PG9403-0164 (75 頁)
CCMP94-RD-012

編號：CCMP 94 -RD-012

行政院衛生署中醫藥委員會 94 年度
研究計畫成果報告

台灣蒲公英之類雌激素作用在骨質疏鬆症預防與治療之評估

Evaluate the estrogen like activity of *Taraxacum formosanum* on prevention and treatment of osteoporosis

執　行　機　構：臺北醫學大學

計 畫 主 持 人：許秀蘊

研　究　人　員：李雅嫈，黃植煒，于逸筑

執　行　期　限：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

＊＊ 本研究報告僅供參考，不代表本會意見 ＊＊

目錄:

中文摘要.....3
英文摘要.....4
壹、前言.....5
貳、材料與方法
一. 台灣蒲公英之萃取、分離及鑑定.....5
二. 細胞培養.....5
三. 細胞活性實驗
（一）細胞活性測試(MTT)測定法.....6
（二）鹼性磷酸酵素(ALP)活性測試法.....6
（三）骨母細胞礦化活性測試法(Von Kossa Stain).....7
（四）即時(Real-time)定量反轉錄聚合酶連鎖反應
(雌激素接受器 α、β；骨鈣素及第一型膠原蛋白；蝕骨細胞抑制蛋白及其結合因子等)
1. Total RNA 之純化.....8
2. 反轉錄(Reverse transcriptase, RT)合成 cDNA.....8
3. 選擇即時定量聚合酶連鎖反應使用之 primer.....8
4. 即時定量聚合酶連鎖反應.....8
參、結果
一. 台灣蒲公英之萃取、分離及鑑定.....9
二. 細胞活性分析(MTT assay).....9
三. TF-1 對新生鼠骨母細胞鹼性磷酸酶(ALP)活性的影響.....9
四. TF-1 對新生鼠骨母細胞鈣堆積的影響.....10
五. 骨細胞之特定基因表現
(一). TF-1 與 E_2 對新生鼠骨母細胞 ERα及β mRNA 表現的影響.....10
(二). TF-1 與 E_2 對新生鼠骨母細胞 COL I, ALP 及 OCN mRNA 表現的影響.....11
(三). TF-1 與 E_2 對新生鼠骨母細胞 OPG 及 OPGL mRNA 表現的影響.....11
(四). TF-1(10^{-7} mg/mL)與 $E_2 10^{-9}$M 對成鼠骨母細胞的影響
1.成鼠與新生鼠骨母細胞的生長曲線(MTT assay).....12
2. TF-1 與 E_2 對成鼠骨母細胞細胞活性的影響.....12
肆、討論.....12
伍、結論與建議.....14
陸、參考文獻.....23

圖表目錄:

圖 1.....15
圖 2.....15
圖 3.....16
圖 4.....16
圖 5.....17
圖 6.....17
圖 7.....18
圖 8.....18
圖 9.....19
圖 10.....19
圖 11.....20
圖 12.....20
圖 13.....21
圖 14.....21

表 1.....22
表 2.....22
表 3.....22
表 4.....22

台灣蒲公英之類雌激素作用在骨質疏鬆症預防與治療之評估

許秀蘊

台北醫學大學

摘要

隨著社會平均年齡之增加，更多的老年人飽受骨質疏鬆之苦，尤其是停經後之婦女。本研究以剛出生及八個月大之成鼠之骨母細胞體外培養之模式，以各種分子生化之觀點來探討台灣固有種---台灣蒲公英，印證其是否具類雌激素之療效，其活性組成是否具類植物性雌激素之作用，解析其對骨細胞的作用機制，並在臨床上適時適地應用於預防或治療骨科相關之疾病。

於初代骨母細胞(初生四天之幼鼠及八個月大之成鼠)的培養模式中，藉由各種分子生化上之表現，如細胞活性測試、鹼性磷酸酵素、骨鈣素及第一型膠原蛋白等蛋白質表現、骨細胞上雌激素接受器之表現、蝕骨細胞抑制蛋白及其結合因子與鈣染色法等來評估台灣蒲公英之影響，探討在細胞分子層面上與雌激素接受體的關係如 **collagen type I, ALP, OPG, OPGL, estrogen receptors (ERα and ERβ) mRNAs**，在整個骨之生成之過程中所扮演之角色。

結果發現，以新生鼠骨母細胞實驗模式下，植物雌激素 **daidzein(10^{-6}~10^{-9}M)**不會使細胞增生。而台灣蒲公英萃取物 **TF-1** 在 **10^{-7}mg/mL** 有最高的新生鼠骨母細胞增生促進率。而在成鼠骨母細胞實驗模式下，**daidzein** 和 **TF-1** 比 **17β-estradiol** 更能促進細胞活性，且經氫譜測知 **TF-1** 為一 **coumarin**。所以 **TF-1** 對於新生鼠和成鼠都具有細胞增生的作用，其中又以對成鼠的效果最佳，本實驗以八個月的雌性成鼠模擬更年期的婦女，因此，**TF-1** 可能對於更年期婦女骨質疏鬆的治療具有正面的意義。

關鍵詞【至少三項】：台灣蒲公英，類雌激素 ，骨質疏鬆症。

Evaluate the estrogen like activity of *Taraxacum formosanum* on prevention and treatment of osteoporosis

Shiow-Yunn Sheu
Taipei Medical University

ABSTRACT

The increasing of average age in the society, more elders especially the postmenopausal woman, are threaten by osteoporosis. So we try to explore the native herb in Taiwan, *Taraxacum formosanum*, to clarify the mechanism underlying the estrogen like activity in osteoblast cells from neonatal and 8-months mice in vitro. The bioactive component will be elucidated and action mechanism on bone cells be evaluated to prevent from or treat bone disease.

Base on primary cell culture model of osteoblast cells from neonatal and 8-months mice in vitro, we try to analyze cells viability, alkaline phosphatase, protein expression of osteocalcin and type I collagen, and calcium accumulation. The detectable levels of collagen type I, ALP, OPG, OPGL, estrogen receptors (ERα and ERβ) mRNAs on osteoblast cells were evaluated the role of *Taraxacum formosanum* playing on bone cell formation.

The results presented herein characterize the cellular effects of estrogen-like activities of extract of *Taraxacum formosanum* (TF-1) on osteoblast cells. TF-1 induced a increase in osteoblast proliferation and the cellular expression of osteoblast-specific genes , with the optimum effects at 10^{-7} mg/mL compared with phytoestrogen (daidzein, 10^{-6}~10^{-9}M). Also it was found by 1H-NMR spectrum that TF-1 is one of coumarin. TF-1 can increase bone formation to prevent the development of osteoporosis.

Keywords【至少三項】: *Taraxacum formosanum*，estrogen like，osteoporosis。

壹、前言

附件 4

在孩童時期骨骼中的骨質會增加，而骨質量達到尖峰則在近 30 歲時，其中女性又較男性低。從中年時期後，骨質量開始隨著年齡下降，尤其是婦女於停經後因體內雌激素(estrogen)的缺乏，導致骨質的流失[Riggs BL et al., 1986; Kraemer DF et al, 2005]，因此停經後的女性是骨質疏鬆症的高危險群[Cormier C et al, 2004; Gunby MC, 1994; Karga H et al, 2004]。骨質疏鬆症是一種骨骼疾病，會使骨骼逐漸變得脆弱，最後很容易就發生骨折。骨質疏鬆症患者最容易發生骨折的部位是髖部、手腕，以及脊椎[Malovolta N et al, 2003; Marx J, 2004]。一旦這些部位發生骨折後，可能造成局部功能尚失，甚至有生命危險。

臨床上常見的骨質疏鬆治療藥物有鈣製劑、維他命 D、抑鈣素(calcitonin)、雌激素、氟化物及二磷酸酐類化合物(bisphosphonate)。其中雌激素是臨床上主要用於停經後婦女骨質疏鬆的標準治療法[Turner RT et al, 1994; Wronski TJ et al., 1988]，稱為雌激素補充療法。然而，利用雌激素補充療法具有潛在的危險性，長期服用雌激素會提高罹患子宮內膜癌，乳癌等的危險性[Colditz GA. 1999]。

近年來發現，在豆科與菊科植物中含有與雌激素結構或生物功能相似的成分[Hutabarat LS et al, 2000]，可預防骨質流失[Barnes S. 1998; Brandi ML, 1997; Tsutsumi N. 1995]，且能增進骨質密度[Picherit C et al, 2000]，稱之為植物雌激素。由於植物雌激素存在於豆類食物或天然植物中[Arjmandi BH et al, 1998]，無毒性且無雌激素的副作用，故以植物雌激素代替雌激素作為雌激素補充療法對於停經後婦女骨質疏鬆之治療，是目前許多研究之方向。所以探討台灣固有種---台灣蒲公英，印證其是否具類雌激素之療效，其活性組成是否具類植物性雌激素之作用，解析其對骨細胞的作用機制，並在臨床上適時適地應用於預防或治療骨科相關之疾病。

