



中國醫藥大學  
基礎醫學研究所  
碩士學位論文

異丙黃酮衍生物藉由調控 ERK、p38、JNK 和 NF- $\kappa$ B  
途徑抑制 RANKL 所誘發的蝕骨細胞形成

Ipriflavone analogues inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by  
inhibiting ERK, p38, JNK and NF- $\kappa$ B pathways

指導教授：譚思濉 博士

共同指導教授：湯智昕 博士

研究生：李巧雯

中華民國九十九年六月

# 目錄

|  |      |
|--|------|
| 目錄.....                                  | I    |
| 附圖目錄.....                                | III  |
| 附表目錄.....                                | V    |
| 縮寫對照表.....                               | VI   |
| 中文摘要.....                                | VIII |
| 英文摘要.....                                | X    |
| 第一章 緒論.....                              | 1    |
| 一、文獻回顧.....                              |      |
| (1) 骨骼結構與代謝.....                         | 1    |
| (2) 蝕骨細胞 (osteoclast).....               | 6    |
| (3) 骨質疏鬆症 (osteoporosis).....            | 15   |
| (4) 造骨細胞 (osteoblast) 相關蛋白.....          | 17   |
| (5) 異丙黃酮 (ipriflavone).....              | 19   |
| (6) 異丙黃酮對於骨骼形成之影響.....                   | 20   |
| (7) 異丙黃酮衍生物 (ipriflavone analogues)..... | 21   |
| 第二章 研究架構與動機.....                         | 23   |
| 一、研究背景.....                              | 23   |
| 二、研究目的.....                              | 24   |

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 三、研究假設.....               | 24 |
| 第三章 材料與方法 .....           | 25 |
| 一、設備與材料.....              | 25 |
| 二、實驗方法.....               | 30 |
| 三、Buffer composition..... | 40 |
| 四、統計分析.....               | 43 |
| 第四章 結果 .....              | 44 |
| 第五章 討論 .....              | 51 |
| 第六章 結論 .....              | 55 |
| 第七章 參考文獻 .....            | 56 |
| 第八章 圖表與圖表說明 .....         | 62 |



## 附圖目錄

|  |    |
|--|----|
| Fig. 1 Bone remodeling.....  | 5  |
| Fig. 2 Osteoclast formation.....   | 8  |
| Fig. 3 Osteoblast-osteoclast interaction.....  | 10 |
| Fig. 4 RANK/RANKL signaling pathway.....   | 13 |
| Fig. 5 Osteoporosis.....   | 16 |
| Fig. 6 Ipriflavone.....  | 20 |
| Fig. 7 Ipriflavone analogues didn't affect cell viability.....   | 62 |
| Fig. 8 Ipriflavone analogues inhibits osteoclastogenesis from bone marrow stromal cells and macrophages..... | 64 |
| Fig. 9 Ipriflavone analogues inhibits the RANKL-induced ERK, p38 and JNK activation.....                     | 65 |
| Fig. 10 Ipriflavine analogues inhibits RANKL-induced NF- $\kappa$ B activation....                           | 66 |
| Fig. 11 Ipriflavone analogues inhibits RANKL-induced $\kappa$ B-luciferase.....                              | 67 |
| Fig. 12 Ipriflavone analogues didn't affect cell viability in osteoblasts.....                               | 68 |
| Fig. 13 Ipriflavone analogues slightly increased ALP expression in osteoblasts.....                          | 69 |
| Fig. 14 Ipriflavone analogues slightly increased BMP-2 expression in osteoblasts.....                        | 70 |
| Fig. 15 Ipriflavone analogues slightly increased OC expression in osteoblasts.....                           | 71 |

Fig. 16 Ipriflavone analogues slightly increased OPN expression in osteoblasts.....72

Fig. 17 Inhibition of bone loss by ipriflavone analogues in ovariectomized mice.....73



## 附表目錄

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| Table. 1 BMPs families.....         | 18 |
| Table. 2 Ipriflavone analogues..... | 22 |
| Table. 3 Primer sequence.....       | 38 |



## 縮寫對照表

ALP : alkaline phosphatase

BMC : bone mineral content

BMD : bone mineral density

BMSCs : bone marrow stromal cells

BMP-2 : bone morphogenetic protein-2

DEXA : dual-energy Xray absorptiometer

ECL : enhanced chemiluminescence

ERK : extracellular signal-regulated kinases

IL-1 : interleukin-1

IL-6 : interleukin-6

JNK : c-Jun N-terminal kinase

MAPK : mitogen activated protein kinase

M-CSF : macrophage colony stimulating factor

MSC : mesenchymal stromal cell

NOF : national osteoporosis foundation

OC : osteocalcin

OPN : osteopontin



PTH : parathyroid hormone

PVDF membrane : polyvinylidene fluoride membrane

RANKL : receptor activator of nuclear factor kappa B ligand

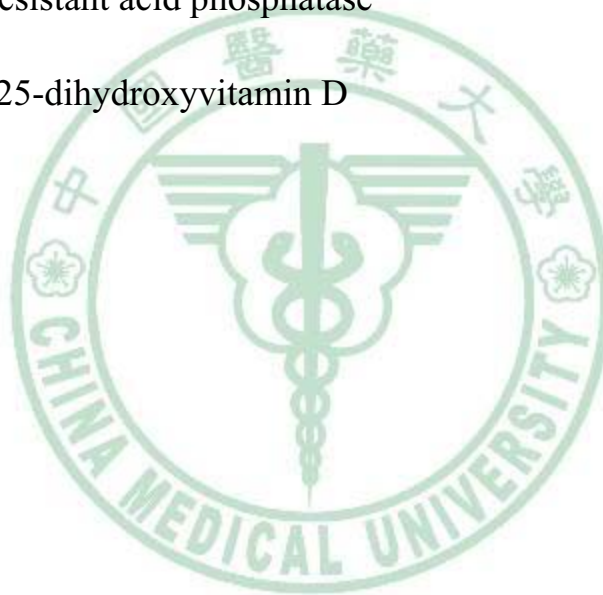
TGF $\beta$  : transforming growth factor- $\beta$

TNF : tumor necrosis factor

TRAF : TNFR associated factors

TRAP : tartrate-resistant acid phosphatase

1,25(OH) $_2$ D $_3$  : 1,25-dihydroxyvitamin D





## 中文摘要

許多研究指出，在蝕骨細胞 (osteoclast) 的形成中，發炎相關的細胞激素扮演著很重要的角色，過度的骨蝕作用可能會導致骨質疏鬆症的發生。異丙黃酮 (ipriflavone) 亦為7-isopropoxyisoflavone，是由苜蓿分離出來的天然異黃酮衍生物，曾有研究指出，異丙黃酮具有抗發炎的活性。所以我們合成新的異丙黃酮衍生物，並研究其抗蝕骨細胞形成的能力。我們由骨髓基質幹細胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs) 及 RAW264.7 巨噬細胞中發現，異丙黃酮衍生物顯著地抑制 RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand) 及 M-CSF (macrophage colony stimulating factor) 所誘導的蝕骨細胞分化作用。在 RAW264.7 巨噬細胞中給予 RANKL，會誘導 ERK (extracellular-signal-regulated kinases)、p38 及 JNK (c-Jun N-terminal kinase) 磷酸化。不過 RANKL 所誘導的 ERK、p38 和 JNK 的磷酸化會被異丙黃酮衍生物所抑制。此外，RANKL 調控增加 I $\kappa$ B $\alpha$  和 Ser536 位置上的 p65 磷酸化， $\kappa$ B-luciferase 和 NF- $\kappa$ B 入核與 DNA 結合的活性，會被異丙黃酮衍生物所抑制。相較之下，異丙黃酮衍生物對於造骨細胞的增殖及分化是沒有影響的。除此之外，異丙黃酮衍生物可以預防卵巢切除所誘發的骨質流失現象。我們研究顯示，在骨髓基質幹細胞及巨噬細胞中，異丙黃酮衍生物藉由抑制 ERK、JNK、p38 和 NF- $\kappa$ B 活

性，抑制蝕骨細胞形成。因此，新的異丙黃酮衍生物，可能對於骨頭健康是有益處的，它可以藉由抑制蝕骨細胞，減少骨質流失。

關鍵字：異丙黃酮衍生物、蝕骨細胞、ERK、JNK、p38、NF- $\kappa$ B



## 英文摘要

Numerous studies have indicated that inflammatory cytokines play a major role in osteoclastogenesis, leading to the bone resorption that is frequently associated with osteoporosis. Ipriflavone (7-isopropoxyisoflavone), a derivative of natural isoflavone isolated from alfalfa, has been reported had anti-inflammatory activity. We synthesized the new ipriflavone derivatives and investigated the anti-osteoclastogenesis activity. We found that ipriflavone analogues markedly inhibited the receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) plus macrophage colony stimulating factor (M-CSF)-induced osteoclastic differentiation from bone marrow stromal cells and RAW264.7 macrophage cells. Treatment of RAW264.7 macrophages with RANKL induced extracellular-signal-regulated kinase (ERK) 、 p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphorylation. However, RANKL-induced ERK 、 p38 and JNK phosphorylation was attenuated by ipriflavone analogues. Furthermore, RANKL-mediated increase of I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation, p65 phosphorylation at Ser536,  $\kappa$ B-luciferase activity and NF- $\kappa$ B binding activity was inhibited by ipriflavone analogues. In contrast, ipriflavone analogues did not affect the proliferation and differentiation of osteoblasts. In addition, ipriflavone analogues prevented the bone loss inducing by ovariectomy in vivo. Our data suggest that ipriflavone analogues inhibits osteoclastogenesis from bone marrow stromal cells and macrophage cells via attenuated of RANKL-induced JNK, p38 and NF- $\kappa$ B activation. Therefore, the new ipriflavone analogues may benefit bone health by decrease bone loss through inhibiting the osteoclast.

Key words : Ipriflavone analogues, Osteoclast, ERK, JNK, p38, NF- $\kappa$ B



# 第一章 緒論

## 一、文獻回顧

### (1) 骨骼結構與代謝

人體內的骨骼是相當堅硬的組織，它是由磷酸鈣的微小晶體和骨基質所構成。而骨骼的形成是鈣質堆積而成，已鈣化的網狀膠質當作骨架，網路後形成骨骼。磷酸鈣使骨骼具有強度，而膠原蛋白則使骨骼具有韌性。骨骼的成分可分為有機質及無機質，其中無機質佔 70%，有機質約佔乾燥骨的 30%。無機質中有 95% 是磷酸鈣，為骨骼的最主要成分。其他成分包括碳酸鹽、鈉、鎂、鉀、氟化物及氯化物等物質。而有機質中包含骨基質 (98%) 及細胞 (2%)。骨基質中 95% 是膠原質，此外 5% 是非膠原質蛋白。骨骼中含三種型式的細胞 (Sikavitsas et al., 2001)：造骨細胞 (osteoblast)、蝕骨細胞及骨細胞 (osteocyte)。骨髓中的間葉細胞 (mesenchymal stromal cell ; MSC) 演化成造骨細胞 (Vik et al., 2005)，主要功能為修復骨骼和結合第 I 型膠原蛋白 (type I collagen)。而造骨細胞能夠對於副甲狀腺素 (parathyroid hormone ; PTH) (Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil et al., 2006; Kitahara et al., 2003) 以及維生素 D (1,25-dihydroxyvitamin D ; 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) 產生反應 (Somjen, 2007)。

人的骨骼終其一生都在不斷的進行骨吸收以及骨形成，使骨骼組織不斷的被代謝與更新，此作用稱為骨的重塑作用 (bone remodeling)。造骨細胞為單核細胞，主要參與骨化作用，而蝕骨細胞為多核細胞，主要吸收骨質，骨骼在成長期或成年期，一直不斷由蝕骨細胞進行骨質分解，釋出鈣質於血液中 (Lerner, 2000)。並且同時由造骨細胞吸收血液中的鈣質進行骨化 (Sikavitsas et al., 2001)，骨骼的形成便由這兩種細胞的增減消長做為平衡。一年間有 20~30% 的骨頭新生而成，新生骨的完成約需花上 3~6 個月時間。

骨重塑作用可分為五個階段 (Fig. 1)：

1. 靜止期 (quiescet)：

骨表面維持靜止狀態，同時骨細胞扁平化，等待骨形成作用。

2. 活化期 (activation)：

骨細胞在靜止期時排列在骨表面上，當刺激出現，骨細胞變成立體狀，細胞間有了空隙，由血液單核球分化而來的前趨蝕骨細胞 (preosteoclast) 便移置空隙中。

3. 吸收期 (resorption)：

前趨蝕骨細胞分化後，變成蝕骨細胞，在骨表面形成，並貼附於骨表面，待蝕骨細胞活化後，便開始在該部位產生骨溶解、吸收以及消化作用。

#### 4. 形成期 (formation) :

此時造骨細胞被活化，進入骨細胞空隙中，而蝕骨細胞活性減低。

被活化的造骨細胞分泌類骨質至骨細胞空隙中，等待礦化作用。

#### 5. 礦化期 (mineralization) :

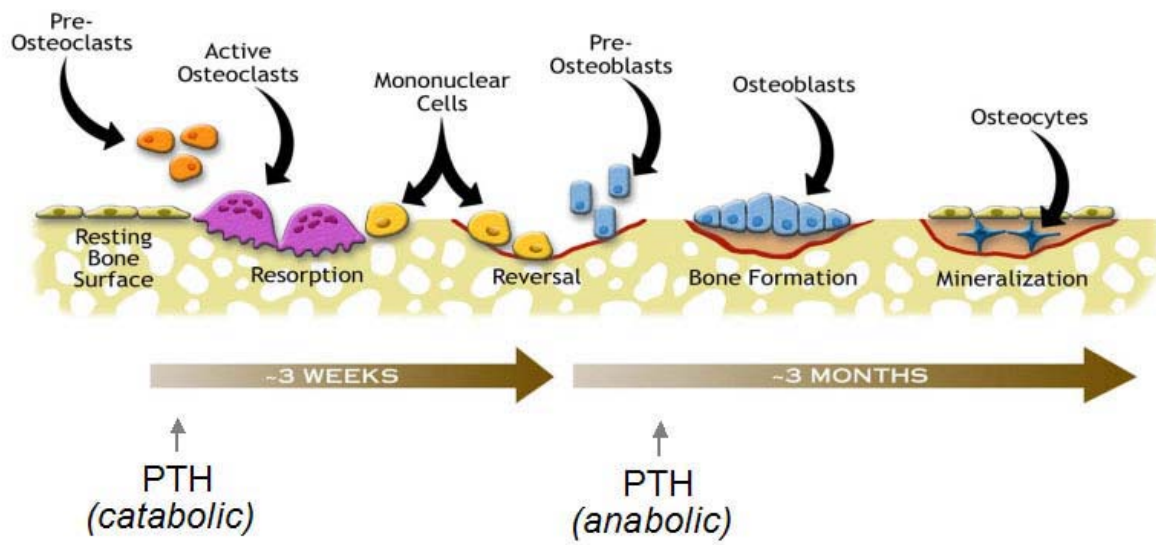
類骨質在骨細胞空隙中，與鈣質結合，沉積於空隙中，將它填滿完成骨修復。

#### 6. 靜止期 :

經過礦化後，骨表面恢復靜止狀態，同時骨細胞扁平化，等待下一個骨重塑作用。



## Bone Remodeling Cycle





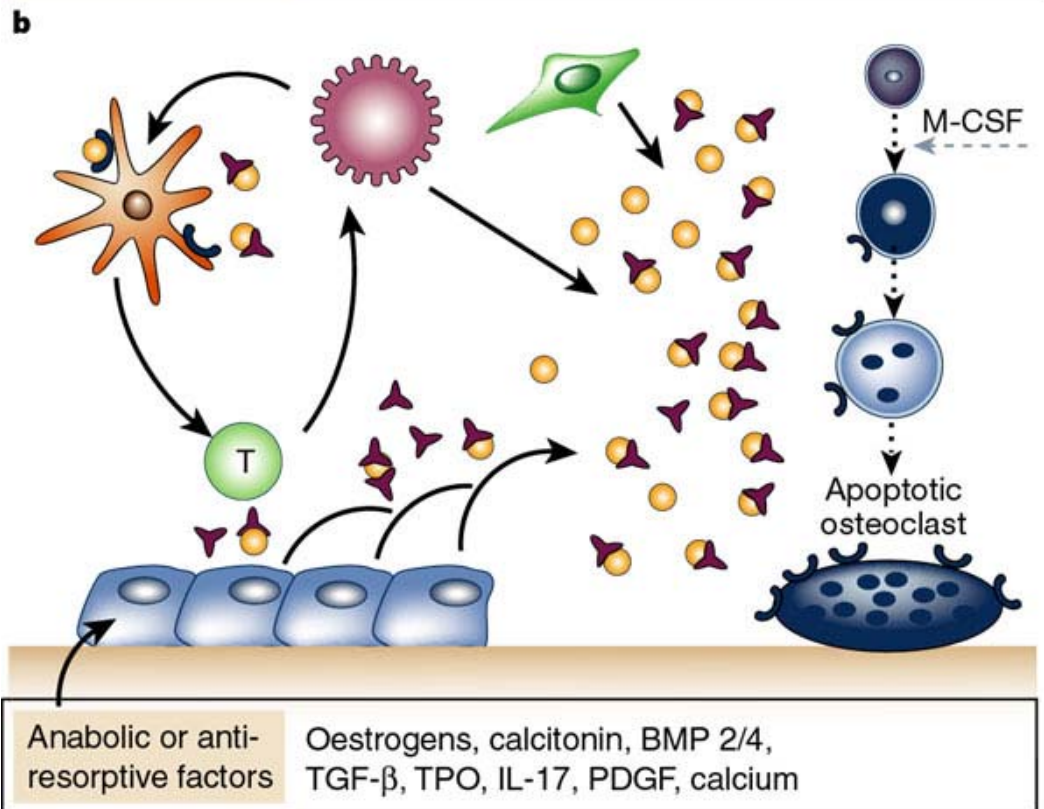
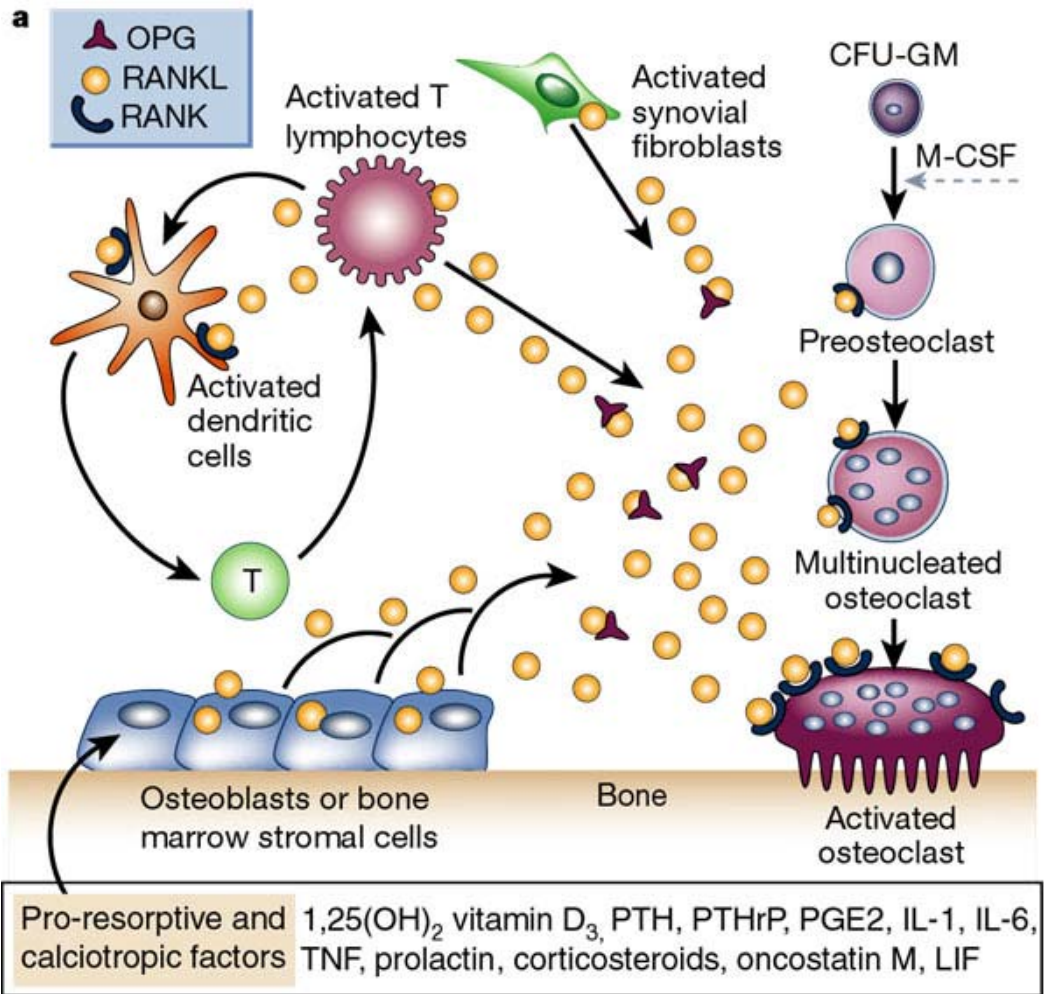
### **Fig. 1 Bone remodeling (Parfitt, 2001)**

