



中國醫藥大學
基礎醫學研究所
碩士學位論文

CCN3 在成骨細胞中，藉由 ILK, p38, JNK 及 AP-1 路徑增加
BMP-4 表現。

CCN3 increases BMP-4 expression through ILK, p38, JNK and AP-1
pathways in osteoblasts

指導教授：湯智昕 博士

研究生：張容慈

中華民國九十九年六月

致謝

我在暖暖南風之中來到癌症大樓開始嶄新的碩士生活，也在炎炎夏日裡完成學業。回首來時路，步調快得彷彿只是昨日：夕陽西下，落地窗上映出湯智昕老師忙碌的背影，我的指導老師有許多的面貌，總是認真研究認真教書、指導學生不遺餘力，時而放聲大笑、時而為我們擔憂…無論是哪一面的老師，我總是心生感激，是湯老師讓我清楚師道的尊貴及研究的真諦，也是湯老師讓我的眼界更加寬闊、讓我知道天地之大。

遙想當初，偌大的實驗室是軒誌學長帶領我邁開第一步，身兼既是學長又是師父的角色，總是無法忘記和他分享生活中大小事時，他露出高深莫測笑容的表情；第一次準備 seminar 時，是小天學長為我解答疑惑、在實驗操作上，更是他提供豐富的經驗替我解決一次又一次的難關；垂頭喪氣、不知所措時，如芳學姐豪邁的身影會適時出現，讓我知道自己是獨一無二；和我一樣熱愛文學的先賜學長，扮演著我心中的文藝青年，在山窮水盡之時，給予柳岸花明的開悟；活潑可愛的蝦米用她獨特的方法，在開心時為我快樂、難過時替我悲傷；冷靜聰慧的巧雯是我碩士班第一位認識的同學，雖然不多話，但是總比別人多一份細膩心思；感謝二年來的班代倉裕，因為有你，所以我不需操心生活大小事、你憨厚燦爛的笑容在我失意時更顯珍貴。

擁有堅強實力的筱琪學姐讓我見識到，從事科學研究時的嚴謹態度；大而化之的雅慧學姐，待人處事時的真誠和不扭捏值得我學習；認真的大頭學長，總有自己的想法，努力實踐夢想的行為撼動我；溫柔的柏村學長，雖然相處時間不長，但是熱心的態度使我感動；時常為實驗室準備糧食的欣珊學姐，總讓我們吃遍各種美食。

安靜神秘的諾萇，是實驗室中第一位認真把我當成學姐看待的學弟；說話具有醍醐灌頂魔力的婉瑜，使我正視自己的盲點；明知必輸卻心甘情願和我進行補 tip 比賽的將軍、每天都和我鬥嘴，實際上卻極其 nice 和溫柔的咩咩…你們用獨特的魅力和形象，讓這段時間裡開懷大笑多於眉頭深鎖，感謝你們陪著我走過看過度過許多的風景，留下一段細細品嚐後還餘韻不絕的回憶。

最後，允許我專注實驗無後顧之憂的爸媽、祈禱我能平安喜樂的爺爺奶奶、最懂我知心的大姐、不常見面卻疼愛我的哥哥、替我加油打氣的表妹和堂弟、遇到不順心時願意聽我訴苦的娜惠、采真、于娟、蕙慈…謝謝你們在我最需要時出現，平撫我的困頓和憂愁，才能讓我撰寫論文順遂。

目錄

| | |
|------------------------------------|-----|
| 縮寫表 | IV |
| 中文摘要..... | VI |
| 英文摘要..... | VII |
| 壹、 緒論..... | 1 |
| 一、 研究背景..... | 1 |
| 二、 研究目的 | 2 |
| 三、 研究假設 | 2 |
| 貳、 文獻探討..... | 3 |
| 一、 骨骼形成機制..... | 3 |
| 二、 造骨相關蛋白..... | 9 |
| 三、 CCN | 12 |
| 四、 CCN3 對骨骼形成之影響..... | 18 |
| 五、 AP1 (Activator protein 1) | 19 |
| 六、 AP1 對骨骼形成之影響..... | 19 |
| 參、 材料與方法..... | 21 |
| 一、 實驗材料..... | 21 |
| 二、 實驗方法..... | 25 |
| 肆、 結果..... | 32 |
| 伍、 結論..... | 36 |
| 陸、 討論..... | 37 |

柒、 參考文獻.....40

捌、 附圖.....46



圖目錄

| | | |
|---------|---|----|
| Fig. 1 | The bone remodeling precess. | 4 |
| Fig. 2 | The preosteoblastic/stromal cell regulated osteoclastogenesis..... | 6 |
| Fig. 3 | The structure of BMPs..... | 9 |
| Fig. 4 | Schematics of CCN protein structure and localization of their integrin binding sites..... | 14 |
| Fig. 5 | Structural comparision of the six CCN proteins..... | 15 |
| Fig. 6 | CCN3 increased bone mineralization but not proliferation and migration..... | 46 |
| Fig. 7 | CCN3 increased BMP-4 expression..... | 47 |
| Fig. 8 | Transcription inhibitor and translation inhibitor suppress CCN3 induced BMP-4 expression..... | 48 |
| Fig. 9 | $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 5$ integrin involved in CCN3-induced BMP-4 expression..... | 49 |
| Fig. 10 | Involvement ILK signaling pathway in CCN3-mediated BMP-4 expression.. | 50 |
| Fig. 11 | Involvement p38 and JNK signaling pathway in response to CCN3 in osteoblasts..... | 51 |
| Fig. 12 | CCN3 increased AP-1 activity in osteoblasts..... | 53 |
| Fig. 13 | CCN3 increased c-Jun translocation into cell nucleus..... | 54 |

縮寫表

ALP : Alkaline phosphatase

AP-1 : Activator protein 1

BMP: Bone morphogenetic proteins

Cbfa-1 : Core-binding factor α 1

CCN : CYR61/CTGF/NOV

ChIP : Chromatin immunoprecipitation technique

CT : Cystin knot

IGF : insulin-like growth factor

ILK : Integrin-linked kinase

MTT : 3- (4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

OB cell : Osteoblast cell

OC cell : Osteoclast cell

OC : Osteocalcin

OPG : Osteoprotegerin

OPN : Osteopontin

Osx : Osterix

PTH : Parathyroid hormone

RANKL : Receptor activator for nuclear factor κ B ligand

RANK : Receptor activator for nuclear factor κ B

Real-time PCR : Real-time polymerase chain reaction



中文摘要

成骨細胞對於維持骨質平衡是很重要，為了增加骨頭強度，礦化作用是必須的。BMPs(骨形成蛋白)是屬於TGF- β (transforming growth factor-beta)的家族之一，已有研究證實其對於成骨細胞分化和成骨作用是非常重要。CCN(CYR61/CTGF/NOV)蛋白含有六種組成，命名由CCN1至CCN6。而CCN蛋白可整合調控integrins的訊息傳導，在這些組成中，CCN3對於骨骼發展是不可或缺的。然而，CCN3和BMP之間的關係目前仍未知。我們使用qPCR (quantitative polymerase chain reaction) 技術發現，在老鼠的成骨細胞MC3T3-E1中，CCN3/NOV會增加BMP-4的基因表現，但是對於BMP-2和BMP-7無任何影響。ILK (Integrin-linked kinase) 抑制劑KP392、p38抑制劑SB203580和JNK抑制劑SP600125會抑制CCN3的作用。在CCN3的刺激下，ILK的Kinase activity和p38，JNK的磷酸化均會增加。此外，將細胞轉染p38 mutant、JNK mutant、ILK siRNA和AP-1寡核苷酸也會降低CCN3的作用。因此，給予藥理學抑制劑和抑制基因的實驗結果顯示，CCN3促使AP-1作用及調節BMP-4的產生，是需要ILK、p38和JNK的訊息傳導路徑參與。總結上述，我們的結果證實CCN3在成骨細胞中，藉由ILK、p38和JNK的活化，產生AP-1-dependent機制增強BMP-4的表現。

關鍵字：骨形成蛋白、成骨細胞、CCN蛋白、AP-1轉錄因子

英文摘要

Osteoblast cells are important for balance of bone mass. To increase bone strength, mineralization of osteoblast cells are necessary. Bone morphogenetic proteins (BMPs) are member of transforming growth factor-beta superfamily, has been reported that plays important roles in osteoblastic differentiation and bone formation. The CCN proteins contain six members, namely CCN1 to CCN6, otherwise, the CCN proteins can integrate and modulate the signals of integrins. Among them, CCN3 is critical to skeletal development. However, the relationship between CCN3 and BMP are largely unknown. We found that CCN3/NOV stimulation increased mRNA levels of BMP-4, but not BMP2 and BMP7 by using qPCR assay in mouse osteoblastic cells MC3T3-E1. ILK (Integrin-linked kinase) inhibitor (KP392), p38 inhibitor (SB203580) and JNK inhibitor (SP600125) inhibited the potentiating action of CCN3. Stimulation of CCN3 increased the kinase activity of ILK and phosphorylation of p38, and JNK. Otherwise, transfection of cells with dominant-negative mutant of p38, JNK, ILK siRNA and AP-1 oligonucleotide, inhibited the action of CCN3. Moreover, the use of pharmacological inhibitors or genetic inhibition revealed that ILK, p38, JNK signaling pathway were potentially required for CCN3-induced AP-1 activation and subsequent BMP4 up-regulation. Taken together, our results provide evidence that CCN3 enhances BMP4 expression in osteoblasts by an AP-1-dependent mechanism involving the activation of ILK, p38 and JNK pathways.

Key words : BMP 、 osteoblast 、 CCN protein 、 AP-1 transcription factor

壹、 緒論

一、 研究背景

骨質疏鬆症隨著人類壽命的延長，已是全球重要的流行病之一，其後果為發生在各部位的骨折，尤以脊椎骨和髖部最為嚴重。

在成人一生中，噬骨和成骨細胞會保持平衡、骨質也會維持動態平衡。但是在 50 歲左右，噬骨作用比起成骨細胞會更活躍，造成骨質的流失，導致骨質缺乏 (Osteopenia) 和骨質疏鬆症 (Osteoporosis)。在骨頭的發展過程中，有三種生理上的原因，使得骨質呈現過低的狀態，一為遺傳因子所造成；二為不正常的內分泌調控、細胞激素等，使得噬骨作用增加；三為成骨細胞功用受損，無法進行適當的成骨作用，或是成骨過程中沒有足夠的刺激。

更進一步探討，其原因為骨質減少或是骨頭結構惡化，形成嚴重的骨折。在細胞激素和荷爾蒙影響下，成骨和噬骨細胞分別從幹細胞分化而來，當噬骨和成骨細胞功能不平衡時，不可逆的骨頭流失就會出現，骨質疏鬆也就產生。

之前的研究已知雌激素 (Estrogen) 和副甲狀腺素 (Parathyroid hormone) 會影響成骨和噬骨細胞。雌激素會藉由增加 IGF-1 (Insulin-like growth factor-1)、OPG (Osteoprotegerin)、TGF- β 、RANKL 降低 (Receptor activator for nuclear factor κ B ligand) 表現而部份影響成骨細胞 (Rogers and Eastell, 2005; Srivastava et al., 1998; Teitelbaum, 2000)；副甲狀腺 (Hyperparathyroidism) 和老化會大量提升 PTH 量 (Fatayerji et al., 2000; Seeman, 2003)，而 PTH 可直接作用在成骨細胞中、增強 RANKL 表現、抑制 OPG。既然骨質疏鬆主要的病因是來自於噬骨和成骨細胞的不平衡，許多的治療方法便由此誕生：一為加強成骨細胞的作用、二為抑制噬骨細胞的作用。例如：雌激素替代療法 (Estrogen replacement therapy) 可以抑制骨頭流失、骨頭更新 (Bone turnover) 和增加骨質密度 (Bone mineral density)。Bisphosphonates 是抑制噬骨最有效的抑制劑，作用為使噬骨細胞不活化且促使凋亡。然而這些治療卻有副作用，如雌激素會增加乳癌風險、bisphosphonates 和下顎骨壞死 (Jaw

osteonecrosis)也有很大的關係(Maerevoet et al., 2005; Rodan and Martin, 2000)。

之前的研究證實，TGF β 家族和骨形成蛋白對於骨頭的恆定是非常重要的，這些因子可調控成骨細胞的增生和分化。而 CCN (CYR61/CTGF/NOV)為一群小分子的基質蛋白，主要參與分化、移行、生長、細胞黏著等生理過程。已有報告指出 CCN 蛋白家族在軟骨分化或是調控軟骨腫瘤也是非常重要，因此 CCN 對於增加骨骼密度確是有影響(Katsube et al., 2009)。

二、 研究目的

本研究目的：

- (一)、CCN3 是否能活化造骨細胞加速分泌 BMP-4 蛋白。
- (二)、探討 CCN3 刺激後使 BMP-4 蛋白表現量改變，是否經由 ILK/JNK、p38/AP-1 此路徑的活化而影響訊息路徑。

三、 研究假設

給予 CCN3 可以啟動 ILK/JNK 及 p38 訊息路徑且活化 AP-1，進而促使造骨細胞中的 BMP-4 蛋白及 mRNA 表現量增加。

貳、 文獻探討

一、 骨骼形成機制

骨骼最主要的功能便是提供身體支撐，其由細胞和細胞外的基質(Extracellular matrix)所組成，當 calcium hydroxyapatite 沉積，使得細胞外基質進行礦化(Mineralization)後，即可賦予骨頭強度(Ducy et al., 2000)。除此之外，為了承受負重和機械性壓力(Mechanical stress)，骨頭必須具有再塑(Remodeling)功能(Fig. 1)，其中骨頭再塑最重要的即為成骨和噬骨作用。

在骨頭中有三種迥異的細胞存在：一為成骨細胞(Osteoblast)，負責骨頭形成；二為破骨細胞(Osteoclast)，負責噬骨；三為骨細胞(Osteocytes)，由成骨細胞轉變而來。骨頭再塑便由成骨細胞和噬骨細胞所負責，它們分別來自於造血幹細胞(Hematopoietic stem cells)和骨髓間葉幹細胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)。



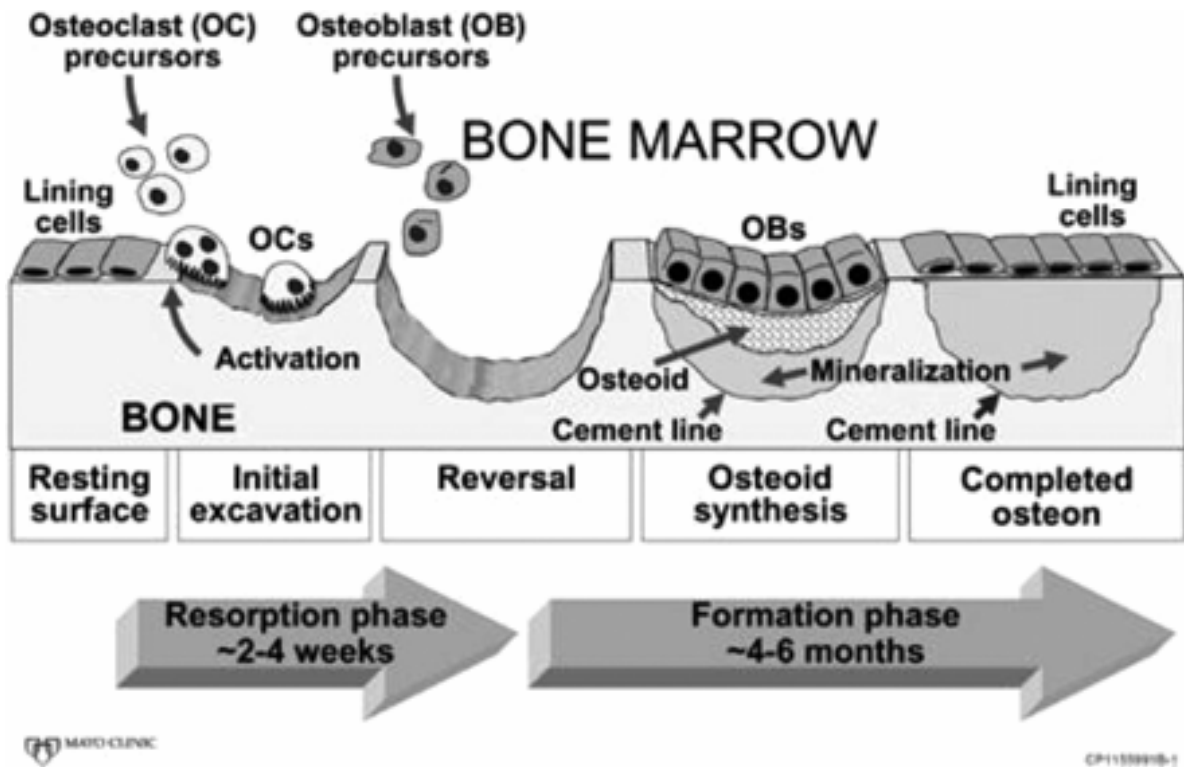


Fig. 1 The bone remodeling process

Bone remodeling sequence. A cartoon depiction of the sequential action of osteoclasts and osteoblasts to remove old bone and replace it with new bone. For simplicity of illustration, the cartoon shows remodeling in only 2 dimensions, whereas in vivo, it occurs in 3 dimensions, with osteoclasts continuing to enlarge the cavity at one end and osteoblasts beginning to fill it in at the other end (Kearns and Kallmes, 2008).

