

國立臺灣體育學院
運動健康科學學系碩士班
碩士學位論文

建立篩選平台—影響肌原母細胞分化之
化合物

**To Establish the Screen Platform —The
Effects of Unknown Chemical
Compounds On The Myoblasts
Differentiation**



研究生：陳南君

指導教授：方世華 教授

中華民國九十九年六月

論文名稱：建立篩選平台—影響肌原母細胞分化之化合物

總頁數：68 頁

院校所組別：國立臺灣體育學院運動健康科學學系碩士班

畢業時間及提要別：九十八學年度第二學期碩士學位論提要

研究生：陳南君

指導老師：方世華 博士

中文摘要

當運動員接觸到對肌肉有害的化合物，就會引發肌肉損傷的危機，影響其運動訓練與表現。我們希望利用一套嚴謹的偵測平台，提早評估可能影響肌肉發展及分化的成份。本研究論文以 C₂C₁₂ 老鼠骨骼肌細胞作為實驗平台，將已知抑制肌細胞分化之氯化甲醇 (methoxychlor, MXC) 當作為對照組，分析一系列“YMT”人工新合成的黃酮類化合物對肌細胞分化的影響，利用細胞型態、細胞存活率、肌肉特定蛋白 Myogenin、肌酸激酶 (creatine kinase, CK) 表現的變化作為評估的依據。實驗結果發現，不同的 YMT 新合成化合物對於肌細胞的影響也不相同，其中 YMT10、12、14、16 這 4 種藥物各別以 0.5 nM、7.5 nM、1 nM、5 nM 的濃度就可達到抑制 50% 肌小管細胞存活率及細胞融合指數，遠比已知的 MXC 更具顯著的抑制效果。而且，藥物對分化後肌細胞內的肌酸激酶活性與 Myogenin 表現量的抑制作用也不相同。若在分化過程中加入 YMT10、14 此 2 種藥物後，發現分化後肌小管細胞的肌酸激酶活性、細胞融合指數及 Myogenin 蛋

白質表現量皆會減少；然而在分化過程加入 YMT12 的肌小管細胞中發現，雖然細胞融合指數及肌酸激酶活性明顯減少，但 Myogenin 的蛋白質表現量並沒有明顯改變；另外，分化過程中加入 YMT16 藥物時，分化後的肌小管細胞之細胞融合指數及 Myogenin 蛋白質表現量會減少，但肌酸激酶活性卻呈現增加趨勢。此外，在分化開始後的不同階段加入 YMT10、12、14 及 16 這 4 種藥物，發現藥物作用的時間即使未達 3 天，仍會對細胞分化產生抑制。由本實驗結果推測，YMT 藥物的苯環結構所銜接的取代基可能造成對肌原母細胞及分化後的肌小管細胞作用濃度不同的原因之一。同時我們發現當肌原母細胞開始分化成肌小管細胞後，對藥物的敏感性也隨之改變。這 4 種不同藥物可能透過影響不同的細胞週期調控因子或訊號傳遞過程，進而改變了肌肉細胞分化後的各種特性。至於這些新合成化合物影響肌肉分化過程的分子機轉，未來需更進一步探討。目前本論文已建立一套篩選的技術平台，可以應用在篩選任何可能抑制或促進肌細胞分化的化合物。

關鍵字：細胞分化

Title of Thesis : To Establish the Screen Platform —The Effects of Unknown Chemical Compounds On The Myoblasts Differentiation

Name of Institute : Department of Exercise Health Science, National Taiwan College of Physical Education

Graduate Date : June 2010 **Degree Conferred :** M.P.E

Name of Student : Chen, Nan-Chun **Advisor :** Fang, Shih-Hua

ABSTRACT

If athletes contact harmful compounds, which may lead to muscle damage, and muscle injury will have impact on athletes training and performance. The aim of this study is to establish a rigorous screening platform for early detection of compounds that may exert inhibitory effects on muscle differentiation. We used C2C12 mouse myoblast cell line as an experimental model, and a synthetic known inhibitor of muscle cell differentiation-Methoxychlor (MXC) as positive control to monitor the accuracy of this screening platform. We investigated whether a series of newly synthesized flavonoids compounds, “YMT”, may affect the muscle cell differentiation. Meanwhile, we observed the changes of morphology, viability, muscle specific protein– Myogenin, and creatine kinase (CK) activity. The results showed that the effects a series of YMT compounds on C2C12 were different. When myoblasts were

treated with 0.5 nM of YMT10, 7.5 nM of YMT12, 1.0 nM of YMT14, and 5.0 nM of YMT16, the cell viability and formation of myotube were decreased about 50% compared with the cell control. Interestingly, the effects of these YMT compounds on creatine kinase activity and Myogenin protein were different. YMT10, 12, 14 and 16 were added to the myoblast cultures when shifted to the differentiation medium at the third day, YMT10 and 14 decreased the fusion index, creatine kinase activity and Myogenin; YMT12 decreased the fusion index and creatine kinase activity, but Myogenin did not change; YMT16 decreased the fusion index and Myogenin, but the creatine kinase activity was increased. In addition, YMT compounds effectively blocked the induction of fusion index when added at an early period of the differentiation of C2C12 cells. From our results, we can conclude that YMT analogues with different substituents might cause the different effects on myoblast or myotube. Meanwhile, we found the sensitivities of myoblast and myotube are different. YMT10, 12, 14 and 16 may change the variety of characteristics through affecting the cell cycle regulator factors or signal transduction. However, further studies are needed to elucidate the detail mechanisms. In summary, we established a screening platform, which can be used to screen the effects of compounds on muscle cell differentiation.

Keywords : cell differentiation

誌謝

本論文能順利的完成要感謝許多人的幫忙及協助。最由衷感激莫過是我的指導教授一方世華老師及史佩玉學姊，在這兩年中，讓對於生命科學懵懂無知的我了解到要用嚴謹的態度、正確的思考邏輯面對實驗及生活的一切。在論文及實驗研究過程中，皆能不厭其煩的給予我教導及指正，並且在我感到沮喪、挫折時，鼓勵我、開導我。真的非常感謝你們！

另外，也非常感謝張振崗老師、和李再立老師於百忙之中撥空仔細的審視本論文和參與口試，並提供寶貴的意見，而使本論文更趨完善。

就讀研究所期間，也非常感謝巫錦霖老師、洪暉老師、邱彥成老師在運科會議上都能給予指導及建議。此外，在也感謝我的家人，在我升學路上一直支持著我，並謝謝系所與實驗室裡的學長姐、親愛同學們及學弟妹們，在我學習過程中給予我鼓勵及協助。最後致上最誠摯的感謝，感謝一路陪伴、幫助過我的每一個人！

目錄

| | |
|---|-----|
| 中文摘要 | I |
| ABSTRACT | III |
| 誌謝 | V |
| 目錄 | VI |
| 表目錄 | IX |
| 圖目錄 | X |
| 附錄 | XI |
| 縮寫與全名對照表 | XII |
| 第壹章 引言 | 1 |
| 第一節 研究背景 | 1 |
| 第二節 研究目的 | 3 |
| 第三節 研究假設 | 4 |
| 第四節 名詞解釋 | 5 |
| 第貳章 文獻探討 | 6 |
| 第一節 肌肉細胞發育及分化起源 | 6 |
| 第二節 肌肉損傷與免疫系統的關連 | 10 |
| 第三節 藥物對肌肉發育及分化影響 | 17 |
| 第四節 總結 | 21 |
| 第參章 研究方法與步驟 | 22 |
| 第一節 實驗設計 | 22 |
| 第二節 實驗材料與方法 | 24 |
| 壹、細胞培養 (cell culture) | 24 |
| 貳、氯化甲醇 (methoxychlor, MXC)及一系列 YMT 新合成化合物對肌原母細胞的影響 | 25 |

| | | |
|-----|---|----|
| 參、 | 一系列 YMT 新合成化合物對肌小管細胞影響 | 25 |
| 肆、 | 結晶紫定量分析 (crystal violet test) | 25 |
| 伍、 | 細胞型態的辨別—伊紅 (eosin-Y) 染色法 及細胞融合指數之計算 | 26 |
| 陸、 | 西方點墨法 (western blotting) 偵測 Myogenin 表現 | 27 |
| 柒、 | 肌酸激酶活性 (creatine kinase activity, CK activity) 之分析 | 29 |
| 第肆章 | 結果 | 30 |
| 第一節 | 肌原母細胞與肌小管細胞之細胞型態 | 30 |
| 第二節 | 不會直接造成肌原母細胞死亡的 MXC 及 YMT 藥物濃度篩選 | 31 |
| 第三節 | YMT 藥物造成分化後的肌小管細胞存活率 低於 50% 的濃度之測試 | 32 |
| 第四節 | 不同濃度的 YMT10、YMT12、YMT14、 YMT16 對肌小管細胞分化的影響 | 33 |
| 第五節 | 肌原母細胞在不同濃度的 YMT10、YMT12、 YMT14、YMT16 影響下分化成肌小管細胞中 的肌酸激酶活性表現 | 34 |
| 第六節 | 肌原母細胞在不同濃度的 YMT10、YMT12、 YMT14、YMT16 影響下分化成肌小管細胞中 的 Myogenin 蛋白質表現量 | 35 |
| 第七節 | 不同分化階段加入 YMT10、YMT12、YMT14 、YMT16 對肌小管細胞分化後的細胞融合 指數之影響 | 36 |

| | |
|--------------|----|
| 第伍章 討論 | 37 |
| 表目錄 | 43 |
| 圖目錄 | 45 |
| 參考文獻 | 51 |
| 附錄 | 67 |

表目錄

| | |
|---|----|
| 表 一 、 不會直接造成肌原母細胞死亡的 MXC 及 YMT 藥物濃度篩選 | 43 |
| 表 二 、 YMT 藥物造成分化後的肌小管細胞存活率 低於 50% 的濃度之測試 | 44 |

圖目錄

| | | |
|------|---|----|
| 圖 一、 | 實驗流程圖 | 23 |
| 圖 二、 | 肌原母細胞與肌小管細胞之細胞型態 | 45 |
| 圖 三、 | 不同濃度的 YMT10、YMT12、YMT14、YMT16 對肌小管細胞分化的影響 | 46 |
| 圖 四、 | 肌原母細胞在不同濃度的 YMT10、YMT12、 YMT14、YMT16 影響下分化成肌小管細胞中的 肌酸激酶活性表現 | 48 |
| 圖 五、 | 肌原母細胞在不同濃度的 YMT10、YMT12、 YMT14、YMT16 對分化成的肌小管細胞中的 Myogenin 蛋白質表現量 | 49 |
| 圖 六、 | 不同分化階段加入 YMT10、YMT12、YMT14、 YMT16 對肌小管細胞分化後的細胞融合指數 之影響 | 50 |

附錄

| | |
|---|----|
| 附錄一、 一系列 YMT 新合成化合物之結構 | 67 |
| 附錄二、 YMT10、12、14、16 各別化學結構式之 示意圖 | 68 |

縮寫與全名對照表

基因及轉錄因子

Myf-5 : Myogenic factor 5

MyoD : Myogenic differentiation antigen-1

MRF4 : Muscle regulatory factor4

細胞核轉錄因子 : Nuclear factor kappa B , NF- κ B

類胰島素生長因子 : Insulin-like growth factor , IGF

纖維母生長因子 : Fibroblast growth factor , FGF

轉化生長因子 : Transforming growth factor , TGF

p38-分裂原活化蛋白質激酶 : p38- Mitogen-activated protein kinase , p38- MAPK

肌酸激酶 : Creatine kinase , CK

藥品及材料

氯化甲醇：Methoxychlor，MXC

去甲基二氫癩創木酸：Nordihydroguaiaretic acid，NDGA

二甲基亞砜：Dimethyl sulfoxide，DMSO

肌肉生長抑制素：Myostatin，MSTN

胎牛血清：Fetal bovine serum，FBS

馬血清：Horse serum，HS

磷酸鹽緩衝液：Phosphate buffer saline，PBS

辣根過氧化酶：Horseradish peroxidase，HRP

第壹章 引言

第一節 研究背景

骨骼肌主要的功能除了維持正常姿勢之外，還具有支撐臟器與避免內部組織受到傷害的功能，同時，藉由肌肉收縮，可以拉動韌帶，使個體產生動作 (Huard, Li, & Fu, 2002)。一旦肌肉發生損傷，往往會造成活動障礙，嚴重時會帶來日常生活上的不舒適與不便利。常引起肌肉損傷的原因有：激烈運動、肌肉壓迫、毒物刺激、局部缺血、酒精成癮等因素，此外，近年來的研究發現，日常生活常用的藥品中也有某些成分會導致肌肉受損，例如：長期服用降血脂藥物 Statin，就會造成肌細胞受損的副作用產生 (Mohaupt et al., 2009)。Statin 對肌肉副作用的影響範圍極廣，輕微可導致肌肉酸痛、無力等，嚴重會造成橫紋肌溶解，甚至在停藥之後，藥物對肌肉造成損害仍會持續進行。現今普遍使用的除草劑和殺蟲劑主成份之一的氯化甲醇 (Methoxychlor, MXC) 也被認為具有導致肌細胞病變的危險 (Grow & Eroschenko, 2002; Steffens, Batia, Baarson, Choi, & Grow, 2007)。這些導致肌細胞受損的毒性成分往往不溶於水，容易殘存在體內不易被代謝，它們除了會使肌細胞發育異常之外，連帶也會使生殖內分泌系統產生病變及異常 (Amstislavsky, Kizilova, & Eroschenko, 2003; Grow & Eroschenko, 2002; Steffens et al., 2007)。

運動員不可避免地也會接觸到環境中各種特性不明的成份，而運動員的肌力是決定運動表現好壞的主要因素，肌肉

細胞受傷會直接影響到訓練反應及運動表現，故我們認為若能建立一套嚴謹的偵測平台，則可在藥物在傷害肌細胞之前提早偵測及防範。

本文中，所測試的化合物“YMT”是一系列 3',4',5'-四甲基查爾酮 (3',4',5'-trimethoxychalcone) 的類似物，以人工合成的方式置換苯環上的取代基 (substituent)，是含有查爾酮 (chalcones) 合成的化合物 (Rao, Fang, & Tzeng, 2009)，此藥物共有 23 種 (YMT 1-23)，由朝陽科技大學曾耀銘教授所提供。查爾酮為黃酮類化合物的其中一類，其結構具有兩個苯環 (benzene ring)，而黃酮類化合物具有抗菌、抗真菌、抗發炎、抗癌等功能，被視為是一種天然的抗氧化劑，也普遍存在於植物當中 (Rao et al., 2009)。目前得知，這些 YMT 新合成化合物可以抑制一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的產生，同時也能抑制肝癌細胞 (Hep G2) 及大腸癌細胞 (Colon205) 的分裂，但目前對一系列 YMT 藥品是否會對肌肉細胞的生長及分化影響性尚不明確。因此，本篇論文我們利用 C₂C₁₂ 老鼠骨骼肌細胞株進行實驗，並使用 MXC 為對照組，評估一系列 YMT 化合物對肌細胞的存活率 (viability) 及分化過程的影響。

第二節 研究目的

本篇論文以 *in vitro* 的方式設計實驗，使用 MXC 作為對照組，將一系列 YMT 化合物當作測試樣品，評估藥物對肌細胞的存活率及分化過程的影響性。以藥物對細胞的毒性影響及肌細胞分化指標測試，建立嚴謹的藥物篩選平台。

第三節 研究假設

目前已知一系列的 YMT 化合物可抑制巨噬細胞產生一氧化氮，達到抗發炎效果。另外，YMT 化合物也能抑制腫瘤細胞進行分裂，但其對肌細胞生長及分化的影響性尚不清楚 (Rao et al., 2009)。所以，我們以這一系列的化合物 (YMT1-23) 作為測試樣品，進行其對肌細胞生長及分化的評估測試。

我們預期這一系列的 YMT 新合成化合物中有部分會對肌細胞的分裂及分化產生影響，其影響性可能是在細胞型態 (morphology)、肌肉特定蛋白質表現量及肌酸激酶 (creatine kinase, CK) 的表現。

