。



第三節 蛋殼膜膠原蛋白水解物、蛋黃水解液和蛋殼粉與 MG-63 類骨母細胞共培養之功能性評估

(一) 實驗流程



(Michaelsen *et al.*, 1994)

圖 2-3 實驗流程及細胞體外試驗之流程。

Figure 2-3 Flowchart of the research scheme of the *in vitro* test.

當無法進行人體或動物試驗時，可利用造骨細胞培養來進行骨質方面之研究，作為初步之評估。然而在 *in vitro* 研究上，細胞由活體組織取出作初代培養 (primary culture) 所需處理的步驟複雜，在培養上也不易生長，且如果未經轉型 (transformation) 為細胞株 (cell line)，亦會在數次分裂後走向死亡；因此在細胞培養部分，就以往文獻中 (Manlagas *et al.*, 1981 ; Majeska, 1982) 大多利用造骨型細

胞 (osteoblast-like cells) 來做研究。造骨型細胞在過去研究中發現，對相同外來刺激的表現，和初代培養之細胞有相同反應，且經轉型後可做續代培養，目前已有數株細胞用於取代初代培養之造骨細胞來做實驗，如本實驗所用之 MG-63 是由人類骨癌細胞 (osteosarcome) 衍生出的另一種細胞，在前人研究中發現 MG-63 類骨母細胞與造骨細胞對活性型維生素 D3 一樣有高度反應性，亦會提高分泌鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 之表現，亦能促進細胞之分化 (Boyan *et al.*, 1989)，其 MC3T3-E1 與 ROS 17/2 也都是常用於實驗之造骨細胞細胞株。先前許多學者已紛紛確立此細胞之造骨功能及活性，因此利用 MG-63 細胞株來探討從蛋殼膜水解液、蛋黃粉水解液及蛋殼粉對造骨細胞活性之影響，在實驗數據及研究結果上具參考價值，其流程如圖 2-3 所示。

#### (一) 細胞培養

由食品工業發展研究所取得冷凍之 MG-63 細胞，將細胞於恆溫水浴槽 37°C 下快速解凍，將細胞培養於 Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Gibco<sup>®</sup>, Mexico, USA)，並添加 10% 熱失活胎牛血清 (fetal bovine serum ; FBS, Gibco<sup>®</sup>) 與 2 mM 左旋麩醯胺酸 (L-glutamine, Gibco<sup>®</sup>)、1.5 g/L 碳酸氫鈉 (sodium bicarbonate, Caissonlabs, Utah, USA) 以及 1.0 mM 丙酮酸鈉 (sodium pyruvate, Caissonlabs)，置於 5% CO<sub>2</sub> 之二氧化碳培養箱 (Revco, Santa Fe Springs, California, USA) 以 37°C 進行培養。細胞解凍後隔天需移除培養基，並以 5 mL phosphate buffered saline (PBS, Gibco<sup>®</sup>) 反覆清洗兩次以去除抗凍劑 (dimethyl sulfoxide ; DMSO, Gibco<sup>®</sup>) 及死亡細胞，再加入新的培養液，細胞剛解凍後生長情形如圖 2-4。

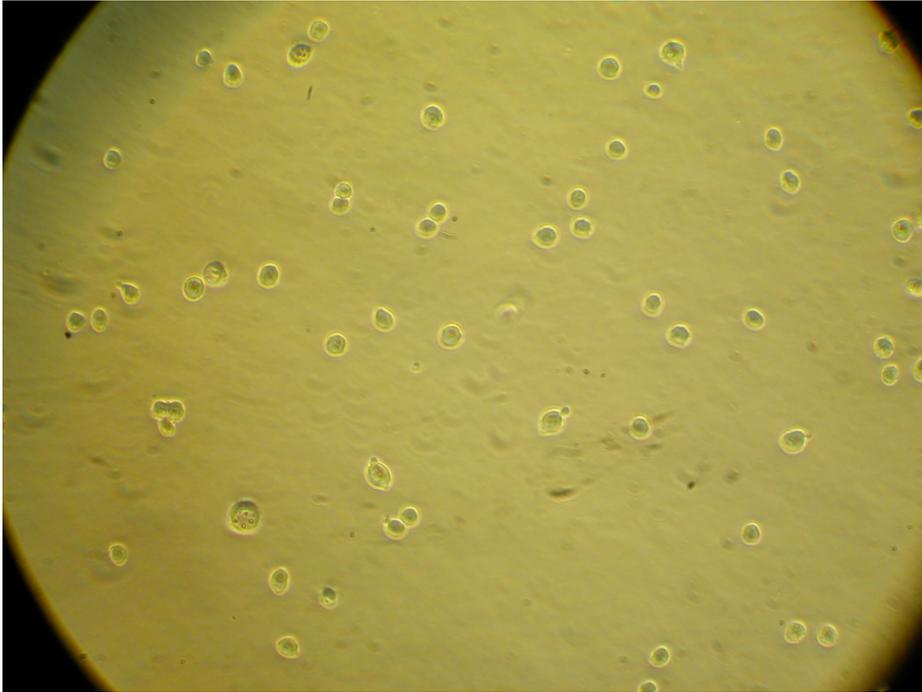


圖 2-4 MG-63 細胞生長情況 (100 X)。

Figure 2-4 The MG-63 cell growth conditions (100X).

## (二) 繼代培養

當細胞在細胞培養盤長至 80-90% 滿盤時，如圖 2-5 所示，細胞即須進行繼代培養。加入 5 mL PBS 反覆清洗兩次，以洗去死亡細胞之碎片，加入 1 mL 體積之 ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA, Sigma) 溶液。將細胞培養盤置於 37°C、CO<sub>2</sub> 培養箱中 5 分鐘後，拿出培養箱用手輕拍，使細胞與盤底脫離；再加入 3 mL MEM 培養液混合，去除 trypsin-EDTA 對細胞之作用，用移液管多次沖散混合均勻，取原液 1/3 量種入新的細胞培養盤中。



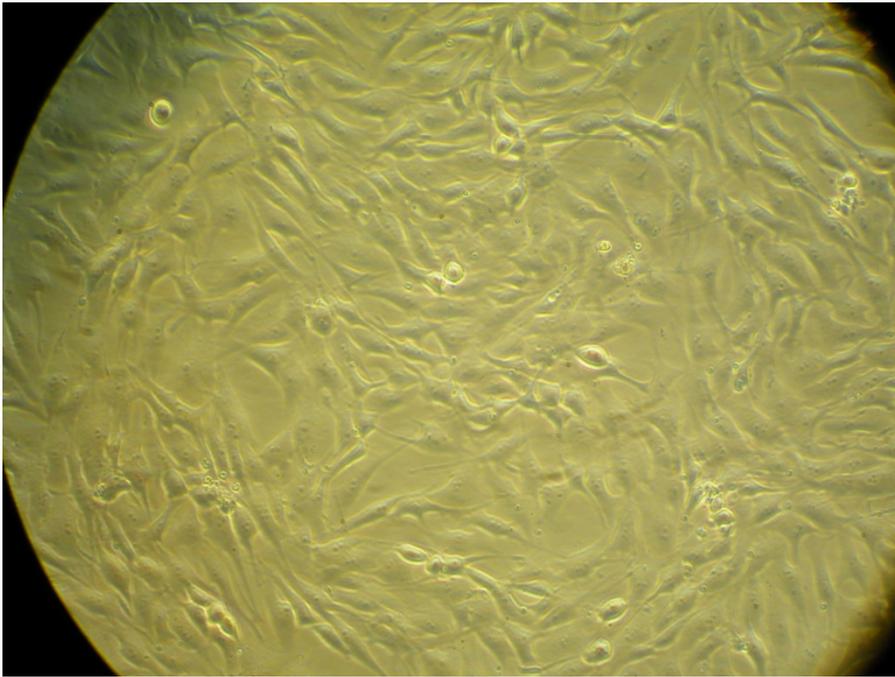


圖 2-5 MG-63 細胞生長情況 (100 X)。

Figure 2-5 The MG-63 cell growth conditions (100X).

### (三) 細胞計數

計算細胞為測量細胞生長最直接之方法，以細胞計數器 (Nucleo Counter) (Marienfeld, Germany) 來計算細胞數，方法為將細胞稀釋成  $2 \times 10^4$ ，取 30  $\mu\text{L}$  之細胞與曲利苯蘭 (trypan-blue, Sigma) 以 1:1 比例混合，注入細胞計數器中，且在顯微鏡下觀察應紀錄細胞個數。由於死細胞會被曲利苯蘭染色成暗藍色，而活細胞則顯示亮圈狀，藉由觀察紀錄細胞計數器上之亮圈數目後，可換算以求得細胞之數目。

首先取 30  $\mu\text{L}$  細胞懸浮液與 30  $\mu\text{L}$  曲利苯蘭等體積混合均勻，而後取 30  $\mu\text{L}$  混合液自血球計數盤上方凹槽加入，於 100 倍顯微鏡 (Optical microscope, Olympus cx41, Tokyo, Japan) 下觀察；活細胞不會被染色，死細胞則為藍色。

$$4 \text{ 大格細胞總數} \times 2 \times 10^4 / 4 = \text{細胞數/ml}$$

(至少乘以 2，因與曲利苯蘭等體積混合)

### (四) 細胞存活率測試 (3-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium assay ; MTT assay )

為一般常用之細胞毒性試驗方法，原理為利用 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide 黃色水溶性固體，可被細胞內粒腺體 (mitochondria) 中的去氫酶 (dehydrogenase) 代謝而將 tetrazolium ring 切斷，還原產生紫色不溶性之沉澱物 formazan (2-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-formazan) 並堆積在細胞中，再以 DMSO 溶解此結晶物質，因只有活細胞才具活性之粒腺體酵素，故所測得知吸光值會與活細胞數量呈正相關。實驗步驟參照 Mosmann (1983) 之作法首先將細胞分盤時所得之 MG-63 細胞依 3,200 cells/well (細胞密度  $10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) 加入 96 多孔培養盤 (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) 置於 5% CO<sub>2</sub> 培養箱以 37°C 培養 12 小時使細胞附著於培養盤底，將培養液移除，緩慢加入 100  $\mu\text{L}$  含不同濃度之蛋

殼膜膠原蛋白水解液及蛋黃水解液 (7 種濃度，分別為 0、5、10、25、50、100、200 及 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 之培養液，每濃度做四重複。另外無細胞之孔盤也添加含水解液之培養液作為空白試驗組，同樣為 4 重複。經反應 24、48 小時後。於每個孔盤中加入 10 $\mu\text{L}$  之 MTT 試劑，(濃度為 5 $\text{mg}/\text{mL}$ )，置於 5%  $\text{CO}_2$  培養箱以 37 $^\circ\text{C}$ ，反應 4 小時。經反應之 MTT 試劑被粒腺體還原成紫色的 formazan 後，將反應試劑移除，加入 100  $\mu\text{L}$  之 DMSO 將紫色之 formazan 溶解，充分搖晃 1 分鐘後，置於酵素免疫分析自動判讀機 (Epoch, BioTek, Vermont, USA) 上讀取波長在 589 nm 之吸光值。每個濃度所得之吸光值扣除空白試驗之吸光值後，求得水解液濃度對細胞數目之關係，以觀察水解液對細胞生長之影響。

#### (五) 細胞型態之觀察 (Morphological investigation)

細胞型態多以染色方式加以觀察，本實驗細胞染色方法參考 Bar and Harlozinska (2000) 之作法。將分盤所得之 MG-63 細胞依  $10^4$  cells/ $\text{cm}^2$  之密度培養於細胞培養盤中，經 12 小時使細胞附著於培養盤底，將培養液移除 (細胞附於培養盤底部)，加入 3 mL 含不同濃度之水解液之培養液，經反應 48 小時後，以 PBS 沖洗兩次，先以 1 mL 之 10% formalin isopropanol 反應 2 分鐘 (此步驟為增加細胞通透性) 後以去離子水沖洗一次，最後加入 0.75% 之蘇木紫 (Hematoxylin, Sigma) 1.5 mL 染色 6 分鐘，以自來水清洗，並以 3 mL 之水覆蓋 10 分鐘。染色後之細胞可於顯微鏡下以 100 之倍數觀察，並照相紀錄之。

#### (六) 鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase ; ALP) 含量測定

鹼性磷酸酵素為造骨細胞所生成，其主要具有將單磷酸脂加水分解而游離出磷酸特性之酵素，長久以來被認為與骨骼之形成有關，主要為造骨細胞分化為骨細胞時所分泌，故本次實驗亦將由水解液加入至造骨細胞培養中，以觀察其對鹼性磷酸酶是否有增進作用。首先將細胞分盤所得之 MG-63 細胞依每孔盤 80  $\mu\text{L}$  細

