

中國醫藥大學中醫學系碩士班碩士論文

編號：GICMS-368

指導教授：陳汶吉 教授

共同指導教授：李德茂 副教授

湯智昕 副教授

論文題目

肉蓯蓉粗萃取物對成骨細胞活性影響初探

Effects of *Cistanche deserticola* crude extract on
the activity of osteoblast

研究生：黃心治

中華民國一〇〇年七月一日

中國醫藥大學碩士班研究生
論文指導教授推薦書

中醫學系碩士班，黃心治君所提之論文
肉蓯蓉粗萃取物對成骨細胞活性影響初探
(題目)，係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授 陳汝吉 (簽章)

中華民國 100 年 6 月 13 日

中國醫藥大學碩士班研究生
論文口試委員審定書

中醫學系碩士班，黃心治君所提之論文
肉蓯蓉粗萃取物對成骨細胞活性影響初探
(題目)，經本委員會審議，認為符合碩士資格
標準。

論文口試委員會

委員 _____ (簽章)

楊順發

李德茂

陳汶吉

主任 系美新

中華民國 100 年 6 月 13 日

目錄

中文摘要.....	1
第一章 前言	1
第二章 文獻探討	2
2.1 骨骼結構與生理	2
2.2 骨質疏鬆症	4
2.3 成骨細胞相關蛋白	6
2.4 中醫對骨質疏鬆症之認識	7
2.5 相關補益藥之歷代中醫文獻探討與藥裡研究	8
第三章 材料與方法	13
3.1 實驗材料.....	13
3.2 實驗方法.....	16
第四章 結果	22
第五章 討論	42
第六章 結論	44
參考文獻.....	45
附錄.....	53
英文摘要.....	54
謝詞.....	55

圖目錄

圖 2.1	骨重塑作用	3
圖 2.2	成骨細胞與破骨細胞關係圖	4
圖 4.1	女貞子粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、 BMP-2 與 OPN 之變化.....	26
圖 4.2	肉蓯蓉粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、 BMP-2 與 OPN 之變化.....	26
圖 4.3	骨碎補粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、 BMP-2 與 OPN 之變化.....	27
圖 4.4	山藥粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、 BMP-2 與 OPN 之變化.....	27
圖 4.5	淫羊藿粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、 BMP-2 與 OPN 之變化.....	28
圖 4.6	杜仲粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、 BMP-2 與 OPN 之變化.....	28
圖 4.7	補骨脂粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、 BMP-2 與 OPN 之變化.....	29
圖 4.8	菟絲子粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、 BMP-2 與 OPN 之變化.....	29
圖 4.9	山茱萸粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、 BMP-2 與 OPN 之變化.....	30
圖 4.10	續斷粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、 BMP-2 與 OPN 之變化.....	30
圖 4.11	巴戟天粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、 BMP-2 與 OPN 之變化.....	31
圖 4.12	熟地黃粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、 BMP-2 與 OPN 之變化.....	31
圖 4.13	不同濃度下肉蓯蓉粗萃取物對成骨細胞活性指標之影響	32
圖 4.14	肉蓯蓉粗萃取物不影響成骨細胞增生或移行能力	33
圖 4.15	肉蓯蓉粗萃取物增強成骨細胞礦化能力	34

圖 4.16	肉蓯蓉粗萃取物透過 ERK 影響細胞活性	35
圖 4.17	肉蓯蓉粗萃取物透過 JNK 影響細胞活性	36
圖 4.18	肉蓯蓉粗萃取物透過 p38 影響細胞活性	37
圖 4.19	肉蓯蓉粗萃取物透過 Akt 影響細胞活性	38
圖 4.20	NF- κ B 家族之 p65 參與肉蓯蓉粗萃取物之活化路徑	39
圖 4.21	抑制劑對成骨細胞礦化與 ALP 活性之影響	40
圖 4.22	轉錄因子 NF- κ B 參與成骨細胞活化路徑	41



表目錄

表 2.1 骨形成蛋白	6
表 3.1 Primer sequence	14



肉蓯蓉粗萃取物對成骨細胞活性影響初探

研究生：黃心治

指導老師：陳汶吉教授

中國醫藥大學中醫學系碩士班

骨質疏鬆症好發於停經後的婦女，常造成脊椎體、髖部與腕部骨折。人類的骨骼約有百分之十持續的進行骨重塑作用，此一作用包括骨頭的生成與溶蝕兩種作用，骨質疏鬆症即是此兩種作用失去平衡所造成。而其中生成作用由成骨細胞所主導，本研究將探討中藥對於成骨細胞活性的影響。

本研究選定十二種常見補腎強筋骨中藥粗萃取物，並以 MC3T3-E1 成骨細胞株來探討。實驗分成兩部分，第一部份評估十二種中藥粗萃取物對 MC3T3-E1 成骨細胞株的影響。第二部分選定其中有效藥物肉蓯蓉並對其機轉做進一步的探討。

結果顯示，肉蓯蓉能夠促進 MC3T3-E1 成骨細胞株的活性與加強礦化作用，根據本研究的結果，肉蓯蓉粗萃取物可為骨質疏鬆症的治療提供一個新的方向。

關鍵詞：中藥、肉蓯蓉、成骨細胞、骨質疏鬆症

第一章 前言

骨質疏鬆症是一種骨質流失所造成的全身性骨骼疾病。由於骨質的流失造成骨折發生率增加。隨著年齡的增加與女性更年期之後，骨質疏鬆的盛行率有上升的趨勢，依台灣健保資料庫統計，五十歲（含）以上的男性有 1.63%，女性有 11.35% 有骨質疏鬆的情形¹。

骨頭的代謝是由成骨細胞與破骨細胞不斷的進行進行骨重塑(bone remodeling)作用來進行，骨質疏鬆即是此一作用失去平衡所致²。現行臨床治療停經後骨質疏鬆的藥物，主要以雙磷酸鹽類藥物為第一線用藥，這類的藥物主要以抑制破骨細胞的活性來增加骨質密度，而這類藥物的副作用有食道炎與下顎骨頭壞死等，且在價格上也相當得昂貴。另外在臨床使用上尚無理想促進成骨細胞活性的藥物，考量到西藥的價格與副作用，因此希望由傳統中醫藥中去篩選出有促進骨質增生與成骨細胞活性的藥物。

在傳統中醫的認知裡，“骨”屬於中醫臟腑概念之中“腎”的範疇³。根據此概念，在歷代典籍的文獻記載中，搜尋篩選補益藥之中屬於入“腎”且並有“填骨髓”、“暖腰膝”、“強筋骨”、“去腰膝疼”等功用的藥物共十一種，分別是山藥、巴戟天、肉蓯蓉、淫羊藿、杜仲、續斷、骨碎補、補骨脂、菟絲子、熟地黃、女貞子。另外在中醫常見補腎方劑如六味地黃丸系列中常見的收澀藥物山茱萸，亦有入腎、暖腰膝的作用，因此一併納入探討。本實驗希望能夠由這十二味藥物之中，找出具有促進骨骼增生能力的藥物，並對其可能作用的機轉做現代醫學的探討與分析，俾使促進中藥的發展與認知。

第二章 文獻探討

2.1 骨骼結構與生理

人體的骨骼主要是由無機鹽與有機物所構成的組織，無機鹽以磷酸鈣為主要成分，而有機物則以膠原纖維為主。磷酸鈣提供骨骼支持的強度，而膠原纖維能使骨骼具有韌性。骨骼中主要有三種細胞，分別是成骨細胞(osteoblast)、骨細胞(osteocyte)與破骨細胞(osteoclast)。其中成骨細胞由骨髓中的間葉細胞(mesenchymal stromal cell; MSC)演化而來，屬於嗜鹼性單核細胞，其主要功能為負責基質的鈣化以形成骨骼與分泌第 I 型膠原蛋白。成骨細胞分化成熟後，便在骨腔中形成為骨細胞。破骨細胞屬於嗜酸性巨大多核細胞，由巨噬細胞分化融合而來，主要功能為清除老舊的骨基質。

人體的骨骼在一生當中都不斷的進行骨吸收與骨合成的作用，此一作用稱為骨重塑作用(bone remodeling)，可以使骨骼組織不斷的代謝及更新。骨重塑作用可以調整骨頭的結構以應付機械性需求的改變，且修復骨基質中的微小損害且避免老化的骨頭堆積，預防骨折的發生⁴。此外對於血漿中的鈣離子恆定也扮演了重要的角色⁵。在正常的成人骨頭中，由破骨細胞與成骨細胞形成特殊的暫時性結構，稱之為basic multicellular unit (BMU)。BMU 長約 1-2 mm，寬約 0.2-0.4 mm，由一開始的破骨細胞與之後的成骨細胞，以及微血管、神經與相關組織所構成⁶。一個 BMU 的週期大約是六到九個月，其中破骨細胞的生命週期約兩週，而活化的成骨細胞作用則約為三個月⁷，而此一特殊的單位結構便負責了骨重塑作用。骨重塑作用一開始在活化期(activation phase)的時候，間質細胞(mesenchymal cells of the osteoblast lineage)受到刺激，進而活化 hematopoietic precursors cells 形成破骨細胞，進入吸收期(resorption phase)。在吸收期，破骨細胞將該部位的骨基質溶解吸收，之後破骨細胞凋亡，進入短暫的 reversal phase，此時間質細胞會被活化為成骨細胞並進入形成期(formation phase)開始形成骨頭(圖 2.1)⁸。

骨重塑作用受到許多因子的調控，有分為全身性與局部性的控制。在全身的調節因子裡，包含了副甲狀腺素(parathyroid hormone; PTH)，

Calcitriol 以及其他荷爾蒙如生長激素(growth hormone)，糖皮質激素 (glucocorticoids)，甲狀腺素 (thyroid hormones) 以及性激素 (sex hormones) 等。其他因子如 insulin-like growth factors (IGFs)，prostaglandins，tumor growth factor-beta (TGF-beta)，bone morphogenetic proteins (BMP) 與一些其他 cytokines 亦參與其中⁵。而在局部微觀來看，骨重塑作用主要透過 RANK /receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL) /osteoprotegerin (OPG) system 來控制，當成骨前驅細胞受到了刺激後，產生 RANKL，而後與在破骨前驅細胞上的 RANK 結合後，刺激破骨前驅細胞分化與活化，開始骨重塑作用(圖 2.2)⁹。另外研究亦發現在缺乏 OPG 的老鼠身上，會因大量的破骨細胞所造成骨吸收作用，而產生嚴重的骨質疏鬆¹⁰。

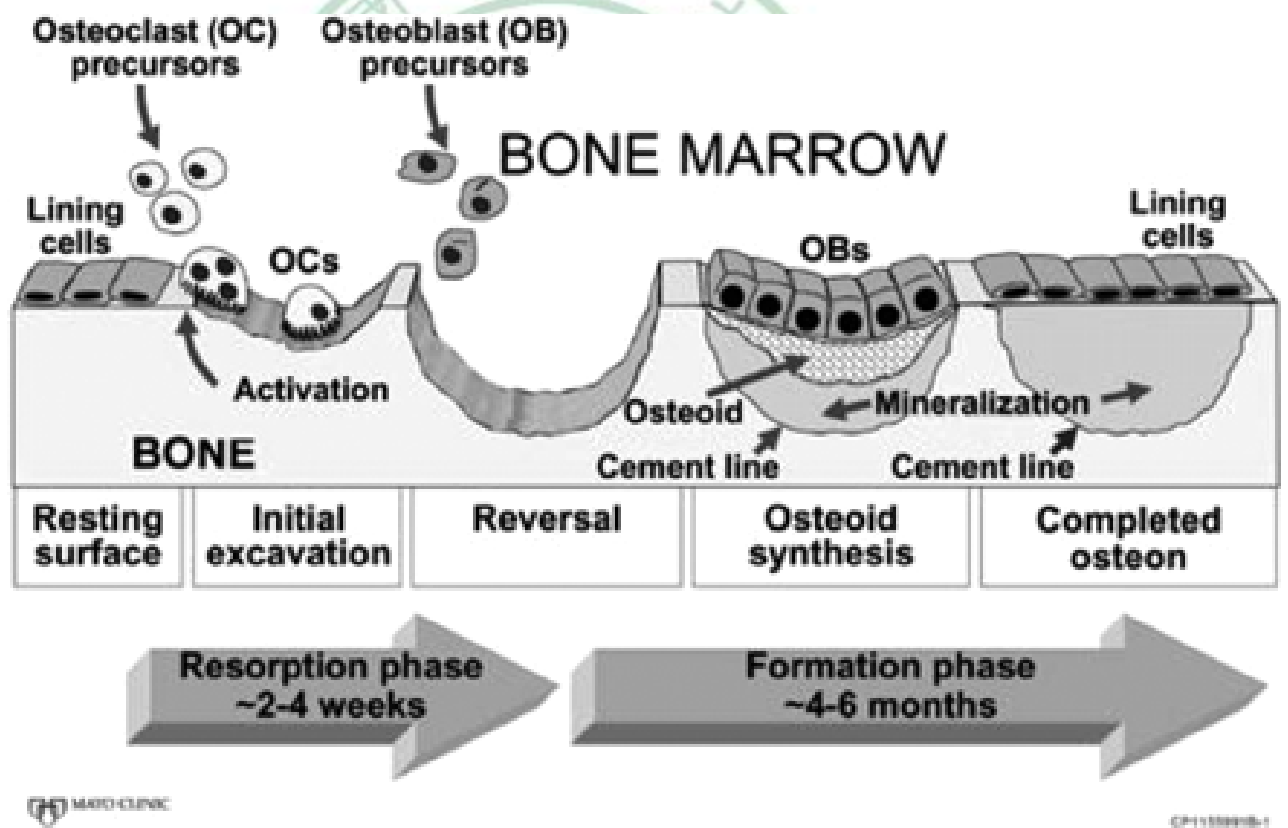


圖 2.1 骨重塑作用¹¹

骨重塑作用在吸收期由破骨細胞溶解老舊骨基質，爾後經過短暫的 reversal phase 進入形成期，此時成骨細胞形成新的骨基質。

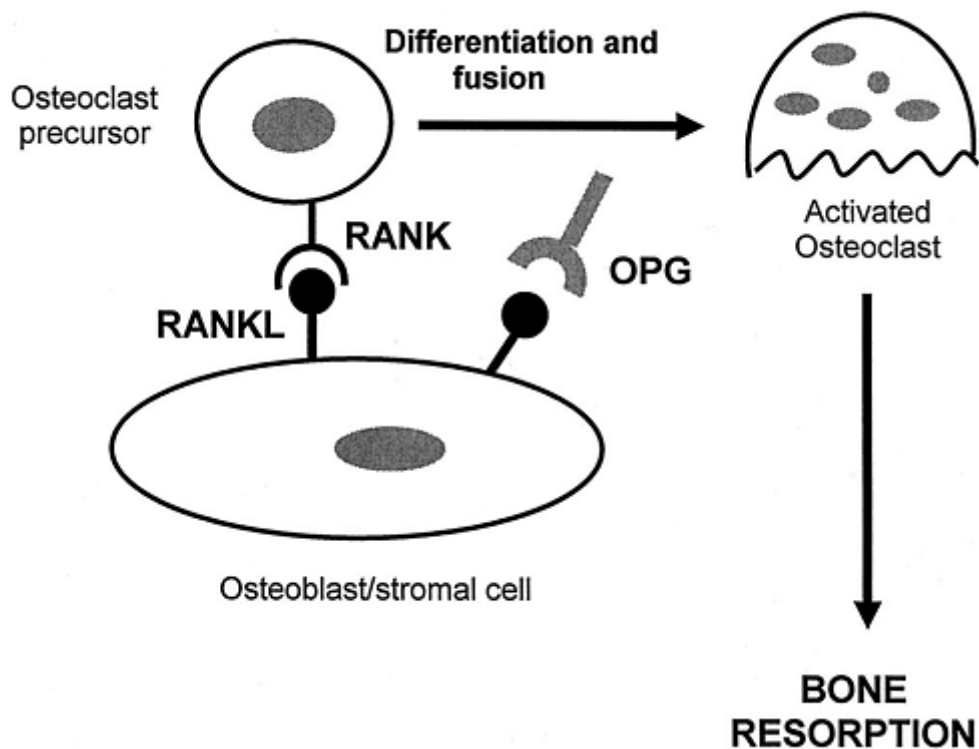


圖 2.2 成骨細胞與破骨細胞關係圖¹²

成骨細胞受到刺激產生 RANKL，進而與破骨前驅細胞 RANK 結合並活化之，形成破骨細胞進行破骨作用。

2.2 骨質疏鬆症

骨質疏鬆症(osteoporosis)的字義為多孔的骨頭(porous bones)，是一種骨質流失所造成的全身性骨頭疾病，此疾病會降低骨頭的密度與強度，使得骨頭變的脆弱而失去韌性，進而增加骨折發生的機率，尤其是發生在手腕、脊椎與髖骨部位的骨折，而在此類的骨折中，較嚴重的可能會造成死亡率的提高¹³。人類的骨頭終其一生都不斷的在進行骨重塑作用，由破骨細胞清除老舊骨基質，接著成骨細胞形成新的骨頭，當破骨細胞過度的活躍，或者成骨細胞形成骨頭的速度不夠的時候，此時製造比不上流失的速度，便造成了骨質密度的降低，而當骨質密度降低到低於正常年輕成人平均最大骨密度負一個標準差時，稱之為 osteopenia，而根據世界衛生組織的定義，當骨質密度小於年輕成人平均最大骨密度負 2.5 個標準差以下時便稱之為骨質疏鬆症

(osteoporosis)，其發生原因可分為原發性(primary)與次發性(secondary)兩種。其中原發性骨質疏鬆約佔百分之九十，主要發生在更年期之後的女性，因為女性荷爾蒙的缺乏而造成大量的骨質流失，而次發性骨質疏鬆則是因為其他疾病或者是藥物的使用如類固醇¹⁴等所造成。

在盛行率方面，在台灣近十年流行病統計調查結果顯示，六十五歲以上，男性有百分之十二，女性有百分之十九已有一個以上脊椎體壓迫性骨折。若依台灣平均壽命，女性有五分之一，而男性有三分之一的機會在其一生會發生一次脊椎體、腕部或髖部骨折，此流行率與美國白人相當，皆屬高流行區域¹⁵。此外根據健保申報資料分析統計，在住院花費方面，平均每年每一人次住院花費均在 46,000-50,000 之間¹⁶。

在治療方面，現今治療骨質疏鬆的藥物主要以雙磷酸鹽類藥物(bisphosphonates)為主，此類藥物主要作用為透過抑制破骨細胞的活性來減少骨質的流失。而此類藥物的副作用包括有可能會造成顎骨的壞死^{17,18}、胃食道逆流與食道炎¹⁹。另外根據最新的健保規定（健保審字第 0990082152 號），此類藥物限用於停經後婦女因骨質疏鬆症（須經 DEXA 檢測 BMD 之 T score $\leq -2.5SD$ ）引起脊椎或髖部骨折，或因骨質疏少症(osteopenia)（經 DEXA 檢測 BMD 之 $-2.5SD < Tscore < -1.0SD$ ）引起脊椎或髖部 2 處或 2 次（含）以上之骨折，如此才符合給付規定。

