

Abstract

In recent years, there has been a lot of effort devoted to the study of the biological functions of Chinese herbs. Gusuibu is a traditional Chinese medicine commonly used for treating or preventing bone or joint diseases. The chick embryo has been used as the experimental animal model to examine the toxicity of aluminum. We applied this model to evaluate the effects of Gusuibu and aluminum on the status of long bone ossification of chick embryos. Embryos were treated on day 8 with 0.7% NaCl, 60 mM aluminum citrate, or the crude water extract of Gusuibu by instilling each solution separately into the air sacs. Aluminum citrate-treated embryos were found to have a significant inhibition on the growth and development of chick embryos, a persistent mid-diaphysis malformation of the tibia, and a significantly shorter tibia length on day 12-incubation. The growth and development of chick embryos treated with the crude water extract of Gusuibu and their reticular structures of trabecular bone were similar to those of the control group. In the embryos treated with Gusuibu for 4 day, ossification was initiated earlier and cortical bone thickness was wider than those of the control group. These results suggest that Gusuibu improves ossification, while aluminum inhibits the growth, development and bone ossification of chick embryos. We demonstrated that the chick embryo was useful and can be applied to evaluate the effects of functional foods on bone ossification and bone formation.

Keywords: Gusuibu Aluminum Chick embryo Chondrocytes Ossification

中文摘要

根據中華民國老年醫學會統計，台灣 65 歲以上男女罹患骨質疏鬆比率分別為 13% 及 24%，造成個人及社會莫大成本耗損，因此許多的研究無不致力於尋找骨質疏鬆之治療或延緩發生的方法。本研究係建立一個評估中草藥或健康食品療效之方法並探討中藥骨碎補對於雞胚胎長骨發育之影響，作為研究治療或延緩骨質疏鬆發生之動物模式。將受精的雞蛋分成 3 組，於 99.8 °F 狀態下孵育 8 天後每天以 25 ml 濃度 60 μ M 之檸檬酸鋁 (n = 24，簡稱鋁組)、0.7% NaCl (n = 14) 及骨碎補水萃取物 (n = 24，簡稱骨碎補組) 分別注射至受精雞蛋之氣室後，繼續孵育。於連續注射之第 4 天及第 8 天，分別自 3 組受精雞蛋中取出雞胚胎，觀察其外型及發育情形並進行骨組織切片、染色及顯微鏡之觀察。結果發現經第 4 天之鋁組雞胚胎，其外觀上有明顯出血的情形、器官外露的現象，且胚胎之身長顯著地較控制組及骨碎補組為低 ($p < 0.05$)，另外，其長骨發現有彎曲的現象，且第 8 天之長骨較第 4 天之長骨具有更顯著地彎曲。於控制組與骨碎補組，無論在外觀、胚胎身長及胚胎之長骨均無顯著的差異性。第 4 天骨碎補組之雞胚胎長骨經過切片及 HE 染色後，以顯微鏡觀察，發現其軟骨細胞 (chondrocytes) 多數已骨化形成骨小樑 (trabecular bone)。根據文獻記載骨面積量與骨徑寬與骨質量有關，因此以 Image Pro-Lite 軟體計算各組之軟骨細胞、骨面積量及骨徑寬，以便推論其形成之骨質量，結果發現第 4 天骨碎補組之骨徑寬較第 8 天控制組高 ($p < 0.05$)，且二組之骨面積量相似，顯示骨碎補水萃取物促使第 4 天雞胚胎之長骨提早骨化達到控制組第 8 天之骨徑寬，暗示骨碎補水萃取物具有促進雞胚胎長骨骨化之現象。反之，鋁組無論第 4 天及 8 天皆發現大量未骨化之軟骨細胞，且其骨面積量及骨徑寬

亦明顯低於控制組及骨碎補組 ($p < 0.05$)，同時明顯地觀察到鋁破壞雞胚胎長骨骨化之現象。本實驗利用雞胚胎作為實驗動物模式，主要原因為此模式不會受到飼養食物的影響。此外，雞胚胎長骨之骨化作用於孵育後的第 8 天開始，因此給予樣品後，可由此階段觀察其對骨質生長發育的影響，實驗結果發現雞胚胎可作為一初期評估中草藥療效之具有潛力之實驗動物模式，且骨碎補水萃取物有促使雞胚胎長骨提早骨化之現象，而鋁則抑制長骨之骨化作用。

關鍵字：骨碎補 鋁 雞胚胎 軟骨細胞 骨化作用

第一章 前言

邁向高齡化的同時，除了癌症、腦中風、心肌梗塞等疾病外，骨質疏鬆症也逐漸受到國人的重視，尤其是老年人，跌倒時容易引起大腿骨頸部骨折，造成從此臥床或經常性腰痛，且骨骼碎裂極難治癒。根據調查結果顯示，台灣地區 65 歲以上人口中，脊椎骨折男性約佔 10%，女性約佔 16%，由於台灣人口平均壽命增加，相對骨質疏鬆症患者也相對增加，骨質疏鬆症所造成之最大併發症就在於引起骨折，骨折產生高死亡率及高社會經濟成本。根據衛生署統計，台灣每年股骨骨折人數約三萬人，不僅花費近四十億之醫療成本，其中約近兩成患者將於一年內死亡，約八成患者於骨折發生後六個月內仍無法行走。此外，每年因骨質疏鬆症所造成的腕部與脊椎骨折，使患者必須承受難忍的疼痛，因而造成活動受限，嚴重影響生活品質。

根據澳洲研究顯示約近 40% 之停經婦女罹患骨質疏鬆，且近 40% 屆臨罹患骨折的可能¹，由此可知骨質疏鬆於停經婦女之影響深遠，骨質疏鬆之治療有二大原則，一為抑制骨質流失，另一為促進骨骼成長。骨質疏鬆症的治療強調給予抗骨吸收劑（antiresorptive agent）如：雌激素（estrogen）、抑鈣素（calcitonin）及雙磷酸鹽類藥物，因為這一類的藥物可預防骨質進一步地流失。故停經後婦女常以荷爾蒙取代治療（hormone replacement therapy；HRT）作為減緩停經後副作用發生。荷爾蒙取代治療已經使用超過 25 年，而合併使用雌激素及黃體素之荷爾蒙治療亦至少年逾 15 年。許多研究顯示停經婦女使用荷爾蒙治療具有降低 50% 以上罹患骨質疏鬆的危險率²，但因使用荷爾蒙取代治療可能有一些副作用，包括：乳癌³、陰道出血⁴等，研究顯示若使用荷爾蒙取代治療 8 年以上，則相對罹患乳癌之危險因子約 1.3 倍，亦因此許多婦女對於服用雌激素減緩或紓解停經症後群產生疑慮及恐慌。

使用於預防或治療骨關節疾病之中草藥種類很多，近年來因荷爾蒙取代治療有許多副作用，因此許多研究學者將具有預防或治療骨關節疾病之中草藥列為預防或治療骨質疏鬆症之研究方向之一，希望能藉

由傳統中草藥之研究，更進一步地為罹患骨質疏鬆之中老年人，尋求另一種較無副作用且有助於改善或延緩骨質疏鬆症症狀枝中草藥物。骨碎補是民間經常使用於治療或預防骨鬆及關節疾病的中草藥，根據過去學者以雞胚胎骨細胞所作之實驗發現，骨碎補有促進骨合成的作用。

本實驗的目的為建立雞胚胎實驗動物模式以評估中草藥物或健康食品療效。實驗設計是將不同之中草藥注射入雞胚胎氣室中，藉由胚胎膜半透之特性，將樣品逐漸滲透進入雞胚胎中吸收注入的試劑，藉此動物模式觀察中藥骨碎補與鋁對於其長骨發育之影響。以此動物模式觀察骨生長、發育作為研究的方向，探討中草藥物對於骨生長發育時期之影響。建立此動物模式可提供日後研究骨發育及骨代謝時另一實驗模式，亦提供一個初期評估中草藥物或健康食品療效評估的方法。

第二章 文獻回顧

2-1 骨碎補

許多的研究學者致力於研究及評估中草藥的功效，了解其藥效果是否與古籍上所記載一樣具有實質的療效或保健的功能⁵。根據過去許多文獻的記載，有一些天然中草藥具有預防及治療骨及關節等相關疾病^{6,7,8,9,10}的功效，骨碎補即是其中之一。

骨碎補是民眾日常使用之民間草藥之一，根莖有補腎強骨、續筋止痛之效，常用來治療腎虛腰痛、跌撲閃挫、筋骨折傷等骨、傷科相關疾病¹¹。根據過去實驗證實骨碎補有促進骨合成過程中醣蛋白含量增加之情形，骨細胞中醣蛋白增加與骨合成作用有密切的關係，此外，1999、2000、2001年劉華昌教授以骨碎補水草物作為實驗藥物，研究其對於造骨細胞之影響及動物臨床療效研究，發現骨碎補水草物於低濃度下能使造骨細胞有抗氧化的效果，且於卵巢切除老鼠實驗中亦發現其有促進骨密度增加之現象。

1996年 Ma 等人以9天齡雞胚胎之股骨細胞於含骨碎補之細胞培養液10天後發現骨碎補使骨細胞中糖蛋白 (proteoglycan) 的合成增加⁶。糖蛋白是軟骨鈣化 (calcifiable cartilage) 之主要成份之一，其於骨鈣化過程中扮演一重要角色，因糖蛋白因子中含有大量的 carboxyl group 及 硫基分子 (sulfate radicals) 使整個糖蛋白分子帶有大量負電荷 (negative charges)，而使其更容易與帶有正電之鈣離子結合。2001年 Liu 等人以老鼠造骨細胞作為實驗模式，將骨碎補水草物加入細胞培養液中與老鼠之造骨細胞一起培養，發現骨碎補水草物具有保護造骨細胞受到自由基攻擊之效果且呈現劑量反應依賴性 (dose dependent)，因此認為骨碎補對於老鼠造骨細胞而言是一個抗氧化物⁸，作者認為此一抗氧化功能可能與骨碎補中所含大量之 Flavonids 有關，骨碎補中所含之 Naringenin (4',5,7-trihydroxy-flavanone) 及 Naringin (醣苷型之 Naringenin) 已被鑑定屬於 Flavonids 類⁸。

2002 年 Lin 等人進行一項評估 10 種民間傳統傷骨科常用藥物對於骨細胞影響的實驗，發現其中只有骨碎補 (*Drynaria fortunei*) 有誘導破骨細胞凋亡的效果，進而推論其有助於骨合成作用⁸。Sun 等人於 2002 年以細胞培養的實驗模式評估骨碎補之功效，發現骨碎補增加細胞培養基中之 PGs (prostaglandins) 含量⁹。Prostaglandins 是一個骨代謝潛在調控者 (modulators)，特別是 PGE₂，為一個強而有力的長骨合成劑 (Ito et al, 1992 及 Akamine, 1993)。2003 年 Sun 等人以同樣的實驗模式進行相關研究，進一步發現骨碎補對於骨受傷位置扮演一個如同骨骼修補因子 (bone-healing factors) 之角色，能夠促進造骨細胞增生及骨礦物質化的作用，對於骨再生 (regeneration) 作用而言，相當有助益⁹。



圖 2.1 大頁骨碎補外觀。

參考來源：台灣常用藥用植物圖鑑 2002 行政院衛生署中醫藥委員會

2-2 鋁

鋁則是地球上含量豐富的金屬之一，也是一個環境污染物，但哺乳動物體內仍有微量存在，許多食物包裝材料或某些藥物都含有鋁。鋁可經鼻腔吸入、由口食入或經皮膚接觸吸收，成人平均每天由飲食中可攝取約 3 至 5 mg 鋁，其中有近 15 μg 經腸道被吸收，由尿液排出¹²。其潛在毒性經常可見於腎衰竭或血液透析病患、長期靜脈注射患者及嬰兒配方奶粉中。

1976 年首度有學者發現血液透析患者出現透析性腦病變 (dialysis encephalopathy) 及骨軟化骨不全症 (osteomalacic osteodystrophy)^{13,14}，因此鋁的相關研究才開始逐漸展開，並使多數人開始正視鋁對於人類生活的影響。目前經研究證實鋁會影響細胞的活性及神經系統並會抑制骨生長發育。1984 年 Andreoli 等人發表論文指出氮血症嬰兒以 aluminum hydroxide [$\text{Al}(\text{OH})_3$] 治療後，觀察其骨切片發現有嚴重之軟骨症 (osteomalacia) 現象。血液透析患者出現鋁毒性的症狀通常可歸因於二種原因，(一) 因患者血磷過高而長時間服用 aluminum hydroxide，(二) 血液透析患者所使用之透析液中含有鋁¹⁵。鋁會蓄積於骨及類骨質 (bone/osteoid) 間，將會抑制骨礦物質化的作用，導致佝僂症 (rickets) 或軟骨症 (osteomalacia)，使骨骼變得軟弱且無支撐力 (adynamic) 而且會減少類骨質的合成及骨的新陳代謝，使骨密度降低而可能引起骨折的現象¹⁶ (Adams, 2002)。

