

中華民國第 63 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 動物與醫學科

探究精神獎

052013

腸內共生菌對肥胖性骨質疏鬆的影響

學校名稱：高雄市立高雄高級中學

作者： 高二 巫晉宇	指導老師： 吳立森
-------------------	------------------

關鍵詞：骨質疏鬆、肥胖、共生菌

摘要

骨質疏鬆是現代人面臨的嚴重問題，多項研究顯示腸內共生菌與骨質疏鬆之間有密切關係。本研究主要探討高熱量飲食 (HFD) 小鼠與正常飲食 (CD) 小鼠之身質、骨質與腸內共生菌的差異，並探討造成骨質差異的可能代謝物。結果發現 CD 小鼠的平均體重顯著提升；分離檢測其糞便中微生物，發現 CD 小鼠中的腸內有益共生菌的對數值為 HFD 的 1.0 - 4.5 倍，HFD 小鼠中的肥胖相關菌種則為 1.5 - 4.0 倍。後續讓 HFD 小鼠攝取 CD 小鼠的腸內共生菌，六個月後平均體重相較於原 HFD 小鼠低 1.47g，平均骨小梁密度高 0.036 mg/cm^3 、骨容積高 5.27%。後續探討共生菌之代謝物 TMA 和 TMAO，HFD 小鼠的 TMAO 量比 CD 中的高 1 倍，並發現 p16 和 p21 基因表現量上升；RUNx2 和 Colla1 表現量降為 0.5 倍，可能是引起骨質疏鬆的原因，值得進一步研究探討。

壹、前言

一、研究動機

因家父具有醫學相關背景，在耳濡目染下，筆者平時的嗜好是閱讀醫學相關文章，在網路上尋找有趣新奇的醫學資訊。高中生物課學到共生菌的培養與對人體的益處，回家搜尋相關資訊後，近期的新聞引起我的注意。內容是關於腸內共生菌可以改善骨質疏鬆的症狀，看了許多篇新聞或文章專欄後，發現大部分新聞報導都引用了一份發表於《內科學誌》(Journal of Internal Medicine)，是瑞典哥德堡大學為期一年的實驗，主要測試羅伊氏乳酸桿菌 (Lactobacillus reuteri ATCC PTA 6475) 與骨質疏鬆間的關係(註 1)。這個研究讓 90 個有骨質疏鬆症狀、年齡在 75~80 歲之間的中年齡女性，補充「羅伊氏乳桿菌 6475」，在 12 個月之後，觀察骨密度、骨結構、發炎指標、骨代謝轉換指標，發現攝取腸內共生菌的組別，各項指標皆改善非常多，這引起了筆者的好奇心。

隨後，筆者仔細查看了這份瑞典的實驗設計與背景知識，發現該期刊的研究設計與靈感主要來自另一份研究，即是 2016 年由 Li JY, Chassaing B, Tyagi AM 的團隊進行的研究「Sex steroid deficiency-associated bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics.」(註 2)。此研究使用了小鼠進行了一系列的實驗，包括讓動物進食自己的糞便萃取物，獲取其中的腸內共生菌，探討了與改善骨質疏鬆相關的問題與相關指標。這使筆者對這個研究結果產生很大的興趣，尤其是這些研究成果後續在人體研究應用上的發展。

骨質疏鬆是現代很多中老年人面臨的狀況，經文獻探討後，筆者認為雖然改善或治療的方式很多，但許多治療藥物都有副作用。腸內共生菌改善骨質疏鬆，是一個新興領域，許多相關機制並未了解。引此筆者想要設計實驗，探討腸內共生菌與骨質疏鬆的關係，同時也請教了許多骨質專家，希望能為此領域相關研究盡一己之力。

二、 目的

- (一) 藉由高熱量飲食建立肥胖型小鼠模型
- (二) 從正常小鼠與肥胖型小鼠獲取並篩選腸內共生菌
- (三) 以分離後的腸內共生菌餵食小鼠，並確認骨質改變之結果
- (四) 探討腸內共生菌代謝物 TMAO 對於骨細胞與骨質的影響

三、 文獻回顧

(一) 骨質疏鬆 (*Osteoporosis*):

骨質疏鬆症是一種常見的骨骼疾病，其特徵是骨骼密度降低和骨骼結構疏鬆，使骨骼變得脆弱和易於斷裂。骨質疏鬆的主要原因是骨骼組織中鈣、磷質和其他礦物質的流失，導致骨骼變得脆弱和脆裂。(註 3)

造成骨質疏鬆的原因有很多，包括年齡、遺傳、性別差異、是否肥胖、生活習慣...等，此實驗的訴求是有關於肥胖與骨質的關係，欲探討在同樣情況下的小鼠，是否因肥胖而產生骨質疏鬆的症狀，而以下實驗將介紹各項骨質指標進行對骨質的檢測。

骨質是骨的主要組成部分，分緻密骨 (compact bone) 和海綿骨 (spongy bone) 兩種。海綿骨是由許多不規則線狀或片狀稱為骨小梁 (trabeculae, Tb) 的骨質互相交織而成，用以支撐與造血。骨質疏鬆程度的判別，通常以骨小梁的相關數值加以表示，如骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁礦物質密度 (trabecular bone mineral density, Tb.BMD)、骨小梁分離度 (trabecular separation, Tb.Sp)、骨小梁數量 (trabecular number, Tb.N)，骨小梁體積/組織體積 (trabecular bone volume, BV/TV) 等，可以用來表示骨小梁在骨骼中的各種指標。簡單來說，骨小梁在骨骼中扮演著鋼筋的作用，通常骨小梁的數量越多、密集，代表骨質越強壯。(註 4)

(二) 腸內共生菌 (*Gut microbiota*)

腸內共生菌是通常是指一些能夠在腸道中生長和繁殖的細菌，這些菌類在腸道中可以產生有益的代謝物質和酵素益生菌，幫助分解和吸收食物中的營養素，除了幫助身體代

謝廢物，代謝物可以產生人體約 10%的熱能，大多數腸道內的分解功能都是由腸內共生菌主導，腸內共生菌群集可以視為是人體中重要的器官之一，對於人體生長發育和代謝有著重要的作用。(註 5)

從生物醫藥資訊庫 Pubmed 中的資料顯示，腸內共生菌常見的菌屬有：*Akkermansia* (嗜黏性蛋白艾克曼氏菌)、*Lactococcus* (乳酸乳球菌)、*Bacteroides* (擬桿菌屬)、*Ruminococcus* (瘤胃球菌屬)、*Bifidobacterium* (雙歧桿菌屬)。這些共生菌分別有有助於腸道消化的菌，亦含與肥胖相關的菌屬。*Akkermansia* (嗜黏性蛋白艾克曼氏菌) 與其他腸道微生物略為差異，其功能為儲存黏蛋白，保護人體腸道內黏膜功能，相當於腸道中的屏障，是腸道內的毒素不易侵入人體，近年來有研究發現腸內共生菌與肥胖症相關，故將此菌作為本實驗的研究對象。*Bifidobacterium* (雙歧桿菌屬)和 *Lactococcus* (乳酸乳球菌)中有常作為藥品的菌種，幫助腸道消化，大部分是對身體有益的菌種。*Ruminococcus* (瘤胃球菌屬) 與 *Bacteroides* (擬桿菌屬) 在近期研究發現此兩種細菌曾被報導為肥胖的成因菌之一，故此實驗著重探查此兩種菌在高脂個體的影響。

(三) 腸內共生菌與骨質疏鬆的關係

欲維持良好骨質，骨質的營養成分獲取，如食物攝取鈣磷質、曬太陽促進合成維生素 D，增加鈣質吸收，皆為有效維持骨質的方法。在瑞典哥德堡大學《內科學誌》(Journal of Internal Medicine)，觀察了 90 位患有骨質疏鬆症狀的女性，發現攝取腸內共生菌組與骨質有相關性(註 1)。而在此實驗中，肥胖多由腸內共生菌組中的特定菌產生的釋出物所導致，取決於量的過寡，而腸內共生菌的吸收也與骨質需要的營養素有關，於是此實驗欲找出肥胖所含有的腸內共生菌組是否會影響骨質。

免疫系統和破骨細胞 (*Osteoclast*) 的形成是調節骨質的重要因素，其中腸道微生物菌叢是調節的重要因素。而其中破骨細胞對於骨質疏鬆的影響佔了很大一部分的影響，破骨細胞主要是通過釋出檸檬酸、乳酸、碳酸、以及各種酶類，對骨組織進行分解及破壞，並且在體內是唯一具骨吸收能力的組織，而腸道腸內共生菌的釋出物對於破骨細胞是否有作用也是此實驗的著重目標。(註 6)

