

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

補充 β -羥基- β -甲基丁酸與舉重訓練對未受訓練者骨骼代謝之交互作用以及分子機轉探討

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 101-2410-H-028-004-
執行期間：101年08月01日至102年07月31日
執行單位：國立臺灣體育運動大學運動健康科學學系

計畫主持人：洪暉

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：張軒濤
碩士班研究生-兼任助理人員：石雅智
碩士班研究生-兼任助理人員：陳思翰

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 102 年 10 月 31 日

中文摘要：訓練過程中，運動員經常藉助各種營養補充品以達到提升訓練效果、修補運動誘發之損傷、防範可能發生的運動傷害。HMB 已被廣泛用於提升肌力、增加骨骼肌含量與協助疲勞恢復等，除此之外，HMB 可能具有影響骨質代謝之作用。因此本研究欲探討在重量訓練時補充 HMB 後，對骨質代謝產生的影響；並探討補充 HMB 後，對於血液中骨質代謝指標與單核前驅細胞內細胞蛋白的影響。自國立台灣體育運動大學招募之 16 名健康的男性受試者，分為補充 HMB 組與補充安慰劑組。於為期一個月的訓練週期內，每天補充 3 g HMB。訓練強度根據由教練所指示之訓練計畫執行。實驗中每週進行採血，分析血液中骨調控細胞激素、骨骼代謝指標、骨代謝相關荷爾蒙之血中濃度。並自可能生成破骨前驅細胞的血液單核球中分析細胞內調控蛋白 $I\kappa B-\alpha$ (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) 與單核細胞膜上的 RANK 受體表現量。結果發現，補充 HMB 造成骨合成指標 B-ALP 顯著且持續上升至訓練期結束；骨礦化指標 osteocalcin 則兩組間並無明顯差異；骨分解指標 beta-crosslaps 則是 HMB 組略低於控制組；骨調控激素 PTH 顯著上升而組間無顯著差異；代謝分解指標 cortisol 僅於第一週的 HMB 組出現顯著上升之變化；補充 HMB 對於骨骼調控細胞激素 sRANKL 與 OPG 均無明顯影響，細胞表面受體 RANK 僅於 Placebo 組第一週達顯著性的上升，隨後恢復至訓練前水平； $I\kappa B-\alpha$ 蛋白兩組皆自第一週起即顯著的下降，但 Placebo 組維持第一週水平至訓練結束，而 HMB 組則持續下降，並於第四週組間達顯著性差異。本研究主要發現，為期四週的訓練週期中，每日補充 3 克 HMB，除了因訓練所提升骨質礦化作用外，還能額外提升造骨細胞的活性，提高骨質的合成作用；並減少減少由運動刺激所造成的骨質分解作用，整體而言，促進骨質增加，保護骨骼系統。

中文關鍵詞：HMB、骨質代謝、負重性運動

英文摘要：Dietary supplement of β -hydroxy- β -methylbutyrate had been proven to increase lean body mass, collagen decomposition and bone mass. The mechanisms of HMB supplements promote myogenesis had been well-documented but the mechanism of HMB inhibit osteoclastogenesis remains unclear. As far as we can research, NF- κ B pathway might play an important role in it. Differentiation and proliferation of osteoclast require activation of RANK and downstream

NF- κ B pathway by RANK ligand(RANKL). During exercise training, increased reactive oxygen species (ROS) production activate NF- κ B pathway and consequently promote osteoclastogenesis. HMB might reduce osteoclast proliferation and differentiation through inhibition of NF- κ B pathway activated by RANKL. Therefore, we proposed present study to discover the effect of HMB supplement and weightlifting training on bone metabolic responses and possible molecular mechanism of those responses. Sixteen healthy male were recruited for present study and divided into two groups with matched body weight. Training protocol were followed by certified weightlifting coach during four weeks of training session and well recorded. All subjects required to take 3 grams of HMB daily on early morning after blood sample were collected. Fasting blood sample were collected weekly in eaaly morning by venipuncture for further analyze. During four weeks of training, HMB supplement increased serum B-ALP level and slightly reduced beta-crosslaps, a bone resorption biochemical marker while no differences were found on bone mineralize marker osteocalcin between groups. Bone modulatint cytokines OPG and RANKL level were not altered by HMB supplement. Somehow, OPG level seems to consist with training volumn in both group. PTH level was obviously increased in both groups while no difference were found between groups. cortisol in group HMB has raised siginificantly in first week then back to the baseline level. Intracellular I κ B- α expression were decreaseed in both groups ever since the training has began and eventually significantly different at week 4. Result of present study indicates that 3g of HMB supplement daily promotes bone formation and slightly reduced bone resorption while mineralization were not affected during four weeks of weightlifting training.

英文關鍵詞： HMB, bone metabolic, weight-bearing exercise

補充 β -羥基- β -甲基丁酸與舉重訓練對未受訓練者骨骼代謝之交互作用以及分子機轉探討

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 101-2410-H-028 -004 -

執行期間：101 年 8 月 1 日至 102 年 7 月 31 日

執行機構及系所：國立臺灣體育運動大學 運動健康科學學系

計畫主持人：洪 暉

共同主持人：

計畫參與人員：林志立、石雅智、張軒濤

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 1 份：

移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

中 華 民 國 102 年 10 月 30 日

中文摘要

訓練過程中，運動員經常藉助各種營養補充品以達到提升訓練效果、修補運動誘發之損傷、防範可能發生的運動傷害。HMB 已被廣泛用於提升肌力、增加骨骼肌含量與協助疲勞恢復等，除此之外，HMB 可能具有影響骨質代謝之作用。因此本研究欲探討在重量訓練時補充 HMB 後，對骨質代謝產生的影響；並探討補充 HMB 後，對於血液中骨質代謝指標與單核前驅細胞內細胞蛋白的影響。自國立台灣體育運動大學招募之 16 名健康的男性受試者，分為補充 HMB 組與補充安慰劑組。於為期一個月的訓練週期內，每天補充 3 g HMB。訓練強度根據由教練所指示之訓練計畫執行。實驗中每週進行採血，分析血液中骨調控細胞激素、骨骼代謝指標、骨代謝相關荷爾蒙之血中濃度。並自可能生成破骨前驅細胞的血液單核球中分析細胞內調控蛋白 I κ B- α (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) 與單核細胞膜上的 RANK 受體表現量。結果發現，補充 HMB 造成骨合成指標 B-ALP 顯著且持續上升至訓練期結束；骨礦化指標 osteocalcin 則兩組間並無明顯差異；骨分解指標 beta-crosslaps 則是 HMB 組略低於控制組；骨調控激素 PTH 顯著上升而組間無顯著差異；代謝分解指標 cortisol 僅於第一週的 HMB 組出現顯著上升之變化；補充 HMB 對於骨骼調控細胞激素 sRANKL 與 OPG 均無明顯影響，細胞表面受體 RANK 僅於 Placebo 組第一週達顯著性的上升，隨後恢復至訓練前水平；I κ B- α 蛋白兩組皆自第一週起即顯著的下降，但 Placebo 組維持第一週水平至訓練結束，而 HMB 組則持續下降，並於第四週組間達顯著性差異。本研究主要發現，為期四週的訓練週期中，每日補充 3 克 HMB，除了因訓練所提升骨質礦化作用外，還能額外提升造骨細胞的活性，提高骨質的合成作用；並減少減少由運動刺激所造成的骨質分解作用，整體而言，促進骨質增加，保護骨骼系統。

關鍵字：HMB、骨質代謝、負重性運動

Abstract

Dietary supplement of β -hydroxy- β -methylbutyrate had been proven to increase lean body mass, collagen decomposition and bone mass. The mechanisms of HMB supplements promote myogenesis had been well-documented but the mechanism of HMB inhibit osteoclastogenesis remains unclear. As far as we can research, NF- κ B pathway might play an important role in it. Differentiation and proliferation of osteoclast require activation of RANK and downstream NF- κ B pathway by RANK ligand(RANKL). During exercise training, increased reactive oxygen species (ROS) production activate NF- κ B pathway and consequently promote osteoclastogenesis. HMB might reduce osteoclast proliferation and differentiation through inhibition of NF- κ B pathway activated by RANKL. Therefore, we proposed present study to discover the effect of HMB supplement and weightlifting training on bone metabolic responses and possible molecular mechanism of those responses. Sixteen healthy male were recruited for present study and divided into two groups with matched body weight. Training protocol were followed by certified weightlifting coach during four weeks of training session and well recorded. All subjects required to take 3 grams of HMB daily on early morning after blood sample were collected. Fasting blood sample were collected weekly in early morning by venipuncture for further analyze.

