

有骨消氣仿萃取物刺激 MC3T3-E1 前驅造骨細胞  
胞分化之研究

The chloroform extract of *Sambucus formosana*  
stimulates preosteoblastic differentiation of  
MC3T3-E1 cells

研究生：洪銘宏

指導教授：邱文慧 博士

國立台東大學

生命科學系

碩士論文

中華民國九十九年一月

國立台東大學

學位論文考試委員審定書

系所別：生命科學研究所

本班 洪銘宏 君

所提之論文 有骨消氣竹萃取物刺激MCTB-E1前驅造骨細胞分化之研究

業經本委員會通過合於  碩士學位論文 條件  
 博士學位論文

論文學位考試委員會：唐志邦

(學位考試委員會主席)

陳運志

邱文慧

(指導教授)

論文學位考試日期：99 年 1 月 4 日

國立台東大學

附註：1. 本表一式二份經學位考試委員會簽後，送交系所辦公室及註冊組或進修部存查。  
2. 本表為日夜學制通用，請依個人學制分送教務處或進修部辦理。



## 謝誌

時間總是在你不經意的時候悄悄流逝，彷彿踏入實驗室是昨天才發生的事情。即將結束在實驗室裡打拼的生活，一本不厚不薄的碩士研究論文，是我兩年半來最大的成就，但是這個成就卻是大家給我的。

感謝我的恩師邱文慧老師，謝謝老師兩年半來的照顧，讓我在台北的生活充滿溫馨。老師的教誨使我不會走入實驗的迷途，讓我可以順利的完成我的學業。感謝國立陽明大學廖志飛老師和弘光科技大學陳建志老師，謝謝你們對論文的指導以及感謝三位老師對於我的努力的肯定，讓我可以順利拿到碩士的文憑。

感謝慧珠學姊，總是在妳很忙的時候麻煩妳，不過妳還是很有耐心的回答我的問題，幫我解決實驗上的疑慮。感謝姿君學姐在實驗室的幫助，還有帶來好吃的點心。感謝淑慧、宇柔、揆廷、小將、文澤、慶芸、晞璿、品文、小鈺、怡如，謝謝你們的陪伴與幫助，是你們讓實驗室充滿歡笑與和樂。感謝我的女朋友欣諭，謝謝她陪我在實驗室度過每個周末，謝謝她對我的包容。也謝謝育清、俊惟、志祥、育豪，還有許多的好朋友們，你們的鼓勵是對我最好的幫助。

出門在外很久了，一直沒有時間回家，感謝我的爸爸、媽媽、大姐和二姐是你們的支持和體貼、包容我的壞脾氣，我非常的感謝你們，是你們的無私與付出造就了現在的我，僅以此論文獻給我的家人，謝謝你們。

# 目錄

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
第一章 緒論.....	5
第一節 前言.....	6
第二節 文獻回顧.....	9
一 骨的構成.....	9
二 骨細胞的分類.....	11
三 骨骼的重塑.....	14
四 骨生成之分劃指標.....	16
五 造骨細胞生成之訊息傳遞路徑.....	18
六 骨質疏鬆症(Osteoporosis).....	20
七 有骨消.....	22
第三節 研究目的.....	23
第二章 材料與方法.....	32
第一節 實驗材料.....	33
第二節 實驗方法.....	37

一 有骨消萃取物之製備 .....	37
二 造骨細胞之培養 .....	37
三 細胞存活率(Cell viability)分析 .....	38
四 鹼性磷酸酶活性分析(ALP activity assay) .....	39
五 OPN、OPG、RANKL 的含量測定 .....	41
六 礦物質化結節(bone nodule)形成的分析 .....	41
七 細胞蛋白質萃取 .....	43
八 電泳法以及西方墨點法 .....	46
第三節 統計分析 .....	49
第三章 結果 .....	50
第一節 有骨消氣仿層萃取物對 MC3T3-E1 的 ALP 活性及細胞存活率之影響 .....	51
第二節 SF-C 與 SF-C-6 誘發 OPN、OPG 及 RANKL 生成之影響 .....	53
第三節 SF-C 和 SF-C-6 對 MC3T3-E1 形成礦物質化結節的影響 .....	54
第四節 SF-C 刺激造骨細胞分化過程中對 BMPs/SMAD signaling pathway 的影響 .....	55
第五節 SF-C 刺激造骨細胞分化過程中對 MAPKs signaling pathway 的影響 .....	56
第六節 SF-C 刺激造骨細胞分化過程中對 PI3K/Akt signaling pathway 的影響 .....	57

第四章 討論 .....	69
第五章 結論 .....	75
第六章 參考文獻 .....	77
圖 I 長骨的構造圖 .....	24
圖 II 造骨細胞分化系列圖 .....	25
圖 III 骨重塑作用的重要時期 .....	26
圖 IV BMPs 誘導造骨細胞生成之訊號傳遞路徑 .....	27
圖 V MAPKs pathway 的成員 .....	28
圖 VI BMPs 活化 SMAD 和 p38 kinase 以及其正相關性 .....	29
圖 VII 造骨細胞分化中 PI3K/Akt pathway 的表現 .....	30
圖 VIII 有骨消植物 .....	31
圖一 有骨消萃取之流程圖 .....	58
圖二 SF-C 和 SF-M 對 MC3T3-E1 的影響 .....	59
圖三 SF-C 之分劃物對 MC3T3-E1 之預試驗 .....	60
圖四 SF-C-5、SF-C-6、SF-C-7 對 MC3T3-E1 的影響 .....	61
圖五 SF-C-6 之次分劃物對 MC3T3-E1 的影響 .....	62

圖六 SF-C 和 SF-C-6 誘發骨生成分化指標之測試.....	63
圖七 SF-C 和 SF-C-6 刺激 MC3T3-E1 形成礦物質化結節的影響.....	64
圖八 SF-C 對 BMPs/SMAD signaling pathway 的影響.....	65
圖九 SF-C 對 p38 MAPK 的影響.....	66
圖十 SF-C 對 ERK MAPK 和 JNK MAPK 的影響.....	67
圖十一 SF-C 對 PI3K/Akt signaling pathway 的影響.....	68



## 中文摘要

骨質疏鬆症 (osteoporosis) 是因為蝕骨細胞的骨蝕損作用 (osteoclastic bone resorption) 大於造骨細胞的骨形成作用 (osteoblastic bone formation) 的一種失衡現象，導致骨量減少及骨密度降低而使骨骼微細結構發生破壞，惡化的結果將導致骨骼脆弱，並使骨折的危險性明顯增高。目前臨床上治療骨質疏鬆症的藥物大多是投予骨蝕損抑制劑，但此類藥物僅能阻止骨質進一步流失卻無法顯著增加骨密度，因此研發出具有促進骨生成作用的藥物是改善骨質疏鬆症的另一個研究方向。本論文以前驅造骨細胞株 MC3T3-E1 作為研究對象，希望能自傳統使用的中草藥資源找出具有促進骨質新生作用的藥物。有骨消 (*Sambucus formosana*) 為民間常用於治療骨折疼痛及跌打挫傷之中草藥，本論文發現有骨消氯仿層萃取物 SF-C 呈現濃度相關性地促進 MC3T3-E1 細胞分化而增加鹼性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 活性，並顯著增加骨基質蛋白-骨橋蛋白 (Osteopontin, OPN) 的表現及礦化現象，此外，SF-C 也會促進 Osteoprotegerin (OPG) 生成。進一步分離 SF-C 後得到 8 個分劃物 (fraction) SF-C-1~SF-C-8，評估其促進 MC3T3-E1 分化的能力發現 SF-C-6 增加 ALP 活性的能力最強，而且也會增加礦化作用。繼續以增加 ALP 的生物活性為導向進行 SF-C-6 細部分離並得到 6 個次分劃物 (subfraction) SF-C-6-1~SF-C-6-6。雖然 SF-C-6 及 SF-C-6-6 仍保有促進造骨前驅細胞分化的活性，但其作用仍低於氯仿萃取物 SF-C，因此本論文選擇探討氯仿萃取物 SF-C 促進造骨細胞分化的作用機轉。實驗發現氯仿萃取物 SF-C 可顯著

增加磷酸化 Akt、磷酸化 Smad 及磷酸化 p38 的表現，且預處理 PI3K 抑制劑 wortmannin、BMP 受體抑制劑 noggin 以及 p38 抑制劑 SB203580 皆可顯著抑制氣仿層萃取物 SF-C 增加 ALP 活性的作用，但是預處理 ERK 抑制劑 PD98059 和 JNK 抑制劑 SB600125 卻不影響 SF-C 的作用，暗示有骨消氣仿層萃取物 SF-C 可透過活化 BMP2/Smad 途徑、p38 MAPKs 途徑以及 PI3K/Akt 途徑促進造骨分化。綜合上述，本研究發現有骨消氣仿層萃取物含有促進骨質新生的活性成分，其作用積轉可能是藉由 (1) 促進造骨細胞分化及礦化並增加骨基質蛋白 OPN 的生成，(2) 提高 OPG 的生成濃度而達成。



## Abstract

Osteoporosis is the imbalance caused by increased osteoclastic bone resorption over osteoblastic bone formation. The decrease in bone mass and bone density could improve defects in bone microarchitecture. The development and progress of osteoporosis can increase the risk for fractures that are a serious problem with many adverse consequences. Until now, most therapies for osteoporosis were focus on the bone resorption inhibitors. Such kinds of medicines just prevent the bone lose but can not increase the bone mass obviously. Thus, a new development stratage for thetreatment of osteoporosis is to find out some drug that has the potential to increase bone mass. The thesis used MC3T3-E1 pre-osteoblastic cell as a target to assess the bone anabolic effects of traditional Chinese medicine. *Sambucus formosana* is a caprifoliaceae herb and often used as a folk medicine to remedy fracture, contusion and pain induced by rheumatism. The research found the chloroform extract of *Sambucus formosana* (SF-C) induced MC3T3-E1 differentiation in a dose-dependent manner by increase in ALP activity, enhance the expression of OPN and OPG, and mineralization. Futher isolation of SF-C obtained 8 fractions, named SF-C-1 ~ SF-C-8. Among these 8 fractions, SF-C-6 be the most potent one to induce osteoblastic differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells. Follow the bioactivity-guide fractionation, 6 subfractions named SF-C-6-1 ~ SF-C-6-6 were isolated from SF-C-6. Although SF-C-6 and SF-C-6-6 still have the ability to promote pre-osteoblast differentiation, but their effects were less than SF-C. Thus, the upstream SF-C was chose to investigate the mechanisms of action implicated in osteoblastogenesis. Our results showed that SF-C notably increased the expression of phosphorylation Akt, Smad and p38. Further, pretreated with PI3K inhibitor wortmannin · BMP receptor

inhibitor noggin and p38 inhibitor SB203580 all markedly inhibited SF-C induced ALP activity. But MEK inhibitor PD98059 and JNK inhibitor SP600125 had no effect on the function of SF-C. The results suggested that Sf-C could promote osteoblast differentiation by activating BMPs/SMAD, p38 MAPKs, and PI3K/Akt signaling pathways. In conclusion, our research found that the chloroform extract of *Sambucus formosana* have the ability to promote osteoblastogenesis, the possible mechanisms might involve (1) induce osteoblast differentiation, mineralization and OPN production, (2) and increase the level of OPG.





# 第一章 緒論

## 第一節 前言

隨著公共衛生政策施行、健康知識的普及和醫學的進步，使人們的平均壽命持續延長。20 世紀中，國際衛生組織（WHO）更是對各先進國家提出「全球人口結構已邁向老年化的趨勢」，而建議將「老人醫療」列入醫療需求重點之一。隨年齡增加而出現的慢性病中，骨質疏鬆症（osteoporosis）是一種最常見的骨頭代謝性疾病，主要造成持續性的骨密度減少，也是造成老年腰背酸痛和骨折的一大潛在因素。此外，多項研究指出女性於停經後，由於雌激素的減少，骨量流失速度明顯增加（Mishima, 1988）。在全世界，尤其是亞洲地區骨質疏鬆症及其伴隨而致的骨折與併發症已成為最受關切的病症之一。

根據我國的資料顯示，65 歲以上，城市婦女脊椎壓迫性骨折的盛行率約為 19%，男性則為 12%。1996 至 2000 年間，65 歲以上女性每年髖部骨折約為 3500 例，男性約為 2500 例。2006 年我國行政院主計處公布，台灣 65 歲以上老年人口數為 226.3 萬人，即將突破總人口比率 10%。預計台灣 65 歲以上人口比例在 2014 年將增為 13%，之後快速上升，至 2051 年將高達 37%。隨著老年人口不斷增加，骨質疏鬆症的預防有趨勢上的重要性。

簡單的解釋骨質疏鬆症就是一種「骨質減少」的疾病，是由於骨蝕損作用（bone resorption）和骨形成作用（bone formation）之間的不平衡所造成（Kuo *et al*, 2005），而老化及更年期障礙是造成骨質疏鬆症的兩個主要原因。骨質疏鬆症

使骨折的機率大幅增加（特別是在腕部），同時也讓壓迫性的神經疼痛造成身體機能的限制（Lee *et al*, 2008）。到目前為止，大多骨質疏鬆症的治療是以藥物抑制骨質吸收為主。臨床上有抑鈣素（calcitonin, CT）、副甲狀腺激素（parathyroid hormone, PTH）、雌激素（estrogen）、雙磷酸鹽類（bisphosphonates）、活性型維生素 D（ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ）、維生素 K（vitamin K）、氟化鈉（sodium fluoride, NaF）等多種合成性用藥（Stuart *et al*, 1997）。然而，在長期服用下副作用的產生是無可避免的，例如：以鼻腔或注射方式投與抑鈣素，會造成病人的不適感和注射部位會有疼痛感、噁心、輕微頭暈等症狀；雌激素則有噁心、嘔吐的症狀，甚至併發子宮內膜癌等副作用（Barrett *et al*, 1996）；雙磷酸鹽類同樣會有噁心、嘔吐、腸不適等副作用（Stuart, 1997）。目前這些抑制骨蝕損的藥物只能阻止骨質的進一步流失，卻無法有效促進骨質新生。因此，患者在無法長期忍受骨質疏鬆症治療所伴隨的副作用下，轉而尋求傳統中醫藥治療法。除了中醫典籍上記載的強化骨質複方外，近年來，更有許多研究報告指出中草藥所含的天然成分可以促進造骨細胞分化及骨質的形成，例如：存在於鼠李屬植物的根和樹皮中的 emodin（Lee *et al*, 2008）、存在於淫羊藿中的 icariine（Yin *et al*, 2007）、植物多酚白藜蘆醇（resveratrol）（Boissy *et al*, 2005）和大豆異黃酮（daidzein）（Pan *et al*, 2005）等。具有直接刺激造骨細胞的增生和分化作用。

冇骨消是台灣原生植物，除了有消炎解毒的功效外，民間亦用來治療骨折疼痛及跌打損傷。在預試驗中我們發現冇骨消萃取物雖然不影響蝕骨細胞活性，

但卻顯著促進造骨細胞分化。由於國人對傳統中草藥治療接受度增加，及長期用後並無顯著副作用的報導，因此，本論文將以現在科學研究，驗證有骨消治療“骨傷”的活性，期望可用於改善骨質疏鬆症疾病。



## 第二節 文獻回顧

### 一、 骨的構成

由人體解剖學上可知，成人約有 206 塊骨骼，由各種不同的形狀組成，其複雜的內在外在結構，使骨骼在減輕重量的同時能夠保持堅硬。一般俗稱的「骨」，主要由骨髓、骨膜和骨質三部分構成。以長骨為例(圖 I)，長骨的兩端是呈窩狀的骨鬆質 (spongy bone)，中間部位是緻密堅硬的骨密質 (compact bone)，骨中央是骨髓腔。嬰幼兒的骨髓腔內的骨髓細胞因具有造血功能而呈現紅色，隨著年齡的增長，扁骨內的骨髓，因脂肪及纖維/纖維結締組織的堆積而形成黃骨髓，隨即失去造血功能。但長骨兩端和扁骨的骨鬆質內，則終生保持著具有造血功能的紅骨髓。

骨膜是覆蓋在骨表面的結締組織膜，裏面有豐富的血管和神經，具有營養骨質的作用。同時，骨膜內還有造骨細胞 (osteoblast)，能增生骨層，能使受損的骨組織癒合、再生，造骨細胞 (osteoblast) 和蝕骨細胞 (osteoclast) 分別反覆地進行建造和破壞骨骼的作用。如果骨形成的比例高，比如人類的嬰兒和青少年兩大成長期，骨頭便有可能延長、加粗、更緻密；相對的，骨侵蝕的速率增加的話，會因為骨質疏鬆，伴隨著多發性的脊椎骨骨折，造成身高的降低。

骨質的基本化學成份是骨基質 (osteoid)；骨基質分為有機質和無機質兩部

分，骨有機質主要是蛋白質，使骨具有一定的韌度，而骨無機質主要是鈣質和磷質，使骨具有一定的硬度。人體的骨就是這樣由若干比例的有機物與無機物共同組成，所以人骨既有韌度又有硬度，只是所佔的比例有所不同。隨年齡階層的改變，骨有機質與無機質的比例也開始出現變化，以兒童及少年為例，因其骨有機質的含量多，所以柔韌度及可塑性比較高；而老年人的骨無機質的含量多，使得骨質硬度高，容易折斷。