此外還有其他的治療藥物包括了也是抑制骨質吸收的藥物如 Oestrogens、Selective estrogen receptor modulator (SERM)、Calcitonin²⁰，其中賀爾蒙療法有可能會增加冠狀動脈疾病、乳癌、中風與肺栓塞的機會²¹，SERM 對於預防老年人髖骨骨折的研究仍不明確，而 Calcitonin 目前研究只有針對預防脊椎椎體骨折²²。另外副甲狀腺素(parathyroid hormone; PTH)則是有刺激成骨細胞生長的作用，但在動物試驗發現可能有增加 osteosarcoma 的機會²⁰，因此臨床上並不建議長期使用。

因此，在中藥裡，尋找價格較低且有效而副作用少的預防藥物，成為一項重要的任務。

2.3 成骨細胞相關蛋白

(1) 骨形成蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2;BMP-2)

在 1965 年 Marshall R. Urist 發現在肌肉內植入脫鈣骨基質會引發新的骨頭形成^{23,24}，之後開始了關於骨形成蛋白的研究，如今已經有大約二十種不同的成員被確認出來，此類蛋白屬於 transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily，因其能夠誘導骨頭與軟骨的形成而稱之（表.1）²⁵。

其中，研究發現 BMP-2 在成骨細胞的分化、以及胚胎骨骼發育與骨重塑作用中扮演了重要的角色^{26,27}。有研究顯示，BMP-2 可以增加年齡週數較大的老鼠其骨頭的形成^{28,29}。此外在基因方面的研究顯示，BMP-2 與骨質疏鬆以及骨質疏鬆所造成的骨折有關^{30,31}。

表 2.1 骨形成蛋白²⁵

BMP	Gene locus	Function	Receptors and inhibitors
BMP-1	8p21	It is a metalloprotease that acts on procollagen I, II, and III. It is involved in cartilage development	Type I receptors
BMP-2	20p12	Acts as a disulfide-linked homodimer and induces bone and cartilage formation. It is a candidate as a retinoid mediator. Plays a key role in osteoblast differentiation	ACVRIA, ACVRIB, ACVRIC, ACVRLI-BMPRI (BMPRIA-BMPRII)
BMP-3	14p22	Induces bone formation	Type II receptors
BMP-4	14q22-q23	Regulates the formation of teeth, limbs and bone from mesoderm. It also plays a role in fracture repair	ACVR2A, ACVR2B, AMHR2, BMPRII
BMP-5	6p12.1	Performs functions in cartilage development	
BMP-6	6p12.1	Plays a key role in joint integrity in adults	Type III receptors
BMP-7	20q13	Plays a key role in osteoblast differentiation. It also induces the production of SMADI. Also key in renal development and repair	Betaglycan
BMP-8	1p35-p32	Involved in bone and cartilage development	
BMP-9		Promoting chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells	Ligand inhibitors
BMP-10	2p14	Play a role in the trabeculation of the embryonic heart	Cerberus, Chordin, DAN, Decorin, Follistatin, Gremlin, Lefty, LTBPI
BMP-15	Xp11.2	May play a role in oocyte and follicular development	Noggin, THBSI

本圖表顯示骨形成蛋白的功能，基因位點，受體與 ligand inhibitors。

(2) 鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase; ALP)

ALP 是最常用來測量成骨細胞活性的生化指標³²。ALP 在人體有數種 isoform，分別由不同器官分泌到血清之中，其中

主要有骨頭、肝臟、小腸與胎盤。其中血清中 bone-specific ALP 和成骨細胞的分化與活性有關。ALP 濃度升高可能代表著軟骨病，Paget's disease，腎臟佝僂病，骨癌等疾病的發生³³。

(3) 骨橋蛋白 (osteopontin; OPN)

在 1979 年，Senger 等人描述了一種 secreted, 60-kDa transformation-specific phosphoprotein 後³⁴，不久便發現了骨橋蛋白的存在。骨橋蛋白是一種高度磷酸化的 sialoprotein，在牙齒與骨骼中都可以發現其大量存在，且參與了許多生理反應³⁵。有研究顯示，骨細胞在受到機械性刺激之後，骨橋蛋白的表現量會增加³⁶。在骨重塑作用中，骨橋蛋白扮演了重要的角色，從成骨細胞的分化到礦化都有此蛋白的表現，尤其在細胞分化時，其基因表現量有明顯的增加^{37,38}。雖然目前的研究指出，骨橋蛋白能夠調節破骨細胞與成骨細胞的功能，但對於機轉仍尚未完全了解³⁹。

以上幾種蛋白，對於成骨細胞在造骨過程中，扮演了重要的調控角色，因此可以測定這些蛋白的表現量來作為成骨細胞分化與合成骨頭的生物指標。

2.4 中醫對骨質疏鬆症之認識

骨質疏鬆症乃是近代西方醫學所特有的名詞，在中醫古籍之中，並無骨質疏鬆症此一名詞的記載，但如此並不表示在古代無此一疾病之發生。以骨質疏鬆症常見的一些臨床表現，例如腰痛、腰酸、身高變矮、骨折等症狀來看，在古籍也有大量相關症狀的描述，而就其臨床表現，當屬“骨痹”、“骨痿”、“骨枯”、“腰痛”、“虛勞”等證範疇⁴⁰⁻⁴²。

在傳統中醫理論裡，認為骨頭的生長與功能，是由中醫五臟裡的“腎”所負責調節³，而此一論述在《內經》中就有許多相關的記載，如《素問·宣明五氣篇》“腎主骨”³，《素問·陰陽應象大論》“腎生骨髓”⁴³，《素問·五臟生成篇》“腎之合，骨也”⁴³，《素問·逆調論篇》“腎者水也，而生於骨，腎不生，則髓不能滿”⁴⁴，《素問·

六節藏象論》“腎者，主蛰，封藏之本，精之處也，其華在髮，其充在骨，為陰中之少陰，通於冬氣”⁴³，都說明了在中醫的理論中，“腎”和“骨”兩者之間的關係相當密切。

此外，在《素問·上古天真論》中提到“女子……三七，腎氣平均，故真牙生而長極；四七筋骨堅，髮長極，身體盛壯。丈夫……三八，腎氣平均，筋骨勁強，故真牙生而長極；四八，筋骨隆盛，肌肉滿壯……八八，則齒髮去，腎者主水，受五藏六府之精而藏之……今五藏皆衰，筋骨解墮，天癸盡矣。故髮鬢白，身體重，行步不正”⁴⁵。其中提到的女子四七筋骨堅，男子四八筋骨隆盛，亦與現代醫學中觀察到人類骨質密度再 25 至 30 歲左右達到最高峰，而後逐漸降低，亦有相似之處。

而在病因表現方面，在《素問·痿論篇》中有提到“腎主身之骨髓……腎氣熱，則腰脊不舉，骨枯而髓減，發為骨痿”⁴³，《素問·脈要精微論篇》“腰者，腎之府，轉搖不能，腎將憊矣……骨者，髓之府，不能久立，行則振掉，骨將憊矣”⁴³，《難經·十四難》“損脈之為病奈何……五損損於骨，骨痿不能起於床”⁴⁶，也說明了“腎”與“骨”之間病因關係。

根據近代的臨床調查研究亦顯示，腎虛證與停經後婦女骨質疏鬆症有關^{47,48}，因此可以推測腎虛是骨質疏鬆的主要病因^{40,49}。而近代一些研究亦發現，補腎藥物可以用於治療骨質疏鬆患者。綜觀骨質疏鬆症與傳統中醫藥之間的關係，依據中醫傳統理論，希望能找出中藥裡能夠促進成骨細胞活性來改善骨質疏鬆的藥物，並進一步探討其現代相關機轉。

2.5 相關補益藥之歷代中醫文獻探討與藥理研究

在中醫理論中，凡是能夠補充人體氣血不足，改善強化臟腑功能的藥物，稱之為補虛藥⁵⁰，骨質疏鬆症在臨床辯證論治上多屬於腎氣不足，因此本實驗希望能由此類補虛藥物中，挑選出具有治療骨質疏鬆，增強成骨細胞功能之潛力的藥物，因此在藥物的選擇上，選擇補虛藥物中屬於入腎的藥物，且在歷代典籍中有提到可以“填骨髓”、

“暖腰膝”、“強筋骨”、“去腰膝疼”的藥物，此外由於動物性藥物在臨床上無法大量取得且價格高昂，故不納入實驗觀察對象。並排除記載有毒之藥物，因此初步篩選出十二味中藥來做進一步的比較與觀察。

(1) 山藥(Shanyao)⁵⁰⁻⁵²

原名薯蕷，為薯蕷科多年生蔓生草本植物薯蕷 *Dioscorea opposita* Thunb. 的塊根。性味甘、平。歸脾、肺、腎經。成分在塊莖含皂苷、黏液質、膽鹼、澱粉，還含止癢素、多酚氧化酶、維生素C等。黏液中含甘露聚糖、植酸。

根據中醫典籍的記載，《名醫別錄》：“止腰痛，補虛勞羸瘦”。《日華子本草》：“助五臟、強筋骨”。《本草綱目》：“益腎氣，健脾胃”。

(2) 巴戟天(Bajitian)⁵⁰⁻⁵²

茜草科多年生藤本植物巴戟天 *Morinda officinalis* How. 的根。性味辛、甘，微溫。歸腎經。成分有棕櫚酸、十九烷、 β -谷甾醇與蔥醌類化合物。

根據中醫典籍的記載，《神農本草經》：“強筋骨，安五臟”。《本草備要》：“補腎益精，治五勞七傷”。

(3) 肉蓯蓉(Roucongrong)⁵⁰⁻⁵²

列當科寄生草本植物肉蓯蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 帶鱗葉肉質莖，性味甘、鹹，溫，歸腎、大腸經。成分含有肉蓯蓉苷、松果菊苷、類葉升麻苷、鵝掌楸苷、甜菜碱、 β -谷甾醇、甘露醇、胺基酸與多醣類等⁵³

根據中醫典籍的記載，《名醫別錄》：“除膀胱邪氣，腰痛”。《日華子本草》：“潤五臟，長肌肉，暖腰膝”。《本草備要》：“補命門相火，滋潤五臟，益髓筋，治五勞七傷”。

(4) 淫羊藿(Yinyanghuo)⁵⁰⁻⁵²

小檗科多年生草本植物心葉淫羊藿 *Epimedium brevicornum* Maxim. 或箭葉淫羊藿 *E. sagittatum*(Sieb. et Zucc.) Maxim.。性味辛、甘，溫。歸肝、腎經。成分含淫羊藿

苷及去甲淫羊藿苷等黃酮類物質，並含揮發油、固醇、生物鹼等。

根據中醫典籍的記載，《名醫別錄》：“堅筋骨”。《日華子本草》：“治一切風冷勞氣，補腰膝”。

(5) 杜仲(Duzhong)⁵⁰⁻⁵²

杜仲科落葉喬木植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv.的樹皮。性味甘，溫。歸肝、腎經。成分含松脂醇二葡萄糖苷、桃葉珊瑚苷、綠原酸、杜仲膠、杜仲苷、咖啡酸、鞣質、黃酮類化合物與少量生物鹼。

根據中醫典籍的記載，《神農本草經》：“主腰脊痛，補中益精氣，堅筋骨”。《名醫別錄》：“治腳中酸痛，不欲踐地”。《日華子本草》：“治腎勞”。《珍珠囊補遺藥性賦》：“杜仲堅筋補損傷”。《本草備要》：“腎充則骨強，能使筋骨相著，治腰膝酸痛”。

(6) 續斷(Xudian)⁵⁰⁻⁵²

川續斷科多年生草本植物續斷 *Dipsacus asper* Wall.的乾燥根。性味苦、甘、辛、微溫。歸肝、腎經。成分含續斷鹼及揮發油、維他命E等。

根據中醫典籍的記載，《神農本草經》：“續筋骨”。《日華子本草》：“助氣調血脈，補五勞七傷”。《滇南本草》：“補肝，強筋骨，走經絡，止經中痠痛”。

(7) 骨碎補(Gusuibu)⁵⁰⁻⁵²

水龍骨科多年生蕨類植物槲蕨 *Drynaria fortunei*(Kunze) J.Sm.的根莖。性味苦、溫。歸肝、腎經。成分有柚皮苷，骨碎補雙氫黃酮苷，骨碎補酸等。

根據中醫典籍的記載，《重修政和經史證類備用本草·卷十一·骨碎補》引陳藏器云：“骨碎補本名猴薑。開元皇帝以其主傷折、補骨碎，故作此名”。《壽世保元》：“骨碎補溫，折傷骨折”。《本草述》：“治腰痛行痺，中風鶴膝風攣氣證”。

(8) 補骨脂(Buguzhi)⁵⁰⁻⁵²

豆科一年生草本植物補骨脂 *Psoralea corylifolia* L.的成熟果實。性味苦、辛，大溫。歸腎、脾經。成分有含黃酮類化合物、香豆精類化合物以及補骨脂酚與揮發油等。

根據中醫典籍的記載，《藥性本草》：“主男子腰疼，膝冷囊濕”。《開寶本草》：“主五勞七傷，風虛冷，骨髓傷敗”。

(9) 菟絲子(Tusizi)⁵⁰⁻⁵²

旋花科一年生寄生性蔓草菟絲子 *Cuscuta chinensis* Lam.的成熟種子。性味辛、甘，平。歸肝、腎經。成分含樹脂樣配糖體、大量澱粉酶、維生素A等。

根據中醫典籍的記載，《名醫別錄》：“養肌強陰，堅筋骨”。《藥性本草》：“治男子女人虛冷，添精益髓，去腰疼膝冷”。

(10) 熟地黃(Shudihuang)⁵⁰⁻⁵²

玄參科多年生草本植物地黃 *Rehmannia glutinosa* Libosch.的根。性味甘，微溫。歸肝、腎經。成分含 β -谷甾醇、甘露醇、梓醇、地黃素、維生素A等。

根據中醫典籍的記載，《珍珠囊》：“滋腎水，益真陰”。《本草綱目》：“填骨髓，長肌肉，生精血，補五臟……男子五勞七傷”。《本草從新》：“滋腎水，封填骨髓”。

(11) 女貞子(Nuzhenzi)⁵⁰⁻⁵²

木樨科常綠喬木植物女真 *Ligustrum lucidum* Ait.的成熟果實。性味甘、苦，涼。歸肝、腎經。成分含齊墩果酸、乙醯齊墩果酸、女貞子苷、亞油酸、亞麻仁酸、油酸、棕櫚酸及甘露醇、葡萄糖等。

根據中醫典籍的記載，《醫學摘粹·本草類要·補藥門》：“入足少陰腎……強筋健骨”。《本草再新》養陰益腎……治腰腿疼”。《本草綱目·卷三十六·冬青》：“強陰，健腰膝，明目”。《本草備要》：“益肝腎，……強腰膝，明耳目”。

(12) 山茱萸(Shanzhuyu)⁵⁰⁻⁵²

山茱萸科落葉小喬木植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.除去果核之果肉。性味酸、微溫。歸肝、腎經。成分

含有山茱萸苷、皂苷、鞣質、沒食子酸、蘋果酸、維生素 A 等。

根據中醫典籍的記載，《日華子本草》：“暖腰膝，助水臟”。《藥性本草》：“補腎氣《壽世保元》：“澀精益髓，腎虛耳鳴，腰膝痛止”。



第三章 材料與方法

3.1 實驗材料

(一) 實驗藥材

本實驗所使用的十二種中藥與相關資料，感謝由中國醫藥大學中醫學院分子醫學研究室侯庭鏞教授提供，為 GMP 藥廠 (Sun Ten Pharmaceutical Co., Taipei, Taiwan 順天堂藥廠股份有限公司) 所製造的中藥粗萃取物，其基緣鑑定，以及 TLC 圖譜或 HPLC 圖譜，皆依中華中藥典所載。

(二) 實驗細胞株(Cell line)：

老鼠成骨細胞株(mouse osteoblastic cell line; MC3T3-E1)
由 ATCC 購買

(三) 實驗儀器：

1. 細胞培養箱(Incubator)
2. 多功能分光光度計(Multi-spectrophotometer)
3. 即時聚合酶連鎖反應器(Applied Biosystems)

(四) 細胞培養(Cell Culture)：

1. α -minimal essential medium (α -MEM)
2. Fetal bovine serum, penicillin/streptomycin (P/S)
3. 細胞培養皿(Gibco Inc, NY, EUSA)
4. 0.5%trypsin-EDTA

(五) 即時聚合酶連鎖反應 (Real-time Polymerase Chain Reaction ; Real-time PCR):

1. DEPC
2. TRIzol
3. RNA 轉 cDNA 系統 (Invitrogen, CA,USA)
4. Isopropanol, Chloroform(J.T Baker, NJ, USA)

5. Oligo dt
6. SYBR Green Supermix
7. GAPDH primer
8. SYBR Green Gene primer (MDBio Inc, Taiwan)(表 3. 1)

表 3.1Primer sequence

m-OPN (F)	5' GATGC CACAG ATGAG GACCT C
m-OPN (R)	5' CTGGG CAACA GGGAT GACAT
BMP-2 (F)	5' ACACA GGGAC ACACC AACCA T
BMP-2 (R)	5' TGTGA CCAGC TGTGT TCATC TTG
m-ALP (F)	5' GTTGC CAAGC TGGGA AGAAC AC
m-ALP (R)	5' CCCAC CCCGC TATTC CAAAC
m-Beta actin (F)	5' TGGCA CCACA CCTTC TACAA TGAGC
m-Beta actin (R)	5' GCACA GCTTC TCCTT AATGT CACGC

(六) 西方點墨法 (Western blotting) :

1. Acrylamide
2. BCATM protein assay kit (Pierce, IL, USA)
3. 1.5M Tris buffer
4. 0.5M Tris bufer
5. PMSF
6. RIPA buffer
7. Na₃VO₄
8. Aprotinin
9. Leupetin
10. NaF
11. Tween20
12. Glycine
13. Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Amresco Inc, Ohio, USA)

14. Ammonium Persulfate (AP)
15. PVDF (Immobilon-p) (Millipore, MA, USA)
16. ECL, Western blot Develop& replenisher, Fix& replenisher, BioMax light Film (Kodak Inc, NY, USA)

(七) 抗體 (Antibody) :

1. p-p38, p-ERK, p-JNK, p-Akt, p-p65 (Cell signal, MA, USA)
2. p38, ERK, JNK, Akt, p65, β -actin, anti-mouse, anti-rabbit 等抗體 (Santa cruz Biotechnology Inc,CA,USA)
3. Gout anti-rabbit HRP

