

鋸齒麒麟菜 (*Eucheuma serra*) 於骨質保健之研究

易琮凱·杜明杰·蔡慧君*

行政院農業委員會水產試驗所水產加工組

摘 要

在生物體中，骨骼的維持是一個循環性的修建工程，包含骨質生成 (bone formation) 及骨流失 (bone resorption)。鋸齒麒麟菜 (*Eucheuma serra*) 為臺灣大宗食用藻類原料，富含鈣質與植化素，因此本研究旨在探討其酵素水解物作為骨質保健素材的可行性與作用機轉。首先分析麒麟菜組成，發現其豐富的鈣質 (1.29 ± 0.06 g/100 g) 可滿足國人 1 日鈣的攝取量，同時也含有 23.11 ± 0.08 g 硫酸多醣可協同促進骨生成作用。MG-63 造骨細胞實驗發現， 0.625 mg/ml 麒麟菜酵素水解物，可顯著提升細胞中第一型膠原蛋白與鹼性磷酸酶分別達 154.36% ($p < 0.05$) 與 164.43% ($p < 0.05$)，顯示具有促進骨母細胞成熟分化為硬骨細胞及生成骨基質的能力。噬骨細胞試驗證實， $250 - 500$ μ g/ml 麒麟菜酵素水解物不僅可調降噬骨細胞成熟與分化相關基因如核因子 κ B 受體 (receptor activator of nuclear factor kappa-B)、T 細胞活化核因子 (nuclear factor of activated T-cells) 和樹突細胞特異性跨膜蛋白 (Dendrocyte expressed seven transmembrane protein) 等 mRNA 表現量為控制組之 $0.11 - 0.06$ ； $0.24 - 0.10$ 和 $0.75 - 0.50$ 倍，同時細胞核的染色結果顯示抑制形成成熟多核的噬骨細胞，並對細胞酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase) 活性呈現劑量性的抑制作用，其中 500 μ g/ml 麒麟菜酵素水解物調降 B 細胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma 2) 抗凋亡基因 mRNA 表現量為對照組 0.45 倍，並提高 BCL-2 相關 x 蛋白 (BCL-2-associated x protein) 促凋亡基因 mRNA 表現量達對照組 2.91 倍，此等結果顯示麒麟菜酵素水解物會抑制噬骨母細胞的分化成熟與骨基質中鈣磷礦化物的分解，另對成熟噬骨細胞也會啟動細胞凋亡阻斷噬骨作用，進而緩解骨質流失。在摘除卵巢誘導骨鬆大鼠動物模式則確效，以 500 mg/kg/day 連續投餵 6 週後，可提升試驗鼠血清中骨源鹼性磷酸酶 (bone-specific alkaline phosphatase) 含量 (0.19 ± 0.03 ng/ml) 與降低第一型膠原蛋白之氮末端肽鏈含量 (4.69 ± 1.80 μ mol/ml)，表示具有促進骨質生成和抑制骨質流失的作用；同時提升骨質密度 (bone mineral density) 值，並如同市售骨鬆治療藥物 (福善美保骨錠)，皆具有提高骨鬆鼠股骨之骨小樑厚度與面積以及減少骨小樑間隙。另麒麟菜酵素水解物經由基因毒性試驗則証實本身及其代謝產物皆不具致突變性；口服急毒性則驗證其半數致死劑量 (median lethal dose, LD₅₀) 大於 1 g/kg BW，基此，以骨鬆動物模式驗證麒麟菜酵素水解物有效濃度 500 mg/kg/day 劑量換算成人每日建議攝取量為 4.8 g。

關鍵詞：鋸齒麒麟菜、造骨細胞、噬骨細胞、骨質疏鬆症

前 言

麒麟菜屬於近海淺水區大型紅藻，藻體呈暗紅色或黃白色，型態為扁圓柱狀或扁平分枝狀，表面有許多短枝狀突起 (梁等, 2005)，廣泛分布於熱帶及亞熱帶之暖水域，如馬來西亞、印尼、澳洲北

部與菲律賓，在臺灣主要品種為鋸齒麒麟菜 (*Eucheuma serra*) (曾與陳, 1977)。鋸齒麒麟菜在分類學上屬於紅藻門 (Rhodophyta)、真紅藻綱 (Florideophyceae)、杉藻目 (Gigartinales)、紅翎菜科 (Solieriaceae)，俗稱為珊瑚草、海燕窩及雞腳菜。在臺灣產於各地海岸及離島，主要生長於亞潮帶 10 m 深礁岩上，尤其喜歡叢生在潮流強勁的海域 (Sudirman *et al.*, 2019)，全年均可見，尤以三至六月為盛產期，是重要經濟海藻，具有食用、除蟲及製作卡拉膠 (White and Wilson, 2015) 等用途。

* 通訊作者 / 基隆市中正區和一路 199 號, TEL: (02)2462-2101 ext. 2601; FAX: (02) 2463-2677; E-mail: hjchai@mail.tfrin.gov.tw

骨質疏鬆症 (osteoporosis) 是一種因骨質密度 (bone mineral density; BMD) 下降而令骨折風險提高的疾病 (Yang *et al.*, 2010), 患者血液中可發現大量分化的噬骨細胞, 進而誘導 T 細胞活化核因子 (nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1; NFATc1), 故 NFATc1 屬於噬骨細胞生成的關鍵因子以及調控噬骨細胞分化的相關基因。另在細胞融合過程中, 樹突細胞特異性跨膜蛋白 (Dendrocyte expressed seven transmembrane protein; DC-STAMP) 基因的內化、修飾並潛進細胞質內, 都屬於噬骨細胞融合的必經過程。造骨細胞分泌之核因子 κ B 配體受體激活劑 (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; RANKL) 及巨噬細胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor; M-CSF) 可作用於前驅噬骨細胞膜上的穿膜糖蛋白受體酪胺酸酶 (transmembrane glycoprotein receptor tyrosine kinase; c-Fms) 並與核因子 κ B 受體 (receptor activator of nuclear factor kappa-B; RANK) 結合, 誘導前驅噬骨細胞分化為 20-100 μ m 且含 4-20 個細胞核之直徑巨大的成熟多核細胞, 並促進抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP) 以及組織蛋白酶 K (cathepsin K)、基質金屬蛋白酵素-9 (matrix metalloproteinase-9; MMP-9)、三磷酸腺苷酶 (ATPase) 等參與細胞融合之酵素的分泌, 導致骨質蝕損 (Morris *et al.*, 2006)。

藻類富含海藻多醣、海藻胺酸、高度不飽和脂肪酸及多種微量元素等具有調節生理作用的活性物質 (陳, 2007)。麒麟菜多醣萃取物具有調節發炎的能力, 可應用於癌症的抑制 (楊等, 2002), 海藻的多樣微量元素有助於人體吸收 (Clarke and Walsh, 2014), 能加速骨質鈣化 (Clarke *et al.*, 2011); 海藻硫酸聚醣 (Kim *et al.*, 2014) 與活性胜肽有抑制噬骨細胞活性的作用 (Kita and Uemura, 2006; Jo *et al.*, 2017)。陳等 (2018) 利用體外細胞模式則發現麒麟菜酵素水解物可促進 MG-63 骨細胞增生, 並抑制噬骨細胞數, 顯示可發展為保骨素材的潛力。Ha *et al.* (2021) 則指出褐藻色素 (fucoxanthin) 能經由調節有絲分裂原活化的蛋白激酶 (MAPK) 及核轉錄紅細胞相關因子 2 (Nrf2) 的細胞訊息傳導來抑制噬骨細胞新生, 具有治療

骨鬆或是類風溼性關節炎的潛力。基此, 本研究先以細胞試驗探討鋸齒麒麟菜酵素水解物對骨質的生成與蝕損之影響, 包含成熟造骨細胞中第一型膠原蛋白與鹼性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP)、噬骨細胞凋亡因子噬骨細胞凋亡因子 B 細胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma 2; BCL-2) 和 BCL-2 相關 x 蛋白 (BCL-2-associated x protein; BAX) 表現, 以及使噬骨細胞成熟所需基因調控的相關蛋白如 NFATc1、DC-STAMP 和 RANK 等變化。另再進行食用安全性評估與動物確效試驗, 期能高值化利用麒麟菜, 提升海藻產業價值鏈。

材料與方法

一、實驗樣品採集與前處理

鋸齒麒麟菜原料於 11-3 月購買自澎湖縣養殖戶黃先生, 攜回實驗室後以淡水反覆沖洗, 去除鹽分、附生植物和小石子後, 烘箱乾燥使水分含量至 15% 以下 (水活性約 0.5), 再經均質機粉碎成粉末, 保存於乾燥箱中備用。

二、實驗方法

(一) 鋸齒麒麟菜成分分析

1. 一般成分分析

依照 AOAC (2016) 方法分析樣品之水分、粗蛋白、粗脂肪、灰分與碳水化合物含量。

2. 硫酸基含量測定

依據 Terho and Hartiala (1971) 方法, 以 sodium rhodizonate 與鋇離子 (Ba^{2+}) 產生紅棕色, 當溶液中含有無機的硫酸根會形成硫酸鋇, 因而減少紅棕色之生成量。含硫多醣經 1.0 N HCl (Showa, Japan) 分解後即可測得多醣中的硫酸基含量。

(1) 試劑

製備 $BaCl_2$ 緩衝液: 2 M acetic acid 10 ml, 5 μ M $BaCl_2$ 2 ml 及 20 μ M $NaHCO_3$ 8 ml, 以絕對乙醇定質量至 100 ml; Na-rhodizonate solution: 5 mg Na-rhodizonate and 100 mg L-ascorbic acid 溶解於 20 ml