胞濃度稀釋為  $10^5$  cells/well 植入 96 孔細胞培養盤中，經 12 小時培養後，使細胞附著於培養盤底，將培養液移除，各孔盤中緩慢加入 80  $\mu$ L 不同處理之樣本(蛋殼膜水解液、蛋黃粉水解液; 其濃度各為 0-400  $\mu$ g/mL) 置於 5%  $\text{CO}_2$  之二氧化碳培養箱，以 37  $^\circ\text{C}$  進行培養 24 小時，而後添加 20  $\mu$ L stop solution (BioVision, Linda Vista Avenue, Mountain, CA 94043, USA) 輕微拍打混勻，使骨母細胞之鹼性磷酸酶活性停止，於恆溫水浴槽 25  $^\circ\text{C}$  下，避光水浴 60 分鐘後呈色，以微量多孔盤光譜分析儀測量波長 405 nm 之吸光值。

#### (七) 骨礦化節點分析 Calcium phosphate deposits (von Kossa assay)

磷酸鈣 (calcium phosphate) 在骨頭基質 (bone matrix) 沉積所造成的礦物質化 (mineralization) 是骨頭分化的重要步驟之一。因此碳酸鈣之沉積量可做為骨細胞分化後期之指標。研究磷酸鈣之沉積目前多以 histochemical staining 來測量，其中以骨礦化節點分析(von kossa method) 最為方便，其藉由染色顏色深淺測定分化之程度。首先將細胞培養 12 小時後，將培養液吸除，並以磷酸緩衝液沖洗二次後，使用 5% 銀溶液，置於日光下。持續曝曬一小時直至黑色，改用去離子水沖洗三次。最後用 核素紅 (nuclear-fast red, Merck) 處理五分鐘後，洗去染劑即可。

#### (八) 茜素紅染色 (Alizarin red staining)

首先將分盤所得之 MG-63 細胞依  $2 \times 10^4$  cells/well 種入 96 孔細胞培養盤中，經 12 小時培養後，使細胞附著於培養盤底，而後繼續培養 5 天，再利用 PBS 進行淋洗，使用 PBS 加 10% 甲醛 (formaldehyde, J.T. Baker<sup>®</sup>) 進行細胞固定，而後利用 2% 之茜素紅染色 (alizarin red S solution, Sigma) 進行染色，染色完後，用 PBS 進行沖洗，乙醇 (ethanol, 景明化工股份有限公司, Taipei, Taiwan) 進行脫水，最後在顯微鏡下以 100 倍進行觀察，並照相紀錄之。

(九) 統計分析

以 SAS 套裝軟體 (Statistics Analysis System) institute 9.1.3 for Windows, Cary, NC, USA)套裝軟體進行變異數分析 (analysis of variance, ANOVA)，再以鄧肯式多變域測定法 (Duncan's new multiple range test) 測定各試驗之處理平均值之間之差異顯著，所有試驗皆經過三重複測定 (repeated measure analysis) 後，將所得之數據以 Microsoft excel 2012 (Microsoft, Corp., Redmond, WA, USA)。



## 肆、結果與討論

### 第一節：蛋殼膜膠原蛋白水解物及蛋黃水解液之製備及分析

從廢棄蛋殼萃取出蛋殼膜之膠原蛋白，蛋黃粉及蛋殼粉則由勤憶蛋品科技公司所提供。將蛋殼膜膠原蛋白及蛋黃粉經過胃蛋白酶及胰蛋白酶水解，製得三種不同水解液，經由胃蛋白酶水解之蛋殼膜膠原蛋白，簡稱為 CP；經由胃蛋白酶水解之蛋黃粉，簡稱為 EP；經由胰蛋白酶水解之蛋黃粉，簡稱為 ET。

#### (一) 酵素水解液之外觀

圖 3-1 為胃蛋白酶酵素水解蛋殼膜膠原蛋白之水解液外觀，而圖 3-2 則為蛋黃粉經胃蛋白酶及胰蛋白酶之水解液外觀；由圖可見蛋黃粉經胃蛋白酶水解後，水解液呈現澄清狀且殘渣量很少，但蛋殼膜膠原蛋白經胃蛋白酶水解處理後，看來很清澈但殘渣量較多。



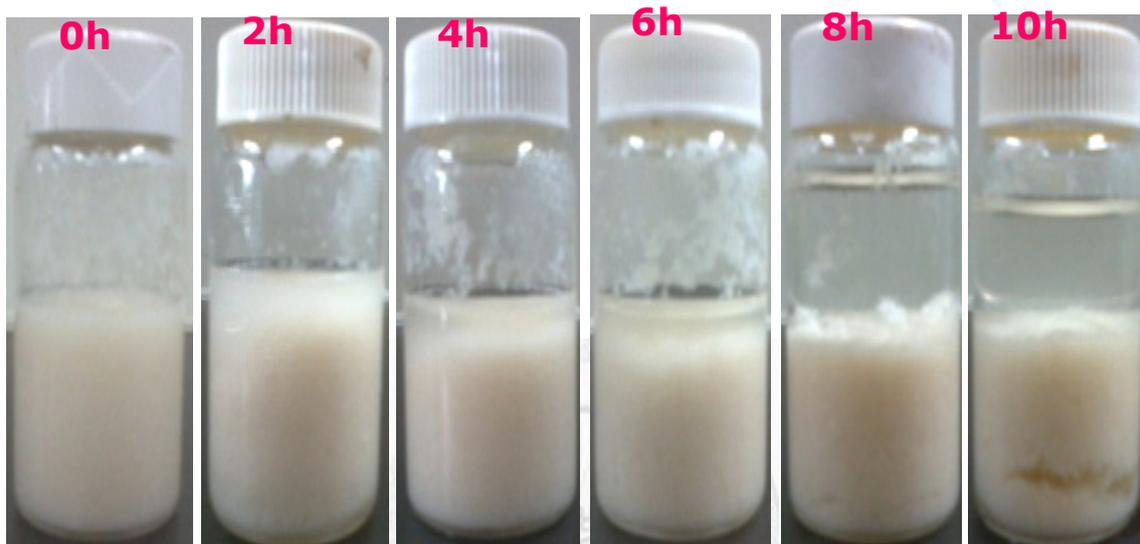


圖 3-1 蛋殼膜膠原蛋白之水解液外觀。

Figure 3-1 The appearance of hydrolysates derived from eggshell membrane collagen hydrolyzed by 1% pepsin.

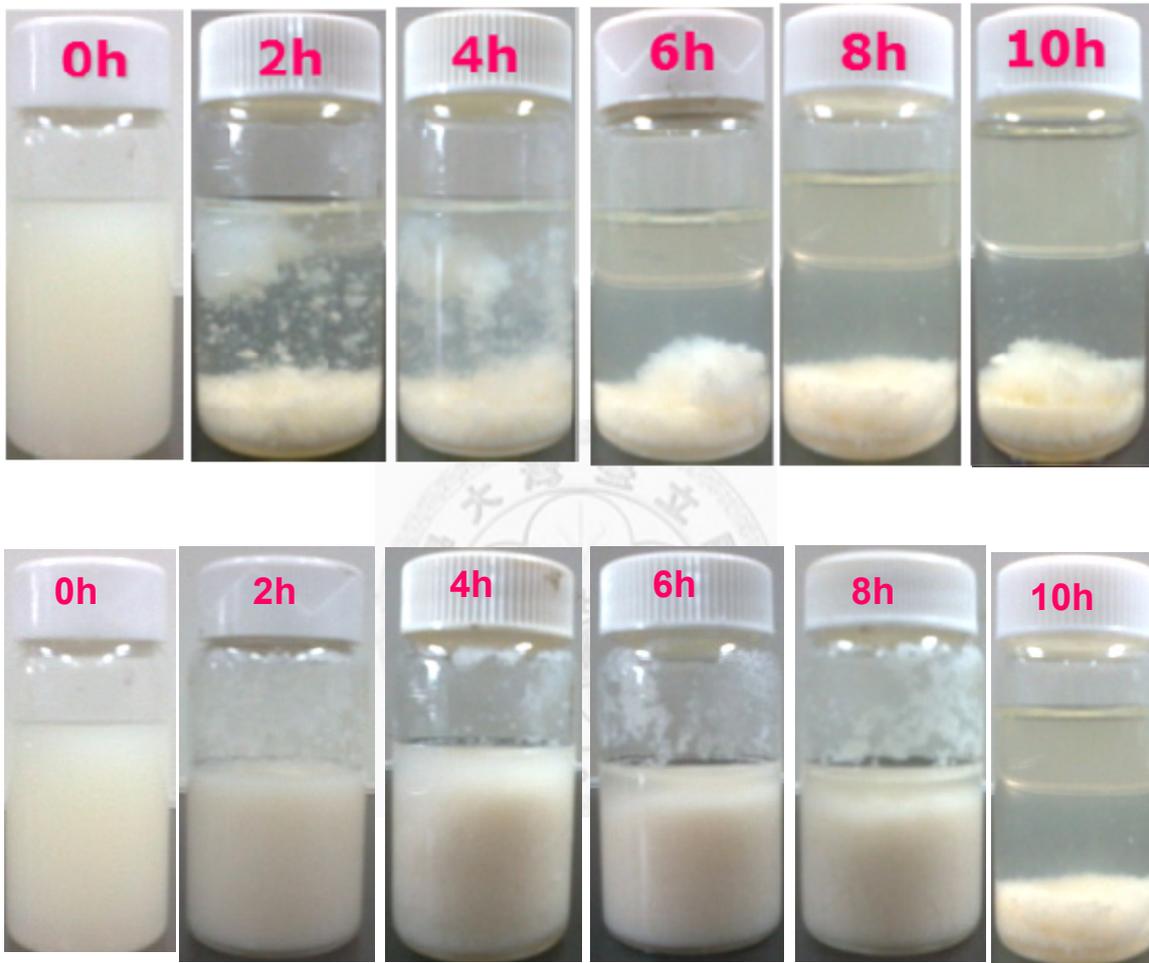


圖 3-2 蛋黃經胃蛋白酶及胰蛋白酶水解之水解液外觀。

Figure 3-2 The appearance of hydrolysates derived from egg yolk powder hydrolyzed by 1% pepsin and 1% trypsin.

## (二) 胜肽含量

測量胜肽含量之方法為 o-phthaldialdehyde 法，此法之 OPA 試劑極易與小於 6kDa 之胜肽類小分子以及游離胺基酸之胺基 ( $-\text{NH}_4^+$ ) 反應。蛋殼膜膠原蛋白及蛋黃粉水解過程胜肽含量之變化如圖 3-3 及圖 3-4。實驗結果顯示，隨著酵素水解時間之增長，其蛋殼膜膠原蛋白水解液之胜肽含量，亦也隨著時間 (0-10 小時) 增加而增加，各處理組水解液中之胜肽含量亦顯著隨之增加 ( $p < 0.05$ )，但在 4 小時開始趨於平緩，於 6 及 8 小時其胜肽含量達最高值，而在水解第 10 小時時，其胜肽含量有些微降低之趨向。

圖 3-4 則為蛋黃粉經胃蛋白酶及胰蛋白酶水解之胜肽含量變化圖。實驗結果顯示，其胜肽含量經由胃蛋白酶之水解液遠高於胰蛋白酶水解液，不過兩種不同酵素水解之胜肽含量都隨著時間增加而增加。但經由胃蛋白酶水解之胜肽含量於水解 4 小時開始趨於平緩，於水解 6 及 8 小時，其胜肽含量達最高值，但在水解 10 小時，其胜肽含量會些微降低；而經由胰蛋白酶水解之胜肽含量於水解 2 小時後，皆隨著時間增加其胜肽含量增加，其又以 6 到 10 小時，其胜肽含量達最高。

