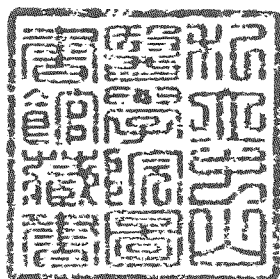


R  
008.8  
4612

私立中山醫學院臨床醫學研究所碩士論文

環孢靈對骨膜細胞成骨性的影響

**Effects of Cyclosporine-A on the osteogenic  
capacity of periosteum-derived cells**



指導教授：李天翎副教授

研究生：楊麗秋

參考書恕不外借

中華民國八十七年一月

中山醫學院圖書館



C048581

~W2Z2;授權書~W1Z1;  
(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 醫學研究所  
\_\_\_\_\_ 組 82 學年度第 1 學期所撰 碩士 學位論文 。

論文名稱：環孢靈對骨膜細胞成骨性的影響

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 \_\_ 年 \_\_ 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名：李天翎

研究生簽名：楊麗秋 學號：R8201211  
(親筆正楷)

日期：民國 87 年 2 月 16 日

---

- 備註：1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。  
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。  
3. 本授權書已於民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。

~W2Z2;簽署人須知~W1Z1;

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：  
在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金 45 元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入 10%的權利金約美金 20 元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣 500 元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如 第 5 項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：  
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞  
地址：台北市和平東路二段 106 號 17 樓 1702 室

-----  
研究生姓名：楊麗秋 聯絡電話：320634

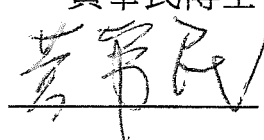
地址：臺中市忠仁街41巷2號

本論文為中山醫學院授予醫學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

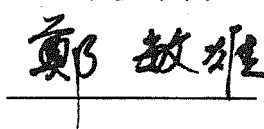
長庚大學醫學院解剖科教授

黃華民博士



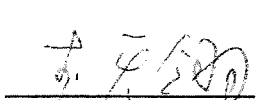
私立中山醫學院醫學系解剖科教授

鄭敏雄博士



私立中山學院醫口腔醫學研究所副教授

李天翎博士



中華民國八十七年元月

學生楊麗秋論文題目為環孢靈對骨膜細胞成骨性的影響，其論文已經中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員審查合格及口試通過，並尤其指導教授核閱後無誤。

指導教授：李天翎

簽名：李天翎

中華民國 87 年 2 月 16 日

## 致謝

在研究所的這些日子，有畢生難以忘懷的往事。最得意的莫過於爲了生養小兒，以悠哉的心境度過了悠悠的孕期。誰知，在臨床、研究所、育兒的考驗下，竟有不知歲月將逝，期限將至的困境。而且，尙不知論文難寫，前後翻覆了幾次，挑燈夜戰之下，還是馬失前蹄了。因此，感謝李天翎老師、銘衡、秀鈴、俊傑、世煌，在實驗上的支持與相伴，感謝鄭敏雄老師對實驗技巧及論文撰寫的指導，還有詼諧風趣的楊肇基老師，謝謝你像朋友一樣的支持。最要感謝的是卓俊吉醫師，幫我打字、編排、幾番折騰下，他常常是飢腸轆轆更改論文到凌晨，害他瘦了一大圈。當然還要感謝我先生父母一路支持我，並在我最忙的時候，接替我照顧年幼的稚子。使我沒有顧慮地在外忙到三更半夜。最重要的，是感謝主，讓我平平地和地走完這一段不算平坦的日子。雖然，年華即將老去，這一生有了這個難忘的歷程，倒也不失遺憾了。

1998年2月

## 中文摘要

由先前的研究已經證實由骨膜衍生而來之未分化的細胞仍具有成骨功能，不論是體內自體或異體骨膜移植，或是體外細胞培養，或以細胞移植於體內，均可觀察到骨質沈積的現象。可達成骨膜移植的路徑及材料雖多，但宿主排斥免疫現象仍或多或少地造成移植的干擾或失敗。環孢靈是是目前使用最廣泛的一種免疫抑制劑，他可以經由抑制白血球間質-2 的產生，來抑制宿主產生免疫排斥反應。但是它也有副作用，如肝、腎、心臟毒性，及牙齦增生等現象；近來亦有因器官移植使用環孢靈素而導致患者顏面畸形的病例報告。因此如何既可以避免環孢靈的毒性，又可同時確保或提升骨膜移植的成功率，長久以來便是醫學界極為重視的課題。本論文之目的，即在於建立一個最適切的體外培養的環境，將由大白鼠脛骨骨膜取得之骨膜細胞做成繼代培養，使這些骨膜細胞在經過長期體外培養之後，既能仍然保有骨膜細胞的成骨分化能力，又能在環孢靈的作用下保持及促進骨膜細胞的分化造骨能力。本研究的結果顯示，骨膜細胞在初代與繼代的培養下，細胞呈多角形似纖維母細胞型態。在細胞長滿時，上皮狀細胞聚集，而纖維狀細胞則散落於周圍，骨膜細胞的培養液在添加維他命 C 即  $\beta$ -GP 後，不論是低密度細胞培養，或高密度細胞培養均有細胞團塊的出現。這種細胞團塊即是具有造骨



細胞潛能的細胞團稱為 Colony forming unit osteoprogenitor (CFU-O)，而且在密度呈  $1 \times 10^5/\text{cc}$  的情況下，仍可見到細胞團的出現。

鹼性磷酸酶 (Alkaline phosphatase ALP) 是在成骨過程中最早出現的標誌，本研究以免疫螢光對 ALP 做了定位及定性分析，已可見光質譜儀做了定量的研究。並研究免疫抑制劑環孢靈 (cyclosporin A CsA) 對骨膜細胞在生長、分化及對 ALP 活性的影響。結果顯示，CsA 並不會影響骨膜細胞型態，也對骨膜細胞生長沒有明顯作用。但是它可增加 CFU-O 的數目，在免疫螢光法中，CsA 可增加 ALP 的螢光呈色，在可見光質譜儀的定量分析下，CsA 亦可增加 ALP 活性的表現。在亞致死劑量之環孢靈存在作用下，骨膜細胞表現出鹼性磷酸酶活性大增，胞內分佈擴展，胞外磷及鈣的沈積也提昇，這些反應在長達四星期的觀察中，並表現出與時遽增的特性，環孢靈素也如預期的並不會造成明顯的細胞增生。本研究初步結果提供了我們將來進一步做動物實驗的設計基礎，也增加了我們對其可行性的信心。

## ABSTRACT

Previous studies have demonstrated that undifferentiated periosteum-derived osteoprogenitor cells (POC) retain their osteogenic potential *in vitro*. Also, it has been shown that the osteogenic capacity of POC cells can be maintained in various situations, be it as autografts or heterotopic allografts *in vivo*; or cells cultured *in vitro*; or as transplanted cell mass into recipients. Although diversified ways and materials for transplants are available, each and every one of them poses few inheritant disadvantages, i. e. the host-vs-graft immune rejections. Cyclosporin A (CsA), one of the most commonly used immunosuppressants nowadays, inhibits the production of interleukin-2 and thus inhibits host rejections. CsA, however, has many undesirable side effects, to name a few, renotoxicity, hepatotoxicity, cardiotoxicity, and the overgrowth of gingiva. It has, therefore, been a challenging subject of medicine advancements to develop a regimen by which not only side-effects of CsA can be reduced or eliminated, but also the success rate of transplantation can be raised. The purpose of the present study was to set up and find out the optimal conditions for an *in vitro* model system of explant culture of POC cells isolated from rat tibiae. Small modifications like modifying the medium composition, the density of cells inoculated on plastics, and other extrinsic factors as well, were attempted such that not only the differentiated markers of POC cells can be faithfully retained for a long period of time *in vitro*, but also some intrinsic factors can be promoted or enhanced by CsA, e. g. the osteogenic capacity. Our data show that in the presence of sublethal maximal dosage of CsA, the expression of alkaline phosphatase, the major marker of osteogenic capacity, by POC cells was enhanced as a function of time. Also, extracellular deposits of calcium and phosphate in the form of mineralizing nodules were increased. Furthermore, as expected, the proliferation rate was not significantly stimulated. Results from the above-mentioned studies demonstrate that the plasticity of differentiated phenotypes can be modified by the synergistic reactions of bioactive factors and matrix milieu. This conceptual findings will pave the way to use cultured cells in cell therapy in the future.

# 目錄

一.簡介	01
總論	01
造骨組織	04
骨膜與移植	06
In vivo	06
In vitro	08
影響 In vitro 骨膜細胞的因子	13
鹼性磷酸酶 ( Alkaline phosphatase , ALP )	14
環孢靈(Cyclosporine A CsA)的作用	16
實驗動機	19
實驗設計與流程圖	21
二.材料與方法	22
細胞培養	22
細胞染色	26
結晶紫染色	26
免疫螢光法	26
環孢靈的滴定實驗	27
細胞之生長曲線	28
鹼性磷酸酶的分析	30

鹼性磷酸酶 (Alkaline phosphatase , ALP )	31
簡單原理	31
ALP 活性校正曲線 (Calibration curve) 之製備	32
Von Kossa Stain	34
三. 結果	36
細胞培養	36
骨膜細胞的初代與繼代培養 圖 1(A-D)	36
肌肉纖維細胞的初代培養與繼代培養 圖 2(A-C)	37
骨膜細胞以高密度 ( $2 \times 10^6 / \text{cc}$ ) 培養 圖 3(A,B)	37
骨膜細胞以低密度 ( $1 \times 10^5 / \text{cc}$ ) 培養 圖 4	38
立體膠原墊的培養 圖 5	38
細胞染色	38
結晶紫染色 圖 6(A,B)	38
細胞骨架 (Cytoskeleton) 之免疫螢光染色 圖 7(A-C)	38
環孢靈(CsA)的濃度滴定 圖 8	39
生長曲線	39
骨膜細胞與肌肉細胞的生長曲線 圖 9	39
骨膜細胞經 CsA 處理後的生長曲線 圖 10	40

鹼性磷酸酶的分析	40
鹼性磷酸酶的定性分析	40
鹼性磷酸酶之免疫螢光 圖 11(A-C)	40
經 CsA 處理後鹼性磷酸酶之螢光染色 圖 12 (A-D)	41
鹼性磷酸酶的定量分析 圖 13	41
高密度與低密度培養之骨膜細胞的 ALP 表現 圖 14	42
Von Kossa Stain 圖 15(A,B)	42
四.討論 (Discussion)	43
圖表說明	47
圖表	53
附錄 免疫螢光染色的配製方法	68
儀器設備	69
藥品及配製方法	70
參考文獻(Reference)	75

## 一. 簡介 ( Introduction )

骨頭即是一種堅硬的特殊組織。是構成脊椎動物重要的組成，以維持其特有的形態。骨的主要結構是由細胞與細胞外基質(extracellular matrix)，即骨基質所組成。目前所知的特殊骨細胞有四種<sup>(7)</sup>，即骨前驅細胞(osteoprogenitor cell)造骨細胞(osteoblast)骨細胞(osteocyte)及蝕骨細胞(osteoclast)四種。骨前驅細胞由間葉(mesenchyme)所衍生而來一種幹細胞(stem cell)，具有分裂及分化的潛能，可以分化造骨細胞。此種前驅細胞主要是存於骨膜(periosteum)的內側面，骨內膜(endosteum)及緻密骨的血管壁內。類似間葉細胞，呈紡錘狀骨前驅細胞大約有二種，一種具有一些內質網可分化為造骨細胞。另外一種，具有較多的粒腺體及游離的核糖體的前蝕骨細胞，可產生蝕骨細胞。造骨細胞來自纖維母細胞，成熟後產生骨。經常可在貯存基質的骨表面發現。其形狀特異，或立方或錐體形，日常排列成連續膜狀。細胞核大，有一明顯核仁細胞質呈顯著的鹼性，含有核糖核蛋白(ribose nucleoprotein)此與骨基質內蛋白質合成有關。細胞質尚含有鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase ALP)它不但可產生骨基質，還參與了骨鈣化作用。骨細胞(osteocyte)，是被骨基質所包圍的造骨細胞分化來的。細胞質呈微鹼性細胞核濃染，脂肪小滴與肝糖，及

與造骨細胞相似之顆粒.蝕骨細胞為一多核細胞，常分布於骨表面窪洞中稱為 **Howship's lacunae**。細胞質呈弱鹼性。具典型囊泡，其本質大多溶體素(lysosome)。蝕骨細胞所分布的骨表面，幾乎均呈蝕刻現象與骨質的吸收有重大關係。

蝕骨細胞可分泌膠原纖維酶 (collagenase)及其他的蛋白分解酵素，作用於骨基質上，而將鈣化的基質分解。骨的再吸收過程完成後,蝕骨細胞就會以退化或退回原來的母細胞方式來消失。

骨基質(Bone matrix)其有機成份佔 35%，主要是含被酸性的粘多醣類所粘附的骨膠原纖維 (osteocollagenous fiber)。而無機成份佔 65%，主要分布於骨膠原纖維的周圍。其所含的礦物質主要磷酸鈣(calcium phosphate)經磷灰石(hydroxyapatite)結晶為主。骨基質以規律的方式，形成並排列為 3-7  $\mu$  m 厚的骨板(lamellae)。

骨之於人如樹之枝幹，人如無骨，豈只毛皮焉附的問題而已，大概在進化史上，就沒有人類一詞了，健全的骨骼架構,是人類得以維持形態，執行功能的必備條件，遺傳

疾病，年齡老化，骨骼病變，腫瘤或意外事故均可能造成局部或廣泛性的骨骼缺損，以致暫時或永久的功能障礙，進而影響日常生活的行為能力。這些往往給人們帶來莫大的痛苦，因此如何來處理這些問題，就是許多科學家一直致力的方向。

修復骨骼缺損的方法中，自體骨移植是相當理想。但是需考慮到來源的位置是否容易取得，而且製造另一個傷口，患者身體心理能否負擔，移植體的存活率也需要列入考慮。另外，異體移植也相當盛行，但要考慮到排斥反應，而且可能感染致命的病原。其他尚有以人工合成的陶瓷，冷凍骨粉，經磷灰石或以骨形成蛋白，來引導未分化間葉細胞聚集，並分化成爲造骨細胞來修復骨骼缺損。

因此，如何在骨缺損內聚集未分化間葉細胞或造骨細胞即是目前處理骨缺損最有效的一種方法。

而深入了解未分化之間葉幹細胞(**mesenchymal stem cells**) 在分化造骨時，其細胞與分子的變化是未來以細胞療法的新式科技發展的基石<sup>(7)</sup>。



## 造骨組織(source of osteogenic cells)

造骨組織的來源主要有骨膜(periosteal envelope)，內骨膜(endosteal envelope)，哈氏內襯(Haversian envelope)<sup>(2)(16)</sup>  
(47)。

其中骨膜覆蓋於除了關節以外之全身骨頭表面，結構分為二層。外層為疏鬆的纖維層(fibrous layer)，內層為緻密的造骨細胞層稱形成層(cambium layer)，部分的膠原纖維進入骨內穿入周邊皮及間質骨板形成 Sharpey's fiber。而其間散落於形成層的細胞呈現上皮狀(epithelial-like)有較高的鹼性磷酸酶反應(alkaline phosphatase activity)，為一種骨前驅細胞(osteoprogenitor cells)。因此，骨膜為造骨(osteogenesis)時骨前驅細胞的主要來源之一。在適當的刺激下，這些骨前驅細胞係經由一連串的細胞轉變，分化成造骨細胞而具有造骨功能<sup>(7)(29)</sup>。

骨膜細胞會分泌 type I collagen，這種膠原是一種骨膠原，在膠原上的緻密小點則是膠原上鈣化的起始點<sup>(8)</sup>。而骨膜的造骨則常見於長骨的生長與骨折時傷口的癒合<sup>(28)</sup>。

內骨膜 (Endosteum) 是骨皮質壁上的單一細胞層，圍繞在

骨髓與海綿的骨小樑組織。這層細胞層細胞層被膜是由立方狀的造骨細胞或呈現休止狀有長梭形核仁和少量細胞質的長梭形細胞所構成。在移植時內骨膜與骨髓是參與造骨作用之骨前驅細胞(osteoprogenitor cells)來源處。造骨作用的引導，主要是由壞死的骨頭與骨髓組織，會分泌一種俱引導作用的物質，這種物質會被由原始的間質細胞所形成的吞噬(phagocytosis)系統吞噬。在被吞噬後，會誘導 induce 間質細胞經一連串分化作用而形成造骨細胞(osteoblast)。

哈氏系統內襯(Haversian envelope)在緻密骨中，其骨質呈現規則排列，骨中有許多縱走的渠道稱為哈氏管(Haversian canal)，彼此有橫面及斜面的連繫。在哈氏管只有內面才有微血管，而且披覆著特別的內骨膜，稱為 Haversian lining

(35)。

## 骨膜(periosteum )與移植(Transplant )

### in vivo 骨膜組織移植

1989 Verstein et. al. 在 in vivo 將骨膜組織自體移植於異位區的動物研究，是爲了觀察骨膜在非骨頭的異位區是否仍有成骨效應，而有了 vascularized periosteal graft 的研究，這種移植是仍然有供應骨膜的血液，這種自體異位區的骨膜移植仍可觀察到成骨效應(osteogenesis)的鈣化現象 (4) (42)。

1990 Nakahara et. al. 在 in vivo 將骨膜組織異體移植於免疫缺乏或不全的動物異位區，不論是在裸鼠或免疫不全的兔子的異位區上，仍有成骨效應發生(42)。

1991 Koshihara et. al. 在 in vivo 骨膜組織的自體移植，利用電流刺激脛骨骨膜後，可移植於因腫瘤而切除下顎骨的缺損區，骨膜可在塑形的鈦金屬網板上，形成鈣化組織(30)。

1992 Hsu et. al. 在 in vivo 將骨膜組織異體移植於異位區的動物實驗中，骨膜取下後對折縫合於異體之肌肉層，於術前一天，術後 4 天投予免疫抑制劑(cyclosporine A, CsA)，異體移植後的骨膜組織，仍然具有成骨效果(19)。

其它影響骨膜成骨效應的有保持形成層 (Cambium layer) 的完整,是骨膜組織移植時必備的條件,否則就失去其特殊的成骨功能。在骨科的應用上牽引(distractio) (67), 位移 (translation) (15) (38) 均可見到成骨作用。早產兒常用的震盪器(vibrator), 也會刺激肋骨的骨膜, 使得肋骨異常增厚肥大(63)。而影響 in vivo 骨膜表現的因子, 如太空飛行(space flight) (62), 在一星期的太空飛行的 S.D 大白鼠會使脛骨 diaphysis 的骨膜性骨形成, 造骨細胞的大小降低並使皮質骨與骨小樑的形成消失。