貳、材料與方法

一. 台灣蒲公英之萃取、分離及鑑定

台灣蒲公英以甲醇萃取濃縮後,依極性大小用正丁醇、水等溶媒劃分, 此粗劃分物先進行細胞活性、酵素活性測試，其具生物活性之粗劃分層，再利用各種逆相管柱層析法(diaion、sephadex、ODS 等) 分離純化, 經質譜、核磁共振光譜、化學反應等解析其結構式。再進一步測試對骨母細胞.、蝕骨細胞各種酵素、雌激素接受器及蛋白質之表現。

二. 細胞培養

使用新生鼠的頭蓋骨以細菌性的膠原酵素處理約半小時，數次之後所培養出的骨細胞就具有骨母細胞的特徵，而後再使用 trypsin 就可將其他的蛋白質，例如：纖維母細胞或是膠原蛋白質消化掉，而得到純化的骨母細胞可供實驗使用。

三. 細胞活性實驗

先以新生鼠骨母細胞為實驗模式，測定細胞活性分析(MTT assay)，篩選具細胞增生的植物雌激素種類及濃度，再做植物雌激素及台灣蒲公英在最佳濃度下對骨母細胞鹼性磷酸酶(ALP)，細胞鈣堆積分析，進而做分子層面的探討。探討其在最佳濃度下，對於雌激素接受體，蝕骨細胞抑制蛋白(OPG)及其結合因子(OPGL)及骨母細胞分化指標(COL I, ALP, OCN) mRNA 表現的影響。

再進一步以八個月大之母鼠的骨母細胞為實驗，模擬更年期骨母細胞的細胞活性，探討其在最佳濃度下，對於成鼠骨母細胞細胞活性分析(MTT assay)的影響，是否與新生鼠骨母細胞結果一致，也更具有治療老年骨質疏鬆症正面意義。

(一) 細胞活性測試(MTT)測定法

骨母細胞移植於 96-well plates 共有三盤，分為加藥後 1、3、7 天後測量其 MTT 值

↓ 將 96 well plate 拿出從 CO_2 培養箱

↓ 吸除 well 內 DMEM, 加入 25ml MTT 於 96 well

↓ 於 CO_2 culture box 靜置 4hrs

↓ 吸除 MTT, 加入 100μl 0.04N HCl/EtOH, 測 570nm 處的吸光值

(二) 鹼性磷酸酵素(alkaline phosphatase；ALP)活性測試法

↓ 培養於 24-well 的骨母細胞共有三盤，分別為加藥後培養 1、3、7 天用，當其測量時，先以 pipet 吸除 DMEM 分裝成兩管的 eppendorf(各 0.5ml)，再以 0.3ml 的 PBS 沖刮下貼盤的骨母細胞，置入另一隻 eppendorf 中，將收集好的 eppendorf 放入-80°C 冰箱中保存

↓ 當 1、3、7 天裝有 DMEM 或骨母細胞的 eppendorf 都收集好後，即可準備測量 ALP 值

↓ 將 ELISA 分析儀先設定為 Kinetic 測量：先震搖混合 3 分鐘，實驗測量共 5 分鐘，其測量間隔為 1 分鐘，故有 6 的測量時間點(0、1、2、3、4、5)，且定溫為 30°C

↓ 取出二盤的 96 well 的細胞培養盤(一盤作為 DMEM 的測量，另一盤則為骨母細胞的測量)，並將 ALP reagent 泡好準備，先行用細胞均質機將含有骨母細胞的 PBS 震勻

將待測的 DMEM 或骨母細胞液從 eppendorf 中取出 5μl 放入 96-well plate 中

↓ 將 ALP reagent 倒入八爪 pipet 槽中，並設定八爪 pipet 吸取量為 125μl，隨即吸取 ALP reagent，放入 96-well plate 中，共二次，使每個 well 內的 ALP reagent 都有 250μl（加入 ALP 的動作需在一分鐘內完成）

↓ 注入 ALP reagent 後，立即將分析盤放入 ELISA 分析儀，並按下 read 鍵進行實驗，測定各樣品的 OD_{405} 值。

↓ 當吸光值測量結束後，將所顯示之數據複製至 Excel 中進行處理

計算式

$$\text{ALP (U/L)} = \frac{\Delta A \text{ per min} \times TV \times 1000}{18.45 \times SV \times LP}$$

U：酵素的活性單位=每分鐘所能催化生成物的 μ mole 數

ΔA per min：波長 405nm 每分鐘的吸收值的差

TV：總體積（mL）

SV：sample 的體積

18.45：p-nitrophenol 於 405nm 下的毫莫耳吸收值

LP：光徑（1cm）

（三）骨母細胞礦化活性測試法(Von Kossa Stain)

↓ 培養於 24-well 的骨母細胞共有三盤，分別為加藥後培養 1、3、7 天用，當其測量時，先以 pipet 吸除 DMEM，並以 PBS 沖洗 well 數次

↓ 加入 10% Formain 500 μl 用以固定細胞，靜置一小時

↓ 一小時後以 pipet 吸除 Formain，並以二次水清洗數次

↓ 將二次水吸乾後，加入 $AgNO_3$ 試劑 500μl，並放置於紫外燈或強烈光源下照射一天

↓ 吸除 $AgNO_3$ 後，以目測觀察每個 well，若有黑褐色的顆粒產生即為磷酸銀或碳酸銀沈澱

以 Kodak DC-290 數位相機攝影後留存紀錄

（四）即時(Real-time)定量反轉錄聚合酶連鎖反應

(雌激素接受器 α、β；骨鈣素及第一型膠原蛋白；蝕骨細胞抑制蛋白及其結合因子等)

ICR mice

↓ α-MEM medium

↓ 37°C, 5% CO2

↓ 7 days

↓ 自細胞萃取、純化及定量 total RNA

↓ 反轉錄(Reverse transcriptase, RT)合成 cDNA

↓ 即時定量聚合酶連鎖反應使用之 primer

↓ 即時定量聚合酶連鎖反應

↓在 RT-PCR 下進行大量複製反應，依照不同的 primer 設定不同的條件
↓經聚合酶連鎖反應後，得到大量之 DNA 產物
↓經電泳分析，可看到 band 的大小及正確位置

1. Total RNA 之純化

(1). 前處理

吸除 6-well plate 內之培養基，再用 PBS 洗兩次後，移除 PBS。加入 1X Nucleic acid purification lysis solution (ABI) 0.5 mL，輕輕搖動 dish，待細胞完全溶解在 lysis 中，用 pipetman 吸取至兩管 1.5 mL 之 eppendoff 中。離心 1500rpm，5 分鐘，目的為去除微小骨碎片。移液至另一個 eppendoff 中，注意不要吸取到沉積之骨脆片。再離心 12000rpm，1 分鐘，目的為消除氣泡。利用 ABI 6100 Nucleic acid prepstation 進行 total RNA isolation。

(2). Total RNA 之分離

(3). Total RNA 含量分析

利用光譜儀(Spectrophotometer, Hitachi 2000)測定檢品在 260nm 及 280nm 的吸光值。依下列公式計算 total RNA 的濃度(Cr)及品質(Q)：

$$Cr\ (ng/\mu L) = OD_{260} * 40\mu g/mL * 稀釋倍數$$

$$Q = OD_{260} / OD_{280}$$

Q 值愈大表示 total RNA 的品質愈好，純度愈高。Q 值需大於 1，才可進行反轉錄合成 cDNA 程序。

2. 反轉錄(Reverse transcriptase, RT)合成 cDNA

依條件進行反轉錄反應-1(RT-1)，其中 total RNA 加入量(X1)視檢品 total RNA 濃度而定，total RNA 的反應量為 1ng～5μg。Total RNA 加入量(X1)和 DEPC 加入量(Y1)總體積為 7μL。

反轉錄反應-1 (RT-1)結束後，將檢品迅速置於冰上 3 分鐘，保持 RNA 結構成直線。依條件進行反轉錄反應-2 (RT-2)。

計算 cDNA 濃度(Cc)：

$$Cc\ (ng/\mu L) = Cr * 2 * (RT\ 加入\ total\ RNA\ 之體積)/(RT\ 總體積)$$

3. 選擇即時定量聚合酶連鎖反應使用之 primer

4. 即時定量聚合酶連鎖反應

依條件進行即時定量聚合酶連鎖反應，其中 templet cDNA 加入量(X2)視實驗需要而定。Templet cDNA 加入量(X2)和 d.d. water 加入量(Y2)總體積為 7.5μL。

參、結果

在本實驗中，不論在新生鼠骨母細胞或八個月大之母鼠骨母細胞的細胞活性分析(MTT assay)上，台灣蒲公英在最佳濃度下皆使骨母細胞活性增加。在新生鼠骨母細胞實驗模式下，鹼性磷酸酶活性無明顯差異；鈣堆積含量增加；ERα mRNA 表現不變，ERβ mRNA 表現提早；OPG 及 OPGL mRNA；COL I，ALP 及 OCN mRNA 表現增加。