之蒸餾水中，以絕對乙醇定量至 100 ml，此試劑具光敏感性必須遮光處理。以 2 - 12 g/ml Na_2SO_4 作為標準建立標準曲線。

(2) 樣品處理

所有樣品總糖含量均調整至 10 mg/ml，然後將 0.5 ml 的 1 N HCl 加入 0.5 ml 之樣品液中，煮沸 1 hr，藉由真空濃縮處理 (60 - 65°C) 移除所有溶劑，然後加入 0.5 ml 去離子水。

(3) 硫酸根測定

將 2 ml 純乙醇加入 0.5 ml 樣品液中，以離心處理 (2500 xg) 去除不溶性蛋白質，然後加入 BaCl_2 緩衝液再加入 1.5 ml Na-rhodizonate 置於暗處反應 10 min，於 30 min 內以波長 520 nm 測定吸光值。

3. 鈣含量測定

參考中華民國國家標準 (CNS) 檢驗法 (經濟部標準局, 2013)，將麒麟菜高溫灰化後，以鹽酸水解之灰分與草酸銨溶液反應生成草酸鈣沉澱，沉澱之草酸鈣經硫酸分解後以過錳酸鉀標準溶液滴定，並以鈣標準溶液訂出標準曲線，以內插法估算出鈣的含量。

(1) 試劑

配置 25% HCl、2% $(\text{NH}_4)\text{OH}$ 、50% $(\text{NH}_4)\text{OH}$ ，並秤取 6.6982g 乾燥 $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 定容至 1 L；取 4.2 g CaC_2O_4 加入 100 ml 二次水配置為飽和草酸鈣；取 1 g methyl red 加入 200 ml 酒精配置為甲基紅指示劑；0.9 M 硫酸；取 3.2 g KMnO_4 於 1 L 二次水中加熱沸騰，並使其持續 1 h 後加蓋，室溫中隔夜冷卻，以細孔之玻璃過濾器抽氣過濾，並以棕色瓶密封保存，作為 0.1 N KMnO_4 標準液。

(2) 過錳酸鉀溶液之標準

取已配置之 25 ml $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 溶液，以 20 ml 之 0.9 M 硫酸與 100 ml 二次水溶解，加熱至 70°C，再以 0.1 N KMnO_4 緩慢加入滴定，至粉紅色能維持 30 秒不變，即達滴定終點。並以此扣除空白滴定值後計算 0.1 N KMnO_4 標準液之力價。

(3) 樣品鈣含量測定

樣品以 600°C 高溫灰化爐灰化 8 hr 後，取 2.4 g 樣灰化樣品，並加入 40 ml 25% HCl 與 1 ml HNO_3 ，煮沸 20 min 後，過濾定容至 250 ml；從中取 25 ml 試液並加入 75 ml 二次水及 2 滴甲基紅指示劑，以 25% HCl 與 50% $(\text{NH}_4)\text{OH}$ 調整至赤橙色 (pH 約為 5.6)，加入 50 ml 二次水煮沸，再加入 10 ml 飽和草酸鈣，待確認顏色轉為橙黃色後加入數滴 25% HCl 調整至粉紅色，並於室溫下靜置一夜。以 NO.5C 濾紙過濾，並以 2% $(\text{NH}_4)\text{OH}$ 洗滌確認無殘留，將含沉澱物之濾紙放入燒杯，加入 125 ml 二次水與 5 ml 0.9 M 硫酸，加熱至 70°C，再以 0.1 N KMnO_4 緩慢加入滴定，至粉紅色能維持 30 sec 不變，即達滴定終點。以此扣除空白滴定值後計算鈣量。

$$\text{Ca} (\%) = 2 \times (A - B) \times f / w$$

A 為樣品消耗 0.1 N KMnO_4 體積；B 為空白試驗消耗 0.1 N KMnO_4 體積；f 為 0.1 N KMnO_4 標準液之力價；w 為樣品重量。

(二) 酵素水解物製備

乾燥麒麟菜粉末加二次水以高熱水解 20 min，冷卻後添加 1% 醱酵酵素水解 24 hr，再於 4°C 下以 7,000 rpm 離心 10 min，再經抽氣過濾取得上清液，經冷凍乾燥機凍乾製成水解物樣品 (產率約 30 - 35%) 置乾燥箱備用。

(三) 人類類造骨細胞 MG-63 (human osteoblast-like cells) 之培養

1. MG-63 細胞活化

人類類造骨細胞 MG-63 購自新竹食品工業研究所菌種中心 (BCRC number 60279)。將細胞懸浮液加入培養盤內，再加入含有 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) 及 1% (v/v) penicillin-streptomycin (10,000 U/ml penicillin and 10,000 mg/ml streptomycin in 0.85% saline) 的 DMEM 培養基，混合均勻後於 37°C，5% CO_2 培養箱培養 24 hr，確定細胞良好貼附，去除培養基改加入新培養基擴養。

2. MG-63 細胞之繼代培養

參照食工所操作方法培養。當 MG-63 細胞密度達 8 分滿時，移去培養基，用 PBS 洗滌細胞 1-

2 次後移去 PBS，加入 Trypsin EDTA 溶液於 37°C 反應 3 min 後，待細胞自壁上脫落或輕拍培養瓶，加入新培養基 (含 10% FBS) 於 4°C 下以 500 xg 離心 5 min 去除上清液，加入新培養基並輕輕將細胞沖散，移至新的培養瓶且使細胞分散均勻，於 37°C，5% CO₂ 培養箱培養約三天繼代一次。

(四) 造骨細胞分化指標測試

1. ALP 活性分析

參照 Huang *et al.* (2011) 方法測定。將 50 μ L MG-63 細胞 (1×10^4 cells/well) 種入 96 孔盤，待細胞貼附後，加入 50 μ L 不同濃度 (0、0.313、0.625、1.25、2.5、5、10 mg/ml) 麒麟菜酵素水解物於培養基中，培養二天後用 PBS 清洗兩次，再加入 pNPP 溶液 (Sigma, N2770) 200 μ L，室溫避光 30 min，再加入 3M NaOH 50 μ L，於 405 nm 測定吸光值。

2. 第 I 型膠原蛋白 (procollagen type I) 含量分析

膠原蛋白參照 TaKaRa MK101 (procollagen type I C-Peptide) kit 方法測定 (Wiechec, 2012)。將麒麟菜酵素水解物以 DMEM 培養液分別配成 0、0.313、0.625、1.25、2.5、5、10 mg/ml 等不同濃度，再將 50 μ L 細胞以 1×10^4 cells/well 種入 96 孔盤中，待細胞貼附後，加入 200 μ L 含麒麟菜酵素水解物的培養基培養二天。取 100 μ L antibody-POD conjugate solution 及 20 μ L 樣品於 96 孔盤中搖晃均勻並於 37°C 反應 3 hr，吸除反應液，再以 PBS 清洗 4 次，加入 100 μ L substrate solution，室溫下反應 15 min 後加入 100 μ L stop solution，於 450 nm 測定吸光值。

(五) 小鼠噬骨細胞培養與分化

1. RAW 264.7 細胞活化

RAW 264.7 (ATCC No. TIB-71) 源自於 BALB/c 小鼠單核球的巨噬細胞株，購自食品工業發展研究中心。將 RAW 264.7 細胞懸浮液加入培養盤內，再加入含有 10% (v/v) FBS 及 1% (v/v) penicillin-streptomycin (10,000 U/ml penicillin and 10,000 mg/ml streptomycin in 0.85% saline) 的 DMEM 培養基，混合均勻後於 37°C、5% CO₂ 培

養箱培養 24 hr，確定細胞良好貼附，去除培養基改加入新培養基擴養。

2. RAW 264.7 細胞之繼代培養

參照食工所操作方法培養。當 RAW 264.7 細胞密度達單層 8 分滿時，移去培養基，用 PBS 洗滌細胞 1 - 2 次後移去 PBS，再加入 PBS 新溶液，輕刮培養壁上貼附之細胞，再於 4°C 下以 500 xg 離心 5 min 去除上清液，加入新培養基並輕輕將細胞沖散，移至新的培養瓶中且使細胞均勻分散，於 37°C、5% CO₂ 培養箱培養，約三天繼代一次。

3. 以 RANKL 誘導 RAW 264.7 細胞分化為成熟噬骨細胞

當造骨細胞上的核因子 κ B 配體的受體激活劑 (RANKL) 與 RAW 264.7 巨噬細胞上的核因子 κ B 的受體 (RANK) 結合後，促使巨噬細胞開始分化成噬骨細胞 (Katopodis *et al.*, 2009)。將 2×10^4 cell/mL 巨噬細胞於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養至細胞貼附後，去除培養液，更換成不含胎牛血清 (serum free) 之 DMEM 培養液，再加入不同濃度之麒麟菜酵素水解物與 20 ng/mL RANKL 及 33.3 ng/mL M-CSF 分化劑共培養 72 - 96 hr，誘使單核球轉型成噬骨細胞，移除細胞上清液，分析進行細胞活存率、細胞染色和抗酒石酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP) 活性分析。

(六) 麒麟菜酵素水解物對噬骨細胞成熟分化之影響

1. 麒麟菜酵素水解物對噬骨細胞內 NFATc1、DC-STAMP 和 RANK 等 mRNA 表現量之影響

參考 Zhao *et al.* (2020) 方法。將 100 μ L RAW 264.7 細胞 (3×10^4 cell/well) 種入 6 孔盤，待細胞貼附後，分別加入分化劑 (50 ng/ml RANKL 和 20 ng/ml M-CSF)，以及不同濃度 (0、5、50、250、500 μ g/ml) 麒麟菜酵素水解物，於 37°C、5% CO₂ 的培養箱培養 96 hr 後，去除培養基加入 BIO-RAD iScript. RT-qPCR Sample Preparation Reagent 並收集上清液，使用 iScript cDNA synthesis kit 反轉錄成 cDNA，再利用 iTaq Universal SYBR Green Supermix 染劑進行 RT-PCR 反應 (分析條件: DNA

denaturation 95°C/30 sec, amplification denaturation 95°C/5 sec, annealing 60°C/30 sec, 35 cycles, melt-curve 65 – 95°C increment 5 sec)。

