

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 研究 disintegrin 及 YC-1 在骨質疏鬆症的治療應用(3/3) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 95-2314-B-002-017-  
執行期間：95年08月01日至96年07月31日  
執行單位：國立臺灣大學醫學院骨科

計畫主持人：楊榮森

計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理：湯智昕、林子閔、吳明岳  
碩士班研究生-兼任助理：游曉薇

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96 年 10 月 23 日

計畫名稱：

研究 disintegrin 及 YC-1 在骨質疏鬆症的治療應用

計畫編號：NSC 93－2314－B－002－076－

執行期限： 93/08/01 ~ 96/07/31

單位名稱：台灣大學醫學院骨科

主持人：楊榮森

中 華 民 國 9 6 年 1 0 月 2 3 日

## 前言

NO 的合成是經由 nitric oxide synthase (NOS) 將 L-arginine 上 guanidine 的氮原子氧化，轉化成 NO 及 L-citrullin (van't Hof and Ralston, 2001)。目前所知的 NOS 有三種 (Forstermann et al., 1995; Shafer et al., 1998): (1) 神經型 (neuronal NOS, nNOS) 主要分佈在神經細胞，在骨骼肌中也有少量的表現。(2) 誘導型 (inducible NOS, iNOS) 最早在巨噬細胞中被發現，但也分佈在肝臟細胞、平滑肌及骨骼肌中。(3) 內皮型 (endothelial NOS, eNOS) 主要分佈於內皮細胞、表皮細胞、血小板、心肌細胞、肥大細胞和嗜中性白血球等。而 nNOS 和 eNOS 皆是持續性在細胞內表現，受到細胞內鈣離子的調控。eNOS 也可以在一些特殊刺激下，如：低氧、應力誘發 eNOS 的表現 (Shafer et al., 1998)。但是 iNOS 則不受到細胞內鈣離子的調控，且細胞在未被活化之前是不被表現的，可以被細胞激素 (如 IL-1、TNF- $\alpha$ )、內毒素 (lipopolysaccharide; LPS) 或氧化劑的誘發而表現。一旦表現出來，便會產生大量的 NO，並且持續較長的時間 (Morris and Billiar, 1994)。

骨細胞與基質 (bone matrix) 的互動關係可能與 Integrin 有關。Integrin 是一種細胞附著蛋白，它是一個由  $\alpha$  和  $\beta$  兩種不同次元所組成的異質性二合體 [1, 2]，目前已知有 16 種  $\alpha$  次元和 9 種  $\beta$  次元，經由其不同的結合可形成 22 種以上的不同 integrin [3]，這些不同的 integrin 分佈在不同細胞的細胞膜上，但大多數位於細胞膜上，其胞外部分可與如 fibronectin、laminin 及膠原質等細胞間質相連結 [4]。人類和老鼠的造骨細胞中今有  $\alpha 2$ 、 $\alpha 5$  和  $\beta 1$ ， $\alpha 2\beta 1$  受體可與膠原質結合， $\alpha 5\beta 1$  可與 fibronectin 結合，人類的造骨細胞另含有  $\alpha 1$  和  $\alpha 3$ ，老鼠造骨細胞也含有  $\beta 5$  和少量  $\alpha v$  [5, 6]，這些細胞的附著及互動作用會影響細胞的增殖和分化，且也可能參與細胞間的互動作用。

Integrin 與間質蛋白的結合過程中，許多是經由 Arg-Gly-Asp(RGD) 序列來結合，而與許多生物功能息息相關，包括胚胎發育，腫瘤細胞生長及轉移，細胞自然凋亡，血液平衡，白血球活化，血栓凝縮細胞對壓力的反應 [7-10]，近年來的研究證實骨細胞上的 integrin 與細胞間質可以結合，並引發互動作用，參與許多細胞的生理功能調節 [11-13]，其中也可能與生成激素的媒介有關。Integrin 在結合間質後，可透過其細胞內結構，而與細胞內的一些蛋白結合，進而連接到細胞的 actin microfilaments，如此可發揮傳遞細胞訊息的重要功用。此外，integrin 也可能媒介著骨基質所受的機械性負荷，並參與生化訊息的傳遞，這些訊息傳遞的路徑，可能仍會有其他生長因子的參與，並且可能會形成回饋環或連鎖反應。造骨細胞的分化是一種多重步驟且有順序的過程，其中包括細胞移動到骨骼表面的過程，這些會受到骨基質、骨細胞 integrin 受體的影響而這過程與骨細胞的分化密切相關 [14, 15]，但目前對於其研究不多，且對其與骨細胞 integrin 的互動機制所知有限，值得進一步的研究。破骨細胞可由骨髓之中的血液原細胞分化而來，而在破骨細胞吸收骨基質之過程之中，破骨細胞必須依賴  $\alpha v\beta 3$  integrin 移行至骨基質的表面上，破骨細胞會利用  $\alpha v\beta 3$  integrin 與骨基質上的骨間質形成一個非常緊密的結合，這個破骨細胞與骨質的結合造成細胞與骨質之中有一區域的空間，破骨細胞將利用這空間分泌酸性物質及蛋白質分解物而進行骨吸收作用，因此 integrin 與破骨細胞之間的交互作用對於骨的再吸收扮演的重要份量。

## 研究目的

骨骼主要是由造骨細胞及破骨細胞維持其生理功能。Integrin 是一種細胞間質蛋白接受器，主要是由  $\alpha$  及  $\beta$  所組成，可與細胞間質結合，在細胞中與細胞分化及發育有關。我們的研究發現蛇毒蛋白衍生物 trigramin (disintegrin) 可以抑制破骨細胞分化、成熟及再吸收作用。破骨前驅細胞加入分化劑 RANKL (50 ng/ml) 及 MCS-F (20 ng/ml) 分化 2 星期以形成破骨細胞，trigramin 可抑制破骨細胞的分化作用。使用 osteoclast activity assay substrate (OAAS) plate 分析破骨細胞吸收能力，trigramin 隨著濃度抑制破骨細胞再吸收的作用。經由 22G 的針頭局部給予 trigramin 在幼鼠脛骨內，可以增加次級海綿骨的 BMD (bone mineral density)、BMC (bone mineral content) 及骨量。因此蛇毒蛋白的衍生物具有抑制破骨細胞之功能及促進骨合成之作用，應具有發展成為治療骨質疏鬆的藥物。