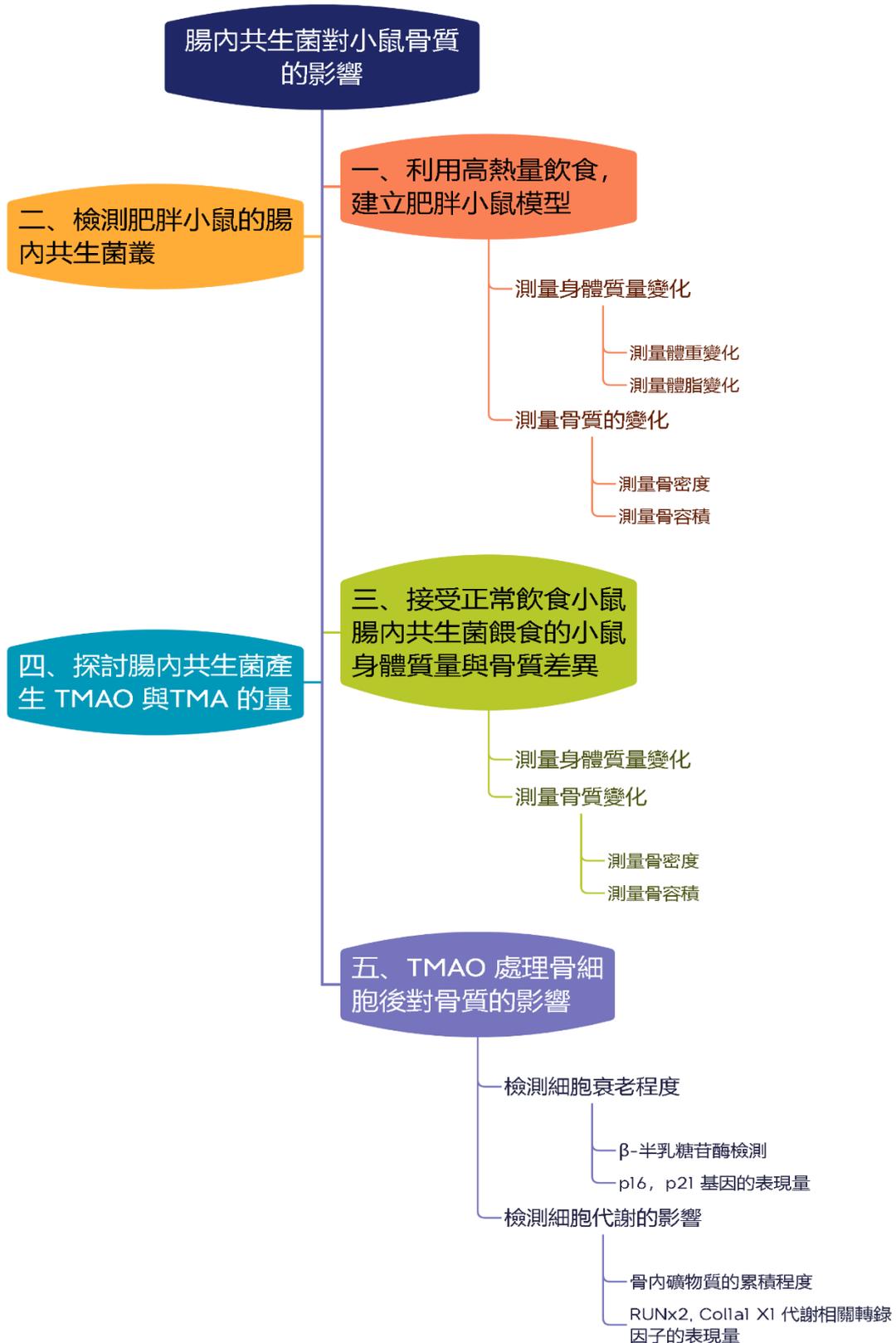
腸內共生菌可以調節腸道菌群的平衡，抑制有害菌的生長，從而減少炎症反應和腸道細胞的壞死，進而保護腸道健康和整體健康。從骨吸收的營養成分來看，腸道健康和骨骼健康之間可能存在著密切的關聯性，有些許腸內共生菌種類被發現可以對骨質有益，例如屬於乳酸菌和嗜酸乳桿菌等腸內共生菌，但未有實質的證據發現其中確切的關聯，為指出其中腸內共生菌影響骨質的關鍵因素，便設計了以下實驗。

貳、研究設備及器材

器材	
飼料 CD；10 Kcal% fat；D12450K	DNA Stool Qiagen 套裝
飼料 HFD；60 Kcal% fat；D1294	Waters Xevo TQ-S 質譜儀
無菌籠	蔡司顯微鏡
無菌操作台	X 射線過濾器
離心機	UHPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography)
1176 Skyscan 掃描儀	

參、研究流程與方法

一、研究流程



二、研究方法

(一) 小鼠實驗與飲食控制

本實驗使用三個月大的 B57L/B6 雄性小鼠 (來自 BioLasco 生物技術公司)，飲食控制實驗飼料餵養以標準的齧齒動物飼料 (CD; 10 Kcal%fat; D12450K, Research Diet Inc. New Brunswick, NJ, USA) 作為對照組，另以高脂肪比例飼料作為操作變因 (HFD; 60 Kcal%fat; D1294, Research Diet Inc. New Brunswick, NJ, USA) 和自由飲水連續 6 個月。每週測量體重並記錄。

(二) 小鼠的體脂肪 MicroCT 分析

本實驗使用 Skyscan 掃描儀 (Bruker, Billerica, MA, USA) 對每個小鼠的全身脂肪進行檢測，並量化分析。實驗流程以麻醉小鼠後，並進行 360°X 射線掃描 (條件: X 射線過濾片, 1 毫米 Al, X 射線強度, 50 千伏; 像素大小 35 微米, 旋轉步長, 0.9°; 幀平均, 2)。後續使用 SKYSCAN® CT-Analysis 軟件重建圖像。小鼠體積的脂肪組織的圖像與脂肪的總體積以軟體被自動估算。

(三) 小鼠骨骼微結構和礦物質密度的 MicroCT 定量分析

本實驗使用 MicroCT 系統對骨骼標本的微觀結構，微結構 (bone microstructure) 和骨質量 (bone mass) 進行掃描，採集 400 片的照片 ($9 \times 9 \times 9 \text{ cm}^3$)，並使用 SKYSCAN® CT-Analysis 軟體對放射照片進行重建，並分析目標照片骨礦物質密度 (bone mineral density)，此實驗取骨小梁中的骨小梁密度 (Tb.BMD, mg/cm^3) 和骨小梁體積/組織體積 (trabecular bone volume, BV/TV, %) 的數據並進行探討。

(四) 分離小鼠糞便內微生物，並取得微生物之 DNA

小鼠禁食 16 小時後，在無菌條件下取得排泄糞便。後續使用 DNA Stool Qiagen 套組分離並取得糞便內微生物的 DNA。

(五) 對小鼠腸道微生物群的 16S rDNA 定序

菌種進行 DNA 純化後，經 PCR 反應擴增片段，電泳跑膠後挖膠純化，進行 16S rDNA 定序，於美國國家生物資訊中心 (NCBI) 進行 BLAST 比對，並利用資料庫計算 α -diversity 和 Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) 的比率。

16S for V3-V4	Forward: 5'-CCTACGGGAGGCTGCAG-3' Reverse: 5'-GACTACGGGTATCTAATC-3'
---------------	---

下列為 Primer 資訊：

(六) 分離糞便內微生物，並灌食小鼠

在無菌環境中取得 1 g 實驗小鼠糞便，混合在 1.5 mL 的林格氏液中。500×g 離心 5 分鐘後，離心後取上清液 0.2mL 通過口服灌食給 HFD 餵養的小鼠。每隻小鼠皆每周給予 3 次，連續 12 週。在 HFD 餵養第 6 個月，進行麻醉，測量體重，並使用 MicroCT 分析對骨量進行量化

(七) 血清中三甲胺 (TMA) 和氧化三甲胺 (TMAO) 分析

先將 0.1 毫升血清與 0.3 毫升甲醇混合，在儀器 10,000×g 下進行離心 30 分鐘後，獲取上清液並使用 ACQUITY UPLC CB 管柱進行 UHPLC 分析，並使用 TargetLynx 軟體與已知標準品計算 TMA 和 TMAO 的量。

(八) 細胞衰老指標的檢測

本實驗使用常用細胞衰老指標， β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 的量與細胞週期調節衰老關鍵基因 p16 和 p21 進行檢測。待測細胞培養 1 天後，去除培養基後，將細胞固定於含 1% 福爾馬林的 PBS 中。 β -半乳糖苷酶的量使用 β -半乳糖苷酶染色試劑盒進行染色；p16 和 p21 基因的表現量則使用 RT-PCR 進行量化並檢驗結果。

(九) 骨骼形成活性的檢測

骨細胞培養 15 天後，使用 Von Kossa 染色試劑盒對骨的礦化基質進行染色並進行觀察。使用含 1% 福爾馬林 PBS 中固定細胞。樣品加入 0.3mL AgNO₃ 並在黑暗中作用 1 小時。在去除 AgNO₃ 後，用去離子水輕輕沖洗標本 3-5 次；並用蘇木精 (hematoxylin) 進行間接染色。使用倒立型顯微鏡觀察並記錄對礦化基質的狀態。使用蔡司圖像分析系統捕捉礦化基質的圖像。使用 RT-PCR 分析對細胞培養物中關鍵骨形成標誌基因 Runx2、Colla1 的表現進行檢測並量化。

(十) RT-PCR 分析

使用 Trizol 分離細胞培養物中的 Total RNA；將 1 mg Total RNA 反轉錄為 RT 產物。針對 p16、p21、Runx2、Colla1 的設計引子，使用 2×TaqMan® 通用 PCR Master Mix，並對 RT 產物進行 PCR 擴增。PCR 結果以和 ABI 7900 檢測系統檢測，並以 DNA 電泳確認。基因表現量的倍數變化使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方式表示。

下列為 Primer 資訊：

p16	Forward: 5'-CCGCTGCAGACAGACTGG-3'; Reverse: 5'-CTACCTGAATCGGGGTACGA-3'
P21	Forward: 5'-CGGTGGAACCTTTGACTTCGT-3' Reverse: 5'-CAGGGCAGAGGAAGTACTGG-3'
Runx2	Forward: 5'-CCAGCAGCACTCCATATCTC-3' Reverse: 5'-CAGCGTCAA CACCATCATTC -3'
Colla1	Forward: 5'-CAAGCAGGGAGGCAATAAGG-3' Reverse: 5'-CGTCAC AAGCAGGGTTAAGC-3'

(十一) 統計學分析

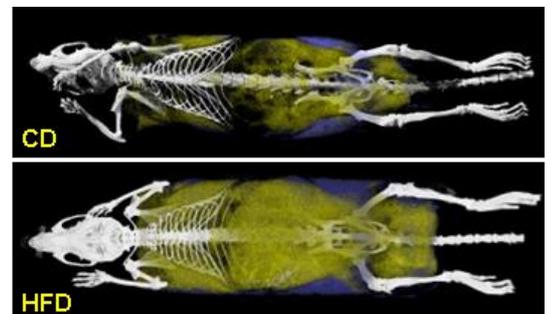
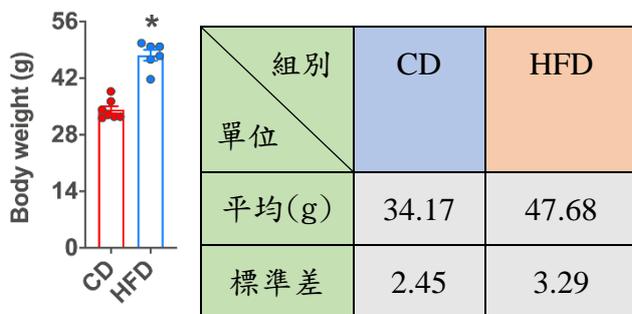
本研究統計軟體以 SPSS 與 Excel 進行分析，對 CD 和 HFD 飼養的小鼠的實驗研究使用 Student's t test 及 ANOVA 檢驗進行統計。P < 0.05 被認為有統計學差異。

肆、研究結果

一、正常小鼠與高熱量飲食小鼠的身體質量與骨質差異

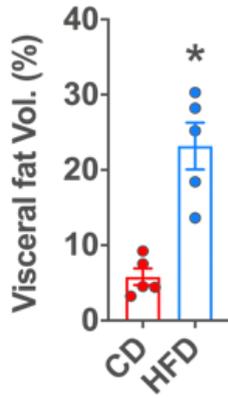
依據「Sex steroid deficiency-associated bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics」這篇研究，肥胖是導致骨質疏鬆的可能因素之一（註2）。因此本研究先以高熱量飼料 (HFD; 60 Kcal%fat) 餵食小鼠連續六個月，建立肥胖小鼠模型，並比較餵食正常飼料 (CD; 10 Kcal%fat) 的身體質量與骨質的差異。操縱變因為飼料種類，在同樣的控制變因下，餵食正常飼料的六隻小鼠體重平均值為 34.17 g，標準差為 2.46；餵食高熱量飲食的七隻小鼠體重平均值 47.68 g，標準差為 3.29， $P < 0.05$ ，有顯著差異如圖一。