1993 Tanaka T. 在老鼠活體以合成 TGF- $\beta_1$  注射發現 TGF- $\beta_1$  可以在頭頂部 (parietal bone) 有膜內骨鈣化 (intramembranous ossification) (59)。

## 在 *in vitro* 骨膜細胞的成骨效應

細胞激動素對骨膜細胞在 *in vitro* 的培養亦有影響，如 TGF- $\beta$  是 Transforming growth factor 的  $\beta$  群，最初是於腫瘤的萃取物中測得，而命名為”Transform”，是因為它能引起並維持腫瘤或變形的細胞的表現型。TGF- $\beta$  可由血中的血小板或骨細胞或噬骨細胞分泌而來，而在一般的組織培養或老鼠胚胎的組織培養液中，亦有 TGF- $\beta$  出現，TGF- $\beta$  有 TGF- $\beta_1$ 、 $\beta_2$ ，不論從骨頭或由血小板來的 TGF- $\beta$  均能促進細胞增殖，增加膠原的合成（collagen synthesis），並可以在 *in vitro* 促進雞的骨膜細胞或老鼠胚胎未分化間質細胞的軟骨生成（Chondrogenesis）<sup>(46)</sup>，而由噬骨細胞來的 Latent TGF- $\beta$ ，則會引起骨吸收，表示 TGF- $\beta$  與骨頭重整（Bone remodeling）的骨代謝的調控有關。

TGF- $\beta$  在造骨細胞的實驗模型<sup>(9)</sup>（1987 Micheal Centrella Osteoblastic-like model, OB-Like model）會抑制 OB 細胞的分化而使細胞保持在未分化的狀態，使之雖有細胞外基質生成卻無法有礦化現象產生。而且 TGF- $\beta$  雖可以提高 1,25 Vit D<sub>3</sub> receptor 的數目，但卻會抑制由 1.25 Vit D<sub>3</sub> 所促進的 Osteocalcin 的生成，而 osteocalcin 是鈣化中、後期所出現的骨基質蛋白。

在 OB-Cell 增殖後，TGF- $\beta$  的濃度會逐漸降低，而使得細胞可經由其他細胞激動素的調控而進入分化期，而出現鈣化特徵。

1990 Hock et. al. 表示 TGF- $\beta$  對 in vitro 的骨膜細胞有廣泛性生長分裂的效果，它有促進骨基質的沈積的效果<sup>(18)</sup>。1990 Izumi T.的研究顯示 TGF- $\beta_1$  不但對骨膜細胞的生長沒有影響，而且 collagen pro  $\alpha_1$ (II) mRNA 會受 TGF- $\beta_1$  的刺激而促進其基因表現<sup>(22)</sup>。由於 1991 Nakhara et. al.<sup>(44)</sup>發現在高密度培養骨膜細胞有形成骨軟骨分化（Osteochondrogenic differentiation）的能力<sup>(42)</sup>。1993 Iwasaki et.al.則發現 TGF- $\beta_1$  在此模型下會促進軟骨生成，卻抑制成骨作用。<sup>(23)</sup>而 1995 Iwasaki et. al.以此模型發現 TGF- $\beta$  可促進軟骨生成（Chondrogenesis）而 Basic fibroblast growth factor(b FGF)，對此模型中的纖維狀細胞則有促進生長增殖，但對 osteochondrogenesis 的分化有抑制的作用<sup>(26)</sup>。

1995 Lee et.al.在 in vitro 骨膜的 explant model 中 collagenase 的分泌會受到細胞激動素（cytokines）的影響，IL-1 $\alpha$  抑制 phagocytosis，而 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 會加強 phagocytosis 的作用，但在 interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) 與 TGF- $\beta$  並用時卻有協同作用。結論認為

IL-1  $\alpha$  與 TGF- $\beta$  可能可以調控胞內或胞外的膠原的分解 (61)。

**Bone Morphogenetic Protein (BMP)** BMP 是由 bone 所萃取的蛋白質，具有引導由軟骨生成分化成骨形成的能力。是 TGF  $\beta$  Superfamily 的一員，有 BMP-1, BMP-2, BMP-3 及 BMP-4 (64)。

1994 Idsdski et. al. 在 in vitro 的骨膜細胞培養中加入 BMP-2(10-100ng/ml)，可以縮短 ALP 表現的時間，鈣化的程度增加，BGP (即 osteocalcin) 的出現提早，而且呈現 BGP-positive 的細胞層較厚，但其對 uronic acid 的含量及  $\alpha_1(\text{II})$  collagen mRNA 的表現沒有影響 (24)，而且 BMP-2 對骨膜細胞或造骨細胞(osteoblast)均有促進 ALPase 活性，膠原合成增加並促進對 PTH 刺激有反應的 cAMP 的增加 (10)。

1991 Tasaki et. al. 與 1994 Scutt et. al. 的研究指出，PTH (parathyroid hormone) and PGE<sub>2</sub>(prostaglandin E<sub>2</sub>) 在短期時間是以增加 cAMP 來刺激生長(proliferation)，長期則會因 cAMP 的胞內濃度增加而抑制了內生 PKC 的活性，而抑制了生長 (61) (62)。



1, 25(OH)<sub>2</sub> Vit D<sub>3</sub> 是 Vit D<sub>3</sub> 中最具生物活性者<sup>(48)</sup>，是維持鈣平衡的調控者之一，它對骨頭的鈣與磷的動態平衡很重要，它可經由一些生物活性來促進生長與分化的遞變。1983 Uchida et. al. 指出 Vit D<sub>3</sub> 在 OB-Cell 實驗模型中，它對未分化細胞的生長增殖作用沒有影響，但卻會抑制這些細胞的分化形成骨細胞團 (bone nodules)，但在生長增殖後，加入 Vit D<sub>3</sub> 會有 ALP activity 及 osteocalcin(O.C) 的增加，而 O.C 即是分化晚期的 Bone protein marker<sup>(60)</sup>。作者推論這可能是未分化細胞過早暴露於 1.25 Vit D<sub>3</sub> 下，會干擾骨生成的既定程序，而影響細胞形造骨細胞團 (Bone nodules) 的能力。所以在骨分化的早期，OB-Cell 在暴露於 1.25 Vit D<sub>3</sub> 之前，需要其它 cytokines 來參與調控。在 Rat OB-Like Cell Model 中，TGF-β 與 Dexamethasone 均會增加 1.25 Vit D<sub>3</sub> 的 Receptor level，而 Retinoic acid 在高劑量下會減少 1.25 Vit D<sub>3</sub> 的 Receptor level，而 1.25 Vit D<sub>3</sub> 卻會減少或阻抑 Testosterone(50 nM) 所促進的 <sup>3</sup>H-Thymidine 吸收的程度<sup>(25)</sup>。

Flurbiprofen 是一種非類固醇之抗發炎藥物，1998 Jee et. al. 顯示 flurbiprofen 可因直接對造骨細胞的促進作用而有 periosteal bone growth，而且可在不降低骨生成下引起 depressed bone resorption<sup>(27)</sup>。



1990 Bellows et. al. 認為 Dexamethasone(Dex) 亦是細胞生長及分化的重要調控者，Dex 對有成骨性的前驅細胞，早期有促進<sup>3</sup>H-thymidine 標示的細胞數目及 ALP 活性的作用 (1) (5) (52) 。

1986 Tenenbaum et. al. 在 *in vitro* 的 Explant culture 中發現有對折(folded)的骨膜、與沒有對折但骨膜的形成層朝上的培養，才有造骨效應的礦化現象，形成層朝下的培養則沒有礦化產生 (55) 。

動物年齡對骨膜細胞成骨性的影響至今仍有爭論，而 1991 Koshihara et. al. 認為骨膜供給者的年齡 (donor age) 並不會使從人類來的骨膜細胞失去其礦化與形成 ALP 的能力 (31) 。然而 1991 Nakahara et. al. 卻持相反意見，他認為年齡會影響骨膜的骨生成能力，超過 22 歲的骨膜供給者就會失去在 *in vivo* 成骨軟骨生成的表徵，他建議利用年輕的骨膜供給者，以細胞再生的方式修復骨骼組織。1994 koshihara. et. al. 對膠原形成的研究，認為在人類 65 歲以前年紀大的骨膜供給者的骨膜細胞的抑制膠原分解酶活性 (Collagenase inhibitory activity) 是年輕的 5 倍多，因此有可能從年齡大的骨膜供給者來的骨膜細胞，可因抑制膠原

的分解，而聚積更多的膠原，有利於骨外基質的形成<sup>(32)</sup>。

1994 Groeneveld et. al. 其骨膜細胞經酶解離後於 *in vitro* 培養。骨膜的來源可以取自頭顱(calvaria)、肩胛骨(scapula)、腓骨(ilium)與脛骨(Tibia), 經實驗發現，來自頭顱的骨膜細胞的成骨效應最差，來自肩胛骨與脛骨的骨膜細胞均有相似而且成骨效果較好，最好的是來自腓骨的骨膜<sup>(17)</sup>。

其它影響骨膜細胞成骨能力的即是如何保留骨膜細胞處於一分化狀況。在 1990 Nakahara et. al. 等比較了以直接 inoculation，或藉由 diffusion chamber<sup>(43)</sup>，porous calcium phosphate<sup>(45)</sup>為載體(carrier)，將骨膜細胞移植于異位區，其中以 Ceramic Assay 顯示能將未分化特性保留到第 8 次繼培養代，即第 20 代仍有成骨能力。

而 *in vitro* 培養的細胞密度，作者也認為至少要有  $5 \times 10^5$  cell/ml 才會有骨軟骨生成的現象。

影響 *in vitro* 骨膜細胞成骨作用的顯微環境因子

*in vitro* 細胞培養的細胞密度至少要有 500000 以上，才會有明顯的造骨作用。1992 Nakahara et. al. 在高密度培養下，

在上層有骨形成,下層則有軟骨形成<sup>(44)</sup>。繼代培養次數及 population doubling 的代數骨膜細胞,在大約第 8 次 繼代培養約第 20 個 population doubling 後,會完全失去成骨作用,但是一些添加因子會影響骨膜細胞,使其增加造骨功能。

1989 Koshihara et. al. 認為 Vit C 可增加 Type I collagen 的合成。1981 Tenebaum 的研究顯示在 in vitro 若沒有添加  $\beta$ -Glycerophosphate( $\beta$ -Gp) 就沒有礦化 (mineralization) 現象;因  $\beta$ -Gp 在 in vitro 可充當 ALP 的受質,以提供礦化所需的磷酸基<sup>(29)</sup>。因此  $\beta$ -Gp 的添加呈現 phase sensitive 的情形,在培養第一天到第三天加入,有鈣化,若在第六天後加入,則仍無鈣化出現<sup>(58)</sup>。

1990 Kaplanfs et. al. 指出骨膜細胞對氧壓具高度敏感性,氧壓約 5%-9%與微血管中的氧壓類似,可表現出 ALP 的活性<sup>(14)</sup>。

### 鹼性磷酸酶(Alkaline phosphatase ALP)

ALP 是一種可與細胞膜鍵結的醣蛋白(glycoprotein),以共價方式與 phosphatidyl inositol 連結,而連附於細胞膜上<sup>(34)</sup>有三個器官是 ALP 的主要基因區(gene loci)即胎盤小腸

和肝，骨，腎(liver/bone/kidney : L/B/K)。然而它們的磷酸酶產物卻有明顯的區別，在 L/B/K 的 ALP 中，以造骨細胞(osteoblast)的 ALP 活性較高.;在纖維母細胞(fibroblast)或肝腎乳房及腦來的細胞均呈較弱的 ALP 活性反應。

ALP 的作用，主要是從細胞內轉移磷酸基(phosphate group)到胞外基質，並移除或抑制鈣化抑制者(inhibitor)的作用，以達到鈣化作用但在 *in vitro* 培養中，要產生鈣化除了要有多層細胞結構外，尚需要有足夠的磷來參與老鼠血清中的磷酸濃度約 10 mM。在 *in vitro* 的培養中缺少磷酸基的供應，就沒有礦化現象。1983 Charrier et. al.指出在以 10mM 磷酸提供培養後，可得到完全礦化的結果。若以 5-10mM 的磷酸基供養後約有 80%礦化出現，若磷酸基在 2.5mM-5mM 則只有稍微的礦化可見，由此可知磷對於 *in vitro* 礦化的重要如同 ALP 一樣<sup>(8)</sup>。

1990 Weinreb et. al.認為 ALP 在骨鈣化中最早出現，可做成骨鑑定的造骨標誌。ALP 的活性直接與骨鈣化增加有關。因 ALP 活性即為造骨細胞(osteoblast)的表現。因此 ALP 活性的增加可視為造骨作用的早期指標<sup>(65)</sup>。

## 環孢靈(Cyclosporine A CsA)的作用

(Cyclosporine A CsA) 是由 fungus (*Tolypadadium inflatum*)與(*cyllindrocapon lucidium*)提煉出來，有 11 個胺基酸組成，厭水性的環狀多肽類(cyclic peptide)<sub>(49)</sub>。它是最早使用於器官和骨髓移植時抗排斥的免疫抑制劑。而在免疫系統中 T 淋巴球的 T helper(T<sub>H</sub>)是免疫反應的起動者，T<sub>H</sub> 受到抗原呈現細胞(Antigen presenting cells)如單核球吞噬細胞 B 細胞，棘細胞和一些 T 細胞，呈現第二類人類主要組織相容 (Human major histocompatibility, MHC) 與抗體複合體，以及白血球間質-1(IL-1)而活化 T<sub>H</sub>，T<sub>H</sub> 活化後會表現 IL-1 接受器，並分泌 IL-2，IL-2 不僅可以刺激胞毒性 T cell，生長 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 對於 T<sub>H</sub> 本身也有自我促進的作用。所以 IL-2 可將免疫反應擴大，而 CsA 的免疫抑制，即是抑制了輔助 T 細胞 (T helper cell)，進而抑制了 IL-2 的產生，而阻礙了 CTL 的活化，而產生 HTL priming，而 HTL priming 所產生的主要是 CD8<sup>+</sup><sub>(41)</sub>產生了免疫抑制效果。CsA 在異體器官移植時，即是抑制移植體受到 donor allo-antigen specific T cell 的浸潤。

CsA 可抑制在為成熟的胸腺細胞 (Thymocyte) 及 T-cell hybridomas 所具有 TCR-mediated apoptosis。TCR 即 T

cell receptor，位於 Tc 上。而 TCR-mediated Apoptosis 必須有基因的表現，而此傳遞的因子即 Nur 77，CsA 即是干擾了 DNA 與 Nur77 protein 的結合，而因此抑制了 T-cell negative selection 所特有的 TCR-mediated Apoptosis，而造成 Autoimmune 上的疾病<sup>(68)</sup>。

CsA 的免疫效果，主要由抑制 IL-2 的生成來達成。它同時也可抑制許多 Ca<sup>++</sup> dependent Transcription factor，如 NF-AT、NFIL-2A、NF-IL2B 及 NHKB<sub>(41)</sub><sup>(49)</sup>，並調控 INF  $\gamma$  與 TNF- $\alpha$  的基因表現<sup>(12)</sup>。由於 CsA 在異體器官移植時，必須長期連續使用，否則就無法抑制排斥反應。因此 CsA 的副作用很多，例如在腎臟移植時，腎臟的損傷與腎性高血壓就是因為 CsA 對血管內皮細胞的毒性作用，抑制了血管內皮細胞中 prostacyclin 的產生，而直接增加了血管收縮的敏感性。這種血管功能失常所以引起的腎及周邊小動脈收縮會造成異體腎臟移植後的高血壓及腎衰竭。而這種 CsA 的毒性作用，可以用鈣阻斷劑（calcium channel blocker）Diliazem 來防止<sup>(13)</sup>。

而 CsA 的副作用上有心臟毒性-心肌肥大，肝毒性，神經毒性，還可藉由 upregulation IL-6 gene expression 使得牙齦呈現過度增生腫大的反應<sup>(66)</sup>。

而 CsA 並非只用於器官移植時的免疫抑制劑，它還可以用來治療 Type I Diabetes Mellitus(第一型糖尿病)、psoriasis 牛皮癬、AIDS 愛滋病、multiple sclerosis 多發性硬化、myasthenia gravis 重症肌無力、aplastic anemia 再生不良性貧血<sup>(21)</sup>、pure red cell anemia 純紅血球貧血、erosive lichen planus 糜爛性扁平苔蘚、allogenic encephalomyelitis 過敏性腦脊髓炎、mycosis fungoides 蕈狀肉芽腫、systemic lupus erythematosus 多形性紅斑、Schistosomiasis、Chronic active hepatitis 慢性活動性肝炎及 Rheumatoid arthritis 風濕性關節炎<sup>(3)</sup>。對於 CsA 在免疫抑制時的不良副作用，可藉由不同投藥方式來降低，如在狗的肺臟移植時，少量的 FK506 (0.003mg/kg) 與 CsA(6mg/kg)共同投予，FK506 為另一種免疫抑制劑，其免疫抑制效果比單獨使用時還好，而副作用也比單獨使用時還少<sup>(20)</sup>，另外，Diltiazem 是一種鈣通透性的抑制劑<sup>(13)</sup>，可降低 CsA 的毒性與抑制由 CsA 所引起的血管收縮。這種混和使用 CsA 及其他的共同藥，對於腎臟移植相當重要，CsA 在其他投予下有急性炎症時，CsA 可以調控 neutrophil 的浸潤，即是減毒( attenuate)作用<sup>(34)</sup>。

在角膜移植時，因 CsA 減少了 IL-2 引發之角膜充血

(revascularization)，抑制排斥反應而增加了角膜的存活<sup>(40)</sup>。所以 CsA 在 *in vivo* 所扮演的角色非僅惟免疫抑制劑。端看使用時機，劑量多寡，是否混合投予。是良藥也是毒藥。

實驗動機源自 1992 Hsu et al.以六週大的 S.D.大白鼠骨膜 (5x3 mm) 為材料將骨膜的成層 (camium layer) 朝內對折縫合移植於異體 (實驗組) 與自體 (控制組) 的肌肉上，實驗組以 CsA 為免疫抑制劑，以 5 mg/kg 施予術前一天與術後持續 4 天。其造骨效果與自體移植組相似，在第 4 及第 7 天除了少許發炎細胞浸潤外，有造骨與血管形成；在第 21 天即有骨化與類骨質形成，有含哈氏系統的皮狀骨出現，而且發炎細胞也更減少了。因此 CsA 使用於異體異位區的骨膜移植，有明顯的成骨作用<sup>(19)</sup>。雖然文獻上有 CsA 會造成 *in vivo* 骨吸收的報告。但在 *in vitro* 及 Hsu et al.的實驗中，可能 CsA 並非單純的免疫抑制劑，CsA 對造骨細胞在 *in vitro* 的造骨分化潛能有保留或促進作用。因為 CsA 造成牙齦增生現象在 *in vitro* 的實驗已多<sup>(66)</sup>。但以 CsA 來觀察骨膜細胞對造骨的影響，卻有待進一步的研究。