A cartoon of a BMU showing the various stages of cellular activity that it passes through temporally. For simplicity of illustration, the cartoon shows remodeling in only two dimensions, whereas in vivo it occurs in three dimensions, with osteoclasts continuing to enlarge the cavity at one end and osteoblasts beginning to fill it in at the other end. At the beginning of the sequence, lining cells on the surface of bone become activated and retract. Osteoclasts are recruited to the active site from precursors in bone marrow or from circulating precursors, and these excavate a resorption cavity, the furthest extension of which becomes bounded by a sclerotic border called the cement line. The resorption phase requires only about 2–4 weeks to complete and is terminated when the osteoclasts disappear by apoptosis. After a brief reversal phase, the resorption cavity becomes lined by osteoblasts. The osteoblasts secrete osteoid that, after a lag period, mineralizes to form new bone. Over a period of some 4–6 months, the formation phase refills the resorption cavity with bone to form a completed osteon.

## (2) 蝕骨細胞

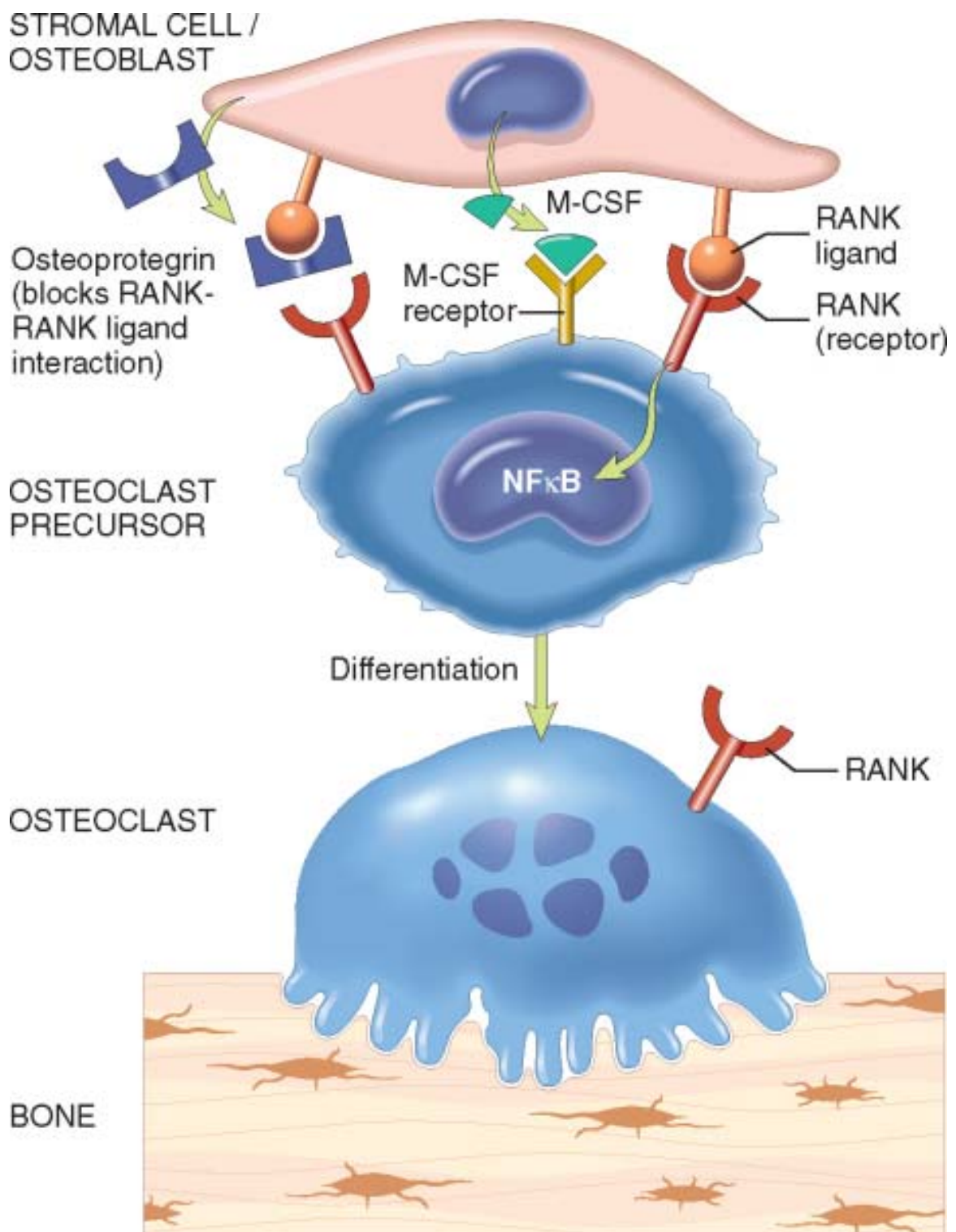
蝕骨細胞是多核細胞，它的來源為骨髓內之單核細胞 (monocyte)。單核細胞及巨噬細胞 (macrophage)，為其前驅物 (Teitelbaum, 2000)，在巨噬細胞成熟分化為蝕骨細胞的過程中，需要有基質細胞或子代造骨細胞的存在 (Udagawa et al., 1990)。經過活化維生素D3及一些細胞介質 (cytokines)，如介白質-1 (interleukin-1；IL-1)、介白質-6 (interleukin-6；IL-6)、轉錄生長因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ；TGF- $\beta$ )、腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor；TNF) 等刺激，分化成蝕骨細胞之前身，再互聚集融合而成 (Fig. 2)。因此蝕骨細胞是一種含有多核之巨大細胞。正常直徑約20~50 $\mu$ m，含3~5個核，在活性加強時 (如在副甲狀腺素刺激下) 可擁有20個以上的核。

廣泛的研究指出，造骨細胞會釋出M-CSF以及RANKL，其為蝕骨細胞形成的要素 (Yao et al., 1998)(Fig. 3)。



**Fig. 2 : Osteoclast formation (Boyle et al., 2003)**

Hormonal control of bone resorption. Schematic representation of the mechanism of action of **a**, pro-resorptive and calcitropic factors; and **b**, anabolic and anti-osteoclastic factors. RANKL expression is induced in osteoblasts, activated T cells, synovial fibroblasts and bone marrow stromal cells, and subsequently binds to its specific membrane-bound receptor RANK, thereby triggering a network of TRAF-mediated kinase cascades that promote osteoclast differentiation, activation and survival. Conversely, OPG expression is induced by factors that block bone catabolism and promote anabolic effects. OPG binds and neutralizes RANKL, leading to a block in osteoclastogenesis and decreased survival of pre-existing osteoclasts.



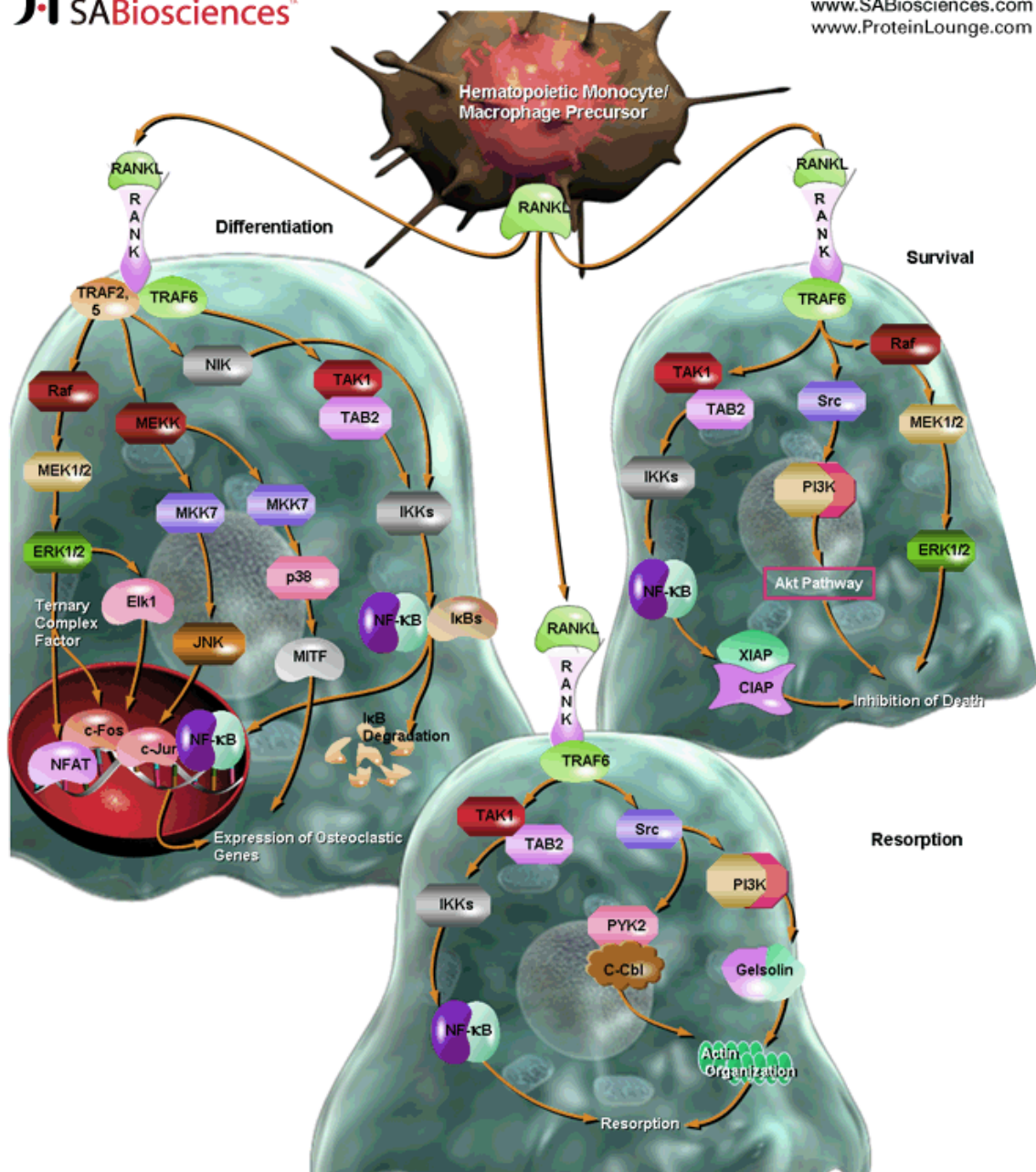
**Fig. 3 : Osteoblast-osteoclast interaction (Abul K. Abbas, 2009)**

Paracrine molecular mechanisms that regulate osteoclast formation and function. Osteoclasts are derived from the same stem cells that produce macrophages. Osteoblast/stromal cell membrane-associated RANKL binds to its receptor RANK located on the cell surface of osteoclast precursors. This interaction in the background of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) causes the precursor cells to produce functional osteoclasts. Stromal cells also secrete osteoprotegerin (OPG), which acts as a decoy receptor for RANKL, preventing it from binding the RANK receptor on osteoclast precursors. Consequently, OPG prevents bone resorption by inhibiting osteoclast differentiation.

當進行骨溶解作用時，會形成不規則之邊緣，內含氫離子幫浦，將氫離子打出細胞外，使外在環境處於酸性，以利所釋放出來的酵素，如酸性磷酸酶 (acid phosphatase)、蛋白酶 (proteases) 以及其他溶酶體 (lysosomal) 酵素，對骨骼進行侵蝕 (Chambers, 2010)。

RANKL為TNF superfamily的成員。會與細胞表面的接受器 (RANK) 結合，傳遞訊息給TRAF (TNFR associated factors) 1、2、3、5以及6 (Darnay et al., 1998)。RANK會由TRAF6和NF- $\kappa$ B誘導激酶，活化NF- $\kappa$ B活性。而TRAF2會活化JNK活性。並且RANKL也會活化NF- $\kappa$ B、JNK、p38以及MAPK (p44/p42 mitogen activated protein kinase) (Darnay et al., 1998; Lee et al., 1997)(Fig. 4)。

不過細胞激素調控蝕骨細胞形成的機制尚未明瞭，因此若可以抑制RANKL訊息傳遞，就可以抑制蝕骨細胞形成所誘導的骨質流失現象。





**Fig. 4 : RANK/RANKL signaling pathway (Darnay et al., 2007)**

RANKL induces the differentiation of osteoclast precursor cells and stimulates the resorption function and survival of mature osteoclasts. The TRAF (TNF Receptor-Associated Factor) adaptor proteins play an important role in the initial event of the signal transduction pathway induced by RANK. TRAFs 1, 2, 3, 5 and 6 bind through the conserved TRAF domain to RANK (Galibert et al., 1998). Among the TRAF proteins, TRAF6 is critical for RANK signaling in osteoclasts. TRAF proteins may act by transmitting the RANK signal to downstream targets that include NF-kappaB (Nuclear Factor-kappa B) and JNK (c-Jun N-terminal kinase). NF-kappaB is retained in the cytoplasm as a complex with the inhibitory I-KappaB (Inhibitor of Kappa Light Chain Gene Enhancer in B-Cells) protein in unstimulated cells. Stimuli that activate NF-kappaB induce the activation of IKKs (I-KappaB Kinases), resulting in the phosphorylation and subsequent proteasome-mediated degradation of I-KappaB. The liberated NF-kappaB then enters the nucleus where it binds to DNA target sites. Events that occur after RANK stimulation in differentiated osteoclasts or osteoclast precursor cells include the phosphorylation and degradation of I-kappaB-Alpha and the nuclear translocation and DNA binding of the NF-kappaB proteins p50, p52, and p65 (Jimi et al., 1999). Other intracellular adaptor proteins that interact with TRAF proteins and regulate the function of TRAF in osteoclasts are TAK1 (TGF-Beta Activated Kinase) and NIK (NF-KappaB-Inducing Kinase). XIAP (Xenopus Inhibitor of Apoptosis) and cIAP are downstream targets of NF-kappaB in osteoclast survival pathway. Members of all three MAPK (Mitogen Activated Protein kinase) families, ERK (Extracellular signal Regulated Kinase), JNK, and p38, are activated by RANK in osteoclasts or osteoclast precursors (Jimi et al., 1999). JNK1, and not JNK2, is important for efficient osteoclast differentiation. The upstream targets of JNK in RANK signaling include MKK7. The dominant-negative MKK6 regulates p38 activity and osteoclastogenesis. Raf is implicated in the activation of ERK via signal transduction involving CD40, a TNFR family receptor that shares similar signaling characteristics as RANK (Kashiwada et al., 1998). The TAK1/TAB2 activity that induces JNK and p38 activation is downstream of TRAF6 in the RANK-signaling pathway. The downstream targets of ERKs and JNKs include the transcription factor Activating Protein-1, a dimer composed of c-Fos and c-Jun protein. ERK induce and activate c-Fos and NFAT(Nuclear Factor of Activated T-Cells) by phosphorylating Elk1, which

is a part of a TCF (Ternary Complex Factor), while JNK increase Activating Protein-1 transcriptional activity through the phosphorylation of c-Jun. Another transcription factor MITF (Microphthalmia-Associated Transcription Factor) is a target of p38 in the RANK-signaling pathway in osteoclasts (Mansky et al., 2002). Src act as a mediator of the RANK to PI3K (Phosphatidylinositol-3 Kinase)/Akt1 signal in osteoclasts. Among the many molecules downstream of Src, PYK2 (Protein Tyrosine Kinase-2) and c-Cbl are implicated in osteoclast adhesion signaling and bone resorption function. Additionally, the association of the actin-binding protein gelsolin with PI3K is important in actin filament formation in osteoclasts (Chellaiah et al., 1998). Src and PI3K function at the point where RANK and adhesion signals converge, transmitting the signals for proper actin cytoskeletal organization that facilitates resorption activity of osteoclasts.