一.台灣蒲公英之萃取、分離及鑑定

台灣蒲公英以甲醇萃取濃縮後,依極性大小用乙酸乙酯、水等溶媒劃分,此粗劃分物先進行細胞活性、酵素活性測試，其具生物活性之粗劃分層(Fr.3)，再利用各種逆相管柱層析法(diaion、sephadex、ODS)等，在各種溶媒系統下(H_2O ~ MeOH; EtOH; 20% ~ 60% MeOH 等)，分離純化，初得 TF-1，如圖 1 所示，以活性測試後剩餘之量測得氫譜，初判為一 coumarin。

二. 細胞活性分析(MTT assay)

以新生鼠骨母細胞為實驗模式，加入不同濃度(10^{-6} ~ 10^{-9}M)之 daidzein 及(10^{1} ~ 10^{-3}mg/mL)之粗萃物(Fr.3)，控制組為含 0.01% DMSO 及 0.01% 酒精之 PBS。由表 1，2 中，在細胞培養加藥 1～21 天期間，控制組的 MTT 吸光值會隨著培養時間延長而增加，於第 14 天時達到高峰。但在第 21 天的時候，控制組 MTT 吸光值則開始下降，有可能當骨母細胞逐漸形成多層的細胞層時，增生速率則會趨緩，並逐漸凋亡有關。

加 daidzein 組在第 1 天，10^{-12}M daidzein 略增加 9.4%。第 7 天，加藥組和控制組之間吸光值接近，二者之間沒有明顯的差異且無統計上的意義。而第 14 天，daidzein 濃度 10^{-9},10^{-12}M 較控制組 O.D.值略低 13.9%和 23.6%。在第 21 天時，加藥組與控制組的骨母細胞活性皆已下降。所以加入不同濃度 daidzein 對新生鼠骨母細胞在細胞增生無明顯的效果。

加粗萃物(Fr.3)藥組在第 1 天，五個不同濃度均比控制組有顯著的促進效果(110.3%～174.9%)，其中以 10^{-1}, 10^{-2} mg/mL 這兩個濃度對骨母細胞 MTT assay 具有最大的促進率，分別為 173.5%及 174.9%。第 7 天，五個不同濃度均比控制組有顯著的促進效果(114.9%～130.0%)，其中以 10^{-1}, 10^{-2} , 10^{-3} mg/mL 這三個濃度對骨母細胞 MTT assay 具有最大的促進率，分別為 128.1%，128.3%及 130.0%。而第 10 天，以 10^{-1} 及 10^{-3} mg/mL 這兩個濃度對骨母細胞 MTT assay 具有最大的促進率，分別為 139.5%及 133.7%。而第 14 天，以 10^{-2} 及 10^{-3} mg/mL 這兩個濃度對骨母細胞 MTT assay 具有最大的促進率，分別為 128.0%及 125.6%。在第 21 天時，加藥組與控制組的骨母細胞活性皆已下降。而粗萃物 Fr.3 (10^{1} ~ 10^{-3}mg/mL)，對新生鼠骨母細胞在細胞增生明顯的效果，以第 10 天，10^{-1} mg/mL 具最大的促進率。

三. TF-1 對新生鼠骨母細胞鹼性磷酸酶(ALP)活性的影響

從 daidzein 與台灣蒲公英之 TF-1 對新生鼠骨母細胞細胞活性結果可知，

TF-1 比 daidzein 較具有使細胞增生的效果，其中以第 10 天，10^{-7} mg/mL 具有最大的促進率。在細胞加藥第 1~28 天期間，我們對加藥組和控制組的細胞培養液檢品進行鹼性磷酸酶(ALP)的定性分析。從表 3 結果顯示，在細胞加藥第 1～14 天的期間，控制組的 ALP 活性隨著培養時間拉長而吸光值愈高，於第 14 天時達到高峰。而在加藥達第 21 天時，因骨母細胞活性的反應而減弱。而加入 TF-1(10^{-7} mg/mL) 骨母細胞之 ALP 活性看起來與控制組極為類似，在第 7，14，21 天略低約 15%，但二者之間沒有明顯的差異。所以，TF-1(10^{-7} mg/mL) 對於新生鼠骨母細胞鹼性磷酸酶(ALP)活性無太大的差異，如圖 2 所示。

四. TF-1(10^{-7} mg/mL)對新生鼠骨母細胞鈣堆積的影響

從 daidzein 與 TF-1(10^{-7} mg/mL)對新生鼠骨母細胞細胞活性結果可知，TF-1 比 daidzein 較具有使細胞增生的效果，其中以第 10 天，TF-1 具有最大的促進率。所以本實驗以 TF-1(10^{-7} mg/mL)為最佳濃度當加藥組，控制組為含 0.01% DMSO 及 0.01% 酒精之 PBS。

在細胞加藥第 1~28 天期間，加藥組和控制組的檢品進行鈣堆積鈣含量分析。從表 4 結果顯示，在細胞培養達第 1～7 天的期間，我們未測到控制組的鈣含量，到第 14～28 天隨著培養時間拉長而鈣含量愈高，於第 28 天時達到高峰。而在加藥達第 14 天時，加 TF-1(10^{-7} mg/mL) 之骨母細胞鈣含量與控制組比較增高 400%，二者之間有明顯的差異。所以，TF-1(10^{-7} mg/mL) 對於新生鼠骨母細胞鈣堆積鈣含量有極大的增加，如圖 3 所示。

五. 骨細胞之特定基因表現

(一). TF-1 與 E_2 對新生鼠骨母細胞 ERα及β mRNA 表現的影響

在細胞加藥第 1~21 天期間，控制組和加藥組(10^{-9}M E_2:17β-estradiol; TF-1:10^{-7} mg/mL)的細胞檢品進行 ERα及β的實驗。在細胞培養達第 1～21 天的期間，我們測到控制組的 ERα mRNA 表現不隨著培養時間增加而有明顯的變化。在加藥 10^{-9}M E_2 和 TF-1(10^{-7} mg/mL)中，兩組加藥組對新生鼠骨母細胞之 ERα mRNA 表現與控制組比較，之間有無明顯的差異。所以，加入 10^{-9}M E_2 和 TF-1(10^{-7} mg/mL)對於新生鼠骨母細胞 ERα mRNA 表現未有明顯差異，如圖 4 所示。。

在細胞培養達第 1～14 天的期間，控制組的 ERβ mRNA 表現隨著培養時間增加而有明顯的增加，最高峰為第 14 天，到第 21 天略為下降。在加藥 10^{-9}M E_2 後，和控制組之 ERβ mRNA 表現比較略低。加入 TF-1(10^{-7} mg/mL)，第 21 天後，加藥組對新生鼠骨母細胞與控制組比較 ERβ mRNA 較高 1.57 倍，之間有明顯的增加。所以，10^{-9}M E_2 對於新生鼠骨母細胞 ERβ mRNA 表現未有明顯差異。而 TF-1(10^{-7} mg/mL)對於新生鼠骨母細胞 ERβ mRNA 表現明顯增加，如圖 5 所示。

在細胞培養達第 1～14 天的期間，控制組的 ERβ/ERα mRNA 比值表現，隨著培養時間增加而有明顯的增加，最高峰為第 21 天，顯示新生鼠骨母細

胞 ERβ的表現較 ERα強。在加藥 10^{-9}M E_2 後，和控制組之 ERβ/ERα mRNA 表現比較略低。加入 TF-1(10^{-7} mg/mL)第 21 天後，加藥組對新生鼠骨母細胞與控制組比較 ERβ/ERα mRNA 較高 2 倍，其間有明顯的增加。所以，10^{-9}M E_2 對於新生鼠骨母細胞 ERβ/ERα mRNA 表現未有明顯差異。TF-1(10^{-7} mg/mL)對於新生鼠骨母細胞 ERβ/ERα mRNA 表現明顯增加，如圖 6 所示。

(二). TF-1 與 E_2 對新生鼠骨母細胞 COL I, ALP 及 OCN mRNA 表現的影響

在細胞培養達第 1 天的時間，控制組的 COL I mRNA 表現。在加藥 10^{-9}M E_2 後，和控制組之 COL I mRNA 表現比較高 1.336 倍。加入 TF-1(10^{-7} mg/mL)對新生鼠骨母細胞與控制組比較 COL I mRNA 較高 1.67 倍，之間有明顯的增加。所以，10^{-9}M E_2 與 TF-1(10^{-7} mg/mL)對於新生鼠骨母細胞 COL I mRNA 表現皆明顯增加，其中又以 TF-1(10^{-7} mg/mL)較大，如圖 7 所示。

在細胞培養達第 7 天的時間，控制組的 ALP mRNA 表現。在加藥 10^{-9}M E_2 後，和控制組之 ALP mRNA 表現比較高 1.212 倍。加入 TF-1(10^{-7} mg/mL)對新生鼠骨母細胞與控制組比較 ALP mRNA 較高 3.605 倍，之間有明顯的增加。所以，10^{-9}M E_2 與 TF-1(10^{-7} mg/mL)對於新生鼠骨母細胞 ALP mRNA 表現皆明顯增加，如圖 8 所示。