(八) 細胞轉染法 (Cell transfection) :

1. Lipofectamine 2000 (Invitrogen)
2. DN-ERK, DN-JNK, DN-p38, DN-Akt
3. Akt-inhibitor, U0126, SB203580, SP600125, PDTC, TPCK

(九) 細胞存活率測定方法 (MTT assay)

1. 3-(4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (MTT) (Sigma-Aldrich, CA, USA)

(十) 細胞移行實驗 (Cell migration assay):

1. Transwell (Costar, NY ; pore size, 8- μ m)

(十一) 礦化 (Mineralization):

1. β -glycophosphate
2. Vitamin C
3. Ailzarin red stain
4. Cetylpyridinium chloride (Sigma-Aldrich, CA,USA)

3.2 實驗方法

(一) 細胞培養 (Cell culture):

老鼠成骨細胞株 (mouse osteoblastic cell line; MC3T3-E1) 培養在 α -MEM 培養液中。將 α -MEM 加入 2.2 克的碳酸氫鈉 (Sodium bicarbonate)，以 1 N 鹽酸(HCL) 將 pH 調整至 7.4，再以 0.22 μ m 過濾器(filter)過濾。最後加入 10 %胎牛血清(fetal bovine serum)、100 μ g/ml 盤尼西林/鏈黴素(P/S)。將 MC3T3-E1 細胞培養在 37°C，5% CO₂ 的培養箱(incubator)裡，約二到三天繼代培養一次。

細胞分盤，首先將培養皿中細胞培養液吸出，加入 10 毫升的 phosphate buffered saline (PBS) (0.02 % KH₂PO₄、0.02 %KCl、0.8 % NaCl、0.216 % EDTA)緩衝液沖洗二次，再加入 1 毫升 trypsin (含 0.05% trypsin、0.02% EDTA)，能幫助細胞脫離培養皿底部。置於 37°C 作用二到三分鐘，使細胞脫離培養皿，如尚未完全脫離，可用手輕拍培養皿邊緣，以幫助細胞脫落。細胞脫落後，以 10 毫升含血清的細胞培養液，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，將上清液除去。再加入適量細胞培養液，待均勻混合後，以 2×10^6 顆細胞 /10 公分培養皿為培養密度種入培養皿中。

(二) 定量即時聚合酶連鎖反應 (Quantitative Real-time polymerase Chain Reaction; qPCR):

定量 PCR 的原理是利用在進行 PCR 時，同步偵測 PCR 產物，並利用偵測到的產物來回推樣品中原始的基因表現量。主要可分為兩種方式，分別是 TaqMan probe 與 SYBR green。本研究使用的是 SYBR Green 系統，其原理為將未鍵結到 DNA 上的 SYBR Green 螢光染劑微弱的螢光當作背景值，而結合到 DNA 雙股螺旋的 minor groove 上的 SYBR green 螢光值訊號會增強。當螢光染劑開始鑲嵌在被放大的基因片段時，螢光值訊號也會跟著相對的提高，若是 PCR 產物的濃度比較高，則可在較低 cycle 數時偵測到放大的螢光值；但是相對的，若 PCR 產物的

濃度較低，便會在較高 cycle 數時才能偵測到放大的螢光值，利用這樣的方法來做 DNA 的定量。

我們將六孔培養皿中加入 500 μ l 的 TRIzol，待細胞完全溶解之後，吸取溶液至 1.5 ml 微量離心管中靜置 5 分鐘。此後加入 100 μ l 氯仿(chloroform)並劇烈振盪 1 分鐘，並在室溫下靜置 3 分鐘。將微量離心管以 4 $^{\circ}$ C、13,200 rpm 離心 15 分鐘後，再將上清液吸取至新的 1.5 ml 微量離心管，並加入等量 isopropanol 混合靜置 10 分鐘。接著以 4 $^{\circ}$ C、11,000 rpm 離心十分鐘，此時可以看到 RNA pellet 沉澱在微量離心管的底部，此時將上清液倒掉，並加入 1ml 75 % 過濾酒精，再以 4 $^{\circ}$ C、7,500 rpm 離心五分鐘。最後將酒精倒掉，在室溫下將微量離心管風乾，加入 10-30 μ l DEPC 水來回溶 RNA，並儲存於-80 $^{\circ}$ C 冰箱。將萃取的 RNA pellet 取 1 μ l，並加入 99 μ l 的 DEPC 水後，用 Beckman DU-800 UV/Visible spectrophotometer 來測量 RNA 濃度，並注意使得 A260/280 數值介於 1.8~2.0 之間，以確保 RNA 的純度及品質。

使用 MMLV kit 將 RNA 轉成 cDNA，步驟如下所示：

- (1)於微量離心管中加入 1 μ l oligo dT、1 μ l 10 mM Dntp 與 1 μ g RNA，並加入 DEPC 水至 20 μ l，在混合後放入 PCR 機器 65 $^{\circ}$ C 五分鐘，使得 RNA denature 後再以 4 $^{\circ}$ C 1 分鐘。
- (2)之後加入 4 μ l 5X First-strand buffer 與 2 μ l 0.1M DTT 並放進 PCR 機器 37 $^{\circ}$ C 2 分鐘。
- (3)最後加入 1 μ l MMLV，放入 PCR 機器 37 $^{\circ}$ C 50 分鐘，70 $^{\circ}$ C 15 分鐘，此時產物即為 cDNA。將轉置完成的 cDNA 取 1 μ l，primer (F)及 primer (R) 各 0.5 μ l，SYBR Green mix 5 μ l，並以 DEPC 水加至 20 μ l。將樣本放置 Applied Biosystem StepOne 進行 10 分鐘 95 $^{\circ}$ C、10 秒鐘 95 $^{\circ}$ C、1 分鐘 60 $^{\circ}$ C、15 秒 95 $^{\circ}$ C、1 分鐘 60 $^{\circ}$ C 共 45 個循環，之後所得相對值，便是我們所求與控制組的相差倍數。

(三) 細胞存活率測定方法 (MTT assay):

細胞存活率測定方法的原理是因為在活的細胞裡，其粒線體內含有脫氫酵素(Dehydrogenase)，此酵素可以將黃色水溶性(3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT) 的 tetrazolium ring 還原切斷，而形成藍色的沉澱物 formazone。而在死亡的細胞裡並不具有脫氫酵素，因此亦不能形成藍色沉澱物 formazone。而我們最後再透過加入 DMSO 來溶出藍色沉澱物 formazone，然後以 ELISA reader 570 nm 來測量其吸光值，即可得知細胞存活率。

將成骨細胞分盤至 96 孔盤中，每一孔洞的細胞數平均約為 5000 顆，等細胞於孔盤中貼附好之後，抽去原有之培養液，並加入 serum-free 培養液。且分別加入不同濃度肉蓯蓉粗萃取物培養四十八小時後，加入 MTT 三十分鐘、再抽除培養液。並在每一孔洞加入 100 μ l DMSO，然後使用 ELISA reader 570nm 來測量吸光值。吸光值的計量方式是以生長百分比計算出不同濃度的藥物對生長的影響。

(四) 西方點墨法 (Western blotting) :

西方點墨法的原理是利用抗原抗體免疫反應的方法，來偵測我們想要觀察的某些特殊的蛋白質。方法為先將樣本混合物經過 polyacrylamide 電泳分離出蛋白，然後轉印到硝酸纖維膜上，接著以標記的抗體與之結合，再用顯影劑使之呈現在感光底片上。

成骨細胞經過 37°C 培養箱培養之後，將培養液抽掉，並以 PBS 沖洗兩次後抽掉，再加入 RIPA buffer 120 μ l 將細胞溶解之後，置放冰上 30 分鐘。接著以刮勺取下移置到 1.5 ml 微量試管中，以 4°C、13200 rpm 離心 15 分鐘後取上清液移置到新的 1.5 ml 微量試管中。此時取 10 μ l 樣本來測量蛋白質含量，方法是用分光光度計測定波長 570 nm 數值，經由蛋白標準液濃度來換算樣本蛋白質之濃度。之後取 30 μ g 等量蛋白質加入 5 倍 sample buffer，並以電動乾浴槽加熱 5 分鐘，爾後注入 10% SDS-PAGE 中分離蛋白質(以 120 voltage 電壓進行電泳一小時)。

分離後將膠體取出並轉印紙(Polyvinylidene fluoride membrane ; PVDF membrane)放齊，緊接著在轉置槽中注滿 Transfer buffer 後，在 4°C 冰上以 400 毫安培電流轉印二小時。之後將轉印紙置於含 5 % 脫脂奶粉由 TBS-T 配置成的 Blocking buffer 15 ml 在室溫中搖晃 1 小時。再與 TBS-T 稀釋之一級抗體 10 ml p-Akt,p-p65, p-p38, p-JNK, p-ERK, Akt,p65, p38, JNK, ERK 於 4°C 冰箱搖晃 1 小時至一天後，以 TBS-T 清洗四次，每次 15 分鐘。緊接著再給與 TBS-T 稀釋之二級抗體 10 ml HRP-mouse and rabbit 且於室溫中搖晃一小時後，同樣的以 TBS-T 清洗四次後，在暗房中加入 Enhanced chemiluminescence (ECL)顯像，用感光底片感光至 Band 出現。

(五) 礦化 (Mineralization):

培養的成骨細胞礦物質堆積可以用 von Kossa stain 或 Alizarin red stain 來作觀察。其中 von Kossa stain 是用銀離子與 phosphate 反應來觀察，而非直接與鈣結合染色。而 Alizarin red stain 可以直接對磷酸鈣沉積物做染色，因此本實驗以此染色法觀察成骨細胞礦化的現象。

將細胞培養到約九分滿，而約 2~3 天即更換培養液以及分化劑(β -glycophosphate 10 mM 與 Vitamin C 50 μ g/ml)，同時給予不同濃度的肉蓯蓉粗萃取物刺激。約十四天之後，以 PBS 清洗細胞，並以 10% 福馬林固定 15 分鐘、PBS 清洗，接著以 Alizarin red stain 來進行避光染色超過 1 小時以上，再用滅菌水清洗。將最後的細胞染色結果以照相系統拍照，再使用 10% cetylpyridinium chloride 溶下 Alizarin red，並用 ELISA reader 550 nm 吸光值來進行測量。

(六) 細胞移行實驗 (Migration assay):

細胞移行實驗是以 transwell (Costar, NY ; pore size, 8- μ m) 二十四孔盤為材料，在大約種植 2×10^4 的細胞量之後，將 200 μ l serum-free 培養液置於 transwell 的上層，並在下層加入不同濃度的肉蓯蓉粗萃取物及 300 μ l serum-free 培養液，置於 37°C、

5% CO₂ 培養箱中培養二十四小時。最後利用福馬林固定十五分鐘，接著以 0.05% crystal violet 染色十五分鐘。並以棉棒去除膜上層的細胞，用 PBS 清洗之後，剩下移行到膜下層吸附的細胞，此時以顯微鏡計數細胞總量，並將計得之量進行統計分析。

(七)傷口癒合實驗(Wound healing assay)：

MC3T3-E1 細胞取得之後，培養在 6 well 的培養皿，每一格 well 的細胞數為 1×10^5 /ml，等到培養皿上的細胞成長到 80% 到 90% 滿之後，再加入肉蓯蓉培養 24 到 48 小時。利用無菌的 P-200 pipette tip 在培養皿上水平刮出線性的直線，此時刮出來的直線上細胞也跟著被移除，形成簡易的傷口模型，並且在培養皿的底層以簽字筆畫出黑色直線做為記號，對於每次在作傷口癒合的分析時可以藉由直線的相對位置，準確定位觀測在位置都在同視野。之後放入培養箱中進行培養，每隔二十四小時及四十八小時利用 Nikon ECLIPSE Ti 倒立螢光顯微鏡（目鏡 CFWE10×/18；物鏡 E4×）觀察，並進行拍照。取得相片之後，利用軟體 NIS-Elements Basic Research 3.0 進行分析。其中要注意的是，因為從培養箱取出之細胞培養皿，與室溫有溫差的存在，因此導致培養皿上蓋會出現薄霧的現象，影響觀察。所以當薄霧出現的時候，可用手指在上蓋摩擦，以減少溫差，降低薄霧形成並儘速完成觀察與拍照。

(八)ALP activity assay

利用 p-Nitrophenyl phosphate 被鹼性磷酸酶分解後會變成最大吸光值 405 nm 的 p-nitrophenol 的特性，藉由偵測吸光值來定量鹼性磷酸酶的活性。

將經過肉蓯蓉粗萃取物刺激二十四小時後，取其培養 MC3T3-E1 成骨細胞株之上清液，加入 100 λ p-Nitrophenyl phosphate，混合後以 ELISA reader 測量 405nm 之數據並量化之。

(九) 冷光酵素 (Luciferase) 活性測定

將已經過十六至十八小時轉染 NF- κ B luciferase vector 的成

骨細胞株，再加肉蓯蓉粗萃取物培養二十四小時後，抽掉培養基，以 PBS 清洗兩次並抽出 PBS，接著加入 80 μ L 的 Reporter lysis buffer，小心輕柔的將細胞充分打散並均勻的將細胞刮取至 1.5 ml 離心管，並放置在冰上反應 10 分鐘，使得細胞完全被打破而將蛋白質釋出。再以 13200 rpm 將離心管離心三分鐘之後，取出 20 μ L 之上清液，並加入 80 μ L 的 luciferase substrate 使之迅速均勻混合，並以冷光儀測定測其 luciferase 活性，讀取冷光產量數值後，以百分率換算表示之。

(十) 統計分析:

本實驗的結果以 Sigma plot 統計軟體進行分析，實驗結果以成對 t 檢定 (paired t-test) 計算分析。數據結果以 mean \pm S.E. 表示各項數值， $p < 0.05$ 表示達到顯著性差異。



第四章 結果

(一) 十二種中藥粗萃取物在不同體積比之下對成骨細胞活性影響

BMP-2、ALP 與 OPN 的表現量與成骨細胞的活性有關，當這些蛋白表現量增加時，表示成骨細胞活性也跟著增加，進而影響細胞分化與礦化的能力，我們想要瞭解根據中醫理論所選擇出來的十二種中藥，包括女貞子、肉蓯蓉、骨碎補、山藥、淫羊藿、杜仲、補骨脂、菟絲子、山茱萸、續斷、巴戟天與熟地黃等，其對成骨細胞的影響是如何，因此我們利用 qPCR 來分析在經過十二種中藥粗萃取物刺激之後，MC3T3-E1 成骨細胞株的 BMP-2、ALP 與 OPN 等生化指標的 mRNA 表現量。由於一開始取得這些中藥粗萃取物之初，我們並不知道這些中藥粗萃取物的濃度，於是我們便將這些中藥粗萃取物分別以 1：100、1：500 與 1：1000 三種不同體積比來刺激 MC3T3-E1 成骨細胞株，實驗初步結果顯示女貞子(圖 4.1)、肉蓯蓉(圖 4.2)、骨碎補(圖 4.3)和山藥(圖 4.4)等四種中藥粗萃取物，隨著體積比的不同，BMP-2、ALP 與 OPN 三種指標的表現量呈現一致性的增加，且達到統計上顯著性差異，而其它進入初步篩選的藥物如淫羊藿(圖 4.5)、杜仲(圖 4.6)、補骨脂(圖 4.7)、菟絲子(圖 4.8)、山茱萸(圖 4.9)、續斷(圖 4.10)巴戟天(圖 4.11)與熟地(圖 4.12)等粗萃取物，其三種生化指標並無一致性的增加現象。

(二) 肉蓯蓉粗萃取物增加 ALP、BMP-2 與 OPN 的表現

在女貞子、肉蓯蓉、骨碎補與山藥等四種中藥粗萃取物之中，選擇肉蓯蓉粗萃取物做進一步的探討，我們在取得肉蓯蓉粗萃取物的乾重資料之後，換算出三種體積比的濃度由低而高分別是 13、26 與 130 $\mu\text{g/ml}$ ，而細胞在不同濃度肉蓯蓉粗萃取物的刺激下，隨著濃度的增加，ALP、BMP-2 與 OPN 三者皆呈現增加的趨勢(圖 4.13)。

(三) 肉蓯蓉粗萃取物增加成骨細胞的礦化，而非細胞增生和移行

在骨重塑作用中，骨細胞必須移行到需要成骨的部位來進

行礦化作用，因此我們希望知道肉蓯蓉萃取物是否會加強成骨細胞的移行聚集反應，進而強化成骨作用，因此利用 Migration assay 與 Wound healing assay 來分析 MC3T3-E1 細胞株的移行情況。在 Migration assay 中發現，給予不同濃度的肉蓯蓉粗萃取物 (0, 6.5, 13, 18.5, 26, 130 $\mu\text{g/ml}$) 刺激，移行的情況並沒有明顯的增加 (圖 4.14A)。此外在 Wound healing assay 中，以不同濃度的肉蓯蓉粗萃取物 (6.5, 13, 26, 130 $\mu\text{g/ml}$) 刺激 MC3T3-E1 成骨細胞株，經過 24 與 48 小時後，觀察到並不會增加細胞的移行 (圖 4.14C、圖 4.14D)。

此外我們想要瞭解，肉蓯蓉的粗萃取物，是否會促進成骨細胞的增生，於是我們利用 MTT assay 來分析 MC3T3-E1 細胞株的增生表現，在經由不同濃度的肉蓯蓉粗萃取物 (0, 6.5, 13, 18.5, 26, 130 $\mu\text{g/ml}$) 刺激後，細胞增生的現象並無明顯的增加 (圖 4.14B)。

在造骨的過程之中，成骨細胞必須經由礦化的過程，才能夠使得骨頭硬化，在給予 MC3T3-E1 細胞株不同濃度的肉蓯蓉粗萃取物 (0, 6.5, 13, 18.5, 26, 130 $\mu\text{g/ml}$) 與分化劑 (β -glycophosphate 10 mM 及 Vitamin C 50 $\mu\text{g/ml}$) 之後，利用 Alizarin red stain 進行分析，同時並測量 ALP 活性。由實驗結果發現，ALP 活性隨著肉蓯蓉粗萃取物濃度的增加有增強的趨勢 (圖 4.15A)，而成骨細胞的礦化能力亦隨著肉蓯蓉粗萃取物之濃度增加而有增強的現象，在肉蓯蓉粗萃取物濃度 130 $\mu\text{g/ml}$ 的刺激下，礦化反應最具明顯 (圖 4.15B)，且達到顯著性差異 ($p < 0.05$)。

(四) ERK、JNK 和 p38 參與在肉蓯蓉粗萃取物的訊息傳導路徑中

MAPKs(mitogen-activated protein kinase) 包含了 extracellular signal-related kinase (ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK) 和 p38 三個成員⁵⁴。之前的研究顯示，活化 MAPK pathway 會刺激成骨細胞的 osteocalcin mRNA 表現⁵⁵，p38 在成骨細胞的分化裡扮演了重要的角色⁵⁶，此外 ERK、JNK 也在成