During four weeks of training, HMB supplement increased serum B-ALP level and slightly reduced beta-crosslaps, a bone resorption biochemical marker while no differences were found on bone mineralize marker osteocalcin between groups. Bone modulating cytokines OPG and RANKL level were not altered by HMB supplement. Somehow, OPG level seems to consist with training volume in both group. PTH level was obviously increased in both groups while no difference were found between groups. cortisol in group HMB has raised significantly in first week then back to the baseline level. Intracellular I κ B- α expression were decreased in both groups ever since the training has began and eventually significantly different at week 4. Result of present study indicates that 3g of HMB supplement daily promotes bone formation and slightly reduced bone resorption while mineralization were not affected during four weeks of weightlifting training.

Keywords: HMB, bone metabolic, weight-bearing exercise

目錄

摘要。	I
Abstract	II
目錄	III
圖目錄。	IV
研究目的	1
研究方法	1
結果	5
結論	錯誤！尚未定義書籤。 2
參考文獻	13

圖目錄

圖 1	訓練期間每週訓練量。.....	5
圖 2	分組訓練期間每週訓練量。.....	5
圖 3	訓練期間骨代謝相關荷爾蒙 PTH 的變化。.....	6
圖 4	訓練期間骨代謝相關荷爾蒙 Cortisol 的變化率。	6
圖 5	訓練期間骨調控蛋白 sRANKL 的變化率。.....	7
圖 6	訓練期間骨調控蛋白 OPG 的變化率。.....	7
圖 7	訓練期間單核細胞中 RANK 的變化率。.....	9
圖 8	訓練期間單核球細胞內 $I\kappa B-\alpha$ 的變化率。.....	9
圖 9	含有 RANK 的單核球細胞 $I\kappa B-\alpha$ 的變化。.....	9
圖 10	訓練期間骨代謝指標 B-ALP 的變化率。.....	10
圖 11	訓練期間骨代謝指標 beta-crosslaps 的變化率。	10
圖 12	訓練期間骨代謝指標 osteocalcin 的變化率。.....	11

研究目的

本研究對象自「國立台灣體育運動大學」運動健康科學學系招募 16 位入學前非經過專項運動訓練、目前無規律運動習慣之男性大學生作為受試者，年齡 20-22 歲。所有受試者依照體重配對後平均分為兩組，給予運動訓練以及 HMB 增補，以期探討在運動訓練期間，補充 HMB 對骨骼系統產生的代謝平衡變化與損傷復原狀態之影響，預期獲得以下數據並提出合理之機轉解釋：

- (一) 補充 HMB 促進骨質合成，並抑制骨質分解，但對於骨質礦化過程無明顯影響。
- (二) 負重性運動訓練促進骨骼礦化速率，配合增補 HMB，對骨骼組織產生保健作用。
- (三) 運動訓練產生的氧化壓力有促進骨質分解的效果，亦即未受訓練者，訓練初期出現骨質分解速率提高現象，而補充 HMB 可抑制此現象，對骨骼組織產生保護作用。
- (四) 運動訓練所產生的氧化壓力可透過 NF- κ B 訊息傳遞路徑的作用誘發破骨細胞新生 (osteoclastogenesis)，補充 HMB 可抑制 NF- κ B 訊息傳遞路徑中 I κ B- α 蛋白的分解，減少 NF- κ B 的 P65 次體進入細胞核內，並藉此抑制破骨細胞新生作用。

研究方法

(一) 實驗樣本的來源及控制

本研究對象自「國立台灣體育運動大學」運動健康科學學系招募 16 位入學前非經過專項運動訓練、目前無規律運動習慣之男性大學生作為受試者，年齡 18-22 歲。參與本實驗之前，均先以問卷方式篩選剔除具有骨骼疾病、免疫系統異常、近期感染發炎、肝腎功能異常以及酗酒、抽煙、大量飲用咖啡等等可能影響骨骼代謝指標的因素，藉以排除不良之影響因素。在運動訓練週期間受試者攝取水分與食物不予限制，運動訓練週期內受試者運動訓練時間與運動強度，依計畫偕同主持人指導調配，受試者均填寫身體健康問卷調查表，並簽署研究自願同意書。

(二) 實驗設計

本實驗將採取配對分組方式，依照體重配對後平均分配受試者，並於兩兩配對之後隨機分派為受試組與控制組，實驗設計的目的為透過體重配對的方式，減少因為訓練份量（總舉重量）不一致所產生的差異，訓練期間要求受試者不得以脫水或熱衰竭等劇烈方法減重，亦要求不得以限制飲食之方式影響體重變化，以免影響各項生理反應。

HMB 增補：訓練期間隨機抽取之受試者依據參照目前搜尋所得研究結果，給予為期四周，每天 3 克之 HMB 鈣鹽製劑 (GNC pro performance, GNC Corporation, Pittsburgh, USA) 增補，控制組則以同樣的膠囊包裝等體積之纖維素與澱粉（安慰劑），所有膠囊均分為兩次於早晚飯後服用。

運動控制：受試者均需計畫偕同主持人指導調配之例行訓練項目以及訓練計畫，訓練期間要求其避免參加非團體共同進行之體能性活動或從事額外之體能訓

練行為，避免體能活動量產生過大差異。

研究問卷：爲了控制其他可能的骨質疏鬆症危險因子，於檢測骨質密度前，由經過訓練的研究人員以問卷方式取得受測者之個人基本資料、個人健康歷史、藥物與營養補充品使用情形、牛奶攝取量、吸煙與飲酒情況等資料。

運動訓練：訓練期依照 101 年之重量訓練課程安排，進行為期一個月的基礎舉重訓練，依照偕同主持人所制訂之訓練計畫執行，訓練期間需接受每次 2 小時，每週 4-5 天的肌力訓練與舉重技巧訓練。期間並詳加記錄訓練量，包含總舉重量、次數等。

運動測試：肌力測試以 Biodex 等速肌力儀 (Biodex isokinetic dynamometer system 4 Pro., Biodex; New York, U.S.A)，檢測股四頭肌、肱二頭肌之最大肌力與肌耐力。最大肌力評估以最大等速向心收縮方式執行，受試者膝關節之股四頭肌等速肌力測試(Concentric-Concentric)所採用的測試速度參照 Feiring (Feiring DC, Ellenbecker TS, Derscheid GL. Test-rest reliability of the biodex isokinetic dynamometer. J Orthop Sports Phys Ther 1990;11:298-300.) 等人之實驗結果，分別設定高速(300 度/秒)與低速(60 度/秒)等速肌力進行實驗，共檢測三次，每次測試之間可依照受試者之自覺體能狀況，休息最多一分鐘。肌耐力則以每組 30 次之反覆等速收縮 (Isometric contraction)，並計算每組動作之最大扭力峰值作功衰退百分比，共執行三組反覆等速收縮測試。

身體組成：使用體箱式身體組成分析儀(BOD-POD, Body Composition Tracking System, Inc.)，以空氣位移原理測量受試者體積，代入體重以公式換算得身體質量組成。

飲食控制：訓練期間受試者的飲食不予限制，飲食份量依據個人狀況調整並給予詳細記錄，但同一組的受試者於 HMB 增補劑與安慰劑投予期間，因體重與訓量份量接近，則要求攝取熱量與營養成分需接近一致，以消除因飲食所造成之差異。

實驗流程：每次實驗週期之期程，依照前趨實驗所得之資料，訂為開始訓練並服用 HMB 之四週，每週進行體能測試、身體組成測試與血液生化分析，於訓練期前、訓練期前的第一週第 1、3、5 天清晨，以及往後三週的每週五清晨，以及訓練期後之第 1、3、5 天清晨，抽取空腹靜脈血，進行後續之血液生化指標追蹤，共計進行 10 次抽血檢驗。

(三) 樣本的採取及分析

血液樣本的採取

(1) 血液樣本採集

本研究之血液樣本將由合格護理人員於預定檢驗日的早晨空腹時抽血 30 cc，

血液樣本分別裝入含有 EDTA 或 heparin 做為抗凝劑的冰涼試管中，於 4°C 離心分離出血漿後，在 48 小時內進行骨代謝指標（B-ALP、osteocalcin、P1NP、Alkaline phosphatase、Osteoprotegerin 與 RANKL）以及肌肉損傷指標（CK、LDH、CA III、Hydroxyproline 與 Hydrolyisine）等生化指標之濃度與活性分析。

（2）分離周邊單核球白血球細胞（PBMC）

取 10ml 全血，放入以 heparin 為抗凝劑的採血管，輕搖以充分混勻，以固定式離心機 2000 rpm 於室溫下離心 15min。離心後，吸取採血管上層之血漿另行放置，並迅速加入等量之 PBS，混合均勻後備用。另取 15ml 離心管，加入兩倍體積之 ficoll 溶液，再緩緩加入已混合均勻的血液，再於室溫下以 3500 rpm 離心 30min。使用滴管吸取離心完後中間乳白色層，並放至另一新的 15ml 離心管，加入 3-10 倍的 PBS 混合均勻後，再以 3500 rpm 於室溫下離心 20min，離心後去除上清液，餘下物質即為所需之 PBMC。