### (3) 骨質疏鬆症 (osteoporosis)

骨質疏鬆症是一種因骨質流失引起骨密度降低，並且骨小樑結構失序及強度變差，導致骨折發生率增加的疾病 (1991)(Fig. 5)。它的發生是一個漸進的過程，無論是原發性、特發性或繼發性，雖然原因不同，但病理改變是一致的，治療原則也都相同。

骨質疏鬆為骨吸收作用與骨形成作用不平衡所造成的疾病，有幾種狀況可能會誘導骨質的流失，例如，賀爾蒙失調、生病或藥物，如皮質類固醇 (corticosteroids) 或抗癲癇藥物 (anti-epileptic agents) 等 (Goltzman, 2002)。

現行通用的治療骨質疏鬆藥物，包括雙磷酸鹽類 (bisphosphonates)、降血鈣素 (calcitonin) 以及雌激素 (estrogen)。皆為抑制骨吸收作用的藥物 (Rodan and Martin, 2000)。

構成骨骼的主要成分有骨基質 (organic marix) 與骨鹽 (bone mineral) 兩大部分，正常情況下兩者量的比例是恆定的，當兩者比例保持不變，但量同時減少時，即為骨質流失。

骨頭密度分類：

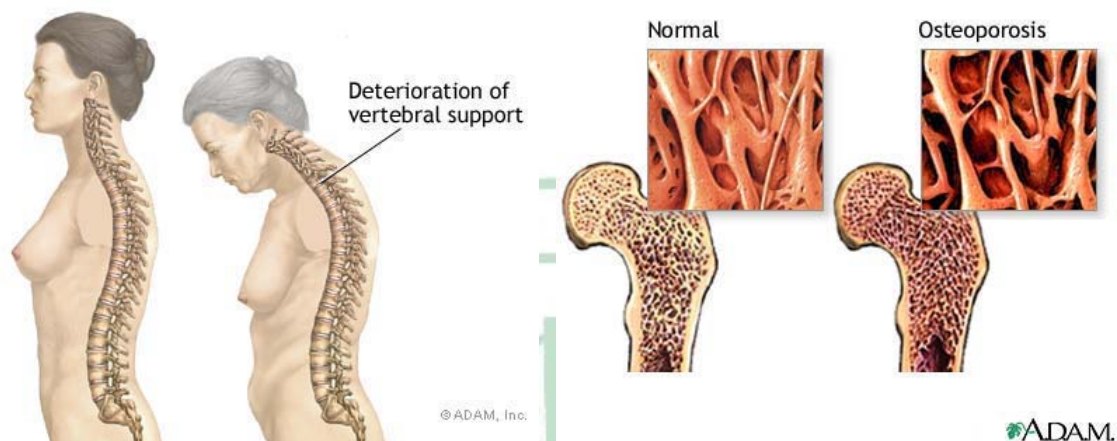
依照骨頭密度 (bone mineral density ; BMD)，可將骨頭流失程度分為以下三類：

1. 骨質稀少症 (osteopenia)：骨頭密度低於一般年輕女性平均值的

1~2.5 個標準差。

2. 骨質疏鬆症：骨頭密度低於一般年輕女性平均值超過 2.5 個標準差。

3. 嚴重性骨質疏鬆症 (established osteoporosis)：骨頭密度低於一般年輕女性平均值超過 2.5 個標準差，並且有多處骨折 (Kanis et al., 1994)。



**Fig. 5 : Osteoporosis (A.D.A.M., Inc.)**

治療骨質疏鬆症最普遍的方法是服用鈣片，每天應攝取約 1,500 毫克的鈣，若能再加上維他命 D，就能更進一步促進鈣質的吸收。若有嚴重骨質疏鬆引起骨折，可服用雙磷酸鹽類，如：福美善錠 (fosamax)，此藥可抑制蝕骨細胞的活性，防止骨質持續流失，但是服用雙磷酸鹽類藥物長達 5 年以上，可能導致大腿容易骨折，療效也不好。多勝類荷爾蒙製劑，如降鈣激素，也有不錯療效。而且此藥的副作用較少，但長期使用效果則有限。

#### (4) 造骨細胞相關蛋白

##### 1. 鹼性磷酸酶 (alkaline Phosphatase ; ALP) :

鹼性磷酸酶為一種分子量約 65 kDa 的蛋白，具有極強攜帶鈣離子的能力，位於腸道、肝臟、腎臟等組織內。而造骨細胞內的鹼性磷酸酶較多，其可將有機磷酸化合物酯解，產生無機磷離子，提供骨基質礦化過程中所需之磷離子，此外，亦可合成膠原蛋白 (Sun et al., 1997)。因此，在骨骼代謝與合成作用中，鹼性磷酸酶可做為骨質代謝的生物指標，可反映出骨細胞代謝狀態，並精確評估骨代謝狀況 (Gundberg, 2000)。

##### 2. 骨形成蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2 ; BMP-2) :

BMP-2 是骨形成蛋白 (bone morphogenetic proteins ; BMPs) 內的成員之一，分子量約為 30kDa，皆隸屬於 TGF- $\beta$  家族。並且發現，去礦物化後的骨質間質裡，有誘導骨形成的蛋白，而此蛋白即是 BMPs (Urist, 1965)。目前已知骨形成蛋白至少有 15 種 (Table. 1)，其中第二型骨形成蛋白誘導骨形成作用較強，已有許多關於骨組織形成的體外 (*in vitro*) 或體內實驗 (*in vivo*) 證實，第二型骨形成蛋白具有明顯的造骨細胞誘導作用，目前已有許多的文獻證實其對於骨組織的形成有正面效益 (Samee et al., 2008; Wang et al., 2004)。

|        | 功能  |
|--------|---|
| BMP-1  | 將不成熟前膠原趨化為成熟膠原蛋白，無 TGF- $\beta$ 家族特定序列，因此非 TGF- $\beta$ 家族成員。 |
| BMP-2  | 促使骨骼及軟骨形成，同時會促使造骨細胞分化   |
| BMP-3  | 可促使骨骼形成   |
| BMP-4  | 與牙齒、四肢中骨骼合成，骨折後的復原有關  |
| BMP-5  | 對於軟骨發育有極大幫助   |
| BMP-6  | 儲存於成人關節中  |
| BMP-7  | 對於造骨細胞分化及腎臟發育修復有關   |
| BMP-8  | 對骨骼與軟骨的發展有益   |
| BMP-15 | 常表現在卵巢內，可促使卵子活化   |

**Table. 1 : BMPs families**

### 3. 骨鈣素 (osteocalcin ; OC) :

骨鈣素為非膠原性蛋白，分子量約為 5.8 kDa，由造骨細胞合成，且會進入骨骼細胞外基質，其中一部分被釋放進入血液循環內，因此骨鈣素的多寡反映出骨形成的程度，可當作有效的骨形成指標。

### 4. 造骨蛋白 (osteopontin ; OPN) :

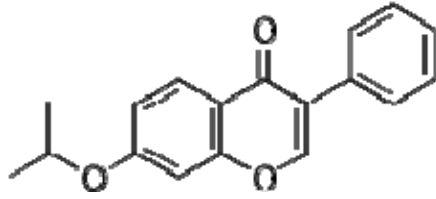
造骨蛋白為骨細胞膜上磷酸化分泌性糖蛋白，分子量約為 65 kDa

(Katakam et al., 2005)，被磷酸化後，傳遞訊息至細胞內，分泌出許多膠原蛋白到骨基質中，維持骨組織內密度 (Ishijima et al., 2007)。造骨蛋白內含有精胺酸-甘胺酸-天門冬胺酸 (Arg-Gly-Asp) 三胜肽序列，此部位可供骨細胞附著於骨組織上 (Denhardt et al., 2001; Ishijima et al., 2007)，且可使骨組織進行礦物化，許多文獻指出造骨細胞蛋白受到機械性壓力其他壓力後，會刺激分泌且活化進行骨形成作用 (Kitahara et al., 2003; Nomura and Takano-Yamamoto, 2000)。而目前對造骨蛋白作用於造骨細胞或蝕骨細胞之機轉尚未明確 (Ishijima et al., 2007)。

上述 4 種蛋白為造骨過程中相當重要的影響蛋白，對於造骨細胞的調控有很重要的地位。所以這些蛋白的變化，對於造骨細胞合成骨骼過程有著相當大的影響力。因此，我們可以測定此 4 種蛋白，做為造骨細胞合成的生物指標。

##### (5) 異丙黃酮

異丙黃酮 (Fig. 6) 亦為 7-isopropoxyisoflavone，是由苜蓿分離出來的天然異黃酮衍生物 (Gennari et al., 1998)。被認為對於健康有正面的影響，如同其它的異黃酮，如金雀異黃酮 (genistein) (Tsuda et al., 1986)。於 1988 年在日本，以被當作骨質疏鬆症的非荷爾蒙藥物，作用為抑制骨吸收 (Agnusdei et al., 1995; Ushiroyama et al., 1995)。



**Fig. 6 : Ipriflavone (Wikipedia)**

### (6) 異丙黃酮對於骨骼形成之影響

研究中指出，異丙黃酮可抑制蝕骨細胞活性，並且在沒有雌激素影響的情況下，促進造骨細胞的活性 (Arjmandi et al., 2000; Miyauchi et al., 1996)。而且在去卵巢的大鼠中可以看到有預防骨質流失的情況 (Civitelli, 1997)。一些實驗模式證實，在骨質疏鬆中，可預防骨質流失 (Reginster, 1993)。以雞為對象的研究中，發現異丙黃酮可能藉由抑制骨的再吸收，並促進骨形成，影響骨重塑作用 (Yao et al., 2007)。

許多研究中發現，若口服200mg的異丙黃酮每天三次，可以抑制骨吸收作用 (Adami et al., 1997; Agnusdei et al., 1989; Gennari et al., 1997; Gennari et al., 1998; Ohta et al., 1999)，且會增加骨形成作用 (Benvenuti et al., 1991)，而在停經後的婦女中，可預防骨質流失的現象 (Adami et al., 1997; Agnusdei et al., 1997)。

異丙黃酮在骨質疏鬆的預防以及治療中，可做為普遍荷爾蒙療法的附加或是替代藥物 (Fig. 7)。它可以增加骨鈣的維持，並抑制骨分解，促進活化造骨細胞，減少骨質疏鬆所引起骨折的疼痛程度 (Ji et al., 2005;

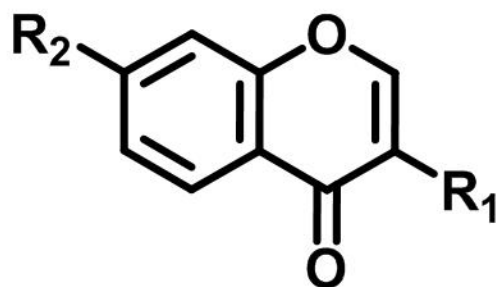


Kim et al., 1997)。

### (7) 異丙黃酮衍生物 (ipriflavone analogues)

異丙黃酮雖副作用較少，安全，可長期服用。但還是有些許的副作用，主要為胃腸障礙、食慾不振。且每天必須服用三次，可能造成患者不便。若我們能夠降低劑量，一天不需多次服用，且有同樣療效，就再好不過了。因此，我們改變異丙黃酮的結構，合成新的異丙黃酮衍生物，來測試是否有抑制蝕骨細胞形成的能力。保留兩個苯環，改變側鏈，製造出五種藥物 (Table. 2)。





|              | R1              | R2               |                                       |
|--------------|-----------------|------------------|---------------------------------------|
| Ipriflavone  | phenyl          | isopropyl        | 7-isopropoxy-3-phenylchromone         |
| Formononetin | 4-methoxyphenyl | OH               | 7-Hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)chromone |
| Genistein    |                 |                  | 5,7-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)     |
| JFL-127      | 4-chlorophenyl  | OCH <sub>3</sub> | 4-methoxy-3-(4-chlorophenyl)chromone  |
| JFL-142      | 4-methoxyphenyl | OCH <sub>3</sub> | 4-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)chromone |
| JFL-144      | 4-fluorophenyl  | OCH <sub>3</sub> | 4-methoxy-3-(4-fluorophenyl)chromone  |

**Table. 2 : Ipriflavone analogues**

## 第二章 研究架構與動機

### 一、研究背景

骨質疏鬆症是由於較低的骨質量和骨組織結構退化，造成骨骼易脆而增加骨折機會的一種疾病。骨質疏鬆的問題造成個人、家庭的不便及社會問題，以往對骨折的發生少被重視，如今預防醫學的觀念崛起，骨質疏鬆症及其伴隨而來的骨折與併發症，在全世界尤其以亞洲地區，成為最受關切的疾病之一。

骨骼是一個有循環置換現象的組織，其過程被稱為重塑作用，而骨骼重塑不平衡，可能會導致骨骼破壞大於再造，使骨質流失加速。人體於18~35歲時，骨骼生長會達顛峰骨質量，自此開始，骨質量每年以0.25~1%的速度流失，而女性在更年期之骨質流失速度會增加至每年2~5%，骨質疏鬆的成因與顛峰骨質量、骨骼重塑不平衡、老化、荷爾蒙缺乏等許多因素有關 (楊榮森，1997)。

根據美國骨質疏鬆學會 (national osteoporosis foundation ; NOF) 的研究指出，2005 年美國約有 4400 萬人受到骨質疏鬆症的威脅，其中約有 1000 萬人被診斷為骨質疏鬆症，3400 萬人有骨質量過低的問題。根據統計資料顯示，超過 50 歲的女性一生中因骨質疏鬆症而導致骨折的機率有 1/2，而男生有 1/4。而其嚴重性方面，百分之二十四的髖骨骨折病患會於

一年內死亡，約有百分之八十的患者在髖骨骨折發生後，6 個月仍然無法走動。而在醫療支出方面，2005 年美國為骨質疏鬆症與其併發症患者，治療的醫療費用高達 190 億美元，由此導致的社會成本更是難以估算。

## 二、研究目的

- (1) 探討異丙黃酮衍生物，是否能夠抑制蝕骨細胞的形成。
- (2) 探討異丙黃酮衍生物，經由何種訊息途徑來抑制蝕骨細胞的形成。
- (3) 探討異丙黃酮衍生物，是否對於造骨細胞有影響。
- (4) 探討異丙黃酮衍生物，是否對去卵巢後的活體動物有正面影響。

## 三、研究假設

異丙黃酮衍生物，可能會藉由抑制 p38、JNK、ERK 以及 NF- $\kappa$ B 的途徑，抑制蝕骨細胞的形成，並可能對於造骨細胞有正面影響，而對於小鼠骨質流失有預防的作用。

## 第三章 材料與方法

### 一、設備與材料

#### (1) 儀器設備

1. 微量吸管 (pippetman)
2. 可見光/紫外光分光光度計 (UV/Visible spectrophotometer DU-800, Beckman Coulter, USA)
3. 多功能酵素免疫分析儀 (triad LT, Dynex Technologies, Inc, UK)
4. 紫外光燈箱 (gel analysis system, EverGene Biotechnology, UK)
5. PCR 加熱機 (robocycler temperature cycler ; Stratagene, La Jolla, CA)
6. 即時聚合酶連鎖反應器 (applied biosystems stepone ; Applied Biosystems Inc, CA, USA)
7. 多功能分光光度計 (multi-spectrophotometer)
8. 細胞培養箱 (incubator)
9. Dual-energy Xray absorptiometer (DEXA) XR-26 (Norland, Fort Atkinson, WI)



## **(2) 實驗細胞株 (cell line)**

1. 老鼠巨噬細胞株 (a mouse macrophage cell line ; RAW264.7)
2. 類造骨細胞株 (the human osteoblast-like cell line ; MG-63)
3. 老鼠造骨細胞株 (a mouse osteoblastic cell line ; MC3T3-E1)  
(American Type Culture Collection)

## **(3) 細胞培養 (cell culture)**

1. Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)
2. Alpha minimal essential medium ( $\alpha$ -MEM)
3. Fetal bovine serum (FBS)
4. Penicillin/streptomycin (P/S)
5. 細胞培養皿  
(Invitrogen Corporation, California, USA)

## **(4) 蝕骨細胞分化實驗 (osteoclast differentiation assay)**

1. M-CSF
2. RANKL  
(Minneapolis, R&D Systems, MN, USA)
3. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) Kit 387-A  
(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

## **(5) 即時聚合酶連鎖反應 (real-time polymerase chain reaction ; Real-time PCR)**

1. TRIzol
2. DEPC

### 3 RNA 轉 cDNA 系統

(Invitrogen Corporation, California, USA)

4. Isopropanol

5. Chloroform

(J.T Baker, NJ, USA)

6. Oligo dT

7. ALP primer

8. BMP-2 primer

9. OC primer

10. OPN primer

(MDBio Inc, Taiwan)

### **(6) 西方墨點法 (western blotting)**

1. Acrylamide

2. BCA<sup>TM</sup> protein assay kit

(Pierce, IL, USA)

3. 0.5M Tris buffer

4. 1.5M Tris buffer

5. PMSF

6. Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

7. Aprotinin

8. NaF

9. Tween20

10. Glycine

11. Tetramethylethylenediamine (TEMED)



(Amresco Inc, Ohio, USA)

12. Ammonium persulfate (APS)

13. PVDF (Immobilon-p)

(Millipore, MA, USA)

14. ECL

15. Western blot develop & replenisher

16. Western blot fix & replenisher

17. BioMax light film

(Kodak Inc, NY, USA)

**(7) 電泳移動改變分析法 (electrophoretic mobility shift assay ; EMSA)**

1. BCA<sup>TM</sup> protein assay kit

2. 核質分離 kit

3. EMSA kit

(Thermo, MA, USA)

**(8) 抗體 (antibody)**

1. p-JNK

2. p-38

3. p-ERK

4. p-IKK $\alpha/\beta$

5. p-I $\kappa$ B $\alpha$

6. p-p65

(Cell signal, MA, USA)

7. Anti-mouse

8. Anti-rabbit





9. JNK
10. p38
11. ERK
12. IKK $\alpha/\beta$
13. I $\kappa$ B $\alpha$
14. p65

(Santa cruz Biotechnology Inc, CA, USA)

**(9) 細胞轉染法 (cell transfection)**

1. Lipofectamine 2000  
(Invitrogen Corporation, California, USA)
2. Luciferase assay kit  
(Promega, WI, USA)

**(10) 其他藥品 (others)**

1. Tris
2. Tris-HCl
3. SDS
4. Glycerol
5.  $\beta$ -mecaptoethanol
6. Bromophenol blue
7. NaCl
8. EDTA
9. HCl

(Amresco Inc, Ohio, USA)



10. Ipriflavone

11. Formononetin

12. Genistein

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

## 二、實驗方法

### (1) 細胞培養

老鼠巨噬細胞株為一種附著形細胞，培養在 DMEM 培養液中。先將 DMEM 泡製後，加入 3.7 克的碳酸氫鈉 (sodium bicarbonate) 並以 1 N 鹽酸 (HCl) 將 pH 調整至 7.4，以 0.22  $\mu\text{m}$  之過濾器 (filter) 過濾，並加入 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum)，100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  盤尼西林/鏈黴素 (P/S) 後，即可使用。RAW264.7 細胞培養在培養箱 (incubator) 內，環境為 37  $^{\circ}\text{C}$ ，5 %  $\text{CO}_2$ ，約 2~3 天繼代培養一次。

類造骨細胞株，為一種附著形細胞，培養在 DMEM 培養液中。先將 DMEM 泡製後，加入 3.7 克的碳酸氫鈉並以 1 N 鹽酸將 pH 調整至 7.2，以 0.22  $\mu\text{m}$  之過濾器過濾，並加入 10 % 胎牛血清，100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  盤尼西林/鏈黴素後，即可使用。MG-63 細胞培養在培養箱內，環境為 37  $^{\circ}\text{C}$ ，5 %  $\text{CO}_2$ ，約 3~4 天繼代培養一次。

老鼠造骨細胞株細胞為一種附著形細胞，培養在  $\alpha$ -MEM 培養液中，培養液泡製後，加入 2 克的碳酸氫鈉並以 1 N 鹽酸將 pH 調整至 7.2，以

0.22  $\mu\text{m}$  之過濾器過濾，並加入 10 % 胎牛血清，100  $\mu\text{g/ml}$  盤尼西林/鏈黴素後，即可使用。MC3T3-E1 細胞培養在培養箱內，環境為 37  $^{\circ}\text{C}$ ，5 %  $\text{CO}_2$ ，約 3~4 天繼代培養一次。

解凍細胞：首先，取 9 毫升新鮮的細胞培養液，置於 10 公分細胞培養皿中備用。將細胞自液態氮桶取出，迅速放到 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴槽快速回溫，當細胞呈現半溶狀態時，把細胞移至無菌操作台內，將冷凍管中的細胞取出，放入 10 公分細胞培養皿中與 9 毫升新鮮的細胞培養液混合均勻，並在 5 %  $\text{CO}_2$  的 37  $^{\circ}\text{C}$  恆溫培養箱中培養。

