



中國醫藥大學  
基礎醫學研究所  
碩士學位論文

CCN3 經由 FAK, PI3K, AKT 及 NF- $\kappa$ B 路徑增加人  
類軟骨瘤細胞的移行能力

CCN3 increases motility of human chondrosarcoma cell via FAK, PI3K,  
AKT and NF- $\kappa$ B pathways

指導教授：譚思濉 博士

共同指導教授：湯智昕 博士

研究生：陳瑞青

中華民國九十九年六月

# 目錄

目錄.....	I
縮寫對照表.....	III
中文摘要.....	V
英文摘要.....	VI
第一章 序論	
一、研究背景.....	1
二、研究目的.....	2
第二章 文獻探討	
一、軟骨肉瘤 (Chondrosarcoma).....	3
二、轉移 (Metastasis).....	8
三、金屬蛋白酵素 (Matrix metalloproteinase ; MMPs) .....	11
四、CCN3.....	15
五、細胞黏著受體 (Integrin).....	22
第三章 實驗材料與方法	
一、實驗材料	
(一) 細胞.....	27
(二) 試劑.....	27
(三) 實驗儀器與耗材.....	29
二、實驗方法	
(一) 細胞培養.....	30
(二) 收集細胞.....	32
(三) 蛋白質定量測定.....	33
(四) 西方墨點法 (Western blot analysis).....	34
(五) 細胞存活率分析 (MTT assay).....	38
(六) 細胞移行分析 (Migration assay).....	39
(七) 細胞轉染法.....	40
(八) 全量 RNA 抽取.....	40
(九) Complementary DNA, cDNA 反轉錄作用.....	41
(十) RT-PCR.....	42
(十一) Luciferase 活性測定.....	43
(十二) Gelatin Zymography.....	44
(十三) 統計分析.....	46
第四章 結果	
一、CCN3 會促進人類軟骨肉瘤細胞的移動性.....	47
二、CCN3 會造成人類軟骨肉瘤細胞之 MMP-13 的大量表現.....	47
三、CCN3 透過 $\alpha\beta 3$ 及 $\alpha\beta 5$ integrin receptor 造成人類軟骨肉瘤細胞移行.....	48

四、FAK 參與在人類軟骨肉瘤細胞移行中 .....	49
五、PI3K/Akt 參與在人類軟骨肉瘤細胞移行中 .....	50
六、NF- $\kappa$ B 參與在由 CCN3 調控增加人類軟骨肉瘤細胞移行中 .....	51
第五章 討論.....	53
第六章 結論.....	57
參考文獻.....	58
圖.....	63



### 縮寫表

<b><math>\alpha</math>-MEM</b>	Minimum Essential Medium
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>cDNA</b>	Complementary DNA
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>ECL</b>	Enhanced chemiluminescence
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>FAK</b>	Focal Adhesion Kinase
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>NaCl</b>	Sodium chloride
<b>NaF</b>	Sodium fluoride
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Sodium bicarbonate
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear Factor kappa-B
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol 3-kinase
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonyl fluoride
<b>PVDF</b>	Polyvinylidene fluoride
<b>RIPA lysis buffer</b>	Non-ionic detergent-containing buffer
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain

	Reaction
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate
<b>siRNA</b>	Small interference RNA
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylenediamine
<b>TPCK</b>	Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone



## 中文摘要

NOV是CCN family (Cyr61-CTGF-Nov family) 中的一員，它又可以稱為CCN3。CCN家族可以進行各種生理的調控如：細胞附著能力、促進細胞移動及刺激細胞增生作用等...。而CCN3可以透過與細胞表面的integrin結合進而促進細胞貼附或移動能力，然而CCN3與軟骨肉瘤的移行並不明朗，在本實驗中我們發現CCN3可以增加人類軟骨肉瘤細胞的移行和matrix metalloproteinase (MMP)-13的表現。另一方面發現RGD會抑制由CCN3所增加的細胞移行及MMP-13的產生，但給予RAG peptide時沒有顯著的差異。接著我們使用訊息傳遞抑制劑FAK mutant、FAK si-RNA、Ly294002、wortmannin、Akt inhibitor、NF- $\kappa$ B inhibitor (PDTC、TPCK及NF- $\kappa$ B inhibitor peptide)、p85 mutant、Akt mutant、IKK $\alpha$  mutant及IKK $\beta$  mutant後，都會抑制CCN3刺激人類軟骨肉瘤細胞的移行能力與MMP-13的產生。給予CCN3後也會促進FAK、PI3K及Akt的活化。這些結果指出CCN3會經過 $\alpha$ v $\beta$ 3及 $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin receptor調控人類軟骨肉瘤細胞的移行能力與MMP-13的表現，是透過PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B這條路徑。

關鍵字：CCN3、細胞黏著受體、人類軟骨肉瘤細胞、移行、金屬蛋白酵素。

## Abstract

Nephroblastoma overexpressed (Nov; CCN3), from the CCN gene family, which is involved in many cellular activities such as growth, differentiation, cell motility, adhesion and division. However, the effect of CCN3 on migration activity in human chondrosarcoma cells is mostly unknown. Here, we found that CCN3 increased the migration and expression of matrix metalloproteinase (MMP)-13 through the  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha v\beta 5$  integrin receptor in human chondrosarcoma cells (JJ012 cells). RGD peptide,  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha v\beta 5$  monoclonal antibody but not RAD peptide inhibitor inhibited the CCN3-induced increase migration and MMP-13 expression. Activations of focal adhesion kinase (FAK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Akt and NF- $\kappa$ B pathways after CCN3 treatment was demonstrated, and CCN3-induced expression of MMP-13 and migration activity was inhibited by the specific inhibitor of PI3K, Akt and NF- $\kappa$ B cascades. Transfection of cells with FAK, p85, Akt, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  mutant also reduced CCN3-induced cancer migration. Taken together, our results suggest that CCN3 acts through FAK/PI3K/Akt, which in turn activates NF- $\kappa$ B, resulting in the activation of MMP-13 and contributing to the migration of human chondrosarcoma cells.

Key world : CCN3 、 Integrin 、 Chondrosarcoma cells 、 Migration 、 MMP-13.





# 第一章 序論

## 一、 研究背景

癌症是目前人類健康生命的頭號殺手，高居國內十大死亡原因榜首，軟骨瘤雖然是一種少見的惡性腫瘤，但缺乏有效的輔助療法且軟骨瘤具有侵犯或遠端轉移的能力 (Tan et al., 2009)，這些都使得病人預後的存活率相當差 (Chow, 2007)。但目前對於軟骨瘤的成因以及轉移的機制都還不是很清楚，但若從中瞭解癌症轉移過程的分子機制，應該可以提供未來關於防治軟骨肉瘤轉移之有效方法，或是當成臨床上診斷癌症轉移的分子標記。

在腫瘤形成與轉移的過程中有許多分子機制參與在其中，這包括關於分解細胞外基質 (Extracellular matrix ; ECM) 的蛋白酶基因，例如：MMP (Matrix metalloproteinase) (Egeblad and Werb, 2002)、以及細胞與細胞間或與間質之間相互作用的基因，例如細胞黏著受體 (Integrin)。MMPs 是一群會與  $Zn^{2+}$  結合的蛋白酶，能夠分解細胞外間質來幫助正在移動的細胞增進侵犯能力，這是腫瘤轉移過程中所必要的，在文獻中也發現，MMPs 的表現量是腫瘤轉移及侵犯能力的指標 (McCawley and Matrisian, 2000)。

CCN family 的是一種與基質有關的分泌型的蛋白質，它們參與許多細胞的活動例如生長、分化、移動、生存等 (Chen and Lau, 2009)；

Perbal, 2004)。而 Nephroblastoma overexpressed (Nov; CCN3)，屬於 CCN family 中的一員，有文獻指出 CCN3 會促進人類腫瘤細胞的移動性與侵犯能力 (Benini et al., 2005; Sin et al., 2009)。臨床上的研究顯示 CCN3 與腫瘤細胞的表現有關 (Perbal et al., 2008; Sin et al., 2009)。CCN3 可以作為 integrin 的配體 (Ligand)，透過與 integrin 的結合開啟下游的訊息傳遞造成細胞移動、凋亡、傷口修復、血管新生與附著能力改變等等... (Chen and Lau, 2009)。然而 CCN3 對於人類軟骨肉瘤細胞的 MMP 表現以及造成細胞移動性的機制目前還不是很清楚。

## 二、 研究目的

本研究的主要目的：

- (一)、 探討 CCN3 是否可以造成 chondrosarcoma cells (JJ012 cells) 的移動性。
- (二)、 探討主要由何種 MMPs 做為細胞侵犯能力的調控。
- (三)、 探討 CCN3 誘導人類軟骨細胞瘤的訊息傳導途徑。

## 第二章 文獻探討

### 一、軟骨肉瘤 (Chondrosarcoma)

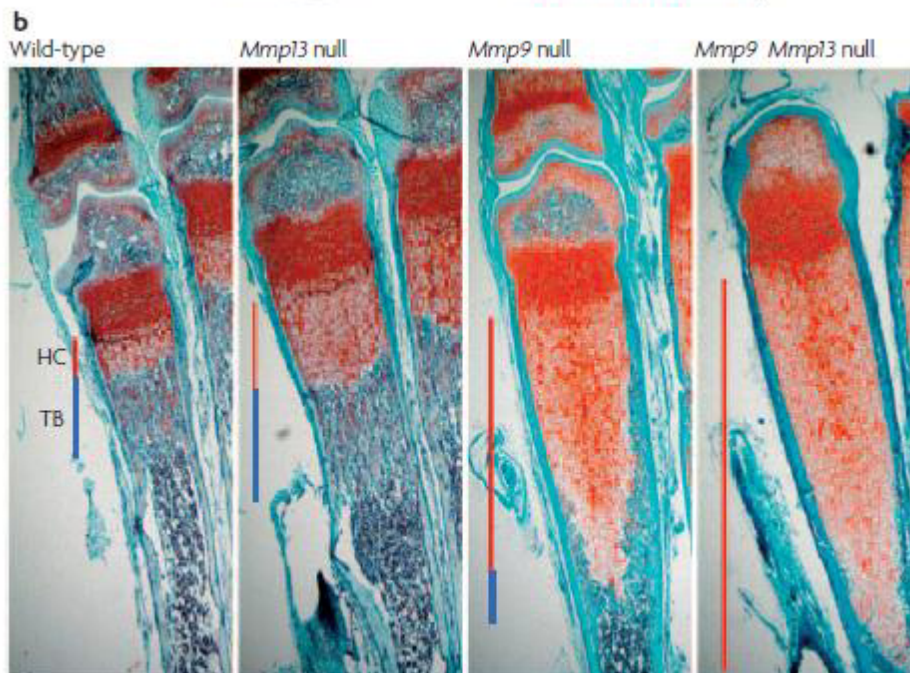
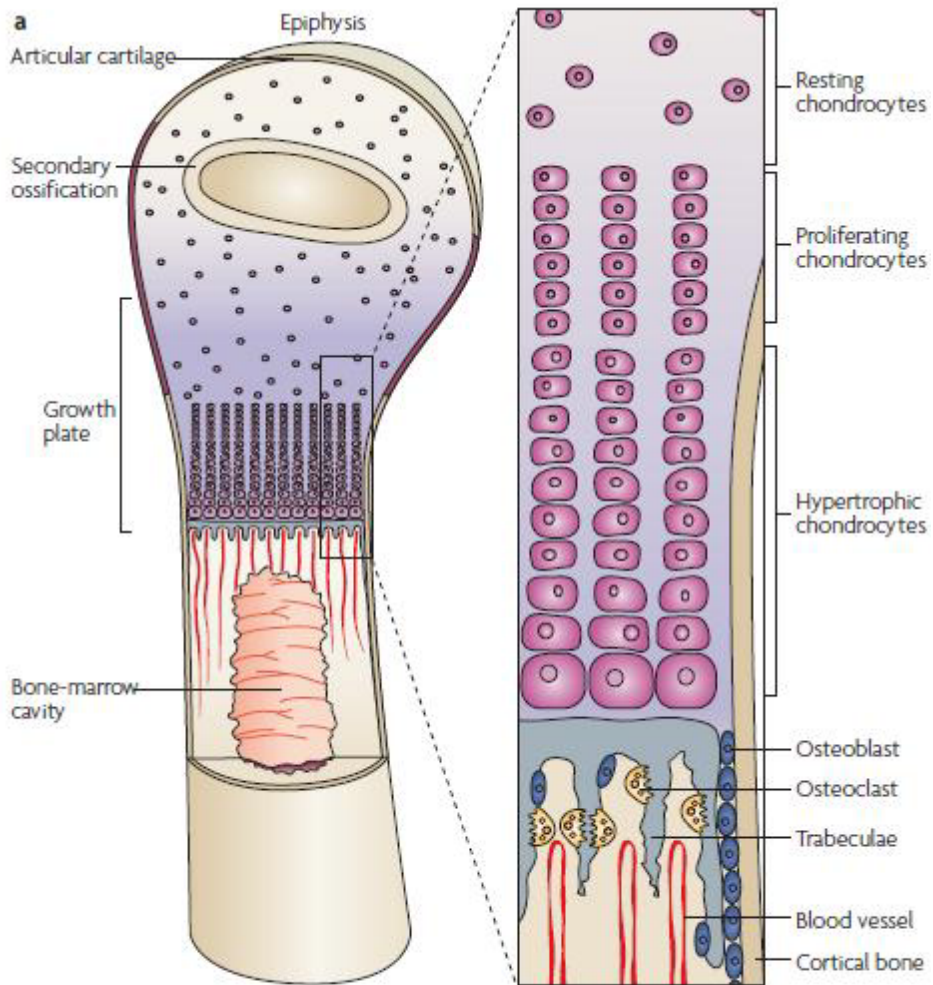
人體的骨骼系統是由：骨 (Bone)、軟骨 (Cartilage) 及關節 (Articulation) 三者組成，透過與肌肉的交互作用進而達到運動、支持和保護身體的功能。骨頭構造中有三種特化的骨細胞，分別是 osteocyte、osteoblast 以及 osteoclast。軟骨分布在關節的表面，保護骨頭、忍受物理性壓力、連接軟組織和負載身體重量 (Poole et al., 1993)。