血液中骨骼代謝相關指標分析

（1）調控骨骼代謝的細胞激素分析

使用酵素連結免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)分析血漿中 OPG (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) 與 sRANKL (PeproTech Inc., Princeton Business Park, Rocky Hill, U.S.) 的濃度。實驗依照廠商提供之操作流程以及本研究小組之經驗修改後之步驟進行，最後以 ELISA Reader 測量 450nm 吸光值，Reference reader 測量 650nm 吸光值。

（2）骨骼代謝指標分析 (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Basel Switzerland)

1. 骨骼分解指標分析

血漿中的 **Beta-crosslaps**、**副甲狀腺素 (PTH)**、**可體松(cortisol)** 的濃度均以自動免疫分析儀 (Roche Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 以電化學發光免疫分析法 (Electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA) 進行定量測試。

2. 骨骼合成指標分析

血清 B-ALP 採用 L-Type ALP · J 商業試劑 (WAKA, Osaka, Japan)，以自動生化分析儀 (Hitachi 7020, Hitachi Science systems, Ltd, Lbaranki Japan) 分析。血漿中 **睪固酮 (Testosterone)** 以自動免疫分析儀 (Roche Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 以電化學發光免疫分析法 (Electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA) 進行定量測試。

3. 骨骼礦化指標分析

骨鈣蛋白 (Osteocalcin) 以自動免疫分析儀 (Roche Elecsys 2010, Roche

Diagnosics, Mannheim, Germany) 以電化學發光免疫分析法 (Electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA) 進行定量測試。

PBMC 內蛋白質定量定位分析

流式細胞儀分析 (Flow cytometry analysis)

1. PBMC 前處理

取出 400 μ l 中含有 4×10^6 顆細胞的 PBMC，放入離心管中，並於 4°C 的環境下，以 5ml 含有 5% FBS 的 PBS 和單核球細胞共同培養 20 分鐘，再以 5 ml PBS 清洗並去除含有 FBS 的溶液兩次，隨後加入 400 μ l 的 PBS，均勻混合細胞後，取出每 100 μ l 含有 10^6 顆細胞的 PBS 溶液，並個別依陰性對照 (negative control) 或單一分析 I κ B- α 、RANK (陽性對照, positive control) 以及同時分析 I κ B- α 與 RANK 加入分析試管內。

2. 細胞表面 RANK 表現與細胞內 I κ B- α 數量的雙染 (double stain) 分析

於室溫，分別將 2 μ l 的 RANK 抗體與細胞避光靜置培養 60 分鐘，未接合細胞的抗體以 2ml 含有 0.5% BSA 的 PBS 溶液清洗，以 1800 rpm 離心 3 分鐘後，倒掉上清液，共兩次。取得最後的細胞後，加入 250 μ l 的 Fixation/Permeabilization solution (BD) 與細胞均勻混和後，於 4°C 培養 20 分鐘後，直接以 2 ml 含有 0.5% BSA 的 PBS 溶液進行清洗，以 1800 rpm 離心 3 分鐘後，倒掉上清液，共兩次，將取得的細胞加入 100 μ l 以 1800 rpm 離心 3 分鐘後，倒掉上清液，共兩次均勻混和後，加入 2 μ l 的 I κ B- α 抗體混合共同培養，並於室溫避光靜置 1 小時後，將未接合的抗體以含有 0.5% BSA 的 PBS 溶液進行清洗兩次後去除，將剩餘的細胞加入 1 ml 含有 0.5% BSA 的 PBS 溶液，均勻混和後，於避光且 4°C 的環境下保存，等待上機分析 (BD FACSCalibur)。

研究結果

受試者基本資料

本研究原預計招募國立台灣體育學院 24 名健康男性選手為受試者，因經費因素僅進行 16 名受試者之完整分析，受試者資料如表 1。

表 1 受試者基本資料

	全部受試者	HMB 組	Placebo 組	P value
年齡 (year)	21.07±1.62	20.55±1.54	21.59±1.62	0.212
身高 (cm)	170.31±6.56	171.75±6.43	168.88±6.79	0.399
體重 (kg)	87.34±18.52	87±18.15	87.67±20.13	0.722

訓練量紀錄

訓練量之記錄表格如，計算方式為，記錄一週有訓練當天之訓練組數、次數及重量，以組數乘以次數再乘以重量的方式計算訓練總量，每日訓練強度及項目由教練安排，選手則依當日體能狀況可自行增減。

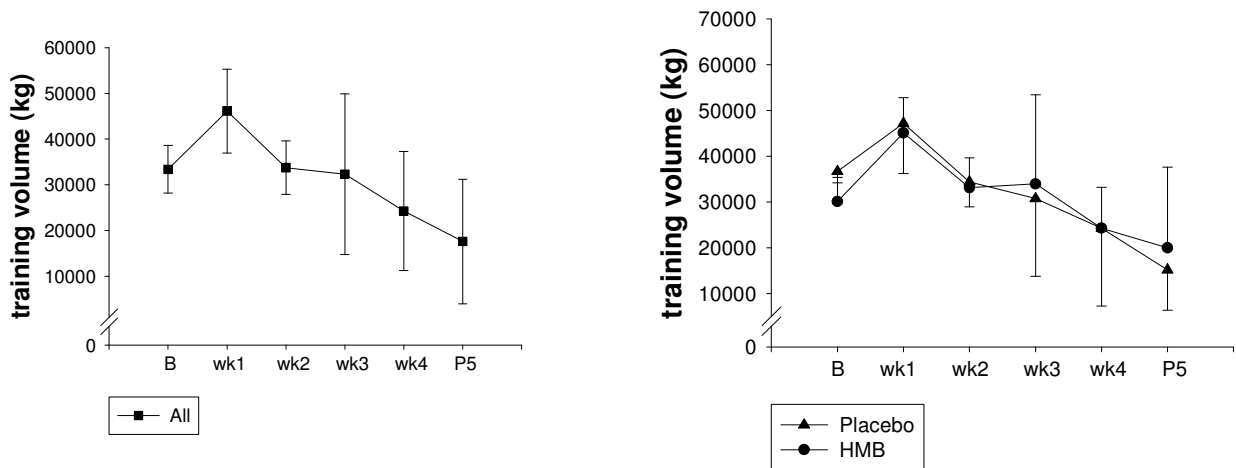


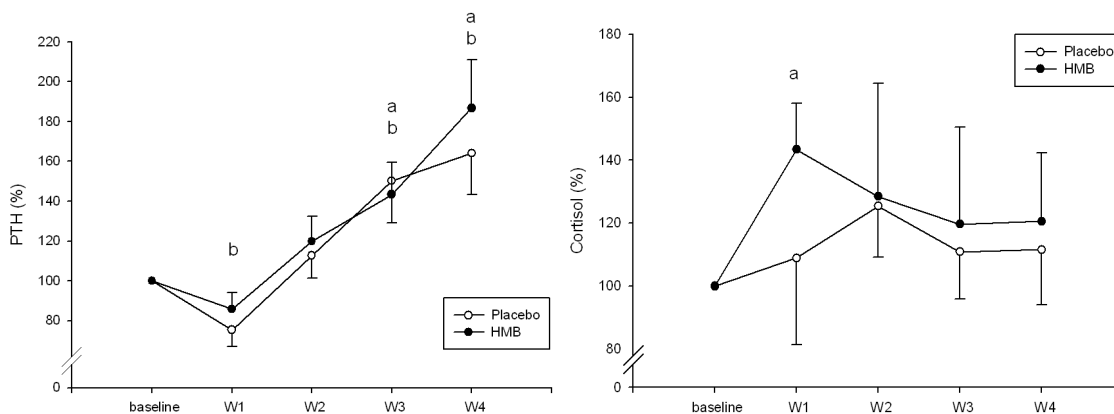
圖 1 (左) 訓練期間總訓練量的變化。

圖 2 (右) 訓練期間兩組各自的訓練量變化。

骨質代謝相關荷爾蒙之結果

調鈣性荷爾蒙 PTH，兩組均自第二週開始便逐漸上升至訓練結束，並於第三週起達顯著水平，Placebo 組第一週顯著下降後，但 HMB 組第一週並無顯著下降現象，而是自第二週起開始逐漸上升，並於第三、四週顯著性高於服用前水準，如圖 3。分解指標 cortisol 則僅 HMB 組於第一週達顯著性的高於服用前水準旋即回歸一般水平，兩組間無明顯差異，如圖 4。