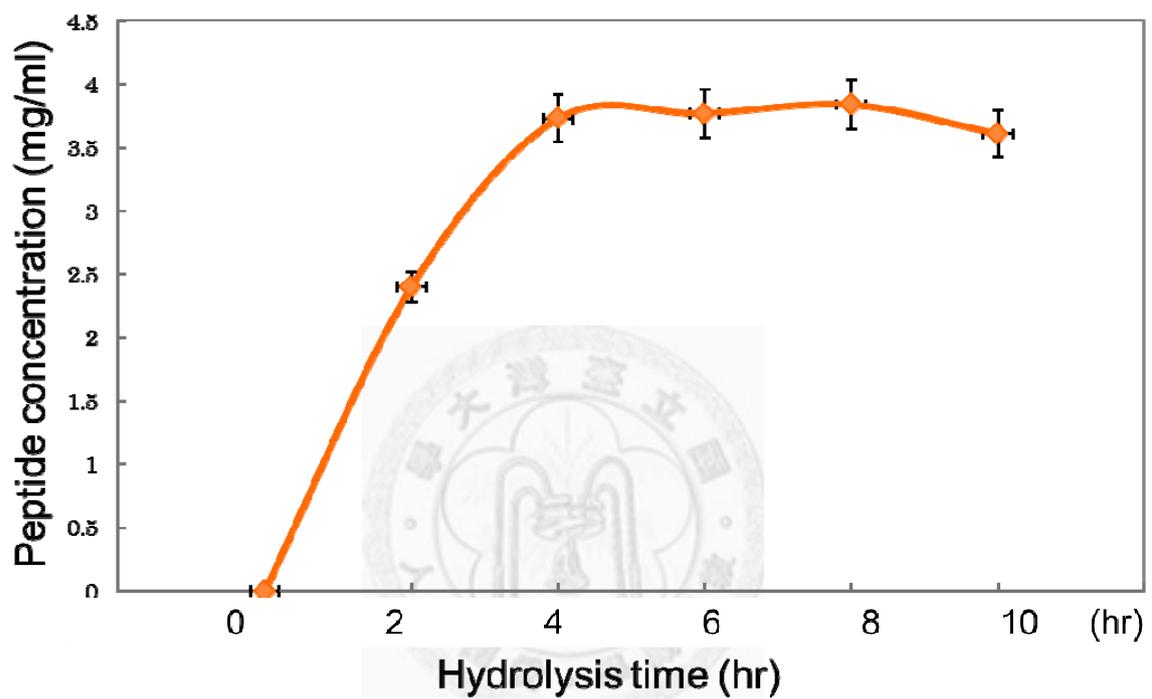


圖 3-3 水解期間胃蛋白酶水解蛋殼膜膠原蛋白之胜肽含量變化。

Figure 3-3 Changes of peptides content during hydrolysis of collagen from eggshell membrane by 1% pepsin. \*:Data expressed as means  $\pm$  standard deviation. (n=3)

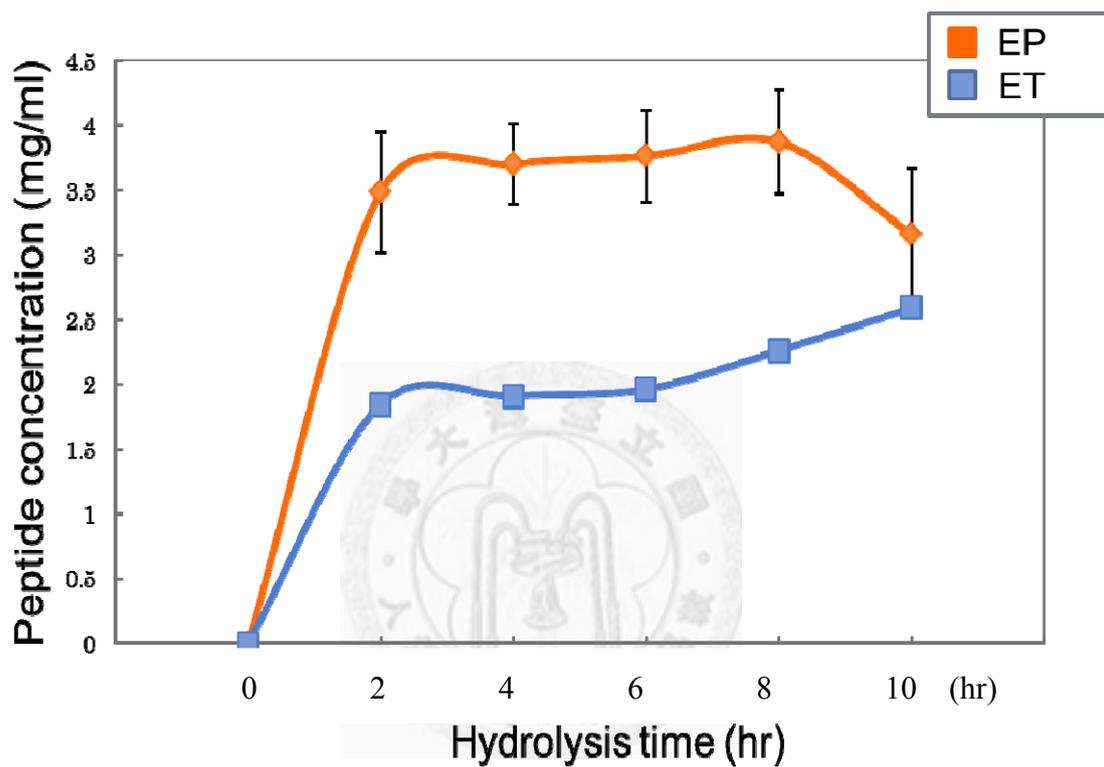


圖 3-4 水解期間胃蛋白酶及胰蛋白酶水解蛋黃粉之胜肽含量變化。

Figure 3-4 Changes of peptides content during hydrolysis of egg yolk powder by 1% pepsin and trypsin. \*:Data expressed as means  $\pm$  standard deviation. (n=3)

## 第二節 蛋殼膜膠原蛋白水解物、蛋黃水解液和蛋殼粉與 MG-63 類骨母細胞共培養之功能評估

### (一) 細胞存活率測試 (3-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium assay ; MTT assay)

圖 3-5 列出各添加不同濃度之蛋殼膜膠原蛋白水解液的組別，其由酵素免疫分析自動判讀機測出的原始吸光值 (O.D.) 數據，再將各組的吸光值與各組的控制組以下列公式上作比例上的轉換，最後畫出各濃度對細胞存活率的百分比圖。

$$\text{MTT Assay (\% of control)} = [\text{O.D. (EXP)} / \text{O.D. (CTR)}] \times 100\%$$

其蛋殼膜膠原蛋白水解液於不同濃度下對 MG-63 細胞增生之情形可由 MTT assay 觀察得知。圖 3-5 為添加經由胃蛋白酶水解 6 及 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液培養 24 小時後，對 MG-63 細胞增生之關係圖，由圖中可發現經胃蛋白酶水解 6 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液於培養 24 小時後，不論任何濃度 (5-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 與對照組相比皆顯著降低。然而添加經胃蛋白酶水解 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液，實驗結果顯示，水解液濃度在 5、10、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  對照組相比，有顯著效果；但在較高之濃度 (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 對於 MG-63 細胞增生卻有抑制之效果。

如圖 3-6 所示，加入不同濃度經胃蛋白酶處理 6 及 8 小時下之蛋黃水解液 (5-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 作用 24 小時，6 小時下蛋黃水解液對造骨細胞的增生或死亡情況在濃度 50、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  與對照組相比，其細胞存活率有上升之現象，亦有統計上之差異 ( $p < 0.05$ )。而 8 小時下蛋黃水解液與對照組相比，其細胞存活率普遍都低於對照組。

圖 3-7 所示，添加不同劑量經胰蛋白酶處理 6 及 8 小時之蛋黃水解液，6 小時水解液對細胞存活率的作用比 8 小時來的明顯，此時濃度為 25、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之組別細胞存活率偏高，相較於對照組之細胞有良好的增殖現象，在統計上均具有顯著的差異 ( $p < 0.05$ )；而 8 小時之蛋黃水解液與對照組相比，其細胞存活率皆呈現下降的趨勢。

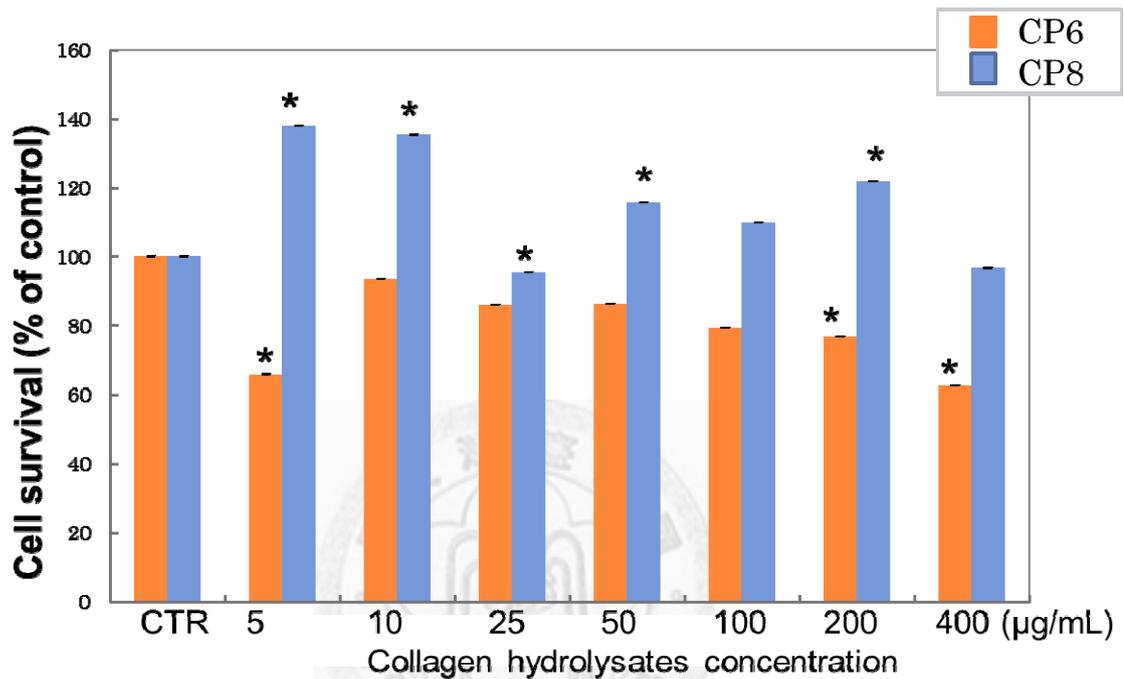


圖 3-5 以細胞增生試驗觀察不同濃度經胃蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解物與 MG-63 細胞反應 24 小時對細胞增生之影響。

Figure 3-5 Proliferation of MG-63 cells cultured with different concentrations of the 6-hour or 8-hour pepsin hydrolysed eggshell membrane collagen at 37 °C for 24 hours. The eggshell membrane collagen hydrolyzed by pepsin for 6 hours (CP6). The eggshell membrane collagen hydrolyzed by pepsin for 8 hours (CP8). Values are mean ± S.D. Asterisk denotes values that are significantly different from control (n = 4, \*P < 0.05).

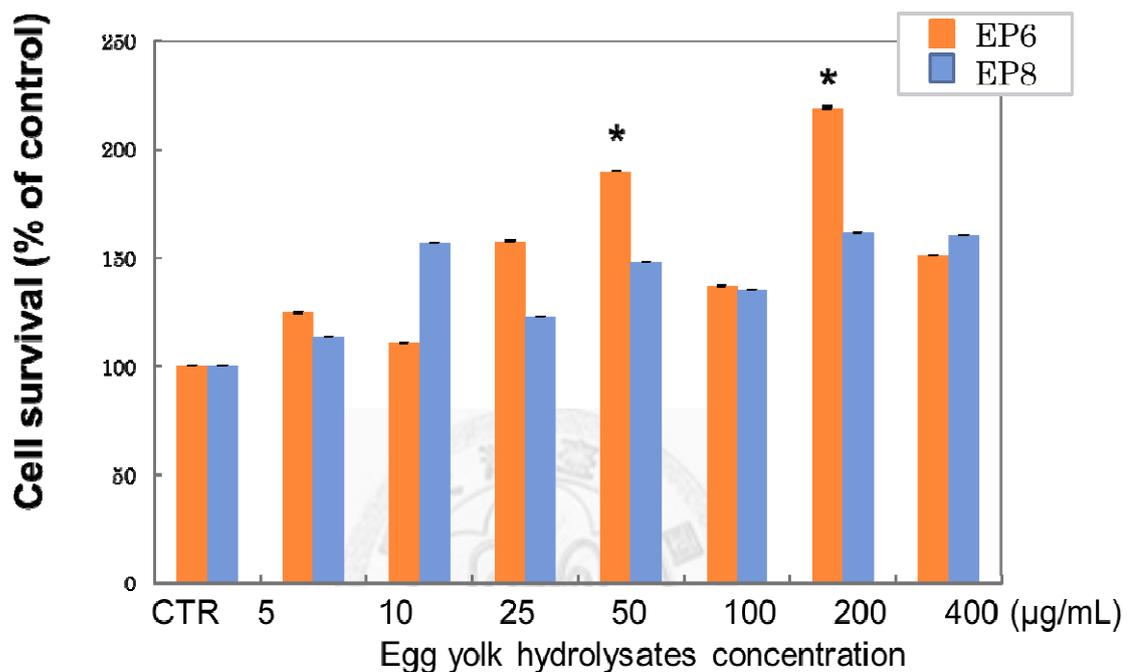


圖 3-6 以細胞增生試驗觀察不同濃度經胃蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋黃粉水解液與 MG-63 細胞反應 24 小時對細胞增生之影響。

Figure 3-6 Proliferation of MG-63 cells cultured with different concentrations of the 6-hour or 8-hour pepsin hydrolysed egg yolk at 37 °C for 24 hours. The egg yolk hydrolyzed by pepsin for 6 hours (EP6). The egg yolk hydrolyzed by pepsin for 8 hours (EP8). Values are mean  $\pm$  S.D. Asterisk denotes values that are significantly different from control ( n = 4, \* $P$  < 0.05).

