



---

(21)申請案號：100101526

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 01 月 14 日

(51)Int. Cl. : *A61K31/522 (2006.01)*

*C07D473/08 (2006.01)*

*A61P19/10 (2006.01)*

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：葉竹來 YEH, JWU LAI (TW)；陳英俊 CHEN, ING JUN (TW)

(74)代理人：蔡清福

(56)參考文獻：

TW 200848044A

審查人員：李淑禎

申請專利範圍項數：5 項 圖式數：45 共 0 頁

---

(54)名稱

茶鹼化合物之抑制骨質疏鬆症活性

THEOPHYLLINE DERIVATIVE INHIBITS OSTEOPOROSIS

(57)摘要

本發明係將茶鹼化合物運用於骨質疏鬆症之醫療功能。含茶鹼之醫藥組合物可預防及治療骨質流失之過程，減少發炎細胞之浸潤。

The theophylline derivative disclosed in the present invention is characterized by having the pharmaceutical functions of osteoporosis. The theophylline derivative protects against bone resorption and inflammatory mediator infiltration.

公告本
-----

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100101526

A61K 31/522 (2006.01)

※申請日：

100.1.14

※IPC 分類：

C07D 473/08 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P 19/10 (2006.01)

茶鹼化合物之抑制骨質疏鬆症活性/theophylline derivative  
inhibits osteoporosis

## 二、中文發明摘要：

本發明係將茶鹼化合物運用於骨質疏鬆症之醫療功能。含茶鹼之醫藥組合物可預防及治療骨質流失之過程，減少發炎細胞之浸潤。

## 三、英文發明摘要：

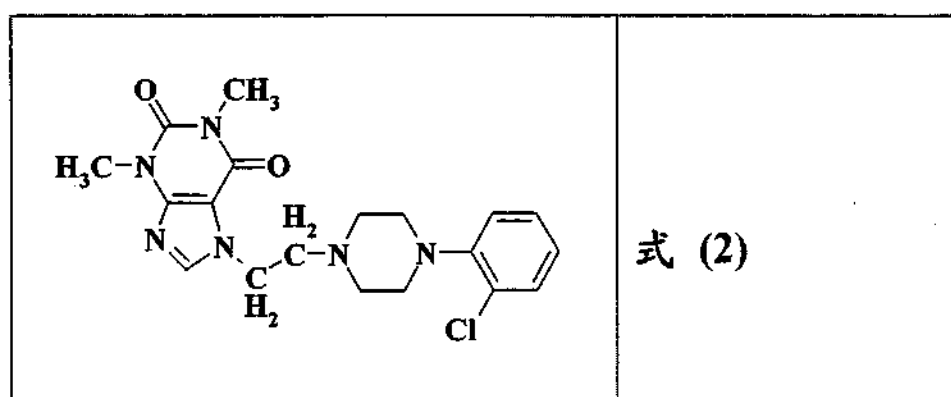
The theophylline derivative disclosed in the present invention is characterized by having the pharmaceutical functions of osteoporosis. The theophylline derivative protects against bone resorption and inflammatory mediator infiltration.

## 四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第 ( ) 圖。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：

## 五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵之化學式：



## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於茶鹼化合物運用於骨質疏鬆症之醫療功能。含茶鹼之醫藥組合物可預防及治療骨質流失之過程，減少發炎細胞之浸潤。

### 【先前技術】

骨質疏鬆症 (osteoporosis) 係蝕骨細胞與造骨母細胞之作用失衡以致骨密度下降、骨頭構型改變，進而產生骨折發生率增高之一種疾病。骨質疏鬆症伴隨骨折之發生不但會對人體造成疼痛，更會增加患者之死亡率並且帶來嚴重之經濟負擔。

造骨母細胞 (osteoblasts) 和脂肪細胞 (adipocytes)、纖維母細胞 (fibroblasts) 均係由間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells) 分化，而蝕骨細胞 (osteoclasts) 係由造血幹細胞 (hematopoietic cells) 之巨噬細胞 / 單核球細胞系列 (macrophage/monocyte lineage) 分化。由骨髓細胞 (bone marrow stromal cells) 及造骨母細胞分泌之兩種屬於腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 族群之細胞激素—巨噬細胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) 以及核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL)，為單核球前驅細胞分化形成蝕骨細胞所必須之因子。核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL) 在造骨幹細胞、骨髓細胞及血管內皮細胞之細胞表面表現，能與單核前驅細胞表面之受體核因子- $\kappa$ B 受體活化因子 (RANK) 結合，進而促使細胞分化成多核之蝕骨細胞，此時分化成熟之蝕骨細胞則分泌耐酒石酸之酸性磷酸酵素 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 而呈現溶蝕骨質之能力。

核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL) / RANK

核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL) 之受體 RANK

通常表現於蝕骨前驅細胞或分化成熟之蝕骨細胞之細胞膜上，核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL) 直接透過細胞與細胞間之接觸與 RANK 進行交互作用，而促使蝕骨細胞分化、增生，呈現溶蝕骨質能力。當核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL) 與單核球前驅細胞膜上之受體 RANK 結合後，RANK 會與腫瘤壞死因子受體相關因子 (tumor necrosis factor receptor- associated factor, TRAFs) 交互作用，隨即開啟一連串與蝕骨細胞分化及活化之訊息傳遞路徑，包含三條主要之訊息傳遞路徑：(1) 核因子- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)、(2) 絲裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAP kinase, MAPK) 和 (3) Src/PI3K/Akt 訊息傳遞路徑，及重要之轉錄因子 c-Fos 和活化 T 細胞核因子(NFATc1)。其中核因子- $\kappa$ B 和 MAP kinase 訊息傳遞路徑調控蝕骨細胞之分化及溶蝕能力，而 Wong, BR.等 1999 年 Mol. Cell.第 4 (6) 期第 1041-1049 頁認為 Src/PI3K/Akt 係主宰蝕骨細胞存亡之訊息傳遞路徑。

#### 腫瘤壞死因子受體相關因子 (TRAFs)

TRAF 家族中包含六種不同之蛋白，皆能與 RANK 作用，Mizukami, J.等人於 2002 年 Mol. Cell. Biol.第 22 (4) 期第 992-1000 頁發現只僅僅去除 TRAF6 基因之老鼠，因嚴重之蝕骨細胞功能缺陷而發生骨石化症，而 Armstrong, AP.等人於 2002 年 J. Biol. Chem.第 277 (46) 期第 44347-44356 頁發現將老鼠 RANK 基因突變，使 RANK 上缺乏 TRAF6 之結合位，令單核球細胞失去形成蝕骨細胞之能力。顯示 TRAF6 於核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL) /RANK 之訊息傳遞路徑中扮演最重要之角色。

#### 核因子- $\kappa$ B 路徑 (Nuclear factor $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)

核因子- $\kappa$ B 在未受刺激之狀態下，與其抑制蛋白 (inhibitory  $\kappa$ B, I $\kappa$ B) 結合並保持非活化狀態。當受到核因子- $\kappa$ B

受体活化因子配体 (RANKL) 刺激後，RANKL 與 RANK 結合，透過 TRAF6 促使核因子- $\kappa$ B 之活化。核因子- $\kappa$ B 之活化導致 I $\kappa$ B 在 Ser-32 與 Ser-36 兩處被 I $\kappa$ B kinase (IKK) 磷酸化，並進行水解與 I $\kappa$ B 分離，其後核因子- $\kappa$ B 便進入細胞核中誘導許多與蝕骨細胞溶蝕活性相關之基因轉錄。

### 絲裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAP kinase, MAPK) 路徑

絲裂原活化蛋白激酶家族之成員包含細胞外訊息調節激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK)、p38 絲裂原活化蛋白激酶 (p38-MAPKs) 和 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinases, JNK)。已知 p38 之抑制劑 SB203580 或 ERK 之抑制劑 PD98059 均可經由核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (RANKL) 而抑制蝕骨細胞分化及蝕骨細胞生成作用 (osteoclastogenesis) 之誘發。ERK 與 JNK 之活化將共同影響下游之轉錄因子 activator protein-1 (AP-1) 之作用，ERK 會誘導並活化 AP-1 族群中之 c-Fos 蛋白之表現；而 JNK 則透過磷酸化 c-Jun 進而增強 AP-1 之轉錄活性，調控 RANK 誘發之蝕骨細胞生成作用。

### Src/PI3K/Akt 路徑

Src 與 TRAF6 交互作用於核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (RANKL) 誘發 anti-apoptotic 絲胺酸 / 酪胺酸激酶 (serine/threonine kinase, Akt) 活化中扮演重要之角色，Src 接在細胞質端之 RANK 尾巴上，受到核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (RANKL) 結合上 RANK、TRAF-6 活化之後之刺激而活化，接著活化下游之 Akt。而 Src 促使 Akt 活化之過程中需要磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 之媒介。使用 c-Src 抑制劑、將 c-Src 基因移除或使用 PI3K 抑制劑 LY294002 皆可抑制 RANKL 誘發 Akt 之活化。RANKL/RANK 透過 TRAF6 經由 Src/PI3K/Akt 之訊息傳遞路徑，調控蝕骨細

胞之生存能力。

### 轉錄因子 (transcription factors)

RANKL/RANK 訊息傳遞路徑藉著活化轉錄因子 AP-1 及核因子- $\kappa$ B 而促使許多與蝕骨細胞溶蝕作用相關之基因表現。AP-1 家族中 c-Jun、JunB、c-Fos、Fra-1 和 Fra-2 參與蝕骨細胞生成作用之調控。而當 c-Fos 與轉錄因子如活化 T 細胞核因子 (nuclear factor of activated T cells, NFATc1) 作用後,促使蝕骨細胞溶蝕作用基因 TRAP 及 Cathepsin K 之表現。Takayanagi H 等人於 2007 年 Ann. NY Acad. Sci.第 1116 期第 227-237 頁認為經由上游之鈣/鈣調素 (calcium/calmodulin) 訊息傳遞:細胞內鈣離子先與鈣離子結合蛋白鈣調素結合後,活化下游之鈣 / 鈣調素依賴性蛋白激酶 (calcium/calmodulin-activated kinases, CaMKs) 以及鈣調磷酸酶 (calcineurin),而使得 NFATc1 活化。因此,AP-1、NFATc1 及核因子- $\kappa$ B 為調控蝕骨細胞溶蝕作用之關鍵之轉錄因子。

### 促炎細胞因子 (Pro-inflammatory cytokines)

活化之巨噬細胞所釋放出一些促炎細胞因子 (pro-inflammatory cytokines) 如:腫瘤壞死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 (interleukin-1, IL-1)、白介素-6 (IL-6),能促使發炎反應而誘發蝕骨細胞生成之作用。活化之 T 細胞及巨噬細胞所釋放之 TNF- $\alpha$ ,可促使 RANK 之表現以及增加 RANK 對核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配體 (RANKL) 之敏感性。IL-6、IL-11 及 IL-17 在發炎反應狀況下促使骨質流失。然而,Wei, S.等人於 2008 年 Pathol. Res. Pract.第 204 (10) 期第 695-706 頁在體外和體內試驗發現 IL-4、IL-10、IL-12、IL-18 及干擾素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ),透過抑制蝕骨細胞分化及其溶蝕活性而抑制蝕骨細胞之生成。

### 高遷移族蛋白 B1 (High-mobility group box 1, HMGB1)

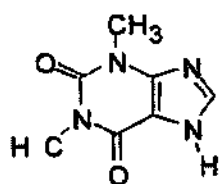
HMGB1 係真核細胞核內之蛋白質,當巨噬細胞被激化或

受到促炎細胞因子之影響，HMGB1 將從細胞核轉移到細胞質內，藉由胞吐作用或細胞膜之破裂而移出細胞，Zhou, Z.等人於2008年 J. Bone. Miner. Res. 第23 (7) 期第1084-1096頁發現在細胞外之 HMGB1 呈現類似促炎細胞因子，在發炎反應之狀況下促使骨質之流失。

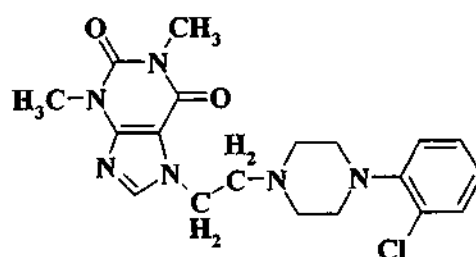
### 碘乙酸鈉 (Monosodium iodoacetate, MIA)

碘乙酸鈉 (MIA) 為甘油醛 3-磷酸去氫酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 之抑制劑，於體外試驗其抑制糖解反應 (glycolysis) 造成軟骨細胞 (chondrocyte cell) 死亡。於活體內試驗，膝關節腔注射 MIA 可誘導膝關節軟骨之軟骨細胞死亡，誘發關節炎 (osteoarthritis)，在發炎反應之環境下，淋巴細胞、巨噬細胞及肥大細胞浸潤，細胞釋放出之促炎細胞因子使得蝕骨細胞被活化，促使關節軟骨 (articular cartilage) 以及軟骨下硬骨 (subchondral bone) 之骨質流失。

具有茶鹼 (theophylline, 1) 架構，經以氯苯基修飾之 KMUP-1 其化學名為 7-[2-[4-(2-氯苯基) 哌嗪]-1-基]-乙基-茶鹼 (7-[2-[4-(2-Chlorophenyl) piperazin-1-yl]ethyl] theophylline)。茶鹼之結構如式 (1)，KMUP-1 之結構係如式 (2) 所示。



式 (1)



式 (2)

已知 KMUP-1 具有活化上皮及內皮之 eNOS，部分活化平滑肌可溶性鳥苷酸環化酶 (soluble guanylyl cyclase, sGC)、抑



制磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, PDE) 3、4 及 5 之作用，而增加細胞內 cGMP 之含量以及具有開啟鉀離子通道之特性；且 KMUP-1 可透過刺激 cGMP 和開啟鉀離子通道之機制，引起兔子之陰莖海綿體平滑肌細胞鬆弛。另外，KMUP-1 已證實可以影響 cAMP/PKA 及 cGMP/PKG 等路徑，而引起氣管上皮細胞 NO 之生成量增加，進而活化氣管平滑肌細胞內 sGC，或係 KMUP-1 直接活化平滑肌細胞內之 sGC，使 cGMP 量增加激活 PKG；KMUP-1 亦可直接活化 adenylate cyclase 引起 cAMP 量增加而激活 PKA，PKA 和 PKG 二者皆引起平滑肌細胞膜鉀離子通道開啟，最後使得氣管平滑肌鬆弛。cAMP 及 cGMP 係細胞內二次訊息傳訊者，同時調節多種生理反應，包括細胞生長及分化、細胞凋亡、醣解作用及酯解作用、免疫及發炎反應等。

Miyamoto, K. 等人於 1997 年 Biochem. Pharmacol. 第 54 (5) 期第 613-617 頁發現 PDE4 抑制劑於 Walker256/S-bearing 大鼠動物模式當中可以抑制骨質流失；Yoshimura, T. 等人於 1997 年 Gen. Pharmacol. 第 29 (4) 期第 633-638 頁亦認為，促使骨質流失之關鍵細胞激素 TNF- $\alpha$ 、IL-1 及 IL-6，可被 PDE4 抑制劑抑制其增生。

發明人鑑於 KMUP-1 對於骨質之活性尚未被研究，經過悉心試驗與研究，並一本鍥而不捨之精神，終構思出本案「茶鹼化合物之抑制骨質疏鬆症活性」，獲知含茶鹼之醫藥組合物可預防及治療骨質流失之過程，減少發炎細胞之浸潤，以下為本案之簡要說明。

### 【發明內容】

本發明之一目之在於提供具有治療骨質疏鬆症之醫藥組合物。

根據本發明之構想，係提供一種有效量之茶鹼化合

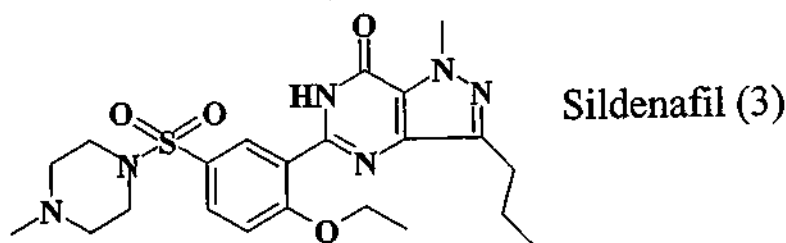
物，其係以氯苯基修飾，可運用 N-(2-氯苯基) 哌嗪 (N-(2-chlorophenyl) piperazine) 與 7-(2-溴乙基) 茶鹼 (7-(2-bromoethyl) theophylline) 合成，化學名為 7-[2-[4-(2-氯苯基) 哌嗪]-1-基]-乙基-茶鹼 (7-[2-[4-(2-Chlorophenyl) piperazin-1-yl]ethyl]theophylline)。

根據上述構想，以核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (RANKL) 誘發巨噬細胞形成類蝕骨細胞的模式，探討磷酸二酯酶 (phosphodiesterase) 第三、四、五型 (PDE3, 4, 5) 抑制劑 KMUP-1 對類蝕骨細胞增生及分化的影響，並深入探討 KMUP-1 抑制類蝕骨細胞增生及分化的作用機轉。

根據上述構想，於體外試驗 KMUP-1 具有抑制類蝕骨細胞增生及分化的作用，於體內試驗可預防及治療發炎性之關節疾病，KMUP-1 可成為一個預防及治療骨質流失的新製劑。

經由 RANKL 刺激 KMUP-1 影響 RAW264.7 細胞之增生

核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (RANKL) 可誘使細胞增生，經由藥物毒性試驗 (MTT assay) 以及細胞增生試驗 (BrdU assay) 進行雙重確認之 KMUP-1 是否抑制 RAW264.7 之細胞增生。無論如第一圖所示之 MTT assay 或第二圖所示之 BrdU assay，KMUP-1 以 5、7.5、10  $\mu$ M 能抑制 RANKL 誘發之細胞增生。而 theophylline 及 sildenafil (3) 於濃度 10  $\mu$ M 對於 RANKL 誘發之細胞增生無明顯之抑制效果。



經由 RANKL 刺激 RAW264.7 細胞分化形成類蝕骨細胞受 KMUP-1 所影響

單核之 RAW264.7 細胞受 RANKL 刺激，分化成多核之類蝕骨細胞，且分泌具有溶蝕活性之標的酵素 TRAP。單核之 RAW264.7 經 RANKL 刺激 5 天，以光學顯微鏡每天觀察細胞分化，並於第 5 天以 TRAP 染色法及 TRAP 活性試驗確認類蝕骨細胞之分化以及 KMUP-1 之影響。染色結果，於光學顯微鏡發現控制組全部為小顆之單核巨噬細胞，因為無 TRAP 之表現，所以 TRAP 染色處理後無法呈現桃紅色。而經 RANKL 以 10 ng/ml 誘發 5 天後之 RANKL 組，可觀察到許多分化成多核大顆類蝕骨細胞之桃紅色，如第三圖至第五圖所示投予 KMUP-1 之組別明顯地呈現與劑量相關地抑制現象。由 TRAP 活性試驗之結果顯示，經 RANKL 以 10 ng/ml 誘發 5 天之細胞呈現大量之 TRAP 活性，而如第六圖所示投與 KMUP-1 之組別則可有效之抑制，且抑制效果呈劑量相關性。另外，濃度 10  $\mu$ M 之茶鹼及 Sildenafil 對於 RANKL 誘發之 TRAP 活性無明顯之抑制效果。

#### **KMUP-1 對類蝕骨細胞之溶蝕作用之影響**

如第三圖至第六圖所示 KMUP-1 可有效地抑制類蝕骨細胞之分化，為確認 KMUP-1 對於分化後之類蝕骨細胞之骨溶蝕作用有影響，將細胞培養於底部已覆蓋類似骨基質之合成磷酸鈣培養皿，同樣給予 10 ng/ml 之 RANKL 刺激 5 天以及不同濃度之 KMUP-1。實驗結果發現，單獨給予 10 ng/ml 核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL) 刺激 5 天之組別與控制組比較，類蝕骨細胞有明顯之溶蝕活性，培養皿底部之覆蓋物因溶蝕而呈現空洞，而如第七圖所示投與 KMUP-1 之組別可抑制類蝕骨細胞之溶蝕作用，如第八圖所示經溶蝕面積計算結果發現 KMUP-1 之抑制效果呈劑量相關性。顯示 KMUP-1 不僅能減少類蝕骨細胞之分化、減少 TRAP 酵素之產生，亦可降低類蝕骨細胞之骨溶蝕作用。

**KMUP-1 影響經由 RANKL 刺激 RAW264.7 細胞分泌促**

## 炎細胞因子

在核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (RANKL) 刺激下，單核球 RAW264.7 細胞能分泌促炎細胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 等，以 ELISA 之方法測定 KMUP-1 影響 RANKL 誘發促炎細胞因子之分泌。如第九圖所示，RANKL 誘發巨噬細胞分泌促炎細胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-6 之分泌量，KMUP-1 呈現劑量相關性之抑制現象；另外，如第十圖所示 KMUP-1 劑量相關性之增加抗發炎反應細胞激素 IL-10 之產量。

### KMUP-1 對 RANKL 誘發核因子- $\kappa$ B 路徑活化之影響

在細胞質內原本與 NF- $\kappa$ B 結合抑制其活性之 I $\kappa$ B $\alpha$  受 RANKL 之刺激，而磷酸化，與 NF- $\kappa$ B 分離後被水解，而自由態之 NF- $\kappa$ B 便轉移到細胞核內，扮演轉錄因子的角色。實驗結果發現，RANKL 誘導 30 分鐘後與控制組相比，細胞質內 I $\kappa$ B $\alpha$  呈現明顯之磷酸化以及水解現象，如第十一圖 (A) 所示事先投予 KMUP-1 不同濃度作用 24 小時之組別可抑制核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (RANKL) 之作用。另外一方面，經 RANKL 誘導 30 分鐘後與控制組相比，細胞核內之 p65 之量明顯增多，而如第十一圖 (B) 所示事先給予 KMUP-1 不同濃度作用 24 小時之組別，對於 p65 之入核有抑制之效果，核內聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (PARP) 之表現並無改變。結果顯示，KMUP-1 可以抑制核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (RANKL) 誘發核因子- $\kappa$ B 路徑之活化。

### KMUP-1 影響 RANKL 誘發 MAP kinases 路徑之活化

MAP kinases 包含 ERK、JNK 和 p38，經核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (RANKL) 之刺激，磷酸化此等蛋白質，而影響下游促使蝕骨細胞分化之關鍵轉錄因子 c-Fos、NFATc1 等。在評估藥物影響之前，於不同時間點利用 10 ng/ml 核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (RANKL) 誘發 ERK、JNK 和 p38 之磷酸化，經西方墨點法發現第 15 分鐘時最明顯，因此，以 15 分鐘做為

RANKL 誘發之時間。如第十二圖至第十四圖所示細胞質內 ERK、JNK 和 p38 之磷酸化程度，KMUP-1 於 7.5 及 10  $\mu$ M 較高濃度時可有效抑制核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL) 誘發之 ERK、JNK 和 p38 磷酸化。顯示 KMUP-1 可減低核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL) 誘發 MAP kinases 路徑之活化。

### **KMUP-1 影響 RANKL 活化關鍵轉錄因子 c-Fos 及 NFATc1**

已知 KMUP-1 影響核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL) 誘發 MAP kinases 路徑之活化，應評估下游促使蝕骨細胞分化之關鍵轉錄因子 c-Fos 和 NFATc1 是否亦受 KMUP-1 之抑制。如第十五圖所示，經 24 小時 RANKL 誘發 c-Fos 之表現，於較高濃度 7.5 及 10  $\mu$ M 時 KMUP-1 可有效地抑制；如第十六圖所示經西方墨點法可見，於 5、7.5 及 10  $\mu$ M 濃度 KMUP-1 之可有效地抑制經 24 小時 RANKL 誘發 NFATc1 之表現。顯示較高濃度之 KMUP-1 可抑制 MAP kinases 一連串之訊息傳遞路徑。

### **KMUP-1 影響 RANKL 誘發細胞鈣離子內流及 calcineurin 之活化**

關鍵性轉錄因子 NFATc1 受絲裂原活化蛋白激酶 (MAP kinases)/c-Fos 之影響，亦受鈣離子路徑之影響。經核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL) 之刺激，令鈣離子由細胞外內流，細胞內鈣離子之增加將活化下游鈣調磷酸酶 (calcineurin) 蛋白之表現，而 calcineurin 之活化又與轉錄因子 NFATc1 相關。利用測定細胞內鈣離子濃度之改變以及用西方墨點法評估 calcineurin 蛋白之表現。以 RANKL 刺激 RAW264.7 巨噬細胞 4 分鐘經鈣離子螢光探針 (fura-2/AM) 測定細胞內鈣離子，如第十七圖 (A) 所示，細胞內鈣離子濃度無明顯之變化。於細胞培養時先給予核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL) 刺