軟骨是由軟骨母細胞 (Chondroblast) 所形成的軟骨細胞與細胞外基質所組成的，其中充滿著由蛋白多醣分子與多醣蛋白分子聚合物的膠原纖維 (Collagen fiber) 與彈性纖維 (Elastic fiber) 的聚合物所組成，它們是構成軟骨堅硬而柔軟的主要因素 (Paulsson et al., 1987)。軟骨可以分成三種，主要的差別在於基質的組成不同，分別為透明軟骨 (Hyaline cartilage)，彈性軟骨 (Elastic cartilage)，以及纖維軟骨 (Fibrocartilage)。以透明軟骨的分布最廣，如關節、肋軟骨、呼吸道，主要是由第二型的膠原蛋白 (Type II collagen) 形成。而當軟骨出現問題時，可能會造成多種的骨骼疾病例如骨頭發育不良症 (Skeletal dysplasias)、內生性軟骨瘤 (Enchondromatosis)。而其中內生性軟骨瘤還有可能會惡性轉化為軟骨肉瘤 (Yu et al., 2003)。除此之外

當發燒或是有其他的發炎反應時，會促使滑膜分泌一種叫做 MMPs 的物質，它破壞膠原蛋白與醣蛋白進而破壞軟骨細胞的發育，造成軟骨喪失功能，也會造成一連串的軟骨病變 (Aigner et al., 2006)。當 MMPs 分泌不足，亦會影響骨頭的生長 (Page-McCaw et al., 2007) (Fig. 1)。







**Fig 1. Skeletal phenotypes of MMP mutants.**

(A) Long bones in mice and humans develop through the process of endochondral ossification, in which a cartilage template forms first and then is resorbed and replaced by mineralized bone. This process requires extensive matrix remodeling and invasion of new blood vessels. (B) Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)- and MMP-13 null femurs display greatly expanded hypertrophic cartilage zones (HC; red line) and altered trabecular bone (TB; blue line). Despite this expansion, MMP-9 and MMP-13 null phenotypes eventually resolve, resulting in good bone formation. The MMP-9 MMP-13 double mutant has an even greater expansion of hypertrophic cartilage, and significantly and persistently shorter long bones. Images courtesy of D. Stickens, D. Behonick and N. Ortega, University of California, San Francisco, USA (Page-McCaw et al., 2007).

軟骨肉瘤是一種由軟骨產生的惡性腫瘤，種類大至上分成三種：典型骨肉瘤 (Classic chondrosarcoma)、去分化型骨肉瘤 (Dedifferentiated chondrosarcoma) 以及間葉型軟骨肉瘤 (Mesenchymal chondrosarcoma)。其中軟骨肉瘤是第二個最常見的原發性骨腫瘤，通常出現在年紀比較大的族群，而軟骨肉瘤可能出現在身體的任何部分，大多常見於骨盆、肋骨、手臂 (肱骨)、肩胛骨和腿 (近端股骨，脛骨)，偶爾會在脊椎或頭骨內發現。

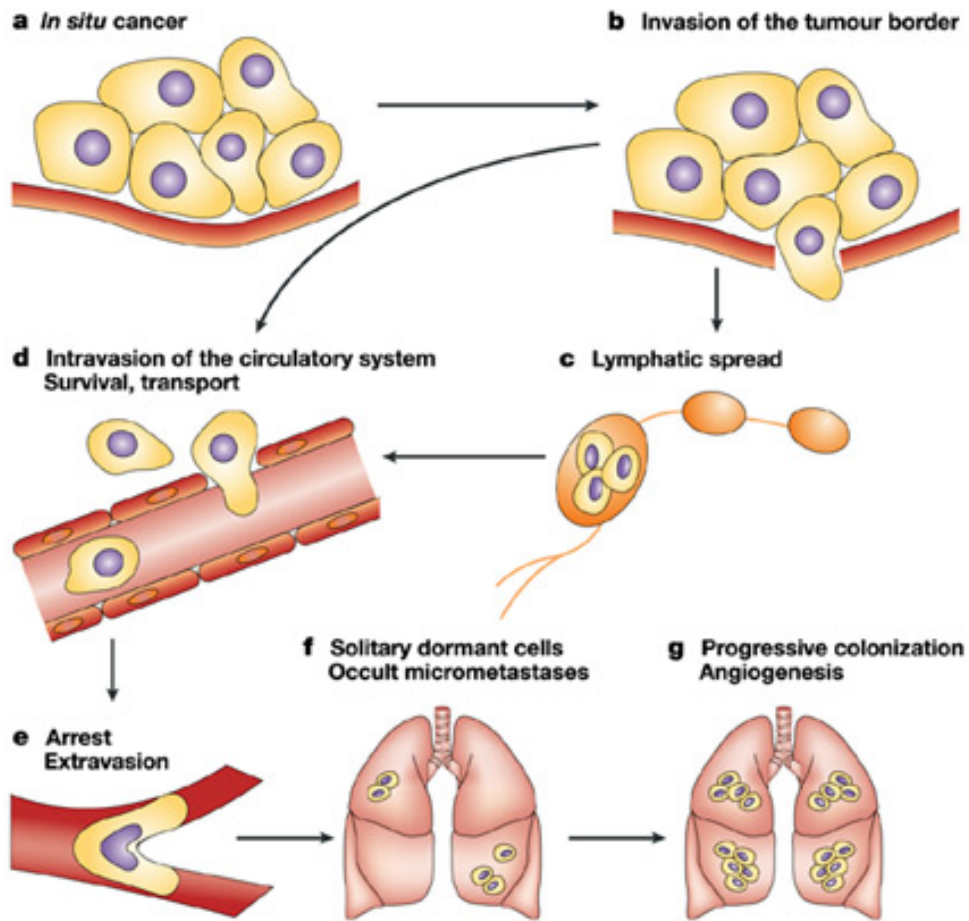
由於軟骨肉瘤對於化學或放療的治療效果並不好，所以目前以手術切除為主要和最成功的手段，但是腫瘤經常被發現在一些不易完全切除的地方，如骨盆或長骨近端，這些都造成手術治療的難題或是有可能產生手術後的後遺症，加上缺乏有效的輔助療法，使得軟骨肉瘤的病人的預後能力差、還會有復發及轉移的可能性 (Fong et al., 2007)。有鑑於此，若能從中瞭解軟骨肉瘤轉移過程的分子機制，或許可以提供未來關於防治軟骨肉瘤轉移之有效方法。

## 二、轉移 (Metastasis)

研究統計約百分之九十的癌症病患死亡原因是癌細胞的轉移 (Sporn, 1996)。腫瘤在轉移的過程為：1、癌細胞剝離 (Detachment)，離開原本的腫瘤。2、接著癌細胞會分泌出分解細胞基質的酵素使得癌細胞具有侵犯能力 (Duffy, 1996)，即可入侵到血管或淋巴系統中。更進一步，癌細胞會產生例如：VEGF、PDGF 等...生長因子 (Blood and Zetter, 1990)，使得血管新生。在血管或淋巴管中，腫瘤細胞如果可以抵擋免疫反應就會貼附到內皮細胞或一些新生的血管壁上。3、穿過血管或淋巴管到目標器官生長，產生新的腫瘤 (Fig. 2)。

在癌細胞的轉移過程中，癌細胞會產生四類分解細胞外基質的酵素：MMPs、serine proteinase (Urokinase plasminogen activator, u-PA)、aspartic proteinase (Pepsin)、cysteine。當中又以 MMPs 與 u-PA 扮演破壞基底膜中重要的角色，所以這些水解蛋白酵素的活性與腫瘤的惡性程度及高度的轉移能力都有相關性 (Cockett et al., 1998)。

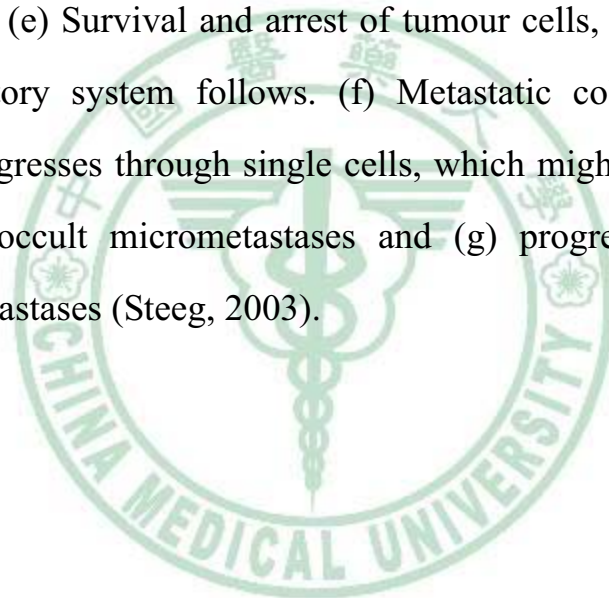




Nature Reviews | Cancer

**Fig 2. A schematic of the metastatic process.**

A schematic of the metastatic process beginning with (a) an in situ cancer surrounded by an intact basement membrane. (b) Invasion requires reversible changes in cell–cell and cell–extracellular-matrix adherence, destruction of proteins in the matrix and stroma, and motility. Metastasizing cells can (c) enter via the lymphatics, or (d) directly enter the circulation. (e) Survival and arrest of tumour cells, and extravasation of the circulatory system follows. (f) Metastatic colonization of the distant site progresses through single cells, which might remain dormant for years, to occult micrometastases and (g) progressively growing, angiogenic metastases (Steeg, 2003).