在細胞培養達第 14 天的時間，控制組的 OCN mRNA 表現。在加藥 10^{-9}M E_2 後，和控制組之 OCN mRNA 表現比較低 0.35 倍。加入 TF-1(10^{-7} mg/mL) 對新生鼠骨母細胞與控制組比較 OCN mRNA 較高 2.116 倍，之間有明顯的增加。所以，10^{-9}M E_2 對於新生鼠骨母細胞 OCN mRNA 表現降低，TF-1(10^{-7} mg/mL)對於新生鼠骨母細胞 OCN mRNA 表現明顯增加，如圖 9 所示。

(三). TF-1(10^{-7} mg/mL)與 10^{-9}M E_2 對新生鼠骨母細胞 OPG 及 OPGL mRNA 表現的影響

在細胞培養達第 1～21 天的期間，控制組的 OPG mRNA 表現隨著培養時間增加而有明顯的增加，最高峰為第 21 天，到第 7 天略為下降。在加藥 10^{-9}M E_2 後，和控制組之 OPG mRNA 表現比較略低。加入 TF-1(10^{-7} mg/mL)第 1～21 天後，加藥組對新生鼠骨母細胞與控制組比較 OPG mRNA 較高，之間有明顯的增加。所以，10^{-9}M E_2 對於新生鼠骨母細胞 OPG mRNA 表現未有明顯差異。TF-1(10^{-7} mg/mL)對於新生鼠骨母細胞 OPG mRNA 表現明顯增加，如圖 10 所示。

在細胞培養達第 1～21 天的期間，控制組的 OPGL mRNA 表現隨著培養時間增加而有明顯的增加，最高峰為第 7～14 天，到第 21 天略為下降。在加藥 10^{-9}M E_2 後，和控制組之 OPGL mRNA 表現比較差異不大，除第 7 天較高。加入 TF-1(10^{-7} mg/mL)第 1～21 天後，加藥組對新生鼠骨母細胞與控制組比較 OPGL mRNA 較高，之間有明顯的增加。所以，10^{-9}M E_2 對於新生鼠骨母細胞 OPGL mRNA 表現除第 7 天較高外，未有明顯差異。TF-1(10^{-7} mg/mL)對於新生鼠骨母細胞 OPGL mRNA 表現明顯增加，如圖 11 所示。

在細胞培養達第 1～7 天的期間，控制組的 OPGL/OPG mRNA 比值表現

隨著培養時間增加而有明顯的增加，第 14～21 天降低，最高峰為第 7 天，顯示在第 7 天新生鼠骨母細胞 OPGL 的表現較 OPG 強。在加藥 10^{-9}M E_2 後，和控制組之 OPGL/OPG mRNA 表現比較，除第 7 天較高外差異不大。加入 TF-1(10^{-7} mg/mL) 第 21 天後，加藥組對新生鼠骨母細胞與控制組比較 OPGL/OPG mRNA 較高 2 倍，之間有明顯的增加。所以，10^{-9}M E_2 對於新生鼠骨母細胞 OPGL/OPG mRNA 表現未有明顯差異。TF-1(10^{-7} mg/mL)對於新生鼠骨母細胞 OPGL/OPG mRNA 表現明顯增加，如圖 12 所示。

(四) TF-1(10^{-7} mg/mL)與 $E_2 10^{-9}$M 對成鼠骨母細胞的影響

1. 成鼠與新生鼠骨母細胞的生長曲線(MTT assay)

從結果可知，新生鼠骨母細胞生長速率大於八個月母鼠骨母細胞。新生鼠骨母細胞 MTT 吸光值隨時間增長而增加，最高峰為第 14 天，第 21 天逐漸下降。而八個月母鼠骨母細胞 MTT 吸光值隨時間增長而增加，生長速率較慢，如圖 13 所示。

2. TF-1(10^{-7} mg/mL)與 $E_2 10^{-9}$M 對成鼠骨母細胞細胞活性的影響

以八個月母鼠骨母細胞維實驗模式下，加入 TF-1(10^{-7} mg/mL)與 10^{-9}M daidzein，用 10^{-9}M E_2 positive 對照實驗。從結果可知，控制組 MTT 吸光值會隨培養時間增長而增加，而加入 10^{-9}M E_2 positive 對照組在第 21 天相較控制組有最大促進率 150.0%。TF-1(10^{-7} mg/mL)在加藥第 7 天相較控制組有促進效果 135.9%，在第 21 天，最大促進率為 207.4%。植物雌激素 daidzein 在 10^{-9}M 濃度下，第 7 天和第 14 天相較控制組有促進效果分別為 130.7%，128.2%，在第 21 天，最大促進率為 141.8%。所以，在第 21 天，TF-1(10^{-7} mg/mL)對成鼠骨母細胞有較大的促進率(207.4%)，如圖 14 所示。

肆、討論

雌激素存在於人體，尤其對於女性的生理調節有很大的關係。女性在停經後,由於體內雌激素的缺乏，引起種種生理不適，其中最令人關注的健康問題為骨質的流失，造成骨質疏鬆症的發生。最近的研究指出，利用存在植物中活性相似雌激素的成分(植物雌激素)如：genistein，daidzein，可促使骨母細胞增生及分化 [Anderson JJB et al., 1997]。

本研究因此想探討植物雌激素對新生鼠骨母細胞的作用機制。在本實驗中，我們發現加入不同濃度(10^{-6}M，10^{-9}M，10^{-12}M)的植物雌激素 daidzein 對於新生鼠骨母細胞增生不受影響，與 2004 年 Michael L 的實驗結果一致 [Michael L et al., 2004]。而台灣蒲公英萃取物 Fr3，加入不同濃度(10^{1} ~ 10^{-3} mg/mL)對於新生鼠骨母細胞增生(MTT assay)，皆有促進的效果，且具有統計上的意義，其中以第 10 天時，10^{-1}M 對於新生鼠骨母細胞具有促進率 139.5%之增生作用。

接著探討對於骨母細胞分化的三個時期：增殖期，分化期，礦化期[Raouf

A and Seth A., 2002; Alberts B et al, 1994]中，分化期的指標鹼性磷酸酶(ALP)與礦化期會產生鈣堆積情況的影響。在鹼性磷酸酶活性分析實驗結果顯示，加入 TF-1(10^{-7} mg/mL)後隨培養時間增加，新生鼠骨母細胞鹼性磷酸酶活性略為降低，但降低程度不大，所以，TF-1(10^{-7} mg/mL)對於新生鼠骨母細胞鹼性磷酸酶活性影響不大。接著從實驗結果發現，在第 14 天時，加入 TF-1(10^{-7} mg/mL)比控制組的鈣含量增加 4 倍，且具有統計上的意義，所以，TF-1 具有加速新生鼠骨母細胞礦化作用。骨母細胞分化過程的最後階段為礦化，此時，骨母細胞凋亡並分化成成骨細胞，分泌鈣離子及與鈣鍵結有關的蛋白－骨鈣素（osteocalcin），形成具有支撐身體功能的骨骼。

雌激素會和雌激素接受體結合成錯合物，影響細胞核內的 DNA。雌激素受體分為兩種，ERα 和 ERβ。植物雌激素也會透過雌激素接受體進入細胞，影響細胞核內的 DNA。在骨母細胞中也發現到 ERα 和 ERβ 的存在，並且雌激素主要透過 ERβ 合成基質蛋白，如第一型膠原蛋白和鹼性磷酸酶[Harry C. Blair et al.,2003]。所以，利用即時定量聚合酶連鎖反應測定 ERα 和 ERβ mRNA 的表現，來瞭解 TF-1 與 E_2 對新生鼠骨母細胞內 ERα 和 ERβ mRNA 表現的影響。結果發現，新生鼠骨母細胞內主要為 ERβ，在第 21 天時，TF-1(10^{-7} mg/mL)比 10^{-9}M E_2 與控制組 ERβ mRNA 表現增強，可能會增加基質蛋白的合成[George GJM Kuiper, 1997; KM Wiren, 2002; Kolja Paech et al, 1997; Kuiper GG et al, 1996; Michael E et al, 2003] 。