第四節 名詞解釋

- (一) 肌原母細胞 (Myoblast)：未經分化的肌肉前趨細胞，存在於肌肉組織中，當受到纖維母細胞生長因子 (fibroblast growth factor, FGF) 刺激時會開始進行細胞分裂 (cell proliferation)。
- (二) 肌小管細胞 (Myotube)：由肌原母細胞融合 (fusion) 後而稱之，當肌小管成熟後最終組成肌纖維，使肌肉產生收縮功能。
- (三) 肌細胞分化 (differentiation)：肌細胞由單顆、單核的型態轉變為多核、管狀的過程稱之。
- (四) 肌細胞生成 (Myogenesis)：由肌肉前趨細胞經過一連串複雜的傳遞訊號使細胞開始分裂成為肌原母細胞，之後再經過其他複雜的傳遞訊號，使細胞融合形成肌小管細胞，最終成為具有功能的肌纖維。
- (五) 肌肉特異性調控因子群 (Muscle regulatory factors, MRFs)：由 Myf5 (myogenic factor 5)、MyoD (myogenic differentiation antigen-1)、Myogenin 和 MRF4 (muscle regulatory factor 4) 所組成，當肌肉特異性調控因子群被啟動，會活化肌肉特異性調控因子表現及功能，以達到調節肌肉分化過程之目的。
- (六) 肌肉損傷 (Muscle injury)：是指外來刺激造成肌肉受損的情形。肌細胞對自身的損傷具有一定程度的修復功能，也稱之為肌肉再生 (regeneration)。

第貳章 文獻探討

第一節 肌肉細胞發育及分化起源

壹、肌肉細胞發育 (muscle development)起源及功能

肌肉細胞可分為心肌、骨骼肌及平滑肌。骨骼肌主要的作用是維持姿勢及支撐臟器與內部組織，以避免身體受到傷害，當肌肉收縮拉動韌帶可以產生動作進行活動 (Huard et al., 2002)。肌細胞生長是經由不同的刺激共同完成。來自於自體分泌 (autocrine)、旁分泌 (paracrine)及內分泌 (endocrine)的不同訊息傳導路徑，使細胞內的調控因子活化造成基因改變，這些改變讓原本單顆、單核的肌原母細胞分化成細長管狀且多核的肌小管細胞，成束的肌小管細胞再形成可供人體活動使用的肌纖維。

骨骼肌細胞由中胚層 (paraxial mesoderm)開始發展，在胚胎時期，中胚層透過環節分裂 (segmentation)形成體節 (somites)，體節是胚胎發育時期時，位於神經管兩側短暫存在的結構，隨著發展過程的進行會進一步分化成生皮肌節 (dermomyotome)、生骨節 (sclerotome)。體節內有肌肉前趨細胞 (myogenic precursor cell)，當其受到神經管及外胚層所釋放的訊號刺激後，促使中軸附近的肌肉前趨細胞變成軸上生肌節 (epaxial myotome)，主要的功能是分化成軀幹及肋骨；靠近腹部的肌肉前趨細胞則會轉變成為軸下生肌節 (hypaxial myotome)，其主要分化為體壁 (body wall)及四肢；腹側旁的肌肉前趨細胞則會轉變成為生皮肌節 (myotome)最後分化為真皮及皮下組織；而背側的肌肉前趨細胞則轉變

成鞏節，最後分化成骨、軟骨或具有纖維性的結締組織 (Le Grand & Rudnicki, 2007; Perry & Rudnick, 2000)。

貳、肌肉發育及分化

影響肌肉發展過程的因子很多，Pax3 及 Pax7 是骨骼肌的前趨細胞才會有的特有調控因子，在胚胎時期為肌肉發育所需。學者們發現，缺乏 Pax3 或 Pax7 基因的小鼠會影響肌肉生成，因此，無法正常生成四肢肌肉 (Epstein, Lam, Jepeal, Maas, & Shapiro, 1995)。另外，FGFs 及纖維結合素 (fibronectin) 為兩個重要的主導影響因子。FGFs 可以刺激肌細胞產生分裂，當纖維母細胞生長因子減少、纖維結合素增加以及肌原母細胞中的肌肉特異性基因群 (muscle-specific genes) 開始表現時，會促使原本型態為單顆、單核的肌原母細胞排列成肌細胞鏈 (cell alignment)，透過細胞膜的融合作用分化成多核成熟的肌小管細胞 (Grow & Eroschenko, 2002; Ono, Sensui, Sakamoto, & Nagatomi, 2006)。解剖學上，成束的肌小管細胞組合在一起即變成有收縮功能的肌纖維。

目前已知的肌肉特異性調控因子群 (myogenic regulatory factors, MRFs)，包括 Myf5、MyoD、Myogenin 以及 MRF4 等 (Braun et al., 1989; Nishimura et al., 2008; Rohwedel et al., 1994)。這些調控因子群皆具有 basic-helix-loop-helix (bHLH) domain 與 basic-DNA binding motif 的特性，因此可以啟動基因上游的啟動子 (promoter) 區域處之 5'-CANNTG-3' 序列。該區又可稱為 E-Box 結合區 (Perry & Rudnick, 2000; Rohwedel et al., 1994)。肌球蛋白輕

鏈 (myosin light chain)、肌球蛋白重鏈 (myosin heavy chain, MHC)、肌酸激酶、旋轉素 I (troponin I) 等皆有 E-Box 結合區結構存在。當上游調控區域的 E-Box 被結合後，則可活化 MRFs 進一步調節肌細胞的分化 (Edmondson & Olson, 1993; Legerlotz & Smith, 2008)。MRFs 家族中，不同的成員負責的角色各有不同，其中，Myf-5 和 MyoD 被視為早期調控因子。這兩個調控因子主要的功能是使胚胎發育成肌肉前趨細胞，使肌原母細胞的分裂能順利進行 (Perry & Rudnick, 2000; Rohwedel et al., 1994)；MyoD 則是磷蛋白 (phosphoprotein) 的一種，由兩個雙極性 α 螺旋 (amphipathic α helices) 所構成，約含有 40~50 胺基酸片段 (Braun, Rudnicki, Arnold, & Jaenisch, 1992; Tapscott et al., 1988)。Myogenin 與 MyoD 兩者的核苷酸序列結構相似，所以被公認為都是用來調控肌肉分化的調控因子。MyoD 通常被認定為是使胚胎趨化為肌肉前趨細胞的主要調控因子；而 Myogenin 則負責調控肌肉細胞最後發育及分化的晚期階段，其能使單核肌原母細胞分化成為細長管狀並多核的肌小管細胞及肌纖維 (Edmondson & Olson, 1993; Le Grand & Rudnicki, 2007; Perry & Rudnick, 2000; Smith, Kachinsky, & Miller, 1994)。

MyoD 最早是由 Davis, Weintraub, 與 Lassar (1987) 的研究先提出，MyoD 的基因主要表現在骨骼肌，而心肌、平滑肌內則並不表現 (Davis, Weintraub, & Lassar, 1987; Hopwood, Pluck, & Gurdon, 1989; Megeney, Kablar, Garrett, Anderson, & Rudnicki, 1996; Perry & Rudnick, 2000; Rohwedel et al., 1994)。其它的研究顯示，C₂C₁₂ 小鼠骨骼肌細胞株在開始分化後約 2 個小時左右，Myogenin 的 mRNA 就開始表現，並且在

第24小時達到最高峰 (Edmondson & Olson, 1989)。Myogenin mRNA的分析結果也發現，Myogenin的基因只表現在骨骼肌及橫隔膜中，而不表現於其他肌肉及非肌肉組織中。Hasty et al.(1993)及 Patapoutian et al.(1995)分別指出缺乏Myogenin或MRF4基因突變也會影響胚胎的發展，使小鼠無法正常生成肌肉。實驗中大部分的小鼠一出生立即死亡，而少部分存活的小鼠肋骨會有嚴重變異。故許多學者推測Myogenin及MRF4是影響肌肉型態及功能發育過程不可缺少的肌肉特異性調控因子 (Braun et al., 1989; Edmondson & Olson, 1989, 1993; Hasty et al., 1993; Patapoutian et al., 1995)。

第二節 肌肉損傷與免疫系統的關連

壹、 體內免疫系統的防禦機制

免疫系統的功能主要是要維持體內防禦機制的恆定，一般分成兩個類型。第一類型稱為先天性免疫力 (innate immunity)，指的是健康個體在受感染前就已存在於體內的防禦機轉，可快速對微生物產生反應，包括：皮膚的屏障、吞噬細胞 (phagocytes) 的吞噬作用 (phagocytosis)、自然殺手細胞 (natural killer cell, NK cell)、補體系統 (complement system) 等。具有吞噬能力的細胞包括：嗜中性白血球 (neutrophil)、單核球 (monocyte) 及巨噬細胞 (macrophage) (林碧鳳、江伯倫, 2006, 第 2 章)。

嗜中性白血球是體內首先會對感染產生反應的白血球，它們會在感染的第一時間內快速移動到感染部位，並且在吞噬微生物後死亡；單核球源自於骨髓內的細胞及血管的內皮細胞，當遇到微生物時，血液中的單核球會主動移動到發炎部位，並且活化成巨噬細胞，而被活化的巨噬細胞則會進行吞噬作用殺死微生物，吞噬微生物後的巨噬細胞會釋放出數種協助發炎反應進行的細胞激素 (cytokines)。細胞激素是可溶性蛋白質，為免疫及發炎反應的介質，與免疫相關的細胞激素包含：腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、趨化激素 (chemokine)、介白素 (interleukin, IL)、干擾素 (interferon, IFN) 等。細胞激素主要與活化自然殺手細胞、巨噬細胞或者 B 細胞等，此外，細胞激素也與細胞分化、分裂、調節修復有關，亦可以引發細胞凋亡 (apoptosis) 及產生發炎反應 (Nieman et al., 2003; Pedersen & Hoffman-Goetz,

2000)，其包括：IL-1、IL-6 和 TNF- α (Dinarello, 1991; Febbraio & Pedersen, 2002)。這些細胞激素會刺激內皮細胞增加選擇素 (selectin)、整合素 (integrin)配體及趨化激素，趨使嗜中性白血球、單核球及 T 細胞 (T-cell)往感染部位聚集並增加血管的擴張及通透性以產生發炎作用 (inflammation) (林碧鳳、江伯倫, 2006, 第 2 章)。

第二類型稱之為適應性免疫力 (adaptive Immunity)，其也被稱之後天性免疫力，當身體受到外物感染後會對入侵的微生物產生專一性的免疫力。適應性免疫又可分為體液性免疫力 (humoral immunity)及細胞性免疫力 (cell-mediated immunity)。體液性免疫力是由 B 細胞 (B-cell)產生抗體 (antibody)，它具專一性可以辨別微生物抗原 (antigen)，主要功能為中和抗原、活化補體系統及促進吞噬作用，進行消滅微生物。細胞性免疫力，則主要是由 T 細胞消滅細胞內的微生物。細胞性免疫力反應分為兩種—CD8⁺T 細胞、CD4⁺T 細胞。CD8⁺T 細胞會殺死已感染微生物的細胞；CD4⁺第一型輔助 T 細胞 (T_H1 cells)會釋出 IL-2 以刺激 T 細胞生長，並使 T_H1 cells 釋放出 IFN- γ 促進發炎反應，活化巨噬細胞以殺死被吞入的微生物，另外，IFN- γ 也會刺激 B 細胞產生抗體；CD4⁺第二型輔助 T 細胞 (T_H2 cells)則會釋放出 IL-4 刺激 IgE (Immunoglobulin E, IgE)抗體的產生及釋出 IL-5 促使嗜酸性白血球 (eosinophil)的活化(林碧鳳、江伯倫, 2006, 第 5 章)。

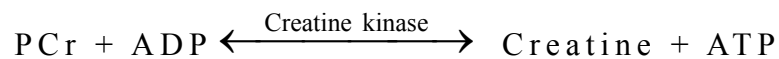
貳、體內細胞激素的改變

免疫系統除了受到下視丘-腦下垂體的調控之外，外界因素的刺激也會影響後天性免疫系統的功能出現變化

(Pedersen, Akerstrom, Nielsen, & Fischer, 2007)。在過去幾十年中，學者們發現當身體壓力 (physical stress)，如：肌肉損傷、創傷 (手術、燒傷、急性心肌梗塞等因素) 及運動均會影響內分泌及細胞激素，而使得體內的免疫系統產生改變 (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000)。Nieman et al. (2003) 指出骨骼肌也會產生細胞激素，當肌肉收縮時，IL-6、IL-1 β 、IL-8、IL-15、TNF- α 及 IFN- γ 等細胞激素表現就會受到影響。

參、 肌酸激酶

肌酸激酶為雙偶聚合酶酵素，在脊椎動物體內扮演著維持能量平衡的功能，其負責催化高能量的磷酸肌酸 (phosphate creatine, PCr) 和 ADP，產生肌酸 (creatine) 及 ATP 以提供身體的能量來源。



細胞質內的肌酸激酶異構酶分成兩型—包括腦分泌型 (brain, B type) 及肌分泌型 (muscle, M type) 兩種，此兩種型態可組合出三種不同的二聚體，包括：CK-MM、CK-BB、CK-MB，常存在於人體器官、腦組織、神經組織、肌肉組織中 (Chamberlain, Jaynes, & Hauschka, 1985)。另外還有一種是由粒線體表現出的肌酸激酶異構酶 (the mitochondrial creatine kinase isoenzyme, CK-Mt)，通常在人體心臟、肝臟、腦部等結構中可被發現。CK-MM，被發現於心肌、肌纖維的 M 線 (M line) 中 (Lang & Wurzburg, 1982; Wallimann, Wyss, Brdiczka, Nicolay, & Eppenberger, 1992)，其半衰期約 15 小

時，常用來診斷心肌梗塞等相關疾病；CK-BB 在腦部及神經組織中的含量較多，在血漿中的濃度範圍約在 0.5—1 U/L 之間，而 CK-BB 的半衰期比 CK-MM 來得短，大約 3 小時左右。CK-BB 亦會大量表現在肌原母細胞內，但當肌原母細胞分化為肌小管細胞後，CK-BB 的濃度也就會隨之下降 (Lang & Wurzburg, 1982; Trask & Billadello, 1990; Wilson, Brindle, & Fulton, 1995)；CK-MB 則主要是由肌肉組織表現，半衰期約 12 小時，濃度正常範圍約 0—2 U/L 之間，但新生兒、幼兒及小孩體內濃度會比成人來得高。CK-MB 通常用來檢測因運動所造成的急性心肌梗塞等相關疾病 (Lang & Wurzburg, 1982)。過去研究也指出肌酸激酶大量存在於成熟的骨骼肌與心肌細胞內，從 Lanngen, Schols, Kelders, Wouters, 與 Janssen-Heininger (2001) 以及 Magalara et al. (2003) 的研究皆發現，C₂C₁₂ 小鼠骨骼肌細胞株在加入含有馬血清的培養基後，其細胞內的肌酸激酶濃度明顯增加 (Chamberlain et al., 1985; Langen, Schols, Kelders, Wouters, & Janssen-Heininger, 2001; Maglara, Vasilaki, Jackson, & McArdle, 2003)。

此外，Ito et al. (2005) 發現 25 μ M 的去甲基二氫癩創木酸 (nordihydroguaiaretic acid, NDGA) 可明顯阻斷肌原母細胞的分化，並降低因從肌原母細胞分化成肌小管細胞的 CK-MB 異構酶濃度。當 NDGA 的濃度愈高時，CK-MB 異構酶的濃度就愈低。總和文獻可知，肌酸激酶除了可作為肌肉損傷的指標外，也可作為細胞分化的指標，肌酸激酶的活性可能會隨著肌原母細胞分化成肌小管細胞而增加，然而，當肌肉的分化過程被減緩甚至抑制時，可能會減少細胞內肌酸