激一週，使巨噬細胞分化成類蝕骨細胞 (osteoclast-like cells, OCL) 後，再以 RANKL 刺激類蝕骨細胞，可明顯增加細胞內鈣離子濃度。0.1  $\mu\text{M}$  濃度之 KMUP-1 無法顯著地抑制 RANKL 誘發細胞外鈣離子內流之作用，而 1 及 10  $\mu\text{M}$  可抑制 RANKL 誘發細胞外鈣離子內流之作用 (第十七圖、第十八圖)。以核因子- $\kappa\text{B}$  受體活化因子配體 (RANKL) 刺激 24 小時，如第十九圖所示西方墨點法之結果，顯示鈣調磷酸酶 (calcineurin) 之表現與控制組相比較有明顯之增加，而同時給予不同濃度之 KMUP-1，發現 5、7.5 及 10  $\mu\text{M}$  能呈現明顯抑制 RANKL 誘發 calcineurin 之表現。

#### ● KMUP-1 影響 RANKL 誘發 Akt 之磷酸化

核因子- $\kappa\text{B}$  受體活化因子配體 (RANKL) 能活化 PI3K/Akt 之訊息傳遞路徑，以維持類蝕骨細胞之生存及增生，避免細胞凋亡。於不同時間點測試核因子- $\kappa\text{B}$  受體活化因子配體 (RANKL) 誘發 Akt 磷酸化之程度。10 ng/ml 核因子- $\kappa\text{B}$  受體活化因子配體 (RANKL) 刺激第 30 分鐘時，誘發 Akt 磷酸化最明顯。以 30 分鐘作為誘發 Akt 磷酸化之時間點，如第二十圖所示，KMUP-1 能有效抑制 RANKL 誘發 Akt 磷酸化之現象，且呈現劑量相關性之抑制效果。

#### ● KMUP-1 影響 RANKL 誘發 MMP-2 及 MMP-9 之活化

KMUP-1 影響三條主要與 RANK/RANKL 相關之上游訊息傳遞路徑，以西方墨點法評估其下游與蝕骨細胞溶蝕作用相關之 MMP-2 及 MMP-9 酵素之產量，並且經由基質金屬蛋白酶酵素 (matrix metalloproteinase, MMP) 電泳分析法 (Gelatin Zymography) 評估 MMP-2 和 MMP-9 之酵素活性。如第二十一圖之西方墨點圖譜所示，KMUP-1 可有效地抑制 RANKL 誘發 24 小時之 MMP-2 及 MMP-9 蛋白質之產量。而如第二十三圖所示 10  $\mu\text{M}$  濃度之 KMUP-1 可減少核因子- $\kappa\text{B}$  受體活化因子配體 (RANKL) 誘發 24 小時之 MMP-2 及 MMP-9 之酵素活

性。

### **KMUP-1 對核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL) 誘發 HMGB1 由細胞核位移至細胞外之影響**

高遷移族蛋白 B1 (HMGB1) 能影響蝕骨細胞之增生及分化，而原本存在細胞核內之 HMGB1，受 RANKL 之刺激，移行到細胞質中或轉移至細胞外，在細胞外之 HMGB1 呈現如促炎細胞因子之作用，可經由 RANKL/RANK 或其他路徑調控蝕骨細胞之增生與分化。以 10 ng/ml 核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL) 刺激 RAW264.7，分別於 0、6、12、18 和 24 小時，分離細胞外培養液、細胞質與細胞核三種地方，經西方墨點法確認 HMGB1 之表現量。刺激 12 小時後，HMGB1 明顯地從細胞核、細胞質遷移至細胞外；而 RANKL 刺激第 18 小時，轉移至細胞質及細胞外培養液之效果最明顯。不同濃度之 KMUP-1 投與 24 小時以及 10 ng/ml 之 RANKL 刺激 18 小時，如第二十五圖至第二十八圖所示投與 5，7.5 和 10  $\mu$ M 之 KMUP-1 均對 RANKL 刺激 HMGB1 由細胞核遷移細胞質及細胞外培養液之作用呈現抑制效果，而該抑制效果呈劑量相關性。

### **KMUP-1 影響 RANKL 誘發與骨溶蝕活性相關之基因 mRNA 之表現**

核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL)，可誘發許多與蝕骨細胞溶蝕活性相關基因之表現。運用逆轉錄聚合酶鏈式反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 之技術，萃取細胞中之 RNA，放大並定量其 mRNA，如第二十九圖所示，TRAF6、TRAP、c-Fos、NFATc1、MMP-9、Fra-1、Fra-2、c-Src 及 Cathepsin K 可被 10 ng/ml 之 RANKL 所誘發，其中 KMUP-1 抑制 TRAP、c-Fos、NFATc1、MMP-9 及 Fra-1 之 mRNA 表現，而無顯著抑制 TRAF6、Fra-2、c-Src 及 Cathepsin K 之效果。另外經由西方墨點法如第三十圖所示，發現以 10

ng/ml 核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL) 誘發 TRAF6 蛋白質之表現，KMUP-1 對於無顯著抑制效果。

### **KMUP-1 影響 MIA 誘發大鼠模式之膝關節炎預防及治療**

於大鼠膝關節腔內注射 4 mg/25  $\mu$ l 碘乙酸鈉 (MIA) 之食鹽水溶液七天可誘發膝關節炎，由於促炎細胞因子之調控，激發蝕骨細胞活性，造成關節軟骨及軟骨下硬骨漸進式之流失。事先口服投予 1、2.5 和 5 mg/kg 劑量 KMUP-1 一週後，於第 8 天於膝關節腔注射 4 mg/25  $\mu$ l 碘乙酸鈉食鹽水溶液，再繼續口服投予 1、2.5 和 5 mg/kg 劑量 KMUP-1 一週，於第 15 天犧牲動物。

如第三十一圖膝關節骨外觀圖所示，注射碘乙酸鈉食鹽水溶液傷害 7 天後之關節軟骨有明顯之破損缺陷，與佯作組 (Sham) 相比較表面顯得非常之不光滑，而給予 2.5 和 5 mg/kg 劑量 KMUP-1 預防及治療之組別可減少碘乙酸鈉所造成之傷害。

如第三十二圖所示蘇木紫和伊紅 (Hematoxylin & Eosin stain) 切片染色之結果可見，第三十二圖 (a) 佯作組之軟骨組織完好，而如第三十二圖 (b) 所示單獨給予碘乙酸鈉食鹽水溶液之傷害組可明顯看到軟骨組織缺陷、傷害後留下之空洞以及大量之發炎細胞浸潤。於 1 mg/kg 劑量 KMUP-1 預防及治療組，碘乙酸鈉傷害後之空洞以及軟骨組織之缺陷依然存在，而如第三十二圖 (c) 所示空洞及軟骨組織之傷害面積比碘乙酸鈉傷害組呈現較小之趨勢，尚有許多發炎細胞之浸潤。碘乙酸鈉傷害後之空洞以及軟骨組織之缺陷，如第三十二圖 (d) 所示於 2.5 mg/kg 劑量 KMUP-1 預防及治療組，較 1 mg/kg 劑量 KMUP-1 頗多改善，與碘乙酸鈉傷害組相比較更呈現明顯差異，發炎細胞之浸潤也明顯減少。於 5 mg/kg 劑量 KMUP-1 預防及治療組，如第三十二圖 (e) 所示碘乙酸鈉傷害後之空洞以及軟骨組織之缺陷程度達到接近佯作組之恢復狀態，唯尚有



一些發炎細胞之浸潤。由 H&E 之切片結果，發現 KMUP-1 可預防及治療碘乙酸鈉所造成之軟骨組織傷害，而其效果呈現劑量相關性。

如第三十三圖所示甲苯胺藍 (toluidine blue) 之切片染色結果，與佯作組相比較，於碘乙酸鈉傷害組之軟骨組織缺陷和破洞，可看到大量之肥大細胞（深藍色）浸潤，而給予 KMUP-1 預防及治療之組別，依照劑量之增高，肥大細胞之浸潤呈現遞減趨勢。顯示 KMUP-1 可減少碘乙酸鈉所誘發之膝關節發炎反應，而效果呈現劑量相關性。

上述賦形劑或稱為『藥學上可接受之載體或賦形劑』、『生物可利用之載體或賦形劑』，係包括溶媒、分散劑、包衣、抗菌或抗真菌劑，保存或延緩吸收劑等任何習知用於製備成劑型之適當化合物。通常此類載體或賦形劑，本身不具備治療疾病之活性，且將本發明所揭示之衍生物，搭配藥學上可接受之載體或賦形劑，製備之各劑型，投與動物或人類不致於造成不良反應、過敏或其它不適當反應。因而本發明所揭示之衍生物，搭配藥學上可接受之載體或賦形劑，係適用於臨床及人類。運用本發明化合物之劑型經由靜脈、口服、吸入或經由鼻、直腸、陰道等局部或舌下等方式投藥，可達到治療效果。對於不同病症之患者，約每日投與 0.1 g 至 100 mg 之活性成份。

該載體隨各劑型而不同，無菌注射之組成物可將溶液或懸浮於無毒之靜脈注射稀釋液或溶劑中，此類溶劑如 1,3-丁二醇。其間可接受之載體可為甘露醇 (Mannitol) 或水。此外固定油或以合成之單或雙甘油酯懸浮介質，係一般習用之溶劑。脂肪酸，如油酸 (Oleic acid)、橄欖油或蓖麻油等與其甘油酯衍生物，尤其經多氧乙基化之型態皆可作為製備注射劑並為天然醫藥可接受之油類。此等油類溶液或懸浮液可包含長鏈酒精稀釋液或分散劑、羧甲基纖維素或類似之分散劑。其他一般使用之介面活性劑如 Tween、Spans 或其他相似之乳化劑或係一

般醫藥製造業所使用於醫藥可接受之固態、液態或其他可用於劑型開發之生物可利用增強劑。

用於口服投藥之組合物則係採用任何一種口服可接受之劑型，其型式包括膠囊、錠劑、片劑、乳化劑、液狀懸浮液、分散劑、溶劑。口服劑型一般所使用之載體，以錠劑為例可為乳糖、玉米澱粉、潤滑劑，如硬脂酸鎂為基本添加物。而膠囊使用之稀釋液包括乳糖與乾燥玉米澱粉。製成液狀懸浮液或乳化劑劑型，係將活性物質懸浮或溶解於結合乳化劑或懸浮劑之油狀介面，視需要添加適度之甜味劑，風味劑或係色素。

鼻用氣化噴霧劑或吸入劑組成物，可根據已知之製劑技術進行製備。例如，將組成物溶於生理食鹽水中，添加苯甲醇或其他適合之防腐劑，或促吸收劑以增強生物可利用性。本發明化合物之組合物亦可製成栓劑，進行經直腸或陰道之投藥方式。

本發明化合物亦可運用『靜脈投藥』，其係包括經由皮下、腹腔、靜脈、肌肉，或關節腔內、顱內、關節液內、脊髓內注射，主動脈注射，胸腔注射，疾病部位內注射，或其他適合之投藥技術。

### 【實施方式】

本案所提出之「茶鹼化合物之抑制骨質疏鬆症活性」將可由以下之實施例說明而得到充分瞭解，使得熟習本技藝之人士可以據以完成之，然而本案之實施並非可由下列實施例而被限制其實施型態，熟習本技藝之人士仍可依據除既揭露之實施例之精神推演出其他實施例，該等實施例皆當屬於本發明之範圍。

#### 實驗材料及方法：

##### 活性實驗：

##### 一、細胞培養

### (1) 細胞培養液製備

將 10 % 胎牛血清 (FBS) 、 20 ml 麩醯胺酸 (glutamine) 、 20 ml 抗生素、 3 g  $\text{NaHCO}_3$  與 DMEM 粉末混合並加二次蒸餾水 2 公升，調整 pH 值至 7.2。

### (2) RAW264.7 初代培養

將細胞解凍後，直接加到含有適量培養液之 10 公分培養盤中，放置於  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2/\text{air}$  環境之培養箱中靜待細胞貼附。隔天再更換培養液以去除抗凍劑 (DMSO)。

### (3) RAW264.7 繼代培養

將舊之培養液吸除後，用新之培養液沖下細胞，即可用 trypan blue 計數細胞並分盤培養。

## 二、藥物毒性試驗 (MTT assay)

將  $10^3$  個細胞接種於 96 孔培養盤中，經 24 小時之細胞培養後，投與不同之藥物及其不同濃度，分別於 24 及 48 小時後加入 MTT (0.05 g/10 ml 磷酸鹽緩衝液 PBS) 10  $\mu\text{l}/\text{well}$ ，培養 4 小時，將培養液吸出，並加入 100  $\mu\text{l}/\text{well}$  異丙醇 (isopropanol) 溶解紫色甲瓚 (formazan) 結晶。快速震盪 15 分鐘，並靜置 15 分鐘後，測量 540 nm ( $\text{OD}_{540}$ ) 和 630 nm ( $\text{OD}_{630}$ ) 之吸光值，將每組數據之 ( $\text{OD}_{540} - \text{OD}_{630}$ ) 與控制組值比較後即可計算出細胞存活百分比。

## 三、細胞增生試驗 (BrdU assay)

依照 Cell Proliferation ELISA BrdU kit 之說明步驟進行實驗。將  $10^3$  個細胞接種於 96 孔培養盤中，經 24 小時之細胞培養後，投與核因子- $\kappa\text{B}$  受体活化因子配體 (RANKL) 10 ng/ml 以及不同濃度之 KMUP-1、theophylline 和 sildenafil，藥物作用 24、48、72 小時後，加入 BrdU labeling reagent 10  $\mu\text{l}/\text{well}$ ，於培養箱中避光培養 4 小時，吸出培養液，加入 FixDenat solution 200  $\mu\text{l}/\text{well}$  於室溫中反應 30 分鐘，接著移除 FixDenat solution，並且加入 Anti-BrdU POD 100  $\mu\text{l}/\text{well}$  於室溫中反應

90 分鐘，移除 Anti-BrdU POD，用 Wash buffer 200  $\mu$ l/well 清洗 3 次後，移除 Wash buffer，加入 Substrate reaction 100  $\mu$ l/well，於室溫中反應 30 分鐘，此時溶液呈藍色，最後加入 Stop solution 25  $\mu$ l/well (1 M  $H_2SO_4$ )，此時溶液呈黃色，震搖 5 分鐘後，測量 450 nm ( $OD_{450}$ ) 和 630 nm ( $OD_{630}$ ) 之吸光值，將每組數據之 ( $OD_{450} - OD_{630}$ ) 與控制組織數值比較後即可算出細胞增生百分比。

#### 四、抗酒石酸酸性磷酸酵素染色法 (TRAP stain)

將  $10^3$  個細胞接種於 96 孔培養盤中，經 24 小時之細胞培養後，投與核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配體 (RANKL) 10 ng/ml 以及不同濃度之 KMUP-1，每 2 天更換一次藥物及培養液，待藥物反應 4 天後，於第 5 天進行染色。首先將磷酸鹽緩衝液 (PBS) 於 37°C 水浴鍋回溫，緩慢加入磷酸鹽緩衝液 (PBS) 100  $\mu$ l/well，再緩慢吸出 100  $\mu$ l/well 之培養液移除，重複磷酸鹽緩衝液 (PBS) 清洗之動作 3 次，直到培養盤中之液體呈透明無色後，勿吸乾，每個孔洞預留約 50  $\mu$ l 之液體，接著緩慢加入 Fixative solution 200  $\mu$ l/well 於室溫中反應 10 分鐘，接著以二次水清洗 3 次，勿吸乾，每個孔洞預留約 50  $\mu$ l 之液體，加入 Substrate 200  $\mu$ l/well 於室溫中避光反應 15 分鐘，於光學顯微鏡下觀察染色深淺，待細胞成功吃入紅色染劑後即可以二次水清洗，最後以光學顯微鏡觀察及拍照 (40 倍及 200 倍)，再用合圖軟體 (Autopano Pro V1.4.2, Kolor, Paris) 合成 40 倍拍下之圖，再以人工計數每個孔洞中細胞核數目大於 3 之多核蝕骨細胞數目，與控制組做比較。

配方：

(1) 固定液 (Fixative solution)：檸檬酸液 (Citrate solution) 25 ml，丙酮 (Acetone) 65 ml，37% 甲醛 (Formaldehyde) 8 ml。避光、4°C 儲存備用。

(2) 檸檬酸液 (Citrate solution)：18 mM 檸檬酸，9 mM

檸檬酸鈉, 12 mM 氯化鈉加水至 100 ml, pH 3.6, 最後加入 0.001% 聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100)。

(3) 基質 (Substrate) : 將萘酚 AS-MX 磷酸鹽 (Naphthol As-Mx-phosphate disodium) 2 mg、耐曬紅紫 LB 鹽 (Fast Red Violet LB) 6 mg 溶於 1 M 酒石酸鈉 (Sodium tartrate) 丙酮液 (0.1 M, pH 5) 與 0.1 M 醋酸鈉 (Sodium acetate) 19 ml。

### 五、抗酒石酸酸性磷酸酵素活性試驗 (TRAP activity assay)

將  $10^3$  個細胞接種於 96 孔培養盤中, 經 24 小時之細胞培養後, 投與核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配體 (RANKL) 10 ng/ml 以及不同濃度之 KMUP-1, 每 2 天更換一次藥物及培養液, 待藥物反應 4 天後, 於第 5 天測 TRAP 活性。首先, 用冰之磷酸鹽緩衝液 (PBS) 100  $\mu$ l/well 清洗 3 次, 吸乾 96 孔培養盤中之液體, 加入 50  $\mu$ l/well 含 0.2% TritonX-100 之裂解緩衝液 (Lysis buffer) 於室溫中反應 10 分鐘:

(1) 吸取上清液 5  $\mu$ l/well, 置於已加入 150  $\mu$ l/well 基質 (Substrate) 之另外一個 96 孔培養盤中, 於 37°C 培養箱中反應 30 分鐘, 待反應液呈黃色後, 最後以 0.1 M 氫氧化鈉 100  $\mu$ l/well 終止反應, 於 37°C 下測量 405 nm ( $OD_{405}$ ) 之吸光值。

基質 (Substrate) 係將 0.1 M 对硝基苯磷酸二钠盐 (4-NPP) 和 0.2 M 酒石酸鈉加入 0.1 M 醋酸鈉緩衝液, 配置成 pH=5。

(2) 吸取上清液 3  $\mu$ l/well, 以 蛋白質濃度分析試劑組 (Bio-Rad DC Protein Assay) 測定蛋白質濃度。

### 六、測定 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 含量 (ELISA)

將  $10^5$  個細胞接種於 24 孔培養盤中, 經 24 小時之細胞培養後, 投與核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配體 (RANKL) 10 ng/ml 以及不同濃度之 KMUP-1, 帶藥物反應 24 小時後, 吸取上清

液，以 13,000 rpm、4°C、離心 20 分鐘後，吸取上清液並用酶聯免疫吸附測試試劑 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA kits) (R&D system 和 eBioscience™) 測定 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-10 之含量，實驗步驟依照 kit 上之說明。

### 七、核質分離 (Nuclear-cytosol protein separation)

#### (1) 萃取細胞質蛋白

依照 NE-PER kit 說明書步驟來抽取核蛋白。將  $2.5 \times 10^6$  個細胞接種於 6 公分培養皿中，經 24 小時之細胞培養後，投與不同濃度之 KMUP-1，待藥物作用 24 小時後，再加入核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配體 (RANKL) 10 ng/ml，培養特定時間。去除培養液，用磷酸鹽緩衝液 (PBS) 洗兩次，加入 1 ml 磷酸鹽緩衝液 (PBS) 刮細胞收集在離心小管中，離心 5 分鐘、4°C、5,000 rpm。將上清液吸乾丟掉，加入蟲擬蠟菌 (CERI) 100  $\mu$ l，震盪 15 秒將細胞打散，再放冰上 10 分鐘。加入 CERII 5.5  $\mu$ l，震盪 5 秒，放冰上 1 分鐘，再震盪 5 秒，離心 5 分鐘、4°C、10,000 rpm，此步驟可將細胞質與細胞核分離，得到上清液為細胞質蛋白，沉澱物為細胞核。將上清液 (細胞質蛋白) 吸出置於離心小管中，儲存於 -80°C 待日後使用。

#### (2) 萃取細胞核蛋白

將剩下之細胞核沉澱物，加入磷酸鹽緩衝液 (PBS) 500  $\mu$ l，離心 5 分鐘、4°C、10,000 rpm，並吸乾上清液丟棄，此步驟可以清洗沉澱物，以避免細胞質液之污染。加入核甘酸切除修復 (NER) 50  $\mu$ l，震盪 15 秒再放冰上 10 分鐘，此步驟重複 4 次，最後離心 10 分鐘、4°C、13,000 rpm，得到之上清液為細胞核蛋白，將上清液 (細胞核蛋白) 吸出置於離心小管中，儲存於 -80°C 待日後使用。

**CERI 配法：**

CERI 原液：PI：PMSF = 100：5：1

**NER 配法：**

NER 原液：PI：PMSF =100：5：1

#### 八、西方墨點法 (Western blotting)

(1) 將  $10^6$  個細胞接種於 6 公分培養盤中，經 24 小時之細胞培養後，投與不同濃度之 KMUP-1，待藥物作用 24 小時後，再加入核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL) 10 ng/ml，培養特定時間。

(2) 將細胞以冰磷酸鹽緩衝液 (PBS) 洗二次後，並去除殘餘之磷酸鹽緩衝液 (PBS) 後加入 25  $\mu$ l 之 Lysis buffer 作用 15 分鐘後，以刮杓刮下蛋白質。再以 13,000 rpm、4°C、離心 30 分鐘後，吸取上清液，檢品可儲存於 -80°C 待日後使用。

(3) 蛋白質濃度以 Bio-Rad DC Protein Assay 測量。得知濃度後，以二次蒸餾水稀釋至特定濃度，取稀釋蛋白液約四分之一體積之檢品緩衝液加入後，放置於沸水中 5 分鐘，再置於冰上 5 分鐘，短暫離心後即可注入至孔洞中。先以電壓 100 伏特跑 10 分鐘，待蛋白質跑至上下膠交界處後，再將電壓轉至 200 伏特，待 40 分鐘後即關閉電源。

(4) 將聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜先以甲醇浸泡 2 分鐘，再用二次蒸餾水潤洗後，再浸泡於轉印緩衝液 (transfer buffer) 中 15 分鐘備用。將十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE) 置於膜上，上下以潤濕之紙墊包夾後，置於半乾轉印 (semi-dry transfer) 機器上扣好電極和上蓋後，以 20 伏特轉漬 30 分鐘。

(5) 修剪膜上得到特定分子量之條紋 (band) 後，加入適量 blocking buffer (5 % 脫脂奶粉溶於洗滌緩衝液 (washing buffer) 室溫下搖晃 1 小時以去除非特異性結合，再以稀釋過之一級抗體均勻覆蓋於 band 上 4°C 作用隔夜。之後吸起一級抗體後，以洗滌緩衝液清洗 5 分鐘六次。在將稀釋後之二級抗體均勻覆蓋於 band 上室溫作用 1 小時，之後再以洗滌緩衝液清洗 5 分鐘六次，即可用 ECL 壓片。

### 九、MMP-2 和 MMP-9 基質金屬蛋白酶酵素電泳分析法 (Gelatin Zymography)

(1) 將  $2.5 \times 10^6$  個細胞接種於 6 公分培養盤中，經 24 小時之細胞培養後，投與核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL) 10 ng/ml 以及不同濃度之 KMUP-1，待藥物反應 24 小時後，吸取上清液，以 13,000 rpm、4°C、離心 20 分鐘後，吸取上清液，冰入 -80°C 冰箱儲存供日後測定。

(2) 製備 10% 膠，將 10 mg 明膠 (gelatin) 添加 1 ml 二次水，於 55-60°C 水浴鍋加熱至澄清溶解新鮮配置 1% 明膠液。

(3) 蛋白質濃度以 Bio-Rad DC Protein Assay 測量。得知濃度後，以二次蒸餾水稀釋至特定濃度，取稀釋檢品約四分之一體積之檢品緩衝液加入後，震搖均勻，即可將檢品注入上膠孔洞中，加入一倍之 running buffer，以電壓 100 伏特跑 10 分鐘，待檢品跑至上下膠交界處後，再將電壓轉至 200 伏特，待 60 分鐘後即關閉電源。