2. TRAP 活性評估

將 20 μ L RAW 264.7 細胞 (5×10^3 cell/well) 種入 48 盤待細胞貼附後，加入分化劑 (50 ng/ml RANKL 和 20 ng/ml M-CSF) 以及不同濃度 (0、5、50、250、500 μ g/ml) 麒麟菜酵素水解物，於 37°C、5% CO₂ 的培養箱培養 96 hr 後，去除培養基後再加入 0.1M 氫氧化鈉 150 μ L，於 37°C、5% CO₂ 的培養箱培養 24 hr 後，分以 acid phosphatase kit 染色測定活性，並另以顯微鏡觀察麒麟菜酵素水解物對噬骨細胞細胞核染色之影響。

3. 麒麟菜酵素水解物對噬骨細胞 BCL-2 和 BAX 凋亡基因 mRNA 表現量之影響

將 100 μ L RAW 264.7 細胞 (3×10^4 cell/well) 種入 6 孔盤，待細胞貼附後，分別加入分化劑 (50 ng/ml RANKL 和 20 ng/ml M-CSF)，以及不同濃度 (0、5、50、250、500 μ g/ml) 麒麟菜酵素水解物，於 37°C、5% CO₂ 的培養箱培養 15 min 後，去除培養基加入 BIO-RAD iScript RT-qPCR ample Preparation Reagent 並收集上清液，使用 iScript cDNA synthesis kit 反轉錄成 cDNA，再利用 iTaq Universal SYBR Green Supermix 染劑進行 RT-PCR 反應。

(七) 安全性試驗

1. 口服急毒性試驗 (IACUC 核准之計畫書編號 110-1k)

Sprague-Dawley (SD) 大鼠藉由單次口服投予麒麟菜酵素水解物，評估是否引起大鼠急毒性症狀。將 6 隻 8 週齡 SD 雌性大鼠分為等量的兩組，每組動物投藥前體重，介於前一組投藥動物體重平均體重 $\pm 20\%$ ，在第一組試驗動物 (A) 投餵最大劑量後，觀察 48 hr 後，投餵第二組試驗動物 (B)，若第一組死亡數 > 1 ，則第二組調降最大投餵劑量。參考衛生福利部食品藥物管理署非臨床試驗優良操作規範 (2019)，將麒麟菜酵素水解物 (試驗物質) 以 1 g/kg body weight (BW) 為試驗起

始劑量，並配製成 25 mg/ml 試驗物質水溶液，試驗動物經 16 hr 禁食後，以口服投予體積 20 ml/kg BW 的試驗物質於 24 hr 內投餵 2 次，投予試驗物質後 4 hr 給予食物，並於投予試驗物質後第 30 min 和 4 hr 各進行 1 次臨床觀察，之後每天 1 次連續觀察至第 14 天，觀察期間紀錄大鼠體重和臨床症狀，並於第 14 天犧牲大鼠後解剖，以肉眼進行病變檢查。

2. 沙門氏菌回復突變試驗

參考細菌基因突變測試法 (gene mutation in bacteria) 使用沙門氏菌系列 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537 等 5 種菌株 (衛生福利部食品藥物管理署, 2020)。單一試驗菌株皆進行陰性對照組、陽性對照組及最大劑量 1.25 mg/plat 之試驗組，另因沙門氏菌系列之突變種缺乏類似哺乳類體內的代謝酵素系統，故另加入大鼠之肝臟均質混合液 (S9) 進行二重複試驗。分取 10 μ L 試驗菌液，加入 10 ml NB No.2 培養液在 37°C 培養箱內，以迴旋震盪器 120 rpm 轉速搖瓶培養 14 hr，並將 100 μ L 菌液分別與 100 μ L 試驗組別進行平板混合試驗，另於 37°C 培養箱內培養 72 hr 後，記錄每盤培養皿中突變菌落數。

(八) 骨鬆評估動物試驗

參照健康食品之骨質保健功效評估方法 (2013) 進行，實驗動物管理及使用委員會 (IACUC) 核准之計畫書編號 WPB-2021-02。試驗動物為 24 隻切除卵巢之 12 週齡雌性 SD 大鼠，隨機分成等量四組，每組動物體重不具顯著差異，飼養環境溫度為 $23 \pm 3^\circ\text{C}$ ，濕度控制 $50 \pm 20\%$ ，並以自動化光照控制系統維持每日 12 hr 恆亮、12 hr 恆暗。試驗動物飲用水係為自來水分注入塑膠瓶後滅菌，大鼠於試驗期間不限制攝食與飲水。試驗組別分為以下四組：G1 溶液對照組，口服投予飲用水，作為疾病模式對照組；G2 低劑量組，口服投予 250 mg/kg/day 麒麟菜酵素水解物；G3 高劑量組，口服投予 500 mg/kg/day 麒麟菜酵素水解物；G4 參考物質組，口服投予 7 mg/kg/week 市售福善美保骨錠。G2 及 G3 試驗組使用劑量係參考細胞試驗以 250 μ g/ml 和 500 μ g/ml 經單位換算；G4 試

驗組參考藥物使用規範及 FDA 健康食品功效評估試驗餵食劑量之公式以 6.25 比值換算大鼠使用劑量。實驗為期 6 週，大鼠連續口服投予試驗物質，每天觀察動物，每週量測體重。最終實驗於第 43 天結束，採集各試驗組大鼠血液與左右兩側大腿骨（股骨），並將血清進行骨源鹼性磷酸酶（bone-specific alkaline phosphatase；B-ALP）及第一型膠原蛋白之氮末端肽鏈（cross link N-telopeptide；NTx）含量分析。左側大腿骨以微電腦斷層掃描儀（Micro CT, Bruker Skyscan 1176）及分析軟體進行 BMD 量測；右側大腿骨則先固定於 10% 中性福馬林液中，製作石蠟切片並經蘇木精-伊紅（H&E）染色，由獸醫病理師進行股骨組織病理學之分析與評估，相關實驗步驟如下述：

1. 骨質疏鬆生物血清指標分析

實驗動物分別於試驗起始日（Day 0）以尾靜脈採血 1 ml，及試驗解剖日（Day 43）以心臟採血約 3 - 5 ml，經離心後收集血清進行分析。第一型膠原蛋白之 NTx 以市售 ELISA kit (rat cross linked N-telopeptide of type 1 collagen (NTx) ELISA KIT, MyBiosource, Inc., USA) 進行分析；B-ALP 則以市售 ELISA kit (rat bone-specific alkphase B (ALP-B) ELISA Kit, MyBiosource, Inc., USA) 進行分析。

2. BMD 評估

動物以過量二氧化碳（CO₂）進行安樂死後，每隻大鼠採集左側大腿，並以微電腦斷層掃描儀及分析軟體進行 BMD 分析。

3. 骨組織病理學分析

每隻犧牲大鼠採集右側大腿置入 10% 中性福馬林固定，經脫鈣、脫水、包埋，以及切片後，以 H&E 染色，並由獸醫病理師判讀股骨骨小樑與型態學的變化，並使用 Image J 分析軟體，分析與量測股骨骨小樑厚度（ μm ）和骨小樑面積（%）。

(九) 統計分析

實驗數據以 SPSS 軟體 (12.0.1C, 2000) 進行統計分析，並以 ANOVA (analysis of variance) 法探討樣品之間是否具有顯著差異，當 F 值為顯著時，再以 Duncan's test 測定組與組間差異顯著性， $p < 0.05$ 即視為具顯著性差異。各組間統計結

果以英文字母表示，不同英文字母代表彼此間具有顯著差異。

結果與討論

一、鋸齒麒麟菜之成分分析

每 100 g 鋸齒麒麟菜組成中以碳水化合物（ 52.22 ± 0.05 g）含量較高，粗灰分（ 22.15 ± 0.07 g）次之，另有 1.29 ± 0.06 g 鈣，與 23.11 ± 0.08 g 硫酸多醣（Table 1），此結果相較於游（2012）和王（2009）之鋸齒麒麟菜和耳突麒麟菜（*Eucheuma cottonii*）的灰分量為 32.97 g 與 49.88 g 差異較大，可能係因品種、採收地點和時間不同所致。麒麟菜可提充足的鈣源且海藻中的鈣常與鎂、鋅、鐵等元素共存，在臨床上可令骨質呈現更好的礦化表現（Lou *et al.*, 2010），而大型藻類的硫酸多醣則被指出可具有抑制噬骨細胞的分化作用（Nguyen *et al.*, 2011）。

Table 1 The composition and constituents of *Eucheuma serra* in close proximity

Compositions	Content (g / per 100 g)
Water	13.77 ± 0.05
Protein	11.65 ± 0.05
Lipid	0.21 ± 0.05
Ash	22.15 ± 0.07
Carbohydrate	52.22 ± 0.05
Calcium	1.29 ± 0.06
Sulfated polysaccharide	23.11 ± 0.08

All data are shown as the mean \pm SD (n = 3)

二、造骨細胞分化指標測試

骨質生成時，造骨細胞分化為硬骨細胞並參與礦化作用（何, 2004），在進行分化或鈣化時，硬骨細胞會降低製造骨基質的能力，並大量合成 ALP（Tsai *et al.*, 2012）。骨基質係由有機基質（organic matrix）及礦物質所構成。有機基質可分為膠原蛋白（collagen）及非膠原蛋白（non-collagen），其中膠原蛋白佔有機基質 90%，最主要為第一型膠原蛋白，是骨骼用來抵抗張力（tensile force）的主要成分（Ryu *et al.*, 2015）。因此本研究則分別以 ALP 活性、第一型膠原蛋白生成量及礦