一氧化碳 (NO) 為一種自由基，在骨合成中也扮演重要角色。YC-1 可加強 NO 對 soluble guanylate cyclase (sGC) 的活化，在本論文我們研究 YC-1 對於骨合成的作用。使用免疫螢光染色法發現 YC-1 增加培養骨細胞 Fn 纖維固化，流式細胞分析也發現 YC-1 促進造骨細胞的  $\alpha 5, \alpha 2, \beta 1$  integrin 表現。給予 YC-1 二星期會增加 ALP 活性，NOS 抑制劑 L-NAME、sGC 抑制劑 ODQ 及 cyclic GMP-dependent protein kinases (PKG) 抑制劑 KT 5823 都可拮抗 YC-1 的作用。處理造骨細胞 YC-1 二星期後會促進骨小結 (bone nodule) 及 collagen 合成。破骨前驅細胞加入分化劑 RANKL (50 ng/ml) 及 MCS-F (20 ng/ml) 分化 2 星期以形成破骨細胞，YC-1 可抑制破骨細胞的分化。使用 osteoclast activity assay substrate (OAAS) plate 分析破骨細胞吸收能力，YC-1 隨著濃度抑制破骨細胞再吸收的作用。經由 22G 的針頭局部給予 YC-1 在幼鼠脛骨內，可以增加次級海綿骨的骨量，而 L-NAME、ODQ 及 KT 5823 都可拮抗 YC-1 的作用。

## 文獻探討

“骨質疏鬆症”是骨質加速流失而導致的結果。主要的原因是鈣質從骨骼組織之中流失。它會導致骨質嚴重減少，使得骨骼疏鬆、變脆、變弱，因而容易骨折。這種現象在脊椎骨特別顯著，因為脊椎骨的構造，枝狀骨的含量比例是比皮質骨高出許多；除此，股骨的上端是支持體重的主要位置，腕骨則是人跌倒時常被用於承受衝擊的部位，這兩處骨骼因而也更容易發生骨折，年齡影響骨骼及其症狀隨著身體的老化，大約從 35 歲起，骨質量會開始慢慢減少。從飲食中吸收鈣質的能力會減弱，尤其是當婦女接近停經期時，雌激素的分泌停止，會加速骨質的流失。骨質疏鬆症通常病人察覺不出有任何症狀，一定要等到骨折發生時方才知道是骨質疏鬆所引起的病變雌激素的作用。目前臨床研究得知停經中或停經後五年內服用雌激素可以有效地預防骨質疏鬆症，可使骨質中鈣質流失的速度減緩下來。但不能把已經流失的鈣質重新補回去。但雌激素的副作用為：子宮癌罹患率的增加、形成血栓症 (thrombosis)。因此在目前為止並沒有一個良好的藥物來治療骨質疏鬆症，本研究經由體外試驗及將利用動物試驗來測試蛇毒蛋白及 YC-1 是否具有治療骨質疏鬆症的功效。

## 研究方法

### 細胞培養

初級造骨細胞 (primary cultured osteoblast) 培養是取自於懷孕第 18 天的 Sprague-Dawley 鼠之胚胎的頂骨 (parietal bone)。母鼠犧牲後，整個子宮取下放於無菌之培養皿中。由子宮取出胎鼠並將其頭顱骨 (calvarium) 分離出來，剪下頂骨且避免取到骨縫 (suture)。仔細地將骨片兩側之骨膜層去除，再將骨片切成碎片。以 0.1% collagenase 將骨片作每次 20 分鐘共 5 次的序列性消化，以便使細胞從骨片釋放出來。收集最後三次消化出來的細胞，這些細胞具有較成熟的造骨細胞的特性，混合這三次消化之細胞即為造骨細胞懸浮液。細胞培養於  $\alpha$ -MEM 中含 1% penicillin-streptomycin 及 10% FBS。培養皿置於 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 之培養箱中。當細胞長滿時，進行繼代培養，所有實驗只取用第一代至第五代作為實驗材料。

### 免疫螢光色法

本實驗是以免疫螢光的方法來定量 Fn 之 fibrillogenesis。先將細胞培養在玻片上，經過 3 到 5 天之後進行染色。細胞以 4% paraformaldehyde 固定 15 分鐘，而後以 PBS 潤洗三次。將細胞和 4% bovine serum albumin (BSA) 一起培養 15 分鐘以去除非選擇性的鍵結點。給予 primary antibody against rat Fn (1:100) 在室溫下與細胞培養一小時。接下來以 PBS 潤洗三次後，細胞和 FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:150) 培養一小時。最後以 propyl gallate mounting solution 來封片，並以 fluorescence microscope (Zeiss confocal microscope LSM410) 來檢視其螢光變化。以 confocal microscope 來定量 10-15 個群聚細胞之平均螢光強度值 (fluorescence intensity)。

### Von Kossa 染色

造骨細胞給予分化培養液 [vitamin C (50  $\mu$ g/ml) 及  $\beta$ -glycerophosphate (10 mM)]，培養液每三天更換一次，14 天後細胞加入 4% paraformaldehyde 固定 10 分鐘，給予 1% silver nitrate 在 UV 下作用 30 分鐘，加入二次水清洗，給予 5% sodium thiosulfate 培養 2 分鐘，最後利用二次水清洗，使用 1% safranin-O 染色，在顯微鏡計算骨小結的數目。

### 測量 ALP 活性

造骨細胞在分化培養液培養 14 天後，加入 0.2% NP-40 將細胞溶解，溶解液經過振盪再離心 1500  $\times$  g 五分鐘，利用 ALP kit 測量上清液中 ALP 的活性。

### Collagen 合成的測量

利用測量 4-hydroxyproline 含量代表造骨細胞 collagen 合成的數量。當細胞分化後給予 6N HCl 溶解細胞，將溶解液置於玻璃管中在 116°C 下水解 16 小時。將水解液真空抽乾，加入等量的水溶解，在 550 nm 波長下測量 4-hydroxyproline 的含量。