過去研究在單一次運動後血漿 PTH 濃度變化發現，無論是長時間中強度運動(Barry & Kohrt, 2007)、高強度的自行車運動後(Maimoun et al., 2006)或是阻力性運動之後(Rong et al., 1997)，皆發現運動後血漿中 PTH 濃度上升的現象，由於運動過程中，血鈣隨著汗液與尿液的排出，為保持體內鈣離子恆定，促使 PTH 濃度上升，以調節鈣離子濃度，但由於高負重訓練所產生的機械性應力抑制骨分解作用(Ruimerman, Hilbers, van Rietbergen, & Huiskes, 2005)，間接抑制 PTH 的分泌，隨著訓練時間的增加與訓練強度的減少，使 PTH 濃度開始逐漸上升至顯著水平，可能隨著訓練強度逐漸減少，且身體開始適應每日訓練的模式，降低因機械性應力所引起的抑制破骨細胞現象(Rubin, Murphy, Nanes, & Fan, 2000)，從而恢復骨分解作用，使 PTH 開始分泌，此一現象即與過去研究中發現的運動後 PTH 濃度上升之現象一致(Barry & Kohrt, 2007; Maimoun et al., 2006; Rong et al., 1997)。至於分解性荷爾蒙 cortisol 濃度並無明顯變化，可能為血液樣本的採集皆於週末休息兩天過後的早晨，所以 Cortisol 濃度已逐漸恢復正常水平(Mouzopoulos et al., 2007)，但整體的變化趨勢與訓練量呈現出相反之現象，顯示訓練量逐漸減少，亦造成體內的分解性作用下降。



註：“a”表示 HMB 組與 baseline 相比達顯著差異。

“b”表示 Placebo 組與 baseline 相比達顯著差異。

圖 3 (左) 訓練期間骨代謝相關荷爾蒙 PTH 的變化率。

圖 4 (右) 訓練期間骨代謝相關荷爾蒙 Cortisol 的變化率。

骨調控蛋白之變化

RANKL 於補充 HMB 組自訓練期開始便呈現上升之趨勢，並於第四週 (W4) 有較大幅度的上升，然以些微差距未達統計上的顯著差異 ($p=0.75$)，而 Placebo 組的血中 RANKL 濃度僅於第二週後些微上升，服用期間均維持穩定水準未有變化，兩組之間並無統計上顯著差異，如圖 13。HMB 與 Placebo 組，OPG 呈現一致性的變化，值得一提的是，OPG 變化趨勢 (圖 5) 與訓練量的變化趨勢相近 (圖 1)。

無論是規律性的一般強度身體活動 (West, Scheid, & De Souza, 2009)，或長期耐力型運動 (Ziegler et al., 2005)，都能夠直接影響 OPG 的濃度，運動後常可發現 OPG 的濃度上升，sRANKL 的濃度下降的現象，其中 OPG 的上升與運動量成正相關，可歸因於運動所產生的機械性應力刺激骨細胞，促使造骨細胞活化，並釋放出 OPG，與 sRANKL 結合，抑制破骨細胞的成熟來保護骨骼 (Kim, You, Yellowley, & Jacobs, 2006; Saunders et al., 2006; Tang, Lin, & Li, 2006)，以防止 sRANKL 與 RANK 接合，以抑制破骨前驅細胞的活化與成熟。

運動過程中所產生的機械性應力，會對骨骼產生微小損傷，此時則由骨細胞與造骨細胞主導，分泌 sRANKL 誘發單核球細胞分化為破骨細胞，負責清除破碎受損的骨骼，以利之後骨質新生作用的進行 (Noble, 2003)，另一方面，運動過程中所生成 ROS 已被證實具有刺激造骨細胞分泌 sRANKL 之作用 (Bai et al., 2005)，而本研究結果中 sRANKL 於前兩週先上升的趨勢與之呼應：然隨後 sRANKL 逐漸下降，可能為訓練後期訓練量減少，降低機械性應力刺激造骨細胞的合成作用，因而逐漸降低 ROS 刺激造骨細胞分泌 sRANKL 之作用。

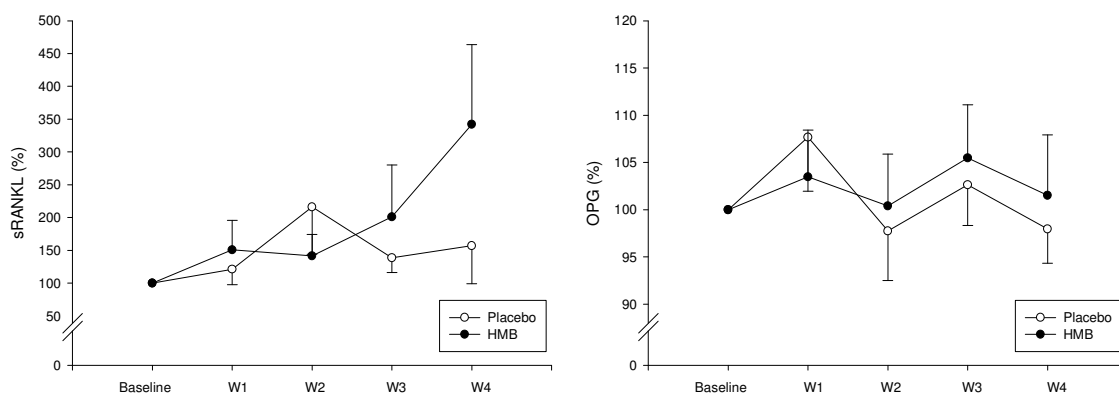


圖 3 (左) 訓練期間骨調控蛋白 sRANKL 的變化率。

圖 6 (右) 訓練期間骨調控蛋白 OPG 的變化率。

單核細胞表面 RANK 與細胞內 I κ B- α 生成結果

在補充 HMB 組，PBMC 中表現 RANK 受體的比率於第一週顯著下降，而自第二週起恢復至正常水平，並於第四週時再呈現出下降趨勢；Placebo 組則於第一週上升後隨後即恢復至一般水準並保持穩定直到實驗結束時，兩組間呈現相互消長之現象，如圖 7。

PBMC 內 I κ B- α ，兩組自第一週起皆顯著下降，HMB 組持續下降至訓練期結束，Placebo 組則從第二週開始便保持一穩定水平，並在第四週發現 HMB 組顯著低於 Placebo 組，如圖 8。

進一步觀察 PBMC 中，細胞表面具有 RANK 受體的單核球細胞其 I κ B- α 的變化後發現，兩組的變化趨勢皆與 RANK 相似，同樣呈現出相互消長的現象，但與 baseline 無顯著差異，如圖 9。

過去研究發現，在帶有腫瘤組織的老鼠補充 HMB 後，腫瘤內 NF- κ B 路徑受到抑制，其抑制蛋白 I κ B- α (Nunes et al., 2008) 含量增加，由於 HMB 具有抑制泛素蛋白酶體水解之效用 (Smith, Mukerji, & Tisdale, 2005; Smith, Wyke, & Tisdale, 2004) 所致；然而運動則會促進 NF- κ B 的活性並減少 I κ B- α 的量 (Ho et al., 2005; Ji, Gomez-Cabrera, Steinhafel, & Vina, 2004; Jimenez-Jimenez et al., 2008)。本研究結果發現無論有無補充 HMB，訓練一週後 I κ B- α 皆呈現下降之趨勢，且補充 HMB 組持續下降至訓練期結束，並於第四週結束時顯著低於 Placebo 組，顯示訓練初期，NF- κ B 的活化現象主要受運動刺激所影響，然隨著訓練時間增加，若補充 HMB，則會持續減少 I κ B- α 的水平。PBMC 中 I κ B- α 的含量越低時，其磷酸化形式 pI κ B- α 則會有著較高的水平 (Garcia-Lopez et al., 2007; Jimenez-Jimenez et al., 2008)，然而是否因為 HMB 抑制泛素蛋白酶體水解之作用 (Smith et al., 2005)，導致大量的 pI κ B- α 堆積，則仍有待進一步研究證實。

單核球細胞表面若表現 RANK 蛋白，則可被作為破骨前驅細胞的指標 (Atkins et al., 2006; Nakagawa et al., 1998)，對照本研究結果發現，相較於 Placebo 組，HMB 組 RANK 的先下降再上升，可視為補充 HMB 組初期的破骨細胞生成減少，因其抑制泛素蛋白酶體之作用 (Smith et al., 2005) 所致，對照本研究 I κ B- α 之結果，顯示補充 HMB 後抑制泛素蛋白酶體的作用減少 NF- κ B 的活化，降低破骨細胞的分化與成熟，而為了維持骨代謝平衡，細胞須代償性增加 RANK 表現，以因應破骨細胞成熟的需求。而訓練期第三週 I κ B- α 持續減少，並於第四週組間達顯著差異，為 NF- κ B 除了具有促進細胞的分化與成熟的功能外，亦會促使細胞合成 I κ B- α 蛋白 (Chen & Greene, 2004)，故補充 HMB 後，降低 NF- κ B 的活化，減少其進入細胞核內啟動 I κ B- α 的再生成，造成 HMB 組的 I κ B- α 顯著低於 Placebo 組。進一步分析含有 RANK 單核球細胞內 I κ B- α 的變化量發現，兩組間變化呈現互相鄉長的趨勢，這表示當補充 HMB 抑制下游轉錄因子後，可能會間接影響到細胞膜上 RANK 的表現量。