由文獻及前人實驗得知免疫抑制劑環孢靈 (Cyclosporine-A CsA) 不只是作用於 T-淋巴球，對於免疫系統以外的多種細胞也能產生不同的藥物作用，如促進牙



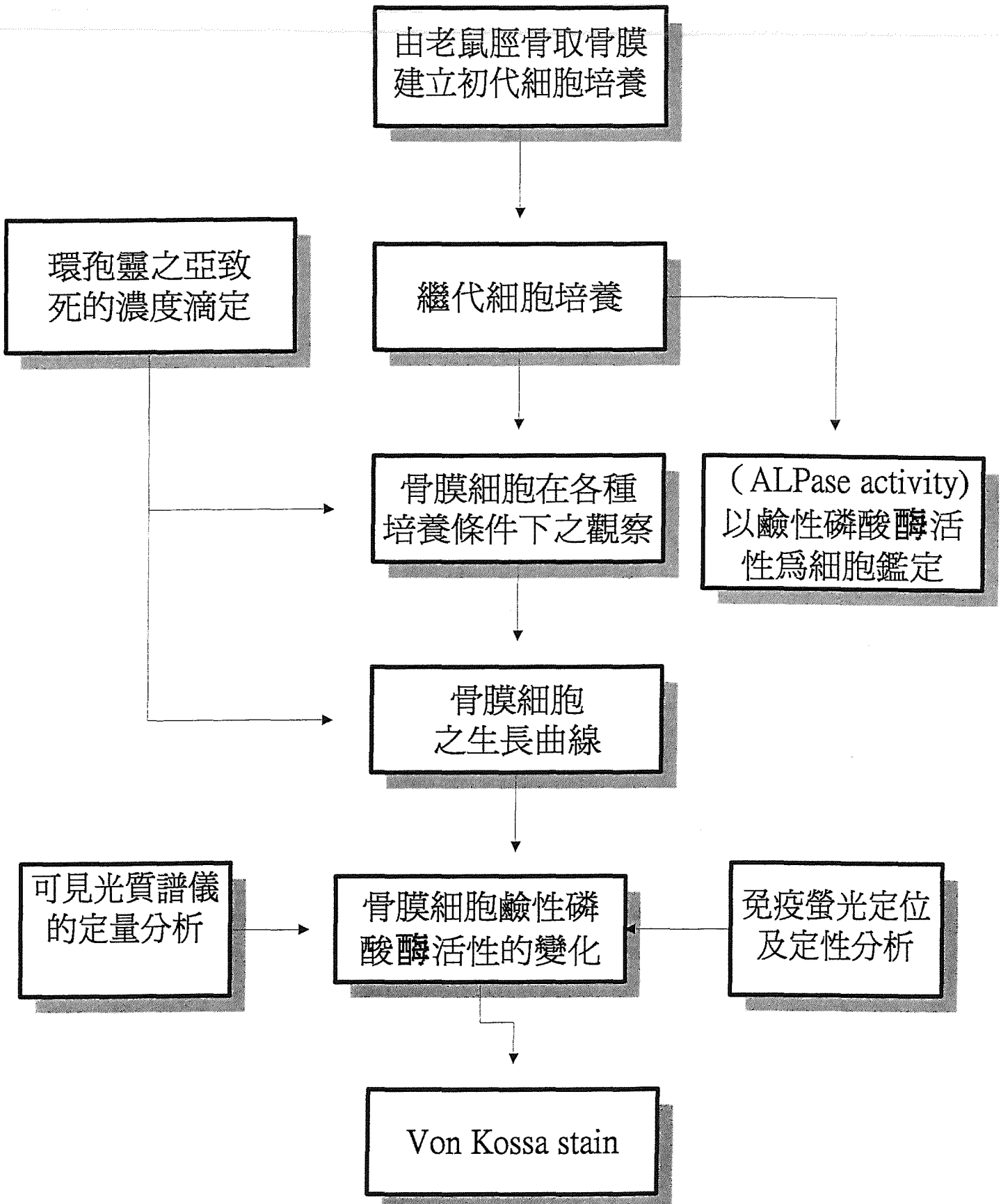
齧細胞的過度增生（overgrowth）。

本實驗之目的，乃在於探討免疫抑制劑環孢靈（cyclosporine-A）對體外培養之骨膜而來的造骨前驅細胞（Periosteum derived osteoprogenic cell）的生長與分化特性的作用。亦即欲測試 CsA 處理骨膜細胞後的幾種可能結果：

1. 促進骨膜細胞的生長增殖（proliferation）。
2. 促進或保留骨膜細胞在 *in vitro* 時表現未分化特性。

這些疑點的澄清，有助於未來作骨細胞移植手術時，尤其是異體移植時的重要參考或改進的依據。

# 實驗設計與流程圖



## 二. 材料與方法 (Material and Methods)

### (一) 細胞培養

#### (1) 骨膜細胞 (Periosteum-derived Osteopogenitor cell) 的初代培養與繼代培養：

骨膜細胞的初代培養方法主要是根據 1992 Hsu et al.<sup>(6)</sup> 的方法來剝取老鼠脛骨骨膜，再以下列二種的方法來取得骨膜細胞。其中一種是參考 1989 Nakahara et al.<sup>(7)</sup> 的方式，用膠原蛋白酶將細胞由骨膜分離而得，另一種方式則是骨膜之組織培養 (Explant culture)。

#### 組織來源：

主要是以六週大的 S.D 大白老鼠 (Sprague Dawley)，重量約 150 公克左右，經 Ketalar (KETAKAR 克太拉、派得公司、每公撮含 Ketamine 50 公絲 Phemerol Chloride 0.1 公絲 (as preservative) inj，每支 1cc 的量做深度麻醉後，將老鼠下半身剃毛後以 0.5% hibitan (ZENECA) 消毒。再用無菌操作，剪開老鼠後腿前內側的皮膚，撥開筋膜後，此時要很小心的將肌肉與骨膜剝離，否則骨膜的組織很容易與肌肉連附而一起剝離。待將表面的肌肉小心地清理乾淨後，可發現骨面上尚存留一透明薄膜，此即是骨膜，可用 15 號刀片將骨膜切開，並小心剝離骨面。此時骨膜組織可

置入冰桶上含 10%PSA 以滅菌的 PBS 的培養皿中，要使骨膜完全浸潤，而且時間不可超過三十分鐘為宜。然而移到無菌真空操作台（Lamina flow hood）繼續操作。以滅菌的 PBS 浸潤五分鐘二次後，以 5000 rpm 離心三分鐘，將上清液倒掉。再加入 1cc 0.25% Collagenase 的培養箱中一小時後，加入 0.5 cc 的純 FBS，吸出上清液於另一收集試管中。重複此步驟三次。將所收集的細胞置於含 20%FBS、1%PSA、（penicillin 10000 unit/ml、streptomycin 10mg/ml amphotericin B 0.025mg/ml）的 F-12（SIGMA）培養液的 75 毫升的培養瓶中。依據多次實驗經驗，要培養 3-4 天左右，骨膜細胞的初代培養才有穩定的發展。所以第一次培養液的更換就不需要太早，可視實際情況來決定更換時機。第二種取得骨膜細胞的方法，是骨膜剝下來後，經 10% PSA 溶液浸潤，以滅菌 PBS 沖洗二次，置入含 200  $\mu$ l FBS 的培養皿中以 15 號刀片切碎，再用滅菌的蓋玻片蓋在散落的骨膜組織之上，可視情況再加少許的 FBS 浸潤而不會使蓋玻片先浮動。經過幾天培養，細胞會慢慢地由組織邊緣出現。等有細胞出現即可以用含 20% FBS. 10% PSA 的 F-12 培養液繼續培養。由於早先的培養皿中只有少量的 FBS，所以必須注意不可使 FBS 乾掉，否則會前功盡棄。等細胞在特定的方格中有長滿的情況下，要用 0.25% Trypsin-1mM EDTA 拆下細胞，此時要注意時間的控制，已有 2/3 的細胞

受到影響而呈現游離漂浮現象時，即以 FBS 終止反應，並小心地收集細胞，切勿使骨膜組織也受到影響，剩下的細胞與組織則繼續培養 3-5 次即丟棄。而收集的細胞則移入 75 ml 的培養瓶中培養。骨膜細胞的繼代培養，宜不超過 5 次。實驗所採用的細胞以第 2-5 次的繼代培養的細胞為主。

### (2)肌肉的纖維母細胞的培養：

肌肉的纖維母細胞來自 S.D 老鼠後小腿的肌肉組織，它的培養方式以組織培養為主。亦即將肌肉剝碎後，附上蓋玻片，以 FBS 培養而得。而肌肉的纖維母細胞是用來執行實驗的控制組之用。

### (3)高密度細胞與低密度細胞培養法之製備：

將直徑 13mm 圓形的蓋玻片先滅菌後置入 6 格培養盤中，將骨膜細胞配成每 cc 培養液中有  $2 \times 10^6$  的細胞濃度，取 50  $\mu$ l 置於每一個蓋玻片上，並將之均勻打散，置於培養箱中培養 30-60 分鐘，待細胞已完全附著，並有展開現象時，再加入培養液。而低密度細胞培養則是以培養液將相同數目之細胞打散，均勻培養於培養皿中。

#### A. 在高密度細胞培養下

1. 培養 24 小時後，做免疫螢光染色之用。

2.培養 3.10.28 天者，可作為鹼性磷酸酶螢光鑑定之用。

3.培養 21.28 天，可用來做 Von kossa stain 以觀察 in vitro 鈣化的情形。

## B. 比較高密度與低密度細胞培養之不同

### (4)以高密度細胞濃度在立體膠原墊的培養

在 24 well 中，每個 well 由 0.5 cc 膠原基質製成，若實驗時，總體積為 A，則其配方如下：

$$V-100 = 0.5A$$

$$0.1N \text{ NaoH} = 0.5A \times 1/8 = 0.625A$$

$$10x \text{ MEM} = 0.5A \times 1/8 = 0.625A$$

$$\text{DMEM} = A - (0.5A + 0.625A + 0.625A) = 0.375A$$

配好後，於 37°C 水浴中充分混合，在每個 well 加入 0.5 cc 的膠原基質，再放入 37°C 培養箱中 1 小時，待其完全凝結再將細胞以 trypsin/EDTA 拆下，配成每 cc 含  $2 \times 10^6$  細胞，每個 well 植入 50  $\mu$ l，再放入 incubator 中一小時，使其貼附於膠原基質後，才加入 F-12 培養液，由於膠原基質黏稠度高，所以必須多配 2 個 well，以防耗損過多，最後不夠使用。

## (二) 細胞染色

### (1) 結晶紫染色

方法：

細胞培養至特定天數後，先抽掉培養液，再以 PBS 浸洗兩次後，固定於 2.5%(v/v) glutaraldehyde 之 PBS 溶液中，再用去離子水洗三次，然後以 1% aqueous crystal violet 染 5 分鐘後，再用二次去離子水浸洗後，即可觀察。

### (2) 細胞骨架螢光染色

免疫螢光染色法：

將培養好的細胞玻片，以 PBS(PH $\approx$ 7.4)浸洗兩次，需動作輕柔緩慢，否則亦將細胞打散。再用冰存於-20 $^{\circ}$ C的甲醇 (Methanol) 固定 10 分鐘後，用 1xPBS 浸洗 5 分鐘，置於 1%BSA (Bovine Serum Albumin Fraction V) in PBS 室溫下 30 分鐘，以除去非專性的接受器，PBS 浸洗 3 次後再用溶於 1%BSA/PBS 的一級抗體(如下列 2-3-2)，使於 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘，再以 PBS 浸洗 3 次，之後再用二級抗體 Anti-mouse IgG-FITC，於 37 $^{\circ}$ C 下作用 30-60 分鐘，再用 PBS 浸洗三次後，用二次去離子水(ddH<sub>2</sub>O)將玻片洗淨後瀝乾，包埋於抗褪色的包埋劑內再以指甲油封存。在這些反覆的步驟裡要注意細胞面，以免失誤。

## 免疫螢光的一級抗體與二級抗體的配製

Anti-Tubulin 稀釋倍數為 1:50 (Sigma, chemical Co.  
clone no. Ac-15 Mab)

Anti-Vimentin 稀釋倍數為 1:40 (Sigma, chemical Co.  
Clone no. V9)

Anti- $\beta$ -actin 稀釋倍數為 1:500 (Sigma, chemical Co.)

Goat-anti-mouse IgG-FITC 稀釋倍數為 1:150

### (3) 檢測鹼性磷酸酶存在之免疫螢光鑑定之抗體配製

ALPase 之一級抗體 1:50 (DAKO)

ALPase 之二級抗體 1:40 (DAKO)

## 三. 環孢靈的滴定實驗 (CsA Titration)

### 環孢靈 (CsA) 的配製

1. 先將 5 mg CsA (0.005g)溶於 500  $\mu$ l 之絕對酒精內。
2. 再加 100  $\mu$ l 之 Tween 20 用力搖動使 CsA 溶化。
3. 最後加入 4400  $\mu$ l 的培養液中 (含 FBS)，此時 CsA 濃度 約  $10^{-3}$ g/ml，再分裝到 Eppendorf Vial 中，放入冰箱上層。以 1:1000 稀釋則為  $1 \times 10^{-6}$ g/ml 的儲存溶液 (stock soln)
4. stock sol'n 取 100  $\mu$ l 加 medium 到 1000  $\mu$ l 即為  $10^{-7}$ g/cc。



$10^{-7}$ g/cc sol'n 取 100  $\mu$ l 加 medium 到 1000  $\mu$ l 即為  $10^{-8}$ g/cc。  
 $10^{-8}$ g/cc sol'n 取 100  $\mu$ l 加 medium 到 1000  $\mu$ l 即為  $10^{-9}$ g/cc。

實驗方法：

1. 先配製好  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ g/ml 的 CsA 濃度後。
2. 在 6 well 盤中，上排種骨膜細胞，下排肌肉纖維細胞共四盤，每個 well 的細胞數目均維持在  $3 \times 10^4$  cell/well。
3. 第一盤用含  $10^{-6}$ g/ml 的 F-12 的培養液。
4. 第二盤用含  $10^{-7}$ g/ml 的 F-12 的培養液。
5. 第三盤用含  $10^{-8}$ g/ml CsA 之 F-12 培養液培養。
6. 第四盤用含  $10^{-9}$ g/ml CsA 之 F-12 培養液培養。

四. 細胞的生長曲線：

(1) 不含免疫抑制劑 CsA 的細胞生長曲線

用 10%FBS 1%PSA 配備於 F-12 中所培養之骨膜及肌肉纖維細胞的生長曲線設計，於每 well 中入  $5 \times 10^4$  個細胞，種 6well 的盤中，共種 5 盤，然後每 24 小時左右（誤差前後不超過 30 分鐘），以 0.25% Trysin/1mMEDTA 拆下三個 well，記下各孔細胞數值後平均之，共有 24、48、72、96、120 小時之細胞數目，以此做細胞生長曲線。

## Coloremetric Assay of cell growth

準備 5 個 6-well plate，拆好細胞後，每個 well 種  $1 \times 10^4$  cell，每隔 24hrs 處理一盤，直到 5 天結束。

於 24 小時後，抽掉 medium，以 1xPBS 浸洗 2 次後，固定於 2.5%(V/V)glutaraldehyde 之 PBS 溶液中(可暫停)，再用二次去離子水洗 3 次，然後以 1%aqueous crystal violet 染 5 分鐘，再用二次去離子水浸洗，此時必須將染料洗淨，直到無顏色為止。將細胞溶於每 well 1ml 之 33% glacial acetic acid 中，並收集於 Eppendorf 中，於 5 分鐘後，以波長 580nm 來測定其吸光度(O.D 質)。而 2.5%glutaraldehyde in PBS 的配方如下：

1. 1cc 25% glutaraldehyde 與 10cc 10xPBS----->加 ddH<sub>2</sub>O 到 100cc。

(2) 含  $10^{-7}$ g/ml 環孢靈的生長曲線：

每盤上排種骨膜細胞，下排種肌肉纖維細胞。每個 well 種  $3 \times 10^4$  個細胞，共八盤。控制組為 F-12 / 10%FBS.1%PSA. VitC.  $\beta$  GP。實驗組為含  $10^{-7}$ g/ml 環孢靈的 F-12 /10%FBS. 1%PSA.Vit C.  $\beta$  GP 溶液。每隔 24 小時固定一盤，最後再一起染色，來測其吸光度，波長 580nm。

## (五) 鹼性磷酸酶(ALP)的分析

### (1) ALP 的螢光定性分析：

#### A. 不含免疫抑制劑 CsA 的 ALP 的免疫螢光表現

高密度細胞群 (Densely conc group)

低密度細胞群 (Loosely conc group)

於 6 well 中上排的細胞以  $2 \times 10^6/\text{cc}$  的濃度，取  $100 \mu\text{l}$  置於中心位置，先於  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  中培養 1 小時後加入 medium，下排則於加入 medium 中，同樣以  $2 \times 10^6/\text{cc}$  的濃度取  $100 \mu\text{l}$  置於 well 中，但同時以 medium 打散使均勻分佈於 well 中。此時上排為高密度細胞培養  $2 \times 10^6/\text{cc}$ ，下排為低密度細胞培養  $2 \times 10^5/\text{cc}$  於 7、14、28 觀察其 ALP 活性的表現。

#### B. 含免疫抑制劑 CsA 的 ALP 螢光表現

細胞培養方法同 A. 培養液中含  $1 \times 10^{-7} \text{g}/\text{cc}$  的 CsA

### (2) 含免疫抑制劑 CsA 的 ALP 可見光定量分析

細胞培養方法同 A. 培養液中含  $1 \times 10^{-7} \text{g}/\text{cc}$  的 CsA

## (六)鹼性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP)

### 酵素活性的測定

簡單原理：

如論文前言中所述，鹼性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase,ALP)的存在及活性高低，是一個廣泛被使用於代表骨芽細胞分生的標誌(Marker)，是以在本研究中分別以免疫螢光法來確定 PO 細胞內有 ALP 的存在及 ALP 在細胞中分佈的位置，可說是對 ALP 的定性研究；至於對 PO 細胞酵素活性的定量研究，則是利用購自 Sigma 公司的檢驗試劑套組(編號 104)，該套試劑組的特色之一，是可藉由所用緩衝液的不同而測定酸性(Acid Phospahtase,ACP)或 ALP 的酵素活性。該試劑組的簡單原理如下：在鹼性緩衝液(2-amino-2-methyl-1-propanol)中，pH10.3 及室溫(約 25 °C)之下，由受測細胞的萃取樣品中所含之 ALP，可將配製好的受質 (substrates)，即 p-nitrophenyl phosphate disodium，水解產生 p-nitro- phenol 和無機磷酸鹽。其中 p-nitrophenol 在強鹼溶液中會形成黃色複合物，此一黃色複合物的吸光強度與 ALP 的酵素活性有正相關的關係，可將 ALP 的活性用可見光質譜儀設定波長於 410nm 下測定出來。