鋁的毒性也可能來自於含鋁制酸劑 (aluminum-binding antacids)，當使用含鋁制酸劑後 24 至 48 小時內可測量出血清鋁過高。1999 年 Patrick 等人以 100 個末期腎衰竭患者實驗發現多數患者仍因含鋁藥物或透析液而使骨切片發現大量鋁蓄積於骨中¹⁷。以雞胚胎作為實驗動物模式，經鋁處理後發現其長骨發育受到嚴重的抑制^{18,19,20}，長骨中段出現彎曲的現象，且隨著注射時間的增加，長骨中段骨彎曲的現象愈明顯。

2-3 研究假說與目的

根據文獻回顧資料發現，骨碎補可保護造骨細胞活性，並可促使破骨細胞凋亡，增加骨合成結構中所必須之醣蛋白，進而促進骨的合成作用。相反地，鋁則會降低或抑制造骨細胞活性，此外，鋁明顯地抑制了骨鈣化的作用。鷄胚胎此動物模式過去曾被利用作為觀察毒性物質如：酒精²¹、咖啡²²、鋁等重金屬對於胚胎生長及骨骼發育之影響，以及觀察中草藥物對於胚胎血管發育影響之觀察²³，本研究則利用此實驗動物的模式，探討骨碎補及鋁對於鷄胚胎長骨發育之影響。除了進行鷄胚胎之外觀型態及生長發育之觀察外，鷄胚胎之長骨經過切片、染色後，亦以顯微鏡觀察其骨組織成長發育的情形並配合 Image Pro-Lite 電腦軟體，計算其軟骨細胞 (chondrocytes)、骨面積 (bone surface) 及骨徑寬 (thickness of cortical bone) 等數值。藉由動物活體實驗之結果推論骨碎補及鋁對鷄胚胎長骨生長發育之影響。

研究目的為建立一個動物活體實驗之模式以縮短實驗時間、降低實驗成本，提供本實驗室日後評估中草藥或健康食品對於預防或治療骨質疏鬆症功效之生物活性測試的方法。

第三章 材料與方法

3-1 實驗設計流程

自 100 顆受精雞蛋中選擇重量符合 $65 \pm 5\text{g}$ ，以照蛋燈照射雞蛋找尋氣室部位並以筆將其氣室部位一一圈劃出氣室定位。氣室定位後將挑選重量符合 $65 \pm 5\text{g}$ 後之受精雞蛋分成三組，分別為骨碎補組 24 個、控制組 14 個、鋁組 30 個送至孵蛋機中以 99.8°F 孵育。孵育之第八天起每天分別於三組注射 $25\ \mu\text{l}$ 之骨碎補水草物、 0.7% NaCl 及 $60\ \text{mM}$ 檸檬酸鋁。孵育之第 12 天（樣品注射後 4 天）及第 16 天（樣品注射後 8 天）自孵蛋機中將骨碎補組、控制組、鋁組各組分別取出 12 個、7 個、15 個受精雞蛋進行解剖及巨觀的生長發育之觀察以及長骨取集後之微觀的長骨切片之骨發育之觀察。實驗設計流程如圖 3.1。

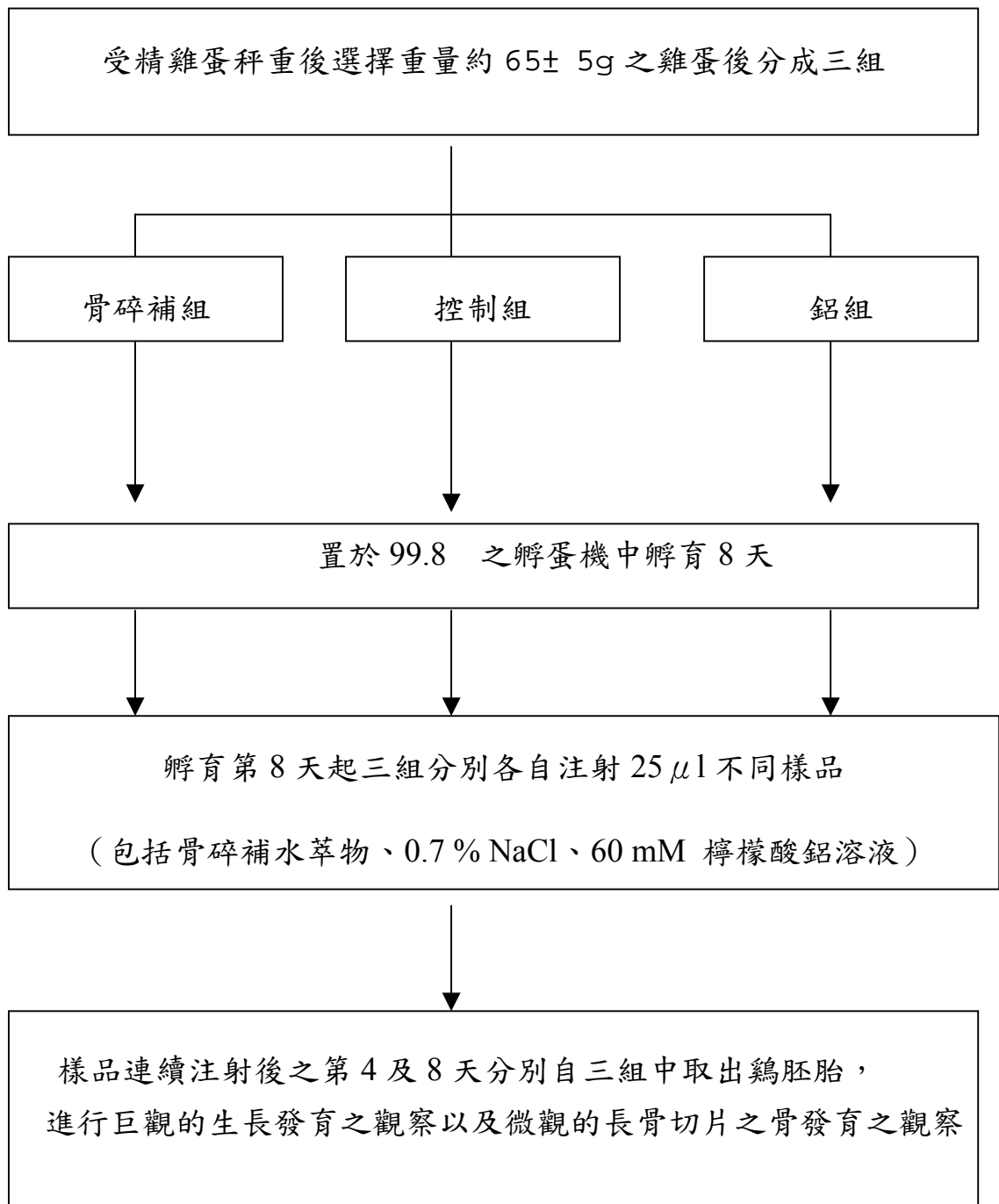


圖 3.1 實驗流程圖

3-2 實驗材料與藥物配製

本計畫所使用之受精雞蛋購自台中中美種鷄場，受精雞蛋均使用愛拔一加品種 (Arbor Acres strain)。骨碎補購自嘉義新隆中藥店如圖一，骨碎補經中國醫藥學院圖慶業藥師基源鑑定為大葉骨碎補 (*Davallia divaricata* BLUME)。

檸檬酸鈉 (sodium citrate) 及氯化鋁 (aluminum chloride) 購自日本 YAKURI Pure 化學公司。

(一)骨碎補水萃取物之製備：取 3.45 g 骨碎補 (圖 3.2)，磨碎後加入 150 ml 二次水共煮使剩餘藥汁為 50 ml 時停止，加熱時間約為 10 分鐘。將藥汁連同藥渣一併倒入濾布過濾，分離出藥渣及藥汁 (骨碎補水萃取物)，骨碎補水萃物取得後分裝成於試管中，每管約 25ml 置於 4 冰箱中冷藏備用。



圖 3.2 大葉骨碎補

(二) 60 mM 檸檬酸鋁 (aluminum citrate) 製備：首先以 0.7 % NaCl 為溶液配置 120 mM 檸檬酸鈉 (sodium citrate) 100 ml 及 120 mM 氯化鋁 (aluminum chloride) 100 ml。各取等量 (50 ml) 之 120 mM sodium citrate 與 120 mM aluminum chloride 二者混合均勻得到 100 ml 60 mM aluminum citrate，將其置於 4 °C 中冷藏備用。

(三) 0.7 % NaCl 製備：取 0.7g NaCl 加入 100 ml 二次水充分混合置於 4 °C 冰箱中備用。

(四) 10% 中性福馬林緩衝固定溶液配置
甲醛原液 (37-40% formalin)，100ml
磷酸二氫鈉 (Sodium phosphate, dibasic)，6.5g
磷酸氫鈉 (Sodium phosphate, monobasic)，6.5g
蒸餾水 (Distilled water)，1000ml

(五) 包埋石蠟 (Merck, 德國)，熔點為 56-58 °C

(六) 脫水劑：酒精

(七) 清潔劑：二甲苯 (xylene) (Merck, 德國)

(八) 水浴槽：Sakura, 日本

(九) 蘇木精染色液 (Mayer's Hematoxylin)：

蘇木精 (Hematoxylin)，1.0 gm
蒸餾水 (Distilled water)，1000 ml
碘酸鈉 (Sodium iodoate)，0.2 gm
銨或鉀明礬 (Ammonium or potassium sulfate)，50 gm
檸檬酸 (Citric acid)，1.0 gm

水合氯醛 (Chloral hydrate), 50 gm

(十) 伊紅染色液 (Eosin Staining Solution), 1% 伊紅酒精溶液:

伊紅 (Eosin Y, water and alcohol-soluble), 10 gm

蒸餾水 (Distilled water), 50ml

先將伊紅完全溶解於蒸餾水中，然後再加入 940 ml 95% 乙醇

(十一) 封片膠: Merck, 德國

(十二) 載玻片及蓋玻片: 德國製

(十三) 切片機: Leica

(十四) 全自動照像顯微鏡: Olympus

(十五) Image Pro-Lite 電腦軟體 (SMS Co., USA)

3-3 實驗動物

受精雞蛋於低溫冷藏狀態(18)下自台中中美種鷄場購回，並於低溫狀態(18)下運送，運送時間不超過 1.5 小時。雞蛋送至實驗室後，先秤重篩選出重量為 65 ± 5 g 之雞蛋，以照蛋燈照射雞蛋找尋氣室部位，並以筆將其氣室部位一一圈劃定位(圖 3.3、圖 3.4)，畫出氣室位置後，將整批受精雞蛋分成三組，分別為骨碎補組 24 個、控制組 14 個、鋁組 30 個，全部置放於孵蛋機中以 99.8°F 的溫度孵育(圖 3.5)，孵蛋機設定為每天旋轉 1/4 圈以模擬母雞孵育雞蛋之情形。於孵育之第七天，以細鐵鑽經 70%酒精消毒後，於已定位為氣室之位置中央鑽一小孔，作為日後注射樣品之位置。鑽洞之小孔以 3M 膠帶封住，以氣室朝上的方式置放入孵蛋機中，進行孵育。本實驗中之鷄胚胎發育時間以孵蛋機孵育之第一天作為鷄胚胎生長發育之第一天。