(4) 將跑完之膠刮除上膠，小心翼翼之將下膠從玻璃上移至塑膠盒中，以 TritonX-100 buffer 於室溫中快速震搖清洗 30 分鐘，2 次。接著以三羥甲基氨基甲烷鹽酸鹽緩衝液 (Tris-HCl buffer) 於室溫中快速震搖清洗 20 分鐘，2 次。倒乾液體後，加入 Developing buffer 於 37°C 水浴鍋作用隔夜。

(5) 倒掉 Developing buffer 後，到抽風櫥內操作接下來之染色及退染之步驟。加入考馬斯藍 (Comassie blue) R-250 stain solution 於室溫中慢速震搖 40-60 分鐘，回收 stain solution 後，加入 destain solution，快速震搖，約 5-10 分鐘更換一次 destain solution，直到白色之 band 出現為止。

(6) 將洗好之膠，放於透明投影片上，以照相機拍照。

### 十、凹洞形成分析法 (Pit formation assay)

將 200  $\mu$ l/well 含核因子- $\kappa$ B 受體活化因子配體 (RANKL) 10 ng/ml 以及不同濃度之 KMUP-1 之培養液加入 BD



BioCoat™ Osteologic™ Bone Cell Culture System (16-well multitest slides) 之 16 孔培養盤中，接著緩慢且均勻地加入含 1,000 個細胞之 100  $\mu$ l 之培養液於每孔中，使每孔之培養液體積為 300  $\mu$ l，放入培養箱中培養 5 天，期間每 2 天更換一次培養液及藥物。待 5 天後，完全移除培養液，撥開 16 孔培養盤之外殼，並以滅菌水清洗 3 次，接著以清潔液 (Bleach solution) 覆蓋培養盤底部，染色 5 分鐘，最後再以滅菌水清洗 5 次，待風乾後即可以光學顯微鏡拍照 (40 倍及 200 倍)，再用合圖軟體 (Autopano Pro V1.4.2, Kolor, Paris) 合成 40 倍拍下之圖。

### 十一、 逆轉錄聚合酶鏈式反應 (Reverse Transcription -Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

#### (1) 細胞前處理

將  $2.5 \times 10^6$  個細胞接種於 6 公分培養盤中，經 24 小時培養後，投與 10 ng/ml 核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配體 (RANKL) 以及不同濃度之 KMUP-1，待藥物反應 24 小時。

#### (2) 萃取 RNA

於層流 (laminar flow) 操作台，以無核酸酶 (nuclease-free) 之器材進行以下步驟。倒掉培養液，用冰磷酸鹽緩衝液 (PBS) 清洗 2-3 次，吸乾液體，加入 RNA 裂解緩衝液 (RNA lysis buffer) 175  $\mu$ l，立即刮下細胞 (每盤細胞使用一隻新之刮勺)，將刮下之細胞液放入 1.5 ml 小型離心管內，加入藍色 RNA 稀釋緩衝液 (RNA Dilution Buffer) 350  $\mu$ l，混合均勻，避免分層，將小型離心管放入 70°C 水浴鍋反應 3 分鐘 (勿超過 3 分鐘)，於 4°C 以 14,000 rpm 離心 10 分鐘，吸取上清液，置入新之小型離心管。

#### (3) 以 Spin 管柱純化 RNA

加入 200  $\mu$ l 95% 酒精混合均勻，將液體轉移到 Spin 管柱內，於 4°C 以 14,000 rpm 離心 1 分鐘，倒掉下管柱內液體，將 50  $\mu$ l 泡好之 DNA 酶緩衝液 (DNase buffer) 散佈在 spin 管柱

之膜上，於室溫中作用 15 分鐘，加入 200  $\mu\text{l}$  DNA 酶中止溶液 (DNase stop solution)，於 4°C 以 14,000 rpm 離心 1 分鐘，加入 RNA 洗滌溶液 (RNA wash solution) 600  $\mu\text{l}$ ，於 14,000 rpm、4°C、離心 1 分鐘，加入 RNA 洗滌溶液 250  $\mu\text{l}$ ，於 4°C 以 14,000 rpm 離心 2 分鐘，丟棄下層 Spin 管柱，將上層 Spin 管柱蓋子扭掉，放在新之小型離心管上，加入無核酸酶溶液 100  $\mu\text{l}$ ，於 4°C 以 14,000 rpm 離心 1 分鐘，溶解之 RNA 取 2  $\mu\text{l}$  進行濃度試驗，其餘立即置入 -80°C 冰箱儲存。

#### (4) RNA 經逆轉錄 (Reverse transcription) 合成 cDNA

分裝 RNA (1  $\mu\text{g}$  RNA)，放入聚合酶鏈式反應 (PCR) 器 70°C 作用 10 分鐘，快速將水氣離心下來，將檢品放回冰上，將配好之 A 溶液加入檢品中。接著跑 PCR 機器 (42°C 60 分鐘，95°C 5 分鐘)，結束後測 cDNA 濃度，定量後每管檢品加 80  $\mu\text{l}$  之水，將檢品放置 4°C 儲存。

A 溶液之製備：混合氯化鎂 (25 mM) 4  $\mu\text{l}$ 、逆轉錄緩衝液 (Reverse Transcription 10x Buffer) 2  $\mu\text{l}$ 、10 mM 核酸混合液 (dNTP Mixture) 2  $\mu\text{l}$ 、重組之核酶及核酶抑制劑 (Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor) 0.5  $\mu\text{l}$ 、AMV 逆轉錄緩衝液 (AMV Reverse Transcriptase) 0.6  $\mu\text{l}$  及寡聚胸腺嘧啶引物 (Oligo (dT) 15 Primer OR Random Primers) 1  $\mu\text{l}$ ，最後添加無核酸酶的水至 20  $\mu\text{l}$ 。

#### (5) 聚合酶鏈式反應 (PCR) 擴大反應

依序加入以下試劑，混合均勻後，跑 PCR 機器。

- I. 修飾功能指示劑 (Taq Master Mix RED) (2X) 10  $\mu\text{l}$
- II. 設計前置引子 (Forward primer) 1  $\mu\text{l}$
- III. 反置引子 (Reverse primer) 1  $\mu\text{l}$
- IV. 互補 DNA (Complementary DNA, cDNA) 2  $\mu\text{l}$
- V. 滅菌二次水 6  $\mu\text{l}$

#### (6) 跑膠 (Running)

A. 製 2% agarose gel (1 片) : 將 1.2 g agarose 溶於 60 ml 0.5x TBE buffer 於三角燒杯中，微波 (中火 2-3 min) 至溶解，加入 1  $\mu$ l 溴化乙錠 (Ethidium Bromide, EtBr)，搖勻後倒入製膠盒中。

B. DNA ladder (marker) 配置法：以 DNA loading dye : DDW = 1:2:7 比例配置。

C. Running buffer : 0.5x TBE buffer (約 300 ml)

D. 以 100 V 電壓跑 30-40 分鐘。

## 十二、細胞內鈣離子濃度測定

利用鈣離子螢光探針 fura-2/AM 作為細胞內鈣離子變化之指示劑，偵測鈣離子在細胞內濃度之變化。fura-2 具有螢光特性且可與鈣離子結合，當 fura-2 和鈣離子結合後所激發出之波長為 340 nm，而非結合型之 fura-2 所激發出之波長為 380 nm，根據此特性可將激發出之螢光強度比例換算成鈣離子濃度。

將 RAW264.7 小鼠巨噬細胞接種於 10 公分培養皿，待細胞長至 90% 匯合狀態後，或將  $10^6$  個細胞接種於 10 公分培養皿，24 小時後加入 10 ng/ml 核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配體 (RANKL) 反應 7 天，待單核細胞分化成多核類蝕骨細胞，倒掉培養液，用磷酸鹽緩衝液 (PBS) 清洗三至四次後，用磷酸鹽緩衝液將全部細胞沖下置於離心管內，1,500 rpm、4°C、離心 5 分鐘，倒掉上清液，加入 2 ml 細胞培養液及 2.5  $\mu$ l 之 fura-2/AM (2  $\mu$ M)，於 37°C 下作用 40 分鐘，於室溫下以 1,500 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，並加入適量生理緩衝液 (physiological buffer) 清洗並離心，最後加入生理緩衝液將細胞打散，將細胞濃度調為  $5 \times 10^5$  cells/ml。取 1 ml 細胞懸浮液置入石英管中，事先加入 KMUP-1 反應 4 分鐘後，將石英管放入 RF-5310 型螢光分光光度計測量 340 nm 和 380 nm 兩種波長在 510 nm 波長所產之螢光強度改變情形。記錄 60 秒後，加入

20 ng/ml 核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (RANKL) 後再記錄螢光強度之改變。

生理緩衝液 (physiological buffer) 之製備：將氯化鈉 130 mM、氯化鉀 5 mM、葡萄糖 10 mM、氯化鎂 1 mM、氯化鈣 1 mM、HEPES 20 mM 溶於 1 公升二次水中，調整 pH 值至 7.4。

### 十三、 碘乙酸鈉動物實驗模式

以碘乙酸鈉 (Monosodium iodoacetate, MIA) 作為誘發老鼠膝關節發炎 (osteoarthritis) 之誘導劑。由國科會購買 30 隻五週大 Wistar 品系公鼠，體重大約 150-165 g，將老鼠分成五組，分別為佯作組 (Sham)、碘乙酸鈉誘導組 (MIA) 及三組 KMUP-1 給藥組 (1、2.5、5 mg/kg 劑量 KMUP-1)，每組各 6 隻老鼠。將老鼠飼養於動物室適應環境一週後，口服餵食 KMUP-1 (1、2.5、5 mg/kg) 一週，於第 8 天分別於碘乙酸鈉組及 KMUP-1 治療組之老鼠左側膝關節，用 26 口徑之 0.5 c.c. 胰島素針注射 4 mg/25  $\mu$ l 碘乙酸鈉食鹽水溶液於膝關節腔內，再餵食 KMUP-1 (1、2.5、5 mg/kg) 一週，於第 15 天將老鼠犧牲。老鼠犧牲時，打開左側膝蓋，分離股骨 (femur) 與脛骨 (tibia) 連結之處，取出股骨接近脛骨之那段關節，修剪乾淨之後，以數位相機拍照。

### 十四、 石蠟切片

將乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 置入燒瓶，添加二次水，加熱至完全溶解成乙二胺四乙酸溶液。將取下之組織，放進包埋盒中，浸泡於 10% 福馬林三天，接著浸泡於 0.5 M 乙二胺四乙酸溶液於 60°C 烘箱作用一週以脫鈣，將脫完鈣之骨頭，以脫水機脫水一天，再進行石蠟包埋及切片，切片厚度為 4  $\mu$ m。

### 十五、 染色

(1) 蘇木紫和伊紅染色 (Hematoxylin & Eosin stain, H&E)

首先脫蠟，將切片置於 60°C 烘箱作用 20 分鐘，浸泡於二甲苯 (xylene) 3 分鐘二次，接著依序浸泡於 100% 酒精 3 分鐘二次，95% 酒精 1 分鐘，80% 酒精 1 分鐘，70% 酒精 1 分鐘，50% 酒精 1 分鐘，二次水 1 分鐘後，浸泡於蘇木紫 (Hematoxylin) 染缸 5 分鐘，取出以流動水清洗 5 分鐘，浸泡於伊紅 (Eosin) 染缸 1.5 分鐘，取出以流動水清洗 5 分鐘後，再依序浸泡於 90% 酒精 1-2 秒，100% 酒精泡 1-2 秒，最後浸泡於二甲苯，即可封片。封好之玻片於光學顯微鏡下拍照。

## (2) 甲苯胺藍 (Toluidine blue)

甲苯胺藍之製備將 1% 硼酸鈉 (sodium borate)、1% 甲苯胺藍、1% 天青 II (AZUR II) 溶於二次水。

首先脫蠟，將切片置於 60°C 烘箱作用 20 分鐘，泡於二甲苯 3 分鐘二次，接著依序浸泡於 100% 酒精 3 分鐘二次，95% 酒精 1 分鐘，80% 酒精 1 分鐘，70% 酒精 1 分鐘，50% 酒精 1 分鐘，二次水 1 分鐘後，浸泡於甲苯胺藍染缸浸泡 1 分鐘，取出以流動水清洗 5 分鐘，再依序浸於 90% 酒精泡 1-2 秒，100% 酒精泡 1-2 秒，最後浸泡於二甲苯中，即可封片。封好之玻片於光學顯微鏡下拍照。

## 十六、 統計方法

所有實驗數據均以平均值  $\pm$  標準誤 (Mean  $\pm$  S.E.M.) 及百分率 (%) 表示。實驗數據之比較，除有特別標示外，均採用 Student's *t*-Test 以及 one-way ANOVA 評估對照組與給藥組間之差異。當 *P* 值小於 0.05 時，表示於統計學上有顯著差異。

### 【圖式簡單說明】

第一圖 KMUP-1 抑制 RANKL 誘發細胞之增生 (MTT 方法)

<sup>#</sup>*P* < 0.01 與對照組比較 (24 hr);

<sup>@@</sup>*P* < 0.01 與對照組比較 (48 hr);

<sup>\*</sup>*P* < 0.05, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01 與 RANKL 組比較 (24 hr);

<sup>+</sup>*P* < 0.05, <sup>++</sup>*P* < 0.01 與 RANKL 組比較 (48 hr)

第二圖 KMUP-1 抑制 RANKL 誘發細胞之增生 (BrdU 方法)

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較

第三圖 KMUP-1 可抑制 RANKL 誘發類蝕骨細胞之分化(光

學顯微鏡影像全景圖 , 放大 40 倍)

第四圖 光學顯微鏡局部放大圖 (放大 200 倍)

a-對照組

b-RANKL 10 ng/ml

c-RANKL + KMUP-1 1  $\mu$ M

d-RANKL + KMUP-1 2.5  $\mu$ M

e-RANKL + KMUP-1 5  $\mu$ M

f-RANKL + KMUP-1 7.5  $\mu$ M

g-RANKL + KMUP-1 10  $\mu$ M

第五圖 KMUP-1 可抑制分化成多核之類蝕骨細胞

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較

第六圖 KMUP-1 可抑制 TRAP 活性

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較

第七圖 KMUP-1 可抑制類蝕骨細胞之溶蝕作用

(A) 光學顯微鏡影像全景圖 (放大 40 倍)

(B) 光學顯微鏡局部放大圖 (放大 200 倍)

第八圖 KMUP-1 可減少溶蝕凹洞面積

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較

第九圖 KMUP-1 影響經由 RANKL 刺激 RAW264.7 細胞分泌

促炎細胞因子

(A) 腫瘤壞死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )

(B) 白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較

第十圖 KMUP-1 可抑制分泌白介素類促炎細胞因子

(A) 白介素-6 (IL-6)

(B) 白介素-10 (IL-10)

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較

第十一圖 KMUP-1 影響經由 RANKL 刺激 RAW264.7 細胞之 NF- $\kappa$ B 活化路徑

(A) KMUP-1 可減少核因子- $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ) 之磷酸化量

(B) KMUP-1 可減少細胞核內 p65 之量

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較

第十二圖 KMUP-1 可抑制細胞質內細胞外訊息調節激酶 (ERK) 之磷酸化程度

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較

第十三圖 KMUP-1 可抑制細胞質內 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 之磷酸化程度

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較

第十四圖 KMUP-1 可抑制細胞質內 p38 絲裂原活化蛋白激酶之磷酸化程度

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較

第十五圖 KMUP-1 可抑制 RANKL 活化 c-Fos 基因蛋白之表現

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較

第十六圖 KMUP-1 可抑制 RANKL 活化 NFATc1 之表現

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較

第十七圖 KMUP-1 影響 RANKL 誘發細胞外鈣離子之內流

(A) RANKL 無法明顯刺激 RAW264.7 巨噬細胞之鈣離子內流

(B) KMUP-1 可減少 RANKL 刺激類蝕骨細胞之鈣離子內流

第十八圖 KMUP-1 抑制 RANKL 刺激類蝕骨細胞外鈣離子之內流

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較

第十九圖 KMUP-1 可抑制 RANKL 活化 calcineurin 之表現

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較

第二十圖 KMUP-1 可抑制細胞質內 Akt 之磷酸化程度

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較

第二十一圖 KMUP-1 影響 RANKL 誘發誘發基質金屬蛋白酵素-2 (MMP-2) 之產量

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較

第二十二圖 KMUP-1 影響 RANKL 誘發基質金屬蛋白酵素-9 (MMP-9) 之產量

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較.



第二十三圖 KMUP-1 影響 RANKL 誘發基質金屬蛋白酵素-2 (MMP-2) 之活性

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較.

第二十四圖 KMUP-1 影響 RANKL 誘發基質金屬蛋白酵素-9 (MMP-9) 之活性

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較

第二十五圖 KMUP-1 影響 RANKL 刺激 HMGB1 之遷移

(A) 各時段 RANKL 10 ng/ml 誘發高遷移族蛋白 B1 之產量

(B) RANKL 10 ng/ml + KMUP-1 ( $\mu$ M) 誘發一天之產量

第二十六圖 KMUP-1 影響 RANKL 刺激培養液之 HMGB1 產量

(A) 各時段 RANKL 10 ng/ml 誘發高遷移族蛋白 B1 之產量

(B) RANKL 10 ng/ml + KMUP-1 ( $\mu$ M) 誘發一天之產量

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較.

第二十七圖 KMUP-1 影響 RANKL 刺激細胞質之 HMGB1 產量

(A) 各時段 RANKL 10 ng/ml 誘發高遷移族蛋白 B1 之產量

(B) RANKL 10 ng/ml + KMUP-1 ( $\mu$ M) 誘發一天之產量

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較.

第二十八圖 KMUP-1 影響 RANKL 刺激細胞核之 HMGB1 產量

(A) 各時段RANKL 10 ng/ml 誘發高遷移族蛋白B1之產量

(B) RANKL 10 ng/ml + KMUP-1 ( $\mu$ M) 誘發一天之產量

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較;

$^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  與 RANKL 組比較

# 第二十九圖 KMUP-1 影響 mRNA 基因之表現

1. 腫瘤壞死因子受體相關因子 (TRAF) 6
2. 耐酒石酸之酸性磷酸酵素 (TRAP)
3. c-Fos 基因蛋白
4. 活化 T 細胞核因子 (NFATc1)
5. 基質金屬蛋白酵素-9 (MMP-9)
6. 原癌基因 (Fra-1)
7. Fra-2 基因
8. c-Src 基因
9. 蛋白酶 K (Cathepsin K)
10. 甘油醛 3-磷酸去氫酶 (GAPDH)

$^{a}P < 0.05$  與對照組比較,

$^{b}P < 0.05$  與 RANKL 組比較

# 第三十圖 KMUP-1 影響腫瘤壞死因子受體相關因子 (TRAF) 6 蛋白質之表現

$^{##}P < 0.01$  與對照組比較

# 第三十一圖 KMUP-1 影響碘乙酸鈉誘發大鼠之膝關節炎 (膝關節外觀圖)

- a. 佯作組 (Sham)
- b. 碘乙酸鈉 4 mg/25  $\mu$ l 食鹽水溶液
- c. 碘乙酸鈉 + KMUP-1 1 mg/kg
- d. 碘乙酸鈉 + KMUP-1 2.5 mg/kg
- e. 碘乙酸鈉 + KMUP-1 5 mg/kg

## 第三十二圖 蘇木紫和伊紅 (H&amp;E) 切片染色 (放大×100)

- a. 佯作組 (Sham)
- b. 碘乙酸鈉 4 mg/25  $\mu$ l 食鹽水溶液
- c. 碘乙酸鈉 + KMUP-1 1 mg/kg
- d. 碘乙酸鈉 + KMUP-1 2.5 mg/kg
- e. 碘乙酸鈉 + KMUP-1 5 mg/kg

## 第三十三圖 軟骨組織切片經甲苯胺藍 (Toluidine blue) 染色圖 (放大×100)

- a. 佯作組 (Sham)
- b. 碘乙酸鈉 4 mg/25  $\mu$ l 食鹽水溶液
- c. 碘乙酸鈉 + KMUP-1 1 mg/kg
- d. 碘乙酸鈉 + KMUP-1 2.5 mg/kg
- e. 碘乙酸鈉 + KMUP-1 5 mg/kg

## 【主要元件符號說明】

## 參考文獻：

- Armstrong AP, Tometsko ME, Glaccum M, Sutherland CL, Cosman D, Dougall WC: A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. *J Biol Chem* 2002, 277 (46) :44347-44356.
- Mizukami J, Takaesu G, Akatsuka H, Sakurai H, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Sakurai N: Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6. *Mol Cell Biol* 2002, 22 (4) :992-1000.
- Miyamoto K, Waki Y, Horita T, Kasugai S, Ohya K: Reduction of bone loss by denbufylline, an inhibitor of phosphodiesterase 4. *Biochem Pharmacol* 1997, 54 (5) :613-617.
- Takayanagi H: The role of NFAT in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci* 2007, 1116:227-237.
- Wei S, Siegal GP: Mechanisms modulating inflammatory osteolysis: a review with insights into therapeutic targets. *Pathol Res Pract* 2008, 204 (10) :695-706.
- Wong BR, Besser D, Kim N, Arron JR, Vologodskaya M, Hanafusa H,

Choi Y: TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell* 1999, 4 (6) :1041-1049.

Yoshimura T, Kurita C, Nagao T, Usami E, Nakao T, Watanabe S, Kobayashi J, Yamazaki F, Tanaka H, Nagai H: Effects of cAMP-phosphodiesterase isozyme inhibitor on cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Gen Pharmacol* 1997, 29 (4) :633-638.

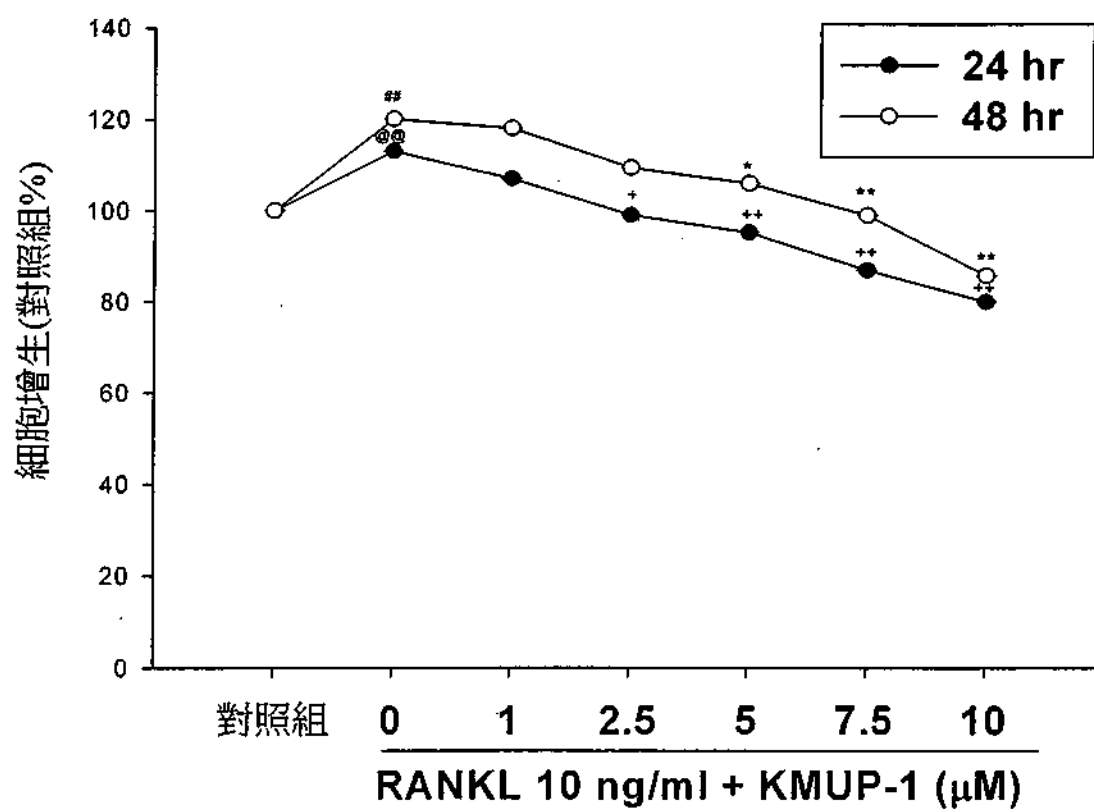
Zhou Z, Han JY, Xi CX, Xie JX, Feng X, Wang CY, Mei L, Xiong WC: HMGB1 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis in a manner dependent on RAGE. *J Bone Miner Res* 2008, 23 (7) :1084-1096.