## 實驗步驟：

### 1. 細胞萃取物的製備

2. 先將骨膜細胞(PO cell)及對照的肌肉纖維細胞(M cell)培養到指定的天數(如 7, 14, 21 或 28 天)後，用冰的 PBS 快速沖洗細胞兩次，再以萃取細胞用之緩衝液(內含 10 mM Tris-HCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100 及 0.1% NaNO<sub>3</sub>)將細胞膜溶解放出細胞質，將部份溶出物及仍粘附在培養盤上的細胞，以塑膠刮杓刮取並收集到 Eppendorf 小管中。爲了確定所有的細胞都會完全溶解，所有的小管又經三次冷凍-解凍(freeze and thaw)循環程序。待所有細胞膜都確定已經溶解後，將各小管置入離心機中以 4,000xg，在 4°C 下離心 15 分鐘，離心後將上清液小心取出置於新的小管，此一上清液內既含有我們要測定的 ALP，因 ALP 是分佈在細胞質及細胞膜上的可溶性蛋白質。此時可將上清液急速冷凍儲存在 -20°C，待不同天數的樣品收齊後再一起繼續接下去的步驟。

### 3. ALP 活性較正曲線(Calibration Curve)之製備：

ALP 活性校正曲線是利用弱鹼性溶液(0.02N NaOH)，來按下表所列之濃度比例稀釋已知濃度的受質 p-nitrophenol 溶液，在測定各種濃度的吸光度之後，以

**Sigma Units/ml** 為 X 軸，對應不同濃度之吸光度為 Y 軸來繪出座標圖，所得之結果應為一近似完全正相關的直線狀的校正曲線。

Tube No	Diluted p-nitrophenol solution (ml)	NaOH 0.02N (ml)	ALP Sigma Unit
1	1.0	10.0	1.0
2	2.0	9.0	2.0
3	4.0	7.0	4.0
4	6.0	5.0	6.0
5	8.0	3.0	8.0
6	10.0	1.0	10.0

#### 4. 測定不同細胞萃取樣本內 ALP 之活性：

先準備兩支 15ml 離心管，其中一支標上「空白組」(Blank)，另一支則標上「試驗組」(Test)。在兩支管內各加入 0.5ml 之 ALP Buffer Solution(Sigma 221)及 0.5ml 之 Stock Substrate Solution(Sigma 104) 將加好溶液的兩支離心管置於 37°C 水浴槽內使之達穩定的溫度後，在標識 Blank 的管內加入 0.1 ml 的去離子水，而在標有 Test 的管子內則加入 0.1 ml 的細胞萃取樣本。將兩管各自混合均勻後記下詳細當時的時間，迅速地將兩離心管同時置入 37°C 水浴槽中使之作用，於作用 15 分鐘後在每支管子內加入 10 ml 的 0.05N 之 NaOH 來終止酵素分解作用並產生黃色的複合物，由各管分別抽取 1ml 來測吸光度(所用之可見光質譜儀為日立 Hitachi U-3000 型，波長設

定為 410nm)，以所得之讀數參考前已製備好的校正曲線，既可換算出對應之樣本 Sigma ALP Units。然後在每支管中加入 4 滴(約 200ul)的純鹽酸(12N HCl)，利用強酸可去除純由 ALP 水解產物 p-nitrophenol 所產生的吸光度，使經過酸處理後測得的吸光度景僅代表細胞萃取液本身可能產生的微小量背景吸光度，將吸光度再參考校正取線並換算成背景 ALP Units。把樣本 ALP Units 減掉背景 ALP Units，所得之結果既為校正過後的樣本 ALP Units。

本實驗檢測了骨膜細胞在下列條件下的鹼性磷酸酶活性包括經 CsA 處理前後之鹼性磷酸酶的活性比較及高密度與低密度細胞培養的 ALP 活性比較

### (七) Von kossa stain

主要是 in vitro 培養下，鈣化物的染色，磷酸會被染成黑褐色，其背景會稍呈暗紅色。

細胞培養於玻片與立體膠原墊上，並於 7、14、21、28 天觀察鈣化程度。 方法如下：

抽掉 medium 後，以 PBS 浸洗 2 次，以 4% PAF(4%PAF 的配製方法為 16% PAF 2.5ml、10% PBS 1.0ml 加 dd H<sub>2</sub>O 6.5 ml)。將細胞或 gel，於室溫固定 15 分鐘，用

**PBS 浸洗 2 次後，再用 ddH<sub>2</sub>O 水洗 2 次，再含 5%AgNO<sub>3</sub> (硝酸銀) 在完全黑暗中作用 30 分鐘，以 ddH<sub>2</sub>O 洗淨 2 次，再將細胞或 gel 置於(75-100W 燈泡)下照明 1 小時，此時盤底最好放一張純白的紙，可加強反應，反應後用 ddH<sub>2</sub>O 洗淨，可以用 crystal violet 或 HE stain 染色，之後用 70%酒精浸潤後脫水，並包埋之。**



### 三.結果(Result)

本實驗採用了以酶來分解骨膜細胞的方法，來收集骨膜細胞，因為在長期研究下，由組織培養的骨膜細胞的未分化特性會因繼代培養而提早喪失。骨膜細胞雖是一尙未分化完全的骨前驅細胞，但是在初代及繼代的培養下，卻無法有任何骨前驅細胞的表現型。因初代與繼代細胞的 **ALPase** 的螢光檢定下無法有螢光呈色。在初代與繼代的培養中，骨膜細胞不論是由酶分解或組織培養而來，細胞均成多角形的形狀，有大的單核與明顯的核仁，而且核仁呈嗜鹼性。圖（1B）圖（1C）

骨膜細胞在培養多天後，細胞會呈現不同的聚集狀態圖（1-A），圖（1-D），上皮狀的細胞會聚集成細胞團狀，而纖維性細胞則散落於細胞團的周圍。

控制組的細胞，主要是由肌肉纖維組織而來，因為肌肉組織鄰近骨膜，其血液供應與顯微環境與骨膜也較相近。

肌肉組織的來源，主要是由 **S.D** 大白鼠的小腿取得。其中某些取樣的位置，包含了黏連於肌肉上的肌膜

(Fascia)。肌肉的初代與繼代培養主要是以組織培養為主。這樣的組別在初代培養中，於組織多天培養後，由肌肉來的細胞漸漸聚集成不定形的細胞團，而且團與團間的細胞呈現類似突觸般的接觸 圖(2A)(2B)，在相位差顯微鏡下觀察，竟然細胞團有如會行走一般，並且可見到細胞突觸收縮回到細胞團邊緣。這種現象難以理解其原因為何。另外，因為有這種現象，即另外在取肌肉組織，並確定沒有肌膜黏連，結果在長期培養下，從肌肉來的細胞呈梭狀，如典型纖維母細胞 圖(2-C)。這種細胞即參與了下列實驗時的控制之用。

細胞培養的方式包括高密度( $2 \times 10^6/\text{cc}$ )培養與低密度細胞培養( $1 \times 10^5/\text{cc}$ )。圖(3-A)這個高密度培養方式，在高密度種植區，即使有 VitC 與  $\beta$ -GP 的存在，長時間培養下，也未見細胞團的出現。這高密度區的細胞呈現多層分佈。只要控制到好培養液的 pH 值，即使長期培養也不會見到細胞的死亡，它仍然能保持高密度且多層的情形。圖(3-B)然而由高密度區邊緣往外分裂增殖的骨膜細胞則出現細胞團狀的分佈，而且呈大小不同地散落於周圍細胞較疏鬆區域。這個截然不同的結果，在多次實驗中，是呈可再現性的(Reproducible)。但是其機制仍不明白。

骨膜細胞之低密度培養為  $1 \times 10^5$  時，骨膜細胞直接以  $1 \times 10^5/\text{cc}$  的濃度，均勻地培養於含 VitC 及  $\beta$ -GP 的培養液下，約經過 10 天，即可看到細胞團出現。圖 (4) 細胞多呈現聚集狀，中心呈現團狀，並分佈於整個培養皿中，與高密度培養的方法有所不同的是，這種低密度培養法不會形成緻密而且多層細胞的結構。

在立體膠原墊的細胞培養，骨膜細胞以高密度的方式培養於立體膠原墊上，含 VitC 及  $\beta$  GP 的培養液下，在第 3 天即可觀察到細胞團的出現，可持續到 45 天之久也不會脫落死亡。圖(5)

爲了觀察細胞，曾嘗試了不同的染色法，但可能細胞會因聚集呈多層狀態，而不亦使細胞和濃染，因此在嘗試了各種染色方法後，發現結晶紫染料，可以在很短的時間內，很容易將骨膜細胞染色。骨膜細胞在加入 VitC 與  $\beta$ -GP 培養下時，可以形成細胞團，而細胞團的細胞密度則會受到環孢靈的影響，而呈現較明顯的結晶紫濃染 圖 (6-B)。在未以 CsA 處理的細胞團可看出細胞聚集的程度較低，細胞的多層現象也比受 CsA 處理的骨膜細胞少。圖 (6-A)爲了觀察骨膜細胞是否爲典型細胞骨架結構，而以  $\beta$ -actin、Tubulin 及 Vimentin 的免疫螢光染色來檢測。

## 在細胞骨架之免疫螢光染色中

圖(7-A) 骨膜細胞有  $\beta$ -actin 呈典型微絲纖維 (Microfilament) 表現，有束狀(bundle)微絲纖維非常發達，充滿整個細胞與細胞的長軸平行。

在圖(7-B) Tubulin 呈典型微細小管 (microtubule) 分佈，以細胞核為中心向細胞邊緣成放射狀分佈。

在圖(7-C) Vimentin 呈典型 intermediated filament (中級微絲)，有極為發達的中級微絲 vimentin，而 Vimentin 是間葉細胞的特徵，說明了骨膜細胞是由間葉 (Mesenchyme) 來的細胞。

爲了決定環孢靈 (CsA) 的實驗濃度，實行了 CsA 亞致死量滴定，以決定最適合細胞生長的 CsA 濃度。

圖(8)：在  $10^{-6}$ g/ml 到  $10^{-9}$ g/ml 的 CsA 濃度的實驗中，以  $10^{-7}$ g/ml 的濃度，對骨膜細胞及肌肉纖維細胞有最佳的促進作用。

在細胞的生長曲線中，包含了不經免疫抑制劑 CsA 處理之骨膜細胞與肌肉纖維細胞的生長曲線。圖(9)：由

骨膜生長曲線得知骨膜細胞的 Doubling population time 爲 26 小時，肌肉纖維細胞的 doubling time 爲 29.5 小時。

圖(10)：由 CsA 對骨膜及肌肉纖維細胞的生長曲線可知，在一週內 CsA 對肌肉纖維細胞有促進生長的效果，但是 CsA 對骨膜細胞的生長沒有明顯改變。

鹼性磷酸酶是分化不全造骨細胞的標誌，它的測定包含定位定性的免疫螢光染色方法及定量的鹼性磷酸酶活性的測定，可由可見光質譜儀以波長 410nm 來分析。

### 鹼性磷酸酶的分析

在鹼性磷酸酶 (ALP) 免疫螢光的定性定位分析，即骨膜細胞的鹼性磷酸酶之螢光染色中，因骨膜細胞具有造骨能力的骨前驅細胞，造骨現象最早出現的標誌即是 ALP，圖(11-A)骨膜細胞在第三天即有正的螢光呈色反應，隨著培養時間增加，其強度隨之增加。在第十天的螢光呈色雖與第三天的類似，但其曝光時間只有第三天的一半 圖(11-B)。而且，在第 28 天的 ALP 的螢光呈色更加明顯，但其曝光時間，約爲第

十天的三分之一 圖 (11-C)。因此，骨膜細胞的 ALP 有隨著培養的時間而增加的現象。

在骨膜細胞經 CsA 處理後鹼性磷酸酶 (ALPase) 的螢光染色中骨膜細胞各以含或不含 CsA 的培養液培養，VitC 與  $\beta$ -GP 也例行地加入培養液中，在經 28 天培養後的 ALPase 螢光呈色，兩組有明顯的差別。圖 (12-A) (12-B) 為不含 CsA 處理者，其螢光呈色明顯低於經 CsA 處理者。圖 (12-C) (12-D)

不含 CsA 處理者，其螢光除強度較弱外，曝光時間也較長。圖 (12-A) 圖 (12-B)

在鹼性磷酸酶的定量分析中，分為骨膜細胞的實驗組，與肌肉纖維細胞的控制組，觀察免疫抑制劑 CsA 對骨膜細胞的 ALP 活性的影響，並研究高濃度與低濃度培養時之骨膜細胞的 ALP 表現

圖(13)結果顯示從長時間培養看 ALP 活性改變。控制組在是否有 CsA 的存在下，肌肉纖維細胞的 ALP 都很低，不會隨著時間的增加而增加。而骨膜之 ALP 在 CsA 處理下，幾乎是隨著時間成直線遞增。

圖(14)在比較密度對 ALP 活性的影響時，凸顯了低濃度骨膜細胞的培養有較強的 ALP 的表現。這是因為在高密度組別中，除了中心的高密度區外，其細胞團的數目明顯地低於低密度組別，而 ALP 的活性，也可表現於高密度區與細胞團區域，因此在低密度組別的細胞團，有較多的 ALP 的活性。

Von Kossa Stain 是用來將 *in vitro* 鈣化物沈積的染色，本實驗觀察了在玻片及立體膠原墊上的鈣化物沈積的染色。

圖 (15-A) 在蓋玻片上的高密度培養下，骨膜細胞在中心觀察到棕色沈積，以 Von Kossa Stain 來染鈣化物，會有黑色沈澱物。在圖 (15-A) (15-B) 中，均可見到鈣沈積的黑色沈澱。

圖 (15-B) 在立體膠原墊的高密度培養下，在三至四天即有細胞團出現。這些細胞團在經 45 天培養下也不會退化或脫落。

## Discussion:

骨膜細胞的初代培養已從酶分解來的細胞呈現較純的成骨表徵與特性。可見細胞多角形外形，同時上皮細胞會成堆的聚集在一起。骨膜細胞的生長，以自培養日算起到第五日均呈線性增加，在過五日後，則成緩慢的平原期，由生長曲線途中可知，骨膜細胞的 **Population doubling time** 約為 26 個小時，比肌肉細胞的 29.5 小時還快。骨膜細胞即使到第七次繼代培養，細胞仍具有相當的未分化特徵。在免疫抑制劑 CsA 以  $10^{-7}$  g/ml 濃度處理下，骨膜細胞的生長顯然不受到 CsA 的影響。鹼性磷酸酶是造骨細胞所具有獨特的活性，而且是骨生成過程中，最先出現的造骨標誌<sup>(65)</sup>。造骨細胞的特徵即鹼性磷酸酶的活性，本實驗中，骨膜細胞的培養，只要有 VitC 及  $\beta$  GP 供給下<sup>(29)</sup>，在第三天的免疫螢光的定性鑑定，即有螢光呈色，而且隨時間增加，螢光的強度也明顯增強。而免疫抑制劑 CsA 可以加強骨膜細胞的鹼性磷酸酶的螢光呈色。在可見光質譜儀的定量分析下，CsA 亦可增加鹼性磷酸酶活性的量。而且在經多天培養後，其活性愈強。在細胞染色方面，可用 HE stain，但在表現上以結晶紫染得最明顯。在結晶紫的染色中，有造骨傾向，呈多層的細胞，它的核及細胞質均成明顯濃染。生長在周圍單層細胞則較不被染色。但結晶紫染色法並不



適用於 Von Kossa stain 中，因為結晶紫會被酒精脫色，而無法脫水處理。而且結晶紫的結晶沈澱會遮蔽 von Kossa 的鈣離子染色。

本實驗中，骨膜細胞有同文獻中所謂 colony forming unit, osteoprogenitor (CFU-O)的造骨細胞表現<sup>(1) (53) (54)</sup>。不論是以高密度 ( $2 \times 10^6/\text{cc}$ ) 細胞培養於立體膠原墊，或蓋玻片、培養皿或低密度 ( $1 \times 10^5/\text{cc}$ ) 於培養皿中，只要有  $\beta$ -GP 及 Vit C 的供給下，就會有多層細胞與多發的細胞團產生。這與文獻上至少要有  $5 \times 10^5$  的細胞濃度才會有較佳的成骨效應，顯然不同。

在細胞骨架之免疫螢光染色的結果顯示骨膜細胞除了具有典型的微絲纖維  $\beta$ -actin 及微絲小管 Tubulin 的特徵外，尚具有間質細胞所特有的中級微絲 Vimentin，證明骨膜細胞為一種間葉細胞。在高密度的骨膜細胞培養中，其中心緻密區細胞呈多層分佈，但細胞團只出現於其緻密區周圍與培養皿的邊緣，細胞團旁邊的背景細胞生長如正常的細胞培養情形。而細胞團則有組織化形成 (Histogenesis)，且緻密區邊緣的細胞團大多有連接的情形，此與在周邊散落的細胞團不同。而低密度細胞培養其鹼性磷酸酶的活性比高密度的細胞培養還高。原因可能是，高密度細胞的培養是在培養皿中心滴下  $50 \mu\text{l}$  體積的細

胞。由周圍往外擴展的造骨細胞數目較少，形成的細胞團數目比低密度培養還少，而且低密度培養的細胞是以相同的細胞數目但卻均勻分散於培養皿中，造骨細胞的數目較多，呈現的細胞團也較多，也因此可能會有較高的鹼性磷酸酶的活性。在 Von kossa Stain 的磷酸鈣沈積染色，不論是在培養皿或立體膠原墊，都有暗褐色的染色，證明有鈣化物沈澱。