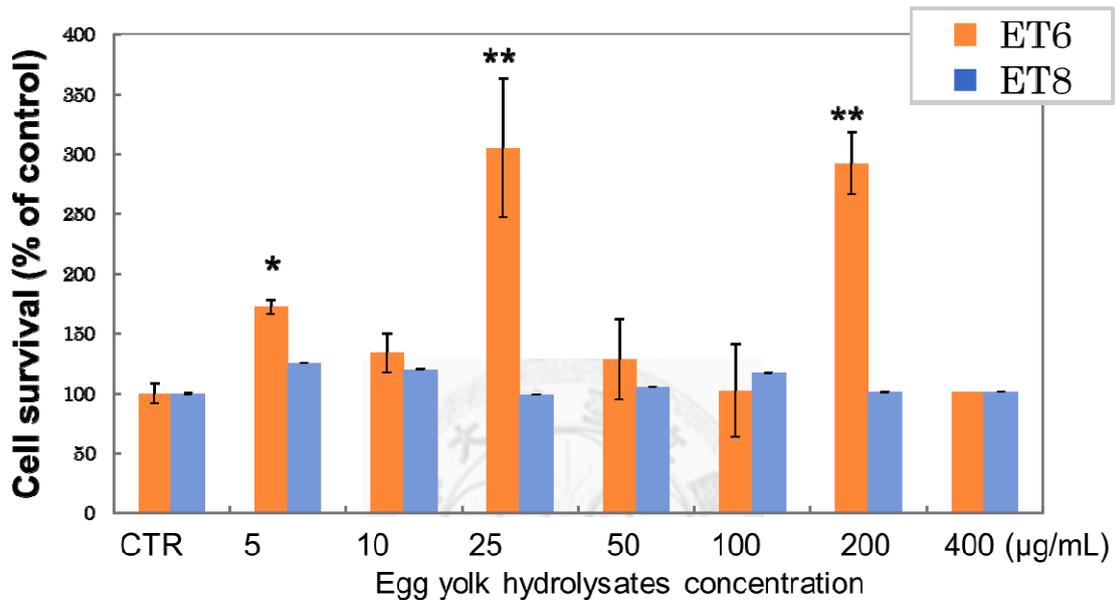


圖 3-7 以細胞增生試驗觀察不同濃度經胰蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋黃粉水解液與 MG-63 細胞反應 24 小時對細胞增生之影響。

Figure 3-7 Proliferation of MG-63 cells cultured with different concentrations of the 6-hour or 8-hour trypsin hydrolysed egg yolk at 37 °C for 24 hours. The egg yolk hydrolyzed by trypsin for 6 hours (ET6). The egg yolk hydrolyzed by trypsin for 8 hours (ET8). Values are mean  $\pm$  S.D. Asterisk denotes values that are significantly different from control ( n = 4, \* $P$  < 0.05).

依圖3-8 所示，在添加不同劑量經胃蛋白酶水解6及8小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液48小時後，6與8小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液對細胞存活率的作用效果與對照組相比，顯著低於對照組，其又以8小時水解液更為之；而6小時蛋殼膜膠原蛋白水解液濃度為50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，與其他濃度及組別相比，在統計上均具有顯著的差異 ( $*p < 0.05$ )。

依圖 3-9 所示，在添加不同劑量經胃蛋白酶處理6及8小時之蛋黃水解液與MG-63細胞進行共培養48小時後，蛋黃水解液對細胞存活率的作用效果只有6小時之水解液其濃度為5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之組別細胞存活率最高，相較於控制組有明顯增殖之現象；而其他濃度組別與對照組相比，在統計上均顯著低於對照組 ( $p < 0.05$ )。

實驗結果顯示，依圖 3-10 所示，在添加不同劑量經胰蛋白酶處理 6 及 8 小時之蛋黃水解液與 MG-63 細胞進行共培養 48 小時後，蛋黃水解液對細胞存活率的作用效果只有 6 小時之水解液之組別細胞存活率與對照組相比較皆有顯著差異，相較於控制組有明顯增殖之現象；其中又以濃度為 5、10 及 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  於統計上有顯著差異 ( $*p < 0.05$ )。而 8 小時之水解與對照組相比，在統計上均顯著低於對照組 ( $*p < 0.05$ )。

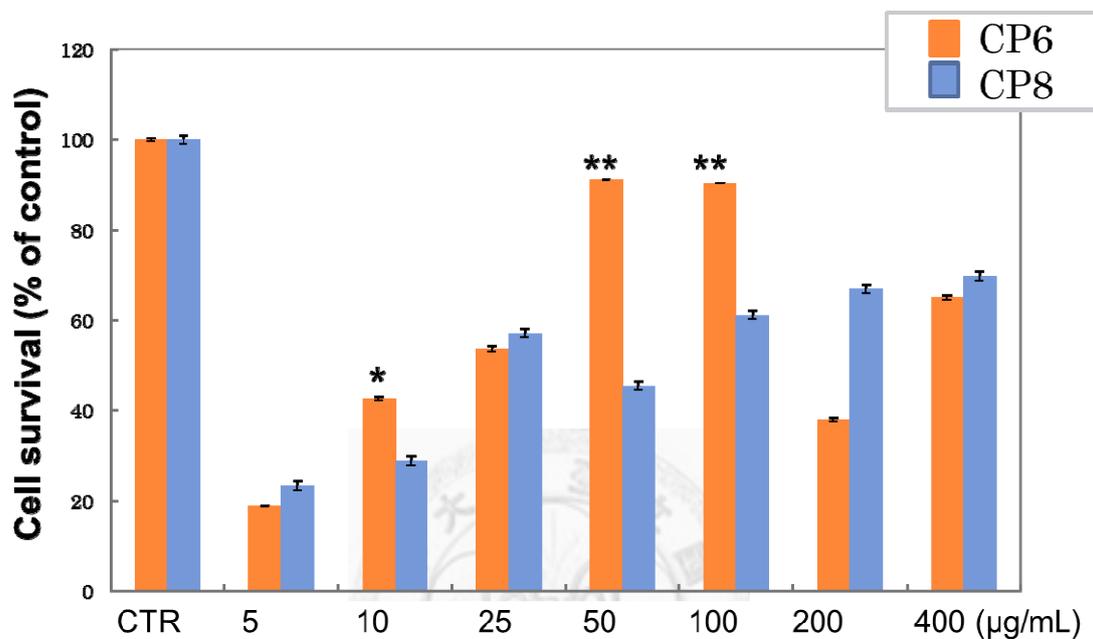


圖 3-8 以細胞增生試驗觀察不同濃度經胃蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解物與 MG-63 細胞反應 48 小時對細胞增生之影響。

Figure 3-8 . Proliferation of MG-63 cells cultured with different concentrations of the 6-hour or 8-hour pepsin hydrolysed eggshell membrane collagen at 37 °C for 48 hours. The eggshell membrane collagen hydrolyzed by pepsin for 6 hours (CP6). The eggshell membrane collagen hydrolyzed by pepsin for 8 hours (CP8). Values are mean  $\pm$  S.D. Asterisk denotes values that are significantly different from control ( n = 4, \* $P$  < 0.05).

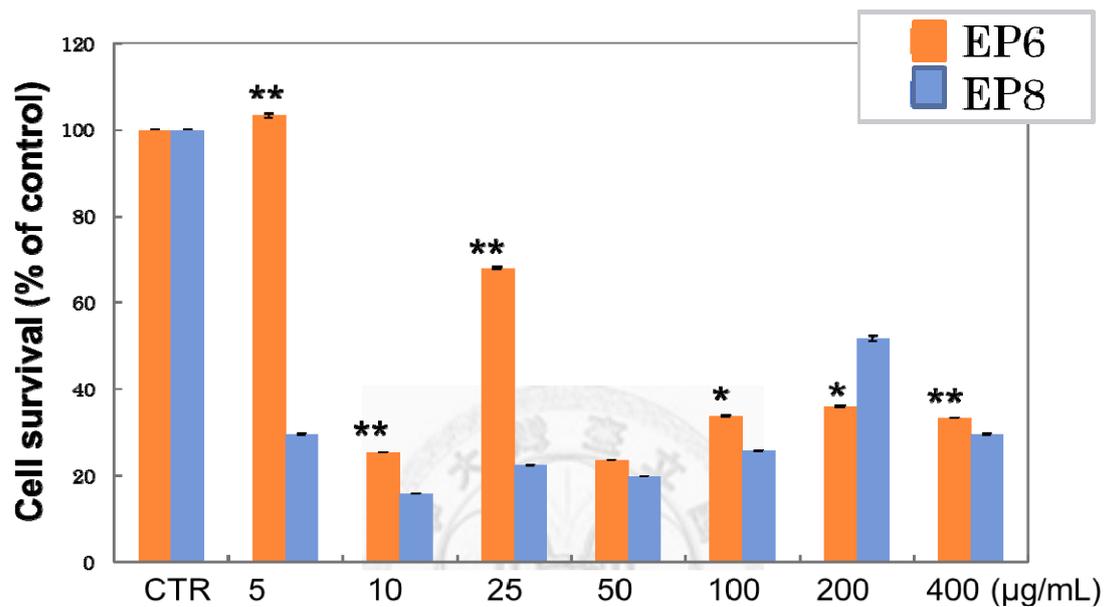


圖 3-9 以細胞增生試驗觀察不同濃度經胃蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋黃粉水解液與 MG-63 細胞反應 48 小時對細胞增生之影響。

Figure 3-9 Proliferation of MG-63 cells cultured with different concentrations of the 6-hour or 8-hour pepsin hydrolysed egg yolk at 37 °C for 48 hours. The egg yolk hydrolyzed by pepsin for 6 hours (EP6). The egg yolk hydrolyzed by pepsin for 8 hours (EP8). Values are mean  $\pm$  S.D. Asterisk denotes values that are significantly different from control ( n = 4, \* $P$  < 0.05).

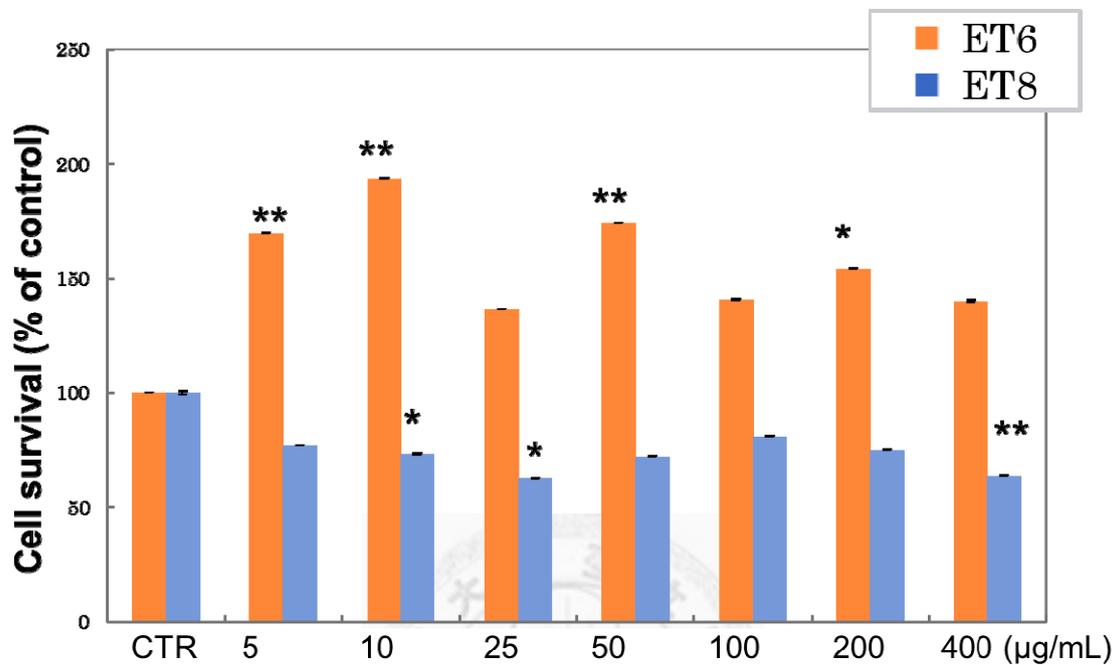


圖 3-10 以細胞增生試驗觀察不同濃度經胰蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋黃粉水解液與 MG-63 細胞反應 48 小時對細胞增生之影響。

Figure 3-10 Proliferation of MG-63 cells cultured with different concentrations of the 6-hour or 8-hour trypsin hydrolysed egg yolk at 37 °C for 48 hours. The egg yolk hydrolyzed by trypsin for 6 hours (ET6). The egg yolk hydrolyzed by trypsin for 8 hours (ET8). Values are mean  $\pm$  S.D. Asterisk denotes values that are significantly different from control ( n = 4, \* $P$  < 0.05).