### 破骨細胞分化測試

利用針筒將 6-8 週老鼠的骨髓抽出，經過一天的沉降，計算漂浮的細胞 (hematopoietic cell)  $1 \times 10^6$  顆於培養皿中，加入分化劑 [RANKL (50 ng/ml) 及 M-CSF (20 ng/ml)]，每三天更換分

化劑，培養 8 天後，使用 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色，在顯微鏡下計算染到 TRAP 且細胞核多於 3 個的細胞。

### 破骨細胞吸收能力的測量

取 hematopoietic cell 於 OAAS plate 中，加入破骨分化劑 5 天後，將分化劑移除給予藥物培養 3 天，加入 1N NaOH 將細胞溶解後清洗 3 次，利用數位相機在顯微鏡下取得影像，在影像分析軟體 (Image-Pro Plus 3.0)，計算破骨細胞吸收的區域面積。

### 活體局部骨內注射

三週大雄性幼鼠 (Sprague-Dawley rat)，體重範圍 76 至 90 克，利用 trichloroacetaldehyde monohydrate (400 mg/ml) 來麻醉，將 22G 針頭尖端取下，針頭消毒後將其埋入脛骨接近膝蓋處，隔日，針頭外端便會被外皮覆蓋過去，利用 30G 針頭所做成的軟管進行注射，利用 X 光可觀察埋針的位置是否正確。每次注射量為 10  $\mu$ l，分別給予生理食鹽水及藥物，連續施打一週後，休息一週，將動物犧牲取出脛骨，去除肌肉及結締組織，使用 dual-energy X-ray absorptiometer (XR-26) 測量 Bone mineral density (BMD) 及 bone mineral content (BMC)，完成上述過程後將脛骨以 4% paraformaldehyde 固定 48 小時，再予 12% EDTA 脫鈣二週，經過脫水及石蠟包埋，作縱向切片 (5  $\mu$ m)，切片以 Mayer's hematoxylin-eosin 染色。

骨量分析時選定次級海綿骨區域，範圍為增長板延伸的 1 mm 至 3 mm 面積，使用數位照相機取得海綿骨的骨小樑 (trabecular bone) 區域之影像，並利用影像分析軟體 (Image-Pro Plus 3.0)，計算脛骨中次級海綿骨區域裡骨小樑的面積比例 (bone volume/tissue volume)。

## 結果與討論

### YC-1 促進造骨細胞合成及礦化

檢視 YC-1 對造骨細胞 Fn 合成的影響。使用免疫螢光染色法發現，給予造骨細胞 YC-1 (10  $\mu$ M) 處理 24 小時增加 Fn 纖維固化 (圖 1)。在另一方面，YC-1 隨著濃度增加造骨細胞 Collagen 合成 (圖 1D)。利用流式細胞分析儀也發現 YC-1 增加初級造骨細胞的  $\alpha$ 5、 $\alpha$ 2 及  $\beta$ 1 integrins 表現 (圖 1C)。造骨細胞分化過程會分泌 ALP，因此 ALP 為造骨細胞分化的重要指標 (Li et al., 1999; Tintut et al., 1999)。造骨細胞加入分化劑 vitamin C (50  $\mu$ g/ml) 及  $\beta$ -glycerophosphate (10 mM) 同時處理 YC-1 二星期，增加 ALP 活性 (圖 2A)，同時給予 NO synthase (NOS) 抑制劑 L-NAME (60  $\mu$ M)、sGC 抑制劑 ODQ (20  $\mu$ M) 或 PKG 抑制劑 KT 5823 (2  $\mu$ M) 都可拮抗 YC-1 增加 ALP 活性的作用 (圖 2A)。這些結果顯示 NO-cGMP-PKG 參與 YC-1 增加造骨細胞分化及成熟的過程中。接下來觀察 YC-1 對於造骨細胞形成骨小結 (bone nodule) 能力的影響，使用 von Kossa 染化法發現 YC-1 隨著濃度增加骨小結的數量 (圖 2B)。另外 YC-1 在 0.1 及 1  $\mu$ M 也具有促進造骨細胞增殖的能力 (與控制組比較分別增加 119.3% 及 126.1%)。

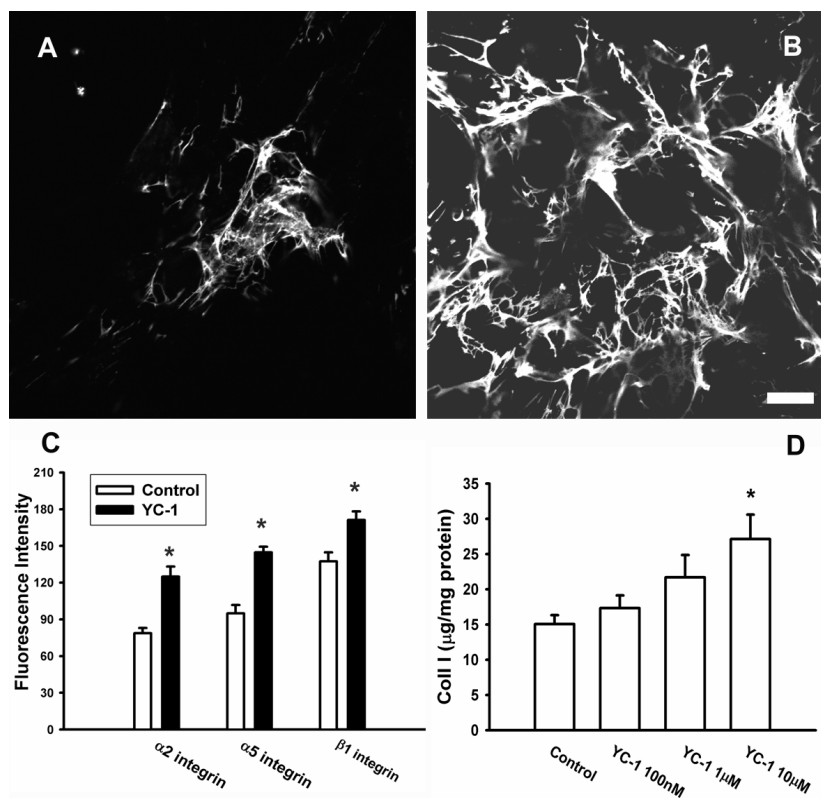
### YC-1 對於破骨細胞分化及吸收的影響

破骨細胞是巨噬細胞家族的成員，可由骨髓中破骨前驅細胞分化而來，加入分化劑 M-CSF (20 ng/ml) 及 RANKL (50 ng/ml) 經過 8 天，會形成多核且巨大的破骨細胞。利用 tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 染色發現 YC-1 隨著濃度抑制破骨細胞分化的能力 (圖 3)。