骨細胞分化中扮演重要角色^{57,58}。我們以 Western blot 進行分析發現,再給予肉蓯蓉粗萃取物刺激之後,發現 p-ERK(圖 4.16A) 與 p-JNK(圖 4.17A) 在十五分鐘, p-p38(圖 4.18A) 在十分鐘左右開始有增強的現象出現,而 ERK、JNK 與 p38 在各時間點均無增強的現象,表示成骨細胞在受到肉蓯蓉萃取物的刺激之後,細胞內的 ERK、JNK 與 p38 的磷酸化會增加。

此外我們以 qPCR 進行分析,當我們分別給予三種 MAP kinase 的抑制劑 U0126(圖 4.16B)、SP600125(圖 4.17B)、SB203580(圖 4.18B) 三十分鐘之後,再以肉蓯蓉粗萃取物刺激,可以發現不管是 ALP、BMP-2 與 OPN 基因的表現量都有大幅降低的現象,此外若轉染 DN-ERK(圖 4.16C)、DN-JNK(圖 4.17C) 與 DN-p38(圖 4.18C) 之後,也可發現 ALP、BMP-2 與 OPN 基因的表現量也有明顯被減少,且達到顯著性差異 ($p < 0.05$)。

(五) Akt 參與肉蓯蓉粗萃取物的訊息傳導路徑中

有研究顯示,Akt 參與了成骨細胞的分化與骨頭的形成⁵⁹。我們以 Western blot 進行分析發現,再給予肉蓯蓉粗萃取物刺激之後, p-Akt 在三十分鐘左右有增強的現象,而 β -actin 無明顯的變化(圖 4.19A),表示成骨細胞在受到肉蓯蓉粗萃取物的刺激之後,細胞內的 Akt 磷酸化會增加。

接著我們使用 qPCR 進行分析。當我們給予 Akt inhibitor 三十分鐘後,再以肉蓯蓉粗萃取物刺激,可以發現不管是 ALP、BMP-2 與 OPN 基因的表現量都有大幅降低的現象(圖 4.19B),此外若轉染 DN-Akt,也可發現 ALP、BMP-2 與 OPN 基因的表現量也有明顯被減少(圖 4.19C),且達到顯著性差異 ($p < 0.05$)。

(六) NF- κ B 參與在肉蓯蓉粗萃取物的訊息傳導路徑中

在哺乳類動物裡,NF- κ B 由 RelA (p65), p50, p52, RelB 與 c-Rel 等五個成員所組成^{60,61}。Western blot 顯示,MC3T3-E1 細胞株經過肉蓯蓉粗萃取物的刺激之後, p-p65 在十分鐘左右

開始有增強的趨勢 (圖 4.20A)，顯示了肉蓯蓉粗萃取物活化了 p65 磷酸化表現。此外我們發現以肉蓯蓉粗萃取物刺激的 MC3T3-E1 細胞株，其 ALP、BMP-2 與 OPN 基因的表現量都有增加，而在使用 NF- κ B 抑制劑 PDTC 與 TPCK 後，這些基因的表現量都有明顯的減少 (圖 4.20B)，且達到顯著性差異 ($p < 0.05$)。

(七) 肉蓯蓉粗萃取物透過 Akt、MAPK、NF- κ B 影響成骨細胞礦化

我們在礦化反應操作時，於每次加入肉蓯蓉粗萃取物 (26 μ g/ml) 之前三十分鐘先加入抑制劑，Akt inhibitor、U0126、SP600125、SB203580、PDTC 以及 TPCK，最後觀察到礦化的現象皆有明顯的被抑制 (圖 4.21A)，且於量化後可發現 (圖 4.21B)，抑制的情況皆達到顯著性差異 ($p < 0.05$)。此外我們測試了 ALP activity，當加入抑制劑之後的 MC3T3-E1 細胞株，其 ALP activity 都有明顯的減少 (圖 4.21C)，且達到顯著性差異 ($p < 0.05$)。

(八) 肉蓯蓉粗萃取物刺激使成骨細胞 NF- κ B 活性增加

當細胞受到刺激之後，會活化許多蛋白，最後影響到 NF- κ B，使得 p65 轉位進入細胞核之後，增加 ALP、BMP-2 與 OPN 基因的表現，進而強化造骨功能。

我們將 MC3T3-E1 成骨細胞株轉染 NF- κ B luciferase vector 當作 NF- κ B 活化的指標。我們發現經過肉蓯蓉粗萃取物刺激的細胞在二十四小時之後，NF- κ B luciferase 活性有增強的趨勢。此外若同時再給予 Akt-inhibitor、U0126、SB203580、SP600125、PDTC 與 TPCK 等抑制劑之後，此一活化現象即被減低 (圖 22A)，且達到顯著性差異 ($p < 0.05$)。此外我們將細胞轉染 DN-Akt、DN-JNK、DN-ERK 與 p38 之後，給予肉蓯蓉粗萃取物刺激，亦發現 NF- κ B luciferase 活性也有減少的現象 (圖 22B)，且達到顯著性差異 ($p < 0.05$)。

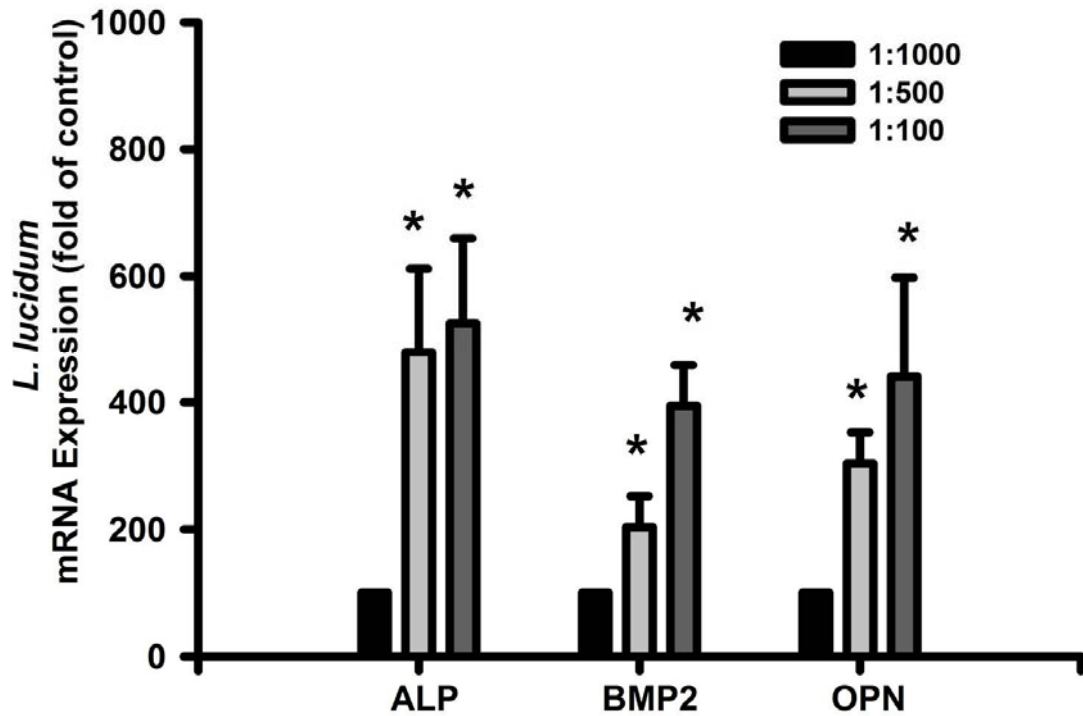


圖 4.1 女貞子粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、BMP-2 與 OPN 之變化(* $p < 0.05$, compared with control)

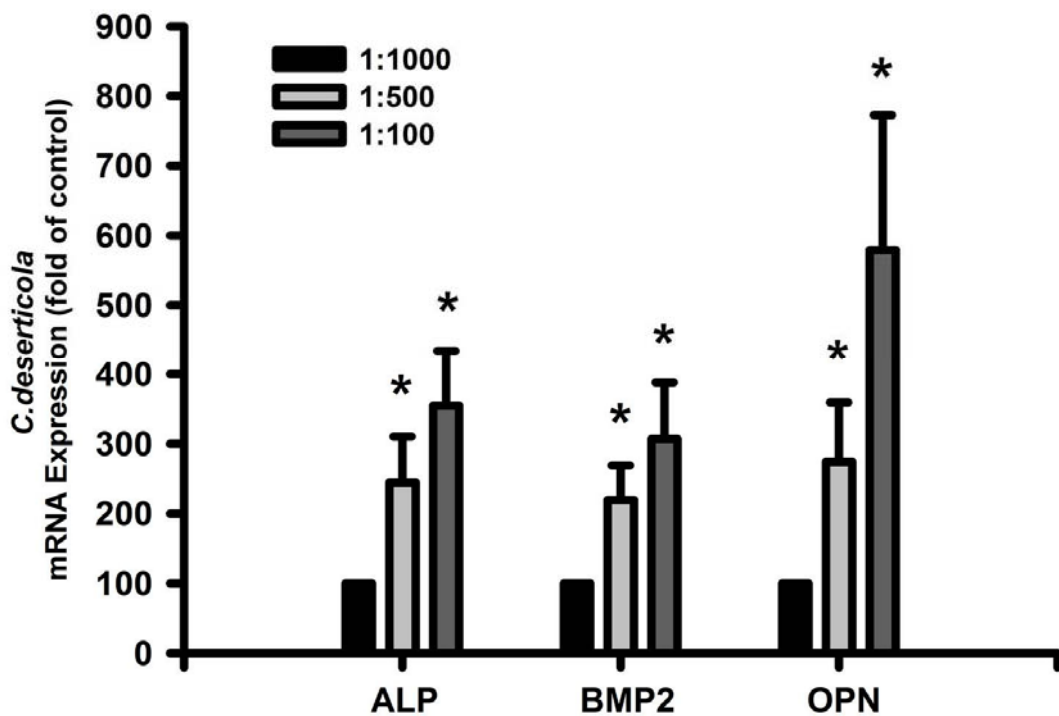


圖 4.2 肉蓯蓉粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、BMP-2 與 OPN 之變化(* $p < 0.05$, compared with control)

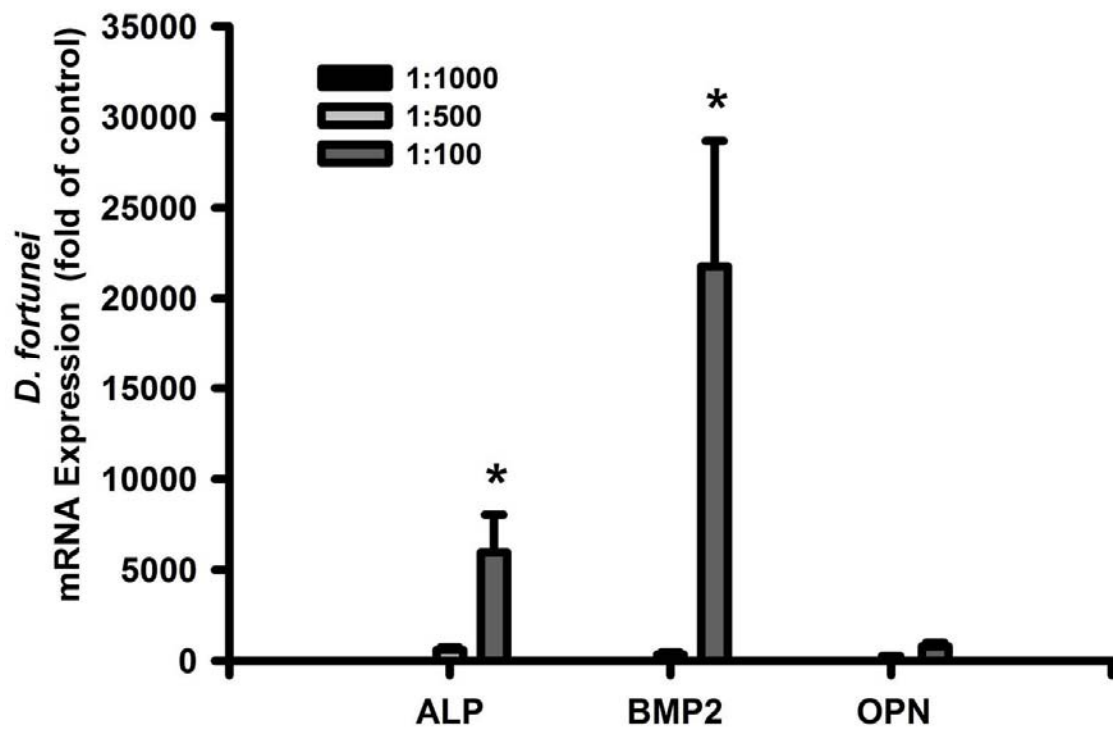


圖 4.3 骨碎補粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、BMP-2 與 OPN 之變化(* $p < 0.05$, compared with control)

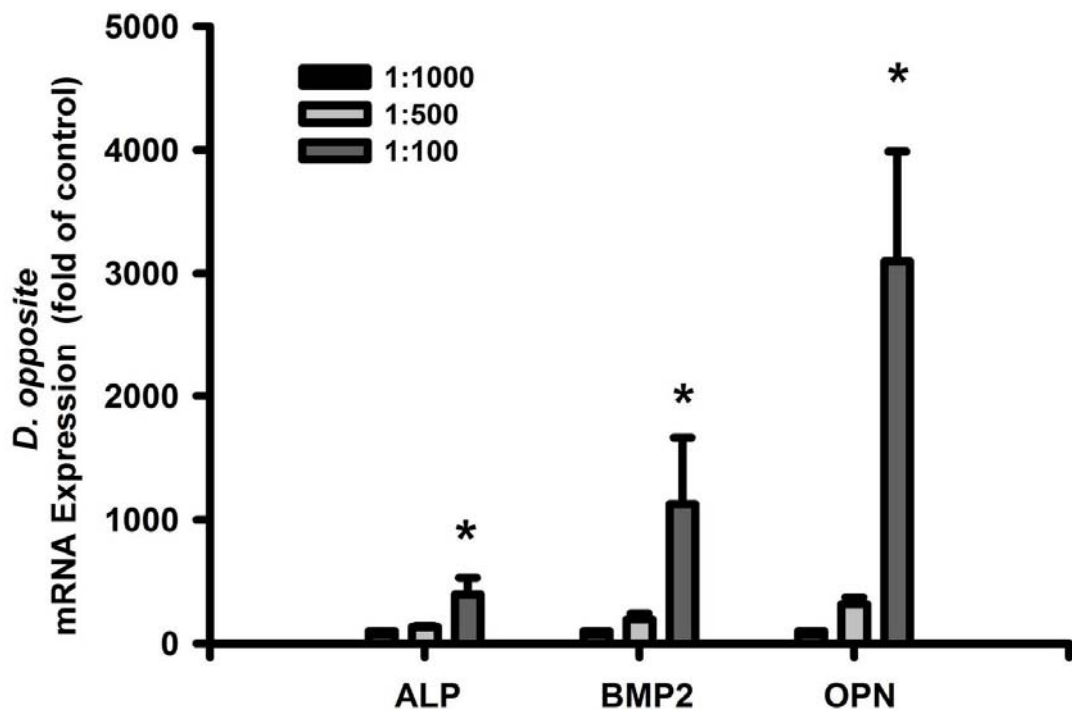


圖 4.4 山藥粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、BMP-2 與 OPN 之變化(* $p < 0.05$, compared with control)

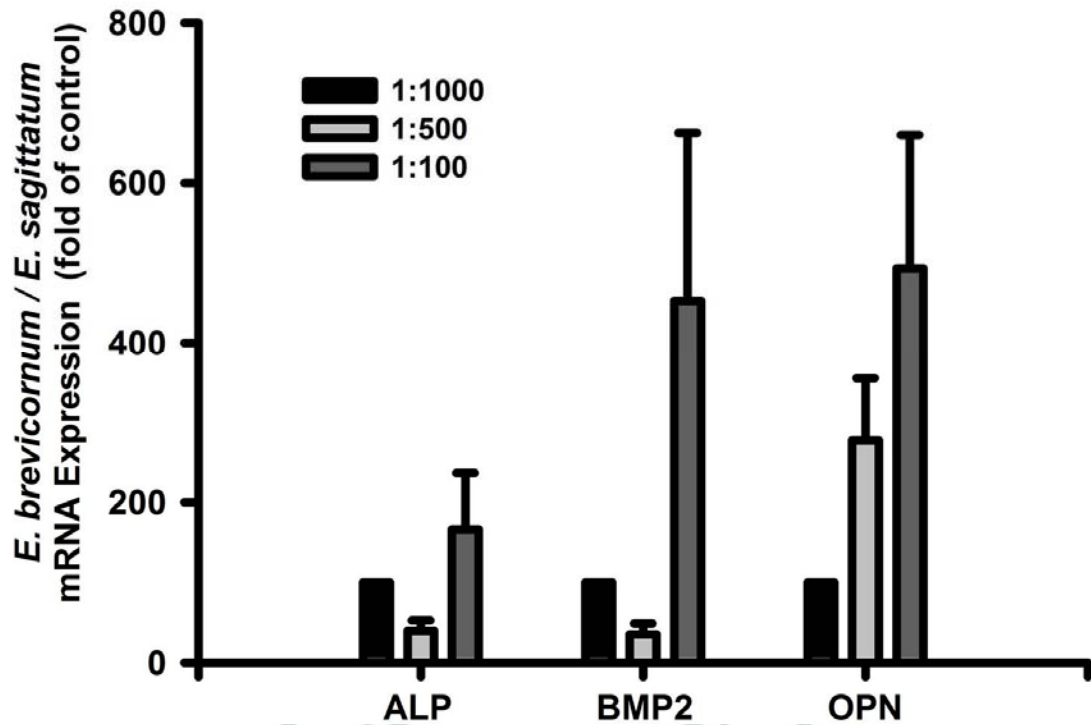


圖 4.5 淫羊藿粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、BMP-2 與 OPN 之變化(* $p < 0.05$, compared with control)