## (二) 細胞型態之觀察 (Morphological investigation)

參考 Bar and Harlozinska, 2000 之作法，利用細胞染色觀察其細胞生長型態，其細胞染色圖片之結果可與 MTT assay 結果做比較。圖 3-11 為不同之水解液，各添加 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  於 MG-63 骨母細胞培養 24 小時後，所做之細胞染色圖片。由圖 3-11 實驗結果顯示，於 24 小時共培養下，不論經胃蛋白酶處理 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液、經胃蛋白酶及胰蛋白酶處理 6 小時之蛋黃水解液，其細胞數目與對照組相比皆有增加之趨勢；其中又以經胃蛋白酶處理 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液以及經胰蛋白酶處理 6 小時之蛋黃水解液對細胞生長有刺激之作用。

圖 3-12 則為同濃度之水解液，各添加 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  於 MG-63 骨母細胞培養 48 小時後，所做之細胞染色圖片。由圖 3-12 實驗結果顯示，於 48 小時共培養下，除了經胰蛋白酶處理 6 小時之蛋黃水解液其細胞數目與對照組相比有顯著增加之趨勢。經胃蛋白酶處理 6 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液以及經胃蛋白酶處理 6 小時之蛋黃水解液與對照組相比，對 MG-63 細胞生長都有抑制之效果，其中又以經胃蛋白酶處理 6 小時之蛋黃水解液抑制細胞生長效果最為明顯。

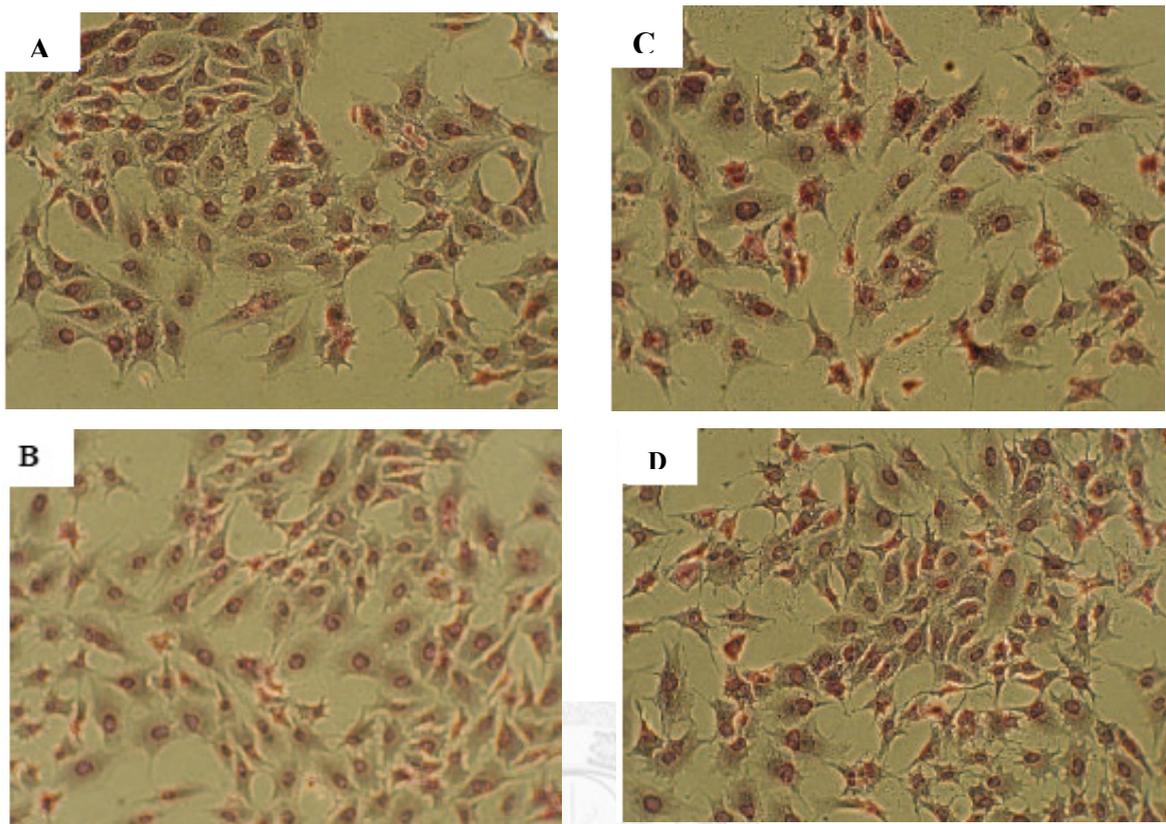


圖 3-11 以染色方式觀察添加不同處理組水解液反應 24 小時對 MG-63 細胞生長之影響 (倍數 100X)。(A) 控制組 (B) 經胃蛋白酶水解 6 小時之蛋黃水解液 (C) 經胃蛋白酶水解之 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液 (D) 經胰蛋白酶水解之 6 小時之蛋黃水解液。

Figure 3-11 Morphological characterization of different treatment sample co-cultured with MG-63 cells for 24 hours, with eggshell membrane collagen hydrolyzed by pepsin for 8 hours (CP8, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), egg yolk hydrolyzed by pepsin for 6 hours (EP, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and egg yolk hydrolyzed by trypsin for 6 hours (ET6, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) compared to control (100X). (A) control (B) egg yolk hydrolyzed by pepsin for 6 hours (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (C) collagen of eggshell membranes hydrolyzed by pepsin for 8 hours (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (D) egg yolk hydrolyzed by trypsin for 6 hours (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

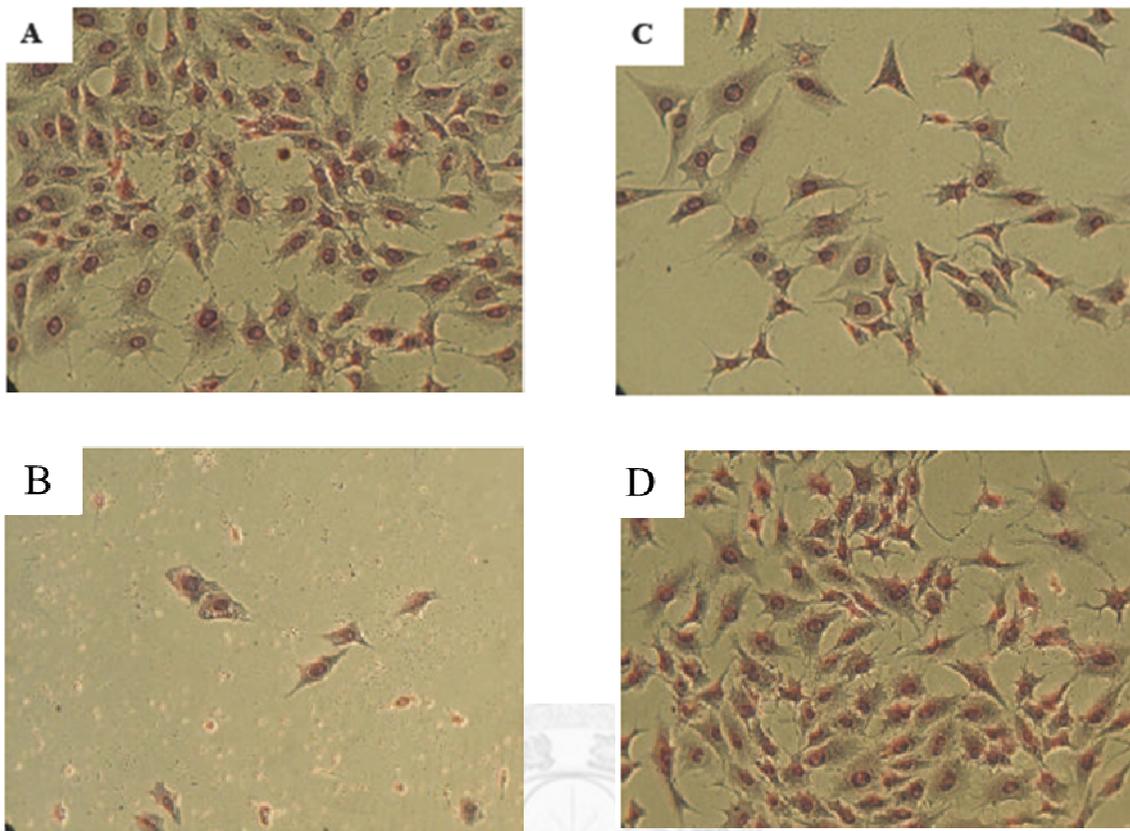


圖 3-12 以染色方式觀察添加不同處理組水解液反應 48 小時對 MG-63 細胞生長之影響 (倍數 100X)。(A) 控制組 (B) 經胃蛋白酶水解 6 小時之蛋黃水解液 (C) 經胃蛋白酶水解之 6 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液 (D) 經胰蛋白酶水解之 6 小時之蛋黃水解液。

Figure 3-12 Morphological characterization of different treatment co-cultured with MG-63 cells for 48 hours, with collagen of eggshell membranes hydrolyzed by pepsin for 6 hours (CP6, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), egg yolk hydrolyzed by pepsin for 6 hours (EP6, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and egg yolk hydrolyzed by trypsin for 6 hours (ET6, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) compared to control (100X). (A) control (B) egg yolk hydrolyzed by pepsin for 6 hours (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (C) collagen of eggshell membranes hydrolyzed by pepsin for 6 hours (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (D) egg yolk hydrolyzed by trypsin for 6 hours (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### (三) 鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase ;ALP) 含量測定

鹼性磷酸酵素 (ALP) 為造骨細胞分化時一個重要的指標，我們選用細胞存活率與 ALP 的含量變化來探討蛋殼膜膠原蛋白水解液、蛋黃水解液及蛋殼粉其對造骨細胞增殖作用之影響。從先前 24 小時的細胞存活率測定中我們已發現，蛋殼膜膠原蛋白水解 8 小時之水解液在低濃度 5-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的時候其提高造骨細胞存活率的作用最好；濃度為 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時，對細胞存活率有抑制之效果。此試驗中添加蛋殼膜膠原蛋白水解 6 及 8 小時不同濃度之水解液加入 MG-63 細胞中，共同培養 24 小時後，再觀察造骨細胞分泌鹼性磷酸酶 (ALP) 之情形。

若造骨細胞分化作用越旺盛其產生的鹼性磷酸酶 (ALP) 越多。實驗結果由圖 3-13 中發現，經胃蛋白酶處理 6 及 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液隨著濃度之增加其鹼性磷酸酶活性皆有顯著增加；6 小時之水解液又以濃度 5、10、25 及 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  與對照組相比，有顯著差異 ( $*p < 0.05$ )。而 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液則在濃度 10 及 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下，與對照組相比有顯著差異 ( $*p < 0.05$ )。

此次試驗中添加經胃蛋白酶水解 6 及 8 小時之不同濃度蛋殼膜膠原蛋白水解液另外又添加濃度固定之微米化蛋殼粉 (0.1%之蛋殼粉)，依圖 3-14 所示其實驗結果發現，添加濃度固定之微米化蛋殼粉都有不錯的效果，其中 6 小時之水解液及 0.1% 蛋殼粉之處理組又以濃度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下，鹼性磷酸酶活性與對照組相比有顯著之效果 ( $*p < 0.05$ )。8 小時之水解液及 0.1% 蛋殼粉之處理組於濃度 5、10 及 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  與對照組相比有顯著之效果 ( $*p < 0.05$ )；其結果又以 8 小時之水解液加 0.1%蛋殼粉之處理組之鹼性磷酸酶活性大於 6 小時之水解液加 0.1%蛋殼粉之處理組。