骨母細胞的分化是一個複雜的過程，在三個時期中會有特定蛋白質的出現，可作為分期的指標。在增殖期，主要有第一型膠原蛋白(COL I)產生；在分化期，分泌鹼性磷酸酵素(ALP)；在礦化期，主要產生與鈣鍵結有關的蛋白－骨鈣素（osteocalcin，OCN）[Hisataka Y, 1998]。為探討 TF-1(10^{-7} mg/mL)對於新生鼠骨母細胞分子層面的影響，我們利用即時定量聚合酶連鎖反應測定 COL I，ALP 及 OCN mRNA 的表現。從實驗結果顯示，在第 1 天時，TF-1(10^{-7} mg/mL)與 10^{-9}M E_2 和控制組比較，其中 TF-1(10^{-7} mg/mL)之 COL I mRNA 表現較強，167.0%。在第 7 天時，TF-1 與 E_2 和控制組比較，其中 TF-1 之 ALP mRNA 表現較強，360.5%。而在第 14 天時，TF1 與 E_2 和控制組比較，其中 TF1 之 OCN mRNA 表現較強，211.6%； E_2 之 OCN mRNA 表現減弱，35%。所以，TF1 會影響新生鼠骨母細胞增殖，這與對新生鼠骨母細胞細胞活性(MTT assay)結果為增生一致。TF1 會影響新生鼠骨母細胞礦化，這與對新生鼠骨母細胞鈣堆積鈣含量增高 4 倍相符。僅分化過程，ALP mRNA 表現增強，ALP 活性分析略為降低，表示 TF1 會影響 transcription，但不影響 translation。

另外，為了間接探討 TF1 對蝕骨細胞的影響，我們利用即時定量聚合酶連鎖反應測定新生鼠骨母細胞 OPG 及 OPGL mRNA 的表現[Hisataka Y, 1998]。從實驗結果顯示，與抑制及活化蝕骨細胞有關的 OPG mRNA 表現延後且增強，OPGL mRNA 表現提前，第 21 天減弱表現，而這樣的結果透露 TF-1(10^{-7} mg/mL)對蝕骨細胞有間接的影響。

我們也進一步探討 TF-1(10^{-7} mg/mL)，10^{-9}M daidzein 與 10^{-9}M E_2 對八個

月 ICR 母鼠骨母細胞細胞活性(MTT assay)的影響。結果發現，TF-1，daidzein 與 E_2 和控制組比較，三者皆有促進增生作用，其中以 TF-1(10^{-7} mg/mL)在第 21 天有最高促進率為 207.4%，這比對新生鼠骨母細胞細胞活性(MTT assay)促進率高，推測 TF-1(10^{-7} mg/mL)對老化的骨母細胞具有較佳的增生效果。

伍、結論與建議

婦女更年期後產生的骨質疏鬆症臨床上的治療方式為雌激素補充療法，但是長期服用有可能誘發乳癌或子宮內膜癌。在植物中活性相似雌激素的成分具有雌激素活性，有可能成為一種較雌激素安全的藥物。本研究先以新生 ICR 小鼠為模式探討台灣蒲公英是否具類植物雌激素之作用，對骨母細胞在體外之生長機制。更進一步，以八個月 ICR 母鼠為模式探討台灣蒲公英對骨母細胞細胞活性的影響。

從本實驗結果中，發現台灣蒲公英 TF1 在 10^{-7} mg/mL 濃度下，對於新生鼠及八個月母鼠骨母細胞有使細胞增生作用，對新生鼠骨母細胞有加速礦化作用，在分子層面上，可使 ERβ mRNA 表現增強，與骨母細胞分化指標有關的 COL I，ALP，OCN mRNA 表現增強，表示 TF1 在骨母細胞的作用為增生及增加基質有關。特別是對八個月母鼠比對新生鼠骨母細胞細胞活性(MTT assay)促進率高，可能對於更年期婦女所造成骨質疏鬆症的治療有正面的意義。

與抑制及活化蝕骨細胞有關的 OPG mRNA 表現延後且增強，OPGL mRNA 表現提前，第 21 天減弱表現。而這樣的結果透露 TF1 對蝕骨細胞有間接的影響，綜上可知，台灣蒲公英與雌激素 17β-estradiol 在新生鼠與成鼠之骨母細胞具有不同模式之基因表現。

陸、圖、表

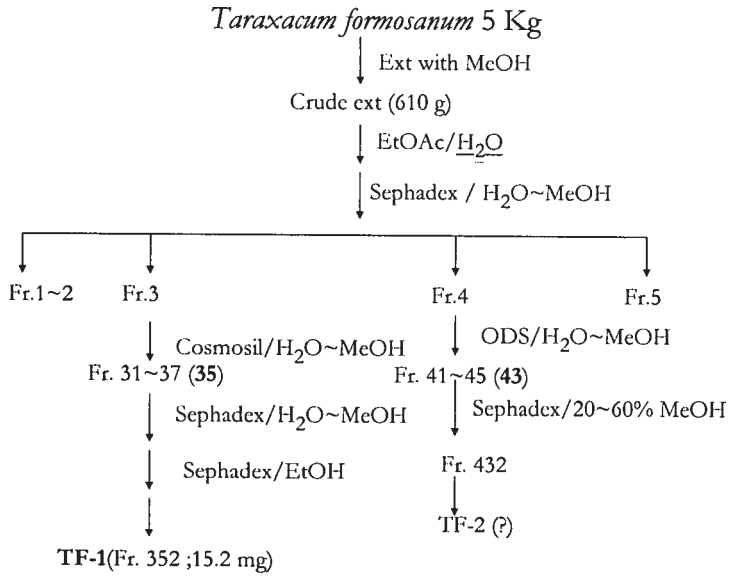

圖 1. 台灣蒲公英萃取流程圖

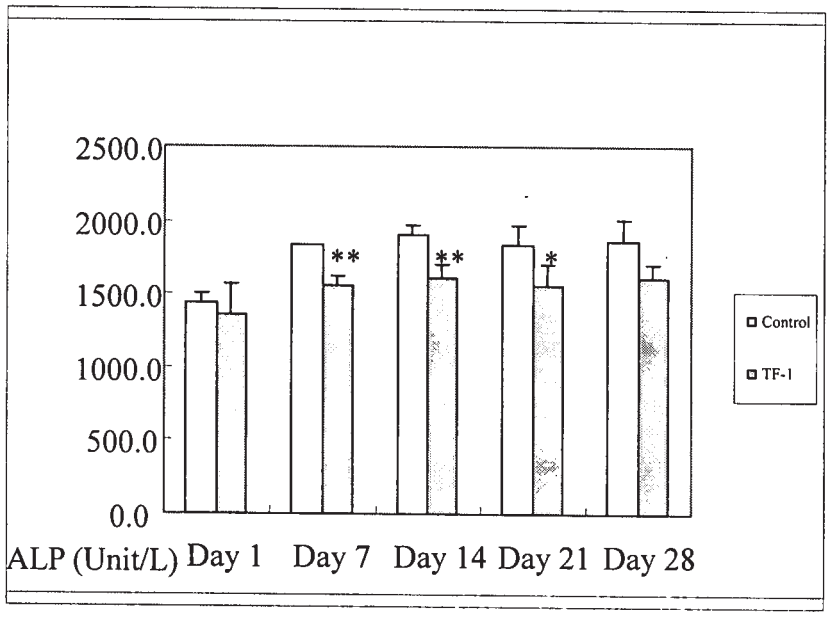

圖 2. TF-1(10^{-7} mg/mL)對新生鼠骨母細胞鹼性磷酸酶(ALP)活性的影響 (N= 4; *: P < 0.05; **: P < 0.01)

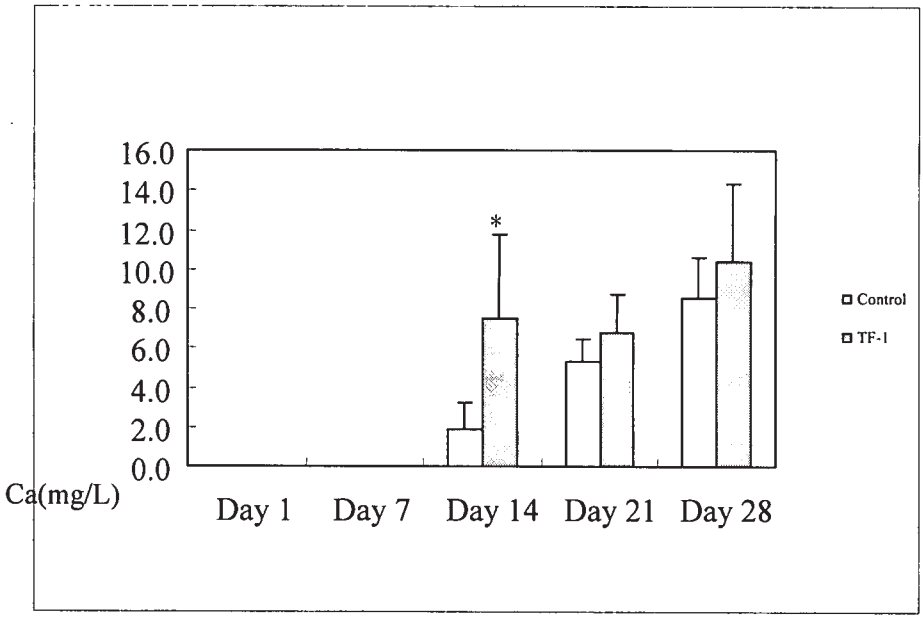

圖 3. TF-1(10^{-7} mg/mL)對新生鼠骨母細胞鈣堆積的影響
(N= 3; *: P < 0.05)

