

國立臺灣體育運動大學  
National Taiwan University of Physical  
Education and Sport

運動健康科學學系碩士班

碩士學位論文

舉重運動員補充 HMB 對骨質代謝之影響

EFFECTS OF  
BETA-HYDROXY-BETA-METHYLBUTYRATE  
SUPPLEMENT ON BONE METABOLISM IN  
WEIGHTLIFTERS



研究生：林家成

指導教授：洪 暉 教授

中華民國 101 年 1 月

論文題目：舉重運動員補充 HMB 對骨質代謝之影響

總頁數：120

院校所組別：國立臺灣體育運動大學運動健康科學學系碩士班

畢業時間及提要別：100 學年度第 1 學期碩士論文提要

研究生：林家成

指導教授：洪暉博士

## 中文摘要

於長時間的訓練過程中，運動員經常藉由補充各式各樣的營養補充品以提升訓練效果，並修補恢復運動時所受到的各種傷害，進而防範可能發生的重大運動傷害，如疲勞性骨折等須長時間復原的傷害。 $\beta$ -羥基- $\beta$ -甲基丁酸(beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, HMB)目前已被廣泛用來提升肌力、增加骨骼肌含量與提升疲勞恢復等，近年來的研究則指出，HMB 可能具有影響骨質代謝之作用，因此本研究欲探討舉重運動員在長期訓練中補充 HMB 後，對骨質代謝產生的影響；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。自國立臺灣體育運動大學舉重代表隊招募 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，並紀錄飲食狀況與填寫運動回顧問卷，訓練強度根據由教練所指示之訓練計畫，每週進行採血。分析血液中骨調控細胞激素 OPG (osteoprotegerin) 與 sRANKL (soluble receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand)，骨骼代謝指

標 B-ALP(bone-specific alkaline phosphatase)、osteocalcin 與 beta-crosslaps，血液荷爾蒙 PTH(parathyroid hormone)與 cortisol，血液單核球中的細胞蛋白 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 receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B (RANK)。結果顯示，骨合成指標 B-ALP 顯著且持續上升至訓練期結束，且於第三週組間達顯著差異；osteocalcin 則兩組皆呈現明顯上升之趨勢，然組間並無明顯差異；骨分解指標 beta-crosslaps，HMB 組四週皆無明顯變化，placebo 組則呈現持續上升之趨勢，並於後兩週達顯著；PTH 兩組於後兩週皆明顯的上升，然組間並無顯著差異；cortisol 於 HMB 組第一週達顯著上升後，隨後恢復至訓練前水平；sRANKL 兩組呈現出不同的變化趨勢；OPG 與訓練量呈現出相似的變化趨勢，RANK 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- $\alpha$  兩組自第一週起即顯著的下降，placebo 組維持第一週水平至訓練結束，而 HMB 組則持續下降至訓練期結束，並於第四週兩組達顯著性差異。本研究主要發現，舉重選手於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；另一方面能有效減少，由運動刺激所造成的骨質分解作用。

關鍵字： $\beta$ -羥基- $\beta$ -甲基丁酸、骨質代謝、負重性運動

## **Abstract**

Recently, beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) is one of the dietary supplements promoted to enhance gains in strength and lean body mass associated with resistance training. Besides, some animal studies indicate that HMB may have the relationship with bone metabolic. Thus this research aims to discuss the effects of HMB supplement on bone biomarker in weightlifters during the training session. Sixteen healthy male weightlifters were recruited from university weightlifting team, and divided into two groups. During the training session, all subjects were asked to follow the training program previously designed by coach. They were took 3(g) HMB daily, and fasting blood sample was taken once a week. Bone cytokine OPG and RANKL, and bone specific biochemical markers including osteocalcin, beta-corsslaps, , bone-specific alkaline phosphatase (B-ALP), and hormones parathyroid hormone (PTH) and cortisol, and the expression of the osteoclastogenesis-related protein RANK and I $\kappa$ B- $\alpha$  levels were analyzed to evaluate the bone metabolic status. The results show that bone formation markers osteocalcin continuously increased, accompanied with increased bone resorption marker beta-corsslaps and reached a significant level in the last two weeks, and PTH had the similar tendency. In addition, I $\kappa$ B- $\alpha$  decreased significantly in the first week and maintained its level until the end of the training. However in group HMB, B-ALP was significantly higher in the third week and I $\kappa$ B- $\alpha$  significantly lower in the fourth week. Besides, sRANKL and beta-crosslaps appeared have a different tendency in the training session. This research found out that those weightlifters who took 3g HMB daily during the four-week training period could additionally increase the bone formation rate. In addition, it could effectively inhibit the bone resorption rate caused by training.

Keywords: beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, bone metabolic, weight-bearing exercise

## 誌謝

本論文承蒙指導教授洪暉博士指點、批閱與斧正，以及這些年來的諄諄教誨，方得以順利完成，在此致上由衷的謝意與感謝。亦承蒙張振崗教授與林志立教授撥冗校閱與斧正，以及方世華教授、巫錦霖教授與邱彥成老師於研究生涯中，給予我各方面的教導與指正，特置卷首，以感師恩。

時光荏苒，自大學至研究所畢業，從開始作實驗到撰寫論文完畢，過程中受到許多人的幫助與鼓勵，讓我可以一路咬著牙撐了過來。感謝洪老師創立研究小組，使研究的過程中有著欣樺、韋靜、陳儀、玫蕙、每每、予親、竹品學姊的指導與陪伴，還有大俠、怡平、君瑋的相互扶持，並且得到昭寬、滷蛋、鈺純、軒浩、思翰、雲珊、婷婷、悅玲等學弟妹的幫助，使得這段研究生活並不孤單。特別感謝張振崗老師提供一個這麼完善的實驗室，讓我可以就近學會並完成各項實驗，還有熱心的運科助理季洧姐、佩玉姐、一凡姐、維修姐、玉芳姐還有後來升格的玫蕙姐，幫我解決許多實驗上的困難，和採集受試者的樣本。以及曾經一起在運科打拼過的家銘、鴻鈞、志暉、翰斯、玫璇、沂欣、羽涵、淳方、名穗、芳喬、忠志、雅娟、煒祥，難以想像若運科生涯中缺少你們，那將會失去多少光彩。這本論文的完成，除上述許多人的指教、幫忙、陪伴與鼓勵外，仍要謝謝舉重隊的選手們的大力配合，奉獻你們的熱血與汗水，與王信淵教練的支持和理解。最後，還要感謝我的父母，如果沒有你們的支持與包容，也不會有今天的這一刻。

離開學校的時間已經開始倒數，雖然已記不清大學入學

時的生澀與稚嫩，但回首這段時光，有苦、有酸、有澀亦有甜，經歷艱辛的過程後，所得到的果實是最甜美不過。未來我將帶著各位師長的教誨與朋友的祝福踏出校門，邁入人生的下一個篇章。

林家成 謹誌

中華民國 101 年 1 月

## 目錄

中文摘要 .....	I
Abstract .....	III
誌謝 .....	IV
目錄 .....	VI
表目錄 .....	VIII
圖目錄 .....	IX
第壹章 緒論 .....	1
第一節 研究背景 .....	1
第二節 研究目的 .....	3
第三節 研究假設 .....	3
第貳章 文獻探討 .....	4
第一節 骨質代謝機制 .....	4
第二節 運動中骨質代謝的機制 .....	10
第三節 關於 HMB .....	16
第四節 補充 HMB 對骨質的影響 .....	22
第五節 HMB 對造、破骨細胞生成的影響 .....	24
第六節 本章總結 .....	33
第參章 研究方法 .....	35
第一節 實驗樣本的來源及控制 .....	35
第二節 實驗設計 .....	35
第三節 實驗流程 .....	36
第四節 血液樣本採集 .....	37
第五節 血液分析與方法 .....	37

第六節 細胞蛋白分析 .....	42
第七節 資料處理與統計分析 .....	45
第肆章 結果 .....	46
第一節 受試者基本資料 .....	46
第二節 訓練量與肌肉損傷指標 .....	46
第三節 單核細胞表面 RANK 與細胞內 I $\kappa$ B- $\alpha$ 生成結果 .....	46
第四節 骨質代謝指標之結果 .....	47
第五節 骨質代謝相關荷爾蒙之結果 .....	48
第六節 骨調控蛋白之結果 .....	48
第伍章 討論 .....	49
附錄：單週訓練內容 .....	102

## 表目錄

表 1 受試者基本資料 .....	105
-------------------	-----

## 圖目錄

圖 1	實驗流程圖。	106
圖 2	訓練期間每週訓練量。	107
圖 3	訓練期間肌肉損傷指標 LDH 的變化率。	108
圖 4	訓練期間肌肉損傷指標 CK 的變化率。	109
圖 5	訓練期間單核細胞中 RANK 的變化率。	110
圖 6	訓練期間單核球細胞內 I $\kappa$ B- $\alpha$ 的變化率。	111
圖 7	訓練期間單核球細胞同時含有 RANK 與 I $\kappa$ B- $\alpha$ 的變化率。	112
圖 8	訓練期間骨代謝指標 B-ALP 的變化率。	113
圖 9	訓練期間骨代謝指標 osteocalcin 的變化率。	114
圖 10	訓練期間骨代謝指標 beta-crosslaps 的變化率。	115
圖 11	訓練期間骨代謝相關荷爾蒙 PTH 的變化率。	116
圖 12	訓練期間骨代謝相關荷爾蒙 cortisol 的變化率。	117
圖 13	訓練期間骨調控蛋白 sRANKL 的變化率。	118
圖 14	訓練期間骨調控蛋白 OPG 的變化率。	119
圖 15	運動與 HMB 對於骨質代謝之交互作用。	120

# 第壹章 緒論

## 第一節 研究背景

選手透過經年累月的練習，不斷鍛鍊體力與技巧以求更高的運動表現，而長時間高強度的運動訓練下，若無適當的休息，可能會因為沒有足夠的恢復時間，造成疲勞的累積，進而造成疲勞性傷害，如疲勞性骨折或非創傷性骨折。高負荷性的耐力運動對於骨組織有著負面影響(Sadideen & Swaminathan, 2004)，有證據指出骨質的流失量和每週運動量呈現正向相關(Stewart & Hannan, 2000)。而近年來， $\beta$ -羥基- $\beta$ -甲基丁酸(beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, HMB)已被廣泛用來防止體重流失、減少骨骼肌損傷、增加骨骼肌和力量以及提升運動表現的營養補充劑(Wilson, Wilson, & Manninen, 2008)，部分動物研究中也指出補充 HMB 具有加速骨質代謝，以及增加骨骼形態和機械性質的特性(Tatara, Sliwa, & Krupski, 2007)。

運動增能劑(ergogenic aid)的使用由來已久，運動選手亦經常藉由補充各類營養品，以增加運動表現、加速疲勞恢復、改善身體組成以及體重控制等應用。部分增補劑因為含有類固醇(steroids)和麻黃鹼(ephedrine)，對身體造成負面影響，甚至造成運動員死亡，已經被國際禁藥組織(World Anti-Doping Agency, WADA)列為運動禁藥，而合法使用之增補劑，目前已證實過量攝取咖啡因對骨骼組織會產生不良的影響，而過量補充蛋白質對骨骼流失的效果也已經獲得證實，補充特定氨基酸對於增長肌肉、增進運動能力的效果雖

然顯著，但對於骨骼組織的作用卻還有待商榷。目前單靠骨質掃描，無法有效檢測出短期內骨質的微小變化。若藉由檢測骨質生化指標或荷爾蒙的改變，來觀察骨質代謝之變化，可快速瞭解營養補充劑對骨質代謝的作用情形。

無論是長期或短期的訓練，規律負重運動對於骨骼益處已被證實，然而仍少有相關研究指出於訓練期間給予 HMB 後，骨質代謝是否產生變化。HMB 目前僅於動物實驗中證實具有促進骨質生長，增加骨質代謝作用，於人體中尚無對於骨質進行相關研究，若能藉由檢測骨骼相關代謝指標，並研究人體中造破、骨細胞的生成是否受到 HMB 的影響，一方面可迅速瞭解 HMB 對於骨質代謝的影響外，另一方面更可解釋其骨質代謝的變化機轉。

## 第二節 研究目的

本研究將探討在運動訓練狀況下使用運動增能劑 HMB 對於骨質代謝所產生的影響。

- 一、探討舉重運動員於訓練週期中補充 HMB 後，對其骨質代謝的變化情況。
- 二、舉重運動訓練與補充 HMB 對骨質代謝作用之交互作用。

## 第三節 研究假設

- 一、高負重的訓練量會增加骨骼調控蛋白與骨周轉率，並促進骨調控荷爾蒙的分泌。
- 二、補充 HMB 的舉重運動員與控制組相比
  - (一)於四週訓練期中，骨代謝指標 B-ALP、osteocalcin 和 beta-crosslaps 具有更顯著的變化。
  - (二)於四週訓練期中，骨調控蛋白 sRANKL 與 OPG 會有不同的變化。
  - (三)於四週訓練期中，骨代謝相關荷爾蒙不會有明顯的差異。
  - (四)於四週訓練期中，PBMC 內的 RANK 與 I $\kappa$ B- $\alpha$  會有不同的變化。

## 第貳章 文獻探討

### 第一節 骨質代謝機制

骨骼主要功能是支撐我們的身體，保護我們體內重要器官及骨髓，並具有新陳代謝及造血等功能，為體內鈣離子與磷酸鹽等重要離子的儲藏地，維持著體內離子的恆定。骨骼主要藉由兩種細胞的交互作用，不斷的進行骨質重塑作用 (bone remodeling)，一種是破骨細胞 (osteoclast)，此種細胞位於硬骨上，與之結合緊密，並分泌酸性物質與酵素分解骨骼，形成中空的孔道，接著造骨細胞分泌膠原蛋白質 (collagen)，形成網狀結構，使磷酸鈣開始於其沉積，蛋白質與磷酸鈣結合，重新建構成一有韌性且堅硬的骨骼結構。另一種是造骨細胞 (osteoblast)，造骨細胞可分泌膠原質，且其有機成分為骨骼的主要組成。

#### 一、骨重塑作用

成人骨骼藉由破骨細胞及造骨細胞於骨骼所產生的協調，持續地進行破壞與生成的作用，並維持在一個動態平衡狀態，亦隨著身體活動的刺激與生理功能上需求而不斷的成長變化。骨骼包含二部分：緻密骨 (cortical bone) 與疏鬆骨 (cancellous bone)，在重塑過程中，破骨細胞會在緻密骨與疏鬆骨表面形成侵蝕溝槽，隨後由造骨細胞貼附於受侵蝕區，重新填入骨基質礦物化形成新骨骼，使骨質量維持於一動態平衡 (Seibel, 2005)。

### (一) 造骨細胞

當於骨質重建時期，骨髓中的骨前驅細胞 (osteoprogenitor cells) 於不同階段分別會增生分化，形成不同的細胞形態。最初由骨髓腔內之間葉細胞 (mesenchymal cells) 的增生與分化，形成造骨前驅細胞 (preosteoblasts)，隨後成熟為造骨細胞。在造骨前驅細胞時期，細胞會分泌第一型膠原蛋白 (type I collagen)，因此稱為生長時期 (growth phase)，此時期細胞進行快速分裂，且細胞核較大且圓。而此時期造骨前驅細胞會接受多種激素刺激，如副甲狀腺素 (parathyroid hormone, PTH)、轉化生長因子  $\beta$  (transforming growth factor, TGF- $\beta$ )、維他命  $D_3$  (1,25(OH) $D_3$ ) 和介白素一型 (interleukin-1, IL-1) 等刺激而增生。當造骨前驅細胞逐漸成熟為造骨細胞時，造骨細胞會分泌部分生長因子，如：血小板衍生生長因子 (platelet-derived growth factors, PDGF) 和血管內皮生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等，因而具有刺激自分泌 (autocrine) 之作用。此一時期亦稱為骨基質成熟期 (matrix maturation)，所分泌合成的骨特異性鹼性磷酸酶 (bone-specific alkaline phosphatase, B-ALP) 業已被廣泛用來做為驗證此一時期的重要生化指標。隨後造骨細胞進入分化末期，特化為骨前驅細胞 (preosteocyte)，此時細胞核逐漸扁平，細胞逐漸使骨礦物鈣離子與磷酸根離子開始沉積，進行骨質礦化 (mineralization)，稱為礦化時期，此時造骨細胞會分泌骨鈣素 (osteocalcin)。最終，骨前驅細胞形成骨細胞，細胞核逐漸扁平至原有的 1/10，且逐步凋亡。

(apoptosis)(Harada & Rodan, 2003; Stein, Lian, Stein, Van Wijnen, & Montecino, 1996)。

## (二) 破骨細胞

破骨細胞為一種多核細胞，含有 2—50 甚至更多個細胞核，是由骨髓中的造血幹細胞(hematopoietic stem cell)所分化而來，並藉由將能夠分化形成破骨細胞的前驅細胞釋放至循環之中，使無論在骨骼表面或骨髓之中皆可生成破骨細胞。破骨前驅細胞分化為成熟之破骨細胞時，需藉由細胞激素 M-CSF(Macrophage-Colony Stimulating Factor)、受體活化核因子  $\kappa$ B 配體蛋白(Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand, RANKL)、腫瘤壞死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和 IL-1 等刺激分化成單核破骨前驅細胞(prostoclast)，再藉由細胞融合(fusion)的過程形成多核破骨前驅細胞，隨後分化為具有蝕骨能力之成熟破骨細胞。這過程多次會經由 RANKL 刺激受體活化核因子  $\kappa$ B 蛋白(Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B, RANK)進行訊息的傳遞，調控破骨細胞的生成，而成熟的破骨細胞可因 RANK 所啟動的訊息傳導路徑，進而減少破骨細胞凋亡(adoposis)速度與機率(Lacey et al., 1998)。當破骨細胞於骨表面形成骨侵蝕的區域，會分泌釋放出氫離子與抗酒石酸-酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)，營造酸性環境，使鈣離子與磷酸根離子釋放於血液中，導致骨侵蝕(Teitelbaum, 2000)。

## 二、骨保護素 OPG/受體活化核因子 $\kappa$ B 配體蛋白 RANKL 交互作用

骨質代謝的系統中，骨保護素 (osteoprotegerin, OPG) 和 RANKL 的交互作用，不僅是骨重塑過程中造骨與破骨細胞之間的相互作用，更可調控破骨細胞的生成機制，而體內許多荷爾蒙、細胞激素和生長因子亦藉由影響 OPG 和 RANKL 的分泌，調節骨骼再吸收作用 (Hofbauer, Gori, et al., 1999; Hofbauer, Khosla, et al., 1999)。有學者發現當破骨細胞生成與活化受到抑制後，其 RANKL/OPG 之比值會呈現出下降的現象 (Boyle, Simonet, & Lacey, 2003)。

### (一) OPG

OPG 又被稱為破骨細胞生成抑制因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF)，為腫瘤壞死因子家族 (tumor necrosis factor) 之受體成員，並能夠抑制破骨細胞生成之細胞激素 (Schoppet, Preissner, & Hofbauer, 2002)。OPG 與 RANK 來自相同來源 (homolog)，且於造骨或基質細胞中也會和 RANKL 相結合而作用，因而減少 RANKL 刺激 RANK 所誘發的破骨細胞生成程序。有研究指出，OPG 的過度表現，會導致老鼠產生骨硬化症 (osteopetrosis)，但是若去除 OPG 的基因表現，則會使老鼠提高骨質疏鬆的現象，增加骨折的風險 (Simonet et al., 1997; Wagner & Karsenty, 2001)。

## (二) RANKL

RANKL 又被稱為腫瘤壞死因子相關之活化誘導細胞激素 (TNF-related activation-induced cytokine, TRANCE)、骨保護素受體 (osteoprotegerin ligand, OPGL) 或破骨細胞分化因子 (osteoclast differentiation factor, ODF)，為骨質代謝過程中非常重要的細胞激素。會於造骨細胞表面所分泌 (Kearns, Khosla, & Kostenuik, 2008)，且為破骨細胞分化的重要因子。RANKL 的多胜肽 (polypeptide) 會由表現細胞表面的第二型跨膜蛋白經酶解 (proteolytically) 後釋放出可溶性的形態 (Anderson et al., 1997; Wong et al., 1997)。亦有部分荷爾蒙與因子會誘發骨基質細胞 (osteogenic stromal cells) 中 RANKL 的表現，刺激骨分解作用，如 TNF- $\alpha$ 、PTH 等 (Hofbauer et al., 2000; Theill, Boyle, & Penninger, 2002)。在臨床研究中發現，多種骨退化性疾病的主要原因為 RANKL 過度產生，如類風溼性關節炎 (rheumatoid arthritis)。部分學者主張血液中的 sRANKL 可作為檢測非創傷性骨折的獨立危險因子，血液中 sRANKL 濃度較低意味著非創傷性骨折的機率較低 (Schett et al., 2004)。

## 三、骨質代謝相關生化指標

骨骼是一種動態變化的組織，於正常的情況下，會隨著時間變化，同時發生著骨合成與分解作用，以維持骨骼的質量與骨架中微小結構的完整性。過往會藉由血液或尿液中骨骼分解指標與合成指標，來間接評估骨細胞的活性。

### (一) 骨合成指標

骨骼在合成階段時，造骨前驅細胞貼附至骨基質上後會分泌膠原蛋白並負責細胞的增生，而當造骨前驅細胞逐漸成熟分化為成熟造骨細胞，此時造骨細胞分泌 B-ALP 與 collagen，而 B-ALP 除了被廣泛作為反應出造骨細胞活性之指標，亦被認為是骨基質成熟之現象 (Garnero & Delmas, 1993)；隨後造骨細胞分化進入礦化時期，鈣離子與磷酸根離子和造骨細胞結合後，進入骨細胞外基質，並分泌 osteocalcin，新合成的 osteocalcin 片段會釋放至循環之中，因而可作為一種礦化性指標 (Price, Williamson, & Lothringer, 1981)；礦化後的造骨細胞則逐漸形成骨細胞 (osteocyte)，因此這些指標會反應出造骨細胞的生長位於何種時期。

### (二) 骨分解指標

骨細胞外基質是由比林二酚胺 (pyridinoline, PYD) 和去氧比林二酚胺 (deoxypyridinoline, DPD) 的交叉連結 (cross-link) 來穩定其構形，當受破骨細胞作用時，會使 PYD 與 DPD 釋放至尿液之中，因而可作為一種測量指標 (Black, Duncan, & Robins, 1988)。另外於骨骼產生分解作用時，造成骨骼中主要含量的 type I collagen 分解，碳端第一型膠原蛋白片斷 (type I collagen C-telopeptide, CTX)，又稱為第一型膠原交聯羧基末端肽 (carboxy-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen, ICTP) (Eriksen et al., 1993)，或氮端第一型膠原蛋白片斷 (type I collagen N-telopeptide, NTX)。這些指標同時也反應出各種酵素是否對於 type I

collagen 產生降解作用 (Delaisse et al., 2003)。

## 第二節 運動中骨質代謝的機制

許多研究證實運動有益骨質增生，且有助於維持骨質密度 (bone mineral density, BMD) (Nowak et al., 2005)，並證實身體活動與骨質密度呈正相關；規律的身體活動者與運動員皆有較高的骨質密度 (Suominen, 1993)。規律運動對骨質益處除機械性負荷 (mechanical loading) 之外，更為重要的是骨骼周轉 (bone turnover) 所造成的骨質代謝影響 (Ryan et al., 1994)。但這些影響因素卻也因運動的類型、持續時間與強度等不同，對骨質密度、骨質代謝與骨質作用機轉亦有所差異。

### 一、運動類型對於骨質代謝之影響

不同運動類型因為造成身體各部位的不同體重負重 (weight-bearing)，藉由給予運動相對應部位的骨骼負荷，產生一機械性應力，使該部位刺激造骨細胞增生 (Bourrin, Palle, Pupier, Vico, & Alexandre, 1995)。因應運動的專項特殊性 (type-specific)，造成身體骨骼肌肉組織分別承受不同的機械性應力，產生特殊性與局部性的影響。藉由雙腳、特殊性部位或全身與地面、或物體所提供短暫地衝擊骨骼組織，產生張力性 (strain) 的機械負荷，皆被證實有利於骨質的生成 (Creighton, Morgan, Boardley, & Broolinson, 2001; Stewart & Hannan, 2000)。依照負重差異更可進而區分成負重運動 (跑步、舉重和阻力運動等)、非負重運動 (游泳) 與部分負重運動 (自行車或划船運動等)。進一步研究 704 位業餘運動選手其

全身各部位骨質密度後指出，橄欖球、足球、格鬥運動與團隊性運動等類型，具有較高的全身骨密度；游泳與划船等運動類型則具有較低的骨質密度(Morel, Combe, Francisco, & Bernard, 2001)。並於跑步和舉重選手、無重量訓練經驗的休閒活動者以及與有氧耐力運動者相較之下，舉重選手與同時從事重量訓練和有氧耐力運動之受試者，皆具有較高的橈骨骨密度(Hamdy, Anderson, Whalen, & Harvill, 1994)。另一方面，自 12-18 歲的白人運動員中，依據其運動類型的不同分為衝擊性負荷(impact load)組(體操、田徑和網球等)、活動負荷(active load)組(游泳與水球運動)與控制組(無訓練經驗者)發現，衝擊性負荷運動類型選手具有較高的全身骨密度；骨合成指標 B-ALP 要顯著的高於活動負荷與控制組，且骨分解指標 DPD 明顯較控制組來得高 (Lima, De Falco, Baima, Carazzato, & Pereira, 2001)。