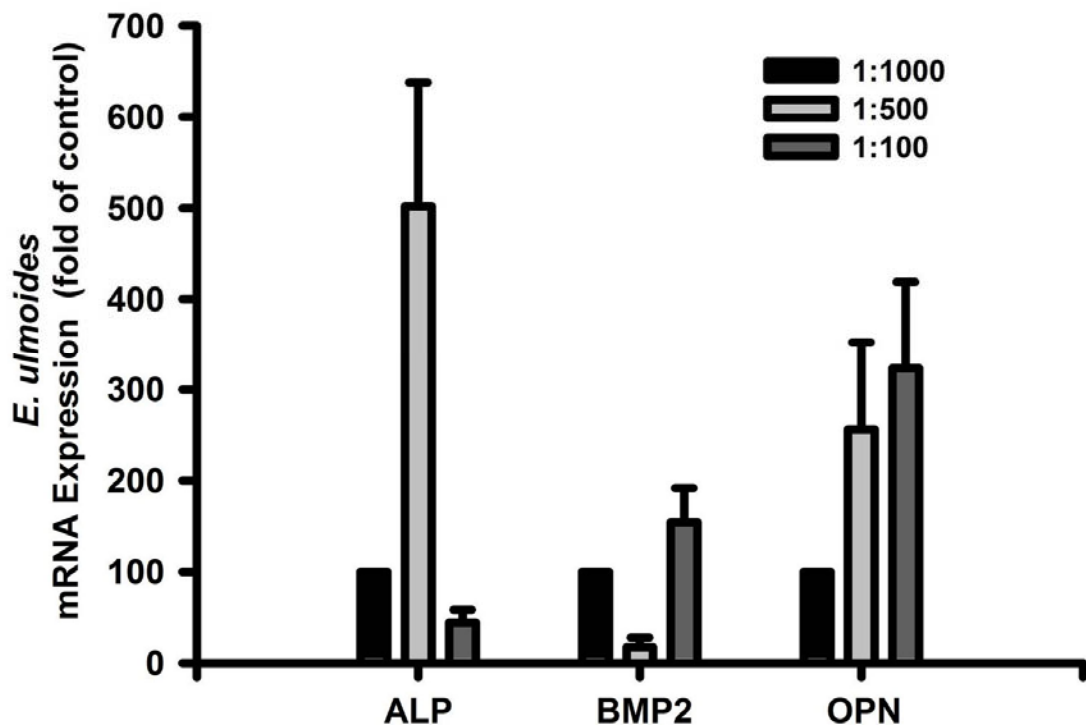


圖 4.6 杜仲粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、BMP-2 與 OPN 之變化(* $p < 0.05$, compared with control)

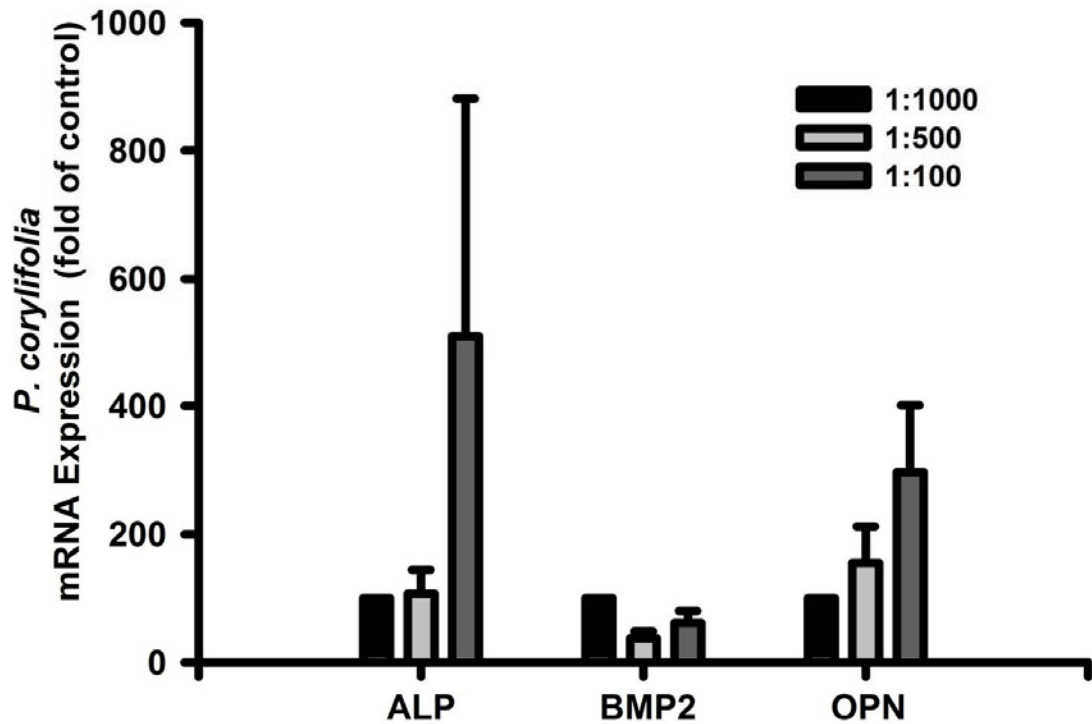


圖 4.7 補骨脂粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、BMP-2 與 OPN 之變化(* $p < 0.05$, compared with control)

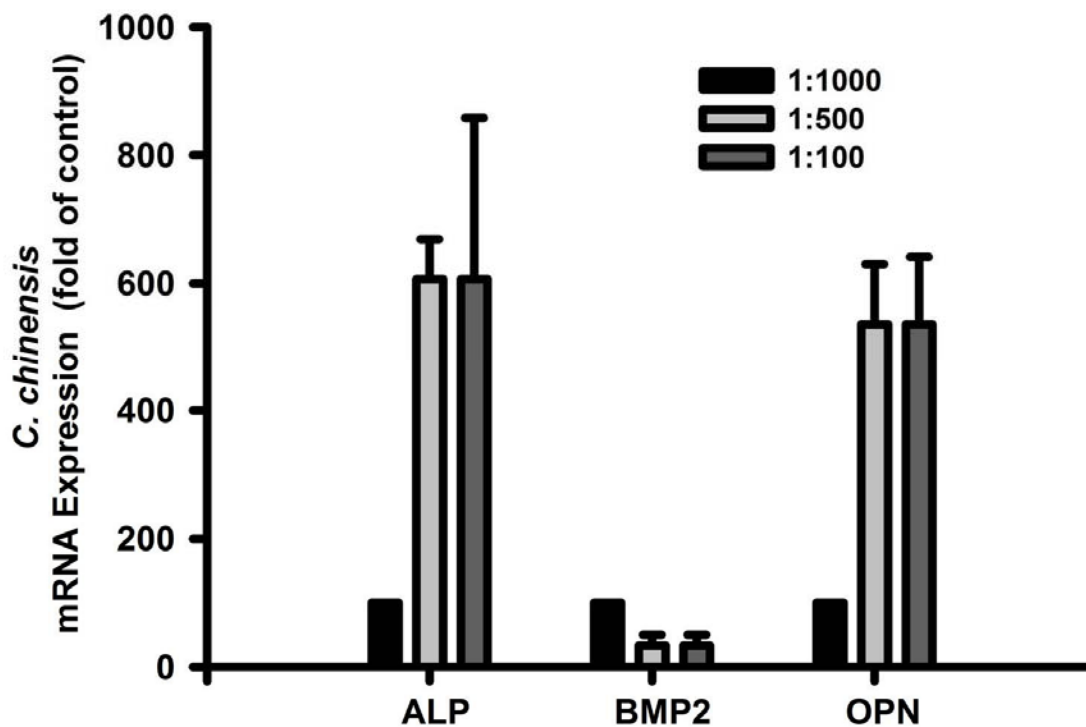


圖 4.8 菟絲子粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、BMP-2 與 OPN 之變化(* $p < 0.05$, compared with control)

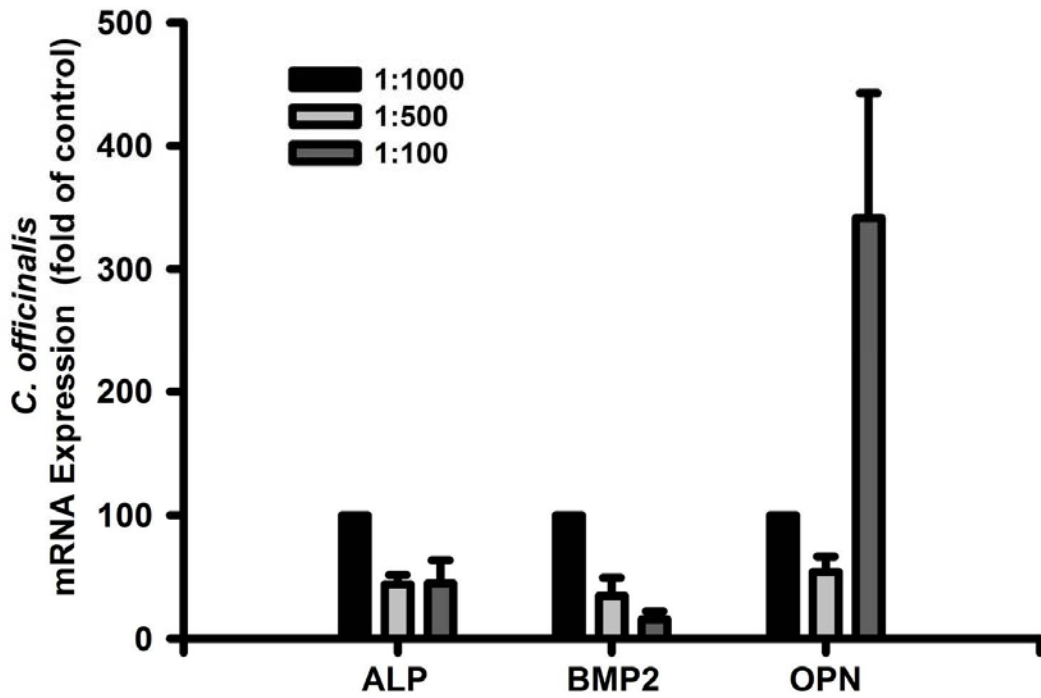


圖 4.9 山茱萸粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、BMP-2 與 OPN 之變化(* $p < 0.05$, compared with control)

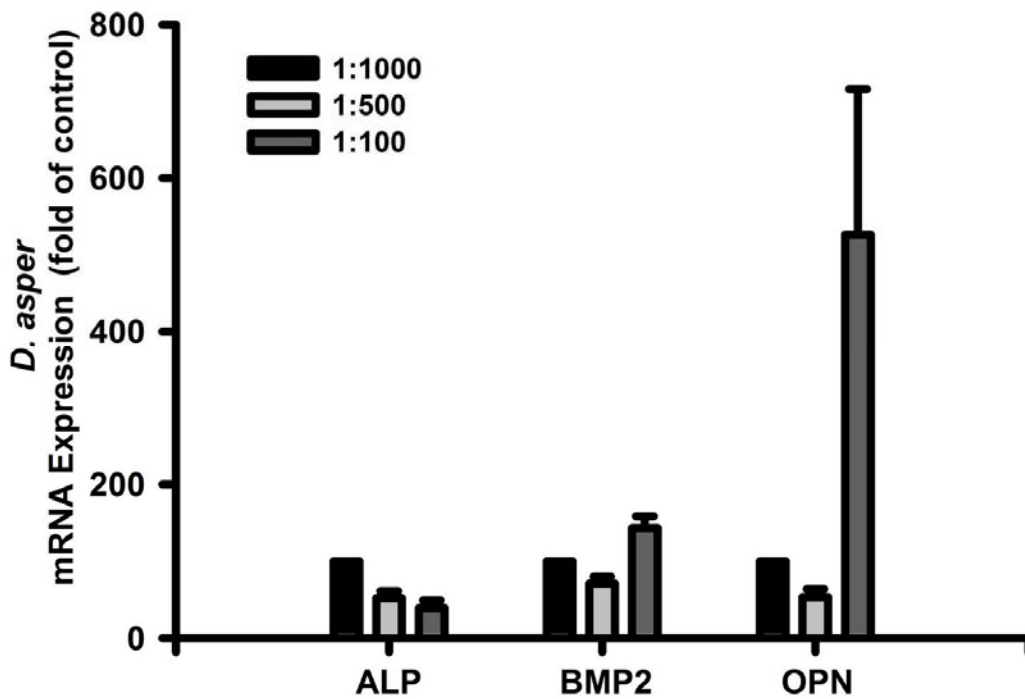


圖 4.10 續斷粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、BMP-2 與 OPN 之變化(* $p < 0.05$, compared with control)

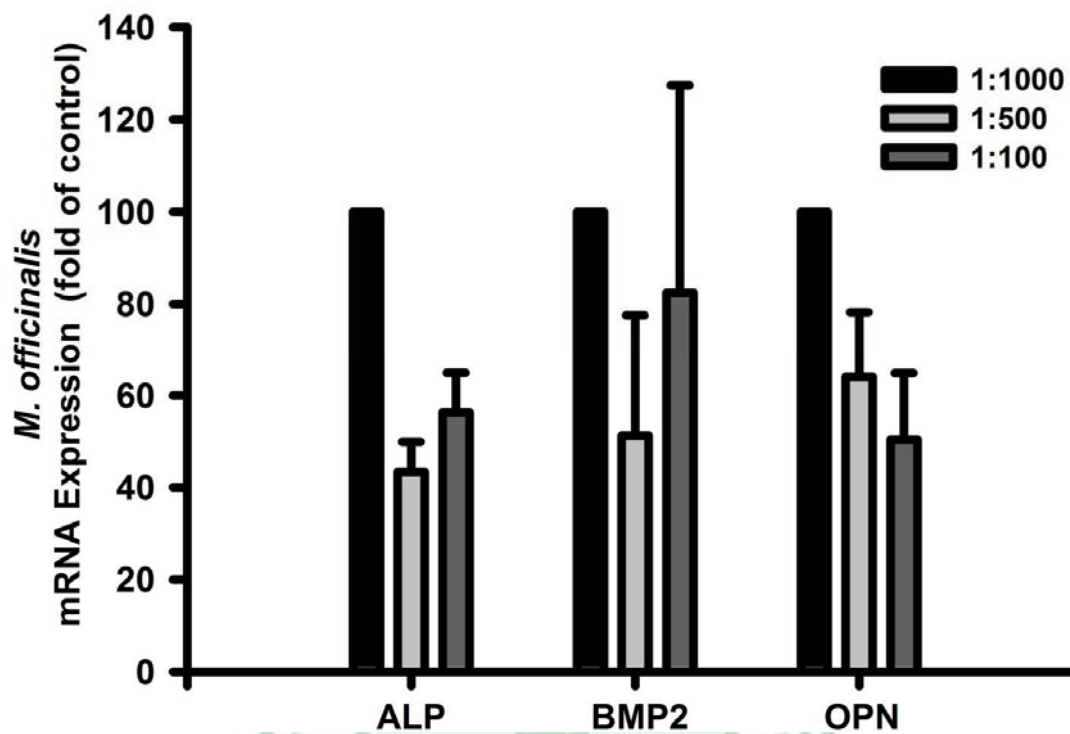


圖 4.11 巴戟天粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、BMP-2 與 OPN 之變化(* $p < 0.05$, compared with control)

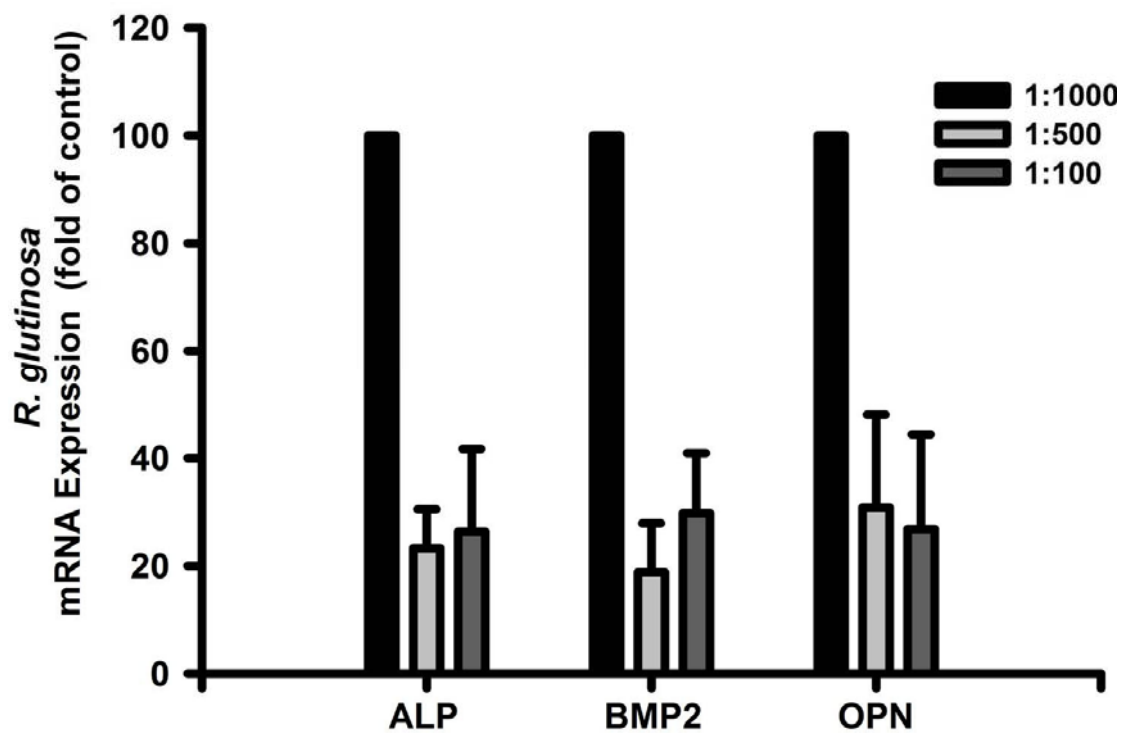


圖 4.12 熟地黃粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、BMP-2 與 OPN 之變化(* $p < 0.05$, compared with control)

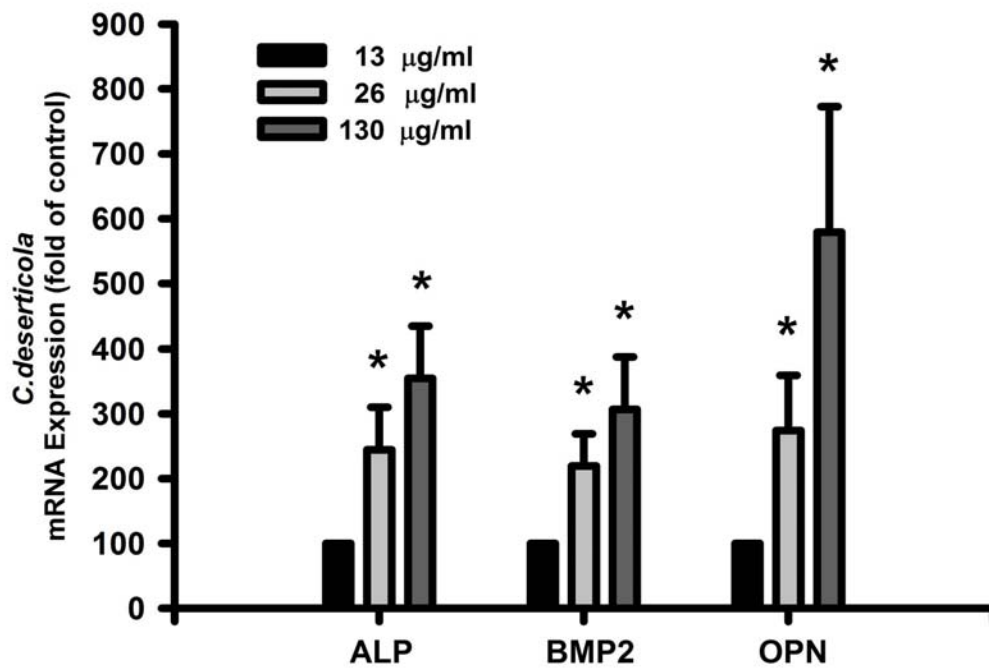


圖 4.13 不同濃度下肉蓯蓉粗萃取物對成骨細胞活性指標之影響
 肉蓯蓉粗萃取物刺激成骨細胞後，以 qPCR 測量得 ALP、BMP-2 與
 OPN 之變化(* $p < 0.05$, compared with control)