成骨細胞為單核細胞，沿著骨頭表面並和鄰近的成骨細胞緊密排列，最重要的功能為骨頭基質沉積和調控噬骨細胞。當成骨細胞受到活化，合成新的骨頭基質，此時可見到高基氏體 (Golgi apparatus)和豐富的粗內質網 (rough endoplasmic reticul)出現(Canhao H et al., 2005(Mackie, 2003)。最後，某些成骨細胞會嵌入骨頭基質中形成骨細胞，同時逐漸停止分泌骨質(Osteoid)。

成骨細胞主要受 Cbfa-1 (Like core-binding factor α -1)和 Osx (Osterix)基因的調控，最近的研究發現 Wnt/ β -catenin 路徑也會參與在成骨細胞的分化和增生。而成骨細胞是如何調控噬骨細胞？其中的機轉為成骨細胞透過 pre-osteoclast cells 上的 RANKL 和 RANK (Receptor activator for nuclear factor κ B)進行噬骨作用的調節。換言之，成骨細胞分泌 OPG (soluble decoy receptor)，OPG 會和 RANKL 結合，藉此阻斷 RANKL 和 RANK 的交互作用，也就阻止了破骨細胞的分化和活化，所以 RANKL 和 OPG 之間的平衡決定了破骨細胞的形成及活性(Gori et al., 2000)(Fig. 2)。通常破骨作用的速度比起成骨作用快許多，破骨作用需要 2-3 週的時間，但是需要三個月才能進行重建(Harada and Rodan, 2003)。

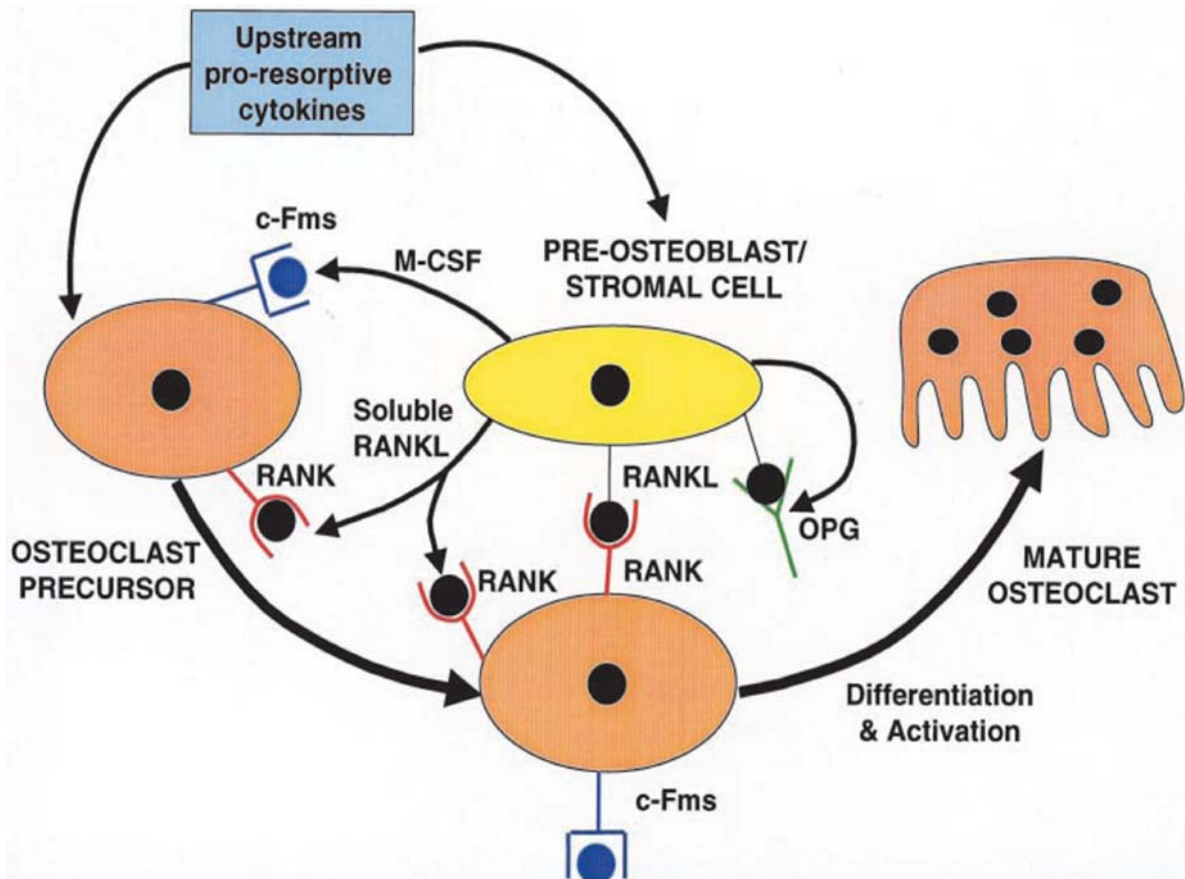


Fig. 2 The preosteoblastic/stromal cell regulated osteoclastogenesis.

RANKL, expressed on the surface of preosteoblastic/stromal cells, binds to RANK on the osteoclastic precursor cells. M-CSF, which binds to its receptor, c-Fms, on preosteoclastic cells, appears to be necessary for osteoclast development because it is the primary determinant of the pool of these precursor cells. RANKL, however, is critical for the differentiation, fusion into multinucleated cells, activation, and survival of osteoclastic cells. OPG puts a brake on the entire system by blocking the effects of RANKL (Khosla, 2001).

除了成骨和噬骨細胞之外，另外最受討論的即為骨細胞。骨細胞是骨頭中含量最豐富的細胞，成熟人類的骨骼超過百分之九十均為骨細胞，它們被 organic matrix 所環繞，並可與骨膜細胞(Periosteal)和內皮細胞進行礦化作用，其細胞質中的胞器成分和體積隨著活性而改變。骨細胞最主要作用為傳遞訊息，因此骨細胞被認為是 mechanosensors，目的在告知成骨和噬骨作用是在何時、何處進行反應(Knothe Tate et al., 2004; Manolagas, 2000; Seeman and Delmas, 2006)。骨頭內大量且複雜的細胞網絡，涵蓋骨頭的內部和外部表面，這也是為何骨頭是如此敏感的原因、且可控制 mineralized matrix 離子的進出和移動。特別的是，這些細胞組成對於調控骨頭和血液中礦物質是非常重要的。骨細胞、成骨細胞和 bone-ining cells 的互相聯繫，更能偵測骨頭的成骨和噬骨作用、以及骨頭基質中礦物離子的流向。

上述已提過，為了維持骨頭內硬度，骨頭必須經由礦化作用。骨頭的礦化是 organic matrix 中可溶性的 calcium 和 phosphate 形成 solid calcium phosphate。骨頭中 solid calcium phosphate 會形成 crystalline apatite，但是此時的結晶化程度是不穩定的，隨著時間增加，apatite 的結晶化程度才會增加。礦化首先在膠原蛋白纖維(Collagen fibrils)特定的洞帶區域(Hole zone regions)上開始，而膠原蛋白纖維上未進行礦化的洞帶區域會和已礦化的部份分離。當膠原蛋白纖維上洞帶區域增加、礦物質出現，matrix 上的礦化也就開始。

骨頭礦化開始時，成骨細胞內的粒腺體會出現 calcium phosphate 顆粒，而 matrix vesicles、extracellular membrane-bound structures 會組成成骨細胞的 plasma membrane。因此粒腺體和 matrix vesicles 會藉由堆積和釋放 calcium phosphate 直接 / 間接影響礦化，但是其所扮演的角色仍未被完全理解透徹。

礦化一但開始便會非常迅速，一小時之內約有 60%或更多的礦物質形成。當初始期之後，礦物質開始長時間堆積，逐漸增加骨頭的密度。雖然 organic 基質內的礦化過程仍舊未知；但是當礦化開始，水和非膠原蛋白的濃度會隨之減少。在礦化期間，非膠原蛋白(Non-collagenous)基質組成的改變，對於控制礦化期是非常重

要，但是其中的機制卻未定義清楚。

最後，骨頭的調控機轉雖是非常複雜，仍可被一些遺傳性疾病所影響，例如：成骨不全症(Osteogenesis imperfecta)、代謝性疾病(Metabolic diseases)、維生素 D 抗性佝僂病(Vitamin D-resistant rickets)。骨頭構造上的不正常會造成骨頭易碎或骨折的風險，除了這些少數的疾病外，大部份骨頭的疾病都是由於噬骨和成骨的不平衡。



二、造骨相關蛋白

(一)、骨形成蛋白-4 (BMP-4):

BMP 為多功能生長因子，屬於 TGF- β 家族。BMP 已被證實參與細胞增生、存活、分化和凋亡，然而其最主要的功能是在誘發骨頭、軟骨、韌帶和肌腱的形成。

1. 構造

所有的 BMPs 均以疏水性前驅蛋白(含有 50~100 個胺基酸)形態被分泌出來，每一種 BMP 都含有 7 個 cysteines，其中六個 cysteines 會組成 cystin knot (CT)，而第七個 cysteine 會與第二個單體進行雙聚體化。BMP 分子起初合成時為巨大的前驅蛋白，之後在 dibasic site 進行切割，因此 C-terminal 活化區域會被釋出。BMPs 構造中含有 signal peptide、pro-domain 和 mature peptide (Fig. 3)。

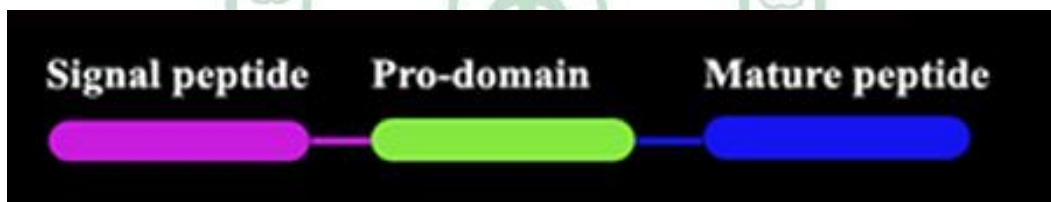


Fig. 3 The structure of BMPs (Modified from Dijke et al.)

BMPs consist of a signal peptide, pro-domain and mature peptide

當細胞將要分泌 BMP 時，BMP 前驅蛋白會切割 signal peptide，接著進行醣基化和雙聚體化，而細胞需要分泌成熟、具有生理活性的 BMP 時，pro-domain 的部份會被切割(Luyten et al., 1989)。

2. 功能

BMPs 已知具有多種功能，不只可以誘發軟骨和骨頭的形成，也參與在許多非骨頭發育的生理過程中，以下便針對 BMP 對於骨頭的影響進行論述。如同其名，

BMP 分子能誘使軟骨和骨頭的形成、模仿胚胎軟骨形成。之前許多研究證實，BMPs 在正常的胚胎發育期間，調節軟骨形成和骨頭形成是非常的重要(Hogan, 1996)。而最具有促骨作用的 BMP 家族為 BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7 和 BMP-9 (Table. 1)。

| BMP | Gene locus | Function | Receptors and inhibitors |
|--------|------------|---|---|
| BMP-1 | 8p21 | It is a metalloprotease that acts on procollagen I, II, and III. It is involved in cartilage development | Type I receptors |
| BMP-2 | 20p12 | Acts as a disulfide-linked homodimer and induces bone and cartilage formation. It is a candidate as a retinoid mediator. Plays a key role in osteoblast differentiation | ACVRIA, ACVRIB, ACVRIC, ACVRLI-BMPR (BMPRIA-BMPRIB) |
| BMP-3 | 14p22 | Induces bone formation | Type II receptors |
| BMP-4 | 14q22-q23 | Regulates the formation of teeth, limbs and bone from mesoderm. It also plays a role in fracture repair | ACVR2A, ACVR2B, AMHR2, BMPR2 |
| BMP-5 | 6p12.1 | Performs functions in cartilage development | Type III receptors Betaglycan |
| BMP-6 | 6p12.1 | Plays a key role in joint integrity in adults | |
| BMP-7 | 20q13 | Plays a key role in osteoblast differentiation. It also induces the production of SMADI. Also key in renal development and repair | |
| BMP-8 | 1p35-p32 | Involved in bone and cartilage development | Ligand inhibitors |
| BMP-9 | | Promoting chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells | |
| BMP-10 | 2p14 | Play a role in the trabeculation of the embryonic heart | Cerberus, Chordin, DAN, Decorin, Follistatin, Gremlin, Lefty, LTBPI |
| BMP-15 | Xp11.2 | May play a role in oocyte and follicular development | Noggin, THBSI |

Table. 1 The list of BMPs (quote from (Xiao et al., 2007)

In this table, it shows the function, gene locus, receptors and ligand inhibitors.

BMP-2 通常表現在具有軟骨聚集、骨膜或造骨區域的周遭；BMP-4 則是表現在軟骨膜上；BMP-6 表現在肥大化軟骨細胞上；在軟骨膜上可以測得高表現的 BMP-7 mRNA 量，但是其表現在關節形成區域是缺乏的 (Zhao et al., 2002)。實驗上的結果更進一步證明，BMP-2 和 BMP-7 對於骨頭和骨頭之外組織的發展是非常重要的。骨頭形成過程中，BMP-2 和 BMP-7 是被間葉幹細胞中的轉錄因子 Runx2

和 Osterix 所調控，因而被誘發表現。BMP-7 缺失老鼠會產生肋骨骨架、四肢、頭蓋骨骨骼的改變；BMP-5 若是突變，直接造成老鼠外耳尺寸縮小、胸骨變形、骨折後的修復功能有缺陷；BMP-6 突變老鼠會延遲胸骨的鈣化(Luyten et al., 1989)

(二)、造骨蛋白 (Osteopontin ;OPN)

OPN 早在 1985 年由 Franzen 和 Heinegard 發現，為磷酸化醣蛋白，被認為以單一基因轉譯為單一蛋白(Smith and Denhardt, 1987; Swanson et al., 1989)。經過不同的磷酸化、醣化、蛋白水解過程，可產生不同分子量的 OPN，其分子由 25~75 kDa 不等。OPN 以 phosphorylated (Salih et al., 1997; Salih et al., 1995; Sorensen et al., 1994) 和 non-phosphorylated (Barber et al., 1999; Chambers et al., 1992; Chang and Prince, 1993; Kubota et al., 1989) 兩種型式被分泌，phosphorylated OPN 是主要進行作用的型態，決定 OPN 是和 cell surface receptors 或 extracellular matrix 結合。

OPN 參與非常多的生理和病理過程，例如：細胞黏著(Reinholt et al., 1990)、血管新生(Asou et al., 2001)、凋亡、發炎反應和腫瘤轉移(Denhardt et al., 2001)。OPN 最重要的角色之一，即是參與骨頭的再塑作用。

OPN 在噬骨細胞中的功能為促使細胞黏著、在噬骨作用中具有趨化性。此外，當軟骨內進行成骨時，OPN 會積聚在礦化的骨頭基質中。再者，加強成骨細胞的分化、增生及加強 ALP (Alkaline phosphatase) 的活性。

(三)、骨鈣素 (osteocalcin ;OC)

骨鈣素是小分子、非膠原蛋白具有高度保留性的分泌蛋白，由造骨細胞所分泌，對於生體內代謝調節、骨頭再塑和骨頭礦化均非常重要，同時也是骨頭生成過程中的 biomarker。其表現會受到多種的生長因子、荷爾蒙和維他命所調控，例如：TGF- β 、TNF- α 、1,25-dihydroxyvitamin D3 等等。

(四)、 鹼性磷酸酶 (Alkaline phosphatase ;ALP):

ALP 為 membrane-bound ectoenzymes，人類的 ALP 可分為四類，分別為 tissue nonspecific、intestinal、placenta 和 germ cell，其中 tissue nonspecific 分佈在人體各處，包含：肝臟、骨頭和腎臟等等。當骨頭快速生長時，血液中 ALP 含量隨之升高，因此 ALP 可做為骨質代謝中的 biomarkr，反應出骨細胞代謝狀態。

三、 CCN (CYR61/CTGF/NOV)

CCN 家族為一群構造相似的小分子基質蛋白(Matrix protein)所組成，包含六種成員，命名由 CCN1 至 CCN6 (Table. 2)。CCN 家族調節各種生理過程，包含分化 (Differentiation)、移行(Mirgation)、生長(Proliferation)、細胞黏著(Cell adhesion)等功用(Katsube et al., 2009)。最先被發現的 CCN 家族為 cysteine rich 61(CYR 61/CCN1)， connective tissue growth factor (CTGF/CCN2)，和 nephroblastoma overexpressed (NOV/CCN3)，最先被發現的此三種蛋白質第一個字母，即用來表示擁有相似構造的 CCN 家族。

| CCN nomenclature | First reported | Synonym (also known as) | NM number (human/mouse) | cDNA Length (human/mouse) | Location (human/mouse) | Main functions |
|------------------|----------------|------------------------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|--|
| CCN1 | 1990 | Cyr61, CEF10, IGFBP10 | NM_001554.4/ NM_010516.2 | 1146 / 1140 | 1p31-p22/3 H2; 3 72.9 cM | Cell migration, angiogenesis, cell adhesion, apoptosis, gastrulation, tumorigenesis |
| CCN2 | 1991 | CTGF, Fisp-12, HCS24, IGFBP8 | NM_001901.2/ NM_010217.2 | 1050 / 1047 | 6q23.1/10 A3-B1; 10 17.0 cM | Fibrogenesis, osteogenesis, chondrogenesis, angiogenesis, diabetic nephropathy, tumorigenesis |
| CCN3 | 1992, 1994 | Nov, IGFBP9 | NM_002514.3/ NM_010930.4 | 1074 / 1065 | 8q24.1/15 D1; 15 22.5 cM | Angiogenesis, tumorigenesis |
| CCN4 | 1998 | WISP1, ELM-1 | NM_003882.2, NM_080838.1/NA | 1104, 1035/ NA | 8q24.1-q24.3/ NA | Tumorigenesis |
| CCN5 | 1998 | WISP2; CTGF-L, rCop-1 | NM_003881.2/NA | 753 / NA | 20q12-q13.1/ NA | Tumorigenesis |
| CCN6 | 1998 | WISP3 | NM_003880.3, NM_198239.1/NA | 1065, 1119/ NA | 6q21 / NA | Tumorigenesis |

Table. 2 CCN family members and their known functions. (quote from(Zuo et al.)