激酶的活性 (Chamberlain et al., 1985; Ito et al., 2005; Maglara et al., 2003)。

肆、肌肉損傷對免疫系統與細胞激素影響

肌細胞對損傷通常會有一定程度的修復功能，這種功能稱之為肌肉再生。常見的外來損傷包括：過度的機械性刺激、體能訓練、毒物刺激，而局部缺血 (eschemia)也是造成肌肉損傷原因之一 (Maglara et al., 2003; Tidball, 2005)。當肌肉受損後，會透過三個不同的階段進行肌肉修補作用 (Jackman & Kandarian, 2004)。第一階段，退化-發炎 (degeneration-inflammation)，通常會在受傷後的第一時間出現，並且退化-發炎的狀況會持續 1~2 週，當肌原纖維 (myofibrils)受損時，會使得細胞外液內的鈣離子滲入受傷區域，造成腫脹並產生血腫 (hematoma)、壞疽 (necrosis)，而體內的巨噬細胞及 T 細胞會透過微血管到達受傷區域並分泌出促發炎細胞激素，趨使嗜中性白血球及巨噬細胞，以促使發炎作用加劇，而巨噬細胞也會透過釋放生長因子調節受損組織的修復及生長，並促使纖維組織母細胞 (fibroblast)在修補過程中合成膠原蛋白 (Butterfield, Best, & Merrick, 2006)；第二階段，肌肉受損後的第 7~10 天會開始進行再生作用，並在第 14 天左右達到高峰，在此階段有許多相關的生長因子會被釋放出來，包括：肝細胞生長因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、類胰島素生長因子 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)、b 纖維母生長因子 (b fibroblast growth factor, bFGF)、轉化生長因子- α (transforming growth factor- α , TGF- α)、轉化生長因子- β (transforming growth

factor- β , TGF- β)等以調控肌細胞的分裂及分化、促使肌肉再生及修復。此外，受傷部位也會開始產生疤組織 (scar tissue) 促使血管向內生長；第三階段則為纖維化作用 (fibrosis)，約在肌肉受損後第 2~3 週出現，疤組織的形成會幫助肌肉組織修復完全 (Huard et al., 2002; Nozaki et al., 2008)。

Stupka 等 (2001)指出肌肉損傷會使肌酸激酶、嗜中性白血球及巨噬細胞數目快速上升，且體內的促發炎細胞激素 IL-6、IL-1、TNF- α 濃度也會隨之增加 (De Rossi, Bernasconi, Baggi, de Waal Malefyt, & Mantegazza, 2000; Febbraio & Pedersen, 2002; Gokhale, Chandrashekar, & Vasanthakumar, 2007; Stupka, Tarnopolsky, Yardley, & Phillips, 2001)。Toft et al. (2002)研究發現，受測者在做完 60 分鐘的腳踏車測驗後，其體內血漿中的 IL-6、IL-1 的受體拮抗劑 (receptor antagonist)皆會在運動後 4 小時達到最高值，而肌酸激酶濃度及嗜中性白血球數目是在運動後一小時後就顯著性地增加 (Toft et al., 2002)。另一篇研究也顯示，以 65% 的最大攝氧量強度做 30 分鐘的離心運動，運動後 2 小時血漿中的 IL-6 濃度開始顯著上升，並且在運動後 7 天內，其血漿中的肌酸激酶及 IL-6 濃度均持續升高 (Bruunsgaard et al., 1997)；Stupka 等 (2001)發現在不同強度的離心運動中，可使肌酸激酶、MPO (myeloperoxidase，常出現於單核球及嗜中性白血球中的酵素)及 CD68 (一種醣蛋白，會表現在單核球及巨噬細胞上)明顯增加，該研究認為升高的原因是運動所造成肌肉損傷所致。也有學者認為單次運動及因運動引起的肌肉損傷，皆會快速增加體內 IL-6 濃度 (Febbraio & Pedersen, 2002)。由上述文獻結果可知，肌酸激酶濃度、IL-6 的變化可

作為肌肉對運動強度、持續時間、耐力及肌肉損傷與否的反應依據 (Febbraio & Pedersen, 2002)。

第三節 藥物對肌肉發育及分化影響

目前已被證實會促進肌肉生成的成分或藥物歸類如下：瘦體素 (leptin)、鈣黏蛋白 (cadherin)、生長素 (ghrelin)等；而會抑制肌肉分化的藥物則有：A23187、2,4-dinitrophenol (DNP)、Chlorpromazine、Dexamethasone、二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、suramin、肌肉生長抑制素 (myostatin, MSTN)、Statin、NDGA、MXC 等。

瘦體素，是一種由脂肪細胞所分泌的蛋白質，過去研究發現其與 T 細胞、B 細胞、造血細胞、平滑肌細胞與胃癌細胞的分裂有關 (Gainsford et al., 1996; Tanabe, Okuya, Tanizawa, Matsutani, & Oka, 1997; Yu et al., 2008)。Yu et al. (2008)的研究指出，瘦體素的濃度愈高時，骨骼肌細胞的分裂速度也愈快；相反的，肌酸激酶活性、Myogenin 及肌球蛋白重鏈的蛋白質表現就會減少。

鈣黏蛋白為穿膜醣蛋白 (transmembrane glycoprotein) 的一種，是存在於細胞膜上的細胞黏附分子 (cell adhesion molecule)。除了會促使細胞間相互黏附外，也主導胚胎發育中不同組織及器官的形成，另外，其與細胞的分化及腫瘤病變也有密切關係 (Ivanov, Philippova, & Tkachuk, 2001)。Redfield, Nieman, & Knudsen (1997)研究發現，透過 N-鈣黏蛋白 (N-cadherin)，會增加 BHK-21/C13 骨骼肌細胞的 β -連環蛋白 (β -catenin)，及肌節中的肌球蛋白 (myosin) 表現量，以促進肌肉分化 (Redfield, Nieman, & Knudsen, 1997)。

生長素是由胃部的上皮細胞所分泌的胜肽類激素，它除了會刺激食慾和活化位於腦下垂體的生長激素受器，以刺激

生長激素釋放外，也可作為血管擴張劑，增加一氧化氮的生物活性 (bioactivity) (Filigheddu et al., 2007)。加入乙醯化 (acylated) 的生長素或是去乙醯化 (des-Acyl) 的生長素，皆會抑制 C₂C₁₂ 小鼠骨骼肌細胞分裂、促進細胞分化，使細胞融合指數及 Myogenin 及肌球蛋白重鏈的蛋白質表現量明顯增加 (Filigheddu et al., 2007)。

Duncan 與 Jackson (1987) 的研究指出，在 Balb/C 小鼠肌肉內分別注入會造成肌肉損傷藥物：A23187 (20 μM)、DNP (1000 μM)、NDGA (5 μM) 及 chlorpromazine (200 μM) 後，發現注入 A23187 或 DNP 兩者，使小鼠比目魚肌所釋放的肌酸激酶濃度比其他 2 種藥物來得高，藥物也會造成肌纖維 Z 線 (z-line) 漸漸地被破壞甚至消失 (Duncan & Jackson, 1987)。近期發現，用於治療關節炎、過敏等發炎現象的皮質類固醇藥物，例如：Dexamethasone，其會透過接受器 Atrogen-1 或者是 MuRF1 導致肌肉萎縮 (Menconi, Gonnella, Petkova, Lecker, & Hasselgren, 2008)。Nishimura et al. (2008) 研究發現 C₂C₁₂ 加入常用於止痛消炎藥品的 DMSO 後，藥物濃度約在 2.5% 時會明顯降低肌肉特異性調控因子 Myf5、MyoD 及 Myogenin 的 mRNA 表現，並且發現肌肉水解相關基因，如：Atrogen-1、MuRF1 及 Foxo3a 的 mRNA 表現量明顯上升 (Menconi et al., 2008; Nishimura et al., 2008)。

Myostatin 為第八號生長分化因子 (growth and differentiation factor-8, GDF-8)，屬於轉化生長因子-β superfamily 的成員，在肌肉發展是扮演負向調控的角色，會抑制細胞的分裂及分化。Langley et al. (2002) 研究發現 myostatin 會透過 Smad 3 機制抑制 MyoD 及 Myogenin 的活性

及表現，使得骨骼肌無法正常由肌原母細胞分化成肌小管細胞 (Langley et al., 2002)。若抑制了 myostatin 的表現，則會明顯刺激肌原母細胞的分化速度至 90% 以上，並且會增加 Myogenin mRNA 450 倍以上的轉譯速度 (Jouliia, et al., 2003)。

在其他研究中發現，如：蘇拉明 (suramin) 或者是 NDGA 等抗纖維化作用與抗氧化藥物皆會抑制 TGF- β 1 表現，以致於抑制 TGF- β 1 與接受器結合，並抑制 myostatin 的活性以促使肌肉修復、再生 (Lee et al., 2003; Nozaki et al., 2008)。而當蘇拉明濃度愈高時，肌原母細胞分化後細胞融合指數也愈高，並且同時也發現到蘇拉明會影響 Myostatin 表現量及老鼠脛前肌受傷部位的纖維化程度 (Nozaki et al., 2008)。

NDGA 是從 creosote bush 中萃取，為天然的抗氧化劑，也是脂肪氧化酶 (lipoxygenase) 抑制劑 (Fujiwara, Takami, Misumi, & Ikehara, 1998; Lee et al., 2003)。當自由基 (reactive oxygen species, ROS) 過多，造成 DNA 氧化傷害，當細胞遇到外來物質傷害時會釋放出花生烯酸 (arachidonic acid)，以刺激脂肪氧化酶活性及促使淋巴球細胞產生促發炎細胞激素，並且也會趨化巨噬細胞及嗜中性白血球以進行防禦 (Fujiwara et al., 1998)。研究發現，NDGA 會抑制未飽和脂肪酸轉變成 5-Lipoxygenase，使得花生烯酸無法刺激淋巴球細胞分泌促發炎細胞激素 (Kim et al., 2008)。在過去研究也顯示，NDGA 除了會抑制淋巴球趨化作用之外，也會抑制 TGF- β 活性及阻斷肌原母細胞的分化 (Lee et al., 2003)，Ito et al. (2005) 研究發現，在 C₂C₁₂ 肌原母細胞在分化成肌小管細胞的過程中加入 25 μ M 的 NDGA，並不會造成細胞損傷或

者凋亡，但是會明顯抑制 MyoD、Myf5 及 Myogenin 等肌肉特異性調控因子表現，從此篇研究中也發現到 NDGA 對肌肉細胞早期的發展及分化過程影響較大。

Mohaupt et al. (2009) 的研究更指出，常用於治療高血脂藥物 Statin，會導致病患產生肌肉酸痛、無力感，嚴重時會產生橫紋肌溶解、肌肉病變情形，甚至停藥之後藥物仍會持續造成肌肉損傷；再者，存在於農作物、家畜、庭院、動物飼料及穀倉的有機氯除蟲劑 MXC，是屬於氯化乙烷衍生物。此成分不易溶於水，會殘存在體內不易被代謝，當人體或小鼠短期暴露於 MXC 中，就有可能導致肌細胞病變之外，更會影響到內分泌系統甚至造成生殖能力和性器官的發育病變 (Amstislavsky et al., 2003; Gartrell, Craun, Podrebarac, & Gunderson; Grow & Eroschenko, 2002; Steffens et al., 2007)。Steffens 等 (2007) 發現以 100 μ M 以下的 MXC 濃度處理肌原母細胞及肌小管細胞時，皆不會造成肌原母細胞抑或是肌小管細胞的凋亡，但是 MXC 會減緩 C₂C₁₂ 分裂速率，因此減少了肌小管細胞的形成。

第四節 總結

肌細胞生成是經過相當複雜的過程，當中胚層的肌肉前趨細胞受到訊號影響，會發展成為肌節及肌原母細胞。而某些的生長因子或肌肉特異性調控因子開始表現時，會促使肌原母細胞排列成肌細胞鏈並產生細胞融合作用，使之分化為肌小管細胞，最終形成為成束並具有收縮功能的肌纖維。當肌肉損傷時，體內會開始釋放出大量的促發炎細胞激素及肌酸激酶。然而，肌酸激酶也會表現於成熟的肌肉細胞中，當肌細胞分化時，其細胞內的肌酸激酶活性也會開始增加。因此，我們推測肌酸激酶除了可作為肌肉損傷指標外，也可當作肌細胞的分化指標。已有許多研究指出，許多藥物皆可能會影響肌肉生長或分化過程。肌力是決定運動員運動表現好壞的主要因素，肌細胞受損對運動員訓練及表現之間的直接關連性是不可被否認的。故我們認為，若能建立一套嚴謹的藥物篩選機制，就能在肌肉組織受到藥物不可逆之傷害之前提早防範。

第參章 研究方法與步驟

第一節 實驗設計

為了了解一系列 YMT 新合成化合物是否會影響 C₂C₁₂ 細胞生長及分化的過程，我們使用 MXC 作為對照組，以肌原母細胞作為藥物濃度的初步篩選工具，先挑出不使肌原母細胞死亡的濃度後，再針對肌原母細胞分化為肌小管細胞過程中，各別加入 YMT 化合物 (YMT1-23) 後，由肌原母細胞分化為肌小管細胞的細胞存活率測試結果中，挑出會顯著影響肌細胞分化的藥物，再進一步分析分化過程中若有 YMT 藥物存在，其對分化後肌小管細胞的細胞型態、細胞融合指數、肌酸激酶、肌肉特定蛋白質表現量的影響性(見圖一)。

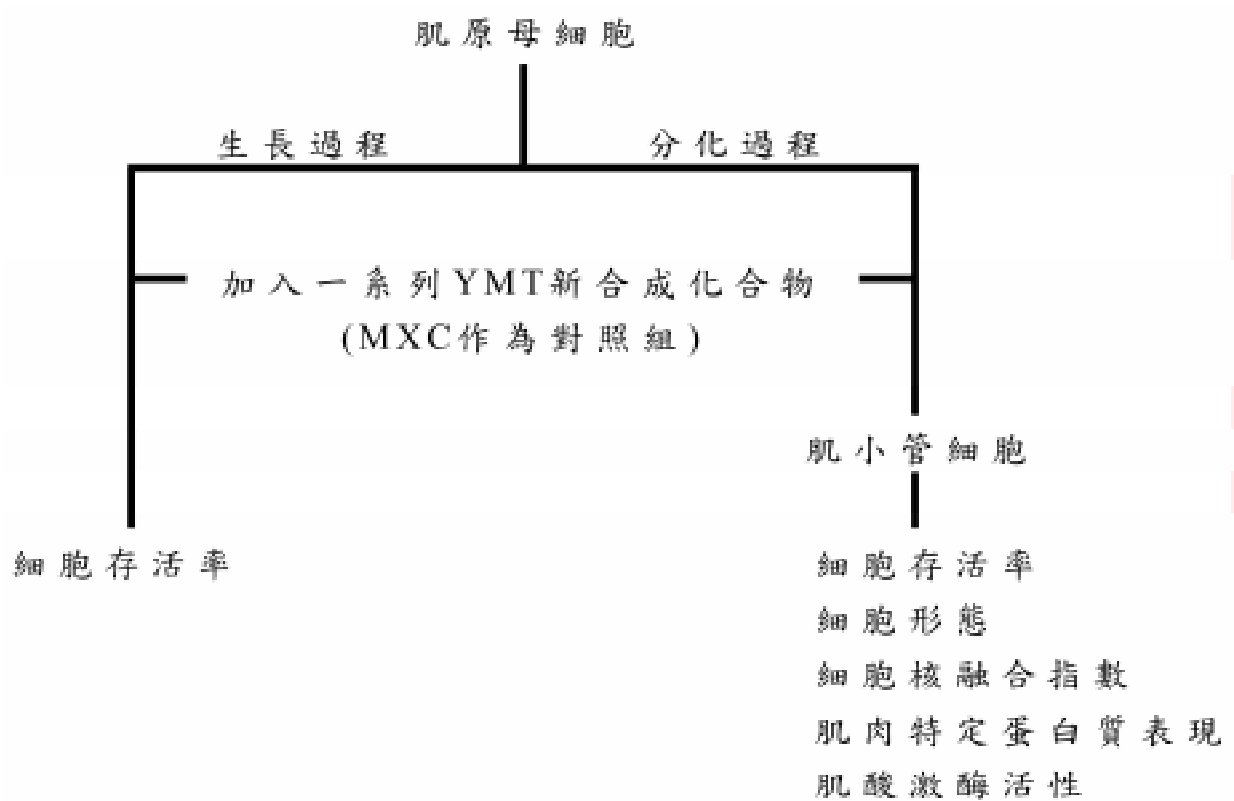


圖 一、實驗流程圖

首先以未分化的肌原母細胞對一系列 YMT 及 MXC 進行初步的藥物濃度篩選，篩選出不會直接造成肌原母細胞死亡的藥物濃度後，再進行肌原母細胞分化為肌小管細胞的過程中加入 YMT 藥物後，評估其對分化後的肌小管細胞之細胞存活率、細胞型態、肌酸激酶、肌肉特定蛋白質表現量的影響。