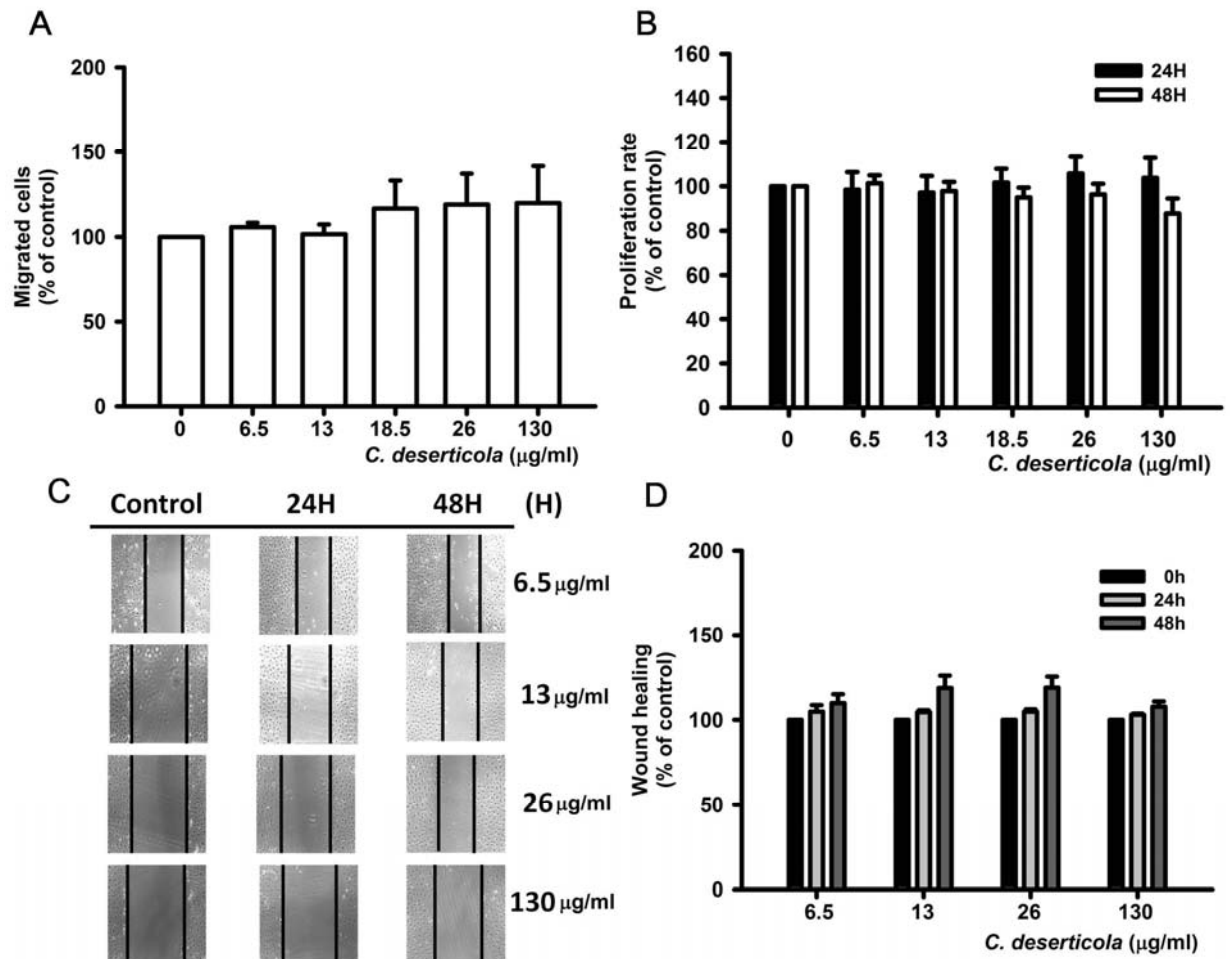


圖 4.14 肉蓯蓉粗萃取物不影響成骨細胞增生或移行能力 (A)Migration assay 測量不同濃度之肉蓯蓉粗萃取物刺激下成骨細胞的移行能力(B)MTT assay 測量不同濃度之肉蓯蓉粗萃取物刺激下成骨細胞的增生率(C)(D)Wound healing assay 測量不同濃度之肉蓯蓉粗萃取物刺激下，在不同時間點觀察成骨細胞的移行能力，並量化之。

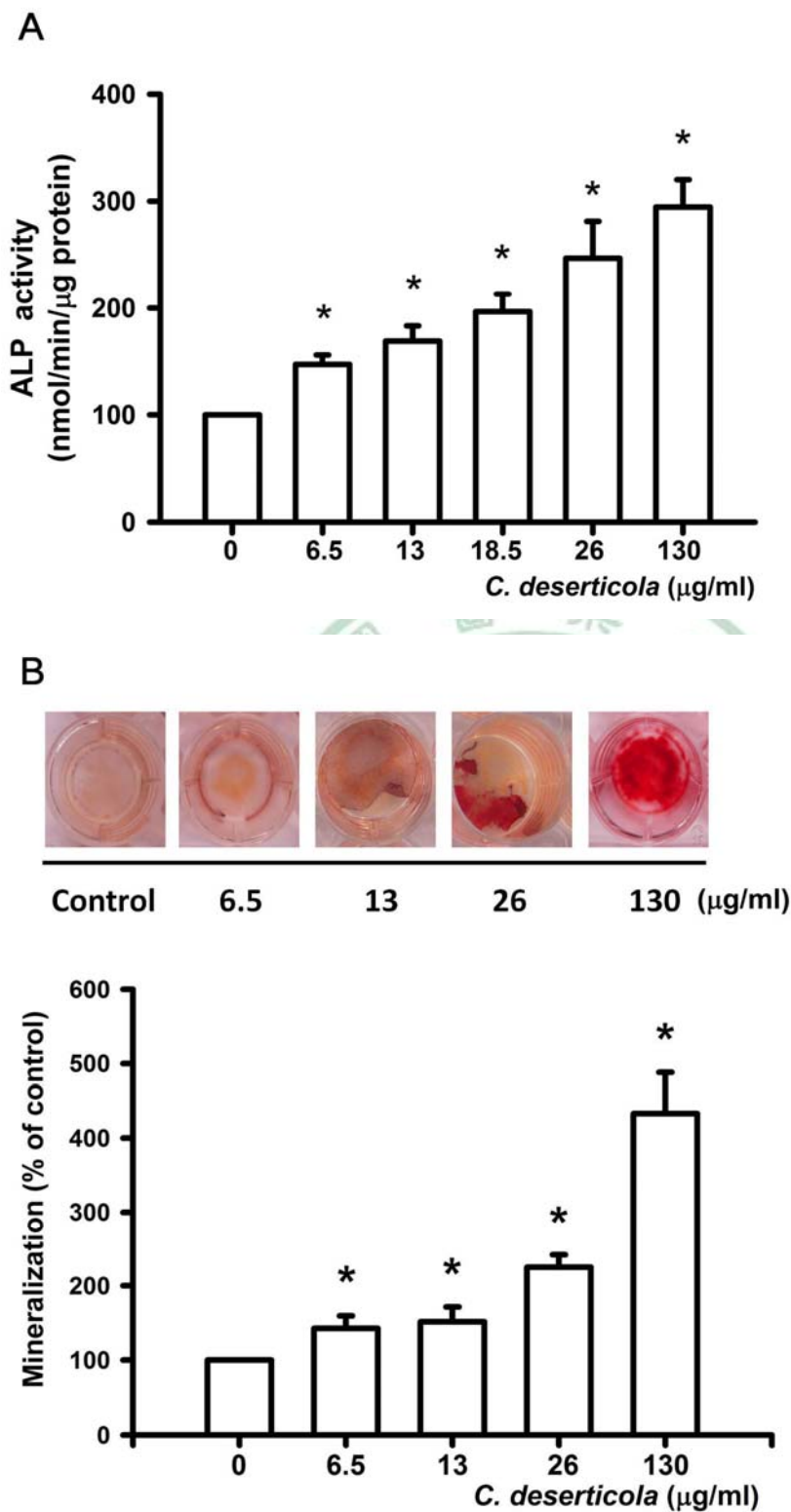


圖 4.15 肉蓯蓉粗萃取物增強成骨細胞礦化能力(A)不同濃度肉蓯蓉粗萃取物刺激成骨細胞所影響之 ALP 活性(B)成骨細胞在不同濃度之肉蓯蓉粗萃取物刺激下的礦化反應。(* $p < 0.05$, compared with control)

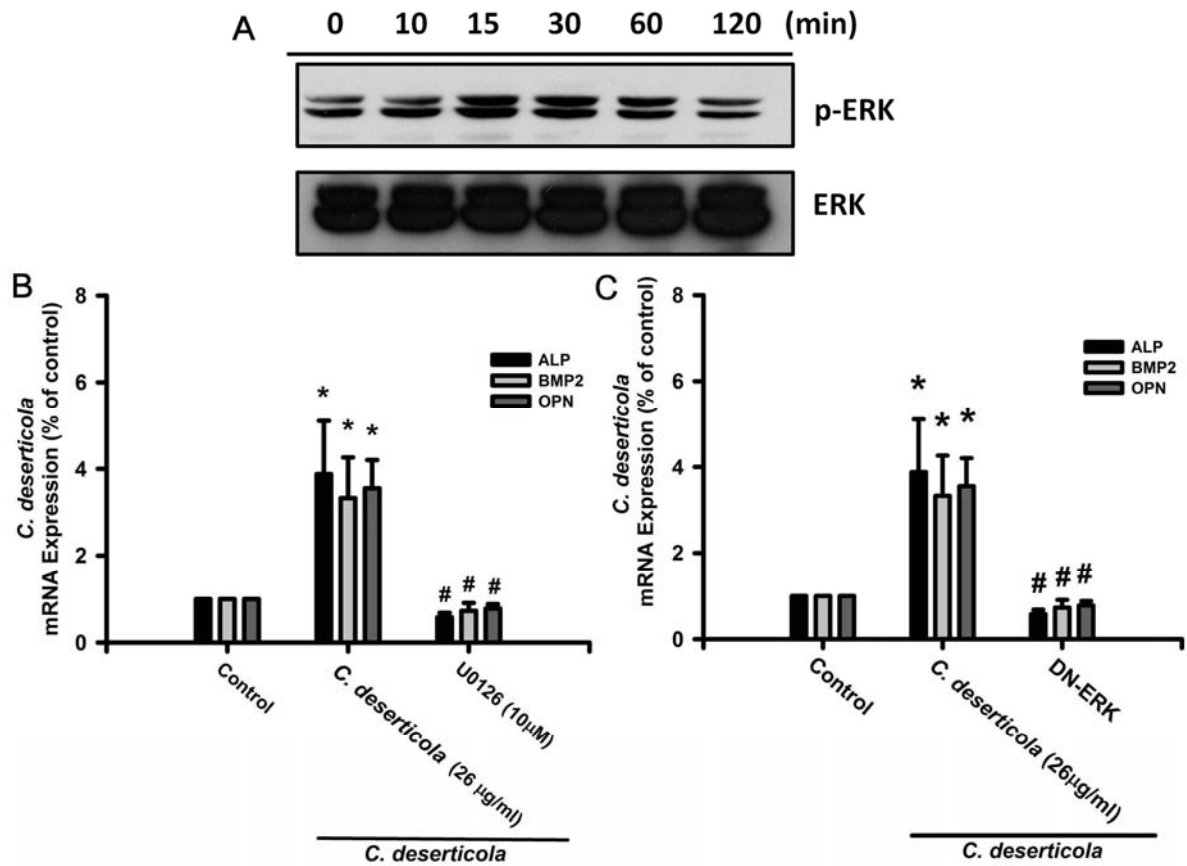


圖 4.16 肉蓯蓉粗萃取物透過 ERK 影響細胞活性 (A) Western blot 檢視不同時間點，肉蓯蓉粗萃取物對成骨細胞 p-ERK 與 ERK 之影響(B) 以 qPCR 測量加入 ERK 抑制劑 U0126 之後，ALP、BMP-2 與 OPN 基因表現量變化 (C) 以 qPCR 測量將成骨細胞轉染 DN-ERK 之後，ALP、BMP-2 與 OPN 基因表現量變化(* $p < 0.05$, compared with control ; # $p < 0.05$, compared with treatment)

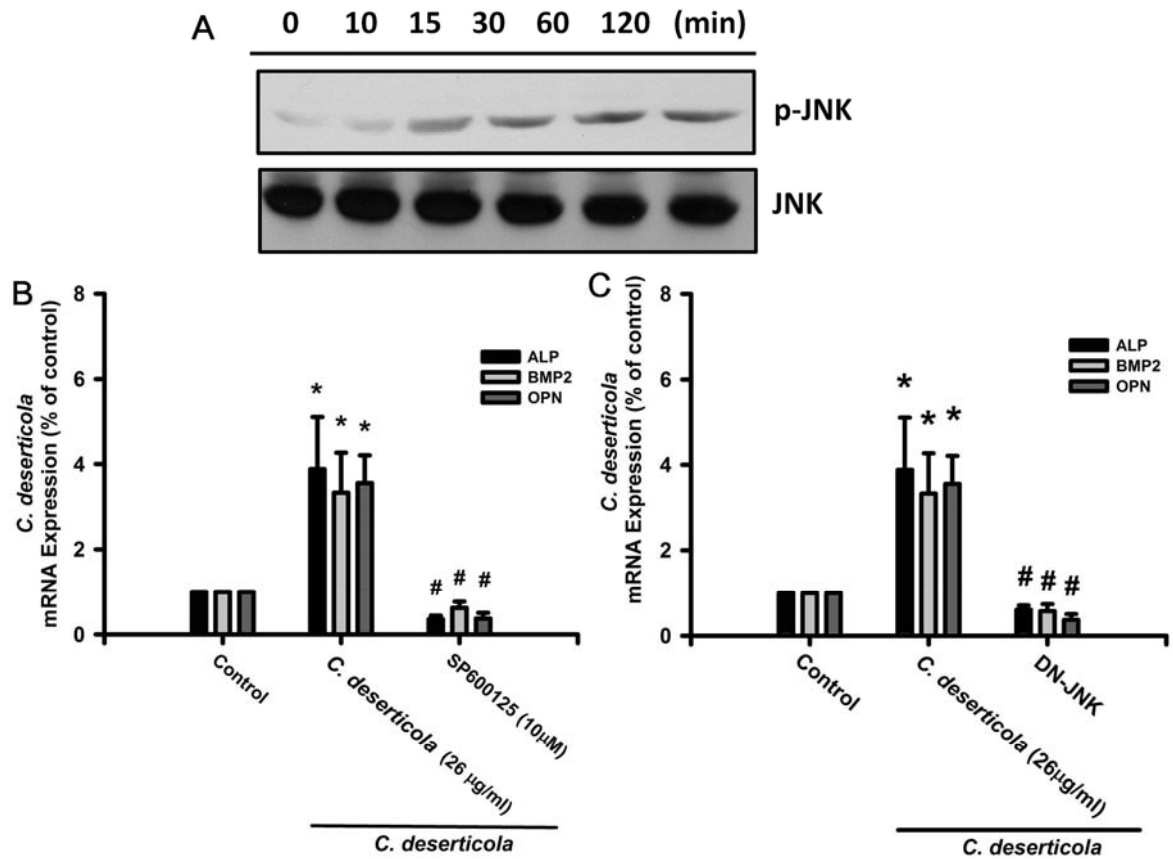


圖 4.17 肉蓯蓉粗萃取物透過 JNK 影響細胞活性 (A) Western blot 檢視不同時間點，肉蓯蓉粗萃取物對成骨細胞 p-JNK 與 JNK 之影響(B) 以 qPCR 測量加入 JNK 抑制劑 SP600125 之後，ALP、BMP-2 與 OPN 基因表現量變化 (C) 以 qPCR 測量將成骨細胞轉染 DN-JNK 之後，ALP、BMP-2 與 OPN 基因表現量變化(* $p < 0.05$, compared with control ; # $p < 0.05$, compared with treatment)

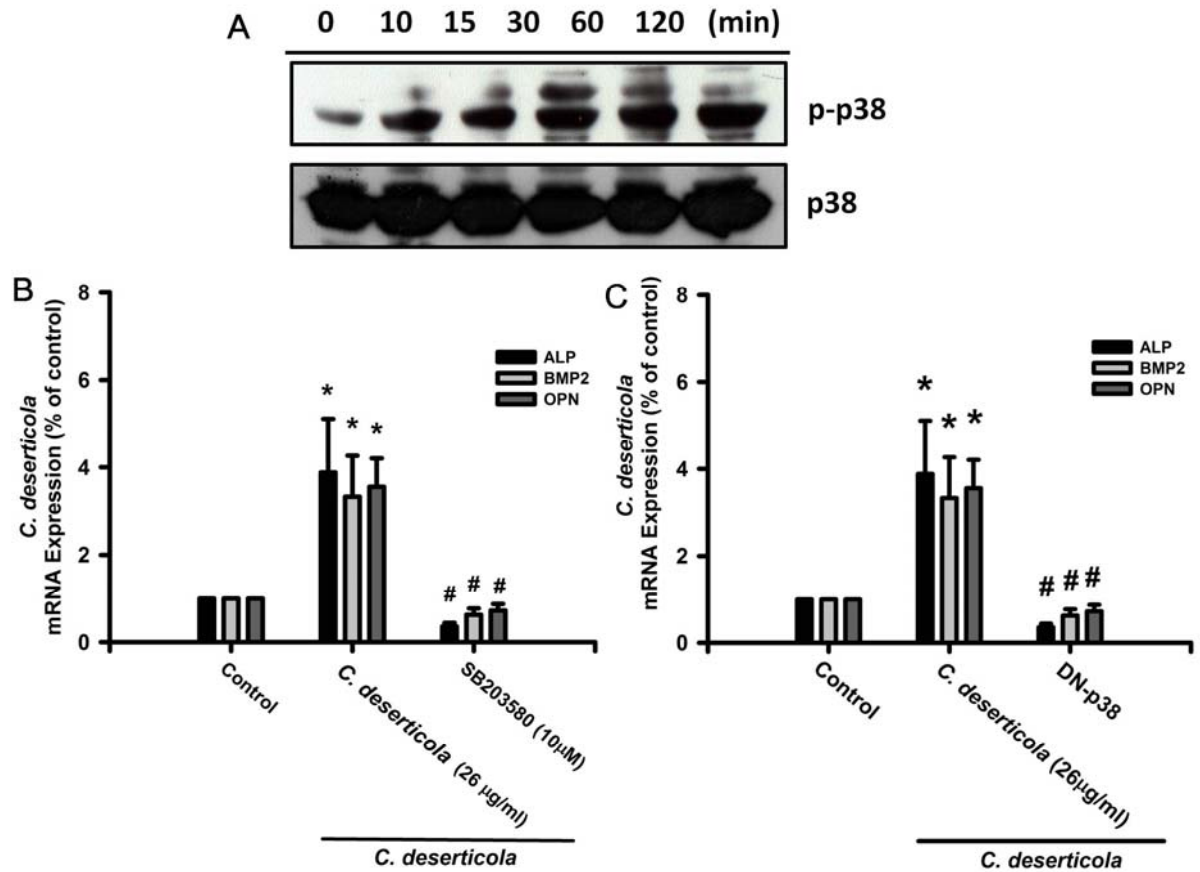


圖 4.18 肉蓯蓉粗萃取物透過 p38 影響細胞活性 (A) Western blot 檢視不同時間點，肉蓯蓉粗萃取物對成骨細胞 p-p38 與 p38 之影響(B)以 qPCR 測量加入 p38 抑制劑 SB203580 之後，ALP、BMP-2 與 OPN 基因表現量變化 (C)以 qPCR 測量將成骨細胞轉染 DN-p38 之後，ALP、BMP-2 與 OPN 基因表現量變化(* $p < 0.05$, compared with control ; # $p < 0.05$, compared with treatment)