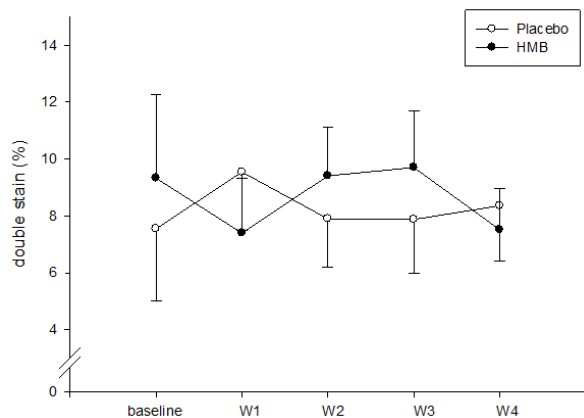


圖 7 (左) 訓練期間單核細胞中 RANK 的變化率。

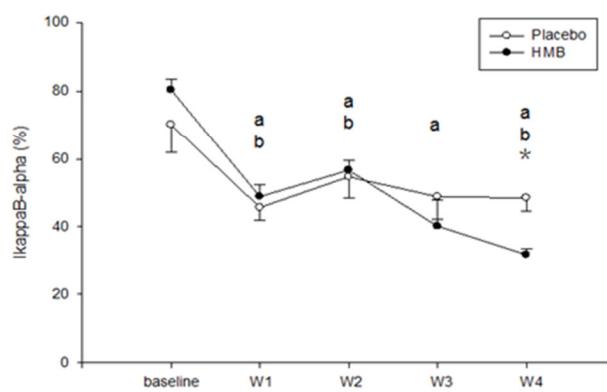


圖 8 (右) 訓練期間單核球細胞內 IκB-α 的變化率。

註：“a”表示 HMB 組與 baseline 相比達顯著差異。

“b”表示 Placebo 組與 baseline 相比達顯著差異。

“*”表示 HMB 組與 Placebo 組相比有顯著差異。

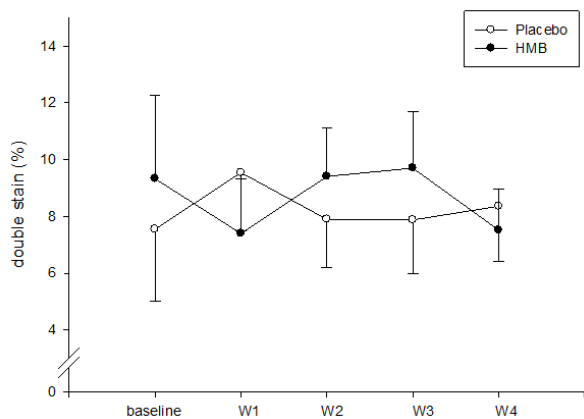


圖 9 訓練期間單核球細胞同時含有 RANK 與 IκB-α 的變化率。

骨質代謝指標之結果

骨合成指標 B-ALP，於補充 HMB 組第一週 (W1) 起即顯著高於 baseline，直至訓練期結束 (W4) 皆如此，Placebo 組則皆無明顯變化，並於第三週 (W3) 發現 HMB 組顯著高於 Placebo 組，如圖 10。骨合成礦化指標 osteocalcin，兩組間呈現相似的變化，前兩週皆無明顯的變化，然 HMB 組於第四週顯著高於 baseline，Placebo 組則於第三週起即顯著高 baseline，如圖 12。至於骨分解指標 beta-crosslaps，HMB 組於四週訓練期之內皆無顯著性的變化，Placebo 組則呈現上升之趨勢，並於第三、四週呈現顯著性上升，兩組間雖無明顯差異，但於第四週兩組間 P 值為 0.081，如圖 11。

由上述結果可以發現，整體而言，HMB 組骨合成指標 B-ALP 與礦化指標 osteocalcin 呈現上升現象，骨分解指標 beta-crosslaps 則無明顯改變；Placebo 組骨合成指標 B-ALP 無明顯變化，骨礦化指標 osteocalcin 有明顯的上升，骨分解指標 beta-crosslaps 則於四週內皆無明顯改變。

動物研究中發現，在剛出生的小羊連續補充 HMB 21 天後，補充 HMB 組的骨骼重量、長度與所能承受的極限強度和最大彈性強度都較控制組顯著為高，且骨合成指標 B-ALP 與 osteocalcin 中也發現明顯較控制組高，骨分解指標 beta-crosslaps 則無明顯差異(Tatara, 2008b)，前者與本研究結果相呼應；後者之變化可能為在長時間、高強度的全身性負重運動後，骨分解指標 ICTP 的顯著上升(Langberg, Skovgaard, Asp, & Kjaer, 2000)，對照本研究中 Placebo 組的骨分解指標 beta-crosslaps 於第三、四週達顯著性上升，以及補充 HMB 後，訓練期內維持一穩定水平現象，證實補充 HMB 有可能具有抑制骨分解之作用。然本研究中 osteocalcin 組間呈現相似的變化，與 Tatara 於剛出生小羊補充 HMB 之結果不同，可能為在負重性訓練中所產生的機械性應力，為促使骨骼礦化作用的主要因素(Pavlin & Gluhak-Heinrich, 2001; Radomisli, Moore, Barrach, Keeping, & Ehrlich, 2001 [ENREF_17](#))。

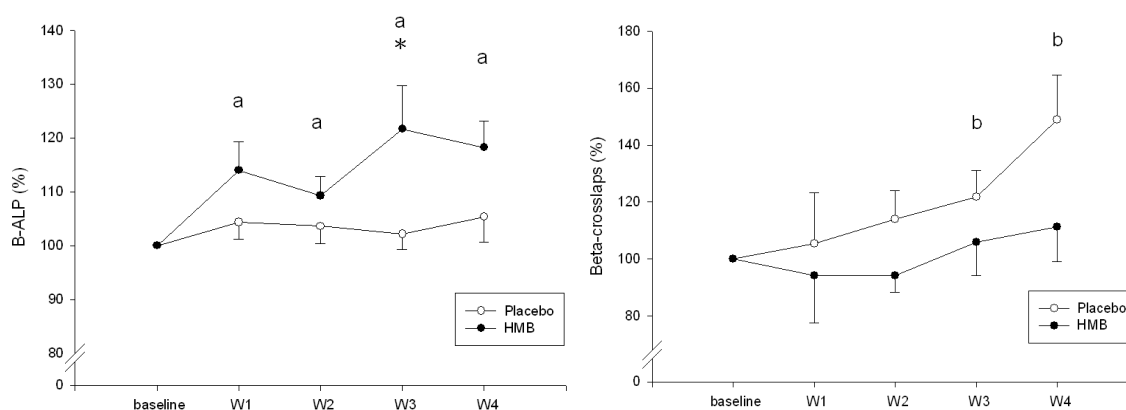


圖 10 (左) 訓練期間骨合成指標 B-ALP 的變化率。

圖 11 (右) 訓練期間骨分解指標 beta-crosslaps 的變化率。

註：“a”表示 HMB 組與 baseline 間達顯著差異。“b”表示 Placebo 組與 baseline 間達顯著差異。“*”表示兩組之間有顯著差異。

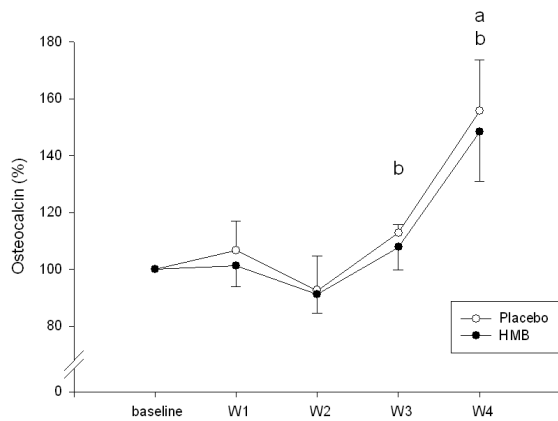


圖 12 訓練期間骨礦化指標 osteocalcin 的變化率。

註：“a”表示 HMB 組與 baseline 間達顯著差異。“b”表示 Placebo 組與 baseline 間達顯著差異。

結論

- (一) 於四週訓練期之中，補充 HMB 後確實對於骨質代謝產生影響，研究結果呼應 Tataru (2008) 等人於動物研究中的結果，補充 HMB 增加骨合成作用。
- (二) 四週訓練期之中補充 HMB 具有降低骨分解作用之功效，補充 HMB 主要會影響單核球細胞內，轉錄因子的訊息傳遞作用，抑制破骨前驅細胞成熟，因而降低破骨細胞的生成，減少骨骼分解作用。
- (三) 適度的減量訓練有助於骨骼的礦化過程，並會提升骨骼的合成與分解速率。