## 二、運動持續時間對於骨質代謝之影響

Ziegler 等人(2005)於全程馬拉松與半程馬拉松運動研究中指出，不論在全程或半程馬拉松，sRANKL 在運動後 30 分鐘皆顯著減少；OPG 在運動後 30 分鐘皆顯著增加，且隨著賽程距離增加而增加(Ziegler et al., 2005)，推測單一次長時間耐力性跑步運動，會影響體內 OPG 與 sRANKL 的比例，進而造成骨質代謝的變化。在超級馬拉松運動後發現，骨合成指標 B-ALP、osteocalcin 和第一類型前膠原蛋白羧基端胜肽鏈(carboxy-terminal propeptide of type I procollagen, P1CP)會立即顯著性的下降，且 B-ALP 與 osteocalcin 三天後仍低

於運動前水平(Mouzopoulos et al., 2007)。Katharina 等人(2009)於 246 公里跑之後，osteocalcin 亦明顯的下降，CTX 則會顯著性的上升(Katharina et al., 2009)。另有研究則指出，長時間的訓練週期中，運動所引發的骨合成與分解作用會隨著訓練量的變化而改變，當訓練量減少，合成指標 PICP 與 B-ALP 隨之下降，分解指標 ICTP 上升；當訓練量上升，則 PICP 上升，ICTP 下降，並且在不同的訓練量之下，骨代謝指標分別會達到新的平衡狀態(Karlsson, Karlsson, Ahlborg, Valdimarsson, & Ljunghall, 2003)。

### 三、長期負重運動對骨質代謝之影響

過去研究指出，骨骼組織於整年的運動賽季中，已習慣相似動作的重覆產生所造成之機械性應力，會使運動員具有較高之骨骼質量(Frost, 1988)。Fujimura 等人(1997)於無規律運動習慣者進行為期四個月，每週 3 次，每次 45 分鐘之重量訓練課程後，發現 osteocalcin 和 B-ALP 明顯高於控制組(Fujimura et al., 1997)。於 37 位男性(51-71 歲)、平時無訓練習慣者給予四個月之阻力訓練後，發現其股骨骨密度較控制組高(Ryan et al., 1994)，且 Shackelford 等人(2004)研究臥床休息 17 週之受試者，比較阻力訓練組與控制組骨密度，控制組 17 週後骨密度顯著減少，而訓練組腰椎骨密度增加，血液中 B-ALP、osteocalcin、PTH 顯著增加(Shackelford et al., 2004)。若將 26 位處於骨質疏鬆症高危險群之停經後婦女，分為重量訓練組(n=17)與控制組(n=9)，於經過至少 9 個月的重量訓練後發現，其重訓組之腰椎骨密度較控制組來得高，

並於無進行重量訓練之控制組發現，腰椎骨密度會顯著的下  
降(Pruitt, Jackson, Bartels, & Lehnhard, 1992)。綜上所述，  
長期阻力訓練不管對於一般族群和低身體活動量者，或是罹  
患骨質疏鬆症患者皆帶來良好的骨質效益

#### 四、短期負重運動對骨質代謝之影響

雖然長期身體活動所產生的機械性負荷已被證實能夠增  
進骨質量，但無論是高或低強度的短期運動後，骨周轉率似  
乎並無立即性變化效果(Maimoun et al., 2009)。於馬拉松此  
種單次長時間、高強度的全身性負重運動後則發現 PICP、  
B-ALP 與 osteocalcin 會明顯下降，而 ICTP 則顯著上升  
(Crespo et al., 1999; Langberg, Skovgaard, Asp, & Kjaer,  
2000; Malm, Ronni-Sivula, Viinikka, & Ylikorkala, 1993)。且  
於平時無規律運動習慣者，進行 7 項的次最大強度阻力運  
動，每項 3 組，每組 10 次反覆後，持續追蹤至運動後三天發  
現，PICP 與 B-ALP 分別於運動後 1 天與 2 天顯著地下降，  
osteocalcin 並無明顯變化，另外骨分解指標 DPD 於運動後 3  
天呈顯著下降(Ashizawa et al., 1998) 另外有學者則於具有  
良好訓練的年輕男性中，進行一回合高強度的離心性肌肉收  
縮，發現 PICP 濃度並無顯著改變，但值得注意的是，會於  
運動 1 小時後產生顯著性的下降，並於兩天後明顯的上升  
(Virtanen, Viitasalo, Vuori, Vaananen, & Takala, 1993)。總結  
上述研究結果發現，單次負重運動後，骨合成指標會顯著性  
的下降，於運動後數天的休息期開始回升，骨分解指標則反  
之，指出單次高強度負重運動後，骨骼呈現分解現象，而於

休息數天後則偏向合成效益。

然而，目前已有許多研究表明，運動本身亦會藉由增加細胞內的活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成(Hollander et al., 2001)，來刺激 nuclear factor  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的活化(Jimenez-Jimenez et al., 2008)，進而影響破骨細胞的分化與成熟(Soysa & Alles, 2009)，因此以下將探討運動刺激對NF- $\kappa$ B活化之影響。

## 五、運動刺激對 NF- $\kappa$ B 活化之影響

NF- $\kappa$ B 為主要調控身體內，發炎與氧化反應之轉錄因子，於大多數的細胞之內，作為協調細胞成熟與分化的角色，且直接參與超過 150 種基因的生成，如免疫反應、抗原呈現受體(antigen-presenting receptors)、急性期反應(acute-phase response)、惡病質(cachexia)、細胞凋亡(apoptosis)以及調節氧化還原作用(regulators of redox status)等相關因子(Pahl, 1999)。而運動時的肌肉收縮，會刺激細胞內的肌漿網釋放出鈣離子，提高 ROS 的生成，而 ROS 的生成被認為會提高 NF- $\kappa$ B 的活化(Muller, Rupec, & Baeuerle, 1997)，因此運動被認為會提高 NF- $\kappa$ B 的活化。目前已發現身體活動，會使骨骼肌內的細胞核和粒線體的基因組產生適應性反應(Atherton et al., 2005)。過去研究顯示，單次劇烈運動後，會產生 ROS 促使 NF- $\kappa$ B 的活化，以致於提升粒線體內的抗氧化酶基因，如錳超氧化物歧化酶(Mn superoxide dismutase, MnSOD)的轉錄作用(Hollander, et al., 2001)。且有規律的運動訓練經驗者，其 MnSOD 顯著高於無運動訓練

經驗者 (Ortenblad, Madsen, & Djurhuus, 1997)，顯示對於有訓練經驗者，ROS 對於身體所造成的傷害較少，因此氧化傷害的相關代謝產物硫代巴比妥酸反應物質 (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) (Pryor, 1991) 的生成較低。並觀察 12 名耐力型運動員，以 80%  $VO_{2max}$  強度的跑步機運動 60 分鐘後，淋巴細胞內的 NF- $\kappa$ B 活性，以及血清內的 TBARS 濃度發現，於運動後 TBARS 會顯著高於運動前水平，且 NF- $\kappa$ B 也明顯較運動前要來得高 (Vider et al., 2001)，顯示運動員於高強度的運動後，會導致 ROS 的生成，進而誘發 NF- $\kappa$ B 的活化。綜上所述，於高強度運動後，無論有無訓練經驗，皆會使 ROS 顯著上升，產生氧化傷害，並誘發 NF- $\kappa$ B 的活性。而規律的運動習慣則會提高肌肉的抗氧化能力 (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001)，促使身體產生適應性反應。因此可得知，運動後所誘發的 ROS 生成，會進一步的誘發 NF- $\kappa$ B 的活化現象。

### (一) 阻力運動對於 ROS 生成之影響

身體活動大約可分為耐力性運動或是阻力性運動，且上述研究中可發現，高強度耐力型運動後皆會造成 TBARS 的上升 (Miyazaki et al., 2001; Vider, et al., 2001)，顯示於耐力型運動後，會明顯提高 ROS 的生成，提高 NF- $\kappa$ B 的活化，然而於 12 名有規律運動習慣的健康男性受試者，進行四階段共 12 週的阻力運動訓練計畫，於第一、四階段為低強度，第二階段為中強度，第三階段為高強度，分別於各階段結束後採血檢測血清中的 TBARS 濃度，結果顯示，有規律運動習

慣的健康男性，僅於高強度訓練期中，TBARS 濃度要顯著高於訓練開始前，其於時間點並無顯著性的變化，另外 TBARS 與訓練量的變化趨勢呈正相關(Margonis et al., 2007)。顯示規律性的阻力運動訓練，其 ROS 生成會與訓練強度成正比。因此，無論是阻力或耐力性運動，高強度運動後皆會使 ROS 的生成增加，且經長期的運動訓練後，亦會有效的提高抗氧化能力，降低 ROS 的生成，並可能進而減少 NF- $\kappa$ B 的活化。

## (二) NF- $\kappa$ B 對於骨質代謝之影響

上述研究中發現，運動中所生成的 ROS 會誘使 NF- $\kappa$ B 的活化(Muller, et al., 1997)。而 NF- $\kappa$ B 在 RANKL 所誘發的破骨細胞生成中，已被認為是主要的下游調控因子(Xing et al., 2002)，且近年來 Vaira 等人(2008)發現，缺乏 p65(RelA) 基因表現的老鼠骨髓中，RANKL 的刺激無助於破骨細胞的生成(Vaira et al., 2008)，因此 NF- $\kappa$ B 於破骨細胞的熟成過程中，主要藉由調控破骨細胞的分化與存活作用(Roodman, 2006)。綜合上述研究發現，由運動刺激所生成的 ROS，會導致 NF- $\kappa$ B 的活化，可能會進而促使破骨細胞的分化與熟成。另一方面，給予造骨細胞 ROS 的刺激後，則已被證實能夠提高 RANKL 的分泌(Bai et al., 2005)，進而可能提高因 RANKL 的刺激所導致的破骨細胞生成。

## 第三節 關於 HMB

### 一、HMB 的簡介

Nissen 等人(1996)證實 HMB 為一種由白胺酸(leucine)代

謝而成的產物，由於對運動表現的正面效果，與具有減少肌肉分解現象之作用，使其受到重視(Nissen et al., 1996)。而Holecek、Muthny、Kovarik與Sispera等人(2009)更加強HMB為抗分解代謝(anti-catabolic)關鍵因子的此一假說(Holecek, Muthny, Kovarik, & Sispera, 2009)。近年的研究中指出，補充HMB會透過許多種路徑，降低因惡病質所引起的肌肉降解，並增加蛋白質合成(Eley, Russell, Baxter, Mukerji, & Tisdale, 2007; Nunes et al., 2008)。此外，HMB與增加骨骼肌質量之關聯性，而被認為具有降低因機械性應力刺激所引發的肌肉損傷之功用(Nissen & Sharp, 2003)。由於上述研究對於補充HMB特性的背書，使得目前運動員為增進運動表現與肌肉質量，於訓練計畫內添加HMB作為運動增補劑已是非常普遍。

## 二、HMB的代謝

HMB為一種可由體內白胺酸自行代謝生成的產物，首先白胺酸經由轉胺作用形成 $\alpha$ -酮異己酸(alpha-ketoisocaproate, KIC)，藉由KIC-雙加氧酶(KIC-dioxygenase)的作用形成HMB(Sabourin & Bieber, 1983)。在白胺酸代謝成KIC後，於粒線體中KIC藉由 $\alpha$ -酮酸脫氫酶(alpha-ketoacid dehydrogenase)代謝成異戊醯基輔酶A(isovaleryl-CoA)，或於細胞質中藉由KIC-雙加氧酶代謝成HMB。大部分KIC會形成isovaleryl-CoA，然一般而言，僅約5%的白胺酸會代謝成HMB(van Koeving & Nissen, 1992)，然後轉換成 $\beta$ -羥基- $\beta$ -甲基輔酶A(beta-hydroxy-beta-methylglutaryl CoA,

HMG-CoA)，之後透過 HMG-CoA reductase 的輔助轉變成為二羥甲戊酸 (mevalonate) 並進入膽固醇的合成路徑，作為組織中膽固醇合成的主要碳來源，維持細胞功能的完整性 (Nissen & Abumrad, 1997)，由於白胺酸經代謝形成 HMB 的量十分有限，若以直接補充白胺酸作為運動增補劑，則效果不彰 (Pitkänen et al., 2003)。

HMB 作為運動增補劑的方式已廣為接受，目前多用於增進提升肌力、增加瘦體組織、降低體脂肪、減緩肌肉損傷和增加血液中胺基酸的濃度等。主要作用可分為以下四類：

1. 抗分解代謝 (anti-catabolic) (Knitter, Panton, Rathmacher, Petersen, & Sharp, 2000; Russell & Tisdale, 2009)。
2. 促合成代謝 (anabolic) (Jowko, et al., 2001)。
3. 促脂肪分解 (lipolytic effects) (Gallagher, Carrithers, Godard, Schulze, & Trappe, 2000)。
4. 提升有氧/無氧運動能力 (O'Connor & Crowe, 2003) 等。

### 三、HMB 的作用機轉

#### (一) 膽固醇合成

膽固醇是細胞膜的主要成份，且與細胞膜的完整性相關，特別是在肌肉組織中有顯著的相關，已有研究發現，當膽固醇的合成減低，會傷害肌肉組織的功能性 (Bastiaanse, Hold, & Van der Laarse, 1997)，進而提升肌肉損傷的發生 (Pierno et al., 1995)。HMB 的代謝過程中，會藉由產生甲戊

二羧酸 (mevalonic acid)，提供膽固醇合成的原料，藉以提高其合成作用 (Nissen & Abumrad, 1997)，進而增加細胞膜之完整性。

## (二) mTOR 途徑的反應

當哺乳類雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 因上游磷酸肌醇-3-激酶 (phosphoinositide 3 kinase, PI3K)/Akt 的作用活化後，會啟動下游訊息的傳遞，促使細胞分化或增生 (Memmott & Dennis, 2009)。近來已有學者的研究發現，HMB 會藉由刺激 mTOR 的活化，增加蛋白質合成 (Eley, et al., 2007)，且於肌原細胞 (myogenic cell) 中也發現，HMB 除會提高 PI3K/Akt 外的活化，尚會增加有絲分裂原活化蛋白質激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)/細胞外訊號調節激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 的活化來促使細胞分化與成熟 (Kornasio et al., 2009)。

## (三) 泛素蛋白酶途徑

泛素的活化會受到分解代謝與數種因子的影響而誘發，如細胞激素 (cytokine)、氧壓 (oxygen stress)、飢餓與活動量減少 (activity reduction) 等，這些因子被認為會誘發蛋白酶體 (proteasome) 的表現，進而增加轉錄因子 NF- $\kappa$ B 的活化，加速肌肉分解 (Tisdale, 2005)。目前的研究指出，於肌肉細胞中，HMB 會藉由抑制泛素蛋白酶體的蛋白水解 (ubiquitin-proteasome proteolytic) 作用，降低蛋白質的降解

作用 (Smith, Wyke, & Tisdale, 2004)，且亦已發現 HMB 能夠減少因下游轉錄因子 NF- $\kappa$ B 的活化，所引發的肌肉流失現象 (Nunes, et al., 2008)。

#### (四) HMB 對 NF- $\kappa$ B 之影響

如前述所提，補充 HMB 具有抑制經由泛素蛋白酶體的蛋白質水解作用 (Portal, Eliakim, Nemet, Halevy, & Zadik, 2010; Smith, Mukerji, & Tisdale, 2005; Smith, et al., 2004)，因此補充 HMB 後可能具有抑制，當 NF- $\kappa$ B · I $\kappa$ B- $\alpha$  (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) 複合體經磷酸化後，I $\kappa$ B- $\alpha$  受蛋白酶體之作用而降解，使 NF- $\kappa$ B 進入至細胞核內與 DNA 結合後進行其後的轉錄作用，Nunes 等人 (2008) 指出，於帶有腫瘤細胞的老鼠身上補充 HMB 後，除有助於減少腫瘤內 NF- $\kappa$ B p65 次體 (subunit) 的堆積，並提升 I $\kappa$ B- $\alpha$  的表現量 (Nunes, et al., 2008)。進而於肌肉細胞實驗中發現，給與 HMB 有助於透過減少泛素蛋白酶體的蛋白水解作用，而降低蛋白質的降解 (Smith, et al., 2004)。綜合上述研究發現，HMB 會藉由抑制泛素蛋白酶體的蛋白水解作用路徑，減少 NF- $\kappa$ B · I $\kappa$ B- $\alpha$  複合體中的抑制蛋白 I $\kappa$ B- $\alpha$  降解，進而抑制 NF- $\kappa$ B 進入細胞核內 (Portal, et al., 2010; Smith, et al., 2004)，導致下游的轉錄作用受到阻礙，同時亦可能會減少主要由 NF- $\kappa$ B 所引發的 I $\kappa$ B- $\alpha$  再生成作用 (Chen & Greene, 2004)。

#### 四、HMB 對運動員的影響

目前動物研究中發現，HMB 有減緩肌肉蛋白水解 (Holecek, et al., 2009)、降低肌肉損傷、減少體脂肪 (Cheng W & N, 1997) 和增加血中膽固醇濃度 (Holecek, et al., 2009) 等效果。人體實驗中，Vukovich、Stubbs 與 Bohlken (2001) 在 31 位老年男、女給予補充 HMB 及八週的阻力訓練後發現，體脂肪 (body fat) 下降 0.66%、去脂體重與上下肢肌力均上升 (Vukovich, Stubbs, & Bohlken, 2001)。而 Coelho 和 Carvalho 等人 (2001) 的研究則顯示，於患有高膽固醇症之男性，供以阻力訓練並補充 HMB，其低密度脂蛋白下降，肌力與去脂體重皆上升 (Coelho & Carvalho, 2001)。但若受試者具有一年以上的阻力運動訓練經驗，經過 9 週的 HMB 補充，下肢肌力僅會些微地提升，而淨體重及體脂肪則無顯著性的改變 (Thomson, Watson, & Rowlands, 2009)；另有研究指出平時有進行訓練者，補充 HMB 並無增加肌力、淨體重以及減少體脂肪的效益 (Rowlands & Thomson, 2009)。近年來，部分動物研究指出補充 HMB 有助於提升血液內多種胺基酸的濃度，如白胺酸、異白胺酸 (isoleucine) 與纈氨酸 (Valine) 等 (Tatara, 2009; Tatara, Sliwa, Krupski, & Worzakowska, 2008<sup>a</sup>)。而有訓練經驗者於阻力運動時補充 HMB，有助於提升淨體重並增加運動表現。研究發現每日補充 3 g HMB 並配合阻力訓練後，淨體重上升 0.28%，且每週肌力上升 1.4% (Nissen & Sharp, 2003)。於有訓練經驗的男性補充 HMB 並配合阻力訓練，結果顯示其體脂肪下降、淨體重上升及增加運動表現，且在 41 名年齡從 20 至 40 歲且具有訓練經驗的女性受試者身上，連

續補充 4 週的 HMB 或安慰劑，補充 HMB 組亦得到類似結果 (Panton, Rathmacher, Baier, & Nissen, 2000)。但是在每週具有 8 小時以上阻力或敏捷訓練的美國大學之美式足球員，連續補充 28 天 HMB 後，淨體重、脂肪量和肌力皆無顯著改變，骨質量亦無顯著變化 (Kreider et al., 2000)；即便是補充 HMB 並搭配肌酸 (creatine) 使用，職業橄欖球選手的肌力與肌耐力、上下肢圍、皮脂厚度 (skinfold) 以及股骨與肱骨的直徑亦無顯著的變化 (Abu, Horner, Kusec, Triffitt, & Compston, 1997; O'Connor & Crowe, 2007)。綜上所述，略有訓練經驗者在補充 HMB 後輔以阻力訓練，有增加淨體重且提升肌力表現之作用，另具有降低體脂肪率的效果。但在長時間訓練的運動員身上，則傾向補充 HMB 無助於增加肌肉量或淨體重，顯示經大量運動後，HMB 的抗分解代謝效果可能會受到限制。

#### 第四節 補充 HMB 對骨質的影響

過去動物研究中發現，血液各項骨骼代謝指標的濃度改變情形 (Tatara, 2008<sup>b</sup>)，顯示 HMB 可能參與骨質代謝之調控路徑，且無論是骨骼的幾何性質 (geometrical property)、機械性質 (mechanical property)、強度 (Tatara, 2009) 和骨礦物含量 (Tatara, Sliwa, Krupski, & Worzakowska, 2008<sup>a</sup>) 等，均發現有顯著性的增加，且可延緩因營養攝取不足所導致的骨質流失 (Tatara, et al., 2008<sup>a</sup>)。

## 一、補充 HMB 對骨生化指標的影響

骨骼會隨著內在環境的改變而受到刺激，進而導致骨質代謝的變化，其中，透過刺激造骨細胞的活性和骨礦物的沉積 (bone mineral deposition)，是生長激素 (growth hormone, GH) 調節骨質代謝的主要因子，類胰島素生長因子一型 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 則主要調節 GH 對於在周邊組織的影響。最近有研究指出，GH 所誘發的 IGF-1 之 mRNA 表現量並不限在肝臟之中，甚至於血漿與周邊組織之中，且 GH 在組織生長的作用，可能起因於自分泌或旁分泌 (autocrine/paracrine) 所製造的 IGF-1 直接刺激 (Breier, 1999)。目前動物研究指出補充 HMB 可能藉由刺激生長激素軸 (somatotrophic axis) 的作用，提升血液中 GH 和 IGF-1 的含量 (Tatara, 2009; Tatara, et al., 2008<sup>a</sup>)，連續給予生產前兩週的母豬補充 HMB，其出生後的小豬有較高的生長速度及體重，且骨合成指標 B-ALP 較控制組來得高 (Tatara, et al., 2007)，進一步於甫出生的小羊連續補充 21 天 HMB 後，分析其第 21 天和第 130 天之血液樣本亦發現，B-ALP 與骨礦化指標 osteocalcin 於第 21 天和第 130 天，以及骨骼分解指標 CTX 於第 130 天皆顯著高於控制組，顯示補充 HMB 組的小羊其骨質代謝速率，顯著高於控制組 (Tatara, 2008<sup>b</sup>)。綜上所述，補充 HMB 會提升血液中 GH 和 IGF-1 的含量，刺激造骨細胞活性，增加骨形成作用，使血液中骨質代謝指標 B-ALP、osteocalcin 和 CTX 的水平增加。

## 二、補充 HMB 對骨骼機械性質的影響

骨骼為具有保護與支持功能的結締組織，其堅硬的結構用以支持每日生理上的反覆負荷活動，因此骨骼透過改變其結構、質量及組成來適應內在或外在環境的改變 (Crespo, Stover, Taylor, Chin, & Shivaprasad, 2000)。近來有動物研究指出，將老鼠分為控制組、卵巢切除組以及卵巢切除並補充 HMB 組，經 60 天的飼養之後發現，卵巢切除組的 BMD 明顯較控制組來得低，而補充 HMB 則使因卵巢切除而骨質流失的老鼠，恢復其骨密度到與控制組相同 (Bieńko et al., 2006)；其機械性質中的極限強度 (ultimate stress)、最大彈性強度 (maximum elastic strength) 與第二轉動慣量 (second moment of inertia) 皆會上升，相應的幾何參數 (geometrical parameters)，如骨骼的橫切面面積 (cross-sectional area) 亦有增加之現象 (Tatara, 2008<sup>b</sup> & 2009)。在剛出生的小羊給予連續 21 天補充 HMB 後，觀察其出生後第 130 天骨骼的機械性質，發現補充 HMB 的小羊與未補充組相比會具有較高的股骨中軸橫切面面積、第二轉動慣量、最大彈性強度和極限強度 (Tatara, 2008<sup>b</sup>)。進而在年齡於 35 天的雄性火雞，連續給予 15 週的 HMB 後，增加其脛骨體積骨密度 (volumetric bone mineral density, vBMD)，且骨骼機械性質也得到相類似的結果 (Tatara, 2009)。以上研究皆指出補充 HMB 後，有助於骨骼生長、增加骨密度、並提高機械性質與幾何參數。

## 第五節 HMB 對造、破骨細胞生成的影響

目前的研究發現，於人體血液中取得之 (peripheral blood

mononuclear cells, PBMC)經由體外給予 HMB 培養後，發現 HMB 具有調節淋巴細胞(lymphocyte)的增生，以及由 T 細胞所衍生之細胞激素。但仍無相關研究指出，HMB 對於人類造、破骨細胞的影響究竟為何，以下將更進一步探討補充 HMB 對造骨細胞與破骨細胞產生何種影響。