### 三、金屬蛋白酵素 (Matrix metalloproteinase ; MMPs)

在腫瘤細胞轉移的過程，分解腫瘤周圍細胞外基質的酵素如 MMPs 是腫瘤轉移過程中所必要的 (Hood and Cheresch, 2002)。目前已經知道 MMPs 可以影響胚胎發育、傷口癒合、發炎反應以及癌細胞轉移 (Curran and Murray, 1999; Nagase and Woessner, 1999)。

MMPs 是一種含鋅的金屬蛋白酵素，其構造主要含有三個 domain：前胜肽區 (Propeptide domain)、催化區 (Catalytic domain) 以及受質作用區 (Substrate domain)，MMPs 開始是以沒有活性的形式 (Proenzyme) 被釋放到細胞外，當 MMPs 構造的 N 端前胜肽區被水解的時後才會具有活性 (Knauper et al., 1996; Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990)。目前發現的 MMPs 有 28 種，而根據 MMPs 的結構以及依照所分解的物質的不同大至上分成五大類 (Fig. 3)：

#### 1. Collagenase :

包括 MMP-1、-8、-13、-18，主要的功能可以降解第一、二、三、及七型膠原，但無法分解 galactinase。而其中 MMP13 又稱為 collagenase-3。

#### 2. Gelatinase :

包括 MMP-2、-9，又稱明膠酶，能夠破壞 collagenase、laminin 和基底膜。

3. Stomelysin :

包括 MMP-3、-7、-10 等，此類的 MMPs 本身不穩定也不易存在組織內，但是很容易被一些細胞激素、腫瘤因子和生長因子所誘發 (Matrisian, 1992)。

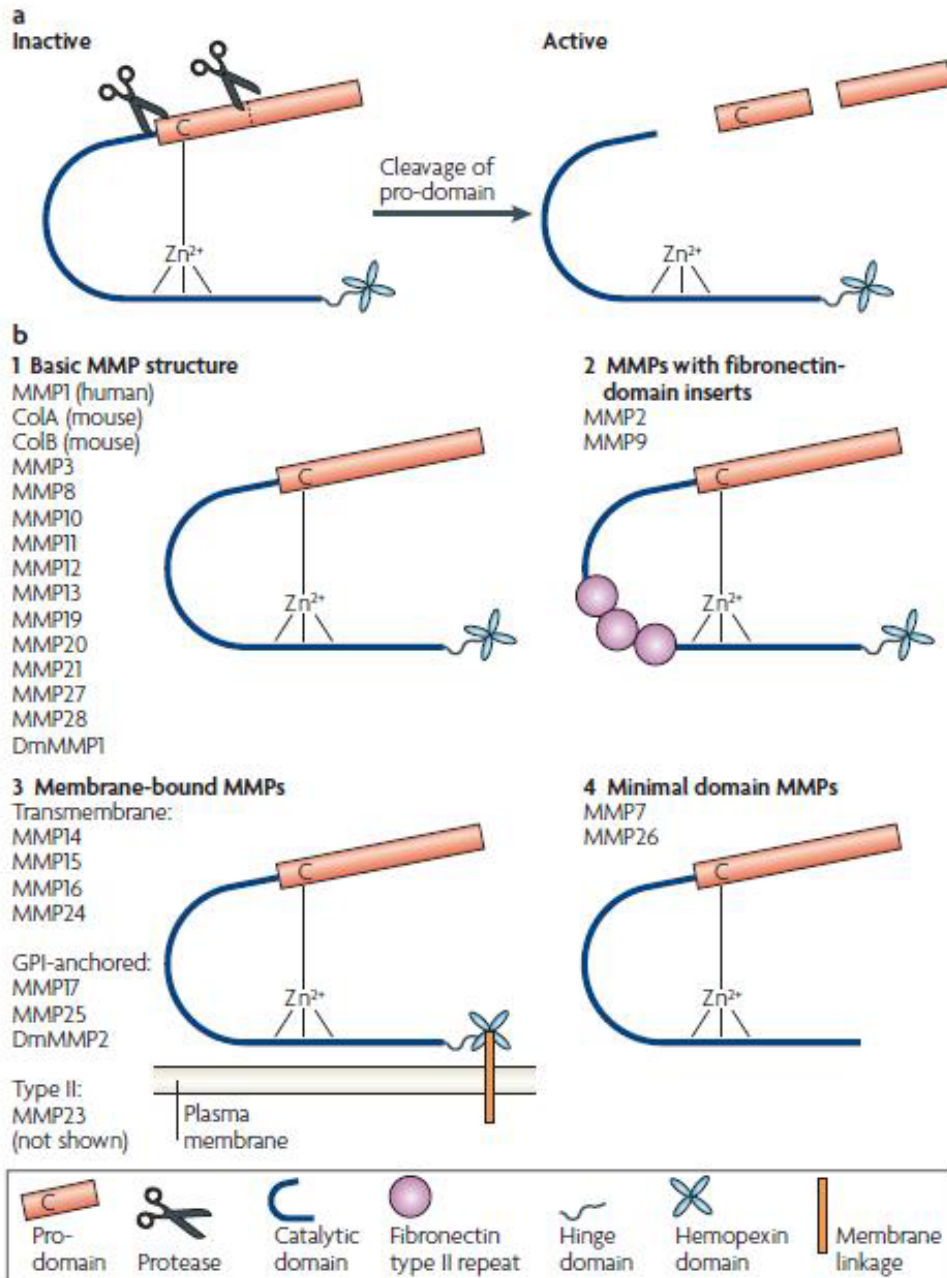
4. Membrane-type MMP :

包括 MMP-14、-15、-16 等，這類的 MMPs 除了可以會分解細胞外基質，還會激活 MMP-2 和-13。

5. 其他類的 MMP :

包括 MMP-4、-5、-6、-20 等等 (Kuzuya and Iguchi, 2003)。





**Fig. 3. Schematic structure of MMPs.**

(a) Matrix metalloproteinases (MMPs) are expressed as pro-proteins. A conserved Cys residue in the pro-domain coordinates the zinc ion, which would otherwise be used for catalysis. The pro-domain is removed by a combination of a cleavage in the domain and a cleavage between the pro-domain and the catalytic domain. (b) Most MMPs share a conserved domain structure of pro-domain, catalytic domain, hinge region and hemopexin domain (1) All MMPs are synthesized with a signal peptide, which is cleaved during transport through the secretory pathway. MMP-2 and MMP-9 have three fibronectin type II repeats in their catalytic domains (2) Membrane type MMPs (MT-MMPs) are linked to the plasma membrane either by a transmembrane domain or by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) linkage, attached to the hemopexin domain (3) Minimal MMPs lack the hinge and hemopexin domains (4) MMP-21 has a truncated hinge domain. *Drosophila melanogaster* DmMMP-2 has an insertion of 214 amino acids into its hinge domain. MMP-23 (not shown) has a nonconserved N-terminal domain that consists of an immunoglobulin IgC2 domain and a ShKT domain; it is unclear if MMP-23 contains a Cys residue switch (Page-McCaw et al., 2007).



MMPs 除了會與 ECM 結合做為細胞移動和侵犯的路徑 (Lochter et al., 1998) 外，最主要的作用是在分解 ECM 幫助移動的細胞侵犯到其他的組織及器官。有文獻指出 MMPs 的表現量除了可以做為腫瘤轉移及侵犯能力的標記 (McCawley and Matrisian, 2000) 外，還可以做為腫瘤惡化程度的判斷，如 MMP-1、-2、-3、-9、-13 等 (Stetler-Stevenson, 1996)，因為不管在人類或是動物中的腫瘤細胞 MMPs 的表現量都有增加的現象 (Coussens et al., 2002)。

#### 四、CCN3

CCN family (Cyr61-CTGF-Nov family) 目前已知有六個明確的成員，包括 CCN1 (Cysteine-rich protein，又稱為 Cyr61)、CCN2 (Connective tissue growth factor，又稱為 CTGF)、CCN3 (Nephroblastoma overexpressed，又稱為 Nov)、CCN4 (Wnt-induced secreted protein-1，又稱為 WISP-1)、CCN5 (也稱為 WISP-2) 以及 CCN6 (也稱為 WISP-3)。CCN 蛋白結構包含極高的同源性 (Homology)，主要是由四個很相似的單元 (Domains) 所組成，包括 insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)、von willebrand factor type C (VWC)、thrombospondin type 1 repeat (TSP1) 和 carboxyl-terminal domain (CT)，其中 WISP-2 缺少 CT domain (Chen and Lau, 2009)。因為 CCN family 成員的結構的 N 端 (NH<sub>2</sub>-terminal)

都含有 secretory signal 的氨基酸殘基，所以 CCN family 的成員屬於分泌型的蛋白質 (Yang and Lau, 1991)，可以表現在細胞表面或是與細胞基質之間 (Fig. 4)。







**Fig. 4. Arrangement of CCN domains.**

(a) A diagram showing the signal peptide (SP), insulin-like growth factor binding domain (IGFBP) in red, von Willebrand factor C repeat (VWC) in blue, thrombospondin type-1 repeat (TSP-1) in yellow and cysteine knot (CT) in green. The protein is split into two halves separated by a variable 'hinge' region. Some of the known binding partners of each module are also listed: insulin-like growth factors (IGFs); bone morphogenic protein 4 (BMP4); transforming growth factor b (TGF-b); LDL receptor protein 1 (LRP-1); and heparin sulphated proteoglycans (HSPGs). (b) A sequence alignment of the CCN protein family. The sections of the sequence corresponding to each domain are shaded according to the colour scheme used in (a) The asterisks highlight the conserved residues and include the 38 cysteines that form part of the key motifs of each domain. The three regions of the sequence that have been implicated directly in integrin binding are also highlighted. These areas are highlighted in bold text. The V2 site binds integrin  $\alpha v\beta 3$ ; the T1 site binds  $\alpha 6\beta 1$ ; the H1 site also binds  $\alpha 6\beta 1$ ; and the H2 site binds HSPGs. The alignment was constructed by the T-Coffee server (Holbourn et al., 2008).

CCN3 最初被發現是因為在鳥禽類中，myeloblastosis-associated viruses 誘發的 avian nephroblastomas (Zeng et al., 2004)，CCN3 被認為參與腫瘤形成過程，有文獻指出在一些 primary tumor cell lines 包括：攝護腺癌、黑色素瘤及骨肉瘤中 CCN3 的表現有被調升的現象 (Maillard et al., 2001; Manara et al., 2002)，在其中 CCN3 被指出可以當作病人預後較差的指標因子 (Perbal et al., 2008)，此外 CCN3 也是一個重要的血管新生誘導因子 (Novel angiogenic)，有研究指出在血管內皮細胞中 CCN3 透過 integrin receptor 可以促進血管形成 (Proangiogenic)，而在臨床上也指出 CCN3 可以誘導血管的新生 (Neovascularization) (Lin et al., 2005)。

在許多不同的細胞型態中，CCN3 可以作為 integrin 的 ligand，藉著與不同的 integrin  $\alpha$  與  $\beta$  subunit 組合，如 integrin  $\alpha\beta3$ 、 $\alpha\beta5$ 、 $\alpha5\beta1$  與  $\alpha6\beta1$  結合來執行調控細胞的功能，包括：CCN3 可結合至細胞表面的  $\alpha\beta3$  及  $\alpha5\beta1$  integrin 並促進內皮細胞 (Endothelial cell) 貼附或移動 (Migration)、透過與  $\alpha6\beta1$  及  $\alpha\beta5$  integrin 結合促使纖維母細胞 (Fibroblasts) 及內皮細胞貼附或移動。除此之外，CCN3 可以透過 integrin  $\alpha6\beta1$  及細胞表面上的 HSPGs (Heparan sulfate proteoglycans) 使得細胞的貼附更加穩固 (Chen and Lau, 2009; Lin et al., 2005) (Table. 1)。

此外 CCN3 也可以調控某些基因表現，包括誘發血管新生及發炎反應有關的細胞激素、MMPs 以及 cell adhesion receptors 增加 (Benini et al., 2005)。



**Table 1.** Specific CCN-integrin interactions and activities they mediate.

(Chen and Lau, 2009)

Integrin	CCN protein	Activities
$\alpha_v\beta_3$	CCN1	Cell adhesion, migration, DNA synthesis, cell survival in ECs; DNA synthesis in fibroblasts
	CCN2	Cell adhesion, migration, cell survival in ECs; hepatic stellate cell adhesion
	CCN3	Cell adhesion migration in ECs
$\alpha_v\beta_5$	CCN1	Cell migration in fibroblasts, synergism with TNF $\alpha$
	CCN3	Cell adhesion, migration in ECs; migration in fibroblasts
$\alpha_5\beta_1$	CCN2	Cell adhesion in chondrocytes, adhesion and migration in pancreatic stellate cells
	CCN3	Cell adhesion, migration in ECs
$\alpha_2\beta_1$	CCN1	Cell adhesion
$\alpha_{IIb}\beta_3$	CCN1	Cell adhesion in platelets
	CCN2	Cell adhesion in platelets
$\alpha_M\beta_2$	CCN1	Cell adhesion in monocytes
	CCN2	Cell adhesion in monocytes
$\alpha_D\beta_2$	CCN1	Cell adhesion