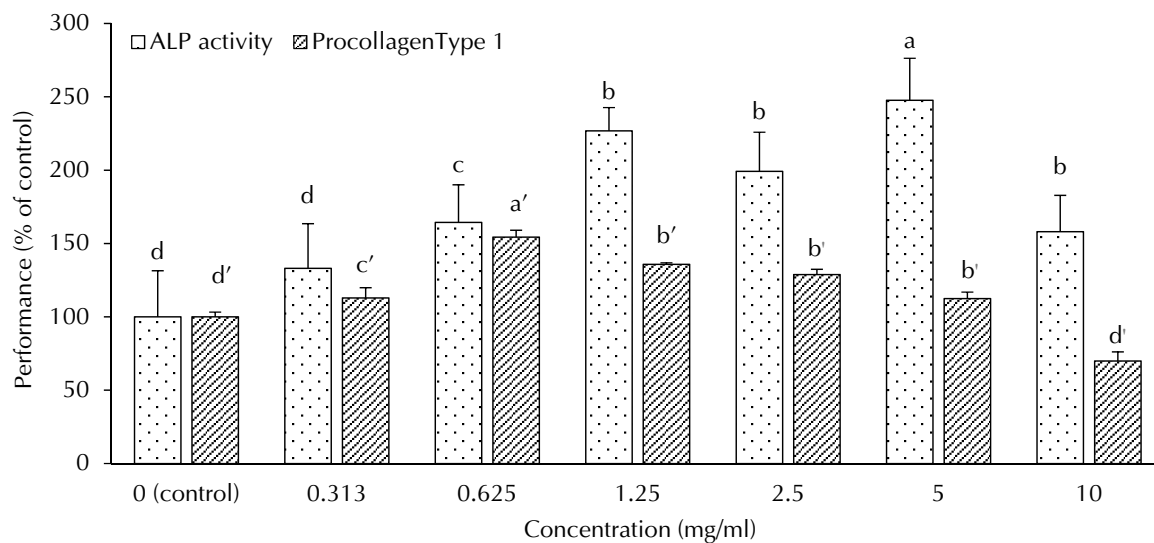


Fig. 1 The effects of *Eucheuma serra* enzyme hydrolyzate on the activity of alkaline phosphatase (ALP) and procollagen type I in osteoblast (differentiation from MG-63). All data are presented as the mean \pm SD (n = 3). Different alphabets on the bar revealed statistically significant differences at $p < 0.05$.

化作用來探討麒麟菜水解物對人類造骨細胞分化作用之評估指標。

(一) ALP 活性評估

ALP 為普遍存在於身體各處細胞的酵素之一，在膽管、肝及骨細胞含量特別高，因此可藉由量測骨細胞所分泌 ALP 含量或活性表現做為造骨細胞功能評估的正向指標 (Aslam *et al.*, 2013)。為確認麒麟菜酵素水解物是否具有促進造骨細胞分化為硬骨細胞之作用，於細胞培養基中添加濃度 0.313 - 10 mg/ml 之麒麟菜酵素水解物，分析其對人類類造骨細胞 MG-63 細胞的影響，結果顯示 0.313 - 5 mg/ml 酵素水解物相較於未添加的控制組 (control)，具有較高的 ALP 活性 (125.16 - 247.59%)，顯示麒麟菜水解物能促進造骨細胞成熟分化 (Fig. 1)。Kuo and Chen (2017) 比較骨鬆患者與健康人血中 ALP 活性，發現正常人之 ALP 活性為骨鬆患者之 162%，顯示骨鬆患者可能有造骨細胞成熟與分化不足的情形，而中藥萃取物寶藿甙 (baohuoside I) 作為抗骨鬆藥物可提升骨髓細胞 ALP 活性達 167% (Xi *et al.*, 2019)，另網地藻萃出物則可減少骨細胞的氧化損傷，而提升骨細胞中 ALP 表現量 (Fidelis *et al.*, 2019)，此等皆與本試驗有相似的結果。

(二) 第一型膠原蛋白生成量

將不同濃度 0.313 - 10 mg/ml 麒麟菜酵素水解物與造骨細胞 MG-63 共培養，並以每單位細胞第一型膠原蛋白生成量作為硬骨細胞的分化指標。試驗結果顯示 0.313 - 5 mg/ml 之麒麟菜水解物對骨細胞中第一型膠原蛋白的生成量皆顯著高於控制組，顯示其對造骨細胞分化為硬骨細胞具有正向的促進作用，其中又以 0.313 - 0.625 mg/ml 酵素水解物對第一型膠原蛋白生成量呈現劑量依賴性，且在 0.625 mg/ml 時達達最高值 (154.36%)，之後隨酵素水解物濃度之增加而漸遞減，表示在該濃度下具有促進造骨細胞分化的表現 (Fig. 1)。

三、麒麟菜酵素水解物對噬骨細胞成熟分化之影響

(一) 麒麟菜酵素水解物對噬骨細胞內 NFATc1、DC-STAMP 和 RANK 等 mRNA 表現量之影響

人體造骨細胞所分泌的蛋白質致活劑 RANKL，可和噬骨細胞受體 RANK 結合，觸發噬骨細胞分化，進而調節核轉錄因子 NFATc1 表現，當 NFATc1 由噬骨細胞質轉入細胞核，即開始調控噬骨細胞分化下游相關的基因

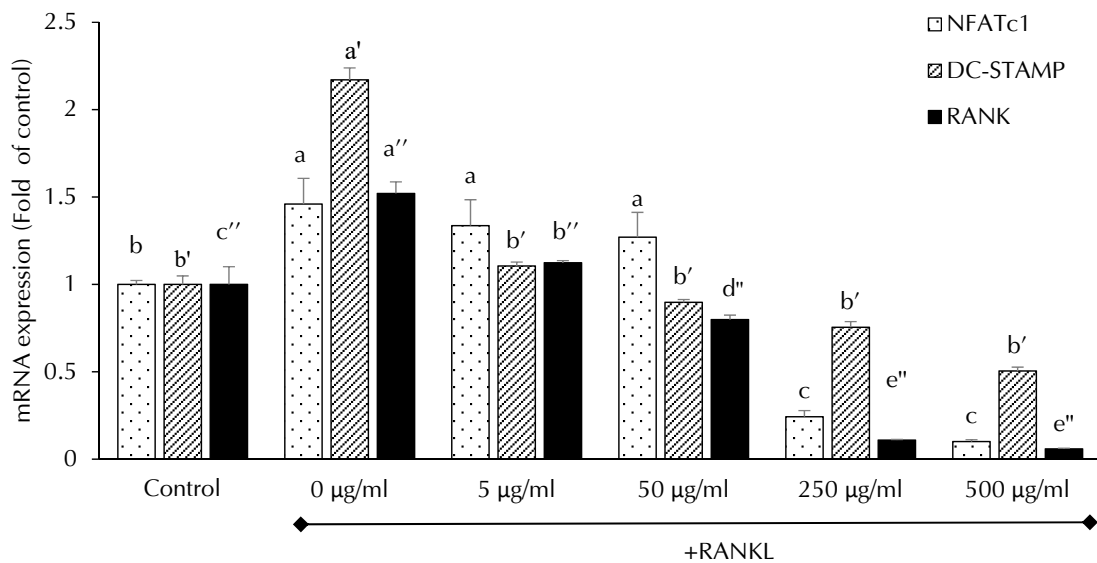


Fig. 2 The effects of *Eucheuma serra* enzyme hydrolyzate on NFATc1, DC-STAMP, and RANK mRNA expression in osteoclasts (differentiation from RAW 264.7). All data is presented as the mean \pm SD (n = 3). Significant differences between alphabets on the same bar were observed at $p < 0.05$.

(Venkatesan *et al.*, 2019), 如 cathepsin K、DC-STAMP 等, 最終促成數個細胞橋接融合為巨大多核噬骨細胞 (Brennan *et al.*, 2015)。本研究將 RAW 264.7 細胞加入含分化劑 (RANKL 和 M-CSF) 培養基, 並分別與 5 - 500 $\mu\text{g/ml}$ 麒麟菜酵素水解物共同培養, 探討對噬骨細胞成熟與分化之影響, 結果顯示培養基中加入 RANKL 的正控制組 (0 $\mu\text{g/ml}$), 其 NFATc1 和 RANK 等 mRNA 表現量分別為控制組的 1.46 ± 0.15 與 1.52 ± 0.07 倍, 而 DC-STAMP mRNA 表現量則提升為控制組的 2.17 ± 0.07 倍, 表示蛋白質致活劑 RANKL 可顯著促進噬骨細胞分化與分化相關基因的表現。然而麒麟菜酵素水解物則可調降噬骨細胞中 RANK、NFATc1 和 DC-STAMP 等 mRNA 表現量, 其中又以高濃度 (250 - 500 $\mu\text{g/ml}$) 處理組效果最為顯著, 可分別調降至控制組之 0.11 - 0.06、0.24 - 0.10 和 0.75 - 0.50 倍, 表示麒麟菜酵素水解物可抑制噬骨細胞成熟與分化過程相關基因的表現 (Fig. 2)。

(二) 顯微鏡觀察麒麟菜酵素水解物對噬骨細胞核之染色情形

噬骨細胞由核因子 B 配體激活受體 (RANKL), 以及巨噬細胞集落刺激因子 (M-CSF) 刺激分化而產生, 故噬骨細胞受到造骨細胞所分泌 RANKL 及 M-CSF 的刺激後, 於前驅噬骨細胞