## 七、申請專利範圍：

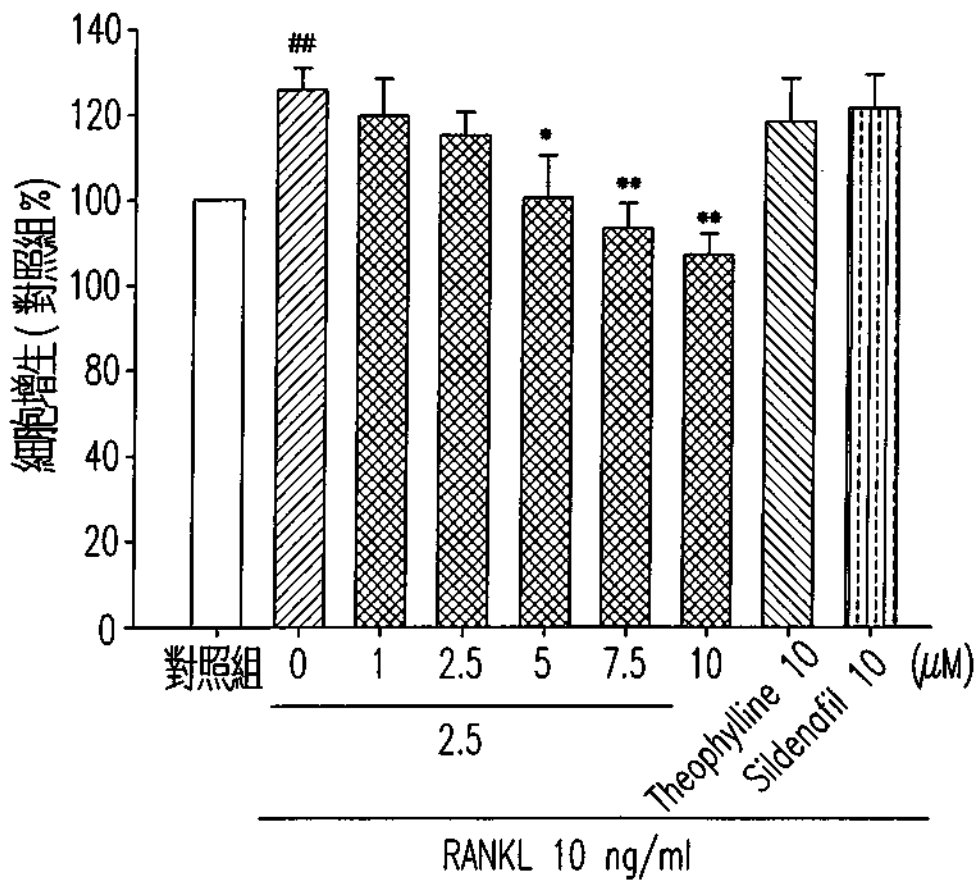
1. 一種 KMUP 類組合物之用途，其係用於製備治療骨質疏鬆症之藥劑，該組合物包含藥學上可接受之載體；  
以及一有效量之 7-[2-[4-(2-氯苯基)哌嗪]-1-基]-乙基-茶鹼  
(7-[2-[4-(2-Chlorophenyl)piperazin-1-yl]ethyl]theophylline)  
化合物。
2. 一種 KMUP 類組合物之用途，其係用於製備治療膝關節軟骨損傷之藥劑，該組合物包含藥學上可接受之載體；  
以及一有效量之 7-[2-[4-(2-氯苯基)哌嗪]-1-基]-乙基-茶鹼  
(7-[2-[4-(2-Chlorophenyl)piperazin-1-yl]ethyl]theophylline)  
化合物。
3. 一種 KMUP 類組合物之用途，其係用於製備抑制類蝕骨細胞增生及分化之藥劑，該組合物包含藥學上可接受之載體；  
以及一有效量之 7-[2-[4-(2-氯苯基)哌嗪]-1-基]-乙基-茶鹼  
(7-[2-[4-(2-Chlorophenyl)piperazin-1-yl]ethyl]theophylline)  
化合物。
4. 一種 KMUP 類組合物之用途，其係用於製備治療發炎性關節疾患之藥劑，該組合物包含藥學上可接受之載體；  
以及一有效量之 7-[2-[4-(2-氯苯基)哌嗪]-1-基]-乙基-茶鹼  
(7-[2-[4-(2-Chlorophenyl)piperazin-1-yl]ethyl]theophylline)  
化合物。
5. 一種 KMUP 類組合物之用途，其係用於製備預防及治療骨質流失疾患之藥劑，該組合物包含藥學上可接受之載體；  
以及一有效量之 7-[2-[4-(2-氯苯基)哌嗪]-1-基]-乙基-茶鹼  
(7-[2-[4-(2-Chlorophenyl)piperazin-1-yl]ethyl]theophylline)  
化合物。

八、圖式：

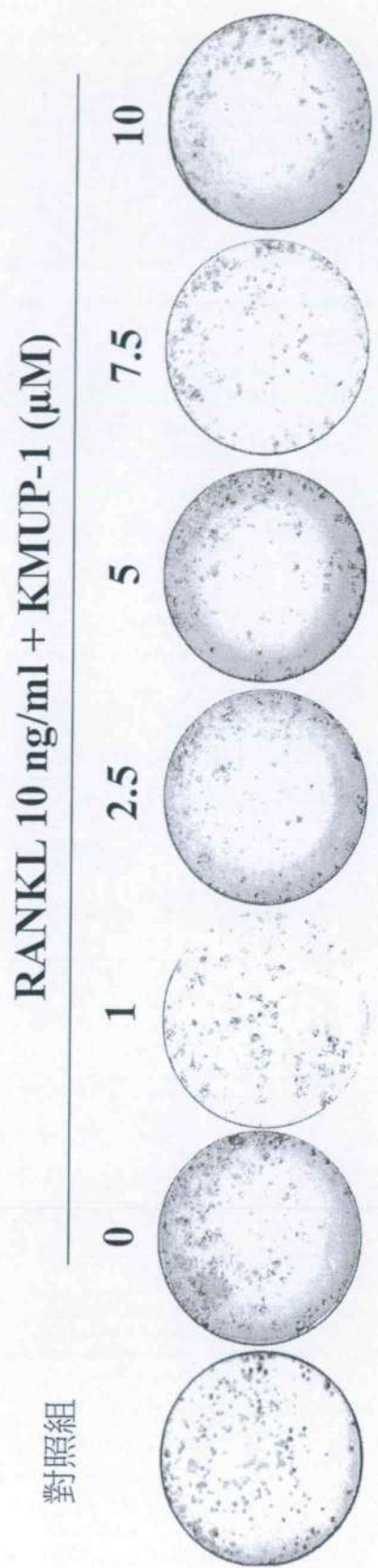
公告本



第一圖

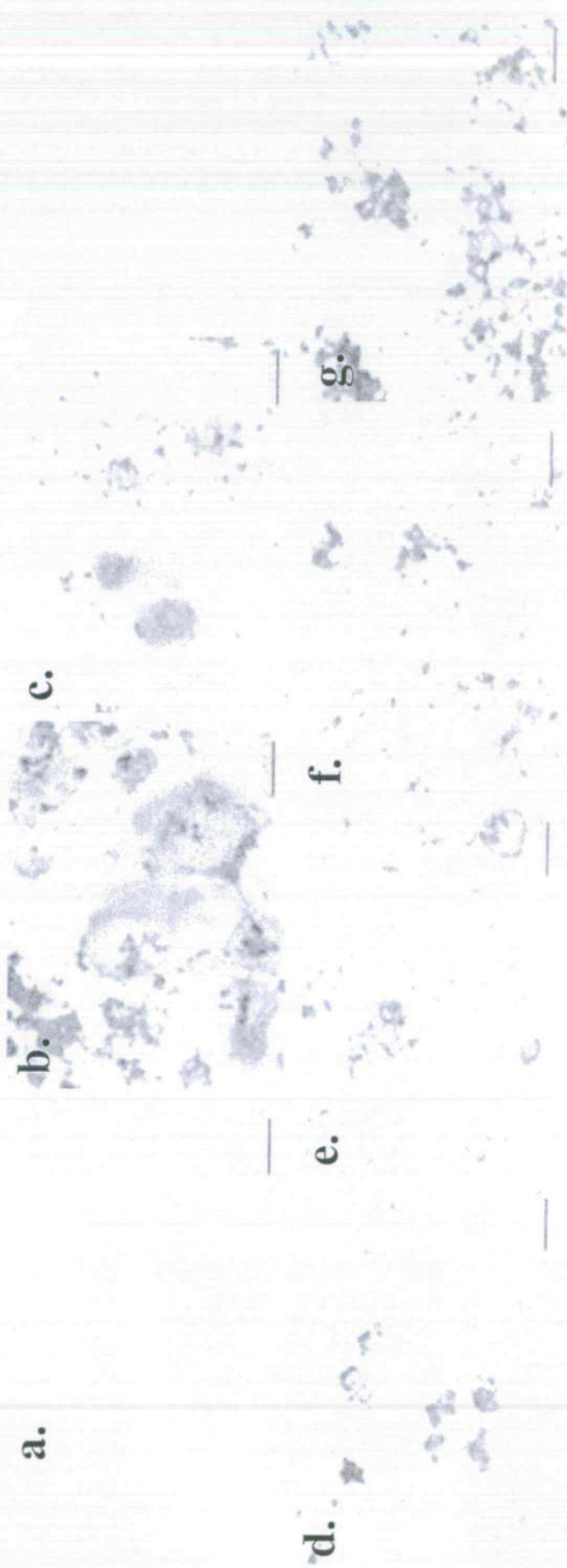


第二圖

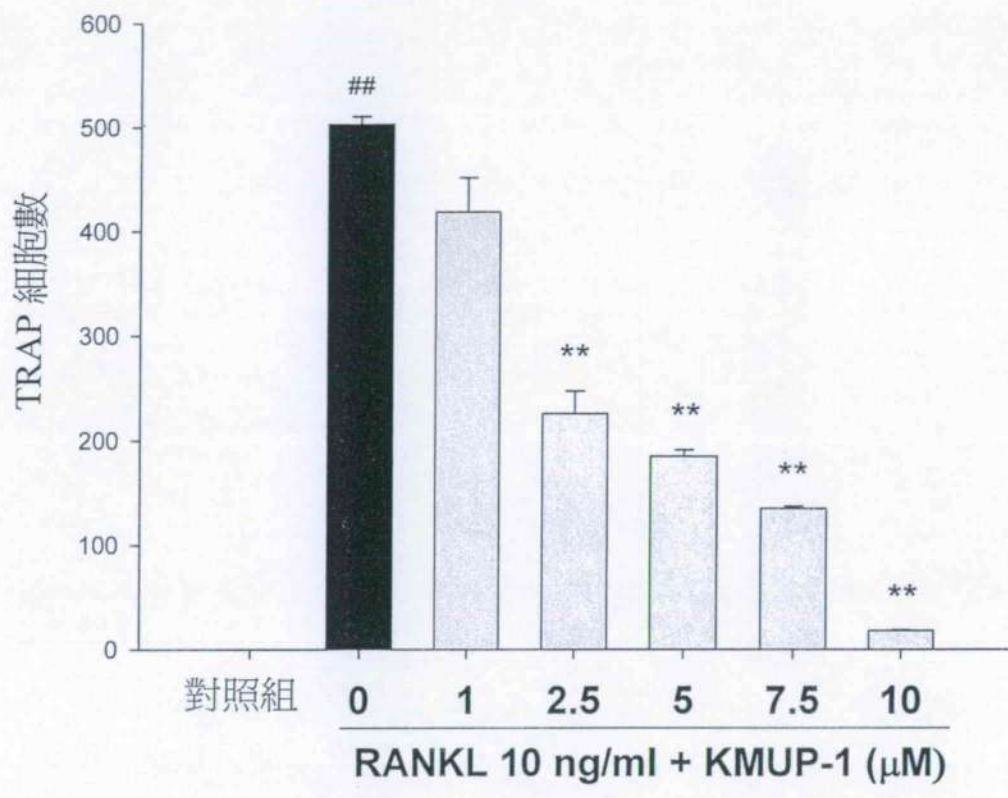


第三圖

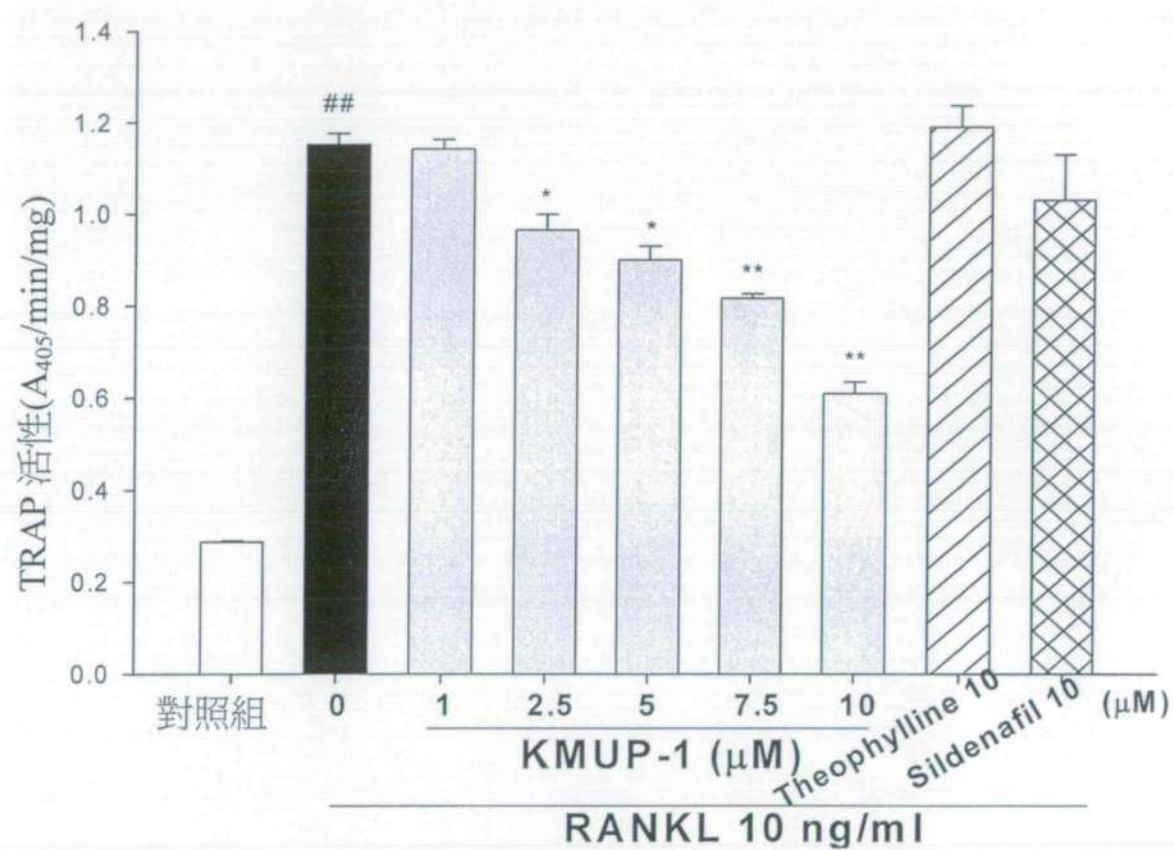




第四圖

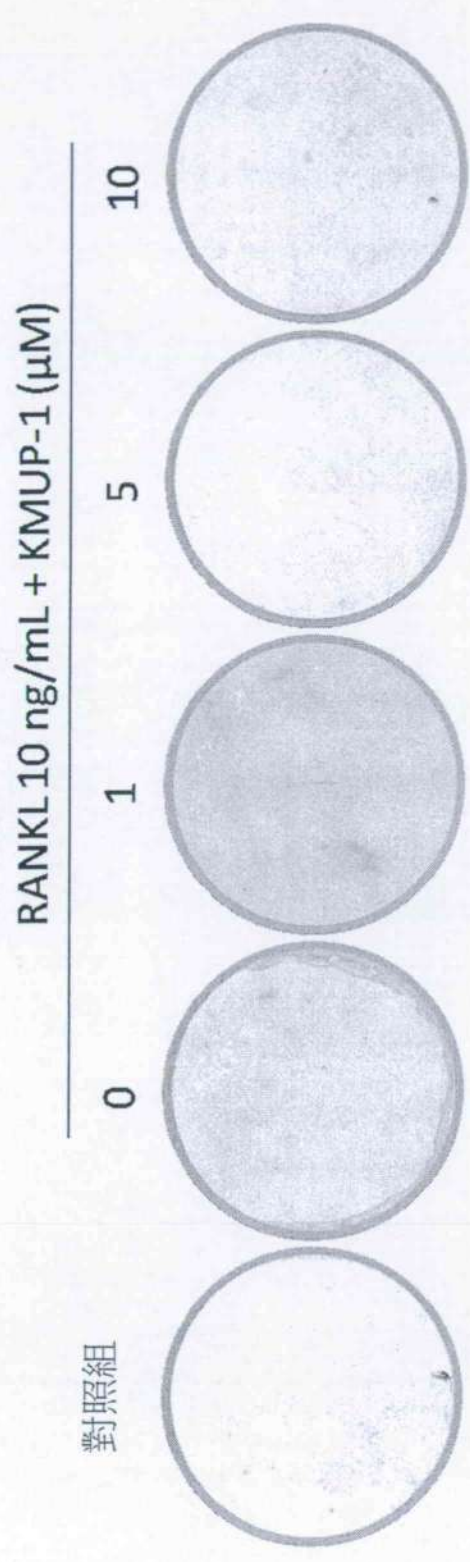


第五圖



第六圖

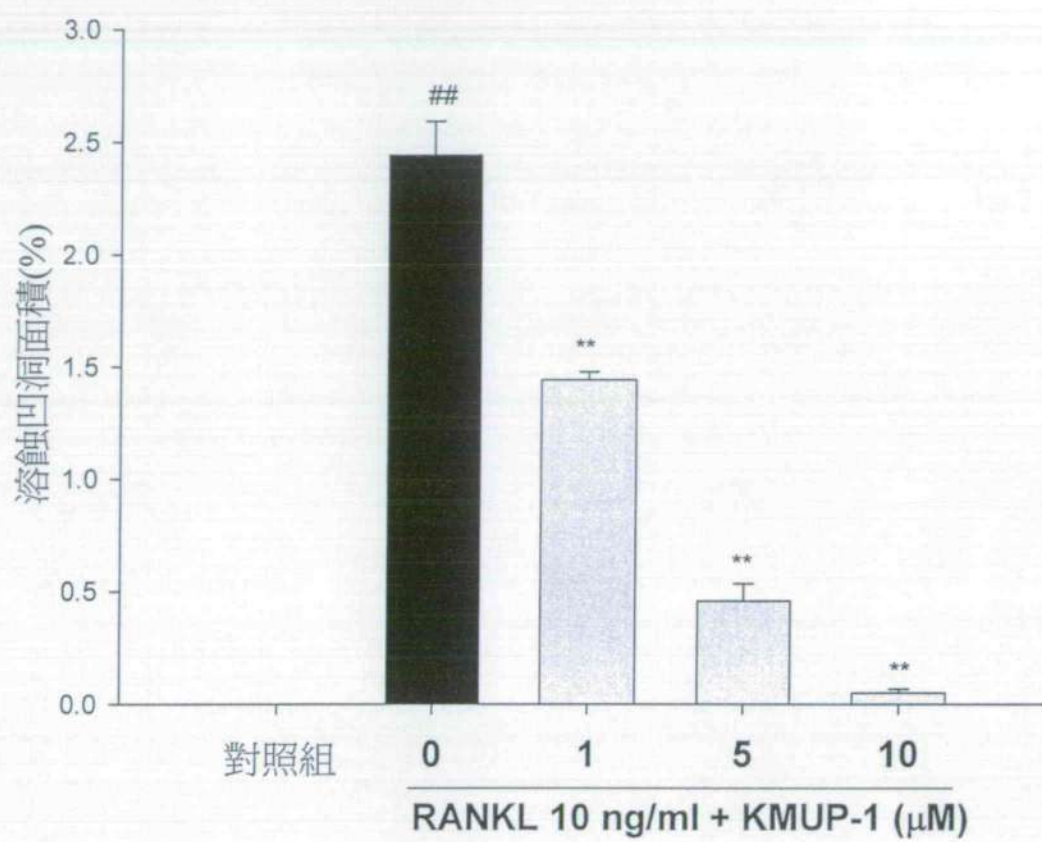




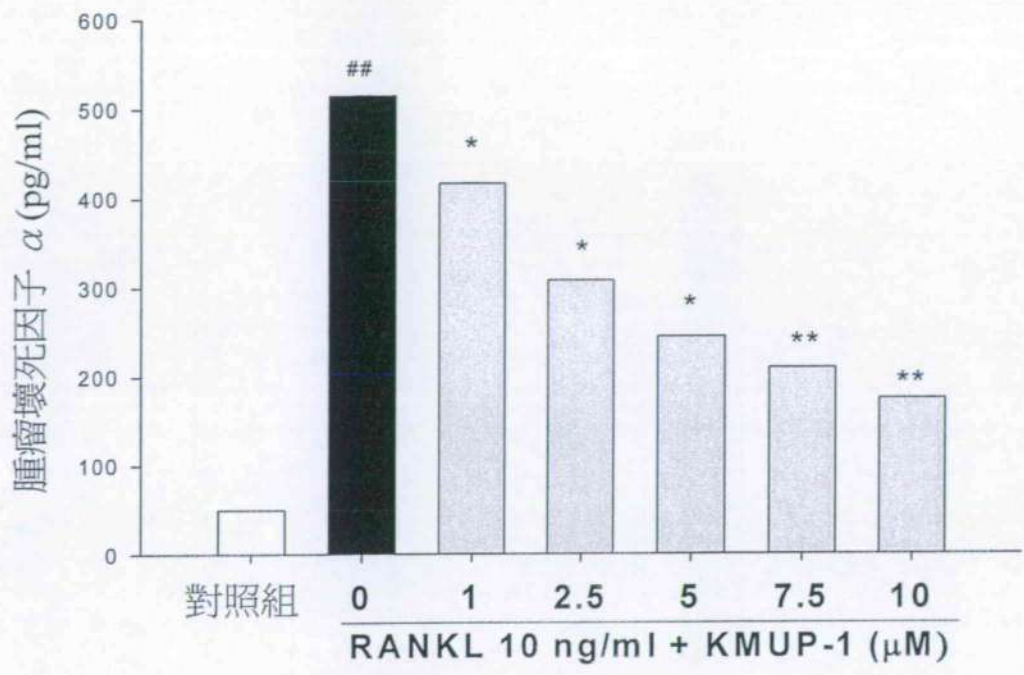
第七圖(A)



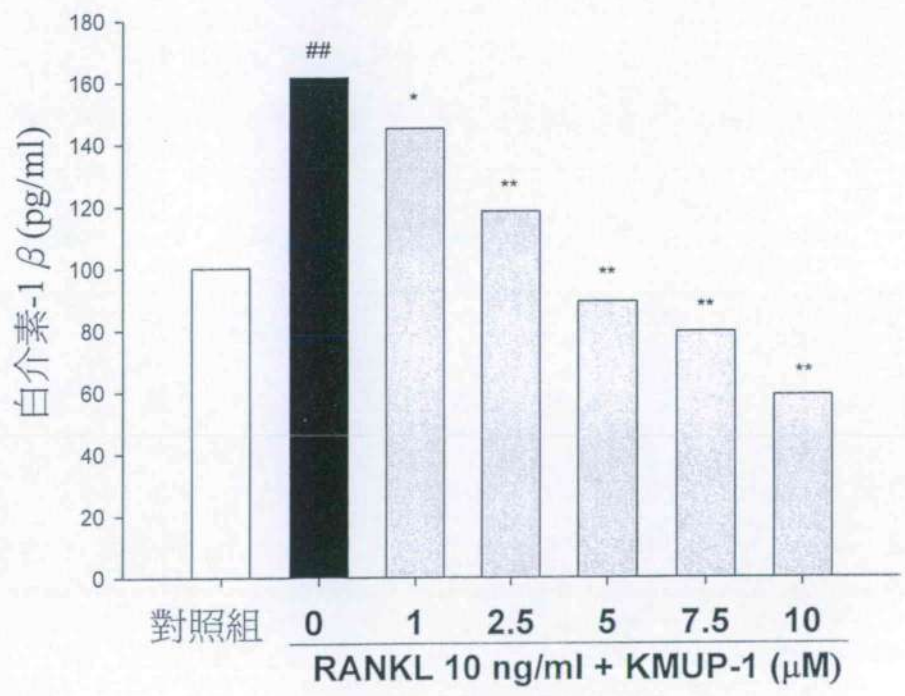
第七圖(B)