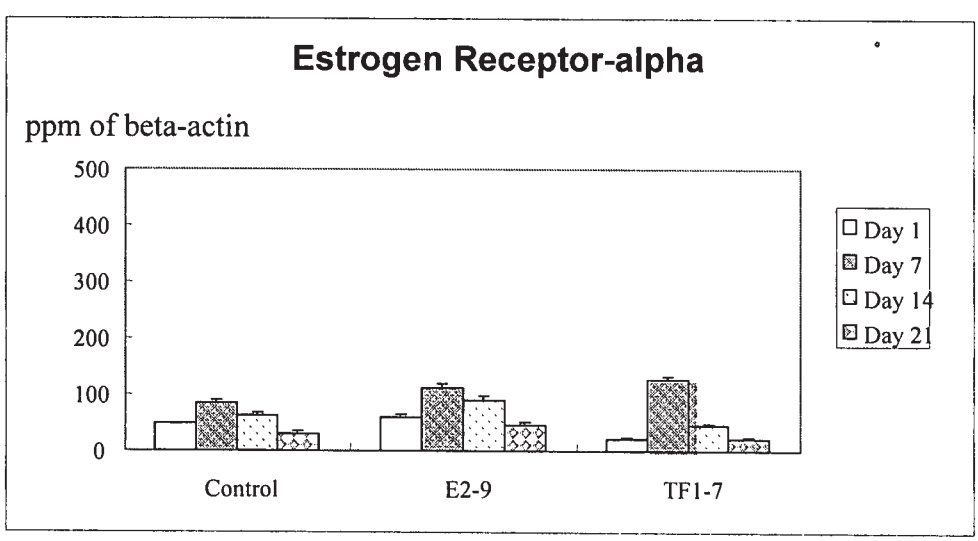

圖 4. TF-1(10^{-7} mg/mL)與 E_2 對新生鼠骨母細胞 ERα mRNA 表現(N=4)

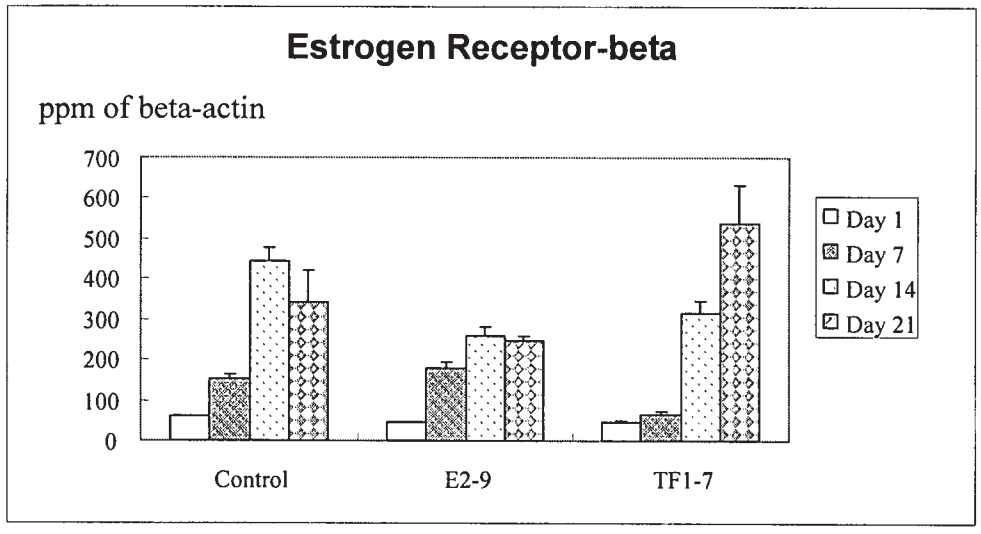

圖 5. TF-1(10^{-7} mg/mL)與 E_2 對新生鼠骨母細胞 ERβ mRNA 表現(N=4)

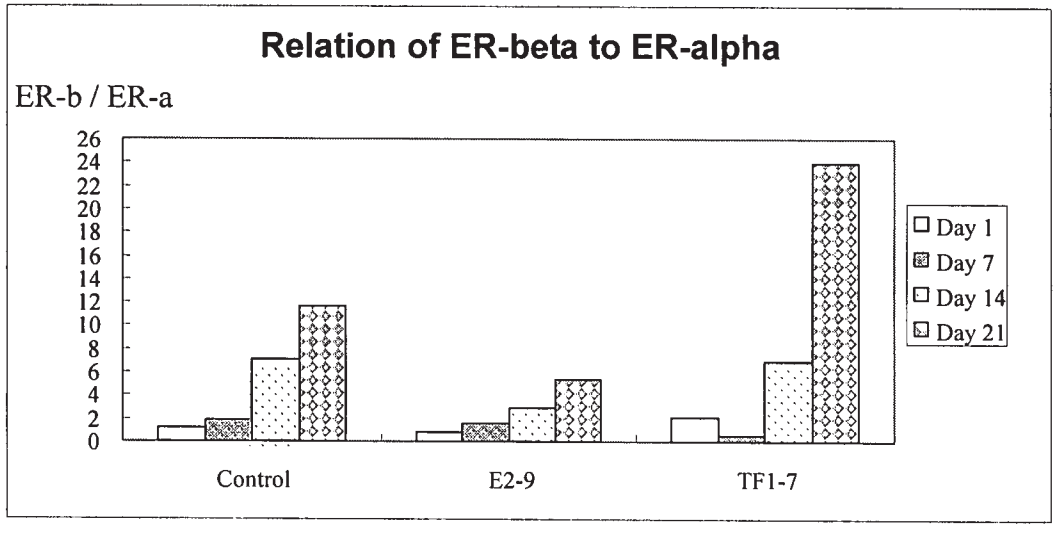

圖 6 TF-1(10^{-7} mg/mL)與 E_2 對新生鼠骨母細胞 ERβ/ERαmRNA 表現的影響
(N=4)

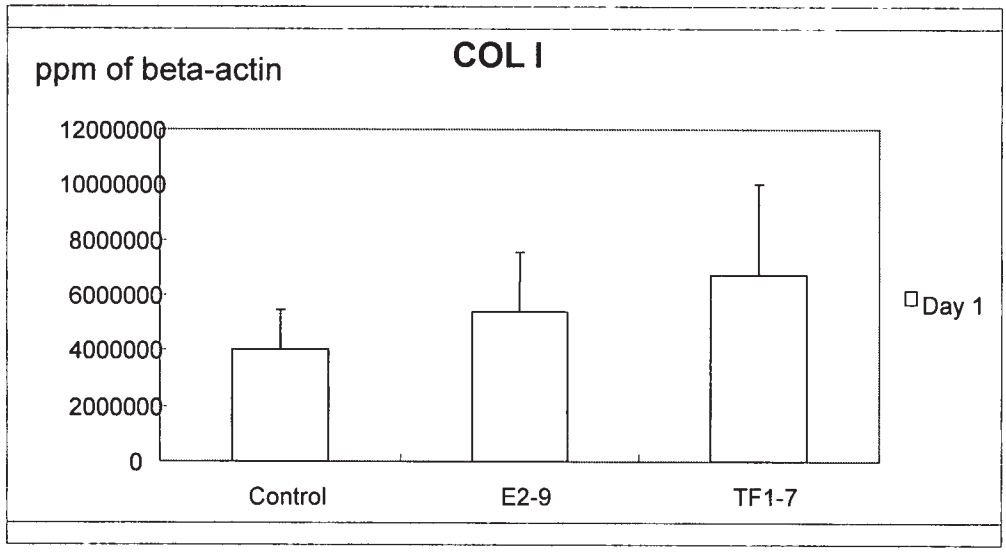

圖 7. TF-1(10^{-7} mg/mL)與 E_2 對新生鼠骨母細胞 COL I mRNA 表現的影響
(N=4)

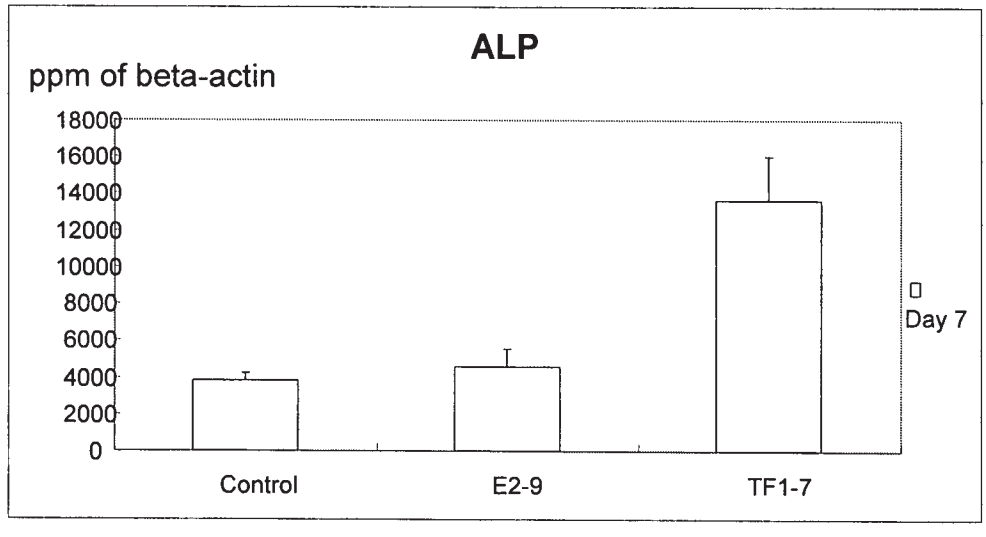

圖 8. TF-1(10^{-7} mg/mL)與 10^{-9}M E_2 對新生鼠骨母細胞 ALP mRNA 表現的影響
(N=4)

