

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

探討 Alendronate, Ibandronate 及 Zoledronic acid 對不同骨癌細胞株轉移之抑制能力及誘導細胞凋亡的機制及其路徑之研究(第 3 年)
研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 98-2314-B-040-003-MY3
執行期間：100 年 08 月 01 日至 101 年 07 月 31 日
執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：呂克修
共同主持人：謝易修
計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理人員：鄭新霖

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

中華民國 101 年 10 月 29 日

中文摘要：雙磷酸鹽類藥物，如 alendronate、ibandronate 及 zoledronic acid，已經廣泛使用於臨床上來治療骨質疏鬆症。然而，這幾年來，有許多文獻指出這類藥物除了在治療骨質疏鬆症外，如前列腺癌、乳癌、肺癌等惡性腫瘤骨轉移及高血鈣也是常使用雙磷酸鹽類。因此，雙磷酸鹽類藥物用於治療許多骨疾病的重要地位是無庸置疑的。雖然雙磷酸鹽類可抑制惡性腫瘤細胞生長能力，甚至高劑量時可促使惡性腫瘤細胞凋亡的作用已經相當明確。但在不同的骨癌細胞中抑制骨癌細胞的轉移方面仍極少被研究。因此，我們利用不同的雙磷酸鹽類藥物 (alendronate、ibandronate 及 zoledronic acid) 在較低濃度時 (0-100 μ M) 處理骨癌細胞株 U2OS，結果發現，這三個雙磷酸鹽類藥物在低濃度時不影響 U2OS 的細胞存活率，而我們進一步利用 wound healing assay 發現 zoledronic acid 會抑制 U2OS 的轉移作用。而我們進一步利用 Boyden chamber assay 也發現，在低濃度時，zoledronic acid 就會抑制 U2OS 的侵襲及轉移作用。但是進一步利用 gelatin zymography 卻發現這三個雙磷酸鹽類藥物也不影響 U2OS 的 MMP-2 及 MMP-9 的活性。而我們也進一步利用 western blotting 發現，zoledronic acid 也不抑制 E-cadherin 及 Vimentin 此分子。我們進一步發現，zoledronic acid 抑制 migration 是與 F-actin 等骨架蛋白有關，並發現與抑制膽固醇合成路徑 (mevalonate pathway) 中有關酵素，如 GGPP (Geranylgeranylpyrophosphate) 合成酶活性有關。

中文關鍵詞：雙磷酸鹽類藥物、骨癌細胞株、轉移、蛋白水解酵素

英文摘要：Bisphosphonates, including alendronate, ibandronate and zoledronic acid, are the well-known drug of osteoporosis. Several in vitro and in vivo reports have suggested that Bisphosphonates might also have specific anticancer action on several types of tumors, such as osteosarcoma, breast, prostate, and melanoma cancer. However, the inhibitory effect related to cell invasiveness of alendronate, ibandronate and zoledronic acid have not been studied yet. Therefore, in this study, the impact of alendronate, ibandronate and zoledronic acid on cell migration were examined in vitro in human osteosarcoma U2OS cells. The cytotoxic effect of various concentrations of alendronate, ibandronate and zoledronic acid (0 - 100 μ M) on U2OS cells

by MTT assay was assessed. It was clear that 24 h treatment of alendronate, ibandronate and zoledronic acid, even at a concentration as high as 100 μ M, had no cytotoxicity to the U2OS cells. Furthermore, zoledronic acid inhibited the migration ability in a dose- and time-dependent manner. By the use of gelatin zymography assays, it was shown that alendronate, ibandronate and zoledronic acid, have no effect in MMP-9 and MMP-2 enzyme activity on U2OS cell. We further found that zoledronic acid inhibits osteosarcoma cell migration via F-actin expression. We also use GGPP pathway's inhibitor, GGOH, to confirm this results.

英文關鍵詞： Bisphosphonates, alendronate, ibandronate, zoledronic acid, Metastasis, osteosarcoma

Zoledronic acid抑制U2OS骨癌細胞株的侵入及轉移的機制探討

Yih-Shou Hsieh¹, Shun-Fa Yang², Shu-Chen Chu³, and Ko-Hsiu Lu^{2,4,*}

¹Institute of Biochemistry, ²Institute of Medicine, Chung Shan Medical University, Taichung
402, Taiwan

³Department of Food Science, Central Taiwan University of Science and Technology,
Taichung, Taiwan

⁴Department of Orthopaedic Surgery, Chung Shan Medical University Hospital, Chung Shan
Medical University, Taichung 402, Taiwan

*Corresponding author. Department of Orthopedics, Chung Shan Medical University
Hospital, No. 110, Sec. 1, Chien-Kuo N. Rd., Taichung 402, Taiwan. Tel.: +886 4
24739595; fax: +886 4 24756437.
E-mail address: cshy307@csh.org.tw (K.-H. Lu).

中文摘要

雙磷酸鹽類藥物，如 alendronate、ibandronate 及 zoledronic acid，已經廣泛使用於臨床上來治療骨質疏鬆症。然而，這幾年來，有許多文獻指出這類藥物除了治療骨質疏鬆症外，如前列腺癌、乳癌、肺癌等惡性腫瘤骨轉移及高血鈣也是常使用雙磷酸鹽類。因此，雙磷酸鹽類藥物用於治療許多骨疾病的重要地位是無庸置疑的。雖然雙磷酸鹽類可抑制惡性腫瘤細胞生長能力，甚至高劑量時可促使惡性腫瘤細胞凋亡的作用已經相當明確。但在不同的骨癌細胞中抑制骨癌細胞的轉移方面仍極少被研究。因此，我們利用不同的雙磷酸鹽類藥物（alendronate、ibandronate 及 zoledronic acid）在較低濃度時 (0-100 μ M)處理骨癌細胞株 U2OS，結果發現，這三個雙磷酸鹽類藥物在低濃度時不影響 U2OS 的細胞存活率，而我們進一步利用 wound healing assay 發現 zoledronic acid 會抑制 U2OS 的轉移作用。而我們進一步利用 Boyden chamber assay 也發現，在低濃度時，zoledronic acid 就會抑制 U2OS 的侵襲及轉移作用。但是進一步利用 gelatin zymography 卻發現這三個雙磷酸鹽類藥物也不影響 U2OS 的 MMP-2 及 MMP-9 的活性。而我們也進一步利用 western blotting 發現，zoledronic acid 也不抑制 E-cadherin 及 Vimentin 此分子。我們進一步發現，zoledronic acid 抑制 migration 是與 F-actin 等骨架蛋白有關，並發現與抑制膽固醇生合成路徑 (mevalonate pathway) 中有關酵素，如 GGPP (Geranylgeranylpyrophosphate)合成酶活性有關。

關鍵字：雙磷酸鹽類藥物、骨癌細胞株、轉移、蛋白水解酵素

前言：

惡性腫瘤細胞的擴散轉移 (metastasis) 往往是癌症病人在臨床治療上預後的一項重要指標；在癌症的分期上，惡性腫瘤細胞的擴散轉移與否，也是一個重要的分界。當惡性腫瘤細胞僅生長發病於局部位置，稱為局部癌；若惡性腫瘤細胞尚未破壞基底膜 (basement membrane) 穿出，稱為原位癌 (carcinoma in situ)。如果能在這階段進行治療，則治癒率最高。當惡性腫瘤細胞藉由血管、淋巴管等方式轉移到人體其他部位生長成續發性惡性腫瘤，就稱為轉移性癌 (metastatic cancer) [1]。大部分的原發性的病灶可以由外科手術及其他治療方式將其完全移除，但是轉移性癌因已轉移至身體各處，造成治療上的困難。

早在 1970 年代之前，肢體骨癌 (osteogenic sarcoma、osteosarcoma) 的治療只有截肢且預後悲慘；一半的病人死於診斷後一年之內，2 年的存活率也只有 25% 左右，活超過 5 年的更少於 20% [2]；這是由於治療時多已有顯微轉移 (micrometastasis)，所以腫瘤很快再復發造成病人死亡；幸運地近 20 年來有效的輔助化學療法，使骨癌的預後顯著改善；如今 2/3 的骨癌病人，可以預期達到長期的存活 (long-term survival) [3,4]，但仍舊無法完全控制，甚至於發現時已經 80% (或許有些無法偵測到) 有肺部轉移 (pulmonary metastasis) [5]。