接著正常飲食與高熱量飲食小鼠兩組各以 Skyscan 掃描儀做體脂肪容量的 MicroCT 分析，掃描結果如圖二，測量數值如圖三。實驗顯示正常飲食小鼠內臟脂肪容量佔身體比例的平均值為 5.80%，標準差為 2.48；高熱量小鼠內臟脂肪容量佔身體比例的平均值為 23.17%，標準差為 6.96， $P < 0.05$ ，有顯著差異。



圖二：CD 與 HFD 小鼠的 MicroCT 照射圖

圖一：正常飲食小鼠 (CD) 與高熱量飲食小鼠與 (HFD) 小鼠體重平均值與標準差，* $P < 0.05$

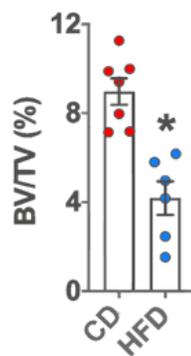
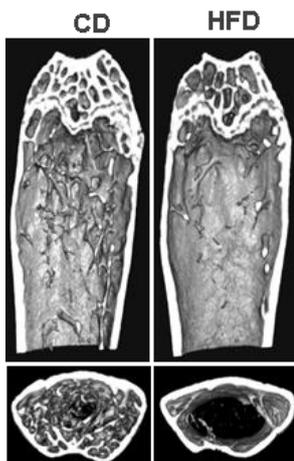


組別	CD	HFD
單位		
平均(%)	5.80	23.17
標準差	2.48	6.96

圖三：CD 小鼠與 HFD 小鼠的內臟脂肪容量百分比，*P < 0.05

對兩組小鼠進行骨骼微結構和骨礦物質密度的 MicroCT 照射顯影與定量分析。

MicroCT 照射顯影如圖四，骨小梁的密度 (Tb.BMD) 分析數值如圖五，骨容積 (BV/TV%) 分析數值如圖六。實驗數據顯示，骨密度 (Tb.BMD) 在正常飲食的小鼠 (CD) 中平均值為 0.095 mg/cm³，標準差為 0.0092；餵食高熱量飲食的小鼠 (HFD) 中的平均值為 0.064 mg/cm³，標準差為 0.019，P < 0.05，有顯著差異。

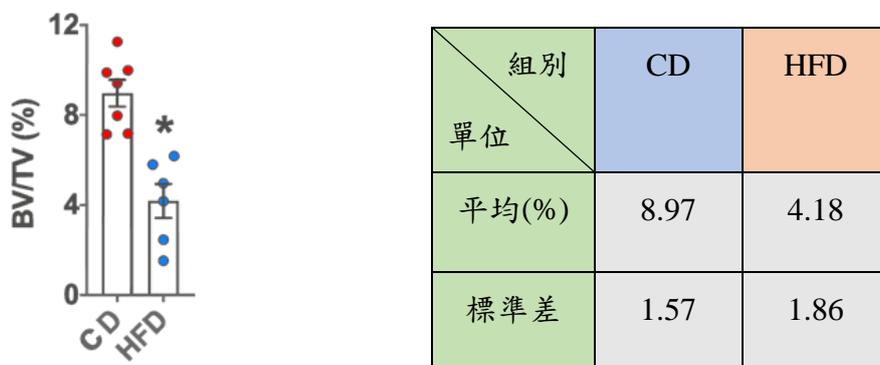


組別	CD	HFD
單位		
平均(mg/cm ³)	0.095	0.064
標準差	0.0091	0.0196

圖四：CD 與 HFD 小鼠的骨骼 MicroCT 圖

圖五：CD 與 HFD 小鼠的骨小梁密度平均與標準差

骨容積 (BV/TV%) 的部分，餵食正常飼料的小鼠 (CD) 骨容積平均值為 8.97%，標準差為 1.57；而餵食高熱量飲食的小鼠 (HFD) 骨容積平均值為 4.18%，標準差 1.86， $P < 0.05$ ，有顯著差異。

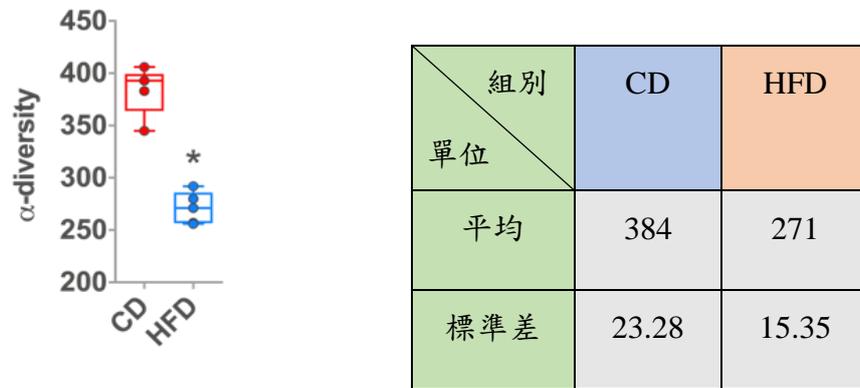


圖六：CD 與 HFD 小鼠的骨容積百分比

二、正常飲食小鼠與高熱量飲食小鼠的腸道共生菌叢的差異

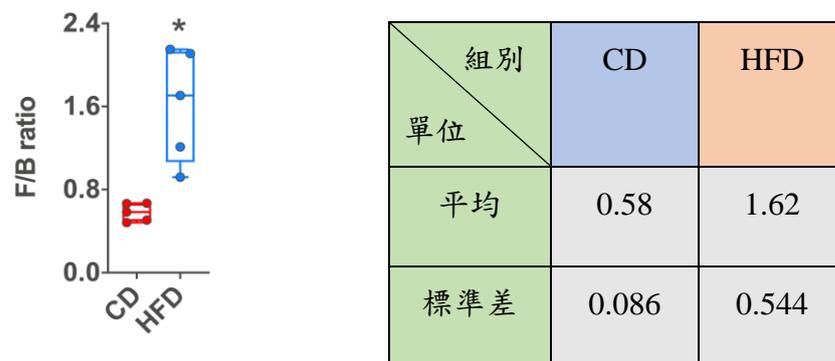
此實驗使用 PacBio Sequel IIe 來進行 DNA 測序，測定 α -diversity 指標顯示菌落多樣性，以及測定 (F/B ratio)，檢視厚壁菌門 (*Firmicutes*) 和擬桿菌門 (*Bacteroidetes*) 的比例 (F/B ratio)。其中厚壁菌門 (*Firmicutes*) 和擬桿菌門 (*Bacteroidetes*) 為腸道中分布最多的兩種菌門，兩者所占在腸道中的數量可以達到 80% 以上，而此實驗欲測定腸內共生菌和這兩種菌分別在正常飲食小鼠 (CD) 和高熱量飲食小鼠 (HFD) 體內的差異和比值。

首先測出 α -diversity 的結果如圖七，在正常飲食小鼠 (CD) 的 α -diversity 平均值為 384，標準差為 23.28，高熱量飲食小鼠 (HFD) 平均值為 271，標準差為 15.35， $p < 0.05$ ，有顯著差異。



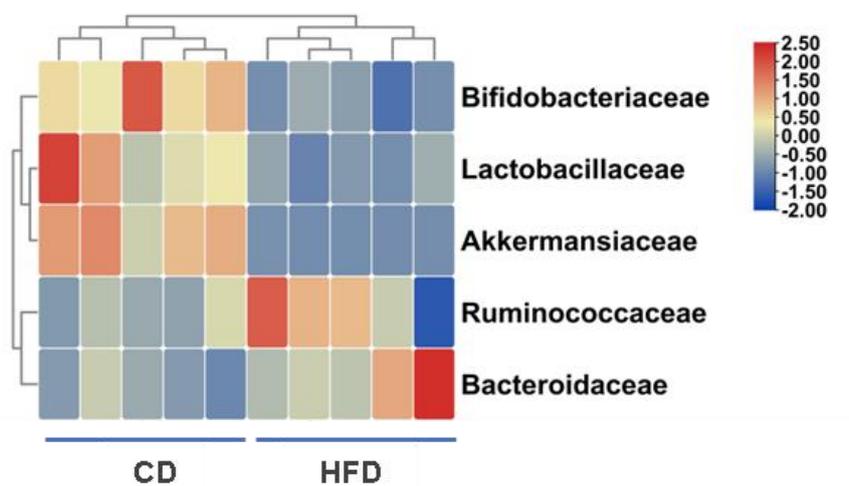
圖七：CD 和 HFD 小鼠的腸內 α -diversity 的密集程度圖

測定正常飲食小鼠 (CD) 和高熱量飲食小鼠 (HFD) 腸道內厚壁菌門 (*Firmicutes*) 對擬桿菌門 (*Bacteroidetes*) 的比值 (F/B) 如圖八，結果顯示在正常飲食小鼠 (CD) 的 F/B 平均值為 0.58，標準差為 0.086，高熱量飲食小鼠 (HFD) 的 F/B 平均值為 1.62，標準差為 0.544， $p < 0.05$ ，有顯著差異。



圖八：CD 和 HFD 小鼠的腸內的 F/B 圖

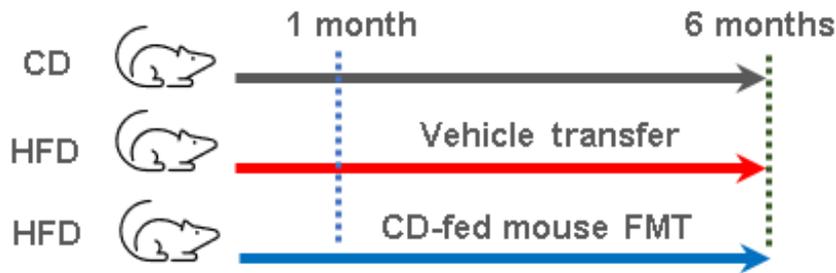
測定選取的實驗菌在正常飲食 (CD) 小鼠和高熱量飲食小鼠 (HFD) 的測定序表現狀況，經 16S rDNA 定序後，發現主要為下列五個屬的腸道共生菌：*Bifidobacterium* (雙歧桿菌屬)、*Akkermansia* (嗜黏性蛋白艾克曼氏菌)、*Lactococcus* (乳酸乳球菌)、*Bacteroides* (擬桿菌屬)、*Ruminococcus* (瘤胃球菌屬)，安全等級皆為 BSL1。在本實驗中，我們將測得 CD 小鼠與 HFD 小鼠細菌的腸內 16S rDNA 含量作做菌種間 log 值比對，結果如圖九。在 CD 小鼠中測出的 log 值，*Bifidobacterium* (雙歧桿菌屬)、*Akkermansia* (嗜黏性蛋白艾克曼氏菌)、*Lactococcus* (乳酸乳球菌) log 值分布在 1.0 至 2.5 之間；*Bacteroides* (擬桿菌屬) 與 *Ruminococcus* (瘤胃球菌屬) 分布在 -1.5 至 -0.5 之間。在 HFD 小鼠中測出的值，*Bacteroides* (擬桿菌屬) 與 *Ruminococcus* (瘤胃球菌屬) log 值大部分分布在 1.0 至 2.5 之間，少部分在 0 以及 -2.0；*Bifidobacterium* (雙歧桿菌屬)、*Akkermansia* (嗜黏性蛋白艾克曼氏菌)、*Lactococcus* (乳酸乳球菌) 皆分布在 -2 至 -0.5 之間。