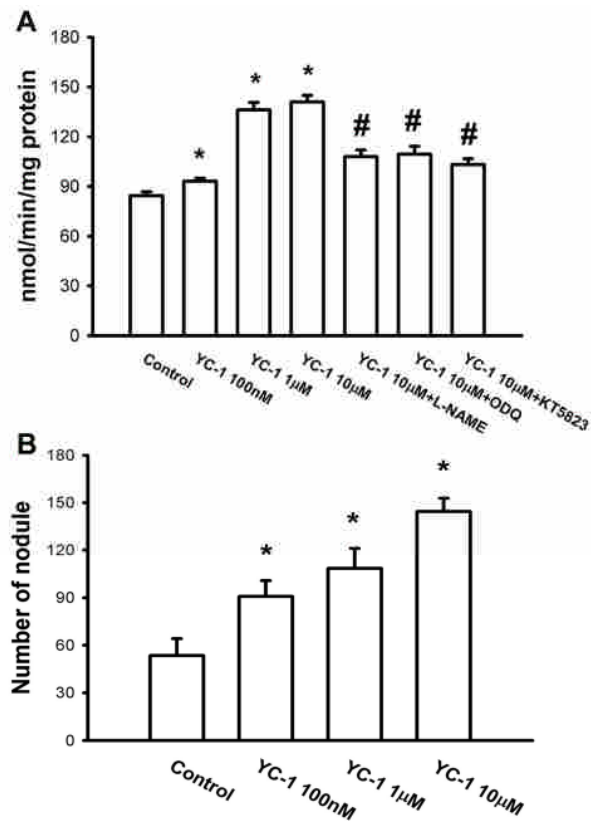
接下來觀察 YC-1 對於成熟破骨細胞吸收能力的影響，將破骨前驅細胞種在 OAAS plate 中，給予 M-CSF 及 RANKL 分化 5 天，接下來將分化劑移除同時給予 YC-1 處理 3 天，YC-1 抑制成熟破骨細胞吸收的能力，而 L-NAME (60  $\mu$ M) 及 KT5823 (2  $\mu$ M) 可拮抗 YC-1 的作用(圖 4)。此外，L-NAME 及 KT5823 本身會促進破骨細胞之骨吸收能力。因此 NO-cGMP-PKG 參與破骨細胞分化及吸收的過程中。

### YC-1 增加幼鼠局部脛骨合成

利用動物模式研究 YC-1 對於骨合成的影響。經由 22G 針頭局部注射 YC-1 (0.1 nmol/day) 在脛骨之內，持續給予 7 天後，在第 14 天將動物犧牲取出脛骨，YC-1 促進次級海綿骨的骨量(圖 5)，海綿骨的骨量增加 90 %。同時 L-NAME (0.6 nmole)、ODQ (0.2 nmole) 或 KT 5823 (0.02 nmole) 都可拮抗 YC-1 所增加骨量的作用(圖 6)。



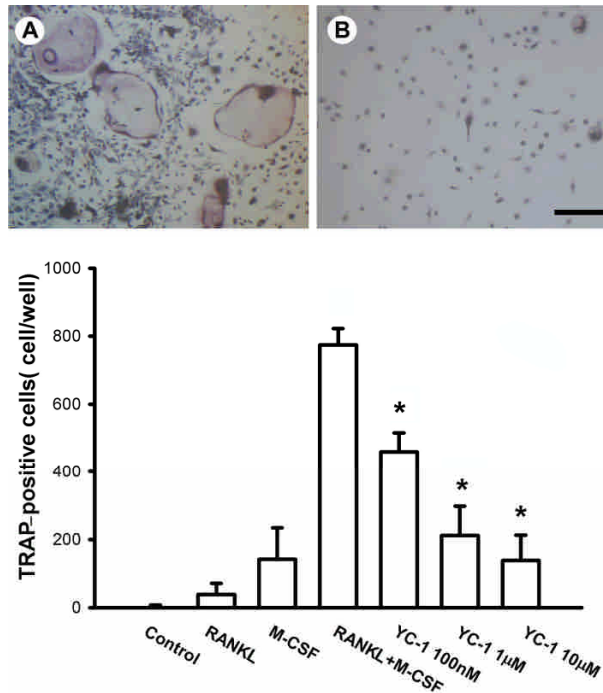
**Fig. 1. Effects of YC-1 on the assembly of endogenously released Fn, cell surface distribution of integrins and collagen synthesis in cultured rat osteoblasts.** Compared with control (A), Fn assembly markedly increased after treatment with 10  $\mu$ M YC-1 for 24 hr (B). (C) Treatment with YC-1 for 24 hr enhanced the fluorescence intensity of  $\alpha 5$  and  $\beta 1$  integrins using flow cytometric analysis. (D) Collagen synthesis was determined by measuring the 4-hydroxyproline content in 2 week-old cultures. Note that YC-1 increased collagen synthesis only at higher concentration. Results are representative of at least three independent experiment. Bar = 10  $\mu$ m. \*:  $p < 0.05$  as compared with control.



**Fig. 2. Enhancement of alkaline phosphatase activity and bone nodule formation by YC-1 in cultured osteoblasts.**

Osteoblastic cultures were derived from calvaria of fetal rat. YC-1 at different concentrations was added to culture medium. The culture medium and drugs were replaced twice a week. (A) YC-1 concentration-dependently increased ALP activity and NO-cGMP-PKG pathway is involved in the potentiation. (B) The number of bone nodule was counted in 2 week-old cultures using von Kossa staining. Note that in comparison with control, YC-1 treatment increased bone nodule formation. Values are the mean $\pm$ S.E. of 4 experiments. \*  $p < 0.05$  as compared with control. #  $p < 0.05$  as compared with YC-1 (10  $\mu$ M)-treated group.