第二節 實驗材料與方法

壹、細胞培養 (cell culture)

C_2C_{12} 肌細胞細胞株 (購自食工所, 台灣) 由小鼠的骨骼肌取得, 本研究中所使用的培養基為 RPMI-1640 medium (SH30011.01; HyClone, Logan, USA)、1% L-glutamine (SH30034.01; HyClone, Logan, USA)、1% 盤尼西林 (SV30010; HyClone, Logan, USA) 及 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (SH30071.03; HyClone, Logan, USA)。 C_2C_{12} 培養於恆溫 37°C、5% 的二氧化碳培養箱中, 每隔 3~4 天進行一次繼代培養, 以保持細胞生長所需的酸鹼值。繼代培養時, 首先將上清液倒出, 並且用 1 倍的磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗 2 次, 以 2 cc 的胰蛋白酶 (trypsin) 把細胞打下後, 將細胞加入裝有 1 倍 PBS 的 15 mL 離心管, 並使用離心機以 1800 rpm、4°C 離心 3 分鐘, 將細胞與上清液分離。離心後, 倒掉上清液, 並且加入含有 10% 胎牛血清的培養基混勻, 取出約 20 μ l 的細胞液, 外加等量的台盼藍 (trypan blue) 計算細胞數目, 再依結果換算取所需的細胞量進行繼代培養。

C_2C_{12} 肌細胞株較為特殊, 其以不同成分血清的培養基培養會表現出兩種不同的肌細胞型態。當以含 10% 胎牛血清的培養基培養時, 其為肌原母細胞; 而讓肌原母細胞分化為肌小管細胞的條件是更換為含有 2% 馬血清 (horse serum, HS) (SH30074.04; HyClone, Logan, USA) 的培養基, 培養至少 3 天, 肌原母細胞即分化為成熟肌小管細胞 (Yaffe & Saxel, 1977a)。

貳、MXC 及一系列 YMT 新合成化合物對肌原母細胞的影響

使用 96 孔盤以每孔 2×10^5 的細胞數目培養肌原母細胞，並且加入含有 10% 胎牛血清的培養基後，放入恆溫 37°C 、5% 的二氧化碳培養箱中培養。細胞貼附 2 小時後，再分別加入不同濃度的一系列 YMT 新合成化合物及濃度為 1000 μM 、500 μM 、100 μM 、10 μM 的 MXC，之後，放入恆溫 37°C 、5% 的二氧化碳培養箱中培養 4 小時後再分析細胞存活率。每種新合成化合物及 MXC 濃度皆以三重覆進行。

參、一系列 YMT 新合成化合物對肌小管細胞影響

使用 96 孔盤以每孔 1.5×10^5 的細胞數目培養肌小管細胞。加入含有 2% 馬血清的培養基後，放入恆溫 37°C 、5% 的二氧化碳培養箱中培養。細胞貼附 2 小時後，再分別加入不同濃度的一系列 YMT 新合成化合物及 MXC，之後再放入恆溫 37°C 、5% 的二氧化碳培養箱中，培養 3 天後分析細胞存活率。每種新合成化合物及 MXC 皆以三重覆進行。

以 6 公分培養皿培養肌小管細胞，細胞數目為 3×10^5 並加入含有 2% 馬血清的培養基後，放入恆溫 37°C 、5% 的二氧化碳培養箱中培養。使細胞貼附 2 小時後，再分別加入不同濃度的 YMT10、YMT12、YMT14、YMT16 及 MXC。然後放入恆溫 37°C 、5% 的二氧化碳培養箱中培養，於 3 天後進行細胞染色與照像或者萃取總蛋白質，凍於 -80°C 再進行蛋白質分析。

肆、結晶紫定量分析 (crystal violet test)

結晶紫，為深紫色蛋白質染劑，是具有黏性的染劑，可快速染在細胞膜上。C₂C₁₂肌細胞株為貼附型細胞，健康的肌細胞株會貼附於培養基上；而不健康甚至死亡的肌細胞株會懸浮於上清液。由貼附的細胞所吸收的結晶紫可決定存活的細胞數目多寡。

實驗步驟為，先倒掉培養於 96 孔盤上的細胞對照組及實驗組之上清液，加入 100 μ l 的 1 倍 PBS 清洗，然後倒掉 1 倍 PBS，再加入 40 μ l 的 1 倍 fix solution (G-6257; Sigma)，讓細胞黏附固定於盤底上，使作用十五分鐘後，再倒掉 1 倍 fix solution，加入 40 μ l 的結晶紫溶劑 (結晶紫粉末 5 g、95% 酒精)，反應 15 分鐘，之後利用流動清水將多餘的結晶紫染劑清洗掉。待 96 孔盤自然晾乾後，加入 100 μ l 的 1 倍 sorensen solution (1 M tri-sodium citrate, 0.1 N NaCl, 90% 酒精) 溶解細胞，利用波長 570 nm 偵測溶解液的吸光值，再以偵測數值評估細胞存活率。

伍、細胞型態的辨別—伊紅 (eosin-Y) 染色法及細胞融合指數之計算

伊紅是一種鮮紅色酸性染劑，可染鹼性物質，例如：細胞質、血紅素、細胞核及肥大細胞等。過去的研究常利用此法進行細胞染色，再輔以計算細胞核方式，計算出細胞核的細胞融合指數，以量化細胞分化情形 (Sabourin, Girgis-Gabardo, Seale, Asakura, & Rudnicki, 1999)。

實驗方式為，將分化後的肌小管細胞，以 4°C 的 1 倍的 PBS 清洗 2 次後，加入固定液 (4% paraformaldehyde) 並以搖

擺式振盪器 (shaker)作用 10~15 分鐘，使細胞黏附固定於盤底上，之後倒掉固定液後再加入 1% 伊紅，以搖擺式振盪器作用 10~15 分鐘，使伊紅染色於細胞質上，最後再利用流動清水將多餘的伊紅清洗乾淨，直至清水呈透明為止並自然晾乾。細胞乾燥後，以顯微鏡 200 倍數的視野下隨意選取 5 個區域計算細胞核數目，並將計算結果套入公式，換算該實驗組的細胞融合指數，加以辨別肌小管細胞的分化程度。計算公式如下：已分化為肌小管細胞的總細胞核數 / 全部細胞核數 = 細胞融合指數。

陸、西方點墨法 (western blotting)偵測 Myogenin 表現

(1) 總蛋白質的萃取及定量

本實驗是利用蛋白質萃取緩衝液 (protein extraction buffer)萃取總蛋白質。首先將分組的細胞以 4°C 的 1 倍的 PBS 洗淨後，加入適量的 lysis buffer (50 mM tris, PH7.6, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% NP-40, 7X complete mini protease inhibitor cocktail tablet) (Roche, Germany)，然後將被打破的細胞刮下，並收集至 1.5 mL 微量離心管中，置於冰上反應 10~15 分鐘。接著以 13000 rpm、4°C 離心 10 分鐘，離心之後所得的上清液即是總蛋白質。將總蛋白質取至另一個新的 1.5 mL 的微量離心管中，利用 Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)，於 595 nm 進行蛋白質定量，之後進行垂直電泳分離。

(2) SDS-聚丙稀醯胺膠電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)

以 30% Polyacrylamide (Bisacrylamide: Acrylamide = 1 :

29)作長 10 公分，寬 8 公分的 SDS-聚丙稀醯胺膠，膠體分為上下兩層，上層為 2.5% stacking gel，下層為 7.5% separating gel。

(3) 電泳 (electrophoresis)及轉印 (transfer)

膠體凝集後，將其置於電泳槽中，槽中注入 1 倍的電泳 (electrophoresis running: tris-base 30.3g、glycin 144g、SDS 10g 配成 1L)緩衝液，將等量的總蛋白質加入電泳之檢體槽中，兩層膠體分別以 100 及 120 伏特的電流進行電泳分析。接著將經過電泳分析的膠體，以 100 伏特之電流進行轉印分析，將蛋白質轉印至硝化纖維膜 (nitrocellulose membrane) (Millipore, Billerica, USA)上。

(4) blocking

將轉印後的轉印膜浸泡於 blocking solution [5 g non-fat dry milk 溶於 100 mL 的 1 倍 tris-buffered saline- tween 20 (TBST) (50 mM tris-base, 150 mM NaCl and 0.05% tween-20)] 緩衝液中，在室溫下置於搖擺式振盪器，搖晃約 60 分鐘，再以 1 倍 TBST 清洗 3~4 次，以避免非專一性的鍵結。

(5) 初級抗體作用

將 Myogenin (ab1835, Abcam)和 α -tubulin (ab7291, Abcam)的初級抗體分別以 1:200 及 1:5000 稀釋於 1 倍 TBST 中。將轉印膜浸泡於 Myogenin 及 α -tubulin 的初級抗體稀釋液中，在室溫下置於搖擺式振盪器上，搖晃約 60 分鐘後，再利用 1 倍的 TBST 在室溫下清洗轉印膜，以洗去非特異性結合的抗體，共清洗 4 次。

(6) 二級抗體作用

將具有辣根過氧化酶 (horseradish peroxidase, HRP)

(AP124P Goat anti-mouse IgG HRP, Chemicon international Inc.) 鍵結之二次抗體以 1:4000 稀釋，使轉印膜於室溫下反應 1 小時，接著利用 1 倍的 TBST 在室溫下清洗轉印膜，以洗去非特異性結合的抗體，共清洗 4 次。

(7) 檢測蛋白質

使用化學冷光系統 (enhanced chemiluminescence, ECL) 與二級抗體上的 HRP 反應產生冷光。再於暗房中以高感光富士底片感光及沖片，並將結果所得之影像以螢光測定儀及定量分析軟體 (Quantity One software, Bio-Rad) 進行蛋白質表現之定量分析。

柒、 肌酸激酶活性 (creatine kinase activity, CK activity) 之分析

以比色法 (colorimetric determination) 的原理分析細胞中肌酸激酶的濃度。萃取細胞總蛋白質之後以肌酸激酶套組 (ECPK-100, BioAssay System, USA) 進行分析。依照試劑套組所附的實驗步驟進行測試。首先，以取 100 μ l 的水加 10 μ l 的校正液作為校正值；另外，110 μ l 的水當作背景值；針對檢體的分析，取 10 μ l 的檢體 (定量 1 μ g 的總蛋白質) 與 100 μ l 還原試劑混合均勻，總體積皆為 110 μ l。各別將反應物加入至 96 孔盤中，放入恆溫 37°C 作用 10 分鐘，以分光光度計偵測波長 340 nm 之吸光值，30 分鐘後再偵測一次吸光值。最後，將所偵測到的吸光值代入公式： $CK (U/L) = (OD_{40min} - OD_{10min} / OD_{calibrator} - OD_{H_2O}) \times 100$ ，換算出肌酸激酶濃度並分析結果。

第肆章 結果

第一節 肌原母細胞與肌小管細胞之細胞型態

肌原母細胞以含有 2% 馬血清的培養基培養三天後，肌原母細胞即分化為肌小管細胞。實驗結果是先以伊紅將細胞染色後，在顯微鏡 200 倍視野下所拍得的照片(見圖二)。照片明顯可見肌原母細胞(圖二 A)呈現單核、單顆的形態；而肌小管細胞(圖二 B)因透過細胞融合作用，而呈現出細長管狀且多核的特性，與肌原母細胞的型態明顯不同。

第二節 不會直接造成肌原母細胞死亡的 MXC 及 YMT 藥物濃度篩選

在肌原母細胞的生長過程中在加入 1000 μM 、500 μM 、100 μM 及 10 μM 的 MXC 濃度並進行 4 小時的短時間培養，然後再以結晶紫定量分析評估細胞存活率。實驗結果可見，當 MXC 濃度為 1000 μM 時，細胞存活率為 54.6%；而濃度為 500 μM ，細胞存活率是 58.5%；另外，其濃度為 100 μM 時，細胞存活率為 91.9%；而濃度為 10 μM 時，細胞存活率則達到 96.9%（見表一）。由此顯示，100 μM 以下的 MXC 濃度並不會使肌原母細胞因細胞毒性死亡。

23 種 YMT 新合成化合物不會造成肌原母細胞死亡的濃度初步篩選結果如下（見表一）：YMT7、11、12 的濃度約為 1 μM ，YMT8、10、15 的濃度約為 5 μM ，YMT13 的濃度約為 6.25 μM ，YMT4、9、16、17、20、21、23 的濃度約為 10 μM ，YMT1、6、14 的濃度約為 12.5 μM ，YMT2、3 的濃度約為 25 μM ，而 YMT5、18、19、22 的濃度則是約為 50 μM 。上述所篩選出的濃度皆能使肌原母細胞存活率達 90% 以上，顯示肌原母細胞不是因藥物毒性而導致細胞死亡。

以肌原母細胞作為不會造成細胞死亡的藥物濃度初步篩選工具，先獲得不使細胞死亡的藥物濃度後，再針對肌原母細胞分化為肌小管細胞時，探討這一系列化合物對分化過程的影響。

第三節 YMT 藥物造成分化後的肌小管細胞存活率低於 50% 的濃度之測試

依肌原母細胞篩選出的結果，做為肌原母細胞分化為肌小管細胞的過程中所加入的參考濃度，發現 23 種不同的新化合物參考濃度，皆會造成肌小管細胞致死。因此，本實驗將新合成化合物濃度往下調整，以找出在 YMT 藥物作用下，造成分化後的肌小管細胞存活率低於 50% 的濃度。

以 23 種 YMT 藥物造成分化後的肌小管細胞存活率低於 50% 的濃度測試結果如下（見表二）：其中以低濃度就可以使肌小管細胞存活率低於 50% 的化合物有 YMT10、12、14、16，其濃度分別為 0.5 nM、7.5 nM、1 nM、5 nM。這 4 種藥物對分化後的肌小管細胞的靈敏度高於其他 YMT 藥物，因此，我們將以這 4 個藥物作為探討肌肉細胞分化過程的主要對象。

第四節 不同濃度的 YMT10、YMT12、YMT14、YMT16 對肌小管細胞分化的影響

本結果是先以伊紅將細胞染色後，再以顯微鏡 200 倍視野下隨機選取 5 處照相（見圖三（A）），然後計算相片中的細胞融合指數，取平均值（見圖三（B））。

圖三（A）中(a)為未加入任何藥物的肌小管細胞，其細胞融合指數達 95.6%，此處作為控制組；(b)為加入 100 μ M MXC 為對照組，細胞融合指數為 49.9%；(c) (d) (e)分別是加入 0.75 nM、0.5 nM、0.25 nM 的 YMT10，其細胞融合指數值各為 36.5%、51.5%、71.3%；(f) (g) (h)分別是加入 11.25 nM、7.5 nM、3.75 nM 的 YMT12，指數為 40.9%、51.5%、87.0%；(i) (j) (k)是加入 1.5 nM、1.0 nM、0.5 nM 的 YMT14，指數各別是 43.5%、52.1%、82.8%；(l) (m) (n)則是分別加入 7.5 nM、5 nM、2.5 nM 的 YMT16，該指數分別為 50.4%、55.0%、80.1%。