CCN 基因家族的分子量大約為 40kDa，且具有非常類似的結構組成。Ccn 基因約有 30%至 50%的核苷酸類似，而 CCN 蛋白約有 40%~60%相似的胺基酸序列 (Fig. 4)。

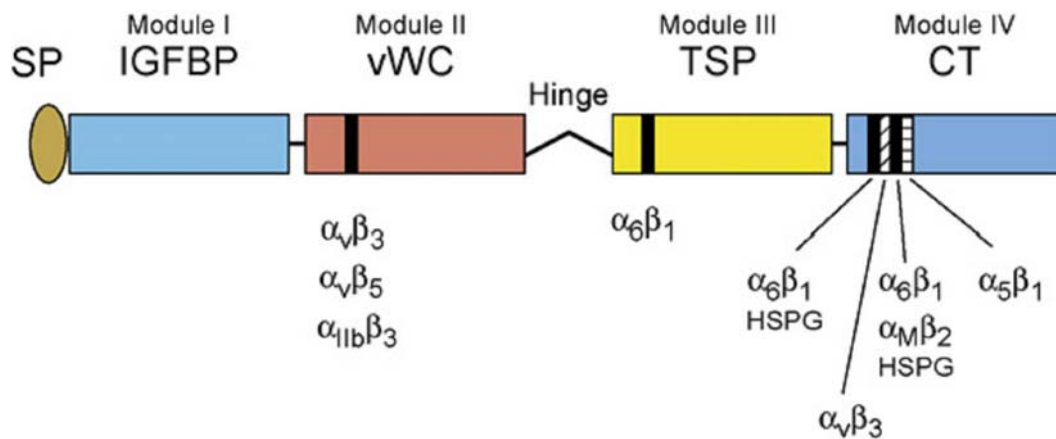


Fig. 4. Schematics of CCN protein structure and localization of their integrin binding sites. The six CCN proteins include CCN1 (CYR61), CCN2 (CTGF), CCN3 (NOV), CCN4(WISP-1, ELM1), CCN5 (WISP-2, COP-1), and CCN6 (WISP-3). They share significant structural homology, including an N-terminal secretory signal peptide (SP), followed by modular domains (illustrated in different colors) with sequence homologies to insulin-like growth factor binding protein (IGFBP, module I), von Willebrand factor type C repeat (vWC, module II), thrombospondin type 1 repeat (TSP, module III), and a cysteine knot containing carboxyl domain (CT, module IV). Throughout the four modules are 38 cysteine residues that are highly conserved. CCN5 uniquely lacks the CT domain but conserves domains I–III. A protease-sensitive hinge region with no sequence homology among the CCN proteins separate domains II and III. Specific binding sites (black and hatched bars) for several integrins and HSPGs have been identified for CCN1 and CCN2. (Chen and Lau, 2009)

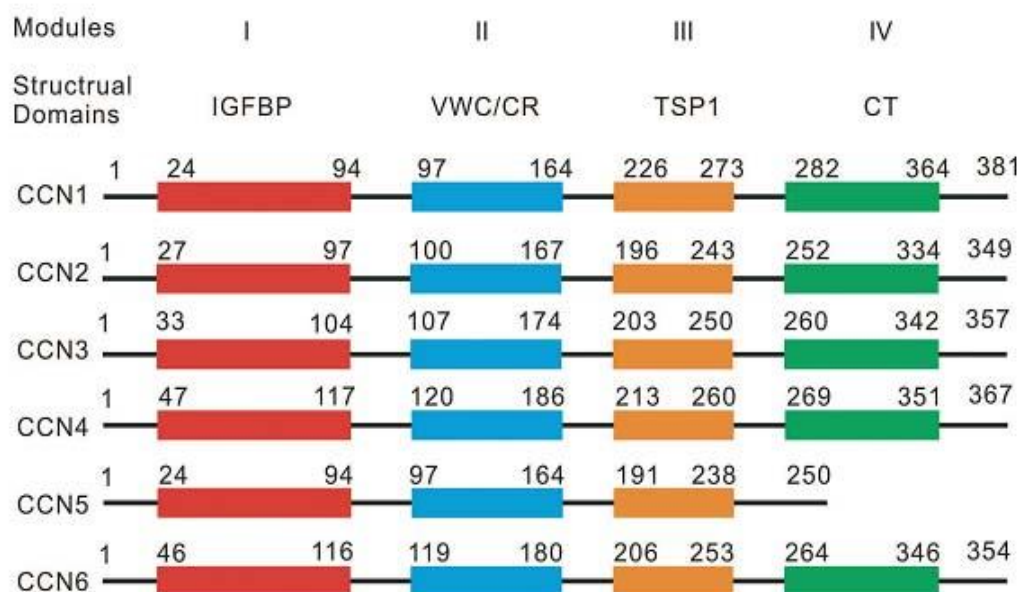


Fig. 5 Structural comparison of the six CCN proteins (quote from(Zuo et al.). The amino acid sequences of the six human CCN proteins were compared. The locations of the four structural domains are shown. It is noteworthy that slicing variants of some CCN transcripts are not shown.

CCN 蛋白由四段功能區域(functional domains)所組成，分別為 modules I、II、III、IV (Fig. 5)，以下便分別介紹此四段功能區域：Modules I 和 IGF (insulin-like growth factor) 結合位具有高度相似性，而 CCN2 對於 insulin-like factor 有較低的親合性 (Vorwerk et al., 2002)。

Modules II 是 von Williebrand factor type C (VWC)重覆的 module，對於寡聚作用非常重要。Modules III 是 thrombospondin type 1 的重覆區域，在細胞黏著上扮演重要角色，其中的胺基酸側鏈為 CCN1 與 integrin 的結合位。Modules IV 是含有 CT 的 C 端區域，而 CCN5 缺乏 CT 區域，CT 對於 von Williebrand factor type C 進行初期 oligomerization 是非常重要的(Bork, 1993)。

而 CCN 蛋白的二段 N-terminal modules (Modules I 和 II)與二段 C-terminal

modules (Modules III 和 IV)之間以可變的胺基酸序列連結(Desnoyers, 2004) , CCN 蛋白透過 modulation 和細胞外因子(Extracellular factors)進行獨特的交互作用。CCN 家族可被生長因子(Growth factor)、細胞激素(Cytokines)或細胞壓力(Cellular stress)所誘發。CCN 可整合調控 integrins、BMPs、VEGF、Wnts 和 Notch 的訊息傳遞。

CCN 家族中各 protein 均有不同的功能，以下便一一介紹：

(一)、 CCN1 蛋白參與發育、血管新生和細胞黏著

CCN1 已被發現參與脊椎動物數種生理過程，較重要的包含細胞移行(cell migration)、血管新生(angiogenesis)、細胞黏著(cell adhesion)和細胞凋亡(apoptosis)。CCN1 藉由和細胞表面的 integrins(包含 $\alpha6\beta1$ 、 $\alpha v\beta5$ 、 $\alpha v\beta3$ 、 $\alpha M\beta2$)調控這些生理過程(Desnoyers, 2004)。在內皮細胞中，CCN1 透過 integrins 調節黏著和移行(Babic et al., 1999; Leu et al., 2004)。而在肌肉細胞裡，CCN1 和 integrin $\alpha6\beta1$ 及硫酸乙醯肝素蛋白多醣(Heparan sulfate proteoglycans, HSPGs) 相互作用，藉此調節細胞黏著和移行(Leu et al., 2004)。當有急性傷口存在時，CCN1 和 CCN2 會受到生長因子的 up-regulated 而刺激纖維母細胞附著。CCN1 和 CCN2 已被證實可以經由 $\alpha6\beta1$ 及 HSPGs 訊息傳遞調控纖維母細胞黏附(Chen et al., 2001)。

(二)、 CCN2 在發育、細胞黏著和細胞移行扮演調節角色

CCN2 最常表現在內皮、平滑肌和軟骨細胞中(Ihn, 2002)，當老鼠缺乏 *Ccn2* 後，其纖維母細胞在 pro-adhesive, pro-inflammatory, pro-angiogenic 基因的表現上均有缺陷(Kennedy et al., 2007)。 *Ccn2* knockout 老鼠在一出生時即死亡，這是因為肺臟發育不全和胸椎發育缺失造成呼吸道衰竭(Baguma-Nibasheka and Kablar, 2008)。這些老鼠均有骨骼肌變形(Skeletal dysmorphisms)、降低細胞外基質的組成(Extracellular matrix components)、減少軟骨細胞的增生(Chondrocyte proliferation)的生理特徵(Katsube et al., 2009)。

(三)、 CCN3 蛋白參與骨骼肌、心臟發育和細胞黏著

在哺乳動物裡，CCN3 和 CCN1、CCN2 扮演很類似的角色，CCN3 表現在許多的組織中，例如：肌肉、軟骨、骨頭和神經，並且調控其發育(Katsuki et al., 2008)。Ccn3 mutant 老鼠具有骨骼和心臟不正常的表現，例如：心肌症(Cardiomypathy), 肌肉萎縮症(Muscle atrophy) (Heath et al., 2008)。在人類臍靜脈內皮細胞裡，CCN3 經由 integrin $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、HSPGs 促使細胞黏著，而調節細胞移行只透過 integrins $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha 5\beta 1$ (Lin et al., 2003)。此外，CCN3 可被 hematopoietic progenitor cells 分泌至人類的血清裡，和血液中的 fibulin-1 形成複合物(Thibout et al., 2003)。在間葉細胞幹細胞分化過程中，CCN3 是很重要的分泌性胞外蛋白，調控骨頭、軟骨的形成和 progenitor cells 的分化、生長和成熟(Katsuki et al., 2008)。

(四)、 CCN4 蛋白抑制 Wnt 訊息路徑

CCN4 在發育的間葉細胞(Mesenchymal)、前成骨細胞(Preosteoblastic)和軟骨細胞(Cartilage cells)中會表現(French et al., 2004)。此外 CCN4 truncated form 一直被認為具有骨骼成長和骨頭修復的重要調節功能(Yanagita et al., 2007)。CCN4 會藉由抑制 Wnt/ β -catenin 中的 c-Myc 訊息傳導路徑而抑制凋亡(Su et al., 2002; You et al., 2002)。

(五)、 CCN5 蛋白抑制細胞生長和能動性

CCN5 幾乎在所有發育中的老鼠和人類胚胎中都有表現，它具有多樣、組織專一性的調控功能 (Gray et al., 2007; Jones et al., 2007)。CCN5 在血管平滑肌(Vascular smooth muscle)裡是 heparin induced gene，具有抗增生(Anti-proliferative)特性(Lake et al., 2003)。Heparin 結合到血管平滑肌表面的接受器上，可增加 CCN5 的表現量、抑制細胞的生長和能動性，但是對於細胞的黏著和凋亡無明顯的影響(Lake et al., 2003)。CCN5 的 overexpression 藉由降低基質金屬蛋白酶(Matrix metalloproteinase-2,

MMP-2)量而減少平滑肌細胞的能動性；相反的，當細胞能動性和 MMP2 量增加時，CCN5 表現減少(Lake and Castellot, 2003)。

(六)、 CCN6 蛋白在骨骼肌肉發育和疾病所扮演的角色

Ccn6 基因的突變和人類的疾病相關，例如：進行性假性類風濕發育不良症 (Progressive pseudorheumatoid dysplasia, PD) 和自體隱性骨肌疾病 (Autosomal recessive skeletal disorder)，其中 PD 會造成軟骨流失及破壞骨頭(Hurvitz et al., 1999)。但是和人類相反，在老鼠的骨頭生長和恆定的過程中，CCN6 並非是最主要的參與者(Kutz et al., 2005)。

四、 CCN3 對骨骼形成之影響

CCN 家族為具有 cysteine 的分泌蛋白，同時有高度保留性多樣結構，且調控發育、胚胎生長、分化和骨頭再塑過程，此外在腫瘤發展也具關鍵角色(Brigstock, 1999)。雖然 NOV/CCN3 在調控軟骨新生的機轉尚未明確，但已有研究指出，在許多組織的分化上均有 NOV/CCN3 的高度表現：(1)在肌母細胞(myoblasts)發育成肌管(myotubes)的過程中，可觀察到 NOV/CCN3 的高度表現。(2)在哺乳類動物的發育中，NOV/CCN3 調控許多組織，例如：神經系統、腎臟、肌肉，特別是軟骨。其中在雞胚胎發育過程裡，NOV/CCN3 的表現量是增加(Su et al., 2002)。(3)從發育期間的雞胚胎分離出間葉細胞，發現其含有大量的 NOV/CCN3 和 type II collagen (為 chondrocyte marker) (Perbal B et al., 2001)。(4) 在 Wilms' tumor 和軟骨瘤，NOV/CCN3 和軟骨分化有密切關連(Yu et al., 2003)。

綜合上列所述，可得知 NOV/CCN3 對於軟骨的分化是正向調控。但是 NOV/CCN3 是否能有助於骨骼的形成作用、加強成骨合成的機制，目前尚未得知。

五、 Activator protein-1; AP-1

多種的雙體組成 Fos, Jun 和 ATF 家族蛋白，這些蛋白再組合成轉錄因子 AP-1(Jochum et al., 2000; Shaulian and Karin, 2002)，AP-1 complex 形成有 Jun-Jun 組成的 homodimer 和 Jun-Fos 組成的 heterodimer，但是以 Jun-Fos 組成的 heterodimer 對 DNA 親和性較高，有一些 CREB 和 ATF 家族蛋白也會參與在 AP-1 複合物中。AP-1 將轉換細胞外訊息，並藉由和 AP-1 啟動子或加強子位置結合，將改變特定基因的表現。AP-1 的表現可因為和其他轉錄因子交互作用、或是受上游激酶調控而影響其活性。

已知 AP-1 參與在許多的生理過程中，包括：細胞分化、增生、凋亡和致癌基因轉變等。在胚胎發育中，Fos 和 Jun 蛋白可被分成兩類：一為 c-Fos、FosB、Jun D，其扮演的地位不是非常重要；另一為 c-Jun、Jun B、Fra-1，對於胚胎發育是必須的。胚胎發育和器官發展的過程中，AP-1 蛋白有其特殊的功能(Table. 3)。

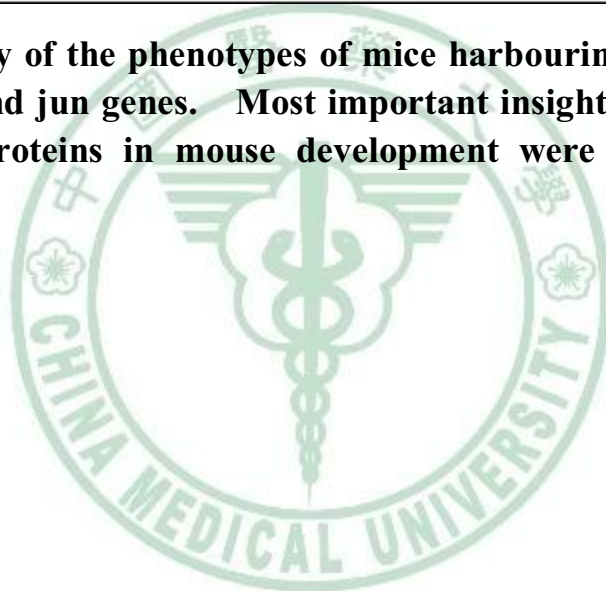
六、 AP-1 對骨骼形成之影響

骨骼的生長和維持均依賴成骨細胞和噬骨細胞，也有研究指出 AP-1 的組成(主要是 Fos 家族)對於這兩種細胞均有影響。

在成骨細胞內，AP-1 的活性可被 TGF- β 、PTH、1,25-dihydroxy vitamin D 所誘發(Karsenty and Wagner, 2002)，其均為成骨細胞分化增生的調控者。在成骨細胞成熟期間，Fos 和 Jun 蛋白被高度表現，然而在細胞外基質產生和礦化期間，表現量隨之降低，緊接著 Fra-2 和 Jun D 成為最主要的表現者。在之前的研究也已發現 c-Fos, Fra-1 等組成若是過度表現，均會造成軟骨或骨頭型態產生變化 (Table. 3)。

| Knockout | | Phenotypes | Affected organs and cell types |
|-----------|------------------|---------------------------------|---|
| c-Fos | | osteopetrosis | bone, osteoclasts |
| FosB | | nurturing defect | brain, hypothalamus |
| Fra-1 | | embryonic lethality (E9.5) | extra-embryonic tissue, placenta |
| Fra-2 | | lethal at birth (unpublished) | |
| c-Jun | | embryonic lethality (E12.5) | liver, hepatoblasts and heart outflow tract |
| JunB | | embryonic lethality (EB-10) | extra-embryonic tissue, placenta |
| JunD | | male sterility | testis, spermatogenesis |
| Transgene | Promoters | Phenotypes | Affected organs and cell types |
| c-Fos | H2k ^b | osteosarcoma | bone, osteoblasts |
| FosB | H2k ^b | none | |
| ΔFosB | TCRβ | impaired T cell differentiation | thymus, immature thymocytes |
| | NSE | osteosclerosis | bone, osteoblasts |
| Fra-1 | H2k ^b | osteosclerosis | bone, osteoblasts |
| Fra-2 | CMV | ocular malformations | eye, anterior eye structures |
| c-Jun | H2k ^b | none | |
| JunB | ubiquitin C | none | |
| | CD4 | enhanced Th2 maturation | thymus / CD4 thymocytes |
| JunD | not reported | | |

Table. 3 A summary of the phenotypes of mice harbouring genetic modifications of the different fos and jun genes. Most important insights regarding the specific functions of AP-1 proteins in mouse development were obtained from loss of function experiments.