圖 3.3 照蛋燈。利用照蛋燈集中燈源，以畫出受精雞蛋之氣室位置。



圖 3.4 將受精雞蛋秤重後，篩選出 $65 \pm 5\text{g}$ 之受精雞蛋並分成三組。

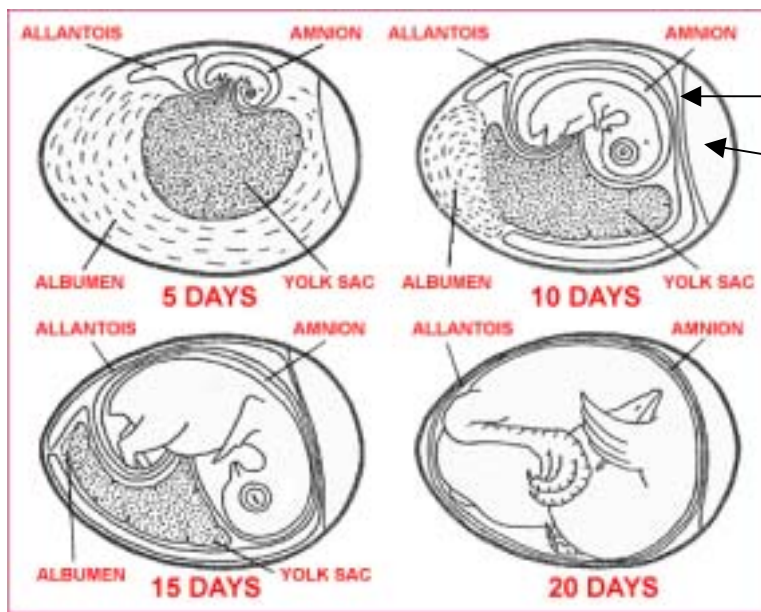
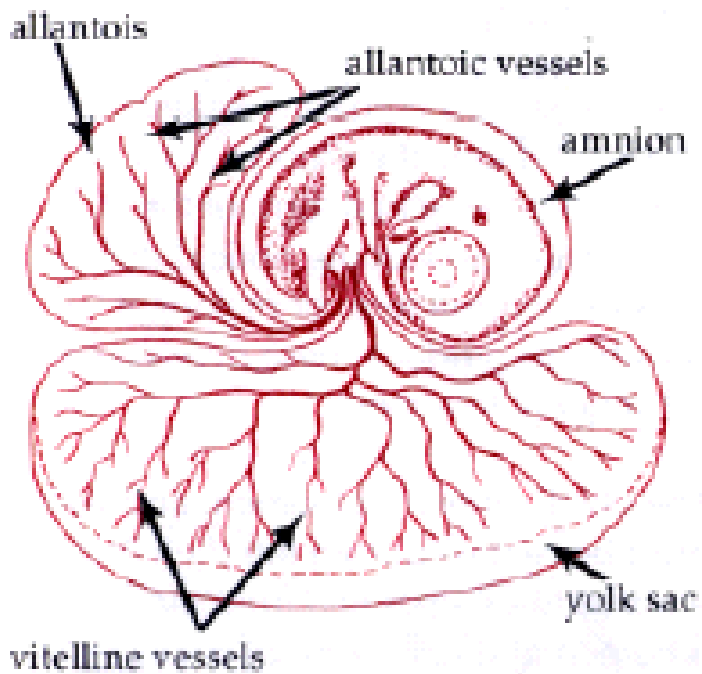


圖 3.5 三組受精雞蛋置放入孵蛋機中以進行孵育。

3-4 樣品收集及處理

3-4-1 藥品之注射

孵育之第八天起，每天分別於三組中注射 25 μ l 之骨碎補水萃物、0.7 % NaCl 及 60 mM aluminum citrate。注射前需先將封住氣室洞孔之 3M 膠帶取下，以 75%酒精消毒該位置，再利用 0.5 ml 之針筒抽取 25 μ l 注射樣品注射入氣室孔洞中，所注射之樣品會透過卵黃膜逐漸滲透進入胚胎中（圖 3.6）。



卵黃膜
氣室空腔

圖 3.6 雞胚胎型態。氣室空腔作為試劑樣品存放緩釋區，卵黃膜為半透膜，氣室空腔中之試劑逐漸透過卵黃膜釋入胚胎中，讓胚胎吸收試劑樣品。文獻來源：A. L. Romanoff, Cornell Rural School Leaflet, September, 1939

孵育之第 12 天（樣品注射 4 天）及第 16 天（樣品注射 8 天），自孵蛋機中將骨碎補組、控制組、鋁組各組分別取出 12 個、7 個、12 個受精雞蛋，進行解剖及長骨之收集。

3-4-2 取出雞胚胎

分別於孵育第 12 天及第 16 天，將雞胚胎犧牲以進行巨觀的觀察並取下其長骨進行骨切片。在孵育之第 16 天，自孵蛋機中之骨碎補組、控制組、鋁組分別取出 12 個、7 個及 12 個受精雞蛋進行解剖。

首先將蛋殼打破取出雞胚胎，將其腹部之動脈剪斷後置於二次水中，待其失去生命跡象後，以二次水沖洗外表去除血水與胚胎黏膜，以紙巾將表面拭乾之後觀察其外表生長情形並測量其身長。

3-4-3 收集雞胚胎之長骨

分別於第 12 天及第 16 天，將雞蛋破除蛋殼取出雞胚胎，以二次水將雞胚胎外表沖洗乾淨去除血水及附著於表面之黏膜，以紙巾將其表面拭乾後利用解剖剪刀取下左右腿，以解剖剪刀將腿骨表面之肌肉組織剔除得到第 12 天及第 16 天之雞胚胎脛骨，所得之雞胚胎脛骨存於 4°C 下準備進一步進行骨切片。

3-4-4 骨骼切片

自 4°C 保存環境中，取出雞胚胎脛骨，以生理食鹽水沖洗，並浸潤於生理食鹽水環境下，仔細地撥除骨膜，將兩端骨端軟骨仔細剔除，以二次水沖洗，並以紗布拭乾水分。長骨區可分成三段如圖 3.7²⁴所示，取出中段骨幹進行切片觀察。

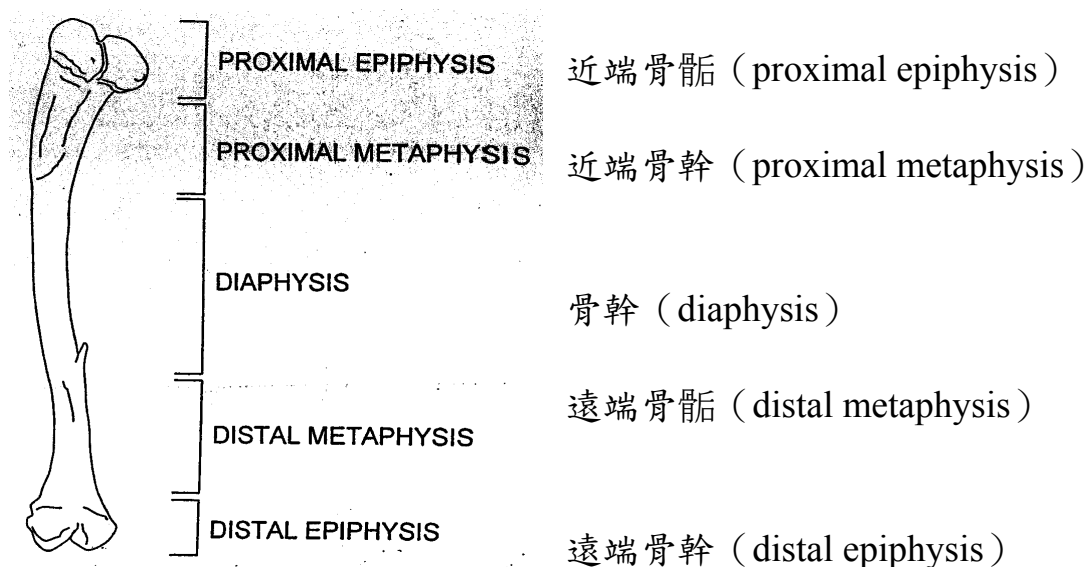


FIG. 1. Scheme of bone dissection. The tibia was divided into five regions: proximal epiphysis, proximal metaphysis, diaphysis, distal metaphysis, and distal epiphysis.

圖 3.7 脛骨分段示意圖。

文獻來源：J Bone Miner Res 2002; 17(9):1639-45

中段骨幹經脫水、浸潤、石蠟包埋等步驟，製作成後度為 4-5 μm 厚之切片，以蘇木精－伊紅染色 (Hematoxylin and Eosin Stain; H&E stain) 後檢查，組織切片、染色之各項程序細述如下。

1、脫水 (Dehydration)

脫水劑：酒精，以低濃度往高濃度之酒精濃度梯度進行脫水作用。脫水時間為：70% 酒精 1 小時→85% 酒精 2 小時→95% 酒精 2 小時→100% 酒精 1.5 小時。

2、清洗 (Clearing)

清洗作用之目的主要是使骨樣品變得乾淨透明，另一方面是能將酒精等脫水劑徹底地清除，以便於石蠟之浸潤。使用之清洗劑為二甲苯 (xylene)，因為 xylene 與石蠟能互溶，而形成溶液狀態。

3、浸潤 (Infiltration)

浸潤作用是利用一種包埋劑，可由液態轉為固態的特性，當包埋劑呈液態時可經由置換作用而進入組織間隙，然後再經由結晶作用而達到浸潤目的。本實驗所使用之浸潤劑為石蠟其熔點為 56-58 $^{\circ}\text{C}$ ，石蠟之浸潤通常是分成 2 至 3 個交換步驟，因為唯有如此，才可以完全除去所殘留之清洗劑。在浸潤作用進行時，需注意時間不可過久、溫度不可過高，因為時間過久或溫度過高都會使組織發生皺縮或變得過硬。

4. 包埋 (Embedding)

骨組織在浸潤完全後，必須使其包被於可凝固之石蠟包埋劑中，以便組織切片之切取。包埋操作程序如下：(a) 組織充分浸潤後，由石蠟浴內取出脫水罐內裝有待切標本之小盒子，打開取出浸潤好之組織，(b) 將溫熱之石蠟倒入包埋模內，約一半量 (倒時要慢，以免氣泡產生)。此時須注意石蠟溫度，當石蠟過熱時，組織與石蠟易分離，往往使得石蠟組織塊發生裂痕，染色時組織亦極易剝離。(c) 將包埋模移於冰冷之盤內，再以溫熱之夾子將骨組織放入包埋模之底層 (注意切面要朝下，骨幹直立於包埋模中)，立即倒入石蠟至包埋模之頂部，待石蠟凝固後再將該含

包埋模之盤子置於冰箱內。15-30 分鐘後即可修整石蠟塊待切片。石蠟塊可修成梯形者，以便於伸展或連續切片之製作。

5、製作切片

以迴轉式切片機 (Rotary microtome) 切下組織先置入 40°C 溫水槽中使石蠟伸展，此時注意有正反面，若方向錯誤較不易伸展。於溫水伸展槽中將平展之石蠟切片以上述之玻片撈取。將撈取之石蠟薄片置於溫水伸展槽邊等待切片水分烘乾，烘乾時間也不可過久，否則石蠟組織會溶掉。將玻片置於烘箱烘乾，約一小時左右即可脫蠟染色。

6、脫蠟作用

脫蠟作用程序如下：(1) 將切片放入 xylene 中連續兩次，每次約浸 5 分鐘，使石蠟完全脫除；(2) 將切片置入 100% 酒精二次，每次約浸 5 分鐘，使 xylene 完全脫除，每次約浸 5 分鐘；(3) 將切片置入 95% 酒精中洗滌二次，每次約浸 5 分鐘；(4) 將切片置入 75% 酒精中洗滌二次，每次約浸 5 分鐘；最後水洗 5 分鐘。

7、染色

先染 Mayer's Hematoxylin 40 分鐘，水洗 5 分鐘之後，再染 Eosin Staining Solution 約 1 分鐘，旋即進行脫水。

8. 脫水

脫水作用之目的是藉由低濃度酒精依次至高濃度酒精，徐徐將組織中水分除去，可避免水泡之產生。脫水由低濃度酒精依次至高濃度酒精分成三槽，每槽約作用 20 分鐘。

9. 清洗 (透明)

最常使用者為 xylene，其可將酒精取代出，同時具有將切片透明化之功用。xylene 分成三槽，每槽約作用 3 分鐘。

10. 封片

封片的目的為保護玻片上之組織切片，同時便於顯微鏡之觀察，蓋玻片之大小隨組織切片的大小而定，但它必須大於組織切片。封片過程為滴一滴封片膠於組織中央，然後以 45 度角徐徐將蓋玻片放下，以鑷子輕壓趕出氣泡，最後用沾有 xylene 之紗布清除多餘之封片膠，將切片平放通風處或抽氣櫃內，待乾燥後即可鏡檢。以 Image Pro-Lite 軟體計算軟骨細胞 (chondrocyte area)、皮質骨面積 (cortical bone area) 及骨徑寬 (thickness of cortical bone)。

3-4-5 統計分析

本實驗所得之數據以 SAS 之 two-way ANOVA 及 Duncan's Multiple Range Test 分析。鷄胚胎身長以 student's t-test 進行統計分析。軟骨細胞、骨面積及骨徑寬以 Duncan's Multiple Range Test 分析。 $p < 0.05$ 表示有顯著差異。

第四章 結果

4-1 巨觀型態學觀察

雞胚胎經 8 天慢性注射骨碎補水萃物及鋁後發現，鋁組之外觀出現明顯器官外露及嚴重出血現象，鋁組之外型較骨碎補組、控制組身長短，如圖 4.1。



圖 4.1、慢性注射 8 日後三組之巨觀觀察。

Figure 4.1 Observation of morphology of each experimental chick embryo. Effects on the development of chick embryos by 8-day treatment of (A) 25 μ l of 60 mM aluminum citrate, (B) 25 μ l of 0.7% NaCl or (C) 25 μ l of the crude water extract of Gusuibu. The length of chick embryos in groups a, b, and c were 7.66 ± 0.61 cm, 14.08 ± 0.81 cm, and 13.90 ± 0.76 cm, respectively.