膜上的穿膜醣蛋白, 如受體酪氨酸激酶和 RANK 受體, 會促進生成 TRAP 及分泌 cathepsin K、MMP-9、ATPase 等酵素以參與細胞融合及骨質蝕損, 最終誘導前驅噬骨細胞分化為直徑 20 - 100 μm 且含 4 - 20 個細胞核之成熟多核噬骨細胞, 啟動骨質蝕損作用 (Aubin *et al.*, 1996)。本研究由顯微鏡觀察噬骨細胞核染色情形, 結果顯示 5 - 2,000 $\mu\text{g/ml}$ 麒麟菜酵素水解物對成熟多核噬骨細胞核數呈現劑量性的抑制作用 (Fig. 3a), 並由量化結果 (Fig. 3b) 顯示, 隨酵素水解物濃度的提升, 其染色噬骨細胞核數呈現顯著降低, 表示麒麟菜酵素水解物可抑制形成多核成熟噬骨細胞。

(三) TRAP 評估

成熟噬骨細胞含有多量的 TRAP 可降解骨基質中固體鈣磷礦化物, 因此測其活性可評估蝕骨細胞的分化能力 (Bachle and Kohal, 2004)。本研究將 RAW 264.7 細胞加入含分化劑 (RANKL 和 M-CSF) 培養基來獲得成熟噬骨細胞, 並探討 5 - 2,000 $\mu\text{g/ml}$ 麒麟菜酵素水解物對 TRAP 活性之影響, 結果顯示酵素水解物對 RAW 264.7 噬骨細胞中 TRAP 活性呈現劑量性的抑制作用, 表示麒麟菜酵素水解物具有抑制噬骨細胞分化為成熟骨細胞並緩解骨基質中鈣磷礦化物的分解 (Fig. 3c)。Song *et al.* (2018) 以脈衝電場施加去卵巢老鼠之

骨鬆症評估模式，發現脈衝電場可調降 0.4 倍 TRAP mRNA 表現量，證明 TRAP 活性與骨鬆症之關聯性；以裙帶菜所製備岩藻聚糖，發現酵素水解處理組調降 TRAP 的作用顯著優於水萃組，推測係因酵素水解有利於海藻聚糖中硫酸基團的暴露而加速反應所致 (Park *et al.*, 2022)。

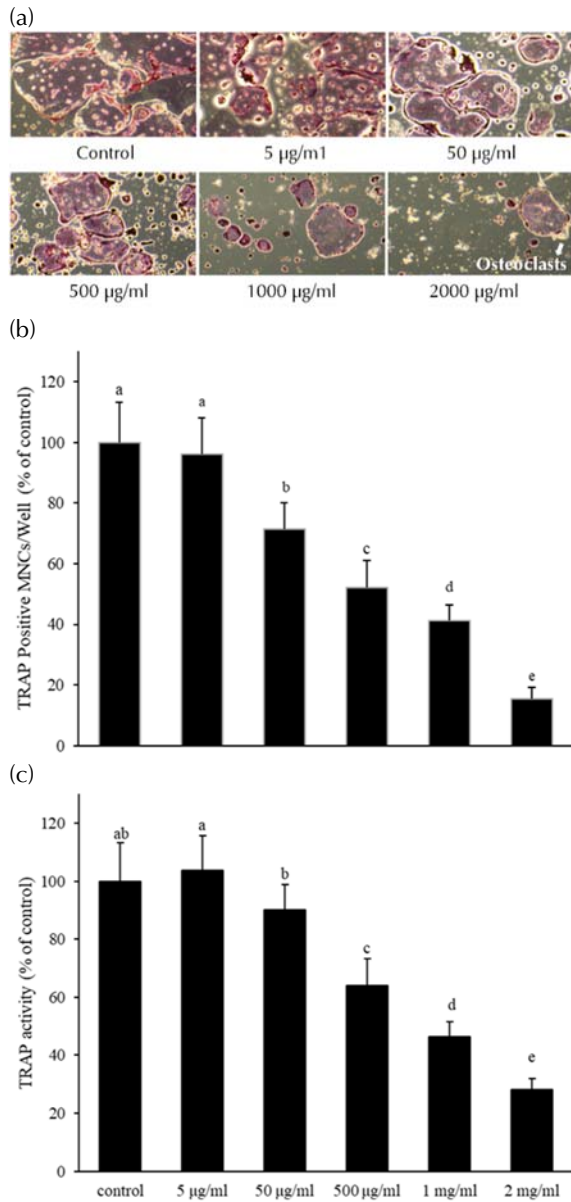


Fig. 3 Effects of *Eucheuma serra* enzyme hydrolyzate on the fusion of multinucleated cells (a), the number of TRAP-positive multinucleated cells (b), and TRAP activity (c) in osteoclasts (differentiation from RAW 264.7). All data are presented as mean ± SD (n = 3). Different alphabets on the bar revealed statistically significant differences at $p < 0.05$.

(四) 麟麟菜酵素水解物對噬骨細胞 BCL-2 和 BAX 凋亡基因 mRNA 表現量之影響

噬骨細胞的過度活化會造成大量流失骨質，因此在正常情況下身體可藉由 BCL-2 抗凋亡基因與 BAX 凋亡基因的表現來調控噬骨細胞的壽命 (Skjodt and Russell, 1992)。在研究中將 RAW 264.7 細胞加入含分化劑 (RANKL 和 M-CSF) 培養基獲得成熟的噬骨細胞，並分別添加 50 - 500 µg/ml 麟麟菜酵素水解物共培養，分析其調控噬骨細胞的凋亡作用，結果顯示 50 - 500 µg/ml 麟麟菜酵素水解物顯著降低噬骨細胞 BCL-2 抗凋亡基因 mRNA 表現量，而 Pang *et al.* (2018) 分析骨鬆患者噬骨細胞，發現 BCL-2 mRNA 表現量為正常者 2.3 倍，顯示其表現量上升將導致噬骨細胞的過度表現。試驗中亦發現 500 µg/ml 麟麟菜酵素水解物顯著提高 BAX 促凋亡基因 mRNA 表現量 (Fig. 4)，表示麟麟菜酵素水解物可促使 RAW 264.7 噬骨細胞走向細胞凋亡的途徑而抑制進行噬骨作用，緩解骨骼代謝循環中的骨質流失，此結果與 Sun *et al.* (2020) 使用 dexamethasone 作用於噬骨細胞提升 BAX mRNA 表現量達 6 倍有相同的趨勢，後續可以結合 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) 分析，進一步確認噬骨細胞的凋亡結果。

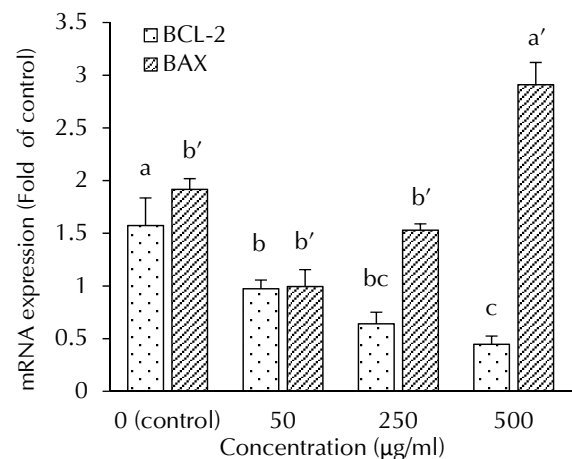


Fig. 4 The influence of *Eucheuma serra* enzyme hydrolyzate on the mRNA expression of BCL-2 and BAX in osteoclasts (differentiation from RAW 264.7). All data are presented as mean ± SD (n = 3). Different alphabets on the bar revealed statistically significant differences at $p < 0.05$.

四、麒麟菜酵素水解物的食用安全性評估

將 6 隻 SD 大鼠以最高限制劑量 1 g/kg body weight 經胃管強迫餵食麒麟菜酵素水解物，並連續觀察 14 天進行 2 次重複的口服急毒性試驗，結果顯示試驗期間老鼠體重無異常，慢性中毒或死亡等現象，內臟組織無肉眼可見的病理變化，顯示麒麟菜酵素水解物經口服投餵大鼠之半數致死劑量 (median lethal dose, LD₅₀) 大於 1 g/kg BW 且不具口服急毒性 (Table 2)。

Table 2 *Eucheuma serra* hydrolyzate's 14-day oral acute toxicity test

	Group A	Group B
Dose (per kg body weight)	1 g/kg	1 g/kg
Body weight (g) at day 1	192.37 ± 2.71	210.20 ± 6.93
Body weight (g) at day 14	233.63 ± 10.83	235.70 ± 12.02
0 - 14 days of clinical symptoms	normal	no lesions
Pathological anatomy*	normal	no lesions

A: The first group, n = 3.

B: The second group, n = 3.