## 一、補充 HMB 對造骨前驅細胞的影響

### (一) 造骨前驅細胞的來源與特色

骨髓中的幹細胞可粗分為造血幹細胞與非造血性幹細胞，而非造血性幹細胞亦稱為間葉幹細胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。這些間葉幹細胞已被證實具有分化為造骨細胞、脂肪細胞(adipocytes)、軟骨細胞(chondrocytes)、肌肉細胞(myocytes)及神經元(neurons)等能力(Baksh, Song, & Tuan, 2004)。間葉幹細胞藉由造骨細胞特有轉錄因子如 Runx2/cbfa1(runt-related transcription factor-2)以及 osterix(Matsubara et al., 2008)分化成造骨前驅細胞，並隨後誘導 type 1 collagen、B-ALP 及骨骼涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)的生成；而晚期則促使造骨前驅細胞進一步分化，並進行礦化作用(mineralization)形成骨細胞(osteocytes)，進而進入骨基質中成為骨質，此時造骨細胞除分泌膠原蛋白外，仍會分泌非膠原物質如 osteocalcin 和骨橋蛋白(osteopontin)等。

### (二) 造骨前驅細胞的分化與熟成

造骨前驅細胞自 MSCs 分化而來，於接受適當刺激後會

逐漸分化為造骨前驅細胞 (preosteoblast)，此時細胞即確定會分化形成造骨細胞，而造骨細胞進一步經鈣、磷沉積後，則形成成熟的骨細胞；當造骨前驅細胞分化為造骨細胞時，細胞外形會從梭狀 (spindle-shaped) 逐漸轉換成立方形 (cuboidal)，使造骨細胞變大，而此時會分泌大量的細胞外基質 (extracellular matrix, ECM)，而這些骨細胞外基質又稱為類骨質 (osteoid)。隨後造骨細胞逐漸由礦化的骨基質將造骨細胞包覆，使其成熟成為骨細胞。

MSCs 經由轉錄因子 Runx2 作用形成造骨前驅細胞，此時受到骨形態生成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 和 osterix 的作用，使得造骨前驅細胞進一步分化為造骨細胞 (Takada, Kouzmenko, & Kato, 2009)。其中，Runx2 主要負責造骨細胞分化過程中所需之轉錄因子，並會受到許多荷爾蒙與細胞激素的作用而活化，如 TGF- $\beta$ 、PTH、纖維母細胞生長因子 (fibroblast growth factor, FGF)、糖皮質激素受體 (glucocorticoid receptor, GR) 和雄激素受體 (androgen receptor, AR) 等，促使造骨細胞的成熟 (Zaidi, 2007)；而 Runx2 的下游反應中，受到 IGF-1 與 BMP-2 所調控的 osterix 為另一必須要的訊息因子，當細胞內的 osterix 和因去磷酸化 (dephosphorylation) 而活化的轉錄因子 NFAT-2 所結合，兩者的相互作用進而啟動造骨細胞生成的轉錄過程 (Koga et al., 2005; Nakashima et al., 2002)。目前也已經發現瘦體素 (leptin)、雌激素 (estrogen)、IGF-1 以及間歇性的 PTH 刺激等，不只具有調節骨前驅細胞的成熟，亦有減緩成熟造骨細胞凋亡的能力 (Xing & Boyce, 2005)。而這些內生性的生長因

子與細胞激素對於造骨前驅細胞的分化與活性，則有相當程度的影響，如 leptin 具有提高造骨細胞的增殖、膠原合成和骨基質的沉積與礦化等作用 (Gordeladze, Drevon, Syversen, & Reseland, 2002)；早期造骨細胞聚集時會大量表現出 IGF-1，動物研究中指出，缺乏 IGF-1 基因的小鼠，給予其造骨細胞大量 IGF-1 刺激，發現具有促進造骨細胞的活性，增進骨骼合成的作用 (Zhao et al., 2000)。

### **(三) 補充 HMB 對造骨細胞的影響**

近來研究發現，補充 HMB 可以促進生長激素軸之功能，促使 GH 和 IGF-1 的分泌量增加 (Tatara, 2008<sup>b</sup>; Tatara, et al., 2007)，進而刺激造骨細胞的活性，骨礦物沉積 (bone mineral deposition) 的指標 B-ALP 的活性，及 osteocalcin 的生成 (Kanbur, Derman, & Kınık,; Rizzoli, 2005)，佐以骨骼分解指標 CTX 上升趨勢，推測補充 HMB 和骨骼代謝 (bone metabolism) 有著高度相關，並推測此一骨質代謝的改變，為給予 HMB 後提升 IGF-1 的分泌，以刺激造骨細胞活性，導致呈現出骨骼合成之趨勢。

### **(四) 補充 HMB 對 IGF-1 與骨質之影響**

IGF-1 對於骨骼具有刺激縱向骨頭 (longitudinal bone) 的生長、生長板 (growth plate) 中軟骨細胞 (chondrocytes) 的分化及增生、皮質骨 (cortical) 與海綿骨 (trabecular) 的形成、造骨細胞的分化與增生以及合成第一型膠原蛋白，且增加 B-ALP 的活性及 osteocalcin 的生成 (Kanbur, et al., 2005; Rizzoli,

Bonjour, & Ferrari, 2001)。先前 Kornasio 等人(2009)的研究中，以取自出生三天小雞的胸大肌之肌纖維母細胞(myoblasts)與 HMB 共同培養後得知，HMB 能有效提升 IGF-1 的 mRNA 表現量，且有劑量依存的現象(Kornasio, et al., 2009)，Rubin 等人(2002)以 ST 小鼠的基質細胞系(murine stromal cell line)的研究中則發現，IGF-1 會強烈的影響到小鼠基質細胞中 OPG/RANKL 的平衡狀態，當 IGF-1 的濃度越高時，則 OPG 的 mRNA 表現量就越低，RANKL 則和 IGF-1 呈現一致的上升，因而若循環中有著高水平的 IGF-1，似乎會抑制血清中 OPG 的濃度(Rubin et al., 2002)。另外有學者發現，於不同年齡層的健康受試者之中，IGF-1 會隨著年齡的增加而下降，且無論是骨骼生化指標 CTX、osteocalcin、第一型前膠原蛋白氮端前勝肽(procollagen type I amino-terminal propeptide, P1NP)與 B-ALP 或是腰椎、頸椎或髖關節骨密度，皆與 IGF-1 呈現顯著正相關(Adami et al., 2010)。無論是在火雞或是剛出生的小羊，分別連續補充 4 個月和 3 週的 HMB 後，會藉由刺激生長激素軸而顯著增加體內 GH 以及 IGF-1 水平，致使骨骼機械性質與型態上皆產生明顯改變，甚至於臨盆前兩週的母豬給予補充 HMB，其子代的骨骼機械性質與形態亦會顯著的上升(Tatara, 2008<sup>b</sup> & 2009; Tatara, et al., 2007; Tatara, et al., 2008<sup>a</sup>)。綜上論述，補充 HMB 具有增加體內 IGF-1 的水平，除刺激造骨細胞的分化與成熟外，更能抑制 OPG mRNA 與增加 RANKL mRNA 的表現量，可能因而提升骨分解作用，促進骨骼周轉率，呈現合成之效益。

## 二、補充 HMB 對破骨前驅細胞的影響

### (一) 破骨前驅細胞的來源與特色

骨髓中的造血幹細胞 (hematopoietic cells)，經由不同的刺激會逐漸形成兩種多分化潛能的始祖細胞，根據細胞表面不同的特殊指標、基因的表現與形成不同聚落的能力，可區分為共通的淋巴 (common lymphoid progenitors, CLPs) 與髓系 (common myeloid progenitors, CMPs) 兩種 (Akashi, Traver, Miyamoto, & Weissman, 2000)，而 CMPs 依據細胞表面有無促紅血球生成素受體 (erythropoietin receptor, EPO-R)，可分為無 EPO-R 的中性粒細胞/巨噬細胞祖細胞 (granulocyte/macrophage progenitors, GMPs) 和巨核細胞/紅血球祖細胞 (megakaryocyte/erythrocyte progenitors)，GMPs 可進而藉由不同的刺激分化成巨噬細胞、破骨細胞與樹突狀細胞的前驅細胞 (precursors)。這些前驅細胞若同樣受到 RANKL 和 M-CSF 的刺激後，皆會形成成熟之破骨細胞；CLPs 若被誘發成具有類 B 細胞表型 (B-cell-like phenotype) 的 B220<sup>+</sup> 細胞，給予介白素 7 型 (interleukin-7, IL-7) 的刺激並和基質/造骨細胞系 (stromal/osteoblast cell line) 共同培養，亦可形成成熟之破骨細胞。於上述中造血幹細胞會分化成不同類型的前驅細胞，當經由不同的刺激而生成破骨細胞者，可稱之為破骨前驅細胞 (osteoclast precursors, OCPs) (Xing & Schwarz, 2005)，並具有以下特色。

1. OCPs 因缺乏細胞表面的特殊指標可供辨認，使得在研究 OCPs 上更為困難。
2. 於骨髓系 (myeloid lineage) 前驅細胞時會將細胞表面

標誌 CD11b 和巨噬細胞集落刺激因子受體 (colony-stimulating factor-1 receptor, c-Fms) 隱匿起來。

3. 與顆粒單核球群落刺激生長因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 與 M-CSF 培養時，會產生顆粒性細胞系與巨噬細胞系 (colony-forming units granulocyte-macrophage, CFU-GM)。
4. OCPs 和 M-CSF 與 RANKL 共同培養後，會分化成含有抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 的細胞以及擁有骨分解的能力。
5. 若細胞表面缺乏 c-Fms (CD11b<sup>+</sup>/c-Fms<sup>-</sup>)，已被認為是分化早期的 OCPs；反之若細胞表面有 c-Fms (CD11b<sup>+</sup>/c-Fms<sup>+</sup>) 則為後期之 OCPs (Xing & Schwarz, 2005)。

亦有研究指出周邊血液單核球細胞中含有 CD14 的單核球細胞，具有高度分化形成破骨細胞的能力 (Nicholson et al., 2000)。而血液中的 OCPs 被認為具有重要的潛在臨床價值，亦即 OCPs 基因庫的多寡會決定形成破骨細胞的數量；PBMC 中 OCP 的水平可作為臨床診斷，來評估骨質流失的風險和對治療的反應，如患有乾癬性關節炎 (psoriatic arthritis, PsA) 的病人，PBMC 中的 OCPs (CD11b<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup>) 會有顯著性的上升 (Ritchlin, Haas-Smith, Li, Hicks, & Schwarz, 2003)，因此血液中的 OCPs，可能代表一種新的策略來預防或治療破骨細胞所調節的骨質流失。然而儘管 OCPs 本身並無骨分解的能力，

但在循環系統中 OCPs 的數量可能與成熟破骨細胞的數目有直接相關(Xing & Schwarz, 2005)。

## (二) 破骨前驅細胞的分化與成熟

造血細胞中的生長因子，經由細胞激素(GM-CSF 和 M-CSF)作用後，早期的破骨前驅細胞會大量繁殖(Lorenzo, Sousa, Fonseca, Hock, & Medlock, 1987)，此為細胞增殖期，此時細胞膜上受體受到作用後，會啟動 Ras/Raf/MEK/ERK 的訊息傳遞路徑，活化細胞核內的轉錄因子 Ets(Chang et al., 2003)，進而啟動 c-Fms 的轉錄作用，經轉譯作用後於破骨前驅細胞表面表現出 c-Fms 蛋白。當進入分化時期，破骨前驅細胞上面的 c-Fms 受到 M-CSF 作用後，會誘發細胞表現出 RANK(Arai et al., 1999)，經由 RANKL 的作用後，RANK 會招募細胞質內的腫瘤壞死因子受體相關因子-6(TNF receptor associated factor 6, TRAF-6)，使其刺激 I $\kappa$ B kinase (Malm, et al.)複合體的活化，造成 I $\kappa$ B- $\alpha$  與 NF- $\kappa$ B 之複合體磷酸化，隨後藉由泛素蛋白酶體的蛋白水解作用，造成 I $\kappa$ B- $\alpha$  降解 (degradation)，釋放出活化的 p50/p65 次體，即為 NF- $\kappa$ B，並進入細胞核內進行隨後的轉錄作用(Xu et al., 2009)。近年來有學者以 RAW-D 和 RAW-N 細胞，與 RANKL 和 TNF- $\alpha$  共同培養後，分析細胞於第 4、8、16、32、48 與 72 小時的變化情形，結果指出當破骨前驅細胞上的 RANK 經 RANKL 刺激後，會於細胞表面迅速表現出樹突狀細胞特異性跨膜蛋白 (dendritic cell-specific transmembrane protein, DC-STAMP)(Kukita et al., 2004)，這將會使單核破骨前驅細

胞融合成多核破骨前驅細胞(Yagi, et al., 2005)，並進一步受 RANKL 作用，形成具有蝕骨能力的破骨細胞(Roodman, 2006)。

### (三) 補充 HMB 對破骨細胞的影響

破骨細胞是由骨髓中造血幹細胞的單核前驅細胞(mononuclear precursors)所分化而成，為主要的骨骼再吸收細胞，會清除老化或凋亡的骨質，再與造骨細胞交互作用，以維持體內鈣離子平衡和骨骼健全發展。於 C7 這種破骨祖細胞系(osteoclast progenitor cell line)的培養中發現，給予 M-CSF 的刺激後會活化細胞的分化，並於細胞表面會顯露出 RANK，是破骨細胞的分化過程中必要的訊息受體(Nakagawa et al., 1998)。且受到 RANKL 的作用，會誘使破骨細胞的分化與生成(Roodman, 2006)。其中於表現出 RANK 的單核細胞中，RANKL 的刺激會促使 NF- $\kappa$ B 的活化(Anderson, et al., 1997)。NF- $\kappa$ B 在 RANKL 所誘發的破骨細胞生成中，被認為是主要的下游(downstream)調控因子(Xing, et al., 2002)。當 NF- $\kappa$ B 路徑受到抑制之後，會降低 RANKL 所誘發的破骨細胞生成(Jimi et al., 2004)。而動物實驗發現，補充 HMB 會抑制腫瘤細胞內 NF- $\kappa$ B 傳導路徑中部分蛋白質的表現量(Nunes, et al., 2008)，據此推測，補充 HMB 後，高度依賴 NF- $\kappa$ B 路徑的破骨細胞分化、熟成過程會受到抑制，減緩破骨細胞的生成，進而降低骨分解作用，減少骨質流失。然而目前仍無直接證據指出，補充 HMB 後會對破骨細胞會產生何種影響，因此以下將進行探討可能之機制。

#### (四) NF- $\kappa$ B 於破骨前驅細胞生成之作用

NF- $\kappa$ B 最早於 1980 年代被指出為調控 B 淋巴細胞(B lymphocytes)中免疫球蛋白(immunoglobulin)基因的轉錄作用(Singh, Sen, Baltimore, & Sharp, 1986)。近年來發現，主要是由 p50、p52、p65(RelA)、c-Rel 以及 RelB 所組成(Karin, Yamamoto, & Wang, 2004)。為活化下游的基因表現，NF- $\kappa$ B 分子形成二聚體，與其抑制蛋白 I $\kappa$ B 的解離後活化，並進入至細胞核內與 DNA 接合。Vaira 等人(2008)於缺乏 p65 基因表現的老鼠和正常老鼠作為控制組研究後相比，血清中的 CTX 明顯的較低，並在細胞實驗中給予 RANKL 的刺激後發現，缺乏 p65 基因的老鼠骨髓即使給予 RANKL 也無助於破骨細胞的生成(Vaira, et al., 2008)。此外，於體外(in vitro)研究中以 RAW<sub>264.7</sub> 細胞給予 RANKL(100 ng/ml)的刺激，以導致破骨細胞的生成，亦發現若給予藥物刺激 I $\kappa$ B- $\alpha$  的蛋白表現量，會抑制 p65 轉移至細胞核內，進而抑制破骨細胞生成(Yip et al., 2004)。綜合上述研究，若增加細胞內 I $\kappa$ B- $\alpha$  的含量，會降低 NF- $\kappa$ B 的 p65 次體進入細胞核之內，而減少破骨細胞的生成。

### 第六節 本章總結

綜觀上述研究可發現，負重性運動訓練所產生的機械性應力，會提高造骨細胞的活性，且運動過程中所生成的 ROS，將會誘發 NF- $\kappa$ B 的活化與提高 RANKL 的分泌，皆會進而促使破骨細胞的熟成。而 HMB 則會藉由增加 GH/IGF-1 的分泌提高骨合成作用，且抑制泛素蛋白酶體的蛋白質水解作用，

降低 NF- $\kappa$ B 的活化，可能因此減少破骨細胞的生成，降低骨分解作用。可發現負重性運動與補充 HMB 皆會提高骨合成作用，但對於骨分解作用會呈現出不同的作用情形，因此本研究將觀察舉重運動員於負重性運動訓練週期中，若給予補充 HMB 後，是否將會改變骨質代謝作用。

## 第參章 研究方法

### 第一節 實驗樣本的來源及控制

本研究將自國立台灣體育運動大學舉重隊招募自願男性受試者共 16 位，年齡 18-22 歲。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、大量飲用咖啡等可能影響骨骼代謝指標的因素。在運動訓練週期間受試者攝取水分與食物不予限制，但須配合進行飲食紀錄。運動訓練週期內受試者運動訓練時間與強度，依教練訓練計畫所指示，不另行介入，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。

### 第二節 實驗設計

本實驗將採取實驗組 (experimental group) 與控制組 (control group) 的對照測試，所有受試者依照年齡及量級平均分為兩組，實驗組於賽前訓練期間接受 HMB 增補，控制組在同一時間則服用安慰劑，於九十九年舉重競賽所進行準備為期四週的賽前訓練期，受試者在四週的實驗期每日服用 3 克之 HMB 膠囊，共服用 28 天，直到比賽開始。採用雙盲研究 (double blind) 測試，各項操作因子如下述各點所示。

1. 運動控制：受試者需配合教練所指示之訓練計畫內的各項訓練項目，訓練期間要求避免參與額外之高強度身體活動或體能訓練等行為，避免不同的活動量造成骨質代謝產生差

異。

2. 實驗問卷：由研究人員以問卷方式取得受試者之個人基本資料、健康史、牛奶攝取量、藥物與營養補充品使用情形。以及吸菸與酒精攝取量等不利於骨質代謝之因子。
3. 運動訓練：運動訓練依照教練所安排之計畫執行，賽前訓練期之中，每位受試者將進行五次採血檢測。
4. 飲食控制：四週的實驗期間，受試者飲食不予以限制，飲食狀況依據個人需求調整。
5. 營養增補：每日給予 3 克之 HMB 鈣鹽製劑 (Calcium salt, GNC, Pittsburgh, USA)，受試者在實驗期的第 1 天起，連續服用 28 天，以同樣的膠囊包裝 HMB 與等體積之纖維素與澱粉(安慰劑)，並均等分為兩份於飯後服用。

### 第三節 實驗流程

16 名自願受試者於填寫完受試者同意書、基本資料、練習狀況與飲食回顧問卷後，依年齡與體重平均分配為控制組與實驗組各 8 名，於為期四週的賽前訓練期間，採取單盲測試方式給予補充安慰劑與 HMB，避免選手產生心理性的影響。給予問卷，紀錄每日訓練量、疲勞程度和飲食記錄，並且確認營養增補劑有無確實服用。每週進行採血分析各項血液生化指標，如下圖所示。

#### 第四節 血液樣本採集

採血當天於早晨八點時，由合格護理人員採集空腹時血液樣本 30 ml。各別取 10 ml 裝入含有 EDTA、heparin 做為抗凝劑的冰涼試管中，於 4°C、速度 3000 轉，離心 10 分鐘分離出血漿，置於 -70°C 冰箱，並於 48 小時內進行骨代謝指標 (beta-crosslaps、osteocalcin、bone-specific alkaline phosphatases、osteoprotegerin 與 RANKL) 之濃度與活性分析。

#### 第五節 血液分析與方法

##### 一、酵素連結免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

##### (一) 血漿中 OPG 濃度之分析

使用 ELISA 分析血漿中 OPG (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) 濃度，針對血漿中 OPG 濃度進行定量檢測。分析步驟為 capture antibody 100 $\mu$ l (2.0 $\mu$ g/ml mouse anti-human OPG) 注入 96 孔盤中，於室溫下 (18-26°C) 避光靜置八小時後，以 300 $\mu$ l 之緩衝液 (0.05% Tween20 in PBS, PH 7.2) 清洗 4 次，加入 100 $\mu$ l 血液樣本與標準品濃度以 4ng/ml recombinant human OPG 之等倍稀釋，避光靜置一小時後以 300 $\mu$ l 緩衝溶液清洗 4 次，再加入 detection antibody 100 $\mu$ l (200  $\mu$ g/ml biotinylated goat anti-human OPG)，避光靜置二小時後以，300 $\mu$ l 緩衝溶液清洗 4 次，加入二級抗體 streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase 反應 20 分鐘後以 300 $\mu$ l 緩衝溶液清洗 4 次，加入 substrate solution 靜

置反應 20 分鐘後，加入 50 $\mu$ l stop solution(1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，以 ELISA Reader (xMark<sup>TM</sup>, Bio-Rad, Hercules, California, U.S.) 測量 450nm 吸光值，Reference reader 測量 540nm 吸光值。

## (二) 血漿中 sRANKL 濃度之分析

使用 ELISA 分析血漿中 sRANKL(PeproTech Inc., Princeton Business Park, Rocky Hill, NJ, USA)濃度，針對血漿中 sRANKL 濃度進行定量檢測。分析步驟為 capture antibody 100 $\mu$ l (1.0 $\mu$ g/ml antigen-affinity purified mouse anti-hsRANK-ligand)注入 96 孔盤中，於室溫下(18-26 $^{\circ}$ C)避光靜置八小時後，以 400 $\mu$ l 之緩衝液(0.05% Tween20 in PBS, PH 7.2)清洗 3 次，加入 100 $\mu$ l 血液樣本與標準品濃度以 4ng/ml recombinant hsRANK-ligand 之等倍稀釋，避光靜置一小時後以 400 $\mu$ l 緩衝溶液清洗 3 次，再加入 detection antibody 100 $\mu$ l (0.5  $\mu$ g/ml biotinylated antigen-affinity purified rabbit anti-hsRANK-ligand)，避光靜置二小時後以 400 $\mu$ l 緩衝溶液清洗 3 次，加入二級抗體 Avidin-HRP conjugated 反應 30 分鐘後以 400 $\mu$ l 緩衝溶液清洗 3 次，加入 substrate solution 靜置反應 9 分鐘後，加入 50 $\mu$ l stop solution(1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，以 ELISA Reader(xMark<sup>TM</sup>, Bio-Rad, Hercules, California, U.S.) 測量 450nm 吸光值，Reference reader 測量 650nm 吸光值。

## 二、自動免疫分析儀測量

### (一) beta-crosslaps 濃度之分析

使用自動免疫分析儀測量(Roche Elecsys 2010, Roche

Diagnstics, Mannheim, Germany), 以電化學發光免疫分析法 (electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA), 第一次反應 (first incubation) 為取 50  $\mu$ l 的血液樣本和 biotinylated anti-beta-crosslaps 單株抗體一起反應; 血液樣本中的抗原從血液成份中釋出。第二次反應 (second incubation) 為加入表面包覆 streptavidin 的微粒子和鈇化合物 (ruthenium, Ru) 標記對 beta-crosslaps 具特異性的單株抗體之後, 形成三明治複合物, 藉由生物素 (biotin) 和 streptavidin 的交互作用結合。反應混合物吸取至測量室中, 微粒子會被磁力吸引到電極表面, 沒有被吸引的物質隨後經由 ProCell 緩衝液移除, 然後利用電極的電壓引發化學光 (chemiluminescent), 以光電倍增管 (photomultiplier) 進行偵測。藉著校正曲線得到測定結果, 此校正曲線是由儀器專一性二點校正, 以及試劑條碼所提供的曲線而形成。

## (二) osteocalcin 濃度之分析

使用自動分析儀測量 (Roche Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 體外以電化學發光免疫分析法, 針對人類血液中的 N-MID osteocalcin 進行定量測試。分析使用三明治酵素連結免疫吸附法, 第一次反應為 20  $\mu$ l 血液樣本和 biotinylated 具 N-MID osteocalcin 具特異性的單株抗體以及鈇化合物標記具 N-MID osteocalcin 特異性的單株抗體反應形成一個三明治複合物。第二次反應為加入表面包覆 streptavidin 的微粒子之後, 先前形成的複合物就可藉由生物素和 streptavidin 的交互作用結合。反應混合物吸取至

測量室中，微粒子會被磁力吸引到電極表面，沒有被吸引的物質隨後會經由 ProCell 緩衝液移除。然後利用電極的電壓引發化學光，以光電倍增管進行偵測。藉著校正曲線得到測定結果，此校正曲線是由儀器專一性二點校正以及試劑條碼所提供的曲線而形成。

### **(三) PTH 濃度之分析**

使用自動分析儀測量 (Roche Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 體外以電化學發光免疫分析法針對人類血液中的 PTH 進行定量測試。分析使用三明治酵素連結免疫吸附法，第一次反應為 20  $\mu$ l 血液樣本和 biotinylated 具 PTH 特異性的單株抗體以及鈎化物標記具 PTH 特異性的單株抗體反應形成一個三明治複合物。第二次反應為加入表面包覆 streptavidin 的微粒子之後，先前形成的複合物就可藉由生物素和 streptavidin 的交互作用結合。反應混合物吸取至測量室中，微粒子會被磁力吸引到電極表面，沒有被吸引的物質隨後會經由 ProCell 緩衝液移除。然後利用電極的電壓引發化學光，以光電倍增管進行偵測。藉著校正曲線得到測定結果，此校正曲線是由儀器專一性二點校正以及試劑條碼所提供的曲線而形成。