細胞分盤：首先將培養皿中的舊細胞培養液吸出，加入 3 毫升的 phosphate buffered saline (PBS) (0.02 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.02 %  $\text{KCl}$ 、0.8 %  $\text{NaCl}$  及 0.216 %  $\text{NaHPO}_4$ ) 緩衝液沖洗兩次，再加入 1 毫升 trypsin (含 0.05 % trypsin、0.02 % EDTA)，為一種蛋白酶，能使細胞脫離培養皿底部，當 trypsin 覆蓋所有細胞後，置於 37  $^{\circ}\text{C}$  培養箱中作用 2~3 分鐘，待細胞脫離培養皿，可利用顯微鏡觀察細胞是否脫離培養皿，如尚未完全脫離，可以用手輕拍培養皿邊緣，以幫助細胞脫落。細胞脫落後，以 10 毫升含血清細胞培養液，將細胞懸浮液移至 15 毫升離心管中，於常溫離心 1500 rpm，5 分鐘後，將上清液移除，再加入適量細胞培養液，待均勻混合後，以  $2 \times 10^6$  個細胞/10 公分培養皿為培養密度種入培養皿中。

冷凍細胞：首先將細胞培養皿中舊的細胞培養液吸出，加入 3 毫升

的 PBS 緩衝液沖洗兩次，再加入 1 毫升 trypsin，當 trypsin 覆蓋所有細胞後，置於 37 °C 培養箱中作用 2~3 分鐘，並用手輕拍培養皿幫助細胞脫落，待細胞脫落後，加入含 10 % 血清細胞培養液抑制 trypsin 活性，混合後將細胞吸出，移至 15 毫升離心管中，於常溫離心 1500 rpm，5 分鐘後，將上清液移除，用手打散細胞後，加入冷凍細胞液 (10 % DMSO) 混合均勻，將細胞移至冷凍管中，放入漸凍盒內並移至零下 80 °C 冷凍，最後將冷凍管移至液態氮桶內。

## (2) 蝕骨細胞分化實驗

細胞種入 24 孔盤中，加入 RANKL 及待測藥物，3 天後，吸出舊的細胞培養液，加入新的培養液，並加入 RANKL 和待測藥物，兩天後，利用 TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) 染細胞。若形成蝕骨細胞及可被染成紅紫色。首先，利用 3.7% 福馬林固定細胞 10 分鐘，加入 Fast GBC solution、sodium nitrite solution、naphthol AS-BI phosphate solution、acetate solution 及 tartrate solution 後，於 37 °C 培養箱中培養 1 小時。利用顯微鏡觀察，TRAP-positive 中，大於 3 個核以上的細胞為蝕骨細胞。

## (3) MTT 分析法

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromide)，本身是一個水溶性 tetrazolium salt，呈現黃色。由於活細胞粒線體的脫氧酵

素 (dehydrogenase) 會還原使它變成不溶性的紫色 formazan。利用溶劑 DMSO (dimethylsulfoxide) 可以把它溶解，而溶解後的物質經由 ELISA reader 讀出吸光值藉以得知細胞活性，反應活細胞數目。

將細胞種入 96 孔盤中，加入待測試劑，培養 48 小時後，將細胞培養液移除，加入 5 mg/ml 的 MTT 原液 50  $\mu$ l，放入 37  $^{\circ}$ C 培養箱中 1 小時後，將 MTT 原液移除，加入 150  $\mu$ l 的 DMSO。待 formazan 溶解後，以 ELISA reader 波長 570 nm 讀取吸光值。

#### (4) 流式細胞技術分析 (flow cytometric analysis)

細胞分盤於六孔盤內，加入待測藥品，24 小時後，用 PBS 清洗，以 trypsin 將細胞打起分離。離心 3000 rpm，5 分鐘後，再以 PBS 清洗，離心 3000 rpm，5 分鐘。利用 3% 福馬林固定細胞，放入 4  $^{\circ}$ C 冰箱 1 天後，以 PBS 清洗，並加入  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin 抗體 (1:100) 反應一個小時。離心 3000 rpm，5 分鐘後，吸出上清液，並加入 anti-rabbit secondary IgG (1:100) 反應一小時。再離心 3000 rpm，5 分鐘後，吸出上清液，加入 PBS 移至流式細胞儀測量管。接著利用流式細胞儀後，以 FACSCalibur and Cellquest software 來分析。

#### (5) 細胞轉染法

利用 lipofectamine 2000 轉染法，各組分別取適量之 DNA 質體，(總

質體量約為 1  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) 於 1.5 ml 離心管中，加入 50  $\mu\text{l}$  之 serum-free DMEM；另外準備各組含有 2  $\mu\text{g}/\text{well}$  的 lipofectamine 2000 於 50  $\mu\text{l}$  之 serum-free DMEM 中，靜置 5 分鐘；取 50  $\mu\text{l}$  lipofectamine 2000 serum-free DMEM 混合溶液，加入含有 DNA 質體之 serum-free DMEM 中，均勻混合並靜置 30 分鐘。將 6 孔盤中原有的培養液吸出，並以 PBS 清洗後，加入 900  $\mu\text{l}$  serum-free DMEM。接著加入 100  $\mu\text{l}$  之 lipofectamine 2000/DNA 質體混合溶液加入後，輕輕搖晃培養盤使其溶液均勻分佈，在 37  $^{\circ}\text{C}$  恆溫培養箱培養 16~24 小時。

#### (6) 冷光酵素 (luciferase) 活性測定

將已經轉染過的細胞吸出培養液，以 PBS 清洗，吸出 PBS 後，加入 80  $\mu\text{l}$  之 reporter lysis buffer，輕輕把細胞刮取置 1.5 ml 離心管，放置冰上反應 10 分鐘，使細胞完全被打破並將蛋白質釋出。再將離心管以 13200 rpm，離心 3 分鐘後，取出 20  $\mu\text{l}$  的上清液，並加入 80  $\mu\text{l}$  的 luciferase substrate 迅速均勻混合，以冷光儀測定其 luciferase 活性，將得到之冷光產量讀值，以百分率換算表示。

#### (7) 西方點墨法

西方點墨法的基本原理為，利用抗原抗體免疫反應的方式，可以用在測定某種特定的蛋白質，樣本混合物先經過 polyacrylamide 電泳分離，

再轉印到硝酸纖維膜上，接著以標記的抗體結合。

蝕骨細胞加入異丙黃酮衍生物，30 分鐘後，加入 RNAKL，1 小時後抽掉培養液，以 PBS 清洗抽掉，加入 RIPA buffer 120  $\mu$ l 將細胞溶解，放冰上 10 分鐘後，以刮勺取下移置 1.5 ml 微量試管中，在冰上反應 30 分鐘，以 13200 rpm 離心 4  $^{\circ}$ C 10 分鐘，取出上清液，移置新的 1.5 ml 微量試管中，取 10  $\mu$ l 之二次水 (依序稀釋)，在加入 200  $\mu$ l 測定試劑反應液 [protein assay reagent A + reagentB (50 : 1)]。置於 37  $^{\circ}$ C 烘箱作用 30 分鐘後，以分光光度計波長 570 nm 測定數值。在經由蛋白標準液濃度換算樣本核蛋白質濃度。以 30  $\mu$ g 等量蛋白質加入 5 倍 sample buffer，以電動乾浴槽加熱 5 分鐘後，將蛋白質放置冰上 5 分鐘後注入於 10 % SDS-PAGE 中分離蛋白質 (100 伏特電壓進行電泳 1 小時)，分離完後將膠體取出與轉印紙 (polyvinylidene fluoride membrane ; PVDF membrane) 齊放，接著於轉置槽中注滿 transfer buffer 後，將電流以 4  $^{\circ}$ C 400 毫安培轉印 2 小時，轉印紙至入含 5 % 脫脂奶粉之 TBS-T 配成 blocking buffer 15 ml 於室溫搖 1 小時，再以 TBS-T 稀釋的一級抗體 10 ml 於 4  $^{\circ}$ C 搖 1 小時或一天 (overnight) 後，以 TBS-T 清洗 3 次，每次 10 分鐘，接著再以 TBS-T 稀釋之二級抗體 10 ml 於室溫搖 1 小時，同樣以 TBS-T 清洗 3 次，每次 10 分鐘，之後加入 enhanced chemiluminescence (ECL) 顯像：取 ECL A/B 溶液各 1 ml 混合均勻後，再均勻加於轉印紙上，將轉印紙放入底片夾，

以感光底片感光至 band 出現。

### (8) 即時聚合酶鏈鎖反應

原理：在進行 PCR 時同步偵測 PCR 產物隨著反應增加的狀況 (即為 real-time)，利用所偵測到的產物回推樣品中原始基因表現量。real-time PCR 可分為兩大方式，TaqMan 及 SYBR GreenER™。本研究使用相對定量 SYBR GreenER™ 的原理。首先設計一個 primer，primer 的設計在我們想探討的 DNA 序列中，可用來與單股 DNA 黏合。

在六孔盤中加入 500  $\mu$ l TRIzol，搖晃均勻，待細胞完全溶解，吸至 1.5 ml 微量離心管中，室溫靜置 5 分鐘。在加入 100  $\mu$ l 氯仿 (chloroform) 劇烈震盪 1 分鐘，並在室溫靜置 3 分鐘。將微量離心管在 4 °C 11000 rpm 離心 15 分鐘。此時將上清液吸至新的 1.5 ml 微量離心管，加入 500  $\mu$ l 的 isopropanol，並溫和混合，在室溫靜置 10 分鐘，並以 4 °C 11000 rpm 離心 10 分鐘。可看見 RNA pellet 沉澱在微量離心管底部，小心將上清液倒掉並加入 1 ml 的 75 °C 過濾酒精，輕晃幾下後再以 4 °C 7500 rpm 離心 5 分鐘。最後小心倒掉酒精，將微量離心管倒蓋，室溫下風乾，並加入 10~30  $\mu$ l DEPC 水回溶 RNA，儲存於 -80 °C 冰箱中。將萃取出來的 RNA 取 1  $\mu$ l 加上 99  $\mu$ l DEPC 水後，利用 Beckman DU-800 UV/Visible spectrophotometer 測量 RNA 濃度，並注意 A260/280 介於 1.8~2.0 之間，確保 RNA 純度極品質。



使用 MMLV kit 將 RNA 轉成 cDNA：

1. 在微量離心管中加入：

dNTP (1  $\mu$ l)、Oligo dT (1  $\mu$ l)、RNA (2  $\mu$ g)，再以 DEPC 水補至 12  $\mu$ l。放入 PCR 機器 65 °C 5 分鐘，使 RNA denature 後，4 °C 1 分鐘。

2. 每管再加入 5X first-strand buffer (4  $\mu$ l)、0.1M DTT (2  $\mu$ l)。放入 PCR 機器 37 °C 2 分鐘。

3. 接著每管加入 MMLV (1  $\mu$ l)，放入 PCR 機器 37 °C 50 分鐘，70 °C 15 分鐘，即為 cDNA。

將轉置完成 cDNA 取 1  $\mu$ l，加入 primer (R) 及 primer (F) 各 0.5  $\mu$ l，及 5  $\mu$ l 2X supermix，再加入 13  $\mu$ l DEPC 水。將樣本放置 Applied Biosystem StepOne 進行 95 °C 10 分鐘後，以 95 °C 15 秒，60 °C 1 分鐘，做共 40 個循環。所得到之相對值，便為我們所求與控制組相差倍數。

Primer 序列為：

| <b>Human</b>    |                                |
|-----------------|--------------------------------|
| Human ALP (F)   | CCA CGT CTT CACA TTT GGTG      |
| Human ALP (R)   | AGA CTG CGC CTG GTT AGT TGT    |
| Human BMP-2 (F) | GGC ATC CTC TCC ACA AAA GA     |
| Human BMP-2 (R) | ACG TCT GAA CAA TGG CAT GA     |
| Human OC (F)    | GTG CAG AGT CCA GCA AAG GT     |
| Human OC (R)    | TCA GCC AAC TCG TCA CAG TC     |
| Human OPN (F)   | CTC CAT TGA CTC GAA CGA CTC    |
| Human OPN (R)   | CAG GTC TGC GAA ACT TCT TAG AT |
| Human GAPDH (F) | TGA ACG GGAGC TCA CTG G        |
| Human GAPDH (R) | TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA     |
| <b>Mouse</b>    |                                |

|                 |                                 |
|-----------------|---------------------------------|
| Mouse ALP (F)   | CAC GGG AGG GTC CTG TAC TA      |
| Mouse ALP (R)   | GGA GGA AGG GAA GAA TCC AG      |
| Mouse BMP-2 (F) | AGC AAG GAC GTC GTG GTG CC      |
| Mouse BMP-2 (R) | ATT ATT TCG GTG CTC GAA ACT ACT |
| Mouse OC (F)    | TGA CCT CAC AGA TCC CAA GCC     |
| Mouse OC (R)    | ATA CCG TAG ATG CGT TTG TAG GC  |
| Mouse OPN (F)   | AGC AAG AAA CTC TTC CAA GCAA    |
| Mouse OPN (R)   | GTG AGA TTC GTC AGA TTC ATC CG  |
| Mouse GAPDH (F) | CCA CCC AGA AGA CTG TGG AT      |
| Mouse GAPDH (R) | CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC      |

**Table. 3 primer sequence**

### (8) DNA 與蛋白結合能力分析法

加藥處理細胞後，使用核質分離 kit 組進行細胞核/質分離實驗。

Nuclear extract 核蛋白抽取：將 6 公分培養皿中舊的培養液吸出，以 PBS 清洗一次，再加入 500  $\mu$ l PBS 刮下細胞並收集於 1.5 ml 微量離心管中，以 3000 rpm 離心 5 分鐘，把上層 PBS 抽乾淨，將加入 200  $\mu$ l 冰冷的 CER I 到所收集的 pellet 中，並 vortex 15 秒鐘，於冰中靜置 10 分鐘，接著加入 11  $\mu$ l 冰冷的 CER II 後 vortex 5 秒鐘，於冰中靜置 1 分鐘，接著 vortex 5 秒鐘後，以 13200 rpm 冷凍離心 5 分鐘，棄上清液部分 (細胞質的部分)。加入 100  $\mu$ l 冰冷的 NER 於所剩的 pellet 中，強烈 vortex 15 秒鐘後置於冰上 45 分鐘，其中每 15 分鐘 vortex 15 秒一次，最後以 13200 rpm 離心 10 分鐘，並收集上清液 (細胞核的部分)。於 -80  $^{\circ}$ C 冷凍，待使用時取出。測量蛋白質濃度，以 96 孔平底盤加入 10  $\mu$ l 蛋白質標準液，或細胞質/細胞核等蛋白質樣本，加入 10  $\mu$ l 之二次水 (序列稀釋)，再加入測

定試劑反應液。置於 37 °C 烘箱中作用 30 分鐘，以分光光度儀測定波長 570 nm 數值。再經由蛋白質標準液濃度換算樣本核蛋白質之濃度。以細胞質檢測蛋白方式測量後，便可進行 EMSA 實驗。

EMSA 實驗：首先配製膠，以 100 伏特跑 30 分鐘電泳，讓膠中的雜質跑到底下，接著加入樣本以 100 伏特跑膠 30~50 分鐘。將膠放置於 2 張濾紙上 (先以 0.5 倍 TBE buffer 浸泡 1 分鐘)，覆同樣大小之 PVDF 膜 (先以 methanol 浸泡 1 分鐘後，再以 0.5 TBE buffer 浸泡 10 分鐘)，用玻璃棒桿趕走氣泡，放置於乾淨的轉置槽內，放入含新鮮未使用過的 transfer buffer 後，將電流以 400 毫安培 4 °C 轉印 30 分鐘，將膠上的 DNA-protein complex 轉置到 PVDF 膜上。將 PVDF 以 UV 燈照射 1200 mJ，15 分鐘，此作用是將 DNA 固定 cross-link 在 PVDF 膜上。將膜泡在 20 ml blocking buffer 加入 66.7 µl stabilized streptavidin HRP 於室溫下搖晃，再以 washing buffer 於室溫下清洗 4 次，每次 5 分鐘，接著以呈色緩衝液 (equilibration buffer) 平衡 5 分鐘，之後加入 ECL 顯像。

#### **(9) 卵巢切除術誘導骨質疏鬆法 (ovariectomy-induced osteoporosis)**

本研究使用母 BALB/c 小鼠 (4 週；22~28 克)，小鼠以 trichloroacetaldehyde (100 mg/kg) 麻醉中進行手術，控制組 (sham) 只進行剖復並縫合，不切除卵巢。

首先，消毒腹部並麻醉，接著切開腹部，沿著脂肪組織尋找卵巢，

拉出輸卵管後，位於輸卵管末端為卵巢。在卵巢下端用線綁住以免流血，接著切除卵巢，把輸卵管放回腹部，並找出另一邊卵巢後切除，縫合腹部，待小鼠甦醒，便完成卵巢切除術 (Tsai et al., 2008)。利用i.p.每兩天給藥一次，共給3週。之後利用dual-energy Xray absorptiometer (DEXA) 測量BMD以及bone mineral content (BMC)。

### 三、Buffer composition

#### (1) Sample buffer (5X) :

7.81 ml stacking buffer (0.5 mM Tris-HCl, pH=6.8)

2.5 g SDS

14.36 ml glycerol

6.25 ml  $\beta$ -mecaptoethanol

2 mg bromophenol blu

加二次水至 50 ml

#### (2) SDS-PAGE

##### 5 % Stacking gel (5 ml) :

3.4 ml H<sub>2</sub>O

0.83 ml 30 % acrylamide mix

0.63 ml 1.0 M Tris (pH=6.8)

0.05 ml 10 % SDS

0.05 ml 10 % ammonium persulfate

0.005 ml TEMED

8 % Stacking gel (5 ml) :

11.5 ml H<sub>2</sub>O

6.7 ml 30 % acrylamide mix

6.3 ml 1.0 M Tris (pH=6.8)

0.025 ml 10 % SDS

0.025 ml 10 % ammonium persulfate

0.015 ml TEMED

12 % Stacking gel (5 ml) :

8.2 ml H<sub>2</sub>O

10 ml 30 % acrylamide mix

6.3 ml 1.0 M Tris (pH=6.8)

0.25 ml 10 % SDS

0.25 ml 10 % ammonium persulfate

0.01 ml TEMED

**(3) EMSA-6 % non-denaturing polyacrylamide gel**

21.5 ml H<sub>2</sub>O

6 ml 30 % acrylamide mix

3 ml 5X TBE

0.3 ml 10 % ammonium persulfate

0.015 ml TEMED

**(4) RIPA buffer**

1 ml lysis buffer

50 mM PMSF

50 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>



10  $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin

1 mM NaF

**(5) Running buffer (10X)**

30.2 g Tris-base

140 g Glycine

10 g SDS

加二次水至 1 L

**(6) Transfer buffer (10X)**

30 g Tris

144 g Glycine

加二次水至 1 L

**(7) Lysis buffer**

50 mM Tris pH7.5

150 mM NaCl

10 mM EDTA

1 % NP-40

0.25 % deoxycholate

**(8) TBS-T (20X)**

48.46 g Tris

0.5 M EDTA

58.44 g NaCl (pH=7.5)