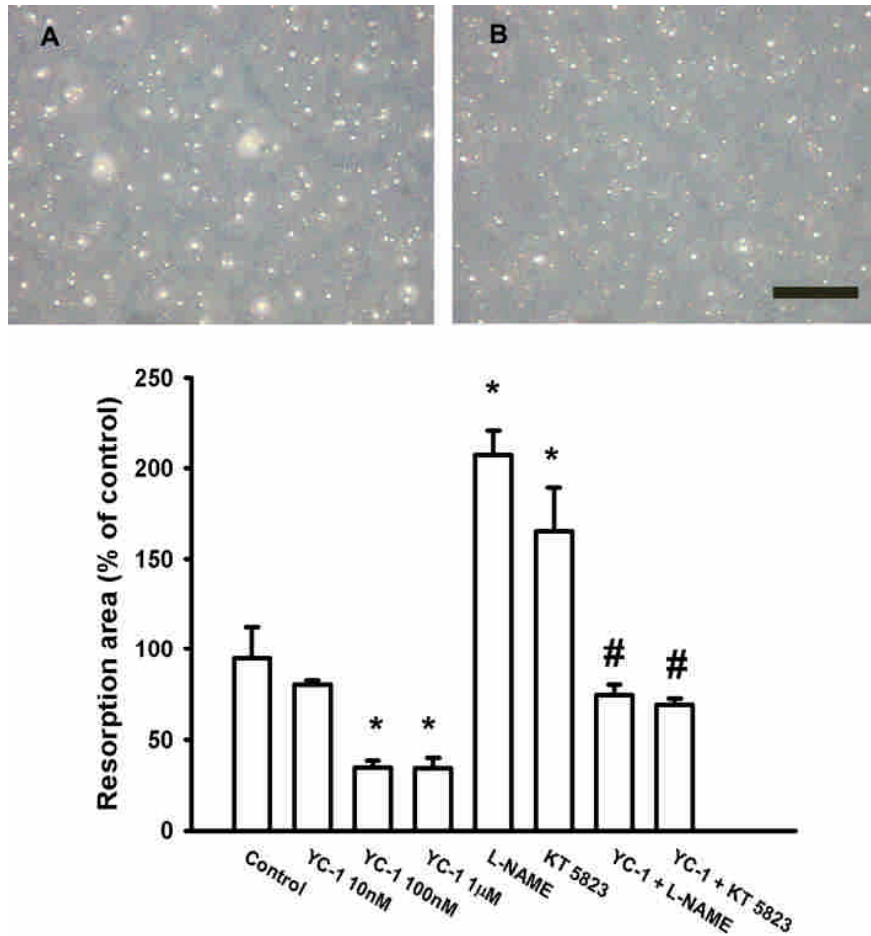




**Fig. 3. Inhibition of osteoclast differentiation by YC-1.**

Osteoclast precursors isolated from long bone of adult male rats were plated on a 24-well plate at  $1 \times 10^6$  cells/well and cultured in the presence of 20 ng/ml M-CSF and 50 ng/ml sRANKL for 8 days. Following TRAP staining, the cells with more than 3 nuclei were counted. Compared with control (A), YC-1 (10μM) treatment markedly inhibited the differentiation of osteoclast. (C) Summary of the result. Data are presented as mean  $\pm$  S.E. obtained from 4 experiments. Bar = 100 μm.

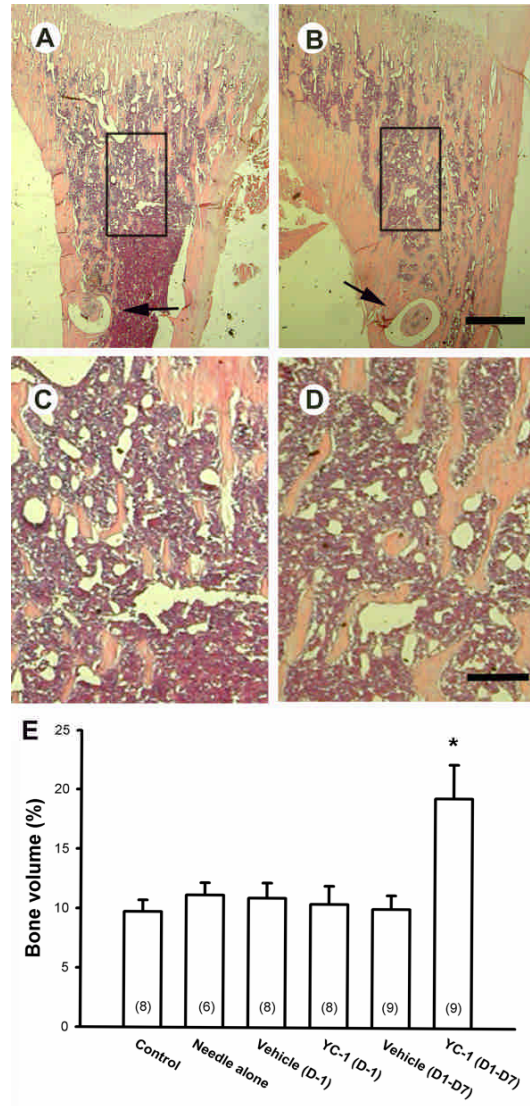
\*:  $p < 0.05$  as compared with RANKL+M-CSF without YC-1 treatment