第八圖

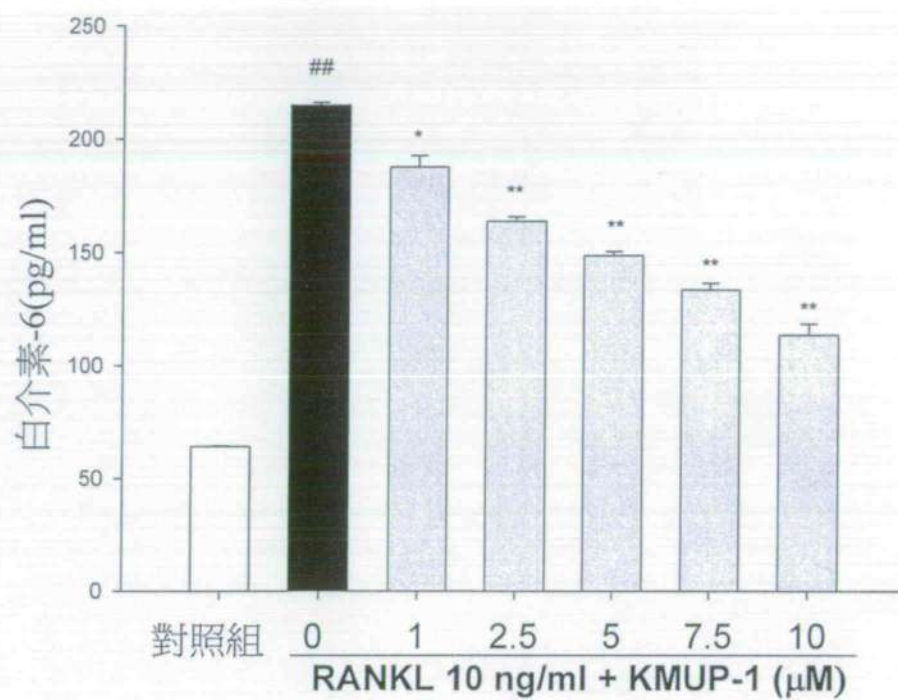


第九圖(A)

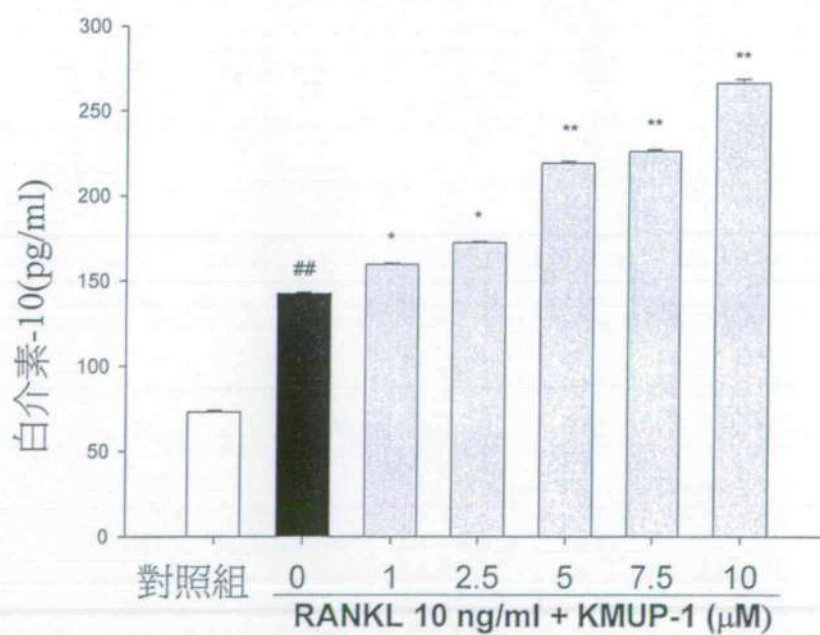


第九圖(B)

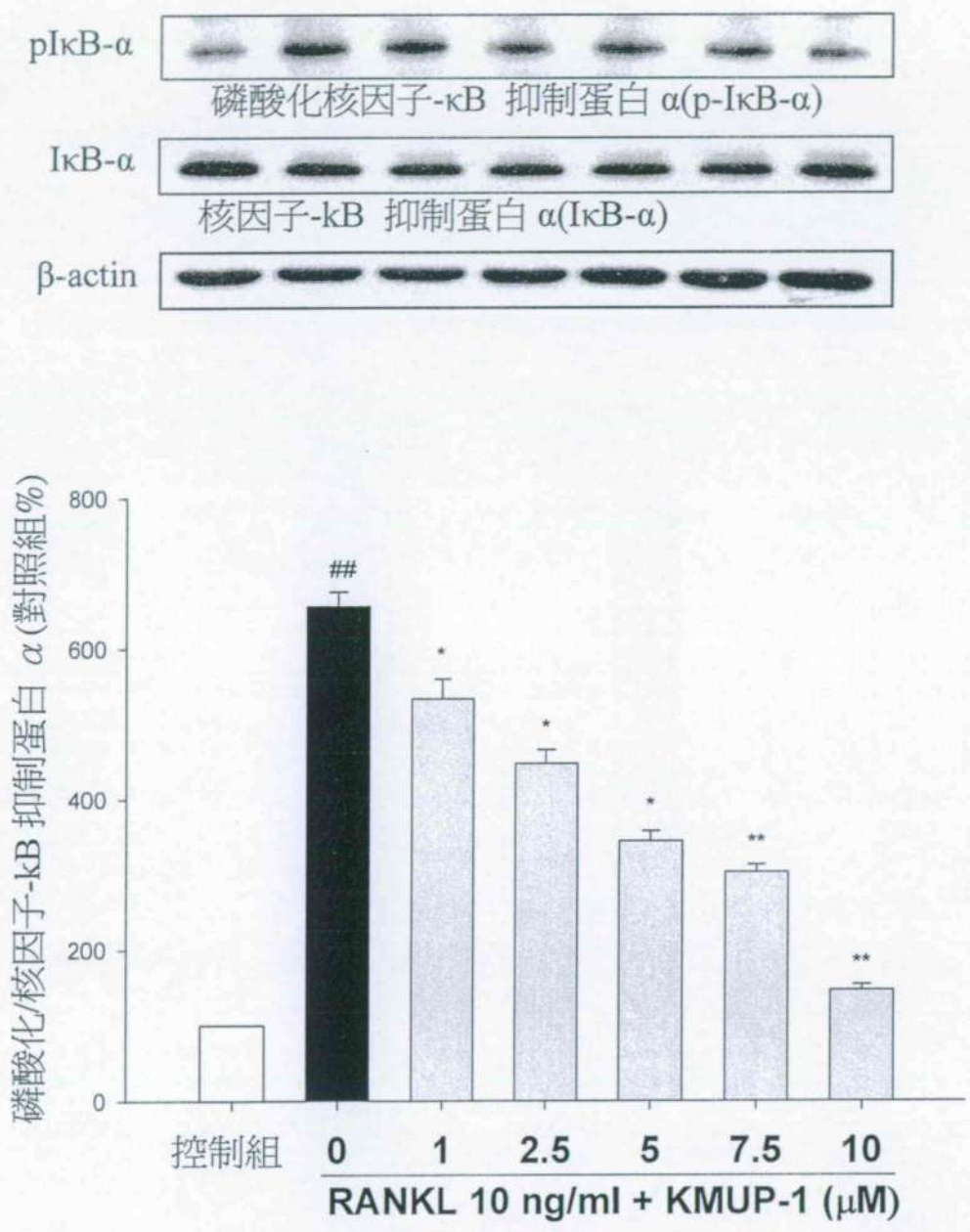




第十圖(A)

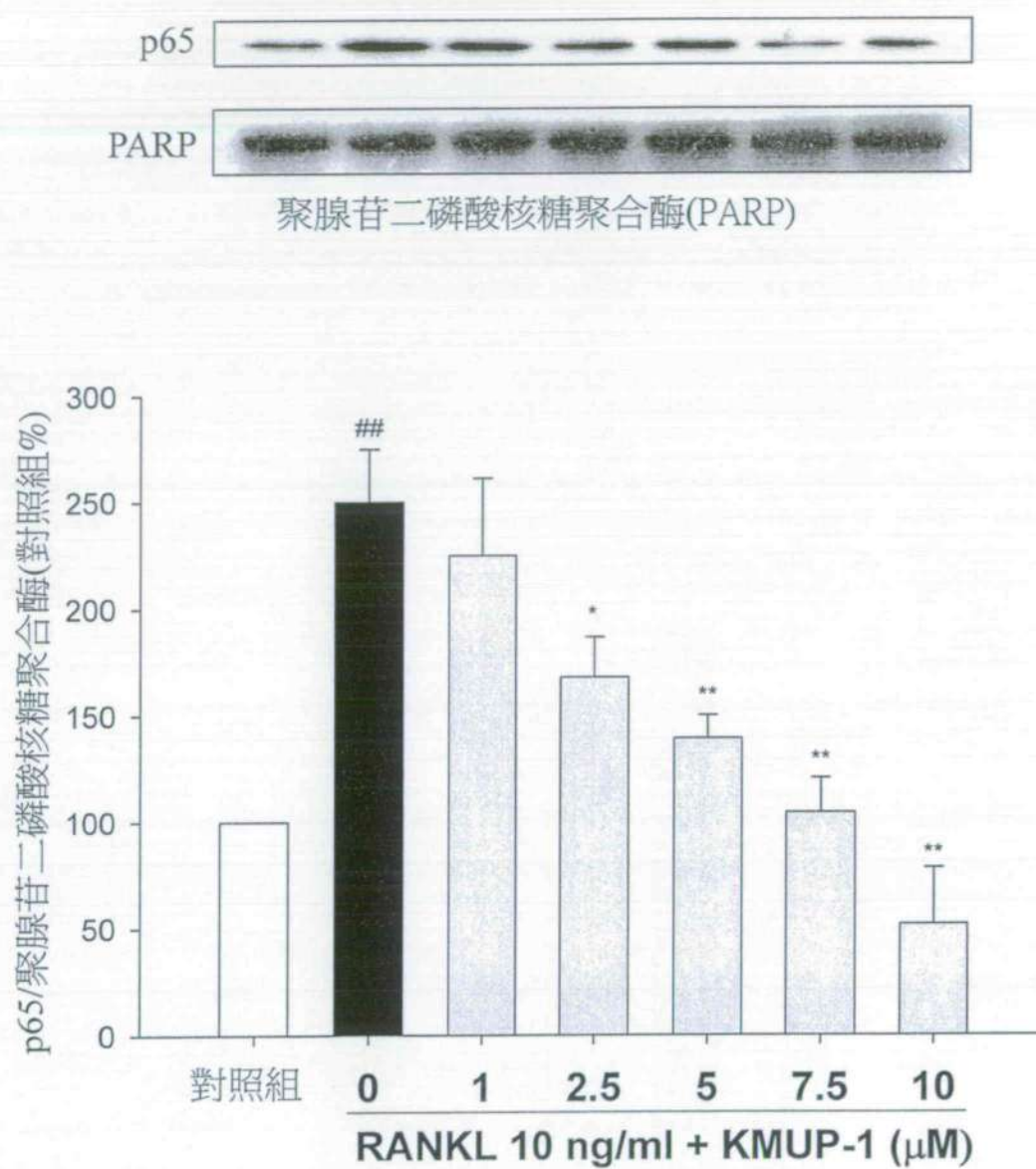


第十圖(B)

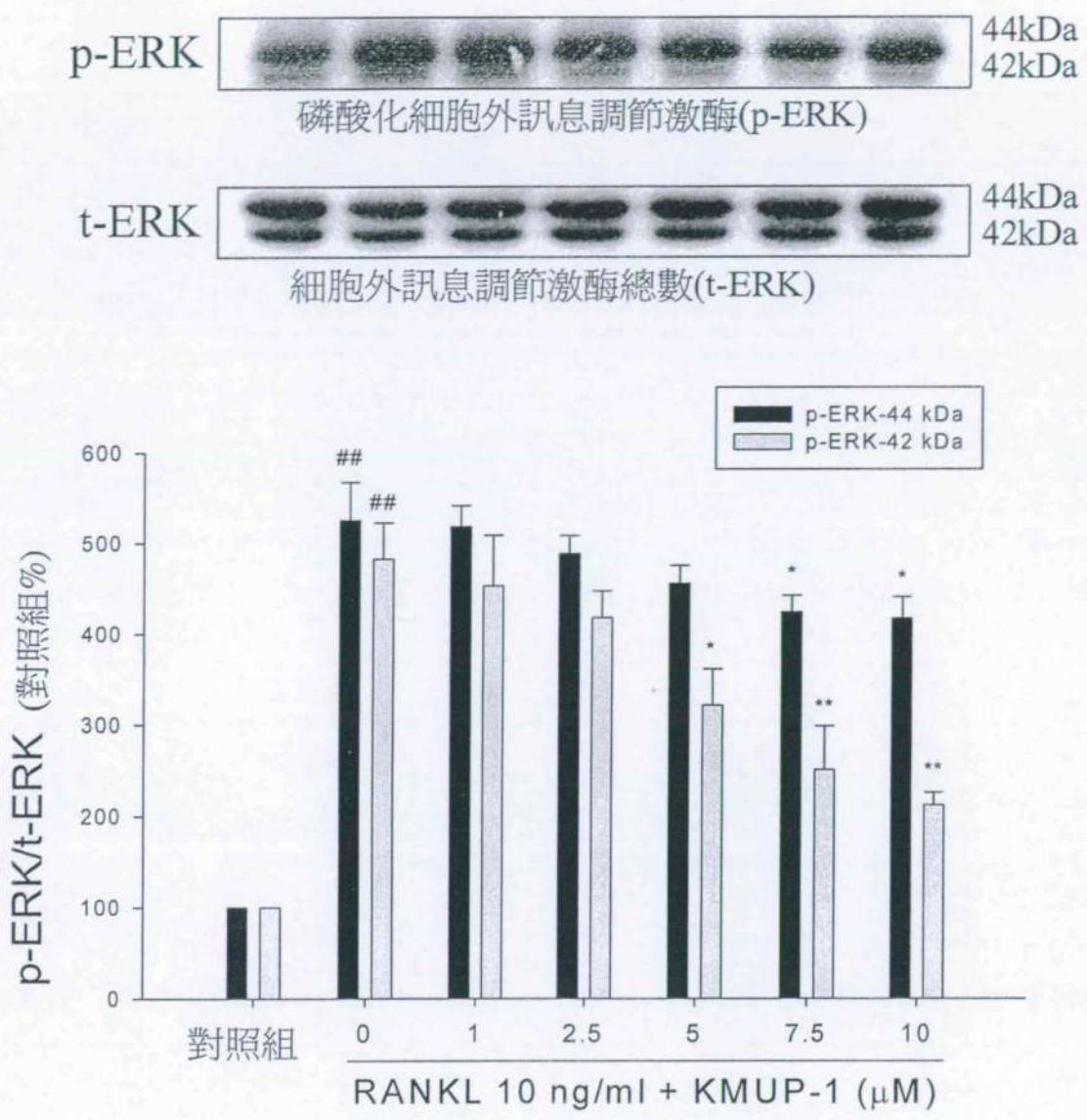


第十一圖(A)

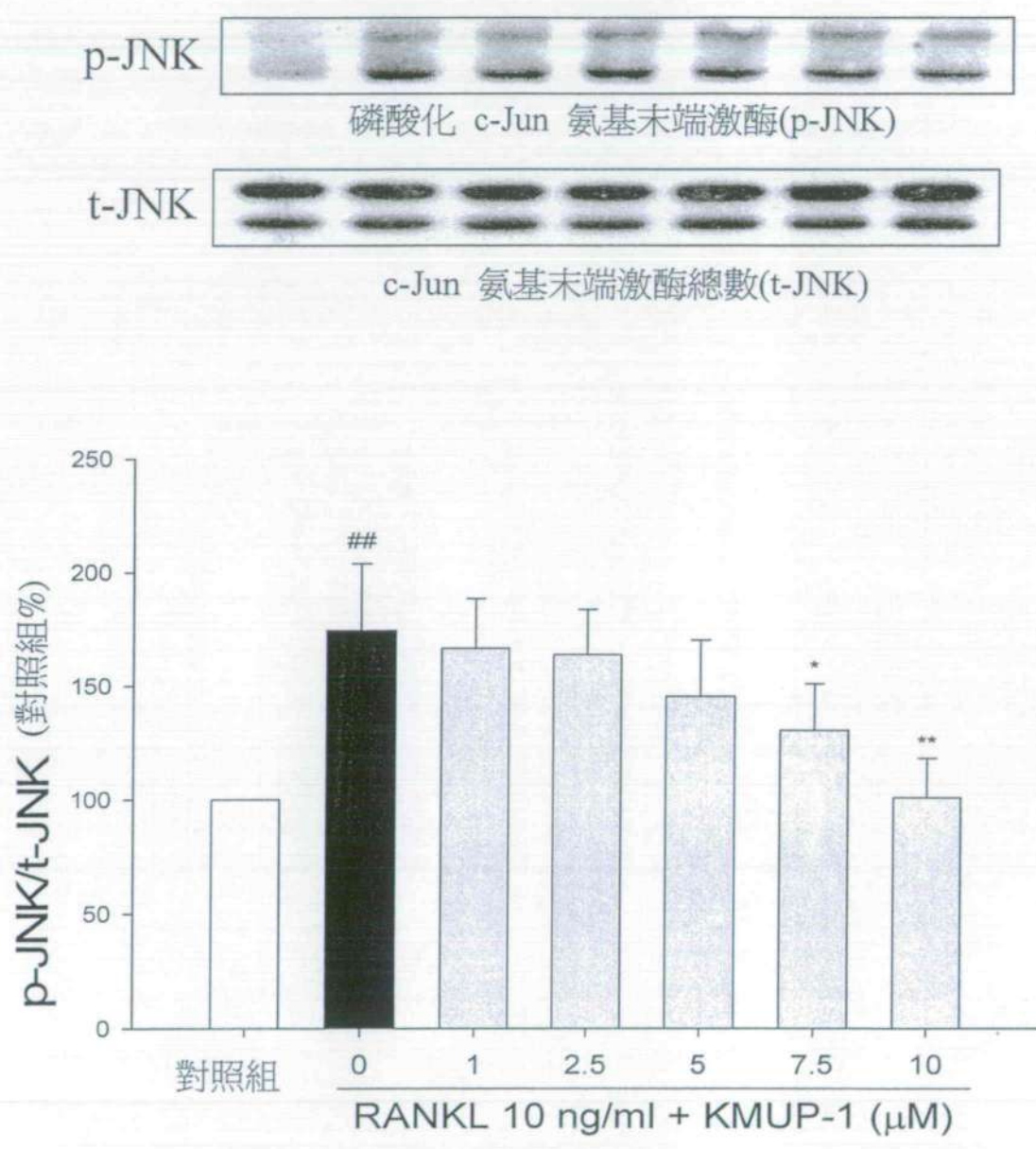




第十一圖(B)

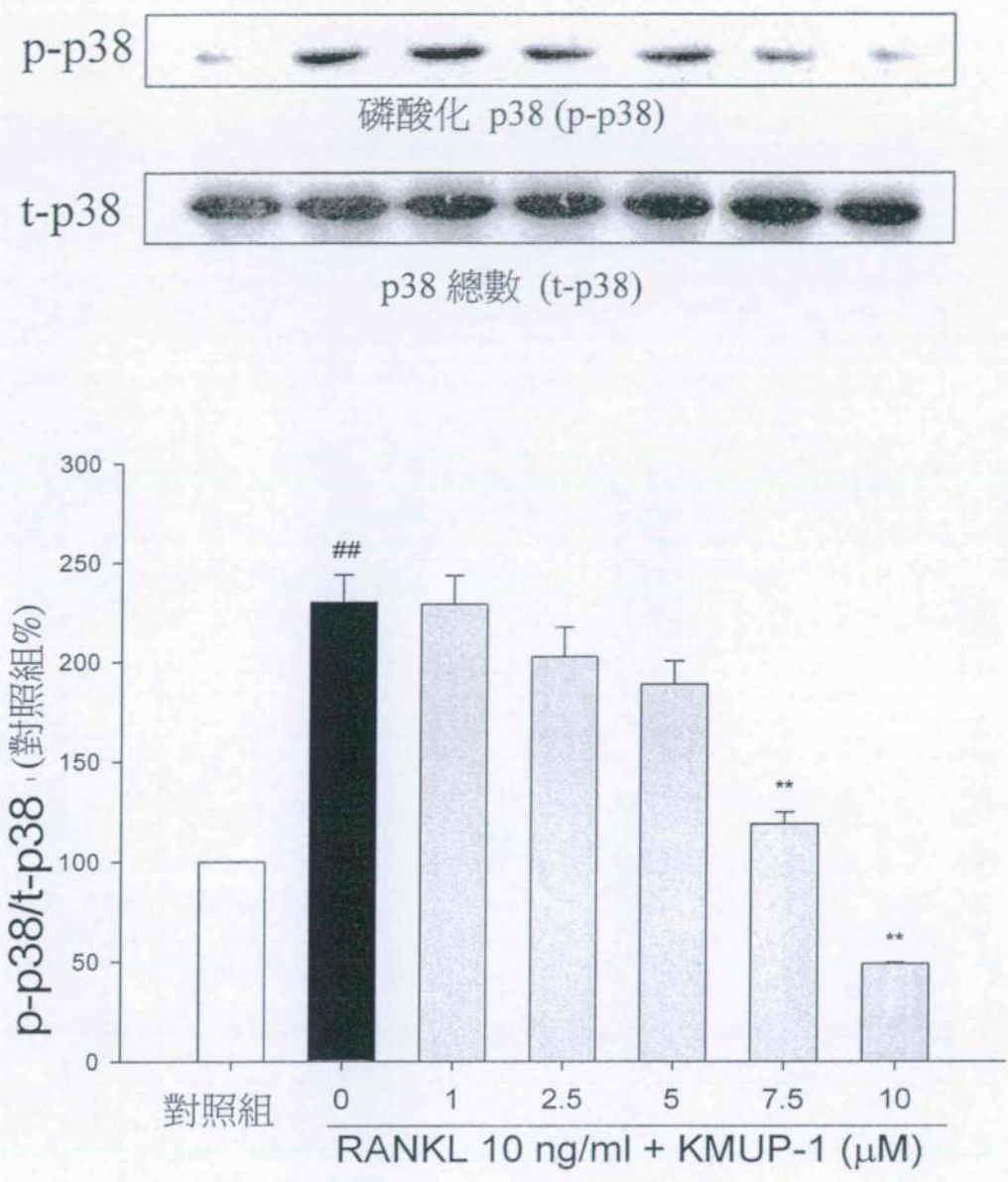


第十二圖

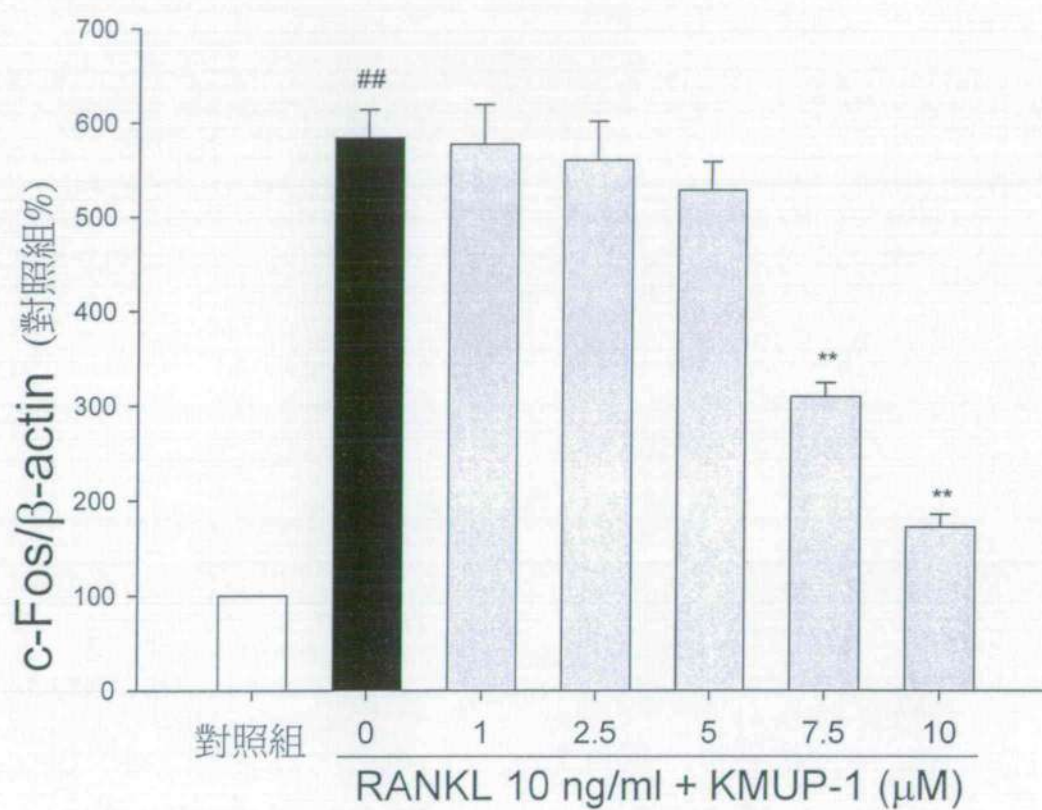
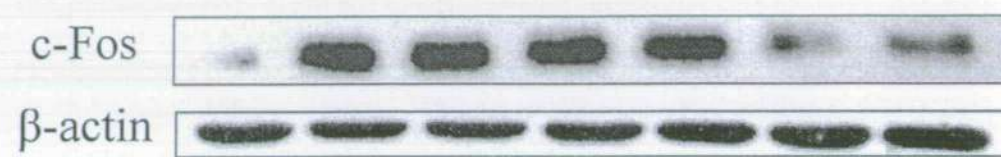