免疫抑制劑 CsA 對骨膜細胞的生長曲線實驗中，證明 CsA 與骨膜細胞的生長無關，但有可能對其分化有一定程度的影響，因為有骨前驅細胞的細胞團數目有明顯的增加。而且在鹼性磷酸酶的實驗中 CsA 隨著時間明顯地促進鹼性磷酸酶的活性，由此可知，CsA 在 *in vitro* 對骨膜細胞有促進分化加強造骨細胞表現的功能。由文獻可知，在 *in vivo* 的骨膜即使存在於異位區，亦能保留其造骨的分化能力。而在 *in vitro* 亦受到各種條件而影響其在 *in vitro* 的造骨能力。如培養時氧壓要在 5%-9% 會有 ALP 的表現<sup>(14)</sup>；培養液中要有  $\beta$ -GP，以供應鈣化所需的磷酸基<sup>(29)</sup>，要使骨膜細胞保有足夠的造骨能力，細胞的密度要適當，高密度細胞培養會傾向於骨軟骨生成<sup>(44)</sup>，至於細胞的來源，與供給者的動物年齡，也以來自年齡小，而且來自腓骨（ilium）或 脛骨（Tibia）的骨膜細胞，有較佳的造骨潛能<sup>(17)</sup>。因此，雖然 CsA 常使用於異體器官移植時的免疫

抑制劑<sup>(19)</sup>，但是它的作用，仍是廣泛性地。它還可以用來治療因免疫引起的疾病，如扁平性苔癬、牛皮癬、多形性紅斑、風濕性關節炎等尚可治療肝硬化<sup>(3)</sup>。而且，本實驗也證實 CsA 的確可以保留骨膜細胞的分化特徵的表現，而且尚有加強作用。這樣的一個 *in vitro* 老鼠骨膜細胞成骨形式的確立，除了確定在 *in vitro* CsA 會引起骨膜細胞分化而加強了成骨效應外，尚可用來研究其他顯微環境對老鼠骨膜細胞的影響。

而利用 CsA 對骨膜細胞的影響，對於未來利用細胞療法的特殊技術來恢復骨骼缺損的可能，譬如視病情需要而採用不同處理的細胞來做骨缺損的治療，如利用細胞激動素 TGF  $\beta$ ，可以將骨膜細胞保留在未分化狀態<sup>(25)</sup>，而 Dex 可以擴大細胞的數目<sup>(5)</sup>，1, 25Vit D3 則可以使骨膜細胞進入一較為分化的狀態<sup>(25)</sup>，在未來發展細胞移植時，可以依據不同需要擷取不同分化狀態的細胞來治療不同的骨缺損<sup>(7)</sup>，是指日可待了。

## 圖表說明

### 一. 細胞培養

#### (1) 骨膜細胞的初代與繼代培養

圖(1-A)由酶分解而來的骨膜細胞的初代培養(原始放大倍數, X400)

圖(1-B)由酶分解而來的骨膜細胞的繼代培養(原始放大倍數, X800)

圖(1-C)由組織培養而來的骨膜細胞的初代培養(原始放大倍數, X800)

圖(1-D)由組織培養而來的骨膜細胞的繼代培養(原始放大倍數, X400)

在初代與繼代的培養中, 骨膜細胞不論是由酶分解或組織培養而來, 細胞均成多角形的形狀, 有大的單核與明顯的核仁, 而且核仁呈嗜鹼性。圖(1B) 圖(1C)

骨膜細胞在培養多天後, 細胞會呈現不同的聚集狀態 圖(1-A), 圖(1-D), 上皮狀的細胞會聚集成細胞團狀(箭頭處), 而纖維性細胞則散落於細胞團的周圍(空心箭頭處)。

#### (2) 肌肉纖維細胞的初代培養與繼代培養

圖(2-A)未將肌膜完全剝離肌肉組織培養之初代培養

圖(2-B)未將肌膜完全剝離肌肉組織培養有細胞團出現

圖(2-C)全由肌肉纖維培養之繼代培養

圖(2-A)(2-B)肌肉組織的來源, 包含了黏連於肌肉上的肌膜(Fascia)。

這樣的組別在初代培養中, 於組織多天培養後, 由肌肉來的細胞漸漸聚集成不定形的細胞團(箭頭處), 而且

團與團間的細胞呈現類似突觸般的接觸（空心箭頭處）。圖(2-C)的肌肉組織，確定沒有肌膜黏連，結果在長期培養下，細胞呈梭狀，如典型纖維母細胞。

### (3) 骨膜細胞以高密度( $2 \times 10^6/\text{cc}$ )培養

圖(3-A)在中心高密度區細胞呈多成層分布即使經多天培養也不會有細胞團出現。

圖(3-B)在高密度區的邊緣散落著許多大小不同的細胞團（箭頭處）。

### (4) 骨膜細胞之低密度培養 ( $1 \times 10^5$ )

圖(4)：經多天培養後仍然會有細胞團產生只是沒有高密度細胞區（箭頭處）。

### (5) 立體膠原墊的培養

圖(5)：經 3-4 天即可看到細胞團的出現，團與團之間有連結（箭頭處）。

## 二 細胞染色

### (1) 結晶紫染色

圖(6-A) 骨膜細胞未經 CSA( $10^{-7}$  g/ml)處理四週之細胞團染色

圖(6-B) 骨膜細胞經 CSA( $10^{-7}$  g/ml)處理四週之細胞團染色 (800 X)

經多天培養上皮狀細胞聚集成團，而纖維狀細胞則分布於其間可見多層細胞的分佈。經 CsA 處理之細胞團較呈結晶紫濃染 (箭頭處)。

### (2)細胞骨架(cytoskeleton)之免疫螢光染色

圖(7-A)  $\beta$ -actin (1600 X)

圖(7-B) Tubulin (1600 X)

圖(7-C) Vimentin (1600 X)

圖(7-A)呈典型微絲纖維有束狀(bundle)微絲纖維與細胞的長軸平行。在圖(7-B)典型微細小管細胞核為中心向細胞邊緣成放射狀分佈。在圖(7-C)呈典型 **intermediated filament** (中級微絲) **Vimentin** 是間葉細胞的特徵, 說明了骨膜細胞是由間葉 (Mesenchyme) 來的細胞。

### 三 環孢靈 (CsA) 的濃度滴定

圖(8)：在  $10^{-6}$ g/ml 到  $10^{-9}$ g/ml 的 CsA 濃度的實驗中，以  $10^{-7}$ g/ml 的濃度，對骨膜細胞及肌肉纖維細胞有最佳的促進作用。

PO：骨膜細胞

M：肌肉纖維細胞

### 四 生長曲線

#### (1) 骨膜細胞與肌肉纖維細胞的生長曲線

圖(9)：由骨膜生長曲線得知骨膜細胞的 Doubling population time 為 26 小時，肌肉纖維細胞的 doubling time 為 29.5 小時。

PO：骨膜細胞

M：肌肉纖維細胞

#### (2) 含 CsA 的生長曲線

圖(10)：在一週內 CsA 對肌肉纖維細胞有促進生長的效果，但是 CsA 對骨膜細胞的生長沒有明顯改變。

## 五. 鹼性磷酸酶的活性分析

### (1) 定位定性分析：骨膜細胞鹼性磷酸酶之免疫螢光鑑定， 免疫螢光細胞染色

#### (a) 不經 CsA 處理者：

圖(11-A): 3 天的螢光呈色 (曝光時間 110'')

圖(11-B): 10 天的螢光呈色 (曝光時間 57'')

圖(11-C): 28 天的螢光呈色 (曝光時間 20'')(1600X)

圖(11-A)骨膜細胞在第三天即有正的螢光呈色反應，  
隨著培養時間增加，其強度隨之增加。圖(11-B)(11-C)

#### (b) 骨膜細胞經 CsA 處理後鹼性磷酸酶之螢光染色

圖(12-A): 未經 CSA 處理之鹼性磷酸酶的螢光呈色  
(18'')

圖(12-B): 未經 CSA 處理之鹼性磷酸酶的螢光呈色  
(32'')

圖(12-C): 經 CSA 處理之鹼性磷酸酶的螢光呈色(15'')

圖(12-D): 經 CSA 處理之鹼性磷酸酶的螢光呈色(20'')

圖(12-A)(12-B)為不含 CsA 處理者，其螢光呈色明顯低於經 CsA 處理者。圖(12-C)(12-D)不含 CsA 處理者，其螢光除強度較弱外，曝光時間也較長。

### (2) 定量分析：可見光質譜儀

#### 經 CsA 處理前後之鹼性磷酸酶的活性比較

圖(13) 骨膜之 ALP 在 CsA 處理下，隨著時間成線性遞增。



(c) 高密度培養之骨膜細胞( $2 \times 10^6/\text{cc}$ )與  
低密度培養之骨膜細胞( $1 \times 10^5/\text{cc}$ )的 ALP 表現

圖(14)：在比較密度對 ALP 活性的影響時，凸顯了  
低濃度骨膜細胞的培養有較強的 ALP 的表現。

## 六. Von Kossa Stain

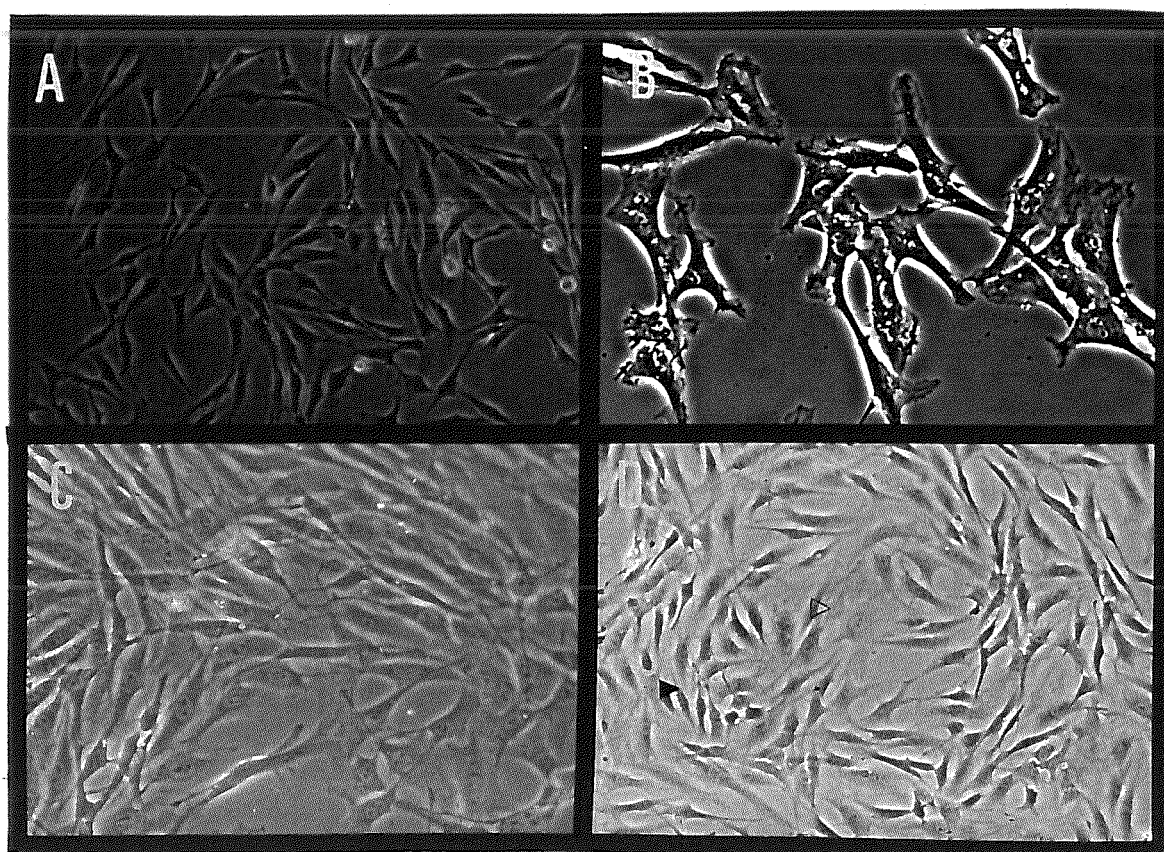
in vitro 磷酸鈣沈積之染色

圖(15-A): on coverglass

圖(15-B): on top of collagen

在圖(15-A)(15-B)中，均可見到鈣沈積的黑色沈澱。  
(400 X)