*Pathological and anatomical examination items include: appearance, subcutaneous tissue, abdominal cavity, reproductive system, spleen, pancreas, liver, stomach, intestine, mesenteric lymph nodes, kidneys, bladder, adrenal glands, thorax, thymus, heart, lungs, oral cavity, salivary glands, lymph nodes, trachea, muscles, esophagus, and others

基因毒性試驗係以沙門氏菌系列 *Salmonella typhimurium* 為測試菌株 (TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537) 分析樣品致突變性，因各測試菌株具有 His⁻ 基因缺失，故在無組胺酸的環境中無法生存，因此將欲測試的物質與沙門氏桿菌在不含組胺酸的培養基中，若發現營養基中未長出沙門氏桿菌，則代表該試驗物質不具致突變性。另某些物質其本身雖不會致突變性，但當進入體內經過肝臟酵素的代謝，就轉化成致突變物，因此試驗中加入 S9 mixture 之目的係為模擬化學物質進入人體後的效應，以評估測試物質的代謝物是否具有致突變性。

試驗結果顯示，無論培養基中有 / 無 S9 存在，添加致突變劑的陽性對照組在 5 株試驗菌株突變菌數相較於陰性對照組皆誘發達 2 倍以上 (Table 3)。在無 S9 的培養基中添加 1.25 mg/plate 麒麟菜酵素水解物，測試菌株 TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537 等菌量接與陰性對照組相當，顯示麒麟菜酵素水解物不會誘發突變且不具致突變性。而在添加 S9 的培養基中亦發現，添加 1.25 mg/plate 麒麟菜酵素水解物對 5 株測試菌株之突變菌量為 38 ± 10、227 ± 3、346 ± 30、13 ± 4、11 ± 1 (CFU/plate) 遠低於陽性對照組且亦與陰性對照組相當，顯示麒麟菜酵素水解物經哺乳類代謝後的產物亦不具致突變性。

五、麒麟菜酵素水解物的骨鬆評估動物試驗

將 24 隻切除卵巢之 12 週齡雌性 SD 大鼠，隨機分成對照溶液組 (G1)、低劑量組 (G2)、高劑量組 (G3) 和參考物質組 (G4) 等進行骨鬆評估動物試驗，42 天試育期間試驗鼠的外觀均無異常，且各試驗組大鼠體重與對照溶液組亦無差異 (Fig. 5)。

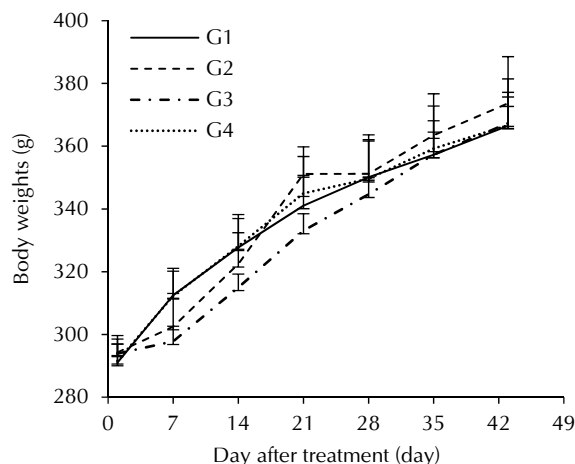


Fig. 5 The six-week body weight records of experimental rats. G1: 0 mg/kg/day, G2: *Eucheuma serra* hydrolyzate 250 mg/kg/day, G3: *E. serra* hydrolyzate 500 mg/kg/day, G4: Fosamax PLUS 7 mg/kg/week. All data are presented as the mean ± SD (n = 6). different alphabets in the same column exhibited statistically significant differences at $p < 0.05$.

Table 3 *Salmonella* reverse mutation test of *Eucheuma serra* hydrolyzate

S. strains	Without S9 (CFU/plate)			With S9 (CFU/plate)		
	negative	positive	<i>E. serra</i> hydrolysate*	negative	positive	<i>E. serra</i> hydrolysate
TA98	38 ± 4	265 ± 6	28 ± 6	36 ± 3	196 ± 12	38 ± 10
TA100	162 ± 22	647 ± 18	167 ± 22	181 ± 7	832 ± 43	227 ± 3
TA102	390 ± 2	899 ± 13	367 ± 23	433 ± 9	892 ± 20	346 ± 30
TA1535	22 ± 1	240 ± 17	24 ± 2	16 ± 5	189 ± 8	13 ± 4
TA1537	14 ± 2	272 ± 36	15 ± 3	14 ± 2	325 ± 41	11 ± 1

*The concentration of *E. serra* hydrolyzate in this test is 1.25 mg/plate.

All data is shown as mean ± SD (n = 3).

All strains have defects and cannot grow normally. S9 is mainly a rat liver enzyme, and the positive substance is a mutagen.

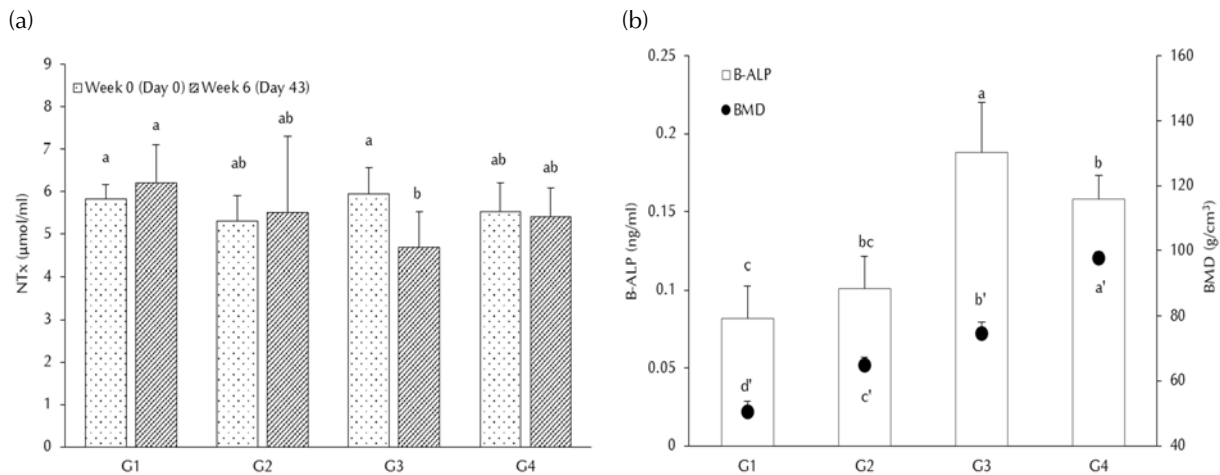


Fig. 6 Rat serum analysis of (a) NTx variations, (b) B-ALP concentration (□), and (c) femoral bone mineral density (●). G1: 0 mg/kg/day, G2: *Eucheuma serra* hydrolyzate 250 mg/kg/day, G3: *E. serra* hydrolyzate 500 mg/kg/day, G4: Fosamax PLUS 7 mg/kg/week. All data are presented as the mean standard deviation (n = 6). Different letters on the bar indicate statistically significant differences at $p < 0.05$.

(一) 骨質疏鬆生物血清指標分析

本試驗測定血清的第一型膠原蛋白之 NTx 及 B-ALP 含量，分別代表骨質流失及骨質成長指標 (Carson and Clarke, 2018)。試驗大鼠連續投予 6 週試驗物質後分析結果顯示，高劑量麒麟菜酵素水解物組 (G3) 的大鼠其 NTx 於餵食不僅在餵食前 ($5.94 \pm 0.62 \mu\text{mol/ml}$) 與後 ($4.69 \pm 1.80 \mu\text{mol/ml}$) 較其他處理組呈現顯著下降趨勢，同時於餵食 Day 43 之 NTx 值亦低於對照組 (G1) 和參考物質組 (G4)，並與對照組 ($6.20 \pm 0.90 \mu\text{mol/ml}$) 呈現顯著差異，此結果表示高劑量麒麟菜酵素水解物具有抑制骨質流失的指標性作用。另 B-ALP 分析結果顯示，無論餵食低劑量 (G2) 或高劑量

(G3)麒麟菜酵素水解物均可促進大鼠血液中 B-ALP 量，其值為 0.10 ± 0.02 與 $0.19 \pm 0.03 \text{ ng/ml}$ ，其中高劑量處理組更顯著高於對照組 (G1; $0.08 \pm 0.02 \text{ ng/ml}$) 和參考物質組 (G4; $0.16 \pm 0.01 \text{ ng/ml}$)，代表麒麟菜酵素水解物具有促進骨質生成之作用 (Fig. 6b)。

(二) BMD 評估

參考物質組 (G4; 福善美保骨錠) 為市售用藥，廣泛應用在治療停經婦女疏鬆症或一般骨鬆患者。本試驗結果顯示，餵食參考物質組之骨密度值為 $97.76 \pm 1.90 \text{ g/cm}^3$ ，高出對照組 (G1; $50.26 \pm 3.10 \text{ g/cm}^3$) 193%，而連續投予 6 週麒麟菜酵素水解物後之低劑量組 (G2) 及高劑量組 (G3) 大鼠的

BMD 值分別為 64.76 ± 2.66 及 $74.64 \pm 3.54 \text{ g/cm}^3$ ，亦顯著高於對照組，代表麒麟菜酵素水解物對骨鬆鼠也具有提升骨質密度的作用 (Fig. 6b)。

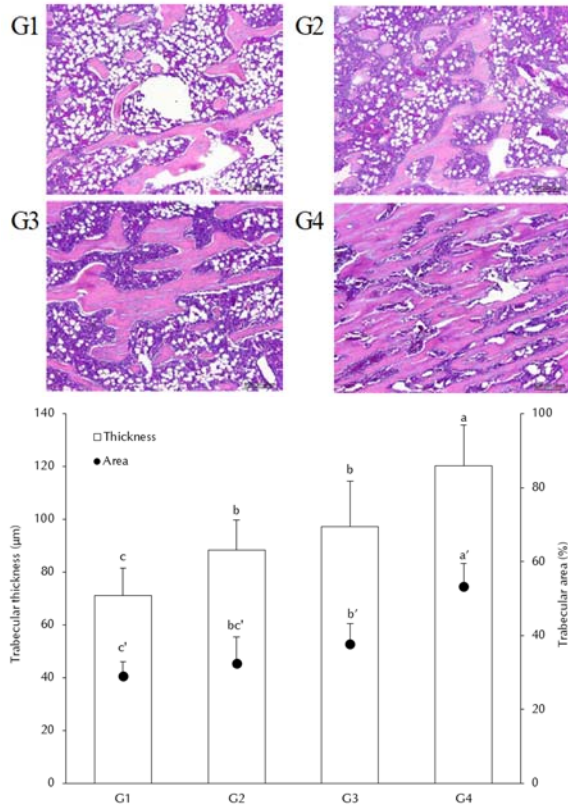


Fig. 7 The trabecular thickness, volume percentage, and tissue section of the rat's femoral artery. G1: 0 mg/kg/day, G2: *Euचेuma serra* hydrolyzate 250 mg/kg/day, G3: *E. serra* hydrolyzate 500 mg/kg/day, G4: Fosamax PLUS 7 mg/kg/week. All data are presented as the mean \pm SD (n = 6). Different alphabets on the bar revealed statistically significant differences at $p < 0.05$.