參、 材料與方法

一、 實驗材料

(一) 實驗儀器:

1. 細胞培養箱(Incubator)
2. 可見光/紫外光分光光度計(UV/Visible spectrophotomer DU-800, Beckman Coulter, USA)
3. 多功能分光光度計(Multi-spectrophotometer)
4. 即時聚合酶連鎖反應器(Applied Biosystems)

(二) 實驗細胞株(Cell line):

1. 老鼠造骨細胞株(mouse osteoblastic cell line; MC3T3-E1)
2. 類造骨細胞株(osteoblast-like cell line ; MG-63)
(ATCC)

(三) 細胞培養(Cell Culture):

1. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
2. α -minimal essential medium (α -MEM)
3. Fetal bovine serum, penicillin/streptomycin (P/S)
4. 細胞培養皿
(Gibco Inc, NY, EUSA)

(四) 即時聚合酶連鎖反應 (Real-time Polymerase Chain Reaction ;

Real-time PCR):

1. TRIzol
2. DEPC
3. RNA 轉 cDNA 系統
(Invitrogen, CA,USA)

4. Isopropanol, Chloroform
(J.T Baker, NJ, USA)
5. SYBR Green mix
(Biotech)
6. Oligo dt
7. GAPDH primer
8. BMP-4 SYBR Green Gene probe
(MDBio Inc, Taiwan)

(五) 西方點墨法 (Western blotting) :

1. Acrylamide
2. BCATM protein assay kit
(Pierce, IL, USA)
3. 0.5 Tris buffer
4. 1.5 Tris bufer
5. PMSF
6. Na₃VO₄
7. Aprotinin
8. NaF
9. Tween20
10. Glycine
11. Tetramethylethylenediamine (TEMED)
(Amresco Inc, Ohio, USA)
12. Ammonium Persulfate (APS)
13. PVDF (Immobilon-p)
(Millipore, MA, USA)
14. ECL, Western blot Develop& replenisher, Fix& replenisher,
BioMax light Film

(Kodak Inc, NY, USA)

(六) 抗體 (Antibody) :

1. p-JNK, p-p38
(Cell signal, MA, USA)
2. JNK, p38, β -actin, ILK, p-Gsk3 β , Gsk3 β , BMP4, anti-mouse, anti-rabbit, c-jun 等抗體
(Santa cruz Biotechnology Inc, CA, USA)
3. α 5 β 1, α v β 3, α v β 5 等抗體
(Millipore, CA, USA)。

(七) 細胞轉染法 (Cell transfection) :

1. Lipofectamine 2000
(Invitrogen)
2. DN-JNK
(由 Dr. M. Karin, University of California, San Diego, CA 提供)
3. DN-p38
(由 Dr. J. Han, South-western Medical Center, Dallas, TX 提供)
4. ILK siRNA
5. FAK siRNA
6. c-Jun siRNA
(Santa cruz Biotechnology Inc, CA, USA)
7. AP-1 oligonucleotide
8. AP-1 oligonucleotide scramble
(MDBio Inc.)

(八) 人類 BMP-4 免疫分析法 (Human BMP-4 Immunoassay):

1. 人類 BMP-4 免疫分析 Kit
(R&D Systems)

(九) 染色質免疫沉澱技術 (Chromatin Immunoprecipitation Technique, ChIP):

1. EZ ChIP™
(Millipore, CA, USA)
2. Gel/PCR DNA Isolation system
(Viogene, CA, USA)

(十) 細胞存活率測定方法 (MTT assay, 3- (4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide):

1. 3- (4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)
(Sigma-Aldrich, CA, USA)

(十一) 細胞移行實驗 (Cell migration assay):

1. Transwell
(Costar, NY ; pore size, 8- μ m)

(十二) 礦化 (Mineralization):

1. Vitamin C
2. β -glycophosphate
3. Ailzarin red stain
4. Cetylpyridinium chloride
(Sigma-Aldrich, CA,USA)

(十三) 免疫螢光染色 (Immunofluorescence):

1. c-Jun 一級抗體
2. rabbit 二級抗體

(Santa cruz Biotechnology Inc, CA, USA)

(十四) 其他藥品 (Others):

1. CCN3
2. Actinomycin D
3. Cycloheximide
4. KP392
5. SP600125
6. SB203580
7. Curcumin、Tanshinone IIA
8. DMSO

(Sigma-Aldrich, CA, USA)。



二、實驗方法

(一) 細胞培養 (Cell culture):

老鼠造骨細胞株(mouse osteoblastic cell line; MC3T3-E1)、類造骨細胞(MG-63)，分別培養在 α -MEM 及 DMEM 培養液中。先將 α -MEM 和 DMEM 分別加入 2.2 和 3.7 克的碳酸氫鈉(Sodium bicarbonate)，並以 1N 鹽酸(HCL) 將 pH 調整至 7.4，再以 0.22 μ m 過濾器(filter)過濾。爾後加入 10 %胎牛血清(fetal bovine serum)、100 μ g/ml 盤尼西林/鏈黴素(P/S)。MC3T3-E1 和 MG-63 細胞培養在培養箱(incubator)裡，其環境為 37°C，5% CO₂，約 2~3 天繼代培養一次。

細胞分盤，首先將培養皿中細胞培養液吸出，加入 10 毫升的 phosphate buffered saline (PBS) (0.02 % KH₂PO₄、0.02 %KCl、0.8 % NaCl、0.216 % EDTA)緩衝液沖洗二次，再加入 1 毫升 trypsin (含 0.05% trypsin、0.02% EDTA)，能幫助細胞脫離培

養皿底部。置於 37°C 作用 2~3 分鐘，使細胞脫離培養皿，如尚未完全脫離，可用手輕拍培養皿邊緣，以幫助細胞脫落。細胞脫落後，以 10 毫升含血清的細胞培養液，將細胞懸浮液移至 15 毫升離心管中，於常溫離心 1500 rpm、5 分鐘，將上清液除去。再加入適量細胞培養液，待均勻混合後，以 2×10^6 顆細胞/10 公分培養皿為培養密度種入培養皿中。

(二) 細胞轉染 (Cell transfection):

利用 Lipofectamine 2000 (Lipo-2000) 轉染法，各組分別取適量之 DNA 質體 (總質體量約為 1 μ g/well) 於 1.5 ml 離心管中，加入 99 μ l 之 serum 培養液。另外準備各組含有 2 μ l/well 的 Lipo-2000 於 98 μ l 之 serum-free 培養液中，靜置 5 分鐘。將兩者分別含有質體培養液和含有 Lipo-2000 培養液，均勻混合並靜置 30 分鐘，另一方面將 well 上的原有培養液吸去，加入 800 μ l serum-free 培養液後再加入 200 μ l 之 Lipo-2000/DNA，再於 37°C 培養箱培養 24 小時。

(三) 西方點墨法 (Western blotting):

西方點墨法的原理為利用抗原抗體免疫反應方法，應用於偵測某種特別的蛋白質。樣本混合物先經過 polyacrylamide 電泳分離，然後轉印到硝酸纖維膜上，接著以標記的抗體結合。

造骨細胞經過 37°C 培養箱培養後，抽掉培養液，以 PBS 清洗兩次後抽掉，加入 RIPA buffer 120 μ l 將細胞溶解，放冰上 30 分鐘。以刮勺取下移置於 1.5 ml 微量試管中，以 13200 rpm 離心 4°C 15 分鐘後，將細胞離心後取上清液，且移置於 1.5 ml 微量試管中。取 10 μ l 檢測蛋白質含量，測量蛋白濃度，再以分光光度計測定波長 570 nm 數值，經由蛋白標準液濃度換算樣本蛋白質之濃度。以 30 μ g 等量蛋白質加入 5 倍 sample buffer，以電動乾浴槽加熱 5 分鐘，注入 10% SDS-PAGE 中分離蛋白質(120 voltage 的電壓進行電泳 1 小時)。分離完將膠體取起與轉印

(Polyvinylidene fluoride membrane ; PVDF membrane)齊放，接著於轉置槽中注滿 Transfer buffer 後將電流以 4°C 400 毫安培轉印 2 小時。轉印紙置入含 5 % 脫脂奶粉之 TBS-T 配成的 Blocking buffer 15 ml 於室溫搖晃 1 小時。再與 TBS-T 稀釋之一級抗體 10 ml 於 4°C 搖晃 1 小時或一天後，換成 TBS-T 清洗 4 次，每次 15 分鐘。

接下來再與 TBS-T 稀釋之二級抗體 10 ml 於室溫中搖晃 1 小時，接著同樣以 TBS-T 洗 4 次之後，加入 Enhanced chemiluminescence (ECL)顯像，以感光底片感光至 Band 出現。

(四) 即時聚合酶連鎖反應(Real-time polymerase Chain Reaction; Real-time PCR):

SYBR Green 系統原理為 SYBR Green 螢光染劑會結合到 DNA 雙股螺旋的 minor groove 上，而未結合上的染劑則有非常微弱的螢光，並且螢光會隨著 DNA 結合量增加而變強。當染劑開始鑲嵌在放大的基因片段時，螢光值訊號也會相對的提高，若產物的濃度高則可在較低 cycle 數時偵測到螢光值；相對的，若基因濃度較低，即會在較高 cycle 數時才能偵測到螢光值，利用這樣的觀念便可以用來做 DNA 的定量。

將 6 孔培養皿中加入 500 μ l 的 TRIzol，待細胞完全溶解，吸至 1.5 ml 微量離心管中靜置 5 分鐘。再加入 100 μ l 氯仿(chloroform)劇烈振盪 1 分鐘，之後在室溫下靜置 3 分鐘。將微量離心管在 4°C、13,200 rpm 離心 15 分鐘，此時將上清液吸至新的 1.5 ml 離心管，再加入等量的 isopropanol 並溫和的混合靜置 10 分鐘。接著在 4°C、11,000 rpm 離心 10 分鐘，此時可看見 RNA pellet 沉澱在微量離心管底部，上清液倒掉並加入 1ml 的 75 % 過濾酒精，再以 4°C、7,500 rpm 離心 5 分鐘。最後倒掉酒精，將微量離心管在室溫下風乾，再加入 10-30 μ l DEPC 水回溶 RNA，儲存於 -80°C 冰箱。將萃取出來的 RNA pellet 取 1 μ l 加上 99 μ l 的 DEPC 水後，利用 Beckman DU-800 UV/Visible spectrophotometer 測量 RNA 濃度，並注意 A260/280 在 1.8~2.0 之間，確保 RNA 的純度及品質。

使用 MMLV 將 RNA 轉成 cDNA，步驟如下：

- (1)在微量離心管內加入 1 μ l oligo dT、1 μ l 10 mM Dntp、1 μ g RNA，加入 DEPC 水至 20 μ l，混合後放入 PCR 機器 65°C 5 分鐘，使 RNA denature 後再以 4°C 1 分鐘。
- (2)加入 4 μ l 5X First-strand buffer 和 2 μ l 0.1M DTT 放入 PCR 機器 37°C 2 分鐘。
- (3)最後加入 1 μ l MMLV，放入 PCR 機器 37°C 50 分鐘，70°C 15 分鐘，即為 cDNA。

將轉置完成的 cDNA 取 1 μ l，SYBR Green mix 取 5 μ l，primer (F)及 primer (R) 各取 0.5 μ l，接著以 DEPC 水加至 20 μ l。將樣本放置 Applied Biosystem StepOne 進行 10 分鐘 95°C、10 秒鐘 95°C、1 分鐘 60°C、15 秒 95°C、1 分鐘 60°C 共 45 個循環，所得到之相對值，便為我們所求與控制組相差倍數。

Primer 序列如下

MC3T3-E1 (Mouse) :

Mouse BMP-4 (F) : GGTGTGGATGCCGCTGAG

Mouse BMP-4 (R) : GGTATGTGTAGGTGGTTGAATGG

Mouse GAPDH (F) : CCACCCAGA AGACTGTGGAT

Mouse GAPDH (R) : CACATTGGGGGTAGGAACAC

MG-63 (Human) :

Human BMP-4 (F) : AGCATGTCAGGATTAGCCGA

Human BMP-4 (R) : TGGAGATGGCACTCAGTTCA

Human GAPDH (F) : TGAACGGGAGCTCACTGG

Human GAPDH (R) : TCCACCACCCTGTTGCTGTA

(五) 人類 BMP-4 免疫分析法 (Human BMP-4 Immunoassay):

BMP-4 immunoassay 實驗方法以購入試劑，於實驗前將所有需要加入的試劑先稀釋完畢。將經過 CCN3 處理的培養皿取出後，吸取上清液備用，首先取出 96

孔盤，分別加入 100 μ l 的 assay diluent RD1-61 至每個 well，接著加入 50 μ l 的 standard 和 samples，然後在室溫下培養 2 小時。加入 400 μ l 的 wash buffer 清洗四次，最後將 wash buffer 完全吸乾，再加入 200 μ l conjugate，室溫下置放 2 小時且避光。依照上述清洗的步驟四次，最後一次完全吸乾，加入 200 μ l substrate solution，在室溫下避光放置 30 分鐘後，加入 50 μ l 的 stop solution 終止反應。在 30 分鐘內以 540 或 570 nm 吸光值讀取，將得到之數值換算成 pg。

(六) 細胞質免疫沉澱技術 (Chromatin Immunoprecipitation Technique ;

CHIP):

將經過 CCN3 處理後的 MC3T3-E1 細胞取出，加入 54 μ l 的 formaldehyde 後在室溫下作用 10 分鐘，之後加入 54 μ l 的 glycine 抑制 formaldehyde 作用，室溫下作用 5 分鐘後放在冰上。接著抽乾 medium 後，再以 PBS 清洗二次，最後一次吸乾 PBS 加入 SDS Lysis buffer 作用。將細胞刮取下來進行超音波震盪，爾後以 13200 rpm 離心 10 分鐘，取出上清液，分別取 50 μ l 當做 input、另取 150 μ l 加入 30 μ l protein A/G 和 20 μ l 的 c-jun 作用一天。

將進行 IP 後的樣品以 13200 rpm 離心 1 分鐘，依序加入 Low salt、High salt、LiCl salt 和 TE，分別均勻搖晃後以 13200 rpm 離心 1 分鐘。最終將 TE Buffer 吸乾，加入 Elution buffer 100 μ l 室溫 15 分鐘，以 13200 rpm 離心 1 分鐘後收集上清液，此步驟重覆 2 次，共得 200 μ l。