實驗結果由圖 3-15 中發現，經胰蛋白酶處理 6 及 8 小時之蛋黃水解液隨著濃度之增加其鹼性磷酸酶活性皆有顯著增加；6 小時之水解液又以濃度 5 及 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  與對照組相比，有顯著差異 ( $*p < 0.05$ )。而 8 小時之蛋黃水解液則在濃度 5、10、25 及 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下，與對照組相比有顯著差異 ( $*p < 0.05$ )。

此次試驗中添加經胰蛋白酶水解 6 及 8 小時之不同濃度蛋黃水解液另外又添加濃度固定之微米化蛋殼粉 (0.1% 蛋殼粉)，依圖 3-16 所示其實驗結果顯示，添加濃度固定之微米化蛋殼粉與未添加蛋殼粉相比有不錯之效果，其中又以 6 小時之水解液其鹼性磷酸酶含量隨著水解液濃度劑量的增加而增加，於濃度 5、10、25 及 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  與控制組相比有顯著之差異，而濃度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  可能因濃度較高之關係，其鹼性磷酸酶含量就無 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  來的高。在統計上具有顯著的差異 ( $*p < 0.05$ )。依據圖 3-16 所示，我們可以發現，雖然蛋黃 6 與 8 小時之水解液額外添加微米化蛋殼粉，鹼性磷酸酶活性都有不錯之效果，但其中又以 6 小時水解液效果來的更好。



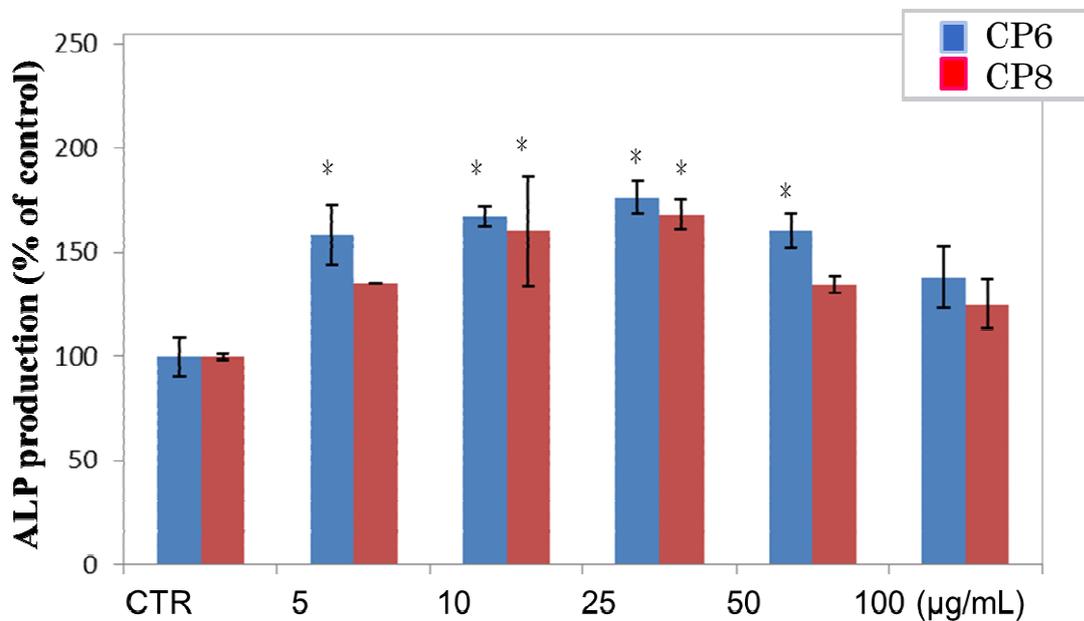


圖 3-13 鹼性磷酸酶活性觀察低濃度時之經胃蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解物對 MG-63 細胞分化之影響。

Figure 3-13 Effect of eggshell membrane collagen hydrolyzed by pepsin for 6 and 8 hours on alkaline phosphatase activity of MG-63 cells. Cells were treated with 0 to 100 mg/mL of hydrolysates for alkaline phosphatase activity. Data are expressed as a percentage of the control value. Data were expressed as means  $\pm$ SEM. \* $p < 0.05$  versus control. Values are mean  $\pm$  S.D. Asterisk denotes values that are significantly different from control (  $n = 4$ , \* $P < 0.05$ ).

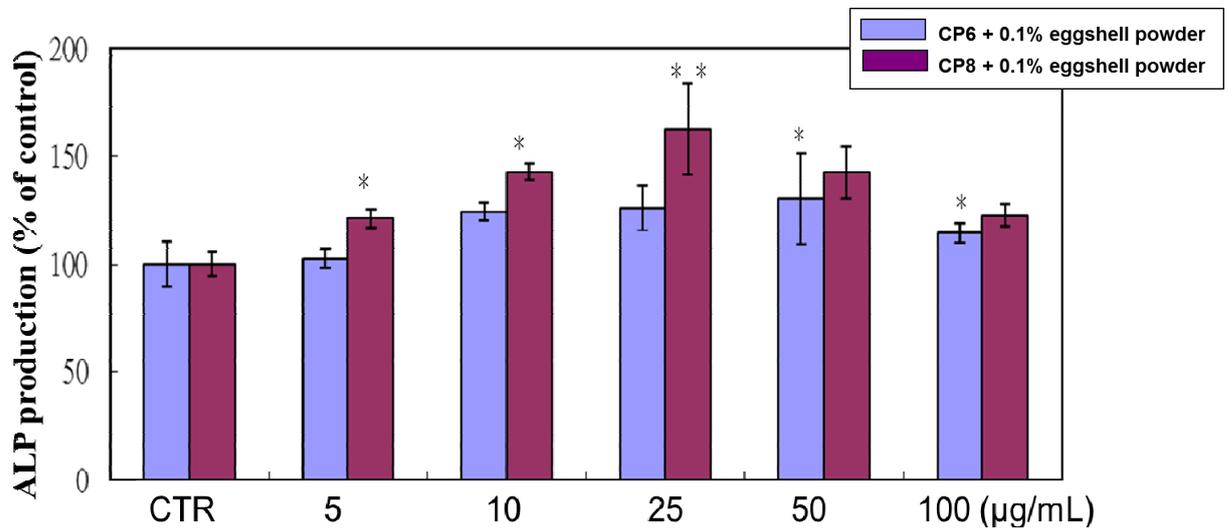


圖 3-14 鹼性磷酸酶活性觀察低濃度時之經胃蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解物添加 0.1% 蛋殼粉之處理組對 MG-63 細胞分化之影響。

Figure 3-14 Effect of combination of 6-hour or 8-hour pepsin hydrolysed eggshell membrane collagen and 0.1% eggshell calcium on alkaline phosphatase activity of MG-63 cells. Cells were treated with 0 to 100 mg/mL of hydrolysates and eggshell calcium for alkaline phosphatase activity. Values are mean  $\pm$  S.D. Asterisk denotes values that are significantly different from control (n = 4, \* $P$  < 0.05).

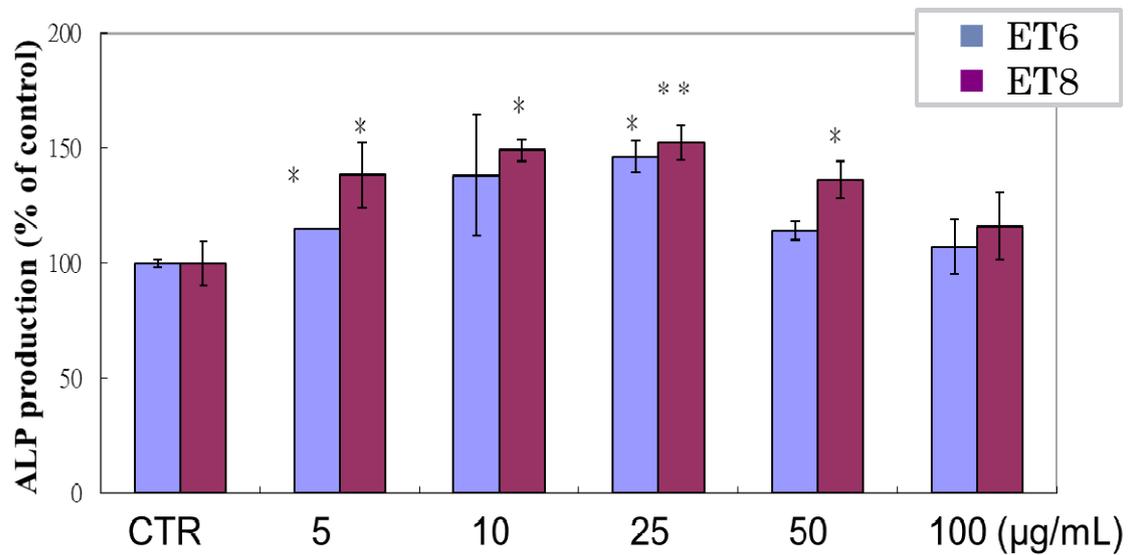


圖 3-15 鹼性磷酸酶活性觀察低濃度時之經胰蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋黃粉水解液對 MG-63 細胞分化之影響。

Figure 3-15 Effect of egg yolk hydrolyzed by trypsin for 6 and 8 hours on alkaline phosphatase activity of MG-63 cells. Cells were treated with 0 to 100 mg/mL of hydrolysates for alkaline phosphatase activity. Values are mean  $\pm$  S.D. Asterisk denotes values that are significantly different from control (n = 4, \* $P$  < 0.05).

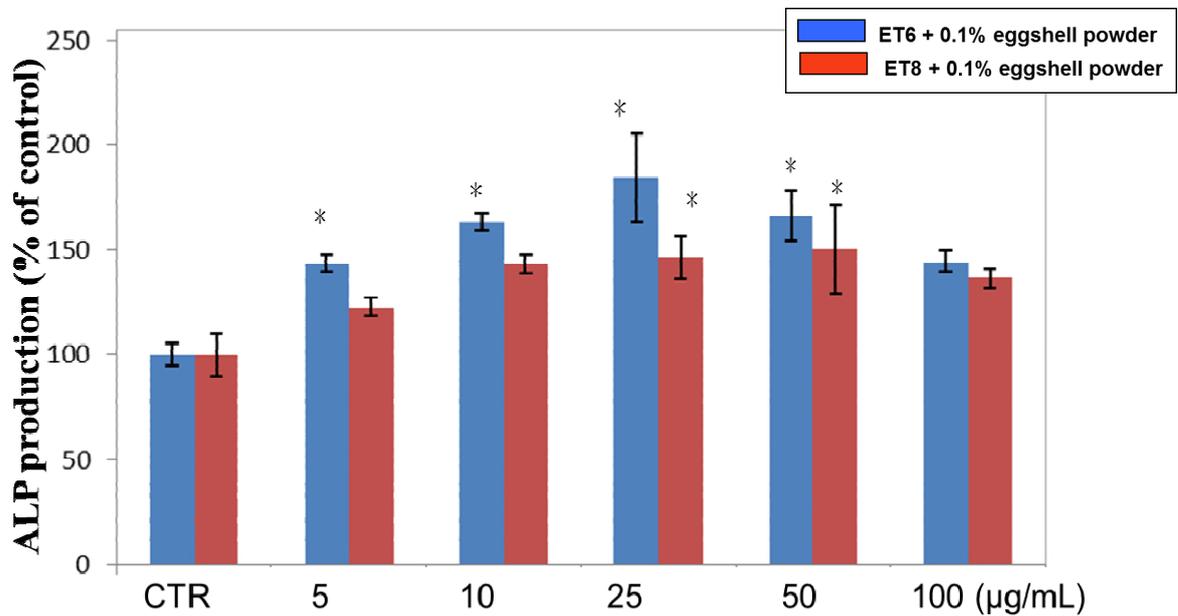


圖 3-16 鹼性磷酸酶活性觀察低濃度時之經胰蛋白酶水解 6 小時及 8 小時之蛋黃粉添加 0.1% 蛋殼粉水解液之處理組對 MG-63 細胞分化之影響。

Figure 3-16 .Effect of combination of 6-hour or 8-hour trypsin hydrolysed egg yolk and 0.1% eggshell calcium on alkaline phosphatase activity of MG-63 cells. Cells were treated with 0 to 100 mg/mL of hydrolysates and eggshell calcium for alkaline phosphatase activity. Values are mean  $\pm$  S.D. Asterisk denotes values that are significantly different from control ( n = 4, \* $P$  < 0.05).