## 二、 骨細胞的分類

### (1) 造骨細胞 (Osteoblast, OB)

造骨細胞是從間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells) 分化而來(圖 II)，具有豐富的粗糙型內質網及高基氏體，會利用縫隙連結結構 (gap junction) 與其他相鄰的造骨細胞傳遞訊息。造骨細胞會分泌骨鈣素 (osteocalcin)、骨絡涎蛋白 (bone sialoprotein, BSP)、骨橋蛋白 (osteopontin, OPN)、第一型膠原質 (type I collagen) 等物質。在造骨細胞所產生的蛋白質中，骨鈣素與骨絡涎蛋白已被證實為骨特异性蛋白，其中還包括鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 等。造骨細胞也會受到多種激素、生長因子的影響，如：副甲狀腺素 (parathyroid hormone, PTH)，前列腺素  $E_2$  (prostaglandin  $E_2$ ,  $PGE_2$ )，轉化生長因子 (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )，1,25 di-hydroxy Vitamin D3 ( $1,25(OH)_2D_3$ ) 對其有分化刺激作用，可以促使前驅造骨細胞的增生與骨膠原蛋白的合成。

造骨細胞最早的標記為 ALP 與 BSP，較晚期則是骨橋蛋白 (OPN) 與骨鈣素 (OCN)，而第一型膠原質在造骨細胞整個形成過程中均可發現。而造骨細胞也參與骨質的礦化過程，分泌的 ALP 可與  $1,25(OH)_2D_3$  相互使鈣離子 ( $Ca^{2+}$ ) 與磷酸基團 ( $PO_4^{3-}$ ) 形成非晶形之磷酸鈣及氫氧基磷酸鈣 (calcium hydroxyapatite)，在骨礦化過程中扮演重要角色。

## (2) 骨細胞 (Osteocyte)

由造骨細胞分化而來的成熟骨細胞，是骨組織主要的細胞。成熟骨細胞本身不具備有絲分裂的能力，而是位於骨表層的造骨細胞分泌出基質將本身包覆所形成，之後骨細胞並不會再分泌基質。換句話說，骨細胞即是被本身分泌基質所包圍之造骨細胞。骨細胞的形狀較扁，成杏仁狀，核染色質更為凝聚。

## (3) 蝕骨細胞 (Osteoclast, OC)

蝕骨細胞屬於多核細胞 (multinucleated cells)，由單核球/巨噬細胞 (monocyte/macrophage) 家族中的單核前驅物 (mononuclear progenitors) 融合而來，過程中需要造骨細胞及基質細胞 (stromal cell) 輔助啟動分化，藉由這兩種輔助細胞所分泌的巨噬細胞族群刺激因子 (macrophage-colony stimulating factor, M-CSF) 以及活化態的 NF- $\kappa$ B ligand 的受體 (receptor for activation of nuclear factor  $\kappa$ B ligand, RANKL) 的表現，促使蝕骨細胞形成。蝕骨細胞是一種獨特、且具高度特異性的細胞，細胞直徑為 20~100  $\mu$ m，型態上屬於多核、巨大且分化完整的細胞。

蝕骨細胞分化晚期的標記為抗酒石酸鹽酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)，主要促進骨蝕損作用。蝕骨細胞含有一級溶小體、大量的多形性粒線體，且在緊鄰骨表面處之細胞膜會形成一波浪邊緣，稱為刷狀緣 (ruffled border)，是蝕骨細胞的骨蝕損發生及凹陷形成處。當蝕骨細胞活化時，

細胞膜上的氫離子幫浦 (proton pump) 促使氫離子打向細胞外移動，令蝕骨細胞在自身圍成的酸性密閉區進行去礦化作用 (demineralization)，接著蝕骨細胞內的溶小體在刷狀緣處釋出酸性磷酸酶 (acid phosphatase, ACP)、膠原蛋白酶 (collagenase)、蛋白酶 (proteinase) 與其他溶小體酶，對骨基質有機質的部分進行消化分解，完成整個蝕骨過程。



### 三、 骨骼的重塑

成熟的骨骼會不斷地進行一連串由蝕骨細胞與造骨細胞重複進行的骨蝕損與骨形成作用，稱為骨重塑作用 (bone remodeling)。在正常情況下，蝕骨細胞的骨蝕損作用和造骨細胞的骨形成作用之間的動態平衡，可以讓骨基質維持於穩定的階段。然而，一旦這兩種細胞間的協調出現失衡現象，將導致骨重塑作用的不穩定，而出現臨床上常見的骨質疏鬆症狀。在骨蝕損作用持續大於骨形成作用下，就會成為嚴重的骨質疏鬆症；另外，若骨形成作用大於骨蝕損作用，則會形成比較罕見的骨質異常增加。

骨重塑作用主要分為以下五個階段：活化期、蝕損期、逆轉期、形成期與休止期(圖 III)。

- (1) 活化期 (activation phase)：骨骼的重塑由受到骨細胞生長因子刺激開始，隨即活化來自骨髓幹細胞的前蝕骨細胞 (pre-osteoclasts)，使其分化後游走到骨表面上。
- (2) 蝕損期 (resorption phase)：活化前蝕骨細胞在骨表面附著以後，便分化為成熟的蝕骨細胞。此時的蝕骨細胞會開始分泌酸性磷酸酶、蛋白酶 (proteases) 與其他溶小體酶，消化分解骨骼中的礦物質及基質。
- (3) 逆轉期 (reversal phase)：當蝕骨細胞吸收作用結束後，活化的造骨細胞隨即趨向蝕骨細胞先前所在的位置。

(4) 形成期 (formation phase)：當造骨細胞聚集在骨蝕損作用造成的骨缺損處，便開始分泌基質蛋白質與膠原蛋白，再聚合成膠原纖維。接著，細胞間的礦物質（鈣、磷等）會沉澱在膠原纖維上，進入骨形成作用程序，製造新生骨。

(5) 休止期 (resting phase)：新生骨量補充了被吸收掉的骨量後，骨表面回復到休止狀態。隨後，部分造骨細胞被埋進骨內，成為骨細胞，而其餘的造骨細胞則扁平化，成為襯裡細胞 (lining cells)。

此五階段的排序和進行過程是互相接續著進行，讓骨質在不斷更新的過程中不至於流失原有的骨質量及骨硬度。

#### 四、 骨生成之分化指標

##### (1) 第一型膠原蛋白 (Type I collagen)

為骨骼中最主要的蛋白質，也是骨基質中最主要的成份，大約占有機骨基質中的 90%，可以提供礦物質晶體沉澱的位置與新生骨質的生長方向，具有調節礦物質沉澱的功能。第一型膠原蛋白可以促進細胞增殖與分化而影響造骨細胞的表現，所以被視為生長階段的一個表現因子。

##### (2) 鹼性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP)

當間葉幹細胞逐漸成熟為造骨細胞時，會大量合成鹼性磷酸酶ALP，長久以來 ALP 就被認為與骨骼形成有相關，為最早發現與造骨細胞有關的標記之一。ALP 是一個大約 65K 達爾頓 (Dalton) 的醣蛋白，大量存在於造骨細胞的表面，具有極強攜帶鈣離子的能力，對於礦化作用有極大的幫助 (Bellows *et al*, 1999)。在骨質代謝合成作用中，會經由磷酯酵素作用而釋出於血液循環中，所以 ALP 可以作為骨質代謝中之生物指標。

##### (3) 骨鈣素 (Osteocalcin, OCN)

骨鈣素是骨骼內非膠原蛋白中含量最多的一種含 gla 的蛋白質，亦稱為 Bone Gla Protein (BGP)。骨鈣素由造骨細胞合成後，協助活化的造骨細胞將鈣

吸引到骨骼組織，以調控造骨細胞礦化與成熟階段，是一個相對較晚期的指標。

而製造此蛋白需要依賴維生素 K<sub>2</sub>，將其轉變為活化形態的骨蛋白質。

#### (4) 骨橋蛋白 (Osteopontin, OPN)

骨橋蛋白為一種骨骼的礦化基質蛋白質，在骨生成中最常發現的時期是進入礦化之前，可以被視為骨生成晚期的指標。造骨細胞和蝕骨細胞均可以分泌骨橋蛋白，而骨橋蛋白對這兩種細胞也都具有影響力，可視為一種調節體內多種系統的細胞激素。因此，骨骼、心血管系統、免疫系統及發炎系統等，都可以發現到骨橋蛋白的參與。

#### (5) 蝕骨細胞抑制因子 (Osteoprotegerin, OPG)

蝕骨細胞抑制因子 (osteoprotegerin, OPG) 是一種由造骨細胞分泌的誘餌受體，主要作用於間接的結合或中和蝕骨細胞分化因子 RANKL，抑制 RANKL 和蝕骨前驅細胞上的接受器 RANK 結合，達到抑制蝕骨細胞活化的結果。

## 五、 造骨細胞生成之訊息傳遞路徑

### (1) BMPs/SMAD signaling pathway

骨骼形成蛋白(Bone morphogenetic proteins, BMPs)屬於 transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) superfamily 的其中一員，並且在骨形成和重塑的過程中扮演重要的角色 (Sykaras *et al*, 2003)。目前已經發現有許多種 BMPs，如：BMP2、BMP4 和 BMP7 與骨骼形成有關，並會誘導間葉幹細胞分化成造骨細胞並且增加造骨細胞的分化功能。BMPs 會經由結合第一型及第二型絲氨酸/蘇氨酸激酶受體 (type I and type II serine/threonine kinase receptors) 磷酸化下游訊息傳遞因子 SMAD 1/5/8，再與 SMAD 4 結合，形成一複合體(圖 IV)進入到細胞核內活化特定基因的轉錄作用，進一步調節下游基因 (Sykaras *et al*, 2003)。

### (2) MAPKs signaling pathway

MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) 是一群 serine/threonine protein kinases，參與大量細胞反應，包括：增生、凋亡、分化 (differentiation) 和免疫防禦等。extracellular-signal-regulated kinase (ERK1/2)、C-JUN NH<sub>2</sub>-terminal protein kinase (JNK) 和 p38 是三個不同的 MAPKs pathway 的主要的成員(圖 V)，可以被生長因子 (growth factors)、細胞激素 (cytokines)、抗癌藥物 (anti-cancer drugs) 等因素活化 (Raman *et al*, 2007)。許多證據指出 MAPK 訊號路徑能夠誘導骨細

胞的分化作用。活化態的 ERK1/2 已經被報導有造骨細胞分化作用和骨骼形成的能力 (Ge *et al*, 2007)。相似於 ERK1/2, p38 的活化也被報導與造骨細胞的分化有關 (Hsu *et al*, 2007)。另外還有報導指出 BMPs 不只會活化 SMAD signaling 也會磷酸化 p38 kinase 路徑, 以及 SMADs 和 p38 kinase signaling 之間是呈現正相關(圖 VI) (Nohe *et al*, 2004)。然而, p38 和 ERK1/2 這兩條訊息路徑對調節造骨細胞分化的精確的作用機制仍然不清楚。

### (3) PI3K/Akt signaling pathway

PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt 路徑調節了多種細胞反應, 包括: 細胞生長、細胞增生、以及防止細胞凋亡等 (Toker *et al*, 1997)。在 2002 年 Choudhury 等人首先發表了 BMP-2 誘導 ALP 的表現需要 PI3K 和它的下游訊號 Akt 的活化。另外, Lovastatin 是一個可以增加造骨細胞分化的藥物, 它的作用是藉由 Ras 調節活化 PI3K 和 Akt 訊息傳遞因子, 刺激 BMPs 的表現量(圖 VII), 進而促進造骨細胞的分化作用 (Ghosh-Choudhury *et al*, 2007)。同時也證實了 PI3K/Akt pathway 在造骨細胞分化過程中具有重要的功能。

## 六、 骨質疏鬆症 (Osteoporosis)

世界衛生組織於 1994 年公佈骨質疏鬆症的定義為「一種因骨量減少或骨密度降低而使骨骼微細結構發生破壞的疾病，惡化的結果將導致骨骼脆弱，並使骨折的危險性明顯增高」。然而骨骼最主要的功能就是支持，使人體維持一定型態，並且有保護內臟的效用，一旦發生骨質疏鬆症，骨頭可能會在承受輕微撞擊就會骨折，甚至引起各種併發症，而嚴重危害生命健康。因此，骨質疏鬆症也就被稱為 21 世紀「無聲無息的殺手」，臨床上也發現患者往往在發生骨折引致劇痛就醫後，才驚覺發現自己已罹患了骨質疏鬆症。

除了年長者外，另有研究指出停經後的婦女也容易罹患此疾病。在正常人的生長過程中，造骨細胞和蝕骨細胞會不斷地進行汰舊換新的生理機能，通常在 30 到 40 歲間就會達成顛峰骨骼質量 (peak bone mass)，隨後漸漸發生礦物質流失現象 (demineralization)，造成骨頭內的骨質慢慢的減少，即為醫學上所稱之骨質缺乏 (osteopenia)。此時若無適當的治療介入，骨質流失的速度會越來越快，就會形成骨質疏鬆症。另外，在神經內分泌學的研究也指出 45 歲後的女性，由於停經以及雌激素分泌量減少，不但罹患骨質疏鬆症的機率比男性高，症狀明顯出現的時間更是早的多。

另外，世界衛生組織也依照骨密度來做出以下的定義：

(1) 嚴重的骨質疏鬆症 (Severe osteoporosis)：骨密度低於年輕人的平均值

(Mean) 減去 2.5 個標準差 (Standard Error of Mean, SEM)，並且曾發生過骨折。

(2) 骨質疏鬆症 (Osteoporosis)：骨密度低於年輕人的平均值減去 2.5 個標準差，但不一定有發生過骨折。

(3) 骨質減少症 (Low bone mass or osteopenia)：骨密度介於年輕人平均值減去 1 個標準差與 2.5 個標準差之間。

(4) 正常骨密度 (Normal)：與年輕人相比，在 1 個標準差之內。

目前全球已超過 2 億人口深受骨質疏鬆的威脅。在台灣，一年約有 15,000 名骨質疏鬆的病患，開刀住院費用約 10 萬，出院後的照護一年約 100 萬，所以一年治療骨質疏鬆的費用，就高達 165 億元。罹患的人口數若持續增加，醫療資金需求也會急速上升，而終將成為人民龐大的負擔。

## 七、 冇骨消

冇骨消(圖 VIII)學名為 *Sambucus formosanum*，為忍冬科 (Caprifoliaceae) 接骨木屬台灣特有種的植物，具有台灣蒴藋、七葉蓮、七珊瑚花、陸英的別稱。由平地至海拔 2500 公尺左右的高地均有分布，為本土固有植物重要的蜜源植物。冇骨消性微寒，味甘淡微苦，全株皆可入藥。在民間療法中，根具有消腫、舒經活絡及消炎解毒的功效；主治骨折疼痛、跌打損傷、風濕骨痛等。莖葉則有利尿解毒、消腫活血止痛的功用；主治肺炎、腎炎水腫及腰膝痠痛；外用可治跌打損傷。然而，在 2005 年 Xie F 等人發現，同樣接骨木屬的 *Sambucus williamsii* 接骨木，在去卵巢大鼠的動物實驗裡具有增加骨質和骨頭強度的功能；另外在 2007 年也發現到經由 60% 酒精萃取的 *Sambucus williamsii* 的萃取物，可以增加 UMR106 造骨細胞株 ALP 活性的就有 5 個之多 (Yang *et al*, 2007)。所以比對民間療法和文獻報導，推測同樣屬於接骨木屬的冇骨消應該具有相似的萃取物，才能夠有治療骨折和跌打損傷的效用。

### 第三節 研究目的

由於冇骨消具有治療骨折疼痛、跌打損傷、風濕骨痛...等傳統民間用法，預試驗中我們也發現冇骨消粗萃物可顯著促進前驅造骨細胞(MC3T3-E1)分化。由於西方文獻中並未有冇骨消的相關研究，因此本論文擬於細胞層面探討冇骨消促進造骨分化的可能機轉，並以生物活性為導向進行進一步的分離萃取。



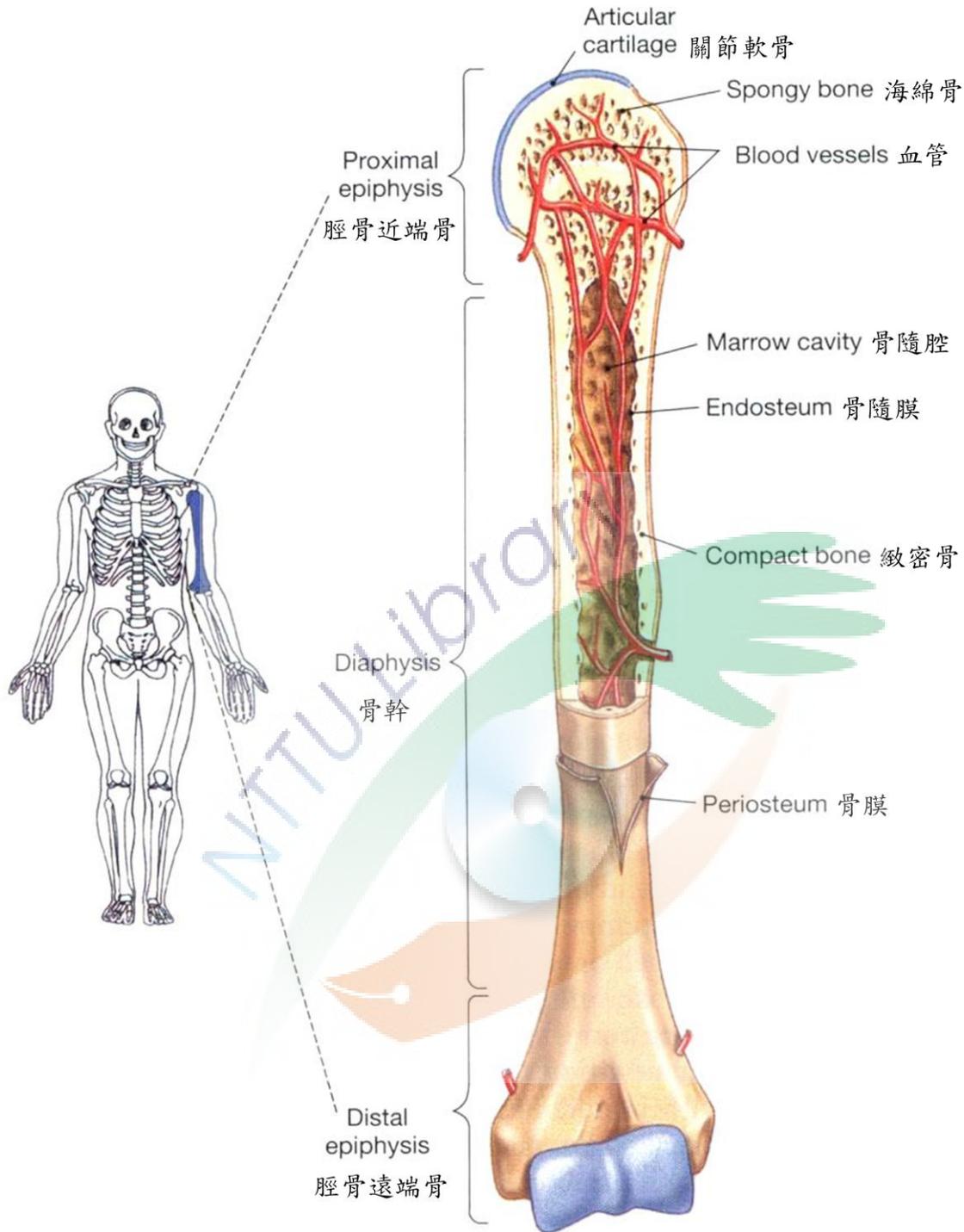


圖 I、長骨的構造圖 (Martini FH *et al*, 2000)