圖九：五種菌屬在 CD 和 HFD 小鼠腸內的 log 含量分布值圖

三、高熱量飲食小鼠接受正常飲食小鼠腸內共生菌後的身體質量與骨質差異

本實驗於無菌環境取得正常飲食小鼠糞便中微生物的上清液 (FMT)，透過口服灌餵給 HFD 餵養的小鼠 (HFD-FMT)，每隻小鼠皆每周給予 3 次，連續 12 週，飼養 6 個月後，測得其體重與骨質，並與正常飲食的小鼠 (CD)、高熱量飲食且未接受 FMT 的小鼠 (HFD-Veh) 對照組進行比較，實驗設計如圖十。實驗數據之體重結果如圖十一，餵食正常飼料的小鼠 (CD) 體重平均值 31.76g，標準差為 1.27；餵食高熱量飲食的小鼠 (HFD-Veh) 體重平均值 39.25g，標準差為 2.33；有接受 FMT 的小鼠 (HFD-FMT) 平均值為 37.58g，標準差為 1.26。

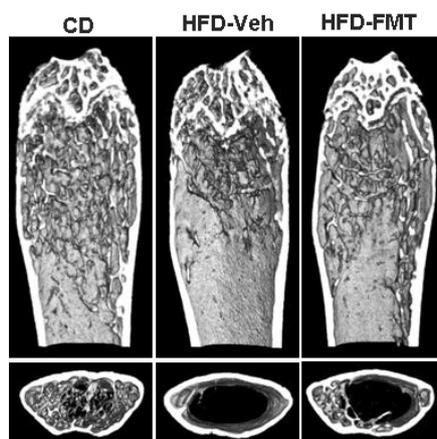


圖十：高熱量飲食小鼠接受正常飲食小鼠腸內共生菌實驗過程示意圖

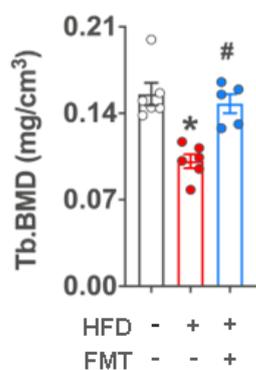


圖十一：高熱量飲食小鼠接受正常飲食小鼠腸內共生菌之體重變化

對三組小鼠進行骨骼微結構和骨礦物質密度的 MicroCT 定量分析，分析骨小梁的密度 (Tb.BMD) 如圖十三與骨容積 (BV/TV%) 如圖十四。在骨小梁密度數據的部分，餵食正常飼料的小鼠 (CD) 骨小梁密度平均值為 0.155 mg/cm^3 ，標準差為 0.022；高熱量飲食的小鼠 (HFD-Veh) 骨小梁密度平均值為 0.101 mg/cm^3 ，標準差 0.010；接受正常飲食小鼠腸內共生菌的高熱量飲食小鼠 (HFD-FMT) 骨小梁密度平均值為 $0.147 \text{ (mg/cm}^3)$ ，標準差為 0.017，和高熱量飲食的小鼠 (HFD-Veh) 相比， $P < 0.05$ ，有顯著差異。



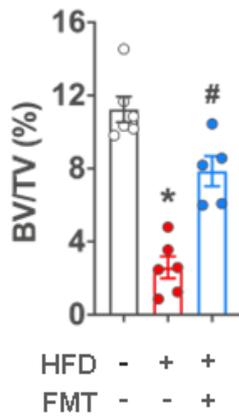
圖十二：CD, HFD-Veh 與 HFD-FMT 三組小鼠的骨骼 MicroCT 照射圖



組別	CD	HFD-Veh	HFD-FMT
單位			
平均(mg/cm^3)	0.155	0.101	0.147
標準差	0.022	0.010	0.017

圖十三：CD, HFD-Veh 與 HFD-FMT 三組小鼠的骨小梁密度 (Tb.BMD) 數據

在骨容積實驗數據的部分，餵食正常飼料的小鼠 (CD) 骨容積平均值為 11.24%，標準差為 1.74；餵食高熱量飲食的小鼠 (HFD-Veh) 骨容積平均值為 2.59%，標準差 1.45；接受正常飲食小鼠腸內共生菌的高熱量飲食小鼠 (HFD-FMT) 的骨容積平均值為 7.86，標準差為 1.86，和高熱量飲食的小鼠 (HFD-Veh) 相比， $P < 0.05$ ，有顯著差異。



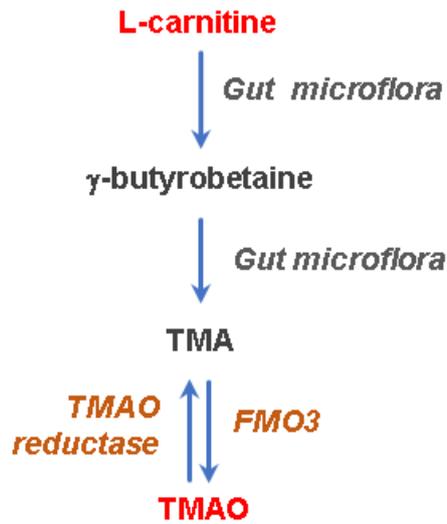
組別	CD	HFD-Veh	HFD-FMT
單位			
平均(%)	11.24	2.59	7.86
標準差	1.74	1.45	1.86

圖十四：CD, HFD-Veh 與 HFD-FMT 三組小鼠的骨容積百分比 (BV/TV%)

四、 探討腸內共生菌代謝物 TMAO 對於骨細胞與骨質的影響

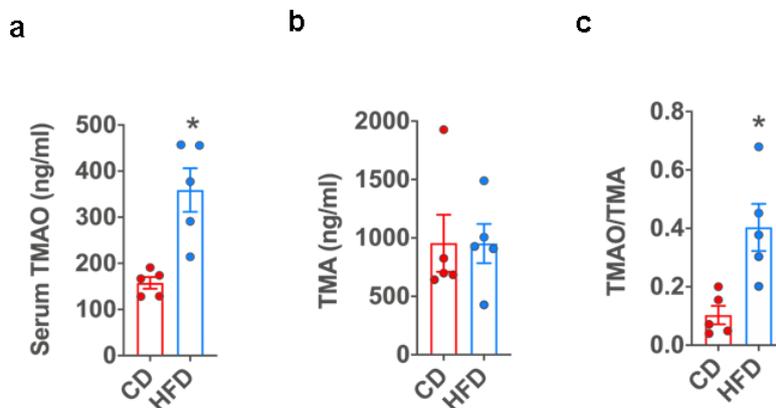
(一) 腸內共生菌產生 TMA 與 TMAO 量的差異

經研究顯示，腸內微生物的相關代謝物對身體有很多影響。其中三甲胺 (TMA) 與氧化三甲胺 (TMAO) 對人體的影響是近期較多研究著墨的重點(註 7)。三甲胺 (TMA) 與氧化三甲胺 (TMAO) 在身體內的代謝機制流程如圖十五。簡單來說，我們吃下含有肉鹼 (carnitine)、膽鹼 (choline) 的食物後，未消化的肉鹼、膽鹼會經腸道共生菌 (Gut microflora) 轉化為三甲胺 (TMA)。三甲胺為一般常見可吸收的代謝物，具臭味及揮發性，對人體無害，但經過黃素單氧化酶 (FMO) 作用後，會使三甲胺氧化為氧化三甲胺 (TMAO)。據台灣醫學會的研究，氧化三甲胺為導致心血管疾病的重要因子。據「Fructus Ligustri Lucidi preserves bone quality through the regulation of gut microbiota diversity, oxidative stress, TMAO and Sirt6 levels in aging mice.」的這篇文獻指出 (註 8)，TMAO 可能也對骨質形成有一定程度的影響，因此實驗欲探討肥胖小鼠腸道中的造成骨質疏鬆的微生物相關代謝物是否與 TMAO 有關。



圖十五：腸道菌與 TMA、TMAO 代謝流程示意圖

使用 UHPLC 檢測正常飲食小鼠與高熱量飲食小鼠的血清中 TMA 與 TMAO 的表現量，結果如圖十六。高熱量飲食小鼠 (HFD) 的 TMAO 含量為普通飲食小鼠 (CD) TMAO 含量的 2 倍 (圖十六 a)，而 TMA 含量無明顯差異 (圖十六 b)，TMAO 對 TMA 的比值是高熱量飲食小鼠 (HFD) 遠高於普通飲食小鼠 (CD) (圖十六 c)。