4 種藥物濃度越高時，細胞融合指數就越低，呈現出明顯的劑量依賴性 (dose-dependent) 現象。

第五節 肌原母細胞在不同濃度的 YMT10、YMT12、YMT14、YMT16 影響下分化成肌小管細胞中的肌酸激酶活性表現

本實驗取 1 μ g 的總蛋白質進行肌酸激酶活性分析（見圖四）。結果顯示，肌原母細胞的肌酸激酶活性平均為 43.7 U/L；而肌小管細胞的肌酸激酶活性平均為 63 U/L；在分化過程分別加入 0.75 nM、0.5 nM、0.25 nM 的 YMT10，分化後的肌小管細胞之肌酸激酶活性各約為 43.15 U/L、64.89 U/L、66.59 U/L；若加入 11.25 nM、7.5 nM、3.75 nM 的 YMT12，分化後的肌小管細胞，其肌酸激酶活性則約為 35.24 U/L、38.52 U/L、49.98 U/L；分化過程若分別加入 1.5 nM、1.0 nM、0.5 nM 的 YMT14 後，分化後的肌小管細胞之肌酸激酶活性表現約是 34.56 U/L、38.52 U/L、49.34 U/L；而在分化過程分別加入 7.5 nM、5.0 nM、2.5 nM 的 YMT16 之後，分化後的肌小管細胞，其肌酸激酶活性則各別是 51.60 U/L、46.32 U/L、37.89 U/L。

結果可見，肌小管細胞的肌酸激酶活性表現大於肌原母細胞。而 YMT10、12、14、16 對分化後的肌小管細胞中的肌酸激酶活性表現影響並不完全一致。當分化過程中，分別加入 YMT10、12、14 此 3 種藥物後，當藥物的濃度愈高，分化後的肌小管細胞之肌酸激酶活性表現則愈低；然而，YMT16 藥物濃度愈高，細胞的肌酸激酶活性表現則愈強。

第六節 肌原母細胞在不同濃度的 YMT10、YMT12、YMT14、YMT16 影響下分化成肌小管細胞中的 Myogenin 蛋白質表現量

圖五中(A)為西方點墨法呈色於 X 光片上的實驗結果，定量後的平均量化結果整理於圖五(B)。實驗結果可見肌原母細胞的 Myogenin 蛋白質表現量明顯低於肌小管細胞；而在分化過程分別加入不同濃度的 YMT10、14 及 16 此 3 種藥物後，可以發現藥物的濃度愈低時，其肌小管細胞的 Myogenin 表現量愈高，並皆呈現劑量依賴的特性；然而，加入不同濃度的 YMT12，肌小管細胞的 Myogenin 蛋白質表現量則沒有明顯變化（見圖五）。

第七節 不同分化階段加入 YMT10、YMT12、YMT14、YMT16 對肌小管細胞分化後的細胞融合指數之影響

圖六(A)為加藥方式示意圖，第0天為加入含有2%馬血清的培養基，以誘發肌原母細胞分化，經過3天則細胞將分化成肌小管細胞。A組為分化過程完全不加藥物，此作為控制組；B組是3天全程加藥；C組為第0天加藥24小時後，更換成含有2%馬血清並未含有藥物的正常培養基；D組是於第1天~第3天連續加藥；E組為第1天加藥後，隔天更換成含有2%馬血清的正常培養基；而F組則是在第2天~第3天連續加藥。加藥後細胞融合指數的平均量化結果整理於圖六(B)。

實驗結果發現，未加入任何藥物的A組，其細胞融合指數均可達96%左右。在不同實驗設計B、C、D、E、F組加入YMT10藥物後，細胞融合指數各別為54.3%、74.0%、74.4%、74.8%和84.1%；而加入YMT12藥物後，B、C、D、E、F組的細胞融合指數為58.8%、71.7%、73.3%、85.6%及87.0%；另外，加入YMT14藥物後，B、C、D、E、F組的細胞融合指數則為56.6%、70.5%、77.3%、78.5%與80.8%；而加入YMT16藥物後，其B、C、D、E、F組的細胞融合指數各別是54.1%、63.8%、72.3%、80.1%及86.3%。

結果顯示，不論加入YMT10、12、14、16這4種藥物，皆以B組的分化抑制性最明顯；而在YMT10、12、14不同的加藥時間組別(C、D、E、F)的細胞融合指數卻沒有明顯差異。但加入YMT16後發現，越晚加入藥物其細胞融合指數會呈現增加的趨勢。

第五章 討論

C₂C₁₂ 細胞是肌肉細胞株，具有與一般細胞株不一樣的特性，在加入不同成分的血清後，經過 3 天後會由肌原母細胞分化成肌小管細胞。在本論文中，我們也觀察所培養的 C₂C₁₂ 肌原母細胞與肌小管細胞的型態明顯不同（圖二），相關文獻提到血清成分、含量的改變是造成 C₂C₁₂ 細胞由肌原母細胞分化成肌小管細胞的主因 (Langen, Schols, Kelders, Wouters, & Janssen-Heininger, 2003; Yaffe & Saxel, 1977a, 1977b)。肌肉細胞生長時，基質 (matrigel) 是提供類似肌內膜的環境，以維持細胞的生長或分化。不同的血清成分會改變基質成分，而當胎牛血清的成分減少或者更換為馬血清後，改變了基質環境，因此，減少肌原母細胞分裂並誘發肌細胞開始進入分化過程 (Yaffe & Saxel, 1977a)。

在一系列 YMT 新合成化合物造成分化後的肌小管細胞存活率低於 50% 的實驗中發現，YMT10、12、14、16 此 4 種藥品在比其他 YMT 化合物較低的濃度即會抑制肌細胞分化，且此有效抑制濃度遠低於已知的化合物 MXC (Steffens et al., 2007)。這樣的結果顯示，同樣是 YMT 系列的藥物，並非對肌細胞的分化有相同的影響性，各類 YMT 藥物不造成肌原母細胞死亡的濃度也有 1~50 倍不等的差距（表一）。Rao 等 (2009) 的研究當中發現，這一系列 YMT 新合成化合物對抑制癌細胞的分裂能力之影響濃度也不相同，可能因為這些 YMT 藥物的苯環結構不同而影響了它們的活性（附錄一）。根據本論文中的結果，我們推測各類 YMT 藥物導致細胞死亡的濃度差異也可能是與苯環結構銜接不同的取代基有關。

此外，YMT10 是其中最具影響效果之化合物，以低於 5×10^{-10} M 的濃度就可以造成分化後的肌小管細胞存活率低於 50%，其次具影響效果之化合物是 YMT14，這兩個化合物的分子式相同，取代基也都相同，唯獨取代基的鍵結位置不同（附錄二）。YMT12 及 YMT16 分別與 YMT10 有一個及兩個不同的取代基，可能因此而造成了彼此之間有效濃度的差異。

肌原母細胞與肌小管細胞除了細胞型態不同之外，在其他特性上也有許多顯著的不同點，例如：肌原母細胞的 Pax3、Pax7、大分子量的熱休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 及肌肉特異性基因群內的 Myf5、MyoD 的表現皆高於肌小管細胞；而肌原母細胞中的肌酸激酶活性、IL-6 及旋轉素 I、肌球蛋白、p38-分裂原活化蛋白質激酶 (p38-mitogen-activated protein kinase, p38-MAPK) 及肌肉特異性基因群內的 Myogenin、MRF4 的表現則是低於肌小管細胞 (Andres & Walsh, 1996; Baeza-Raja & Munoz-Canoves, 2004; Chamberlain et al., 1985; Epstein et al., 1995; Maglara et al., 2003; Steffens et al., 2007)。當我們以相同濃度分析 YMT 藥物對肌原母細胞或肌小管細胞之影響時，發現這兩種不同階段的肌細胞對同一種 YMT 藥物的敏感度不同，影響細胞存活率以及細胞特性的效果也不盡相同。此結果暗示，當肌原母細胞開始分化成肌小管細胞後，對藥物的敏感性有可能隨之改變。

Lanngen, Schols, Kelders, Wouters, & Janssen-Heininger (2001) 及 Magalara 等 (2003) 的研究皆指出在 C_2C_{12} 加入含有馬血清的培養基後，其細胞內肌酸激酶活性明顯增加。在我們的研究中也發現，肌原母細胞中的肌酸激酶活性約為 42.59

U/L，而肌小管細胞中的肌酸激酶活性平均為 62.24 U/L，遠高於肌原母細胞，此實驗結果與過去研究類似 (Langen et al., 2001)。Ito et al. (2005)研究指出，肌肉細胞分化過程中如加入 NDGA 藥物，會造成細胞分化速度減緩，因此，減少肌細胞中的肌酸激酶濃度。

Myogenin 是負責調控肌肉型態及功能發育過程的晚期調控因子，大多研究皆指出 Myogenin 的 mRNA 表現量會隨著分化時間而增加，並且在分化後的第 1 天、第 2 天表現最為明顯 (Joulia et al., 2003; Langley et al., 2002; Rohwedel, et al., 1994)。相同地，Andres & Walsh (1996)及其他研究指出，Myogenin 的蛋白質表現量約在分化後的第 2 天或者第 3 天表現最多 (Andres & Walsh, 1996; Ito et al., 2005; Kook et al., 2008)。而本實驗結果發現，肌小管細胞的 Myogenin 蛋白質表現量的確明顯高於肌原母細胞，也與過去研究結果相似。其他研究也曾發現，分化過程中如加入 NDGA 藥物，也會減少 Myogenin 的蛋白質表現量 (Ito et al., 2005)。

然而在本實驗的結果發現，不同的 YMT 藥物對細胞融合指數、肌酸激酶活性及 Myogenin 蛋白質表現之影響並不一致。在分化過程中加入 YMT10、14 此 2 種藥物後發現，當 YMT10、14 濃度愈高，則肌小管細胞的肌酸激酶活性、細胞融合指數及 Myogenin 的蛋白質表現量皆呈現減少的趨勢；然而在分化過程加入 YMT12 的肌小管細胞中發現，當 YMT12 濃度愈高時，雖然細胞融合指數及肌酸激酶活性明顯減少，但 Myogenin 的蛋白質表現量並沒有明顯改變；另外，分化過程中加入 YMT16 藥物時，分化後的肌小管細胞之細胞融合指數及 Myogenin 的蛋白質表現量會減少，但肌酸激

酶活性卻呈現增加趨勢。根據相關文獻顯示，肌肉細胞分化的過程，會受到細胞週期 (cell cycle) 的調控因子或者訊號傳遞 (signal transduction) 而影響分化過程及結果 (Lindon, Montarras, & Pinset, 1998; Molkenin & Olson, 1996a, 1996b)。過去研究指出，當肌細胞受到某些調控因子或者訊號傳遞影響，會開始趨使細胞進入分化過程，並且抑制細胞週期，使細胞停止生長。例如：肌細胞中，抑制細胞週期蛋白催化激酶基因 (CdKs inhibitors, CKIs) p21^{CIP1}、p27^{KIP1} 及 p57^{KIP2} 會刺激肌肉特異性基因 MyoD 及 Myogenin 的表現 (Wang, Helin, Jin, & Nadal-Ginard, 1995; Zetser, Gredinger, & Bengal, 1999; Zhu & Skoultchi, 2001)。轉錄因子 E2F 被活化時，會促使細胞核開始製造基因以及增加細胞分化的基因表現 (Kitzmann & Fernandez, 2001; Parker et al., 1995; Skapek, Rhee, Spicer, & Lassar, 1995; Winter & Arnold, 2000; Zhu & Skoultchi, 2001)。另外，如：FGFs、TGF- β 等生長因子也可調控分裂原活化蛋白質激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAP-kinase)，達到促進細胞分裂及抑制肌酸激酶活性之目的 (Winter & Arnold, 2000)。曾有研究指出酪胺酸激酶接受器 (tyrosine kinase receptor)- c-met 不活化時，會抑制肌肉細胞分化，造成四肢、橫膈膜等骨骼肌發育不全 (Molkenin & Olson, 1996b)。此外，細胞核轉錄因子 (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 被活化時，會進入細胞核內開始製造基因，間接活化 cAMP 的依賴性蛋白質激酶 A (cAMP-dependent protein kinase A, PKA)，因此造成肌球蛋白減少及抑制 MyoD 的 mRNA 合成，以抑制肌肉分化 (Kwiecinska, Roszkiewicz, Lokociejewska, & Orzechowski,

2005; Langen et al., 2001)。其它研究也指出，在肌細胞分化的過程中，IL-6 的 mRNA 表現量會明顯增加，並且透過調控 NF- κ B 的 p65 之含量，進而促進了肌細胞分化 (Baeza-Raja & Munoz-Canoves, 2004; Craig et al., 2000)。在 C₂C₁₂ 分化過程中，p38-MAPK 除了會增加肌酸激酶活性外，也會增加肌肉特異性基因表現以促進肌肉細胞分化 (Zetser et al., 1999)。然而，當其被抑制時，會減少 MyoD 的表現及阻斷細胞的分化 (Baeza-Raja & Munoz-Canoves, 2004; Naya & Olson, 1999)。學者們發現，肌細胞強化物因子-2/ 多蛋白橋接因子-1 (myocyte enhancer binding factor-2/ multiprotein bridging factor-1, MEF-2/ MBF-1) 的複合體可使 C₂C₁₂ 及 BC₃H1 骨骼肌細胞進行分化之外，肌細胞強化物因子-2 可能也會活化肌酸激酶的啟動子，因而，促進肌酸激酶及肌球蛋白的基因表現 (Cserjesi et al., 1992; Cserjesi & Olson, 1991)。而肌細胞強化物因子-2 被抑制時，細胞內 Myogenin 蛋白質表現量會明顯減少，因此抑制肌細胞分化 (Winter & Arnold, 2000)。另外，磷酸肌醇 3 激酶 (Phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 會經由不同的傳遞路徑影響肌細胞分化，當 PI3K 的活性受到抑制時會抑制肌酸激酶釋放 (Winter & Arnold, 2000)。近年發現小分子量的熱休克蛋白會出現在心臟及骨骼肌內，並且在肌原母細胞開始分化後的第 0 天，其細胞內的熱休克蛋白 27 和 α B-crytallin mRNA、蛋白質就會開始表現，此外，肌酸激酶以及 Myogenin mRNA 表現量在分化後的第 15 小時也會開始明顯增加，研究學者推測小分子量的熱休克蛋白也可能會調控肌肉分化過程 (Sugiyama et al., 2000)。因此我們推測，不同的藥物可能透過對細胞週期

調控因子或者訊號傳遞過程不同的影響，使得分化後的細胞內肌酸激酶活性、Myogenin 的蛋白質表現量與細胞融合指數結果不一致。

此外，本實驗觀察在不同分化階段加入藥物後，發現 3 天全程加藥組，其抑制分化效果最為明顯，此 4 種新合成化合物均造成分化結果低於 50~60% 左右。再者，第 0 天加藥 24 小時後更換成僅含有 2% 馬血清的乾淨培養基及第 1 天~第 3 天連續加藥之 2 種實驗情況下，抑制分化也高達百分之 25~30% 以上。由此結果推知，若是藥物在一開始分化時即加入，即使後來移除藥物，依然會抑制分化的程度。顯示這 4 種不同藥物可能是影響在肌肉細胞分化的前期。Ito et al. (2005) 研究指出，NDGA 會抑制 MyoD、Myf5 及 Myogenin 等肌肉特異性調控因子表現，可能是因為抑制肌肉分化前期 (< 1 天) 所需的 p38-MAPK。過去研究顯示，Myostatin 可能是透過 Smad 3 機制，以抑制 MyoD 及 Myogenin 的活性及表現，更發現到 Myostatin 也會影響肌肉早期分化過程，並使 p21^{CIP1} 的表現量減少，造成肌原母細胞無法分化成肌小管細胞 (Langley et al., 2002)。

由上述有關調控因子及訊號傳遞過程影響肌肉生長及分化的研究結果，我們推測，YMT 10、12、14 及 16 可能會透過影響不同的細胞週期調控因子或訊號傳遞過程，進而改變肌肉細胞分化後的各種特性，雖然目前對這些新合成化合物對於分化過程的影響路徑並不甚了解，可能需更進一步探討其相關機制。然而本論文已建立一套技術平台，可篩選可能會影響肌原母細胞分化之化合物，未來可以作為篩選其他可能抑制或促進肌細胞分化的化合物之有效工具。