**Fig. 4. Inhibition of bone resorption by YC-1.**

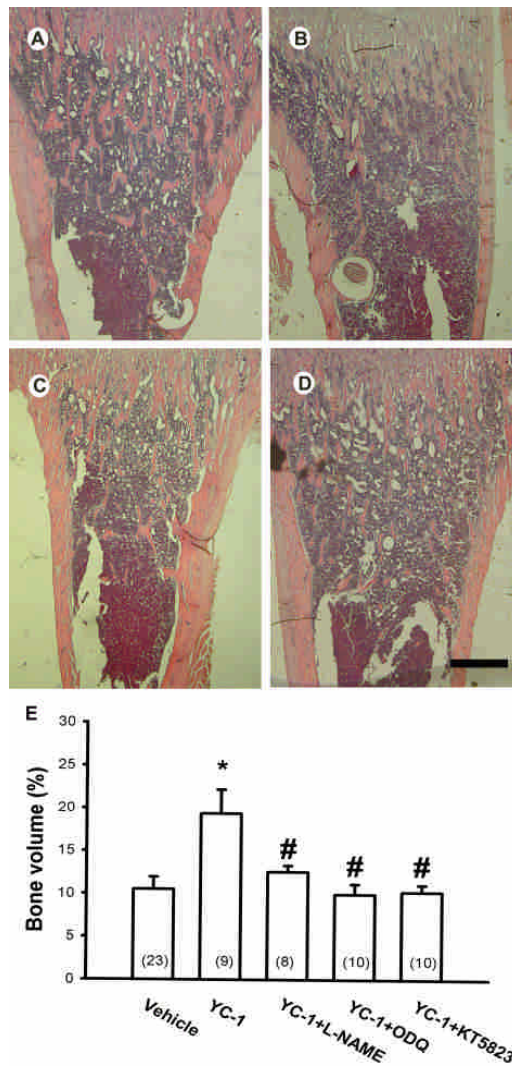
Osteoclast precursors isolated from long bone of adult male rats were plated on a 24-well OAAS plate at  $1 \times 10^6$  cells/well and cultured in the presence of 20 ng/ml M-CSF and 50 ng/ml sRANKL for 5 days. M-CSF and sRANKL were then removed and YC-1 and other tested drugs was added to cultures. Resorbed lacunae on the OAAS plates were photographed under an inverted-phase-contrast microscope ( $\times 200$ ) 3 days after YC-1 treatment. Note that compared with control (A), YC-1 treatment inhibited resorption activity of osteoclasts (B). (C) Total resorption area per well was graphed and measured by image analyzer. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of triplicate wells normalized for the mean value of control wells.

Bar = 100  $\mu$ m



**Fig. 5. Enhancement of bone formation by YC-1 in the tibia metaphysis of rats.**

YC-1 (0.1 nmole/day) was percutaneously injected through the needle cannula (as shown by arrow) into the proximal tibia once/day for 1 day or 1 week. DMSO at 0.03% was injected into the contralateral side for comparison. On the Day-14, the rats were sacrificed and tibiae were used for the analysis of bone volume. Compared with vehicle-treated side (A), the photomicrographs of decalcified tibial metaphysis showed a marked increase in bone mass induced by intraosseous injection of YC-1 for 1 week (B). The black box area was shown at a higher magnification in (C) and (D), respectively. (E) Summary of the results. [ Mean±S.E.(n) ] Note that injection of YC-1 for 7 days but not 1 day significantly increased bone volume. Bar = 1mm (A & B) or 200  $\mu$ m (C & D).



**Fig. 6. NO-cGMP-PKG-dependent enhancement of bone volume by YC-1.**

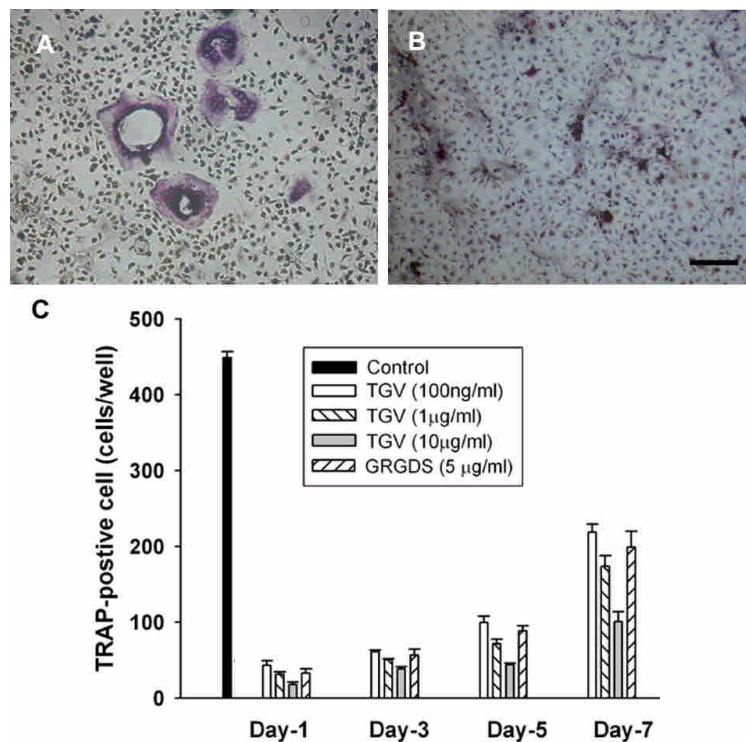
YC-1 with or without related inhibitors were daily injected into tibia through a needle cannula for 7 days. The tibia was then isolated 7 days following the last injection. Note that the increase of bone volume by YC-1 (0.1 nmole/day) (A) was significantly inhibited by NOS inhibitor L-NAME (0.6 nmole/day) (B), soluble guanylyl cyclase inhibitor ODQ (C, 0.2 nmole/day), and PKG inhibitor KT 5823 (D, 0.02 nmole/day). (E) Summary of the results [ Mean±S.E.(n) ]. Bar = 1 mm.