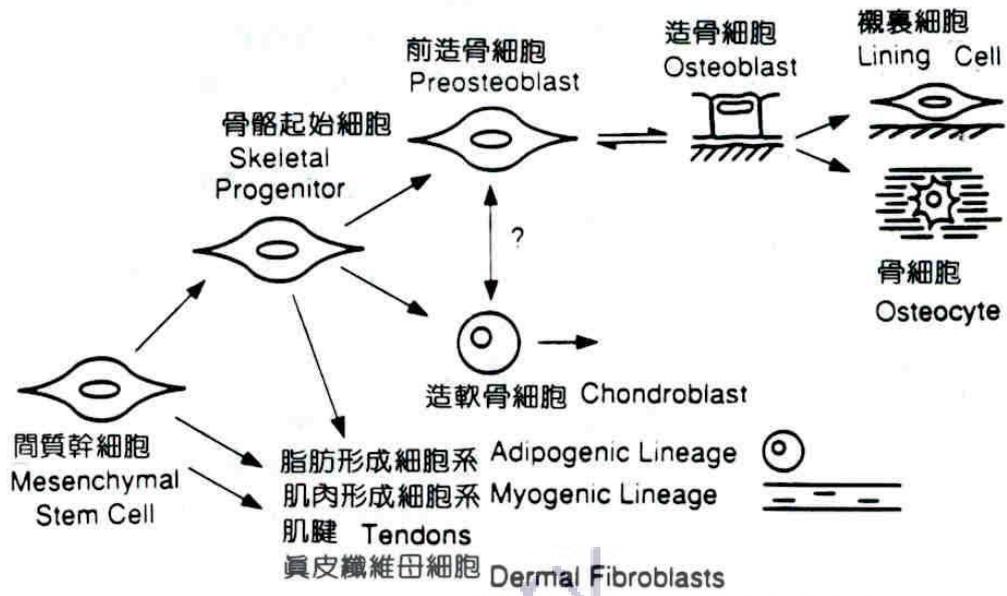
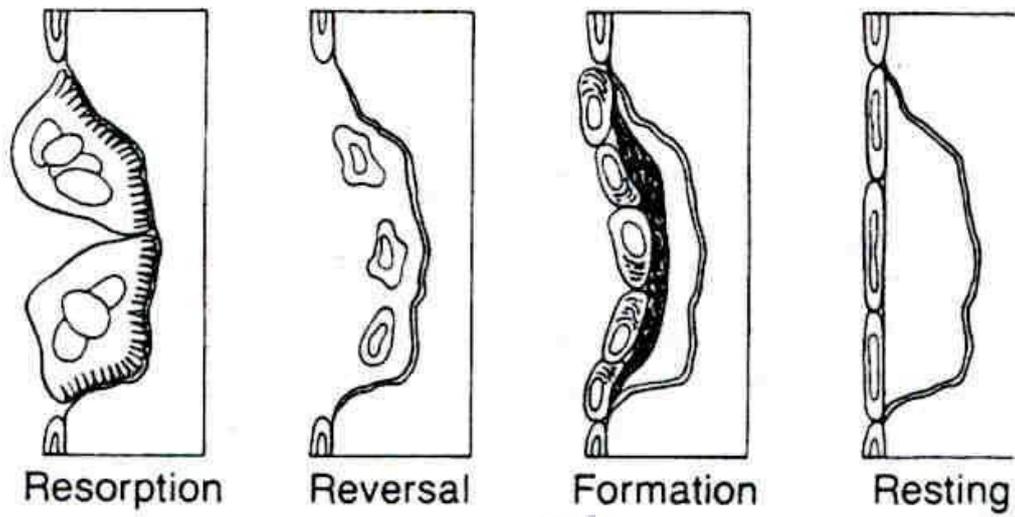


圖 II、造骨細胞分化系列圖(楊榮森, 民 86)。



蝕損期

逆轉期

形成期

休止期

圖 III、骨重朔作用中幾個重要的時期(Mundy GR, 1999)。

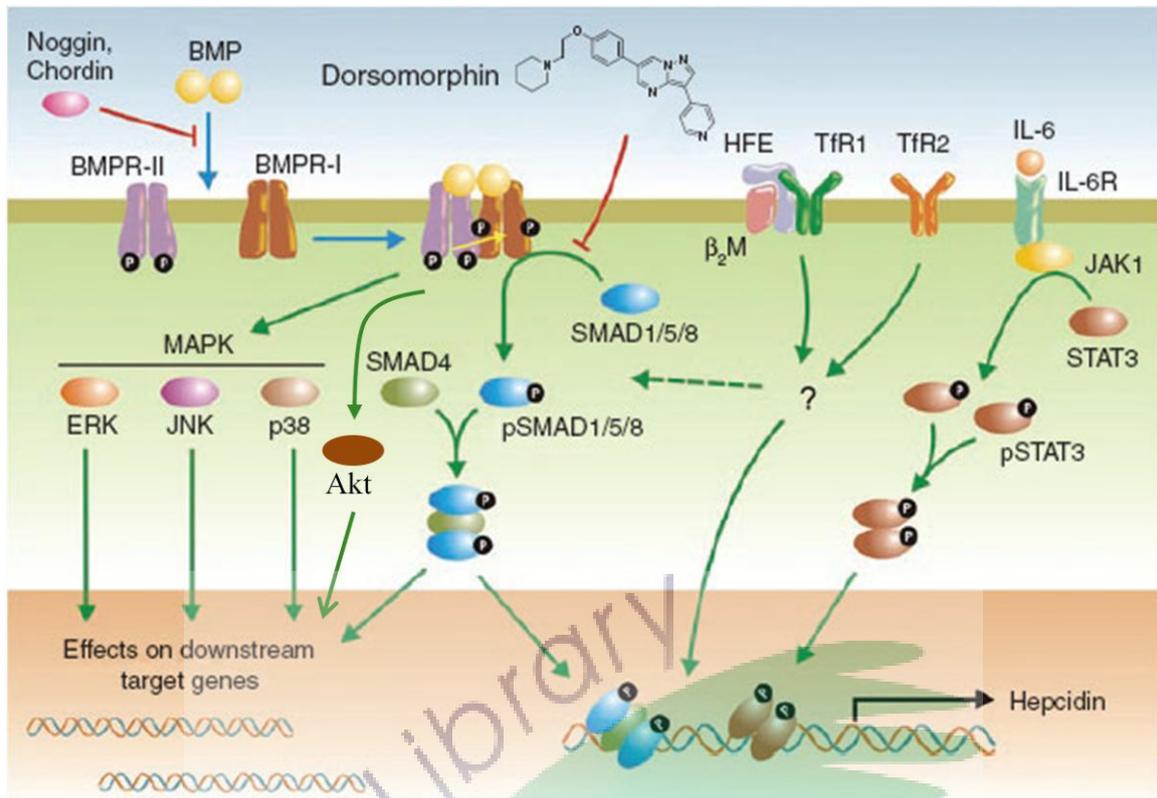


圖 IV、BMPs 誘導造骨細胞生成之訊息傳遞路徑(Anderson GJ *et al*, 2008)。

### Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades

Select a search pathway below.

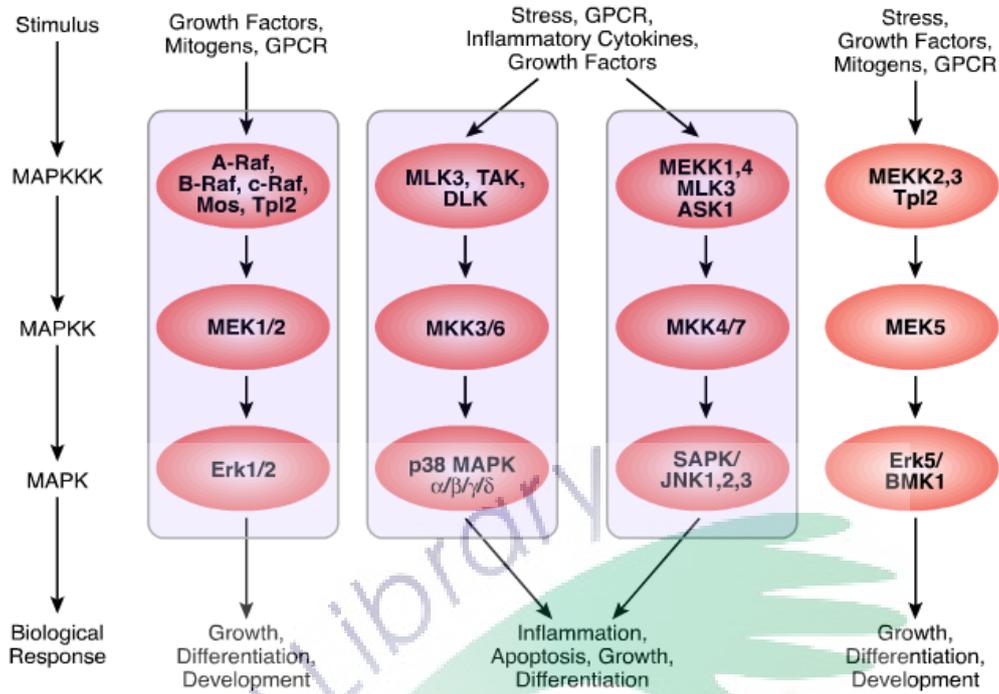


圖 V、三個不同的 MAPKs pathway 的成員

(<http://www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp>)。

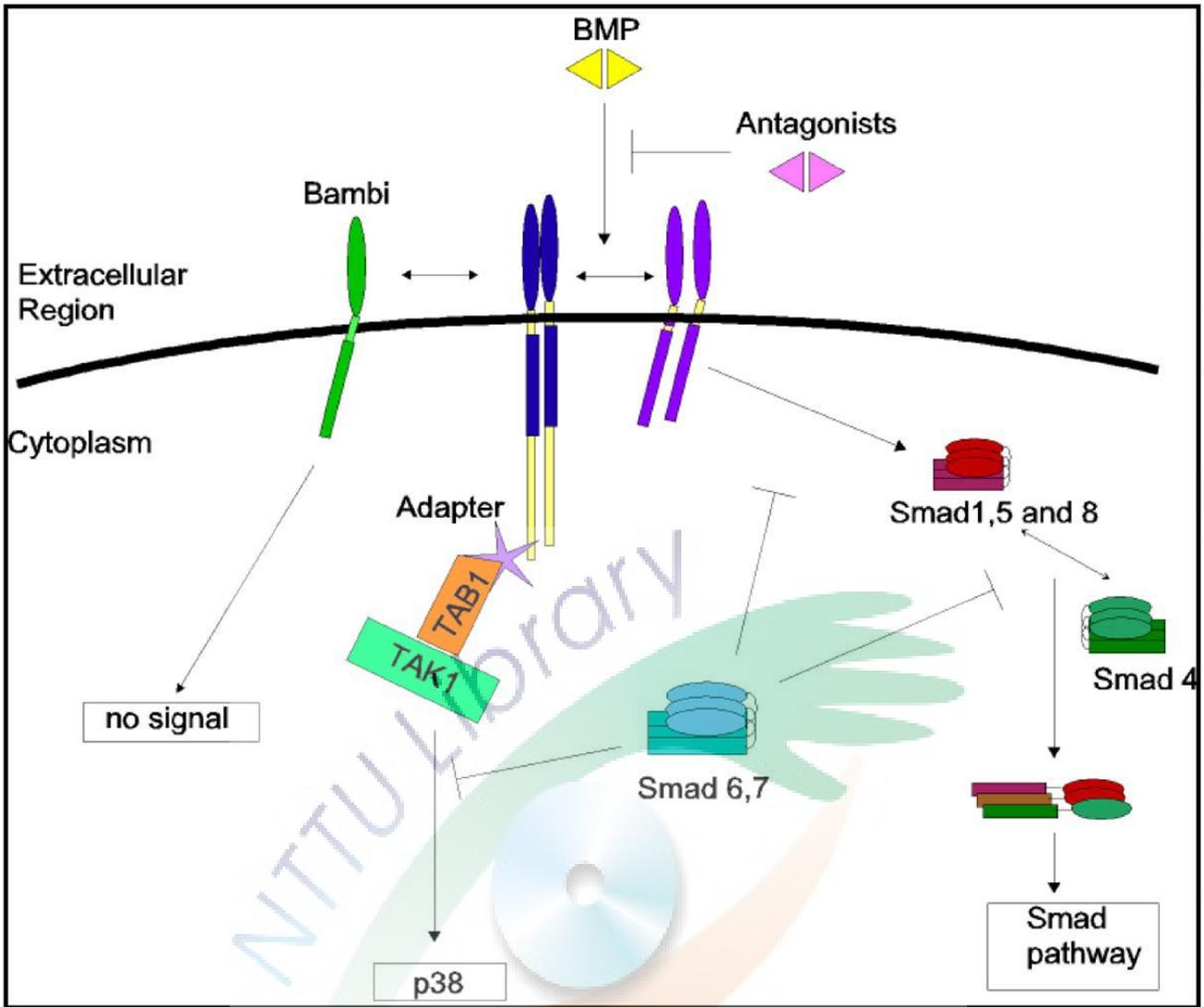


圖 VI. BMPs 同時活化 SMADs 和 p38 kinase 以及其正相關性 (Nohe *et al*, 2004)。

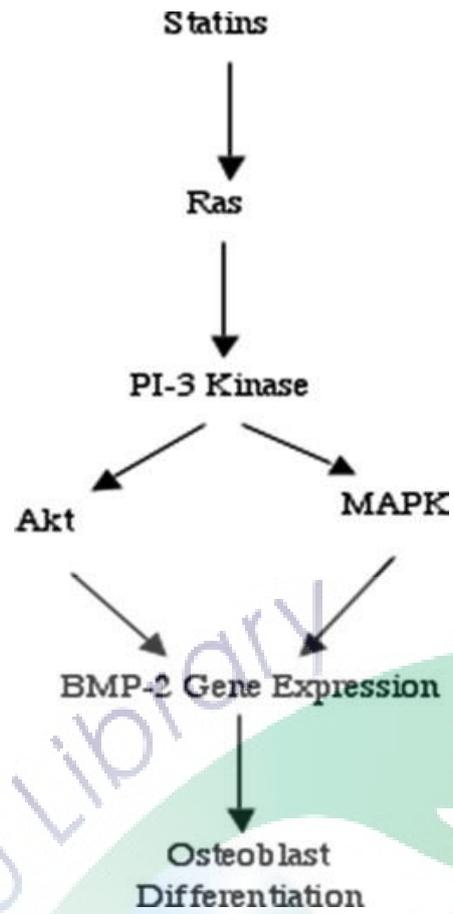


圖 VII、造骨細胞分化中 PI3K/Akt pathway 的表現(Choudhury NG *et al*, 2007)。



圖 VIII、有骨消植物。



## 第二章 材料與方法

## 第一節 實驗材料

### 一、 實驗藥品與試劑

2-Amino-2-methyl-1-propanol (AMP) (Sigma, USA)

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, USA)

Agarose LE (USB, USA)

Alizarin Red S (ARS) (Sigma, USA)

Aprotinin (Sigma, USA)

Ascorbic acid (Sigma, USA)

Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, USA)

Bovine serum albumin (BSA) (Sigma, USA)

Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA)

Foetal bovine serum (Biological industries, Israel)

Glycerol 2-Phosphate (Wako, Japan)

Immobilon<sup>TM</sup> Western Chemiluminescent HRP Substrate (MILLIPORE, USA)

Leupeptin (Sigma, USA)

Magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>) (USB, USA)

Methanol (Echo, Taiwan)

Minimum Essential Medium Alpha Medium ( $\alpha$ -MEM) (Invitrogen Corporation,

USA)

NP-40 (Sigma, USA)

Mouse Osteopontin Quantikine (R&D Systems, USA)

Mouse Osteoprotegerin/TNFRSF11B Quantikine (R&D Systems, USA)

Mouse TRANCE/RANKL/TNFSF11 Quantikine (R&D Systems, USA)

PD98059 (Sigma, USA)

Pepstatin (Sigma, USA)

Potassium chloride (KCl) (J.T. Baker, USA)

SB203580 (Calbiochem, USA)

SP600125 (Calbiochem, USA)

Sodium chloride (NaCl) (Amersham Life Science, USA)