参考文献

- Atkins, G. J., Kostakis, P., Vincent, C., Farrugia, A. N., Houchins, J. P., Findlay, D. M., . . . Zannettino, A. C. (2006). RANK Expression as a cell surface marker of human osteoclast precursors in peripheral blood, bone marrow, and giant cell tumors of bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(9), 1339-1349. doi: 10.1359/jbmr.060604
- Bai, X. C., Lu, D., Liu, A. L., Zhang, Z. M., Li, X. M., Zou, Z. P., . . . Luo, S. Q. (2005). Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblast. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17497-17506. doi: M409332200 [pii]
10.1074/jbc.M409332200
- Barry, D. W., & Kohrt, W. M. (2007). Acute effects of 2 hours of moderate-intensity cycling on serum parathyroid hormone and calcium. *Calcified Tissue International*, 80(6), 359-365. doi: 10.1007/s00223-007-9028-y
- Chen, L. F., & Greene, W. C. (2004). Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(5), 392-401. doi: 10.1038/nrm1368
nrm1368 [pii]
- Garcia-Lopez, D., Cuevas, M. J., Almar, M., Lima, E., De Paz, J. A., & Gonzalez-Gallego, J. (2007). Effects of eccentric exercise on NF-kappaB activation in blood mononuclear cells. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 39(4), 653-664. doi: 10.1249/mss.0b013e31802f04f6
00005768-200704000-00011 [pii]
- Ho, R. C., Hirshman, M. F., Li, Y., Cai, D., Farmer, J. R., Aschenbach, W. G., . . . Goodyear, L. J. (2005). Regulation of IkappaB kinase and NF-kappaB in contracting adult rat skeletal muscle. *American Physiological Society American Journal of Physiology*, 289(4), C794-801. doi: 00632.2004 [pii]
10.1152/ajpcell.00632.2004
- Ji, L. L., Gomez-Cabrera, M. C., Steinhafel, N., & Vina, J. (2004). Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(13), 1499-1506. doi: 18/13/1499 [pii]
10.1096/fj.04-1846com
- Jimenez-Jimenez, R., Cuevas, M. J., Almar, M., Lima, E., Garcia-Lopez, D., De Paz, J. A., & Gonzalez-Gallego, J. (2008). Eccentric training impairs NF-kappaB activation and over-expression of inflammation-related genes induced by acute eccentric exercise in the elderly. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(6), 313-321. doi: S0047-6374(08)00048-1 [pii]
10.1016/j.mad.2008.02.007

- Kim, C. H., You, L., Yellowley, C. E., & Jacobs, C. R. (2006). Oscillatory fluid flow-induced shear stress decreases osteoclastogenesis through RANKL and OPG signaling. *Bone*, 39(5), 1043-1047. doi: S8756-3282(06)00481-9 [pii]
10.1016/j.bone.2006.05.017
- Langberg, H., Skovgaard, D., Asp, S., & Kjaer, M. (2000). Time pattern of exercise-induced changes in type I collagen turnover after prolonged endurance exercise in humans. *Calcified Tissue International*, 67(1), 41-44. doi: 10.1007/s00223001094 [pii]
- Maimoun, L., Manetta, J., Couret, I., Dupuy, A. M., Mariano-Goulart, D., Micallef, J. P., . . . Rossi, M. (2006). The intensity level of physical exercise and the bone metabolism response. *International Journal of Sports Medicine*, 27(2), 105-111. doi: 10.1055/s-2005-837621
- Mouzopoulos, G., Stamatakos, M., Tzurbakis, M., Tsembeli, A., Manti, C., Safioleas, M., & Skandalakis, P. (2007). Changes of bone turnover markers after marathon running over 245 km. *International Journal of Sports Medicine*, 28(7), 576-579. doi: 10.1055/s-2007-964841
- Nakagawa, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., . . . Higashio, K. (1998). RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 253(2), 395-400.
- Noble, B. (2003). Bone microdamage and cell apoptosis. *eCells and Materials Journal* 6, 46-55; discussion 55. doi: vol006a05 [pii]
- Nunes, E. A., Kuczera, D., Brito, G. A., Bonatto, S. J., Yamazaki, R. K., Tanhoffer, R. A., . . . Fernandes, L. C. (2008). Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation reduces tumor growth and tumor cell proliferation ex vivo and prevents cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats by modifying nuclear factor-kappaB expression. *Nutrition Research*, 28(7), 487-493. doi: S0271-5317(08)00107-3 [pii]
10.1016/j.nutres.2008.04.006
- Pavlin, D., & Gluhak-Heinrich, J. (2001). Effect of mechanical loading on periodontal cells. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 12(5), 414-424.
- Radomisli, T. E., Moore, D. C., Barrach, H. J., Keeping, H. S., & Ehrlich, M. G. (2001). Weight-bearing alters the expression of collagen types I and II, BMP 2/4 and osteocalcin in the early stages of distraction osteogenesis. *Journal of Orthopaedic Research* 19(6), 1049-1056. doi: 10.1016/S0736-0266(01)00044-4
- Rong, H., Berg, U., Topping, O., Sundberg, C. J., Granberg, B., & Bucht, E. (1997). Effect of acute endurance and strength exercise on circulating calcium-regulating hormones and bone markers in young healthy males. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 7(3), 152-159.
- Rubin, J., Murphy, T., Nanes, M. S., & Fan, X. (2000). Mechanical strain inhibits expression of

- osteoclast differentiation factor by murine stromal cells. *American Physiological Society American Journal of Physiology*, 278(6), C1126-1132.
- Ruimerman, R., Hilbers, P., van Rietbergen, B., & Huiskes, R. (2005). A theoretical framework for strain-related trabecular bone maintenance and adaptation. *Journal of Biomechanics*, 38(4), 931-941. doi: S0021929004002015 [pii]
10.1016/j.jbiomech.2004.03.037
- Saunders, M. M., Taylor, A. F., Du, C., Zhou, Z., Pellegrini, V. D., Jr., & Donahue, H. J. (2006). Mechanical stimulation effects on functional end effectors in osteoblastic MG-63 cells. *Journal of Biomechanics*, 39(8), 1419-1427. doi: S0021-9290(05)00180-6 [pii]
10.1016/j.jbiomech.2005.04.011
- Smith, H. J., Mukerji, P., & Tisdale, M. J. (2005). Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by {beta}-hydroxy-{beta}-methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. *Cancer Research*, 65(1), 277-283. doi: 65/1/277 [pii]
- Smith, H. J., Wyke, S. M., & Tisdale, M. J. (2004). Mechanism of the attenuation of proteolysis-inducing factor stimulated protein degradation in muscle by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. *Cancer Research*, 64(23), 8731-8735. doi: 64/23/8731 [pii]
10.1158/0008-5472.CAN-04-1760
- Tang, L., Lin, Z., & Li, Y. M. (2006). Effects of different magnitudes of mechanical strain on Osteoblasts in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(1), 122-128. doi: S0006-291X(06)00676-0 [pii]
10.1016/j.bbrc.2006.03.123
- Tatara, M. R. (2008b). Neonatal programming of skeletal development in sheep is mediated by somatotrophic axis function. *Experimental Physiology*, 93(6), 763-772.
- West, S. L., Scheid, J. L., & De Souza, M. J. (2009). The effect of exercise and estrogen on osteoprotegerin in premenopausal women. *Bone*, 44(1), 137-144. doi: S8756-3282(08)00774-6 [pii]
10.1016/j.bone.2008.09.008
- Ziegler, S., Niessner, A., Richter, B., Wirth, S., Billensteiner, E., Woloszczuk, W., . . . Geyer, G. (2005). Endurance running acutely raises plasma osteoprotegerin and lowers plasma receptor activator of nuclear factor kappa B ligand. *Metabolism*, 54(7), 935-938. doi: S002604950500096X [pii]
10.1016/j.metabol.2005.02.009

國科會補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：102年10月31日

計畫編號	NSC 101-2410-H-028 -004 -		
計畫名稱	補充 β -羥基- β -甲基丁酸與舉重訓練對未受訓練者骨骼代謝之交互作用以及分子機轉探討		
出國人員姓名	洪 暉	服務機構及職稱	國立臺灣體育運動大學
會議時間	102年6月27日 至 102年6月30日	會議地點	
會議名稱	(中文)歐洲運動科學學會年會 (英文) 18th annual Congress of the EUROPEAN COLLEGE OF SPORT SCIENCE		
發表題目	Acute effect of HMB supplement of bone modulating cytokines and downstream protein expression: A pilot study		



**18th annual Congress of the
EUROPEAN COLLEGE OF SPORT SCIENCE
UNIFYING SPORT SCIENCE**

26th - 29th June 2013, Barcelona - Spain

Hosted by the National Institute of Physical Education of Catalonia (INEFC)



European College of Sport Science e.V.

