

# 紅藻酵素水解物作為保骨素材之探討

陳柏璇<sup>1</sup>、杜明杰<sup>1</sup>、李沛珊<sup>2</sup>、蔡慧君<sup>1</sup>

<sup>1</sup>水產試驗所水產加工組、<sup>2</sup>東部海洋生物研究中心

## 前言

綠藻、褐藻、與紅藻等海洋大型藻類的藻體乾物中，含量最高者為藻類多醣，大約佔藻體乾重 60% 以上。該些藻類細胞中的多醣依其生理功能可區分為三大類：(1)細胞壁多醣，主要是纖維素 (cellulose)；(2)細胞內外的黏質多醣，如洋菜 (agar)、岩藻聚醣 (fucoidan) 與褐藻酸 (alginic acid) 等，是主要的藻類多醣，可以協助藻類適應多變的海洋環境；(3)藻類的貯藏多醣，主要成分是類似澱粉 (starch) 的多醣類化合物 (潘等 2009)。海藻的分布，除了水溫及地形因素外，一般而言，都是受到光照的影響，而呈現垂直分布情形，而低潮線附近、潮間帶下部和深海部分多為紅藻類為主。

鋸齒麒麟菜 (*Eucheuma serra*) 為大型紅藻類 (圖 1)，主要分布於日本南部、琉球群島、臺灣、中國、菲律賓、印尼、馬來西亞及斯里蘭卡等暖水域。通常在 3-4 月間開始繁殖，6-8 月為盛產期，至 10 月中旬後則逐漸消失 (臺灣海藻資訊網, 2012)，全球每年有 800 萬噸的產量 (White and Wilson, 2012)。麒麟菜含有高量膳食纖維、礦物質、維生素、蛋白質、抗氧化劑和不飽和脂肪酸等，是一種營養豐富的海藻 (Matanjun et al., 2009)。

根據聯合國世界衛生組織 (WHO) 的定



圖 1 鋸齒麒麟菜藻體

義，當一個國家 65 歲以上的老年人口超過全國總人口的 7% 時稱為高齡化社會；超過 14% 時稱為高齡社會 (aged society)；超過 20% 時則稱為超高齡社會 (super/hyper aged society)。根據內政部調查資料 (2018) 指出，臺灣 65 歲以上老人比例已達 14% 進入高齡社會，老化指數高達 100% 以上；2026 年則會邁入超高齡社會。為活用藻類機能成分及因應全球高齡化趨勢，本所以類噬骨細胞 (osteoclast-like cells) (由 RAW264.7 巨噬細胞分化而成) 體外細胞模式，探討麒麟菜酵素水解物作為骨質保健素材之可行性，期能應用作為銀髮族營養補充膳食，以改善年長者之生活品質，並提升水產產業之價值鏈。

## 麒麟菜之利用價值

麒麟菜通常用來提取鹿角菜膠 (carragenan)，間接應用於食品、醫藥和化工行業。近年來，以其為原料製成風味食品之加工技術也得到廣泛的應用 (李等，2002)。鹿角菜膠是由  $\kappa$  型 (Kappa)、 $\lambda$  型 (Lambda)、 $\mu$  型 (Mu)、 $\iota$  型 (Iota)、 $\nu$  型 (Nu) 及  $\theta$  型 (Theta) 等六種結構不同的聚合物所組成的複雜混合物 (Stanley, 1987)。Kawakubo et al. (1999) 指出，將麒麟菜萃取物注射皮下組織可刺激骨骼生長，增加骨骼對鈣 (Ca) 的吸收，另也可用以治療風濕性關節炎、胃潰瘍及十二指腸潰瘍。另外由於鹿角菜膠本身帶有少量硫酸根，可提高抗凝血酶 (antithrombin) 活性並抑制絲胺酸蛋白酶 (serine proteinase)、凝血酶 (thrombin) 和活化因子 (activated clotting factor) 的活性，故具有抗凝血作用 (孫和吳，2009)。目前以紅藻生產鹿角菜膠的研究相當多，例如利用杉藻科紅藻 *Gigartina skottsbergii* 生產環狀鹿角菜膠 (Carlucci et al., 1997)；以育葉藻科紅藻 *Stenogramme interrupta* 生產  $\mu$ -、 $\nu$ - 與  $\lambda$ - 型之鹿角菜膠 (Caceres et al., 2000)。食用麒麟菜可改善人體的鈉鉀平衡，有助於預防高血壓等心血管疾病 (戚等，2005)。麒麟菜多醣含有天然的硫酸酯化多醣，具有抑制 HIV、HSV 等病毒和作為免疫促進劑之生物活性 (李等，2003)。麒麟菜的蕨藻紅素對 HL-60 細胞有毒殺和誘導凋亡的作用，具有發展抗腫瘤藥物的可能性 (楊等，2002)。