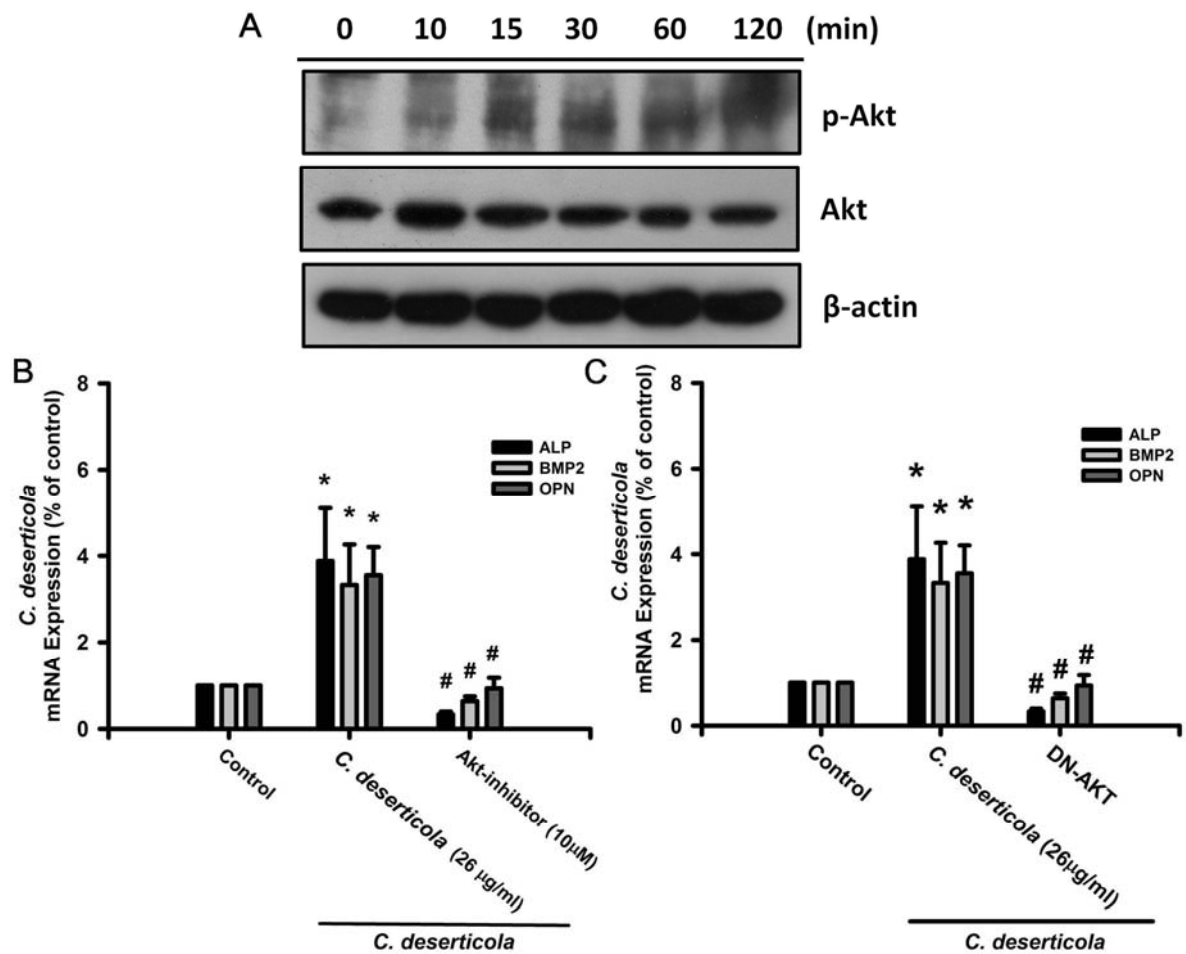


圖 4.19 肉蓯蓉粗萃取物透過 Akt 影響細胞活性 (A) Western blot 檢視不同時間點，肉蓯蓉粗萃取物對成骨細胞 p-Akt 與 Akt 之影響(B)以 qPCR 測量加入 AKT 抑制劑之後，ALP、BMP-2 與 OPN 基因表現量變化 (C)以 qPCR 測量將成骨細胞轉染 DN-Akt 之後，ALP、BMP-2 與 OPN 基因表現量變化(* $p < 0.05$, compared with control ; # $p < 0.05$, compared with treatment)

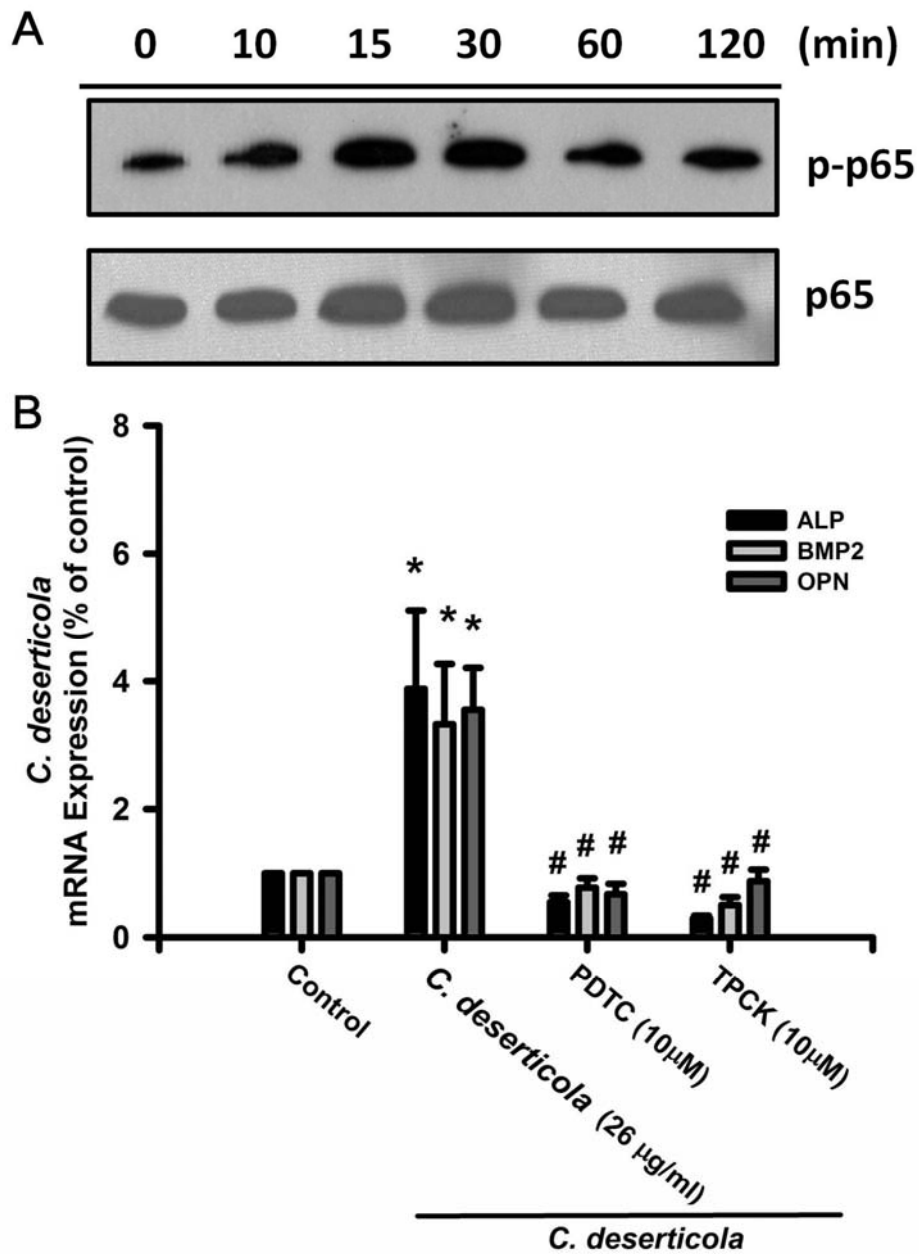


圖 4.20 NF- κ B 家族之 p65 參與肉蓯蓉粗萃取物之活化路徑 (A) Western blot 檢視不同時間點，肉蓯蓉粗萃取物對成骨細胞 p-p65 與 p65 之影響(B)以 qPCR 測量加入 NF- κ B 抑制劑 PDTC 與 TPCK 之後，ALP、BMP-2 與 OPN 基因表現量變化(* $p < 0.05$, compared with control ; # $p < 0.05$, compared with treatment)

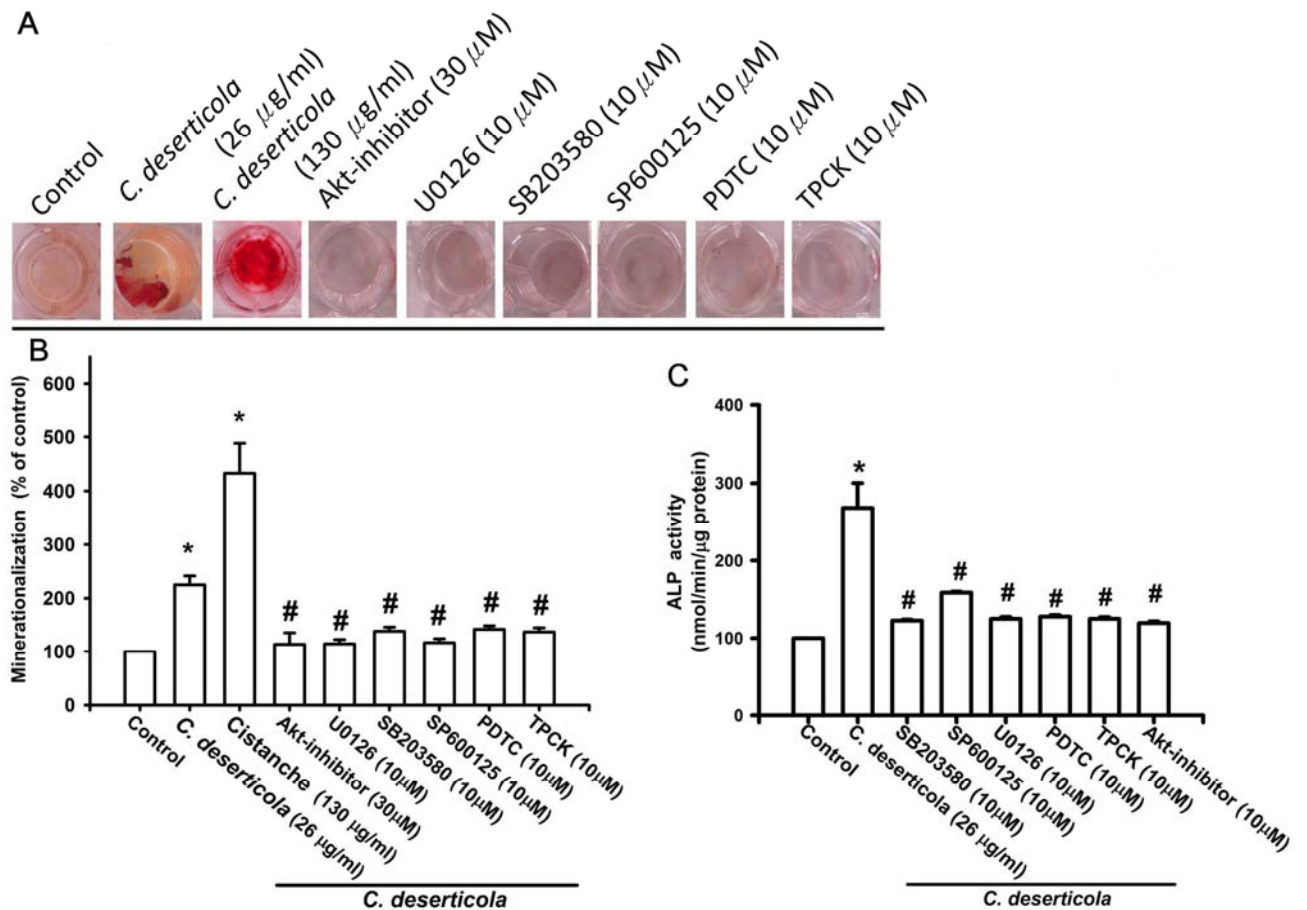


圖 4.21 抑制劑對成骨細胞礦化與 ALP 活性之影響 (A)(B) 以肉蓯蓉粗萃取物刺激成骨細胞並加入抑制劑之後，成骨細胞礦化反應(C) 以肉蓯蓉粗萃取物刺激成骨細胞並加入抑制劑之後，成骨細胞 ALP activity 反應 (* $p < 0.05$, compared with control ; # $p < 0.05$, compared with treatment)

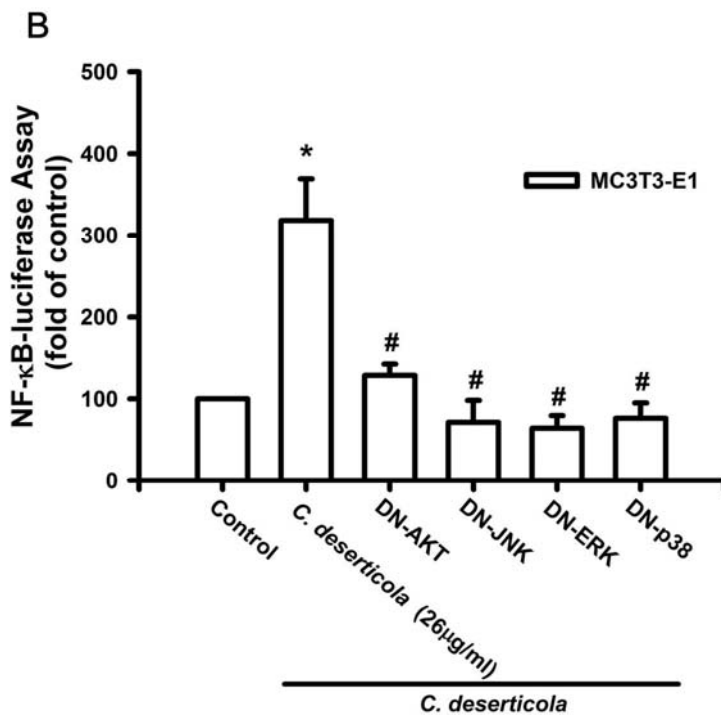
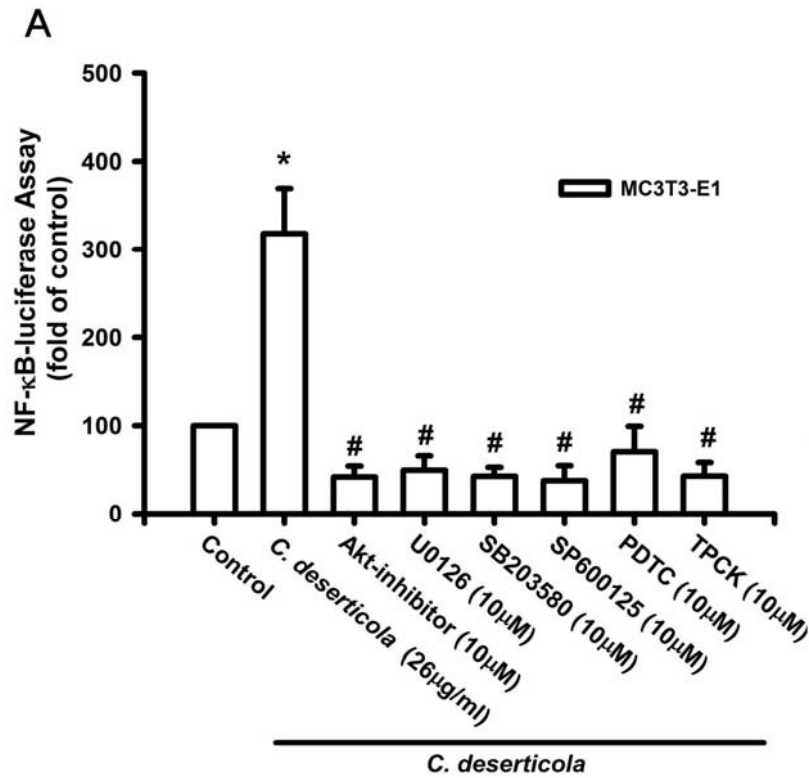


圖 4.22 轉錄因子 NF-κB 參與成骨細胞活化路徑 (A) 以 NF-κB luciferase assay 測量成骨細胞經肉蓯蓉粗萃取物刺激並加入抑制劑之後，成骨細胞之反應 (B) 以 NF-κB luciferase assay 測量成骨細胞經肉蓯蓉粗萃取物刺激之後，轉染隱性變異質體，成骨細胞之反應。(* $p < 0.05$, compared with control ; # $p < 0.05$, compared with treatment)