把 Input 和 Ip 樣品同時加入 5M NaCl 8 μ l，65 $^{\circ}$ C 加熱 4 小時；接著加入 1 μ l RNase A 在 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 mins；最後加入 4 μ l 0.5 M EDTA，8 μ l 1M Tris-HCl，1 μ l protease K 在 45 $^{\circ}$ C 加熱 1~2 小時。

接著加入 0.5 ml GP buffer 和 44.4 μ l 的 isopropanol 混合均勻，再放上 GPTM column 到 tube 上，加入樣品後以 13200 rpm 離心 1 分鐘再去除廢液、加入 0.5 ml Wn buffer 和 Ws buffer 後分別以 13200 rpm 離心 1 分鐘後去除廢液。把 column 放到新

的 tube 上，加入 20 μ l 的 Elution buffer，放置 2~3 分鐘後以 13200 rpm 離心 1 分鐘。

把 Elute 出來的 DNA 進行 PCR，PCR 條件為 DNA 7 μ l、BMP-4 primer 1 μ l、dNTP 0.4 μ l、MgCl₂ 1.5 μ l、10x buffer 2 μ l、Taq 1 μ l，加水至 20 μ l。之後配置 2 % DNA 膠，跑電泳 100V 30 分鐘，再以 UV 燈照射，將實驗結果以照相系統拍下。

BMP-4 序列為：

BMP-4 primer (F) : CTGCTCACAGCCTGTTTCAA

BMP-4 primer (R) : TGGGCTTCCCTGAGTTTAGA

(七) 礦化 (Mineralization):

將細胞種植約 7 分滿，約 2~3 天更換培養液及分化劑(β -glycophosphate 10 mM 及 Vitamin C 50 μ g/ml)，同時給予不同的 CCN3 濃度刺激。約十天左右，將細胞以 PBS 清洗、福馬林固定 15 分鐘、PBS 清洗，以 Alizarin red stain 進行染色超過 1 小時以上，再用滅菌水清洗未染上的 Alizarin red。將最後的細胞呈色結果以照相系統拍照，再使用 10% cetylpyridinium chloride 溶下 Alizarin red，以 550 nm 吸光值進行測量。

(八) 細胞存活率測定方法 (MTT assay):

原理是利用細胞株中活細胞粒線體內脫氫酵素(Dehydrogenase)可將 (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT) 之 tetrazolium 還原切斷，而形成藍色沉澱物 formazone。而死亡的細胞是不具有脫氫酵素，亦不能形成藍色沉澱物 formazone。最後在加入 DMSO 溶出藍色沉澱物 formazone，最後以 ELISA reader 540 nm 測量吸光值，即可以得知細胞存活率。

將細胞分盤至 96 孔盤中，每一孔洞的細胞數約為 5000 顆，待細胞貼好後，吸掉原有的培養液，加入 serum-free 培養液。分別加入不同濃度藥物培養 48 小時後，加入 MTT 30 分鐘、吸掉培養液，每一孔洞加入 100 μ l DMSO，最後以 ELISA reader 570

nm測量吸光值，即可以得知細胞內的蛋白含量。吸光值之計量方式:生長百分比計算出不同濃度之藥物抑制生長情形。

(九) 細胞移行實驗 (Migration assay) :

細胞移行實驗需以 transwell (Costar, NY ; pore size, 8- μ m) 24 孔盤為材料，大約種植 2×10^4 的細胞量。在 200 μ l serum-free 培養液置於 transwell 的上層，在下層加入不同濃度的 CCN3 及 300 μ l serum-free 培養液，放到 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養 24 小時。再以福馬林固定 15 分鐘並用 0.05% crystal violet 染色 15 分鐘。上層的細胞以棉棒去除，再用 PBS 清洗，細胞會移行到膜的下層吸附，再以顯微鏡計數細胞總量，將計得之量進行統計分析。

(十) 免疫螢光染色 (Immunofluorescence):

將 12mm 的玻璃片放在 24 盤裡，在上層種植 MC3T3-E1 細胞，再以不同時間點給予 CCN3，或是先給抑制劑刺激 30 分鐘，再給 CCN3，經過 24 小時之後以 PBS 清洗。在室溫下以福馬林固定 15 分鐘後，使用 PBS 清洗二次，再給 Triton-x100 0.25 % 5 分鐘後，以 PBS 清洗三次；加入 c-Jun 一級抗體作用一小時後，以 PBS 清洗三次；給予二級抗體避光一小時後，以 PBS 清洗三次。最後在載玻片上滴上一滴 mount solution 蓋上玻片，再使用指甲油封片，並使用雷射掃描共軛焦顯微鏡技術(Laser Scanning Confocal Microscopy)進行偵測。

(十一) 統計分析:

本實驗結果以 Sigma plot 統計軟體進行分析，實驗結果以成對 t 檢定(paired *t-test*)計算分析。數據結果以 mean \pm S.E. 表示各項數值。

肆、 結果

一、CCN3 增加造骨細胞的礦化而非細胞增生和移行

BMP-4 在骨骼上扮演著誘發骨生成的角色，可藉由促進造骨細胞的增生、移行、礦化而填補蝕骨細胞造成的空洞。因此，我們想瞭解 CCN3 的刺激是否會促使成骨細胞的功能提升，我們利用 MTT assay 分析 MC3T3-E1 造骨細胞株內的增生表現。由實驗中發現，經由 CCN3 不同濃度(0, 3, 10, 30, 100 ng/ml)刺激，細胞增生情況並無明顯增加(Fig. 6A)。

接下來我們欲確定成骨細胞是否會藉由移行聚集，而加強成骨作用，因此利用 Migration assay 分析 MC3T3-E1 造骨細胞株移行情況。由實驗中發現，在給予不同濃度的 CCN3 (0, 3, 10, 30, 100 ng/ml)刺激，移行情況並無明顯增加(Fig. 6B)。

然而成骨細胞在進行造骨作用時，必須經由礦化才能促使骨頭硬化，因此給予不同濃度 CCN3 (0, 3, 10, 30, 100 ng/ml)和 differentiation agent (β -glycophosphate 10 mM 和 Vitamin C 50 μ g/ml)的刺激，利用 Alzarin red 染色進行分析。由實驗結果得知，在 CCN3 30 ng/ml 的濃度下，mineralization 最具明顯，且達顯著性差異 ($p<0.05$)(Fig. 6C)。

二、CCN3 增加 BMP-4 的表現

根據之前研究得知，在軟骨細胞中 CCN 蛋白家族確是能促進 BMP 蛋白的產生。因此我們想瞭解造骨細胞內 BMP 蛋白是否會受到 CCN3 的刺激而表現。首先，使用 Real-time PCR 分析 MC3T3-E1 造骨細胞株，由實驗中發現，在給予相同濃度的 CCN3 之下，BMP-4 mRNA 有明顯表現，且達顯著性差異($p<0.05$)，但對於 BMP-2 和 BMP-7 並無影響(Fig. 7A)。更進一步再給予不同濃度的 CCN3，偵測其 BMP-4 mRNA 的表現量。由實驗結果得知，在 CCN3 30 ng/ml 刺激下，BMP-4 mRNA expression 最明顯，且達顯著性差異($p<0.05$) (Fig. 7B)。接著以 Western blot 分析 BMP-4 蛋白表現，由實驗結果可知，在 12 小時之後有磷酸化量明顯增加(Fig. 7C)。

三、轉錄作用抑制劑和轉譯抑制劑可降低 CCN3 所誘發的 BMP-4 表現

為了得知 BMP-4 基因的表現，是否經由重新轉錄和轉譯步驟，於是我們給予轉錄和轉譯抑制劑：actinomycin D 和 cyclohexamide。

利用 Real-time PCR 分析 MC3T3-E1 細胞的 BMP-4 表現量變化，在給予 CCN3 30 ng/ml 之前，以 actinomycin D (10 nM) 和 cyclohexamide (10 μ M) 先刺激 30 分鐘。實驗中只給予 CCN3 的造骨細胞，其 BMP-4 表現量明顯加強，但是給抑制劑後，兩組 BMP-4 基因表現量明顯被抑制，且達顯著性差異 ($P < 0.05$) (Fig. 8)。以上結果均代表造骨細胞受 CCN3 刺激，需要重新進行轉錄和轉譯作用才能夠使 BMP-4 基因生成。

四、 $\alpha 5\beta 1$ 和 $\alpha v\beta 5$ integrin 抗體參與在 CCN3 所引起的 BMP-4 表現

由之前的研究得知，CCN3 經由 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 及 $\alpha v\beta 5$ 等 integrin 可促使細胞黏著和調節細胞移行作用 (Lin et al., 2003)。因此，我們想知道 CCN3 是透過何種 integrin 的傳遞，促使下游訊息產生，最後造成 BMP-4 基因的增加。首先給予 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 及 $\alpha v\beta 5$ 抗體 30 分鐘進行中和作用，接著再予以 CCN3，經過 24 小時後抽取 RNA，觀其 mRNA 表現量。由實驗結果得知， $\alpha 5\beta 1$ 和 $\alpha v\beta 5$ 抑制 BMP-4 基因表現量，也就是說，CCN3 透過此兩種 integrin 進行訊息的調控，且達顯著性差異 ($p < 0.05$) (Fig. 9)。

五、ILK 參與在 CCN3 的訊息傳導路徑中

之前的文獻得知，ILK 和細胞內的生成、轉移和活化有極大關係 (Tseng et al., 2010)，因此我們想知道在 MC3T3-E1 細胞株內，ILK 是否會受到 CCN3 刺激而被活化。首先，我們必須確定成骨細胞在受到 CCN3 刺激後，ILK 參與在活化 BMP-4 基因的路徑上。因此我們轉染 ILK siRNA 及給予 ILK 抑制劑 KP392 (3 μ M)，由實驗結果得知，兩組 BMP-4 基因表現量明顯被抑制，且達顯著差異 ($P < 0.05$) (Fig.

10A)。接著以 Western blot 分析，轉染 ILK siRNA 後的成骨細胞，ILK 的蛋白明顯降低(Fig. 10A)。

接著我們進一步研究 ILK 受體 p-GSK-3 β 是否有磷酸化情形出現，結果發現在 10 分鐘後，ILK Kinase activity 增加(Fig. 10B)。

六、p38 和 JNK 參與 CCN3 的訊息傳導路徑中

p38 和 JNK 均屬於 MAPKs 家族之一，其中 p38 參與在許多的發炎反應、細胞生長和存活。之前的研究得知 p38 在成骨細胞的分化中，扮演極重要的角色，而 JNK 被證實在成骨細胞分化晚期中佔有重要地位(Hu et al., 2003; Matsuguchi et al., 2009)。

故我們使用 Real-time PCR 進行分析。當分別給予 SB203580 (10 μ M)和 SP600125 (10 μ M) 30 分鐘後再以 CCN3 刺激，可發現其 BMP-4 基因表現量大幅降低；若是分別轉染 p38-DN 和 JNK-DN，其 BMP-4 基因表現量明顯被減少，且達顯著差異($p < 0.05$)(Fig. 11A & 11B)。

接著以 Western blot 進行分析，由實驗結果得知，p-p38 和 p-JNK 在 10 分鐘左右磷酸化現象出現，且 p38 和 JNK 在各時間點均無磷酸化現象，代表造骨細胞受 CCN3 刺激後，細胞內的 p38 和 JNK 活性會增加，但量不會增加(Fig. 11C & 11D)。

為了證明 ILK 和 p38、JNK 的上下游關係，我們先將細胞以 KP392 處理 30 分鐘，之後再給予 CCN3。由實驗結果得知，p-p38 和 p-JNK 的磷酸化表現量減少，但是 p38 和 JNK 表現無任何改變，證實 ILK 位於 p38 和 JNK 上游(Fig. 11E)。

七、AP-1 參與在 CCN3 的訊息傳導路徑中

AP-1 為轉錄因子，主要參與在細胞分化、增生，其由多種的雙體組成，例如：Fos, Jun 和 ATF 家族蛋白(Jochum et al., 2000; Shaulian and Karin, 2002)。而在之前

的研究更點出，在成骨細胞成熟期間，Fos 和 Jun 蛋白會被高度表現(Jochum et al., 2001)。因此為了得知 AP1 是否為成骨細胞受 CCN3 刺激後，主要的基因調控者，我們使用了 AP1 抑制劑 Curcumin (10 μ M)和 Tanshinone IIA (3 mM)。由 Real-time PCR 實驗結果得知，給予抑制劑後，BMP4 基因表現量大幅降低，且達顯著性差異 ($p<0.05$)(Fig. 12A)。

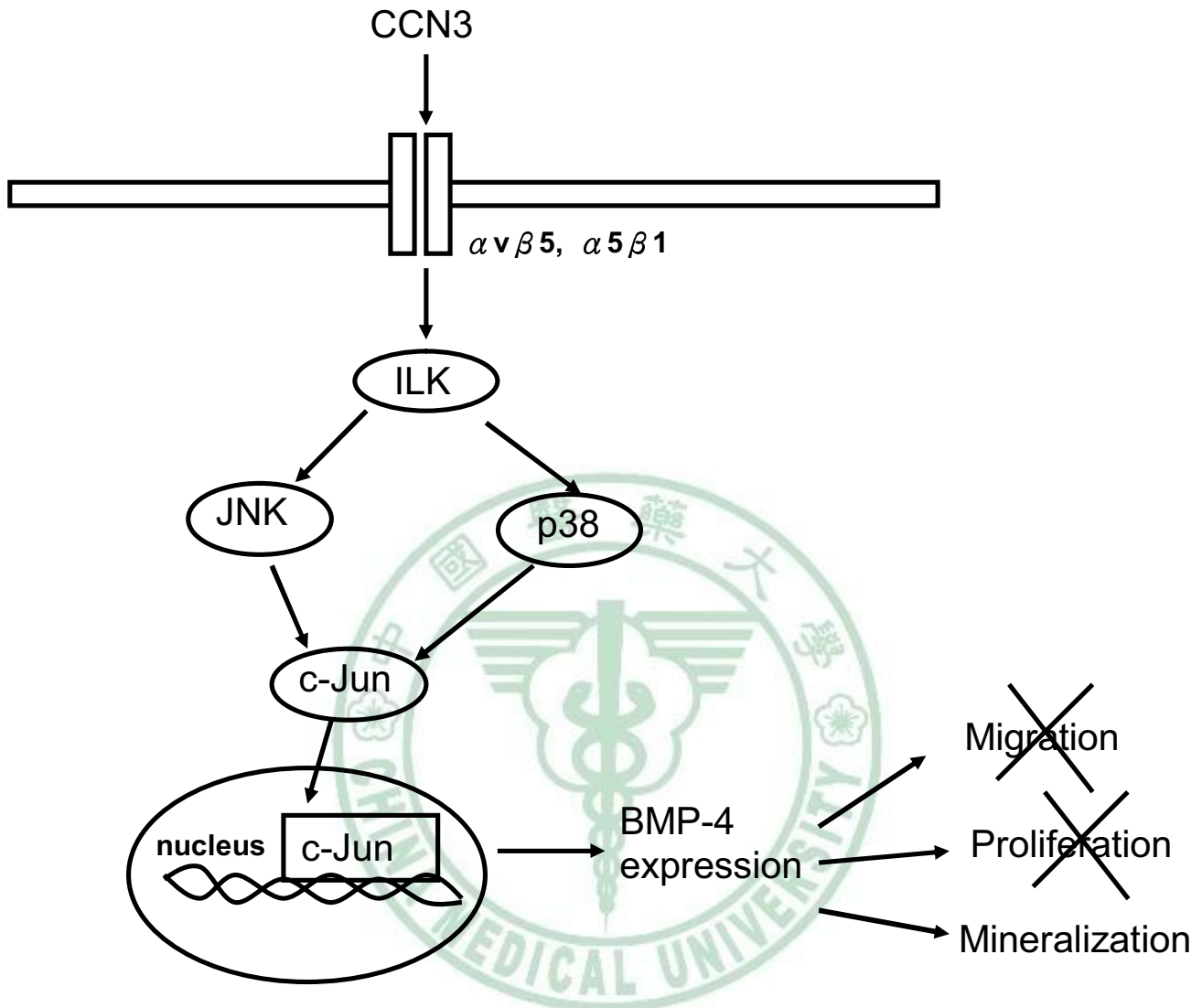
為了更進一步證實此項推論，使用 AP-1 oligonucleotide 轉染成骨細胞，由於 AP-1 oligonucleotide 為 AP-1 結合位的競爭型寡核苷酸，若 AP-1 參與在傳導路徑上，其 BMP-4 基因表現量應是會降低。由 Fig. 12B 觀察得知，比起 scramble 控制組，轉染 AP-1 oligonucleotide 的 MC3T3-E1 細胞，BMP-4 基因表現量確實是明顯下降，且達顯著性差異($p<0.05$)。