測量骨碎補組、控制組及鋁組之鷄胚胎平均身長分別為 13.90 ± 0.76 cm、 14.08 ± 0.81 cm 及 7.66 ± 0.61 cm，鋁組身長較骨碎補組及控制組明顯短 (7.66 ± 0.61 cm vs. 13.90 ± 0.76 cm、 14.08 ± 0.81 cm, $p < 0.05$)，骨碎補組與控制組之鷄胚胎身長並無顯著差異 (13.90 ± 0.76 cm vs. 14.08 ± 0.81 cm, $p > 0.05$)，如表 4.1。

表 4.1、慢性注射三種試劑 8 日後之身長測量

Table 4.1 The average body length of chick embryos.

Al group ^a	NaCl group ^a	Gusuibu group ^a
7.66 ± 0.61 ^b	14.08 ± 0.81 ^c	13.90 ± 0.76 ^c

^aChick embryos chronically treated with 60 mM aluminum citrate, 0.7% NaCl or the crude water extract of Gusuibu for 8 days.

^b $p < 0.05$, Al vs. 0.7% NaCl, $p < 0.05$, Al vs. Gusuibu.

^cnot significant.

Results expressed as mean \pm SD.

第 12 天及第 16 天取出鷄胚胎之脛骨後，發現經 4 天及 8 天慢性注射鋁之鷄胚胎長骨中段有明顯彎曲現象，其餘二組均無此現象，如圖 4.2。

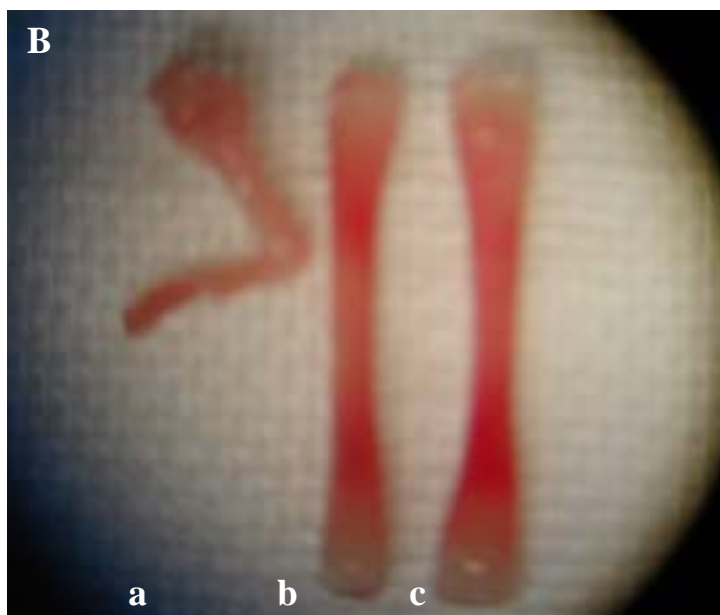


圖 4.2、慢性注射後四天(A)及八天(B)之長骨

Figure 4.2 Photography of the long bone of 12-day (A) and 16-day (B) embryos chronically treated on day 8 of incubation with **a** 60 mM aluminum citrate, **b** 0.7% NaCl, and **c** the crude water extract of Gusuibu.

4-2 骨切片顯微觀察

經四天慢性注射 0.7% NaCl 之鷄胚胎長骨切片後，觀察到許已形成的骨小樑組織及軟骨細胞，如圖 4.3。

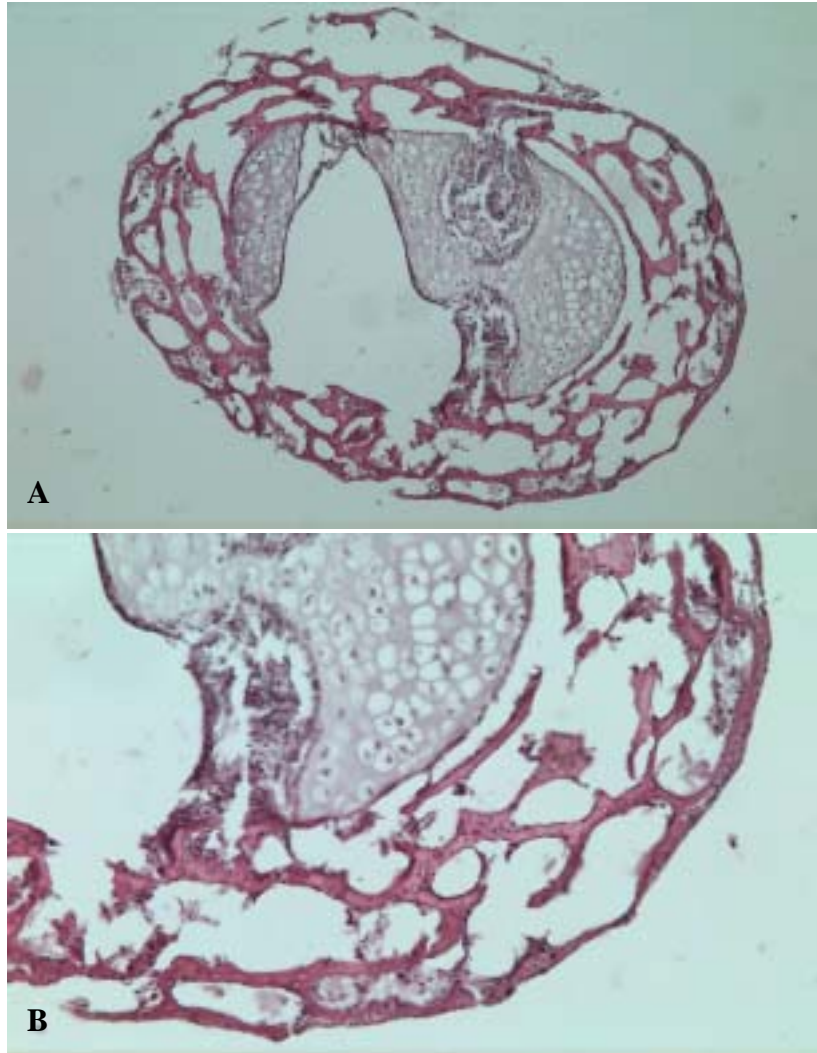


圖 4.3 慢性注射 0.7% NaCl 四天後之長骨切片顯微觀察圖。

Figure 4.3 Histological observations of long bone of chick embryo treated with 0.7% NaCl for 4 days. **A**, low power view of HE staining of 5- μ m section of the mid-diaphysis of the tibia of chick embryo treated with 0.7% NaCl for 4 days, (HE, $\times 10$) . **B**, higher power view of the selected section in **Figure 4.3-A** (HE $\times 20$) .

經四天慢性注射檸檬酸鋁之鷄胚胎長骨切片，發現許多軟骨細胞增生，並觀察到類骨質形成但未骨化為骨小樑的組織，此外，發現骨外徑變形，如圖 4.4。

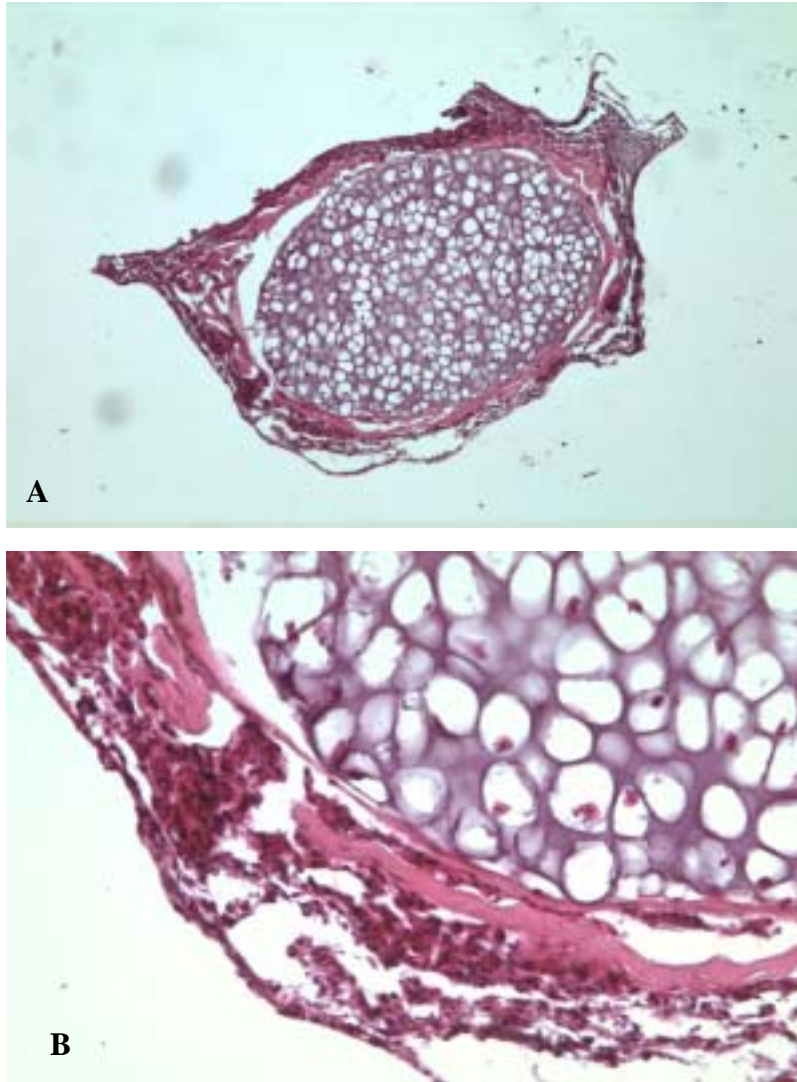


圖 4.4 慢性注射檸檬酸鋁四天後之長骨切片顯微觀察圖。

Figure 4.4 Histological observations of long bone of chick embryo treated with aluminum citrate for 4 days. **A**, low power view of HE staining of 5- μ m section of the mid-diaphysis of the tibia of chick embryo treated with aluminum citrate for 4 days. (haematoxilin and eosine, $\times 10$). **B**, higher power view of the selected section in **Figure 4.4-A** (HE $\times 40$).

骨碎補水萃物慢性注射四天後之鷄胚胎長骨切片，發現許多骨小樑組織，同時觀察到許多造骨細胞聚集於骨邊緣，此組較少觀察到軟骨細胞，如圖 4.5。

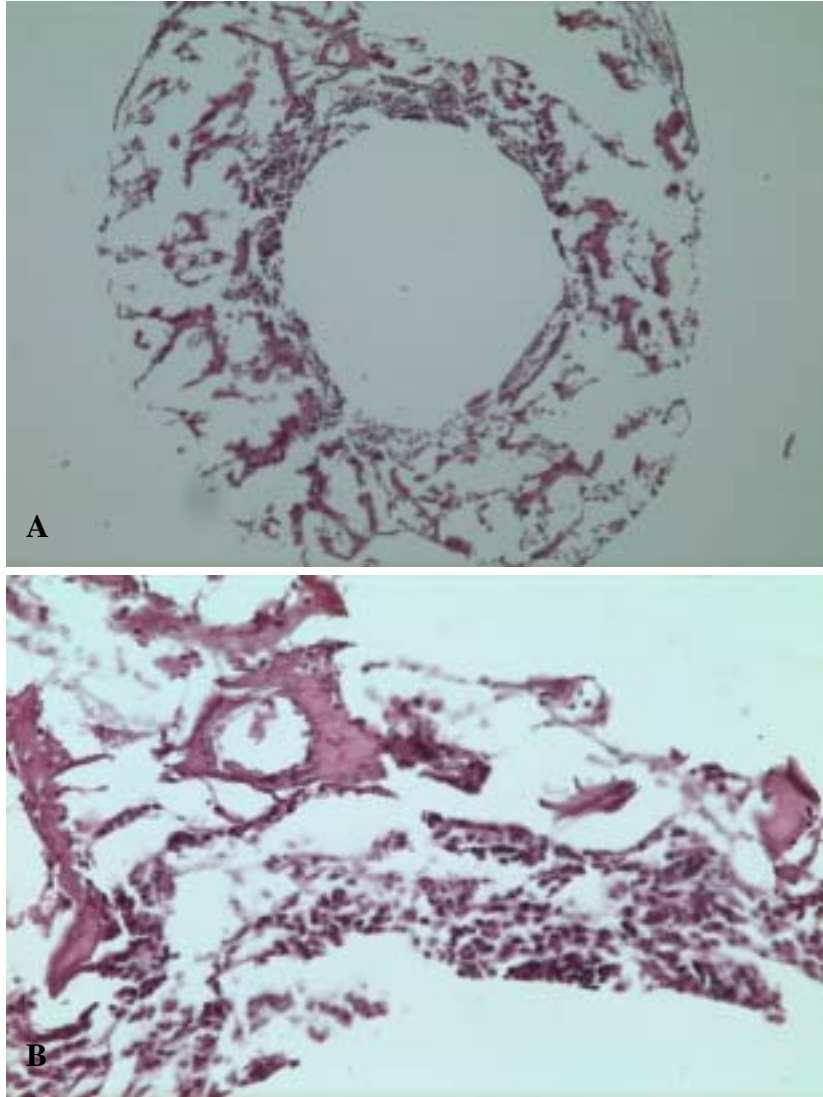


圖 4.5 慢性注射骨碎補水萃物四天後之長骨切片顯微觀察圖。

Figure 4.5 Histological observations of long bone of chick embryo treated with the crude water extract of Gusuibu for 4 days. **A**, low power view of HE staining of 5- μ m section of the mid-diaphysis of the tibia in chick embryo treated with the crude water extract of Gusuibu for 4 days, (HE, $\times 10$) . **B**, higher power view of the selected section in **Figure 4.5-A** (HE $\times 40$).