第十三圖

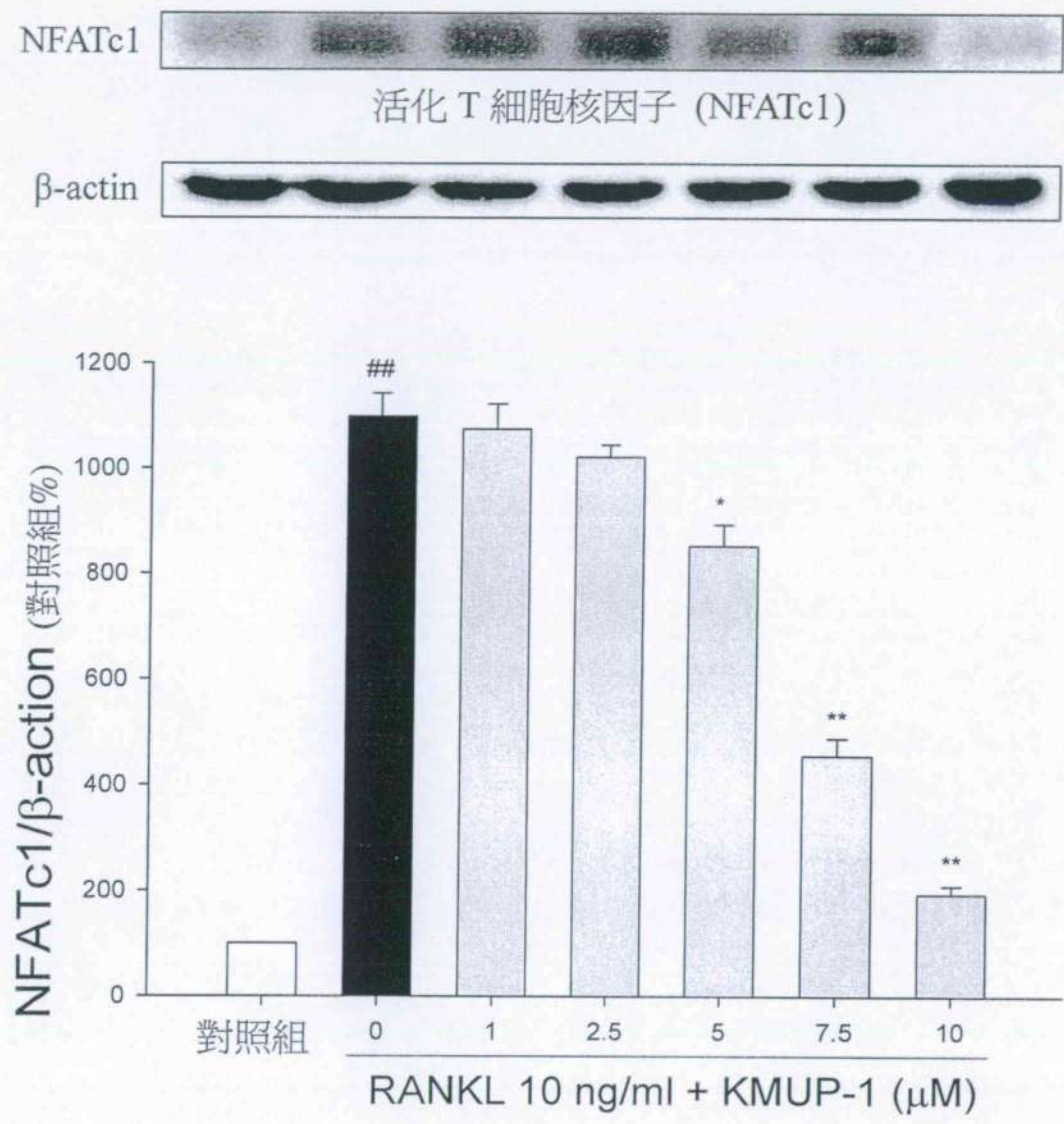




第十四圖

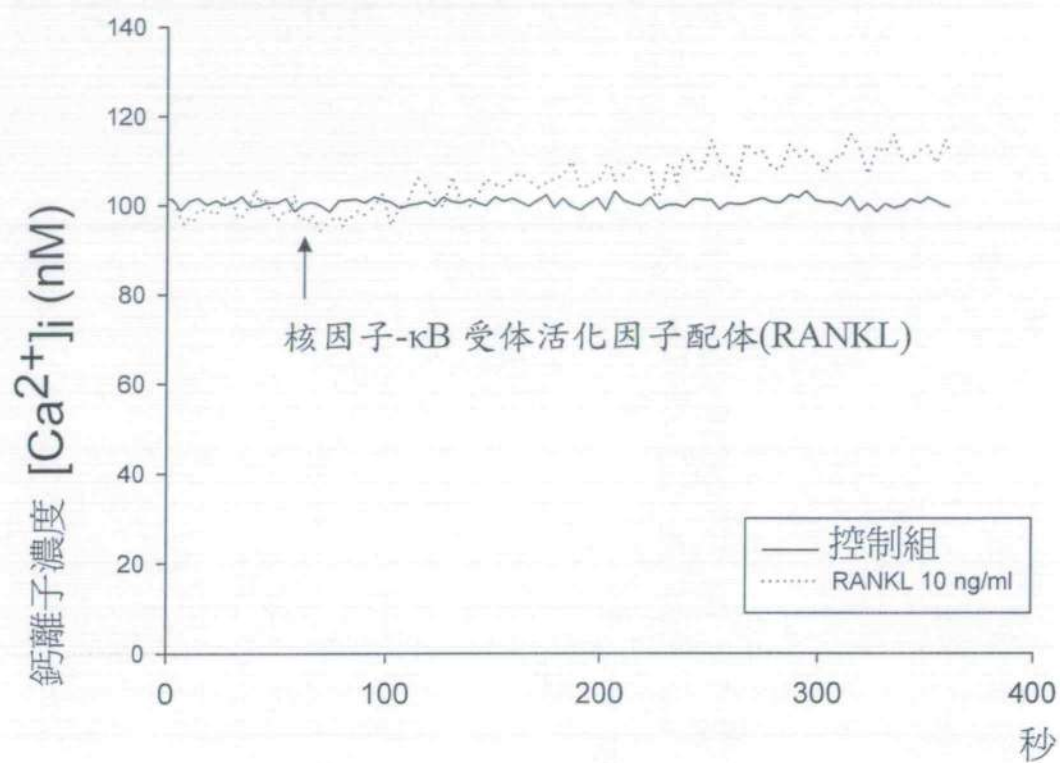


第十五圖



第十六圖



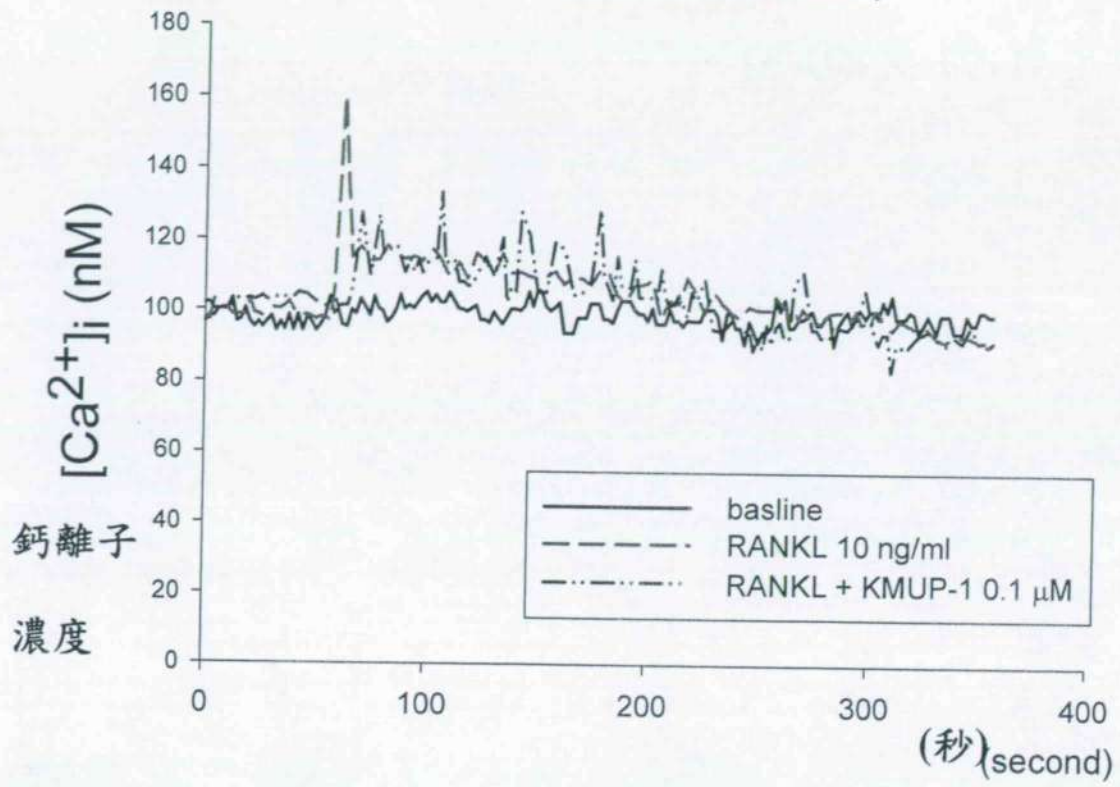


第十七圖(A)

10年4月23日修正替換頁

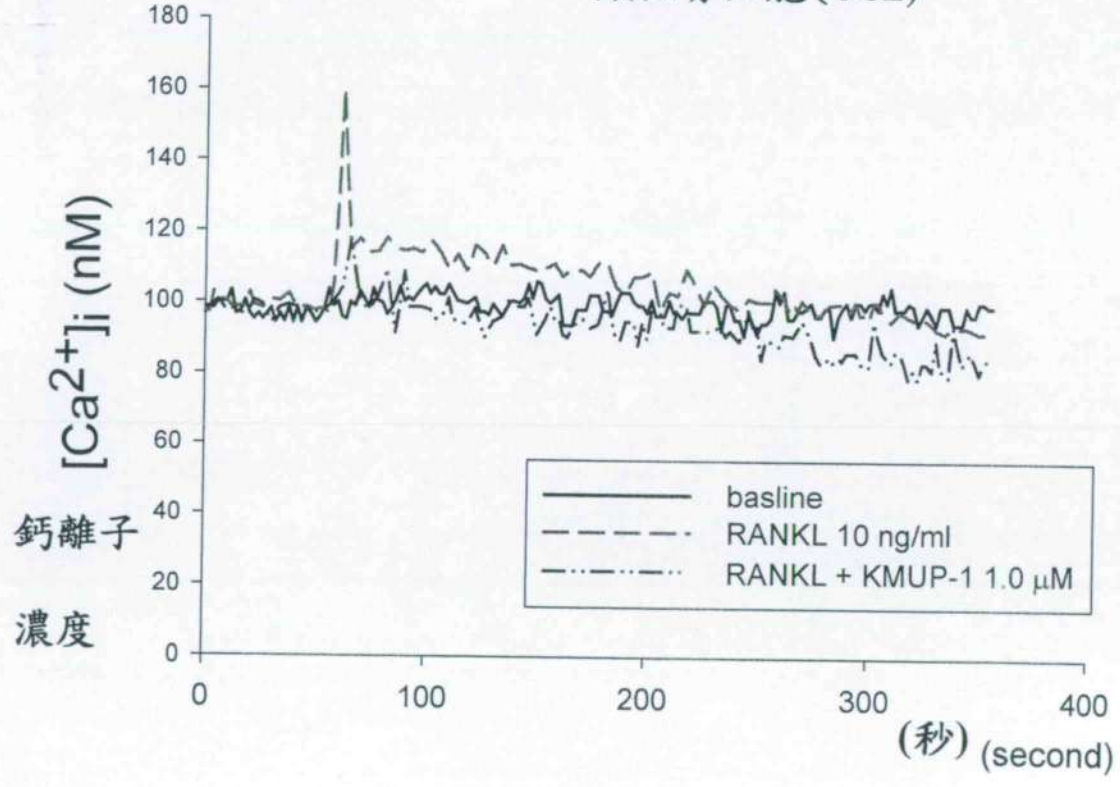
第十七圖 (B-1)

類蝕骨細胞(OCL)



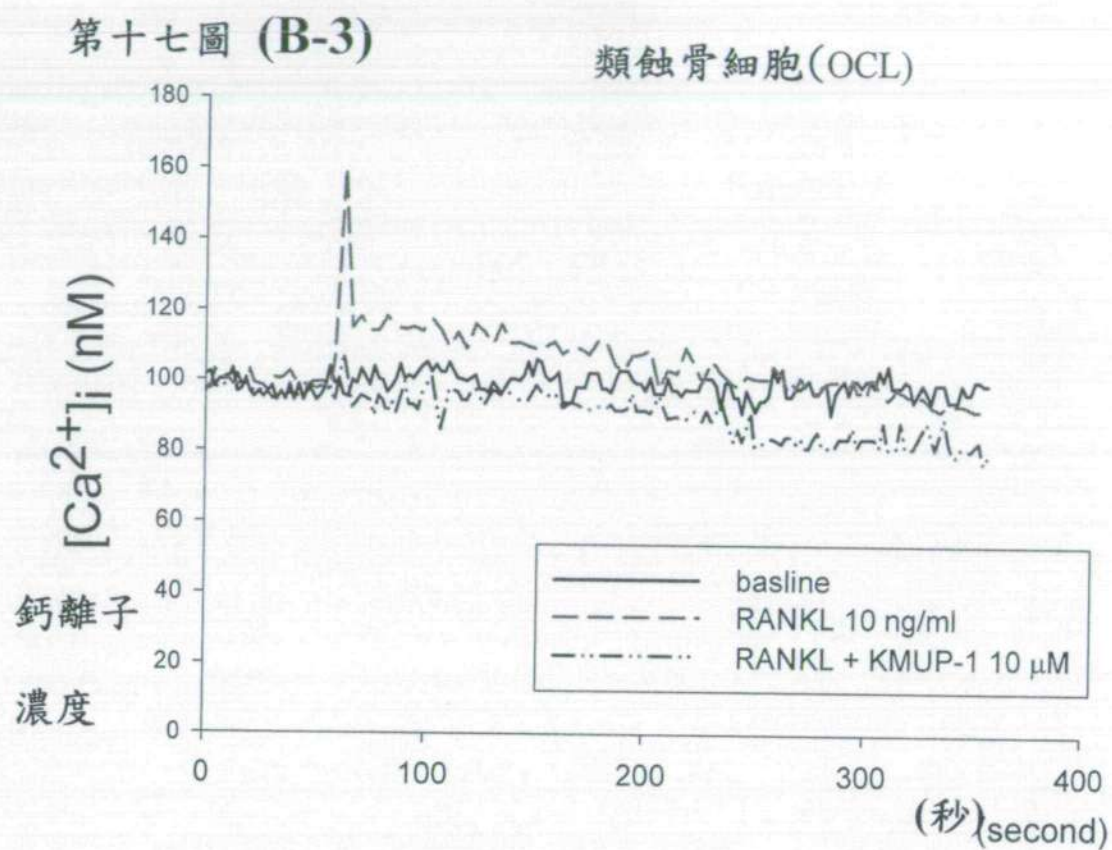
第十七圖 (B-2)

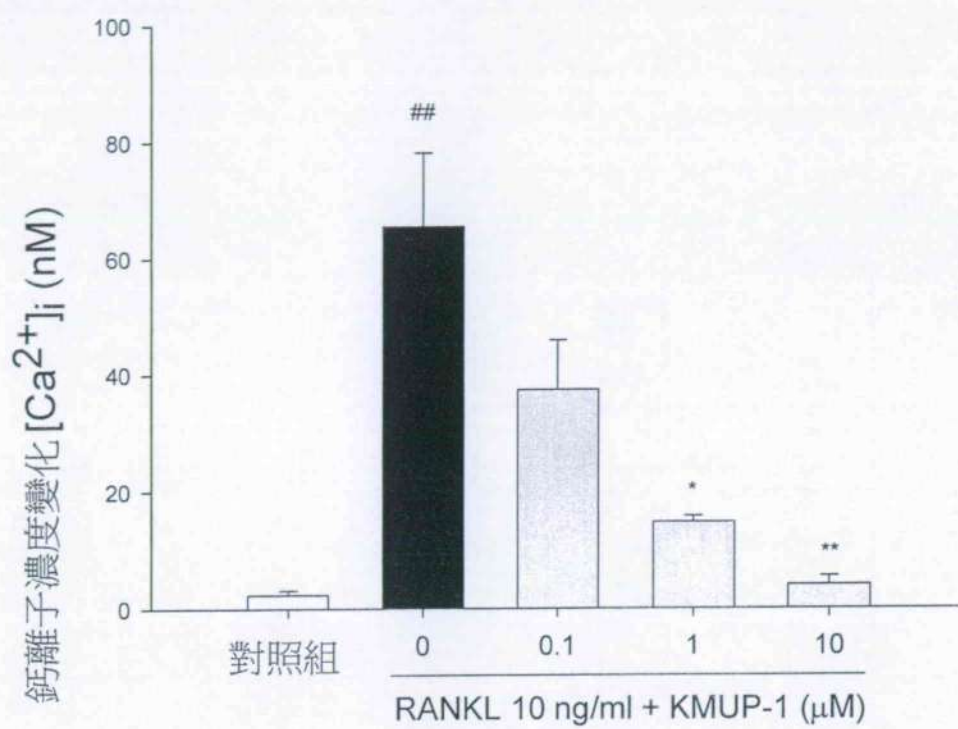
類蝕骨細胞(OCL)