#### (四) 骨礦化節點分析 Calcium phosphate deposits (von Kossa assay)

研究磷酸鈣之沉積目前多以 histochemical staining 來測量，其中以 Von Kossa method 最為方便。本實驗之處理組為添加 0.1 % 之蛋殼粉以及於之前實驗測定細胞增生試驗及鹼性磷酸酶活性之試驗找出之最佳處理組-經胰蛋白酶水解 6 小時之蛋黃水解液。在此實驗中，將經胰蛋白酶水解 6 小時之蛋黃水解液額外添加 0.1% 蛋殼粉與只添加 0.1% 蛋殼粉及對照組 (商業市售之鈣) 相較。如圖 3-17 所示，添加 0.1% 之蛋殼粉與對照組相比有明顯礦化之效果；經胰蛋白酶水解 6 小時之蛋黃水解液額外添加 0.1% 蛋殼粉與只單純添加 0.1% 蛋殼粉相比其效果又更為明顯。此實驗我們發現，添加 0.1% 蛋殼粉其礦化效果比對照組來的好，其中又以有額外添加蛋黃水解液亦添加蛋殼粉之礦化效果最好。



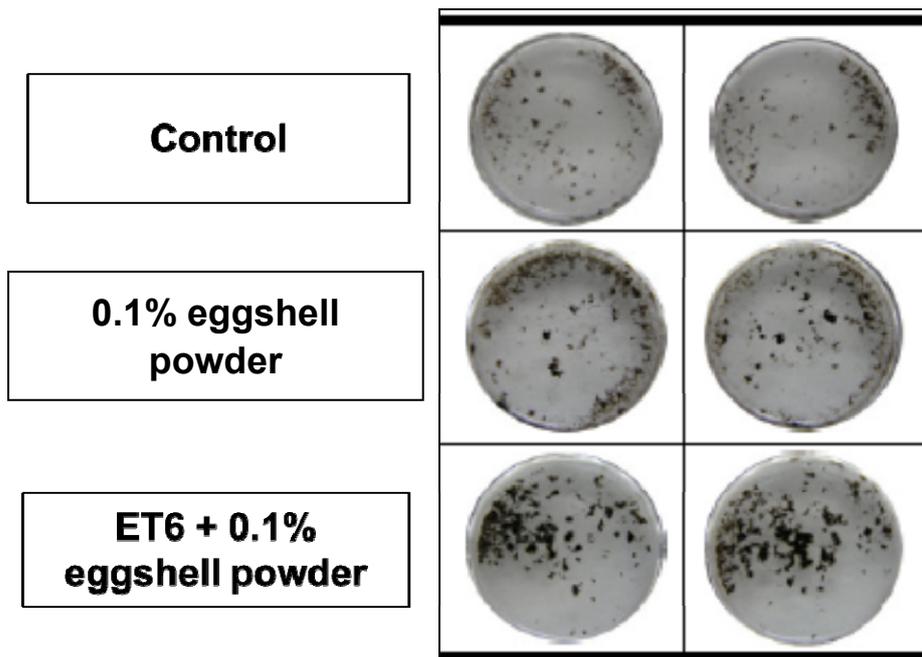


圖 3-17 添加不同處理組之蛋殼粉與 MG-63 共培養觀察其骨礦化結點之影響。

Figure 3-17 Von Kossa staining of the mineralized matrix of bone formation in MG-63 osteoblasts.



#### (五) 茜素紅染色 (Alizarin red staining)

本實驗利用茜素紅染色法來觀察添加不同處理組對 MG-63 細胞礦化之影響。圖 3-18 為茜素紅染色於肉眼觀察，當紅色染劑越深，表骨細胞礦化效果越好。其實驗結果顯示只單純添加經胃蛋白酶水解 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液，礦化效果與對照組有些微差異，但效果不明顯。但添加經胰蛋白酶水解 6 小時之蛋黃水解液，其礦化效果與對照組及蛋殼膜膠原蛋白水解液相比，有明顯差異。但效果更為明顯地為添加 0.1% 蛋殼粉、胃蛋白酶水解 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液與經胰蛋白酶水解 6 小時之蛋黃水解液，兩者相加再一起以及蛋白酶水解 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液與經胰蛋白酶水解 6 小時之蛋黃水解液又再添加 0.1% 蛋殼粉；其中又以三者添加在一起之礦化效果最好。

圖 3-18 可與圖 3-19 之結果做對照來看，如圖 3-19 所示，在對照組、只單純添加蛋殼膜膠原蛋白或蛋黃水解液，尚未有骨礦化結節產生；然而在添加 0.1% 蛋殼粉及兩種水解液之組別，有些微明顯之礦化骨結節產生，其中又以三者添加在一起之礦化骨結節最為明顯。

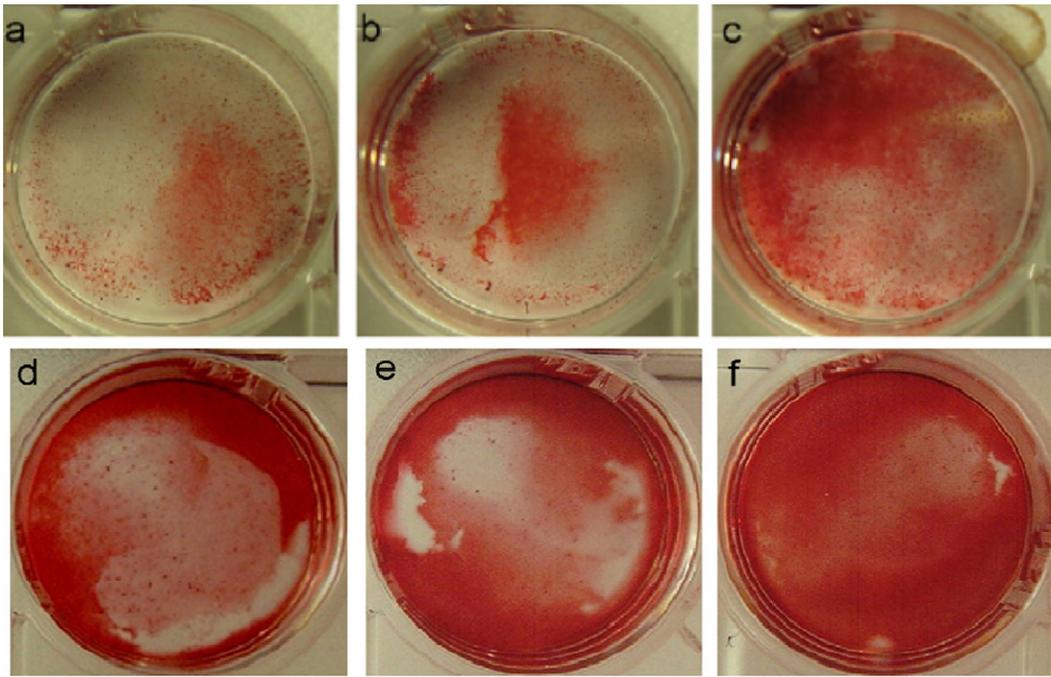


圖 3-18 不同劑量之水解液及蛋殼粉與 MG-63 類骨母細胞共培養觀察其茜素紅染色之影響。

Figure 3-18 Alizarin red staining for the mineralized matrix and nodules. The MG-63 cells were cultured for 5 days in the different kind of hydrolysates and eggshell calcium in the absence of the osteogenic supplements. Representative sections of alizarin red staining from (A) control (B) collagen of eggshell membranes hydrolyzed by pepsin for 8 hours (C) egg yolk hydrolyzed by trypsin for 6 hours (D) 0.1% eggshell powder (E) collagen of eggshell membranes hydrolyzed by pepsin for 8 hours and egg yolk hydrolyzed by trypsin for 6 hours (F) collagen of eggshell membranes hydrolyzed by pepsin for 8 hours、egg yolk hydrolyzed by trypsin for 6 hours and 0.1% eggshell powder. All the cells with hydrolysates were positively stained with the alizarin red staining.

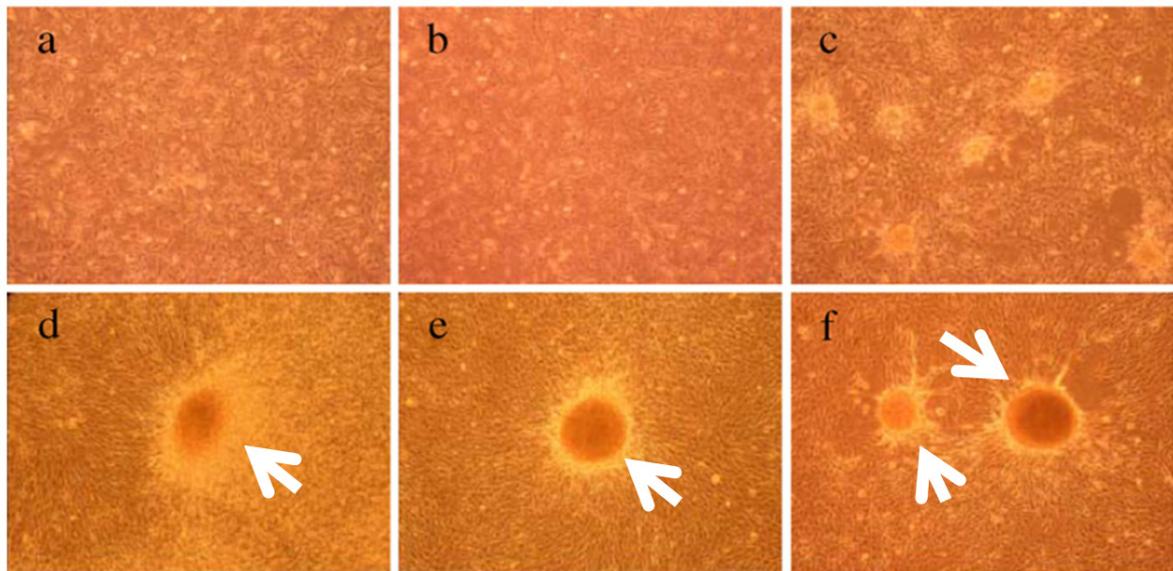


圖 3-19 不同劑量之水解液及蛋殼粉與 MG-63 類骨母細胞共培養，於茜素紅染色下觀察骨礦化結節之形成。

Figure 3-19 Bone-like nodule formation of the MG-63 cells that were cultured in the (A) absence of the osteogenic supplements as a control, (B) collagen of eggshell membranes hydrolyzed by pepsin for 8 hours, (C) egg yolk hydrolyzed by trypsin for 6 hours (D) 0.1 % eggshell powder (E) collagen of eggshell membranes hydrolyzed by pepsin for 8 hours and egg yolk hydrolyzed by trypsin for 6 hours and (F) collagen of eggshell membranes hydrolyzed by pepsin for 8 hours ,egg yolk hydrolyzed by trypsin for 6 hours 0.1% eggshell powder.

## (六) 未來展望

### 1. 活體實驗之研究

此實驗僅以 in vitro 之方式研究蛋殼膜膠原蛋白水解液、蛋黃粉水解液及蛋殼粉對 MG-63 細胞之影響，其在活體上之應用有待探討。活體之研究將對蛋殼膜水解液、蛋黃粉水解液及蛋殼粉每日所餵飼之份量會有較正確之訂定，且也考慮其蛋殼膜膠原蛋白水解液、蛋黃粉水解液及蛋殼粉於活體內吸收之影響。以活體做實驗也可求初一安全劑量。

### 2. 醫學上之應用

若活體之研究能證實這些水解液之保健效果，則可應用於骨質疾病之預防。

### 3. 藥膳食品之開發

目前已有不同來源之膠原蛋白水解液製作成錠或保健食品於人體食用，若此水解液在將來之研究真正確認其具功效，不只解決國內外廢棄蛋殼處理成本及環境汙染之問題，亦也提高蛋殼膜之經濟效益，更可為平日飲食之保健食品。

## 伍、結論

本研究目的為探討蛋殼粉、蛋殼膜膠原蛋白水解液以及蛋黃水解液在類骨母細胞上之影響。

- (一) 在蛋殼膜萃取膠原蛋白方面，目前已可有效萃取其蛋殼膜中之膠原蛋白。
- (二) 細胞增生試驗：經胃蛋白酶水解 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液效果最為顯著，經胰蛋白酶水解 6 小時之蛋黃水解液效果也是最為顯著，其中又以胰蛋白酶水解 6 小時之蛋黃水解液最好。
- (三) 鹼性磷酸酶活性測試：經胃蛋白酶水解 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液若另外添加 0.1% 蛋殼粉在此次試驗有顯著效果；另經胰蛋白酶水解 6 小時之蛋黃水解液之效果若另在額外添加 0.1% 蛋殼粉其效果更為顯著。
- (四) 礦化節點分析試驗：將胃蛋白酶水解 8 小時之蛋殼膜膠原蛋白水解液、胰蛋白酶水解 6 小時之蛋黃水解液與 0.1% 蛋殼粉，三者有加乘效果，比只用水解液或水解液另外添加 0.1% 蛋殼粉效果來的好。至於其在兩者礦化染色試驗方面都有不錯的效果。

## 陸、參考文獻

- 林慶文，蛋之化學與利用。華香園。2000。87-92。
- 林興中，骨質疏鬆。台灣醫界。1995。38:34-38。
- 林興中，骨質疏鬆症。嘉義醫訊。1993。15:10-15。
- 林興中，骨質疏鬆症之最近發展。台灣醫界。1994。37(3):209-212。
- 姚維人，吳重慶，骨質疏鬆之成因。秀傳醫學雜誌。1994。1 (4):179-185。
- 洪雅萍，膠原蛋白產品的功效。科學發展。2004。380:30-35。
- 張天鈞，Bisphosphonate 與骨質疏鬆。當代醫學。1998。25(6):447-449。
- 張聖善，蛋品加工學。華香園。1999。4:68-78。
- Angele, P., J. Abke, R. Kujat, H. Faltermerier, D. Schumann, M. Nerlich. 2004. Influence of different collagen species on physic-chemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials*, 25. 2381-2841.
- Aubin, J. E., L. Malaval, F. Liu, and K. Gupta. 1995. Osteoblast and chondroblast
- Baker, J. R. and D. A. Balch. 1962. Studies of membrane, mammary cores and cuticle of the hen egg shell. *Biochem. J.* 32:352.
- Baylink, D. and J. Wergedal. Bone formation and resorption by osteocytes. 1997. Cellular Mechanisms for Calcium Transfer and Homeostasis (Ed. Nichols G, Wasserman R. H.) 257.
- Berridge, M. V. and A. S. Tan. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303:474-482.
- Bowers G. N. Jr. and R. B. McComb. 2000. A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. *Clin. Chem.*, 12, pp.70-89.