## 造骨細胞和噬骨細胞之作用

造骨細胞 (osteoblast) 會分泌鹼性磷酸

酶 (alkaline phosphatase, ALP)、骨基質蛋白 (bone matrix protein, BMP)、第一型膠原蛋白及其他的間質蛋白 (如 osteonectin 和 osteopontin) 等 (Yang et al., 2012)，其中 ALP 是用來檢測造骨細胞功能的指標之一，其活性的上升或下降可代表造骨細胞合成功能增加或減少 (Aubin et al., 1996; Tsai et al., 2012)；骨鈣素 (osteocalcin) 則被視為造骨細胞晚期分化與骨頭鈣化的指標之一。另外造骨細胞也會分泌巨噬細胞群落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF) 及核因子  $\kappa$ -B 配體受體致活劑 (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL) 來促進蝕骨細胞生長及分化，同時也會分泌蝕骨細胞抑制因子 (osteoprotegerin, OPG)，而 OPG 會與 RANKL 結合，使 RANKL 無法與核因子  $\kappa$ -B 配體 (receptor activator of nuclear factor kappa-B, RANK) 結合，導致噬骨細胞 (osteoclast) 生成被阻斷，抑制其生合成，進而降低骨質蝕損作用；OPG 也參與噬骨細胞的凋亡作用 (apoptosis) (Katopodis et al., 2009)。

噬骨細胞受到造骨細胞所分泌之 RANKL 及 M-CSF 的刺激，作用於前驅噬骨細胞膜上的穿膜醣蛋白受體酪胺酸酶 (transmembrane glycoprotein receptor tyrosine kinase, c-Fms) c-Fms 和 RANK 受體，促進抗酒石酸性磷酸鹽酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 以及組織蛋白酶 K (cathepsin K)、基質金屬蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、三磷酸腺苷酶 (ATPase) 等參與細胞融合以及骨質蝕損之酵素的分泌，最終誘導前驅噬骨細胞分化為