一般而言，惡性腫瘤細胞的擴散轉移必須伴隨著細胞生理狀態的改變，其中包含了【一】細胞移動 (migration) 和侵襲 (invasion) 能力的增加；【二】細胞與細胞間相互作用力的破壞；【三】細胞與細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 之間粘連貼附能力 (adhesion) 的增加；以及【四】細胞外基質的分解。而惡性腫瘤細胞的擴散轉移是由惡性腫瘤細胞穿過細胞外基質開始，緊接著侵入到循環系統中的血管或淋巴管，隨著循環的體液而移動，最後貼附在內皮細胞上，穿破血管或淋巴管到達新的組織器官，並藉由血管的新生成 (angiogenesis)，惡性腫瘤奪取正常組織器官的養分，而使惡性腫瘤細胞大量增生 (proliferation)，造成正常組織器官功能的耗弱，最後造成癌症病人的死亡。

惡性腫瘤細胞在擴散轉移的過程中，可分為侵襲 (invasion) 及轉移 (metastasis)

兩個階段，其中惡性腫瘤細胞破壞基底膜後侵入周圍組織，便稱之為侵襲；而惡性腫瘤細胞藉由侵入到循環系統中的血管或淋巴管，隨著循環的體液而移動至遠處的器官組織，便稱之為轉移。當正常細胞轉變成惡性腫瘤細胞時，需要特殊的訊息傳導使其不斷的增生、逃脫細胞凋亡、誘發惡性腫瘤細胞組織周圍血管增生，以供應足夠的養分，另外也提升惡性腫瘤細胞對周圍組織的侵襲和轉移能力[6-8]。

惡性腫瘤細胞會產生細胞外基質分解酵素，包括有 serine proteinase、基質金屬蛋白水解酶 (MMPs)、cathepsins、胞漿素原活化劑 plasminogen activators (PAs)，其中 MMP-2、MMP-9 及尿激酶型胞漿素原活化劑 (urokinase-type PA, u-PA) 在基底膜的破壞扮演著重要角色，與癌症的侵襲及轉移能力最有關。惡性腫瘤細胞本身會製造 MMPs，在癌症等級增加時某些 MMPs 亦會相對的增加，而 MMPs 具有蛋白分解活性可分解膠原蛋白，在腫瘤破裂的基底膜處可測得大量的 MMPs，現已證實是用來作局部侵襲和遠處轉移，主要在於助長癌細胞穿透基底膜，由血管或淋巴管滲入組織而達轉移之目的[9-16]。

基質金屬蛋白水解酶 (MMPs) 為一群含鋅之蛋白分解酵素，依其作用之受質特性及作用方式，共可分為六大類，分別是 collagenases、gelatinases、stromlyns、matrilysins、membrane type-metalloproteinases (MT-MMPs) 及其它，分別參與 ECM 的合成與分解；於正常生理情況下，參與如：胚胎的發育，胚胎的著床，血管生成和組織重建等。自組織分泌出來的 MMPs 為 latent proenzymes，需經過蛋白分解酵素，如 PAs 轉換成活化態之後才具有酵素活性；另外，許多證據顯示這些活化後 MMPs 可受內生性組織抑制劑 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) 調節而改變其活性，也就是說 MMPs 與 TIMPs 之間 imbalance 為決定 ECM 分解或堆積的，甚至惡性腫瘤細胞貼附、移動、侵襲和轉移的主要因素[17-28]。

雙磷酸鹽類藥物 (bisphosphonates) 如：alendronate、ibandronate 及 zoledronic acid，已經廣泛使用於臨床上來治療骨質疏鬆症[29-33]，而其作用原理為雙磷酸鹽類藥物會與 FPP 合成酶 (farnesyl pyrophosphate synthase) 結合，抑制 FPP 合成酶活性，進而抑制蝕骨細胞 (osteoclasts) 活性[34-36]。因此，它能抑制骨骼遭到破壞，原本是適用於治療骨質疏鬆症等骨量減少的疾病。然而，這幾年來，有許多文

獻指出這類藥物除了在治疗骨質疏松症外，如前列腺癌、乳癌、肺癌等恶性肿瘤骨转移及高血钙也是常使用雙磷酸鹽類[37-44]。例如有文獻指出 zoledronic acid 在乳癌引發的骨轉移的治療上，具有不錯的治療效果[37, 45-46]。臨床研究報告也證實第三代雙磷酸鹽藥物中的 ibandronate，除了在治疗骨轉移有不錯的效果外，最值得重視的是它的副作用比例非常低[47-48]。因此，雙磷酸鹽類藥物用於治療許多骨疾病的重要地位是無庸置疑的，特別是在骨質疏松症上的使用，更是倍受重視；在癌症的治療過程中，更是佔有重要的地位。

目前無論於活體或活體外試驗都證實高劑量雙磷酸鹽類具有抑制恶性肿瘤細胞生長能力及促使恶性肿瘤細胞凋死亡等作用，而且呈 dose-及 time-dependent 的關係[49-52]。經由機轉分析得知 alendronate、ibandronate 及 zoledronic acid 等雙磷酸鹽類的作用機制有（1）透過 cell cycle arrest；（2）抑制 DNA 合成，抑制 NF- κ B 活化作用；（3）活化 caspase-3 活性；以及（4）抑制 Rho activity，進而抑制細胞增生作用等[53-55]。雖然雙磷酸鹽類可抑制恶性肿瘤細胞生長能力，甚至於高劑量時可促使恶性肿瘤細胞凋亡的作用，已經相當明確。但在不同的骨癌細胞中其化學防癌及抗癌作用之角色上，如低劑量下雙磷酸鹽類可否影響 MMPs family、plasmin、u-PA、組織型胞漿素原活化劑 tissue-type PA (t-PA) 或其抑制劑 TIMPs、PA inhibitors (PAIs) 之表現或高劑量誘導不同骨癌細胞株的細胞凋亡方面，仍極少被研究。因此，我們利用不同的雙磷酸鹽類藥物，如：alendronate、ibandronate 及 zoledronic acid，針對骨癌細胞株 U2OS，比較並分析這些不同的雙磷酸鹽類藥物對於 U2OS 的細胞移動、侵襲抑制作用的效果，有何不同？

若以藥物成份側鏈含有氮原子與否，將雙磷酸鹽類藥物作區分，大致可分為含氮類(nitrogen-containing)與非含氮類(non-nitrogen-containing) 雙磷酸鹽類藥物。非含氮類雙磷酸鹽類藥物進入細胞後會與含有三磷酸腺苷的 ATP-compound 結合，成為一無法水解的產物，阻斷 ATP 釋出，細胞處於缺乏能量(ATP)的狀態，導致能量缺乏使得細胞死亡；而含氮類雙磷酸鹽類藥物，如上述所提的 zoledronic acid，則是抑制膽固醇生合成路徑(mevalonate pathway)中有關酵素，如 FPP (farnesylpyrophosphate) 合成酶、GGPP (Geranylgeranylpyrophosphate) 合成酶活性，

合成異戊二烯物質，如 FPP 與 GGPP，進而減少蛋白質轉譯後修飾：異戊烯化 (prenylation)作用[56-58]。異戊烯化作用為調控某些細胞質內蛋白的轉位並貼附至細胞膜內膜上的關鍵步驟，Prenylation 主要包含了 farnesylation 與 geranylgeranylation 兩大作用[59]。Farnesylation 主要經由轉移酶(Farnesyl Transferase enzyme, FTase) 將 FPP 上十五碳成份轉移至蛋白上；而 Geranylgeranylation 則是藉由 Geranylgeranyltransferase enzyme, GGTase) 將 GGPP 上二十碳成份轉移至修飾目標蛋白上[56,60]。此目標蛋白，如一類小分子蛋白 small GTPase protein，包含了 Ras、Rho 蛋白家族，需 prenylation 作用使得原本存於細胞質當中未活化的小分子蛋白得以貼附至細胞膜上執行正常生理功能[61]。過去許多文獻題到，Ras 及 Rho 蛋白參與調控腫瘤細胞的移動性。此外，此類小分子蛋白主要調控細胞骨架生成以及重組作用，除了與細胞移動性有關之外，在不同的細胞模式中不管是 *in vivo* 或 *in vitro*，small GTPase protein 更參與腫瘤細胞型態以及貼附能力改變的調控[62]。而 zoledronic acid 阻斷 FPP 與 GGPP 合成酶合成膽固醇合成路徑中間產物 FPP 與 GGPP，可藉由添加其衍生物 FOH (farnesol)及 GGOH (geranylgeraniol)來恢復 small GTPase protein 的 farnesylation 與 geranylgeranylation 作用[63]。