慢性注射 0.7% NaCl 八天後之鷄胚胎長骨切片，發現此時期軟骨細胞已全數骨化形成緻密的骨小樑組織，於此可推斷鷄胚胎孵育之第 16 天軟骨細胞均骨化形成骨小樑，如圖 4.6。

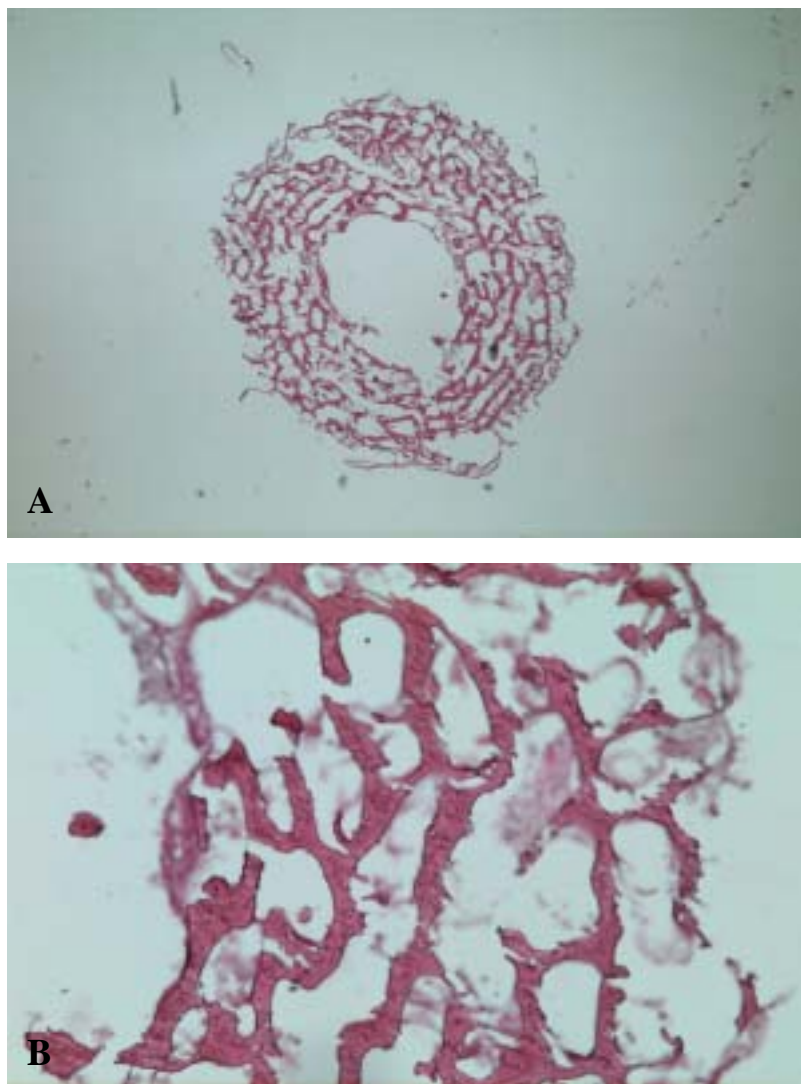


圖 4.6 慢性注射 0.7% NaCl 八天後之長骨切片顯微觀察圖。

Figure 4.6 Histological observations of long bone of chick embryo treated with 0.7% NaCl for 8 days. **A**, low power view of HE staining of 5- μ m section of the mid-diaphysis of the tibia of chick embryo treated with 0.7% NaCl for 8 days, (HE \times 10) . **B**, higher power view of the selected section in **Figure 4.6-A** (HE \times 40) .

經八天慢性注射檸檬酸鋁之鷄胚胎長骨切片，發現許多軟骨細胞繼續增生且完全無任何骨小樑形成骨化作用的現象，如圖 4.7。

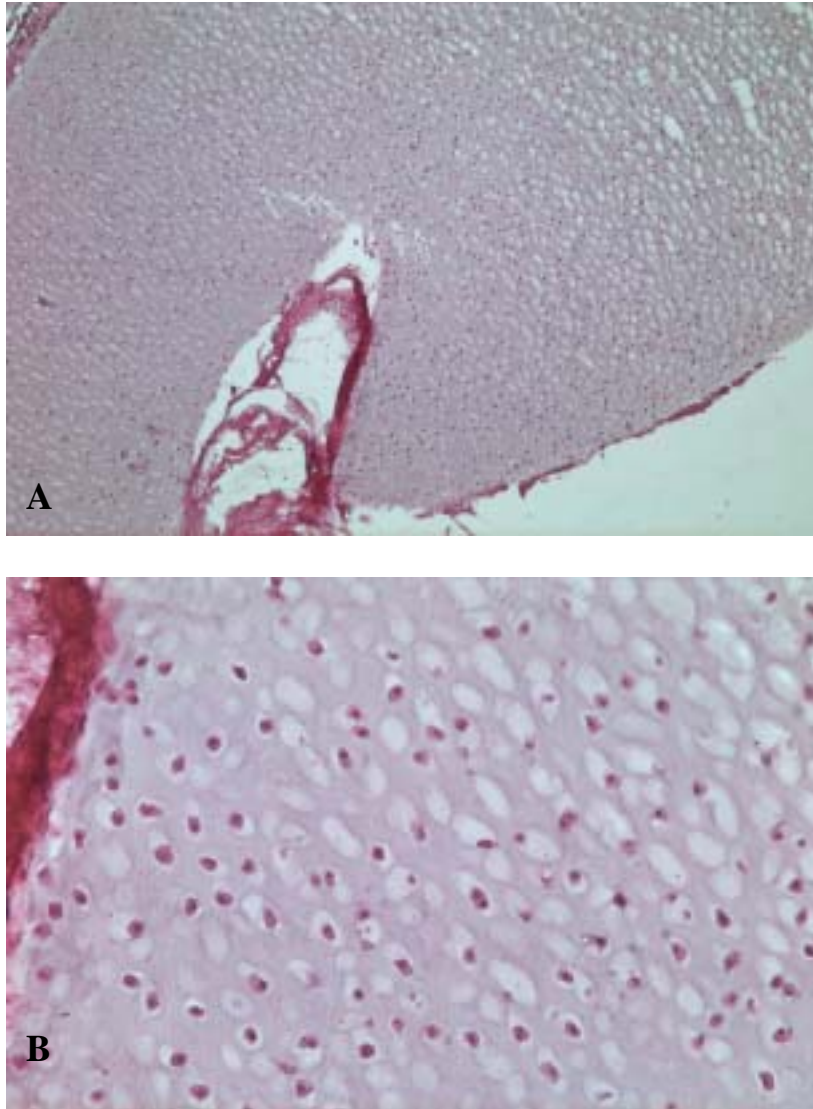


圖 4.7 慢性注射檸檬酸鋁八天後之長骨切片顯微觀察圖。

Figure 4.7 Histological observations of long bone of chick embryo treated with 60 mM Al-citrate for 8 days. **A**, low power view of HE staining of 5- μ m section of the mid-diaphysis of the tibia of chick embryo treated with 60 mM Al-citrate for 8 days, (HE, $\times 10$) . **B**, higher power view of the selected section in **Figure 4.7-A** (HE $\times 40$) .

骨碎補水萃物慢性注射八天後之鷄胚胎長骨切片，觀察到許多緻密的骨小樑組織，如圖 4.8。

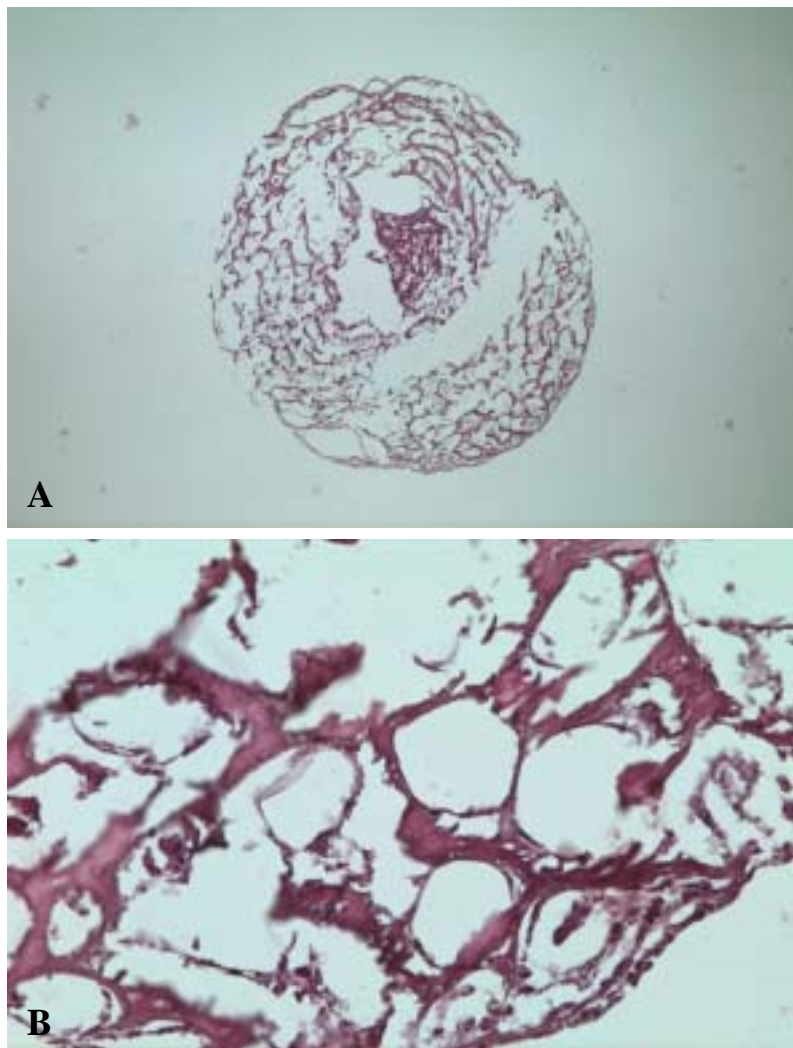


圖 4.8 慢性注射骨碎補水萃物八天後之長骨切片顯微觀察圖。

Figure 4.8 Histological observations of long bone of chick embryo treated with the crude water extract of Gusuibu for 8 days. **A**, low power view of HE staining of 5- μ m section of the mid-diaphysis of the tibia of chick embryo treated with the crude water extract of Gusuibu for 8 days (HE \times 4). **B**, higher power view of the selected section in **Figure 4.8-A** (HE \times 40) .