Sodium dodecyl sulfate (SDS) (USB, USA)

Sodium fluoride (NaF) (Sigma, USA)

Sodium hydrogen carbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ) (J.T. Baker, USA)

Sodium orthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) (Sigma, USA)

TEG (BIOCHROM AG, Germany)

Tris (Bio-Rad, USA)

TRIZOL reagent (Invitrogen, USA)

Tween-20 (Sigma, USA)

## 抗體

Anti-rabbit IgG (Cell Signaling, USA)

p38 MAP kinase antibody (Cell Signaling, USA)

p44/42 MAP kinase antibody (Cell Signaling, USA)

Phospho-GSK-3  $\beta$  Antibody (Cell Signaling, USA)

Phospho-p38 MAPK kinase Antibody (Cell Signaling, USA)

Phospho-p44/42 MAP kinase Antibody (Cell Signaling, USA)

Phospho-SAPK/JNK Antibody (Cell Signaling, USA)

Phospho-Smad1/Smad5/Smad8 Antibody (Cell Signaling, USA)

RunX2 Antibody (Santa Cruz, USA)

SAPK/JNK rabbit Antibody (Cell Signaling, USA)

Smad 1/5/8 Antibody (Santa Cruz, USA)

## 二、 儀器設備與耗材

24 well cell culture cluster (Costar, USA)

96 well cell culture cluster (Costar, USA)

Autoclave (Tomin, Taiwan)

Centrifuge (Kubota 1720, Kubota 5800, Japan)

CO<sub>2</sub> incubator (造鑫, Taiwan)

ELISA reader (Bio-Tek Instrument, USA)

Hypercassette™ (Amershan Life Science, USA)

Laminar flow hood (造鑫, Taiwan)

NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA)

PES bottle top filter, 500ml (NALGENE filtration Products, USA)

PCR electrophoresis chamber (Advance, Japan)

pH meter (Jenco, Microcomputer pH-vision 6071, Taiwan)

SDS-PAGE electrophoresis chamber (Novel Experimental Technology, USA)

Tissue Culture dishes, 100×20 mm (CELLSTAR, USA)

Tissue Culture dishes, 35×10 mm (FALCON, USA)

Water bath (Yihdern, Taiwan)

迴轉式恆溫振盪器 (豐技生技, Taiwan)

## 第二節 實驗方法

### 一、 有骨消萃取物之製備

先將有骨消 (*Sambucus formosanum*) 乾燥後，切割成小片段，加入乙醇 (ethanol)，以水浴加熱方式蒸煮 2 小時，然後過濾去渣起汁，如此重複 2 次，合併所有的有骨消乙醇萃取的過濾液，經過減壓濃縮，得到乙醇粗抽出物。加入氯仿 (chloroform)，過濾可得氯仿不可溶 (SF-M) 和氯仿可溶 (SF-C) 等兩部份。進行 ALP activity assay，以刺激 ALP 活性能力最優良的萃取物進行矽膠 (Silica Gel) 層析分析分離，取得次分割物 (subfractions)，如此重複動作，期望可以取得純化物。

### 二、 造骨細胞之培養

本論文所選用的小鼠前驅造骨細胞株 MC3T3-E1，為陽明大學口腔生物研究所 陳恆理老師實驗室提供。使用 10 cm 培養皿將細胞培養於含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、100 unit/ml penicillin 及 100 unit/ml streptomycin 的 Minimum Essential Medium Alpha Medium ( $\alpha$ -MEM) 中，將細胞培養於 37 °C 恆溫且含有 5% CO<sub>2</sub> 之培養箱，當細胞長至八、九分滿時，進行細胞的繼代培養。繼代培養時，先將原來的  $\alpha$ -MEM 抽乾，加入 phosphate buffered saline (PBS) 搖晃清洗三次，隨後抽乾，再加入 1ml 的 TEG [含 trypsin、

ethylenediaminetetraacetic (EDTA) 及 glucose] 溶液，潤濕所有細胞，放入培養箱中約 5-10 分鐘，再加入 2ml 的  $\alpha$ -MEM，將細胞輕輕沖洗下來置入 15ml 離心管，以 15000 rpm，4°C，7 分鐘的條件離心。離心後倒掉上清液，細胞拍散，加入 1ml 新鮮  $\alpha$ -MEM。抽取 100  $\mu$ l 的細胞液培養於 10cm 培養皿，並置回培養箱中，剩餘細胞可用於細胞實驗中。

### 三、細胞存活率 (Cell viability) 分析

MTT (3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 為一種黃色水溶性的 tetrazolium salt，在活細胞中可藉由粒線體的琥珀酸去氫酶 (succinate dehydrogenase) 將 MTT 的 tetrazolium ring 轉變成藍紫色非水溶性的 fomazan，堆積在細胞中，再以 DMSO 溶解，偵測 570 nm 吸光值。因存活的細胞越多所生成的 fomazan 顆粒會越多，所以吸光值越大表示細胞存活率越高。

將 MC3T3-E1 細胞培養在 96 wells plate 中，細胞數為  $1.5 \times 10^4$  cells/well，經過藥物不同濃度處理及反應時間之後，移除 well 中的培養液，加入 PBS 清洗，移除 PBS。加入 100  $\mu$ l 培養液和 10  $\mu$ l MTT，置於培養箱中四小時後。移除培養液和 MTT，加入 200  $\mu$ l DMSO，使其完全溶解後偵測波長 570 nm 吸光值。

#### 四、 鹼性磷酸酶活性分析 (ALP activity assay)

ALP 因屬於早期出現的生化指標，常被用來檢測藥物對骨生成分化作用的能力。其測量原理為 ALP 在體外於 pH = 8~10 的環境下，能水解單酯磷酸 (monoester phosphate)，故加入單酯磷酸受質  $\rho$ -Nitrophenylphosphate，ALP 會將其轉換為 phosphate 與  $\rho$ -Nitrophenyl，並於 405 nm 有最大吸光值，其吸光值越大表示 ALP 活性越高。

##### (1) 細胞培養處理

將 MC3T3-E1 細胞培養在 96 wells plate 中，細胞數為  $1.5 \times 10^4$  cells/well，於恆溫培養箱中放置一晚。確定細胞平貼於孔盤底部後，移除 well 中的培養液，重新置入含有 5% FBS 的  $\alpha$ -MEM 與不同濃度的藥物，置於恆溫培養箱中三天 (72 小時)。三天後收取上清液，以 PBS 輕輕搖晃清洗每個 well，移除 PBS 後，加入 100  $\mu$ l 的 0.01% SDS (sodium dodecyl sulfate) 溶液到每個 well 中，於迴轉式恆溫振盪器在室溫下震盪 40 分鐘。

##### (2) 細胞蛋白質濃度分析

測量細胞內蛋白質含量所使用之試劑為 Bio-Red Protein Assay。定量的方法，先將牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 配製成標準的蛋白質溶液，定量

所使用的濃度為 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mg/ml。將 Bio-Red Protein Assay 以 200  $\mu$ l/well 的量添加到 96 wells plate 中，7 個濃度標準液和震盪結束後的各樣品溶液各取 10  $\mu$ l，於 96 wells plate 中的 Bio-Red Protein Assay 充分混合。在波長 595 nm 下測量其吸光值，利用標準曲線計算出樣品蛋白質含量，即可定量蛋白質。

### (3) *p*-Nitrophenylphosphate (PNPP) 溶液與標準液配置

取 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) 0.5 ml 和 40 mM 的  $MgCl_2$  0.5 ml 與逆滲透 (RO) 水配置成 10ml，pH=10 的 AMP 溶液。再將 AMP 溶液與 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate 粉末配置成 9 mM 之 PNPP 溶液（此配置過程需在避光環境下）。標準液使用 0.02 N 的 NaOH 溶液與 *p*-Nitrophenol standard solution 以連續稀釋的方式，配置成 7.8125~250  $\mu$ M 不同濃度的 PNPP 標準液（此配置過程需在避光環境下）。

### (4) ALP activity assay

以下過程需在避光環境中。在每個樣品中各添加 100  $\mu$ l 的 PNPP 溶液，同時將不同濃度的 *p*-Nitrophenyl standard solution，各取 190  $\mu$ l 至乾淨的 well 中，以鋁箔紙包覆，再以迴轉式恆溫振盪器於室溫下震盪 30 分鐘。偵測波長 405 nm 吸光值。利用標準曲線計算出樣品 PNPP 含量，即可計算每小時每 mg

protein 中所含有的 PNPP 濃度 ( $\mu\text{M PNPP/hr/mg protein}$ )，濃度值越大表示 ALP 活性越高。

## 五、 OPN、OPG 及 RANKL 的含量測定

此試驗所使用的培養液 (culture medium) 是收集自 ALP activity assay 各實驗組的上清液，並利用市售 ELISA Kit 作分析。依循 protocol 的步驟，將 standard 和培養液樣本分別與 assay diluent 添加到 kit 組內的 microplate，輕微搖晃均勻，於室溫下反應 2 小時後，以 wash buffer 清洗，移除所有液體後，加入 conjugate buffer 於室溫下反應 2 小時，同樣以 wash buffer 清洗並移除所有液體後，加入 substrate solution 於室溫下反應 30 分鐘 (此反應過程需在避光環境下進行)，隨後添加 stop solution 中止其反應後，偵測波長 450 nm 吸光值。利用 standard 計算出標準曲線，即可定量生化指標的活性濃度。

## 六、 礦物質化結節 (bone nodule) 形成的分析

利用茜紅素 S 染色法 (alizarin red S staining, ARS staining)，以組織染色的方式染出造骨細胞所堆積的 bone nodule 礦物質沉澱。ARS 可以和鈣等陽離子互相結合而形成紅褐色，故可用來評估藥物對礦物質化能力的影響。

### (1) 細胞培養處理

將 MC3T3-E1 細胞培養在 24 wells plate 中，細胞數為  $1 \times 10^4$  cells/well，於恆溫培養箱中培養六天，每 3 天更換一次新鮮的培養液。六天後，移除 well 中的培養液，重新置入含有 5% FBS、 $50 \mu\text{g/ml}$  ascorbic acid 和  $10 \text{ mM } \beta$ -glycerophosphate 的  $\alpha$ -MEM 與不同濃度的藥物，於恆溫培養箱中培養 14 天，每 3 天更換細胞培養液和添加藥物。

### (2) ARS 染劑配置

取逆滲透 (RO) 水將 Alizarin Red S 粉末配置成  $40 \text{ mM}$  的 ARS 溶液，並調整其 pH 值  $4.0 \sim 4.1$ 。以濾紙過濾後，可保存於  $4^\circ\text{C}$  冰箱備用。

### (3) ARS 染色步驟

將 well 內的細胞培養液抽乾，以 PBS 清洗 2~3 次後，抽乾 PBS，每個 well 加入 75% 的冰酒精固定，作用 1 小時。隨後用 RO 水清洗一次，放入恆溫烘箱中，待 plate 完全乾燥後，此時可存放於室溫保存。將配置好的 ARS 染劑以  $500 \mu\text{l/well}$  的使用量添加 plate 中，作用 5 分鐘。抽乾染劑，加入 PBS 輕輕搖晃清洗多餘染劑，去除 PBS 放入恆溫烘箱中，待乾燥後，以顯微鏡觀察並拍照。以  $0.1 \text{ N NaOH}$  溶液溶解染色後的沉澱物，完全溶解後，偵測波長  $548 \text{ nm}$ ，即可做藥物對礦物質化能力的定量處理。

## 七、 細胞蛋白質萃取

### (1) Total protein 的萃取

#### (一) 細胞培養處理

將 MC3T3-E1 細胞培養於 3.5 cm 培養皿中，細胞數為  $1 \times 10^6$  cells/dish，於恆溫培養箱中培養 24 小時後，抽乾培養基，置入不含有 FBS 的  $\alpha$ -MEM，於恆溫培養箱中放置一晚。抽乾培養皿內的培養基，以 PBS 清洗一次，加入不含有 FBS 的  $\alpha$ -MEM 與藥物，置回於恆溫培養箱中，分別培養不同時間點。

#### (二) Total protein lysis buffer 配置

首先先配置含有 50 mM Tris-HCl (PH 7.4)、1% NP-40、150 mM NaCl、0.25% Na-deoxycholate、1 mM EDTA 於 100 ml RO 水的 radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer。接著再將 1 mM NaF  $5 \mu\text{l}$ 、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$   $5 \mu\text{l}$ 、1  $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin  $1 \mu\text{l}$ 、1  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin  $1 \mu\text{l}$ 、1  $\mu\text{g/ml}$  Pepstain  $1 \mu\text{l}$ 、1 mM PMSF  $5 \mu\text{l}$  與 RIPA buffer 互相混合配置成 1ml 的 total protein lysis buffer。

#### (三) Total protein 的萃取

蛋白質萃取的所有步驟都需在冰上處理。將結束藥物處理的培養皿，抽去

培養液，以 PBS 清洗兩次，加入適量的 total protein lysis buffer 使其均勻分布於培養皿表面。使用橡膠刮刀刮下細胞，連同 lysis buffer 吸至離心管，反應 40 分鐘，以超音波打碎機 (0.5 cycles, 60% amplitude) 作用 1 分鐘。以 13000 rpm, 4°C, 5 分鐘的條件離心，上清液即為 total protein 的萃取液，收集並儲存於 -80 °C 冰箱備用。

## (2) Cytosol and Nuclear protein 的萃取

### (一) 細胞培養處理

同 total protein 的處理方式。

### (二) Cytosol and Nuclear protein lysis buffer 配置

#### 1. Cytosol protein lysis buffer :

10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>      10 μl

10 mM NaF              50 μl

5 mM MgCl<sub>2</sub>            5 μl

1 mM EDTA             2 μl

1 mM PMSF             5 μl

10 μg/ml Leupeptin    10 μl

1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin      1  $\mu\text{l}$

1 % NP-40                  100  $\mu\text{l}$

與 RO 水互相混合成 1 ml。

## 2. Nuclear protein lysis buffer :

10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$       10  $\mu\text{l}$

10 mM NaF                  50  $\mu\text{l}$

5 mM  $\text{MgCl}_2$               5  $\mu\text{l}$

1 mM EDTA                  2  $\mu\text{l}$

1 mM PMSF                  5  $\mu\text{l}$

10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin      10  $\mu\text{l}$

1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin          1  $\mu\text{l}$

1 % NP-40                  100  $\mu\text{l}$

0.5 M NaCl                  100  $\mu\text{l}$

與 RO 水互相混合成 1 ml。

### (三) Cytosol and Nuclear protein 的萃取

蛋白質萃取的所有步驟都需在冰上處理。已結束處理的培養皿，抽去培養液，以 PBS 清洗兩次，加入適量的 cytosol protein lysis buffer 使其均勻分布於培養皿表面。使用橡膠刮刀刮下細胞，連同 lysis buffer 吸至離心管，反應 40 分鐘，

以超音波打碎機 (0.5 cycles, 60% amplitude) 作用 1 分鐘。以 9500 rpm, 4°C, 10 分鐘的條件離心, 上清液即為 cytosol protein 的萃取液, 收集並儲存於 -80°C 冰箱備用。離心管剩餘的 pellet 在加入適量的 nuclear protein lysis buffer 反應 40 分鐘, 同時以超音波打碎機 (0.5 cycles, 60% amplitude) 作用 1 分鐘。以 13000 rpm, 4°C, 10 分鐘的條件離心, 上清液即為 nuclear protein 的萃取液, 收集並儲存於 -80°C 冰箱備用。

## 八、 電泳法以及西方墨點法

### (1) 十二基硫酸鈉電泳法 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

在電泳進行時, 蛋白質會由負極向正極移動, 分子量大的蛋白質移動較慢, 較靠近負極; 分子量小的蛋白質移動較快, 較靠近正極, 所以依照分子量的大小可得知其相對位置。

#### (一) Tris-Glycine SDS Running Buffer (10X)配置

Tris Base 29 g、Glycine 144 g 與 SDS 10 g 一同溶解於 RO 水至 1 L。

#### (二) 電泳法實驗流程

本實驗選擇 10% resolving gel、5% stacking gel 分離蛋白質。將細胞蛋白質以 Bio-Red Protein Assay 分析後，取 40  $\mu$ g 之總蛋白量進行電泳步驟，加入適量的 Laemmli sample Buffer 混合均勻，於 100°C 下加熱 5 分鐘後，spin down 且置於冰上冷卻，將其分別注入 (loading) 於製作完成之膠片孔中，並在膠片之其中一孔加入 5  $\mu$ l 之蛋白質分子量標記物 (protein molecular markers)，做為標識，於充滿電泳緩衝液 [ tris-glycine SDS running buffer (1X) ] 中進行電泳分離。於室溫下，先以電壓 50 V，待 marker 展開後，再調整電壓到 100 V 進行電泳。

## (2) 西方墨點法

### (一) Tris-Glycine SDS Transfer Buffer (25X) 和 TBS buffer (5X) 配置

Tris Base 18.2 g 與 Glycine 90 g 一同溶解於 RO 水至 500 ml，即為 Transfer Buffer (25X)。實驗中使用的是 Transfer Buffer (1X)，配置方法為 40 ml 25X Transfer Buffer、200 ml methanol 與 RO 水 760 ml 一同混合均勻。TBS buffer (5X) 的配置方法為 NaCl 40 g、KCl 1 g、Tris Base 15 g 一同溶解於 RO 水至 500 ml。