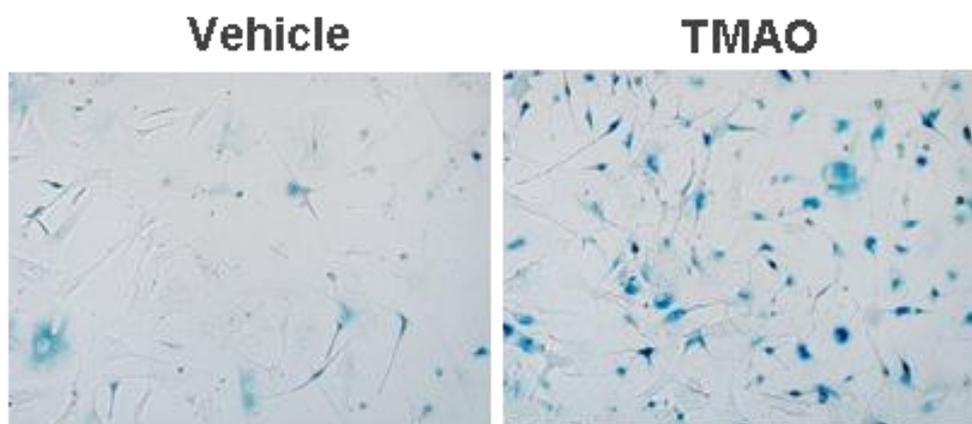


圖十六：TMAO 與 TMA 在 CD 與 HFD 小鼠中的含量與比例圖

(二) TMAO 處理後對骨細胞與骨質的影響

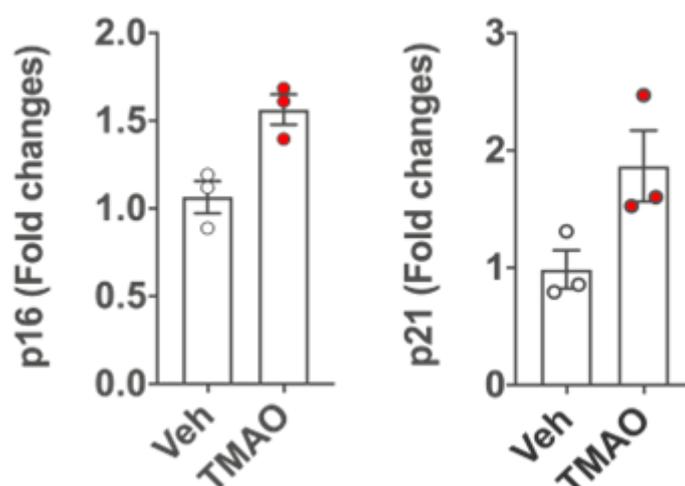
以 TMAO 處理骨細胞之後，利用 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 染色並觀察 TMAO 對骨細胞的衰老狀況如圖十七，並觀察其細胞週期調節衰老指標基因 p16 和 p21 的表現量，

了解 TMAO 對骨細胞生長的影响。在 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 染色觀察結果顯示，相較於對照組，經 TMAO 處理之骨細胞染色後 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 之結果明顯較多，顯現 TMAO 處理過後的骨細胞較為衰老。



圖十七：TMAO 處理後的骨細胞與對照組 (Vehicle) 的 β -galactosidase 染色結果

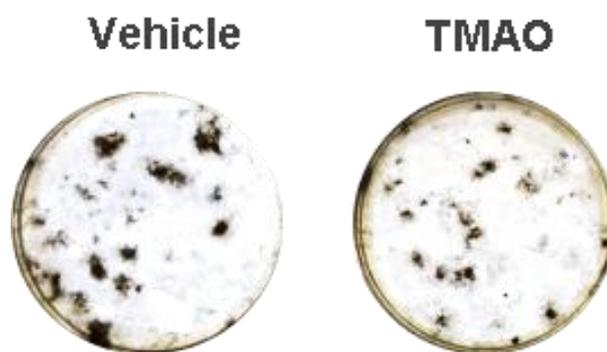
同樣的，在實驗中使用 RT-PCR 分析檢測細胞週期調節指標基因 p16 和 p21，此兩種基因的表現量為細胞衰老的指標。實驗結果如圖十八，相較於對照組，p16 的含量在骨細胞中增長了 1.58 倍，而 p21 的含量增長了 1.89 倍，結果皆顯示，在 TMAO 下作用的骨細胞增生活性皆有降低。



圖十八：TMAO 作用後與對照組 p16 與 p21 的 RT-PCR 含量分析

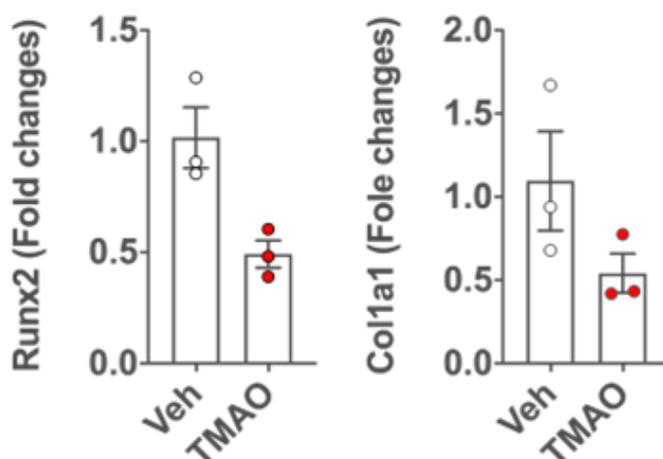
(三) TMAO 處理後之骨細胞礦物質累積情形與相關代謝轉錄因子表現量

骨細胞以 TMAO 處理培養 15 天後，使用 Von Kossa 染色試劑盒對骨的礦化基質進行染色並進行觀察骨細胞代謝礦物質的狀況，並與對照組比較實驗結果，如圖十九。實驗結果顯示，對比於對照組，受到 TMAO 作用的骨細胞代謝物明顯較少，顯示受到 TMAO 作用的骨代謝功能較遲緩。



圖十九：TMAO 作用後與對照組在骨代謝後產生的產物

使用 RT-PCR 分析骨骼代謝相關轉錄因子：RUNx2 與 Coll1a1 X1 的表現量如圖二十。RUNx2 參與骨細胞分化並促進骨細胞成熟，可以進行骨細胞中的蛋白質轉錄；Coll1a1 X1 則與骨骼發育和膠原纖維的合成有關。結果顯示 RUNx2 轉錄因子的含量降為對照組的 0.5 倍，Coll1a1 X1 基因表現量則降為 0.53 倍，顯示對於骨骼代謝與發育的功能降低。



圖二十：TMAO 處理後的骨細胞之 Runx2 和 Coll1a1 的 RT-PCR 含量分析

伍、討論

一、 正常與高熱量飲食小鼠的骨分析

在本實驗中測出的結果中，正常小鼠 (CD) 的平均體重為 34.17 g，內臟脂肪容量百分比的平均值為 5.80%；高熱量飲食小鼠 (HFD) 的體重平均值 47.68 g，內臟脂肪容量百分比的平均值為 23.17%，高熱量飲食小鼠 (HFD) 的重量比正常小鼠 (CD) 高，內臟脂肪佔的百分比的比例也較多。

再比較兩種小鼠的骨密度及骨容積，正常小鼠 (CD) 的骨小梁密度平均值為 0.095 mg/cm³，骨容積平均值為 8.97%；高熱量飲食小鼠 (HFD) 的骨小梁密度平均值為 0.064 mg/cm³，骨容積平均值為 4.18%。首先是骨密度的部分，從結果上可以看到，高熱量飲食小鼠的骨小梁密度平均低於正常小鼠。因此，高熱量飲食小鼠的骨骼會比正常小鼠來的更脆弱易裂。而在骨容積的部分，高熱量飲食小鼠的骨骼涵蓋容積比正常小鼠少，代表其骨骼結構較正常小鼠的更細小，更脆弱易裂。

二、 正常飲食小鼠與高熱量飲食小鼠腸道共生菌叢的差異分析

在本實驗中，發現我們篩選出五種腸內共生菌。經文獻查詢，其中三種是對生物體有益的菌種，如 *Bifidobacterium* (雙歧桿菌屬)、*Akkermansia* (嗜黏性蛋白艾克曼氏菌)、*Lactococcus* (乳酸乳球菌) 這三種，在 CD 小鼠中相較於 HFD 小鼠的 log 值高 1.0 - 4.5；另外兩種會則是在肥胖個體中的常見共生菌，*Ruminococcus* (瘤胃球菌屬) 與 *Bacteroides* (擬桿菌屬)，HFD 小鼠中 log 值比 CD 小鼠高 1.5-4.0。在肥胖個體中，此類菌種比例高，使得促進分解和保護腸道的菌量下降，推測益菌的減少與肥胖相關菌種的增加是引起肥胖的關鍵因素之一。

三、 餵食正常小鼠腸內共生菌後高熱量飲食小鼠的骨分析

對高熱量飲食且餵食正常小鼠腸道微生物的小鼠 (HFD-FMT) 與正常 (CD) 和高熱量飲食小鼠 (HFD) 測量體重，正常小鼠 (CD) 體重平均值為 31.76g；高熱量飲食小鼠 (HFD-Veh) 的體重平均值為 39.25g；有接受腸道微生物的小鼠 (HFD-FMT) 體重平均值為

37.58g，可以看到，攝取正常小鼠腸道微生物 (HFD-FMT) 的小鼠體重對比高熱量飲食小鼠 (HFD-Veh) 有減輕的趨勢。

將三種小鼠的骨質狀況做比較，骨小梁密度的部分，餵食正常飼料的小鼠 (CD) 骨小梁密度平均值為 0.155 mg/cm^3 ，骨容積平均值為 11.24%；高熱量飲食的小鼠 (HFD-Veh) 骨小梁密度平均值為 0.101 mg/cm^3 ，骨容積平均值為 2.59%；接受正常飲食小鼠腸內共生菌的高熱量飲食小鼠 (HFD-FMT) 骨小梁密度平均值為 $0.147(\text{mg/cm}^3)$ ，骨容積平均值為 7.86%。從結果來看可以發現，在餵食過 FMT 後的小鼠在骨密度以及骨容積的部分比起高熱量飲食小鼠有回升的趨勢，可以看出餵食正常小鼠腸道微生物確實有改善骨骼的結構及堅實程度。

四、 測定正常與高熱量飲食小鼠中的腸道代謝物差異

檢測到腸內共生菌與骨質存在的關聯，此實驗觀察了近期兩種被報導可能為肥胖性以及非肥胖性的指標代謝物分別是 TMAO 及 TMA，HFD 小鼠的 TMAO 含量為 CD 小鼠 TMAO 含量的 2 倍，而兩者的 TMA 含量無明顯差異，而其中 TMAO 對 TMA 的含量比值是 HFD 小鼠遠高於 CD 小鼠。由結果得知，TMA 含量在兩種小鼠中並無差異，唯獨 TMAO 在正常小鼠中的含量較少，在高熱量飲食小鼠中含量則較高，應證了肥胖小鼠與 TMAO 含量呈現正相關。

五、 觀察骨細胞與 TMAO 之關係

為找出 TMAO 是否會真正影響骨質，將 TMAO 在骨細胞中培養，觀察 TMAO 對骨細胞的表現，在將 TMAO 放置在骨細胞培養下，可以看出對比於對照組 (Vehicle) 的 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 量， β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 在 TMAO 培養下的數量較為密集，而 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 做為一種細胞衰老的指標性物質，可以得知 TMAO 具有讓骨細胞衰老的能力，意即高熱量飲食小鼠體內的經過 TMAO 作用，骨細胞的老化程度較正常老鼠的骨細胞高。