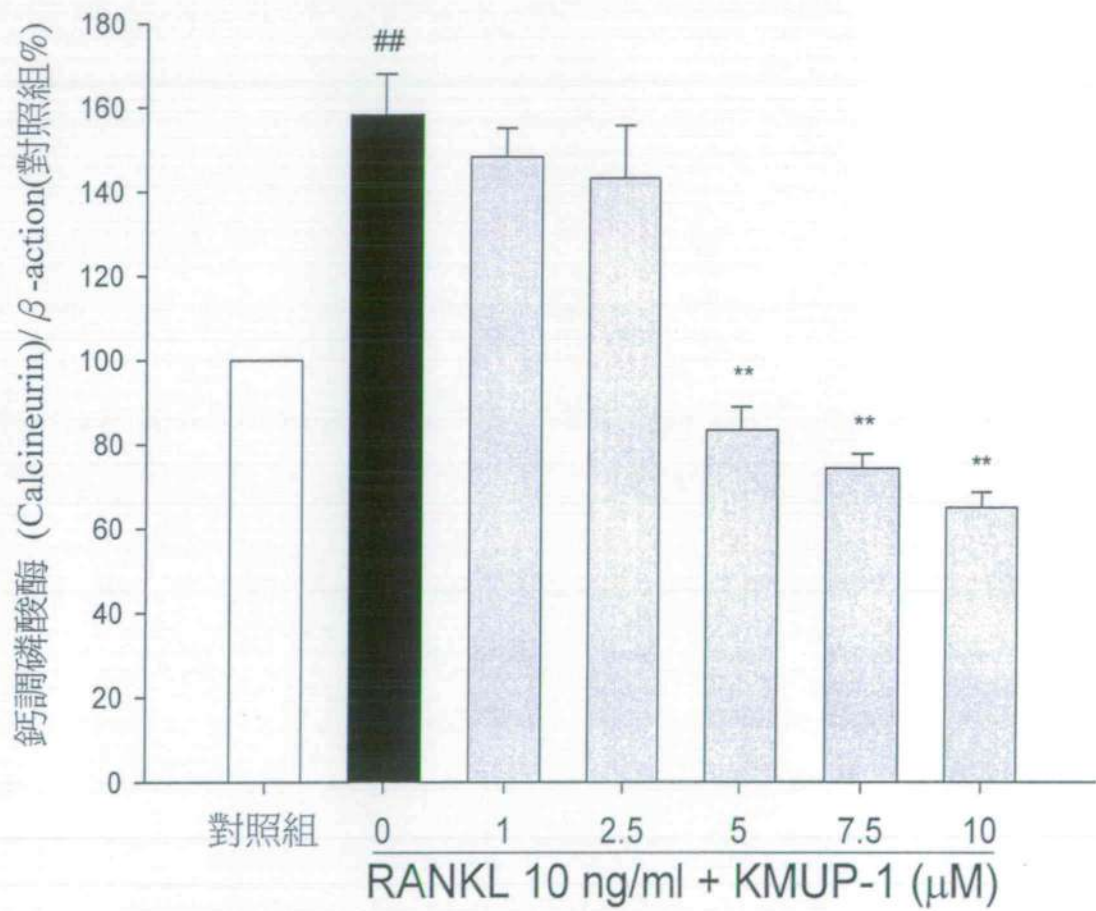


102年4月23日修正替換頁



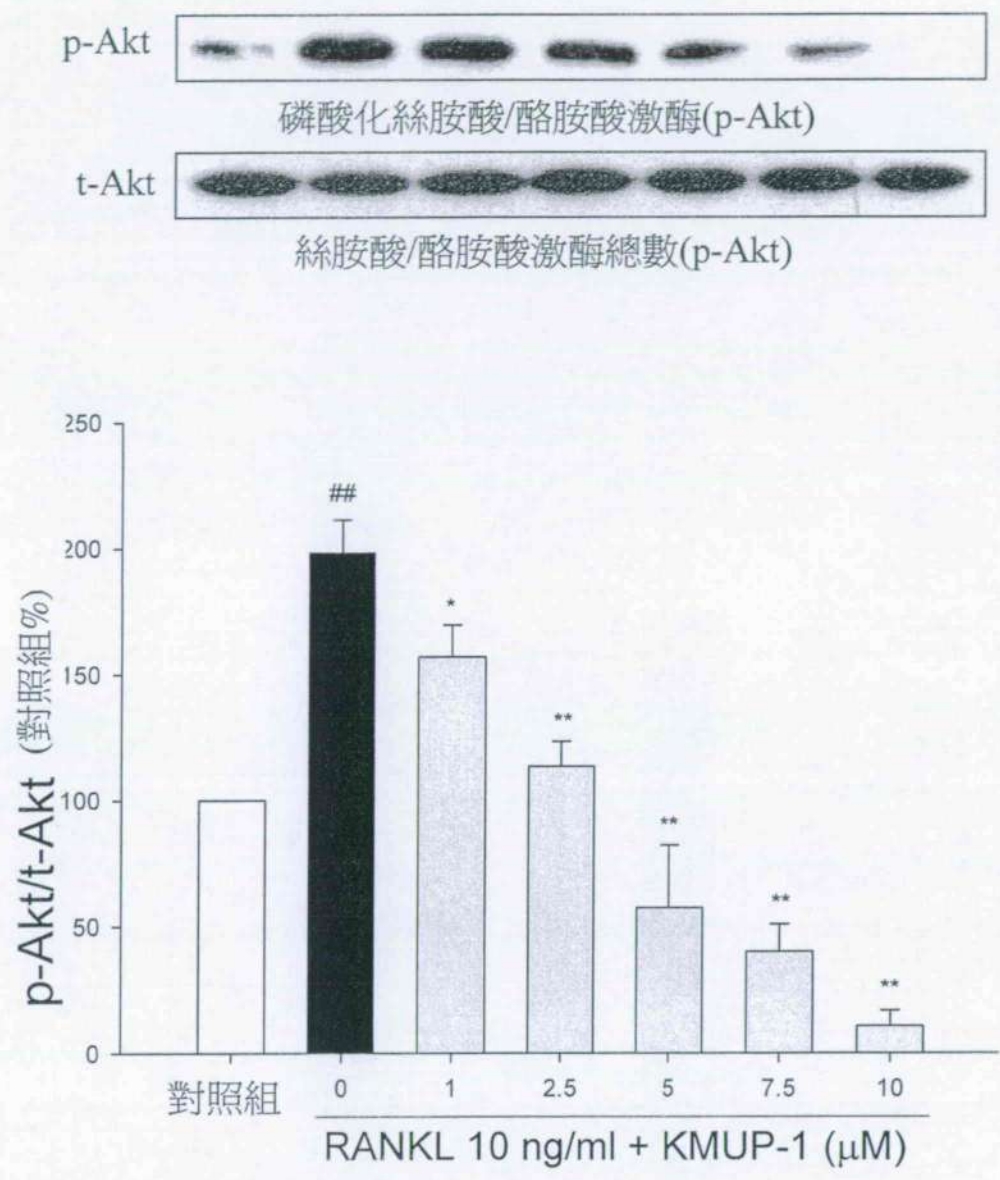


第十八圖

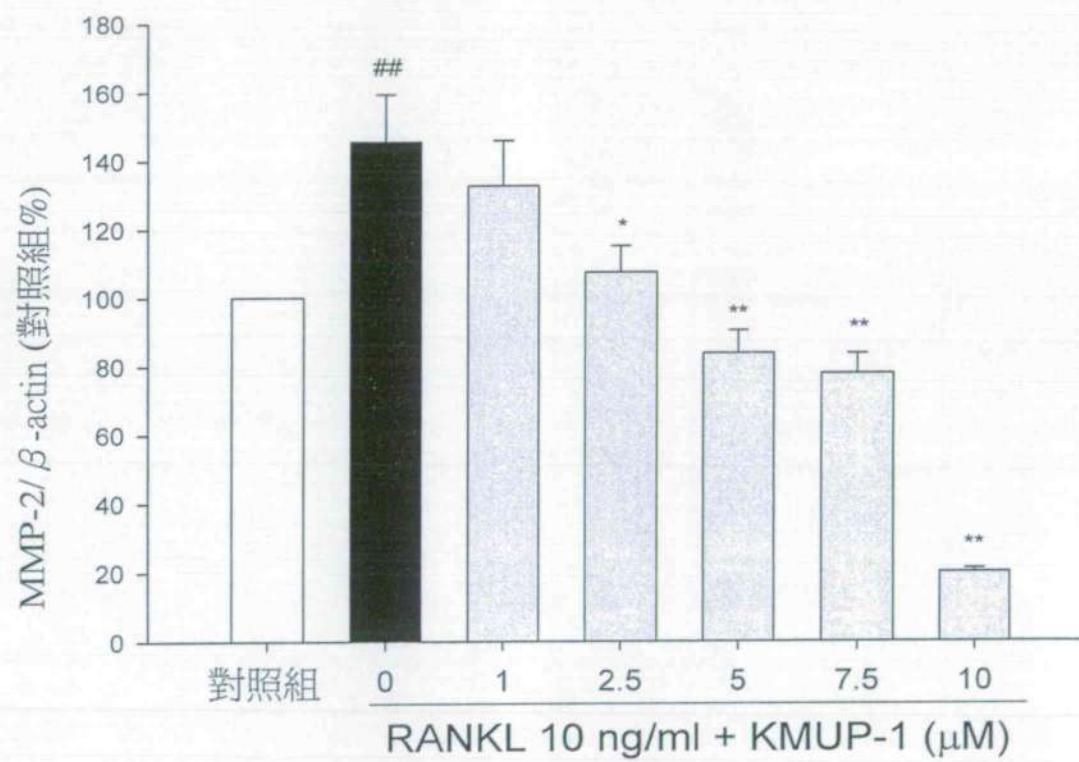
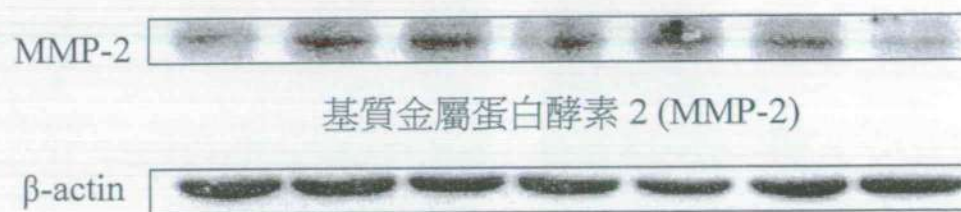


第十九圖

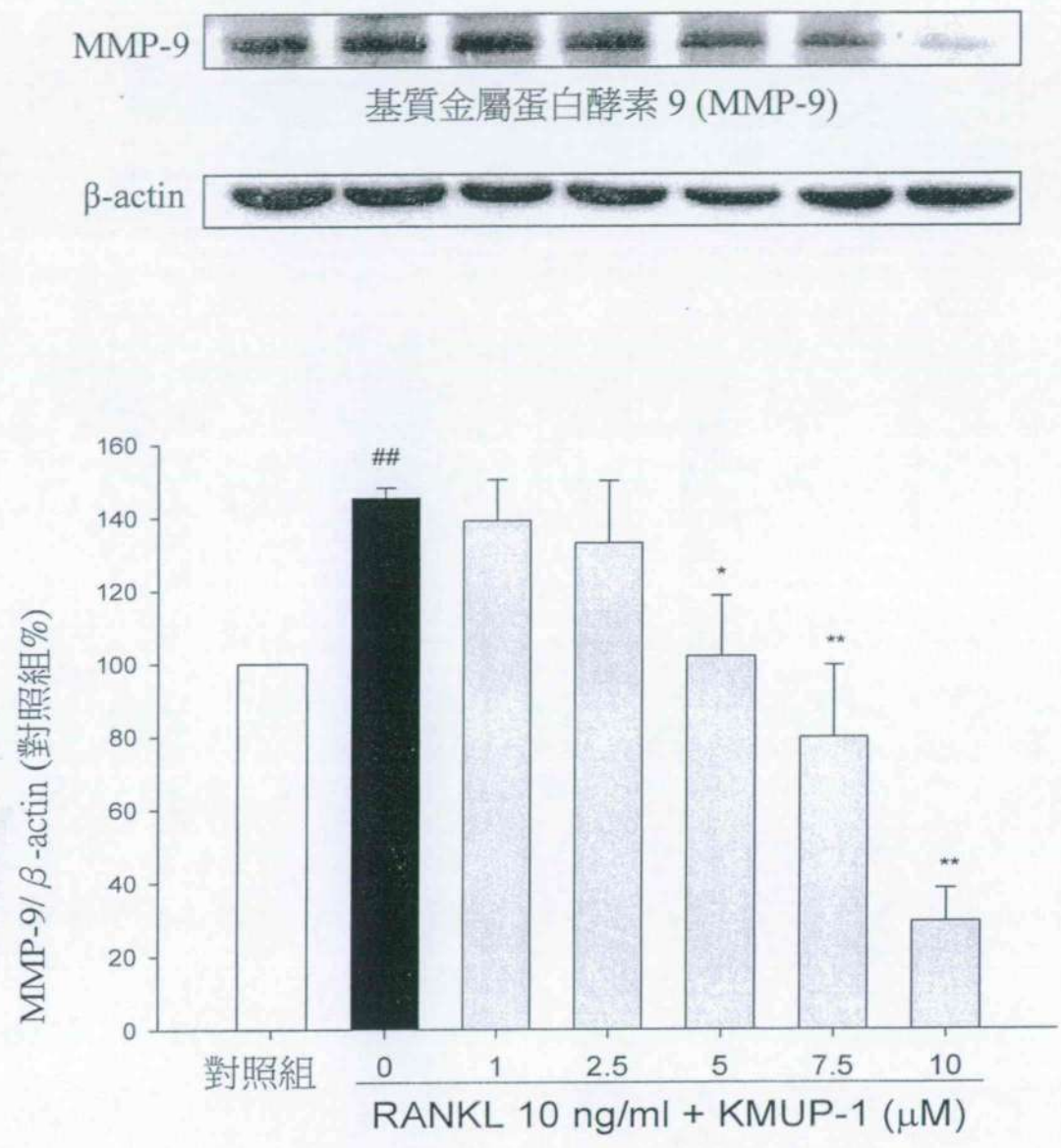




第二十圖

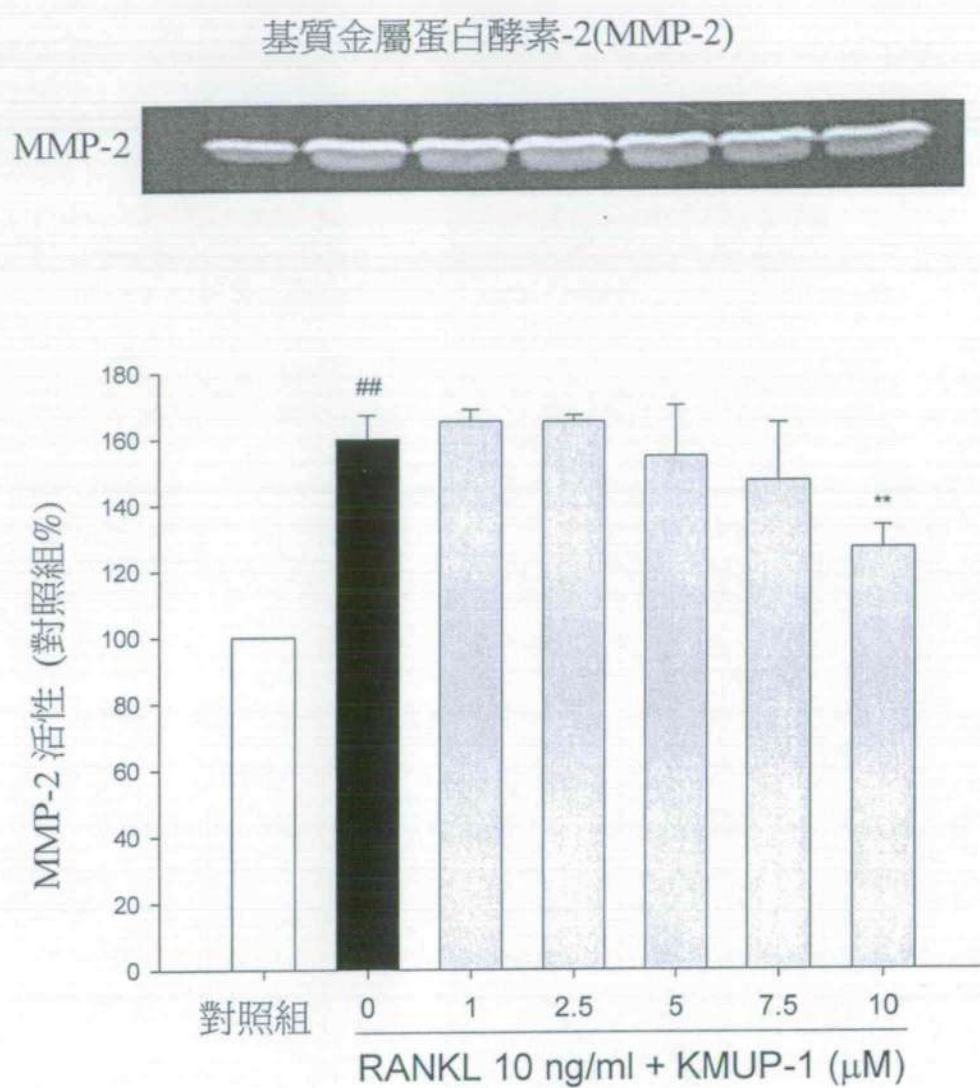


第二十一圖

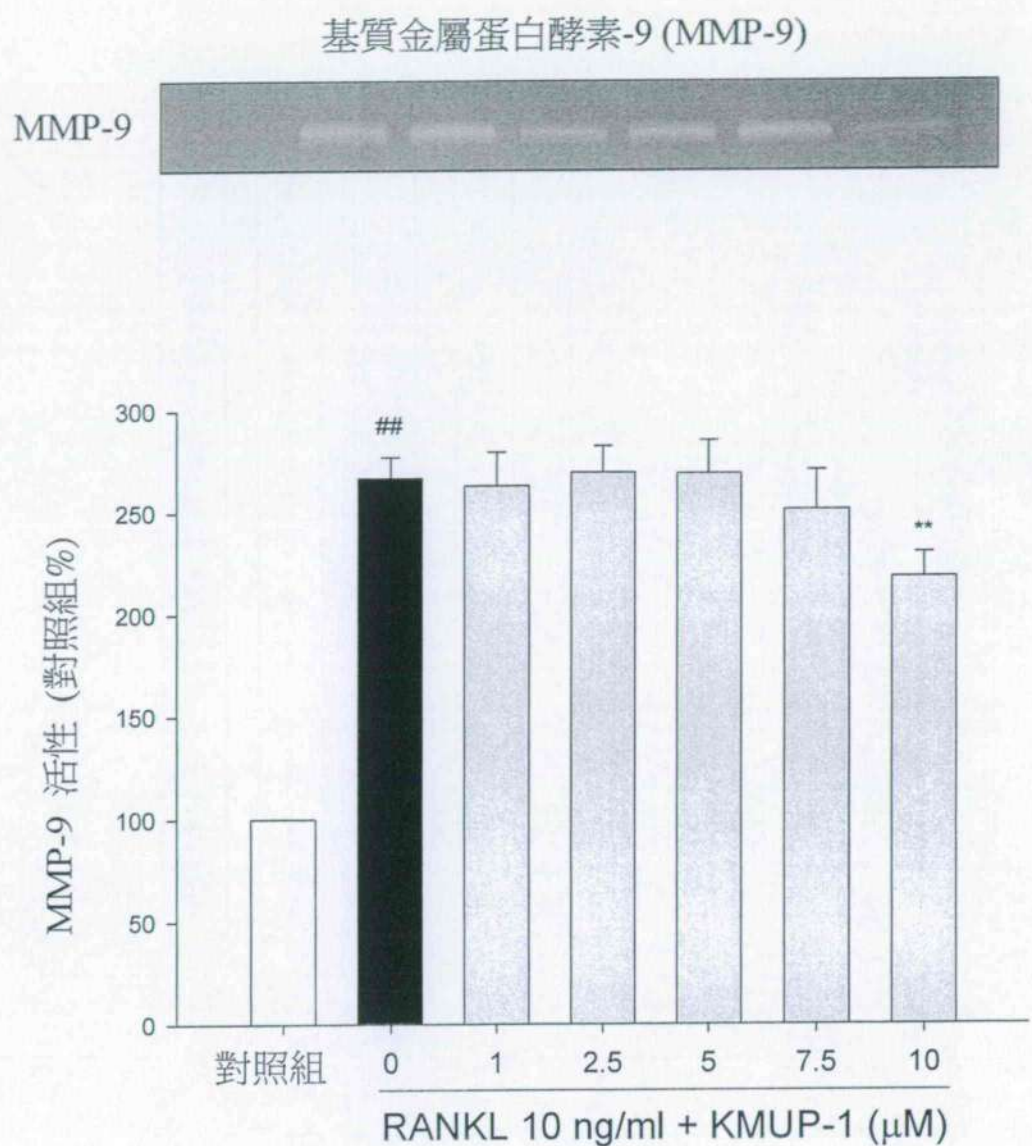


第二十二圖



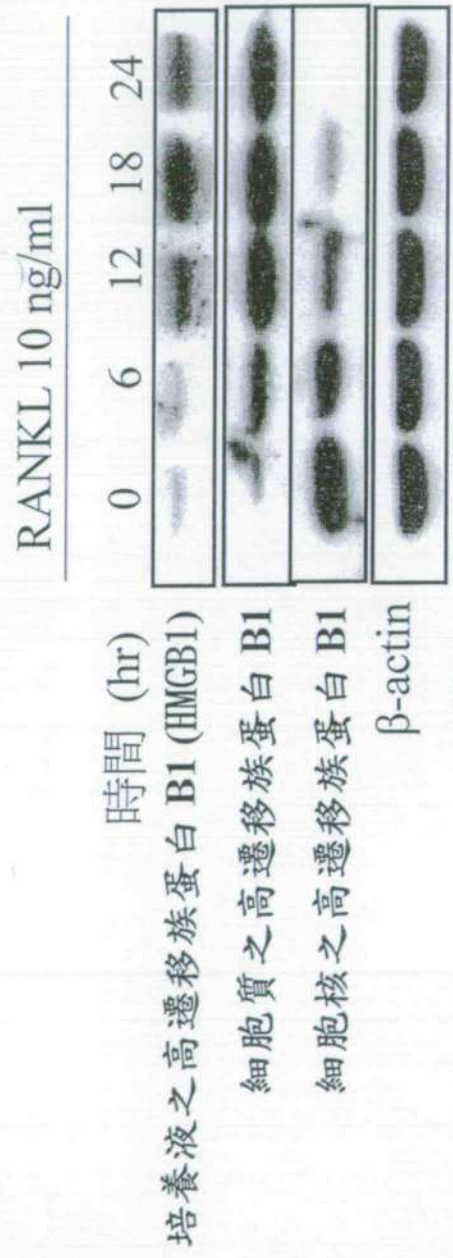


第二十三圖

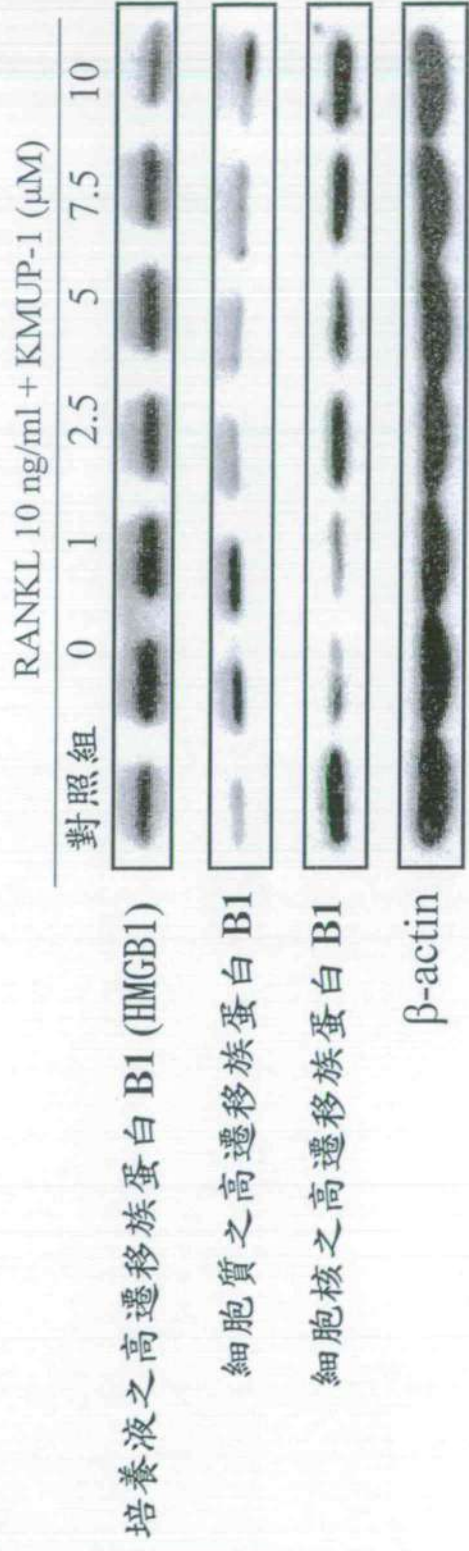


第二十四圖

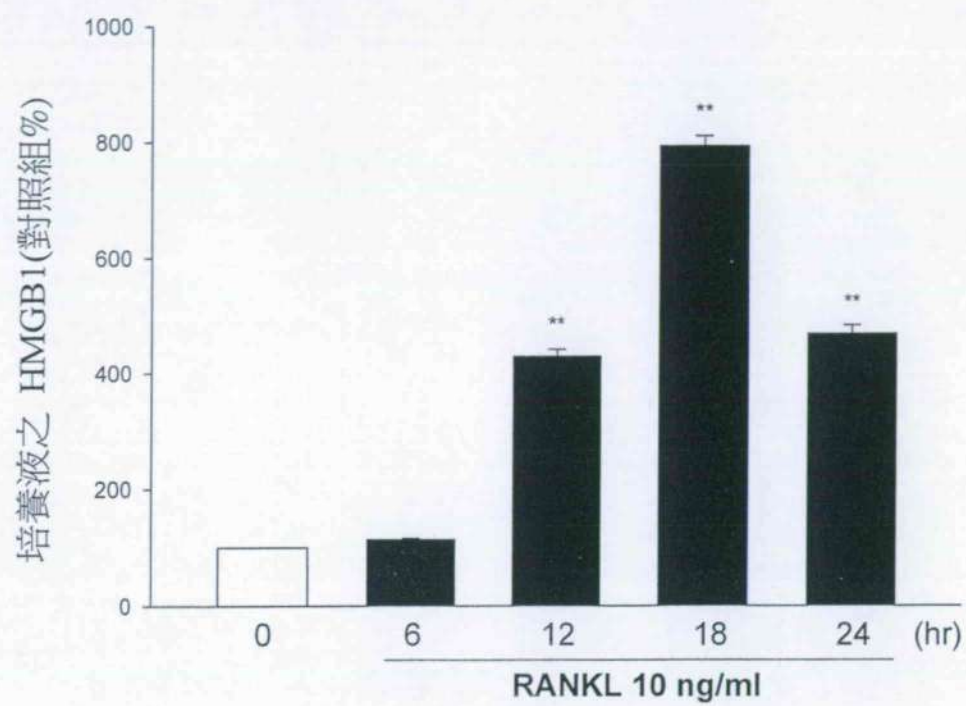




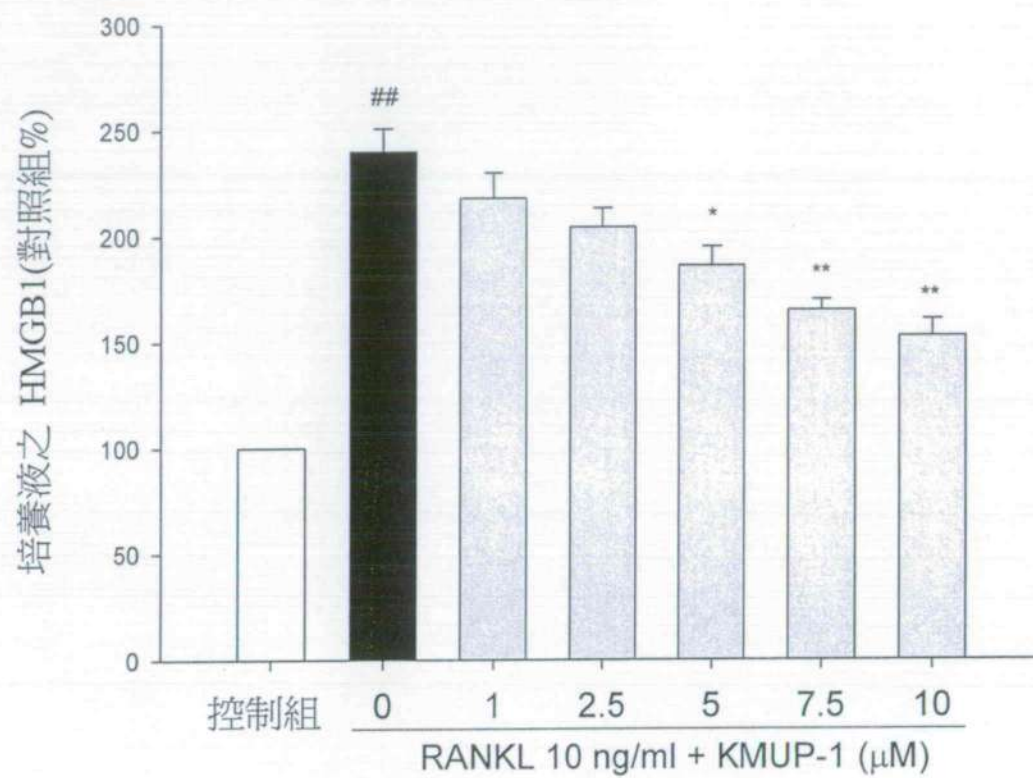
第二十五圖(A)