### (二) 西方墨點法實驗流程

需先將 NC membrane 與兩張海綿以 transfer buffer 浸潤 15 分鐘以上，操

作時，再將 2 張 3M 濾紙於 buffer 中浸濕。重疊的順序從負極到正極依序為海綿，濾紙，SDS-PAGE gel，NC membrane，濾紙，海綿，並使用玻棒移除氣泡，再放入轉印槽中，並使用 transfer buffer (1X) 做為轉移緩衝溶液。將轉印槽置於 4°C 冰櫃中，以 200 mA 轉印 2 小時。轉印完成後，切割所需範圍，以 5% non-fat milk/0.1% TBS-T (TBS in 0.1% Tween 20) blocking buffer 作用 1 小時，去除 blocking buffer，加入所要觀察的蛋白質一級抗體 (抗體配法依照各自的 protocol 所配置)，於室溫下作用 2 小時，以 0.1% TBS-T buffer 重複清洗 10 分鐘 3 次，加入適用一級抗體之二級抗體，於室溫下作用 1.5 小時後，以 0.1% TBS-T buffer 重複清洗 15 分鐘 3 次，最後於暗房中以 Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate 作用 5 分鐘，以 X-ray film 感光顯影後，即放入自動洗片機洗片。

### 第三節 統計分析

實驗數據皆以平均值  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  SE) 作表示。實驗數據利用 SigmaPlot 10.0 統計軟體以 Student's *t*-test 來比較組別間的差異，當統計結果  $P < 0.05$  時，則認為兩組間的差異具有統計學上的意義。





### 第三章 結果

## 第一節 有骨消氣仿層萃取物對 MC3T3-E1 的 ALP 活性及細胞存活率之影響

圖一為有骨消的萃取與分離流程，並以測試 ALP 活性為導向，往下分離活性效果最好的萃取物。由於有骨消目前尚未取得純分化物，所以本論文就取得的各層萃取物進行活性分析

萃取有骨消首先取得的是 SF-C 和 SF-M，分別是氣仿可溶層和氣仿不可溶層。在預試驗中發現有骨消粗萃物會促進造骨細胞的分化，故進行劑量反應分析。同時將 SF-C 和 SF-M 在不同濃度（ $1\ \mu\text{g/ml}$ 、 $5\ \mu\text{g/ml}$ 、 $10\ \mu\text{g/ml}$ 、 $15\ \mu\text{g/ml}$ 、 $20\ \mu\text{g/ml}$ ）下對 MC3T3-E1 進行 ALP activity assay；並且以 MTT assay 偵測細胞存活率，釐清 SF-C 和 SF-M 對 MC3T3-E1 細胞株是否有細胞毒殺作用。實驗結果發現 SF-C 和 SF-M 在無顯著毒性的情況下（圖二 B），SF-C 在  $10\ \mu\text{g/ml}$  具有增加 2 倍 ALP 活性的能力，SF-M 則無任何作用（圖二 A）。根據此結果，以 SF-C 為分離對象，得到 8 個分劃物 (fraction)，分別命名為：SF-C-1、SF-C-2、SF-C-3、SF-C-4、SF-C-5、SF-C-6、SF-C-7、SF-C-8。

將此 8 個分劃物在不同濃度下（ $5\ \mu\text{g/ml}$ 、 $10\ \mu\text{g/ml}$ 、 $15\ \mu\text{g/ml}$ 、 $20\ \mu\text{g/ml}$ ）測試 ALP activity（圖三）。預試驗結果發現僅有 SF-C-5、SF-C-6、SF-C-7 有增加 ALP 活性的能力。於是針對此 3 個分劃物進行細部劑量反應分析，同時與 SF-C 在不同濃度下（ $1\ \mu\text{g/ml}$ 、 $2.5\ \mu\text{g/ml}$ 、 $5\ \mu\text{g/ml}$ 、 $10\ \mu\text{g/ml}$ 、 $15\ \mu\text{g/ml}$ 、 $20\ \mu\text{g/ml}$ ）

測試 ALP activity 及 cell viability。實驗結果發現 SF-C 在無顯著毒性的情況下，濃度  $10\ \mu\text{g/ml}$  依然具有 2 倍 ALP 活性的能力。SF-C-5 在濃度  $2.5\ \mu\text{g/ml}$  時，有 1.5 倍 ALP 活性的能力；SF-C-6 在濃度  $10\ \mu\text{g/ml}$  時，亦有 2 倍 ALP 活性的能力，同時也是作用最好的分劃物；SF-C-7 隨著藥物濃度的提升，增加 ALP 活性的能力也會跟著提升（圖四 A）。但此 3 個分劃物在藥物濃度  $15\ \mu\text{g/ml}$  和  $20\ \mu\text{g/ml}$  作用下，對 MC3T3-E1 有顯著的毒性影響（圖四 B）。根據此結果，以 SF-C-6 為分離對象，得到 6 個次分劃物（subfraction），分別命名為：SF-C-6-1、SF-C-6-2、SF-C-6-3、SF-C-6-4、SF-C-6-5、SF-C-6-6。

將此 6 個次分劃物在不同濃度下（ $5\ \mu\text{g/ml}$ 、 $10\ \mu\text{g/ml}$ 、 $15\ \mu\text{g/ml}$ 、 $20\ \mu\text{g/ml}$ ）測試 ALP activity 及 cell viability。實驗結果發現 SF-C 依舊在無顯著毒性的情況下，濃度  $10\ \mu\text{g/ml}$  依然具有 2 倍 ALP 活性的能力。而在 6 個次分劃物中僅發現 SF-C-6-4、SF-C-6-5、SF-C-6-6 具有增加 ALP 活性的能力（圖五 A），又以 SF-C-6-6 作用能力最好，幾近於 SF-C 的效力，不過此 3 個次分劃物卻對 MC3T3-E1 有顯著的毒性影響（圖五 B）。

藥物誘發的 ALP 活性越高表示刺激造骨細胞分化的能力越好，有骨消氣仿層萃取物目前分離到第三層的次分劃物。SF-C、SF-C-6、SF-C-6-6 為各層萃取物中誘發 ALP 活性最好的藥物，但是 SF-C-6-6 在細胞處理過程中，有偵測出細胞毒性的影響，所以接下來的實驗以 SF-C 和 SF-C-6 為主。

## 第二節 SF-C 與 SF-C-6 誘發 OPN、OPG 及 RANKL 生成之影響

骨生成過程中，除了早期的 ALP 可以當作指標外，尚有調控蝕骨細胞分化的 OPG 和 RANKL (Boyle *et al*, 2003)，以及與骨質礦化有關的 OPN (Kuo *et al*, 2005)。收集 ALP activity assay 實驗的上清液，係經由藥物與細胞共同培養三天後的培養液。挑選 SF-C 與 SF-C-6 濃度 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 、5  $\mu\text{g/ml}$ 、10  $\mu\text{g/ml}$  當做實驗組。圖六 A 為藥物刺激 OPN 生成之濃度變化；圖六 B 則為藥物刺激 OPG 生成之濃度變化；圖六 C 為偵測藥物刺激 RANKL 生成在 OD 450nm 的變化量。如圖所示，隨著藥物濃度的增加，OPN 和 OPG 產生的濃度也隨之增加。然而，藥物對 RANKL 的 OD 值變化量數值皆低於標準曲線最小濃度(0 pg/ml)所偵測到的 OD 值(0.123)以下，故無法換算成濃度變化量，但是可以評估有骨消不會增加 RANKL 的濃度，而促進蝕骨細胞的分化。

實驗結果得知，SF-C 與 SF-C-6 除了可以增加 ALP 的活性，刺激造骨細胞早期分化外，還可以增加 OPN 的濃度產量，刺激造骨細胞在中後期的分化活性和礦化能力，和增加 OPG 的濃度以抑制蝕骨細胞的分化，間接調控骨生成的作用。

### 第三節 SF-C 和 SF-C-6 對 MC3T3-E1 形成礦物質化結節的影響

為了要評估藥物對造骨細胞的礦化作用是否具有影響，將細胞分別與 SF-C 和 SF-C-6（濃度  $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $5 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ ）共同培養 14 天，並使用 ARS 染色法染出造骨細胞所堆積的礦物質沉澱。圖七 A 為 SF-C 誘發 MC3T3-E1 造骨細胞礦化的表現，由圖可得知在濃度  $5 \mu\text{g/ml}$  和  $10 \mu\text{g/ml}$  可以大量引發造骨細胞的鈣離子沉澱，而且以  $10 \mu\text{g/ml}$  的效果較為明顯。圖七 B 則為 SF-C-6 對 MC3T3-E1 造骨細胞礦化的表現，由圖可得知在濃度  $5 \mu\text{g/ml}$  和  $10 \mu\text{g/ml}$  同樣可以引發造骨細胞的鈣離子沉澱，不過卻是以  $5 \mu\text{g/ml}$  的效果較為明顯。另外可以發現與 SF-C 共同培養 14 天的細胞經 ARS 染色後，呈現出的紅褐色比與 SF-C-6 共同培養 14 天的細胞來得深且更加的明顯，這表示說 SF-C 對於促進鈣離子沉澱誘發礦化作用的表現比 SF-C-6 的作用好。

綜觀上述實驗後發現，SF-C 與 SF-C-6 在刺激 ALP 活性以及 OPG、OPN 的生成濃度變化量上具有相似的活化程度；然而，在礦化作用變化量，SF-C 的表現量卻優於 SF-C-6 的作用。所以接下來的實驗以 SF-C 為主。

## 第四節 SF-C 刺激造骨細胞分化過程中對 BMPs/SMAD signaling pathway 的影響

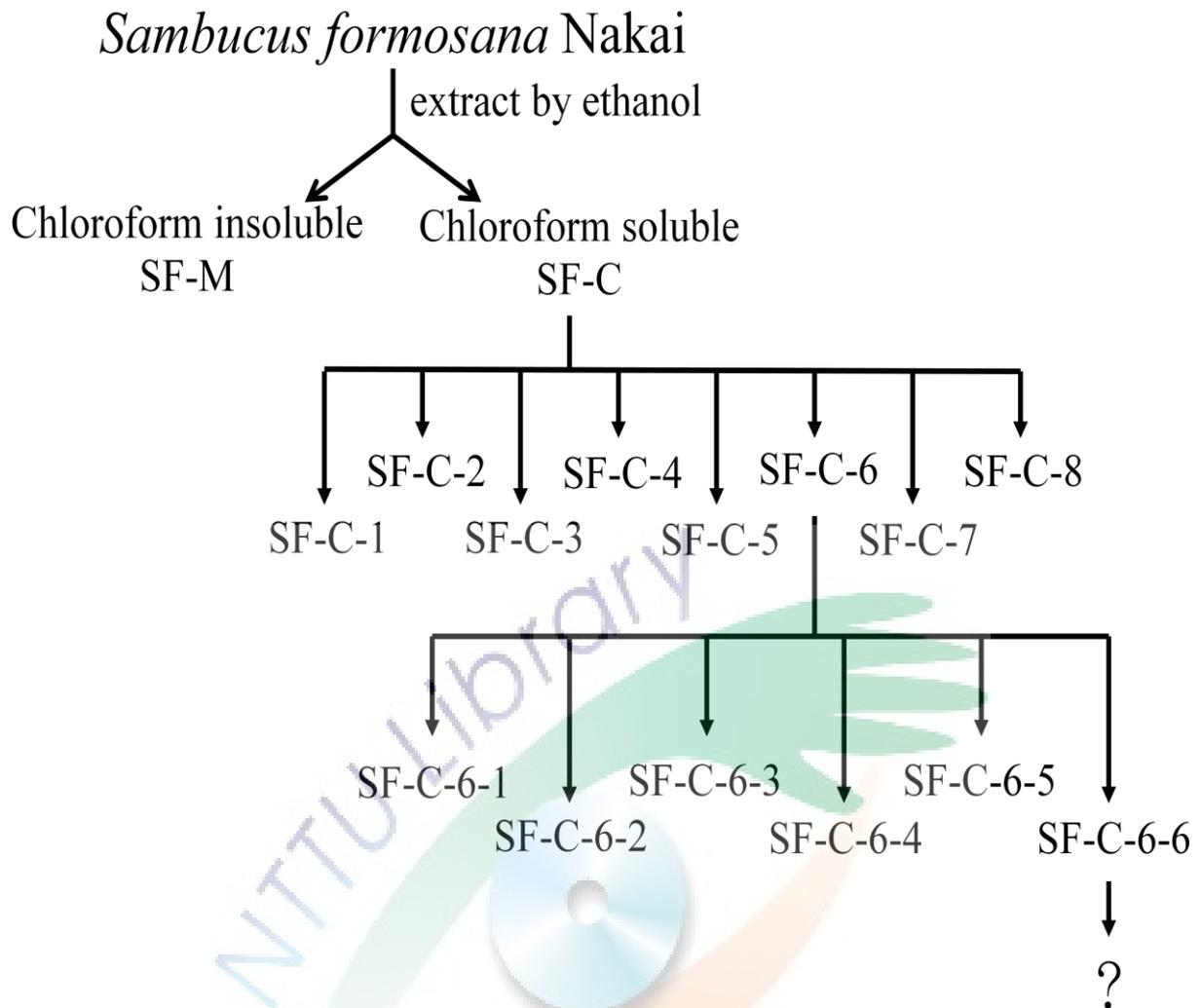
BMPs 在骨形成和骨細胞分化過程中扮演了重要的角色，並且 BMPs 的刺激作用會引起下游轉錄因子 SMAD protein 的活化以及控制核內基因的轉錄作用 (Tang *et al*, 2007)。因此利用 noggin (BMP 受體抑制劑) 來測試 SF-C 在分化過程中對 BMPs/SMAD 的影響。實驗方法與 ALP activity assay 相同，差別在於加入藥物 SF-C 前，以不同濃度的 noggin (濃度  $0.05 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$ ) 預先處理一個小時，隨後加入 SF-C  $10 \mu\text{g/ml}$ ，共同培養三天，測試 ALP 活性。其實驗組別有：control 組、抑制劑處理組、藥物處理組、抑制劑加藥物處理組。從實驗結果顯示，SF-C  $10 \mu\text{g/ml}$  刺激 MC3T3-E1 產生的 ALP activity，會隨著 noggin 的濃度增加而有減少的趨勢(圖八 A)。Western blot 分析結果顯示，BMPs 的下游轉錄因子 SMAD protein 活化情形會隨著 SF-C 刺激的濃度增加 (濃度  $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $5 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ 、 $15 \mu\text{g/ml}$ ) 而增加(圖八 B)。這顯示著 SF-C 會透過 BMPs/SMAD signaling pathway 的部分調控而達到促進造骨細胞骨生成作用。

## 第五節 SF-C 刺激造骨細胞分化過程中對 MAPKs signaling pathway 的影響

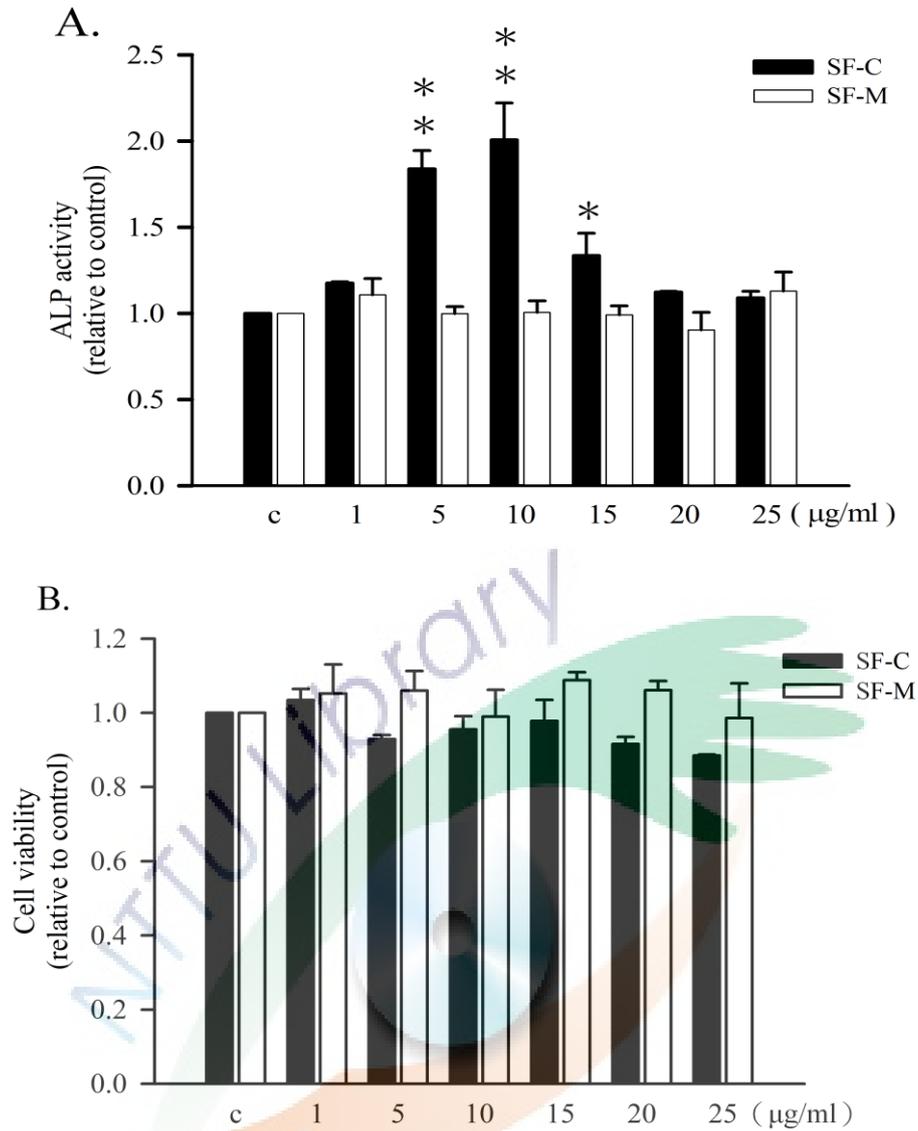
BMPs 同時也會活化不同於 SMAD pathway 的 MAPKs protein kinases (Nohe *et al*, 2004)。已知 SF-C 會經由 BMPs/SMAD signaling pathway 來啟動訊息傳遞，接著就測試對 MAPKs 的影響。利用 SB203580 (p38 抑制劑)、PD98059 (ERK 抑制劑)和 SP600125(JNK 抑制劑)來測試 SF-C 在分化過程中對 MAPKs 的影響。實驗方法與 ALP activity assay 相同，在加入藥物 SF-C 前，將三種抑制劑以不同濃度預先處理一個小時，隨後加入 SF-C 10  $\mu$ g/ml，共同培養三天，測試 ALP 活性。其實驗組別有：control 組、抑制劑處理組、藥物處理組、抑制劑加藥物處理組。根據實驗結果發現，僅有 SB203580 會對 SF-C 誘發的 ALP 活性產生抑制作用(圖九 A)，而 PD98059 和 SP600125 則無作用(圖十 A 和 B)。所以針對 p38 做 western blot 的試驗，實驗結果顯示 p38 MAPK 在 SF-C 濃度 5  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml 和 15  $\mu$ g/ml 刺激下，均有明顯活化的效果(圖九 B)。這顯示 SF-C 的除了會經由 BMPs/SMAD signaling pathway 的部分調控外，還會透過磷酸化 p38 MAPK，進而調控分化作用的進行。