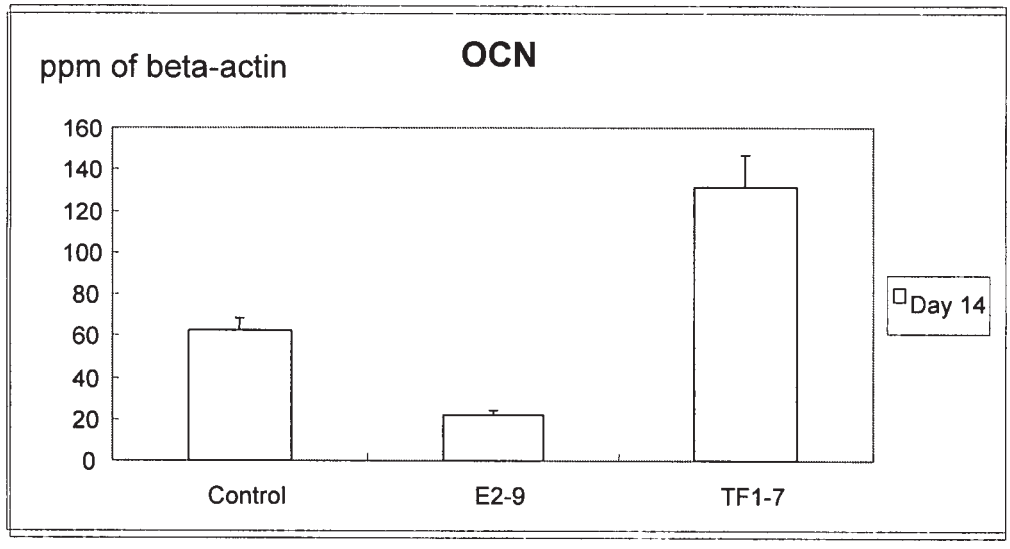

圖 9 TF-1(10^{-7} mg/mL)與 10^{-9}M E_2 對新生鼠骨母細胞 OCN mRNA 表現的影響
(N=4)

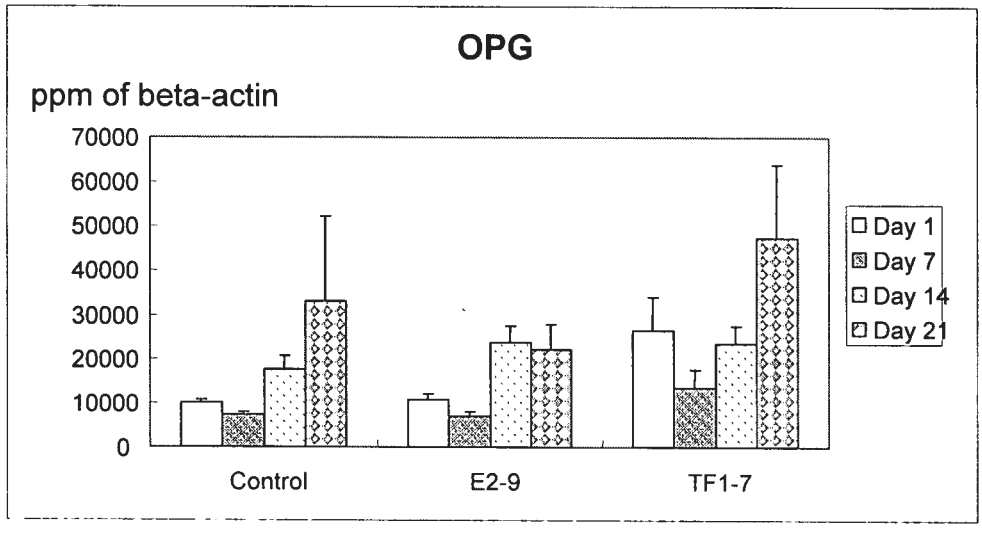

圖 10. TF-1(10^{-7} mg/mL)與 E_2 10^{-9}M 對新生鼠骨母細胞 OPG mRNA 表現的影響
(N=4)

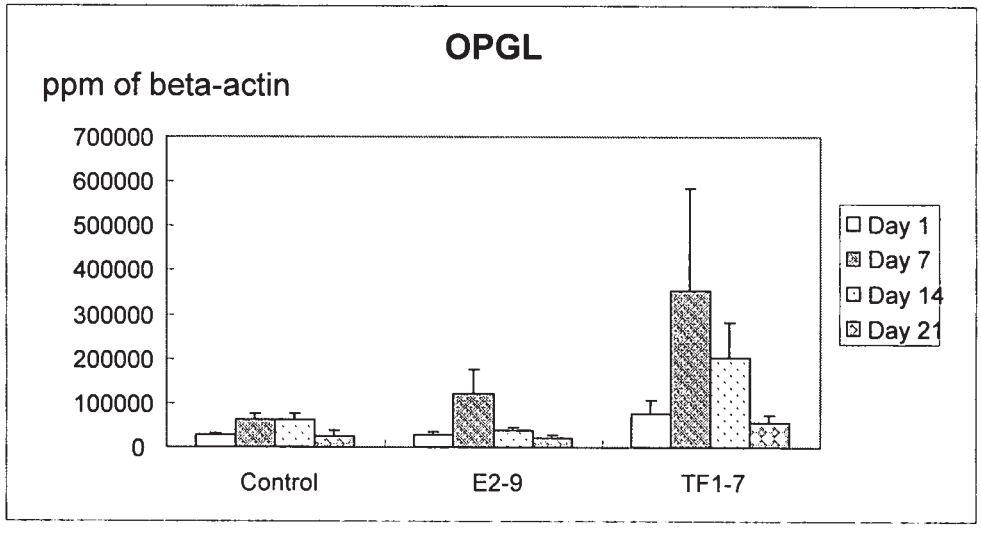

圖 11. TF-1(10^{-7} mg/mL)與 E_2 10^{-9}M 對新生鼠骨母細胞 OPGL mRNA 表現的影響 (N=4)

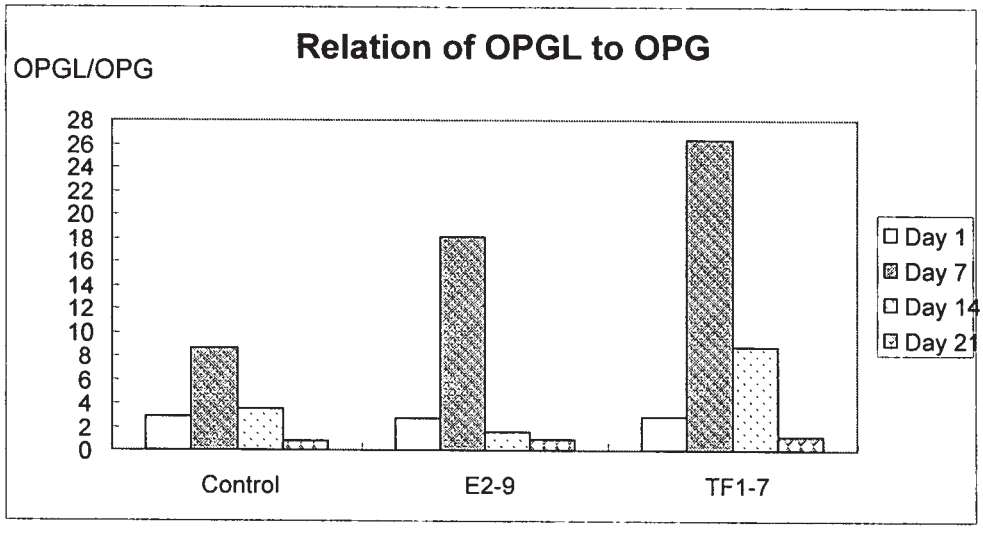

圖 12. TF-1(10^{-7} mg/mL)與 E_2 10^{-9}M 對新生鼠骨母細胞 OPGL /OPG mRNA 表現的影響 (N=4)