第二十五圖(B)

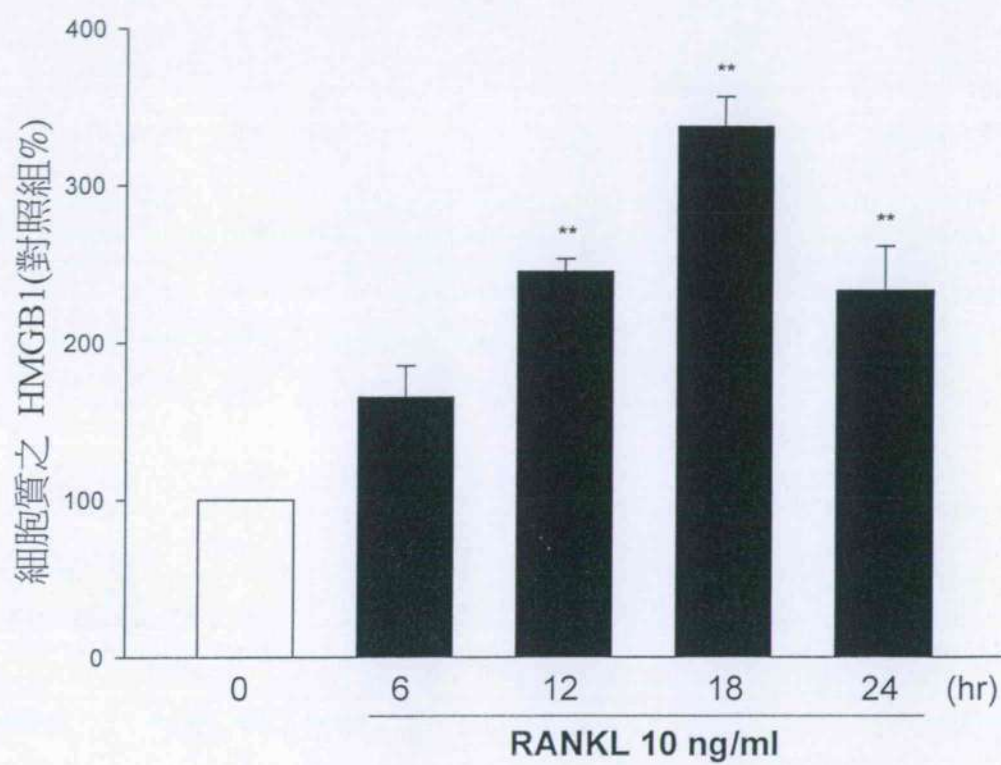


第二十六圖(A)

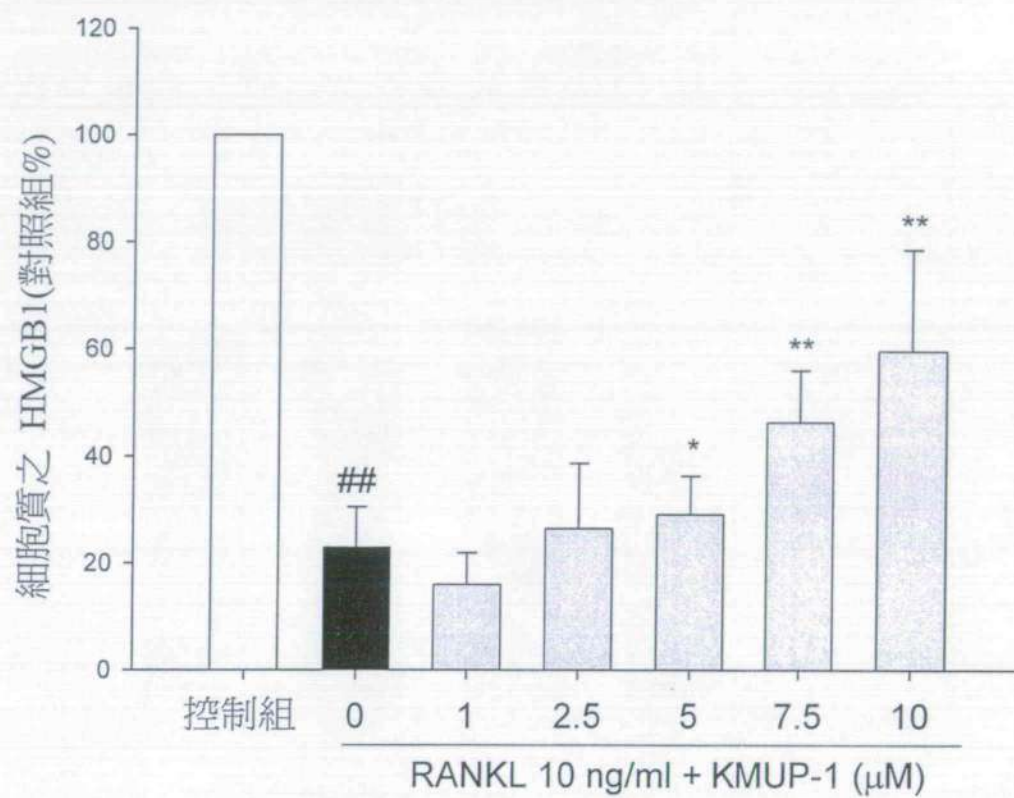


第二十六圖(B)

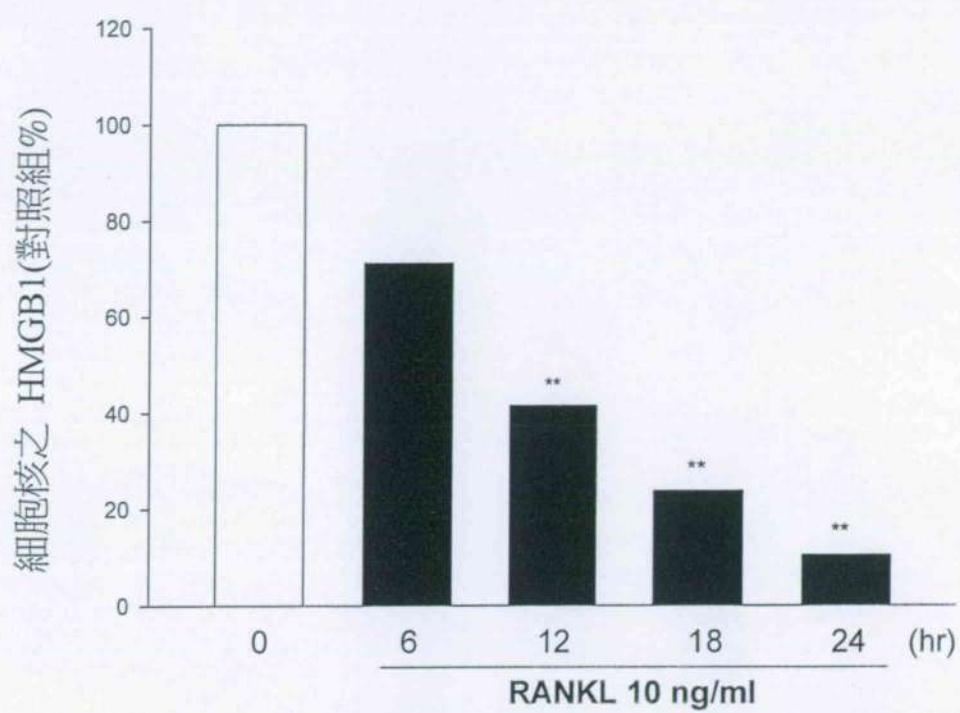




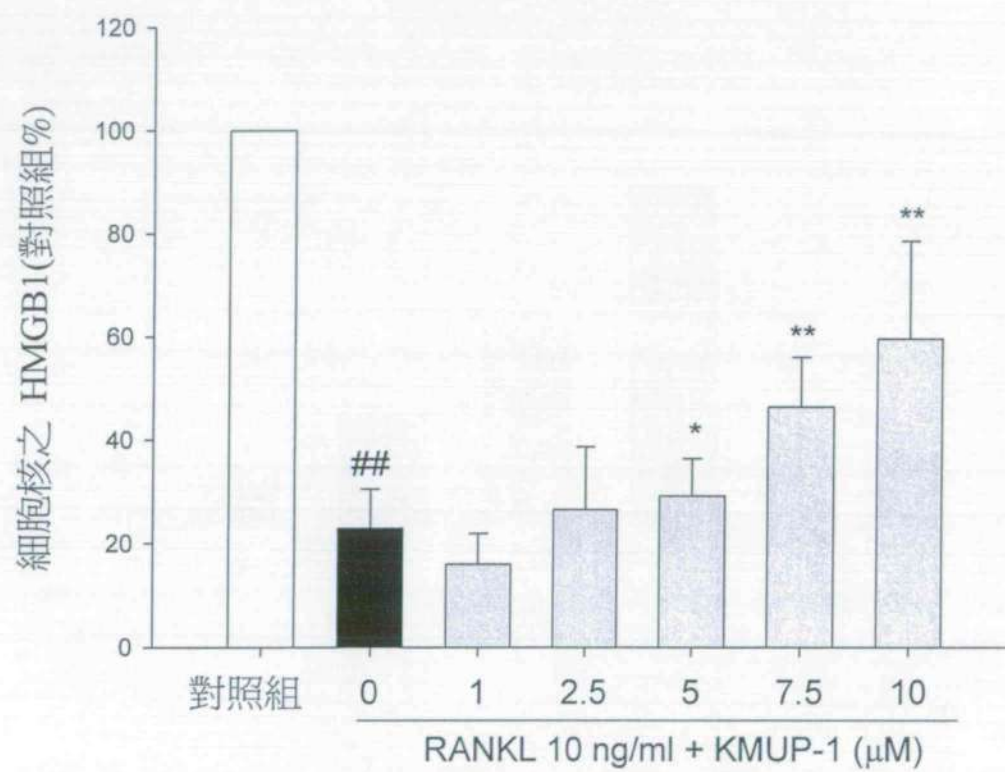
第二十七圖(A)



第二十七圖(B)

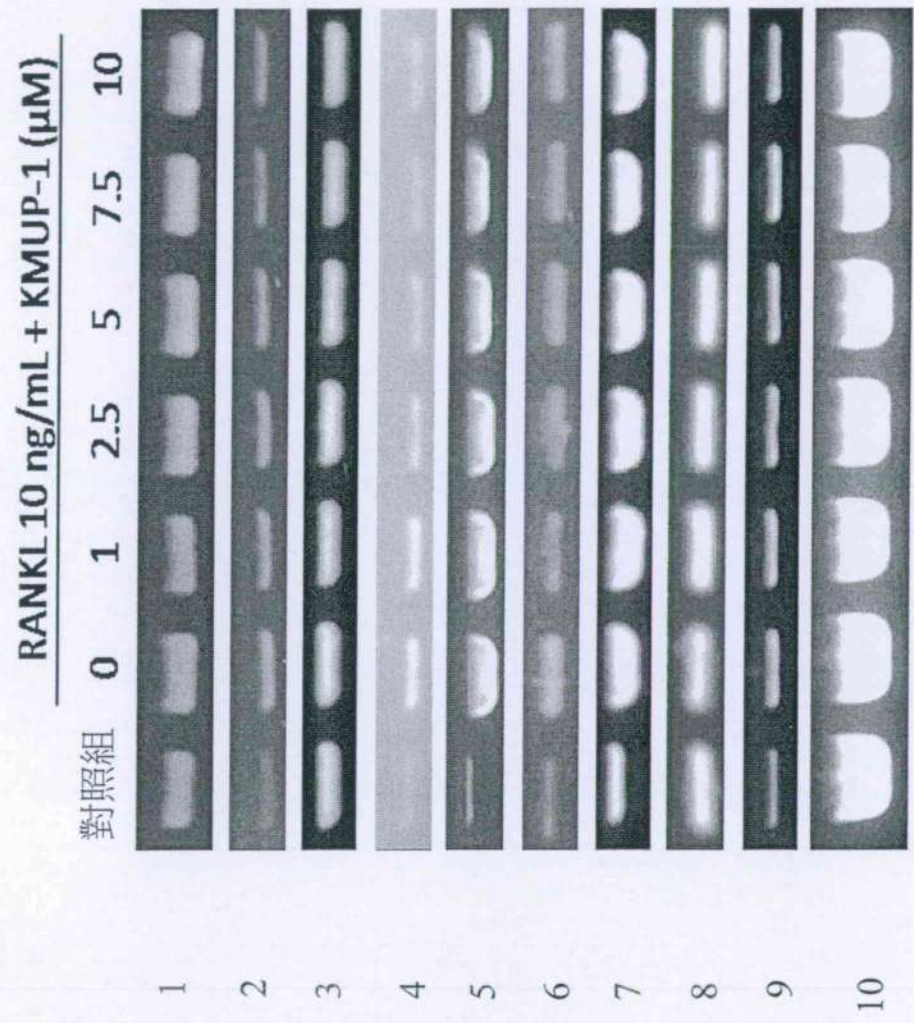


第二十八圖(A)



第二十八圖(B)



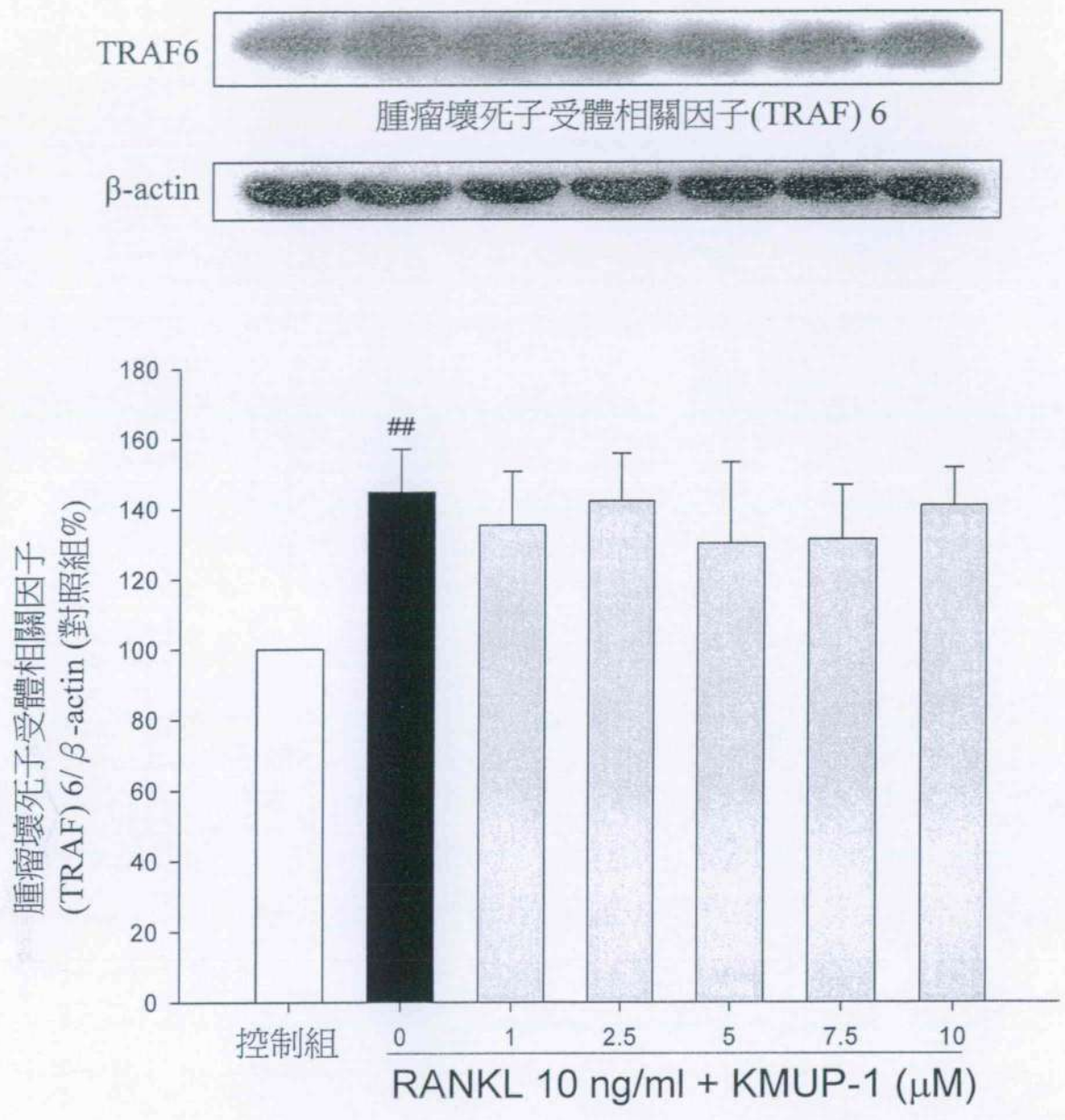


第二十九圖(A)



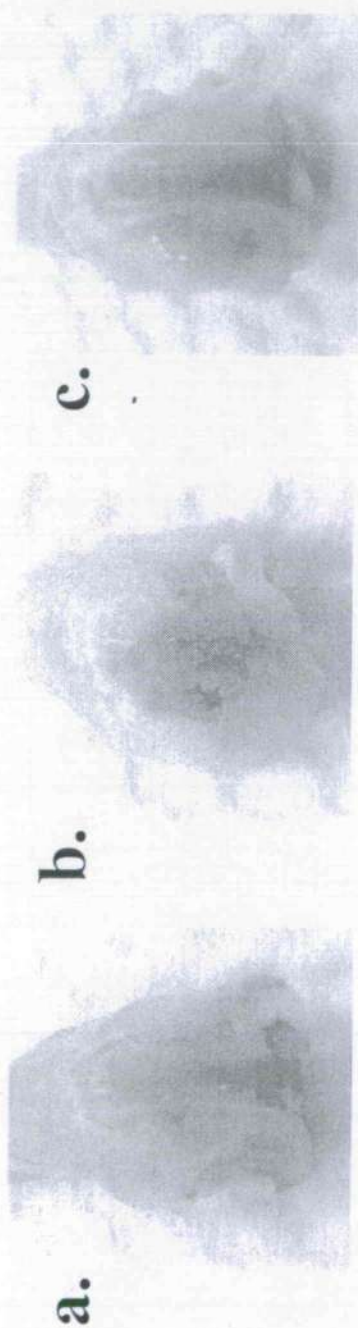
RANKL 10 ng/ml + KMUP-1 (μM)							
mRNA 表現 (對照組 %)							
基因	對照組	0	1	2.5	5	7.5	10
TRAF6	100	124.3±5.6 <sup>a</sup>	100.2±4.7	123.8±2.3	125.9±2.9	128.4±6.5	127.2±1.3
TRAP	100	430.7±28.7 <sup>a</sup>	422.4±24.8	427.7±39.3	359.9±20.7 <sup>b</sup>	293.8±30.1 <sup>b</sup>	259.3±18.3 <sup>b</sup>
c-Fos	100	114.7±6.8 <sup>a</sup>	105.4±8.1	100.3±4.7	84.5±5.2 <sup>b</sup>	67.1±4.5 <sup>b</sup>	73.1±6.3 <sup>b</sup>
NFATc1	100	280.5±8.8 <sup>a</sup>	256.9±7.5	184.7±4.2 <sup>b</sup>	161.8±2.9 <sup>b</sup>	132.9±2.4 <sup>b</sup>	121.5±4.5 <sup>b</sup>
MMP-9	100	1824.2±159.6 <sup>a</sup>	1732.4±168.9	1619.9±179.8	1570.9±159.3 <sup>b</sup>	1439.8±188.8 <sup>b</sup>	1372.0±175.6 <sup>b</sup>
Fra-1	100	437.9±29.1 <sup>a</sup>	244.1±38.9 <sup>b</sup>	285.1±44.8 <sup>b</sup>	310.1±56.3 <sup>b</sup>	238.7±49.9 <sup>b</sup>	265.2±64.1 <sup>b</sup>
Fra-2	100	472.2±30.1 <sup>a</sup>	428.3±38.5	490.5±42.3	488.2±57.6	474.5±52.1	496.6±44.1
c-Src	100	91.2±3.3	101.4±4.5	103.9±2.7	95.8±2.8	91.5±4.5	98.6±6.2
Cathepsin K	100	303±5.6 <sup>a</sup>	304±7.8	305±5.9	312±6.2	321.5±10.2	245±8.5 <sup>b</sup>

第二十九圖(B)

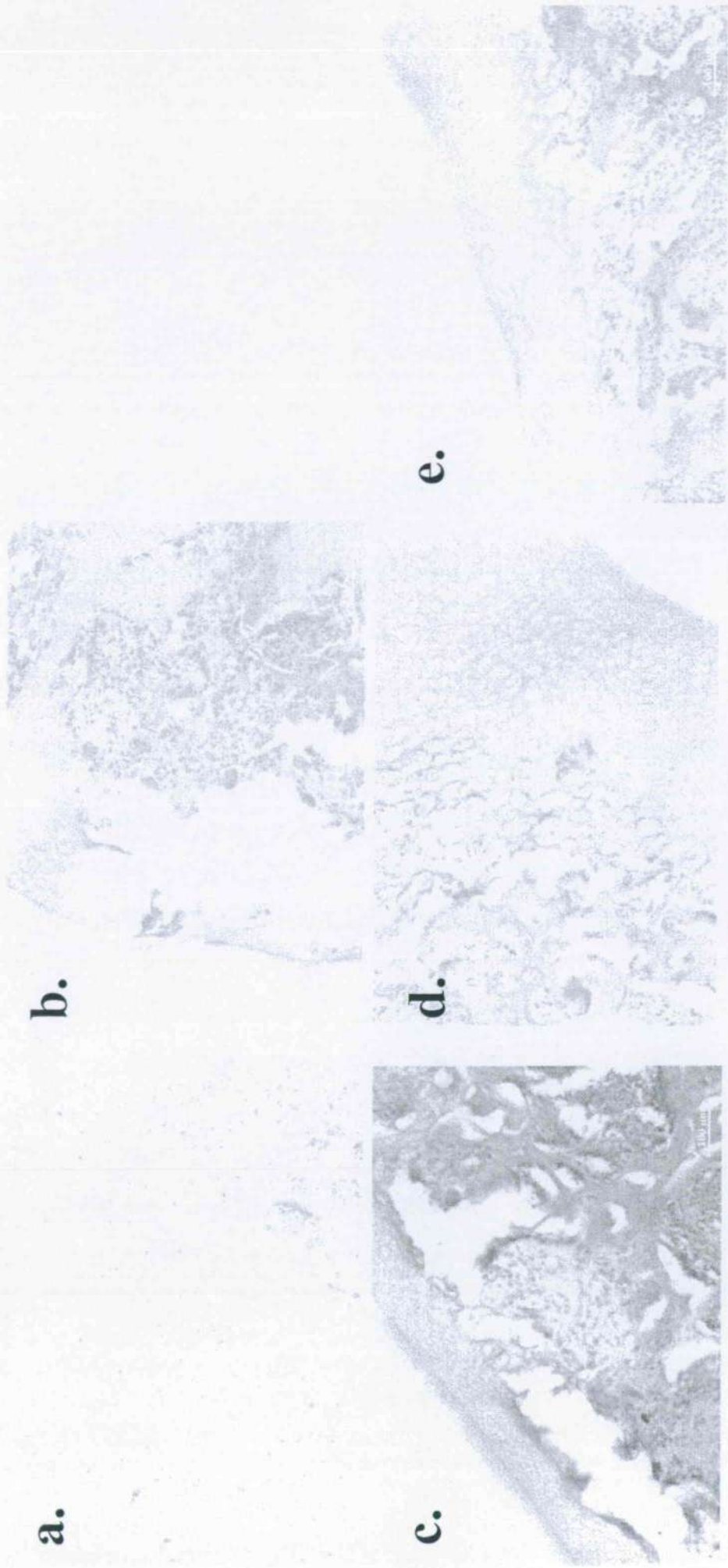


第三十圖





第三十圖



第三十二圖



c.



b.



a.



e.



d.

第三十三圖