第五章 討論

骨質疏鬆症是由於成骨細胞與破骨細胞之間的作用失去平衡所造成的，現今西醫的治療方式為以抑制破骨細胞作用的雙磷酸鹽類藥物為主，這一類的藥物常造成一些副作用如胃酸逆流或食道炎，更甚者還有下顎骨壞死等副作用產生，因此隨著人口年齡結構老化的影響，尋找安全且較無副作用，而價格合理的藥物，是一個重要的議題。在傳統中醫裡，常使用一些補腎方劑如六味地黃丸等複方藥物來治療骨質疏鬆症^{62,63}，亦有動物實驗顯示傳統補腎方劑能夠減緩骨質疏鬆的現象⁶⁴。本實驗希望能透過中醫的理論，並從歷代典籍的回顧中，找出能夠治療骨質疏鬆的藥物，且希望此藥物能夠作用在成骨細胞，加強造骨機能。因此依據中醫“腎主骨”的概念，在傳統中藥裡，以大陸中藥學教材⁵²裡的補虛藥為主，初步排除動物性藥物與記載有毒藥物，選定了十一種藥物，分別是山藥、巴戟天、肉蓯蓉、淫羊藿、杜仲、續斷、骨碎補、補骨脂、菟絲子、熟地與女貞子，這十一種中藥在古書記載有強筋骨、暖腰膝、止腰痛等類似功能的入腎藥物，而在傳統的補腎方劑如六味地黃丸、左歸丸、右歸丸與濟生腎氣丸等組方中常見的中藥山茱萸，雖然在此書中歸類為收澀藥物，但查其典籍記載，如《日華子本草》“暖腰膝，助水臟”《壽世保元》“澀精益髓，腎虛耳鳴，腰膝痛止”，可能對成骨細胞有潛在的作用，因此在此放入一併比較探討。因此本實驗第一階段選用了上述十二種藥物，並針對其對成骨細胞的活性指標 ALP、OPN 與 BMP-2 的表現之影響來做藥物篩選。

實驗初步篩選結果發現，骨碎補、山藥、女貞子與肉蓯蓉等四種中藥粗萃取物對成骨細胞的生化指標 ALP、BMP-2 與 OPN 有劑量依存關係，隨著濃度增加，三種生化指標皆有上升的趨勢，因此我們希望由四種藥物中選定一種藥物作進一步的探討。

關於探討骨碎補⁶⁵⁻⁷¹、女貞子⁷²與山藥⁷³等藥物與骨頭之間的影響與關係已有許多研究，肉蓯蓉在傳統中醫裡提到，有助腎補陽、潤腸通便的功效。在臨床應用上可以用於治療陽痿、不孕、腰膝冷痛與筋骨無力等，此外還有潤腸的作用，可用於治療腸燥津枯的便秘⁵²。

現代藥理研究指出肉蓯蓉粗萃取物有抗發炎的作用⁷⁴與加強學習記憶的功效⁷⁵，而肉蓯蓉與成骨細胞的研究並不多且不明確，因此我們選定肉蓯蓉粗萃取物來做進一步的探討。

如何促進成骨細胞來增強造骨作用，主要透過增加成骨細胞的數目，或者是增強成骨細胞功能來達到造骨的目的。前者可以透過 MTT assay 來測量細胞 proliferation 的速度，而後者可以透過礦化作用來觀察。根據本實驗發現，在老鼠成骨細胞株中，肉蓯蓉粗萃取物對於成骨細胞的 proliferation 與 migration 皆無明顯的影響。而在礦化方面，依本篇的實驗結果可知，肉蓯蓉粗萃取物對於促進礦化的形成的確是有幫助。

之前的研究指出，成骨細胞中 p38、ERK、JNK 與 Akt 活化之後，會促進其細胞活性。在本實驗中，我們發現將成骨細胞以肉蓯蓉粗萃取物刺激之後，其 p38、ERK、JNK 與 Akt 均有活化的現象，且在加入抑制劑或以轉染作用給予隱性變異質體之後，其生化指標與礦化作用皆有被抑制的現象，此結果顯示，肉蓯蓉粗萃取物是透過 MAPK 與 Akt 等路徑來影響其細胞功能。

本篇實驗可以初步瞭解肉蓯蓉粗萃取物以及其他進入篩選的中藥粗萃取物對於成骨細胞之影響，此外肉蓯蓉粗萃取物可以增加成骨細胞的礦化能力。

骨質疏鬆症已是一種對中老年人與停經後婦女極具影響的流行病，而昂貴的治療藥物與其副作用，促使我們希望由傳統中醫藥裡找出有效的治療藥物。探討骨質疏鬆症的相關機轉與尋找有效的中藥治療藥物，已是目前重要的研究方向。相信本研究可讓骨質疏鬆的研究者不管對於肉蓯蓉粗萃取物或其他進入篩選評估之中藥有更深入的瞭解與認識。

第六章 結論

綜合以上本篇所完成的實驗可知，在老鼠成骨細胞中給予肉蓯蓉粗萃取物，可以藉由活化 ERK、JNK、p38、Akt 等蛋白，促使轉錄因子 p65 作用，使得 BMP-2、ALP 與 OPN 的表現量增加。此外能促進成骨細胞礦化程度之提升，但是對於細胞的移行和增生能力並無明顯效果。



參考文獻

1. Yang NP, Jen I, Chuang SY, Chen SH, Chou P. Screening for low bone mass with quantitative ultrasonography in a community without dual-energy X-ray absorptiometry: population-based survey. *BMC Musculoskelet Disord.* 2006;7:24.
2. Jilka RL. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol.* 2003;41(3):182-185.
3. 孟景春，周仲瑛：中醫學概論，知音出版社，1994。
4. Chapurlat RD, Delmas PD. Bone microdamage: a clinical perspective. *Osteoporos Int.* 2009;20(8):1299-1308.
5. Hadjidakis DJ, Androulakis, II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1092:385-396.
6. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem.* 1994;55(3):273-286.
7. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000;21(2):115-137.
8. Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem.* 1999;45(8 Pt 2):1353-1358.
9. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001;142(12):5050-5055.
10. Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;247(3):610-615.
11. Riggs BL, Parfitt AM. Drugs used to treat osteoporosis: the critical

- need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. *J Bone Miner Res.* 2005;20(2):177-184.
12. Coetzee M, Kruger MC. Osteoprotegerin-receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand ratio: a new approach to osteoporosis treatment? *South Med J.* 2004;97(5):506-511.
 13. Center JR, Nguyen TV, Schneider D, Sambrook PN, Eisman JA. Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study. *Lancet.* 1999;353(9156):878-882.
 14. Adachi JD, Papaioannou A. Corticosteroid-Induced osteoporosis: detection and management. *Drug Saf.* 2001;24(8):607-624.
 15. 洪瑞國：老年人發生第二次對側髖骨骨折之保護及危險因子之分析及探討 Assessment of Protective and Risk Factors of the Second Contralateral Hip Fracture in the Elderly。醫務管理研究所，國立陽明大學，2010。
 16. 李瑋君，韓岳津，吳英黛，曹昭懿：骨質疏鬆相關骨折住院病患之健保申報分析。臺灣醫學。2007;11卷(1期):頁 22-28。
 17. Dannemann C, Gratz KW, Riener MO, Zwahlen RA. Jaw osteonecrosis related to bisphosphonate therapy: a severe secondary disorder. *Bone.* 2007;40(4):828-834.
 18. Barrier A, Lescaille G, Rigolet A, Descroix V, Goudot P, Ruhin B. [Jaw osteonecrosis induced by oral biphosphonates: 12 cases]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac.* 2010;111(4):196-202.
 19. Zografos GN, Georgiadou D, Thomas D, Kaltsas G, Digalakis M. Drug-induced esophagitis. *Dis Esophagus.* 2009;22(8):633-637.
 20. Goltzman D. Discoveries, drugs and skeletal disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(10):784-796.
 21. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results

- From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288(3):321-333.
22. Chesnut CH, 3rd, Silverman S, Andriano K, Genant H, Gimona A, Harris S, Kiel D, LeBoff M, Maricic M, Miller P, Moniz C, Peacock M, Richardson P, Watts N, Baylink D. A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the prevent recurrence of osteoporotic fractures study. PROOF Study Group. *Am J Med*. 2000;109(4):267-276.
 23. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150(698):893-899.
 24. Reddi AH, Marshall R. Urist: a renaissance scientist and orthopaedic surgeon. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85-A Suppl 3:3-7.
 25. Xiao YT, Xiang LX, Shao JZ. Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;362(3):550-553.
 26. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988;242(4885):1528-1534.
 27. Zhao M, Harris SE, Horn D, Geng Z, Nishimura R, Mundy GR, Chen D. Bone morphogenetic protein receptor signaling is necessary for normal murine postnatal bone formation. *J Cell Biol*. 2002;157(6):1049-1060.
 28. Matsumoto A, Yamaji K, Kawanami M, Kato H. Effect of aging on bone formation induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2 combined with fibrous collagen membranes at subperiosteal sites. *J Periodontal Res*. 2001;36(3):175-182.
 29. Fleet JC, Cashman K, Cox K, Rosen V. The effects of aging on the

- bone inductive activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology*. 1996;137(11):4605-4610.
30. Zmuda JM, Sheu YT, Moffett SP. The search for human osteoporosis genes. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2006;6(1):3-15.
 31. Styrkarsdottir U, Cazier JB, Kong A, Rolfsson O, Larsen H, Bjarnadottir E, Johannsdottir VD, Sigurdardottir MS, Bagger Y, Christiansen C, Reynisdottir I, Grant SF, Jonasson K, Frigge ML, Gulcher JR, Sigurdsson G, Stefansson K. Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2. *PLoS Biol*. 2003;1(3):E69.
 32. Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, Pikula S, Azzar G, Radisson J, Bandorowicz-Pikula J, Buchet R. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim Pol*. 2003;50(4):1019-1038.
 33. Seibel MJ. Clinical use of markers of bone turnover in metastatic bone disease. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005;2(10):504-517; quiz 501 p following 533.
 34. Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell*. 1979;16(4):885-893.
 35. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(3):279-303.
 36. Klein-Nulend J, Roelofsen J, Semeins CM, Bronckers AL, Burger EH. Mechanical stimulation of osteopontin mRNA expression and synthesis in bone cell cultures. *J Cell Physiol*. 1997;170(2):174-181.
 37. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J*

- Clin Invest.* 2001;107(9):1055-1061.
38. Raouf A, Seth A. Discovery of osteoblast-associated genes using cDNA microarrays. *Bone.* 2002;30(3):463-471.
 39. Ishijima M, Tsuji K, Rittling SR, Yamashita T, Kurosawa H, Denhardt DT, Nifuji A, Ezura Y, Noda M. Osteopontin is required for mechanical stress-dependent signals to bone marrow cells. *J Endocrinol.* 2007;193(2):235-243.
 40. 李雪靖，郭鴻：原發性骨質疏松癥中醫藥治療概況。河北醫藥 2010(20):2911-2914.
 41. 陳元川，趙詠芳，王翔，徐宇，詹紅生，石印玉：補腎中藥改善骨質疏松大鼠骨骼強度的作用機制。中醫正骨 2008(11):6-8+85.
 42. 林昭庚：中西醫病名對照大辭典，臺北市，國立中國醫藥研究所，2001。
 43. 程士德：內經，知音出版社，1990。
 44. 任應秋：素問今釋，啟業書局，1988。
 45. 陳九如：黃帝內經今義，正中書局，1986。
 46. 黃維三：難經發揮，正中書局，1994。
 47. 張文淮：停經後婦女腎虛證與骨質密度、牙齒搖動度的相關性研究 Association of Kidney Vacuity, Bone Mineral Density and Tooth Mobility in Postmenopausal Women。中國醫學研究所，中國醫藥學院 1997。
 48. 陳雅吟：停經後婦女骨質疏松症與中醫腎虛證相關性之研究 The association between postmenopausal osteoporosis and Kidney-vacuity syndrome in Chinese Medicine。中國醫學研究所，中國醫藥學院 1997。
 49. Xu H, Lawson D, Kras A, Ryan D. The use of preventive strategies for bone loss. *Am J Chin Med.* 2005;33(2):299-306.
 50. 顏正華：中藥學，知音出版社，1991。
 51. 王輝武：中醫百家藥論薈萃，重慶出版社，1997。

52. 凌一揆：中藥學，知音出版社，2004。
53. 徐雅慧，羅吉方，張憲昌，林哲輝：市售肉蓯蓉藥材之鑑別。藥物食品檢驗局調查研究年報 2007(25 號):110-118。
54. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002;298(5600):1911-1912.
55. Xiao G, Jiang D, Thomas P, Benson MD, Guan K, Karsenty G, Franceschi RT. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J Biol Chem*. 2000;275(6):4453-4459.
56. Hu Y, Chan E, Wang SX, Li B. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 2003;144(5):2068-2074.
57. Ge C, Xiao G, Jiang D, Franceschi RT. Critical role of the extracellular signal-regulated kinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development. *J Cell Biol*. 2007;176(5):709-718.
58. Matsuguchi T, Chiba N, Bandow K, Kakimoto K, Masuda A, Ohnishi T. JNK activity is essential for Atf4 expression and late-stage osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*. 2009;24(3):398-410.
59. Mukherjee A, Rotwein P. Akt promotes BMP2-mediated osteoblast differentiation and bone development. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 5):716-726.
60. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:693-733.
61. Boyce BF, Yao Z, Xing L. Functions of nuclear factor kappaB in bone. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1192:367-375.
62. 關儉，唐潔鳳，郭榮林：六味地黃丸對絕經后骨質疏松患者骨

- 密度的干預研究。海南醫學 2009(05):79-80。
63. 許正發，代玉金：右歸丸治療骨質疏松癥 96 例。國醫論壇 2002(02):50。
 64. 鞠大宏，于福祿，張麗坤，于智敏，趙宏艷，劉梅潔，張立石，劉紅，潘靜華，王少君：滋陰補腎法對卵巢切除所致骨質疏松大鼠成骨細胞 COX-2 蛋白和 mRNA 表達的影響。中國中醫基礎醫學雜誌 2006(12):918-920。
 65. Hung TY, Chen TL, Liao MH, Ho WP, Liu DZ, Chuang WC, Chen RM. *Drynaria fortunei* J. Sm. promotes osteoblast maturation by inducing differentiation-related gene expression and protecting against oxidative stress-induced apoptotic insults. *J Ethnopharmacol.* 2010;131(1):70-77.
 66. Sun JS, Dong GC, Lin CY, Sheu SY, Lin FH, Chen LT, Chang WH, Wang YJ. The effect of Gu-Sui-Bu (*Drynaria fortunei* J. Sm) immobilized modified calcium hydrogenphosphate on bone cell activities. *Biomaterials.* 2003;24(5):873-882.
 67. Sun JS, Theriault BL, Anderson GI. The effect of Gu-Sui-Bu (*Drynaria fortunei*) on bone cell activity. *Am J Chin Med.* 2004;32(5):737-753.
 68. Wang XL, Wang NL, Zhang Y, Gao H, Pang WY, Wong MS, Zhang G, Qin L, Yao XS. Effects of eleven flavonoids from the osteoprotective fraction of *Drynaria fortunei* (KUNZE) J. SM. on osteoblastic proliferation using an osteoblast-like cell line. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2008;56(1):46-51.
 69. Jeong JC, Kang SK, Youn CH, Jeong CW, Kim HM, Lee YC, Chang YC, Kim CH. Inhibition of *Drynariae* Rhizoma extracts on bone resorption mediated by processing of cathepsin K in cultured mouse osteoclasts. *Int Immunopharmacol.* 2003;3(12):1685-1697.
 70. Jeong JC, Lee JW, Yoon CH, Lee YC, Chung KH, Kim MG, Kim CH. Stimulative effects of *Drynariae* Rhizoma extracts on the

- proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Ethnopharmacol.* 2005;96(3):489-495.
71. Wong RW, Rabie AB. Systemic effect of crude extract from rhizome of *Drynaria fortunei* on bone formation in mice. *Phytother Res.* 2006;20(4):313-315.
72. Li G, Zhang XA, Zhang JF, Chan CY, Yew DT, He ML, Lin MC, Leung PC, Kung HF. Ethanol extract of *Fructus Ligustri Lucidi* promotes osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Phytother Res.* 2010;24(4):571-576.
73. Yen ML, Su JL, Chien CL, Tseng KW, Yang CY, Chen WF, Chang CC, Kuo ML. Diosgenin induces hypoxia-inducible factor-1 activation and angiogenesis through estrogen receptor-related phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts. *Mol Pharmacol.* 2005;68(4):1061-1073.
74. Lin LW, Hsieh MT, Tsai FH, Wang WH, Wu CR. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activity caused by *Cistanche deserticola* in rodents. *J Ethnopharmacol.* 2002;83(3):177-182.
75. Choi JG, Moon M, Jeong HU, Kim MC, Kim SY, Oh MS. *Cistanche Herba* enhances learning and memory by inducing nerve growth factor. *Behav Brain Res.* 2011;216(2):652-658.

附錄

中藥	乾重(mg/ml)
山藥	31
巴戟天	32
肉蓯蓉	13
淫羊藿	21
杜仲	7
續斷	16
骨碎補	17
補骨脂	15
菟絲子	24
熟地黃	14
女貞子	34
山茱萸	37

感謝由侯庭鏞教授所提供之十二種中藥粗萃取物乾重資料

Effects of *Cistanche deserticola* crude extract on the activity of osteoblast

Name: Hsin-Chih Huang

Major Professor's Name: Wen-Chi Chen

Graduate Institute of Chinese Medicine

Osteoporosis frequently occurs in women after menopause, often caused fracture of vertebral body, hip and wrist. About ten percent of human bone role in the effect of bone remodeling includes both bone formation and dissolution. Osteoporosis took place by the unbalance of these two effects. Osteoblasts make bone formation and in this study we explore Chinese herbal medicine for the activity of osteoblast.

Our study used twelve selected common Bushen chinese herbal medicine crude extracts and MC3T3-E1 osteoblast cell line. Our research divided into two parts. The first part was to evaluate the effect of the twelve Bushen chinese herbal medicine crude extracts on MC3T3-E1 osteoblast cell line. Then we selected one of the effective drugs *C. deserticola* to make more advanced study. Our results revealed *C. deserticola* promote cell activity and mineralization in MC3T3-E1 osteoblast cell line. According to the results of this study, *C. deserticola* extracts provide a new direction for the treatment of osteoporosis.

Key words: Chinese herbal medicine, *Cistanche deserticola*, osteoblast, osteoporosis

謝詞

本論文特別感謝中國醫藥大學中西醫結合研究所所長陳汶吉教授，中國醫藥大學中醫學系學士班中醫基礎學科主任李德茂副教授，中國醫藥大學中醫學系學士班中醫外傷學科暨中國附醫骨科部馮逸卿副教授，中國醫藥大學醫學院醫學系學士班藥理學科湯智昕副教授，在這兩年的時間中予以耐心指導。

此外還要感謝中國醫藥大學中醫學系侯庭鏞教授提供的中藥粗萃取物，使得實驗得以順利完成。感謝中山醫學大學醫學研究所楊順發副教授在口試時予以指導，使得論文內容更臻完備。

最後感謝在這兩年裡對我鼓勵與支持的家人和同伴，感謝你們。