八、CCN3 增加 c-Jun 轉位進入細胞核

細胞受到刺激後，會活化許多蛋白使 c-Jun 進入核內與 AP-1 結合，促使細胞增加 BMP-4 基因表現量，進而加強造骨功能。我們分別轉染 c-Jun siRNA 至 MC3T3-E1 細胞株內，觀察 Real-time PCR 和 Western blot 結果。由實驗圖表得知，轉染 c-Jun siRNA 的 BMP-4 基因和蛋白表現量，比起只由 CCN3 刺激組來得低，且達顯著性差異($p<0.05$)(Fig. 13A)。接著我們以 Western blot 分析 c-Jun 蛋白，發現在 10 分鐘後，其磷酸化表現明顯增加(Fig. 13B)。

再者，利用免疫螢光染色法偵測細胞質中的 c-Jun 蛋白，是否會在 CCN3 刺激之下進入細胞核內，啟動下游基因進行轉錄和轉譯。於是由實驗結果可看出，細胞受到 CCN3 刺激 60 分鐘後即會由細胞質轉位入細胞核(Fig. 13C)；若是給予上游抑制劑 SB203580、SP00125、Tanshinone IIA 和 Curcumin 後，c-Jun 轉位入細胞核的現象明顯被降低(Fig. 13D)。

伍、 結論



綜合以上本篇所完成的實驗可知，當在老鼠成骨細胞中給予 CCN3，可以藉由活化 ILK, p38, JNK 蛋白，促使轉錄因子 c-Jun 作用，使得 BMP-4 的表現量增加。且 BMP-4 的表現量提高，可讓成骨細胞的礦化程度提升，但是對於細胞的移行和增生能力並無明顯效果。

陸、 討論

根據之前的研究得知，CCN 蛋白中最常探討的即為 CCN1 和 CCN2。包含探討 CCN1 在人類軟骨瘤中，透過 $\alpha\beta3$ / FAK/ ERK/ AP-1 路徑，造成細胞移行的機制(Tan et al., 2009); CCN2 在成骨細胞中促使骨頭生長機制 (Smerdel-Ramoya et al., 2010); 以及 CCN2 透過 Smad 路徑，使得軟骨細胞增生(Smerdel-Ramoya et al., 2008)。然而 CCN3 所被探討的主題大多為在腫瘤細胞中所扮演的角色，例如：在骨癌中 CCN3 所佔的調控角色(Perbal et al., 2008); 在肌肉骨骼(Musculoskeletal)腫瘤中，探討 CCN3 基因的表現量(Manara et al., 2002)。

和 CCN2 相比，CCN3 是否會造成骨骼增生或分化較少被提出研究。然而 CCN 蛋白均具有非常類似的結構，且 CCN3 已被證實可調控肌肉、軟骨、骨頭和神經的發育(Katsuki et al., 2008)。倘若缺少 CCN3 基因，會使骨骼和心臟的發展受阻(Heath et al., 2008)，以上述的實驗報告為基石，CCN3 與成骨細胞造骨功能之間的關係，是值得更進一步研究。由本篇實驗結果證明，CCN3 確實是藉由多種蛋白的訊息傳遞、轉錄因子 AP-1 調控、骨形成蛋白(BMP-4)基因表現，而增強老鼠造骨細胞(MC3T3-E1)的礦化。

骨再塑作用主要受到噬骨細胞和成骨細胞的相互調控而成，當噬骨細胞吸收鈣離子，使得成骨細胞活化，其中參與成骨細胞分化及作用的蛋白非常多，例如：BMPs、OPN、ALP 和 OC。上述所提，即以 BMPs 家族最知名，BMP-2、BMP-4 和 BMP-7 最具促骨生成作用。Lau 等人(2009)使用老鼠顱蓋骨當樣本，給予 BMP-4 的刺激，使得下游 core-binding factor alpha-1 (Cbfa-1) 和 ALP 的基因表現量大幅增加，造成細胞增生和分化。此文獻的結果雖與本研究中的 BMP-4 造成骨頭礦化增強不盡相同，但是卻能瞭解 BMP-4 確實可以增強造骨細胞的功能。基於此文獻實驗樣本為老鼠顱骨，和本實驗的造骨細胞(MC3T3-E1)不同，因此造成實驗上的結果有所差異(Lau et al., 2009)。

加強成骨細胞的造骨作用的方法有二：一為增加成骨細胞的數目、二為提升

成骨細胞的 function。此二種方法可分別使用 MTT assay 偵測細胞的生成 (proliferation) 速率，以及測量成骨細胞的礦化程度。由於礦化為骨頭硬度最主要的因素，礦化程度愈高，代表造骨功能愈佳。再者，成骨細胞必須聚集一起才可進行造骨作用，關於這一點，我們可使用細胞移行 (Migration assay) 觀察。根據之前的文獻顯示，CCN2 藉由調控 BMP-2，提高軟骨細胞增生 (proliferation) 和分化 (differentiation) 程度 (Maeda et al., 2009)。

然而 CCN3 對於成骨細胞 proliferation、differentiation 和 mineralization 影響的報告卻是極少。Bleau AM 等人 (2007) 曾提出在神經膠質瘤細胞中，CCN3 會抑制其 proliferation；另外 Benini S 等人 (2005) 證實在 Ewing's tumors 中，CCN3 同樣會抑制細胞的 proliferation。根據本篇實驗發現，在老鼠成骨細胞中，CCN3 對於 proliferation 和 migration 同樣無明顯的影響。至於在礦化方面，目前仍未有文獻可證實，但是依本篇的實驗結果可知，CCN3 促進礦化的形成確是有幫助。

Tang 等人 (2003) 的研究指出，BMP 可從 organic 骨頭基質中分離出來，此外還可促使軟骨重新合成 (de novo) 和骨頭的形成。本實驗給予轉錄、轉譯抑制劑，發現 BMP-4 mRNA 表現量減少，也就說明 BMP-4 蛋白必須經由 de novo 路徑重新合成，而非進行 salvage (回收) 路徑。為了更進一步確認此假設，利用西方點墨法發現在 12 小時之後 BMP-4 蛋白才以 mature form 被分泌，在 24 小時左右磷酸化表現達到最多，種種結果證實本項實驗和 Tang 等人提出的理論不謀而合。

根據已知的文獻，CCN3 會藉由 $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha \nu\beta 3$ 及 $\alpha 5\beta 1$ 調控下游基因 (Lin et al., 2003)。因此我們使用 $\alpha \nu\beta 3$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 及 $\alpha \nu\beta 5$ 中和抗體，發現以 $\alpha 5\beta 1$ 和 $\alpha \nu\beta 5$ 處理過的成骨細胞，其 BMP-4 mRNA 基因表現下降，也就說明本實驗中，CCN3 透過它們進行調控。

Tseng 等人的文獻可知，在低氧的環境下，ILK 參與成骨細胞分泌 BMP 的路徑中，雖然探討的路徑和本實驗並不相同，可以確定的是 ILK 會參與在成骨細胞的活化中。在實驗結果中發現，處理 KP2392 和轉染 ILK-siRNA 後，BMP-4 mRNA

表現量減少了，這說明 ILK 有可能參與在路徑中。於是我們深入探討 ILK 的受體 GSK3 β ，發現其 Kinase activity 增加，證實 ILK 參與其中。

目前有關 CCN3 的研究大多著重對於腫瘤的影響，至於是否促進骨骼成骨作用的研究較少探討，本篇實驗可初步瞭解 CCN3 不只對腫瘤的移行和分化有關，也可增加造骨細胞的礦化。再者，骨質疏鬆症已成為對成人極具影響的流行病，尋找延遲骨鬆的相關機制及治療藥物，已是當前最重要的研究方向之一。相信本研究以此機制，可讓骨質疏鬆研究者對於 CCN3 及骨形成蛋白作用有更深入的認識。



柒、 參考文獻

- Asou, Y., Rittling, S.R., Yoshitake, H., Tsuji, K., Shinomiya, K., Nifuji, A., Denhardt, D.T., and Noda, M. (2001). Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. *Endocrinology* 142, 1325-1332.
- Babic, A.M., Chen, C.C., and Lau, L.F. (1999). Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Mol Cell Biol* 19, 2958-2966.
- Baguma-Nibasheka, M., and Kablar, B. (2008). Pulmonary hypoplasia in the connective tissue growth factor (Ctgf) null mouse. *Dev Dyn* 237, 485-493.
- Barber, L., Prince, H.M., Rossi, R., and Bertoncello, I. (1999). Fluoro-Gold: An alternative viability stain for multicolor flow cytometric analysis. *Cytometry* 36, 349-354.
- Bork, P. (1993). The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett* 327, 125-130.
- Brigstock, D.R. (1999). The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr Rev* 20, 189-206.
- Chambers, A.F., Behrend, E.I., Wilson, S.M., and Denhardt, D.T. (1992). Induction of expression of osteopontin (OPN; secreted phosphoprotein) in metastatic, ras-transformed NIH 3T3 cells. *Anticancer Res* 12, 43-47.
- Chang, P.L., and Prince, C.W. (1993). 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- induced tumorigenic transformation and osteopontin expression in mouse JB6 epidermal cells. *Cancer Res* 53, 2217-2220.
- Chen, C.C., Chen, N., and Lau, L.F. (2001). The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 276, 10443-10452.
- Chen, C.C., and Lau, L.F. (2009). Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 771-783.
- Denhardt, D.T., Noda, M., O'Regan, A.W., Pavlin, D., and Berman, J.S. (2001). Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 107, 1055-1061.
- Desnoyers, L. (2004). Structural basis and therapeutic implication of the interaction of CCN proteins with glycoconjugates. *Curr Pharm Des* 10, 3913-3928.
- Ducy, P., Schinke, T., and Karsenty, G. (2000). The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289, 1501-1504.

- Fatayerji, D., Mawer, E.B., and Eastell, R. (2000). The role of insulin-like growth factor I in age-related changes in calcium homeostasis in men. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 4657-4662.
- Gori, F., Hofbauer, L.C., Dunstan, C.R., Spelsberg, T.C., Khosla, S., and Riggs, B.L. (2000). The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* 141, 4768-4776.
- Gray, M.R., Malmquist, J.A., Sullivan, M., Blea, M., and Castellot, J.J., Jr. (2007). CCN5 Expression in mammals. II. Adult rodent tissues. *J Cell Commun Signal* 1, 145-158.
- Harada, S., and Rodan, G.A. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423, 349-355.
- Heath, E., Tahri, D., Andermarcher, E., Schofield, P., Fleming, S., and Boulter, C.A. (2008). Abnormal skeletal and cardiac development, cardiomyopathy, muscle atrophy and cataracts in mice with a targeted disruption of the *Nov* (*Ccn3*) gene. *BMC Dev Biol* 8, 18.
- Hogan, B.L. (1996). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10, 1580-1594.
- Hu, Y., Chan, E., Wang, S.X., and Li, B. (2003). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for osteoblast differentiation. *Endocrinology* 144, 2068-2074.
- Hurvitz, J.R., Suwairi, W.M., Van Hul, W., El-Shanti, H., Superti-Furga, A., Roudier, J., Holderbaum, D., Pauli, R.M., Herd, J.K., Van Hul, E.V., *et al.* (1999). Mutations in the CCN gene family member WISP3 cause progressive pseudorheumatoid dysplasia. *Nat Genet* 23, 94-98.
- Jochum, W., David, J.P., Elliott, C., Wutz, A., Plenk, H., Jr., Matsuo, K., and Wagner, E.F. (2000). Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat Med* 6, 980-984.
- Jones, J.A., Gray, M.R., Oliveira, B.E., Koch, M., and Castellot, J.J., Jr. (2007). CCN5 expression in mammals : I. Embryonic and fetal tissues of mouse and human. *J Cell Commun Signal* 1, 127-143.
- Karsenty, G., and Wagner, E.F. (2002). Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2, 389-406.
- Katsube, K., Sakamoto, K., Tamamura, Y., and Yamaguchi, A. (2009). Role of CCN, a vertebrate specific gene family, in development. *Dev Growth Differ* 51, 55-67.
- Katsuki, Y., Sakamoto, K., Minamizato, T., Makino, H., Umezawa, A., Ikeda, M.A., Perbal, B., Amagasa, T., Yamaguchi, A., and Katsube, K. (2008). Inhibitory effect of CT domain of CCN3/NOV on proliferation and differentiation of

- osteogenic mesenchymal stem cells, Kusa-A1. *Biochem Biophys Res Commun* 368, 808-814.
- Kearns, A.E., and Kallmes, D.F. (2008). Osteoporosis primer for the vertebroplasty practitioner: expanding the focus beyond needles and cement. *AJNR Am J Neuroradiol* 29, 1816-1822.
- Kennedy, L., Liu, S., Shi-Wen, X., Chen, Y., Eastwood, M., Sabetkar, M., Carter, D.E., Lyons, K.M., Black, C.M., Abraham, D.J., *et al.* (2007). CCN2 is necessary for the function of mouse embryonic fibroblasts. *Exp Cell Res* 313, 952-964.
- Khosla, S. (2001). Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142, 5050-5055.
- Knothe Tate, M.L., Adamson, J.R., Tami, A.E., and Bauer, T.W. (2004). The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1-8.
- Kubota, T., Zhang, Q., Wrana, J.L., Ber, R., Aubin, J.E., Butler, W.T., and Sodek, J. (1989). Multiple forms of SppI (secreted phosphoprotein, osteopontin) synthesized by normal and transformed rat bone cell populations: regulation by TGF-beta. *Biochem Biophys Res Commun* 162, 1453-1459.
- Kutz, W.E., Gong, Y., and Warman, M.L. (2005). WISP3, the gene responsible for the human skeletal disease progressive pseudorheumatoid dysplasia, is not essential for skeletal function in mice. *Mol Cell Biol* 25, 414-421.
- Lake, A.C., Bialik, A., Walsh, K., and Castellot, J.J., Jr. (2003). CCN5 is a growth arrest-specific gene that regulates smooth muscle cell proliferation and motility. *Am J Pathol* 162, 219-231.
- Lake, A.C., and Castellot, J.J., Jr. (2003). CCN5 modulates the antiproliferative effect of heparin and regulates cell motility in vascular smooth muscle cells. *Cell Commun Signal* 1, 5.
- Lau, K.H., Gysin, R., Chen, S.T., Wergedal, J.E., Baylink, D.J., and Mohan, S. (2009). Marrow stromal cell-based cyclooxygenase 2 ex vivo gene-transfer strategy surprisingly lacks bone-regeneration effects and suppresses the bone-regeneration action of bone morphogenetic protein 4 in a mouse critical-sized calvarial defect model. *Calcif Tissue Int* 85, 356-367.
- Leu, S.J., Chen, N., Chen, C.C., Todorovic, V., Bai, T., Juric, V., Liu, Y., Yan, G., Lam, S.C., and Lau, L.F. (2004). Targeted mutagenesis of the angiogenic protein CCN1 (CYR61). Selective inactivation of integrin alpha6beta1-heparan sulfate proteoglycan coreceptor-mediated cellular functions. *J Biol Chem* 279, 44177-44187.
- Lin, C.G., Leu, S.J., Chen, N., Tebeau, C.M., Lin, S.X., Yeung, C.Y., and Lau, L.F. (2003). CCN3 (NOV) is a novel angiogenic regulator of the CCN protein family. *J Biol Chem* 278, 24200-24208.

- Luyten, F.P., Cunningham, N.S., Ma, S., Muthukumaran, N., Hammonds, R.G., Nevins, W.B., Woods, W.I., and Reddi, A.H. (1989). Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem* 264, 13377-13380.
- Mackie, E.J. (2003). Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 1301-1305.
- Maeda, A., Nishida, T., Aoyama, E., Kubota, S., Lyons, K.M., Kuboki, T., and Takigawa, M. (2009). CCN family 2/connective tissue growth factor modulates BMP signalling as a signal conductor, which action regulates the proliferation and differentiation of chondrocytes. *J Biochem* 145, 207-216.
- Maerevoet, M., Martin, C., and Duck, L. (2005). Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates. *N Engl J Med* 353, 99-102; discussion 199-102.
- Manara, M.C., Perbal, B., Benini, S., Strammiello, R., Cerisano, V., Perdichizzi, S., Serra, M., Astolfi, A., Bertoni, F., Alami, J., *et al.* (2002). The expression of *ccn3(nov)* gene in musculoskeletal tumors. *Am J Pathol* 160, 849-859.
- Manolagas, S.C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21, 115-137.
- Matsuguchi, T., Chiba, N., Bandow, K., Kakimoto, K., Masuda, A., and Ohnishi, T. (2009). JNK activity is essential for Atf4 expression and late-stage osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 24, 398-410.
- Perbal, B., Zuntini, M., Zambelli, D., Serra, M., Sciandra, M., Cantiani, L., Lucarelli, E., Picci, P., and Scotlandi, K. (2008). Prognostic value of CCN3 in osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 14, 701-709.
- Reinholt, F.P., Hulthenby, K., Oldberg, A., and Heinegard, D. (1990). Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4473-4475.
- Rodan, G.A., and Martin, T.J. (2000). Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289, 1508-1514.
- Rogers, A., and Eastell, R. (2005). Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 6323-6331.
- Salih, E., Ashkar, S., Gerstenfeld, L.C., and Glimcher, M.J. (1997). Identification of the phosphorylated sites of metabolically ³²P-labeled osteopontin from cultured chicken osteoblasts. *J Biol Chem* 272, 13966-13973.
- Salih, M.A., Ahmed, A.A., Sid Ahmed, H., and Olcen, P. (1995). An ELISA assay for the rapid diagnosis of acute bacterial meningitis. *Ann Trop Paediatr* 15, 273-278.