## 圖表



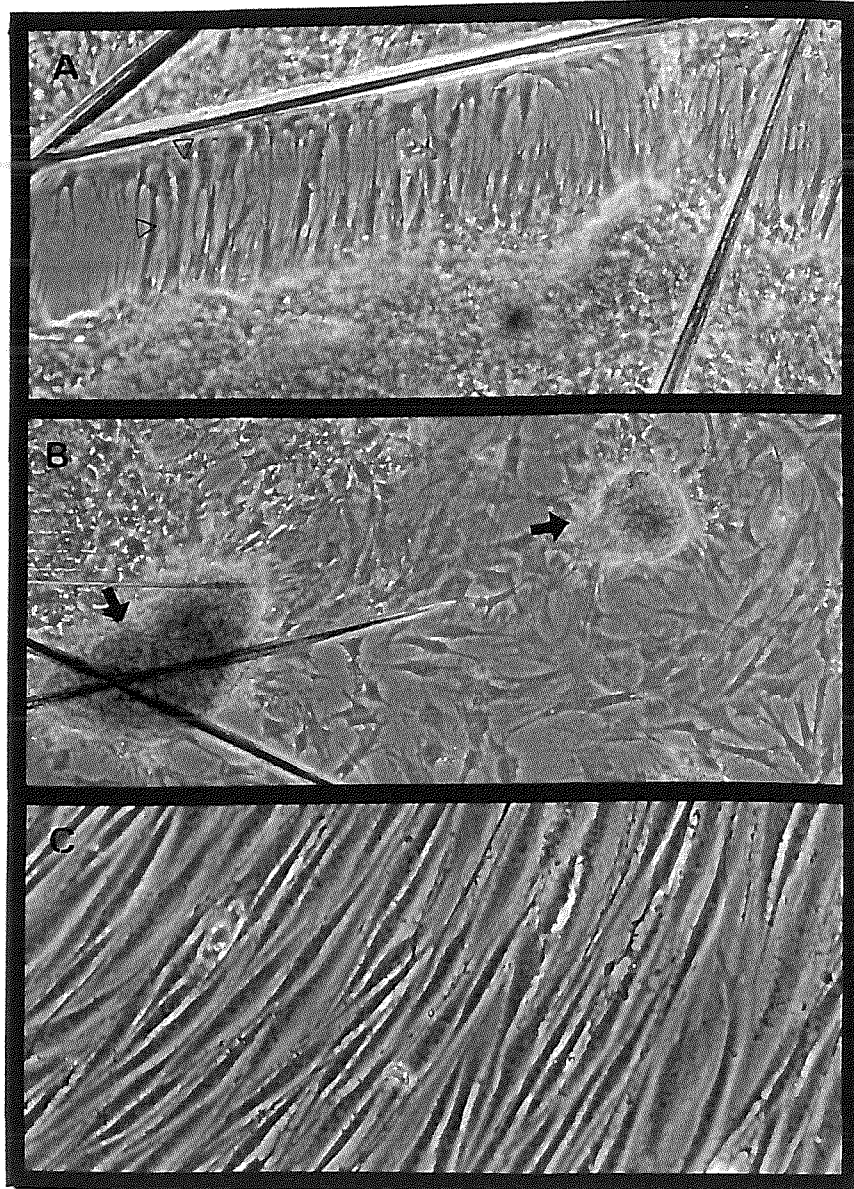
圖(1) 骨膜細胞的初代與繼代培養

圖(1-A)由酶分解而來的骨膜細胞的初代培養

圖(1-B)由酶分解而來的骨膜細胞的繼代培養

圖(1-C)由組織培養而來的骨膜細胞的初代培養

圖(1-D)由組織培養而來的骨膜細胞的繼代培養



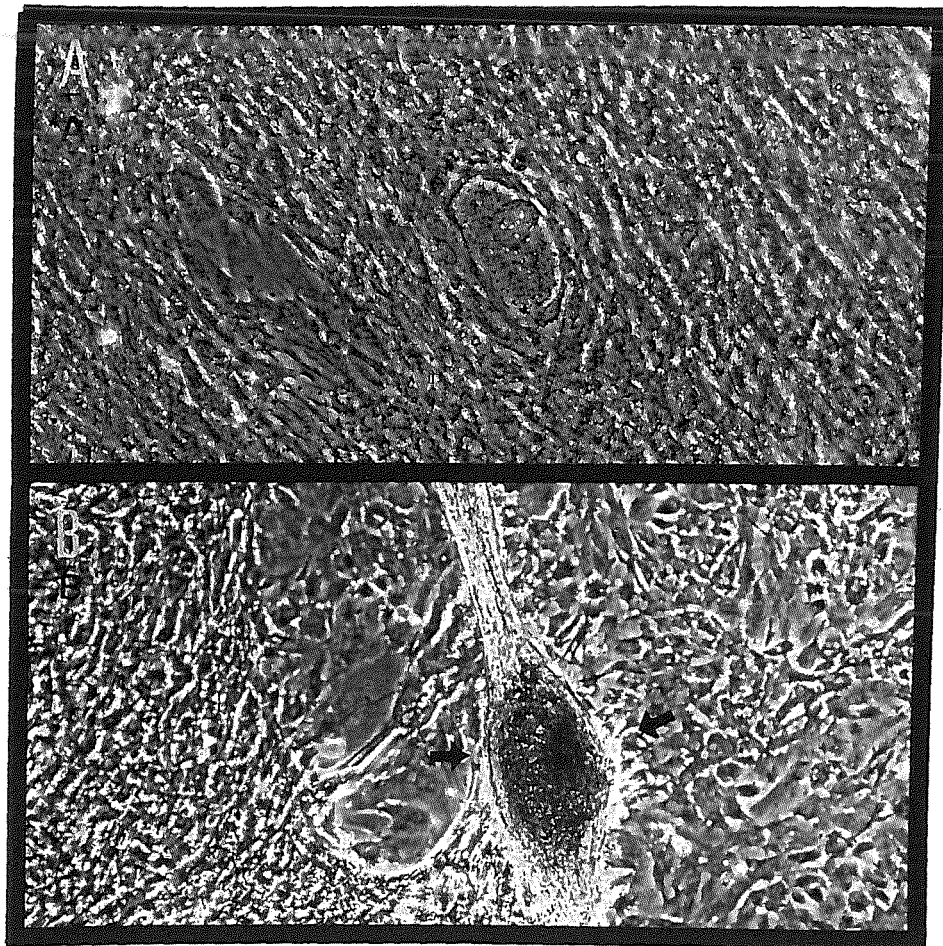
圖(2) 肌肉纖維細胞的初代培養與繼代培養

圖(2-A)未將肌膜完全剝離肌肉組織培養之初代培養

圖(2-B)未將肌膜完全剝離肌肉組織培養有細胞團出現

圖(2-C)全由肌肉纖維培養之繼代培養

圖(2-A)(2-B)肌肉組織的來源，包含了黏連於肌肉上的肌膜（Fascia）。



圖(3) 骨膜細胞以高密度( $2 \times 10^6/\text{cc}$ )培養

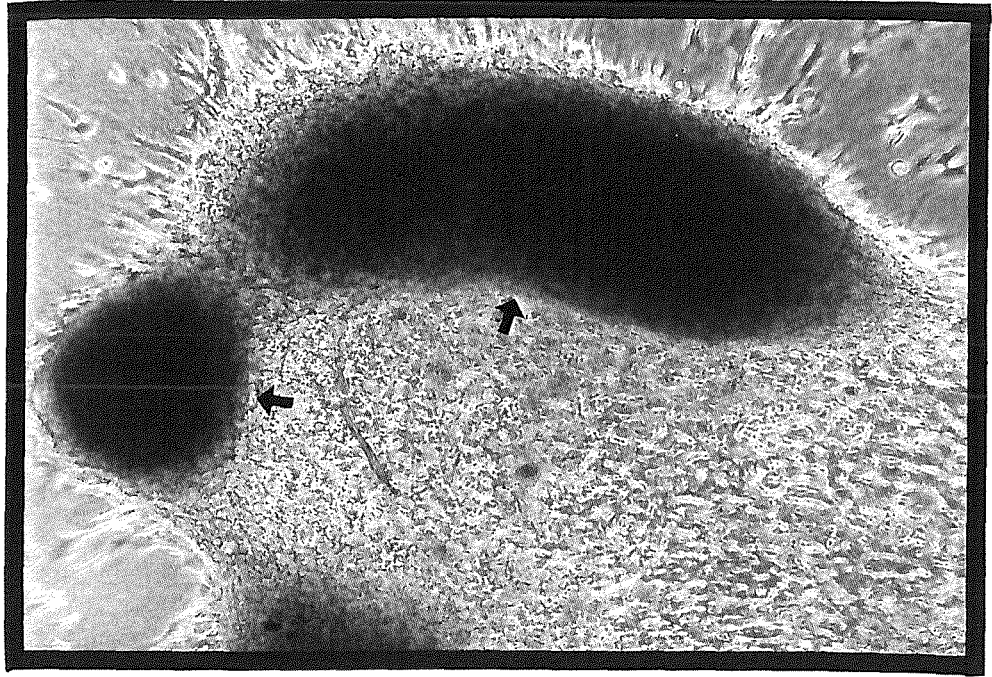
圖(3-A)在中心高密度區細胞

圖(3-B)在高密度區的邊緣

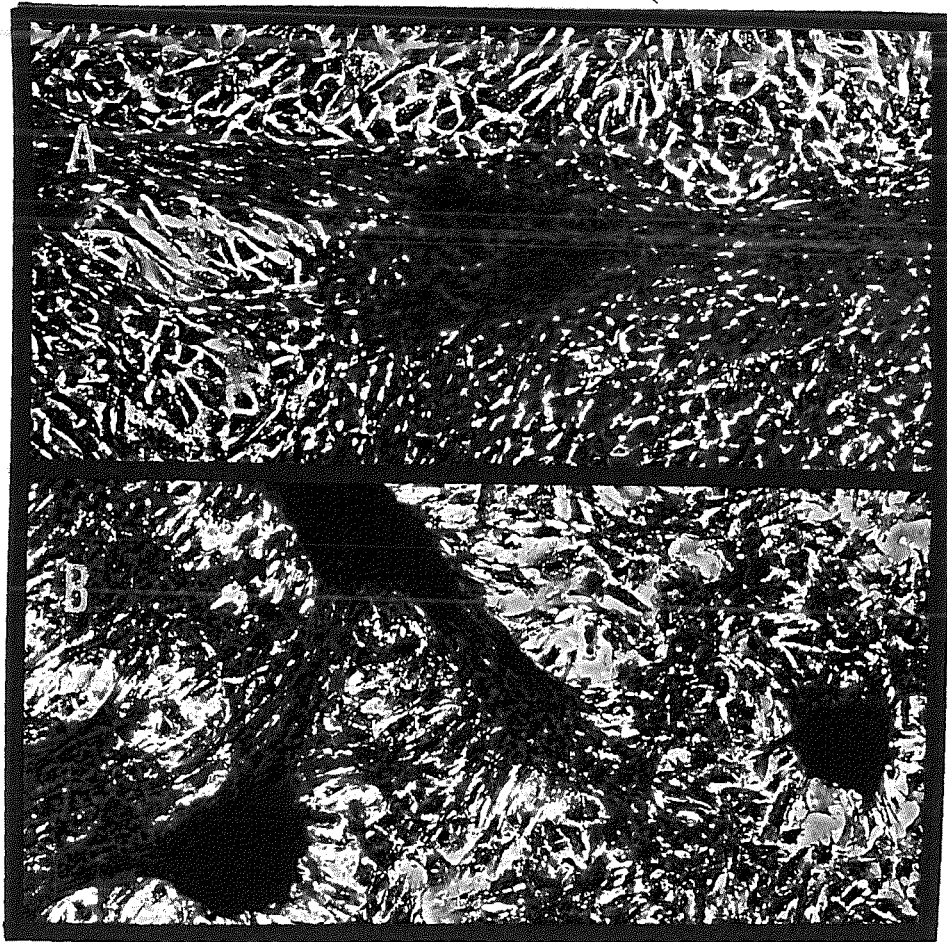


圖(4) 骨膜細胞之低密度培養 ( $1 \times 10^5$ )





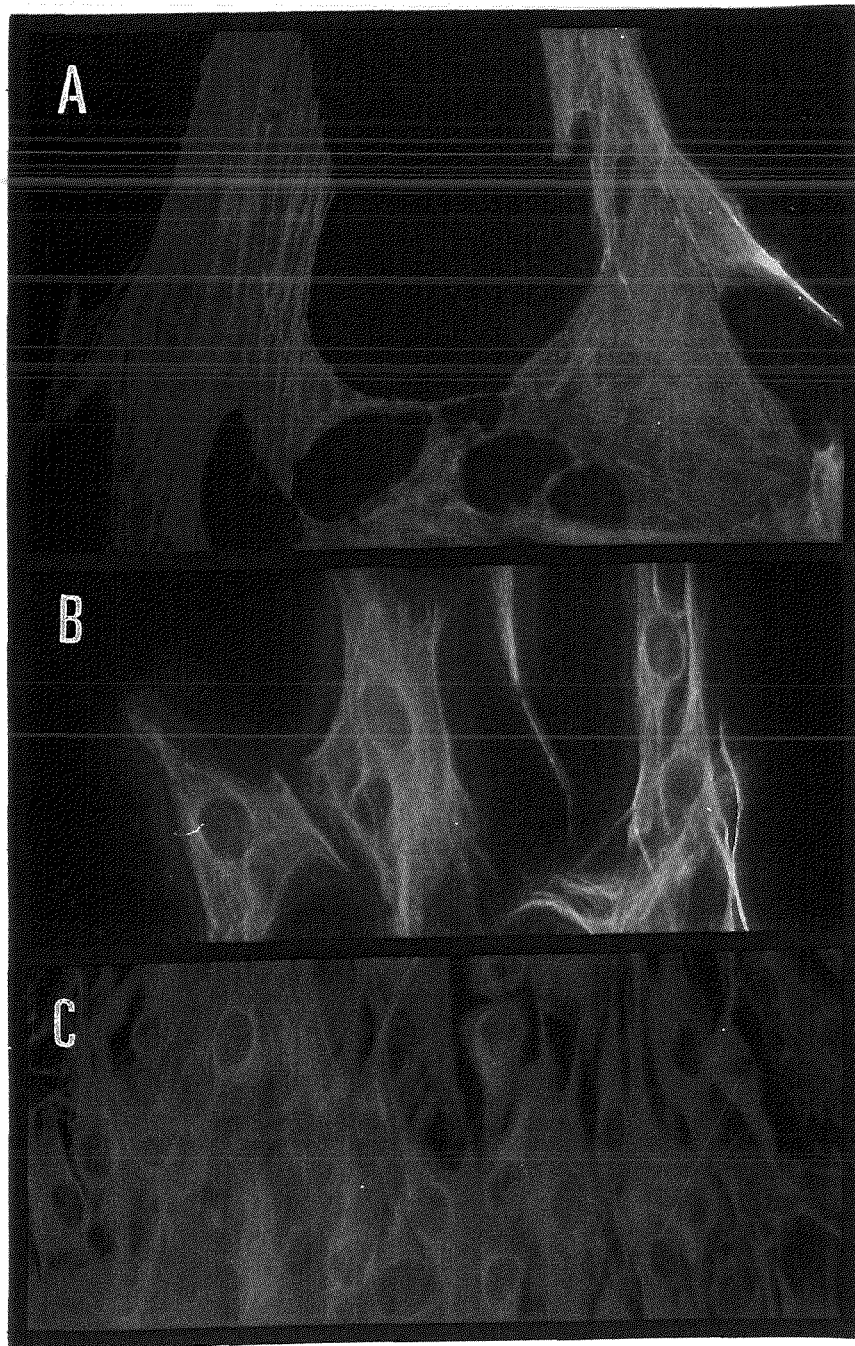
圖(5)立體膠原墊的培養



圖(6) 結晶紫染色

圖(6-A) 骨膜細胞未經 CSA( $10^{-7}$  g/ml)處理四週之細胞團染色

圖(6-B) 骨膜細胞經 CSA( $10^{-7}$  g/ml)處理四週之細胞團染色



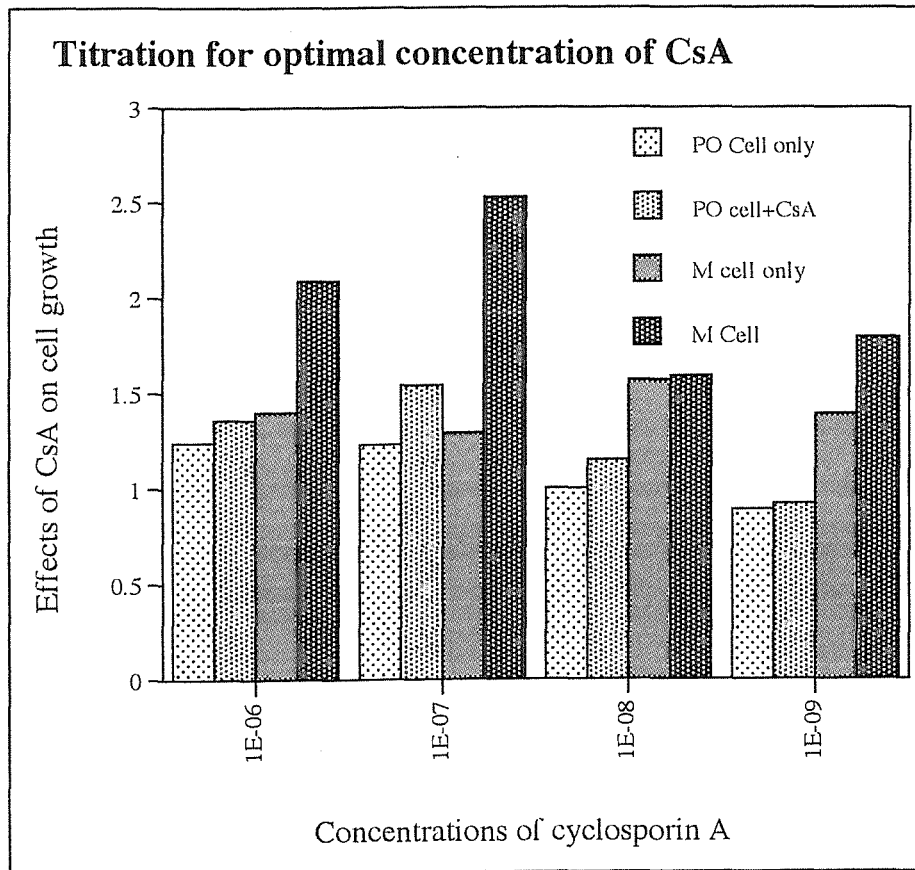
圖(7)細胞骨架(cytoskeleton)之免疫螢光染色

圖(7-A)  $\beta$ -actin

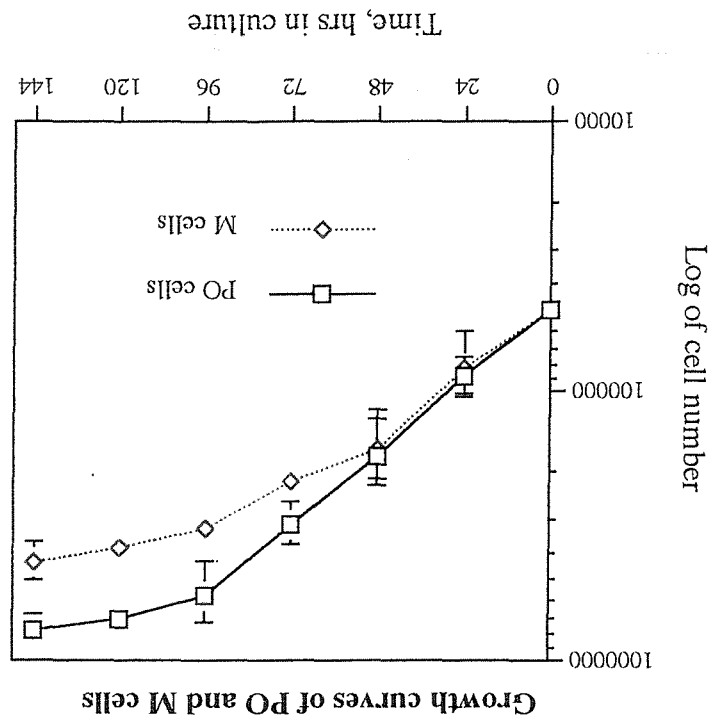
圖(7-B) Tubulin

圖(7-C) Vimentin



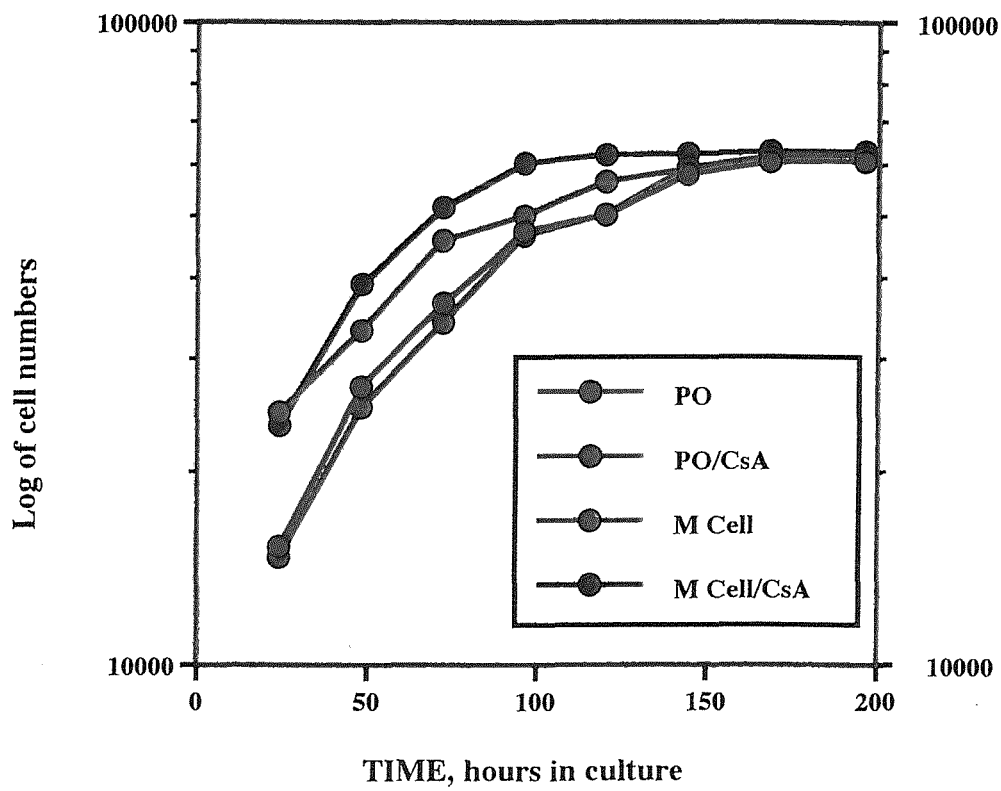


圖(8)：環孢靈(CsA)的濃度滴定濃度為在  $10^{-6}$ g/ml 到  $10^{-9}$ g/ml



圖(9)骨膜細胞與肌肉纖維細胞的生長曲線

Effects of CsA on the growth curves

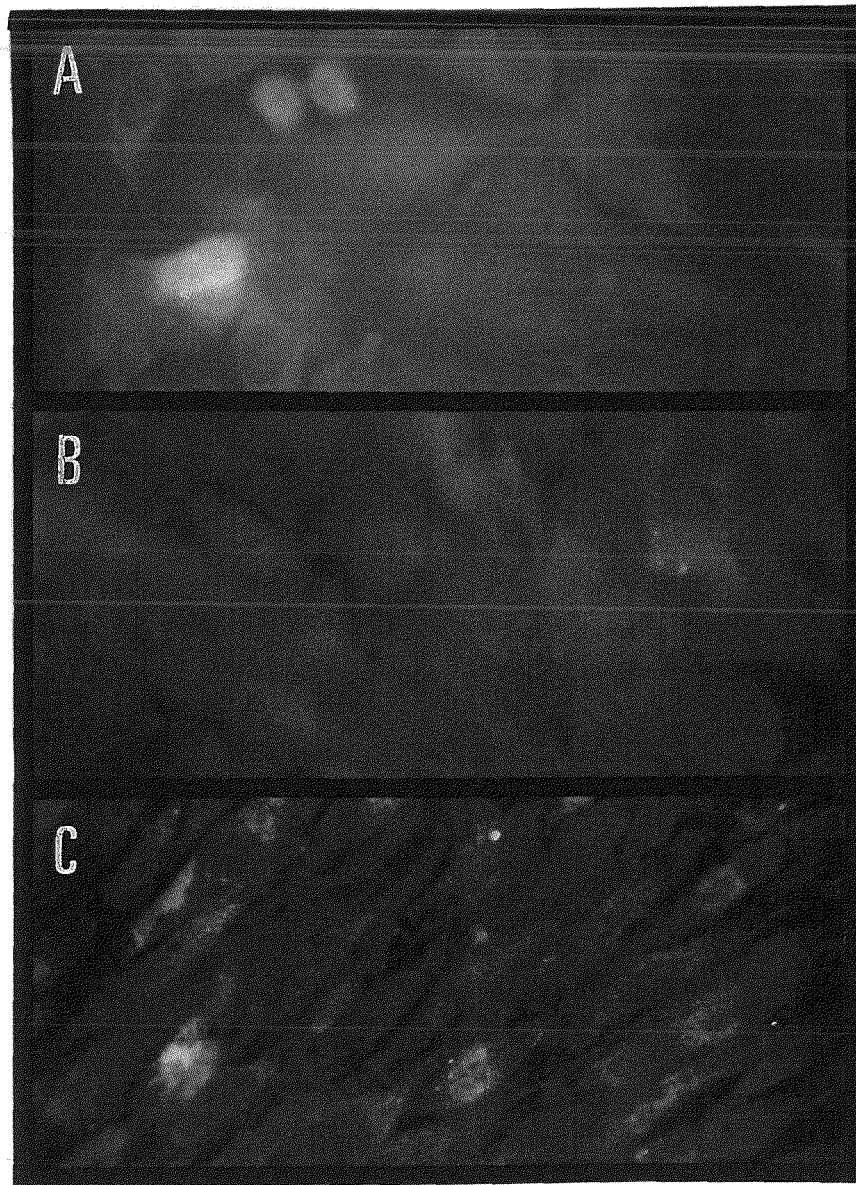


圖(10)：含 CsA 的生長曲線

PO：骨膜細胞

M：肌肉纖維細胞

CsA：環孢靈( $10^{-7}$ g/ml)