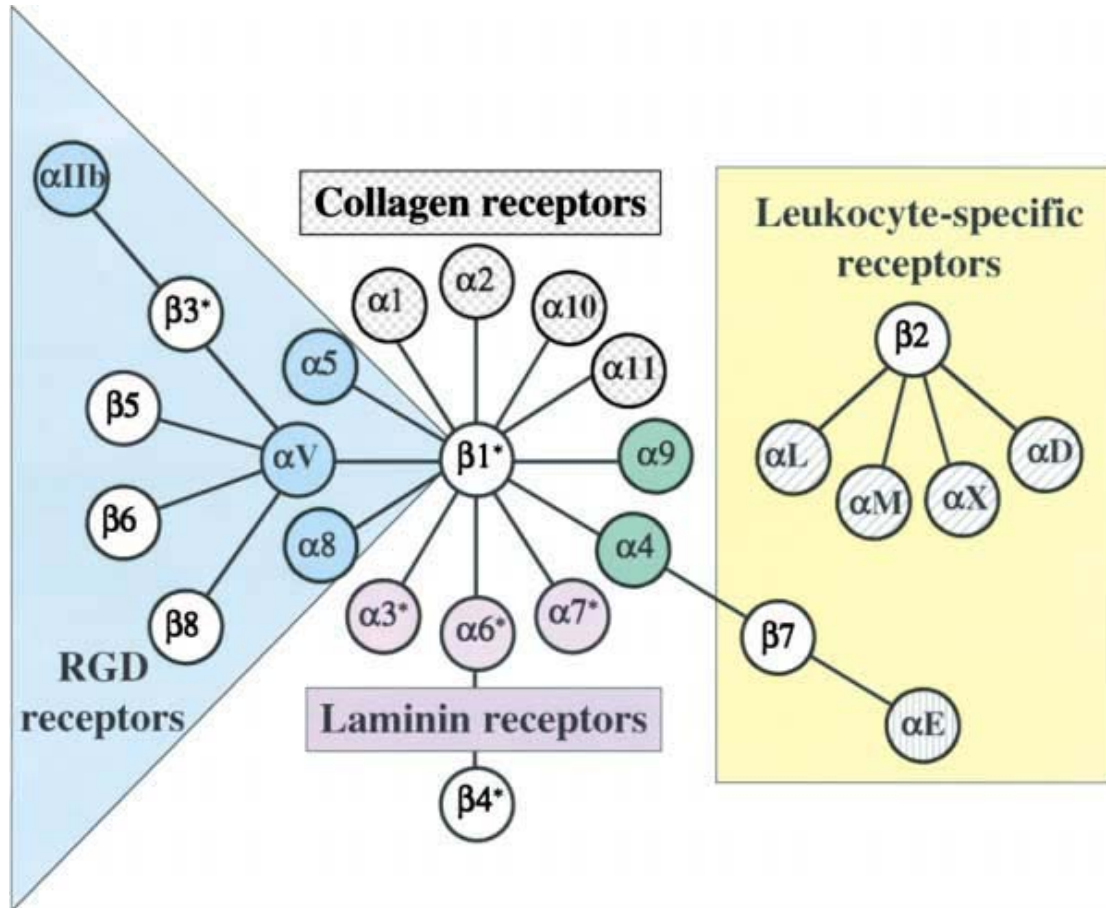
Integrins are cell adhesion receptors that also regulate other cellular functions. They serve as the principal receptors for CCN proteins.



## 五、 細胞黏著受體 (Integrin)

Integrin 是一群位在細胞表面上的接受器，會控制細胞骨架物質 (Cytoskeletal elements) 及與細胞基質 (Matrix) 之間的交互作用，所以 integrin 在細胞移動及黏附過程中扮演著重要角色。它們是由  $\alpha$  及  $\beta$  兩個次單元 (Subunits) 所構成的 heterodimer receptor，目前已知有 18 種  $\alpha$  次單元及 8 種  $\beta$  次單元，不同的  $\alpha$  次單元可以和  $\beta$  次單元結合形成約 24 種的 integrin receptor (Guo and Giancotti, 2004)。

Integrin 與 ligand 結合時主要是辨視 ligand 中由數個氨基酸所組成的短肽 (Peptide) 序列，而不同的 Integrin 可以辨別相同序列或同一個 ligand 中不同的氨基酸序列，其中大致分為兩大類：辨視 RGD (Arg-Gly-Asp) 序列以及非 RGD 序列。其中  $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_v\beta_6$ 、 $\alpha_{IIb}\beta_3$  及  $\alpha_v\beta_1$  可以識視 ligand 分子中的 RGD 序列；而其他則是辨別 ligand 中 YGDLR、KQAGDV、DGEA 等短肽序列 (Ruoslahti, 1996) (Fig 5)。



### **Fig 5. The Integrin Receptor Family**

Integrins are  $\alpha\beta$  heterodimers ; each subunit crosses the membrane once, with most of each polypeptide (>1600 amino acids in total) in the extracellular space and two short cytoplasmic domains (20-50 amino acids). The figure depicts the mammalian subunits and their  $\alpha\beta$  associations ; 8 $\beta$  subunits can assort with 18 $\alpha$  subunits to form 24 distinct integrins. These can be considered in several subfamilies based on evolutionary relationships (coloring of  $\alpha$  subunits), ligand specificity and , in the case of  $\beta 2$  and  $\beta 7$  integrins, restricted expression on white blood cells.  $\alpha$  subunits with gray hatching or stippling have inserted I/A domains (see text). Such  $\alpha$  subunits are restricted to chordates, as are  $\alpha 4$  and  $\alpha 9$  (green) and subunits  $\beta 2$ - $\beta 8$ . In contrast,  $\alpha$  subunits with specificity for laminins (purple) or RGD (blue) are found throughout the metazoan and are clearly ancient (see text). Asterisks denote alternatively spliced cytoplasmic domains. A few extracellular domains are also alternatively spliced (not shown). Further information on integrin subunit structures and details of ligand specificity are given in several extensive reviews (Hemler, 1999; Plow et al., 2000; van der Flier and Sonnenberg, 2001).



當 integrin 與適當的 ligand 結合受到活化後，會將細胞訊息由內向外 (Inside-out) 及由外向內 (Outside-in) 傳遞，除了會改變細胞骨架去調節細胞與細胞間、細胞外基質間的附著能力 (Adhesion)、基因轉錄的調節等，進而影響細胞的生長、分化、移動及侵犯能力、甚至會改變細胞的型態 (Hood and Cheresch, 2002; Hynes, 1992) 及參與傷口的修復 (Wound healing)。

其中 inside-out 的訊息傳遞主要是改變細胞黏著受體的親和力 (Affinity) (Hood and Cheresch, 2002; Zhang et al., 1996)；而 outside-in 的訊息傳遞則是指由細胞黏著受體受到活化後所引起的訊息瀑布效應 (Signaling cascade) (Hood and Cheresch, 2002)，而其中 FAK (Focal adhesion kinase)、Src kinase 及 paxillin 是三個重要的訊息傳遞分子。

FAK 是一個非受體型酪胺酸磷酸激酶 (Non-receptor protein tyrosine kinase)，分子量為 125kDa (Kanner et al., 1990)，表現在大多數的細胞及組織中。FAK 是 integrin receptor 產生 outside-in signaling 中位於最上游也是最重要的蛋白，而 FAK 不具備 SH2 或 SH3 domains (SH2 domain for binding to phosphor-tyrosine；SH3 domain for binding to proline-rich regions)。當訊息由 integrin 將訊息往下傳遞時，會活化 FAK，使得 FAK 的 C 端 (C-terminal) 會與 talin 和 paxillin 結合後，會在 Y397 這個位置自我磷酸化後而產生活性，接著將訊息往下傳送

進而活化下游的訊息途徑，以調控包括細胞遷移、細胞存活、細胞增生及細胞分化 (Desgrosellier and Cheresch, 2010; Webb et al., 2004)。文獻中指出在 FAK<sup>-/-</sup>的細胞中發現其細胞的移動能力與生長都會明顯的降低 (Cary et al., 1996; Westhoff et al., 2004)，這意味著 FAK 在癌細胞的惡化過程有相關性。



## 第三章 實驗材料及方法

### 第一節 實驗材料

#### (一) 細胞:

本實驗所使用的是人類軟骨瘤細胞 (JJ012) 由 Dr. Sean P Scully (University of Miami, School of Medicine, Miami, FL) 實驗室提供。

#### (二) 試劑:

##### A. 實驗藥品

1. CCN3 (Rocky Hill, NJ, USA, Peprotech)
2. Wortmannin、LY294992、Akt inhibitor、PDTC、TPCK  
(Calbiochem, San Diego, CA, USA)
3. NF- $\kappa$ B inhibitor peptide (Enzo)
4. RGD、RAD (Louisville, KY)

##### B. 細胞培養試劑

1. DMEM (Sigma-Aldrich, Madison, MA, USA)
2.  $\alpha$ -MEM (Sigma-Aldrich, Madison, MA, USA)
3. fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen Corporation, California,

USA)

4. Gentamycin (Invitrogen, USA)
5. Hycobian (Invitrogen, USA)
6. Insulin (Invitrogen, USA)

#### C. 電泳及西方墨點轉漬試劑

1. BAS<sup>TM</sup> protein assay kit (Pierce, IL, USA)
2. Acrylamide、Tris、Tris-HCl、SDS、PMSF、Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、  
Aprotinin、NaF (Amersco Inc, Ohio, USA)
3. Tween20、Glycine (Amersco Inc, Ohio, USA)
4. Tetramethylethylenediamine (TEMED)、Ammonium  
Persulfate (APS)、PVDF (Immobilon-p) (Millipore, MA,  
USA)
5. ECL (Kodak Inc, NY, USA)
6. Wester blot Develop & replenisher、Fix & replenisher、  
BioMax light Film (Kodak Inc, NY, USA)

#### D. 抗體

1. p-FAK、p-PI3K、p-Akt、p-IKK $\alpha/\beta$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-p65、 $\beta$ -actin  
(Cell signal, MA, USA)
2. FAK-siRNA、Anti-mouse、Anti-rabbit、FAK、PI3K、Akt、  
IKK $\alpha/\beta$ 、I $\kappa$ B $\alpha$ 、p65 (Santa cruz Biotechnology Inc, CA, USA)

3.  $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 5$ 、 $\alpha 5\beta 1$  integrin (Millipore)

#### E. 即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR)

1. TRIzol (Invitrogen, CA, USA)
2. DEPC (Invitrogen, CA, USA)
3. RNA 轉 cDNA 系統 (Invitrogen, CA, USA)
4. Isopropanol、Chloroform、Oligo dt (J.T Baker, NJ, USA)

#### F. 細胞轉染法 (Cell transfection)

1. Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, USA)
2. Luciferase substrate (Promega, WI, USA)

#### G. 電泳移動改變分析法 (EMSA)

1. BCA<sup>TM</sup> assay kit (Pierce, IL, USA)
2. EMSA kit (Thermo, MA, USA)

#### H. 其它藥品

EDTA、 $\beta$ -mecaptoethanol、NaCl、Deoxycholate、HCl、Sodium bicarbonate、bromophenol blue (Amresco Inc, Ohio, USA)

### (三) 實驗儀器與耗材

1. 微量吸管 (Pipetman)

2. 可見光/紫外光分光光度計 (UV/Visible spectrophotometer  
DU-800, Bechman Coulter, USA)
3. 紫外光燈箱 (Gel analysis system, EverGene  
Biotechnology, UK)
4. PCR 加熱機 (RoboCycler Temperature Cycler; Stratagene,  
La Jolla, CA)
5. 即時聚合酶連鎖反應器 (Applied Biosystems 7300;  
Applied Biosystems prism 7900, Applied Biosystems Inc,  
CA, USA)
6. 多功能分光光度計 (Muti-spectrophotometer)
7. 細胞培養箱 (Incubator)



## 第二節 實驗方法

### (一) 細胞培養 (Cell culture)

培養人類軟骨瘤細胞的培養液為 DMEM :  $\alpha$ -MEM = 1 : 1，配置後裝入滅菌且烘乾過的玻璃瓶。配置時將一包的 DMEM powder 加入  $\text{NaHCO}_3$  3.7 克，以及一包的  $\alpha$ -MEM powder 加入 2.2 克的  $\text{NaHCO}_3$  後分別溶於滅菌的二次水中，將 pH 值調至 pH 7.2，補二次水至總體積 1 liter。再以 0.22  $\mu\text{m}$  的濾膜過濾分裝，保存於 4  $^{\circ}\text{C}$  中。

## A. 培養液添加物：

### 1. Fetal bovine serum

將冷凍的血清前一天先靜置 4°C 冰箱，使其慢慢溶解後，隔天放入水浴槽中以 55°C 中去補體 30 分鐘後，在無菌操作檯中分裝至 50ml 無菌離心管中，再用 parafilm 包覆瓶口，保存於 -20°C。