20–100 mm 且含 4–20 個細胞核之直徑巨大的成熟多核細胞，導致骨質蝕損 (圖 2) (Duplomb et al., 2006)。

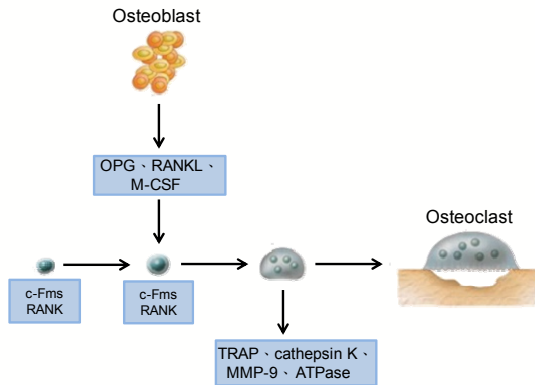


圖 2 噬骨細胞形成圖

## 骨質保健健康食品之功效評估

根據衛福部食藥署 2013 年修正公告「健康食品之骨質保健功效評估辦法」，骨質保健功效評估須同時測定造骨細胞與噬骨細胞活性至少任一項指標。如受試產品能同時促進造骨細胞活性與抑制噬骨細胞活性，則肯定該受試產品可促進骨骼健康；但若該受試產品能促進造骨細胞活性或抑制噬骨細胞活性，且對另一細胞無負面作用時，亦得視為「健康食品」。故本實驗以 RAW264.7 巨噬細胞分化而成的類噬骨細胞體外模式探討紅藻酵素水解物作為骨質保健素材之可行性。

## 細胞毒性及增生作用試驗

### 一、不同濃度的紅藻酵素水解物對類噬骨細胞的細胞毒性試驗

將 RAW264.7 巨噬細胞加入含分化劑 (RANKL 和 M-CSF) 的培養基 ( $\alpha$ -minimum

essential media,  $\alpha$ -MEM)，置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培養箱培養 3 天後，用顯微鏡可觀察到明顯的細胞膜撐大及中間出現多核的噬骨細胞型態，同時也可觀察到未分化的細胞 (圖 3)。

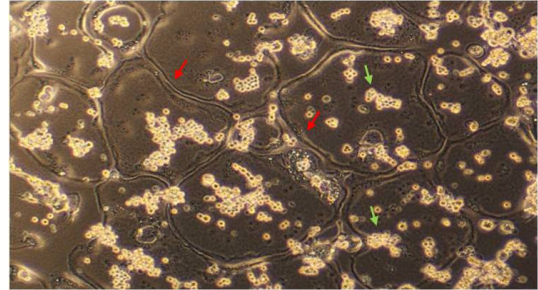


圖 3 已分化之噬骨細胞 (200x 顯微鏡觀察，紅色箭頭為已分化細胞，綠色箭頭為未分化細胞)

待類噬骨細胞分化完全，加入 5  $\mu$ g/ml、50  $\mu$ g/ml、500  $\mu$ g/ml、1 mg/ml、2 mg/ml 和 4 mg/ml 等不同濃度的紅藻酵素水解物共同培養 48 小時。參照 Cell Titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega)，移除培養液後，再加入 19  $\mu$ l 的 MTS 試劑和 1  $\mu$ l 吩嗪硫酸甲酯 (phenazine methosulfate, PMS) 溶液，於培養箱中反應 4 小時，以全波長微盤分析儀於波長 490 nm 測定細胞活存率，結果顯示，隨著紅藻酵素水解物添加濃度之上升，細胞活存率顯著提升 73–97%，其中高濃度組 (1–4 mg/ml) 和控制組 (100%) 相比，細胞活存率可達 97%，且無顯著差異，表示酵素水解物對噬骨細胞無細胞毒性 (圖 4)。

### 二、不同濃度的紅藻酵素水解物對類噬骨細胞的增生作用試驗

在細胞新合成 DNA 時，溴脫氧尿苷 (bomodeoxyuridine, BrdU) 可取代胸腺嘧啶 (thymidine, T)，進而被 BrdU 的抗體偵測以確

認細胞的增生。待類噬骨細胞分化完全後，加入不同濃度之紅藻酵素水解物培養 24 小時，並利用 Cell Proliferation BrdU ELISA kit，檢測是否可抑制噬骨細胞的增生作用。結果顯示，細胞中 BrdU 的測定值隨紅藻酵素水解物添加濃度之提升而減少為 26 – 82%，表示紅藻酵素水解物可抑制噬骨細胞的增生作用（圖 5）。