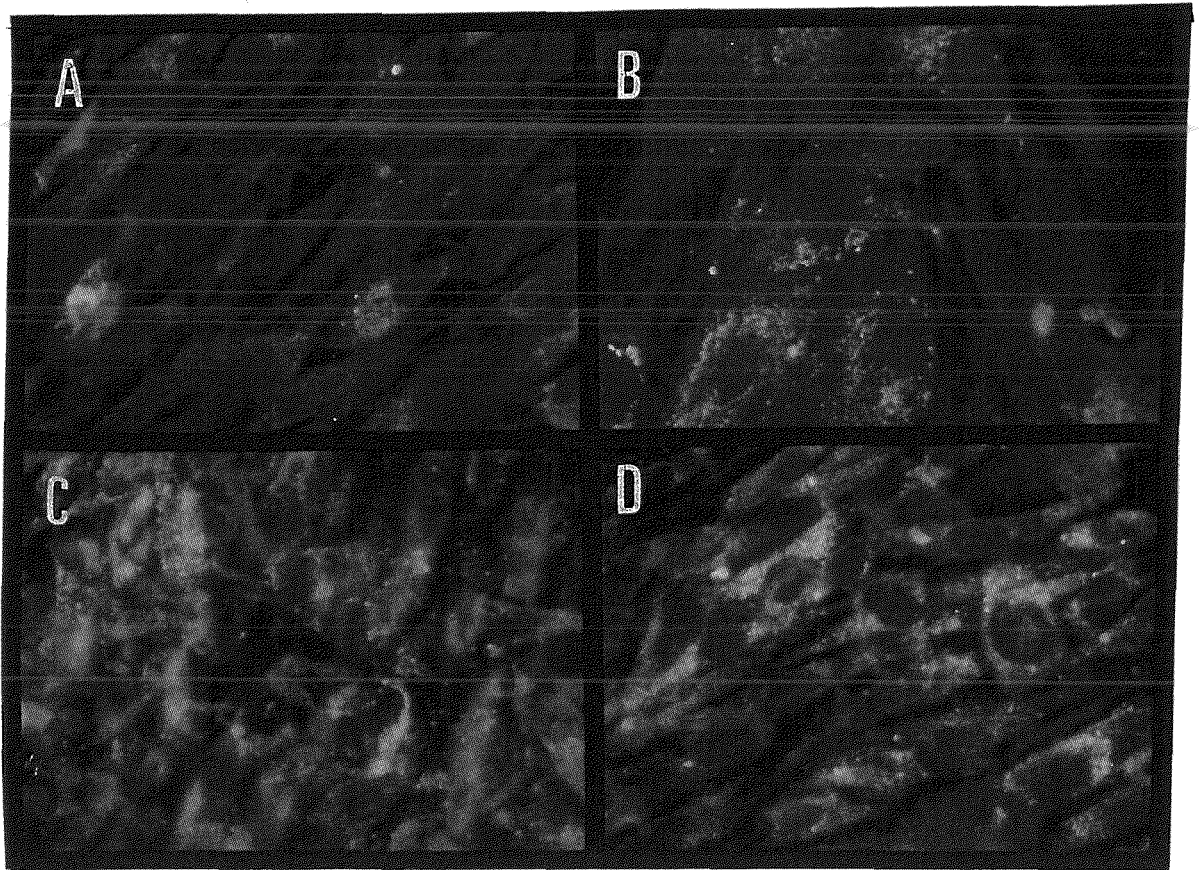


圖(11)骨膜細胞鹼性磷酸酶之免疫螢光鑑定

圖(11-A): 3 天的螢光呈色 (曝光時間 110'')

圖(11-B): 10 天的螢光呈色 (曝光時間 57'')

圖(11-C): 28 天的螢光呈色 (曝光時間 20'')



圖(12) 骨膜細胞經 CsA 處理後鹼性磷酸酶之螢光染色

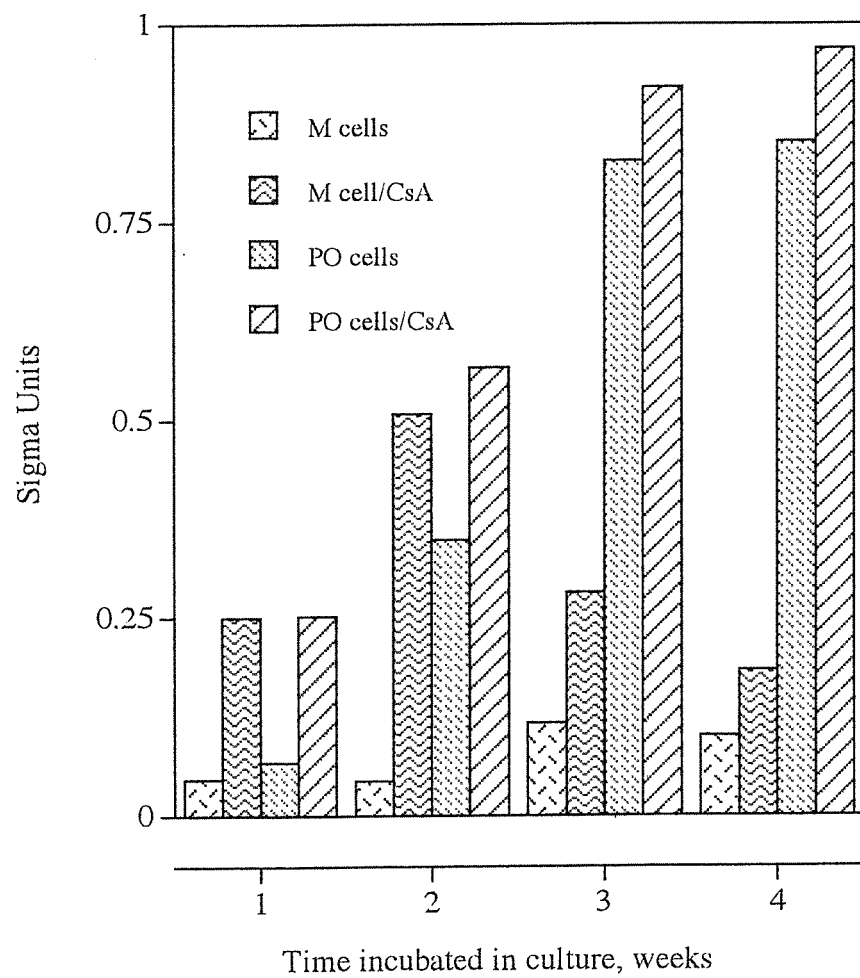
圖(12-A): 未經 CSA 處理之鹼性磷酸酶的螢光呈色(18'')

圖(12-B): 未經 CSA 處理之鹼性磷酸酶的螢光呈色(32'')

圖(12-C): 經 CSA 處理之鹼性磷酸酶的螢光呈色(15'')

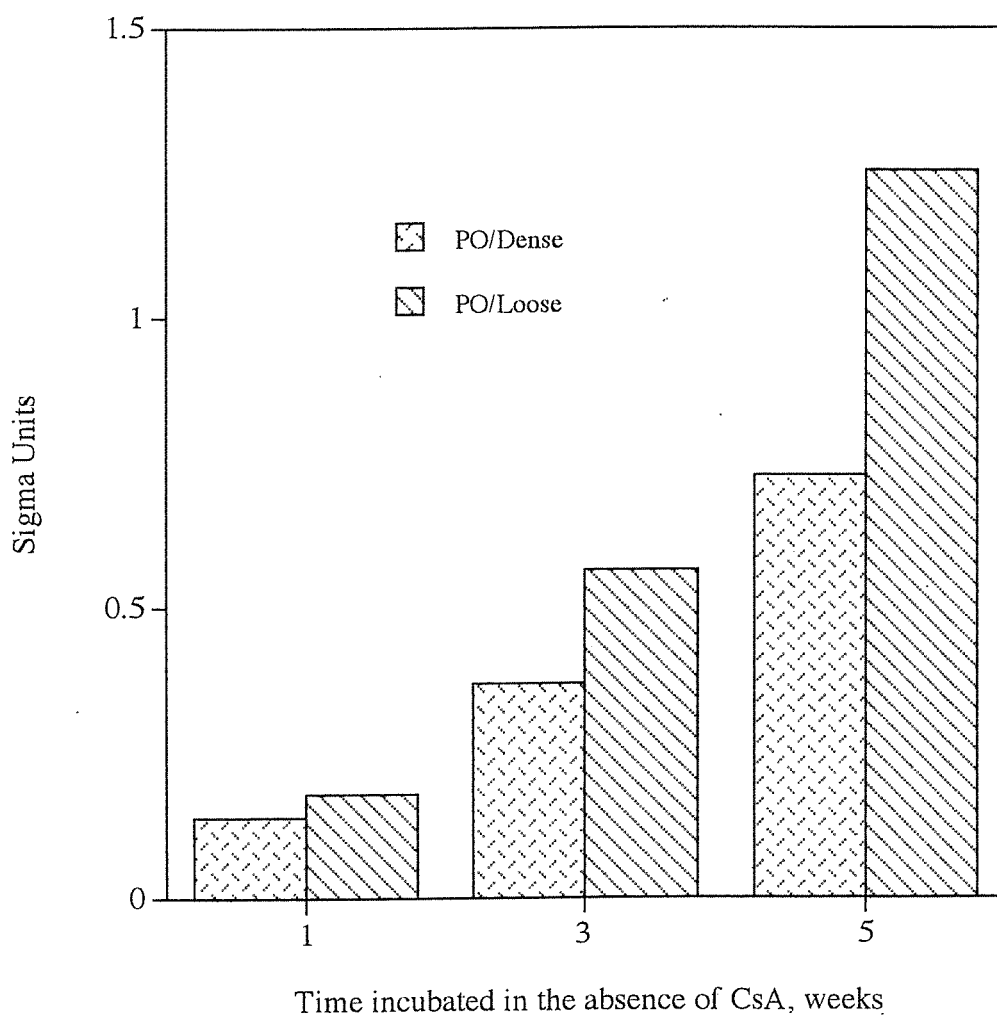
圖(12-D): 經 CSA 處理之鹼性磷酸酶的螢光呈色(20'')

**The activity of alkaline phosphatase of cells grown in the presence and absence of CsA**

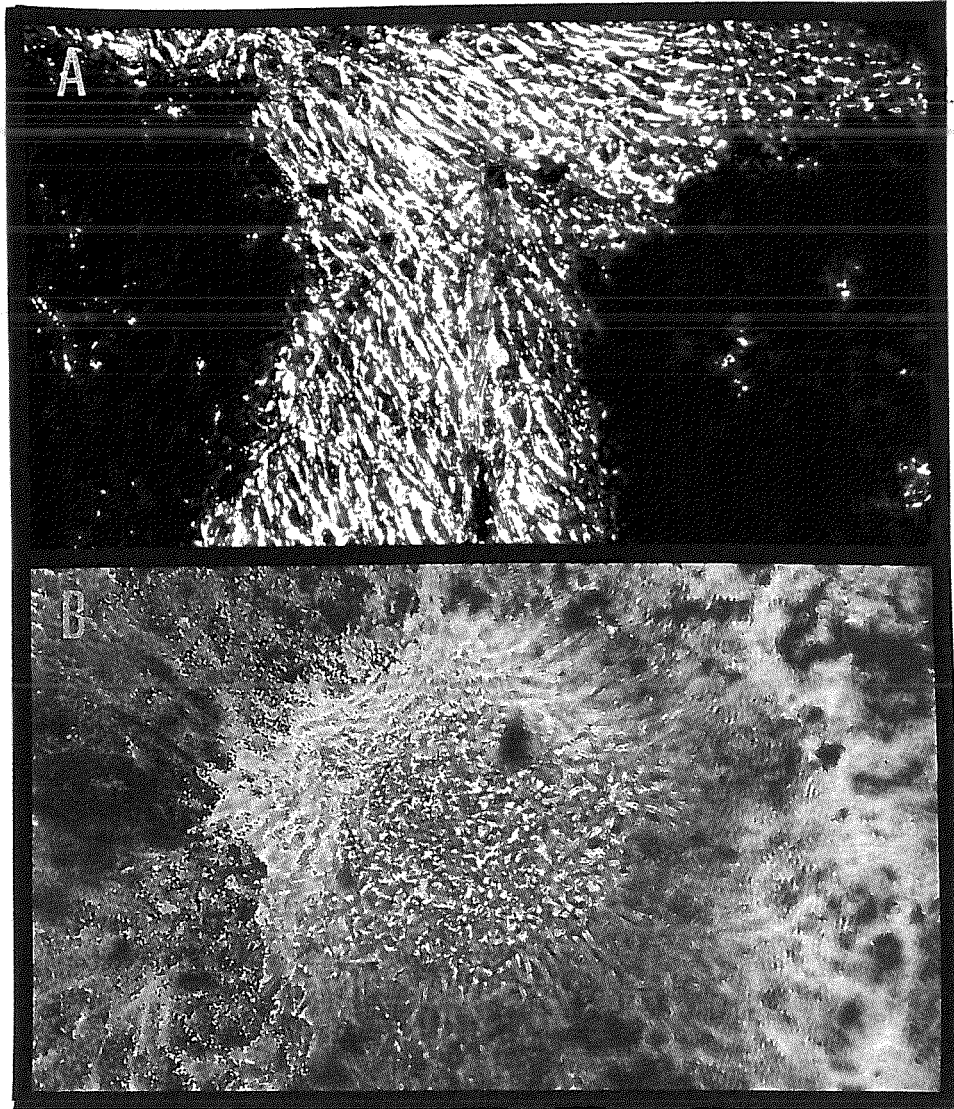


圖(13)經 CsA 處理前後之鹼性磷酸酶的活性比較

The effects of the volume density of cells on the expression of alkaline phosphatase



圖(14) 高密度培養之骨膜細胞( $2 \times 10^6/cc$ )與低密度培養之骨膜細胞( $1 \times 10^5/cc$ )的 ALP 表現



圖(15) Von Kossa Stain

in vitro 磷酸鈣沈積之染色

圖(15-A): on coverglass

圖(15-B): on top of collagen



## 免疫螢光染色的配製方法

Primary antibody	Host animal	Ig Class	R/A dilute	Cat No	出產公司
<b>Anti-B-Actin</b>	Mouse	IgG1	1/250	A5441	Sigma
<b>Anti-tubulin</b>	Mouse	IgM	1/25	10610	Sigma
<b>Anti-Vimentin</b>	Mouse	IgG1	1/80	V-6630	Sigma
<b>Anti-ALPase</b>	Rabbit	IgG	1:500	Z0271	DAKO

2 <sup>0</sup> Antibody	Host Animal	Ig Class	R/A dilute	Cat No	出產公司
<b>Anti-Mouse FTTC</b>	Goat	2 <sup>0</sup> Ab IgG	1/80	F4018	Sigma
<b>Anti-ALPase</b>	Rabbit	20 Ab Mainly Ig	1/20	F0205	DAKO

# 附錄

## 儀器設備

儀器設備	廠牌
1. 電動電子顯示天秤	AB 104
2. PH meter	Backman
3. Phase contrast microscope	Nikon
4. Immunofluorescence microscope	NICON/DIA PHOTO 3000 ZEISS/AXIOPHOT
5. Incubator	NAPCO/5410
6. Laminar Flow Hood	HOLTEN/HB2448
7. Water Bath	DS LAB/DSB-1000 BARNSTEAO/THERMOLYNE 17600
8. VORTEX	SCIENTIFIC INDUSTRIES/VORTEXGENIZ 2
9. Centrifuge	KUBOTA/2010 SENER INSTRUMENT/IWAKI
10. Camera	NIKON/F-601 ZEISS/45 60 70 01
11. Shaker	HYBAID/HB-SHK 1
12. Pipetman	GILSON
13. Pipet-aid	DRUMMOND
14. 本生燈 Burner	
15. 真空烘箱 Vacuum Oven	
16. 磁性電動攪拌系	
17. 可丟棄滅菌過濾器	Nalgen Company
18. 可丟棄滅菌注射筒過濾器 Disposable membrane filter 100ml	
19. 可見光質譜儀	Hitachi V-3000

## 藥品及配製方法：

### 1. Dulbecco's Modified EAGLE'S MEDIUM NUTRIENT MIXTURE F-12 HAM

(DMEM/Ham's Nutrient Mixture F-12)with L-Glutamine and 15Mm Hepes without Sodium Bicarbonate , product NO: D-8900 。

加入 1.2g/L 的 sodium Bicarbonate 是原廠的 Formula , 但在實驗時, PH value 往往於 10 分鐘後就 down 到 PH  $\approx$  6.55 。而本實驗為有關 osteogenesis , 在酸性環境中, 並不利於骨細胞生長, 以加 sodium bicarbonate 達 3.79g/L 較能達到隔天才換 medium 的要求。

### Nutrient Mixture F-12

由 R.G Ham 設計來充當無血清的 medium , 以提供 transformed cell 在培養基的 clonal growth 之用, 其成分複雜並含有稀有元素, 呈多用途性。加入血清可以維持正常或變形細胞在培養皿中的生長。Mixture 中含 Hepe's buffer , 其最終濃度為 15mM , 可以彌補在無血清供應時所失去的緩衝能力。在 DME 的 Glucose 只有 1000mg/L , 可用來培養老鼠胚胎細胞, F-12 的改變即是將 Glucose 提高 3150mg/L 以適應各種不同的細胞。