### **(四) cortisol 濃度之分析**

使用自動分析儀測量 (Roche Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 體外以電化學發光免疫分析法針對人類血液中的 cortisol 進行定量測試。分析使用三

治酵素連結免疫吸附法，第一次反應為 20  $\mu$ l 血液樣本和 biotinylated 具 cortisol 特異性的單株抗體以及鈣化物標記具 cortisol 特異性的單株抗體反應形成一個三明治複合物。第二次反應為加入表面包覆 streptavidin 的微粒子之後，先前形成的複合物就可藉由生物素和 streptavidin 的交互作用結合。反應混合物吸取至測量室中，微粒子會被磁力吸引到電極表面，沒有被吸引的物質隨後會經由 ProCell 緩衝液移除。然後利用電極的電壓引發化學光，以光電倍增管進行偵測。藉著校正曲線得到測定結果，此校正曲線是由儀器專一性二點校正以及試劑條碼所提供的曲線而形成。

### 三、自動生化分析儀

#### (一) B-ALP 之濃度分析

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，主波長 405nm，副波長 505nm。

#### (二) 肌酸激酶 (creatine kinase, CK) 之濃度分析

血清中 CK 活性，採用 CicaLiquid CK 商業試劑組 (WAKA, Osaka, Japan)，以全自動生化分析儀檢測 (Hitachi 7020, Hitachi science systems, Ltd, Lbaranki Japan)，吸光值波長 340nm。

### **(三) 乳酸脫氫酶(lactate dehydrogenase, LDH)之濃度分析**

血漿中LDH活性，採用乳酸lactic acid dehydrogenase, LD: lactate dehydrogenase, EC1.1.1.27商業試劑組(WAKA, Osaka, Japan)，以全自動生化分析儀檢測(Hitachi 7020, Hitachi science systems, Ltd, Lbaranki Japan)，吸光值波長340nm。

## **第六節 細胞蛋白分析**

### **一、分離周邊血液單核球細胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)**

取 10ml 全血，放入以 heparin 為抗凝劑的採血管，充分搖勻，以固定式離心機 2000 轉於室溫下離心 15min。離心完後，以可調式微量滴管吸取採血管上層之 plasma，並加入與取出 plasma 約等量的 PBS，混合均勻後備用。另外取 15ml 離心管，加入 1:2 的 ficoll，再緩緩加入已混合均勻的血液，使用固定式離心機以 3500 轉於室溫下離心 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，離心完後，倒掉上清液，留下底層物質即為 PBMC。

### **二、流式細胞儀分析 (flow cytometry analysis)**

#### **(一) PBMC 前處理**

取出 400 $\mu$ l 中含有 4x10<sup>6</sup> 顆細胞的 PBMC，放入離心管中，並於 4 $^{\circ}$ 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 $\mu$ l 的 PBS，均勻混合

細胞後，取出每 100 $\mu$ l 含有 10<sup>6</sup> 顆細胞的 PBS 溶液，並個別依陰性對照 (negative control) 或單一分析 I $\kappa$ B- $\alpha$ 、RANK (陽性對照，positive control) 以及同時分析 I $\kappa$ B- $\alpha$  與 RANK 加入分析試管內。

## (二) 陰性對照 (negative control)

在 100 $\mu$ l 含有 10<sup>6</sup> 顆細胞的 PBS 溶液中，再加入 900 $\mu$ l 含有 0.5% BSA 的 PBS 溶液，均勻混合後，於避光且 4 $^{\circ}$ C 的環境下保存，等待上機分析 (BD FACSCalibur, Franklin Lakes, NJ USA)。

## (三) 陽性對照 (positive control)

### 1. RANK

於室溫，分別將 2  $\mu$ l 的 anti-human RANK/TNFRSF11A-phycoerythrin (R&D systems Inc., Minneapolis, MN, USA) 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 轉離心 3 分鐘後，倒掉上清液，共兩次。取得最後的細胞後與 1ml 含有 0.5% BSA 的 PBS 溶液混和，均勻混和後，於避光且 4 $^{\circ}$ C 的環境下保存，等待上機分析 (BD FACSCalibur, Franklin Lakes, NJ USA)。

### 2. I $\kappa$ B- $\alpha$

加入 250 $\mu$ l 的 fixation/permeabilization solution (BD, Franklin Lakes, NJ USA) 與細胞均勻混和後，於 4  $^{\circ}$ 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 轉離心 3 分鐘後，倒掉上清液，共兩次，將取得的細胞加入 100 $\mu$ l 以 1800 轉離心 3 分鐘後，倒掉上清液，共兩次均勻混和後，加入 2  $\mu$ l 的 anti-human I $\kappa$ B- $\alpha$  and fluorescein conjugates for immunofluorescence(Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA)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 $^{\circ}$ C 的環境下保存，等待上機分析(BD FACSCalibur, Franklin Lakes, NJ USA)。

#### (四) 雙染(double stain)分析

於室溫，分別將 2  $\mu$ 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 轉離心 3 分鐘後，倒掉上清液，共兩次。取得最後的細胞後，加入 250 $\mu$ l 的 fixation/permeabilization solution(BD, Franklin Lakes, NJ USA)與細胞均勻混和後，於 4 $^{\circ}$ 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 轉離心 3 分鐘後，倒掉上清液，共兩次，將取得的細胞加入 100 $\mu$ l 以 1800 轉離心 3 分鐘後，倒掉上清液，共兩次均勻混和後，加入 2  $\mu$ l 的 I $\kappa$ B- $\alpha$  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 $^{\circ}$ C 的環境下保存，等待上機分析(BD FACSCalibur, Franklin

Lakes, NJ USA)。

## 第七節 資料處理與統計分析

所有數據皆以平均值±標準誤呈現，使用重複量數單因子變異數分析(repeated measurement one-way ANOVA)探討訓練期間骨骼代謝生化指標的變化情形。並以獨立樣本 T 檢定(independent samples T test)，分析檢視補充 HMB 對於骨質代謝指標在整個訓練期各採樣點間是否產生差異。若變異數檢定達顯著水準，則以 Fisher's least significant difference(LSD)進行事後比較，所有數據皆使用 SPSS 12.0 統計軟體分析，顯著水平設定為  $P < 0.05$ 。

## 第肆章 結果

### 第一節 受試者基本資料

本研究以國立台灣體育運動大學舉重隊 16 名健康男性選手為受試者，年齡為  $21.07 \pm 1.62$  歲，身高為  $170.31 \pm 6.56$  公分，體重為  $87.34 \pm 18.52$  公斤(表 1)。

### 第二節 訓練量與肌肉損傷指標

選手於訓練期第一週即開始大量的運動負荷；第二週訓練量為恢復前一週大量訓練後所造成的疲勞，且維持體能狀況，訓練量降為平時訓練水平；第三週又再略為提升訓練量，並為了因應第四週之後的比賽到來，於第四週再度降低訓練量(圖 2)，除維持體能狀況外，並藉此恢復一連串訓練後所造成的疲勞。此外，選手的訓練模式，為每週一至週五皆會進行阻力運動訓練，第一週的訓練項目如附錄一，隨後藉由調整阻力性運動的重量與反覆次數，來降低其運動強度。肌肉損傷指標 LDH，兩組於訓練期第一週起即顯著性上升，隨後有逐漸恢復之現象，但直至訓練期結束仍舊高於訓練期前的水平。另一肌肉損傷指標 CK，則兩組皆持續上升至第二週後便逐漸恢復至訓練前水平，僅 HMB 組於第二、三週有較 baseline 來得高，兩組間並無顯著性差異(圖 3、4)。

### 第三節 單核細胞表面 RANK 與細胞內 $I\kappa B-\alpha$ 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(圖 5)。PBMC 內  $I\kappa B-\alpha$ ，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(圖 6)。進一步觀察 PBMC 中，細胞表面具有 RANK 受體的單核球細胞其  $I\kappa B-\alpha$  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(圖 7)。

#### 第四節 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(圖 8)。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於 baseline(圖 9)。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(圖 10)。

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。

### 第五節 骨質代謝相關荷爾蒙之結果

調鈣性荷爾蒙 PTH，placebo 組第一週顯著下降後，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，HMB 組的變化趨勢相似，但第一週並無顯著下降，自第二週起開始上升，並於第三、四週達顯著性上升(圖 11)。cortisol 於兩組之間呈現出相似的變化，皆為先上升後降至訓練前水平，僅於 HMB 組第一週達顯著性的上升，且兩組間無明顯的差異性(圖 12)。

### 第六節 骨調控蛋白之結果

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，但仍未達統計上的顯著水平( $p=0.75$ )，而 placebo 組則呈現緩慢上升至訓練期第二週後，開始逐漸恢復至訓練前水平，兩組之間並無統計上顯著差異(圖 13)。HMB 與 placebo 組，OPG 呈現一致性的變化，有趣的是，這變化趨勢與訓練量的變化趨勢相近(圖 14)。

## 第五章 討論

本研究延伸自本研究室 2009 年舉重選手經長時間訓練後骨質代謝變化之研究，最重要的發現為，舉重選手於補充 HMB 後會增加骨合成作用，並具有減緩骨分解作用之趨勢。在為期四週的訓練期之內，兩組之間肌肉損傷指標的變化並無明顯的差異，變化的趨勢亦甚為相同，這顯示補充連續補充四週 HMB 對於舉重訓練所造成的肌肉損傷並無太大影響，而主要可能影響到體內其它部分，如本研究所探討之骨質代謝方面。於四週的舉重訓練期間，無論是 HMB 組或 placebo 組，骨合成礦化指標皆持續的上升，且 placebo 組的骨分解指標持續且明顯的上升至訓練期結束，而補充 HMB 後則減緩此一現象。在運動期間影響骨質代謝變化的原因，為體內骨調控蛋白 OPG、sRANKL 或骨調控荷爾蒙 PTH、cortisol 等，其濃度改變所致，本研究中發現，有無補充 HMB 對於骨合成分解指標亦有所影響。目前 HMB 的相關研究，多著墨於減緩肌肉損傷、加快疲勞恢復與增加淨體重等功用 (Wilson, et al., 2008)，然而對於骨質代謝之相關研究仍知之甚少，目前僅有部分動物研究指出補充 HMB 對於骨質所產生的影響 (Bieñko, et al., 2006; Tatara, 2008<sup>b</sup> & 2009; Tatara, et al., 2007; Tatara, et al., 2008<sup>a</sup>)。本研究首次以人體為研究對象，探討舉重選手在四週訓練期之中補充 HMB 後，對於骨質代謝之影響。

在 HMB 與骨質的相關研究之中，補充 HMB 除被認為會增加 IGF-1 與 GH 的分泌，以增加造骨細胞提升骨合成作用

外(Tatara, 2008<sup>b</sup> & 2009)，近來研究亦發現，HMB 具有抑制泛素蛋白酶體(ubiquitin-proteasome)的作用，而降低轉錄因子 NF- $\kappa$ B 的活化(Nunes, et al., 2008; Portal, et al., 2010; Smith, et al., 2004)，而當 NF- $\kappa$ B 被抑制後，可減緩破骨細胞生成與抑制破骨細胞功用(Vaira, et al., 2008; Zavrski et al., 2005)。在本研究中，主要探討 HMB 是否藉由破骨細胞前驅細胞中 RANK 與 RANKL 鍵結後的訊息傳遞作用來影響破骨細胞的生成，進而導致舉重選手於訓練期之中的骨質代謝作用產生變化。

先前研究中指出，無論運動的強度大小，運動後多會伴隨著 NF- $\kappa$ B 的活化(Kim et al., 2009)，此一現象的產生，主要被認為是運動會增加細胞內 ROS 的生成(Powers & Lennon, 1999)，進而使下游的轉錄因子 NF- $\kappa$ B 受到活化(Hollander, et al., 2001)。若平時有進行規律運動習慣者，則會減緩因運動所引發 NF- $\kappa$ B 的活化，以及其誘發的肌肉損傷現象(Jimenez-Jimenez, et al., 2008)。本研究中發現，有無補充 HMB，訓練期中肌肉損傷指標 CK 與 LDH 並無差異，然而 van Someren、Edwards 與 Howatson(2005)在一般健康男性且無阻力運動訓練經驗者，給予每日補充 3 g HMB 和 0.3 g KIC 或是 3 g 安慰劑，於 14 天後進行 70% 的最大肌力(1 repetition maximum, 1RM)來引發肌肉損傷現象後發現，補充 HMB 組其肌肉損傷指標 CK 要顯著低於補充安慰劑組(van Someren, Edwards, & Howatson, 2005)，另一方面，在 40 位有阻力訓練經驗者，給予連續 4 週補充 0 g、3 g 與 6 g 的 HMB 後，給予單次最大肌力(1 RM)的運動來誘發肌肉損傷，在肌肉損

傷指標方面並無明顯的差異 (Kreider, Ferreira, Wilson, & Almada, 1999)，此一結果與本研究一致，比較上述結果，推測此差異可能與受試者是否有持續性的規律運動，產生適應性現象有關。因此於本研究中，訓練並無引發嚴重的肌肉損傷現象，以及過多的發炎現象。

由於本研究之受試者為經長期的阻力運動訓練之舉重選手，且訓練模式為每週一至週五連續不間斷之方式，其中訓練量變化於第一週顯著的上升，隨後逐漸減少，因此本研究的訓練過程中，可能於第一週會產生較高的氧化壓力，造成 NF- $\kappa$ B 的活化，隨後逐漸減少，但這仍須未來進一步的研究證實。

#### 一、運動刺激對骨骼的影響

目前許多研究證實，運動時所產生的機械性應力為主要調節骨骼生理結構和功能的作用。機械性應力具有刺激骨細胞之功能，使造骨細胞活化，並增進骨骼結構的完整性 (Ruimerman, Hilbers, van Rietbergen, & Huiskes, 2005)。另一方面，運動也會誘使 ROS 的生成 (Hollander, et al., 2001)，進而刺激造骨細胞生成 sRANKL (Bai, et al., 2005)，促使破骨細胞的分化與成熟，增加骨質分解作用。已有研究指出，高衝擊性的負重性運動相較耐力型運動，對於骨骼具有較多的益處 (Lanyon, 1992)，而舉重運動為一種加重負重型的運動型態，過往研究經長時間訓練的舉重選手，其骨骼合成指標 B-ALP 與 osteocalcin 皆明顯較一般受試者高 (Karlsson, Vergnaud, Delmas, & Obrant, 1995)，顯示舉重選手具有較高

的骨合成代謝作用。

### (一) 運動刺激對骨質代謝產物之影響

在訓練期之中，骨礦化指標 osteocalcin 前兩週 (W1、W2) 無明顯的變化，於第三週開始顯著的上升至第四週訓練結束；骨分解指標 beta-crosslaps 自訓練期開始即緩慢上升，並同樣在後兩週顯著的上升至訓練結束；骨合成指標 B-ALP 於訓練期之內皆無明顯改變。目前研究顯示長期阻力性運動訓練對於一般民眾和平時身體活動量較低者，於骨質合成作用，以及增加骨質密度有較為明顯的效益 (Fujimura, et al., 1997; Ryan, et al., 1994)，於規律運動者亦發現到相似之結果 (Nishiyama, Tomoeda, Ohta, Higuchi, & Matsuda, 1988)。Creighton 等人 (2001) 的研究指出 34 名健康大學女性運動員，依據其專長運動項目的不同，分為高衝擊負荷組 (籃球、排球)、中等衝擊負荷組 (足球) 和無衝擊負荷組 (游泳) 以及 7 名過去一年內每週運動低於 1 小時的控制組，在完成各自賽季內兩週的訓練之後，檢測其骨質密度與骨合成指標 osteocalcin，和骨分解指標 NTX 後發現，高衝擊負荷組其全身骨密度明顯高於其於各組，且中等衝擊負荷組亦明顯較無衝擊負荷組高，高衝擊負荷組與中等衝擊負荷組骨合成指標 osteocalcin 較無衝擊負荷組高 (Creighton, et al., 2001)。且在先前的研究中，招募 140 名軍人在經過 15 週的軍事訓練之後，骨合成指標 osteocalcin 及 total-ALP 皆有顯著增加 (Casez et al., 1995)，綜合上述研究發現，在有訓練經驗者身上，經過一段時間的訓練之後，骨合成指標皆會上升，這與本研究

結果相似，並且同樣是男性舉重選手，Karlsson 等人(1995)的結果也證實舉重選手其骨礦化指標 osteocalcin 較一般受試者較高(Karlsson, et al., 1995)。本次研究另外發現，骨分解指標 beta-crosslaps 在訓練後期(W3、W4)顯著增加，於先前有規律運動習慣者的研究之中，Woitge 等人(1998)在經過 8 週，每週 3 次，每次 60 分鐘的無氧訓練之後發現，骨合成指標 B-ALP 與 osteocalcin，以及骨分解指標 PYD 皆有顯著性的上升(Woitge et al., 1998)，對照本研究結果發現，於長時間負重性運動訓練之中，負重訓練刺激會增加骨骼的礦化作用，持續性的負重訓練，同樣使骨分解作用逐漸上升，造成骨周轉率的上升。

## (二) 運動刺激對骨調控蛋白之影響

骨調控蛋白於四週訓練期中，OPG 與 sRANKL 的變化大致呈現出交互消長的現象，前兩週 sRANKL 呈現出上升的趨勢，於後兩週則下降，OPG 則與訓練量呈現出相似的變化，前兩週為先上升再下降，並在第三週再次上升，第四週再下降之情形，但皆未達顯著性變化。Ziegler 等人(2005)認為單次長時間的耐力性跑步運動後，會影響 OPG 與 sRANKL 之間的平衡狀態，造成 OPG 的濃度上升，sRANKL 的濃度下降，其中 OPG 的上升與跑步的距離成正比，顯示跑步運動中，地面給予的反作用力刺激骨骼，使造骨細胞活化，釋放出較多的 OPG。且在有規律月經週期的女性，探討運動對於體內骨骼調控蛋白之影響中發現，有規律運動習慣的女性，其 OPG 較坐式生活者，明顯要高出 26%，再次顯示規律的運動對於

OPG 有正面的影響 (West, Scheid, & De Souza, 2009)，這與本研究中，訓練量與 OPG 的變化趨勢相似之情形相符合。因此，無論是規律性的身體活動 (West, et al., 2009)，或長期劇烈性運動 (Ziegler, et al., 2005)，都能夠直接影響 OPG 的濃度，可能是由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。已有研究顯示，運動過程中所產生的機械性應力，會對骨骼產生微小損傷，此時會誘發破骨細胞作用，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)，對照本研究結果，sRANKL 於前兩週先上升的趨勢與骨合成指標 B-ALP 相似，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。

### **(三) 運動刺激對單核球細胞上 RANK 與 I $\kappa$ B- $\alpha$ 之影響**

血液單核球細胞膜上 RANK 於四週負重性運動訓練中，第一週顯著上升，隨後於第二週恢復至訓練前水平，並持續維持到訓練結束，而細胞內 I $\kappa$ B- $\alpha$  於第一週顯著下降，並維持此一顯著下降水準至訓練結束，若僅觀察含有 RANK 單核球內的 I $\kappa$ B- $\alpha$  則發現，其變化趨勢與 RANK 一致。過去研究

發現，運動或肌肉收縮皆會造成 ROS 的上升 (Kamata, Manabe, Oka, Kamata, & Hirata, 2002; Muller, et al., 1997)，且隨後導致 NF- $\kappa$ B 的活化，其中於單一次急性劇烈運動後，發現磷酸化後的 I $\kappa$ B- $\alpha$  (phosphor-I $\kappa$ B- $\alpha$ , pI $\kappa$ B- $\alpha$ ) 會顯著性的減少，且 NF- $\kappa$ B 的活性上升 (Ha et al., 2004; Ho et al., 2005; Ji, Gomez-Cabrera, Steinhafel, & Vina, 2004)，顯示單次高強度的運動過後，運動所造成 NF- $\kappa$ B 的活化現象，是由於運動壓力促使 ROS 的生成增加，促使 I $\kappa$ B- $\alpha$  分解，釋放出 p50/p65 次體，即 NF- $\kappa$ B。進一步在長期訓練之中則發現，老鼠在經過 12 週的跑步機運動訓練後，會導致 I $\kappa$ B- $\alpha$  蛋白顯著下降 (Spangenburg, Brown, Johnson, & Moore, 2006)，顯示於規律運動後，會逐漸適應訓練強度，使得 NF- $\kappa$ B 路徑的活化現象減少。本研究中的受試者皆為有長期訓練經驗者，因此綜合上述研究發現，有規律運動習慣者，在多天期的負重運動訓練期之中，於訓練初期較高的訓練負荷情況下，運動刺激 ROS 的生成，促使 NF- $\kappa$ B 的活化 (Kramer & Goodyear, 2007)，造成整體 I $\kappa$ B- $\alpha$  蛋白顯著下降，並且 ROS 的生成與阻力運動訓練量呈正比 (Margonis, et al., 2007)，因此在減量訓練的影響下，ROS 的生成隨訓練量逐漸減少而趨於穩定，但仍持續誘發 NF- $\kappa$ B 的活性，使 I $\kappa$ B- $\alpha$  維持一穩定較低的水平，且 RANK 訊息傳遞路徑活化，會增加破骨細胞的分化與成熟 (Ha, et al., 2004)，也因為當單核球細胞膜上含有 RANK 時，被認為是破骨前驅細胞 (Nakagawa, et al., 1998)，對照本研究首次觀察在多天期負重訓練中 RANK 的變化，推測在訓練初期單核球細胞被逐漸誘發成破骨前驅細胞，且運動刺激增加 ROS 的生

成，導致大量 NF- $\kappa$ B 活化，促使破骨細胞的分化與熟成，隨後因逐漸適應訓練模式與強度，使 NF- $\kappa$ B 與破骨前驅細胞的生成趨於穩定。因此本研究中，訓練量在第一週明顯的增加，也促使 I $\kappa$ B- $\alpha$  的大量分解，誘使 NF- $\kappa$ B 的大量活化，隨後第二週當舉重選手訓練量下降時，ROS 的生成隨之減少 (Margonis, et al., 2007)，降低 NF- $\kappa$ B 的活化現象，減緩 I $\kappa$ B- $\alpha$  的降解作用，因此本研究中的 I $\kappa$ B- $\alpha$  於第二週起便呈現一穩定水平，然本研究中之舉重選手每天都會接受訓練，與 Margonis 等人 (2007) 每週僅訓練兩天的訓練模式不同，因而即使訓練量逐漸減少，但 ROS 可能仍受每日運動刺激作用而持續穩定生成，促使一定量的 I $\kappa$ B- $\alpha$  降解。

#### (四) 運動刺激對骨代謝相關荷爾蒙之影響

四週負重性運動訓練中，骨調控荷爾蒙 PTH 於第一週顯著下降後，隨後便呈現上升之趨勢，並於第三、四週達顯著水平，cortisol 則於前兩週逐漸上升，後兩週便開始恢復至訓練前水準，但訓練期中，組內並無顯著性變化。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)，皆發現單一次運動後會提升血漿中 PTH，推測這可能是單一次運動後，血鈣隨著汗液與尿液的排出，導致體內鈣離子未達恆定狀態，促使 PTH 濃度上升，以調節鈣離子濃度，但於訓練期第一週中，PTH 為顯著性的下降，可能因本研究中，選手的訓練模式為每天進行高強度的阻力運動訓練，因此在連續多

天的負重性運動訓練期，一開始高負重訓練所產生的機械性應力致使骨分解作用下降(Ruimerman, et al., 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)，因而恢復骨分解作用的產生，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，顯示體內的分解性作用自第二週起逐漸下降，可能因訓練量逐漸減少所致。

#### **(五) 運動刺激對於造/破骨細胞之影響**

破骨前驅細胞在分化熟成為成熟的破骨細胞過程時，主要是由前驅細胞膜上的 RANK 受體與 RANKL 結合後，啟動細胞內一連串的訊息傳遞路徑(如 JNK、NF- $\kappa$ B、p38 等)，使破骨前驅細胞逐漸分化且熟成為破骨細胞(Boyce et al., 2005)。目前研究指出，當 RANKL 刺激細胞膜上的 RANK 受體時，會誘發細胞內的 ROS 生成，使破骨細胞熟成(Koh et al., 2006; Lee et al., 2005)，另一方面，Bai 等人(2005)發現，人類的類造骨細胞(osteoblast-like)，MG63，給予 ROS 的刺激

後，能夠顯著提升 RANKL 的 mRNA 與蛋白表現量(Bai, et al., 2005)，這意味著，當造骨細胞受到 ROS 的刺激後，會促使造骨細胞分泌更多的 RANKL，來刺激破骨前驅細胞的分化與成熟。綜上所述，運動刺激會誘使 ROS 的生成(Hollander, et al., 2001)，來刺激造骨細胞分泌 RANKL(Bai, et al., 2005)，並誘發破骨前驅細胞的分化與成熟(Ha, et al., 2004)，且 RANKL 亦會刺激破骨前驅細胞，使細胞內 ROS 生成(Lee, et al., 2005)，同樣會導致破骨前驅細胞的分化與成熟。因而運動除運動時所產生的機械性應力，具有誘發造骨細胞活性的能力外，運動時體內所產生的 ROS 亦會刺激造骨細胞分泌 RANKL，並促使破骨前驅細胞的分化與成熟。