## 結語

本研究已建立 RAW264.7 巨噬細胞分化成噬骨細胞之體外細胞評估模式，並以顯微

鏡觀察到細胞成為多核的型態。另外也發現紅藻酵素水解物對噬骨細胞無細胞毒性，且高濃度的紅藻酵素水解物可抑制噬骨細胞增生，符合「健康食品骨質保健功效評估辦法」所指「如受試產品能具有抑制噬骨細胞活性或促進造骨細胞活性，亦得視為健康食品」之規定，故紅藻酵素水解物可能有助於促進骨骼健康，惟後續尚須進一步分析酸性磷酸酶活性來探討骨質吸收作用，並續以 mRNA 表現探討其對抑制噬骨細胞的作用機轉，期能研發安全有效之骨質保健食品機能素材，作為銀髮族營養補充膳食，以改善年長者之生活品質，並提升藻類之附加價值。

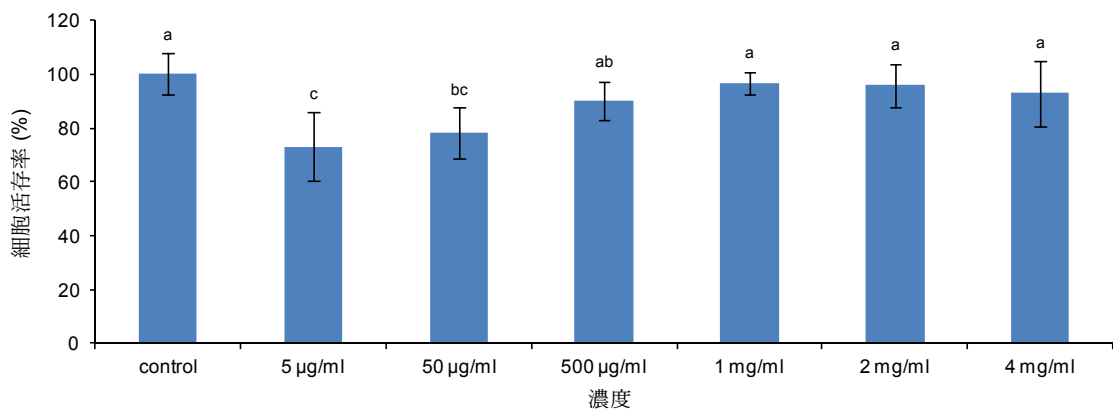


圖 4 不同濃度的麒麟菜酵素水解物與 RAW264.7 噬骨細胞共同培養 48 小時後對細胞存活率之影響

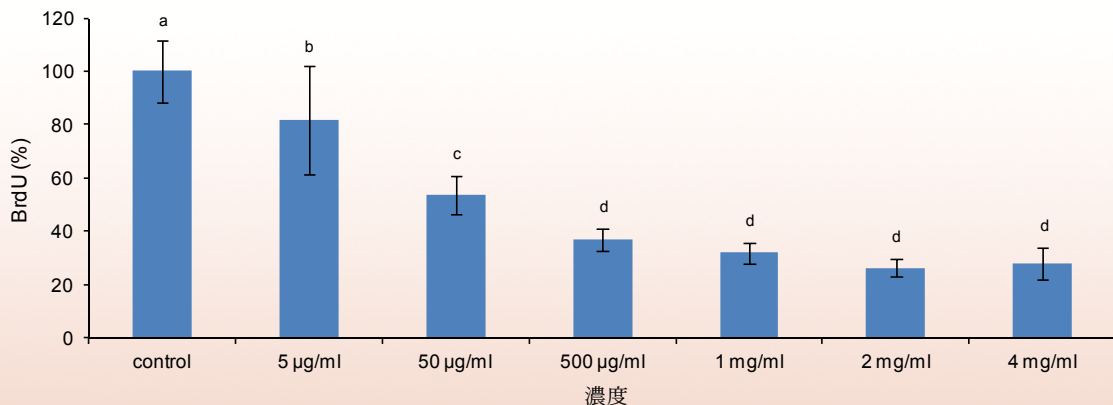


圖 5 不同濃度的麒麟菜酵素水解物與 RAW264.7 噬骨細胞共同培養 24 小時後對 BrdU 之影響