Am Sportpark Müngersdorf 6
50933 Cologne
GERMANY

VAT-ID: DE251715668 - St.Nr.: 223/5905/0216

register of associations: VR12508

Barcelona, 04.07.2013

Letter of acceptance

To

Name: **Wei**
Surname: **Hung**
Institution: National Taiwan University of physical education and Sport
Department: Exercise and Health Science
Address: 16, sec 1 Shun-Shin road
40404 Taichung, Taiwan
Account-ID: **3733**
Registration category: **Non ECSS Member (Registration incl. Membership 2013*)
incl. Book of Abstracts as hardcopy (20 €)**
Amount: **490 €**

To whom it may concern

We hereby confirm that the below listed abstract(s) is/are accepted for presentation at the 18th annual Congress of the European College of Sport Science – ECSS Barcelona 2013.

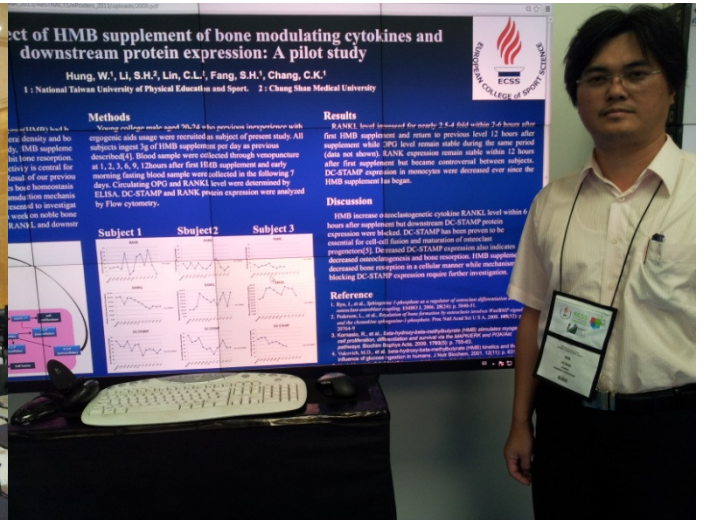
Submitted abstracts

Abstr-ID: 2009, Presentation format: Mini-Oral , Session name: PP-PM28 - Nutrition [NU] 2
Title: Acute effect of HMB supplement of bone modulating cytokines and downstream protein expression: A pilot study
Authors: Hung, W.1, Li, S.H.2, Lin, C.L.2, Fang, S.H.1, Chang, C.K.1
Institution: 1: National Taiwan University of Physical Education and Sport. 2: Chung Shan Medical University
Date: 27.06.2013, 01.01, Lecture room: Sala d'Actes, No: 4

Supported by *SporTools GmbH* - Data management in sports



歐洲國家會議廳多半是羅馬式建築或巴洛克式建築，這次 ECSS 年會臺灣學者參加者眾多，報到實在會場門口巧遇母校師長林正常教授與劉有德教授



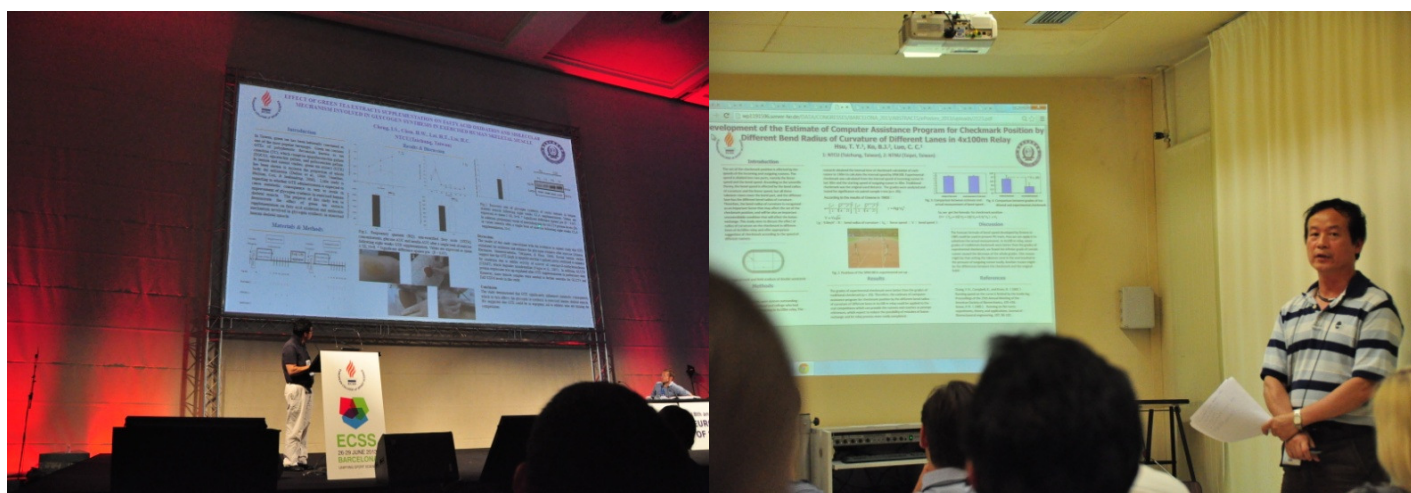
以往的觀念，投稿海報發表，應該就是站在海報前面等著觀眾提問，這是第二次參加 ECSS 年會，雖然跟其他研討會不一樣，ECSS 會要求海報發表者要進行兩分鐘的口頭報告，既然有了第一次經驗，也覺得尚可應付，只是在接到通知的時候，poster 全都改成了 mini-Oral present?? 雖然事先已經知道，歐洲各國環保高漲，對於無紙化的措施執行的十分徹底，事先也請教歐洲國家歸國學人巫錦霖教授，得知所有的海報都是以電子看板的方式呈現，但是 mini-Oral present 的要求卻是第一次遇到，完全茫無頭緒，等到達會場，對照發表場次，才發現原來竟然是再發表場次才發現所謂的 mini-Oral present 竟是在可容納四百餘人的議會廳。

其他國家的學者或許因為早已見多識廣，或者是使用語言已經十分熟悉，看起來總是一派氣定神閒、穩若泰山的模樣，而非英語系國家的亞洲學者則是較為嚴肅，我，更是戰戰兢兢的發表，因為僅有兩分鐘時間的 mini-oral，要敘述整個完整的故事，其實是比十五分鐘的正式口頭發表，還更有壓力。會後聽眾提問，濃厚的歐洲腔英文，我一直反映不及，索性主持人立刻以純正的英式英文再幫我重述一次提問，方能進行回答。

湊巧與台灣師大鄭景峰教授同場發表，鄭教授台風穩健。



此次同行共計七人，台中教育大學許太彥教授、李炳昭教授、李國維教授屬於人文科學領域，發表的場地規模較小，三位教授均賣力演出，但事後都覺得聽眾不夠多，不過癮，而程一雄教授因發表議題符合本次研討會主軸，因而被安排在可容納近七百人的主會議廳發表，程教授不疾不徐，表達順暢穩健，頗獲與會學者與主持人好評。



二、與會心得

雖然常常在跟學生強調語言能力很重要，英文是世界共通語言，由其實學術社會更是如此，但發現自己雖自詡語言能力尚佳，在面對眾多學者之際，尚未能夠達到揮灑自如、精簡用字，於兩分鐘內完整清楚呈現一個研究的狀態，仍有待加強，而各國學者的口音也是我亟待適應的項目。

另者，由於網路、電子期刊的蓬勃發展，雖於國內也可即時接收際學者的研究成果，與時俱進的更新研究知識，並將新知應用於本人所授的課程，諸如：生物化學、運動傷害、解剖生理學等等，但面對面的與國際學者交換意見，更可即時的腦力激盪，擦出更多的學術火花，本次發表，台下聆聽的學者及提出寶貴的意見，對我後續的研究頗有助益。

三、發表論文全文或摘要

Acute effect of HMB supplement of bone modulating cytokines and downstream protein expression:
A pilot study

Introduction

Dietary supplement of β -hydroxy- β -methylbutyrate(HMB) had been proven to increase total bone mass, bone mineral density and bone strength in animal studies. In our previous study, HMB supplement not only increase bone formation but also inhibit bone resorption. The balance between osteoclast and osteoblast activity is central for maintaining the integrity of bone homeostasis. Result of our previous study indicates that HMB supplement regulates bone homeostasis in an un-coupled manner while the molecule transduction mechanism remains unknown. Therefore we designed presented to investigate the acute effect of HMB supplement within a week on noble bone modulating cytokines osteoprotegerin (OPG), RANKL and downstream protein DC-STAMP expression.