(三) 骨組織病理學分析

將各試驗組之大鼠犧牲後，採集右側大腿骨以 10% 中性福馬林固定，經脫鈣、脫水、包埋、切片及 H&E 染色後，將組織切片標本探討骨小樑與型態學變化，結果顯示連續投予 6 週低劑量 (G2) 和高劑量 (G3) 的麒麟菜酵素水解物，其大鼠股骨之骨小樑平均厚度分別為 88.20 ± 11.51 和 $97.24 \pm 17.22 \mu\text{m}$ ，雖低於參考物質組 (G4; $120.21 \pm 15.57 \mu\text{m}$)，但仍高於對照組 (G1; $71.08 \pm 10.48 \mu\text{m}$) 且以高劑量處理組呈現顯著差異，顯示投餵麒麟菜水解物同參考藥物般可促進骨鬆大鼠的骨質厚度。另分析大鼠股骨骨小樑面積，則發現其變化趨

勢與骨質厚度呈現正相關，以參考物質組 (G4) 最高為 $53.32 \pm 2.54\%$ ；高劑量 (G3) 麒麟菜水解物組 $37.68 \pm 2.75\%$ 優於低劑量組 (G2) $32.45 \pm 2.92\%$ ，而對照組 (G1) 最低 ($28.92 \pm 1.61\%$)，此也與解剖骨小樑 H&E 染色得到一致性的結果，即投餵參考物質與高、低劑量麒麟菜水解物相較於對照組其股骨骨小樑間隙皆有減少的趨勢。綜上結果顯示對骨鬆大鼠投餵麒麟菜酵素水解物可與骨鬆治療藥物 (福善美保骨錠) 具有相同的效果，皆可減少骨小樑間空隙，提升骨質厚度與骨面積 (Fig. 7)。

結 論

麒麟菜含豐富鈣質 ($1.29 \pm 0.06 \text{ g/100 g}$) 可滿足國人 1 日鈣的攝取量，是為良好食源性的鈣源，其成分也含有 $23.11 \pm 0.08 \text{ g}$ 硫酸多醣可協同促進骨生成作用。以造骨細胞 (MG-63) 試驗證實麒麟菜酵素水解物可促進骨母細胞成熟分化為硬骨細胞及生成骨基質，尤以濃度 0.625 mg/ml 時可提升第 I 型膠原蛋白量與 ALP 達 154.36% 與 164.43%。另噬骨細胞試驗證實， $250\text{-}500 \mu\text{g/ml}$ 麒麟菜酵素水解物不僅調降噬骨細胞成熟與分化相關基因如 RANK、NFATc1 和 DC-STAMP 等 mRNA 表現量為控制組之 0.11 - 0.06；0.24 - 0.10 和 0.75 - 0.50 倍，而量化噬骨細胞核數的染色結果亦顯示可抑制形成多核成熟噬骨細胞，同時也對細胞中 TRAP 活性呈現劑量性的抑制作用，表示麒麟菜酵素水解物具有抑制噬骨細胞分化為成熟骨細胞並緩解骨基質中鈣磷礦化物的分解。另外麒麟菜酵素水解物也顯著降低噬骨細胞中 BCL-2 抗凋亡基因 mRNA 表現量，其中濃度 $500 \mu\text{g/ml}$ 更顯著提高 BAX 促凋亡基因 mRNA 表現量達對照組 2.91 倍，表示酵素水解物啟動噬骨細胞凋亡而抑制進行噬骨作用，緩解骨骼代謝循環中的骨質流失。

麒麟菜酵素水解物經口服急毒性驗證 LD_{50} 大於 1 g/kg BW 且不具口服急毒性；基因毒性試驗則證實麒麟菜酵素水解物本身及其代謝產物均不具致突變性。因此將麒麟菜酵素水解物分別以細胞試驗濃度 $250 \mu\text{g/ml}$ 與 $500 \mu\text{g/ml}$ 換算為卵巢摘除的骨鬆動物模式食用低劑量組 250 mg/kg (G2) 與高劑量組 500 mg/kg (G3)，經連續投餵 6

週後皆可提升試驗鼠血清中 B-ALP 含量與降低 NTx 量，表示水解物具有促進骨質生成和抑制骨質流失的作用，其中低劑量處理組效果又以高劑量處理組效果更為顯著 ($0.19 \pm 0.03 \text{ ng/ml}$; $4.69 \pm 1.80 \mu\text{mol/ml}$)。BMD 評估結果顯示，麒麟菜酵素水解物無論低劑量 (G2) 及高劑量 (G3) 皆可提升大鼠 BMD 值至 64.76 ± 2.66 及 $74.64 \pm 3.54 \text{ g/cm}^3$ ，且顯著高於對照組 (G1 ; $50.26 \pm 3.10 \text{ g/cm}^3$)；骨組織病理學分析則証實低劑量 (G2) 和高劑量 (G3) 處理組與市售骨鬆治療藥物 (G4; 福善美保骨錠) 相同，皆可提高骨鬆鼠股骨之骨小樑厚度與面積，並減少骨小樑間隙，且以高劑量 (500 mg/kg/day) 麒麟菜酵素水解物優於低劑量處理組，據此大鼠劑量換算成人每日建議攝取量為 4.8 g 。

參考文獻

- 王瓊誼 (2009) 耳突麒麟菜寡醣混合物之抗氧化活性及美白功能研究. 國立臺灣海洋大學食品科學系 碩士學位論文, 基隆, 臺灣.
- 中華民國衛生福利部食品藥物管理署 (2013) 健康食品之骨質保健功效評估方法.
- 中華民國衛生福利部食品藥物管理署 (2019) 非臨床試驗優良操作規範.
- 中華民國衛生福利部食品藥物管理署 (2020) 健康食品安全評估方法.
- 何鳳娟 (2004) 檳榔子萃取物與檳榔鹼對類造骨細胞的活性與基因表現之影響. 國立陽明大學臨床牙醫學研究所 碩士論文, 臺北, 臺灣.
- 經濟部標準局 (2013) 中華民國國家標準(CNS).
- 梁智洲, 岑穎州, 葉紹明, 伍枝明 (2005) 瓊枝異枝麒麟菜中硫酸酯基多醣不同提取方法的化學分析比較. 暨南大學學報(自然科學64版), 26(3): 380-385.
- 陳芳怡 (2007) 海藻 *Euचेuma cottonii* 調節血糖功能性評估及其複方中草藥飲品之開發. 國立嘉義大學食品科學系 碩士學位論文, 嘉義, 臺灣.
- 陳柏璇, 杜明杰, 李沛珊, 蔡慧君 (2018) 紅藻酵素水解物作為保骨素材之探討. 水試專訊, 62: 22-25.
- 曾文洋, 陳忠信 (1977) 臺灣的麒麟菜. 臺灣省水產試驗所試驗報告, 28: 103-112.
- 楊宜婷, 岑穎洲, 肇靜嫻, 狄靜芬 (2002) 麒麟菜中藻藻紅素抗腫瘤活性研究. 中國病理生理雜誌, 18(7): 851-852.
- 游欣儀 (2012) 鋸齒麒麟菜乳酸發酵產品之生產與抗氧化特性之探討 國立臺灣海洋大學食品科學系 碩士學位論文, 基隆, 臺灣.
- AOAC (2016) Official Methods of Analysis (20th edition). Association of Official Analytical Chemists, Rockville, Maryland, U.S.A.
- Aslam, M. N., I. Bergin, K. Jepsen, J. M. Kreider, K. H. Graf, M. Naik, S. A. Goldstein and J. Varani (2013) Preservation of bone structure and function by *Lithothamnion sp.* – derived minerals. Biol. Trace Elem. Res., 156: 210-220.
- Aubin, R., P. Menard, and D. Lajeunesse (1996) Selective effect of thiazides on the human osteoblast-like cell line MG-63. Kidney Int., 50: 1476-82.
- Bachle, M. and R. J. Kohal (2004) A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. Clin. Oral Implants Res., 15: 683-92.
- Brennan, O., B. Stenson, A. Widaa, D. M. O’Gorman and F. J. O’Brien (2015) Incorporation of the natural marine multi-mineral dietary supplement aquamin enhances osteogenesis and improves the mechanical properties of a collagen-based bone graft substitute. J. Mech. Behav. Biomed. Mater., 47: 114-123.
- Carson, M. A. and S. A. Clarke (2018) Bioactive compounds from marine organisms: potential for bone growth and healing. Mar. Drugs, 16(9): 340.
- Clarke, S. A., P. Walsh, C.A. Maggs and F. Buchanan (2011) Designs from the deep: marine organisms for bone tissue engineering. Biotechnol. Adv., 10: 213-227.
- Clarke, S. A. and P. Walsh (2014) Marine organisms for bone repair and regeneration. Bone Sub. Biomater., 2014: 294-318.
- Fidelis, G. P., C. H. F. Silva, L. T. D. B. Nobre, V. P. Medeiros, H. A. O. Rocha and L. S. Costa (2019) Antioxidant fucoidans obtained from tropical seaweed protect pre-osteoblastic cells from hydrogen peroxide-induced damage. Mar. Drugs, 17: 506.
- Ha, Y. J., Y. S. Choi, Y. R. Oh, E. H. Kang, G. Khang, Y. B. Park and Y. J. Lee (2021) Fucoxanthin suppresses osteoclastogenesis via modulation of MAP kinase and Nrf2 signaling. Mar. Drugs, 19(3): 132.
- Huang, Y. C., P. C. Hsiao and H. J. Chai (2011) Hydroxyapatite extracted from fish scale: effects on MG63 osteoblast-like cells. Ceram. Int., 37: 1825-1831.
- Jo, C., F. F. Khan, M. I. Khan and J. Iqbal (2017) Marine bioactive peptides: Types, structures, and physiological functions. Food Rev. Int., 33(1): 41-61.