材料與方法

研究方法如下：

1. 細胞培養及處理

骨癌細胞株 U2OS 以 DMEM 培養基培養，加入適量 antibiotics 及 10% heat-inactivated FCS，以不同的雙磷酸鹽類藥物 (alendronate、ibandronate 及 zoledronic acid) 於細胞培養箱中培育 24、48、72 小時後，取出 conditioned medium 及 cell lysate 進行 zymography 及 western blot 分析 MMP-2 及 MMP-9 活性及相關蛋白表現；並收取細胞進行 *in vitro* invasion/migration assay。

2. MTT (microculture tetrazolium) 分析

將 U2OS 骨癌細胞株，以 $3\sim5\times 10^4$ 細胞數分至 24 孔盤中，37°C 培養 16 小時後，加入不同的雙磷酸鹽類藥物 (alendronate、ibandronate 及 zoledronic acid) 處理 24 小時後，去除加藥的細胞培養液，再加入 1 ml 以細胞培養液 10 倍稀釋的 MTT reagent (final concentration 0.5 mg/ml)，待此作用 4 小時之後再以異丙醇將結晶溶出，於 O.D. 565 nm 下測定溶液吸光，由吸光強度可得知存活的細胞數多寡。

3. gelatin-zymography (gelatinase 活性測試)

首先製備 0.1% gelatin-8% SDS-PAGE 電泳膠片，置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液。取 16 μ l sample (蛋白總量 20 μ g)，加入 4 μ l loading buffer，將 sample loading 到電泳片中，以 140 V 進行電泳分離。大約 3 小時之後，將膠拆下，加入 50 ml 的 washing buffer，在室溫下洗 30 分鐘，共兩次。倒掉 washing buffer 之後，加入 50 ml 的 reaction buffer，於 37°C 恆溫箱下反應 12 個小時。將反應完後的 gel，以 staining buffer 染色 30 min，之後再以退色液退染觀看結果，並以 densitometer (AlphaImage 2000, AlphaImage comp) 量化結果。

4. cell motility 分析

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，lower chamber 為含有 10% FCS 的 DMEM，將細胞處理不同的雙磷酸鹽類藥物 (alendronate、ibandronate 及 zoledronic acid) 24 小時後，以 0.05% 的 trypsin-EDTA 打下所有細胞並用 trypan

blue 計算細胞數，然後注入固定量的細胞 (10^4 - 1.5×10^4 cell/well) 於 upper chamber，待細胞移動 5 小時以後，取下薄膜，以甲醇固定細胞 10 分鐘，風乾 5 分鐘之後，以 Giemsa (1:20) 染色 1 小時，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在 $400\times$ 顯微鏡底下每個 well 隨機選取 3 個視野，數 5 個 wells，作移動細胞數之統計。

5. cell invasion 分析

將 cellulose nitrate filters 預先 coating 上 $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Marix gel (0.5 mg/ml)，在 laminar flow 風乾 3~5 小時，在將細胞處理不同的雙磷酸鹽類藥物 (alendronate、ibandronate 及 zoledronic acid) 24 小時後，以 0.05% 的 trypsin-EDTA 打下所有細胞並用 trypan blue 計算細胞數，然後注入固定量的細胞 (10^4 - 1.5×10^4 cell/well) 於 upper chamber，待細胞移動 5 小時以後，取下薄膜，以甲醇固定細胞 10 分鐘，風乾 5 分鐘之後，以 Giemsa (1:20) 染色 1 小時，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在 $400\times$ 顯微鏡底下每個 well 隨機選取 3 個視野，數 5 個 wells，作移動細胞數之統計。

6. western blotting 分析

利用 western blotting 的方法測定 E-cadherin 及 Vimentin; 首先製備 12.5% SDS-PAGE 電泳膠片，置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液，取 $16 \mu\text{l}$ sample (蛋白總量 $20 \mu\text{g}$)，加入 $4 \mu\text{l}$ loading buffer，將 sample denature (95°C , 10 min) 之後再 loading 到電泳片中，以 140 V 進行電泳分離。大約 3 小時之後，將膠拆下後進行蛋白轉漬，將膠體置入冰冷之 transfer buffer，將預先浸濕的 NC paper 蓋在膠體上面後裝入 transfer holder，於 4°C 下，以 100 V 進行轉漬 1 小時之後，取出 NC paper 加入 blocking buffer，在室溫下搖動一個小時。然後加入一級抗體於 TBS buffer，在 4°C 下反應 overnight，之後以 washing buffer (TBS + 0.05% Tween 20) 清洗三次，每一次 10 分鐘。接著再加入二級抗體於 TBS buffer，於室溫作用二個小時後以 washing buffer 清洗三次，每一次 10 分鐘。最後加入 25 ml

substrate buffer 進行呈色反應（或以 ECL 冷光系統紀錄），待 NC paper 上有明顯的 band 出現，即以水終止反應並晾乾，並以 densitometer（AlphaImage 2000，AlphaImage comp）量化結果。

7. wound healing 分析(傷口癒合試驗)

將 U2OS 細胞以 80×10^4 /well 的細胞量均勻分至 6 公分細胞培養皿中，靜置於 37°C 含 5% CO_2 的細胞培養箱中，培養約 16 小時，待細胞完全貼附至培養皿上，去除孔盤中舊的細胞培養液，再加入 3 mL 的 1× PBS 清洗細胞後吸去 1× PBS，反覆 2 次之後，每個培養皿加入 3 mL 不含胎牛血清的細胞培養液以進行細胞 starvation(飢餓狀態) 動作，讓細胞暫時停止生長，使細胞週期回到 G0 phase，置於 37°C 含 5% CO_2 的細胞培養箱中，培養約 16 小時後，將鐵尺過火，等冷卻後架在培養皿上，以黃色微量吸管尖(200 p) 在培養皿上劃線約 4 條，創造傷口後，再吸去細胞培養液，以 3 mL 的 1× PBS 清洗細胞後吸去 1× PBS，反覆 2 次，加入含有不同濃度 zoledronic acid、或合併處理 GGOH、FOH 且含 10% 胎牛血清的細胞培養液，以照相系統挑選寬度適中之傷口並拍照紀錄，標示為 0 小時，置於 37°C 含 5% CO_2 的細胞培養箱中，並於不同時間點個別拍照紀錄傷口癒合情形。

8. 細胞免疫螢光染色分析(Cytoimmunofluorescence)

將 U2OS 細胞以 50×10^4 /well 的細胞量均勻分至 6 公分細胞培養皿中，靜置於 37°C 含 5% CO_2 的細胞培養箱中，培養約 16 小時，待細胞完全貼附至培養皿上，去除孔盤中舊的細胞培養液，再加入 3 mL 的 1× PBS 清洗細胞後吸去 1× PBS，反覆 2 次之後，每個培養皿加入含有不同濃度 zoledronic acid、或額外加入 GGOH、FOH 且含 10% 胎牛血清的細胞培養液，置於 37°C 含 5% CO_2 的細胞培養箱中，處理 24 小時後，丟棄含有藥物的培養液。以 1× PBS 清洗 2 次再加入 4% paraformaldehyde 固定細胞 15 分鐘，以 1× PBS 洗去 paraformaldehyde，後再加入 0.5% Triton-X 100 於 shaker 上作用 10 分鐘，1× PBS 清洗 2 次，加入含 BSA 的

blocking solution 作用30分鐘，加入一級抗體Taxes red(F-actin)、DAPI (nuclear)
避光作用2小時，後以1× PBS清洗3次，封片。最後以共軛焦顯微鏡於不同藥物
處理下選取2個視野拍照，觀察細胞骨架蛋白變化。