表一、不會直接造成肌原母細胞死亡的MXC及YMT藥物濃度篩選

| | | 不造成細胞死亡的濃度 (μM) | 存活率 (%) [#] |
|-------|----|------------------------------|----------------------|
| 未加藥物 | | 0.0 | 100.0 |
| MXC藥物 | | 1000.0 | 54.6 \pm 2.9 |
| | | 500.0 | 58.5 \pm 6.6 |
| | | 100.0 | 91.9 \pm 7.5 |
| | | 10.0 | 96.9 \pm 6.3 |
| YMT藥物 | 1 | 12.5 | 93.0 \pm 2.0 |
| | 2 | 25.0 | 98.1 \pm 1.1 |
| | 3 | 25.0 | 100.7 \pm 3.9 |
| | 4 | 10.0 | 100.6 \pm 0.8 |
| | 5 | 50.0 | 103.9 \pm 2.4 |
| | 6 | 12.5 | 89.3 \pm 4.5 |
| | 7 | 1.0 | 102.0 \pm 1.0 |
| | 8 | 5.0 | 88.6 \pm 1.7 |
| | 9 | 10.0 | 102.6 \pm 8.2 |
| | 10 | 5.0 | 92.7 \pm 2.2 |
| | 11 | 1.0 | 108.2 \pm 8.5 |
| | 12 | 1.0 | 90.6 \pm 6.5 |
| | 13 | 6.3 | 97.8 \pm 7.2 |
| | 14 | 12.5 | 83.6 \pm 6.9 |
| | 15 | 5.0 | 80.9 \pm 10.7 |
| | 16 | 10.0 | 94.1 \pm 3.8 |
| | 17 | 10.0 | 109.8 \pm 8.5 |
| | 18 | 50.0 | 95.8 \pm 8.1 |
| | 19 | 50.0 | 98.0 \pm 3.1 |
| | 20 | 10.0 | 99.9 \pm 4.4 |
| | 21 | 10.0 | 90.5 \pm 4.5 |
| | 22 | 50.0 | 105.9 \pm 9.8 |
| | 23 | 10.0 | 94.0 \pm 3.6 |

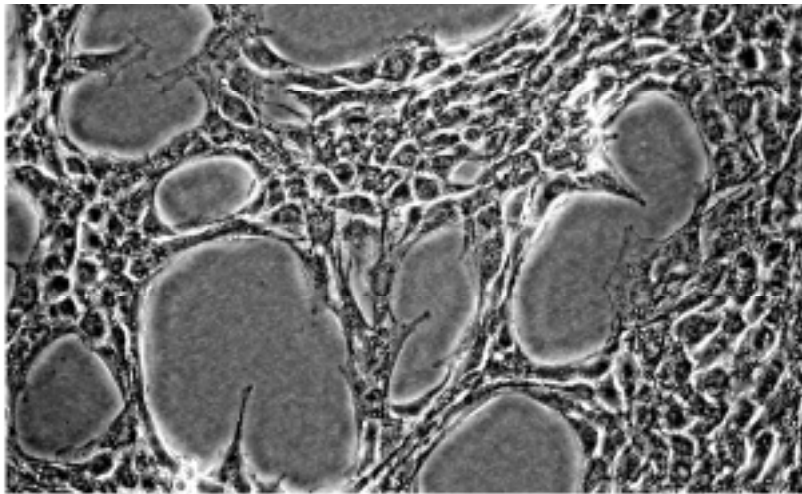
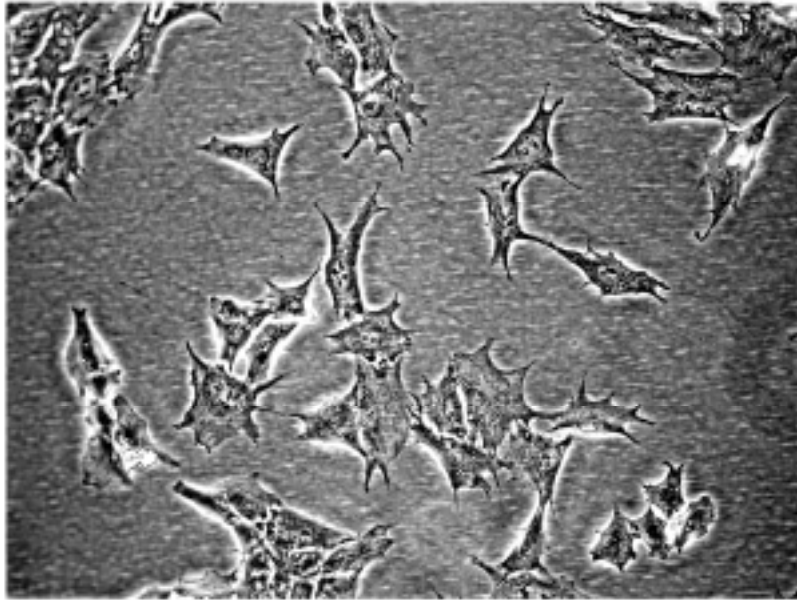
[#]存活率 (%) = 實驗組的細胞存活率平均值 / 控制組的細胞存活率平均值 (n=9)

表二、YMT藥物造成分化後的肌小管細胞存活率
低於50%的濃度之測試

| | | <u>存活率低於50%的濃度 (nM)</u> |
|-------|----|-------------------------|
| 未加藥物 | | 0.0 |
| MXC藥物 | | 100000.0 |
| YMT藥物 | 1 | 1000.0 |
| | 2 | 1000.0 |
| | 3 | 1000.0 |
| | 4 | 1000.0 |
| | 5 | 1000.0 |
| | 6 | 2000.0 |
| | 7 | 200.0 |
| | 8 | 500.0 |
| | 9 | 10000.0 |
| | 10 | 0.5 |
| | 11 | 100.0 |
| | 12 | 7.5 |
| | 13 | 10.0 |
| | 14 | 1.0 |
| | 15 | 20.0 |
| | 16 | 5.0 |
| | 17 | 5000.0 |
| | 18 | 10000.0 |
| | 19 | 5000.0 |
| | 20 | 5000.0 |
| | 21 | 10000.0 |
| | 22 | 25000.0 |
| | 23 | 10000.0 |

(n=9)

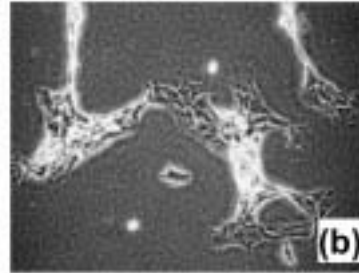
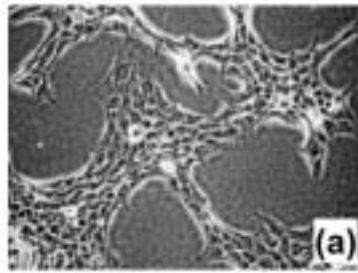
(A)



圖二、肌原母細胞(A)與肌小管細胞(B)之細胞型態(x 200)

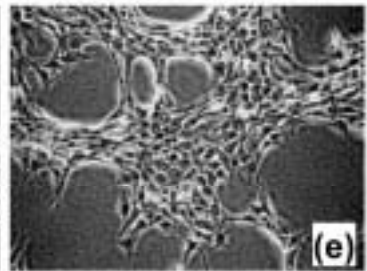
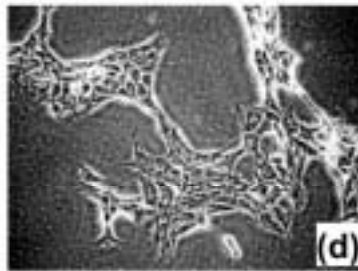
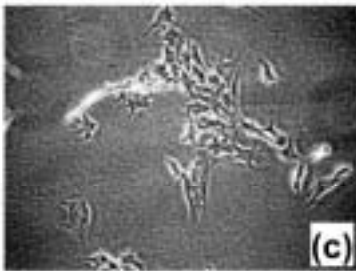
(A)

肌小管細胞

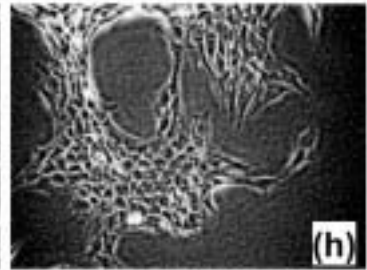
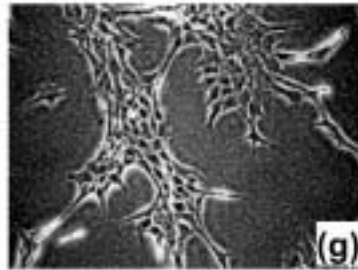
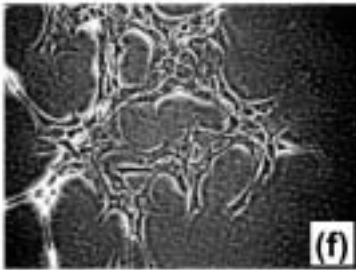


MXC

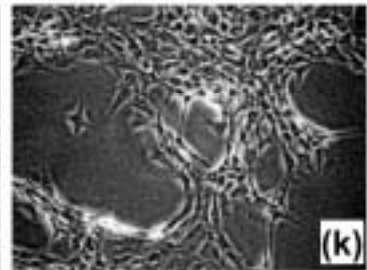
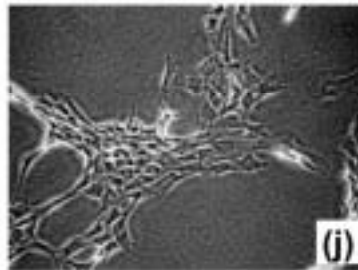
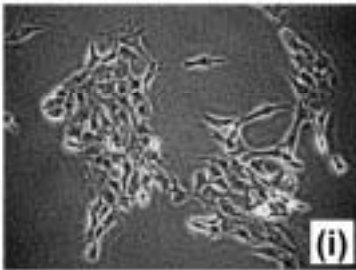
YMT10



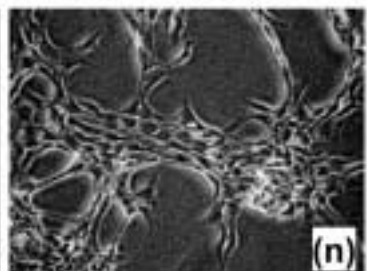
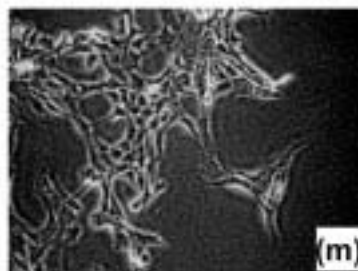
YMT12