- Seeman, E. (2003). Invited Review: Pathogenesis of osteoporosis. *J Appl Physiol* 95, 2142-2151.
- Seeman, E., and Delmas, P.D. (2006). Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 354, 2250-2261.
- Shaulian, E., and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4, E131-136.
- Smerdel-Ramoya, A., Zanotti, S., and Canalis, E. (2010). Connective tissue growth factor (CTGF) transactivates nuclear factor of activated T-cells (NFAT) in cells of the osteoblastic lineage. *J Cell Biochem* 110, 477-483.
- Smerdel-Ramoya, A., Zanotti, S., Deregowski, V., and Canalis, E. (2008). Connective tissue growth factor enhances osteoblastogenesis in vitro. *J Biol Chem* 283, 22690-22699.
- Smith, J.H., and Denhardt, D.T. (1987). Molecular cloning of a tumor promoter-inducible mRNA found in JB6 mouse epidermal cells: induction is stable at high, but not at low, cell densities. *J Cell Biochem* 34, 13-22.
- Sorensen, E.S., Rasmussen, L.K., Moller, L., Jensen, P.H., Hojrup, P., and Petersen, T.E. (1994). Localization of transglutaminase-reactive glutamine residues in bovine osteopontin. *Biochem J* 304 (Pt 1), 13-16.
- Srivastava, S., Weitzmann, M.N., Kimble, R.B., Rizzo, M., Zahner, M., Milbrandt, J., Ross, F.P., and Pacifici, R. (1998). Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of Egr-1 and its interaction with Sp-1. *J Clin Invest* 102, 1850-1859.
- Su, F., Overholtzer, M., Besser, D., and Levine, A.J. (2002). WISP-1 attenuates p53-mediated apoptosis in response to DNA damage through activation of the Akt kinase. *Genes Dev* 16, 46-57.
- Swanson, G.J., Nomura, S., and Hogan, B.L. (1989). Distribution of expression of 2AR (osteopontin) in the embryonic mouse inner ear revealed by in situ hybridisation. *Hear Res* 41, 169-177.
- Tan, T.W., Yang, W.H., Lin, Y.T., Hsu, S.F., Li, T.M., Kao, S.T., Chen, W.C., Fong, Y.C., and Tang, C.H. (2009). Cyr61 increases migration and MMP-13 expression via α v β 3 integrin, FAK, ERK and AP-1-dependent pathway in human chondrosarcoma cells. *Carcinogenesis* 30, 258-268.
- Teitelbaum, S.L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504-1508.
- Thibout, H., Martinerie, C., Creminon, C., Godeau, F., Boudou, P., Le Bouc, Y., and Laurent, M. (2003). Characterization of human NOV in biological fluids: an enzyme immunoassay for the quantification of human NOV in sera from patients with diseases of the adrenal gland and of the nervous system. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 327-336.

- Tseng, W.P., Yang, S.N., Lai, C.H., and Tang, C.H. (2010). Hypoxia induces BMP-2 expression via ILK, Akt, mTOR, and HIF-1 pathways in osteoblasts. *J Cell Physiol* 223, 810-818.
- Vorwerk, P., Hohmann, B., Oh, Y., Rosenfeld, R.G., and Shymko, R.M. (2002). Binding properties of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3), IGFBP-3 N- and C-terminal fragments, and structurally related proteins mac25 and connective tissue growth factor measured using a biosensor. *Endocrinology* 143, 1677-1685.
- Xiao, Y.T., Xiang, L.X., and Shao, J.Z. (2007). Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 550-553.
- Yanagita, T., Kubota, S., Kawaki, H., Kawata, K., Kondo, S., Takano-Yamamoto, T., Tanaka, S., and Takigawa, M. (2007). Expression and physiological role of CCN4/Wnt-induced secreted protein 1 mRNA splicing variants in chondrocytes. *FEBS J* 274, 1655-1665.
- You, Z., Saims, D., Chen, S., Zhang, Z., Guttridge, D.C., Guan, K.L., MacDougald, O.A., Brown, A.M., Evan, G., Kitajewski, J., *et al.* (2002). Wnt signaling promotes oncogenic transformation by inhibiting c-Myc-induced apoptosis. *J Cell Biol* 157, 429-440.
- Yu, C., Le, A.T., Yeger, H., Perbal, B., and Alman, B.A. (2003). NOV (CCN3) regulation in the growth plate and CCN family member expression in cartilage neoplasia. *J Pathol* 201, 609-615.
- Zhao, M., Harris, S.E., Horn, D., Geng, Z., Nishimura, R., Mundy, G.R., and Chen, D. (2002). Bone morphogenetic protein receptor signaling is necessary for normal murine postnatal bone formation. *J Cell Biol* 157, 1049-1060.
- Zuo, G.W., Kohls, C.D., He, B.C., Chen, L., Zhang, W., Shi, Q., Zhang, B.Q., Kang, Q., Luo, J., Luo, X., *et al.* The CCN proteins: important signaling mediators in stem cell differentiation and tumorigenesis. *Histol Histopathol* 25, 795-806.

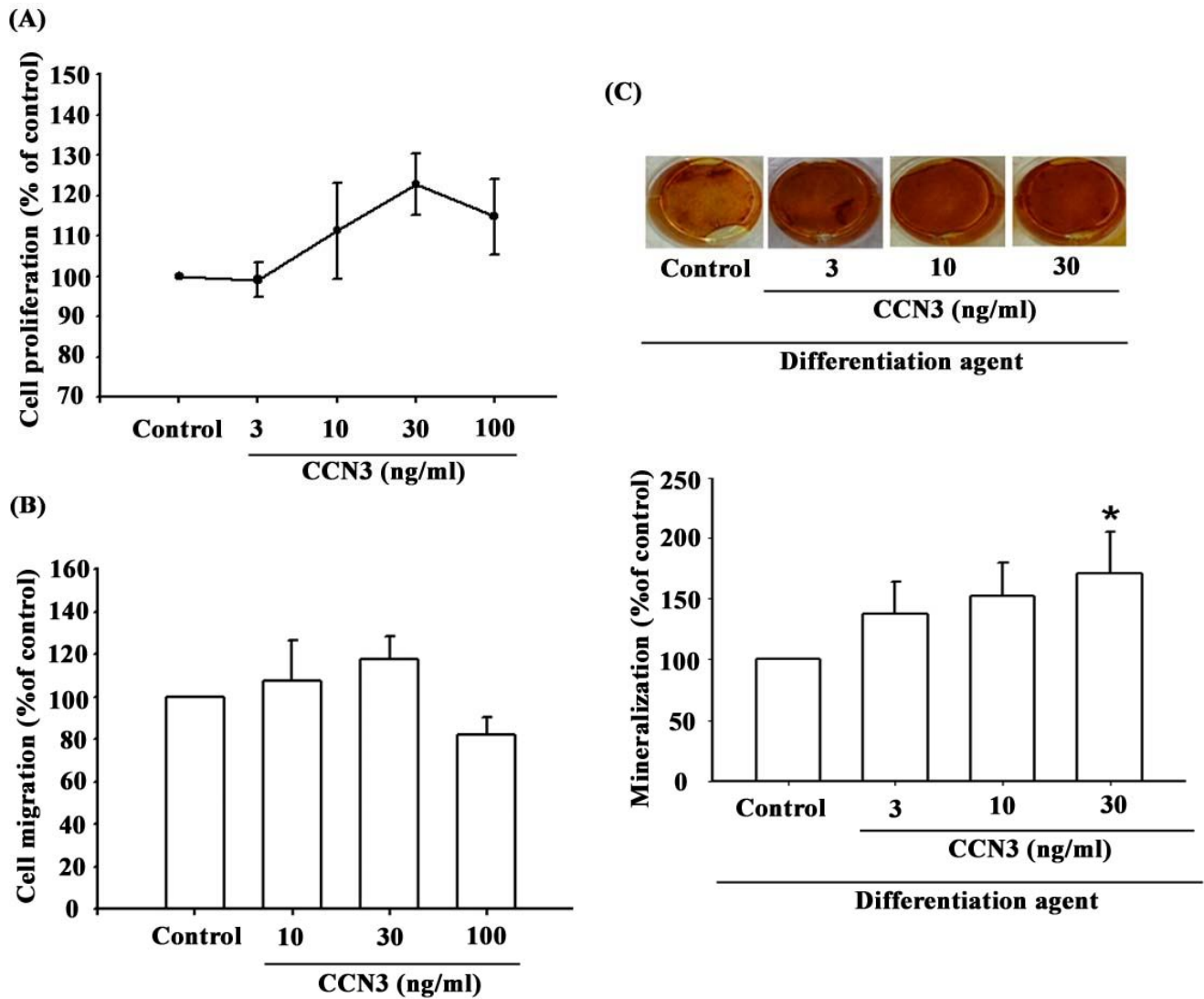


Fig. 6 CCN3 increased bone mineralization but not proliferation and migration.

(A) MC3T3-E1 cells were stimulated by indicated dose intervals (0, 3, 10, 30, 100 ng/ml) for 48 hr, and proliferation was determined by MTT assay. (B) MC3T3-E1 cells were stimulated by indicated dose intervals (0, 10, 30, 100 ng/ml) for 24 hr, and cell migration was determined by migration assay. (C) MC3T3-E1 cells were stimulated by indicated dose intervals (0, 3, 10, 30, 100 ng/ml) and differentiation agent (β -glycophosphate 10 mM and Vitamin C 50 μ g/ml) for 15 days, and bone cell mineralization was determined by Alizarin red stain. Results are expressed as the mean \pm S.E. * $p < 0.05$ compared with control. # $p < 0.05$ compared with CCN3-treated group.

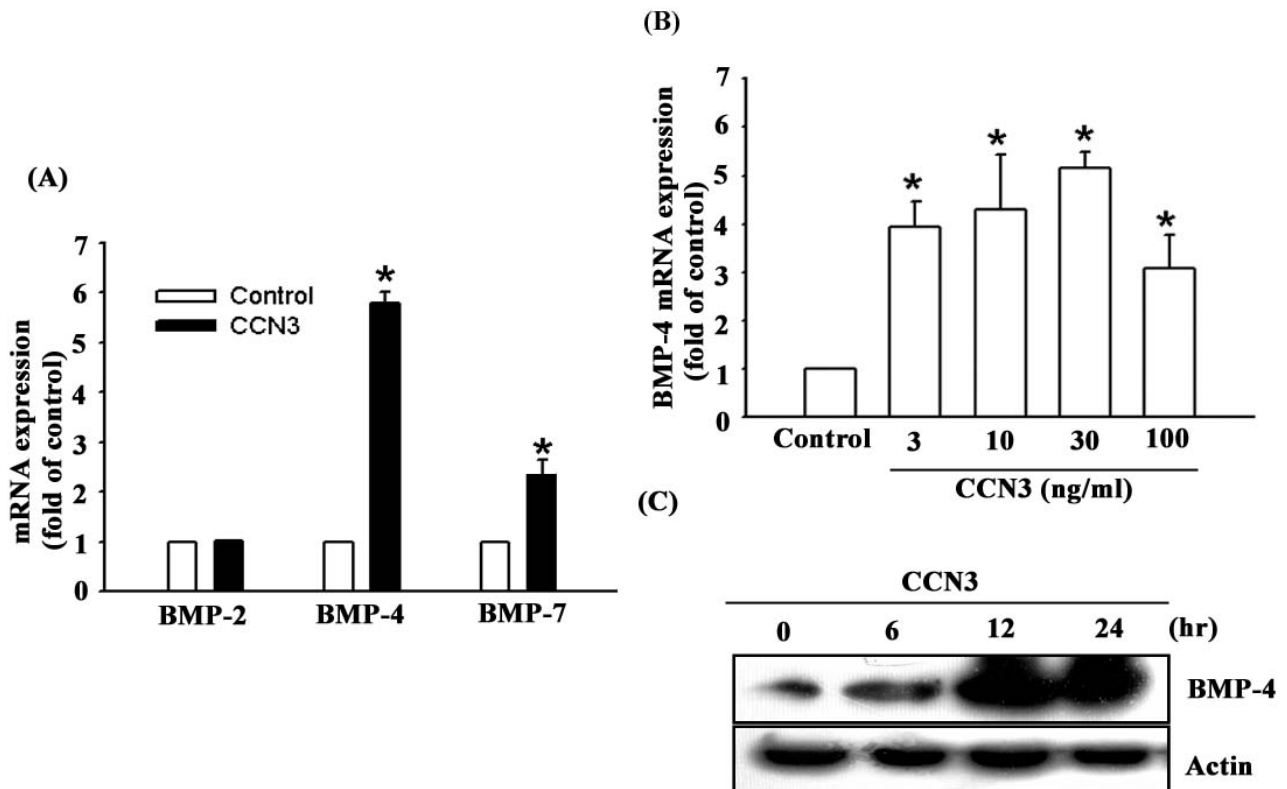


Fig. 7 CCN3 increased BMP-4 expression.

(A) MC3T3-E1 cells were treated with CCN3, and the BMP-4 mRNA expression was determined by qPCR. (B) MC3T3-E1 cells were treated with CCN3 for indicated dose intervals (0, 3, 10, 30, 100 ng/ml), and BMP-4 expression was examined by qPCR. (C) MC3T3-E1 cells were treated with CCN3 for indicated time intervals (0, 6, 12, 24 hr), and BMP-4 expression was determined by Western blot analysis. Results are expressed as the mean \pm S.E. * $p < 0.05$ compared with control.

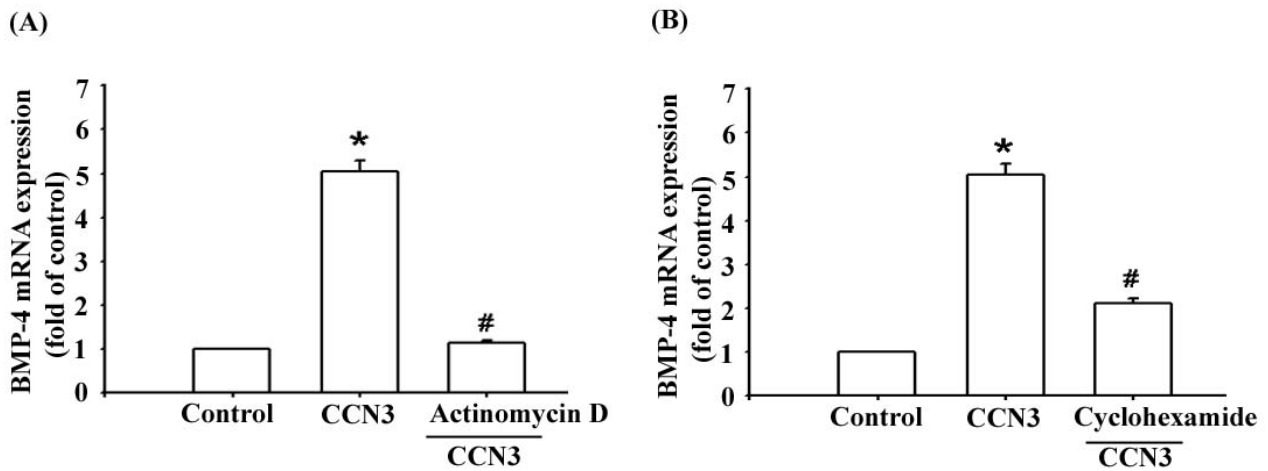


Fig. 8 Transcription inhibitor and translation inhibitor suppress CCN3 induced BMP-4 expression.

(A) MC3T3-E1 cells were pretreated with transcription inhibitor (actinomycin D 10nM) for 30 mins followed by stimulation of CCN3 (30 ng/ml). The BMP-4 mRNA expression was examined by qPCR. (B) MC3T3-E1 cells were pretreated with translation inhibitor (cyclohexamide 10 μ M) for 30 mins followed by stimulation of CCN3 (30 ng/ml). The BMP-4 mRNA expression were examined by qPCR. Results are expressed as the mean \pm S.E. * $p < 0.05$ compared with control. # $p < 0.05$ compared with CCN3-treated group.