## 二、補充 HMB 後對骨骼之影響

於動物實驗中已驗證，補充 HMB 被認為具有增加骨質合成作用，並降低骨質分解作用，以提升骨質機械性質之效用(Bieñko, et al., 2006; Tatara, 2008<sup>b</sup> & 2009; Tatara, et al., 2007; Tatara, et al., 2008<sup>a</sup>)。本研究為首次於人體實驗中驗證，補充 HMB 後對於骨質代謝相關指標的影響，並與已知對於骨質代謝有許多益處的負重性運動刺激相對照，觀察在多天期的負重訓練中，補充 HMB 後對於骨質代謝之影響，以下將探討，於訓練期中，補充 HMB 後對於骨質代謝指標、骨調控蛋白、骨代謝相關荷爾蒙與循環中的單核前驅細胞中 RANK 和 I $\kappa$ B- $\alpha$  變化之影響。

### (一) 補充 HMB 對骨質代謝指標之影響

選手在補充 HMB 後，骨合成指標都有顯著性的增加，其中 B-ALP 於第一週即明顯的上升，並於訓練期呈現上升之趨勢；osteocalcin 於前三週並無明顯變化，第四週急遽上升並達統計上的顯著性。骨分解指標 beta-crosslaps 於訓練期之中，前兩週呈現些許下降之趨勢，然而在第三、四週開始逐漸上升至訓練前水平。本研究結果顯示補充 HMB 後，有助於提升骨合成作用，且降低骨分解作用，過往的動物研究中發現，在剛出生的小羊連續補充 HMB 21 天後，分析其 21 天時的骨代謝指標 B-ALP、osteocalcin、beta-crosslaps 與犧牲後 (137±3.7 Day) 其股骨的骨骼機械性質，結果顯示，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, 2008<sup>b</sup>)，這與本研究結果相呼應，且 Langberg 等人 (2000) 指出，在長時間、高強度的全身性負重運動後，會發現骨分解指標 ICTP 的顯著上升 (Langberg, et al., 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 確實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)。

## (二) 補充 HMB 對骨調控蛋白之影響

連續四週補充 HMB 期間，骨調控蛋白 sRANKL 呈現緩慢但持續上升的趨勢直至訓練期結束，OPG 則與訓練量呈現出相似之變化。本研究為第一次觀察補充 HMB 後對於骨調控蛋白 OPG 與 sRANKL 之影響，發現補充 HMB 後，OPG 的變化趨勢仍舊與訓練量一致，顯示 OPG 的分泌依然主要會受到運動訓練的直接影響 (Saunders, et al., 2006)，因此 HMB 並不影響 OPG 分泌情況，但似乎會影響 sRANKL 的分泌，目前雖無研究指出，補充 HMB 後對於 sRANKL 是否產生直接影響，但由本研究結果 B-ALP 之變化，推測是補充 HMB 後因提高造骨細胞的合成，且運動所誘發 ROS 的生成，使 ROS 刺激造骨細胞分泌 sRANKL (Bai, et al., 2005)，所以補充 HMB 後因造骨細胞的合成增加，因而提高由 ROS 刺激造骨細胞後所生成的 sRANKL 分泌。

## (三) 補充 HMB 對單核球細胞上 RANK 與 I $\kappa$ B- $\alpha$ 之影響

過去研究發現，在帶有腫瘤組織的老鼠補充 HMB 後，有助於減少腫瘤內 NF- $\kappa$ B，並增加其抑制蛋白 I $\kappa$ B- $\alpha$  (Nunes, et al., 2008)，這是因為 HMB 具有抑制泛素蛋白酶體水解之效用 (Smith, et al., 2005; Smith, et al., 2004)，然而運動則會促進 NF- $\kappa$ B 的活性並減少 I $\kappa$ B- $\alpha$  的量 (Ho, et al., 2005; Ji, et al., 2004; Jimenez-Jimenez, et al., 2008)，本研究為首次結合這兩者進行觀察，發現無論有無補充 HMB，訓練一週後 I $\kappa$ B- $\alpha$  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- $\kappa$ 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 $\kappa$ B- $\alpha$  的水平，有研究指出，當 PBMC 中 I $\kappa$ B- $\alpha$  的含量越低時，其 pI $\kappa$ B- $\alpha$  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 $\kappa$ B- $\alpha$  堆積，則仍有待進一步研究證實。目前已有研究證實，於單核球細胞中若含有 RANK，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，可能為補充 HMB 組初期的破骨細胞生成減少，也因其抑制泛素蛋白酶體之作用 (Smith, et al., 2005)，對照本研究 I $\kappa$ B- $\alpha$  之結果，顯示補充 HMB 後抑制泛素蛋白酶體的作用減少 NF- $\kappa$ B 的活化，降低破骨細胞的分化與熟成，因而造成細胞代償性的增加 RANK 以提升部分破骨細胞的熟成，來維持骨代謝平衡。而訓練期第三週 I $\kappa$ B- $\alpha$  持續減少，並於第四週組間達顯著差異，為 NF- $\kappa$ B 除了具有促進細胞的分化與熟成的功能外，仍是 I $\kappa$ B- $\alpha$  生成的主要因子 (Chen & Greene, 2004)，故補充 HMB 後，降低 NF- $\kappa$ B 的活化，減少其進入細胞核內啟動 I $\kappa$ B- $\alpha$  的再生成，造成 HMB 組的 I $\kappa$ B- $\alpha$  顯著低於 placebo 組。若進一步觀察含有 RANK 單核球細胞內 I $\kappa$ B- $\alpha$  的變化量發現，其變化趨勢與含有 RANK 單核球的變化一致，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。

#### **(四) 補充 HMB 對骨代謝相關荷爾蒙之影響**

於四週負重性運動訓練中補充 HMB，體內分解性荷爾蒙 cortisol 於第一週顯著性的上升後，隨後逐漸恢復至訓練前水平；PTH 的濃度則於第一週有些許的下降後，隨後持續的上升至第三、四週達顯著水平。目前研究發現，於菁英排球選手賽季中每日補充 3 g HMB 後，檢測賽季前後 cortisol 的濃度變化發現，兩組之間並無明顯差異 (Portal et al., 2011)，這與本研究結果相符，這指出補充 HMB 對於 cortisol 並無明顯影響，另外過去並無研究顯示補充 HMB 對於骨調控蛋白 PTH 之關聯，但本研究結果亦發現與 placebo 組無顯著差異，顯示補充 HMB 後，似乎不會藉由改變骨調控荷爾蒙 PTH 之變化來調節骨質代謝。

### **三、負重性訓練期間補充 HMB 後骨質代謝之影響**

#### **(一) 負重性訓練期補充 HMB 對於骨合成作用之影響**

四週的負重性運動訓練之中，可發現 HMB 組與 placebo 組的骨骼調控蛋白 OPG 的變化呈現相似的變化，並與訓練量的變化趨勢一致，過往研究顯示，運動時所產生的機械性應力，對於調節 OPG 的合成與活化均發揮重大的影響 (Kim, et al., 2006; Saunders, et al., 2006)。Saunders 等人 (2006) 於細胞實驗中發現，經兩小時的應力刺激後，於 15、30 和 60 分鐘皆使水溶性 OPG 明顯增加 (Saunders, et al., 2006)，並在人體實驗中也觀察到，經過運動訓練後，血液中 OPG 的濃度也會有顯著性的增長 (West, et al., 2009)，本研究結果也支持 OPG 濃度的改變主要由運動量的變化所影響，有無補充 HMB

並不影響其 OPG 的濃度變化。然而，本研究發現補充 HMB 後，骨合成指標 B-ALP 在訓練期之中呈現持續上升並達顯著之現象，與 placebo 組持續維持一基準水平之結果不同，顯示補充 HMB 後可能會提升造骨細胞的作用，增進骨質合成作用。過去研究顯示，補充 HMB 會提升 GH 和 IGF-1 的濃度 (Tatara, 2008<sup>b</sup>; Tatara, et al., 2007)，因而促進造骨細胞的活化與增生，隨後合成第一型膠原蛋白，並促使 B-ALP 與 osteocalcin 釋放至血液中的濃度增加 (Kanbur, et al., 2005; Rizzoli, et al., 2001)，這與本次研究結果中組間的 B-ALP 變化相符，但本研究 osteocalcin 組間的變化卻無明顯差異，兩者呈現出一致的變化趨勢，探討過去的研究發現，長期有規律運動性的選手，特別是高衝擊負荷運動類型，在運動後的 osteocalcin 濃度會顯著高於運動前水平 (Nishiyama, et al., 1988)，顯示高衝擊負荷的運動刺激，會促進造骨細胞的礦化作用，並釋放 osteocalcin 至循環之中，對照本研究結果並據此一現象推測，負重性運動刺激所產生的機械性應力為主要影響骨骼的礦化作用 (Pavlin & Gluhak-Heinrich, 2001; Radomisli, et al., 2001)，因此補充 HMB 後骨骼的礦化作用仍主要由負重運動刺激所調控。綜上所述，本研究結果指出，在四週的負重性運動訓練之後，訓練量會影響骨調控蛋白 OPG 的變化，且隨著訓練的時間增加，骨骼因持續的負重性應力刺激，使造骨細胞逐漸的礦化，然而若予以補充 HMB 後，則可能會提高 GH 與 IGF-1 的分泌，刺激造骨細胞的活化與合成膠原蛋白 (Xing & Boyce, 2005; Zhao, et al., 2000)，促進骨骼的合成作用。

## (二) 補充 HMB 對於骨分解作用之影響

進而觀察骨分解作用發現，骨調控蛋白 sRANKL 又稱之為破骨細胞活化因子，在經過四週的訓練期之後，雖然組內與組間皆無顯著性差異，但 HMB 組與 placebo 組卻呈現出相互消長的現象，且 HMB 組於訓練後期(W3、W4)有逐漸攀升的趨勢，有趣的是，sRANKL 的受體 RANK 於單核前驅細胞中，組間也呈現出相互消長的變化趨勢，早先研究證實，位於細胞膜上的 RANK 與具有調控破骨細胞生成的作用(Li et al., 2000)，本研究結果發現，舉重選手在負重性運動訓練第一週，血液中單核球細胞膜上的 RANK 明顯的增加，且 sRANKL 表現出上升之趨勢，對應骨分解指標 beta-crosslaps 和骨合成指標 B-ALP 皆呈逐漸上升的現象，與 I $\kappa$ B- $\alpha$  顯著性的下降情況，指出負重性運動訓練一方面增加造骨細胞合成外，另一方面因 ROS 的堆積，刺激造骨細胞分泌 sRANKL，使 sRANKL 與細胞膜上的 RANK 結合，進而增加 NF- $\kappa$ B 的活化，使破骨前驅細胞逐漸地分化且熟成為破骨細胞。隨後受減量訓練的影響，降低因負重運動所誘發的 ROS 生成，讓 I $\kappa$ B- $\alpha$  降解情形減少，亦即 NF- $\kappa$ B 的活化現象趨緩，使得 RANK 恢復至訓練前水平，且 sRANKL 也於訓練後期(W3、W4)恢復至訓練前的濃度，但 beta-crosslaps 則依然持續上升並且達顯著，推測可能是訓練前期所活化的破骨前驅細胞已成熟為破骨細胞，且本實驗室先前的研究結果發現，舉重選手於訓練期中，骨周轉率會逐漸上升，由於骨骼的大量合成與分解，因此造骨細胞增多，使由 ROS 刺激造骨細胞所生成的 sRANKL 增加，促使破骨細胞的分化與熟成，使骨分解指

標逐漸的上升。相較於 placebo 組，HMB 組的 RANK 先下降再上升，可能為補充 HMB 組初期(W1)的破骨細胞生成減少，身體為維持骨質代謝平衡，進而提高 RANK 的分泌以增進破骨細胞的分化與熟成，且補充 HMB 後具有抑制當 sRANKL 與破骨前驅細胞膜上的 RANK 結合後，所啟動下游轉錄因子 NF- $\kappa$ B 的作用 (Smith, et al., 2005)，而 NF- $\kappa$ B 被抑制後也已被證實會減少破骨細胞的生成 (Jimi, et al., 2004)。另外，Zavrski 等人 (2005) 使用 RANKL 刺激破骨前驅細胞生長同時，加入骨切片和已知具有抑制蛋白酶體作用因而抑制 NF- $\kappa$ B 活性的藥物 MG-132 和 MG-262，觀察其骨分解指標 TRAP 與骨切片上的蝕骨現象，以及所生成的破骨細胞中 NF- $\kappa$ B 的活性差異，發現若給予蛋白酶體抑制劑，則其 TRAP、蝕骨現象與 NF- $\kappa$ B 的活性皆會顯著的低於控制組，顯示若抑制細胞內蛋白酶體降解 I $\kappa$ B- $\alpha$  的作用後，將會有效的抑制破骨細胞的生成，減少骨分解的作用 (Zavrski et al., 2005)，同時對照本研究結果，HMB 組骨分解指標 beta-crosslaps 略低於訓練前的水平，這與 placebo 組的變化趨勢相異，顯示補充 HMB 後減少骨分解作用的產生，然組間 I $\kappa$ B- $\alpha$  並無產生不同的變化，這可能是於初期的高強度訓練中，仍主要由高強度的阻力運動訓練所生成的 ROS 刺激 NF- $\kappa$ B 的活化使 I $\kappa$ B- $\alpha$  降解，進而人體補充 HMB 後，影響 I $\kappa$ B- $\alpha$  至 NF- $\kappa$ B 的作用路徑，造成骨分解作用減少。隨後可能由於持續性抑制骨骼分解作用，使體內細胞代償性的增加 RANK，以提升部分破骨細胞的熟成，來維持骨質代謝平衡，然而因補充 HMB 後提高造骨細胞的合成，因此提高運動刺

激所生成的 ROS，促發造骨細胞分泌 sRANKL 現象 (Bai, et al., 2005)，使 sRANKL 分泌量逐漸增加，對照骨分解指標 beta-crosslaps 有些許上升現象但只略高於訓練前水平，顯示骨分解作用仍處於被抑制之現象，但是否因藥物的適應性作用使第四週 RANK 呈現下降之趨勢，則仍有待進一步研究證實。過去研究發現負重性運動訓練會增加 ROS 的生成 (Margonis, et al., 2007)，進而導致 NF- $\kappa$ B 的活化 (Hollander, et al., 2001)，然而補充 HMB 會藉由抑制泛素蛋白酶體作用 (Smith, et al., 2005)，減少 NF- $\kappa$ B 活化現象 (Nunes, et al., 2008)，以及所導致的破骨細胞活化現象 (Jimi, et al., 2004)。因此以下將進一步探討，多天期的負重運動訓練中，補充 HMB 後對於負重性運動訓練所誘發的 NF- $\kappa$ B 現象之影響。

#### **四、負重運動訓練期間補充 HMB 對於 NF- $\kappa$ B 之影響**

上述研究結果發現補充 HMB 後，具有抑制泛素蛋白酶體作用，進而減少 NF- $\kappa$ B 的活化現象 (Smith, et al., 2005)，來達到抑制破骨細胞的生成 (Xing, et al., 2002; Xu, et al., 2009)，然運動訓練過程中，運動刺激已被證實會增加 ROS 的生成 (Powers & Lennon, 1999; Radak, Chung, Koltai, Taylor, & Goto, 2008)，進而促使 NF- $\kappa$ B 的活化 (Hollander, et al., 2001)。以下將依序探討負重性訓練對 ROS 所誘發的 NF- $\kappa$ B 活化之影響，與補充 HMB 後，此一現象之變化。

##### **(一) 負重性訓練對於 NF- $\kappa$ B 活化之影響**

運動過程中，不可避免地會增加 ROS 的生成與活化，造

成氧化傷害的發生，但同時也會活化與抗氧化防禦系統相關的基因，進而產生適應性現象(Powers, Ji, & Leeuwenburgh, 1999)。ROS 的生成具有活化下游轉錄因子 NF- $\kappa$ B 之功用(Hollander, et al., 2001)，長時間的規律運動，則會強化骨骼肌中抗氧化防禦系統因應氧化壓力的能力(Powers & Lennon, 1999)，本研究 placebo 組之中，NF- $\kappa$ B 的抑制蛋白 I $\kappa$ B- $\alpha$  於訓練期第一週顯著的下降後，隨後自第二週起維持一穩定水平至訓練結束，可能因減量訓練使每日訓練所造成的 ROS 生成減少(Margonis, et al., 2007)，降低 NF- $\kappa$ B 的活化現象，減少 I $\kappa$ B- $\alpha$  的降解，而選手逐漸適應每日的訓練模式後，使 ROS 的生成趨於穩定，進而使 I $\kappa$ B- $\alpha$  的濃度維持一穩定水平。且與本研究相同的多天期負重性運動訓練的相關研究中則發現，負重性運動訓練會增加 ROS 的生成，並與訓練量成正比(Margonis, et al., 2007)，因而可能會進一步導致 NF- $\kappa$ B 的活化(Hollander, et al., 2001)，本研究則進一步發現規律的每日負重性運動訓練，在運動訓練的後期因訓練量降低而減緩 I $\kappa$ B- $\alpha$  的分泌，且於訓練期之中呈現一逐漸適應之現象。

## **(二) 負重訓練中補充 HMB 抑制 NF- $\kappa$ B 活化之影響**

本研究於四週的負重訓練中補充 HMB 後，進一步觀察到，I $\kappa$ B- $\alpha$  於第三、四週持續下降，並於第四週與 placebo 組達顯著差異。前述探討中發現，規律負重運動訓練後期，因逐漸適應訓練模式與強度，減緩 NF- $\kappa$ B 的活化，使 I $\kappa$ B- $\alpha$  呈現一穩定水平狀況。然 NF- $\kappa$ B 的活化現象，除誘發許多促發炎因子(如：IL-1、IL-6 與 TNF- $\alpha$  等)的生成外(Tak & Firestein,

2001)，還是其抑制蛋白 I $\kappa$ B- $\alpha$  生成的重要因素(Chen & Greene, 2004)，綜合上述研究發現與本研究結果，意味著舉重選手於訓練期中補充 HMB 後，訓練期前兩週 I $\kappa$ B- $\alpha$  與 placebo 組並無差異，顯示 NF- $\kappa$ B 的活化作用，主要由大量的負重性運動訓練所刺激，而導致 I $\kappa$ B- $\alpha$  的大量降解，此時補充 HMB 對於抑制 NF- $\kappa$ B 的活化現象有限，而進入訓練期後兩週，受減量訓練之影響，以及選手開始適應訓練模式，且補充 HMB 依然持續抑制其轉錄因子 NF- $\kappa$ B 的活化現象，導致缺乏轉錄因子的啟動，因而持續減少 I $\kappa$ B- $\alpha$  的生成現象，使得訓練期結束時組間 I $\kappa$ B- $\alpha$  呈現出顯著的差異。

## 五、小結

綜合上述現象可發現，骨骼組織在為期四週的負重性運動訓練中，訓練量的變化會影響機械性應力的大小，進而誘導 OPG 分泌的多寡(Saunders, et al., 2006)，同時減少 sRANKL 的分泌(Rubin, Fan, Biskobing, Taylor, & Rubin, 1999)，然而補充 HMB 後 OPG 的分泌仍舊主要由訓練量的改變誘發其變化，顯示補充 HMB 後並不影響造骨細胞分泌 OPG 的能力，而於補充 HMB 組發現在四週訓練期之中，骨合成指標 B-ALP 與骨分解指標 beta-crosslaps 皆呈現不同的變化趨勢，顯示補充 HMB 後會提高造骨細胞的合成與活性，並增進第一型膠原的合成，同時因訓練時所生成的 ROS 刺激較多生成的造骨細胞，使 sRANKL 的分泌量逐漸增多(Bai, et al., 2005)，另一方面，補充 HMB 同時具有抑制骨骼分解作用之現象，而其骨骼分解作用減少的結果，為 HMB 的補充會抑

制泛素蛋白酶體的作用 (Smith, et al., 2005)，可能進而減少破骨前驅細胞的分化與熟成，亦由於訓練過程中生成的 ROS，誘發 NF- $\kappa$ B 的持續活化現象受到抑制，並降低 I $\kappa$ B- $\alpha$  的再生成作用，同樣會造成破骨前驅細胞的分化與熟成作用下降，由於下游的訊息傳遞路徑受到抑制，因此可能代償性的增加單核球細胞上 RANK 的表現量，增加 sRANKL 與 RANK 的鍵結以促發破骨細胞的熟成，增加骨分解作用。補充 HMB 後提高骨骼的合成作用 (Tatara, 2008<sup>b</sup>)，促使骨基質的成熟且合成膠原蛋白，並釋放出 B-ALP 進入循環之中 (Garnero & Delmas, 1993)，因而使訓練期後期 B-ALP 會顯著的高於 placebo 組，而 osteocalcin 的生成仍主要由訓練時所產生的機械性應力所調控 (Pavlin & Gluhak-Heinrich, 2001)，故訓練期之中，骨礦化指標 osteocalcin 兩組間並無明顯的差異性。為期四週的負重性訓練中補充 HMB，會藉由抑制 sRANKL 與 RANK 鍵結後的下流轉錄因子訊息傳遞過程，進而降低骨質的分解作用，並藉由提高 GH 與 IGF-1 的分泌 (Kornasio, et al., 2009; Tatara, 2008<sup>b</sup>; Tatara, et al., 2007) 來提高造骨細胞的合成 (Kanbur, et al., 2005)(圖 15)。

## 結語

本研究主要發現舉重選手於四週訓練期之中，補充 HMB 後確實對於骨質代謝產生影響，並於 placebo 組之中發現，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，這與本實驗室先前的結果一致，而每天給予 3 g 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且活化造骨細胞。補充 HMB 主要會影響 PBMC 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，而根據其他學者的研究指出，舉重運動員於訓練期中，進一步提升骨合成作用，可能是由於補充 HMB 後提高 GH 與 IGF-1 的生成 (Kornasio, et al., 2009; Tatara, 2008<sup>b</sup>; Tatara, et al., 2007)，而促進造骨細胞的活性增加 (Kanbur, et al., 2005)。

與先前研究不同的是，本研究首次探討人體連續補充 HMB 後骨質代謝的變化，本研究結果呼應 Tatara 等人 (2008) 於動物研究中的結果，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，考量過去研究中，選手在經過大量過負荷的訓練後，容易引起的疲勞性骨折現象 (Sadideen & Swaminathan, 2004)，每日補充 3 g HMB 可能有助於加強骨質的合成作用，進而修補因過度訓練所引發的骨質流失現象。

全文完

## 參考文獻

- Abu, E. O., Horner, A., Kusec, V., Triffitt, J. T., & Compston, J. E. (1997). The localization of androgen receptors in human bone. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(10), 3493-3497.
- Adami, S., Zivelonghi, A., Braga, V., Fracassi, E., Gatti, D., Rossini, M., et al. (2010). Insulin-like growth factor-1 is associated with bone formation markers, PTH and bone mineral density in healthy premenopausal women. *Bone*, 46(1), 244-247.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., & Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404(6774), 193-197.
- Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., et al. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390(6656), 175-179.
- Arai, F., Miyamoto, T., Ohneda, O., Inada, T., Sudo, T., Brasel, K., et al. (1999). Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *The Journal of Experimental*

- Medicine*, 190(12), 1741-1754.
- Ashizawa, N., Ouchi, G., Fujimura, R., Yoshida, Y., Tokuyama, K., & Suzuki, M. (1998). Effects of a single bout of resistance exercise on calcium and bone metabolism in untrained young males. *Calcified Tissue International*, 62(2), 104-108.
- Atherton, P. J., Babraj, J., Smith, K., Singh, J., Rennie, M. J., & Wackerhage, H. (2005). Selective activation of AMPK-PGC-1alpha or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(7), 786-788.
- Atkins, G. J., Kostakis, P., Vincent, C., Farrugia, A. N., Houchins, J. P., Findlay, D. M., et al. (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.
- Bai, X. C., Lu, D., Liu, A. L., Zhang, Z. M., Li, X. M., Zou, Z. P., et al. (2005). Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblast. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17497-17506.
- Baksh, D., Song, L., & Tuan, R. S. (2004). Adult mesenchymal

- stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8(3), 301-316.
- 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.
- Bastiaanse, E. M., Hold, K. M., & Van der Laarse, A. (1997). The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes. *Cardiovascular Research*, 33(2), 272-283.
- Bieńko, M., Radzki, R. P., Kapica, M., Puzio, I., Filip, R., & Pawłowska, M. (2006). Influence of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on the structural strength of bones. *Medycyna Weterynaryjna*, 62(8), 963-965.
- Black, D., Duncan, A., & Robins, S. P. (1988). Quantitative analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in urine using ion-paired reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 169(1), 197-203.
- Bourrin, S., Palle, S., Pupier, R., Vico, L., & Alexandre, C. (1995). Effect of physical training on bone adaptation in three zones of the rat tibia. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10(11), 1745-1752.