YMT14



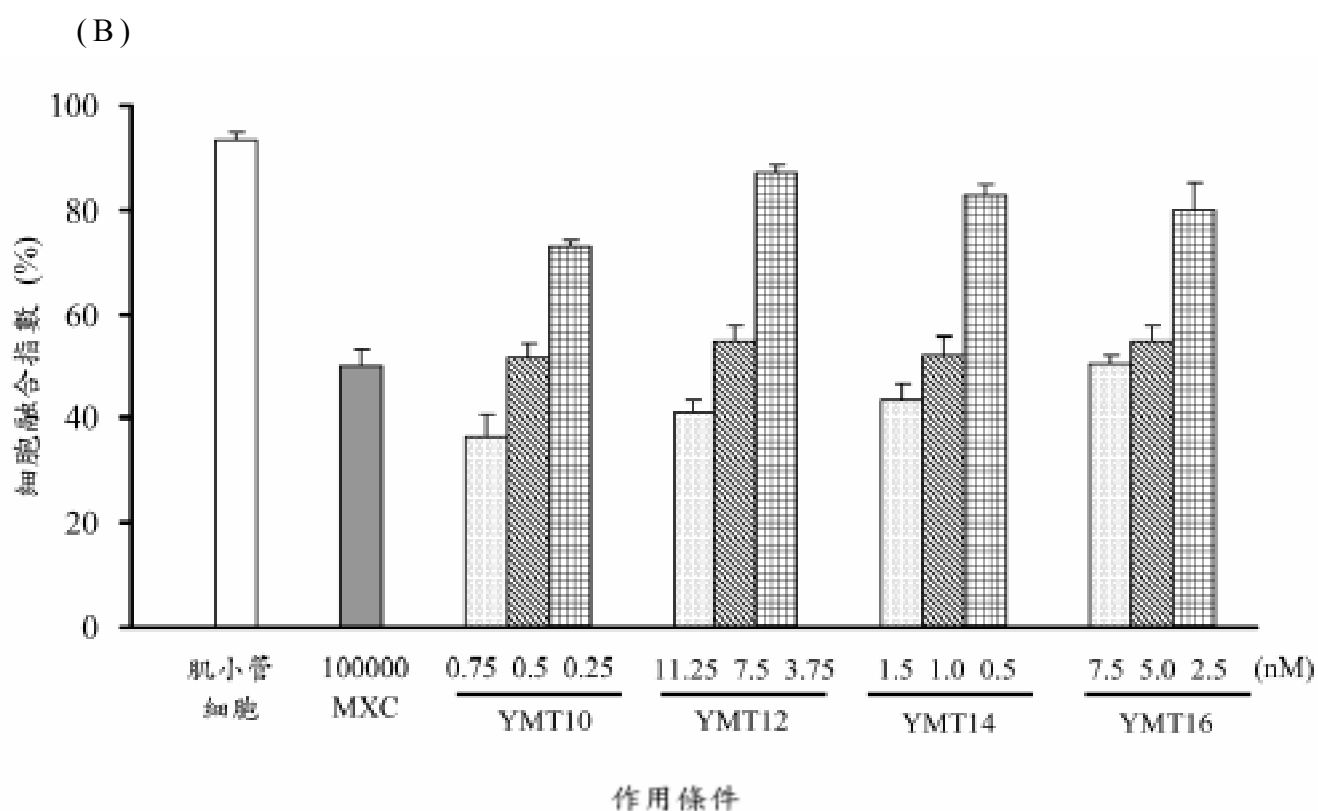
YMT16



高濃度

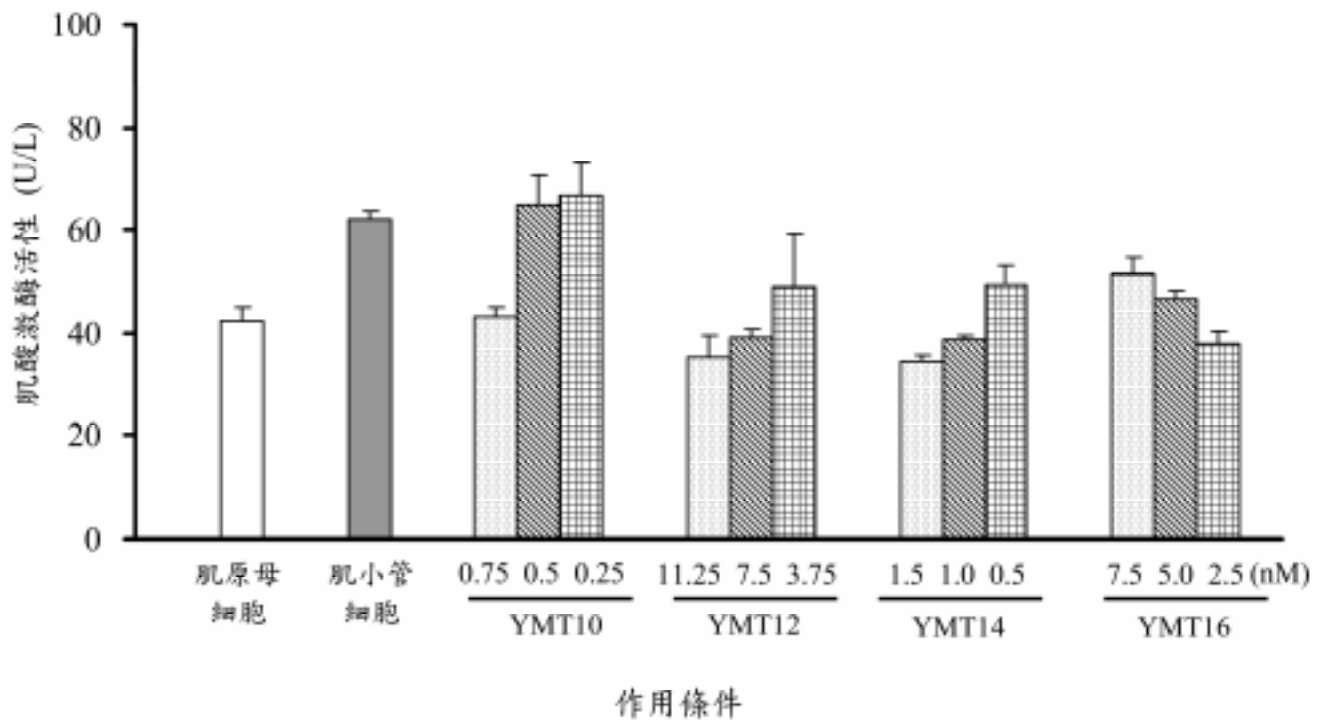
中濃度

低濃度



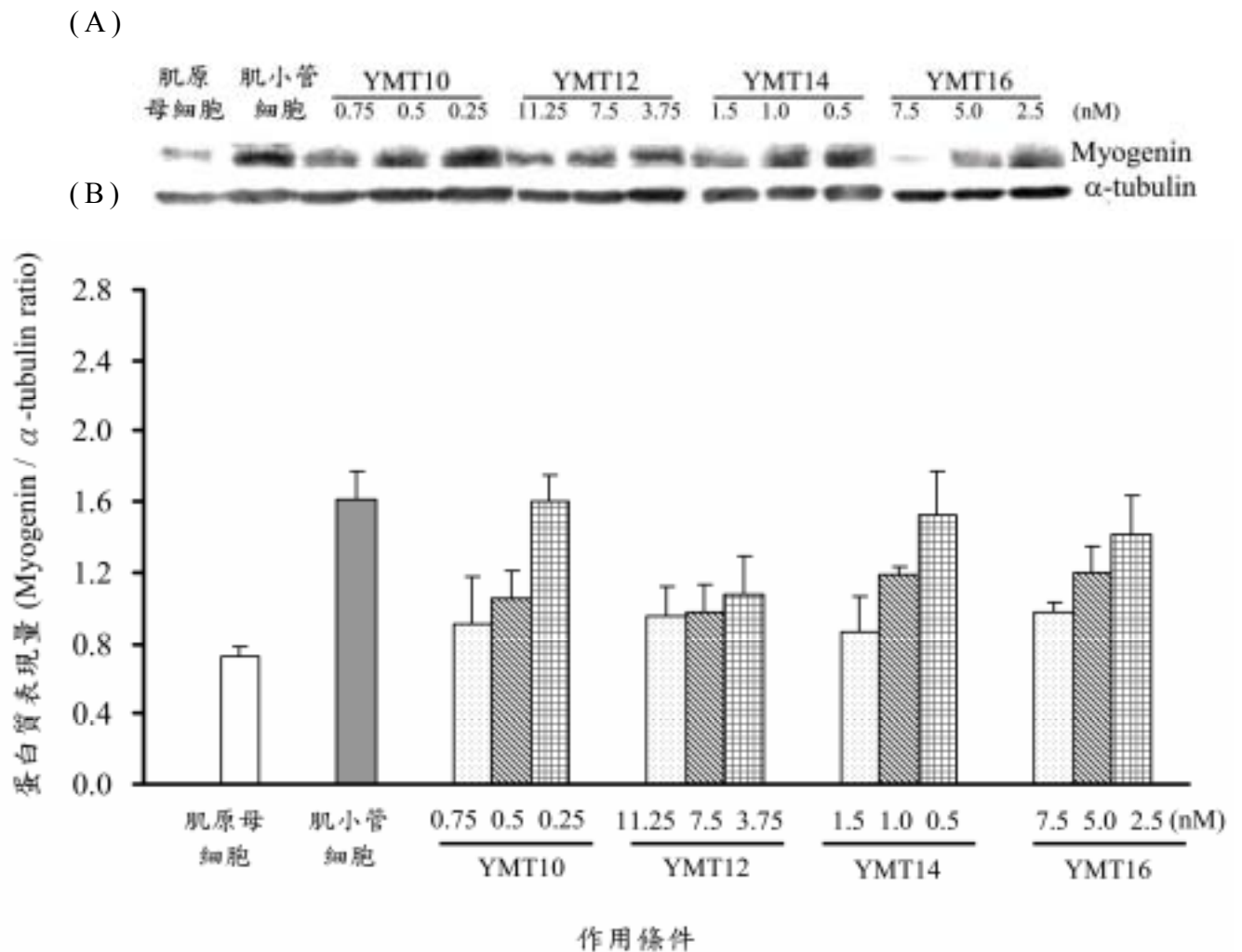
圖三、不同濃度的 YMT10、YMT12、YMT14、YMT16 對肌小管細胞分化的影響 (n=3)

圖(A)為細胞型態圖。本圖中(a)為未加入任何藥物的肌小管細胞，此處做為控制組，(b)為加入100 μ M MXC的對照組，(c) (d) (e)分別是加入0.75、0.5、0.25 nM YMT10的細胞，(f) (g) (h)分別是加入11.25、7.5、3.75 nM YMT12的細胞，(i) (j) (k)是加入1.5、1.0、0.5 nM YMT14的細胞，(l) (m) (n)則是分別加入7.5、5、2.5 nM YMT16的細胞，肌小管細胞皆以Eosin-Y染色後，在200倍顯微鏡下拍攝的照片。圖(B)則為量化後的細胞融合指數。本數據皆以平均數 \pm 標準差表示。



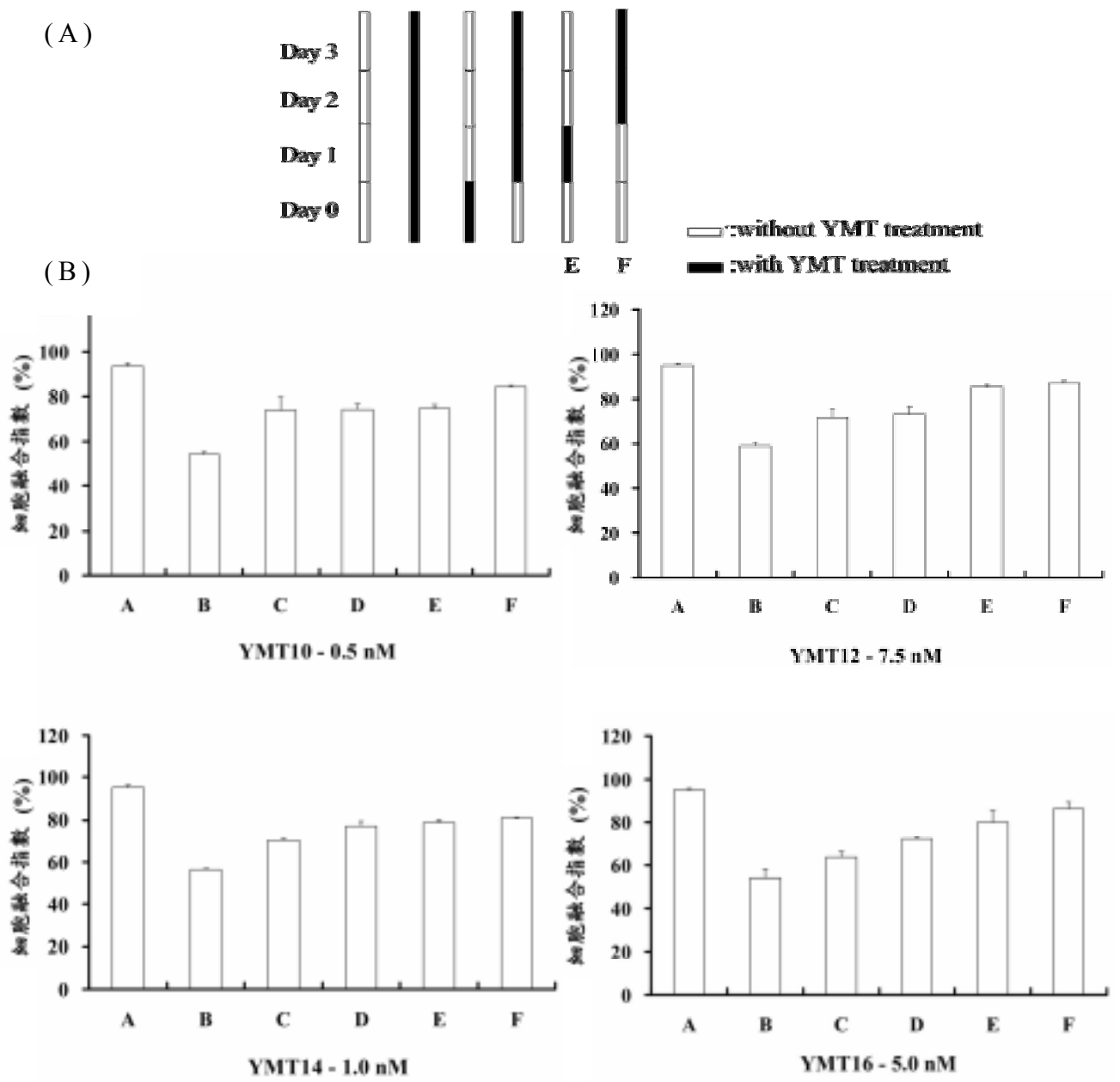
圖四、肌原母細胞在不同濃度的 YMT10、YMT12、YMT14、YMT16 影響下分化成肌小管細胞中的肌酸激酶活性表現 (n=3)

本數據皆以平均數±標準差表示。□:代表肌原母細胞，■:代表肌小管細胞，▨:代表高濃度的 YMT10、12、14、16，▩:代表中濃度的 YMT10、12、14、16，▪:代表低濃度的 YMT10、12、14、16。



圖五、肌原母細胞在不同濃度的YMT10、YMT12、YMT14、YMT16影響下分化成肌小管細胞中的Myogenin蛋白質表現量 (n=3)

(A)為西方點墨法呈色於X光片上的實驗結果，(B)為定量後的平均量化結果。□:代表肌原母細胞，■:代表肌小管細胞，▣:代表高濃度的YMT10、12、14、16，▤:代表中濃度的YMT10、12、14、16，▥:代表低濃度的YMT10、12、14、16。本數據皆以平均數±標準差表示。



圖六、不同分化階段加入 YMT10、YMT12、YMT14、YMT16 對肌小管細胞分化後的細胞融合指數之影響 (n=6)

本數據皆以平均數±標準差表示。本實驗(A)為加藥方式示意圖，(B)為加入 YMT10、12、14、16 後細胞融合指數的平均結果量化圖。

參考文獻

中文部份

林碧鳳、江伯倫（譯）（2006）：基礎免疫學 免疫系統的功能和異常。臺北：藝軒圖書出版社。（Abul K.A., and Andrew H.L., 2004）

英文部份

- Amstislavsky, S. Y., Kizilova, E. A., & Eroschenko, V. P. (2003). Preimplantation mouse embryo development as a target of the pesticide methoxychlor. *Reproductive Toxicology*, *17*(1), 79-86.
- Andres, V., & Walsh, K. (1996). Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *The Journal of Cell Biology*, *132*(4), 657-666.
- Baeza-Raja, B., & Munoz-Canoves, P. (2004). p38 MAPK-induced nuclear factor-kappaB activity is required for skeletal muscle differentiation: role of interleukin-6. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(4), 2013-2026.
- Braun, T., Bober, E., Buschhausen-Denker, G., Kohtz, S., Grzeschik, K. H., & Arnold, H. H. (1989). Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible autoactivation by the Myf gene products. *The EMBO Journal*, *8*(12), 3617-3625.
- Braun, T., Rudnicki, M. A., Arnold, H. H., & Jaenisch, R. (1992). Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell*, *71*(3), 369-382.

- Bruunsgaard, H., Galbo, H., Halkjaer-Kristensen, J., Johansen, T. L., MacLean, D. A., & Pedersen, B. K. (1997). Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *The Journal of Physiology*, 499 (Pt 3), 833-841.
- Butterfield, T. A., Best, T. M., & Merrick, M. A. (2006). The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. *Journal of Athletic Training*, 41(4), 457-465.
- Chamberlain, J. S., Jaynes, J. B., & Hauschka, S. D. (1985). Regulation of creatine kinase induction in differentiating mouse myoblasts. *Molecular Biology of the Cell*, 5(3), 484-492.
- Craig, R., Larkin, A., Mingo, A. M., Thuerauf, D. J., Andrews, C., McDonough, P. M., et al. (2000). p38 MAPK and NF-kappa B collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release. Evidence for a cytoprotective autocrine signaling pathway in a cardiac myocyte model system. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 23814-23824.
- Cserjesi, P., Lilly, B., Bryson, L., Wang, Y., Sassoon, D. A., & Olson, E. N. (1992). MHox: a mesodermally restricted homeodomain protein that binds an essential site in the muscle creatine kinase enhancer. *Development (Cambridge, England)*, 115(4), 1087-1101.
- Cserjesi, P., & Olson, E. N. (1991). Myogenin induces the

- myocyte-specific enhancer binding factor MEF-2 independently of other muscle-specific gene products. *Molecular Biology of the Cell*, 11(10), 4854-4862.
- Davis, R. L., Weintraub, H., & Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 51(6), 987-1000.
- De Rossi, M., Bernasconi, P., Baggi, F., de Waal Malefyt, R., & Mantegazza, R. (2000). Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation. *International Immunology*, 12(9), 1329-1335.
- Dinareello, C. A. (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*, 77(8), 1627-1652.
- Duncan, C. J., & Jackson, M. J. (1987). Different mechanisms mediate structural changes and intracellular enzyme efflux following damage to skeletal muscle. *Journal of Cell Science*, 87 (Pt 1), 183-188.
- Edmondson, D. G., & Olson, E. N. (1989). A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes & Development*, 3(5), 628-640.
- Edmondson, D. G., & Olson, E. N. (1993). Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(2), 755-758.
- Epstein, J. A., Lam, P., Jepeal, L., Maas, R. L., & Shapiro, D.

- N. (1995). Pax3 inhibits myogenic differentiation of cultured myoblast cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(20), 11719-11722.
- Febbraio, M. A., & Pedersen, B. K. (2002). Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(11), 1335-1347.
- Filigheddu, N., Gnocchi, V. F., Coscia, M., Cappelli, M., Porporato, P. E., Tauli, R., et al. (2007). Ghrelin and des-acyl ghrelin promote differentiation and fusion of C2C12 skeletal muscle cells. *Molecular Biology of the Cell*, 18(3), 986-994.
- Fujiwara, T., Takami, N., Misumi, Y., & Ikehara, Y. (1998). Nordihydroguaiaretic acid blocks protein transport in the secretory pathway causing redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(5), 3068-3075.
- Gainsford, T., Willson, T. A., Metcalf, D., Handman, E., McFarlane, C., Ng, A., et al. (1996). Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), 14564-14568.
- Gartrell, M. J., Craun, J. C., Podrebarac, D. S., & Gunderson, E. L. Pesticides, selected elements, and other chemicals

in adult total diet samples, October 1980-March 1982.

Journal Name: J. Assoc. Off. Anal. Chem.; (United States); Journal Volume: 69:1, Medium: X; Size: Pages: 146-161.