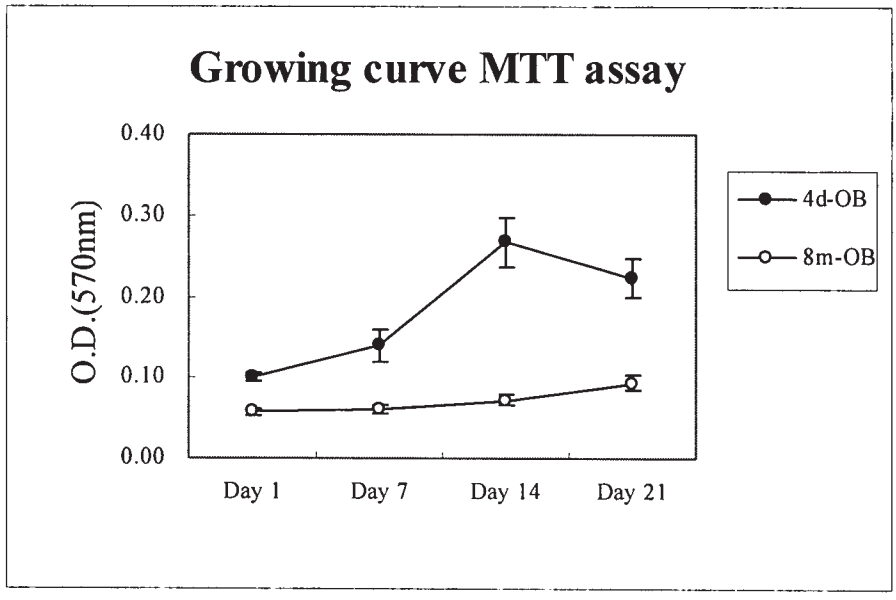

圖 13. 成鼠與新生鼠骨母細胞的生長曲線(MTT assay)
(4d-OB:N= 12; 8m-OB:N=6)

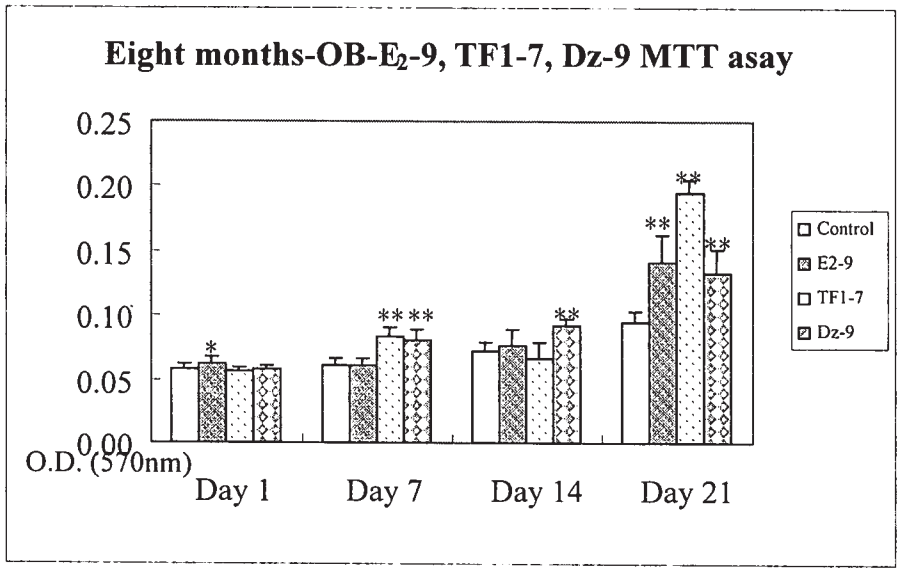

圖 14. TF-1(10^{-7} mg/mL), 10^{-9}M daidzein 與 E_2 對成鼠骨母細胞活性(MTT assay)的影響(N= 6; *: P < 0.05; **: P < 0.01)

表 1. MTT Assay (4D-OB) for Daidzein

Log M	Day1	Day7	Day14	Day21
control	100.0	100.0	100.0	100.0
-6	100.7	106.8	104.4	117.4*
-9	102.3	94.9	86.1	99.7
-12	109.4**	100.5	76.4*	105.8

*:p<0.05, **:p<0.005, n=5

表 2. MTT Assay (4D-OB) for Fr.3

Log mg/mL	Day1	Day7	Day10	Day14	Day21
control	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
1	110.3**	114.9*	113.5*	113.9**	120.4**
0	145.9**	125.0**	122.2**	111.2*	130.5**
-1	173.5**	128.1**	139.5**	119.7**	139.3**
-2	174.9**	128.3**	127.7**	128.0**	140.8**
-3	144.3**	130.0**	133.7**	125.6**	141.2**

*:p<0.05, **:p<0.005, n=12

表 3. ALP Activity Test (4D-OB) for TF-1

	Day1	Day7	Day14	Day21	Day 28
control	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
TF-1	94.0	84.4**	84.8**	84.4*	86.2

TF-1:10^{-7} mg/mL

*:p<0.05, **:p<0.01, n=4

表 4. Calcium Content Test (4D-OB) for TF-1

	Day1	Day7	Day14	Day21	Day 28
control	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
TF-1	-	-	400.0*	127.2	122.0

TF-1:10^{-7} mg/mL

*:p<0.05, , n=3

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP94-RD-012 提供經費贊助，使本計劃得以順利完成，特此誌謝。

柒、參考文獻

Alberts B et al., Molecular biology of the cell Garland, Inc. New York, 1994.

Anderson JJB Garner SC: The effects of phytoestrogens on bone. Nutr Res. 1997, 17:1617-32.

Arjmandi BH, Getlinger MJ, Goyal NV, Alekel L, Hassler CM, Juma S, Drum ML, Hollis BW, Kukreja SC: Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone deficiency in ras. Am J Clin Nutr. 1998, 68: 1358-63.

Barnes S.: Evolution of the health benefits of soy isoflavones. Proc Soc Exp Biol Med. 1998, 217(3): 386-92.

Brandi ML.: Natural and synthetic isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases. Calcif Tissue Int. 1997, 61 Suppl 1: 5-8.

Colditz GA.: Hormones and breast cancer: evidence and implications for consideration of risks and benefits of hormone replacement therapy. J Women's Health, 1999, 8(3): 347-57.

George G. J. M. Kuiper, BO Carlsson, KAJ Grandien, Eva Enmark, Johan Haggblad, Stefan Nilsson, and Jan-ake Gustafsson: Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β. Endocrinology 1997, 138(3): 863-70.

Harry C. Blair, Lihuan Cao, Rongfa Bu, Jennifer I. Oakley, Sara E. Kalla: Estrogen receptor-β modulates snthesis of bne mtrix poteins in hman oteoblast-lke MG63 clls. J Cell Biochem. 2003, 89(1):152-64.

Hisataka Y., Nobuyuki S., Nobuakinakagawa: Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): A mechanism by which OPG/OCIF Inhibits osteoclastogenesis *in Vitro*. Endocrinology 1998, 139(3): 1329-37.

Hutabarat LS, Greenfield H, Mulholland M.: Quantitative determination of isoflavones and coumestrol in soybean by column liquid chromatography. J Chromatogr A. 2000, 886(1-2): 55-63.

K M Wiren, A Chapman Evans and X-W Zhang: Osteoblast differentiation influences androgen and estrogen receptor-α and –β expression. J Endocrinol. 2002, 175:683-94.

Kolja Paech, Paul Webb, George G. J. M. Kuiper, Stefan Nilsson, Jan-Ake Gustafsson, Peter J. Kushner, Thomas S. Scanlan: Differential ligand activation of estrogen receptors ERα and ERβ at AP1 sites. Science 1997, 277: 1508-10.

Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA.: Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996, 93(12): 5925-30.

Marx J.: Coming to Grips With Bone Loss. Science 2004, 305:1420-2.

Michael E. Carley, David J. Rickard, John B. Gebhart, Maurice J. Webb, Karl C.

Podratz, Thomas C. Spelsberg: Distribution of estrogen receptors α and β mRNA in mouse urogenital tissues and their expression after oophorectomy and estrogen replacement. Int Urogynecol J. 2003, 14:141-5.

Michael L, Anne DW, Colette C, Alain P: A low dose of daidzein acts as an ERβ-selective agonist in trabecular osteoblasts of young female piglets. J Cell Phys. 2004, 200:253-62.

Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP. Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. J Nutr. 2000, 130(7):1675-81.

Raouf A, Seth A: Discovery of osteoblast-associated genes using cDNA microarrays. Bone 2002, 30(3): 463 – 471.

Riggs BL, Melton LJ 3rd.: Involutional osteoporosis. N Engl J Med. 1986, 314: 1676–1686.

TJ Wronski , M Cintron, AL Doherty and LM Dann: Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. Endocrinology 1988, 123: 681-686.

Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC: Skeletal effects of estrogen. Endocrine Rev 1994, 15:275-300.

Tsutsumi N.: Effect of coumestrol on bone metabolism in organ culture. Biol Pharm Bull. 1995, 18(7):1012-5.