- Boyce, B. F., Yamashita, T., Yao, Z., Zhang, Q., Li, F., & Xing, L. (2005). Roles for NF-kappaB and c-Fos in osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 23(Suppl), 11-15.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337-342.
- Breier, B. H. (1999). Regulation of protein and energy metabolism by the somatotrophic axis. *Domestic Animal Endocrinology*, 17(2-3), 209-218.
- Casez, J. P., Fischer, S., Stussi, E., Stalder, H., Gerber, A., Delmas, P. D., et al. (1995). Bone mass at lumbar spine and tibia in young males--impact of physical fitness, exercise, and anthropometric parameters: a prospective study in a cohort of military recruits. *Bone*, 17(3), 211-219.
- Chang, F., Steelman, L. S., Lee, J. T., Shelton, J. G., Navolanic, P. M., Blalock, W. L., et al. (2003). Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia*, 17(7), 1263-1293.
- Chen, L. F., & Greene, W. C. (2004). Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(5), 392-401.

- Cheng W, P. B., & N, A. (1997).  
Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate increases fatty acid oxidation by muscle cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11, A381.
- Coelho, C. W., & Carvalho, T. (2001). Effects of HMB supplementation on LDL-cholesterol, strength and body composition of patients with hypercholesterolemia. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 33(5), S340.
- Creighton, D. L., Morgan, A. L., Boardley, D., & Brolinson, P. G. (2001). Weight-bearing exercise and markers of bone turnover in female athletes. *Journal of Applied Physiology*, 90(2), 565-570.
- Crespo, R., Revilla, M., Villa, L. F., Usabiaga, J., Leibar, X., & Rico, H. (1999). Transient dissociation of bone metabolism induced by high performance exercise: a study in elite marathon runners. *Calcified Tissue International*, 64(4), 287-290.
- Crespo, R., Stover, S. M., Taylor, K. T., Chin, R. P., & Shivaprasad, H.L. (2000). Morphometric and mechanical properties of femora in young adult male turkeys with and without femoral fractures. *Poultry Science*, 79(4), 602-608.
- Delaisse, J. M., Andersen, T. L., Engsig, M. T., Henriksen, K., Troen, T., & Blavier, L. (2003). Matrix

- metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microscopy Research and Technique*, 61(6), 504-513.
- Eley, H. L., Russell, S. T., Baxter, J. H., Mukerji, P., & Tisdale, M. J. (2007). Signaling pathways initiated by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate to attenuate the depression of protein synthesis in skeletal muscle in response to cachectic stimuli. *American Journal of Physiology*, 293(4), E923-931.
- Eriksen, E. F., Charles, P., Melsen, F., Mosekilde, L., Risteli, L., & Risteli, J. (1993). Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation with bone histomorphometry. *Journal of Bone and Mineral Research*, 8(2), 127-132.
- Frost, H. M. (1988). Vital biomechanics: proposed general concepts for skeletal adaptations to mechanical usage. *Calcified Tissue International*, 42(3), 145-156.
- Fujimura, R., Ashizawa, N., Watanabe, M., Mukai, N., Amagai, H., Fukubayashi, T., et al. (1997). Effect of resistance exercise training on bone formation and resorption in young male subjects assessed by biomarkers of bone metabolism. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12(4), 656-662.
- Gallagher, P. M., Carrithers, J. A., Godard, M. P., Schulze, K. E., & Trappe, S. W. (2000).

- Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate ingestion, Part I: effects on strength and fat free mass. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32(12), 2109-2115.
- 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.
- Garnero, P., & Delmas, P. D. (1993). Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 77(4), 1046-1053.
- Gordeladze, J. O., Drevon, C. A., Syversen, U., & Reseland, J. E. (2002). Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *Journal of Cellular Biochemistry*, 85(4), 825-836.
- Ha, H., Kwak, H. B., Lee, S. W., Jin, H. M., Kim, H. M., Kim, H. H., et al. (2004). Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts. *Experimental Cell Research*, 301(2), 119-127.
- Hamdy, R. C., Anderson, J. S., Whalen, K. E., & Harvill, L. M. (1994). Regional differences in bone density of young

- men involved in different exercises. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 26(7), 884-888.
- Harada, S., & Rodan, G. A. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 423(6937), 349-355.
- Ho, R. C., Hirshman, M. F., Li, Y., Cai, D., Farmer, J. R., Aschenbach, W. G., et al. (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.
- Hofbauer, L. C., Gori, F., Riggs, B. L., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Spelsberg, T. C., et al. (1999). Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology*, 140(10), 4382-4389.
- Hofbauer, L. C., Khosla, S., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Boyle, W. J., & Riggs, B. L. (2000). The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15(1), 2-12.
- Hofbauer, L. C., Khosla, S., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Spelsberg, T. C., & Riggs, B. L. (1999). Estrogen stimulates gene expression and protein production of

- osteoprotegerin in human osteoblastic cells.  
*Endocrinology*, 140(9), 4367-4370.
- Holecek, M., Muthny, T., Kovarik, M., & Sispera, L. (2009).  
Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on  
protein metabolism in whole body and in selected tissues.  
*Food and Chemical Toxicology*, 47(1), 255-259.
- Hollander, J., Fiebig, R., Gore, M., Ookawara, T., Ohno, H., &  
Ji, L. L. (2001). Superoxide dismutase gene expression  
is activated by a single bout of exercise in rat skeletal  
muscle. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*,  
442(3), 426-434.
- 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.
- Jimenez-Jimenez, R., Cuevas, M. J., Almar, M., Lima, E.,  
Garcia-Lopez, D., De Paz, J. A., et al. (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.
- Jimi, E., Aoki, K., Saito, H., D'Acquisto, F., May, M. J.,  
Nakamura, I., et al. (2004). Selective inhibition of  
NF-kappa B blocks osteoclastogenesis and prevents

- inflammatory bone destruction in vivo. *Nature Medicine*, 10(6), 617-624.
- Jowko, E., Ostaszewski, P., Jank, M., Sacharuk, J., Zieniewicz, A., Wilczak, J., et al. (2001). Creatine and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) additively increase lean body mass and muscle strength during a weight-training program. *Nutrition*, 17(7-8), 558-566.
- Kamata, H., Manabe, T., Oka, S., Kamata, K., & Hirata, H. (2002). Hydrogen peroxide activates IkappaB kinases through phosphorylation of serine residues in the activation loops. *Federation of European Biochemical Societies*, 519(1-3), 231-237.
- Kanbur, N. Ö., Derman, O., & Kınık, E. (2005). The relationships between pubertal development, IGF-1 axis, and bone formation in healthy adolescents. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 23(1), 76-83.
- Karin, M., Yamamoto, Y., & Wang, Q. M. (2004). The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(1), 17-26.
- Karlsson, K. M., Karlsson, C., Ahlborg, H. G., Valdimarsson, O., & Ljunghall, S. (2003). The duration of exercise as a regulator of bone turnover. *Calcified Tissue International*, 73(4), 350-355.
- Karlsson, M. K., Vergnaud, P., Delmas, P. D., & Obrant, K. J.

- (1995). Indicators of bone formation in weight lifters. *Calcified Tissue International*, 56(3), 177-180.
- Katharina, K.-S., Markus, T., Gottfried, H. S., Katerina, S., Antonia, L. M., Stephan, G., et al. (2009). A 246-km continuous running race causes significant changes in bone metabolism. *Bone*, 45(6), 1079-1083.
- Kearns, A. E., Khosla, S., & Kostenuik, P. J. (2008). Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocrine Reviews*, 29(2), 155-192.
- 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.
- Kim, S. Y., Jun, T. W., Lee, Y. S., Na, H. K., Surh, Y. J., & Song, W. (2009). Effects of exercise on cyclooxygenase-2 expression and nuclear factor-kappaB DNA binding in human peripheral blood mononuclear cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1171, 464-471.
- Knitter, A. E., Panton, L., Rathmacher, J. A., Petersen, A., & Sharp, R. (2000). Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle damage after a prolonged run. *Journal of Applied Physiology*, 89(4), 1340-1344.

- Koga, T., Matsui, Y., Asagiri, M., Kodama, T., de Crombrughe, B., Nakashima, K., et al. (2005). NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nature Medicine*, 11(8), 880-885.
- Koh, J. M., Lee, Y. S., Kim, Y. S., Kim, D. J., Kim, H. H., Park, J. Y., et al. (2006). Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intracellular ROS generation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(7), 1003-1011.
- Kornasio, R., Riederer, I., Butler-Browne, G., Mouly, V., Uni, Z., & Halevy, O. (2009). Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) stimulates myogenic cell proliferation, differentiation and survival via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793(5), 755-763.
- Kramer, H. F., & Goodyear, L. J. (2007). Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 103(1), 388-395.
- Kreider, R. B., Ferreira, M., Greenwood, M., Wilson, M., Grindstaff, P., Plisk, S., et al. (2000). Exercise nutrition effects of calcium beta-HMB supplementation during training on markers of catabolism, body composition, strength and sprint performance. *Journal of Exercise Physiology*, 3(4), 48-59.

- Kreider, R. B., Ferreira, M., Wilson, M., & Almada, A. L. (1999). Effects of calcium beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation during resistance-training on markers of catabolism, body composition and strength. *International Journal of Sports Medicine*, 20(8), 503-509.
- Kukita, T., Wada, N., Kukita, A., Kakimoto, T., Sandra, F., Toh, K., et al. (2004). RANKL-induced DC-STAMP is essential for osteoclastogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(7), 941.
- Lacey, D., Timms, E., Tan, H., Kelley, M., Dunstan, C., Burgess, T., et al. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93(2), 165-176.
- 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.
- Lanyon, L. E. (1992). Control of bone architecture by functional load bearing. *Journal of Bone and Mineral Research*, 7 (Suppl 2), S369-375.
- Lee, N. K., Choi, Y. G., Baik, J. Y., Han, S. Y., Jeong, D. W., Bae, Y. S., et al. (2005). A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast

- differentiation. *Blood*, 106(3), 852-859.
- Leeuwenburgh, C., & Heinecke, J. W. (2001). Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Current Medicinal Chemistry*, 8(7), 829-838.
- Li, J., Sarosi, I., Yan, X. Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H. L., et al. (2000). RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), 1566-1571.
- Lima, F., De Falco, V., Baima, J., Carazzato, J. G., & Pereira, R. M. (2001). Effect of impact load and active load on bone metabolism and body composition of adolescent athletes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 33(8), 1318-1323.
- Lorenzo, J. A., Sousa, S. L., Fonseca, J. M., Hock, J. M., & Medlock, E. S. (1987). Colony-stimulating factors regulate the development of multinucleated osteoclasts from recently replicated cells in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*, 80(1), 160-164.
- Maimoun, L., Manetta, J., Couret, I., Dupuy, A. M., Mariano-Goulart, D., Micallef, J. P., et al. (2006). The intensity level of physical exercise and the bone metabolism response. *International Journal of Sports Medicine*, 27(2), 105-111.

- Maimoun, L., Simar, D., Caillaud, C., Coste, O., Barbotte, E., Peruchon, E., et al. (2009). Response of calciotropic hormones and bone turnover to brisk walking according to age and fitness level. *Journal of Sports Science and Medicine*, 12(4), 463-467.
- Malm, H. T., Ronni-Sivula, H. M., Viinikka, L. U., & Ylikorkala, O. R. (1993). Marathon running accompanied by transient decreases in urinary calcium and serum osteocalcin levels. *Calcified Tissue International*, 52(3), 209-211.
- Margonis, K., Fatouros, I. G., Jamurtas, A. Z., Nikolaidis, M. G., Douroudos, I., Chatzinikolaou, A., et al. (2007). Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(6), 901-910.
- Matsubara, T., Kida, K., Yamaguchi, A., Hata, K., Ichida, F., Meguro, H., et al. (2008). BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(43), 29119-29125.
- Memmott, R. M., & Dennis, P. A. (2009). Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cell Signal*, 21(5), 656-664.
- Miyazaki, H., Oh-ishi, S., Ookawara, T., Kizaki, T., Toshinai, K., Ha, S., et al. (2001). Strenuous endurance training in

humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 84(1-2), 1-6.

Morel, J., Combe, B., Francisco, J., & Bernard, J. (2001). Bone mineral density of 704 amateur sportsmen involved in different physical activities. *Osteoporosis International* 12(2), 152-157.

Mouzopoulos, G., Stamatakos, M., Tzurbakis, M., Tsembeli, A., Manti, C., Safioleas, M., et al. (2007). Changes of bone turnover markers after marathon running over 245 km. *International Journal of Sports Medicine*, 28(7), 576-579.

Muller, J. M., Rupec, R. A., & Baeuerle, P. A. (1997). Study of gene regulation by NF-kappaB and AP-1 in response to reactive oxygen intermediates. *Methods*, 11(3), 301-312.

Nakagawa, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., et al. (1998). RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(2), 395-400.

Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., et al. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required

- for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108(1), 17-29.
- Nicholson, G. C., Malakellis, M., Collier, F. M., Cameron, P. U., Holloway, W. R., Gough, T. J., et al. (2000). Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL). *Clinical Science*, 99(2), 133-140.
- Nishiyama, S., Tomoeda, S., Ohta, T., Higuchi, A., & Matsuda, I. (1988). Differences in basal and postexercise osteocalcin levels in athletic and nonathletic humans. *Calcified Tissue International*, 43(3), 150-154.
- Nissen, S. L., & Abumrad, N. N. (1997). Nutritional role of the leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 8(6), 300-311.
- Nissen, S. L., Sharp, R., Ray, M., Rathmacher, J. A., Rice, D., Fuller, J. C., Jr., et al. (1996). Effect of leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *Journal of Applied Physiology*, 81(5), 2095-2104.
- Nissen, S. L., & Sharp, R. L. (2003). Effect of dietary supplements on lean mass and strength gains with resistance exercise: a meta-analysis. *Journal of Applied Physiology*, 94(2), 651-659.

- Noble, B. (2003). Bone microdamage and cell apoptosis. *eCells and Materials Journal*, 6, 46-55; discussion 55.
- Nowak, A., Stemplewski, R., Szeklicki, R., Karolkiewicz, J., Pilaczynska-Szczesniak, L., & Osinski, W. (2005). Biochemical markers of bone metabolism in healthy elderly men. The relationship to physical activity. *Aging Male*, 8(2), 75-80.
- Nunes, E. A., Kuczera, D., Brito, G. A., Bonatto, S. J., Yamazaki, R. K., Tanhoffer, R. A., et al. (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.
- O'Connor, D. M., & Crowe, M. J. (2003). Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate and creatine monohydrate supplementation on the aerobic and anaerobic capacity of highly trained athletes. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 43(1), 64-68.
- O'Connor, D. M., & Crowe, M. J. (2007). Effects of six weeks of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) and HMB/creatine supplementation on strength, power, and anthropometry of highly trained athletes. *The Journal of Strength and Conditioning Research*, 21(2), 419-423.

- Ortenblad, N., Madsen, K., & Djurhuus, M. S. (1997). Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. *American Journal of Physiology*, 272(4 Pt 2), R1258-1263.
- Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18(49), 6853-6866.
- Panton, L. B., Rathmacher, J. A., Baier, S., & Nissen, S. (2000). Nutritional supplementation of the leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (hmb) during resistance training. *Nutrition*, 16(9), 734-739.
- Pavlin, D., & Gluhak-Heinrich, J. (2001). Effect of mechanical loading on periodontal cells. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 12(5), 414-424.
- Pierno, S., De Luca, A., Tricarico, D., Roselli, A., Natuzzi, F., Ferrannini, E., et al. (1995). Potential risk of myopathy by HMG-CoA reductase inhibitors: a comparison of pravastatin and simvastatin effects on membrane electrical properties of rat skeletal muscle fibers. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 275(3), 1490-1496.
- Pitkänen, H. T., Oja, S. S., Rusko, H., Nummela, A., Komi, P. V., Saransaari, P., et al. (2003). Leucine supplementation does not enhance acute strength or

- running performance but affects serum amino acid concentration. *Amino Acids*, 25(1), 85-94.
- Portal, S., Eliakim, A., Nemet, D., Halevy, O., & Zadik, Z. (2010). Effect of HMB supplementation on body composition, fitness, hormonal profile and muscle damage indices. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 23(7), 641-650.
- Portal, S., Zadik, Z., Rabinowitz, J., Pilz-Burstein, R., Adler-Portal, D., Meckel, Y., et al. (2011). The effect of HMB supplementation on body composition, fitness, hormonal and inflammatory mediators in elite adolescent volleyball players: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study. *European Journal of Applied Physiology*, 111(9), 2261-2269.
- Powers, S. K., Ji, L. L., & Leeuwenburgh, C. (1999). Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 31(7), 987-997.
- Powers, S. K., & Lennon, S. L. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(4), 1025-1033.
- Price, P. A., Williamson, M. K., & Lothringer, J. W. (1981). Origin of the vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone. *The*

- Journal of Biological Chemistry*, 256(24), 12760-12766.
- Pruitt, L. A., Jackson, R. D., Bartels, R. L., & Lehnhard, H. J. (1992). Weight-training effects on bone mineral density in early postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research*, 7(2), 179-185.
- Pryor, W. A. (1991). The antioxidant nutrients and disease prevention--what do we know and what do we need to find out? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(1 Suppl), 391S-393S.
- Radak, Z., Chung, H. Y., Koltai, E., Taylor, A. W., & Goto, S. (2008). Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 34-42.
- 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.
- Ritchlin, C. T., Haas-Smith, S. A., Li, P., Hicks, D. G., & Schwarz, E. M. (2003). Mechanisms of TNF-alpha- and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(6), 821-831.
- Rizzoli, R., Bonjour, J. P., & Ferrari, S. L. (2001). Osteoporosis, genetics and hormones. *Journal of*

- Molecular Endocrinology* 26(2), 79-94.
- Rong, H., Berg, U., Torring, 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.
- Roodman, G. D. (2006). Regulation of osteoclast differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1068(1), 100-109.
- Rowlands, D. S., & Thomson, J. S. (2009). Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation during resistance training on strength, body composition, and muscle damage in trained and untrained young men: a meta-analysis. *The Journal of Strength and Conditioning Research*, 23(3), 836-846.
- Rubin, J., Ackert-Bicknell, C. L., Zhu, L., Fan, X., Murphy, T. C., Nanes, M. S., et al. (2002). IGF-I regulates osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in vitro and OPG in vivo. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(9), 4273-4279.
- Rubin, J., Fan, X., Biskobing, D. M., Taylor, W. R., & Rubin, C. T. (1999). Osteoclastogenesis is repressed by mechanical strain in an in vitro model. *Journal of*

*Orthopaedic Research* 17(5), 639-645.

- 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.
- Russell, S. T., & Tisdale, M. J. (2009). Mechanism of attenuation by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate of muscle protein degradation induced by lipopolysaccharide. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 330(1-2), 171-179.
- Ryan, A. S., Treuth, M. S., Rubin, M. A., Miller, J. P., Nicklas, B. J., Landis, D. M., et al. (1994). Effects of strength training on bone mineral density: hormonal and bone turnover relationships. *Journal of Applied Physiology*, 77(4), 1678-1684.
- Sabourin, P. J., & Bieber, L. L. (1983). Formation of beta-hydroxyisovalerate by an alpha-ketoisocaproate oxygenase in human liver. *Metabolism*, 32(2), 160-164.
- Sadideen, H., & Swaminathan, R. (2004). Effect of acute oral calcium load on serum PTH and bone resorption in young

- healthy subjects: an overnight study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(12), 1661-1665.
- 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.
- Schett, G., Kiechl, S., Redlich, K., Oberhollenzer, F., Weger, S., Egger, G., et al. (2004). Soluble RANKL and risk of nontraumatic fracture. *The Journal of the American Medical Association*, 291(9), 1108-1113.
- Schoppet, M., Preissner, K. T., & Hofbauer, L. C. (2002). RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(4), 549-553.
- Seibel, M. J. (2005). Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *The Clinical Biochemist Reviews*, 26(4), 97-122.
- Shackelford, L. C., LeBlanc, A. D., Driscoll, T. B., Evans, H. J., Rianon, N. J., Smith, S. M., et al. (2004). Resistance exercise as a countermeasure to disuse-induced bone loss. *Journal of Applied Physiology*, 97(1), 119-129.
- Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., et al. (1997). Osteoprotegerin:

- a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89(2), 309-319.
- Singh, H., Sen, R., Baltimore, D., & Sharp, P. A. (1986). A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature*, 319(6049), 154-158.
- 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.
- 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.
- Soysa, N. S., & Alles, N. (2009). NF-kappaB functions in osteoclasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378(1), 1-5.
- Spangenburg, E. E., Brown, D. A., Johnson, M. S., & Moore, R. L. (2006). Exercise increases SOCS-3 expression in rat skeletal muscle: potential relationship to IL-6 expression. *The Journal of Physiology*, 572(Pt 3), 839-848.
- Stein, G. S., Lian, J. B., Stein, J. L., Van Wijnen, A. J., &

- Montecino, M. (1996). Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiological Reviews*, 76(2), 593-629.
- Stewart, A. D., & Hannan, J. (2000). Total and regional bone density in male runners, cyclists, and controls. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32(8), 1373-1377.
- Suominen, H. (1993). Bone mineral density and long term exercise. An overview of cross-sectional athlete studies. *Sports Medicine*, 16(5), 316-330.
- Tak, P. P., & Firestein, G. S. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(1), 7-11.
- Takada, I., Kouzmenko, A. P., & Kato, S. (2009). Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nature Reviews Rheumatology*, 5(8), 442-447.
- 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.
- Tatara, M. R. (2008<sup>b</sup>). Neonatal programming of skeletal development in sheep is mediated by somatotrophic axis function. *Experimental Physiology*, 93(6), 763-772.
- Tatara, M. R. (2009). Effect of beta-hydroxy beta-methylbutyrate (HMB) administration on

- volumetric bone mineral density, and morphometric and mechanical properties of tibia in male turkeys. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 93(6), 669-677.
- Tatara, M. R., Sliwa, E., & Krupski, W. (2007). Prenatal programming of skeletal development in the offspring: effects of maternal treatment with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on femur properties in pigs at slaughter age. *Bone*, 40(6), 1615-1622.
- Tatara, M. R., Sliwa, E., Krupski, W., & Worzakowska, M. (2008<sup>a</sup>). 3-Hydroxy-3-methylbutyrate administration diminishes fundectomy-induced osteopenia of the lumbar spine in pigs. *Nutrition*, 24(7-8), 753-760.
- Teitelbaum, S. L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289(5484), 1504-1508.
- Theill, L. E., Boyle, W. J., & Penninger, J. M. (2002). RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annual Review of Immunology*, 20, 795-823.
- Thomson, J. S., Watson, P. E., & Rowlands, D. S. (2009). Effects of nine weeks of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation on strength and body composition in resistance trained men. *The Journal of Strength and Conditioning Research*, 23(3), 827-835.
- Tisdale, M. J. (2005). The ubiquitin-proteasome pathway as a

- therapeutic target for muscle wasting. *The Journal of Supportive Oncology* 3(3), 209-217.
- Vaira, S., Alhawagri, M., Anwisye, I., Kitaura, H., Faccio, R., & Novack, D. V. (2008). RelA/p65 promotes osteoclast differentiation by blocking a RANKL-induced apoptotic JNK pathway in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(6), 2088-2097.
- van Koevering, M., & Nissen, S. (1992). Oxidation of leucine and alpha-ketoisocaproate to beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in vivo. *American Journal of Physiology*, 262, E27-31.
- van Someren, K. A., Edwards, A. J., & Howatson, G. (2005). Supplementation with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) and alpha-ketoisocaproic acid (KIC) reduces signs and symptoms of exercise-induced muscle damage in man. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 15(4), 413-424.
- Vider, J., Laaksonen, D. E., Kilk, A., Atalay, M., Lehtmaa, J., Zilmer, M., et al. (2001). Physical exercise induces activation of NF-kappaB in human peripheral blood lymphocytes. *Antioxid Redox Signal*, 3(6), 1131-1137.
- Virtanen, P., Viitasalo, J. T., Vuori, J., Vaananen, K., & Takala, T. E. (1993). Effect of concentric exercise on serum muscle and collagen markers. *Journal of Applied Physiology*, 75(3), 1272-1277.