## 蛇毒蛋白成份對於破骨細胞分化及吸收的影響

破骨細胞是巨噬細胞家族的成員，可由骨髓中破骨前驅細胞分化而來，加入分化劑 M-CSF (20 ng/ml) 及 RANKL (50 ng/ml) 經過 8 天，會形成多核且巨大的破骨細胞。利用 tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 染色發現 trigramin 隨著濃度抑制破骨細胞分化的能力(Fig. 7)。接下來觀察 trigramin 對於成熟破骨細胞吸收能力的影響，將破骨前驅細胞種在 OAAS plate 中，給予 M-CSF 及 RANKL 分化 5 天，接下來將分化劑移除同時給予 trigramin 處理 3 天，trigramin 抑制成熟破骨細胞吸收的能力(Fig. 8)。因此蛇毒蛋白成份 trigramin 參與破骨細胞分化及吸收的過程中。

## 蛇毒蛋白增加幼鼠局部脛骨合成

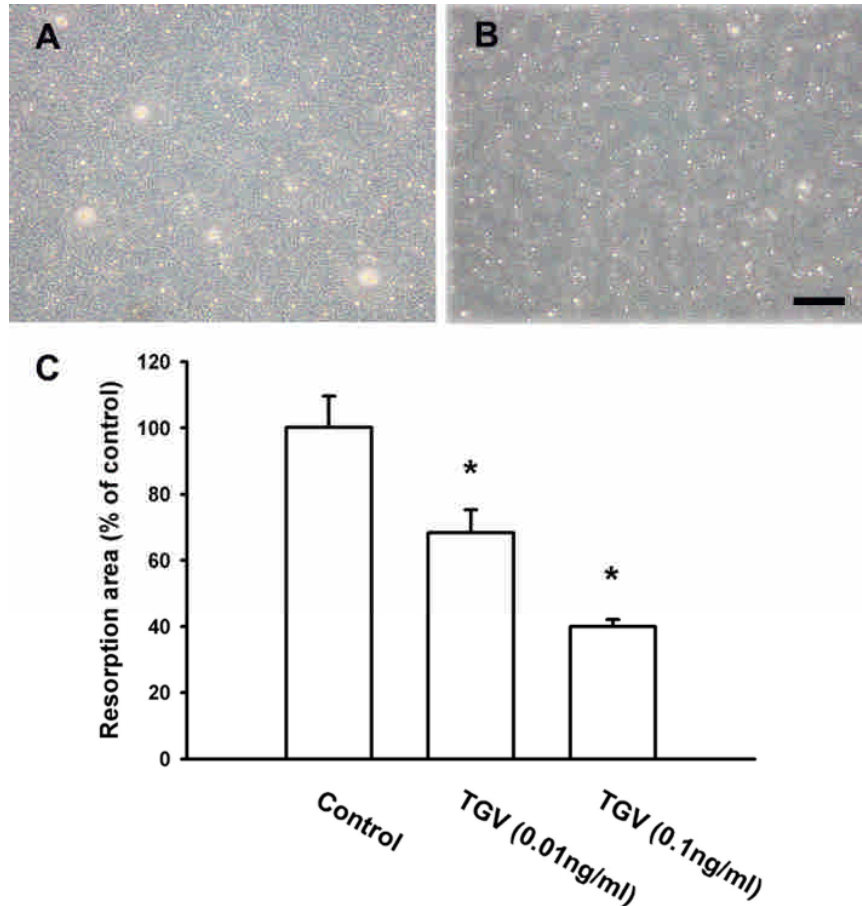
利用動物模式研究蛇毒蛋白成份對於骨合成的影響。經由 22G 針頭局部注射 trigramin 在脛骨之內，持續給予 7 天後，在第 14 天將動物犧牲取出脛骨。Trigramin 促進次級海綿骨的骨量(Fig. 9)。同時 trigramin 也增加脛骨內 BMD 及 BMC 含量 (Table 1)。



**Fig 7. Inhibition of osteoclast differentiation by disintegrin**

Osteoclast precursors isolated from rat long bone were plated on a 24-well plate at  $1 \times 10^6$  cells/well and cultured in the presence of 20 ng/ml M-CSF and 50 ng/ml sRANKL for 8 days. Following TRAP staining, the cells with more than 3 nuclei were counted. Compared with control (A), TGV ( $\mu\text{g/ml}$ ) treatment markedly inhibited osteoclast differentiation. (C) Summary of the result. Data are presented as mean  $\pm$  S.E. obtained from 4 experiments.

\*  $p < 0.05$  as compared with control.

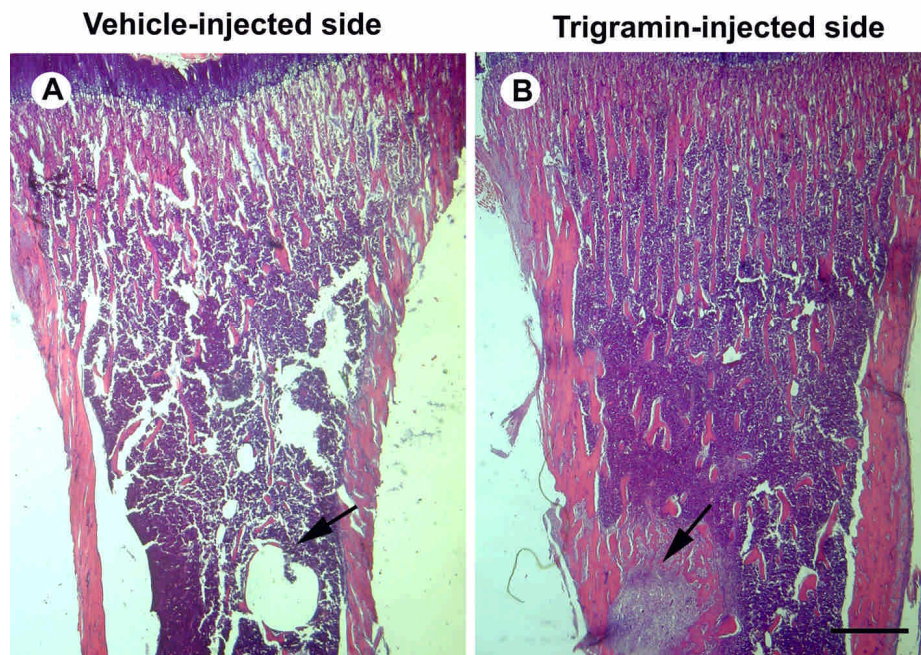


**Fig. 8. Inhibition of bone resorption by disintegrin.**

Osteoclast precursors isolated from rat long bone were plated on a 24-well OAAS plate at  $1 \times 10^6$  cells/well and cultured in the presence of 20 ng/ml M-CSF and 50 ng/ml sRANKL for 5 days. M-CSF and sRANKL were the withdrawaled and TGV was then added to culture. Resorbed lacunae on the OAAS plates were photographed under an inverted-phase-contrast microscope ( $\times 200$ ) 3 days after trigramine treatment. Note that compared with control (A), trigramine treatment inhibited bone resorption activity of osteoclast (B). (C) Total resorption area per well was measured by image analyzer and graphed. Each column represents the mean and S.E. of triplicate wells normalized for the mean value of control wells.