加二次水至 1 L



#### 四、統計分析

本實驗結果以 sigmaplot 統計軟體進行分析。每個實驗均進行三次以上獨立試驗，實驗結果以  $\text{mean} \pm \text{S.E.}$  表示，以 student's  $t$  test 進行數據分析， $p < 0.05$  於統計上表示有顯著差異。



## 第四章 結果

### 一、異丙黃酮衍生物對於骨髓基質幹細胞及 RAW264.7 巨噬細胞的細胞存活率的影響

首先，為了確定異丙黃酮衍生物，對於骨髓基質幹細胞及 RAW264.7 巨噬細胞是否具有毒性，因此，在細胞中加入異丙黃酮衍生物 (5  $\mu$ M) 兩天後，我們利用 MTT 來測量細胞存活率。由實驗中發現，異丙黃酮衍生物，對於骨髓基質幹細胞或 RAW264.7 巨噬細胞的細胞存活率沒有影響 (Fig. 8A, B)。

### 二、異丙黃酮衍生物抑制蝕骨細胞形成

蝕骨細胞是專門的單核細胞/巨噬細胞家族的成員，由骨髓造血前趨物所分化而成 (bone marrow hematopoietic precursors)。我們由成年雄性 SD 鼠中取出長骨，並分離出骨髓基質幹細胞，種  $1 \times 10^6$  細胞於 24 孔盤中。在蝕骨細胞前驅物骨髓基質幹細胞中，給予 RANKL (50 ng/ml) 以及 M-CSF (20 ng/ml) 5 天，以誘導成熟的蝕骨細胞形成，而成熟的蝕骨細胞內有多核的特徵，因此我們可以利用 TRAP 去染核，大於 3 顆核為蝕骨細胞。

給予 RANKL 和 M-CSF 有顯著的蝕骨細胞生成，但是合併給予異丙黃酮衍生物，明顯抑制了蝕骨細胞的形成 (Fig. 9A)。Fig. 9B 為量化圖。



同樣的情況也在RAW264.7巨噬細胞中可以看到。在 $2 \times 10^4$ 顆RAW264.7巨噬細胞中，給予RANKL (50 ng/ml) 以及M-CSF (20 ng/ml)，或合併給予異丙黃酮衍生物，5天後可以看到蝕骨細胞的生成，但合併給予異丙黃酮衍生物，會抑制蝕骨細胞的形成 (Fig. 9C)。

因為成熟的蝕骨細胞中，含有 $\alpha\beta$  integrin (Nesbitt et al., 1993)，所以我們可以測量 $\alpha\beta$ 當作蝕骨細胞成熟的標記。在RAW264.7巨噬細胞中，給予RANKL (50 ng/ml) 以及M-CSF (20 ng/ml)，或合併給予異丙黃酮衍生物，5天後，利用流式細胞儀測量 $\alpha\beta$ 表現量。給予RANKL以及M-CSF，顯著增加 $\alpha\beta$ 表現量。相較於RANKL，合併給予異丙黃酮衍生物，明顯減少 $\alpha\beta$ 表現量 (Fig. 9D)。

由以上的實驗結果顯示，異丙黃酮衍生物，可以抑制蝕骨細胞的形成。

### 三、異丙黃酮衍生物抑制 RANKL 所誘導的 ERK、p38 以及 JNK 活性

MAPKs (mitogen-activated protein kinase) 包含3個成員，ERK、p38以及JNK，有研究指出，它們和RANKL所調控的蝕骨細胞形成有關 (Tsai et al., 2008)。為了解釋異丙黃酮衍生物的訊息傳遞路徑，我們利用西方點墨法測量MAPKs的活性。

在RAW264.7巨噬細胞中，給予或不給JFL-142 (0.3  $\mu$ M) 及JFL-144 (0.3 $\mu$ M)，30分鐘後，給予RANKL (50 ng/ml)，60分鐘後，收集細胞，並

利用 phospho-ERK 抗體、phospho-p38 抗體及 phospho-JNK 抗體做免疫點墨。我們發現 RANKL 會顯著增加 ERK、p38 及 JNK 磷酸化，但合併給予異丙黃酮衍生物，抑制了 RANKL 所誘導增加的 ERK、p38 及 JNK 活性 (Fig. 10)。

#### 四、異丙黃酮衍生物抑制 RANKL 所誘導的 NF- $\kappa$ B 活性

除了 MAPKs 之外，轉錄因子 NF- $\kappa$ B 也參與蝕骨細胞分化作用之中 (Bossard et al., 1999)，所以我們利用西方點墨法以及 DNA 與蛋白結合能力分析法，測量 NF- $\kappa$ B 活性。

在 RAW264.7 巨噬細胞中，給予或不給 JFL-142 (0.3  $\mu$ M) 及 JFL-144 (0.3  $\mu$ M)，30 分鐘後，給予 RANKL (50 ng/ml)，60 分鐘後，收集細胞，並利用 phospho-IKK $\alpha$ / $\beta$  抗體、phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  抗體及 phospho-p65<sup>Ser536</sup> 抗體做免疫點墨。我們發現 RANKL 會顯著增加 IKK $\alpha$ / $\beta$ 、I $\kappa$ B $\alpha$  及 p65<sup>Ser536</sup> 磷酸化，但合併給予異丙黃酮衍生物，抑制了 RANKL 所誘導增加的 IKK $\alpha$ / $\beta$ 、I $\kappa$ B $\alpha$  及 p65<sup>Ser536</sup> 活性 (Fig. 11A)。

接著，在 RAW264.7 巨噬細胞中，給予或不給 JFL-142 (0.3  $\mu$ M) 及 JFL-144 (0.3  $\mu$ M)，30 分鐘後，給予 RANKL (50 ng/ml)，120 分鐘後，收集細胞，並利用 EMSA 測量 DNA 與蛋白結合能力。我們發現 RANKL 會顯著增加 NF- $\kappa$ B 活性，但合併給予異丙黃酮衍生物，抑制了 RANKL 所誘導增加的 NF- $\kappa$ B 活性 (Fig. 11B)。

## 五、異丙黃酮衍生物抑制 RANKL 所誘導的 NF- $\kappa$ B 活性

為了進一步證實 NF- $\kappa$ B 活性，參與異丙黃酮衍生物的作用中，所以我們利用  $\kappa$ B 冷光酵素活性測定，測量 NF- $\kappa$ B 活性。

在 RAW264.7 巨噬細胞中，轉染  $\kappa$ B promoter-luciferase，1 天後，給予或不給異丙黃酮衍生物，30 分鐘後，給予 RANKL (50 ng/ml) 24 小時，收集細胞，並以冷光測定儀測量。我們發現，給予 RANKL 顯著增加 NF- $\kappa$ B 活性，相較於 RANKL，合併給予異丙黃酮衍生物，明顯抑制了 RANKL 所誘導增加的 NF- $\kappa$ B 活性 (Fig. 12)。

這些結果顯示，ERK、p38、JNK 以及 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞路徑，是異丙黃酮衍生物減少巨噬細胞分化形成蝕骨細胞的必要路徑。

## 六、異丙黃酮衍生物對於造骨細胞的細胞存活率之影響

從前面的實驗得知，異丙黃酮衍生物對於蝕骨細胞的形成有抑制作用，接著想要知道異丙黃酮衍生物，是否對於造骨細胞有影響，所以做以下的測試。

首先，為了確定異丙黃酮衍生物，對於造骨細胞是沒有毒性的，因此，在 MG-63 cells 及 3T3 cells 中給予異丙黃酮衍生物 (5  $\mu$ M) 2 天後，我們利用 MTT 來測量細胞存活率。由實驗中發現，異丙黃酮衍生物，對於 MG-63 cells 或 3T3 cells 的細胞存活率是沒有影響的 (Fig. 13)。

## 七、異丙黃酮衍生物些許影響造骨細胞的分化作用 (ALP)

因為前造骨細胞分化為成熟造骨細胞時，會分泌一些因子，例如，ALP、BMP-2、OC以及OPN，因此我們可以測量這些因子，當作造骨細胞分化成熟的標記 (Lee et al., 1999)。

在MG-63細胞中，加入異丙黃酮衍生物24小時後，利用即時聚合酶鏈鎖反應測量ALP活性。我們發現異丙黃酮衍生物，對於MG-63細胞中，ALP活性沒有影響 (Fig. 14A)。

在3T3細胞中，加入異丙黃酮衍生物24小時後，利用即時聚合酶鏈鎖反應測量ALP活性。我們發現異丙黃酮衍生物，對於3T3細胞中，ALP活性有些許增加 (Fig. 14B)。

## 八、異丙黃酮衍生物些許影響造骨細胞的分化作用 (BMP-2)

在MG-63細胞中，加入異丙黃酮衍生物24小時後，利用即時聚合酶鏈鎖反應測量BMP-2活性。我們發現異丙黃酮衍生物，對於MG-63細胞中，BMP-2活性有些許增加 (Fig. 15A)。

在3T3細胞中，加入異丙黃酮衍生物24小時後，利用即時聚合酶鏈鎖反應測量BMP-2活性。我們發現異丙黃酮衍生物，對於3T3細胞中，BMP-2活性有稍微增加 (Fig. 15B)。

## 九、異丙黃酮衍生物些許影響造骨細胞的分化作用 (OC)

在MG-63細胞中，加入異丙黃酮衍生物24小時後，利用即時聚合酶鏈鎖反應測量OC活性。我們發現異丙黃酮衍生物，對於MG-63細胞中，OC活性有些許增加 (Fig. 16A)。

在3T3細胞中，加入異丙黃酮衍生物24小時後，利用即時聚合酶鏈鎖反應測量OC活性。我們發現異丙黃酮衍生物，對於3T3細胞中，OC活性有稍微增加 (Fig. 16B)。

#### 十、異丙黃酮衍生物些許影響造骨細胞的分化作用 (OPN)

在MG-63細胞中，加入異丙黃酮衍生物24小時後，利用即時聚合酶鏈鎖反應測量OPN活性。我們發現異丙黃酮衍生物，對於MG-63細胞中，OPN活性沒有影響 (Fig. 17A)。

在3T3細胞中，加入異丙黃酮衍生物24小時後，利用即時聚合酶鏈鎖反應測量OPN活性。我們發現異丙黃酮衍生物，對於3T3細胞中，OPN活性有稍微增加 (Fig. 17B)。

因此，我們由以上4個造骨細胞分化成熟的標記可以知道，異丙黃酮衍生物稍微影響造骨細胞的分化作用。

#### 十一、在卵巢切除鼠中異丙黃酮衍生物能夠抑制骨質流失

在*in vitro*實驗中，我們已得知異丙黃酮衍生物，會抑制蝕骨細胞的形成，再來我們想要知道，在*in vivo*實驗中，是否也能夠得到相同結果。

因此我們利用雌性BALB/c小鼠，做卵巢切除手術，分成5組，開刀不切除卵巢、切除卵巢 (ovariectomized)、以及切除卵巢後給予ipriflavone、JFL-142或JFL-144 (100  $\mu$ g/kg)，給藥組利用腹部注射 (i.p.) 的方式，每2天給藥一次，共給3週。之後利用DEXA測量BMC以及BMD。

我們發現，切除卵巢組相較於開刀不切除卵巢，顯著較低的BMC值，而相較於切除卵巢組，給予ipriflavone、JFL-142或JFL-144，有顯著增加的BMC值 (Fig. 18A)。

而且，切除卵巢組相較於開刀不切除卵巢，也有顯著較低的BMD值，而相較於切除卵巢組，給予ipriflavone、JFL-142或JFL-144，有顯著增加的BMD值 (Fig. 18B)。

因此我們得到和*in vitro*實驗相同的結果。



## 第五章 討論

骨質流失是相關於老化、關節炎、癌症以及慢性發炎疾病的主要問題之一，若要製造出新的藥品抑制骨質流失，那麼就需要注意，安全、有效、負擔得起，這幾個要點是重要的 (Sung et al., 2009)。異丙黃酮是由苜蓿分離出來的天然異黃酮衍生物，並曾有研究指出，異丙黃酮具有抗發炎的活性。而異丙黃酮已在市面上可以看得到，但是它必須時常服用，並有些許的副作用。由先前研究指出，異丙黃酮無法預防骨質流失 (Alexandersen et al., 2001)。所以我們合成了新的異丙黃酮衍生物，研究是否能夠有更好的療效。因此，本篇的研究目的就是想要探討，異丙黃酮衍生物對於RANKL誘導蝕骨細胞形成的影響。而我們由骨髓基質幹細胞以及巨噬細胞中發現，異丙黃酮衍生物能夠抑制蝕骨細胞的形成。而RANKL所誘導的ERK、p38、JNK以及NF- $\kappa$ B活性，也會被異丙黃酮衍生物抑制。異丙黃酮衍生物也能夠預防卵巢切除所誘發的骨質流失現象。

為了評估異丙黃酮衍生物對於蝕骨細胞形成的影響，我們利用健康大鼠，骨髓基質幹細胞培養系統，以及巨噬細胞 *in vitro* 給予RANKL/M-CSF刺激產生蝕骨細胞。我們的結果顯示，異丙黃酮衍生物能夠抑制蝕骨細胞分化。

MAPK家族成員是脯氨酸 (proline) 管理的絲氨酸 (serine)/ 羥丁氨

酸 (threonine) 激酶，它在細胞生長、分化以及細胞凋亡，扮演著很重要的角色 (Hirai et al., 1983)。有些外在的刺激會活化羥丁氨酸及酪氨酸 (tyrosine) 的磷酸化。而MAPK家族成員包括ERK、p38以及JNK (Berg et al., 2003; Ducy et al., 2000)。而且有一些研究指出RANKL/RANK結合會引起ERK、p38以及JNK的磷酸化，而這些磷酸化會導致蝕骨細胞的分化(Berg et al., 2003; Ducy et al., 2000; Yasuda et al., 1998)。在本篇研究，我們利用同質繁殖族群的RAW264.7細胞，證明異丙黃酮衍生物對於前趨蝕骨細胞訊息傳遞的影響。我們發現，在給予RANKL刺激的RAW264.7細胞中，異丙黃酮衍生物顯著地抑制ERK、p38及JNK的磷酸化。由此結果顯示，異丙黃酮衍生物抑制蝕骨細胞分化成熟可能是因為調控了ERK、p38以及JNK磷酸化所致。此外，老鼠的骨髓基質幹細胞給予RANKL和M-CSF培養7天，異丙黃酮衍生物顯著地減少蝕骨細胞的形成。綜合以上結果，我們推斷此現象是因為異丙黃酮抑制RANK結合到RANKL，進而造成無法使ERK、p38及JNK的訊息傳導。

NF- $\kappa$ B在巨噬細胞中，扮演著極重要的角色，調控細胞週期、細胞附著、激素產生、細胞凋亡以及其它重要的細胞過程。蝕骨細胞形成以及其功能是由RANKL誘導NF- $\kappa$ B活性所調控的 (Bossard et al., 1999)。因此，如果抑制NF- $\kappa$ B活性，或許能夠影響蝕骨細胞活性，進而治療骨質疏鬆症。在本篇研究，我們證實異丙黃酮衍生物，在RAW 264.7細胞中，藉



由抑制IKK $\alpha/\beta$ 、I $\kappa$ B $\alpha$ 及p65的磷酸化，證明抑制RANKL所誘導的NF- $\kappa$ B活性。接著利用轉染 $\kappa$ B-luciferase當做指標，測量NF- $\kappa$ B活性，我們也發現RANKL所增加的NF- $\kappa$ B活性被異丙黃酮衍生物所抑制。由以上結果可以假設，異丙黃酮衍生物在巨噬細胞中，抑制NF- $\kappa$ B活性，進而造成蝕骨細胞形成以及其在吸收作用的活性被抑制。

骨頭是一個複雜的組織，由幾種類形的細胞組成，並且連續不斷的經歷更新以及修復過程。當骨的再吸收及形成不協調，且骨分解大於骨形成時，可能會造成骨質疏鬆症 (Tsai et al., 2008)。我們在本篇研究發現，異丙黃酮衍生物能夠預防，切除卵巢所誘導的骨質流失情形。因此，異丙黃酮衍生物或許是一個抗再吸收劑，能夠治療骨質疏鬆症。目前骨質疏鬆症用藥，包括雙磷酸鹽類、降鈣激素以及雌激素，這些都是抗再吸收的藥物，並藉由抑制蝕骨細胞功能來維持骨量 (Goltzman, 2002)。但是給予這些藥物對於增加或恢復骨量的影響相當小，每年不超過2% (Rodan and Martin, 2000)。所以製造出令人滿意的造骨劑是值得去研究的，例如teriparatide，它可以刺激新骨的形成，並修正小樑微架構的不平衡，且它是獨特作用於骨質疏鬆症。因為新骨生成主要功能是來自於造骨細胞，所以如果能夠增加造骨細胞的分化，就能夠增加骨形成作用 (Cobb and Goldsmith, 1995; Quinn et al., 1998)。在本篇研究，我們發現兩種造骨細胞株中，異丙黃酮衍生物，對於其分化指標的ALP、BMP-2、

OC以及OPN有稍微的影響。所以由以上結果可以知道，異丙黃酮衍生物有抗再吸收的作用，並且能夠稍微增加骨形成的活性。



## 第六章 結論

本篇研究，我們在骨髓基質幹細胞及巨噬細胞中，證明異丙黃酮衍生物能夠抑制蝕骨細胞形成。而異丙黃酮衍生物也抑制了RANKL所誘導的ERK、p38、JNK及NF- $\kappa$ B活性。因此，異丙黃酮衍生物或許對於減少蝕骨細胞形成及其活性，有個較好的影響，並在骨質疏鬆症治療中，能夠促進骨頭健康。



## 第七章 參考文獻

- (1991). Consensus development conference: prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 90, 107-110.
- Abul K. Abbas, Jon C. Aster M.D., Nelson Fausto M.D., Vinay Kumar. (2009). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition*, 8th ed.
- Adami, S., Bufalino, L., Cervetti, R., Di Marco, C., Di Munno, O., Fantasia, L., Isaia, G.C., Serni, U., Vecchiet, L., and Passeri, M. (1997). Ipriflavone prevents radial bone loss in postmenopausal women with low bone mass over 2 years. *Osteoporos Int* 7, 119-125.
- Agnusdei, D., Crepaldi, G., Isaia, G., Mazzuoli, G., Ortolani, S., Passeri, M., Bufalino, L., and Gennari, C. (1997). A double blind, placebo-controlled trial of ipriflavone for prevention of postmenopausal spinal bone loss. *Calcif Tissue Int* 61, 142-147.
- Agnusdei, D., Gennari, C., and Bufalino, L. (1995). Prevention of early postmenopausal bone loss using low doses of conjugated estrogens and the non-hormonal, bone-active drug ipriflavone. *Osteoporos Int* 5, 462-466.
- Agnusdei, D., Zacchei, F., Bigazzi, S., Cepollaro, C., Nardi, P., Montagnani, M., and Gennari, C. (1989). Metabolic and clinical effects of ipriflavone in established post-menopausal osteoporosis. *Drugs Exp Clin Res* 15, 97-104.
- Alexandersen, P., Toussaint, A., Christiansen, C., Devogelaer, J.P., Roux, C., Fechtenbaum, J., Gennari, C., and Reginster, J.Y. (2001). Ipriflavone in the treatment of postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. *JAMA* 285, 1482-1488.
- Arjmandi, B.H., Birnbaum, R.S., Juma, S., Barengolts, E., and Kukreja, S.C. (2000). The synthetic phytoestrogen, ipriflavone, and estrogen prevent bone loss by different mechanisms. *Calcif Tissue Int* 66, 61-65.
- Benvenuti, S., Tanini, A., Frediani, U., Bianchi, S., Masi, L., Casano, R., Bufalino, L., Serio, M., and Brandi, M.L. (1991). Effects of ipriflavone and its metabolites on a clonal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 6, 987-996.
- Berg, C., Neumeyer, K., and Kirkpatrick, P. (2003). Teriparatide. *Nat Rev Drug Discov* 2, 257-258.