## 第六節 SF-C 刺激造骨細胞分化過程中對 PI3K/Akt signaling pathway 的影響

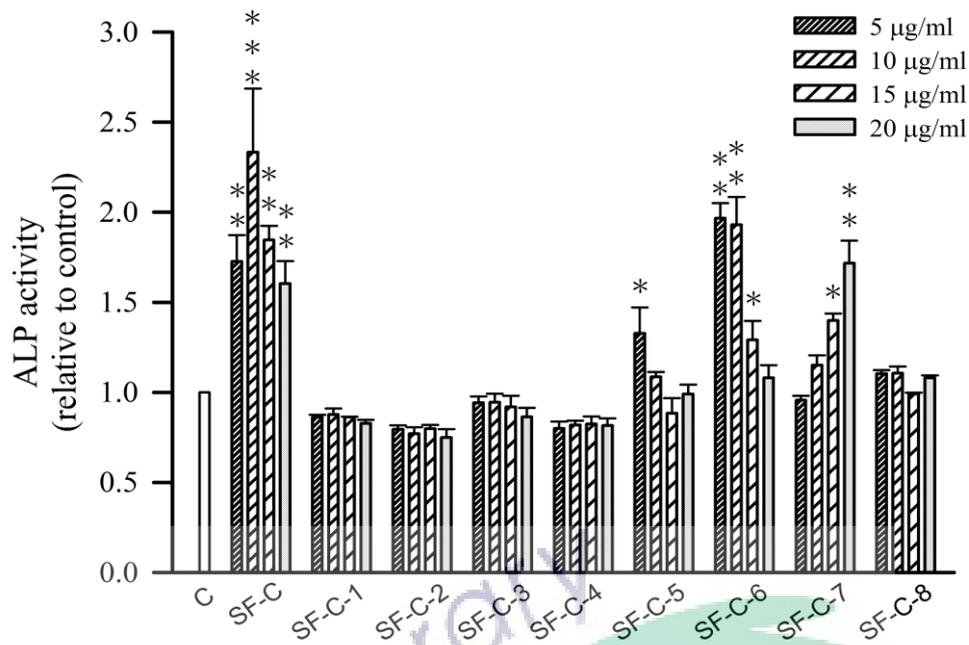
利用 wortmannin (PI3K 抑制劑) 來測試 SF-C 在分化過程中對 PI3K/Akt 的影響。實驗方法與 ALP activity assay 相同，在加入藥物 SF-C 前，將 wortmannin 以不同濃度 (濃度  $0.05 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$ ) 預先處理一個小時，隨後加入 SF-C  $10 \mu\text{g/ml}$ ，共同培養三天，測試 ALP 活性。其實驗組別有：control 組、抑制劑處理組、藥物處理組、抑制劑加藥物處理組。根據實驗結果發現隨著 wortmannin 的濃度增加，SF-C 誘發的 ALP 活性會有明顯的抑制(圖十一 A)。Western blot 分析結果顯示 Akt 在 SF-C 濃度  $5 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$  和  $15 \mu\text{g/ml}$  刺激下，均有明顯活化的效果(圖十一 B)。這顯示 SF-C 的刺激除了會經由 BMP/SMAD signaling pathway，並誘發 p38 MAPK 的磷酸化外，另外還會需要 PI3K/Akt 的調控進而達到分化作用的進行。



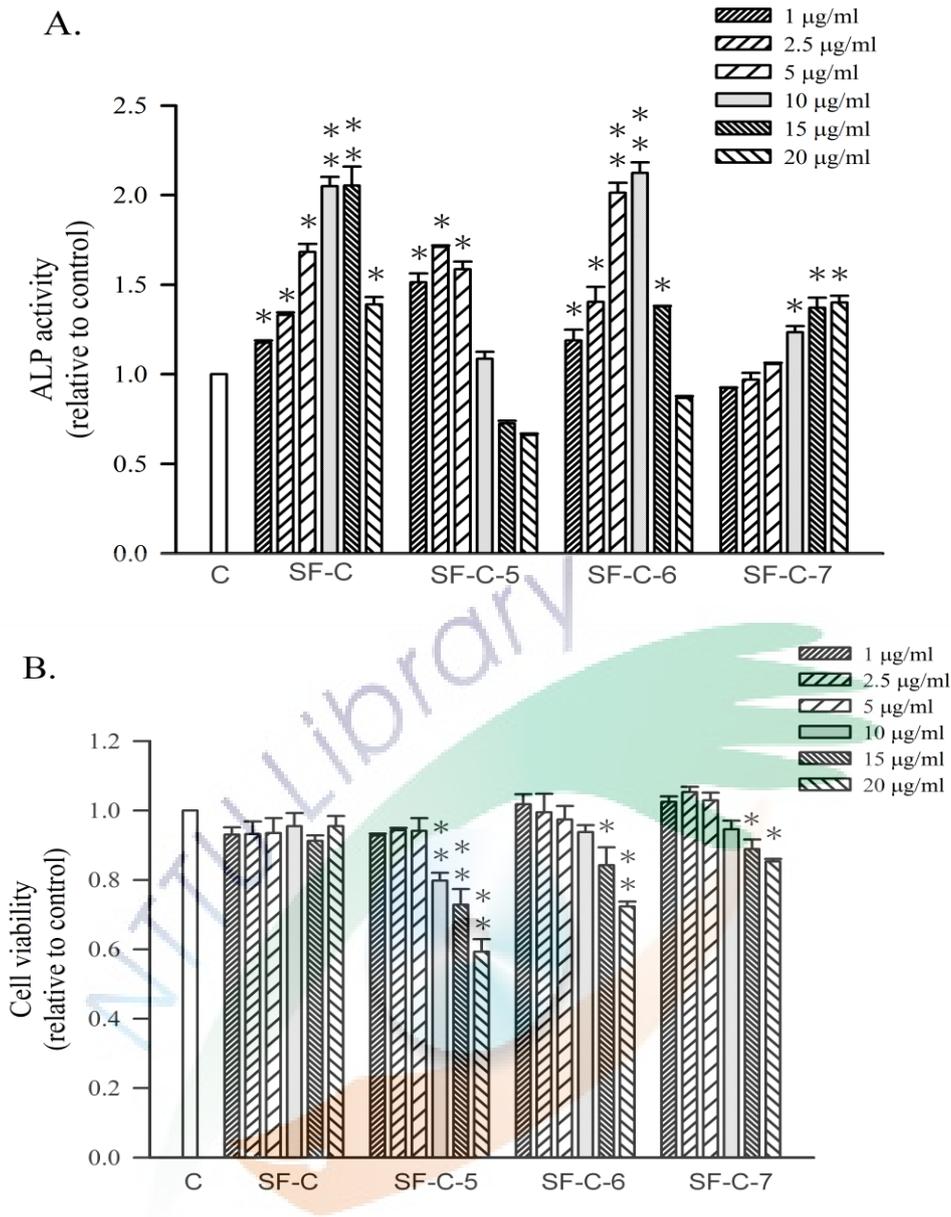
圖一、有骨消萃取之流程圖。有骨消經乙醇加熱萃取後，以氯仿分為可溶層(SF-C)與不可溶層(SF-M)，再以刺激造骨細胞株(MC3T3-E1) ALP 活性為導向，挑選活性最好的分割物，持續往下分離(SF-C → SF-C-6 → SF-C-6-6)，目前尚未取得純化合物。



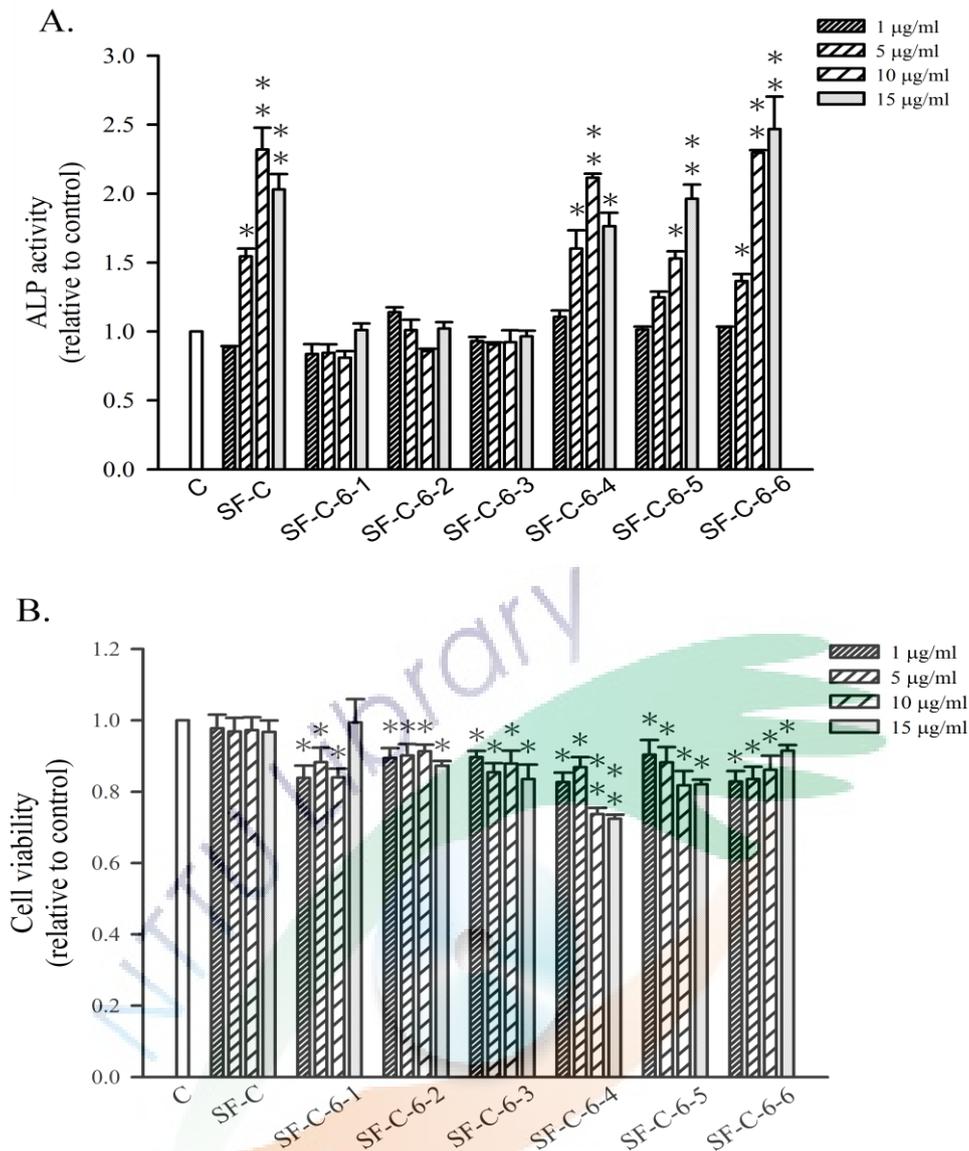
**圖二、SF-C 和 SF-M 對 MC3T3-E1 的影響。**培養 MC3T3-E1 ( $1.5 \times 10^4$  cells/well) 於 96 wells plate 中，加入 SF-C 或 SF-M 與之共同培養 72 小時後，(A)偵測 ALP 活性，及(B)測試細胞存活率。橫軸表示處理不同藥物濃度，c 為 control 組；縱軸以 c 組為 1，藥物實驗組與之計算其比值。結果以平均值±標準誤差值表示。\*， $p < 0.05$ ；\*\*， $p < 0.01$ ，表示與 control 組比較的結果。



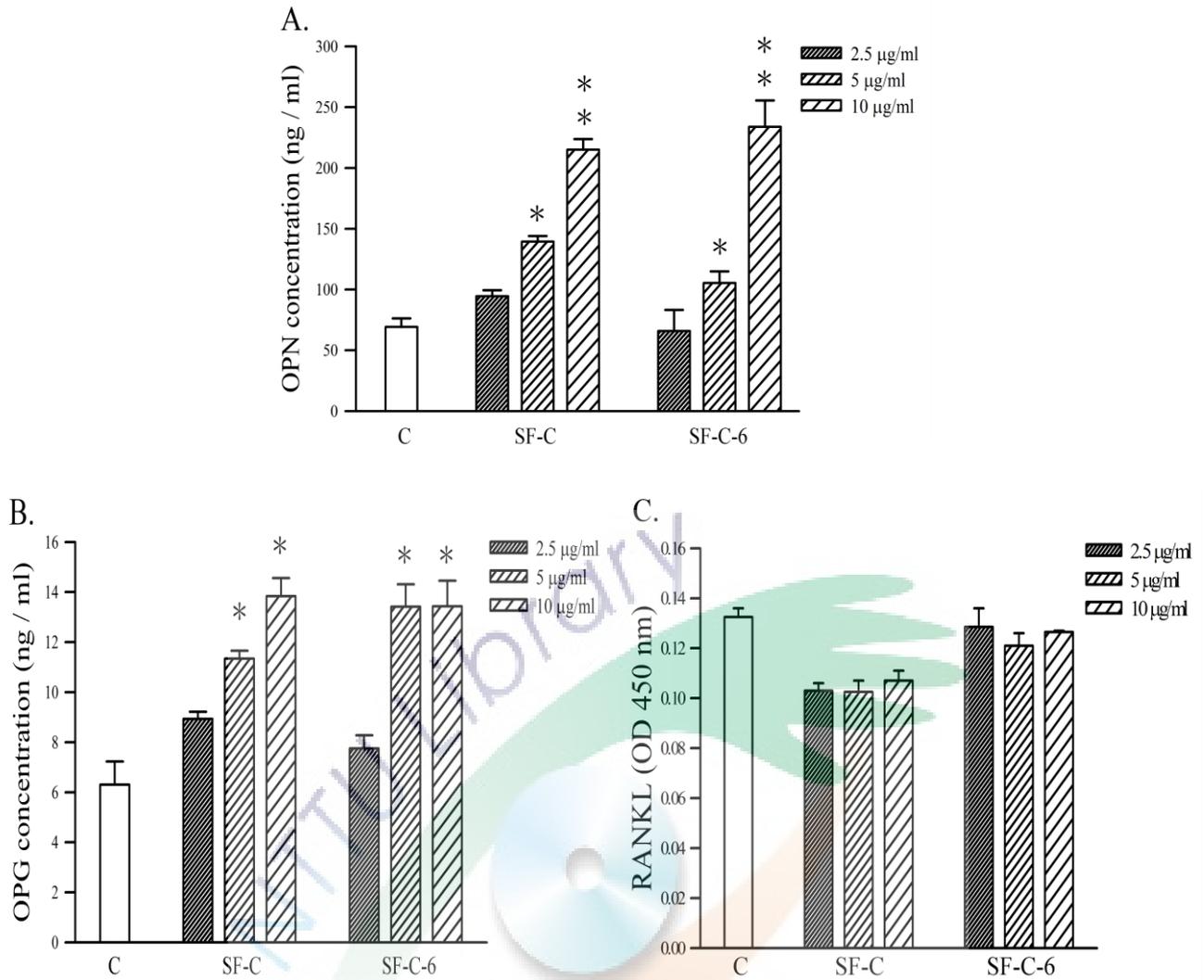
圖三、SF-C 之分割物對 MC3T3-E1 之預試驗。純化分離 SF-C 得到 8 個分割物，培養 MC3T3-E1 ( $1.5 \times 10^4$  cells/well) 於 96 wells plate 中，將 SF-C 與 SF-C 之分割物與之共同培養 72 小時後，偵測 ALP 活性，發現僅有 C-5、C-6、C-7 具有增加 ALP 的活性能力。結果以平均值 $\pm$ 標準誤差值表示。\* ,  $p < 0.05$  ; \*\* ,  $p < 0.01$  ; \*\*\* ,  $p < 0.001$  , 表示與 control 組比較的結果。