結果：

雙磷酸鹽類藥物 (alendronate、ibandronate及zoledronic acid) 對於人類骨癌細胞株 U2OS 細胞存活率的影響

將 U2OS 骨癌細胞株以 5.0×10^4 的細胞數培養在 24 孔培養皿內，培養 16 小時後，給予不同濃度的雙磷酸鹽類藥物 (alendronate、ibandronate及zoledronic acid) (0-100 μM) 處理 24 小時後，將藥物移除，利用 MTT assay 偵測細胞的存活率，其結果與處理 0 μM 雙磷酸鹽類藥物 (alendronate、ibandronate及zoledronic acid) 之對照組作比較。由結果發現 U2OS 細胞在雙磷酸鹽類藥物 (alendronate、ibandronate及zoledronic acid) (0-50 or 0-100 μM) 這幾個濃度的處理之下並不會影響細胞的存活率(Figure 1-3)。

雙磷酸鹽類藥物 (alendronate、ibandronate及zoledronic acid) 對人類骨癌細胞株U2OS 分泌 MMP-2 及 MMP-9 的能力

將U2OS 骨癌細胞株以 5.0×10^4 的細胞數培養在 24 孔培養皿內，培養 16 小時後，以 serum-starvation 的情形下給予不同濃度的雙磷酸鹽類藥物 (alendronate、ibandronate及zoledronic acid) 處理 24 小時後，收取 serum-free 的 medium，以 gelatin zymography 來分析 MMP-9 及 MMP-2 的表現，並且以 MTT assay 來定量細胞的存活數作為基準。結果顯示，在相同的細胞數下，給予不同劑量的雙磷酸鹽類藥物 (alendronate、ibandronate及zoledronic acid)，其細胞所分泌的 MMP-9 及 MMP-2 的活性沒有明顯的抑制作用 (Figure 1-3)。

zoledronic acid 抑制人類骨癌細胞株U2OS轉移能力的分析

我們進一步利用 wound healing 的實驗，觀察 U2OS 骨癌細胞株在 zoledronic acid (0, 60, 100 μM) 處理 24, 48 小時後，其轉移的能力為何? 結果顯示其移動能力依 zoledronic

acid 濃度由低到高有明顯的抑制效果，而在 48 小時更為明顯。因此這代表著 zoledronic acid 可以有效抑制 U2OS 細胞轉移的能力(Figure 4)。

zoledronic acid抑制人類骨癌細胞株U2OS 侵襲及轉移能力的分析

我們進一步利用 Boyden chamber assay 的實驗，觀察 U2OS 骨癌細胞株在 zoledronic acid (0-100 μ M) 處理 24 小時後，其侵襲及轉移的能力為何？結果顯示其侵襲及轉移能力在 zoledronic acid 低濃度時有明顯的抑制效果。因此這代表著 zoledronic acid 可以有效抑制 U2OS 細胞侵襲及轉移的能力(Figure 5)。

zoledronic acid對人類骨癌細胞株U2OS 表現 E-cadherin 及Vimentin 的能力

我們進一步利用 western blotting 的實驗，觀察 U2OS 骨癌細胞株在 zoledronic acid (0-100 μ M) 處理 24 小時後，其抑制抑制 E-cadherin 及 Vimentin 的能力為何？結果顯示 zoledronic acid 不抑制 E-cadherin 及 Vimentin 此分子(Figure 6)。因此，我們發現 zoledronic acid 會抑制 U2OS 的轉移作用，但是卻不是透過 MMP-2, MMP-9, E-cadherin 及 Vimentin 這些常見的蛋白水解酵素。因此，未來的方向則是朝向其他影響轉移的路徑如骨架蛋白做進一步分析探討。

zoledronic acid抑制人類骨癌細胞株U2OS移動能力的分析

將 U2OS 骨肉瘤細胞以 80×10^4 的細胞數分盤到 6 公分培養皿，培養 16 小時待細胞貼附後，以微量吸管尖劃出一道空間以模擬傷口，以不同濃度的 zoledronic acid (0, 25, 50, 75, 100 μ M) 且含 10% 胎牛血清的細胞培養液處理，並於 0、6、12、24 小時等不同時間點、分別以照相系統拍照紀錄 24 小時內傷口癒合情形。據結果顯示，處理不同劑量的 zoledronic acid，隨著濃度增加，其細胞爬行、移動能力明顯下降，當劑量逐漸上升，相反的，傷口癒合程度越低 (Figure 7)。

GGOH、FOH 恢復zoledronic acid抑制人類骨癌細胞株U2OS移動能力的分析

除了單純觀察不同濃度 zoledronic acid 對於U2OS 移動能力影響之外，我們更額外加入不同濃度的膽固醇生合成路徑之中間產物，GGPP 與 FPP 其衍生物 GGOH (25 μ M)、FOH (25 μ M)，並以傷口癒合試驗，且於0小時與24小時來觀察GGOH、FOH 對於U2OS 細胞株移動能力恢復的情形。結果顯示處理24小時後 GGOH 可以有有效的恢復由zoledronic acid所抑制的移動能力；而 FOH 則與單獨加入 zoledronic acid 結果一樣，並無法有效恢復此抑制作用 (Figure 8)。

zoledronic acid、GGOH、FOH 對於人類骨癌細胞株U2OS骨架蛋白影響的分析

zoledronic acid以及額外加入GGOH與FOH處理24小時後，以一級抗體DAPI和Taxes red分別將細胞核與F-actin染色，觀察人類骨癌細胞株U2OS在單獨處理zoledronic acid以及分別額外加入GGOH與FOH作用下，細胞骨架蛋白的變化。結果顯示，相較於對照組，單獨處理zoledronic acid有效的阻斷骨架蛋白F-actin，另zoledronic acid額外合併處理GGOH與FOH部份，GGOH明顯的恢復F-actin骨架架構；然而FOH則與單獨處理zoledronic acid一樣，F-actin表現較少，意即FOH無法恢復由zoledronic acid所阻斷的骨架蛋白 (Figure 9)。

References

1. Nabeshima K, Inoue T, Shima Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int* 2002;52:255-64.
2. Friedman MA, Carter SK. The therapy of osteogenic sarcoma: current status and thoughts for the future. *J Surg Oncol* 1972;4:482.
3. Raymond AK, Chawla SP, Carrasco CH, Ayala AG, Fanning CV, Grice B, Armen T, Plager C, Papadopoulos NE, Edeiken J. Osteosarcoma chemotherapy effect: a prognostic factor. *Semin Diagn Pathol* 1987;4:212-36.
4. Meyers PA, Heller G, Healey J, Huvos A, Lane J, Marcove R, Applewhite A, Vlamis V, Rosen G. Chemotherapy for Non-metastatic Osteogenic Sarcoma: The Memorial Sloan-Kettering Experience. *J Clin Oncol* 1992;10:5-15.
5. Weis L. Common malignant bone tumors: osteosarcoma. In: Simon MA, Springfield D, editors. *Surgery for bone and soft tissue tumors*. Philadelphia, NY: Lippincott-Raven; 1997.
6. Kurschat P, Mauch C. Mechanisms of metastasis. *Clin Exp Dermatol* 2000;25:482-9.
7. Koizumi K, Hojo S, Akashi T, Yasumoto K, Saiki I. Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. *Cancer Sci* 2007;98:1652-8
8. Funasaka T, Raz A. The role of autocrine motility factor in tumor and tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:725-35.
9. MacDougall JR, Matrisian LM. Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1995;14:351-62.
10. Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2003;36:128-37.
11. Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 2002;21:2245-52.

12. Noel A, Gilles C, Bajou K, Devy L, Kebers F, Lewalle JM, Maquoi E, Munaut C, Remacle A, Foidart JM. Emerging roles for proteinases in cancer. *Invasion Metastasis* 1997;17:221-39.
13. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 2001;11:S37-43.
14. Webb CP, Vande Woude GF. Genes that regulate metastasis and angiogenesis. *J Neurooncol* 2000;50:71-87.
15. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2000;10:415-33.
16. Reuning U, Magdolen V, Wilhelm O, Fischer K, Lutz V, Graeff H, Schmitt M. Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis. *Int J Oncol* 1998;13:893-906.
17. Abecassis I, Olofsson B, Schmid M, Zalcman G, Karniguian A. RhoA. Induces MMP-9 expression at CD44 lamellipodial focal complexes and promotes HMEC-1 cell invasion. *Exp Cell Res* 2003;291:363-76.
18. Wick W, Platten M, Weller M. Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta. *J Neurooncol* 2001;53:177-85.
19. Tester AM, Ruangpanit N, Anderson RL, Thompson EW. MMP-9 secretion and MMP-2 activation distinguish invasive and metastatic sublines of a mouse mammary carcinoma system showing epithelial-mesenchymal transition traits. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:553-60.
20. Ntayi C, Lorimier S, Berthier-Vergnes O, Hornebeck W, Bernard P. Cumulative influence of matrix metalloproteinase-1 and -2 in the migration of melanoma cells within three-dimensional type I collagen lattices. *Exp Cell Res* 2001;270:110-8.
21. Hoegy SE, Oh HR, Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) suppresses TKR-growth factor signaling independent of metalloproteinase inhibition. *J Biol Chem* 2001;276:3203-14.