### 2. Gentamycin

每 400 ml 的培養液加入 450  $\mu$ l 的 gentamycin。(Final conc. 50  $\mu$ g/ml)

### 3. Hycobian

每 400 ml 的培養液加入 45  $\mu$ l 的 hycobian。

### 4. Insulin

每 400 ml 的培養液加入 11  $\mu$ l 的 insulin。

### 5. PBS (Phosphate balanced solution)

1X PBS 以 8 g NaCl、1.2 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  加二次水配製，其 pH 調成 7.4 後補二次水到 1 升，滅菌後保存於 4°C。

## B. 細胞培養步驟

### 1. 細胞分盤 (Subculture)

將人類軟骨肉瘤細胞培養於 culture medium (10% FBS)，放置於細胞培養箱 (37°C，5%  $\text{CO}_2$ )，等細胞成長約八至九分滿時，進行分盤培養。分盤前會在新的培養皿上標明細胞株的名稱以及



分盤時間，分盤時將舊的培養液吸走，每次以 37°C 回溫後的滅菌 1X PBS 3~5 ml 沖洗細胞，共清洗二次。再加入 8~10 ml 37°C 回溫後的培養液，將細胞全部沖下來，並吸放數次直到均勻沖散細胞以 1:3 或 1:4 的比例分盤培養。

## 2. 冷凍細胞：

約八分滿的人類軟骨肉瘤細胞，冷凍細胞前一天更換成新鮮的培養液。首先將舊的培養液吸走，每次以 3~5ml PBS 沖洗細胞，共清洗三次。加入 1 ml trypsin 放入 incubator 反應後加入 5ml 的培養液，將細胞全部沖下來，再將細胞液吸取置於 15 ml 離心管，離心 1500 rpm，5 分鐘之後將細胞沉澱下來。去除上清液，將 1 ml 含有 10% 的 DMSO 的培養液沖下細胞並裝放於冷凍小管中，置於 -80°C 冰箱保存。

## 3. 解凍細胞：

由 -80°C 冰箱中取出人類軟骨肉瘤細胞，迅速放到 37°C 的水浴槽中快速回溫後，在無菌操作台將細胞溶於適量的細胞培養液後，隔天待細胞貼附後再換培養液，即可進行實驗。

## (二) Cell lysates 收集



#### A. 試劑：

主要溶液 lysis buffer (RIPA buffer) ，可將細胞裂解。使用前先將它配置成 modified RIPA buffer ，若要配製成 1 ml ，需要 1ml RIPA 、 50mM PMSF 20  $\mu$ l 、 1000x protease inhibitor 1  $\mu$ l 、 50mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  20  $\mu$ l 以及 1mM NaF 10  $\mu$ l ，這些是蛋白質水解酶抑制劑，例如 sodium orthovanadate 是 phosphatase inhibitor ， aprotinin 以及 PMSF 是 serine protease inhibitor 。

#### B. 步驟：

1. 將 medium 吸走，用 1X PBS 清洗細胞兩次後，再將 PBS 吸乾。
2. 加入 120  $\mu$ l lysis buffer (6 well)，利用刮勺將細胞刮下，置於冰上。
3. 以 4 $^{\circ}$ C 、 13200 rpm ，離心 15 分鐘，取上清液到新的 eppendorf ，保存於 -20 $^{\circ}$ C 。

### (三) 蛋白質定量測定

#### A. 試劑：

1. BSA (2 mg/ml)
2. Protein Reagent Assay Kit

## B. 步驟：

配製 1、0.5、0.25、0.125、0.0625 及 0.03125 mg/ml，6 種不同濃度的 BSA 後，做出蛋白質濃度標準曲線。取 10 $\mu$ l 的待測樣品溶液到 96 well 中後，加入 protein reagent assay kit 所附之 A 溶液與 B 溶液以 50:1 比例混合，使最後總體積為 200  $\mu$ l。放入 37°C incubator 中，放置 30 分鐘。採用 Bradford protein assay，測各種不同量之 BSA 在波長 595 nm 的吸光值，畫出 standard curve。再測 sample 的 O.D. 值，求出 sample 的蛋白質濃度。

## (四) 西方墨點法 (Western blot analysis)

### A. 試劑：

#### 1. Sample buffer (5X)

stacking buffer (0.5mM Tris-HCl, PH=6.8)	7.81 ml
SDS	2.5 g
glycerol	12.36 ml
$\beta$ -meraptoethanol	6.25 ml
bromophenol blue	2 mg

再加二次水至 50 ml。

#### 2. Lysis buffer

RIPA buffer	1 ml
50 mM PMSF (8.71 mg in 1 mL DMSO)	20 $\mu$ l
50 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (9.195 mg in 1ml PBS)	20 $\mu$ l
1mM NaF (42 mg in 1ml PBS)	10 $\mu$ l
1 $\mu$ g/ml aprotinin	10 $\mu$ l
1 $\mu$ g/ml leupeptin	10 $\mu$ l

### 3. TBS-T (20X)

Tris	48.46 g
EDTA	0.5 M
NaCl (PH=7.5)	58.44 g

加二次水至 1 升。

### 4. Running buffer (10X)

Tris-base	30.2 g
Glycine	140 g
SDS	10 g

### 5. Transfer buffer (10X)

Tris	30 g
Glycin	144g

加二次水至 1 升。

### 6. SDS-PAGE

#### Stacking gel (5%)

d.d.H <sub>2</sub> O	3 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.75 ml
Acrylamide/bis (30%)	0.65 ml
10% SDS	0.1 ml
10% APS	0.1 ml
TEMED	0.012 ml

**Stacking gel (8%)**

ddH <sub>2</sub> O	11.5 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 6.8	6.3 ml
Acrylamide/bis (30%)	6.7 ml
10% SDS	0.025 ml
10% APS	0.025 ml
TEMED	0.015 ml

**Stacking gel (10%)**

d.d.H <sub>2</sub> O	7.9 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 6.8	5 ml
Acrylamide/bis (30%)	6.7 ml
10% SDS	0.2 ml
10% APS	0.2 ml
TEMED	0.012 ml

**Stacking gel (12%)**

d.d.H <sub>2</sub> O	8.2 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 6.8	6.3 ml



Acrylamide/bis ( 30%)	10.0 ml
10% SDS	0.25 ml
10% APS	0.25 ml
TEMED	0.01 ml

#### 7. Blotting buffer ( 5%)

TBS-T	50 ml
5% 脫脂牛奶	25g

#### B. 製膠：

依上方的配方製 Resolving gel 後均勻混合 ( TEMED 最後加), 將此溶液倒入已經架設好的膠槽中約八分滿後, d.d.H<sub>2</sub>O, 隔絕空氣, 待凝膠 (約 25 分鐘)。移去 d.d H<sub>2</sub>O 後插入插入 comb, 再將配置好的 stacking gel 以 pipette 注入避免有氣泡的殘留, 待膠凝即完成製膠的步驟。

#### C. 電泳：

將已經定量好的蛋白質加入 5x loading dye, 放置 95°C 加熱 5 分鐘使之變性, 注入到電泳槽中, 以 100V 跑電泳, 完成後取出 gel。

#### D. 蛋白質轉印法：

將 PVDF 膜以 methanol 浸泡, 取出轉印夾打開平放, 放上海綿

墊後鋪上一張濾紙後，疊上 PVDF 膜後再放上 gel 再鋪一張濾紙及海綿，裝有轉印緩衝液的轉印槽中，以 400 mA 轉印二小時，即可取出轉印完成的 PVDF 膜，在室溫中以 5% 的脫脂牛奶 blocking 一小時後即可加上一抗抗體於室溫下反應一小時，以 TBS-T 溶液清洗 3 次 (15 分鐘)，再加入二抗抗體室溫下反應一小時，再以 TBS-T 溶液清洗 3 次 (15 分鐘)，依 membrane 大小，加入適量的 ECL kit solution I 與 II 等比例的均勻混和液。反應後以 X-ray film 感光。

## (五) 細胞存活率分析 (MTT assay)

### A. 試劑：

MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylterazolium bromide ]  
working solution (1mg/ml)

### A. 原理：

活細胞中的 mitochondrial dehydrogenase 會將黃色的 MTT (1 mg/ml)，轉換成不溶性的紫色的 formazan，而死細胞並不會造成如此改變。故可由此以 MTT assay 測定細胞存活率或增殖作用的方法。

### B. 步驟：

在 96 well 中種下 1000 顆人類軟骨肉瘤細胞後待九成滿後，加入



抑制劑或是加入不同濃度的 CCN3 ( 10、30、100 ng/ml ) 後，37°C incubator 培養 48hrs 後，以 PBS 清洗二次後加入 50 $\mu$ l 的 MTT solution 放置 37°C incubator 反應 30 分鐘 (避光) ，吸去多餘 MTT 後加入 DMSO 150  $\mu$ l 避光 30 分鐘後，以波長 570 nm 測定吸光值。

## (六) 細胞移行分析 (Migration assay)

利用 Transwell (Costar, Corning Life Science, Acton, MA; pore size, 8 $\mu$ M) ，將其放置於 24 well 中使用。在每個 transwell 中種入以不同的抑制劑包括：Ly294002、Akt inhibitor、PDTC、TPCK、NF- $\kappa$ B inhibitor peptide 及 wortmannin 處理 30 分鐘或前一天使用細胞轉染法送入 MMP-13 siRNA、FAK si-RNA、FAK mutant、p85 mutant、Akt mutant、IKK $\alpha$  mutant 及 IKK $\beta$  mutant 後，將 15000 顆細胞與 200  $\mu$ l sermu-free 培養液放於 transwell 的上層，而下層為放置 300  $\mu$ l 含有 CCN3 的 sermu-free 的培養液。之後放入 37°C incubator 培養 16 至 18 個小時後，使用 1% formaldehyde 固定 5 分鐘並用 0.05% crystal violet 染色 30 分鐘後，使用 PBS 清洗多餘的染劑後以棉花棒拭去 PBS 並移除上層細胞後，以顯微鏡觀察行至下層貼附的細胞並計算其數量，重複實驗達三次以上。

## (七) 細胞轉染法

使用 lipofectamine 2000 轉染法，把 1  $\mu\text{l}$ /well 的 DNA 質體或 siRNA (short interfering RNA) 放於 1.5 ml 的離心管中，加入 49  $\mu\text{l}$  的 serum-free medium，另外準備含有 2  $\mu\text{l}$ /well 的 lipo-2000 加入 48  $\mu\text{l}$  的 serum-free medium 後，分別靜置 5 分鐘，取 50  $\mu\text{l}$  lipo-2000 serum-free medium 的混合溶液加入至含有 DNA 質體的 1.5 ml 的離心管中，均勻混合後靜置 25 分鐘，將 well 換成體積為 900  $\mu\text{l}$  的 serum-free medium 後加入 100  $\mu\text{l}$  的 plasmid/lipo-2000 質體混合液，使其總體積為 1 ml，輕晃 well 使溶液均勻分佈，放置 37°C incubator 培養 16~24 小時後可依不同的實驗所需而再做處理或直接將細胞收起待測。

## (八) 全量 RNA 抽取

取出已經完成轉染或是加入抑制劑及 CCN3 的 6 well，使用 PBS 清洗一次後加入 0.5ml 的 TRIzol reagent (Invitrogen Corporation, California, USA)，反應 5 分鐘後把細胞收到 1.5 ml 的離心管中，加入 100  $\mu\text{l}$  的 chloroform 並劇烈搖晃 1 分鐘後靜置 3 分鐘後，離心 1100 rpm，15 分鐘，將上清液到新的離心管中加入 500  $\mu\text{l}$  isopropyl alcohol 反應 10 分鐘，離心 1100 rpm，10 分鐘，去除上清液後加入 1 ml 75% 酒精，離心 7500 rpm，5 分鐘，風乾後使用 DEPC 水回溶。

## (九) Complementary DNA, cDNA 反轉錄作用

已經定量好的 RNA 使用 M-MLV-RT kit (Invitrogen, Epicentre biotechnologies, Wisconsin, USA) 將 total RNA 轉成 complementary DNA。

步驟：

1.

DEPC 水	9 $\mu$ l
oligo dT	1 $\mu$ l
dNTP	1 $\mu$ l
RNA	1 $\mu$ g

總體積 12  $\mu$ L。混合後放於 PCR 加熱器 65°C，5 分鐘、4°C，1 分鐘，接著置於冰上。

2.