- Vukovich, M. D., Stubbs, N. B., & Bohlken, R. M. (2001). Body composition in 70-year-old adults responds to dietary beta-hydroxy-beta-methylbutyrate similarly to that of young adults. *Journal of Nutrition*, 131(7), 2049-2052.
- Wagner, E. F., & Karsenty, G. (2001). Genetic control of skeletal development. *Current Opinion in Genetics and Development*, 11(5), 527-532.
- 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.
- Wilson, G. J., Wilson, J. M., & Manninen, A. H. (2008). Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on exercise performance and body composition across varying levels of age, sex, and training experience: A review. *Nutrition and Metabolism*, 5, 1.
- Woitge, H. W., Friedmann, B., Suttner, S., Farahmand, I., Muller, M., Schmidt-Gayk, H., et al. (1998). Changes in bone turnover induced by aerobic and anaerobic exercise in young males. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(12), 1797-1804.
- Wong, B. R., Rho, J., Arron, J., Robinson, E., Orlinick, J., Chao, M., et al. (1997). TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *The Journal of*

- Biological Chemistry*, 272(40), 25190-25194.
- Xing, L., & Boyce, B. F. (2005). Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328(3), 709-720.
- Xing, L., Bushnell, T., Carlson, L., Tai, Z., Tondravi, M., Siebenlist, U., et al. (2002). NF-kappaB p50 and p52 expression is not required for RANK expressing osteoclast progenitor formation but is essential for RANK and cytokine mediated osteoclastogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(7), 1200-1210.
- Xing, L., & Schwarz, E. (2005). Circulating osteoclast precursors: a mechanism and a marker of erosive arthritis. *Current Rheumatology Reviews*, 1(1), 21-28.
- Xu, J., Wu, H. F., Ang, E. S., Yip, K., Woloszyn, M., Zheng, M. H., et al. (2009). NF-kappaB modulators in osteolytic bone diseases. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 20(1), 7-17.
- Yagi, M., Miyamoto, T., Sawatani, Y., Iwamoto, K., Hosogane, N., Fujita, N., et al. (2005). DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(3), 345-351.
- Yip, K., Zheng, M., Feng, H., Steer, J., Joyce, D., & Xu, J. (2004). Sesquiterpene lactone parthenolide blocks

- lipopolysaccharide induced osteolysis through the suppression of NF-kappaB activity. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(11), 1905-1916.
- Zaidi, M. (2007). Skeletal remodeling in health and disease. *Nature Medicine*, 13(7), 791-801.
- Zavrski, I., Krebbel, H., Wildemann, B., Heider, U., Kaiser, M., Possinger, K., et al. (2005). Proteasome inhibitors abrogate osteoclast differentiation and osteoclast function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333(1), 200-205.
- Zhao, G., Monier-Faugere, M. C., Langub, M. C., Geng, Z., Nakayama, T., Pike, J. W., et al. (2000). Targeted overexpression of insulin-like growth factor I to osteoblasts of transgenic mice: increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation. *Endocrinology*, 141(7), 2674-2682.
- Ziegler, S., Niessner, A., Richter, B., Wirth, S., Billensteiner, E., Woloszczuk, W., et al. (2005). Endurance running acutely raises plasma osteoprotegerin and lowers plasma receptor activator of nuclear factor kappa B ligand. *Metabolism*, 54(7), 935-938.

## 附錄：單週訓練內容

每位受試者自身的最大肌力各有所不同，故練習時的實際重量負荷亦有所不同，在此呈現其中一位受試者於高強度訓練期時，單週訓練課表內容。

### 週一：

**膝位抓：**強度 80% 1-2 次、3 組。

單次內容：35kg 4 下、2 組，45kg 3 下、2 組，55kg 3 下、1 組，60kg 3 下、1 組，65kg 3 下、2 組，70kg 2 下、1 組、72.5kg 2 下、1 組，75kg 2 下、2 組。

**膝位高上膊：**強度 80% 2-3 次、3 組。

單次內容：35kg 4 下、1 組，55kg 3 下、1 組，65kg 3 下、1 組，70kg 3 下、3 組，75kg 3 下、1 組，80kg 2 下、2 組。

**直膝推：**強度 80% 4 次、5 組。

單次內容：35kg 4 下、1 組，45kg 4 下、1 組，55kg 4 下、1 組，60kg 4 下、1 組，65kg 3 下、1 組。

### 週二：

**抓舉：**強度 70% 2 次、3 組，強度 80% 2 次、3 組。

單次內容：35kg 3 下、2 組，45kg 3 下、2 組，55kg 3 下、1 組，60kg 3 下、1 組，65kg 3 下、2 組，70kg 2 下、3 組，75kg 1 下、1 組，77kg 1 下、1 組，80kg 1 下、1 組。

**挺舉：**強度 70% 2-3 次、2 組，強度 80% 2 次、3 組。

單次內容：45kg 3 下、1 組，55kg 3 下、2 組，65kg 3 下、1 組，75kg 3 下、1 組，80kg 3 下、1 組，85kg 3 下、1 組，90kg 2 下、1 組。

**週三：**

**箱上上膊：**強度 80% 2 次、3 組。

單次內容：35kg 2 下、2 組，45kg 2 下、2 組，55kg 2 下、2 組，65kg 2 下、1 組，75kg 2 下、2 組，85kg 2 下、3 組。

**週四：**

**後蹲：**強度 80% 3 次、3-5 組。

單次內容：45kg 10 下、1 組，55kg 8 下、1 組，75kg 5 下、1 組，85kg 3 下、1 組，95kg 3 下、1 組，105kg 3 下、1 組，115kg 3 下、1 組，120kg 3 下、3 組。

**架上挺：**強度 70% 3 次、3-5 組。

單次內容：35kg 3 下、2 組，45kg 3 下、2 組，55kg 3 下、2 組，65kg 3 下、2 組，75kg 3 下、5 組。

**週五：**

**抓舉：**強度 70% 3 次、3-5 組。

單次內容：35kg 3 下、2 組，45kg 3 下、2 組，55kg 3 下、1 組，60kg 3 下、5 組。

**高上膊**：強度 75% 3 次、3-5 組。

單次內容：45kg 3 下、2 組，55kg 3 下、2 組，65kg 3 下、4 組，70kg 1 下、1 組，75kg 1 下、2 組，80kg 1 下、1 組，82.5kg 1 下、3 組。

**窄拉**：強度 90% 2 次、3 組，強度 100% 2 次、3 組。

單次內容：95kg 2 下、3 組，105kg 2 下、3 組，115kg 2 下、1 組，125kg 2 下、1 組，135kg 2 下、1 組，140kg 2 下、1 組，145kg 2 下、1 組，155kg 1 下、1 組。

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	87±18.15	0.399
體重 (kg)	87.34±18.52	87±18.15	168.88±6.79	0.722

註：p 值為 HMB 組與 placebo 組相比之結果，當  $P < 0.05$  時達顯著。

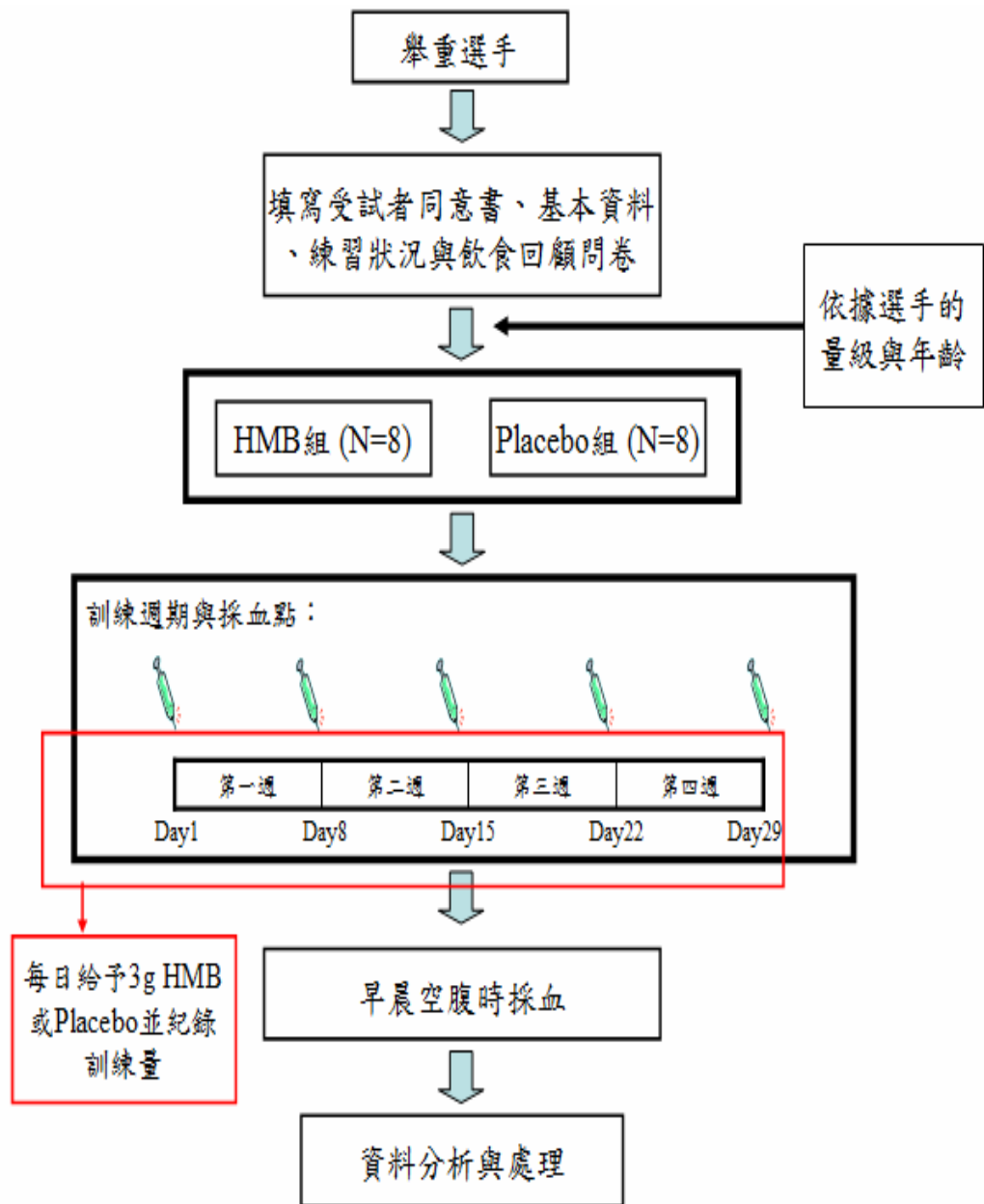
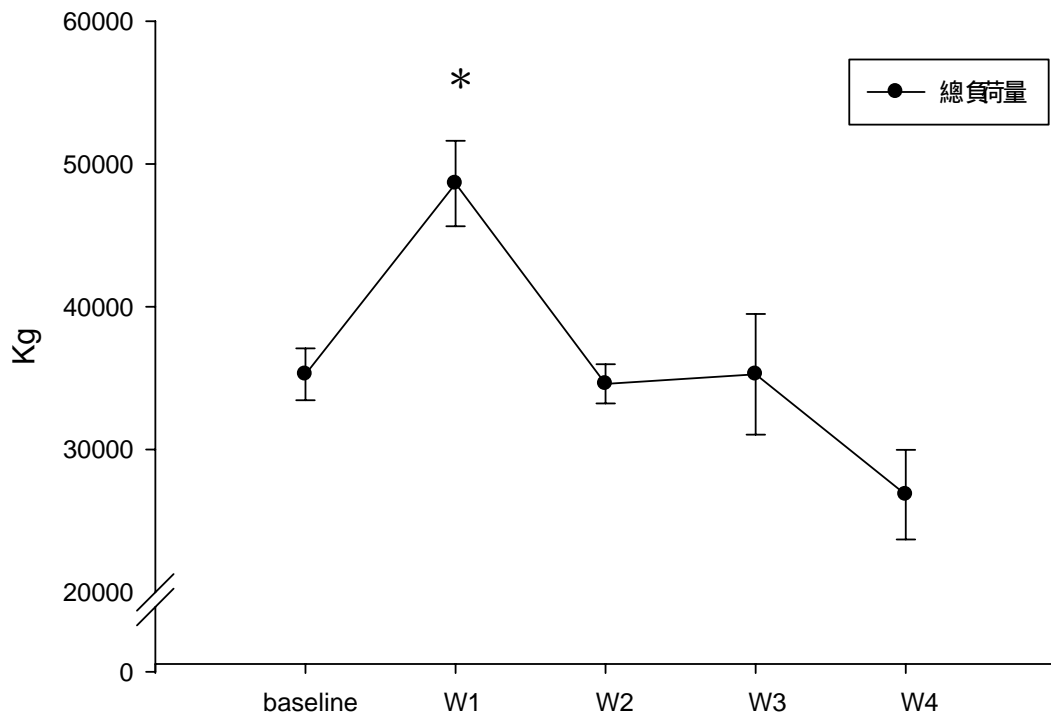
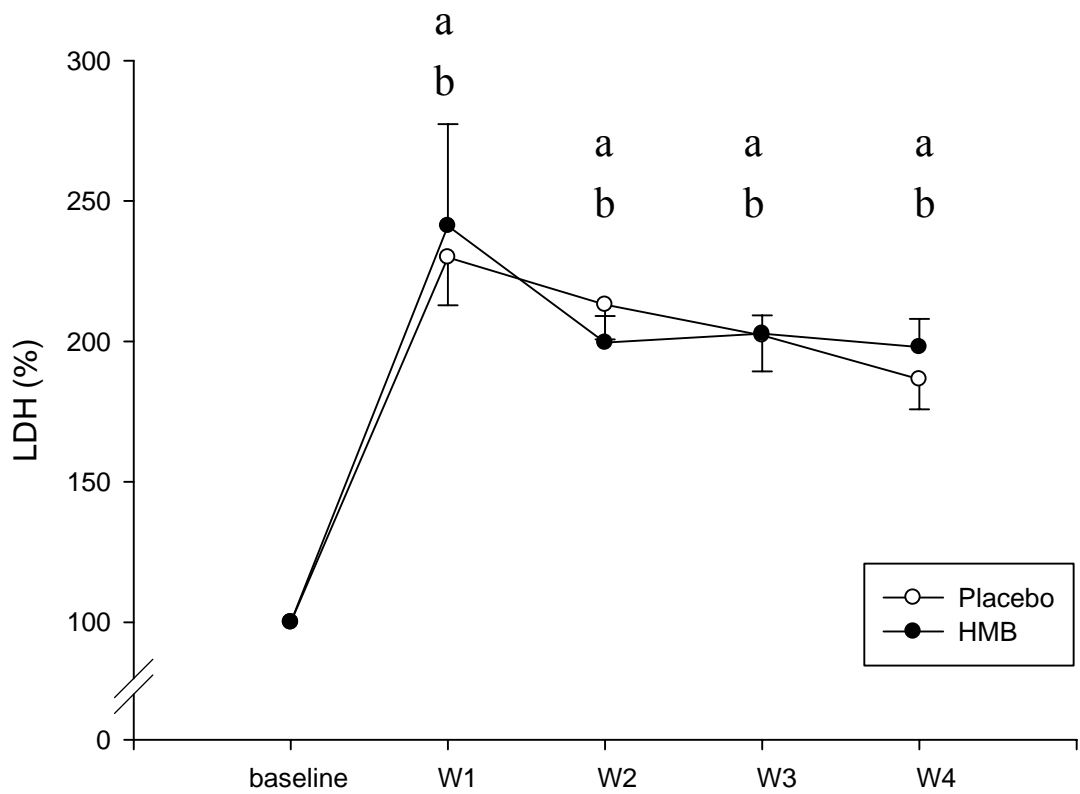


圖 1 實驗流程圖。



註：“\*”表示與 baseline 相比達顯著差異。

圖 2 訓練期間每週訓練量。



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 訓練期間肌肉損傷指標 LDH 的變化率。

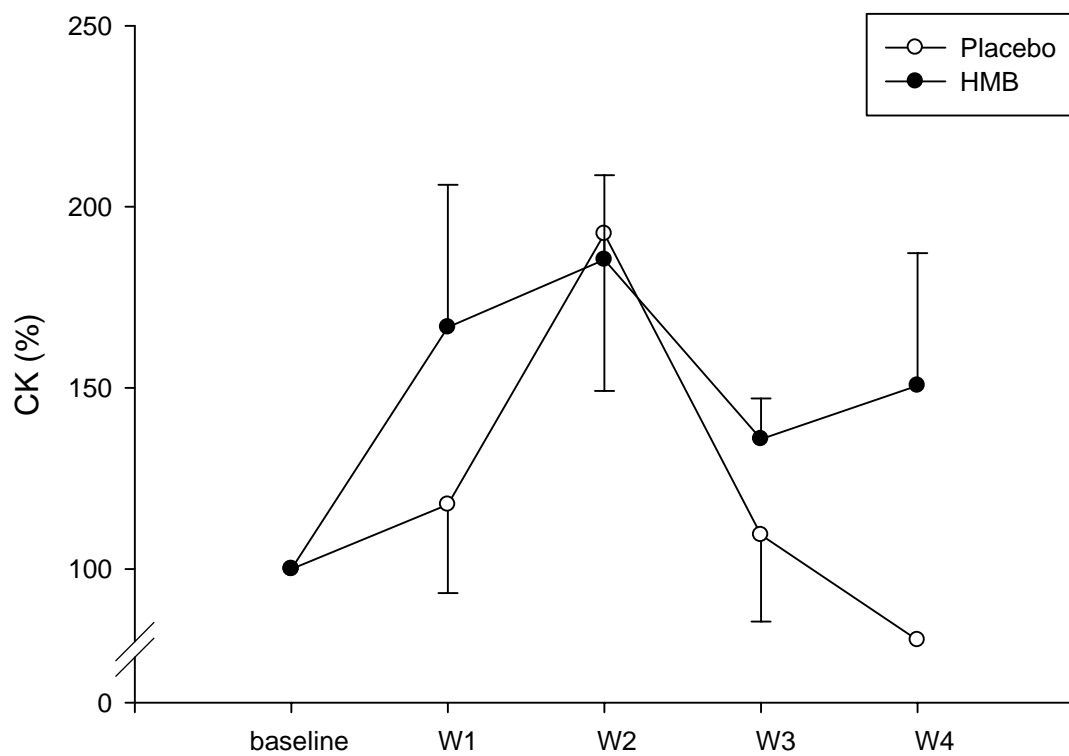
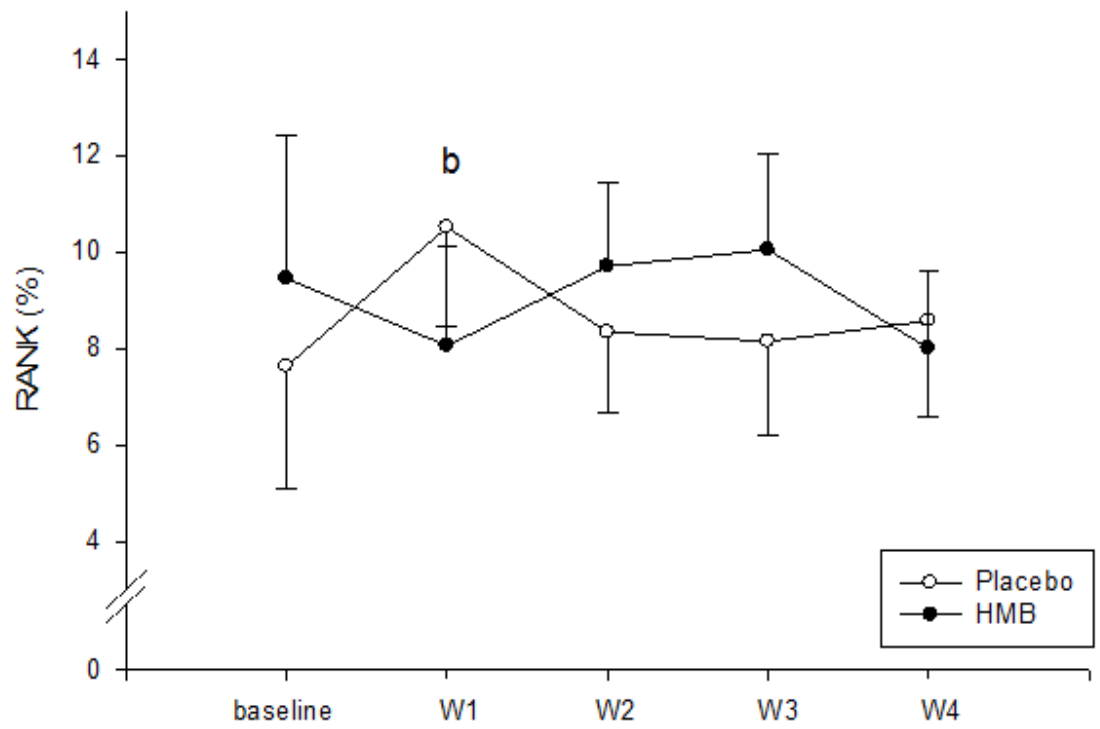
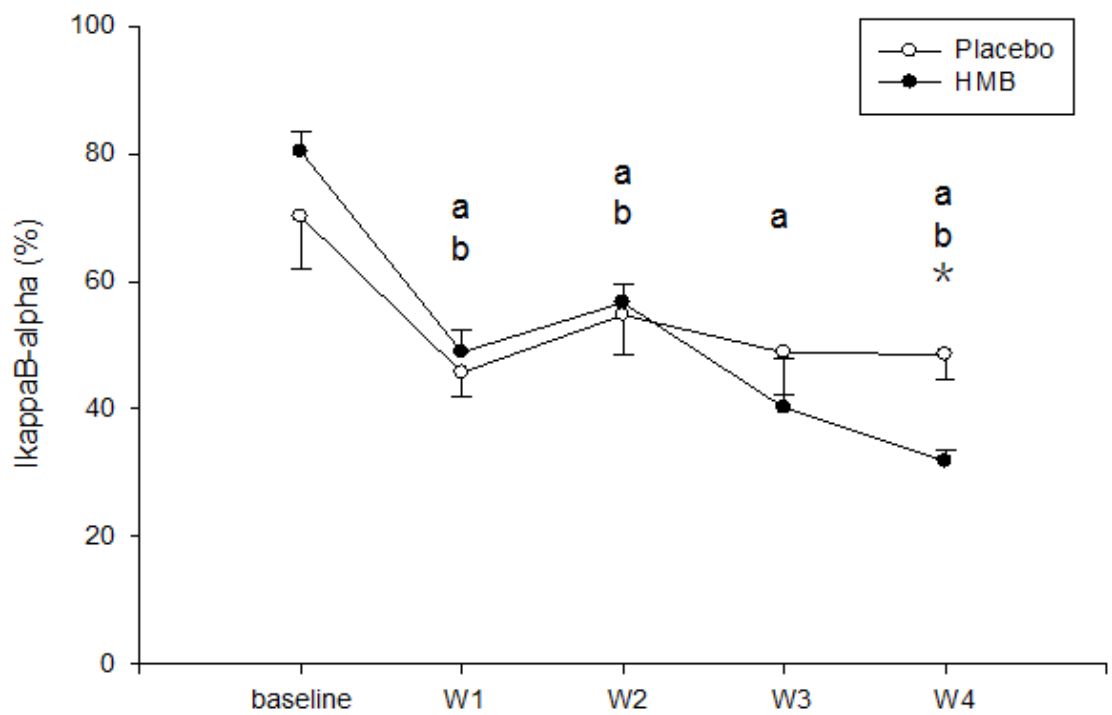


圖 4 訓練期間肌肉損傷指標 CK 的變化率。



註：“b”表示 placebo 組與 baseline 相比達顯著差異。

圖 5 訓練期間單核細胞中 RANK 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 6 訓練期間單核球細胞內 IκB-α 的變化率。