\*  $p < 0.05$  as compared with control.





**Fig. 3. Trigramin increased bone volume in tibia metaphysis of rats.**

Trigramin (10 or 100  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{l}$ , once/day) was locally injected into tibia through the needle cannula (arrow) into the proximal tibia for 1 week. Vehicle was injected into the contralateral side for comparison. Rats were sacrificed and the tibiae were used for analysis of bone volume on the Day-14. Compared with vehicle-treated side (A), chronic treatment with trigramin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) markedly increased bone volume (B). Bar = 0.5 mm.

**Table 1. Effect of trigramin on the bone mineral density, bone mineral content and bone volume in tibia**

	Contralateral side	Trigramin (10 $\mu\text{g/ml}$ )	Trigramin (100 $\mu\text{g/ml}$ )
BMD ( $\text{g/cm}^2$ )	0.07 $\pm$ 0.003	0.084 $\pm$ 0.003*	0.089 $\pm$ 0.002*
BMC (g)	0.077 $\pm$ 0.006	0.093 $\pm$ 0.006*	0.11 $\pm$ 0.007*
BV/TV (%)	7.41 $\pm$ 0.78	13.6 $\pm$ 1.27*	16.18 $\pm$ 1.02*

\*  $p < 0.05$ : significant difference between groups.

## 參考文獻

- an der Flier A and Sonnenberg A (2001) Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* **305**:285-298.
- Brighton CT, Albelda SM: Identification of integrin cell-substratum adhesion receptors on cultured rat bone cells. *J Orthop Res* 10:766-773, 1992.
- Clark EA, Brugge JS: Integrins and signal transduction pathway: the road taken. *Science* 268:233-239, 1995.
- Clover J, Dodds RA, Gowen M: Integrin subunit expression by human osteoblasts and osteoclasts in situ and in culture. *J Cell Sci* 103:267-271, 1992.
- Damsky CH: Extracellular matrix-integrin interactions in osteoblast function and tissue remodeling. *Bone* 25:95-96, 1999.
- Ferrell JE, Martin GS: Tyrosine-specific protein phosphorylation is regulated by glycoprotein IIb-IIIa in platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2234-2238, 1989.
- Forstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H (1995) Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol* **50**:1321-1332.
- Frisch SM and Francis H (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* **124**:619-626.
- Haas TA, Plow EF: Integrin-ligand interactions: a year in review. *Curr Opin Cell Biol* 6:656-662, 1994.
- Hynes R: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25, 1992.
- Ignarro LJ (1992) Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: A widespread signal transduction mechanism. *Biochem Soc Trans* **20**:465-469.
- Juilfs DM, Soderling S, Burns F, Beavo JA (1999) Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **135**:67-104.
- Li Z, Zhou Z, Yellowley CE, Donahue HJ (1999) Inhibiting gap junctional intercellular communication alters expression of differentiation markers in osteoblastic cells. *Bone* **25**:661-666.
- Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J: *Molecular biology*, 3<sup>rd</sup> ed. 1995.
- Morris SM and Billiar TR (1994) New insight into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* **266**:E829-839.
- Moursi AM, Damsky CH, Luli J, Zimmerman D, Doty SB, Aota S, Globus RK: Fibronectin regulated calvarial osteoblastic differentiation. *J Cell Sci* 109:1369-1380, 1996.
- Oldberg A, Franzen A, Heiegard D, et al. Identification of a bone sialoprotein receptor in osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 263:19433-19436, 1988.
- Schwartz MA, Ingber DE: Integrating with integrins. *Mol Biol Cell* 5:389-393, 1994.
- Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH: Integrins: emerging paradigms of signal



- transduction. *Ann Rev Cell Dev Biol* 11:549-599, 1995.
- Shafer OT, Chen A, Kumar SM, Muller KJ, Sahley CL (1998) Injury-induced expression of endothelial nitric oxide synthase by glial and microglial cells in the leech central nervous system within minutes after injury. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **265**:2171-2175.
- Shattil SJ, Ginsberg MH, Brugge JS: Adhesive signaling in platelets. *Curr Opin Cell Biol* 6:695-704, 1994.
- Shinar D, Schmidt A, Halperin D, et al.: Expression of  $\alpha v$  and  $\beta 3$  integrin subunits in rat osteoclasts in situ. *J Bone Miner Res* 8:403-414, 1993.
- Tintut Y, Parhami F, Le V, Karsenty G and Demer LL (1999) Inhibition of osteoblast-specific transcription factor Cbfa 1 by the cAMP pathway in osteoblastic cells. *J Biol Chem* **274**:28875-28879.
- Vuori K: Integrin signaling: Phosphorylation events in focal adhesion. *J Mem Biol* 165:191-199, 1998.
- Zagotta WN and Siegelbaum SA (1996) Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu Rev Neurosci* **19**:235-263.

### 與本計劃相關且已發表的論文

1. **Yang RS**, Tang CH, Chuang WJ, Huang TH, Peng HC, Huang TF, Fu WM (2005) Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. *Toxicon* 45:661-9. (SCI)
2. **Yang RS**, Chiang HS, Tang CH, Yeh CS, Huang TF (2005) Rhodostomin inhibits thrombin-enhanced adhesion of ROS 17/2.8 cells through the blockade of  $\alpha v \beta 3$  integrin. *Toxicon*. 46:387-393. (SCI)
3. Tang CH, **Yang RS**, Huang TH, Lu DY, Chuang WJ, Huang TF, Fu WM. (2006) Ultrasound stimulates cyclooxygenase-2 expression and increases bone formation through integrin, FAK, phosphatidylinositol 3-kinase and Akt pathway in osteoblasts. *Molecular Pharmacology* (SCI).