5X First-strand Buffer	4 $\mu$ l
0.1M DTT	2 $\mu$ l

混合後置於 PCR 加熱器 37°C，2 分鐘，接著置於冰上。

3.

M-MLV	1 $\mu$ l
-------	-----------

混合後放於 PCR 加熱器 37°C，50 分鐘、70°C，15 分鐘後即得到 cDNA。可儲存於 -20°C 以備用。

## (十) RT-PCR

(Real-time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

### A. 原理：

利用進行 PCR 同步偵測 PCR 產物隨著反應增加的狀況 (即為 “Real-time”) 利用所偵測到的產物回推原樣品中的基因表現量。而 Real-time PCR 可分為兩大類：TaqMan 及 SYBR<sup>®</sup>GreenER<sup>™</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA)。而本研究是使用相對定量 SYBR<sup>®</sup>GreenER<sup>™</sup> 的原理是先設計一個 primer，而此 primer 是設計在我們要的一段 DNA 序列中，可以用來與單股 DNA 黏合，藉由 SYBR<sup>®</sup>GreenER<sup>™</sup> qPCR SuperMix 在 PCR 過程中，與下列 DNA 序列黏合的 primer (MDBio Inc)。

### B. primer：

#### MMP-1：

(sense) 5'-CGACTCTAGAAACACAAGAGCAAGA-3'  
(antisense) 5'-AAGGTTAGCTTACTGTCCACACGCTT-3'

#### MMP-2：

(sense) 5'-GTGCTGAAGGACACACTAAAGAAGA-3'  
(antisense) 5'-TTGCCATCCTTCTCAAAGTTGTAGC-3'

#### MMP3：

(sense) 5'-GTTAGGAGAAAGGACAGTGGTCCTG-3'  
(antisense) 5'-GGCATAGGCATGGGCCAAAACATT-3'

#### MMP-9：

(sense) 5'-CACTGTCCACCCCTCAGAGC-3'  
(antisense) 5'-GCCACTTGTTCGGCGATAAGC-3';

**MMP-13 :**

(sense)5'-TGCTCGCATTCTCCTTCAGGA-3'  
(antisense) 5'-ATGCATCCAGGGGTCTCCTGGC-3'

**Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) :**

(sense)5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'  
(antisense) 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

**C. 步驟 :**

配製 mixture solution :

cDNA (10-100ng)	0.7-1 $\mu$ l
SYBR <sup>®</sup> GreenER <sup>™</sup> SuperMix	5 $\mu$ l
primer R (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
primer F (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l

混合後將樣本置於 Applied Biosystems Inc prism 7900 (ABI prism 7900, CA, USA) 進行相對定量分析，隨著 PCR 產物的增加，信號也會隨著增強，因此可以做相對定量的分析。

**(十一) Luciferase 活性測定**

取出已經完成轉染或是加入抑制劑及 CCN3 的 12 well ，加入 PBS 清洗二次後，加入 report lysis buffer 刮下細胞後在冰上靜置 10 分鐘，以 13200 rpm 離心 3 分鐘後，取出上清液 20  $\mu$ l 置於 96 well 的

白盤中並加入 80  $\mu$ l 的 luciferase substrate 混合後，以冷光儀測定 luciferase 活性，所得的數值以百分率換算後表示。

## (十二) Gelatin zymography

### A. 試劑：

#### 1. Non-reduced sample buffer：

Stacking buffer (PH=6.8 , 0.5M Tris-HCl)	7.8 ml
SDS	2.5 g
Glycerol	14.36 ml

加水至 50 ml，加 bromophenol blue (有變藍即可)。

#### 2. Tris-HCl (500mM)

Tris	30 g
------	------

加水至 500 ml，PH=7.5。

#### 3. Coomassie blue：

0.125% Coomassie blue	0.125 g
40% MeOH	40 g
10% Acetic acid	10 ml

加水至 100 ml。

#### 4. Coomassie blue destain buffer：

40% d.d.H <sub>2</sub> O	200 ml
50% MeOH	250 ml
10% Acetic acid	50 ml



## 5. Gelatin gel :

d.d.H <sub>2</sub> O	6.03 ml
1.5M Tris-HCl (PH=8)	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml
30% Polyacrylamide	2.83ml
Gelatin (20mg/ml)	0.5 ml
AP	0.15 ml
TEMED	0.009 ml

## 6. Develop buffer composition :

Tris-HCl (50mM , PH=7.5)	50 ml
10mM ZnCl <sub>2</sub>	5 μl
1M CaCl <sub>2</sub>	0.25 ml
Triton-100X	0.5 ml
10% NaN <sub>3</sub>	0.1 ml

## B. 步驟：

將配製好的膠注入架好的膠台中，sample 加 non-reduced sample buffer 後注入 well 中以 100V 跑電泳，完成後把膠取出先以 d.d.H<sub>2</sub>O 清洗兩次去除多餘的 SDS 後，再置於 [Tris-HCl (50mM , PH=7.5) + 2.5% Triton-100] 室溫下反應 30 分鐘，再放入 Tris-HCl (50mM , PH=7.5) 中清洗兩次，一次 15 分鐘，目地在於恢復 MMPs 的活性。

將膠放入 develop buffer composition buffer 中於 37<sup>0</sup>C , 50 rpm 的培養箱內，約 15 小時後。膠用 coomassie blue 染色約一小時後再使用

coomassie blue destain buffer 退到可以看的到 band 即可封膠。

### (十三) 統計分析

處理組與控制組的數據間，係採用 Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ，判定是否有統計上差異，數據結果以 Mean $\pm$ S.M. 表示各項數據。



## 第四章 結果

### 一、 CCN3 會促進人類軟骨肉瘤細胞的移動性

一般癌症細胞會先有移行的能力之後，才會進行轉移作用 (Metastasis)，由於 CCN3 具有調節細胞骨架的重組與促進其他癌細胞的移動能力，因此推估 CCN3 可能會改變細胞的移行性，實驗的目的地為處理不同的濃度的 CCN3 (0, 10, 30, 100 ng/ml) 後，利用 transwell migration assay 在固定時間 (16 小時) 觀察 CCN3 對於人類軟骨肉瘤細胞有無移動性，結果發現在處理 30 ng/ml 的濃度時細胞的移動情形最為顯著 (Fig. 6A)。而有文獻指出 CCN3 會抑制癌細胞生長 (Proliferation)，因此在本實驗中使用 MTT assay 去偵測 CCN3 對於人類軟骨肉瘤細胞的增生程度以及確認細胞的移動性，而由實驗結果發現不同的 CCN3 濃度對於人類軟骨肉瘤細胞的存活率並沒有統計上的意義，表示了 CCN3 會促進人類軟骨肉瘤細胞的移動性，但不影響細胞存活率 (Fig. 6B)。

### 二、 CCN3 會造成人類軟骨肉瘤細胞之 MMP-13 的大量表現

細胞的轉移性和細胞所分泌的 MMPs 存有很大的關聯性，所以在實驗中使用了 RT-PCR、Western blotting 以及 gelatin-zymography 分析細胞所分泌之 MMP 的表現量以及活性，

觀察在處理 CCN3 後是否會影響細胞分泌 MMP 及種類。有文獻指出在人類的癌症細胞中其 MMP -1、-2、-3、-9 和-13 的表現與腫瘤惡性程度及轉移作用有關 (Egeblad and Werb, 2002; Tan et al., 2009)。所以實驗先以 RT-PCR 去篩選其 MMP -1、-2、-3、-9 和-13 的表現，發現當以 CCN3 處理人類軟骨癌 24 小時之後，以 MMP-13 mRNA 的表現量最為顯著 (Fig. 7A)。接著處理 CCN3 不同時間後 (0、6、12、24 小時) 後，使用 Western blotting 及 gelatin-zymography 的方法觀察 MMP-13 蛋白質表現與活性，結果指出 MMP-13 都有 time-dependent 的現象 (Fig. 7B)。除此之外，我們更進一步的使用 MMP-13 si-RNA 來證明 MMP-13 是主要影響人類軟骨肉瘤細胞的移動性 (Fig. 7C)，接著使用西方墨點法證明，轉染 MMP-13 si-RNA 有成功 (Fig. 7D)。由結果指出 CCN3 可以造成人類軟骨肉瘤細胞產生 MMP-13 進而造成細胞的移動性。

### 三、 CCN3 透過 $\alpha\beta3$ 及 $\alpha\beta5$ integrin receptor 造成人類軟骨肉瘤細胞移行

文獻指出 CCN3 會透過  $\alpha5\beta1$ 、 $\alpha\beta3$  及  $\alpha\beta5$  integrin receptor 調控細胞的移動性與附著力。於是我們假設  $\alpha5\beta1$ 、 $\alpha\beta3$  及  $\alpha\beta5$  integrin receptor 參與在 CCN3 影響人類軟骨肉瘤細胞的移動過

程中。首先使用  $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$  及  $\alpha v\beta 5$  的抗體 30 分鐘之後，再加入 CCN3，24 小時後收集細胞利用 Western blotting 觀察 MMP-13 的蛋白質表現，發現細胞若先處理  $\alpha v\beta 3$  及  $\alpha v\beta 5$  的抗體後會抑制 CCN3 產生 MMP-13 (Fig 8A)。另一方面使用 migration assay 及 RT-PCR 分析，同樣先在細胞中處理  $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$  及  $\alpha v\beta 5$  的抗體 30 分鐘之後，再加入 CCN3，在 migration assay 的結果中發現先處理  $\alpha v\beta 3$  及  $\alpha v\beta 5$  抗體的細胞移行能力會明顯下降 (Fig. 8B)，另外 RT-PCR 的結果也顯示當細胞處理  $\alpha v\beta 3$  及  $\alpha v\beta 5$  抗體後，造成 MMP-13 的表現量明顯下降 (Fig. 8C)，另外由於 integrin 主要藉由辨識 ligand 上的 RGD (Arg-Gly-Asp) 序列而做結合，額外使用 RGD peptide 加以確認，由於它可以阻斷 integrin 與 ligand 的結合。而 RGD 可以阻斷 CCN3 所增加 MMP-13 表現，但 RAD 沒有此作用 (Fig. 8C)。綜合以上結果得知 CCN3 促進人類軟骨肉瘤細胞移行與分泌 MMP-13 是透過  $\alpha v\beta 3$  及  $\alpha v\beta 5$  integrin receptor。

#### 四、 FAK 參與在人類軟骨肉瘤細胞移行之中

文獻指出 Focal adhesion kinase (FAK) 是一種存於細胞質中的 non-receptor protein tyrosine kinase，分子量大約為 125kDa，當細胞經由 integrin 附著於細胞外基質蛋白的時後，FAK 會很快的



被激活，進而與其他訊息分子作用，因此 FAK 被認為在 integrin 所調節的訊息傳遞過程中，扮演重要的角色。使用 Western blotting 觀察給予 CCN3 刺激經過不同的時間 (0、10、15、30、60、120 分鐘) 其 FAK (tyr397) 的活性，發現 FAK 的磷酸化是短暫性的，大約在 10 分鐘到 30 分鐘之間達到高峰後，在一小時便快速下降 (Fig. 9A)。此外轉染人類軟骨肉瘤細胞 FAK si-RNA 和 FAK mutant 24 小時後加入 CCN3 刺激，利用 migration assay 以及 RT-PCR 的方法分析 (Fig. 9B、9C)，都可觀察到人類軟骨肉瘤細胞的移行能力與 MMP-13 的產生都有明顯的抑制作用。從結果中得知 FAK 的活化參與在 CCN3 的作用中。

##### 五、 PI3K/Akt 參與在人類軟骨肉瘤細胞移行中

由 integrin 所調節的訊息傳遞路徑有 PI3K/Akt 所參與，或是其他路徑如：ERK、JNK 及 MEK/MAPK。所以一開始我們先使用 Western blotting 觀察在給予細胞 CCN3 後其路徑蛋白的磷酸化表現。當給予人類軟骨癌細胞 CCN3，10 分鐘之後，PI3K 的磷酸化有顯著的增加 (Fig. 10A)，因此先著重在 PI3K/Akt 這條路徑。當給予軟骨肉瘤細胞 PI3K 抑制劑 (Ly294002 及 wortmannin) 30 分鐘，或是轉染 PI3K mutant (p85) 24 小時後，進行 migration assay