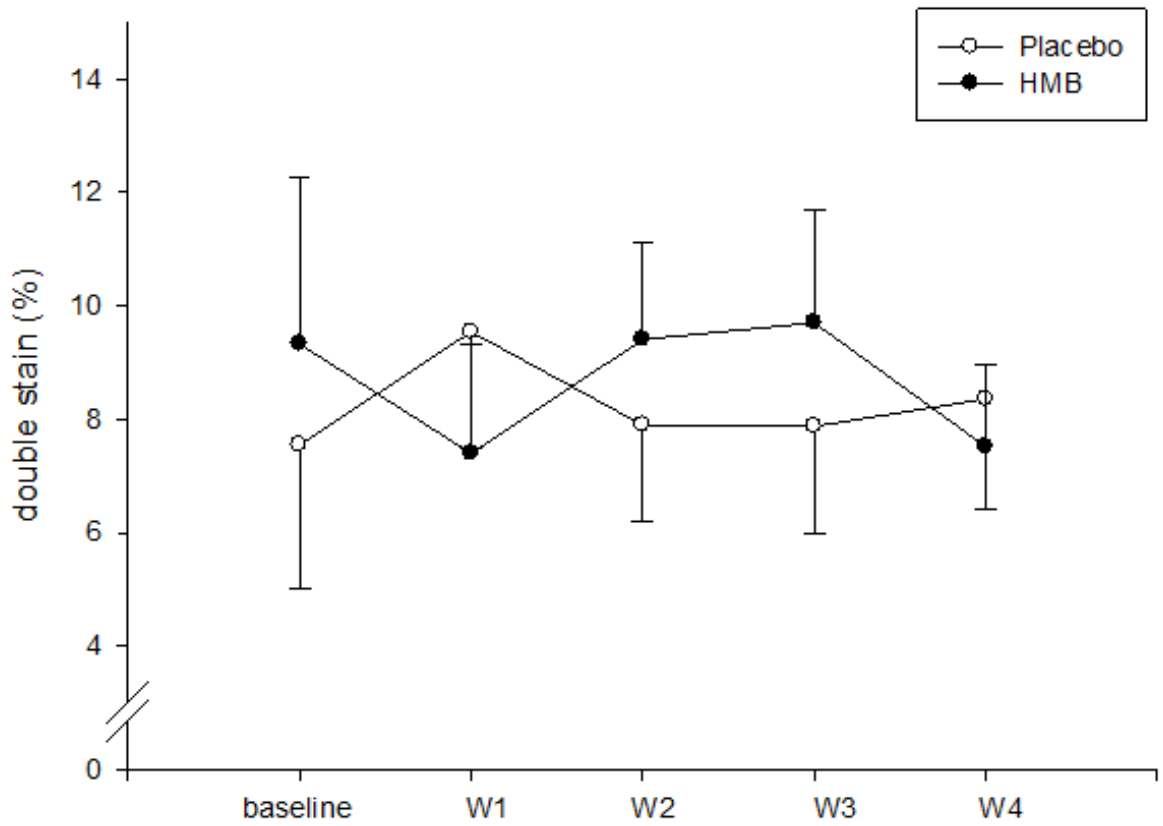
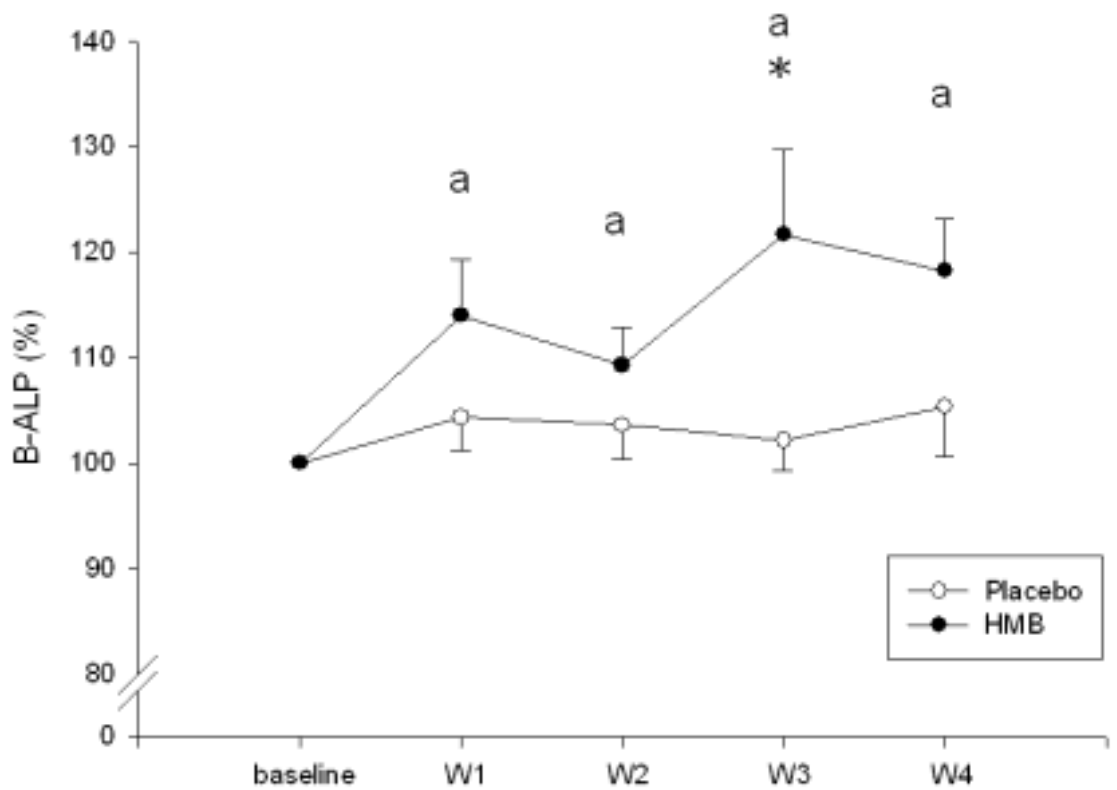


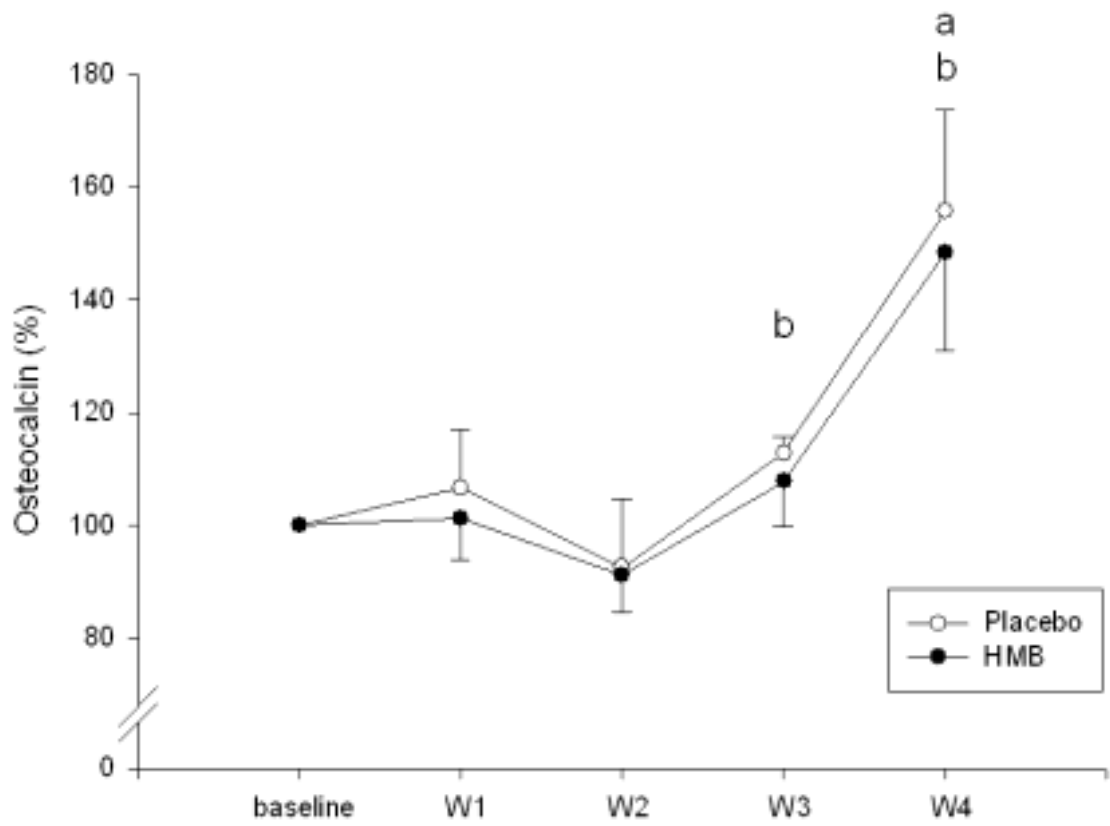
圖 7 訓練期間單核球細胞同時含有 RANK 與  $I\kappa B-\alpha$  的變化率。



註：“a”表示 HMB 組與 baseline 相比達顯著差異。

“\*”表示 HMB 組與 placebo 組相比有顯著差異。

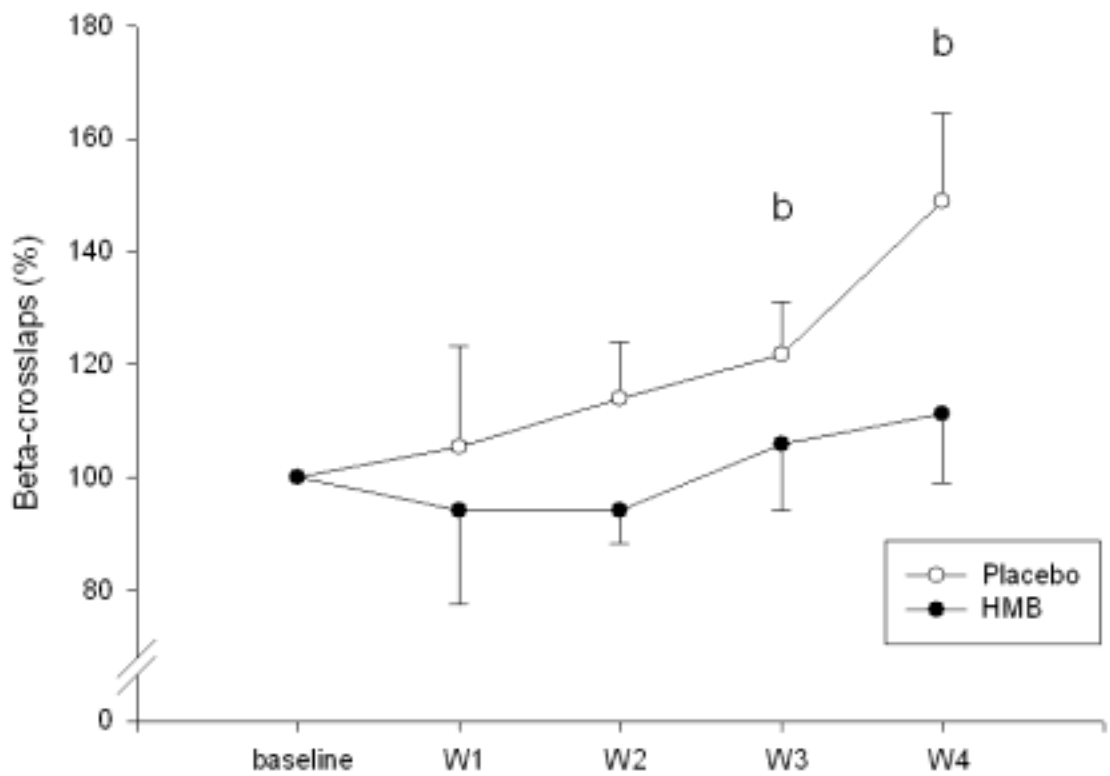
圖 8 訓練期間骨代謝指標 B-ALP 的變化率。



註：“a”表示 HMB 組與 baseline 相比達顯著差異。

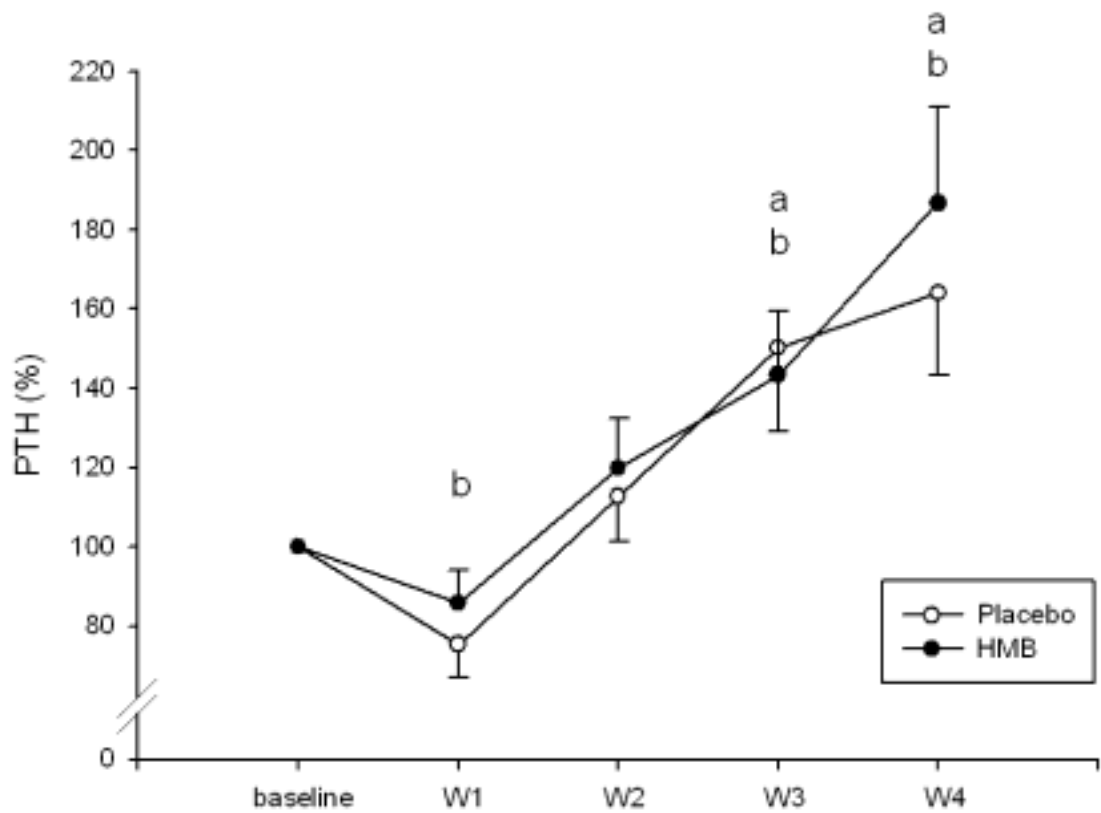
“b”表示 placebo 組與 baseline 相比達顯著差異。

圖 9 訓練期間骨代謝指標 osteocalcin 的變化率。



註：“b”表示 placebo 組與 baseline 相比達顯著差異。

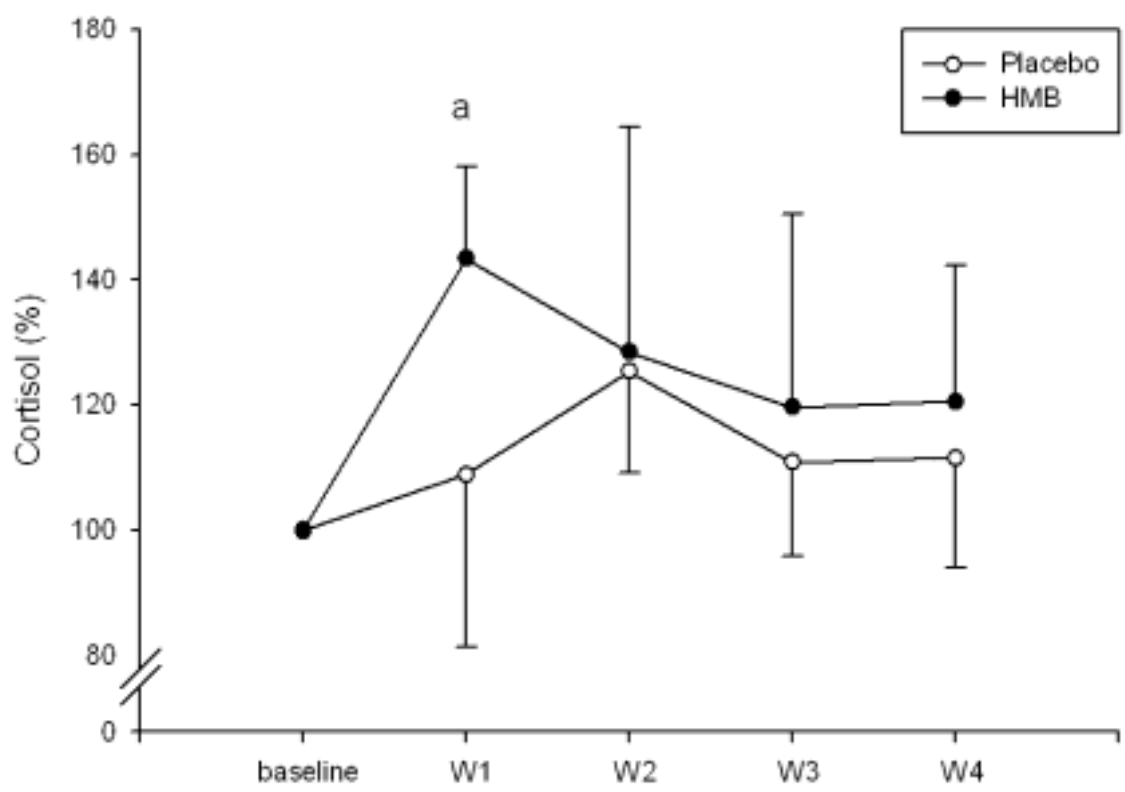
圖 10 訓練期間骨代謝指標 beta-crosslaps 的變化率。



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。

圖 11 訓練期間骨代謝相關荷爾蒙 PTH 的變化率。



註：“a”表示HMB組與baseline相比達顯著差異。

圖 12 訓練期間骨代謝相關荷爾蒙 cortisol 的變化率。

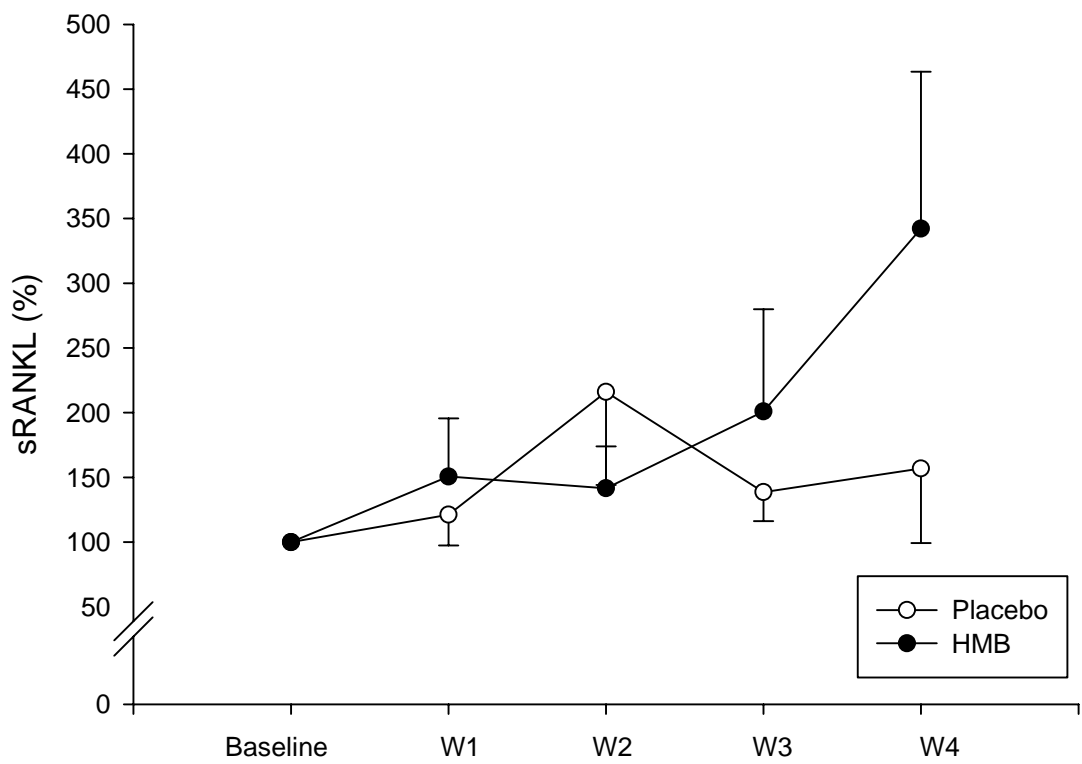


圖 13 訓練期間骨調控蛋白 sRANKL 的變化率。

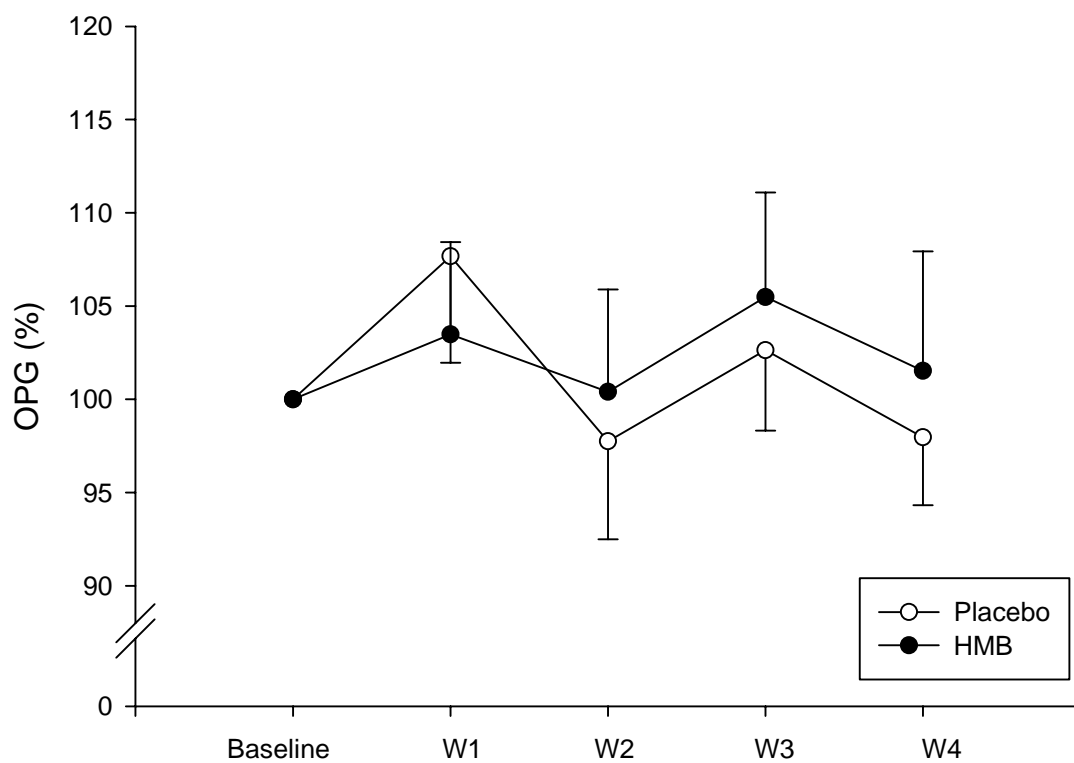
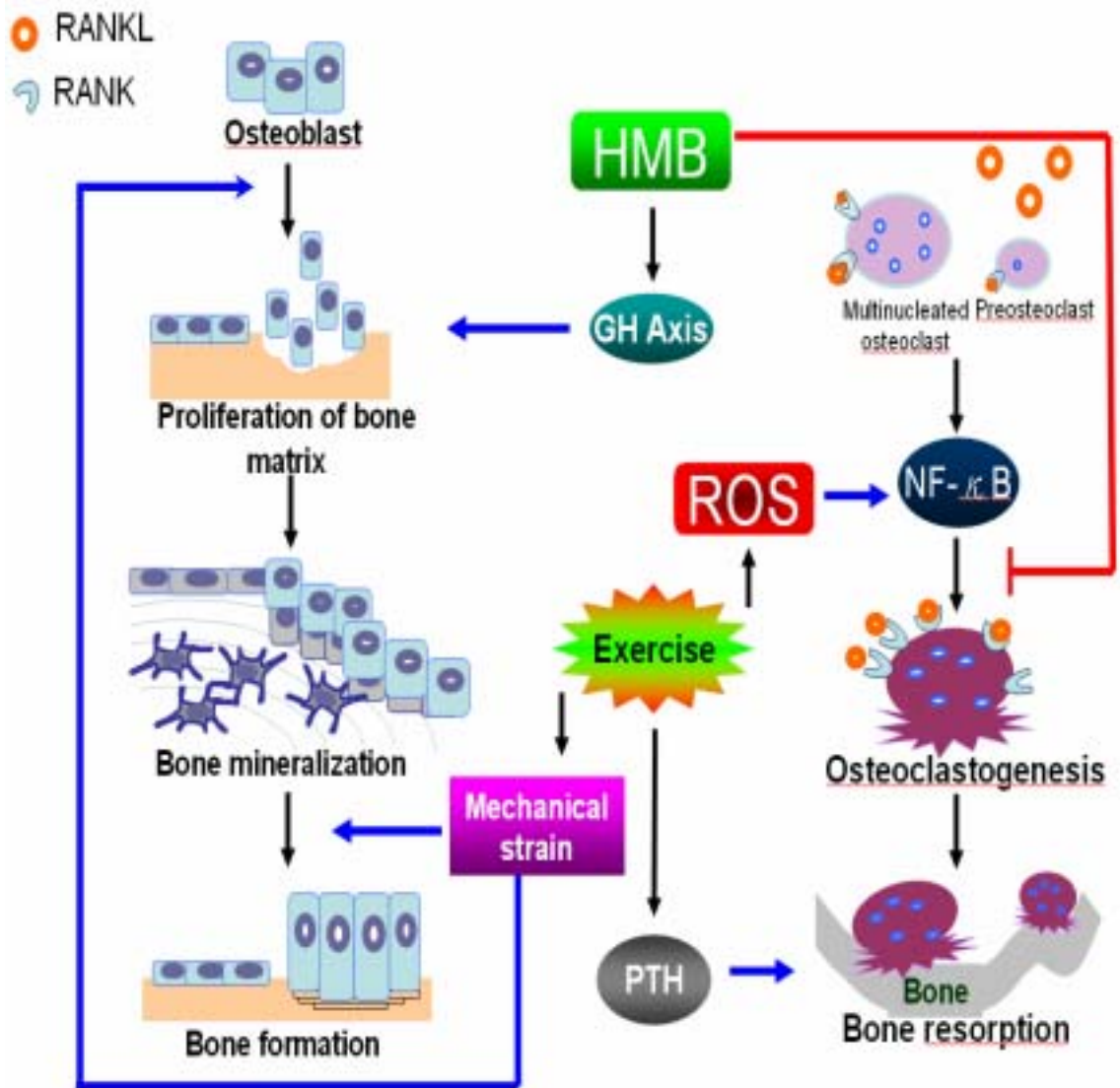


圖 14 訓練期間骨調控蛋白 OPG 的變化率。



(修改自 洪暉，國科會計劃書，民 100)

圖 15 運動與 HMB 對於骨質代謝之交互作用。