- Bowers, G. N. and R. B. McComb. 1966. A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. Clin. Chem. 12:70-89.
- Boyan, B. D., Z. Schwartz, L. F. Bonewald. 1989. Localization of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-responsive alkaline phosphatase in osteoblast-like cells (ROS 17/2.8, MG63, and MC3T3) and growth cartilage cells in culture. J Biol. Chem. 264:11879-11886.
- Brayboy, T. R., X. W. Chen, Y. S. Lee. 2001. The protective effects of Ginkgo biloba extract (Egb 761) against free radical damage to osteoblast-like bone cells (MC3T3-E1) and the proliferative effects of Egb 761 on these cells. Nutr Res. 21:1275-1285.
- Buuneli, N., G. Atilla, G. Güner, and G. Oktay. 2001. Biochemical analysis of total collagen content and collagen types I, III, IV, V and VI in gingiva of various periodontitis categories. Journal of the international academy of periodontology. 3(1):1-6.
- Cameron, J. R. and J. Sorenson. 1963. Measurement of bone mineral in vivo: and improved method. Science. 142:230-232.
- Christenson, R. 1992. Biochemical marker of bone metabolism: an overview. Clin Biochem 30: 573-593.
- Chvapil, M. and L. R. Kronenthal, Van. Winkle-Jr. 1973. W, Medical and Surgical Applications of Collagen. International Review of connective tissue research. Academic press. New York. pp1-61.
- Coelho, M. J., A. T. Cabral, M. H. Fernandes. 2000. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in  $\alpha$ -MEM and in DMEM. Biomaterials. 21:1087-1094.

- Coelho, M. J., A. T. Carbral, and M. H. Fernandes. 2000. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials*. 21:1095-1102.
- Dai, J., D. Lin, J. Zhang, P. Habib, P. Smith, J. Murtha, Z. Fu, Z. Yao, Y. Qi and E. T. Keller. 2000. Chronic alcohol ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 in mice. *J Clin. Invest.* 106(7):887-895.
- Deyl, Z., I. Mikšík. 2000. Advanced separation methods for collagen parent  $\alpha$ -chains, their polymers and fragments. *Journal of Chromatography B*. 739, 3-31.
- differentiation. *Bone*. 17 : 77s-83s.
- Eriksen, E. and Kassem M. 1992. The cellular basis of bone remodeling. *Triangle*, 31:45-57.
- Franceschi, R. T., W. M. James, and G. Zerlauth. 1985.  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 specific regulation of growth, morphology, and fibronectin in a human osteosarcoma cell line. *J. Cell. Physiol.* 96:191-198.
- Ganong, W. 1997. Hormonal control of calcium metabolism and the physiology of bone. *Review of Medical Physiology* (Ed. Ganong W.F.):359-371.
- Ganta, D. R., McCarthy M. B. and Gronowicz G. A. Ascorbic acid alters collagen integrins in bone culture. *Endocrinology*, 138, pp. 3606-3612.
- George, J. M., R. P. Carmen. 1984. Poultry products technology. Third Edition. Food products press. Pp353-385. New York. Haworth Press.
- Gilbert, A. B. 1971. In physiology and biochemistry of domestic fowl, Vol. 3 (Ed Bell, D. J. and B. M. Freeman). P1291, Academic Press.
- Guillerminet, F. H. Beaupied, V. Fabien-Soulé, D. Tomé, C.-L. benhamou, C. Roux, and A. Blais. 2010. Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: An in vitro and in vivo study.

Bone 24:827-834.

Harris, E. D., J. E. Blount, and R. M. Leach, Jr. 1980. Localization in eggshell membrane formation and composition. *Science* 208:55-56.

Henry K. L. and Norman A. W. 1995. Vitamin D: Metabolism and biological actions. A syndrome *Lancet*. 268:431-434.

Heremans, H., A. Billiau, J. Cassiman, J. C. Mulier, and P. DeSomer. 1978. In vitro cultivation of human tumor tissues II. Morphological and virological characterization of three cell lines. *Oncology*. 35:246-252.

Huether, S. E. and K. L. McCance. 2000. *Understanding Pathophysiology*. Second edition.

Huether, S. E., K. L. McCance. 1989. *Endocrinology and metabolism clinics of north America-metabolic bone disease, part I (18) : no.4.*

Huiying, L. I., N. Tsuneo, T. Takahiro, L. I. Jianxin, M. Tatsuro, P. J. Kumar, T. Syuichi, T. Yasuhiro, K. Shiqetoshi, and S. Hikaru. 1998. *Understanding Pathophysiology*. Antiosteoporotic activity of the steams of *Sambucus sieboldiana*. *Biol Pharm Bull*. 21(6):594-598, Mundy G. R. 1999. *Bone remodeling and its disorders*. Martin Dunitz, 2nd edition, USA. 356-372.

Im, G.-I., S. A. Qureshi, J. Kenney, H. E. Rubash, and A. S. Shanbhag. 2004. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials*. 25:4105-4115.

John, W. G. 1980. *Collagen : the anatomy of a protein*. *Studies in biology* No.117:1-53.

Kader, K. E., D. F. Holmes, J. A. 1996. Trotter and J. A. Chapman. Collagen fibril formation. *Biochem J*. 316 (pt 1):1-11.

Karl, E. K., K. E. Kadler, D. F. Holmes, J. A. Trotter, and J. A. Chapman. 1996. Collagen fibril formation. *Biochem. J*.316, 1-11.

Kimble, R. B., A. K. Høgåsen, L. Nordsletten, A. O. Aasen, and J. A. Falch. 1995. There

- is no difference in spontaneous and 17 beta-estradiol-induced interleukin-1 beta release by peripheral blood mononuclear cells from nonosteoporotic women with different rates of early postmenopausal bone loss. *Endocrinology*. 136(7):3054-3061.
- Lee, C. H., A. Singla and Y. Lee. 2001. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm*. 221. 1-22.
- Lee, W. 1997. Skeletal tissue. *Principles of anatomy and physiology* (Ed. Lee Liu, S. H., R. S. Yang, R. Shaikh, and J. M. Lane. 1995. Collagen in tendon, ligament, and bone healing. *Clin Orthop*.318:265-278.
- Majeska, R. J. and G. A. Rodan. 1982. The effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on alkaline phosphatase in osteoblastic osteosarcoma cells. *J. Biol. Chem*. 257: 3362-3365.
- Manolagas, S. C., D. W. Burton, and L. J. Deftos. 1981. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> stimulates the alkaline phosphatase activity of osteoblast-like cells. *J. Biol. Chem*. 256:7115-7117.
- Moskowitz, R. 2000. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. W. B. Saunders Company.
- Nesheim, M. C., R. E. Austic. and L. E. Card. 1979. *Poultry production*, 12th ed. P46 Lea and Febiger.
- Posner, A. 1987. Bone mineral and the mineralization process. *Bone Mineral Research* (Ed. Peck W. A.) Vol:5-65.
- Riggs, B. L., L. J. Melton 1992. 3rd : The prevention and treatment of osteoporosis. *N Engl J. Med*. 327(9):620-627.
- Romanoff, A. L. and A. J Romanoff. 1949. *The avian egg*. John Wiley and Sons, New York.
- Shing-Chuan Shen. 2002. In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin,

- quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production. *European Journal of Pharmacology*. 446:187-194.
- Sikavitsas, V. I., J. S. Temenoff, A. G. Mikos. 2001. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*. 22 : 2581-2593.
- Simkiss, K. and T. G. Taylor. 1973. In physiology and biochemistry of domestic fowl, D. J. Bell and B. M. freeman (Editors), Vol. 3, Academic Press, New York.
- Stein, G. S., J. B. Lian, J. L. Stein, A. J. Van Wijnen, M. Montecino. 1996. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol. Rev.* 76:593-629.
- Suguro, N., S. Horiike, Y. Masuda, M. Kunou and T. Kokubu. 2000. Bioavailability and commercial use of eggshell calcium, membrane proteins and yolk lecithin products. Page 219-220 in *Egg Nutrition and Biotechnology*. J. S. Sim, S. Nakai and W. Guenter, ed. CAB international, JP.
- Szmuckler-moncler S., Dean D. D. and Schwartz Z., Titanium surface roughness alters responsiveness of MG-63 osteoblast-like cells to 1  $\alpha$ ,25-(OH)2D3. *J. Biomed. Mater. Res.*, 39, pp.77-85.
- Takahashi K., Ghatei M. A. 1993. Presence of endothelin immunore-activity in human osteoblast cell in culture medium. The 4th international symposium on osteoporosis and consensus development conference, Hong Kong, 27 March-2April, 522.
- Tortora, G. J. 1999. *Principles of human anatomy*. Benjamin/ Cummings Science Publishing, 8th edition, USA, 547-562.
- U.S.D.A., Department of agriculture. 1968. *Egg grading manual*. U.S.D A., Washington, D.C.
- Viguet-Carrin, S., P. Garnero, P. D. Delmas. 2006. The role of collagen in bone strength.

Osteoporos Int. 17:319-336.

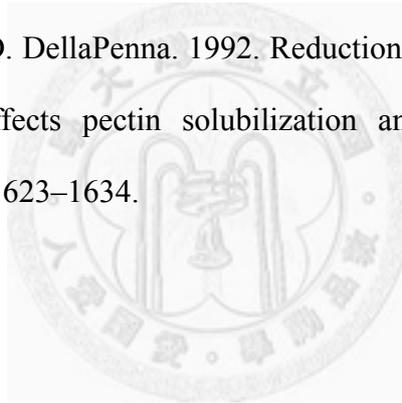
Werkmeister, J. A. and J. A. M. Ramshaw. 2000. Immunology of collagen-based biomaterials. In D. L. Wise (Ed.), Biomaterials and bioengineering handbook. pp 739-759. New York. Marcel Dekker.

Wong, M., M. J. C. Hendrix, K. Mark, C. Little, and R. STERN. 1984. Collagen in the egg shell membranes of the hen. Dev. Biology. 104:28-36.

Yao, W.-J. and C.-C. Wu. 1999. Recent advances in bone density measurement. Show-Chwan Med. J. 1(4):179-185.

Young, M. F. 2003. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. Osteoporos Int. 14:S35-S42.

Zheng L., C. Watson, and D. DellaPenna. 1992. Reduction to tomato polygalacturonase subunit expression affects pectin solubilization and degradation during fruit ripening. Plant Cell 6: 1623–1634.



## 柒、作者小傳

作者係桃園縣中壢市人。畢業於桃園縣平鎮市復旦高中。民國九十五年考取大葉大學生物產業科技學系，民國九十九年畢業，同年考取國立台灣大學動物科學技術學系碩士班生產技術組。在學期間，於恩師 蘇和平博士悉心指導下完成本論文，並於民國一百年十二月三日獲得中國畜牧學會壁報組之論文新人獎。