由上述發現，控制組慢性注射 4 天後之鷄胚胎長骨切片有軟骨細胞及骨小樑的生成之現象（圖 4.3），當繼續慢性注射 0.7% NaCl 至 8 天後之鷄胚胎長骨切片，觀察到完整且緻密的骨小樑組織，同時此期並無觀察到任何的軟骨細胞（圖 4.6），因此，可推論鷄胚胎長骨骨化作用於孵育後第 16 天完成。另外，經骨碎補水草物慢性注射 4 天後之鷄胚胎長骨切片中，可觀察到此時期之軟骨細胞幾乎已完全骨化為骨小樑，且骨小樑組織完整、緻密（圖 4.5），而於骨碎補水草物慢性注射 8 天後之切片中觀察到仍是緻密且完整之骨小樑組織（圖 4.8）。

另外，連續注射檸檬酸鋁 4 天後之鷄胚胎長骨切片顯示出軟骨細胞增生，及未骨化之類骨質（圖 4.4），慢性注射檸檬酸鋁 8 天後（圖 4.7）之軟骨細胞增生面積較注射檸檬酸鋁 4 天者增加，且慢性注射檸檬酸鋁 8 天後之鷄胚胎長骨切片完全觀察不到骨小樑生成，同時骨外徑亦因骨化不全而出現更嚴重變形，因此無法取得完整中段骨橫切面。由此可觀察到經檸檬酸鋁注射之鷄胚胎長骨切片顯示出軟骨細胞增生的現象，且隨檸檬酸鋁注射時間增加，軟骨細胞面積也隨之增加，但因觀察不到骨小樑形成，而推論骨化作用被鋁所抑制。

長骨組織切片中之軟骨細胞面積、皮質骨面積及骨徑寬等數據與骨化作用程度、骨強度有關，故以 Image Pro-Lite 電腦軟體計算骨切片之軟骨細胞面積、皮質骨面積及骨徑寬，依下列定義量測及計算上述三項^{25,26}（圖 4.9）。

1. 骨切片面積（cross-sectional area）：骨切片中沿外骨膜（periosteal surface）範圍所描繪之區域，包括髓質面積。
2. 髓質面積（medullary area）：沿骨切片中之內骨膜（endosteal surface）描繪出來電腦計算所得區域。
3. 軟骨細胞面積（chondrocyte area）：骨切片中描繪軟骨細胞區域並經電腦計算統計所得。
4. 皮質骨面積（cortical bone area）：骨切片面積扣除軟骨細胞面積、髓質面積及空白區後經電腦計算統計所得。
5. 骨徑寬（thickness of cortical bone）：選定該骨切片中骨徑最寬之位置，定位後以電腦游標畫一直線所得之距離。

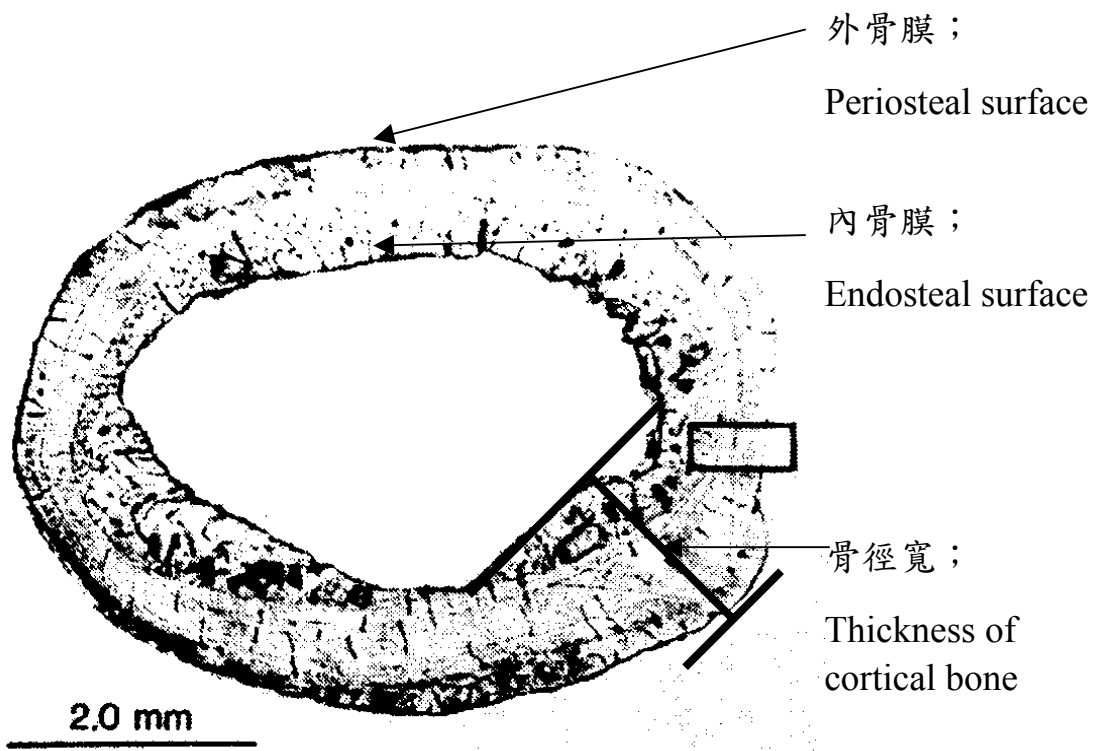


圖 4.9 骨切片示意圖。參考來源：*Endocrine Reviews*.19 (1):55-79, 1998

以 Image Pro-Lite 軟體進行骨切片組織顯微測量之結果並經軟體計算與統計後之結果綜合整理於表 4.2、表 4.3 及圖 4.4 至 4.7。

表 4.2 得知慢性注射骨碎補水草物 4 天後之皮質骨面積、皮質骨徑及軟骨細胞面積與控制組於統計上均無顯著差異性 ($p > 0.05$)，此外，經 8 天慢性注射骨碎補水草物之皮質骨面積較同時期之控制組大 ($754594.20 \pm 123264.54 \mu\text{m}^2$ v.s. $576075.49 \pm 74965.67 \mu\text{m}^2$ ，

$p < 0.05$)，且皮質骨徑亦較同時期之控制組厚 ($349.03 \pm 21.14 \mu\text{m}$ v.s. $310.67 \pm 41.89 \mu\text{m}$ ， $p < 0.05$)，意即為，慢性注射 4 天後骨碎補組與控制組並無顯著差異，直至慢性注射 8 天後，觀察到骨碎補組之皮質骨較同期之控制組大且厚。

慢性注射 8 天後之鋁組之皮質骨面積、皮質骨徑因骨嚴重變形而無法量測，而此時期之控制組及骨碎補組則因骨化作用完成，而無法觀察到軟骨細胞。

表 4.2 慢性注射三種不同樣品 4 日及 8 日後之鷄胚胎脛骨中段切片之皮質骨面積、皮質骨厚度、軟骨細胞面積比較

Table 4.2 Effect of each treatment on bone measurements at the tibia mid-diaphysis^a

Treatment	Cortical bone surface (μm^2)	Thickness of cortical bone (μm)	Chondrocyte surface (μm^2)
Day 4- 0.7% NaCl	466702.25± 194394.16	266.23± 157.50	139307.90± 177077.37
Day 4 -Guisubu	640327.21± 331712.37 ^d	337.01± 48.90 ^c	19789.39± 15599.21
Day 4 -aluminum	104085.32± 162584.83	31.40± 6.63	162984.38± 17430.32
Day 8 -0.7% NaCl	576075.49± 74965.67 ^{d,f}	310.67± 41.89 ^{c,e}	NA ^b
Day 8 -Guisubu	754594.20± 123264.54 ^f	349.03± 21.14 ^e	NA ^b

^aResults are the mean±SD.

^bNA=not available.

^{c,e,f} $p < 0.05$.

^d $p > 0.05$.

三組慢性注射 4 日及 8 日後，長骨切片中軟骨細胞面積與皮質骨面積所佔比率計算製表為表 4.3，得知慢性注射骨碎補水草物 4 天後之軟骨細胞佔切片面積之 1.47 %，較同時期之控制組(20.66 %)與鋁組(75.48 %)之軟骨細胞面積比例小，且皮質骨所佔面積較(79.65 %)同時期之控制組(76.90 %)與鋁組(24.58 %)大，意即慢性注射骨碎補水草物 4 天後之軟骨細胞較其餘二組少，而皮質骨較其餘二組大。此外，表 4.3 觀察到慢性注射骨碎補水草物 8 天後之皮質骨較(93.2 %)同時期之控制組(90.68 %)厚。此期之鋁組因骨變形而無法取得皮質骨厚度，而骨碎補組及控制組之軟骨細胞係因全數骨化形成骨小樑，而無軟骨細胞數據可利用。

表 4.3 慢性注射 4 日及 8 日之骨切片中軟骨細胞面積及皮質骨面積所佔比率

Table 4.3 The ratio of chondrocytes area and cortical bone area on cross-sectional area.

Treatment	Cross-sectional area (m2)	Chondrocytes area (%)	Cortical bone area (%)
Day 4- 0.7% NaCl	606816.25	20.66 %	76.90 %
Day 4- Guisubu	803888.93	1.47 %	79.65 %
Day 4- aluminum	215905.94	75.48 %	24.58 %
Day 8- 0.7% NaCl	635276.25	NA ^a	90.68 %
Day 8- Guisubu	809001.93	NA ^a	93.2 %

^aNA= not available.

圖 4.10 發現慢性注射後第 4 天鋁組與其他二者有顯著差異，表示鋁組之皮質骨面積較控制組與骨碎補組小，且於慢性注射鋁 8 天後因骨嚴重變形而無法取得完整骨組織切片，因此此期之鋁組並無數據可計算、統計。此外，控制組與骨碎補組之慢性注射 4 天後之數據統計後發現，二者之皮質骨面積並無顯著差異性。另外，比較慢性注射 8 天後之控制組與骨碎補組之數據發現，骨碎補組之皮質骨面積顯著地較控制組大 ($p < 0.05$)，意即鷄胚胎經骨碎補水碎物連續注射 8 天後之皮質骨面積較同時期之控制組大約 2.52%。

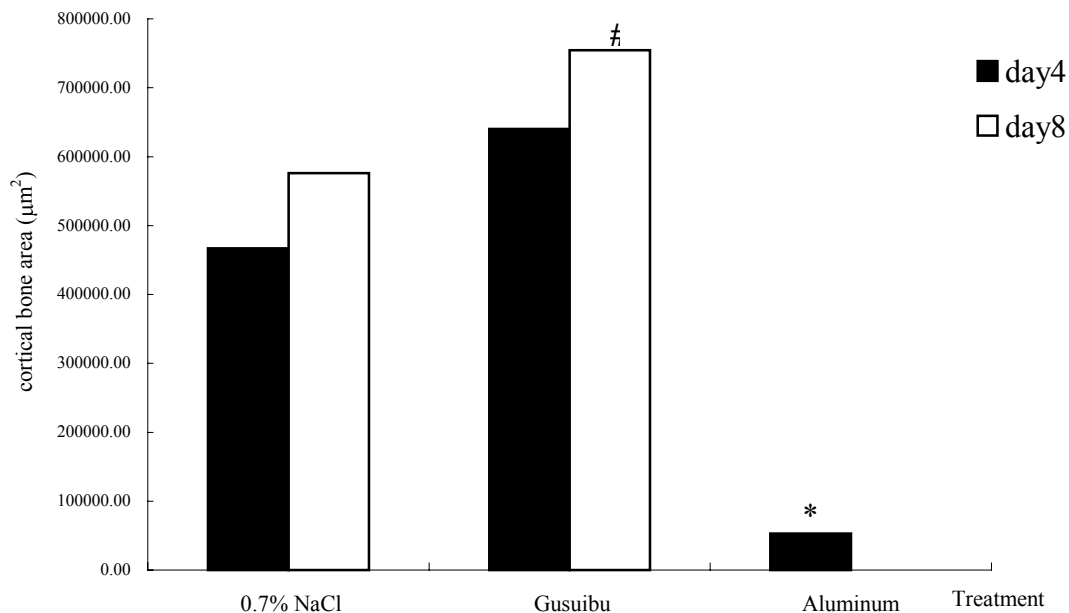


圖 4.10 比較三組慢性注射後第四天及第八天之皮質骨面積。

Figure 4.10 Measurements of the area of cortical bone surface after treatment with 0.7% NaCl, the crude water extract of Gusuibu and aluminum.

Results are expressed as mean \pm S.D. (* $p < 0.05$ vs. control and Gusuibu groups.