- Bossard, M.J., Tomaszek, T.A., Levy, M.A., Ijames, C.F., Huddleston, M.J., Briand, J., Thompson, S., Halpert, S., Veber, D.F., Carr, S.A., *et al.* (1999). Mechanism of inhibition of cathepsin K by potent, selective 1, 5-diacylcarbohydrazides: a new class of mechanism-based inhibitors of thiol proteases. *Biochemistry* 38, 15893-15902.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S., and Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337-342.
- Chambers, T.J. (2010). The birth of the osteoclast. *Ann N Y Acad Sci* 1192, 19-26.
- Chellaiah, M., Fitzgerald, C., Alvarez, U., and Hruska, K. (1998). c-Src is required for stimulation of gelsolin-associated phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 273, 11908-11916.
- Civitelli, R. (1997). In vitro and in vivo effects of ipriflavone on bone formation and bone biomechanics. *Calcif Tissue Int* 61 Suppl 1, S12-14.
- Cobb, M.H., and Goldsmith, E.J. (1995). How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 270, 14843-14846.
- Darnay, B.G., Besse, A., Poblentz, A.T., Lamothe, B., and Jacoby, J.J. (2007). TRAFs in RANK signaling. *Adv Exp Med Biol* 597, 152-159.
- Darnay, B.G., Haridas, V., Ni, J., Moore, P.A., and Aggarwal, B.B. (1998). Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappab and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 273, 20551-20555.
- Denhardt, D.T., Burger, E.H., Kazanecki, C., Krishna, S., Semeins, C.M., and Klein-Nulend, J. (2001). Osteopontin-deficient bone cells are defective in their ability to produce NO in response to pulsatile fluid flow. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 448-453.
- Ducy, P., Schinke, T., and Karsenty, G. (2000). The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289, 1501-1504.
- Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil, I., Alobera-Gracia, M.A., del-Canto-Pingarron, M., and Blanco-Jerez, L. (2006). Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11, E151-157.
- Galibert, L., Tometsko, M.E., Anderson, D.M., Cosman, D., and Dougall, W.C. (1998). The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem* 273, 34120-34127.

- Gennari, C., Adami, S., Agnusdei, D., Bufalino, L., Cervetti, R., Crepaldi, G., Di Marco, C., Di Munno, O., Fantasia, L., Isaia, G.C., *et al.* (1997). Effect of chronic treatment with ipriflavone in postmenopausal women with low bone mass. *Calcif Tissue Int* 61 *Suppl 1*, S19-22.
- Gennari, C., Agnusdei, D., Crepaldi, G., Isaia, G., Mazzuoli, G., Ortolani, S., Bufalino, L., and Passeri, M. (1998). Effect of ipriflavone--a synthetic derivative of natural isoflavones--on bone mass loss in the early years after menopause. *Menopause* 5, 9-15.
- Goltzman, D. (2002). Discoveries, drugs and skeletal disorders. *Nat Rev Drug Discov* 1, 784-796.
- Gundberg, C.M. (2000). Biochemical markers of bone formation. *Clin Lab Med* 20, 489-501.
- Hirai, A., Terano, T., Hamazaki, T., Sajiki, J., Saito, H., Tahara, K., Tamura, Y., and Kumagai, A. (1983). Studies on the mechanism of antiaggregatory effect of Moutan Cortex. *Thromb Res* 31, 29-40.
- Ishijima, M., Tsuji, K., Rittling, S.R., Yamashita, T., Kurosawa, H., Denhardt, D.T., Nifuji, A., Ezura, Y., and Noda, M. (2007). Osteopontin is required for mechanical stress-dependent signals to bone marrow cells. *J Endocrinol* 193, 235-243.
- Ji, H.Y., Lee, H.W., Kim, Y.H., Jeong, D.W., and Lee, H.S. (2005). Simultaneous determination of piroxicam, meloxicam and tenoxicam in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 826, 214-219.
- Jimi, E., Akiyama, S., Tsurukai, T., Okahashi, N., Kobayashi, K., Udagawa, N., Nishihara, T., Takahashi, N., and Suda, T. (1999). Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol* 163, 434-442.
- Kanis, J.A., Melton, L.J., 3rd, Christiansen, C., Johnston, C.C., and Khaltsev, N. (1994). The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 9, 1137-1141.
- Kashiwada, M., Shirakata, Y., Inoue, J.I., Nakano, H., Okazaki, K., Okumura, K., Yamamoto, T., Nagaoka, H., and Takemori, T. (1998). Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity in CD40 signaling along a ras-independent pathway. *J Exp Med* 187, 237-244.
- Katakam, A.K., Chipitsyna, G., Gong, Q., Vancha, A.R., Gabbeta, J., and Arafat, H.A. (2005). Streptozotocin (STZ) mediates acute upregulation of serum and pancreatic osteopontin (OPN): a novel islet-protective

- effect of OPN through inhibition of STZ-induced nitric oxide production. *J Endocrinol* 187, 237-247.
- Kim, S.H., Lee, J.S., and Lee, M.G. (1997). Determination of a isoflavone derivative, ipriflavone, and its metabolites, M1 and M5, in rat plasma, urine, and tissue homogenate by high-performance liquid chromatography. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 98, 313-324.
- Kitahara, K., Ishijima, M., Rittling, S.R., Tsuji, K., Kurosawa, H., Nifuji, A., Denhardt, D.T., and Noda, M. (2003). Osteopontin deficiency induces parathyroid hormone enhancement of cortical bone formation. *Endocrinology* 144, 2132-2140.
- Lee, M.H., Javed, A., Kim, H.J., Shin, H.I., Gutierrez, S., Choi, J.Y., Rosen, V., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., Stein, G.S., *et al.* (1999). Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 73, 114-125.
- Lee, S.Y., Reichlin, A., Santana, A., Sokol, K.A., Nussenzweig, M.C., and Choi, Y. (1997). TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity* 7, 703-713.
- Lerner, U.H. (2000). Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biol* 19, 107-120.
- Mansky, K.C., Sankar, U., Han, J., and Ostrowski, M.C. (2002). Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF-kappa B ligand signaling. *J Biol Chem* 277, 11077-11083.
- Miyauchi, A., Notoya, K., Taketomi, S., Takagi, Y., Fujii, Y., Jinnai, K., Takahashi, K., Chihara, K., and Fujita, T. (1996). Novel ipriflavone receptors coupled to calcium influx regulate osteoclast differentiation and function. *Endocrinology* 137, 3544-3550.
- Nesbitt, S., Nesbit, A., Helfrich, M., and Horton, M. (1993). Biochemical characterization of human osteoclast integrins. Osteoclasts express alpha v beta 3, alpha 2 beta 1, and alpha v beta 1 integrins. *J Biol Chem* 268, 16737-16745.
- Nomura, S., and Takano-Yamamoto, T. (2000). Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol* 19, 91-96.
- Ohta, H., Komukai, S., Makita, K., Masuzawa, T., and Nozawa, S. (1999). Effects of 1-year ipriflavone treatment on lumbar bone mineral density

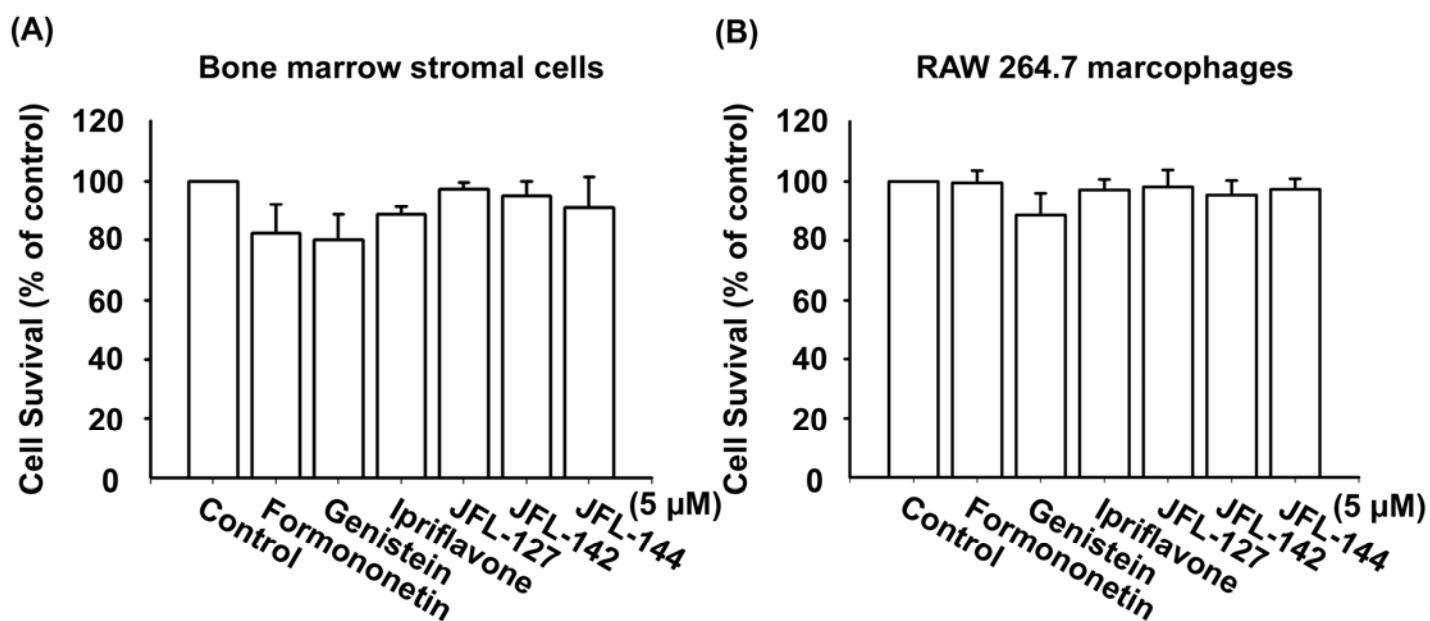
- and bone metabolic markers in postmenopausal women with low bone mass. *Horm Res* 51, 178-183.
- Parfitt, A.M. (2001). The bone remodeling compartment: a circulatory function for bone lining cells. *J Bone Miner Res* 16, 1583-1585.
- Quinn, J.M., Elliott, J., Gillespie, M.T., and Martin, T.J. (1998). A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* 139, 4424-4427.
- Reginster, J.Y. (1993). Ipriflavone: pharmacological properties and usefulness in postmenopausal osteoporosis. *Bone Miner* 23, 223-232.
- Rodan, G.A., and Martin, T.J. (2000). Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289, 1508-1514.
- Samee, M., Kasugai, S., Kondo, H., Ohya, K., Shimokawa, H., and Kuroda, S. (2008). Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) transfection to human periosteal cells enhances osteoblast differentiation and bone formation. *J Pharmacol Sci* 108, 18-31.
- Sikavitsas, V.I., Temenoff, J.S., and Mikos, A.G. (2001). Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials* 22, 2581-2593.
- Somjen, D. (2007). Vitamin D modulation of the activity of estrogenic compounds in bone cells in vitro and in vivo. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 17, 115-147.
- Sun, J.S., Tsuang, Y.H., Liao, C.J., Liu, H.C., Hang, Y.S., and Lin, F.H. (1997). The effects of calcium phosphate particles on the growth of osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 37, 324-334.
- Sung, B., Murakami, A., Oyajobi, B.O., and Aggarwal, B.B. (2009). Zerumbone abolishes RANKL-induced NF-kappaB activation, inhibits osteoclastogenesis, and suppresses human breast cancer-induced bone loss in athymic nude mice. *Cancer Res* 69, 1477-1484.
- Teitelbaum, S.L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504-1508.
- Tsai, H.Y., Lin, H.Y., Fong, Y.C., Wu, J.B., Chen, Y.F., Tsuzuki, M., and Tang, C.H. (2008). Paeonol inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by inhibiting ERK, p38 and NF-kappaB pathway. *Eur J Pharmacol* 588, 124-133.
- Tsuda, M., Kitazaki, T., Ito, T., and Fujita, T. (1986). The effect of ipriflavone (TC-80) on bone resorption in tissue culture. *J Bone Miner Res* 1, 207-211.



- Udagawa, N., Takahashi, N., Akatsu, T., Tanaka, H., Sasaki, T., Nishihara, T., Koga, T., Martin, T.J., and Suda, T. (1990). Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7260-7264.
- Urist, M.R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899.
- Ushiroyama, T., Okamura, S., Ikeda, A., and Ueki, M. (1995). Efficacy of ipriflavone and 1 alpha vitamin D therapy for the cessation of vertebral bone loss. *Int J Gynaecol Obstet* 48, 283-288.
- Vik, S.A., Maxwell, C.J., and Hanley, D.A. (2005). Treatment of osteoporosis in an older home care population. *BMC Musculoskelet Disord* 6, 7.
- Wang, Z.G., Hu, J., Zou, S.J., Li, J.H., Gao, Z.W., and Wang, D.Z. (2004). [Recombinant human BMP-2 accelerates bone formation of mandibular distraction osteogenesis in rabbits]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 22, 186-188.
- Yao, G.Q., Sun, B., Hammond, E.E., Spencer, E.N., Horowitz, M.C., Insogna, K.L., and Weir, E.C. (1998). The cell-surface form of colony-stimulating factor-1 is regulated by osteotropic agents and supports formation of multinucleated osteoclast-like cells. *J Biol Chem* 273, 4119-4128.
- Yao, J., Zhang, J., and Hou, J.F. (2007). Effects of ipriflavone on caged layer bone metabolism in vitro and in vivo. *Poult Sci* 86, 503-507.
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., *et al.* (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3597-3602.

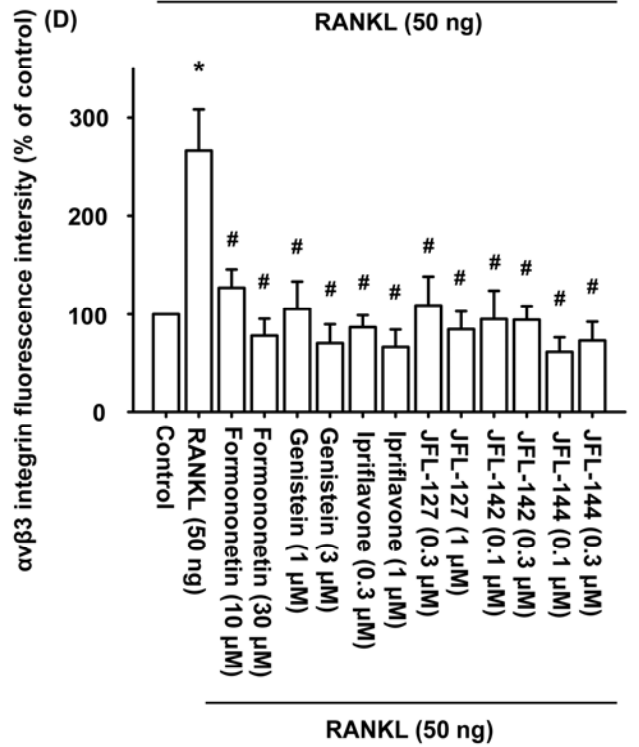
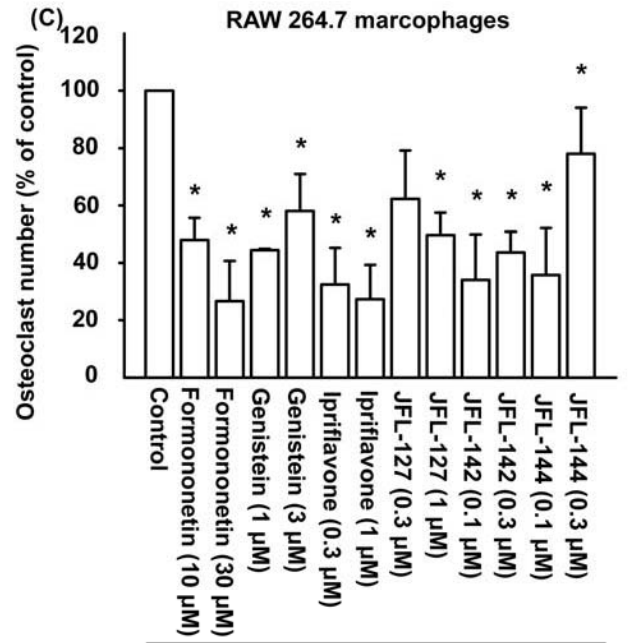
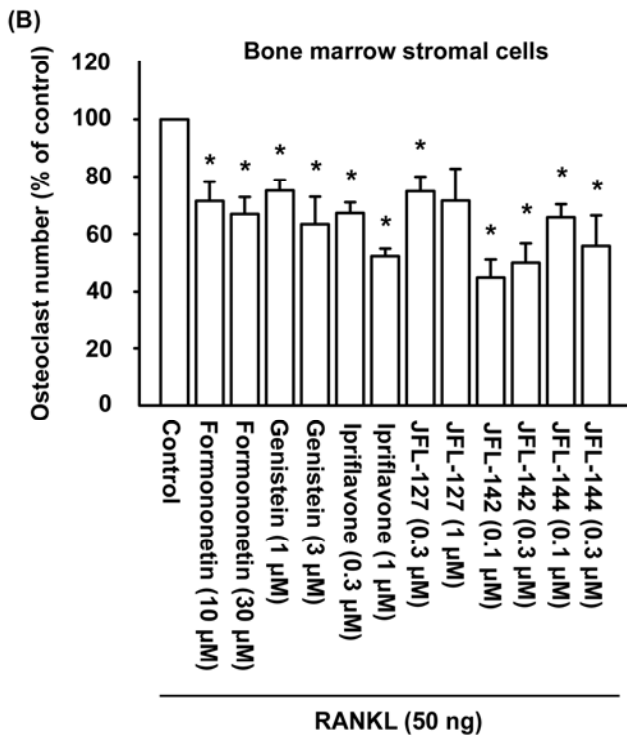
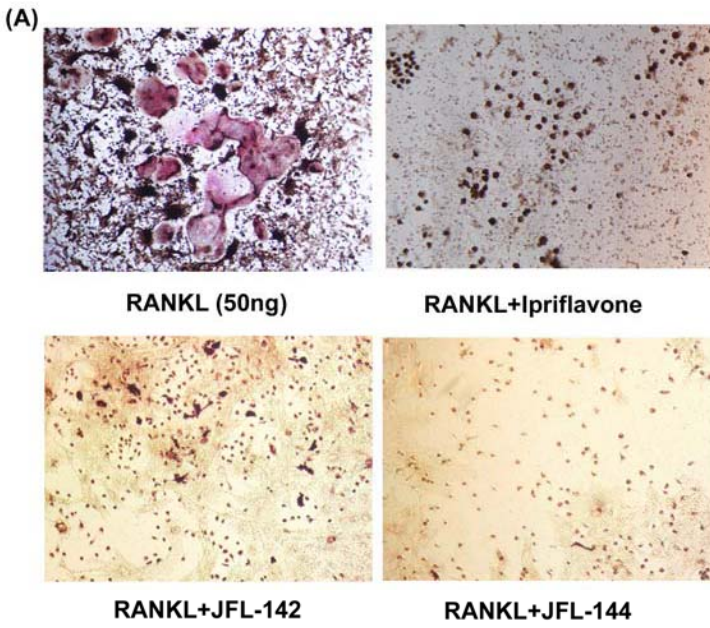
楊榮森 編譯，骨質疏鬆症，合記圖書出版社，台北，1997。