22. Deryugina EI, Bourdon MA, Reisfeld RA, Strongin A. Remodeling of collagen matrix by human tumor cells requires activation and cell surface association of matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res* 1998;58:3743-50.
23. Ree AH, Bjornland K, Brunner N, Johansen HT, Pedersen KB, Aasen AO, Fodstad O. Regulation of tissue-degrading factors and in vitro invasiveness in progression of breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:205-15.
24. Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L, Cilli M, Vacca A, Onisto M, Santi L, Stetler-Stevenson WG, Albini A. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer* 1998;75:246-53.
25. Mitra A, Chakrabarti J, Chattopadhyay N, Chatterjee A. Membrane-associated MMP-2 in human cervical cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2003;22:93-100.
26. Nakada M, Miyamori H, Yamashita J, Sato H. Testican 2 abrogates inhibition of membrane-type matrix metalloproteinases by other testican family proteins. *Cancer Res* 2003;63:3364-9.
27. Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Albini A, Natali PG, Bagnato A. Endothelin receptor blockade inhibits molecular effectors of Kaposi's sarcoma cell invasion and tumor growth in vivo. *Am J Pathol* 2003;163:753-62.
28. Munshi HG, Wu YI, Ariztia EV, Stack MS. Calcium regulation of matrix metalloproteinase-mediated migration in oral squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002;277:41480-8.
29. Pazianas M, Miller P, Blumentals WA, Bernal M, Kothawala P. Review of the literature on osteonecrosis of the jaw in patients with osteoporosis treated with oral bisphosphonates: prevalence, risk factors, and clinical characteristics. *Clin Ther* 2007;29:1548-58.
30. Watts NB. Treatment of osteoporosis with bisphosphonates. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998;27:419-39.

31. Eastell R. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 1998;338:736-46.
32. Devogelaer JP, Nagant de Deuxchaisnes C. Osteoporosis. *Br J Rheumatol* 1993;32 Suppl 4:48-55.
33. Papapoulos SE, Landman JO, Bijvoet OL, Löwik CW, Valkema R, Pauwels EK, Vermeij P. The use of bisphosphonates in the treatment of osteoporosis. *Bone* 1992;Suppl 1:S41-9.
34. Keller RK, Fliesler SJ. Mechanism of aminobisphosphonate action: characterization of alendronate inhibition of the isoprenoid pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266:560-3.
35. Russell RG, Xia Z, Dunford JE, Oppermann U, Kwaasi A, Hulley PA, Kavanagh KL, Triffitt JT, Lundy MW, Phipps RJ, Barnett BL, Coxon FP, Rogers MJ, Watts NB, Ebetino FH. Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1117:209-57.
36. Russell RG. Ibandronate: pharmacology and preclinical studies. *Bone* 2006;38(4 Suppl 1):S7-12.
37. Mazurkiewicz M, Mazurkiewicz T. Zoledronic acid in the treatment of bone metastases from the breast and prostate carcinoma. *Ortop Traumatol Rehabil* 2003;5:374-8.
38. Cicek M, Oursler MJ. Breast cancer bone metastasis and current small therapeutics. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:635-44.
39. Zeliadt SB, Penson DF. Pharmacoeconomics of available treatment options for metastatic prostate cancer. *Pharmacoeconomics* 2007;25:309-27
40. Chay CH, Cooper CC, Hellerstedt BA, Pienta KJ. Antimetastatic drugs in prostate cancer. *Clin Prostate Cancer* 2002;1:14-9.
41. Sone S, Yano S. Molecular pathogenesis and its therapeutic modalities of lung cancer metastasis to bone. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:685-9.
42. Yano S, Zhang H, Hanibuchi M, Miki T, Goto H, Uehara H, Sone S. Combined therapy with a new bisphosphonate, minodronate (YM529), and chemotherapy for multiple

- organ metastases of small cell lung cancer cells in severe combined immunodeficient mice. *Clin Cancer Res* 2003;9:5380-5.
43. Clines GA, Guise TA. Hypercalcaemia of malignancy and basic research on mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic metastasis to bone. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:549-83.
 44. Wenzel C, Bartsch R, Hussian D, Pluschnig U, Locker GJ, Sevela U, Zielinski CC, Steger GG. Zoledronate in a patient with pamidronate refractory hypercalcemia syndrome. *Support Care Cancer* 2004;12:678-81.
 45. Duivenvoorden WC, Vukmirović-Popović S, Kalina M, Seidlitz E, Singh G. Effect of zoledronic acid on the doxycycline-induced decrease in tumour burden in a bone metastasis model of human breast cancer. *Br J Cancer* 2007;96:1526-31.
 46. Saad F. Zoledronic acid: past, present and future roles in cancer treatment. *Future Oncol* 2005;1:149-59.
 47. Zheng Y, Zhou H, Brennan K, Blair JM, Modzelewski JR, Seibel MJ, Dunstan CR. Inhibition of bone resorption, rather than direct cytotoxicity, mediates the anti-tumour actions of ibandronate and osteoprotegerin in a murine model of breast cancer bone metastasis. *Bone* 2007;40:471-8.
 48. Michigami T, Hiraga T, Williams PJ, Niewolna M, Nishimura R, Mundy GR, Yoneda T. The effect of the bisphosphonate ibandronate on breast cancer metastasis to visceral organs. *Breast Cancer Res Treat* 2002;75:249-58.
 49. Dass CR, Choong PF. Zoledronic acid inhibits osteosarcoma growth in an orthotopic model. *Mol Cancer Ther* 2007;6:3263-70.
 50. Molinuevo MS, Bruzzone L, Cortizo AM. Alendronate induces anti-migratory effects and inhibition of neutral phosphatases in UMR106 osteosarcoma cells. *Eur J Pharmacol* 2007;562:28-3.
 51. Muller S, Migianu E, Lecouvey M, Kraemer M, Oudar O. Alendronate inhibits proliferation and invasion of human epidermoid carcinoma cells in vitro. *Anticancer*

- Res 2005;25:2655-60.
52. Hashimoto K, Morishige K, Sawada K, Tahara M, Kawagishi R, Ikebuchi Y, Sakata M, Tasaka K, Murata Y. Alendronate inhibits intraperitoneal dissemination in in vivo ovarian cancer model. *Cancer Res* 2005;65:540-5.
 53. Cheng YY, Huang L, Lee KM, Li K, Kumta SM. Alendronate regulates cell invasion and MMP-2 secretion in human osteosarcoma cell lines. *Pediatr Blood Cancer* 2004;42:410-5.
 54. Hashimoto K, Morishige K, Sawada K, Tahara M, Shimizu S, Ogata S, Sakata M, Tasaka K, Kimura T. Alendronate suppresses tumor angiogenesis by inhibiting Rho activation of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:478-84.
 55. Verdijk R, Franke HR, Wolbers F, Vermes I. Differential effects of bisphosphonates on breast cancer cell lines. *Cancer Lett* 2007;246:308-12.
 56. Denoyelle C, Hong L, Vannier JP, Soria J, Soria C. New insights into the actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA-dependent and -independent effects. *Br J Cancer*. 2003; 88: 1631-40
 57. van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Löwik C, Papapoulos S. Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 264: 108-11.
 58. Bergstrom JD, Bostedor RG, Masarachia PJ, Reszka AA, Rodan G. Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase. *Arch Biochem Biophys*. 2000; 373: 231-41.
 59. Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates *Curr Pharm Des*. 2003; 9: 2643-58.
 60. Zhang FL, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem*. 1996; 65: 241-69.
 61. Caraglia M, Budillon A, Tagliaferri P, Marra M, Abbruzzese A, Caponigro F. Tagliaferri P, Marra M, Abbruzzese A, Caponigro F. Isoprenylation of intracellular proteins as a new

target for the therapy of human neoplasms: preclinical and clinical implications. *Curr Drug Targets*. 2005; 6: 301-23.

62. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res*. 2002; 84: 57-80.

63. Virtanen SS, Väänänen HK, Härkönen PL, Lakkakorpi PT. Alendronate inhibits invasion of PC-3 prostate cancer cells by affecting the mevalonate pathway. *Cancer Res*. 2002; 62: 2708-14.

Figure 1

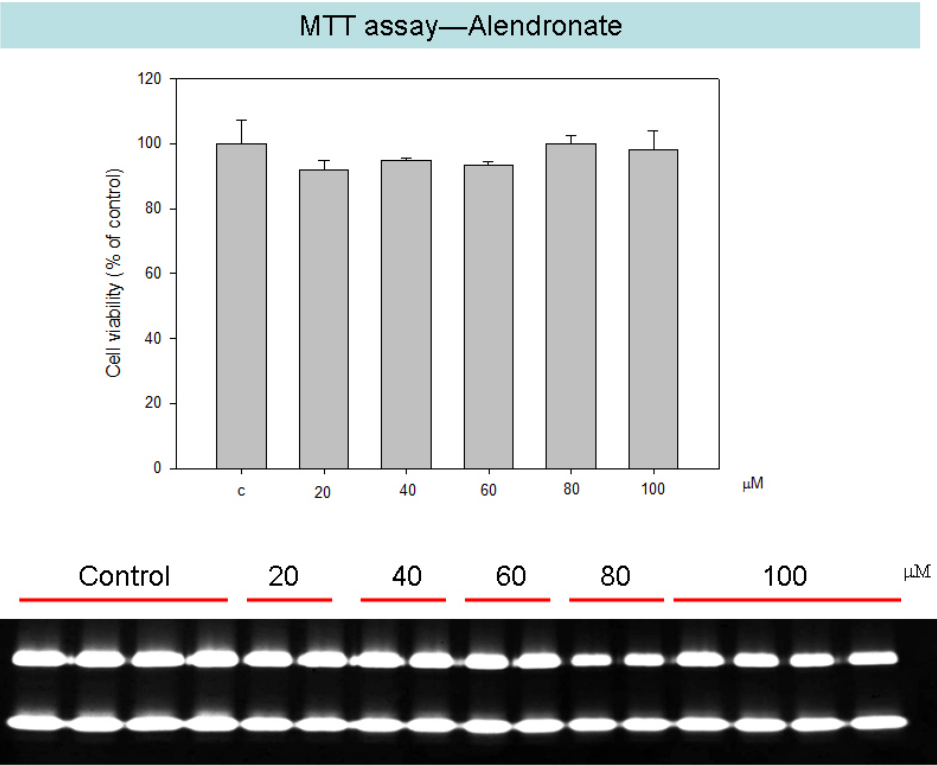


Figure 2

MTT assay—Ibandronate

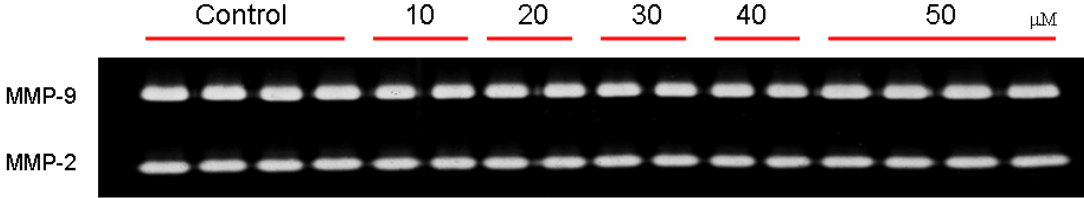
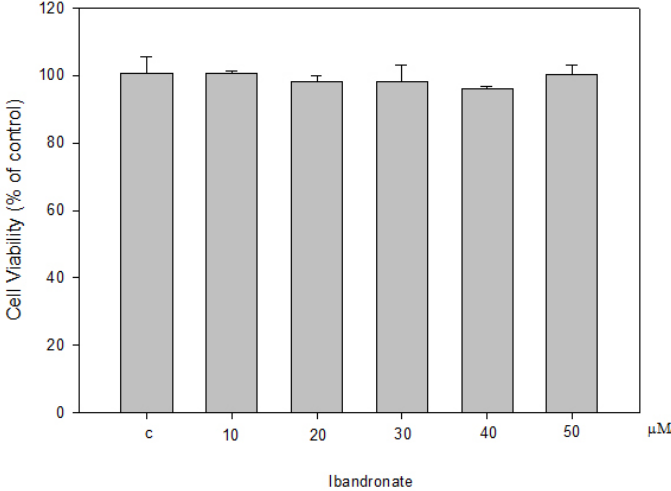