[#] $p < 0.05$ vs. control group)

比較三組於慢性注射 4 天及 8 天後之皮質骨厚度，發現慢性注射 4 天後之鋁組與其他二者有顯著差異，鋁組之皮質骨厚度較控制組與骨碎補組低，此外，慢性注射 4 天後之控制組與骨碎補組之數據統計後發現，二者無顯著差異性。然而，比較慢性注射 8 天後之控制組與骨碎補組發現，骨碎補組之皮質骨厚度顯著地較控制組厚 ($p < 0.05$)，意即雞胚胎經骨碎補水碎物連續注射 8 天後之皮質骨厚較同時期之控制組厚約 39 mm。

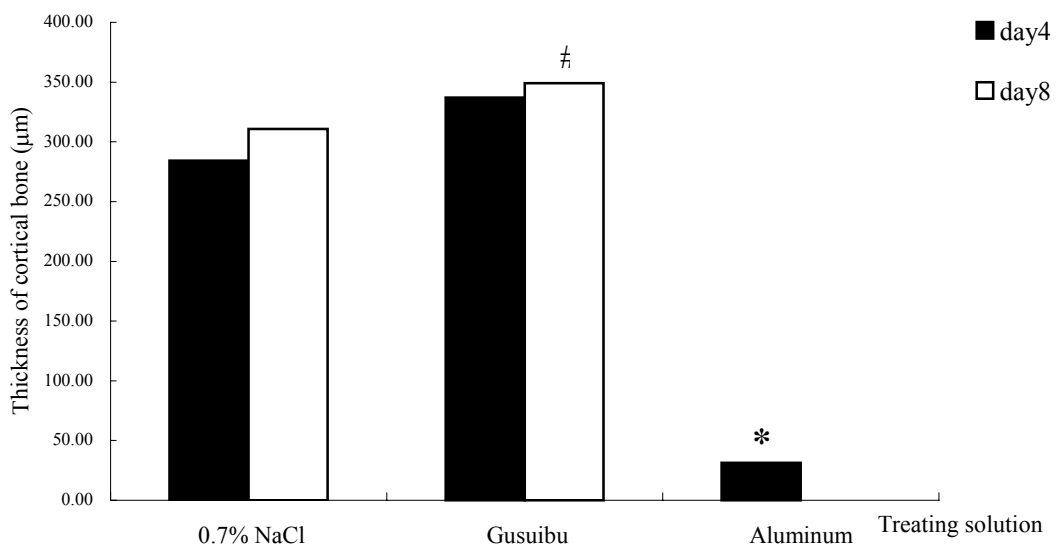


圖 4.11 比較三組慢性注射後第四天及第八天之皮質骨厚度。

Figure 4.11 Measurements of the thickness of cortical bone after treatment with 0.7% NaCl, the crude water extract of Gusuibu and aluminum.

Results are expressed as mean \pm S.D. (* $p < 0.05$ vs. control and Gusuibu groups. # $p < 0.05$ vs. control group)

比較慢性注射第 8 天之控制組與第 4 天骨碎補組之皮質骨面積，發現慢性注射 4 天之骨碎補組之皮質骨面積與 8 天之控制組相似($640327.21 \pm 331712.37 \mu\text{m}^2$ v.s $576075.49 \pm 74965.67 \mu\text{m}^2$)，意即為，4 天之骨碎補組之皮質骨面積相當於 8 天之控制組之皮質骨面積 (圖 4.12)。

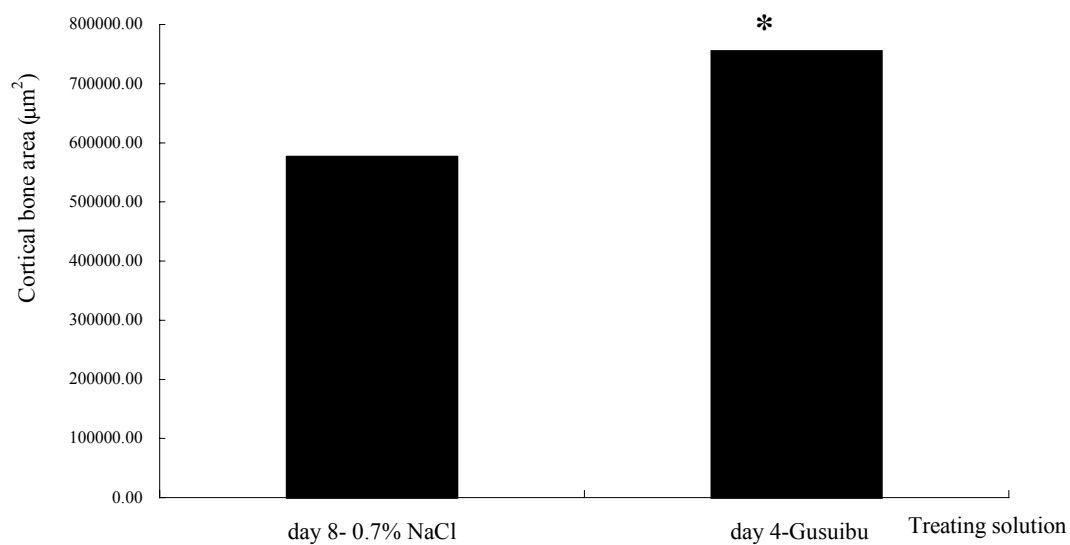


圖 4.12 慢性注射後第 8 天控制組與第 4 天骨碎補組之皮質骨面積比較

Figure 4.12 Comparison of the area of cortical bone between the long bone of day 8-0.7% NaCl and day4-Gusibu treated on chick embryos.

Results are expressed as mean \pm S.D. (* $p < 0.05$ vs. day 8-0.7% NaCl)

圖 4.13 說明慢性注射 4 天之骨碎補組之皮質骨厚度與 8 天之控制組相似 ($p > 0.05$), 意即為, 4 天之骨碎補組之皮質骨厚度相當於 8 天之控制組之皮質骨厚度

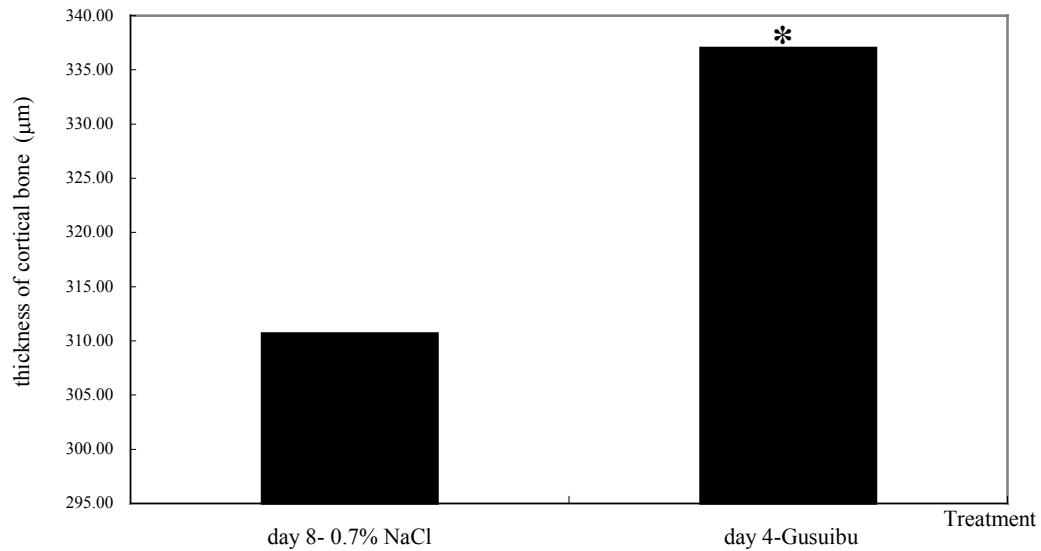


圖 4.13 慢性注射後第八天控制組與第四天骨碎補組之皮質骨厚度比較
Figure 4.13 Comparison of the thickness of cortical bone between the long bone of day 8-0.7% NaCl and day4-Gusuibu treated on chick embryos.
Results are expressed as mean \pm S.D. (* $p < 0.05$ vs. day 8-0.7% NaCl)

第五章 討論

根據多年以雞胚胎作為實驗模式之學者 Firling 於 1999 年發表文獻中表示，以雞胚胎作為實驗模式的優點為（一）雞胚胎已脫離母體為一獨立的生存個體，實驗期間之營養均由其卵黃供給，因此不受外界營養供應之影響，亦無攝食及進食量的問題，（二）雞胚胎正值成長發育期許多荷爾蒙均未發展成熟，因此可直接介入觀察其生長初期骨骼的成長，（三）雞胚胎時期之骨骼成長發育不受到骨合成（bone formation）及骨溶蝕（bone resorption）平衡作用的影響，因此以雞胚胎作為實驗模式可直接觀察特定之試劑對於骨成長發育之影響¹⁹。

雞胚胎之長骨礦物質化（mineralization）於孵育後第八天開始²⁷（表 5.1），因此，本實驗自第八天開始，進行慢性注射三種不同樣品入受精雞蛋之氣室，於注射後的第 4 天（孵育第 12 天）及第 8 天（孵育第 16 天）進行巨觀的型態觀察及微觀的骨切片觀察，結果發現鋁抑制了骨化之過程，並導致骨軟化現象，而骨碎補水草物則具有促進骨化的作用。

表 5.1 鷄胚胎孵育各時期之長骨生長情形

參考來源：Develop Biol. 86:147-156, 1981

stage	incubation	Periosteal area	Cartilage model	Limb
24	4-4.5	Not present	Not present	Type 1 collagen uniformly distributed
25	4.5-5.0	No histochemical evidence of bone	Metachromatic staining first observed	Increased hyaluronidase activity; rapid ^{35}S incorporation into core
26-27	5-5.5	Cells distinct from cartilage core	Increased metachromasia cell elongation of midcartilage mass	
28	5.5-6.0	Perichondral region fluorescence with Type 1 collagen antibody; population of cells in middiaphysis stain positive for alkaline phosphatase	Increase in cartilage zone	Cells develop adenylate cyclase response to PTH
29-30	6-7	Osteoid histochemically detected; increase in alkaline phosphatase positive zone; perichondrium becomes bilayered periosteum	Cartilage hypertrophy begins	Increase in alkaline phosphatase activity
31	7.0-7.5	Type 1 collagen synthesis increases	Increased cartilage hypertrophy	Adenylate cyclase response to calcitonin
32	7.5	Elongation and thickening of alkaline phosphatase positive zone	Increased cartilage hypertrophy	Increased calcitonin response
33	7.5-8	Alizarin red S positive stain for calcium; EM localization of mineral deposits		Increase in osteocalcin
34	8	Appearance of hydroxyapatite crystals	Vascular invasion of cartilage	--

實驗中以巨觀型態學觀察可發現鋁嚴重影響鷄胚胎長骨之生長，鋁組之鷄胚胎外型生長明顯較其他二組短小，且其長骨於第 4 天及第 8 天都觀察到有明顯彎曲的現象，此項發現與過去的研究報告有一致性，1994，1999 年 Firling 等人均觀察到，此外，鷄胚胎外型有出血現象。

根據文獻記載鋁有明顯抑制骨骼生長並導致骨軟化症 (osteomalacia) 之現象^{12,16,18,19,20,28}，1986 年 Goodman 發表鋁抑制骨生長的可能機轉²⁹為：(一) 鋁可視為一個骨礦物質化之生化抑制劑 (physical-chemical inhibitor)；(二) 鋁會抑制腎臟中 25(OH)-vitamin D-1. α -hydroxylase 之合成³⁰。

1982 年 Maloney 等人以腎衰竭病患 (osteomalacia) 的骨骼進行組織切片後，發現有嚴重骨化不全的情形³¹，1984 年 Goodman 等人以動物實驗發現靜脈注射鋁的動物出現骨礦化不全的現象，新生的類骨質無法進一步骨化成為新生骨小樑，利用組織切片的方法同樣發現因軟骨症而出現的組織缺損現象³⁰。類骨質是形成新骨前由造骨細胞 (osteoblast) 所產生的組織，一旦類骨質形成之後，則是礦物質化的作用開始，鈣及磷會形成氫氧磷灰石沉積於類骨質中，逐漸使骨骼組織變得堅硬，使骨骼具有強力可抵抗外力不彎曲，若骨合成的階段只形成類骨質而未進一步進行礦物質化 (骨化作用)，則會因此而形成骨化不全的軟骨結構 (骨組織中未有足夠之氫氧磷灰石沉積於類骨質中)。軟骨症與骨質疏鬆症之差別如圖 5.1。圖 5.1 可得知骨軟化症之骨組織中骨基質較正常骨所含之骨基質多，但礦物質部分較正常骨所含之礦物質量少，使得骨軟化症之骨骼組織之骨強力減少，因此無法負重。而骨質疏鬆症則是骨中礦物質部分 (鈣質總量) 降低，造成骨組織出現內部疏鬆、孔洞而呈現易脆的特性。

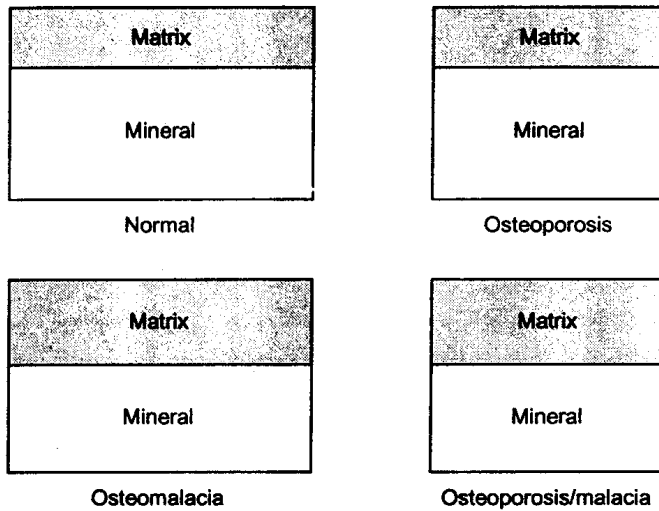


Illustration of the difference between osteoporosis and osteomalacia. In osteoporosis the amount of bone is decreased but the ratio of matrix to bone mineral is normal. In osteomalacia, the amount of bone is normal but the ratio of matrix to bone mineral is decreased.