同樣的，在 RT-PCR 分析檢測細胞週期調節指標基因 p16 和 p21 的實驗中，此兩種基

因亦細胞衰老的指標，在實驗中，對比於對照組 (Vehicle)，p16 的含量在骨細胞中增長了 1.58 倍，p21 的含量增長了 1.89 倍。測出的結果在 TMAO 作用下的 p16 和 p21 基因表現量增加，表示細胞衰老程度亦較高。

而在骨代謝的部分，對比於對照組 (Vehicle)，受到 TMAO 作用的骨細胞代謝礦物質沉澱物相較於對照組 (Vehicle) 來的少，骨代謝物質少可以推斷其代謝功能遲緩或者停擺，換言之，可以得知，在 TMAO 作用下，骨細胞代謝的能力會受到抑制並減緩。

使用 RT-PCR 分析測定骨骼 RUNx2 轉錄因子以及 Colla1 X1 型膠原蛋白基因表現量，RUNx2 轉錄因子的含量降為對照組的 0.5 倍、Colla1 X1 型膠原蛋白基因的含量降為 0.53 倍，結果來看，對比於對照組 (Vehicle)，兩者在 TMAO 作用下的含量比正常骨細胞少，由於兩種因子分別與骨細胞的分化和產生骨質中的膠原蛋白有關，並同樣具備骨代謝的能力，可以推測骨細胞在 TMAO 作用下會降低骨細胞分化能力，產生膠原蛋白和骨細胞的不足，降低骨骼發展，並同時減緩骨骼的代謝能力，為造成骨質疏鬆的關鍵因子。

陸、結論與未來展望

一、HFD 與 CD 小鼠體質與骨質比較

- (一) 餵食 HFD 小鼠的體重高於 CD 小鼠的體重
- (二) 餵食 HFD 小鼠的骨小梁密度與骨容積皆低於 CD 小鼠
- (三) 發現餵食高熱量飲食對骨質有負面影響

二、HFD 小鼠與 CD 小鼠的腸道菌叢的差異

- (一) HFD 小鼠中的有益共生菌含量較 CD 小鼠低，肥胖相關菌種含量較 CD 小鼠高
- (二) 發現骨質與致胖菌的含量有正相關

三、CD 小鼠的腸道微生物餵食 HFD 小鼠實驗

- (一) HFD-FMT 小鼠的體重較 HFD 小鼠輕
- (二) HFD-FMT 小鼠中的骨小梁密度與骨容積占比較 HFD 小鼠提升
- (三) 發現餵食 CD 小鼠的腸道微生物後骨質有明顯改善

四、CD 與 HFD 小鼠中的腸道代謝物差異

- (一) CD 小鼠與 HFD 小鼠中的 TMA 含量相差極小
- (二) HFD 小鼠中的 TMAO 含量為 CD 小鼠的 2 倍
- (三) 發現 HFD 中有負面影響的 TMAO 比例高於 CD 小鼠

五、TMAO 作用於骨細胞實驗

- (一) TMAO 會加速骨質衰老及衰老基因的表現
- (二) TMAO 會降低骨細胞代謝，並造成代謝相關基因減少
- (三) 發現 TMAO 為造成骨質疏鬆的關鍵因素

統整以上內容，發現肥胖個體的腸道共生菌產生的 TMAO 在人體中會影響骨質的代謝以及加速老化，是造成骨質疏鬆的關鍵因素之一，值得進一步研究 TMAO 在體內與 TMA 的轉換機制，並研發特定藥物或治療方法使 TMAO 轉換至 TMA 的路徑，降低 TMAO 在體內的增長，期望可以減少個體產生肥胖性骨質疏鬆的機率。

參考文獻資料及其他

1. Nilsson, A. G., Sundh, D., Bäckhed, F., & Lorentzon, M. (2018). Lactobacillus reuteri reduces bone loss in older women with low bone mineral density: a randomized, placebo- controlled, double- blind, clinical trial. *Journal of internal medicine*, 284(3), 307-317.
2. Li, J. Y., Chassaing, B., Tyagi, A. M., Vaccaro, C., Luo, T., Adams, J., ... & Pacifici, R. (2016). Sex steroid deficiency–associated bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics. *The Journal of clinical investigation*, 126(6), 2049-2063.
3. 衛生福利部國民健康署，疾病防治，慢性病防治，骨質疏鬆，2023.3.15 取自：
<https://www.hpa.gov.tw/Pages/List.aspx?nodeid=216>
4. 骨骼系統，骨的結構，2023.3.15 取自：
http://www.hkpe.net/hkdsepe/human_body/bones_structure.htm
5. Rinninella, E., Cintoni, M., Raoul, P., Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Pulcini, G., ... & Mele, M. C. (2019). Food components and dietary habits: keys for a healthy gut microbiota composition. *Nutrients*, 11(10), 2393.
6. 黃永銓, 江濤, 蘇海濤, 羅毅文, & 侯秋科. (2017). 腸道菌群與骨質疏鬆關係的研究進展. *Journal of Southern Medical University*, 37(2), 278.
7. 台灣醫學會，腸道菌在心血管疾病所扮演的角色，2023.3.16 取自：
<http://www.fma.org.tw/2018/S-3-2.html>
8. Li, L., Chen, B., Zhu, R., Li, R., Tian, Y., Liu, C., ... & Gao, S. (2019). Fructus Ligustri Lucidi preserves bone quality through the regulation of gut microbiota diversity, oxidative stress, TMAO and Sirt6 levels in aging mice. *Aging (Albany NY)*, 11(21), 9348.
9. Turrone F, Milani C, Duranti S, et al. Bifidobacteria and the infant gut: an example of co-evolution and natural selection. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(1):103-118.
doi:10.1007/s00018-017-2649-4
10. Cani PD, de Vos WM. Next-generation beneficial microbes: the case of Akkermansia muciniphila. *Front Microbiol*. 2017;8:1765. doi:10.3389/fmicb.2017.01765

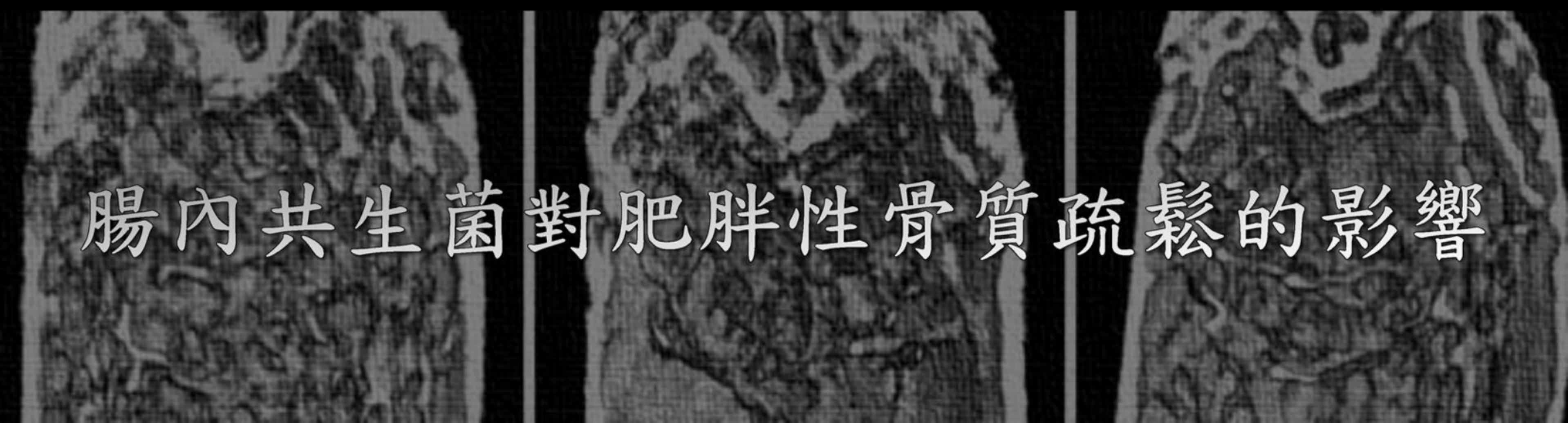
11. Li Y, Li H, Li Y, Liu Z, Li X. Characterization and immunomodulatory activity of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* Q8. *Carbohydr Polym.* 2017;157:107-115. doi:10.1016/j.carbpol.2016.09.056
12. Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022-1023.
13. Larsen, N., Vogensen, F. K., van den Berg, F. W., Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B. K., ... & Hansen, L. H. (2010). Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PloS one*, 5(2), e9085.

【評語】 052013

探討高熱量飲食小鼠與正常飲食小鼠之身質、骨質與腸內共生菌的差異，這是個相當有趣且適合的題目。

1. 研究中只涉及了高熱量飲食小鼠和正常飲食小鼠的比較，缺乏對照組，例如低熱量飲食小鼠，無法全面評估高熱量飲食對骨質疏鬆的影響。
2. 雖然研究提到了代謝物 TMA 和 TMAO 的量變化，但未能提供更多關於這些代謝物如何與骨質疏鬆相關的信息，如能對代謝物和機制有進一步研究及詳細解釋更佳。
3. 腸道菌相的測定方法及實驗宜在詳加說明。
4. 實驗記錄本沒有詳實呈現實驗過程，宜再加強。

作品海報



腸內共生菌對肥胖性骨質疏鬆的影響

摘要

本研究探討高熱量飲食 (HFD) 小鼠與正常飲食 (CD) 小鼠之身質、骨質與腸內共生菌的差異，並探討造成骨質差異的可能代謝物。結果發現 HFD 小鼠的平均體重顯著提升；檢測其糞便中微生物，發現 CD 小鼠中的腸內有益共生菌的對數值為 HFD 的 1.0 - 4.5 倍，HFD 小鼠中的肥胖相關菌種則為 1.5 - 4.0 倍。後續讓 HFD 小鼠攝取 CD 小鼠的腸內共生菌，六個月後平均體重較原 HFD 小鼠低 1.47g，平均骨小梁密度高 0.036 mg/cm³、骨容積高 5.27%。後續探討共生菌之代謝物 TMA 和 TMAO，HFD 小鼠的 TMAO 量比 CD 中的高 1 倍，並發現 p16 和 p21 基因表現量上升；RUNx2 和 Colla1 表現量降為 0.5 倍，可能是引起骨質疏鬆的原因，值得進一步研究探討。