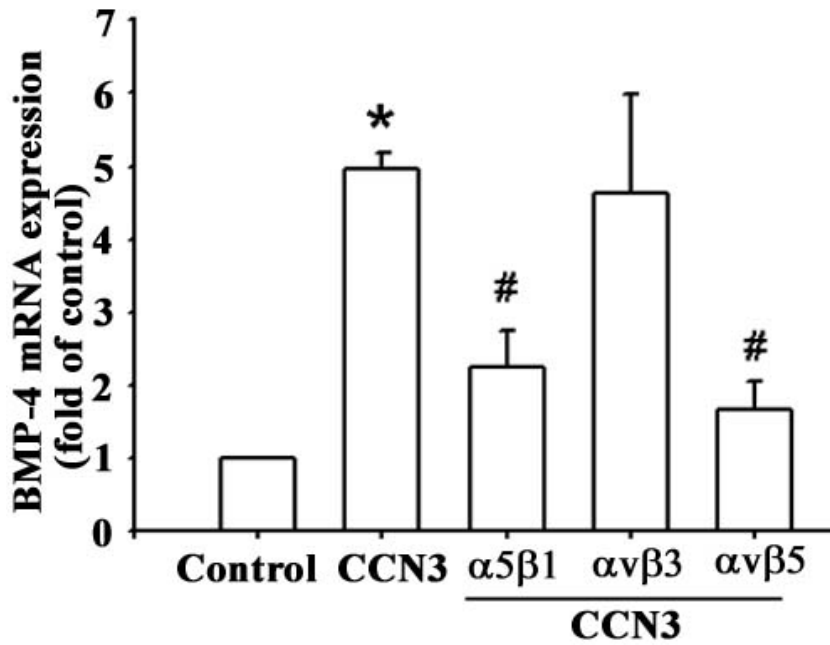


Fig. 9 $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 5$ integrin involved in CCN3-induced BMP-4 expression.

MC3T3-E1 cells were pretreated with $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ or $\alpha v\beta 5$ antibody for 30 mins followed by treating CCN3 (30 ng/ml), and BMP-4 expression was determined by qPCR. Results are expressed as the mean \pm S.E. * $p < 0.05$ compared with control. # $p < 0.05$ compared with CCN3-treated group.

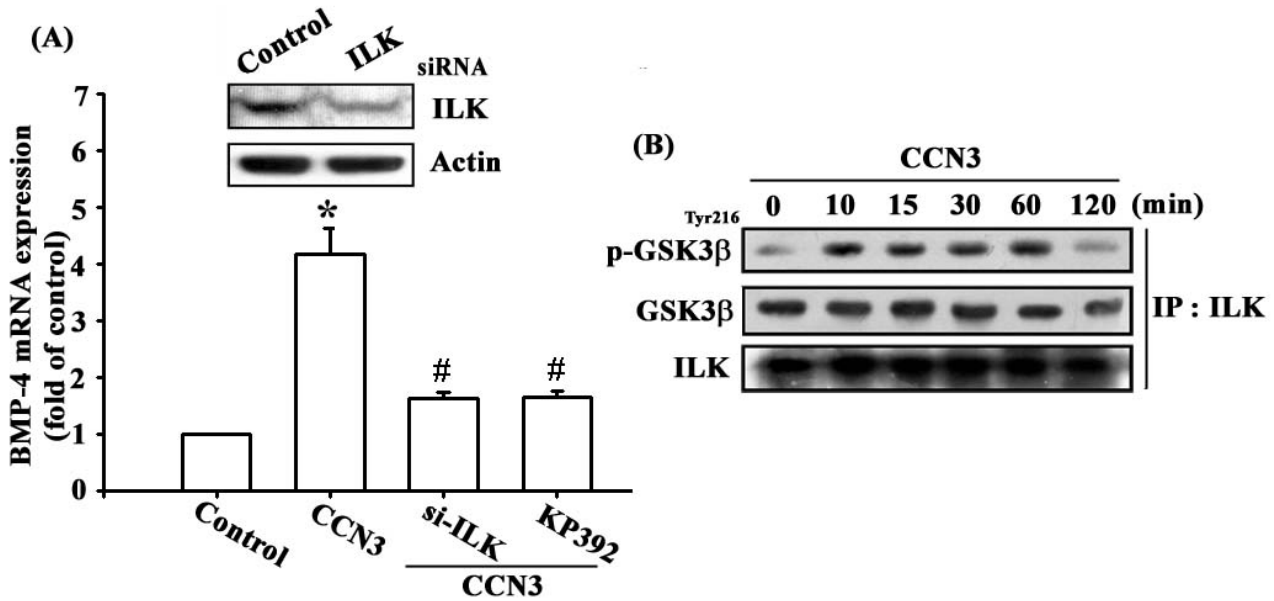


Fig. 10 Involvement ILK signaling pathway in CCN3-mediated BMP-4 expression.

(A) MC3T3-E1 cells were transfected with ILK siRNA or pretreated with KP392(3 μ M) for 30 mins followed by treating CCN3 (30 ng/ml). The mRNA expression of BMP-4 were determined by qPCR. Otherwise, cells were transfected with control of ILK siRNA for 24 h, the protein expression of ILK was examined by Western blot analysis. (B) MC3T3-E1 cells were treated with CCN3 (30 ng/ml) for indicated time intervals (0, 10, 15, 30, 60, 120 min), and cell lysates were immunoprecipitated(IP) with an antibody specific for ILK. Immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-pGSK3 β or GSK3 β . Results are expressed as the mean \pm S.E. * $p < 0.05$ compared with control. # $p < 0.05$ compared with CCN3-treated group.

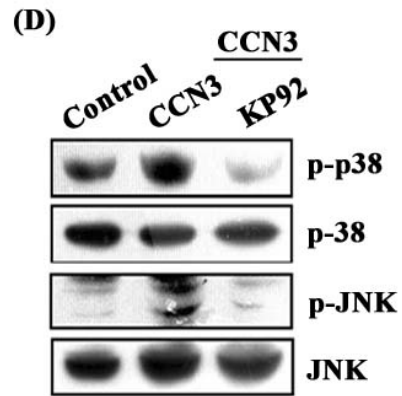
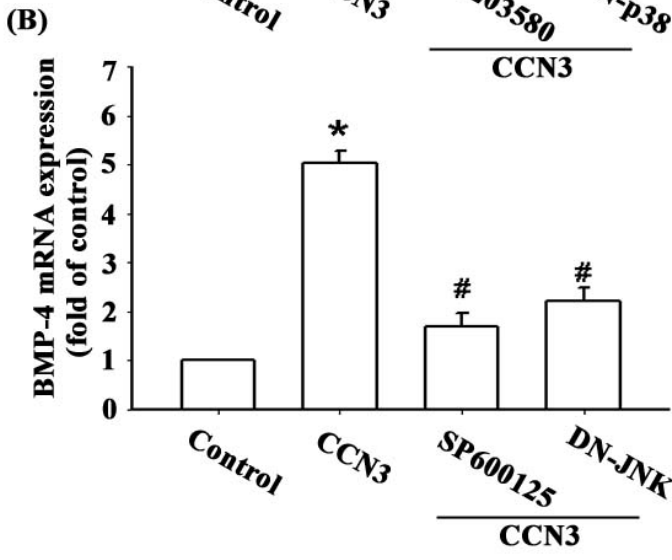
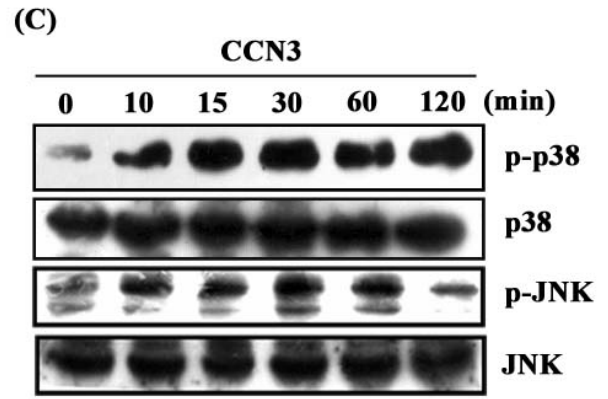
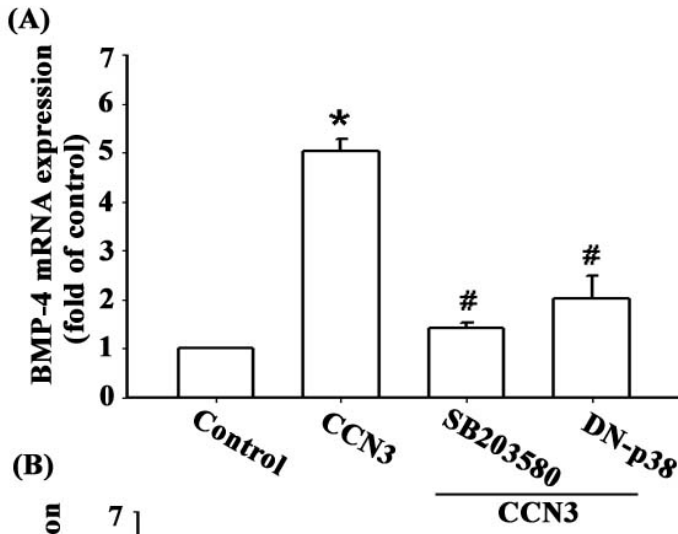


Fig. 11 Involvement p38 and JNK signaling pathway in response to CCN3 in osteoblasts.

(A) MC3T3-E1 cells were pretreated with P38 inhibitor (SB203580 10 μ M) and transfected with DN-P38 followed by treating CCN3 (30 ng/ml) and BMP-4 expression was determined by qPCR. (B) MC3T3-E1 cells were pretreated with JNK inhibitor (SP600125 10 μ M) and transfected with DN-JNK followed by treating CCN3 (30 ng/ml) and BMP-4 expression was determined by qPCR. (C) MC3T3-E1 cells were treated with CCN3 (30 ng/ml) for indicated time intervals (0, 10, 15, 30, 60, 120 min), p-P38 and p-JNK expression were determined by Western blot analysis. (D) MC3T3-E1 cells were pretreated with KP392 (3 μ M) for 30 mins followed stimulation with CCN3 (30 ng/ml) for 1h, and p-p38 and p-JNK expression was determined by Western blot analysis. Results are expressed as the mean \pm S.E. * $p < 0.05$ compared with control. # $p < 0.05$ compared with CCN3-treated group.



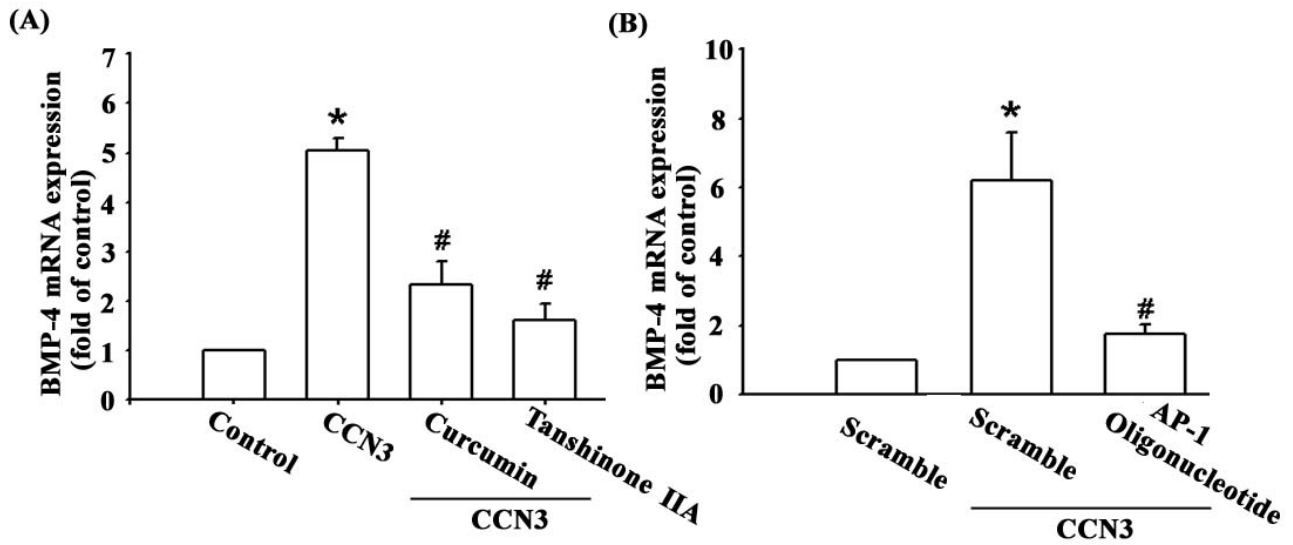


Fig. 12 CCN3 increased AP-1 activity in osteoblasts.

(A) MC3T3-E1 cells were pretreated with AP-1 inhibitor (Curcumin 10 μ M or Tanshinone IIA 3 μ M) for 30 mins followed by treating with CCN3 (30 ng/ml) and BMP-4 expression were determined by qPCR. (B) MC3T3-E1 cells were transfected with scramble or AP-1 oligonucleotide for 24 hr and BMP-4 expression were determined by qPCR. Results are expressed as the mean \pm S.E. * $p < 0.05$ compared with control. # $p < 0.05$ compared with CCN3-treated group.

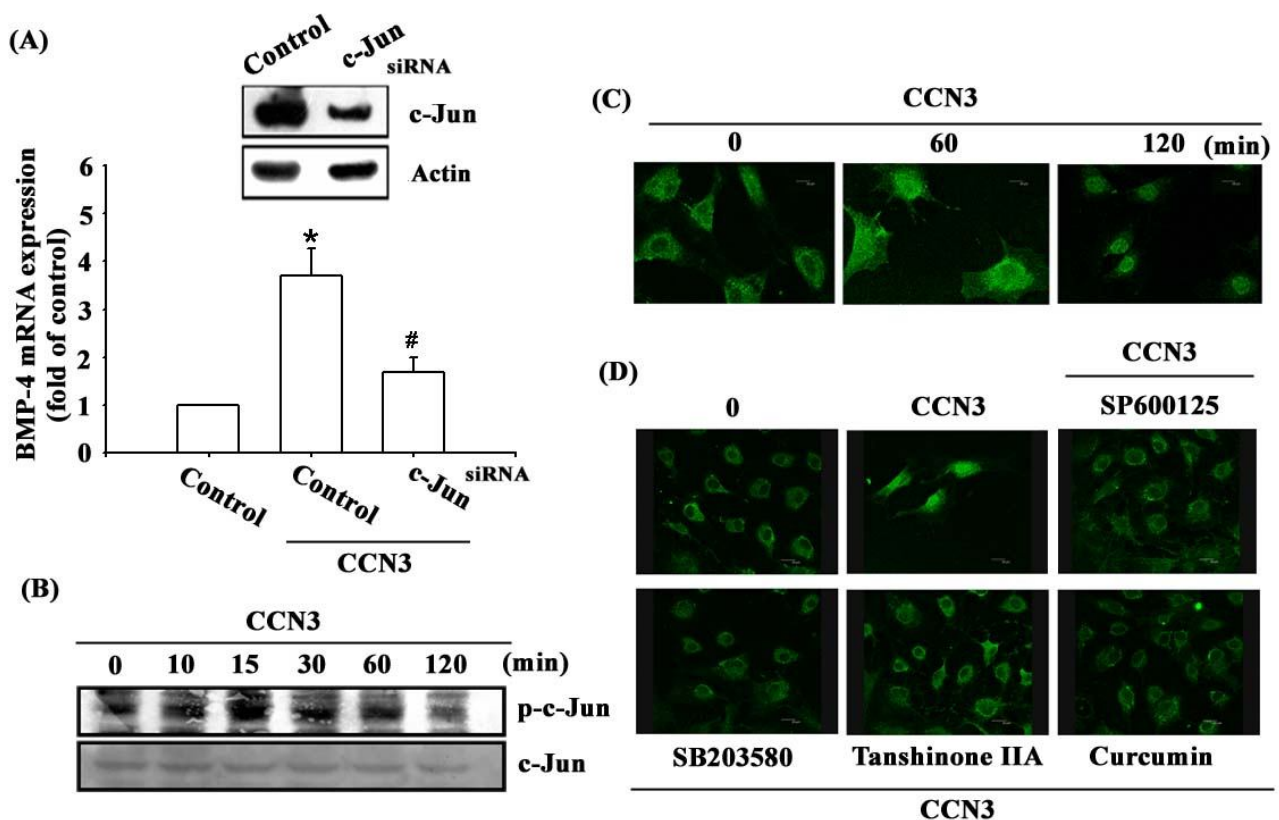


Fig. 13 CCN3 increased c-Jun translocation into cell nucleus.

(A) MC3T3-E1 cells were transfected with c-Jun siRNA followed by treating CCN3 (30ng/ml), the BMP-4 mRNA were examined by qPCR. Otherwise MC3T3-E1 cells were transfected with control of c-Jun siRNA for 24 hr, the protein expression of c-Jun were examined by Western blot analysis. (B) MC3T3-E1 cells were treated with CCN3 (30 ng/ml) for indicated time intervals(0, 10, 15, 30, 60, 120 min), p-c-Jun expression were determined by Western blot analysis. (C) MC3T3-E1 cells were treated with indicated time intervals (0, 60, 120 min), and translocation were examined by Immunofluorescence technique. (D) MC3T3-E1 cells were pretreated with upstream inhibitors for 30 min followed by treating CCN3 (30 ng/ml) for 1 hr, and the translocation into nucleus were detected by Immunofluorescence technique. Results are expressed as the mean \pm S.E. * $p < 0.05$ compared with control. # $p < 0.05$ compared with CCN3-treated group.