圖 5.1 骨軟化症 (osteomalacia) 與骨質疏鬆 (osteoporosis) 之比較。

參考來源：Philip Sambrook. Chapter 5, Systems of the body.

在實驗中以 Image Pro-Lite 軟體統計及計算後發現，慢性注射鋁 4 天後之軟骨面積佔骨切片面積 75.48%，相較於控制組 (20.66%) 及骨碎補組 (1.47%) 均較高，且繼續注射鋁至第 8 天觀察到軟骨細胞幾乎已佔整個骨切片面積，由此可知，鋁幾乎完全地抑制雞胚胎長骨骨化作用，此外，與骨強度有關之皮質骨厚度，由慢性注射 4 天後之 31.4 μm 至 8 天後無完全變形無法量測之結果，發現隨注射鋁時間增加，骨化不全現象愈加明顯。

慢性注射骨碎補水萃物之雞胚胎長骨切片與同時期控制組比較有促進軟骨細胞提早鈣化的現象。慢性注射骨碎補 4 天後之軟骨細胞面積佔整個切片面積 (cross-sectional area) 1.47 %，相較於同時期之控制組軟骨面積佔整個切片面積為 20.66 % (表三)，由此可知，骨碎補水萃物較控制組提早骨化。骨合成作用之初期會出現軟骨細胞增生的現象，也就是說，軟骨細胞增生是形成新骨前的一個步驟³²，當軟骨細胞形成後，隨著類骨質慢慢生成之同時，軟骨細胞會逐漸減少，之後類骨質會進行礦物質化，形成許多骨小樑，骨小樑慢慢地增加，彼此形成一個網狀、緻密且完整之骨組織結構，此骨組織則為一個完整具強力的骨組織，可抵抗外力³¹。

慢性注射骨碎補水萃物後第 8 天，皮質骨面積及皮質骨厚度均較同時期之控制組高。比較慢性注射骨碎補水萃物 4 天後之骨切片與 8 天控制組之骨切片，發現骨碎補組第 4 天之皮質骨面積及皮質骨厚度均較控制組高，明顯觀察到骨碎補水萃物確實較控制組提早骨化的現象。

Ohlsson 等人²⁶發表文獻中指出，在動物實驗中要了解骨代謝情形最好的方式進行骨組織的分析。骨組織切片分析能夠更深層的探討骨骼生長型態，因此才能明確解釋實驗的結果。本實驗則利用一般實驗室常使用之切片、染色的方法與選擇生長週期較短，且受賀爾蒙及攝食影響較少的雞胚胎作為實驗模式，藉以觀察民間常用之中草藥—骨碎補及毒性物質鋁對於雞胚胎長骨生長發育之影響。

根據涂等人於 2001 年發表『骨碎補類藥材之生藥學研究』³²中指出台灣民間經常使用的骨碎補通常分有六大類，本實驗所使用的為一般最為常見的大葉骨碎補 (*Davallia divaricata* BLUME) 屬於骨碎補科 (Davalliaceae) 骨碎補屬 (*Davallia* SMITH)，其根莖中含有骨碎補酸 (davallic acid)、黃-3-醇糖苷、原矢車菊素糖苷類等成分。

行政院衛生署已建立健康食品安全評估方法，分別包括健康食品之調節血脂、調整腸胃、改善骨質疏鬆等評估方法，關於骨質部分的健康食品目前多以骨質疏鬆為主要訴求，安全評估方法則利用成熟之年老大鼠或卵巢切除之雌性大白鼠，模擬人類老年族群或停經之婦女，以股骨、脛骨或其他部為之骨骼切片計算骨小樑數目，或其他適當生理或病理之觀察與診斷，或是測量骨密度，當骨骼之組織學判斷及分析發現實驗組明顯優於控制組時，表示受試品對於預防骨質疏鬆症可能有幫助。

於本實驗中，以雞胚胎的模式取代年老或卵巢切除之雌鼠主要原因有三：(一)雞胚胎實驗不受飼養環境與攝食條件及不受賀爾蒙調控等因素之影響，(二)雞胚胎生長週期短，實驗重複性高，(三)此模式之耗用成本較低，對於初期篩選具療效之中草藥時為一個非常適合的實驗動物模式。

此外，目前有許多學者投入雞胚胎骨蛋白之研究，並陸續發表許多相關文獻，本實驗之未來方向為進一步研究骨蛋白質的表現，針對實驗結果中具療效之中草藥或健康食品更深入地研究試劑對於實驗動物骨蛋白的影響，藉由建立之雞胚胎動物模式，篩選具有促進骨合成效果之中草藥或健康食品，如斷續、一條根、黃豆等，經由連續注射中草藥或健康食品之雞胚胎長骨取出，進行骨蛋白質萃取、分析以觀察中草藥或健康食品對於特定骨蛋白之影響，更深入地探討中草藥或健康食品之生理療效與骨代謝之機轉。

第六章 結論

台灣民間常使用與治療骨傷科相關中草藥眾多，許多研究人力投注於研究台灣特有中草藥織療效評估及機轉探討，本實驗建立雞胚胎動物模式，觀察抑制骨合成之毒性物質鋁與民間經常使用之骨碎補對於雞胚胎長骨之影響。經實驗結果發現雞胚胎對於評估健康食品或中草藥療效為一個具有潛力之動物實驗模式，並藉此模式發現骨碎補水萃物有促進軟骨細胞減少而增加骨化的作用，而鋁則有明顯抑制類骨質骨化成為新生骨之作用。

參考文獻

1. Australian National Consensus Conference 1996. The prevention and management of osteoporosis. Consensus statement. *Med J Aust.* 1997; 167:s1-s15.
2. Grady D, Rubin SM, Petitti DB, Fox CS, Black D, Ettinger B, Ernster VL, and Cumming SR : Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med.* 1992; 117:1016-1037.
3. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52705 women with breast cancer and 108411 women without breast cancer. *Lancet.* 1997; 350(9084): 1047-1059.
4. Nand SL, Webster MA, Baber R, O'Connor V : Bleeding pattern and endometrial changes during continuous combined hormone replacement therapy. *Obstet Gynecol.* 1998; 91(5 Pt 1): 678-84.
5. Yu S, Chen K, Li S and Zhang K : In vitro and vivo studies of the effect of a Chinese herb medicine on osteoclastic bone resorption. *Chin J Dent Res.* 1999; 2(1): 7-11.
6. Ma KC, Zhu TY, Wang FX : Stimulative effects of Gusuibu (*Drynaria baronii*) injection on chick embryo bone primordium calcification in Vitro. *Am J Chin Med.* 1996, 14(1): 77-82.
7. Liu HC, Chen RM, Jian WC and Lin YL : Cytotoxic and antioxidant effects of the water extract of the traditional Chinese herb Gusuibu (*Drynaria fortunei*) on rat osteoblasts. *J Formos Med Assoc.* 2001; 100(6): 383-8.
8. Lin CY, Sun JS, Sheu SY, Lin FH, Wang YJ, Chen LT : The effect of Chinese medicine on bone cell activities. *Am J Chin Med.* 2001; 30(2 &3): 271-85.

9. Sun JS, Lin CY, Dong GC, Sheu SY, Lin FH, Chen LT, Wang YJ : The effect of Gusuibu (*Drynaria fortunei J. Sm*) on bone cell activities. *Biomaterials*. 2003, 23:3377-85.
10. Sun JS, Dong GC, Lin CY, Sheu SY, Lin FH, Chen LT, Chang WH and Wang YJ : The effect of Gusuibu (*Drynaria fortunei J. Sm*) immobilized modified calcium hydrogenphosphate on bone cell activities. *Biomaterials*. 2003; 24(5): 873-82.
11. 賴齡, 羅吉方, 張憲昌, 林哲輝. 藥物食品檢驗局調查研究年報 2002;20:135-54.
12. Committee on Nutrition : Aluminum toxicity in infants and children. *Pediatrics*. 97(3): 413-6, 1996.
13. Alfrey AC, LeGendre GR, and Kaehny WD : The dialysis encephalopathy syndrome: possible aluminum intoxication. *N Engl J Med*. 1976; 294:184-188.
14. Ward MK, Feest TG, Ellis HA, Parkinson IS, and Kerr DN: Osteomalacic dialysis osteodystrophy: evidence for a water-borne aetiological agent, probably aluminum. *Lancet*. 1978; 1(8069): 841-56.
15. Kelly's Textbook of internal medicine. Lippincott Williams & Wilkins, 2000
16. Adams JE : Dialysis bone disease. *Semin Dial*. 2002; 15(4): 277-289.
17. D'Haese PC, Couttenye MM, Lamberts LV, Elseviers MM, Goodman WG, Schrooten I, Cabrera WE, De Broe ME : Aluminum, iron, lead, cadmium, copper, zinc, chromium, magnesium, strontium, and calcium content in bone of end-stage renal failure patients. *Clin Chem*. 1999; 45(9): 1548-56.

18. Miyahara T, Hayashi M, and Kozuka H : The effect of aluminum on the metabolism of embryonic chick bone in tissue culture. *Toxicology Letters*. 1984; 21(2): 237-40.
19. Firling CE, Hill TA, Severson AR : Aluminum toxicity perturbs long bone calcification in the embryonic chick. *Arch Toxicol*. 1999;73:359(6)-66.
20. Firling CE, Severson AR, Hill TA : Aluminum effects on blood chemistry and long bone development in the chick embryo. *Arch Toxicol*. 1994;68:541-7.
21. Lynch SA, Elton CW, Carver FM, Pennington SN : Alcohol-induced modulation of the insulin-like growth factor system in early chick embryo cranial tissue. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001; 25(5): 755-63.
22. Hawkins JA, Hu N, Clark EB : Effect of caffeine on cardiovascular function in the stage 24 chick embryo. *Dev Pharmacol Ther*. 1984;7(5):334-43.
23. 徐士蘭, 謝淑鐘, 謝昀志, 王慧瑛. 黃芩苷元對內皮細胞之生物效應 第十七屆天然中草藥物研討會暨中草藥生物科技研討會論文 2001
24. Shiiba M, Arnaud SB, Tanzawa H, Kitamura E, Yamauchi M : Regional alterations of Type I collagen in rat tibia induced by skeletal unloading. *J Bone Miner Res*. 2003; 17(9):1639-45.
25. Turner RT, Hannon KS, Demers LM, Buchanan J and Bell NH : Differential effects of gonadal function on bone histomorphometry in male and female rats. *J Bone Miner Res*. 1989; 4(4):557-63.

26. Ohlsson Claes, Bengtsson Bengt-Åke, Isaksson Olle GP, Andreassen TT and Sloomweg MC : Growth hormone and bone. *Endocrine reviews*. 1998; 19(1): 55-79.
27. Osdoby P, Caplan AI : First bone formation in the developing chick limb. *Dev Biol*. 1981; 86(1): 147-56.
28. Goodman WG, O'Connor J : Aluminum alters calcium influx and efflux from bone in vitro. *Kidney Int*. 1991; 39(4): 602-7.
29. Goodman WG : Experimental aluminum-induced bone disease: studies in vivo. *Kidney Int*. 1986; 29(18): S32-6.
30. Goodman WG, Henry DA, Horst R, Nudelman RK, Alfrey AC, and Coburn JW : Parenteral aluminum administration in dog: II. Induction of osteomalacia and effect on vitamin D metabolism. *Kidney Int*. 1984; 25:370-5.
31. Maloney NA, Ott SM, Alfrey AC, Miller NL, Coburn JW, and Sherrard DL : Histological quantitation of aluminum in iliac bone from patients with renal failure. *J Lab Clin Med*. 1982; 99:206-16.
32. Galotto M, Campanile G, Banfi A, Trugli M, Cancedda R : Chondrocyte and osteoblast differentiation stage-specific monoclonal antibodies as a tool to investigate the initial bone formation in developing chick embryo. *Euro J Cell Biol*. 1995; 67:99-105.
33. Roach HI : New aspects endochondral ossification in the chick: chondrocyte apoptosis, bone formation by former chondrocytes, and acid phosphatase activity in the endochondral bone matrix. *J Bone Miner Res*. 1997; 12(5): 795-805.
34. 涂慶業, 陳中川, 謝文全, 李珮瑞 : 骨碎補類藥材之生藥研究 2001