**配製法：DMEM/F-12 基礎培養液**

**DMEM/F-12 powder 1Bottle**

**NaHCO<sub>3</sub> 3.79 g/L**

以約 950cc ddH<sub>2</sub>O 完全溶解後，再以 NaOH 及 HCL 來調整，使 PH=7.4，再將總體積加 ddH<sub>2</sub>O 至 1000cc 以 0.2 μ m filter 過濾滅菌。

**2. PSA (Pen-Strep-Ampho-Sol) Biological industries**

**Penicillin: 1000 units/ml,**

**Streptomycin: 10mg/ml,**

**Amphotericin B: 0.025mg/ml**

**3. FBS(Fetal Bovine Serum) Biological Industries**

**4. 10% complete DMEM/F-12 (cDMEM/F-12)**

**PSA 1ml**

**FBS 10ml**

**DMEM/F-12 89 ml**

**5. Trypsin/EDTA : GIBOCO-BRL**

**0.25% trypsin**

**1mM EDTA**

## 6. Vitrogen 100: Collagen Corporation

Collagen Concentration : 3.0mg/ml

## 7. DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) Solution :

GIBCO-BRL per liter

DPBS powder 一小包溶於 1000cc 的 ddH<sub>2</sub>O 中，可用 Autoclave 來滅菌，或可依配方配製，方法如下：

PBS 的配方

KCl : 0.2 g/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0.2g/l

NaCl : 8g/l

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 1.15g/l

## 8. Methanol

Merck

## 9. 1% BSA Solution

Bovine Serum Albumin 1g

PBS 100ml

## 10. $\beta$ -Glycerophosphate( $\beta$ -GP)

C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>, FW216.0, G-9891, Sigma

10mM  $\beta$ -GP

2.16g 溶於 10cc ddH<sub>2</sub>O 中為 stock sol'n 過濾滅菌

取 1c.c. stock sol'n 可配製 100cc 培養液

#### 11. Vit C 50 $\mu$ g/ml

取 100mg VitC 溶於 10cc ddH<sub>2</sub>O 中為 stock sol'n 過濾滅菌

Stock sol'n 取 0.5cc，可配製 100cc 的 medium

#### 12. Silver Nitrate

AgNO<sub>3</sub>, FW:169.9, S-8157, Sigma

#### 13. Cyclosporin A(cyclosporine) 5mg, C3662, Sigma

環孢靈 (CsA) 的配製

先將 5mgCsA(0.005g)溶於 500ml 之絕對酒精內。

在加 100  $\mu$ l 之 Tween 20 用力搖動使 CsA 溶化。

最後加入 4400  $\mu$ l 的培養液中(含 FBS)，此時 CsA 濃度 約 10<sup>-3</sup>g/ml，再分裝到 Eppendorf Uial 中，放入冰箱上層。以 1:1000 稀釋則為 1x10<sup>-6</sup>g/ml 的儲存溶液 (stock soln)

stock sol'n 取 100  $\mu$ l 加 medium 到 1000  $\mu$ l 即為 10<sup>-7</sup>g/cc。

10<sup>-7</sup>g/cc sol'n 取 100  $\mu$ l 加 medium 到 1000  $\mu$ l 即為 10<sup>-8</sup>g/cc。

10<sup>-8</sup>g/cc sol'n 取 100  $\mu$ l 加 medium 到 1000  $\mu$ l 即為 10<sup>-9</sup>g/cc。

#### 14. Crystal violet (MERCK)

1g Crystal violet 溶於 100ml ddH<sub>2</sub>O

## 15. Glutaraldehyde (MERCK)

1cc 25% glutadehyde 與 10cc 10X PBS →加 ddH<sub>2</sub>O 到  
100cc

## Reference

1. **Bellows, C. G., Aubin, J. E., and Heersche, J. N.M.** 1987. Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro. *Endocrinology* 121: 1985-1992.
2. **Burchart, H.**, 1987 Biology of bone transplantation. *Orthop. Clin. North Am.* 18:187-196
3. **Bach, J. F.**, 1988 Cyclosporine in autoimmunity. *Transpl Proc* 20 (suppl 4):379-381
4. **Burstein, F. D., Canalis, R. F., Canalis E. M., and Ariyan, S.** 1989 Scanning electron microscopy and gel electrophoresis of vascularized periosteal autografts. *Plast. Reconstr. Surg.* 83:500-510
5. **Bellows, C. G., Heersche, J. N. M. and Aubin, J. E.** 1990 Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. *Dev Biol* 140:132-138
6. **Bonewald, L. F., Kester, M. B., Swain, L. D., Khare, S., Johnson, T. L., Leach, R. J., and Boyan, B. D.** 1992 Effects of combining transforming growth factor  $\beta$  and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on differentiation of a human osteosarcoma(MG-63). *J Biolchem*, 267(13):8943-8949
7. **Bruder, S. P., Fink, D. J., and Caplan, A. I.** 1994 Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell. Biochem.* 56:283-294
8. **Charrier, B. E., Glorieux F. H., Michel van der Rest and Pereir, G.** 1983 Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol.*, 96: 639-643



9. **Centrella, M., McCarthy, T. L., and Canalis, E.** 1987. Transforming growth factor  $\beta$  is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J. Biol.chem.* 262(6):pp2869-2874
10. **Chen, P., Carrington, J. L., Hammonds, R.G. and Reddi, A.H.** 1991. Stimulation of chondrogenesis in limb bud mesoderm cells by recombinant human bone morphogenetic protein 2B(BMP-2B) and modulation by transforming growth factor  $\beta$  1 and  $\beta$  2. *Exp. Cell. Res.* 195:509-515
11. **Chan, B.B.K., Kern, J. A., Flanagan, T. L., Kron, I. I., and Tribble, C. G.** 1992. Effects of in vivo cyclosporine Administration on endothelium-dependent responses in isolated vascular rings. *Circulation* 86:supplIII 295-299
12. **Cockfield, S. M., Ramassar, V., and Halloran, P. F.** 1993. Regulation of INF- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in vivo *J. Immunol.* 150(2): 342-352
13. **Carrier, M., Tronc, F., Stewart, D., Nattel, S., and Pelletier, L.C.** 1993. Blockade of cyclosporine-induced vasoconstriction by the calcium channel blocker diltiazem in dogs. *J. Thor. Cardio. Surg.* 106(3):487-490
14. **Deren L. A., Kaplan, F. S. and Brighton, C. T.** 1990. Alkaline phosphatase production by periosteal cells at various oxygen tensions in vitro. *Clin. Ortho.& rel. res.* (252):307-312
15. **Felk, S. A., Ellender, G., and Ramm-Anderson, S.M.** 1990. Periosteal response in translation-induced bone remodelling. *J. of Anatomy.* 171:69-84
16. **Goldberg, V. M., Shaffer, J. W., Field, G., and Davy, D. T.** 1987. Biology of vascularized bone grafts. *Orthop Clin North AM* 18:197-205

17. Gally, S.H., Miura, Y., Comisso, C.N., and Fitzsimmons, J.S. And O'Driscoll S.W. 1994. Relationship of donor site to chondrogenic potential of periosteum in vitro. *J. of Orthopedic Research*. 12(4):515-25.
18. Hock, J.M., Canalis, E., and Centrella, M. 1990 Transforming growth factor- $\beta$  stimulates bone matrix apposition and bone cell replication in cultures fetal rat calvariae. *Endocrino*. 126(1):421-6.
19. Hsu, M., Umeda, H., and Nishijima, K., 1992. An experimental study of the osteogenicity of free periosteal allografts with cyclosporine A administration. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*. 21:178-182
20. Hasegawa, S., Yokomise, H., Hirai, T., Fukuse, T., Muro, K., Takahashi, Y., Inui, K., Aoki, M., Hitomi, S., and Wada, H. 1992 Combination use of suboptimal dose of FK 506 and cyclosporine in canine lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 194(5):1340-1348
21. Hirao, A., Kawano, Y., and Takaue, Y., 1993. Effects of immunosuppressants, FK506, Deoxyspergualin, and Cyclosporine A on immature human hematopoiesis *Blood*, Vol :8(5) 1179-1183.
22. Izumi, T., Scully, S.P., Heydemann, A. and Bolander, M.E. 1992 Transforming growth factor beta 1 stimulates typeII collagen expression in cultured periosteum-derived cells. *J. of Bone & Mineral Research*. 7(1):115-21
23. Iwasaki, M., Nakata, K., Nakahara, H., Nakase, T., Kimura, T., Kimata, K., Caplan, A. I., and Ono, K. 1993 Transforming growth factor- $\beta$  1 stimulates chondrogenesis and inhibits osteogenesis in high density culture of periosteum-derived cells. *Endocrinology* 132(4):1603-1608
24. Iwasaki, M., Nakahara, H., Nakase, T., Kimura, T., Takaoka, K., Caplan, A. I., and Ono, K. 1994. Bone

morphogenetic protein 2 stimulates osteogenesis but does not affect chondrogenesis in osteochondrogenic differentiation of periosteum-derived cells. *J. Bone Min. Res.* 9(8):1195-1204

25. **Ingram, R. T., Bonde, S. K., Riggs, B. L., Fitzpatrick, L. A.** 1993 Effects of transforming growth factor beta (TGF  $\beta$ ) and 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on the function, cytochemistry and morphology of normal human osteoblast-like cells. *Differentiation* 153-163
26. **Iwasaki, M., Nakahara, H., Nakata, K., Nakase, T., and Kimura, T.** 1995. Regulation of proliferation and osteochondrogenic differentiation of periosteum-derived cells by transforming growth factor- $\beta$  and basic fibroblast growth factor. *J. of Bone&Joint Surgery Am. Vol* 77(4):543-54
27. **Jee, W. S. Li, W. J. Li, Y. L.** 1988 Flurbiprofen-induced stimulation of periosteal bone formation and inhibition of bone resorption in older rats. *Bone* 9(6):381-389
28. **Krzysztof, H., and Wlodarski, M.D.** 1989 Normal and heterotopic periosteum. *Clin. Orthop.Rel. Res.* 241:265-276
29. **Koshihara, Y., Kawamura, M., Endo, S., Tsutsumi, C., Kodama, H., Oda, H., and Higaki, S.** 1989. Establishment of human osteoblastic cells derived from peristeum in culture. *In vitro Cellular & developmental Biology.* 25(1):37-43
30. **Kamegai, A., Mori, M. and Inoue, S.** 1990. Mandibular reconstruction using electrically stimulated periosteum. *J. of Cranio-Maxillo-Facial Surgery.* 19(1):8-13
31. **Koshihara, Y., Hirano, M., Kawamura, M., Osa, H., and Higaki, S.** 1991. Mineralization ability of cultured human osteoblast-like periosteal cells does not decline with aging. *J. of Gerontology.* 46(5):B201-6.

32. **Kubes, P., Hunter, J., and Granger, D. N.** 1991 Effects of cyclosporine A and FK506 on ischemia/reperfusion-induced neutrophil infiltration in the cat. *Dig. Dis. And Sci.* 36(10):1469-1472
33. **Koshihara, Y., Honda, Y.** 1994 Age-related increase in collagen production in cultured human osteoblast-like periosteal cells. *Mechanisms of Ageing & Development.* 74(1-2):89-101
34. **Kawase, T., and Saito, S.** 1995. Osteoblastic character of fibroblasts derived from human periodontal ligament. *Tiss. Cult. Res. Common.* 14:109-125
35. **Leeson, L.,** Histology 4<sup>th</sup> edition 137-164 1981
36. **Lie, T.S., Preissinger, H., Bach, M., Vogel, J., Ogawa, K., Kroeger, T., and Brunner, G.** 1991 The protective effect of cyclosporine against cirrhotic alteration of the liver. *Surgery* 110:847-53
37. **Liu, J., Farmer, Jr., J.D., Lane, W.S., Friedman, J., and Weissman, I.** 1991 Calcineurin is a common target of cyclosporine A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* Vol.66806-815
38. **Lozupone, E., Favia, A., Grimaldi, A.** 1992 Effects of intermittent mechanical force on bone tissue in vitro:preliminary results. *J. of Bone& Mineral Res.* 7 suppl 2:S407-9
39. **Lipman, R. M., Epstein, R. J.,and Hendricks, R. L.** 1992 Suppression of corneal neovascularization with cyclosporine. *Arch. Ophthalmol* 110:405-407.
40. **Moskalewski, S., Boonekamp, P. M., and Scherft, J.P.,** 1983. Bone formation by isolated calvarial osteoblasts in syngeneic and allogeneic transplants:light microscopic observations. *Am. J. Anat.* 167:249-263

41. Mattila, P.S., Ullman, K.S., Fiering, S., Emmel, W. A., McCutcheon, M., Vrabtree, G. R., and Herzenberg, L.A. 1990. The actions of cyclosporine A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *J. Embo.* 9:4425-4433.
42. Nakahara, H., Bruder, S. P., Goldberg, V. M., and Caplan, A. I. 1990 In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 259:223-231.
43. Nakakhara, H., Bruder, S. P., Haynesworth, S. E. , Holecek, J.J., Baber, M.A., Goldberg, V. M., and Caplan, A. I. 1990 Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone.* 11: 181-188
44. Nakahara, H., Dennis, J. E., Bruder, S. P. , Haynesworth, S. E., Lennon, D. P., and Calpan, A.I. 1991. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp. Cell Res.* 195:492-503
45. Nakahara, H., Goldberg, V.M., and Caplan, A.I. 1992 Culture-expanded periosteal-derived cells exhibit osteochondrogenic potential in porous calcium phosphate ceramics in vivo. *Clin. Orthop.* 276:291-298.
46. Nakase, T., Nakahara, H., Iwasaki, M., Kimura, T., Kimata, K., Watanabe, K., Caplan, A.I. and Ono, K. 1993 Clonal analysis for developmental potential of chick periosteum-derived cells: agar gel culture system. *Biochem. & Biophy. Res. Com.* 195(3):1422-8
47. Nijweide, P.J., Burger, E. H., and Feyen, J.H.M. 1986. Cells of bone: proliferation, differentiation, and Hormonal Regulation. *Physiol. Rev.* 66(4):855-881
48. Petkovich, P. M., Wrana, J. L., Grigoriadis, A.E., Heersche, J. N.M., and Sodek, J. 1987. 1,25-

Dihydroxyvitamin D3 increases epidermal growth factor receptors and transforming growth factor  $\beta$ -like activity in a bone-derived cell line. *J. Biol. Chem.* 262(28): pp13424-13428

49. **Shevach, E. M.**, 1985 The effects of cyclosporine A on the immune system. *Ann. Rev. Immunol.* 3:397-423
50. **Schreiber, S. L.** 1991 Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 251: 283-287
51. **Scutt, A., Duvos, C., Lauber, J., Mayer, H.** 1994 Time-dependent effects of parathyroid hormone and prostaglandin E2 on DNA synthesis by periosteal cells from embryonic chick calvaria. *Calcified Tissue International* 55(3):208-15
52. **Tenenbaum H. C.** 1981 Role of organic Phosphate in Mineralization of bone in vitro. *J. Dent Res* 60(C):1586-1589
53. **Tenenbaum, H. C., and Herrsche, J.N.M.** 1985 Dexamethasone stimulates osteogenesis in chick periosteum in vitro. *Endocrinology* 117:2211-2217
54. **Tenenbaum, H.C., McCulloch, C.A.G., and Palangio, K.** 1986. Simultaneous autoradiographic and histochemical analysis of bone formed in vitro. *Bone.* 34:769-773
55. **Tenenbaum, H.C., Heersche, J.N.M.** 1986. Differentiation of osteoid-producing cell in vitro: possible evidence for the requirement of a microenvironment. *Calcif Tissue Int.* 38:262-267
56. **Turksen, K., Aubin, J.E.** 1991. Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. *J. Cell Biol.* 114:373-384
57. **Tasaki, Y., Takamori, R., Koshihara, Y.** 1991

Prostaglandin D2 metabolite stimulates collagen synthesis by human osteoblasts during calcification. *Prostaglandins*. 41(4):303-13

58. **Tenenbaum, H.C., Limeback, H., McCullosh, C.A.G., Mamujee, H., Sukhu, B., and Torontali, M.** 1992 Osteogenic Phase-specific co-regulation of collagen synthesis and mineralization by  $\beta$ -glycerophosphate in chick periosteal cultures. *Bone* 13: 129-138
59. **Tanaka, T., Taniguchi, Y., Gotoh, K., Satoh, R., Inazu, M., Ozawa, H.** 1993 Morphological study of recombinant human transforming growth factor beta 1-induced intramembranous ossification in neonatal rat parietal bone. *Bone*. 14(2):117-23
60. **Uchida, A., Kikuchi, T., and Shimomura, Y.,** 1988. Osteogenic capacity of cultured human periosteal cells. *Acta Orthop Scand* 59(1):29-33.
61. **Van der Zee, E., Everts, V., Hoeben, K., Beertsen, W.** 1995 Cytokines modulate phagocytosis and intracellular digestion of collagen fibrils by fibroblasts in rabbit periosteal explants. Inverse effects on procollagenase production and collagen phagocytosis. *J. of cell Science*. 108:3307-15
62. **Wronski, T. J., Morey-Holton, E. R., Doty, S. B., Masese, A. C., Walsh, C. C.** 1987 Histomorphometric analysis of rat skeleton following spaceflight. *American Journal of Physiology*. 252:R252-5
63. **Wood, BP.,** 1987 Infant ribs: generalized periosteal reaction resulting from vibrator chest physiotherapy. *Radiology*. 162(3):811-2
64. **Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Miysock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M., and Wang, E.A.** 1988 Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528-1534

65. **Weinreb, M., Shinar, D., Rodan, G.A.**, 1990. Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *J. bone Min. Res.* 5(8):831-842
66. **Williamson, M.S., Miller, E.K. Rees, J.P. and Iacopino, A.M.** 1994. Cyclosporine A upregulates interleukin-6 gene expression in human gingiva: possible mechanism for gingival overgrowth. *J. Periodontol* 65(10):895-903
67. **Yasui, N., Kojimoto, H., Shimizu, H., and Shimomura, Y.** 1991. The effect of distraction upon bone, muscle, and periosteum. *Orthop. Clin. Of North Am.* 22(4):563-7
68. **Yazadanbakhsh, K., Choi, J.W., Li, Y., Lau, L. F., and Choi, Y.** 1995. Cyclosporin A blocks apoptosis by inhibiting the DNA binding activity of the transcription factor Nur77. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol:92 pp.* 437-441.