Figure 3

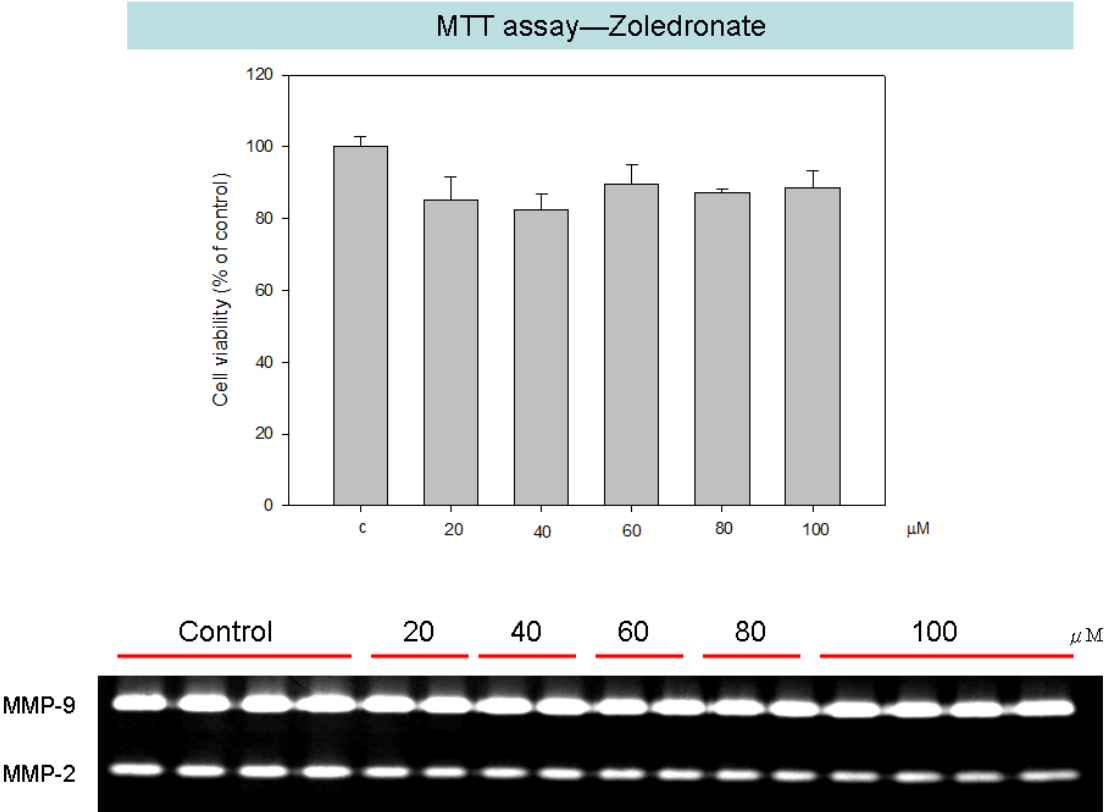


Figure 4

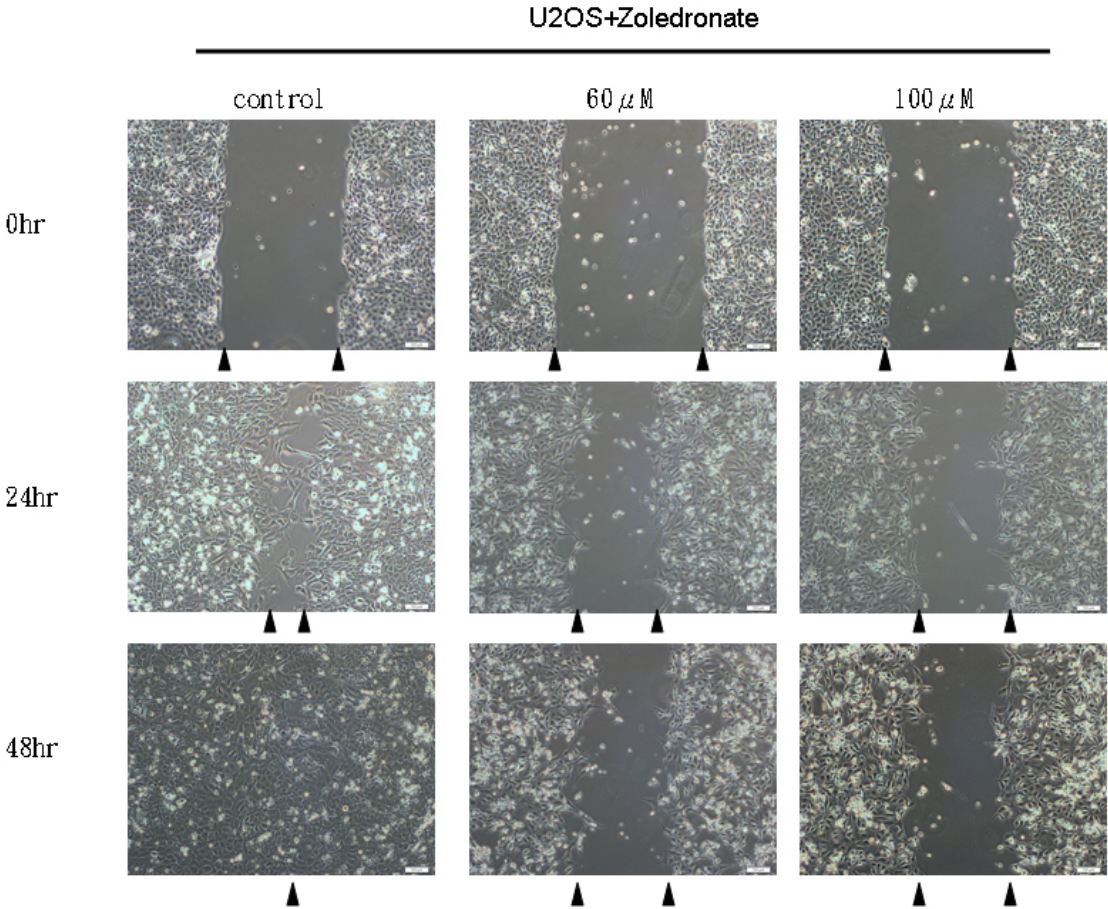


Figure 5

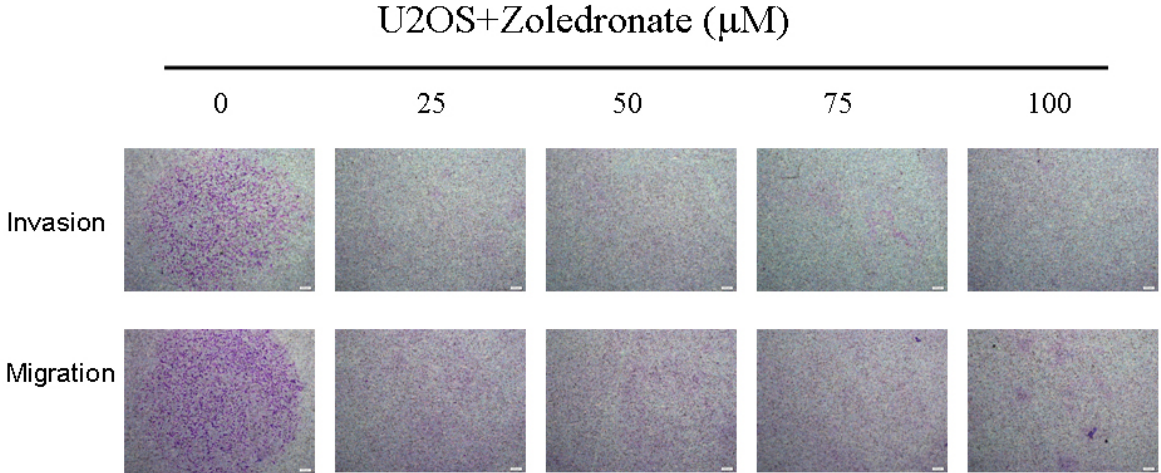


Figure 6

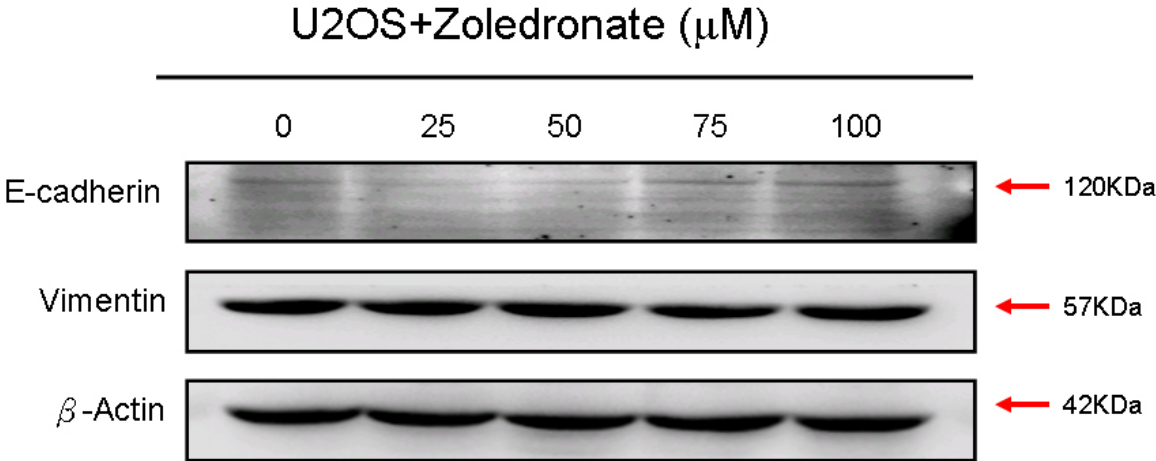


Figure 7

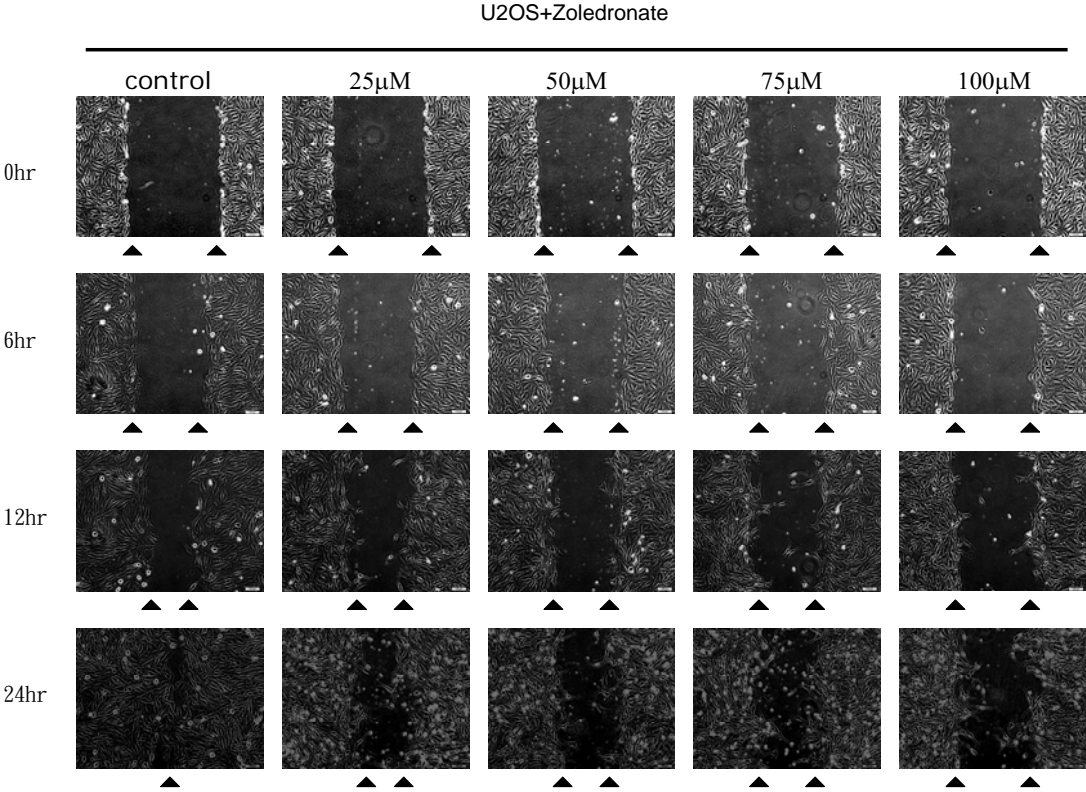


Figure 8

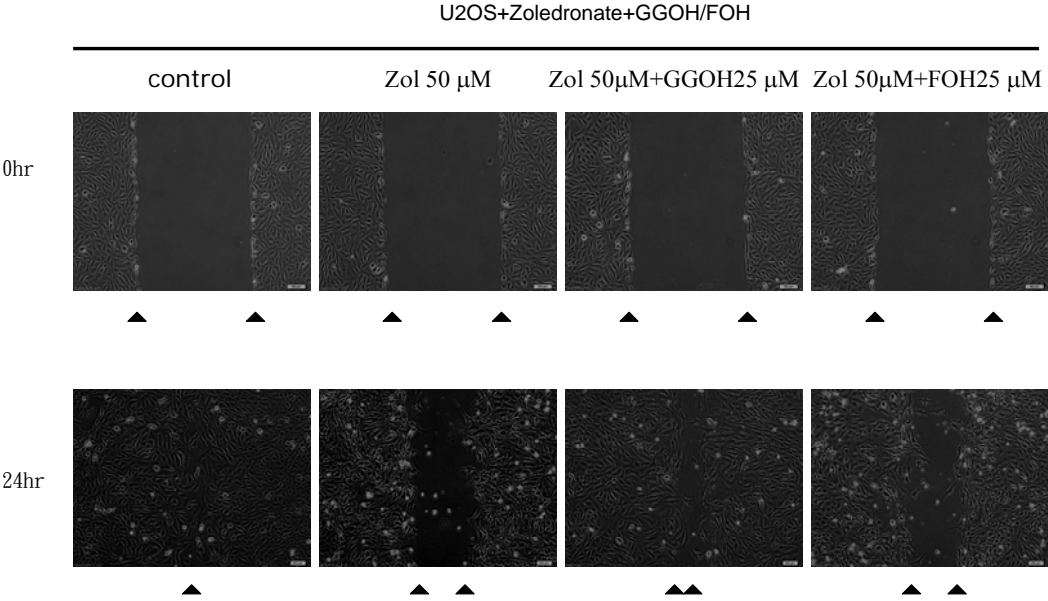
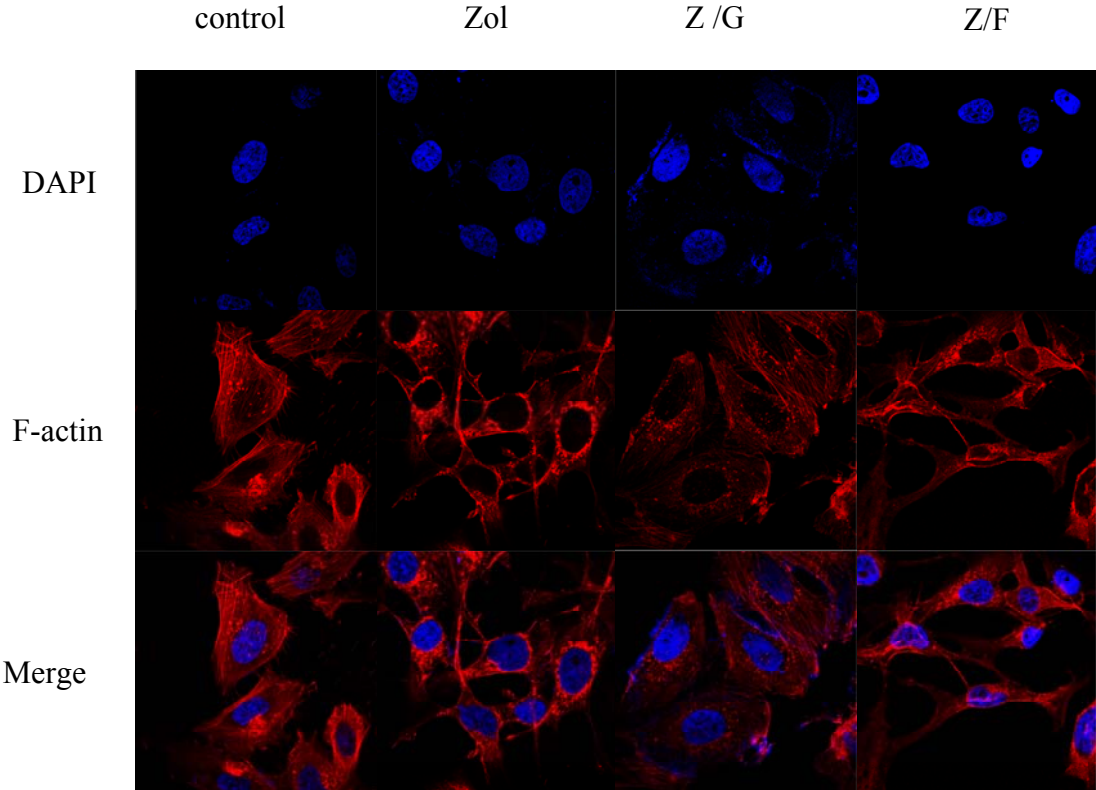


Figure 9



國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2012/10/29

國科會補助計畫	計畫名稱: 探討Alendronate, Ibandronate及Zoledronic acid對不同骨癌細胞株轉移之抑制能力及誘導細胞凋亡的機制及其路徑之研究
	計畫主持人: 呂克修
	計畫編號: 98-2314-B-040-003-MY3 學門領域: 骨科
無研發成果推廣資料	

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：呂克修		計畫編號：98-2314-B-040-003-MY3					
計畫名稱：探討 Alendronate, Ibandronate 及 Zoledronic acid 對不同骨癌細胞株轉移之抑制能力及誘導細胞凋亡的機制及其路徑之研究							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	2	2	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	1	1	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