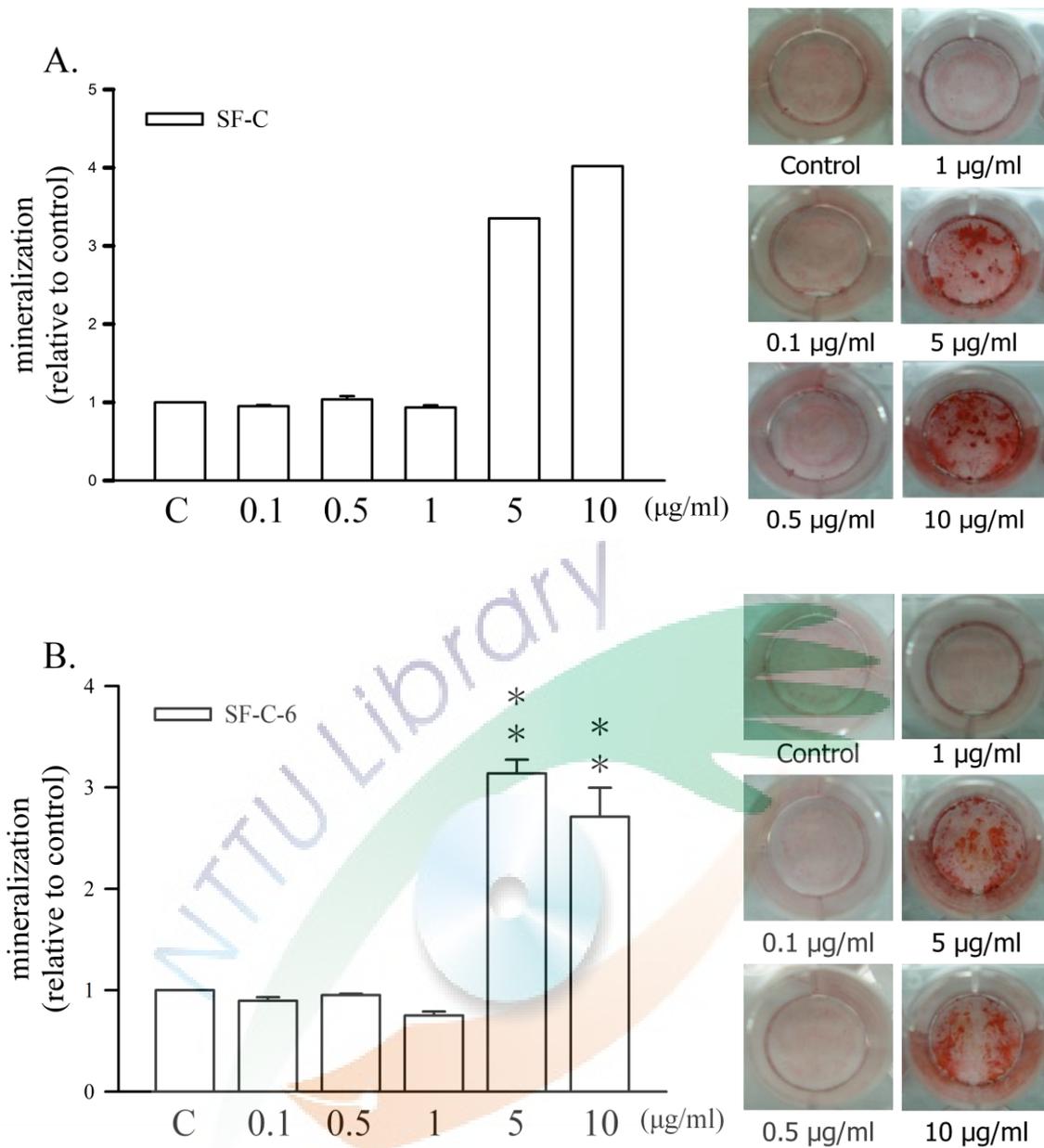
圖四、SF-C-5、SF-C-6、SF-C-7 對 MC3T3-E1 的影響。培養 MC3T3-E1 ( $1.5 \times 10^4$  cells/well) 於 96 wells plate 中，將 SF-C、SF-C-5、SF-C-6、SF-C-7 與之共同培養 72 小時後。發現 SF-C-6 活化 ALP 活性的能力幾乎相當於 SF-C 的刺激能力 (A)偵測 ALP 活性，及(B)測試細胞存活率。結果以平均值±標準誤差值表示。\*， $p < 0.05$ ；\*\*， $p < 0.01$ ，表示與 control 組比較的結果。



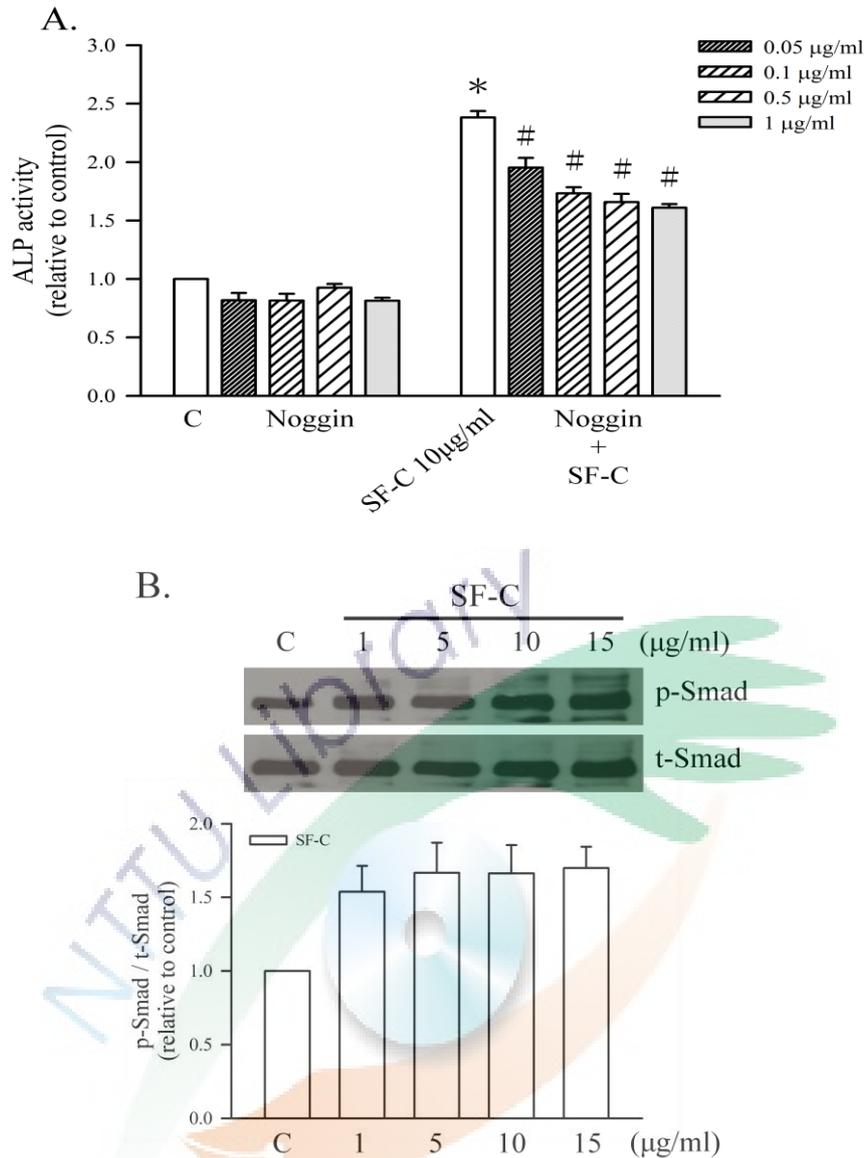
**圖五、SF-C-6 之次分劃物對 MC3T3-E1 的影響。**純化分離 SF-C-6 得到 6 個次分劃物，培養 MC3T3-E1 ( $1.5 \times 10^4$  cells/well) 於 96 wells plate 中，將 SF-C 與 SF-C-6 之次分劃物與之共同培養 72 小時後，(A)偵測 ALP 活性，及(B)測試細胞存活率。發現 C-6-4、C-6-5、C-6-6 都具有明顯的活性能力，不過卻有細胞毒性的抑制作用。結果以平均值 $\pm$ 標準誤差值表示。\* ,  $p < 0.05$  ; \*\* ,  $p < 0.01$  ; \*\*\* ,  $p < 0.001$  , 表示與 control 組比較的結果。



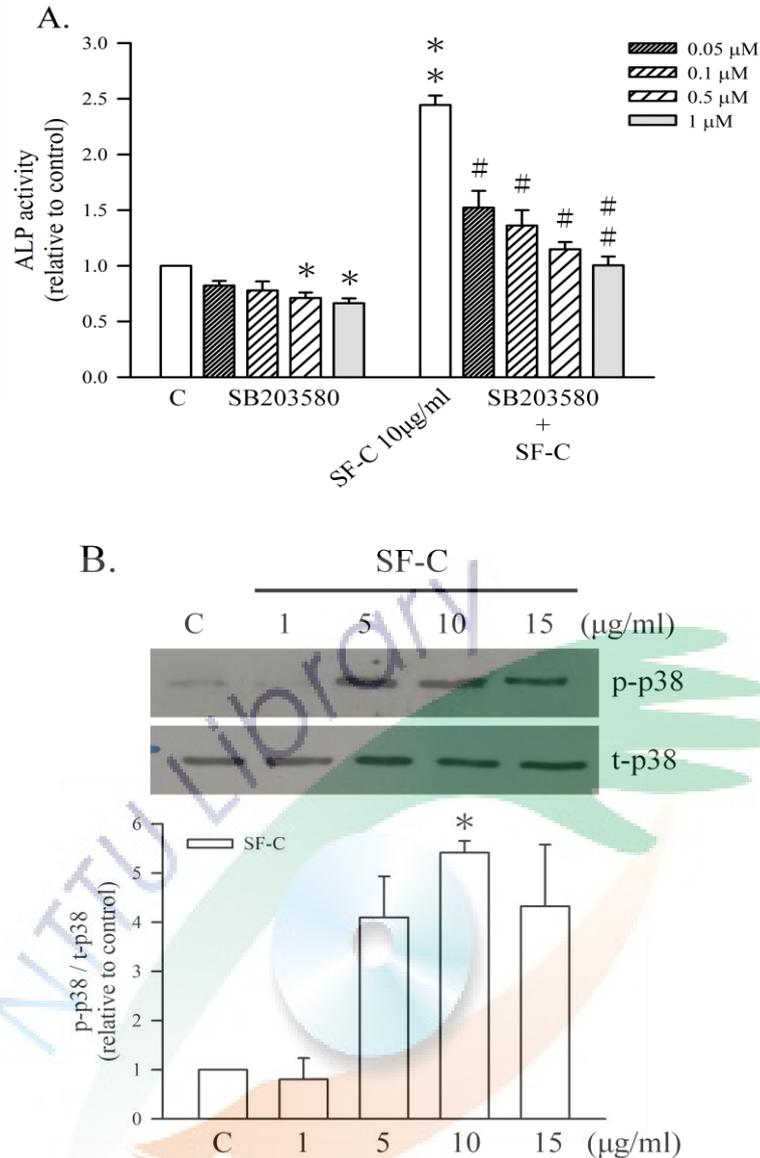
圖六、SF-C 和 SF-C-6 誘發骨生成分化指標之測試。收集 ALP activity assay 實驗的上清液，使用 ELISA kit 作為分析。圖(A)藥物刺激後 OPN 之濃度，圖(B)藥物刺激後 OPG 之濃度變化量，及圖(C)RANKL 在 OD 450 nm 的分析。結果以平均值±標準誤差值表示。\*， $p < 0.05$ ；\*\*， $p < 0.01$ ，表示與 control 組比較的結果。



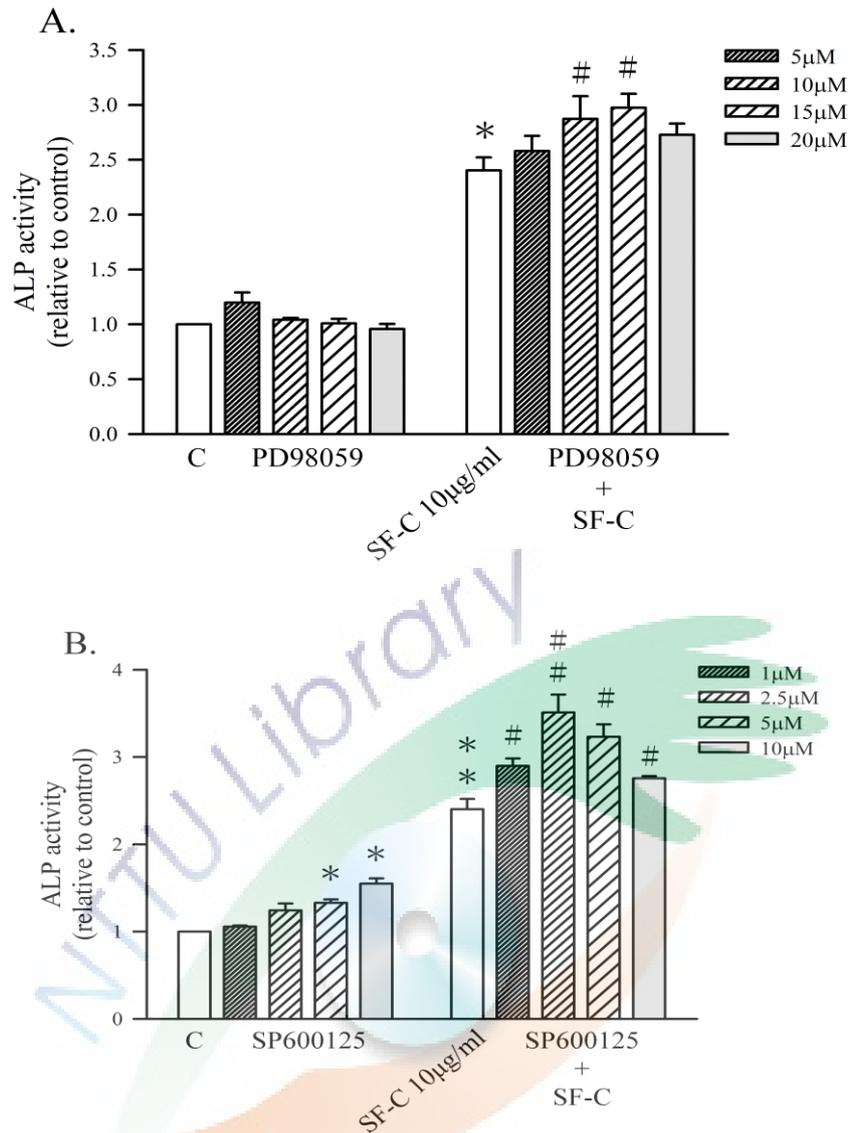
圖七、SF-C 和 SF-C-6 刺激 MC3T3-E1 形成礦物質化結節的影響。培養 MC3T3-E1 ( $1 \times 10^4$  cells/well) 於 24wells plate 6 天後，分別加入 SF-C 和 SF-C-6 不同濃度與之共同培養 14 天，每 3 天更換細胞培養液和重新添加藥物濃度。圖(A)右側為 SF-C 與細胞共同培養後的染色圖，左側為定量的結果；圖(B)右側為 SF-C-6 與細胞共同培養後的染色圖，左側為定量的結果。結果以平均值±標準誤差值表示。\*\*,  $p < 0.01$ ，表示與 control 組比較的結果。



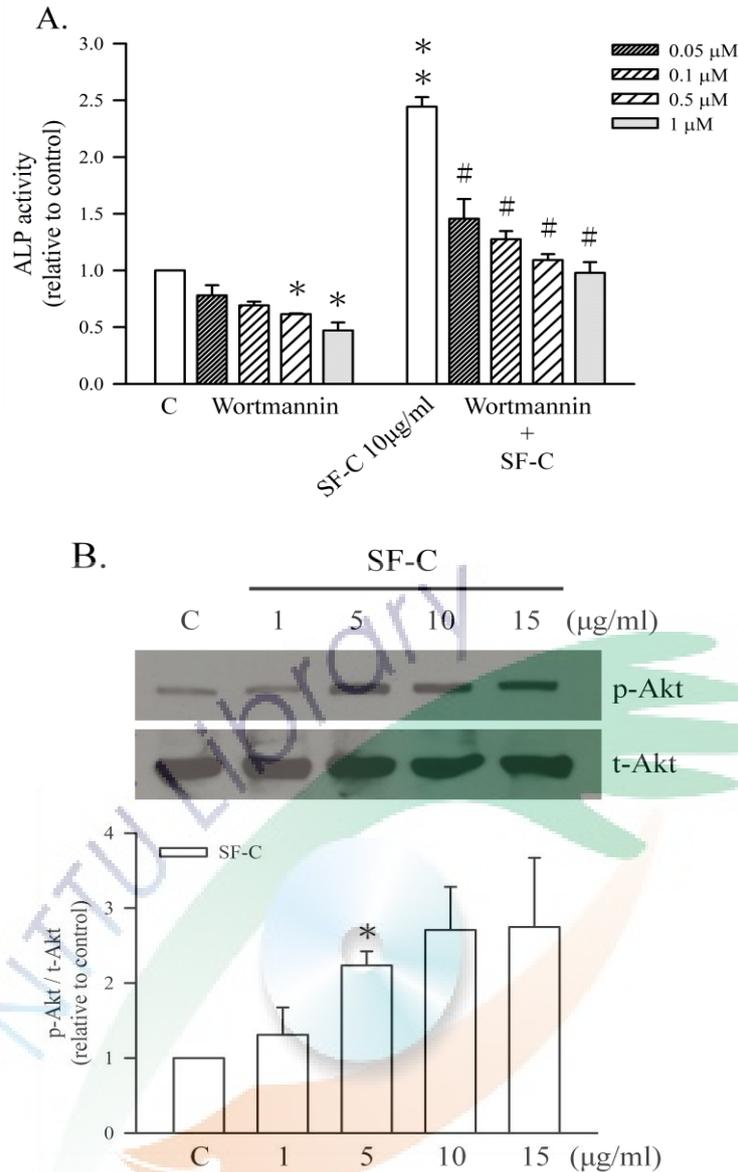
**圖八、SF-C 對 BMPs/SMAD signaling pathway 的影響。**圖(A)培養 MC3T3-E1 ( $1.5 \times 10^4$  cells/well) 於 96 wells plate 中，利用 noggin 預先處理細胞 1 小時後，再加入 SF-C 10  $\mu\text{g/ml}$  培養 3 天。結果顯示隨著 noggin 濃度增加對 SF-C 的抑制作用也越來越明顯。結果以平均值 $\pm$ 標準誤差值表示。\* ,  $p < 0.05$ ，表示與 control 組比較的結果。# ,  $p < 0.05$ ，表示與藥物 SF-C 組比較的結果。圖(B)培養 MC3T3-E1 ( $1 \times 10^6$  cells/well) 於 3.5cm dish 中，加入不同濃度 SF-C，以 western bolt 測試 SF-C 對 SMAD 的藥物濃度變化。