Methods

Young college male aged 20-24 who previous inexperience with ergogenic aids usage were recruited as subject of present study. All subjects ingest 3g of HMB supplement per day as previous described[1]. Blood sample were collected through venopuncture at 1, 2, 3, 6, 9, 12hours after first HMB supplement and early morning fasting blood sample were collected in the following 7 days. Circulating OPG and RANKL level were determined by ELISA. DC-STAMP and RANK protein expression were analyzed by Flow cytometry.

Results


RANKL level increased for nearly 2.5-5 fold within 2 hours after first HMB supplement and return to previous level 11 hours after supplement while OPG level remain stable during the same period. RANK expression increased within 2 hours after first supplement and remains higher than baseline level until 6th day. DC-STAMP expression was decreased 24hours after supplement.

Discussion

HMB increase osteoclastogenetic cytokine RANKL level within hours after supplement but downstream DC-STAMP protein expression were blocked. DC-STAMP has been proven to be essential for cell-cell fusion and maturation of osteoclast progenitors[2]. Decreased DC-STAMP expression also indicates decreased osteoclastogenesis and bone resorption. HMB supplement decreased bone resorption in a cellular manner while mechanisms of blocking DC-STAMP expression require further investigation.

References


1. Vukovich, M.D., et al., beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) kinetics and the influence of glucose ingestion in humans. *J Nutr Biochem*, 2001. 12(11): p. 631-639.
2. Yagi, M., et al., DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med*, 2005. 202(3): p. 345-51.



Acute effect of HMB supplement of bone modulating cytokines and downstream protein expression: A pilot study

Hung, W.¹, Li, S.H.², Lin, C.L.², Fang, S.H.¹, Chang, C.K.¹

1 : National Taiwan University of Physical Education and Sport. 2 : Chung Shan Medical University



Introduction

Dietary supplement of β -hydroxy- β -methylbutyrate(HMB) had been proven to increase total bone mass, bone mineral density and bone strength in animal studies. In our previous study, HMB supplement not only increase bone formation but also inhibit bone resorption. The balance between osteoclast and osteoblast activity is central for maintaining the integrity of bone homeostasis. Result of our previous study indicates that HMB supplement regulates bone homeostasis in an un-coupled manner while the molecule transduction mechanism remains unknown. Therefore we designed presented to investigate the acute effect of HMB supplement within a week on bone modulating cytokines osteoprotegerin (OPG), RANKL and downstream protein DC-STAMP expression.

Methods

Young college male aged 20-24 who previous inexperience with ergogenic aids usage were recruited as subject of present study. All subjects ingest 3g of HMB supplement per day as previous described[4]. Blood sample were collected through venopuncture at 1, 2, 3, 6, 9, 12hours after first HMB supplement and early morning fasting blood sample were collected in the following 7 days. Circulating OPG and RANKL level were determined by ELISA. DC-STAMP and RANK protein expression were analyzed by Flow cytometry.

Results

RANKL level increased for nearly 2.5-4 fold within 2-6 hours after first HMB supplement and return to previous level 12 hours after supplement while OPG level remain stable during the same period (data not shown). RANK expression remain stable within 12 hours after first supplement but became controversial between subjects. DC-STAMP expression in monocytes were decreased ever since the HMB supplement has began.

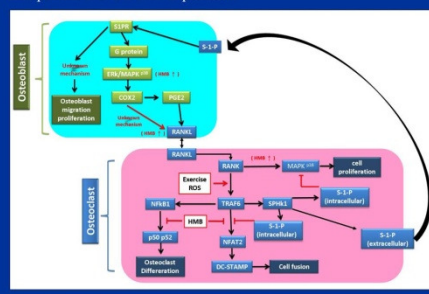


Fig. 1 Schema of osteoclastogenesis modulation by osteoblast through RANKL and osteoclastogenesis by osteoclast through S1P. This diagram was first published by Ryu *et al.* [1] and modified according to several publication about the effect of HMB supplement on bone metabolism and regulation of bone formation by osteoclast through S1P[2, 3]

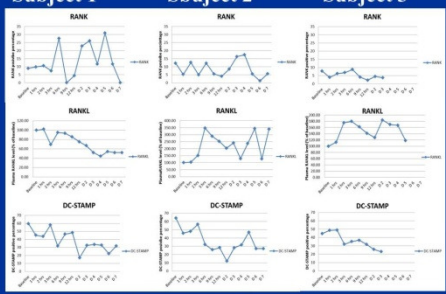


Fig. 2 Plasma RANKL level (data shown as percentage of baseline), RANK, and DC-STAMP expression in PBMC (data shown as percentage of positive staining)

Discussion

HMB increase osteoclastogenetic cytokine RANKL level within 6 hours after supplement but downstream DC-STAMP protein expression were blocked. DC-STAMP has been proven to be essential for cell-cell fusion and maturation of osteoclast progenitors[5]. Decreased DC-STAMP expression also indicates decreased osteoclastogenesis and bone resorption. HMB supplement decreased bone resorption in a cellular manner while mechanisms of blocking DC-STAMP expression require further investigation.

Reference

1. Ryu, J., et al., *Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling*. *EMBO J*, 2006. 25(24): p. 5840-51.
2. Pedersen, L., et al., *Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(52): p. 20764-9.
3. Komasio, R., et al., *Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) stimulates myogenic cell proliferation, differentiation and survival via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1793(5): p. 755-63.
4. Vukovich, M.D., et al., *beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) kinetics and the influence of glucose ingestion in humans*. *J Nutr Biochem*, 2001. 12(11): p. 631-639.
5. Yagi, M., et al., *DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells*. *J Exp Med*, 2005. 202(3): p. 345-51.

Contact : hongweiarcher@hotmail.com, hongwei@ntupes.edu.tw

攜回資料名稱及內容

1. Proceeding of 18th Annual Congress of the EUROPEAN COLLEGE OF SPORT
SCIENCE ISBN : 978-84-695-7786-8
2. ASPETAR Sports Medicine Journal First issue
ASPETAR Sports Medicine Journal Volumn 2 issue 3
ASPETAR Sports Medicine Journal Volumn 2 issue 2

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/10/28

國科會補助計畫	計畫名稱: 補充 β -羥基- β -甲基丁酸與舉重訓練對未受訓練者骨骼代謝之交互作用以及分子機轉探討
	計畫主持人: 洪暉
	計畫編號: 101-2410-H-028-004- 學門領域: 運動生理學
無研發成果推廣資料	

101 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：洪暉		計畫編號：101-2410-H-028-004-				計畫名稱：補充β-羥基-β-甲基丁酸與舉重訓練對未受訓練者骨骼代謝之交互作用以及分子機轉探討	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	2	2	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	2	2	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>林家成，陳思翰，王信淵，張振崗，洪暉（民一百年）。補充HMB對舉重選手骨質代謝變化之影響。2011 體育運動學術團體聯合年會暨學術研討會，口頭發表，台北。優秀論文獎</p>
--	---

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與（閱聽）人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

本研究主要發現於為期四週訓練期的重量訓練期之中，補充 HMB 後確實對於骨質代謝產生影響，而每天給予 3g 的補充 HMB 則會有效的降低骨分解作用，並進一步增加骨基質生成。補充 HMB 主要會影響單核球細胞內，轉錄因子的訊息傳遞作用，抑制破骨前驅細胞成熟，因而降低破骨細胞的生成，減少骨骼分解作用。其他學者的研究亦指出，在重量訓練的訓練期中，補充 HMB 後提高 GH 與 IGF-1 的生成，而促進造骨細胞的活性增加，進一步提升骨合成作用，其結果與本研究之發現互相呼應。此外本研究亦發現，適度、適時的減輕訓練份量，有助於加速骨骼的礦化過程，維持骨骼組織堅韌的強度。

參照先前研究之前研究結果發現，本研究為極少數探討人體連續補充 HMB 後骨質代謝的變化，研究結果與 Tatara (2008) 等人於動物研究中的結果互相呼應，補充 HMB 確實具有增加骨合成作用，並降低骨分解作用之功效，並且這與由負重運動所引發對骨質的效益並不衝突，補充 HMB 主要作用範圍在於刺激骨質增生與減少骨質分解，而尚須配合負重性運動訓練方可刺激骨骼礦化之過程，完備整個骨骼組織代謝歷程。考量過去研究中，選手在經過大量超負荷的訓練後，容易引起的疲勞性骨折現象(Sadideen & Swaminathan, 2004)，每日補充 3g HMB 可能有助於加強骨質的合成作用，修補因過度訓練所引發的骨質流失現象，從而達到預防疲勞性骨折等運動傷害之目的。