- Katopodis, H., A. Philippou, R. Tenta, C. Doillon, K. K. Papachroni, A. G. Papavassiliou and M. Koutsilieris (2009) MG-63 Osteoblastlike cells enhance the osteoprotegerin expression of PC-3 prostate cancer cells. *Anticancer Res.*, 29 (10): 4013-4018.
- Kim, Y. W., S. H. Baek, S. H. Lee, T. H. Kim, and S. Y. Kim (2014) Fucoidan, a sulfated polysaccharide, inhibits osteoclast differentiation and function by modulating RANKL signaling. *Int. J. Mol. Sci.*, 15(10): 18840-18855.
- Kita, M. and D. Uemura (2006) Bioactive heterocyclic alkaloids of marine origin. *In* *Bioactive Heterocycles I. Topics in Heterocyclic Chemistry* (S. Eguchi ed.), Vol 6, 157-179.
- Kuo, T. R. and C. H. Chen (2017) Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: recent developments and future perspectives. *Biomark. Res.*, 2017(5):18.
- Lou, N., Y. Wang, D. Sun, J. Zhao, Y. Wang and Z. Gao (2010) Isolation of stem-like cells from human MG-63 osteosarcoma cells using limiting dilution in combination with vincristine selection. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 47(6): 340-347.
- Morris, C., J. Thorpe, L. Ambrosio and M. Santin (2006) The soybean isoflavone genistein induces differentiation of MG63 human osteosarcoma osteoblasts. *J. Nutr.*, 136: 1166-1170.
- Nguyen, M. H. T., W. K. Jung and S. K. Kim (2011) Marine algae possess therapeutic potential for Calcium mineralization via osteoblastic differentiation. *Adv. Food Nutr.*, 64: 429-441.
- Park, B., S. N. Yu, S. H. Kim, J. Lee, S. J. Choi, J. H. Chang, E. J. Yang, K. Y. Kim and S. C. Ahn (2022) Inhibitory effect of biotransformed fucoidan on the differentiation of osteoclasts Induced by receptor for activation of nuclear factor- κ B Ligand. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 32(8): 1017-1025.
- Pang, T., M. Gong, J. T. Han and D. Liu (2018) Relationship between osteoporosis and expression of BCL-2 and CXCL12. *Exp. Ther. Med.*, 15: 1293-1297.
- Ryu, B. M., Y. X. Li, K. H. Kang, S. K. Kim and D. G. Kim (2015) Floridoside from *Laurencia undulata* promotes osteogenic differentiation in murine bone marrow mesenchymal cells. *J. Funct. Foods*, 19: 505-511.
- Skjodt, H. and G. Russell (1992) Bone cell biology and the regulation of bone turnover. *Cytokines Bone Metab.*, 1-70.
- Song, Z. H., W. Xie, S. Y. Zhu, J. J. Pan, L. Y. Zhou and C. Q. He (2018) Effects of PEMFs on *Osx*, *Ocn*, *TRAP*, and *CTSK* gene expression in postmenopausal osteoporosis model mice. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 11(3): 1784-1790.
- Sudirman, S., H. W. Chang, C. K. Chen and Z. L. Kong (2019) A dietary polysaccharide from *Eucheuma cottonii* downregulates proinflammatory cytokines and ameliorates osteoarthritis-associated cartilage degradation in obese rats. *Food Funct.*, 2019(10): 5697-5706.
- Sun, X., L. J. Gan, N. Li, S. Y. Sun and N. Li (2020) Tabersonine ameliorates osteoblast apoptosis in rats with dexamethasone-induced osteoporosis by regulating the Nrf2/ROS/Bax signalling pathway. *AMB Express*, 10: 165.
- Terho, T. T. and K. Hartiala (1971) Method for determination of the sulfate content of glycosaminoglycans. *Anal. Biochem.*, 41(2): 471-476.
- Tsai, S. W., H. M. Liou, C. J. Lin, K. L. Kuo, Y. S. Hung, R. C. Weng and F. Y. Hsu (2012) MG63 osteoblast-like cells exhibit different behavior when grown on electrospun collagen matrix versus electrospun gelatin matrix. *PLoS One*, 7(2): 1-11.
- Venkatesan, J., S. Anil, S. Rao, I. Bhatnagar and S. K. Kim (2019) Sulfated polysaccharides from macroalgae for bone tissue regeneration. *Curr. Pharm. Des.*, 25(10): 1200-1209.
- White, L. W. and P. Wilson (2015) Chapter 2 – World seaweed utilization. *In* *Seaweed Sustainability: Food and Npn-Food Applications* (B. K. Tiwari and D. J. Troy eds.), Academic Press, Auckland, New Zealand, pp. 7-25.
- Wiechec, A., E. Stodolak-Zych, A. Fraczek-Szczypt, M. Bazewicz and W. M. Kwiatek (2012) The study of human osteoblast-like MG 63 cells proliferation on resorbable polymer-based nanocomposites modified with ceramic and carbon nanoparticles. *Acta Physica Polonica A*, 121(2): 546-550.
- Xi, Y. H., T. W. Jiang, J. M. Yu, M. T. Xue, N. Xu, J. K. Wen, W. H. Wang, H. L. He and X. J. Ye (2019) Preliminary studies on the anti-osteoporosis activity of baohuoside I. *Biomed. Pharmacother.*, 115: 108850.
- Yang, J., X. Zhang, W. Wang and J. Liu (2010) Insulin stimulates osteoblast proliferation and differentiation through ERK and PI3K in MG-63 cells. *Cell Biochem. Funct.*, 28: 334-41.
- Zhao, Y., H. L. Wang, T. T. Li, F. Yang and C. M. Tzeng (2020) Baicalin ameliorates dexamethasone-Induced osteoporosis by regulation of the RANK/RANKL/OPG signaling pathway. *Drug Des. Devel. Ther.*, 14: 195-206.

Study of *Eucheuma serra* on Bone Health Care

Tsung-Kai Yi, Ming-Chieh Tu and Huey-Jine Chai*

Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The maintenance of bones is referred to as the "bone remodeling cycle," which has two components: osteogenesis and bone loss. On the other hand, *E. serra* is an abundant source of calcium and phytochemicals in Taiwan that is used as an edible algal raw material. This study aims to investigate the mechanism and enzymatic hydrolysis of *E. serra* for the development of bone healthcare products. We discovered that 100 grams of *E. serra* contains 1.3 ± 0.06 g of calcium, which is sufficient to meet the daily calcium needs of humans, and that 23.11 ± 0.08 g of sulfated polysaccharide can promote osteogenesis in a synergistic manner. When 0.625 mg/ml *E. serra* hydrolyzate was added to the maturation of osteoblasts (MG-63), the type I procollagen and alkaline phosphatase levels increased by 154.36% ($p < 0.05$) and 164.43% ($p < 0.05$), respectively. Which demonstrated that *E. serra* hydrolyzate can promote osteoblast maturation and mineralization. In addition, it was confirmed that 250-500 μ g/ml *E. serra* hydrolyzate down-regulated the mRNA expression of genes related to osteophyte maturation and differentiation, including RANK, NFATc1, and DC-STAMP, which were 0.11-0.06; 0.24-0.10; and 0.75-0.50 in the control group. In addition, nuclear staining revealed that it inhibited the formation of mature multinucleated osteophytes and exhibited a dose-dependent inhibition of cell TRAP activity. BCL-2 and BAX mRNA expression were 0.45-fold and 2.91-fold of the control group, respectively. This variant demonstrated that *E. serra* hydrolyzate mitigates bone loss by promoting osteoblast apoptosis and inhibiting the decomposition of calcium minerals in the bone matrix. In ovarian removal animal experiments, after 6 weeks of continuous administration of 500 mg/kg/day *E. serra* hydrolyzate, the B-ALP content (0.19 ± 0.03 ng/ml) increased and the NTx content (4.69 ± 1.80 μ mol/ml) decreased in the serum of test rats, indicating that *E. serra* hydrolyzate promoted bone formation and prevented bone loss. Also, the femoral bone mineral density, trabecular bone thickness, and trabecular bone area ratio of rats were found to be slightly or significantly greater than those of the control solution group, just as Fosamax PLUS did. In addition, genotoxicity testing revealed that *E. serra* hydrolyzate and its metabolites were not mutagenic, and the median lethal dose (LD50) for acute oral toxicity was greater than 1 g/kg BW. Based on all available data, the recommended daily adult dose of *E. serra* hydrolyzate is 4.8 g.

Key words: *Eucheuma serra*, osteoblast, osteoclast, osteoporosis

*Correspondence: 199 Hou-lh Road, Keelung 202, Taiwan. TEL: (02)2462-2101 ext. 2601; FAX: (02) 2463-2677; E-mail: hjchai@mail.tfrin.gov.tw