及 RT-PCR，可觀察到人類軟骨肉瘤細胞的移行能力與 MMP-13 的產生都有明顯的抑制作用 (Fig. 10B、10C、10D、10E)。因此 PI3K 活化參與在 CCN3 之作用中。接下來討探 Akt 是否也參與在其中，進一步給予細胞 Akt 的抑制劑 (Akt inhibitor) 30 分鐘，或是轉染 Akt mutant 24 小時後，使用 migration assay 及 RT-PCR 觀察到人類軟骨肉瘤細胞的移行能力與 MMP-13 的產生都有明顯的抑制作用 (Fig. 11B、11C、11D、11E)。因此 Akt 活化參與在 CCN3 之作用中。

#### 六、 NF- $\kappa$ B 參與在由 CCN3 調控增加人類軟骨肉瘤細胞移行中

之前的研究指出當 CCN family 在誘發細胞轉移時會透過 NF- $\kappa$ B 轉錄因子 (Lin et al., 2004)。在此為了探討人類軟骨肉瘤細胞是否會對 CCN3 所誘發的 NF- $\kappa$ B 產生調控作用，首先使用 Western blotting 觀察在給予細胞 CCN3 刺激經過不同的時間 (0、10、15、30、60、120 分鐘) 後其 IKK $\alpha/\beta$ 、I $\kappa$ B 蛋白質的磷酸化表現，實驗結果指出其磷酸化的表現有呈現 time-dependent 的現象 (Fig. 12C)。接著給予細胞 NF- $\kappa$ B inhibitor (PDTC、TPCK 及 NF- $\kappa$ B inhibitor peptide) 30 分鐘，或是使用轉染 IKK $\alpha$  及 IKK $\beta$  mutant 24 小時後，利用 migration assay 及 RT-PCR 觀察，發現當

處理 NF- $\kappa$ B 抑制劑與 mutant 時，人類軟骨肉瘤細胞的移行能力與 MMP-13 的產生都有明顯的抑制作用 (Fig. 12A、12B、12D、12E)。更進一步將人類軟骨肉瘤細胞轉染入  $\kappa$ B-luciferase 當作 NF- $\kappa$ B 活性的指標因子，由實驗結果顯示，當細胞處理 PI3K inhibitor (Ly294002 及 wortmannin)、Akt inhibitor 和 NF- $\kappa$ B inhibitor (PDTC、TPCK 及 NF- $\kappa$ B inhibitor peptide) 都能降低由 CCN3 所誘發的 NF- $\kappa$ B 活性 (Fig. 13A、13B)。另外，將人類軟骨肉瘤細胞一同轉染入 p85、Akt、IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$  mutant 也能抑制 NF- $\kappa$ B 轉錄因子的活性。綜合以上的結果得知 NF- $\kappa$ B 參與在 CCN3 調控人類軟骨肉瘤細胞的路徑中。



## 第五章 討論

腫瘤細胞會藉由分泌MMPs，使得腫瘤細胞會穿過細胞外基質，隨著血液或淋巴系統侵入身體其他部位的組織或器官 (Bremnes et al., 2002; Page-McCaw et al., 2007) 後，腫瘤細胞會大量增生造成正常細胞無法得到充足的養分而導至正常組織器官的功能減弱，這也是造成癌症病人死亡的重要因素之一。軟骨肉瘤具有轉移的潛在能力，加上軟骨肉瘤對於化學或放療的治療效果並不好，以及缺乏有效的輔助療法，使得大多數的軟骨肉瘤病人預後能力差、更會有復發及轉移的可能性。因此若能從中瞭解軟骨肉瘤轉移過程的分子機制，或許可以提供未來關於治療軟骨肉瘤轉移之有效方法 (Fong et al., 2007)。文獻指出在人類的癌症細胞中其MMP-1、-2、-3、-9和-13的表現與腫瘤惡性程度及相關轉移作用有關。因此本實驗的目地在於探討人類軟骨肉瘤細胞轉移的機制路徑，更進一步的討論是那一種的MMP參與在其中，由實驗結果得知，CCN3會造成人類軟骨肉瘤細胞產生大量的MMP-13。MMP-13是關節疾病中導至軟骨退化的重要因子之一，而當軟骨出現問題時，可能會造成多種的骨骼疾病，而其中內生性軟骨瘤還有可能會惡性轉化為軟骨肉瘤 (Yu et al., 2003)。所以我們認為MMP-13的功能除了能夠促進癌細胞的移動外，還可能會造成周圍正

常的軟骨細胞趨於惡化形成癌細胞。而研究MMP除了可以幫助瞭解腫瘤發生的過程外，希望可以從中去研究開發出抑制MMP作用的藥物來治療癌症病人，或許這會是降低病人癌症復發及轉移的可能性。

在先前的研究中發現CCN3會表現在正常組織，包括腎，神經系統，肺，肌肉，軟骨，但在腫瘤細胞中的表現鮮少為人知 (Manara et al., 2002)。加上有科學家 (Rudolf Virchow) 指出癌細胞除了自身具備的這些能力外，也會受到週遭細胞分泌的細胞激素、化學激素或生長因子來誘使它們向癌細胞聚集 (Coussens and Werb, 2002; DeNardo and Coussens, 2007)，並使它們表現表現出有利於腫瘤生長、轉移的形態，進而創造出一個適合腫瘤生長的微環境 (Joyce and Pollard, 2009)。由於CCN family可以當做integrin receptor的ligand，結合之後可以負責調控細胞間或細胞與細胞外基質的作用，接著影響細胞骨架形態、調控細胞生長、分化、移動、附著及傷口的修復，因此我們想知道CCN3是否會透過integrin receptor來造成人類軟骨肉瘤細胞的移動性以及CCN3與integrin receptor的關係。首先我們先是以transwell來確定在處理CCN3後人類軟骨肉瘤細胞的移動性，並利用處理integrin receptor的抗體得到的結果為CCN3透過 $\alpha\beta3$ 及 $\alpha\beta5$  integrin receptor調控人類軟骨肉瘤細胞的移行能力。

在過去的研究中指出CCN3可做為骨癌病人，例如：Ewing

sarcoma和osteosarcoma中，預後較差的指標因子 (Perbal et al., 2009; Perbal et al., 2008)，除此之外在Chronic Myeloid Leukaemia (CML) 及黑色素瘤 (Melanoma) 中，CCN3有被down-regulated的現象，其功能在於降低腫瘤細胞的侵犯能力與分泌MMPs蛋白質或是增加凋亡作用，有點類似腫瘤抑制因子的角色(Fukunaga-Kalabis et al., 2008; McCallum et al., 2009)，然而在骨癌細胞例如Ewing's sarcoma中會觀察到CCN3具有促進腫瘤的移行及侵犯能力，綜合以上的論點可以知道，CCN3於不同的組織中扮演著不同的角色 (Benini et al., 2005)。

近年來的文獻指出在一些惡性的腫瘤細胞中如：肺癌、乳癌、黑色素瘤、肝癌...等等，都可以觀察到NF- $\kappa$ B的大量表現。另外在in vitro的實驗中也証實了在許多不同的細胞型態中，細胞表面的integrin receptors與ligand結合活化後，啟動PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B的訊息傳遞。例如，內皮細胞在血管新生過程中可以經由 integrin  $\alpha\beta 3$ 透過NF- $\kappa$ B調控細胞的生存能力 (Scatena and Giachelli, 2002) 或是藉由活化NF- $\kappa$ B促進細胞的移動與侵犯能力 (Lin et al., 2004)。接著我們使用訊息傳遞抑制劑MMP-13 si-RNA、Ly294002、wortmannin、Akt inhibitor、NF- $\kappa$ B inhibitor (PDTC、TPCK及NF- $\kappa$ B inhibitor peptide)、p85 mutant、Akt mutant、IKK $\alpha$  mutant 及 IKK $\beta$  mutant後，都會抑制CCN3刺激人類軟骨肉瘤細胞的移行能力與MMP-13的產生。另一方



面使用 RGD peptide 及 RAG peptide 發現 RGD 會抑制 MMP-13 的產生，但給予 RAG peptide 時沒有顯著的差異，並配合使用冷光酵素活性測定觀察抑制劑與 mutant 對於細胞內 NF- $\kappa$ B 的活性，發現當處理抑制劑與 mutant 時都會降低 NF- $\kappa$ B 的活性。這些結果指出 CCN3 會經過  $\alpha$ v $\beta$ 3 及  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin receptor 調控人類軟骨肉瘤細胞的移行與分泌 MMP-13，是透過 PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B 這條路徑 (Fig. 14)。





## 第六章 結論

綜合以上的實驗結果，可以得到CCN3經由 $\alpha v\beta 3$ 及 $\alpha v\beta 5$  integrin receptor往下傳遞訊息，活化下游PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B這條路徑調控人類軟骨肉瘤細胞分泌MMP-13，進而調控人類軟骨瘤細胞的移行能力。



## 參考文獻

- Aigner, T., Soeder, S., and Haag, J. (2006). IL-1beta and BMPs--interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. *Eur Cell Mater* 12, 49-56; discussion 56.
- Benini, S., Perbal, B., Zambelli, D., Colombo, M.P., Manara, M.C., Serra, M., Parenza, M., Martinez, V., Picci, P., and Scotlandi, K. (2005). In Ewing's sarcoma CCN3(NOV) inhibits proliferation while promoting migration and invasion of the same cell type. *Oncogene* 24, 4349-4361.
- Blood, C.H., and Zetter, B.R. (1990). Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1032, 89-118.
- Cary, L.A., Chang, J.F., and Guan, J.L. (1996). Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J Cell Sci* 109 (Pt 7), 1787-1794.
- 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.
- Chow, W.A. (2007). Update on chondrosarcomas. *Curr Opin Oncol* 19, 371-376.
- Cockett, M.I., Murphy, G., Birch, M.L., O'Connell, J.P., Crabbe, T., Millican, A.T., Hart, I.R., and Docherty, A.J. (1998). Matrix metalloproteinases and metastatic cancer. *Biochem Soc Symp* 63, 295-313.
- Coussens, L.M., Fingleton, B., and Matrisian, L.M. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295, 2387-2392.
- Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860-867.
- Curran, S., and Murray, G.I. (1999). Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 189, 300-308.
- DeNardo, D.G., and Coussens, L.M. (2007). Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 9, 212.

Desgrosellier, J.S., and Cheresh, D.A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10, 9-22.

Duffy, M.J. (1996). Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin Cancer Res* 2, 613-618.

Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-174.

Fong, Y.C., Yang, W.H., Hsu, S.F., Hsu, H.C., Tseng, K.F., Hsu, C.J., Lee, C.Y., and Scully, S.P. (2007). 2-methoxyestradiol induces apoptosis and cell cycle arrest in human chondrosarcoma cells. *J Orthop Res* 25, 1106-1114.

Fukunaga-Kalabis, M., Martinez, G., Telson, S.M., Liu, Z.J., Balint, K., Juhasz, I., Elder, D.E., Perbal, B., and Herlyn, M. (2008). Downregulation of CCN3 expression as a potential mechanism for melanoma progression. *Oncogene* 27, 2552-2560.

Guo, W., and Giancotti, F.G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 816-826.

Holbourn, K.P., Acharya, K.R., and Perbal, B. (2008). The CCN family of proteins: structure-function relationships. *Trends Biochem Sci* 33, 461-473.

Hood, J.D., and Cheresh, D.A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2, 91-100.

Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.

Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9, 239-252.

Kanner, S.B., Reynolds, A.B., Vines, R.R., and Parsons, J.T. (1990). Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3328-3332.

Knauper, V., Lopez-Otin, C., Smith, B., Knight, G., and Murphy, G. (1996). Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 271, 1544-1550.

Kuzuya, M., and Iguchi, A. (2003). Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb* 10, 275-282.

Lin, C.G., Chen, C.C., Leu, S.J., Grzeszkiewicz, T.M., and Lau, L.F. (2005). Integrin-dependent functions of the angiogenic inducer NOV (CCN3): implication in wound healing. *J Biol Chem* 280, 8229-8237.

Lin, M.T., Chang, C.C., Chen, S.T., Chang, H.L., Su, J.L., Chau, Y.P., and Kuo, M.L. (2004). Cyr61 expression confers resistance to apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by a mechanism of NF-kappaB-dependent XIAP up-regulation. *J Biol Chem* 279, 24015-24023.

Lochter, A., Sternlicht, M.D., Werb, Z., and Bissell, M.J. (1998). The significance of matrix metalloproteinases during early stages of tumor progression. *Ann N Y Acad Sci* 857, 180-193.