雙磷酸鹽類藥物，如 alendronate、ibandronate 及 zoledronic acid，已經廣泛使用於臨床上來治療骨質疏鬆症。然而，這幾年來，有許多文獻指出這類藥物除了在治療骨質疏鬆症外，如前列腺癌、乳癌、肺癌等惡性腫瘤骨轉移及高血鈣也是常使用雙磷酸鹽類。因此，雙磷酸鹽類藥物用於治療許多骨疾病的重要地位是無庸置疑的。雖然雙磷酸鹽類可抑制惡性腫瘤細胞生長能力，甚至高劑量時可促使惡性腫瘤細胞凋亡的作用已經相當明確。但在不同的骨癌細胞中抑制骨癌細胞的轉移方面仍極少被研究。因此，我們利用不同的雙磷酸鹽類藥物（alendronate、ibandronate 及 zoledronic acid）在較低濃度時（0-100 微M）處理骨癌細胞株 U2OS，結果發現，這三個雙磷酸鹽類藥物在低濃度時不影響 U2OS 的細胞存活率，而我們進一步利用 wound healing assay 發現 zoledronic acid 會抑制 U2OS 的轉移作用。而我們進一步利用 Boyden chamber assay 也發現，在低濃度時，zoledronic acid 就會抑制 U2OS 的侵襲及轉移作用。但是進一步利用 gelatin zymography 卻發現這三個雙磷酸鹽類藥物也不影響 U2OS 的 MMP-2 及 MMP-9 的活性。而我們也進一步利用 western blotting 發現，zoledronic acid 也不抑制 E-cadherin 及 Vimentin 此分子。我們進一步發現，zoledronic acid 抑制 migration 是與 F-actin 等骨架蛋白有關，並發現與抑制膽固醇合成路徑（mevalonate pathway）中有關酵素，如 GGPP（Geranylgeranylpyrophosphate）合成酶活性有關。