## 第八章 圖表與圖表說明



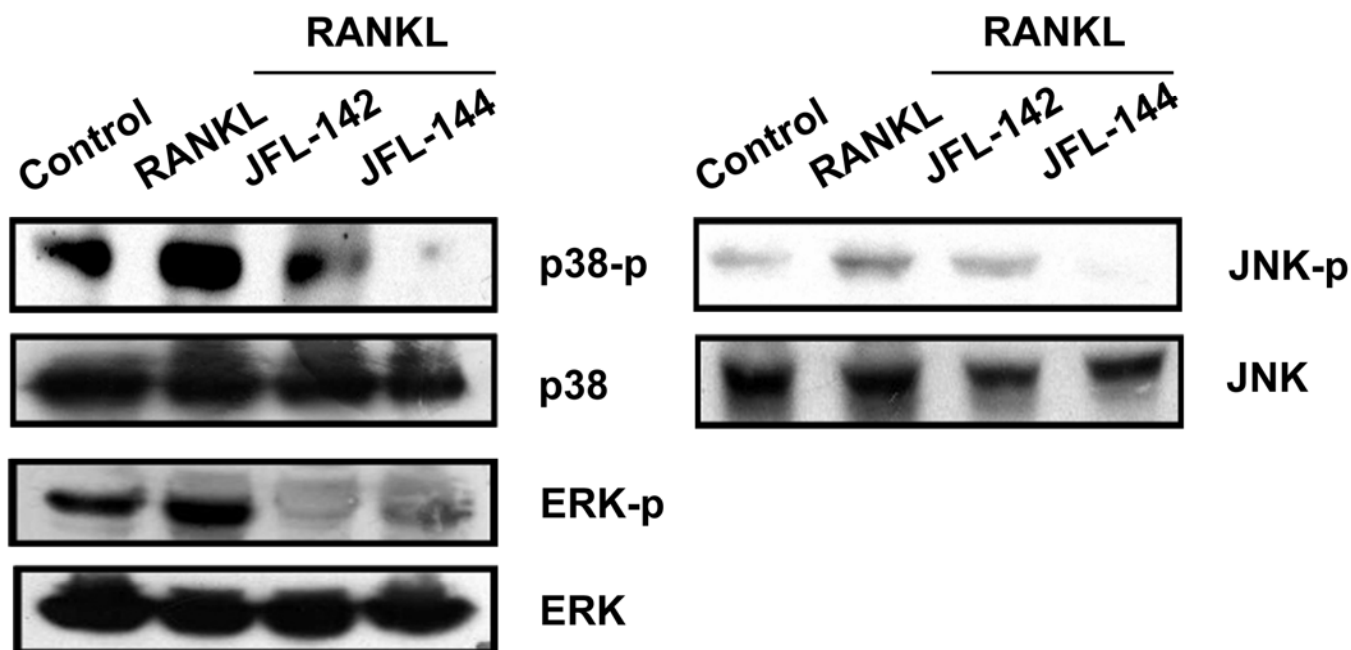
**Fig. 7 Ipriflavone analogues didn't affect cell viability.**

Bone marrow stromal cells or RAW264.7 cells were treated with ipriflavone analogues (5 μM) for 2 days and cell viability was evaluated by the MTT assay. Note that ipriflavone analogues did not affect the cell viability of bone marrow stromal cells and RAW264.7 cells (n=3).



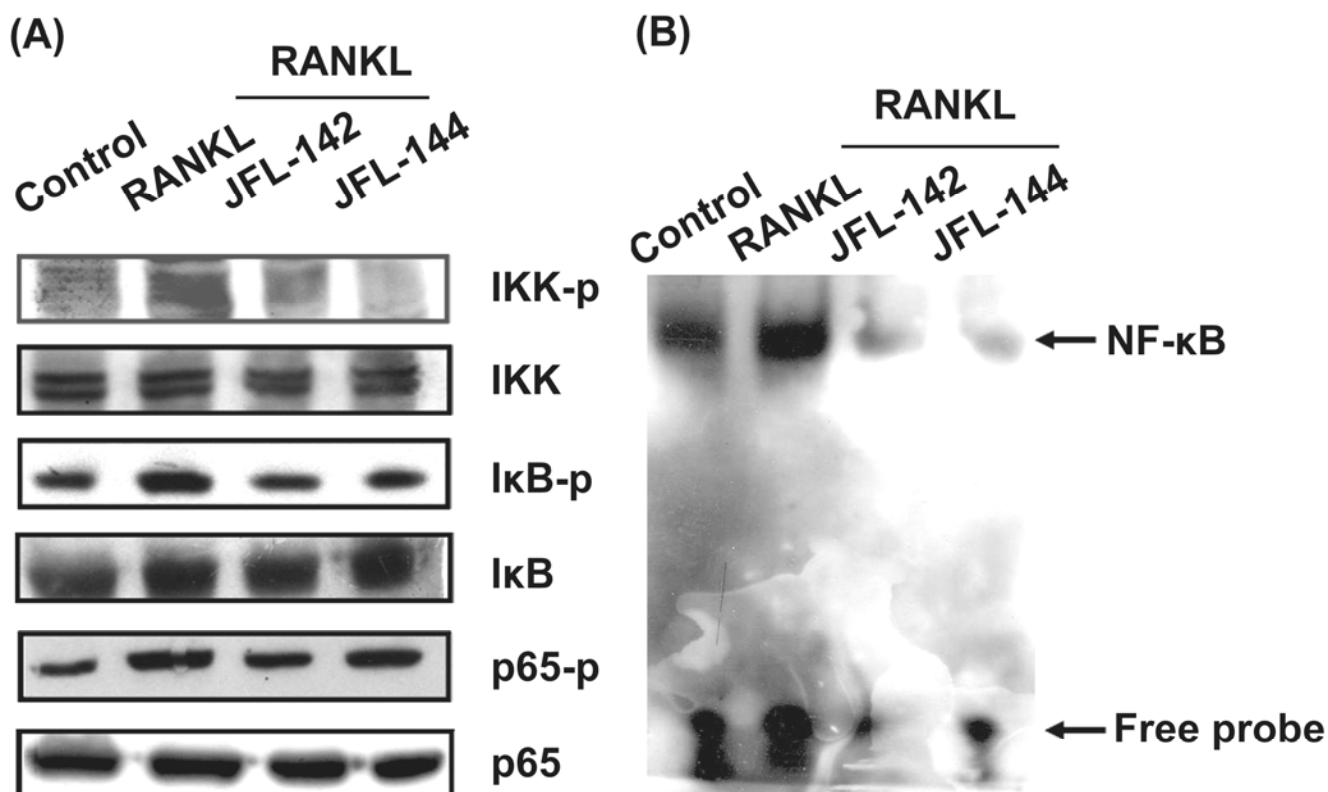
**Fig. 8 Ipriflavone analogues inhibits osteoclastogenesis from bone marrow stromal cells and macrophages.**

Osteoclast precursors were isolated from long bones of adult male SD rats and plated on a 24-well plate at  $1 \times 10^6$  cells/well. Cultured in the presence of M-CSF (20 ng/ml) and RANKL (50 ng/ml) for 7 days. Following TRAP staining, the cells with more than 3 nuclei were counted (A). Compared with RANKL plus M-CSF, ipriflavone analogues treatment markedly inhibited the differentiation of osteoclast. The quantitative data are shown in (B)(n=3). RAW264.7 cells were seeded at  $2 \times 10^4$  and incubated for 5 days with M-CSF (20 ng/ml) and RANKL (50 ng/ml) without or with ipriflavone analogues. Treatment with ipriflavone analogues inhibited osteoclastogenesis (n=3)(C). RAW264.7 cells were seeded at  $2 \times 10^4$  and incubated for 5 days with M-CSF (20 ng/ml) and RANKL (50 ng/ml) without or with ipriflavone analogues. Treatment with ipriflavone analogues inhibited  $\alpha\text{v}\beta 3$  expression (n=3)(D). Data are presented as mean $\pm$ S.E. (n=3). \*  $p < 0.05$  as compared with control. #  $p < 0.05$  as compared with RANKL.



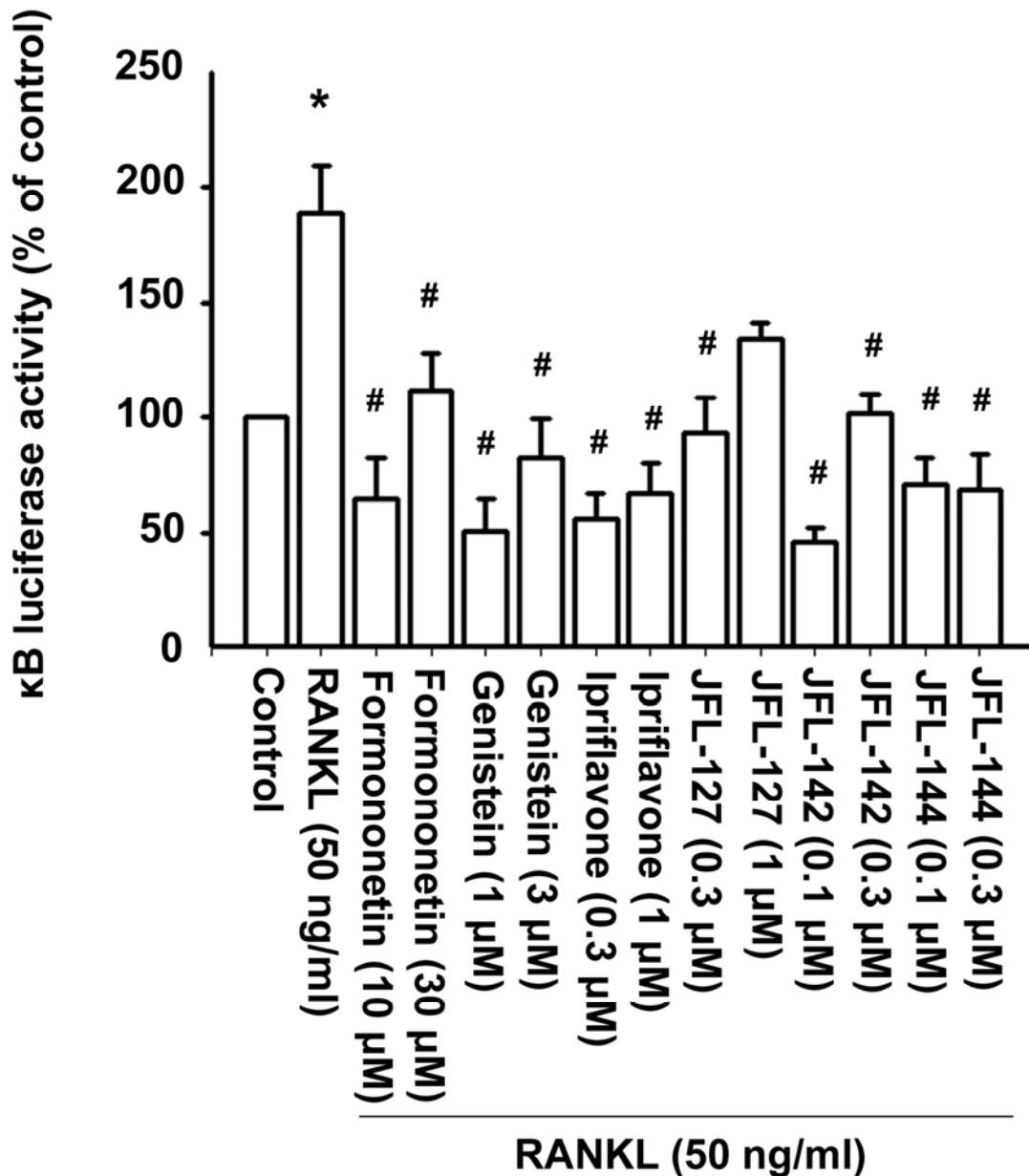
**Fig. 9 Ipriflavone analogues inhibits the RANKL-induced p38 、 JNK and ERK activation.**

RAW264.7 cells were pretreated with JFL-142 (0.3  $\mu$ M) and JFL-144 (0.3  $\mu$ M) for 30 min, and followed treatment with RANKL (50 ng/ml) for 60 min, than the p38 、 JNK and ERK phosphorylation was determined by immunoblotting using phospho-p38 、 JNK and ERK specific antibody. Note that ipriflavone analogues inhibits the RANKL-induced p38 、 JNK and ERK phosphorylation .



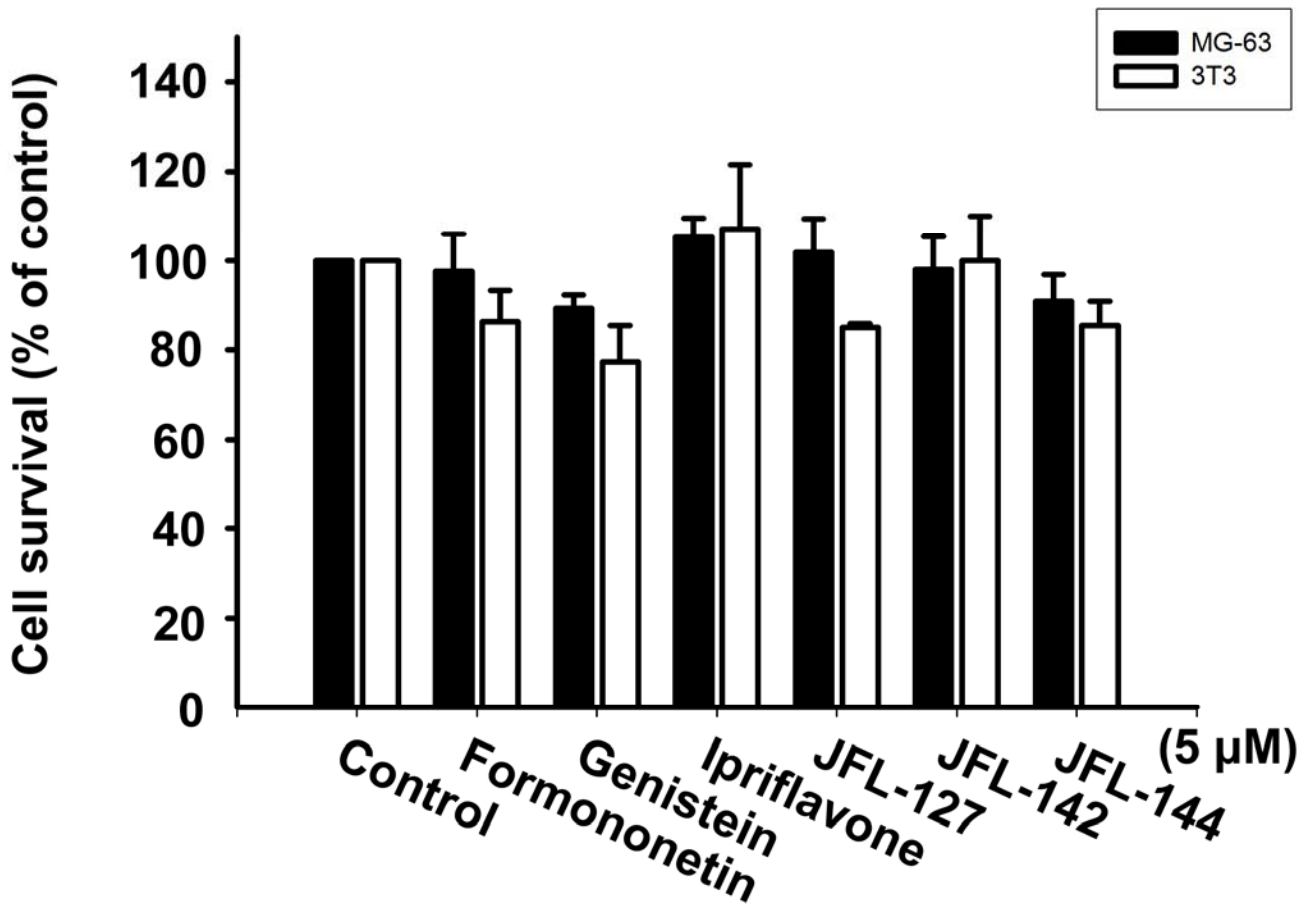
**Fig. 10 Ipriflavone analogues inhibits RANKL-induced NF-κB activation.**

RAW264.7 cells were pretreated with JFL-142 (0.3  $\mu$ M) and JFL-144 (0.3  $\mu$ M) for 30 min, and followed treatment with RANKL (50 ng/ml) for 60 min, then the IKK $\alpha/\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and p65 phosphorylation at Ser536 was determined by immunoblotting using phospho-IKK $\alpha/\beta$ , phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  and phospho-p65 specific antibody. Note that ipriflavone analogues inhibits the RANKL-induced IKK $\alpha/\beta$  phosphorylation, I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and p65 phosphorylation (A). RAW264.7 cells were pretreated with JFL-142 (0.3  $\mu$ M) and JFL-144 (0.3  $\mu$ M) for 30 min, before incubation with RANKL (50 ng/ml) for 2 h. The NF- $\kappa$ B binding activity were examined by EMSA (B).