**圖九、SF-C 對 p38 MAPK 的影響。**圖(A)培養 MC3T3-E1 ( $1.5 \times 10^4$  cells/well) 於 96 wells plate 中，利用 SB203580 預先處理細胞 1 小時後，再加入 SF-C 10  $\mu$ g/ml 培養 3 天。結果顯示隨著 SB203580 濃度增加對 SF-C 的抑制作用也越來越明顯。結果以平均值 $\pm$ 標準誤差值表示。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ，表示與 control 組比較的結果。#,  $p < 0.05$ ; ##,  $p < 0.01$ ，表示與藥物 SF-C 組比較的結果。圖(B)培養 MC3T3-E1( $1 \times 10^6$  cells/well)於 3.5cm dish 中，加入不同濃度 SF-C，以 western bolt 測試 SF-C 對 p38 的藥物濃度變化。



**圖十、SF-C 對 ERK MAPK 和 JNK MAPK 的影響。**培養 MC3T3-E1 ( $1.5 \times 10^4$  cells/well) 於 96 wells plate 中，利用 PD98059 (圖 A)和 SP600125 (圖 B)預先處理細胞 1 小時後，再加入 SF-C  $10 \mu\text{g/ml}$  培養 3 天。結果顯示 ERK 抑制劑, PD98059 和 JNK 抑制劑, SP600125 皆無法抑制 SF-C 誘發的 ALP 活性。結果以平均值 $\pm$ 標準誤差值表示。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ , 表示與 control 組比較的結果。#,  $p < 0.05$ ; ##,  $p < 0.01$ , 表示與藥物 SF-C 組比較的結果。



圖十一、SF-C 對 PI3K/Akt signaling pathway 的影響。圖(A)培養 MC3T3-E1 ( $1.5 \times 10^4$  cells/well) 於 96 wells plate 中，利用 wortmannin 預先處理細胞 1 小時後，再加入 SF-C 10  $\mu$ g/ml 培養 3 天。結果顯示隨著 wortmannin 濃度增加對 SF-C 的抑制作用也越來越明顯。結果以平均值 $\pm$ 標準誤差值表示。\* ,  $p < 0.05$ ; \*\* ,  $p < 0.01$  , 表示與 control 組比較的結果。# ,  $p < 0.05$  , 表示與藥物 SF-C 組比較的結果。圖(B)培養 MC3T3-E1 ( $1 \times 10^6$  cells/well) 於 3.5cm dish 中，加入不同濃度 SF-C，以 western bolt 測試 SF-C 對 Akt 的藥物濃度變化。



## 第四章 討論

使用天然物和它們的衍生物當做治療的藥劑，其歷史來源已經不可考。事實上，已經有許多天然物對骨質具有有益的效用 (Putnam *et al*, 2007)。例如前文所述之 emodin (Lee *et al*, 2008)、icariine (Yin *et al*, 2007)、resveratrol (Patrice *et al*, 2005) 和 daidzein (Pan *et al*, 2005) 等，都具有直接刺激造骨細胞的增生和分化作用。本實驗所使用的中草藥為冇骨消 (SF)，是忍冬科接骨木屬的植物，屬於台灣原生特有種。在民間用藥上具有治療骨折疼痛和跌打損傷以及舒經活絡的效果。

由 1995 年 Aubin 等人表示，造骨細胞在分化的過程中三個基本過程分別為細胞增生 (proliferation)、骨基質成熟 (matrix maturation)、與礦化 (mineralization)。許多骨蛋白的表現量與酵素活性，均可做為骨生成的指標，如 osteopontin (OPN)、osteoprotegerin (OPG)、鹼性磷酸酶 (ALP)，而且 OPN 和 ALP 與骨基質成熟與礦化的過程相關性極高。

ALP 為造骨細胞的一個表現指標，礦化過程的基本酵素，ALP 的活性增加表示造骨細胞的分化能力增加。所以本實驗首先將冇骨消的氯仿層萃取物做 ALP activity assay。實驗發現 SF-C 在 ALP 的增長上最為明顯，並且以細胞存活率來看，在濃度 1、5、10、15、20、25  $\mu\text{g/ml}$  幾乎毫無細胞毒性的殺傷力。隨著作用濃度的增加 ALP 的表現也隨之增加，10  $\mu\text{g/ml}$  的 SF-C 具有增強 2 倍 ALP 活性的能力。SF-C-5, C-6, C-7 三個有效作用分割物發現，SF-C-5 在濃度 2.5  $\mu\text{g/ml}$  具有增加 ALP 的作用；SF-C-6 同樣在 10  $\mu\text{g/ml}$  具有明顯的增加 ALP 活性的能力；

SF-C-7 則在  $20 \mu\text{g/ml}$  有明顯的 ALP 活性反應，但是卻有細胞毒性的產生。或許這暗示著 SF-C 增加 ALP 活性作用的能力是這三個分劃物綜合起來的作用。然而分離純化 SF-C-6 同樣得到三個有效作用的次分劃物, SF-C-6-4、SF-C-6-5、SF-C-6-6 其有效作用濃度皆集中在  $10 \mu\text{g/ml}$  以上，但在細胞存活率偵測中都有細胞毒性的抑制作用。

OPN 是一種酸性蛋白質，出現在造骨細胞的晚期分化階段，可以使造骨細胞吸附氫氧化磷酸鈣 (Young *et al*, 1992)，具有與鈣結合的能力，可沉澱骨質。OPG 是一個可溶性的蛋白質可以抑制蝕骨細胞的形成和骨蝕損作用，以及可以調節骨密度和骨質量 (Simonet *et al*, 1997)，然而 OPG 扮演一個誘餌接受器，可以阻止 RANKL 結合到 RANK 上。RANKL 已經被確認為是調節蝕骨細胞生成作用和骨蝕損作用的重要角色，隨後，RANKL 也被指出能夠結合並活化跨膜接受器 RANK (Anderson *et al*, 1997)。所以 OPG 和 RANKL 的表現，可以調節骨蝕損作用和骨密度的多寡，並且可以控制 RANK 在蝕骨細胞上的活化狀態 (Boyle *et al*, 2003)。本實驗使用 SF-C 和 SF-C-6 這兩個有明顯增加 ALP 活性作用的萃取物進行測試，實驗結果發現在 SF-C 和 SF-C-6 作用下，可以明顯的增加 MC3T3-E1 細胞之 OPN 蛋白質和 OPG 蛋白質的表現量。然而，RANKL 卻無法測得實際濃度的數據，但這也暗示著 SF-C 和 SF-C-6 不會增加 RANKL 的濃度，促進蝕骨細胞的分化作用。所以如果忽略 RANKL 的表現，在 OPG 和 OPN 明顯的表現量下。可以判定有骨消具有增加造骨細胞的分化能力而且不會作用於蝕骨細胞以及可

以促使鈣離子沉澱，增進礦化作用的能力。除此之外，本實驗還使用 ARS 染色法觀察 SF-C 和 SF-C-6 在不同濃度的作用下，對於 MC3T3-E1 的礦物質化結節的表現。根據實驗結果發現 SF-C 在  $10\ \mu\text{g/ml}$  和 SF-C-6 在  $5\ \mu\text{g/ml}$  有明顯的礦化作用的能力，但是 SF-C-6 的作用卻還比不上 SF-C 的促進能力。

綜合以上實驗發現，SF-C 可以刺激 MC3T3-E1 大幅度增強 ALP 活性作用的能力，增加 OPN 蛋白質和 OPG 蛋白質的表現量，另外還有明顯促進礦化作用的能力。這顯示有骨消在造骨細胞的分化過程中，不單單只是作用於前期分化階段，而且會持續的刺激造骨細胞的中後期分化能力，使其能夠順利分化至骨細胞。

一直以來 BMPs 就被認為在骨形成作用和骨重塑作用的過程中扮演相當重要的角色 (Hsu *et al*, 2007)。另外也有一些天然物的研究報告指出，可藉著誘發 BMP 和其下游傳遞因子 SMAD 的活化，進而達到造骨細胞的分化作用，例如:osthole (Kuo *et al*, 2005) 和 fraxetin (Kuo *et al*, 2006)。根據本實驗的研究結果發現 BMPs 的受體抑制劑, noggin 確實可以抑制 SF-C 所刺激 MC3T3-E1 產生的 ALP 的活性。另外，SMAD 的磷酸化作用也明確的在 SF-C 處理後的細胞中被發現。這些結果顯示 BMPs/SMAD signaling 系統在 SF-C 調節的細胞成熟和造骨細胞分化作用裡扮演著重要的角色。

BMPs 已經被報導出在造骨細胞分化作用裡不只會活化 SMAD signaling 而且也會磷酸化 p38 kinase 路徑，以及 SMAD 和 p38 kinase signaling 之間是呈現正

相關 (Nohe *et al*, 2004)。另外，BMPs 誘導造骨細胞骨基質基因的表現和 ALP 活化作用裡，包含了 p38 和 SMAD 訊號之間的交互作用 (Guicheux *et al*, 2003)。根據上述相關報導，再對照本論文的結果，SF-C 在造骨細胞的分化系統中不磷酸化 ERK1/2 和 JNK 的表現，只有明顯磷酸化 p38，或許就是因為需要藉由和 BMPs/SMAD 的交互作用才會在 SF-C 調節的細胞成熟和造骨細胞分化作用裡表現出來，同時這也顯示 p38 MAPK 在 SF-C 調節分化作用的重要性。不過其詳細的機制仍然不清楚。

PI3K 在肌肉和脂肪組織的分化中扮演一個不可缺少的角色 (Jiang *et al*, 1998)。通常 PI3K 的活化作用會與生長和分化因子誘導蛋白質之 tyrosine 的磷酸化增加有關 (Shepherd *et al*, 1998)。而且 PI3K 在細胞訊息傳遞內會引導細胞生長和抑制細胞凋亡 (Toker *et al*, 1997)。然而在 2002 年 Choudhury 等人首先發現了 PI3K 在骨生成作用裡的作用與 BMPs 的關係。他們也發現了 SMAD 與 PI3K/Akt signaling cascade 在誘導轉錄因子調節造骨細胞骨生成作用時，彼此之間會有互相影響的關係。根據本論文結果發現，PI3K 抑制劑, wortmannin 會抑制 SF-C 誘導的 ALP 活性作用，並且在 western blot 的實驗也觀察到 SF-C 的確可以明顯的造成 PI3K 下游因子 Akt 的磷酸化。同樣推測在 SF-C 刺激 MC3T3-E1 細胞的分化作用下，SMAD 和 PI3K/Akt signaling cascade 具有彼此交叉作用並促使造骨細胞的成熟和調節分化作用的能力。不過其詳細的機制仍然不清楚。

綜合上述的討論，有骨消的氣仿層萃取物, SF-C 在細胞實驗中已經明確的

發現可以促進 ALP 的活化能力、骨基質蛋白 OPN 的生成、增加蝕骨抑制因子 OPG 的表現以及增加礦化作用的能力。並且在初步的機轉作用中也發現會對 BMPs/SMAD signaling pathway、p38 MAPK 和 PI3K/Akt signaling cascade 具有刺激磷酸化的作用。未來可以進一步的純化分離有骨消取得純物質，探討對於造骨細胞分化作用的能力，或者更深入的研究明確的作用機轉以及彼此之間的交互作用。



# 第五章 結論



本論文藉由 MC3T3-E1 前驅造骨細胞株證實有骨消的氣仿層萃取物含有促進骨質新生的活性成分。並且根據研究顯示，有骨消在治療骨折疼痛和跌打損傷的傳統療法上，可能是藉由促進造骨細胞的分化能力、增加礦化作用的能力和增加骨基質蛋白 OPN 的生成，以及提高 OPG/RANKL 的比值，以達到快速補充流失的骨質。然而其作用的機轉有可能是透過活化 BMPs/SMAD 途徑、p38 MAPKs 途徑以及 PI3K/Akt 途徑和彼此之間的交互作用，但其明確的作用機制有待進一步的探討。



## 第六章 參考文獻

- Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER *et al.* A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390:175-179, 1997
- Anderson GJ, Darshan D. Small molecule dissection of BMP signaling. *Nature Chemical Biology* 4:15-16, 2008
- Aubin JE, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 17:S77-S83, 1995
- Barrett J. Phytoestrogens : friends or foes? *Environmental Health Perspectives* 104:478-482, 1996
- Bellows CG, Reimers SH, Heersche JN. Expression of mRNAs for type-I collagen, bone sialoprotein, osteocalcin, and osteopontin at different stages of osteoblastic differentiation and their regulation by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Cell Tissue Research* 297:249-259, 1999
- Boissy P, Andersen TL, Abdallah BM, Kassem M, Plesner T, Delaisse JM. Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. *Cancer Research* 65:9943-9952, 2005
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337-342, 2003
- Choudhury NG, Abboud SL, Nishimura R, Celeste A, Mahimainathan L, Choudhury

GG. Requirement of BMP-2 induced phosphatidylinositol 3-kinase and Akt Serine/Threonine kinase in osteoblast differentiation and SMAD dependent BMP-2 gene transcription. *Journal of Biological Chemistry* 277:33361-33368, 2002

Ge C, Xiao G, Jiang D, Franceschi RT. Critical role of the extracellular signal-regulated kinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development. *Journal of Cell Biology* 176:709-718, 2007

Ghosh-Choudhury N, Mandal CC, Choudhury GG. Statin-induced Ras activation integrates the phosphatidylinositol 3-kinase signal to Akt and MAPK for bone morphogenetic protein-2 expression in osteoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 282:4983-4993, 2007

Guicheux J, Lemonnier J, Ghayor C, Suzuki A, Palmer G, Caverzasio J. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research* 18:2060-2068, 2003

Hsu YL, Chang JK, Tsai CH, Chang Chien TT, Kuo PL. Myricetin induces human osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Biochemical Pharmacology* 73:504-514, 2007

- Jiang BH, Zheng JZ, Vogt PK. An essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in myogenic differentiation. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 95:14179-14183, 1998
- Kuo PL, Hsu YL, Chang CH, Chang JK. Osthole-mediated cell differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in human osteoblast cells. *Biochemical Pharmacology* 314:1290-1299, 2005
- Kuo PL, Hsu YL, Chang CH, Chang JK. Bone morphogenetic protein-2 and -4 mediates fraxetin-induced maturation and differentiation in human osteoblast-like cell lines. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 29:119-124, 2006
- Lee SU, Shin HK, Min YK, Kim SH. Emodin accelerates osteoblast differentiation through phosphatidylinositol 3-kinase activation and bone morphogenetic protein-2 gene expression. *International Immunopharmacology* 8:741-747, 2008
- Martini FH, Bartholomew EF. Essentials of Anatomy and Physiology. *Prentice Hall, Inc.* 2<sup>nd</sup> edition, USA, 2000
- Mishima S. The effect of long-term pulsing electromagnetic field stimulation on experimental osteoporosis of Rats. *International Journal of Occupational and Environmental Health* 10:31-45, 1988
- Mundy GR. Bone Remodeling and its Disorders. *Martin Dunitz* 2<sup>nd</sup> edition, USA,

1999

Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cellular Signalling* 16:291-299, 2004

Pan W, Quarles LD, Song LH, Yu YH, Jiao C, Tang HB, *et al.* Genistein stimulates the osteoblast differentiation via NO/cGMP in bone marrow culture. *Journal of Cellular Biochemistry* 223:131-137, 2005

Putnam SE, Scutt AM, Bicknell K, Priestley CM, Williamson EM. Natural products as alternative treatments for metabolic bone disorders and for maintenance of bone health. *Phytotherapy Research* 21:99-112, 2007

Raman M, Chen W, Cobb MH. Differentiation regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26:3100-3112, 2007

Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signaling. *Biochemical Journal* 333:471-490, 1998

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R *et al.*

Osteoprotegerin : a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309-319, 1997

Stuart HR. Science, medicine, and the future : osteoporosis. *British Medical Journal* 315:469-472, 1997

Sykaras N, Opperman LA. Bone morphogenetic proteins(BMPs) : how do they

function and what can they offer the clinician? *Journal of Oral Science* 45:57-73, 2003

Tang CH, Yang RS, Chien MY, Chen CC, Fu WM. Enhancement of bone morphogenetic protein-2 expression and bone formation by coumarin derivatives via p38 and ERK-dependent pathway in osteoblasts. *European Journal of Pharmacology* 579:40-49, 2008

Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387:673-676, 1997

Xie F, Wu CF, Zhang Y, Yao XS, Cheung PY, Chan AS, Wong MS. Increase in bone mass and bone strength by *Sambucus williamsii* HANCE in ovariectomized rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 10:1879-1885, 2005

Yang XJ, Wong MS, Wang NL, Chan SC, Yao XS. Lignans from the stems of *Sambucus williamsii* and their effectson osteoblastic UMR106 cells. *Journal of Asian Natural Products Research* 9:583-591, 2007

Yin XX, Chen ZQ, Liu ZJ, Ma QJ, Dang GT. Icariine stimulates proliferation and differentiation of human osteoblasts by increasing production of bone morphogenetic protein 2. *Chinese Medical Journal* 120(3):204-210, 2007

Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Hegard AM, Robey PG. Structure, expression and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 281:275-294, 1992

楊榮森. 骨質疏鬆症-病因，診斷，治療. 合計圖書出版社. 台北, 民 86

參考網址

<http://www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp>