- Gokhale, R., Chandrashekhara, S., & Vasanthakumar, K. C. (2007). Cytokine response to strenuous exercise in athletes and non-athletes--an adaptive response. *Cytokine, 40(2)*, 123-127.
- Grow, W. A., & Eroschenko, V. P. (2002). The pesticide methoxychlor disrupts the fusion of myoblasts into myotubes in skeletal muscle cell culture. *Toxicology and Applied Pharmacology, 179(2)*, 105-110.
- Hasty, P., Bradley, A., Morris, J. H., Edmondson, D. G., Venuti, J. M., Olson, E. N., et al. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature, 364(6437)*, 501-506.
- Hopwood, N. D., Pluck, A., & Gurdon, J. B. (1989). MyoD expression in the forming somites is an early response to mesoderm induction in *Xenopus* embryos. *The EMBO Journal, 8(11)*, 3409-3417.
- Huard, J., Li, Y., & Fu, F. H. (2002). Muscle injuries and repair: current trends in research. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume, 84-A(5)*, 822-832.
- Ito, H., Ueda, H., Iwamoto, I., Inaguma, Y., Takizawa, T., Asano, T., et al. (2005). Nordihydroguaiaretic acid

- (NDGA) blocks the differentiation of C2C12 myoblast cells. *Journal of Cellular Physiology*, 202(3), 874-879.
- Ivanov, D. B., Philippova, M. P., & Tkachuk, V. A. (2001). Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry. Biokhimiia*, 66(10), 1174-1186.
- Jackman, R. W., & Kandarian, S. C. (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *American journal of physiology. Cell Physiology*, 287(4), C834-843.
- Joulia, D., Bernardi, H., Garandel, V., Rabenoelina, F., Vernus, B., & Cabello, G. (2003). Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Experimental Cell Research*, 286(2), 263-275.
- Kim, S. Y., Kim, T. B., Moon, K. A., Kim, T. J., Shin, D., Cho, Y. S., et al. (2008). Regulation of pro-inflammatory responses by lipoxygenases via intracellular reactive oxygen species in vitro and in vivo. *Experimental & Molecular Medicine*, 40(4), 461-476.
- Kitzmann, M., & Fernandez, A. (2001). Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 58(4), 571-579.
- Kook, S. H., Lee, H. J., Chung, W. T., Hwang, I. H., Lee, S. A., Kim, B. S., et al. (2008). Cyclic mechanical stretch stimulates the proliferation of C2C12 myoblasts and inhibits their differentiation via prolonged activation of

- p38 MAPK. *Molecules and Cells*, 25(4), 479-486.
- Kwiecinska, P., Roszkiewicz, B., Lokociejewska, M., & Orzechowski, A. (2005). Elevated expression of NF-kappaB and Bcl-2 proteins in C2C12 myocytes during myogenesis is affected by PD98059, LY294002 and SB203580. *Cell Biology International*, 29(4), 319-331.
- Lang, H., & Wurzburg, U. (1982). Creatine kinase, an enzyme of many forms. *Clinical Chemistry*, 28(7), 1439-1447.
- Langen, R. C., Schols, A. M., Kelders, M. C., Wouters, E. F., & Janssen-Heininger, Y. M. (2001). Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(7), 1169-1180.
- Langen, R. C., Schols, A. M., Kelders, M. C., Wouters, E. F., & Janssen-Heininger, Y. M. (2003). Enhanced myogenic differentiation by extracellular matrix is regulated at the early stages of myogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 39(3-4), 163-169.
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., & Kambadur, R. (2002). Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49831-49840.
- Le Grand, F., & Rudnicki, M. A. (2007). Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Current Opinion in*

- Cell Biology*, 19(6), 628-633.
- Lee, C. H., Jang, Y. S., Her, S. J., Moon, Y. M., Baek, S. J., & Eling, T. (2003). Nordihydroguaiaretic acid, an antioxidant, inhibits transforming growth factor-beta activity through the inhibition of Smad signaling pathway. *Experimental Cell Research*, 289(2), 335-341.
- Legerlotz, K., & Smith, H. K. (2008). Role of MyoD in denervated, disused, and exercised muscle. *Muscle & Nerve*, 38(3), 1087-1100.
- Lindon, C., Montarras, D., & Pinset, C. (1998). Cell cycle-regulated expression of the muscle determination factor Myf5 in proliferating myoblasts. *The Journal of Cell Biology*, 140(1), 111-118.
- Maglara, A. A., Vasilaki, A., Jackson, M. J., & McArdle, A. (2003). Damage to developing mouse skeletal muscle myotubes in culture: protective effect of heat shock proteins. *The Journal of Physiology*, 548(Pt 3), 837-846.
- Megeney, L. A., Kablar, B., Garrett, K., Anderson, J. E., & Rudnicki, M. A. (1996). MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes & Development*, 10(10), 1173-1183.
- Menconi, M., Gonnella, P., Petkova, V., Lecker, S., & Hasselgren, P. O. (2008). Dexamethasone and corticosterone induce similar, but not identical, muscle wasting responses in cultured L6 and C2C12 myotubes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105(2), 353-364.

- Mohaupt, M. G., Karas, R. H., Babiychuk, E. B., Sanchez-Freire, V., Monastyrskaya, K., Iyer, L., et al. (2009). Association between statin-associated myopathy and skeletal muscle damage. *CMAJ : Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Medicale Canadienne*, 181(1-2), E11-18.
- Molkentin, J. D., & Olson, E. N. (1996a). Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9366-9373.
- Molkentin, J. D., & Olson, E. N. (1996b). Defining the regulatory networks for muscle development. *Current Opinion in Genetics & Development*, 6(4), 445-453.
- Naya, F. J., & Olson, E. (1999). MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(6), 683-688.
- Nieman, D. C., Davis, J. M., Henson, D. A., Walberg-Rankin, J., Shute, M., Dumke, C. L., et al. (2003). Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3-h run. *Journal of Applied Physiology*, 94(5), 1917-1925.
- Nishimura, M., Mikura, M., Hirasaka, K., Okumura, Y., Nikawa, T., Kawano, Y., et al. (2008). Effects of dimethyl sulphoxide and dexamethasone on mRNA

- expression of myogenesis- and muscle proteolytic system-related genes in mouse myoblastic C2C12 cells. *Journal of Biochemistry*, 144(6), 717-724.
- Nozaki, M., Li, Y., Zhu, J., Ambrosio, F., Uehara, K., Fu, F. H., et al. (2008). Improved muscle healing after contusion injury by the inhibitory effect of suramin on myostatin, a negative regulator of muscle growth. *The American Journal of Sports Medicine*, 36(12), 2354-2362.
- Ono, Y., Sensui, H., Sakamoto, Y., & Nagatomi, R. (2006). Knockdown of hypoxia-inducible factor-1alpha by siRNA inhibits C2C12 myoblast differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98(3), 642-649.
- Parker, S. B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A. T., Bradley, A., et al. (1995). p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5200), 1024-1027.
- Patapoutian, A., Yoon, J. K., Miner, J. H., Wang, S., Stark, K., & Wold, B. (1995). Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. *Development (Cambridge, England)*, 121(10), 3347-3358.
- Pedersen, B. K., Akerstrom, T. C., Nielsen, A. R., & Fischer, C. P. (2007). Role of myokines in exercise and metabolism. *Journal of Applied Physiology*, 103(3),

1093-1098.

- Pedersen, B. K., & Hoffman-Goetz, L. (2000). Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiological Reviews*, *80*(3), 1055-1081.
- Perry, R. L., & Rudnick, M. A. (2000). Molecular mechanism regulating myogenic determination and differentiation. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, *5*, D750-767.
- Rao, Y. K., Fang, S. H., & Tzeng, Y. M. (2009). Synthesis and biological evaluation of 3',4',5'-trimethoxychalcone analogues as inhibitors of nitric oxide production and tumor cell proliferation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *17*(23), 7909-7914.
- Redfield, A., Nieman, M. T., & Knudsen, K. A. (1997). Cadherins promote skeletal muscle differentiation in three-dimensional cultures. *The Journal of Cell Biology*, *138*(6), 1323-1331.
- Rohwedel, J., Maltsev, V., Bober, E., Arnold, H. H., Hescheler, J., & Wobus, A. M. (1994). Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Developmental Biology*, *164*(1), 87-101.
- Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Seale, P., Asakura, A., & Rudnicki, M. A. (1999). Reduced differentiation potential of primary MyoD^{-/-} myogenic cells derived

- from adult skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology*, 144(4), 631-643.
- Skapek, S. X., Rhee, J., Spicer, D. B., & Lassar, A. B. (1995). Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5200), 1022-1024.
- Smith, T. H., Kachinsky, A. M., & Miller, J. B. (1994). Somite subdomains, muscle cell origins, and the four muscle regulatory factor proteins. *The Journal of Cell Biology*, 127(1), 95-105.
- Steffens, B. W., Batia, L. M., Baarson, C. J., Choi, C. K., & Grow, W. A. (2007). The pesticide methoxychlor decreases myotube formation in cell culture by slowing myoblast proliferation. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 21(5), 770-781.
- Stupka, N., Tarnopolsky, M. A., Yardley, N. J., & Phillips, S. M. (2001). Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. *Journal of Applied Physiology*, 91(4), 1669-1678.
- Sugiyama, Y., Suzuki, A., Kishikawa, M., Akutsu, R., Hirose, T., Wayne, M. M., et al. (2000). Muscle develops a specific form of small heat shock protein complex composed of MKBP/HSPB2 and HSPB3 during myogenic differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(2), 1095-1104.

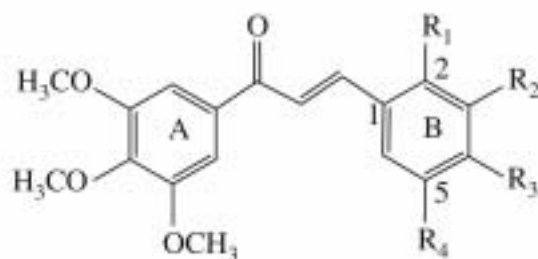
- Tanabe, K., Okuya, S., Tanizawa, Y., Matsutani, A., & Oka, Y. (1997). Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 241(3), 765-768.
- Tapscott, S. J., Davis, R. L., Thayer, M. J., Cheng, P. F., Weintraub, H., & Lassar, A. B. (1988). MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4877), 405-411.
- Tidball, J. G. (2005). Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(2), R345-353.
- Toft, A. D., Jensen, L. B., Bruunsgaard, H., Ibfelt, T., Halkjaer-Kristensen, J., Febbraio, M., et al. (2002). Cytokine response to eccentric exercise in young and elderly humans. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 283(1), C289-295.
- Trask, R. V., & Billadello, J. J. (1990). Tissue-specific distribution and developmental regulation of M and B creatine kinase mRNAs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1049(2), 182-188.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., & Eppenberger, H. M. (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine

- kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *The Biochemical Journal*, 281 (Pt 1), 21-40.
- Wang, J., Helin, K., Jin, P., & Nadal-Ginard, B. (1995). Inhibition of in vitro myogenic differentiation by cellular transcription factor E2F1. *Cell growth & Differentiation : The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, 6(10), 1299-1306.
- Wilson, I. A., Brindle, K. M., & Fulton, A. M. (1995). Differential localization of the mRNA of the M and B isoforms of creatine kinase in myoblasts. *The Biochemical Journal*, 308 (Pt 2), 599-605.
- Winter, B., & Arnold, H. H. (2000). Activated raf kinase inhibits muscle cell differentiation through a MEF2-dependent mechanism. *Journal of Cell Science*, 113 Pt 23, 4211-4220.
- Yaffe, D., & Saxel, O. (1977a). A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 7(3), 159-166.
- Yaffe, D., & Saxel, O. (1977b). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270(5639), 725-727.
- Yu, T., Luo, G., Zhang, L., Wu, J., Zhang, H., & Yang, G.

- (2008). Leptin promotes proliferation and inhibits differentiation in porcine skeletal myoblasts. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(1), 13-21.
- Zetser, A., Gredinger, E., & Bengal, E. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(8), 5193-5200.
- Zhu, L., & Skoultchi, A. I. (2001). Coordinating cell proliferation and differentiation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 11(1), 91-97.

附錄

附錄一、一系列 YMT 新合成化合物之結構



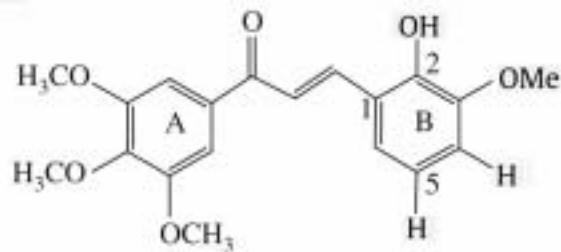
| Compound | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | Formula | Yield ^a (%) |
|-----------|----------------|----------------|----------------------------------|-----------------|--|------------------------|
| 1 | OMe | OMe | H | H | C ₂₀ H ₂₂ O ₆ | 88 |
| 2 | H | OMe | OMe | H | C ₂₀ H ₂₂ O ₆ | 90 |
| 3 | H | OMe | OMe | OMe | C ₂₁ H ₂₄ O ₇ | 86 |
| 4 | H | H | N(CH ₃) ₂ | H | C ₂₀ H ₂₃ NO ₄ | 78 |
| 5 | OMe | H | OMe | OMe | C ₂₁ H ₂₄ O ₇ | 87 |
| 6 | H | H | OH | H | C ₁₈ H ₁₈ O ₅ | 75 |
| 7 | H | OMe | OH | H | C ₁₉ H ₂₀ O ₆ | 83 |
| 8 | OMe | H | OMe | H | C ₂₀ H ₂₂ O ₆ | 88 |
| 9 | OH | H | H | OH | C ₁₈ H ₁₈ O ₆ | 58 |
| 10 | OH | OMe | H | H | C ₁₉ H ₂₀ O ₆ | 72 |
| 11 | H | OH | OH | H | C ₁₈ H ₁₈ O ₆ | 57 |
| 12 | H | OH | H | H | C ₁₈ H ₁₈ O ₅ | 70 |
| 13 | H | H | OMe | H | C ₁₉ H ₂₀ O ₅ | 89 |
| 14 | H | OH | OMe | H | C ₁₉ H ₂₀ O ₆ | 85 |
| 15 | H | OMe | H | H | C ₁₉ H ₂₀ O ₅ | 92 |
| 16 | H | H | F | H | C ₁₈ H ₁₇ FO ₄ | 77 |
| 17 | H | H | Br | H | C ₁₈ H ₁₇ BrO ₄ | 75 |
| 18 | H | H | NO ₂ | H | C ₁₈ H ₁₇ NO ₆ | 68 |
| 19 | H | H | Me | H | C ₁₉ H ₂₀ O ₄ | 82 |
| 20 | OH | H | H | NO ₂ | C ₁₈ H ₁₇ NO ₇ | 66 |
| 21 | CHO | H | H | H | C ₁₉ H ₁₈ O ₅ | 70 |
| 22 | H | CHO | H | H | C ₁₉ H ₁₈ O ₅ | 72 |
| 23 | H | H | H | CHO | C ₁₉ H ₁₈ O ₅ | 75 |

^a Isolated yield including recovered starting material.

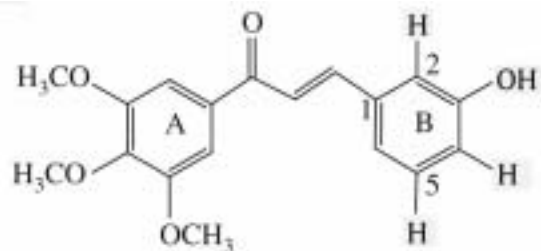
圖表來源 (Rao, Fang, & Tzeng, 2009)

附錄二、 YMT10、12、14、16 各別化學結構式之示意圖

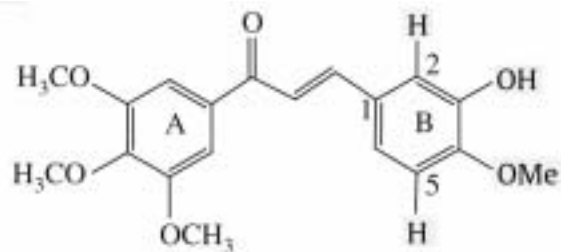
YMT10



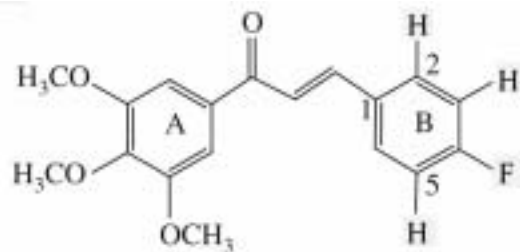
YMT12



YMT14



YMT16



修改自 (Rao, Fang, & Tzeng, 2009)