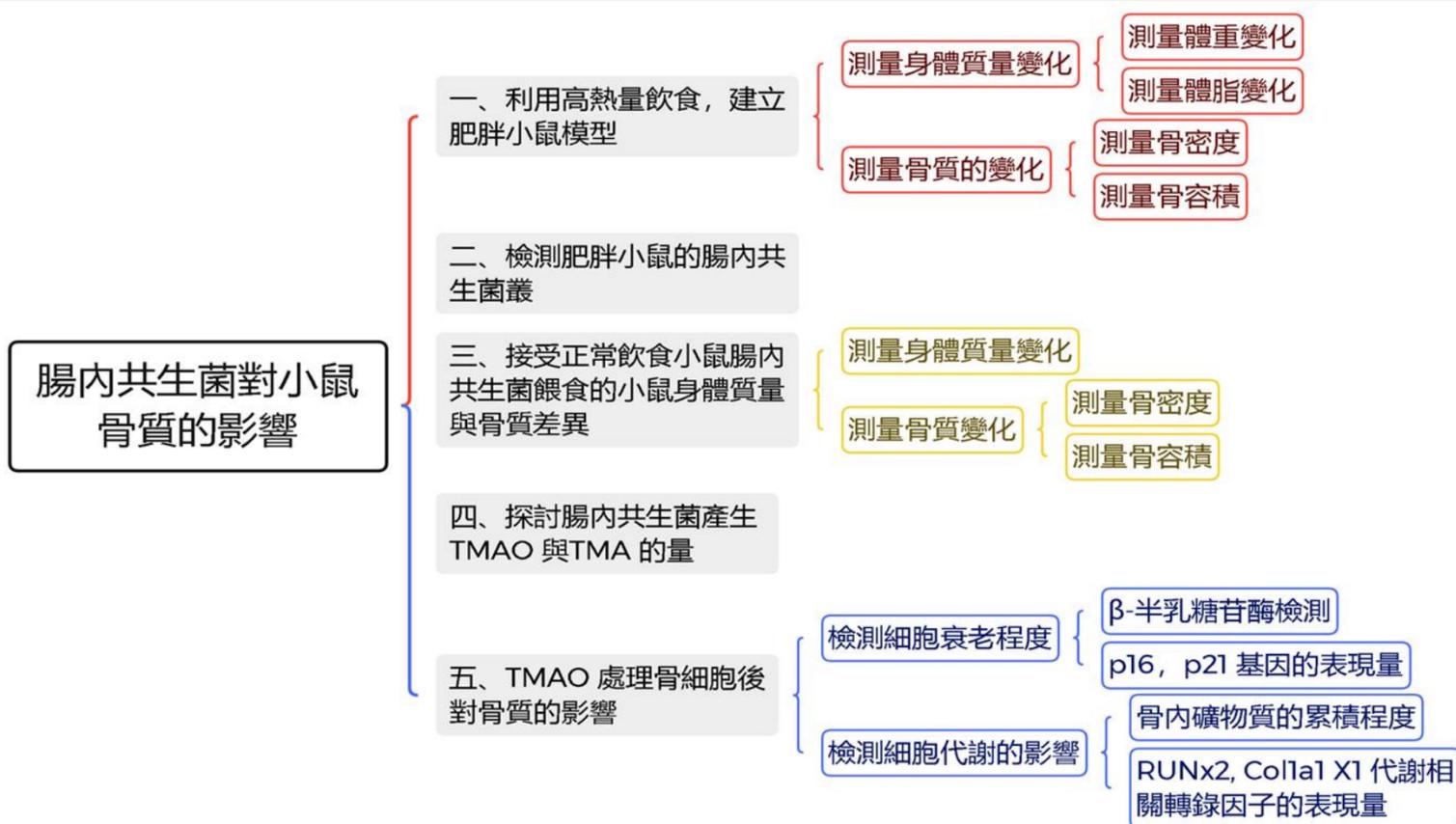
壹、研究動機

在《Journal of Internal Medicine》發表的一項研究讓 90 個有骨質疏鬆症狀、年齡在 75~80 歲之間的中年齡女性，補充「羅伊氏乳桿菌 (*Lactobacillus reuteri*) 6475」，在 12 個月之後，觀察骨密度、骨結構、發炎指標、骨代謝轉換指標，發現攝取腸內共生菌的組別，上述指標皆改善非常多，同時該期刊引用了一項藉由讓小鼠進食腸內共生菌以改善骨質的研究。因此，好奇於這些研究成果後續在人體研究應用上的發展，並欲瞭解腸內共生菌改善骨質疏鬆相關機制，便設計了以下實驗內容。

貳、研究目的

- (一) 藉由高熱量飲食建立肥胖型小鼠模型
- (二) 從正常小鼠與肥胖型小鼠獲取並篩選腸內共生菌
- (三) 以分離後的腸內共生菌餵食小鼠，並確認骨質改變之結果
- (四) 探討腸內共生菌代謝物 TMAO 對於骨細胞與骨質的影響

參、實驗架構

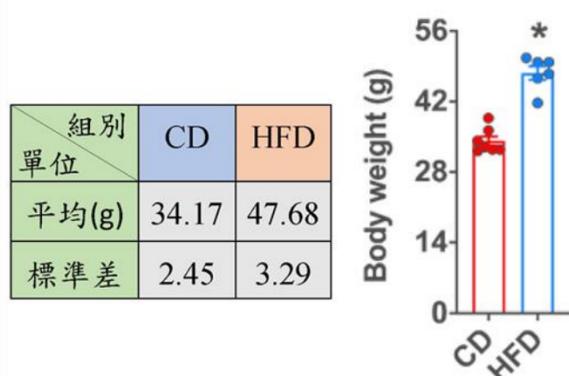


肆、實驗結果

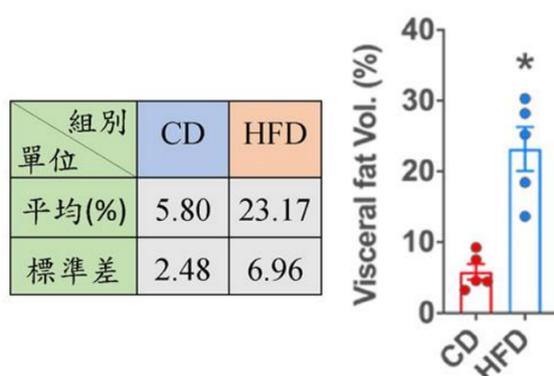
一、正常小鼠與高熱量飲食小鼠的身體質量與骨質差異

本研究先以高熱量飼料 (HFD; 60 Kcal%fat) 餵食小鼠連續六個月，建立肥胖小鼠模型，並比較餵食正常飼料 (CD; 10 Kcal%fat) 的身體質量與骨質的差異。

測定 CD 小鼠與 HFD 小鼠的體重平均值， $P < 0.05$ ，有顯著差異。



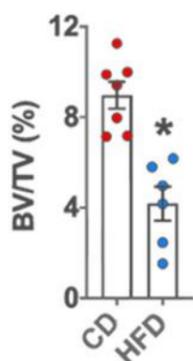
測定 CD 小鼠；HFD 小鼠的內臟脂肪容量比例平均值， $P < 0.05$ ，有顯著差異。



肆、實驗結果

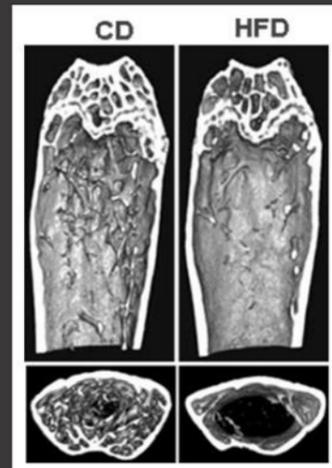
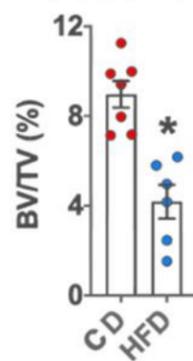
測定骨密度 (Tb.BMD) 在 CD 小鼠與 HFD 小鼠中的平均值, $P < 0.05$, 有顯著差異。

組別	CD	HFD
單位		
平均 (mg/cm^3)	0.095	0.064
標準差	0.0091	0.0196



測定骨容積 (BV/TV%) CD 小鼠與 HFD 小鼠中的平均值, $P < 0.05$, 有顯著差異。

組別	CD	HFD
單位		
平均 (%)	8.97	4.18
標準差	1.57	1.86

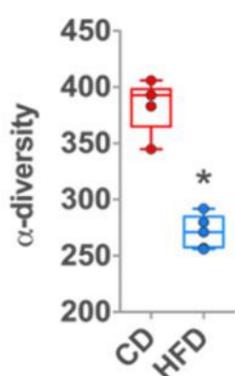


二、正常飲食小鼠與高熱量飲食小鼠的腸道共生菌叢的差異

對小鼠腸內共生菌進行 DNA 測序, 測定 α -diversity 指標顯示菌落多樣性, 以及測定 F/B ratio, 並用 16S rDNA 定序五種腸內共生菌的表現量。

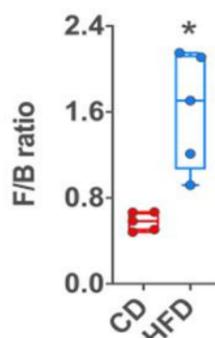
測出 α -diversity 的結果, 在 CD 小鼠與 HFD 小鼠中的平均值, $p < 0.05$, 有顯著差異。

組別	CD	HFD
單位		
平均	384	271
標準差	23.28	15.35

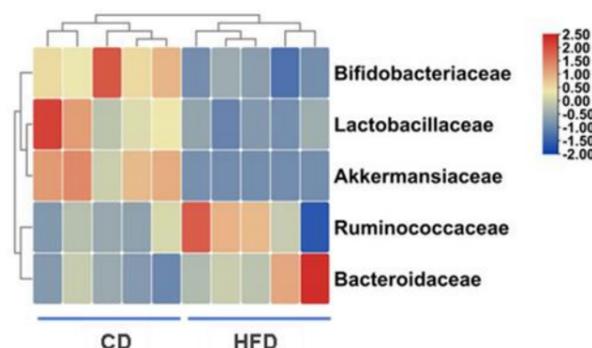


測定腸道內厚壁菌門 (*Firmicutes*) 對擬桿菌門 (*Bacteroidetes*) 的比值 (F/B ratio), 在 CD 小鼠與 HFD 小鼠中的平均值, $p < 0.05$, 有顯著差異。

組別	CD	HFD
單位		
平均	0.58	1.62
標準差	0.086	0.544



測定選取的實驗菌在 CD 小鼠和 HFD 小鼠的測定序表現量, 經 16S rDNA 定序後, *Bifidobacterium* (雙歧桿菌屬)、*Akkermansia* (嗜黏性蛋白艾克曼氏菌)、*Lactococcus* (乳酸乳球菌)、*Bacteroides* (擬桿菌屬)、*Ruminococcus* (瘤胃球菌屬)的結果。