**Fig. 11 Ipriflavone analogues inhibits RANKL-induced κB-luciferase.**

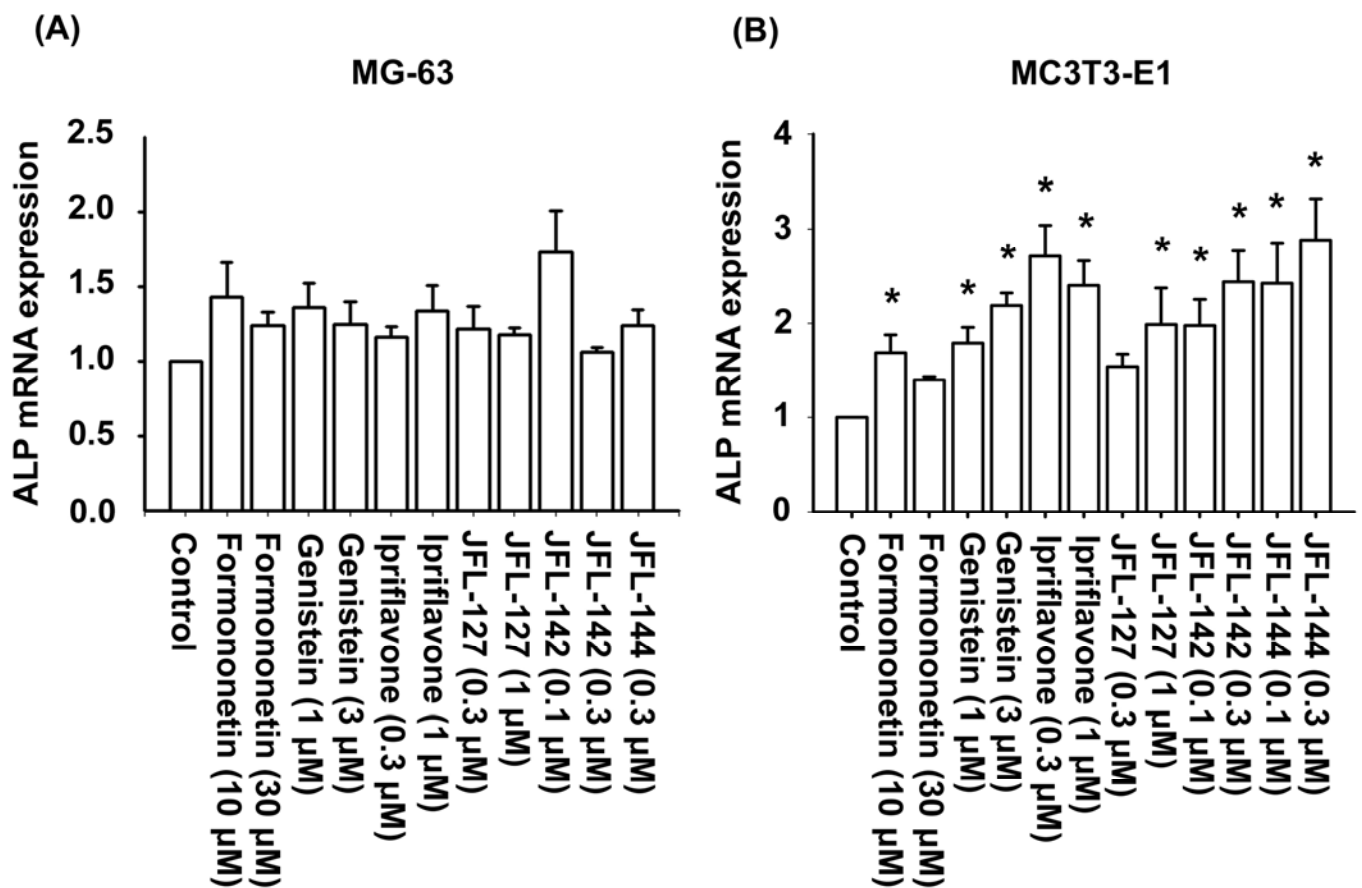
RAW264.7 cells were transfected with κB-luciferase expression vector and then pretreated with ipriflavone analogues for 30 min, before incubation with RANKL (50 ng/ml) for 24 h. Luciferase activity were determined. Data are presented as mean±S.E. (n=3). \* p<0.05 as compared with control. # p<0.05 as compared with RANKL.



**Fig. 12 Ipriflavone analogues didn't affect cell viability in osteoblasts.**

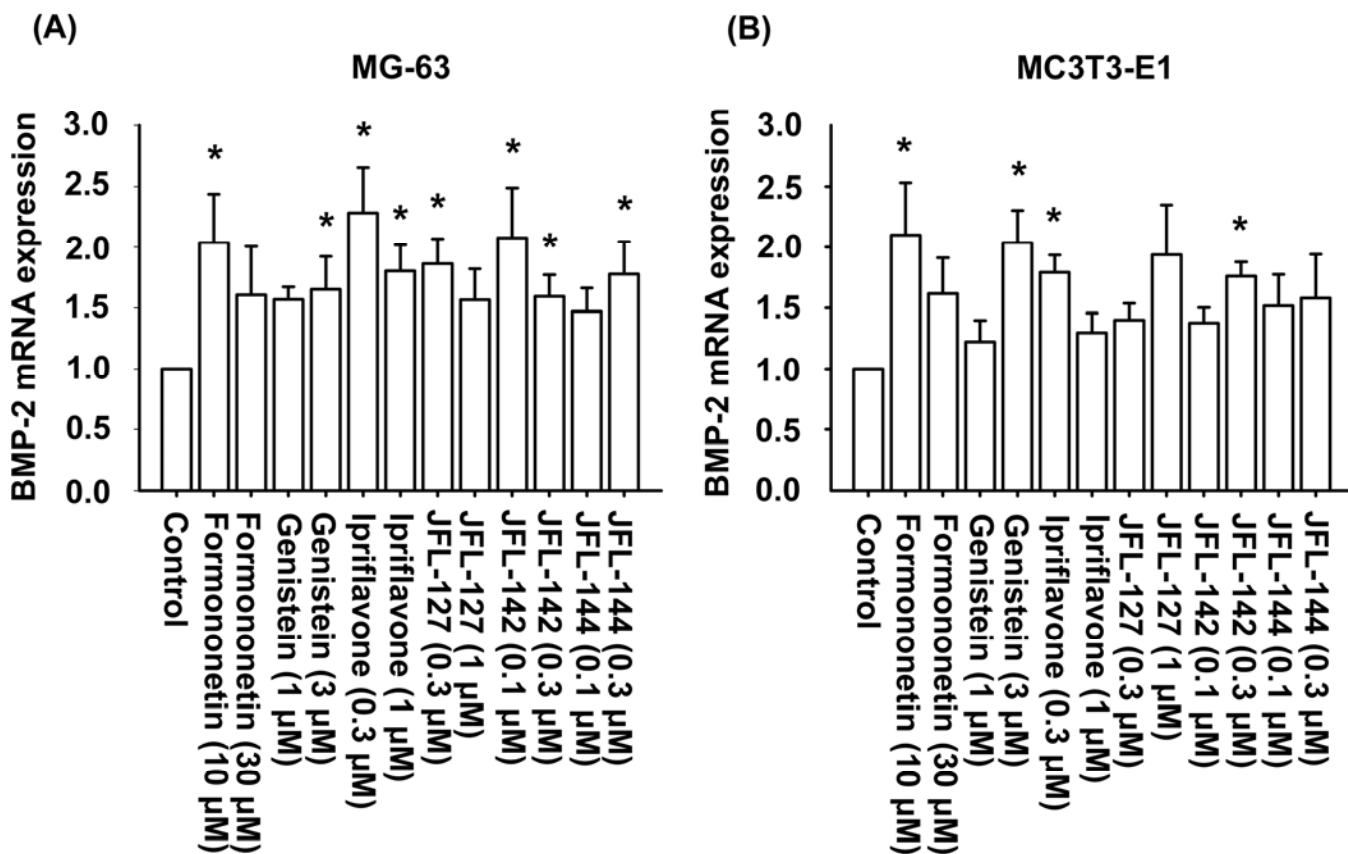
MG-63 cells and 3T3 cells were treated with ipriflavone analogues (5  $\mu$ M) for 2 days and cell viability was evaluated by the MTT assay. Note that ipriflavone analogues did not affect the cell viability of MG-63 cells and 3T3 cells. Data are presented as mean $\pm$ S.E. (n=3).





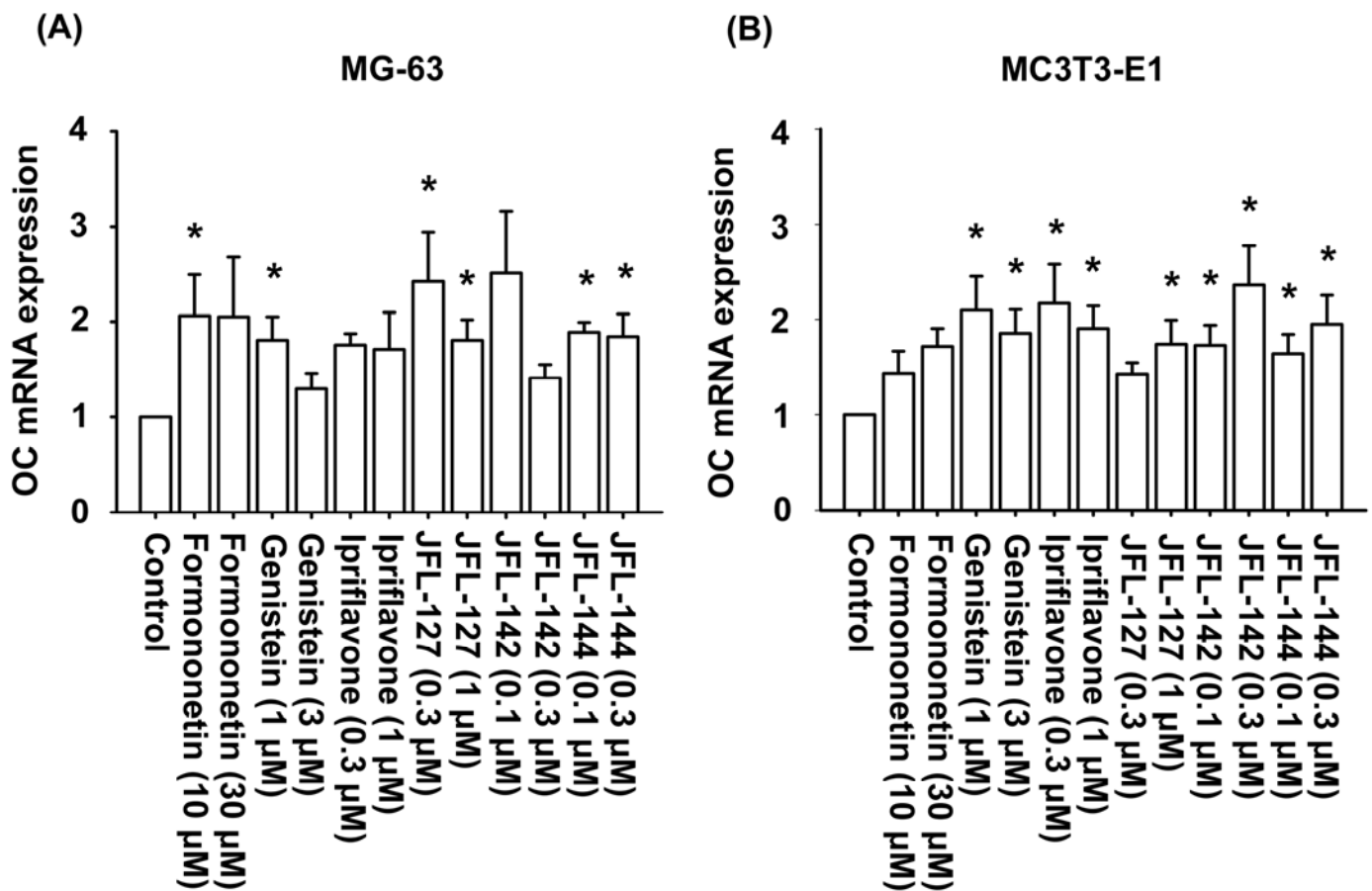
**Fig. 13 Ipriflavone analogues slightly increased ALP expression in osteoblasts.**

MG-63 cells and 3T3 cells were treated with ipriflavone analogues for 24 h. ALP mRNA expression was assessed by qPCR (A & B). Data are presented as mean $\pm$ S.E. (n=3). \* p<0.05 as compared with control.



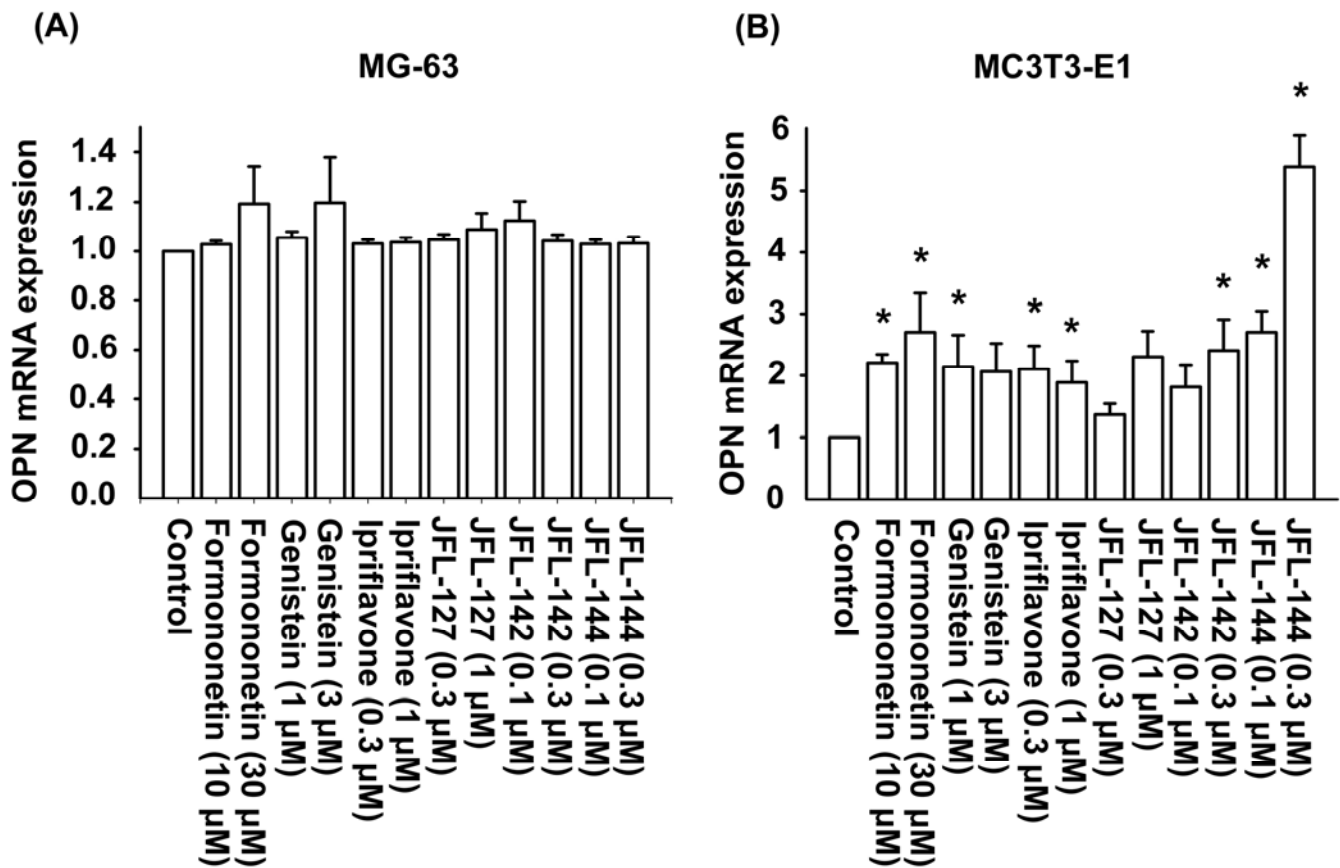
**Fig. 14 Ipriflavone analogues slightly increased BMP-2 expression in osteoblasts.**

MG-63 cells and 3T3 cells were treated with ipriflavone analogues for 24 h. BMP-2 mRNA expression was assessed by qPCR (A&B). Data are presented as mean $\pm$ S.E. (n=3). \* p<0.05 as compared with control.



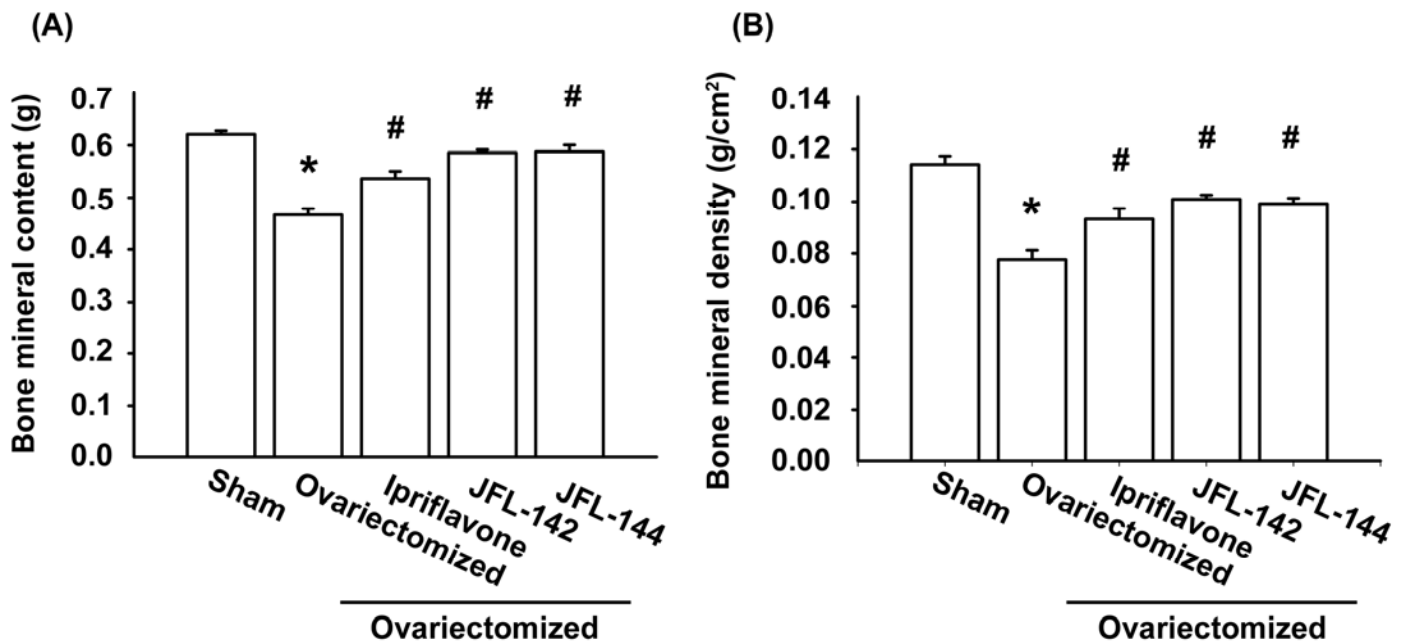
**Fig. 15 Ipriflavone analogues slightly increased OC expression in osteoblasts.**

MG-63 cells and 3T3 cells were treated with ipriflavone analogues for 24 h. OC mRNA expression was assessed by qPCR (A & B). Data are presented as mean  $\pm$  S.E. (n=3). \*  $p < 0.05$  as compared with control.



**Fig. 16 Ipriflavone analogues slightly increased OPN expression in osteoblasts.**

MG-63 cells and 3T3 cells were treated with ipriflavone analogues for 24 h. OPN mRNA expression was assessed by qPCR (A & B). Data are presented as mean  $\pm$  S.E. (n=3). \*  $p < 0.05$  as compared with control.



**Fig. 17 Inhibition of bone loss by ipriflavone analogues in ovariectomized mice.**

Female BALB/c mice were given a sham operation or ovariectomized. Mice were treated with the ipriflavone or JFL-142 or JFL-144 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) by i.p., then determined the BMC and BMD by DEXA 3 weeks after surgery (A & B). Data are presented as mean  $\pm$  S.E. (n=8–10 mice/group). \*  $p < 0.05$  as compared with sham. #  $p < 0.05$  as compared with ovariectomized-group.