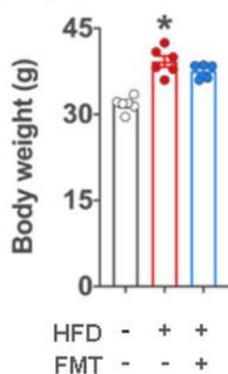


三、高熱量飲食小鼠接受正常飲食小鼠腸內共生菌後的身體質量與骨質差異

分離 CD 小鼠糞便內微生物, 並灌食給 HFD 小鼠 (HFD-FMT 小鼠), 餵食六個月後, 分析其各項指標與未灌食之 HFD-Veh 小鼠和 CD 小鼠的差異。

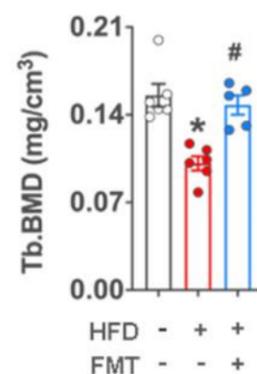
測定 CD 小鼠、HFD-Veh 小鼠、HFD-FMT 小鼠的體重平均值, $P < 0.05$, 有顯著差異。

組別	CD	HFD-Veh	HFD-FMT
單位			
平均 (g)	31.76	39.25	37.58
標準差	1.27	2.33	1.26



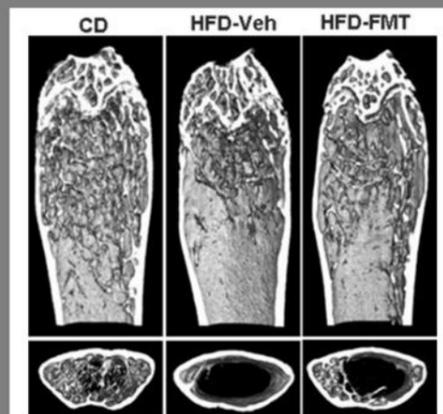
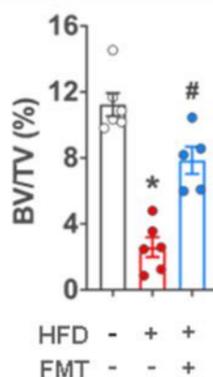
測定骨小梁密度數據, 在 CD 小鼠、HFD-Veh 小鼠、HFD-FMT 小鼠中的平均值, $P < 0.05$, 有顯著差異。

組別	CD	HFD-Veh	HFD-FMT
單位			
平均 (mg/cm^3)	0.155	0.101	0.147
標準差	0.022	0.010	0.017



測定骨容積實驗數據, 在 CD 小鼠、HFD-Veh 小鼠、HFD-FMT 小鼠中的平均值, $P < 0.05$, 有顯著差異。

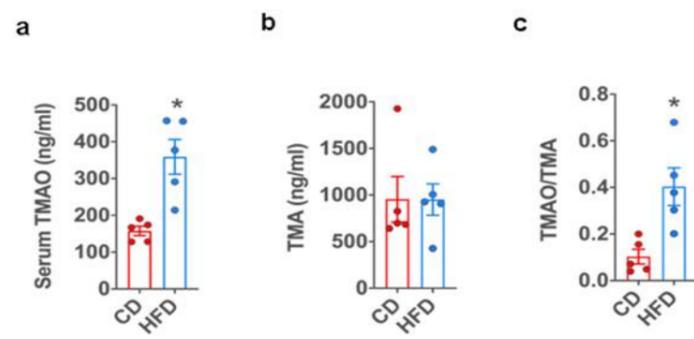
組別	CD	HFD-Veh	HFD-FMT
單位			
平均 (%)	11.24	2.59	7.86
標準差	1.74	1.45	1.86



四、探討腸內共生菌代謝物 TMAO 對於骨細胞與骨質的影響

(一) 腸內共生菌產生 TMA 與 TMAO 量的差異

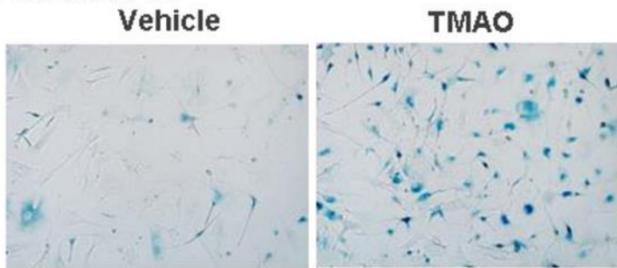
檢測 CD 小鼠與 HFD 小鼠的血清中 TMA 與 TMAO 的表現量。HFD 小鼠的 TMAO 含量為 CD 小鼠 TMAO 含量的 2 倍, 而 TMA 含量無明顯差異, TMAO 對 TMA 的比值是 HFD 小鼠遠高於 CD 小鼠。



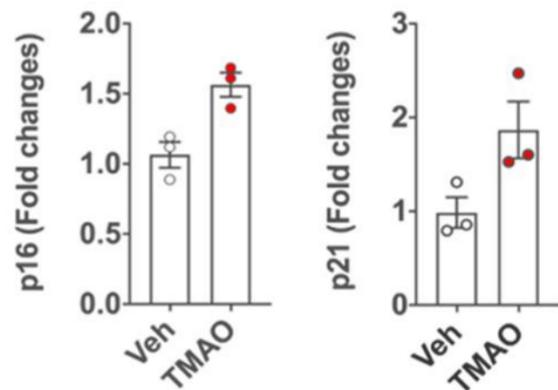
肆、實驗結果

(二) TMAO 處理後對骨細胞與骨質的影響

觀察β-半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 在 TMAO 處理之骨細胞量，染色結果顯示，相較於對照組，經 TMAO 處理之骨細胞染色後β-半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 之結果明顯較多。

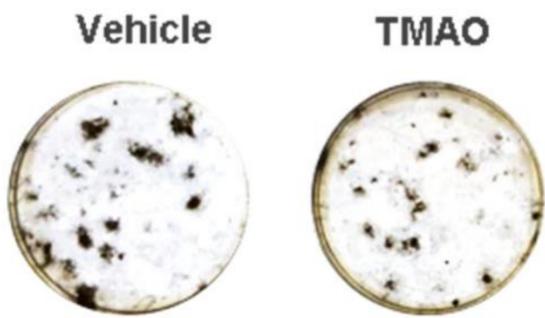


檢測基因 p16 和 p21 分別在對照組與實驗組的表現量，此兩種基因的表現量為細胞衰老的指標。

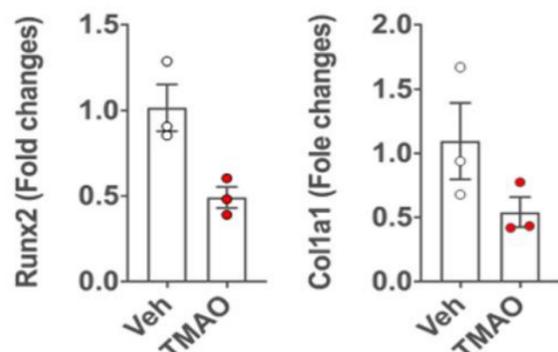


(三) TMAO 處理後之骨細胞礦物質累積情形與相關代謝轉錄因子表現量

觀察骨細胞代謝礦物質的狀況，並與對照組比較實驗結果。實驗結果顯示，對比於對照組，受到 TMAO 作用的骨細胞代謝物明顯較少。



分析骨骼代謝相關轉錄因子：RUNx2 與 Colla1 X1 分別在對照組與實驗組的表現量。



伍、討論

一、正常與高熱量飲食小鼠的骨分析

從實驗結果得知，HFD 小鼠的骨小梁密度平均低於 CD 小鼠。因此，高熱量飲食小鼠的骨骼會較 CD 小鼠脆弱。而在骨容積的部分，HFD 小鼠的骨骼涵蓋容積比 CD 小鼠少，代表其骨骼結構較 CD 小鼠的更細小，更易斷裂。

二、正常飲食小鼠與高熱量飲食小鼠腸道共生菌叢的差異分析

在我們篩選的五種實驗菌中，其中三種是對生物體有益的菌種，在 CD 小鼠中相較於 HFD 小鼠的 log 值高 1.0 - 4.5；另外兩種會則是在肥胖個體中的常見共生菌，在肥胖個體中，此類菌種比例高，使得促進分解和保護腸道的菌量下降，推測有益菌種的減少與肥胖相關菌種的增加是引起肥胖的關鍵因素之一。

三、餵食正常小鼠腸內共生菌後高熱量飲食小鼠的骨分析

結果來看可以發現，在餵食過 FMT 後的小鼠在體重相較於 HFD 飲食小鼠較輕，而在骨密度以及骨容積的部分比起 HFD 小鼠有回升的趨勢，可以看出餵食 CD 小鼠腸道微生物能改善骨骼的結構及堅實程度。

四、測定正常與高熱量飲食小鼠中的腸道代謝物差異

由結果得知，TMA 含量在兩種小鼠中並無顯著差異，而 TMAO 在 CD 小鼠中的含量較少，在 HFD 小鼠中含量則較高，應證了肥胖小鼠與 TMAO 含量呈現正相關。

五、觀察骨細胞與 TMAO 之關係

(一) 觀察 β-半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 及檢測 p16 與 p21 基因，推斷 TMAO 為骨細胞衰老的可能因素，即 HFD 小鼠體內因 TMAO 較多，骨細胞的老化程度較 CD 小鼠的骨細胞高。

(二) 從觀察骨細胞代謝物及分析 RUNx2 轉錄因子以及 Colla1 X1 型膠原蛋白基因表現量，可以推測骨細胞在 TMAO 量多的情況下，會降低骨細胞分化能力，進而造成膠原蛋白和骨細胞的不足，骨骼發展遲緩，並減緩骨骼的代謝能力，造成骨質疏鬆。

陸、結論

一、餵食高熱量飲食對小鼠骨質有負面影響

二、骨質與致胖菌的種類與含量有相關性

三、HFD-FMT 小鼠的骨質有明顯改善

四、HFD 小鼠中的 TMAO 比例高於 CD 小鼠

五、TMAO 為造成骨細胞衰老與代謝減緩等與骨質疏鬆相關的關鍵

柒、參考資料

1. Nilsson, A. G., Sundh, D., Bäckhed, F., & Lorentzon, M. (2018). Lactobacillus reuteri reduces bone loss in older women with low bone mineral density: a randomized, placebo-controlled, double-blind, clinical trial. *Journal of internal medicine*, 284(3), 307-317.
2. Li, J. Y., Chassaing, B., Tyagi, A. M., Vaccaro, C., Luo, T., Adams, J., ... & Pacifici, R. (2016). Sex steroid deficiency-associated bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics. *The Journal of clinical investigation*, 126(6), 2049-2063.
3. Rinninella, E., Cintoni, M., Raoul, P., Lopetuso, L. R., Scalfaferrì, F., Pulcini, G., & Mele, M. C. (2019). Food components and dietary habits: keys for a healthy gut microbiota composition. *Nutrients*, 11(10), 2393.