Maillard, M., Cadot, B., Ball, R.Y., Sethia, K., Edwards, D.R., Perbal, B., and Tatoud, R. (2001). Differential expression of the *ccn3* (*nov*) proto-oncogene in human prostate cell lines and tissues. *Mol Pathol* 54, 275-280.

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.

Matrisian, L.M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14, 455-463.

McCallum, L., Lu, W., Price, S., Lazar, N., Perbal, B., and Irvine, A.E. (2009). CCN3: a key growth regulator in Chronic Myeloid Leukaemia. *J Cell Commun Signal* 3, 115-124.

McCawley, L.J., and Matrisian, L.M. (2000). Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today* 6, 149-156.

Nagase, H., and Woessner, J.F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274, 21491-21494.

Page-McCaw, A., Ewald, A.J., and Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and

the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 221-233.

Paulsson, M., Morgelin, M., Wiedemann, H., Beardmore-Gray, M., Dunham, D., Hardingham, T., Heinegard, D., Timpl, R., and Engel, J. (1987). Extended and globular protein domains in cartilage proteoglycans. *Biochem J* 245, 763-772.

Perbal, B. (2004). CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* 363, 62-64.

Perbal, B., Lazar, N., Zambelli, D., Lopez-Guerrero, J.A., Llombart-Bosch, A., Scotlandi, K., and Picci, P. (2009). Prognostic relevance of CCN3 in Ewing sarcoma. *Hum Pathol* 40, 1479-1486.

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.

Poole, A.R., Rizkalla, G., Ionescu, M., Reiner, A., Brooks, E., Rorabeck, C., Bourne, R., and Bogoch, E. (1993). Osteoarthritis in the human knee: a dynamic process of cartilage matrix degradation, synthesis and reorganization. *Agents Actions Suppl* 39, 3-13.

Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 697-715.

Scatena, M., and Giachelli, C. (2002). The alpha(v)beta3 integrin, NF-kappaB, osteoprotegerin endothelial cell survival pathway. Potential role in angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 12, 83-88.

Sin, W.C., Tse, M., Planque, N., Perbal, B., Lampe, P.D., and Naus, C.C. (2009). Matricellular protein CCN3 (NOV) regulates actin cytoskeleton reorganization. *J Biol Chem* 284, 29935-29944.

Sporn, M.B. (1996). The war on cancer. *Lancet* 347, 1377-1381.

Steeg, P.S. (2003). Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 3, 55-63.

Stetler-Stevenson, W.G. (1996). Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *Am J Pathol* 148, 1345-1350.

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  $\alpha$ 5 $\beta$ 3 integrin, FAK, ERK and AP-1-dependent pathway in human chondrosarcoma cells. *Carcinogenesis* 30, 258-268.

Van Wart, H.E., and Birkedal-Hansen, H. (1990). The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5578-5582.

Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6, 154-161.

Westhoff, M.A., Serrels, B., Fincham, V.J., Frame, M.C., and Carragher, N.O. (2004). SRC-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase couples actin and adhesion dynamics to survival signaling. *Mol Cell Biol* 24, 8113-8133.

Yang, G.P., and Lau, L.F. (1991). Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface. *Cell Growth Differ* 2, 351-357.

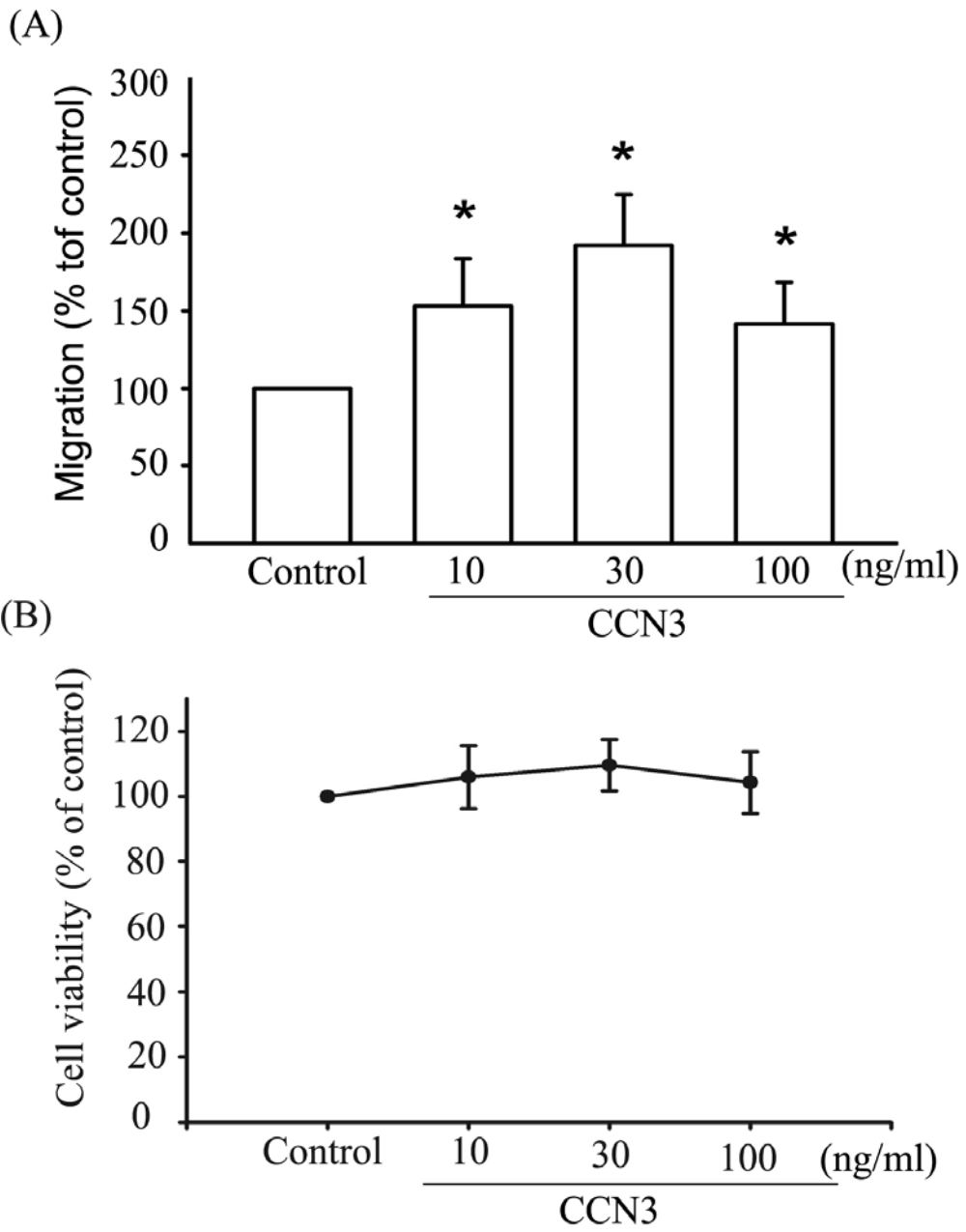
Yu, C., Le, A.T., Yeger, H., Perbal, B., and Alman, B.A. (2003). NOV (CCN3) regulation in the growth plate and CCN family member expression in cartilage neoplasia. *J Pathol* 201, 609-615.

Zeng, Z.J., Yang, L.Y., Ding, X., and Wang, W. (2004). Expressions of cysteine-rich61, connective tissue growth factor and Nov genes in hepatocellular carcinoma and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 10, 3414-3418.

Zhang, Z., Vuori, K., Wang, H., Reed, J.C., and Ruoslahti, E. (1996). Integrin activation by R-ras. *Cell* 85, 61-69.

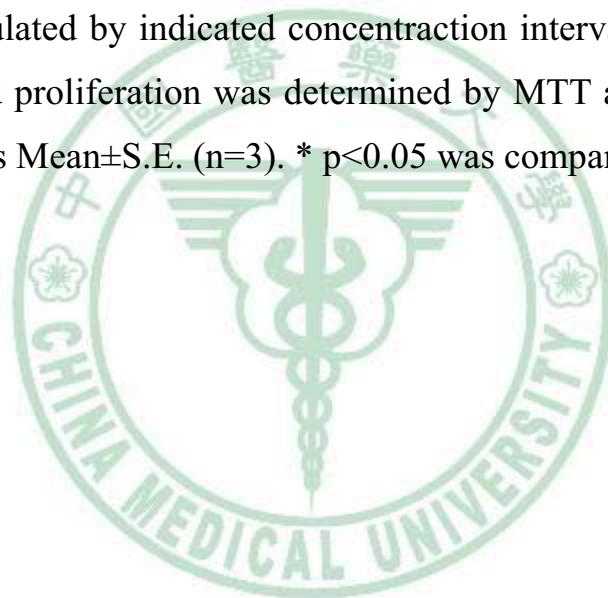


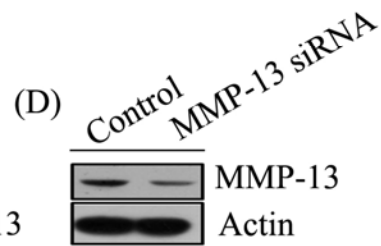
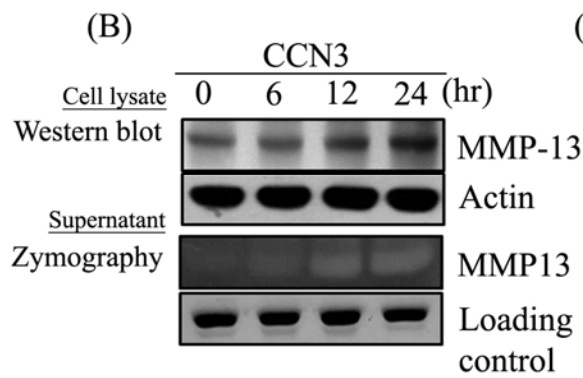
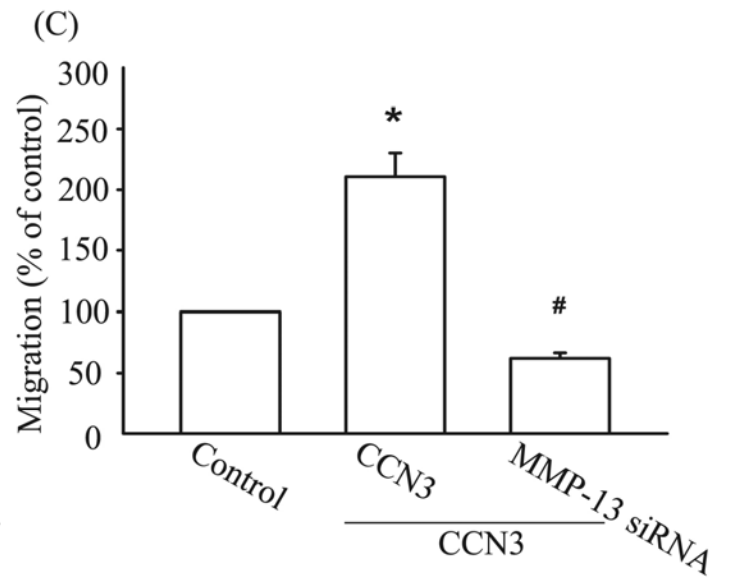
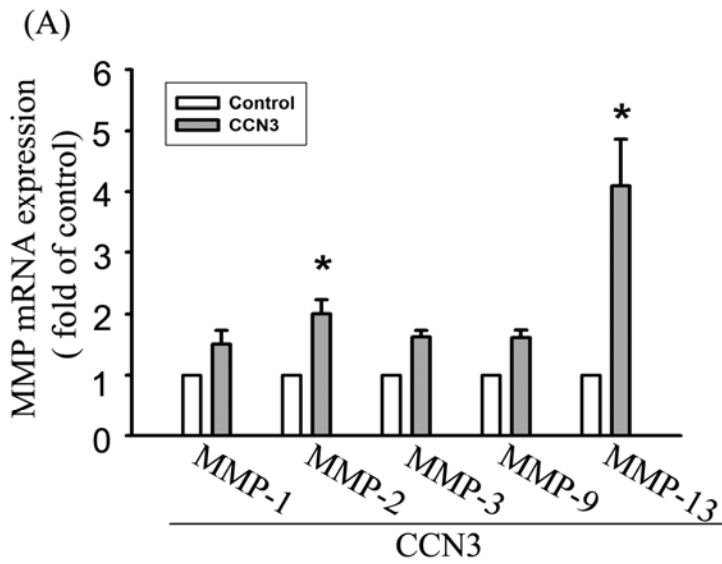
圖表



**Fig 6. CCN3 induced the migration activity of human chondrosarcoma cells.**

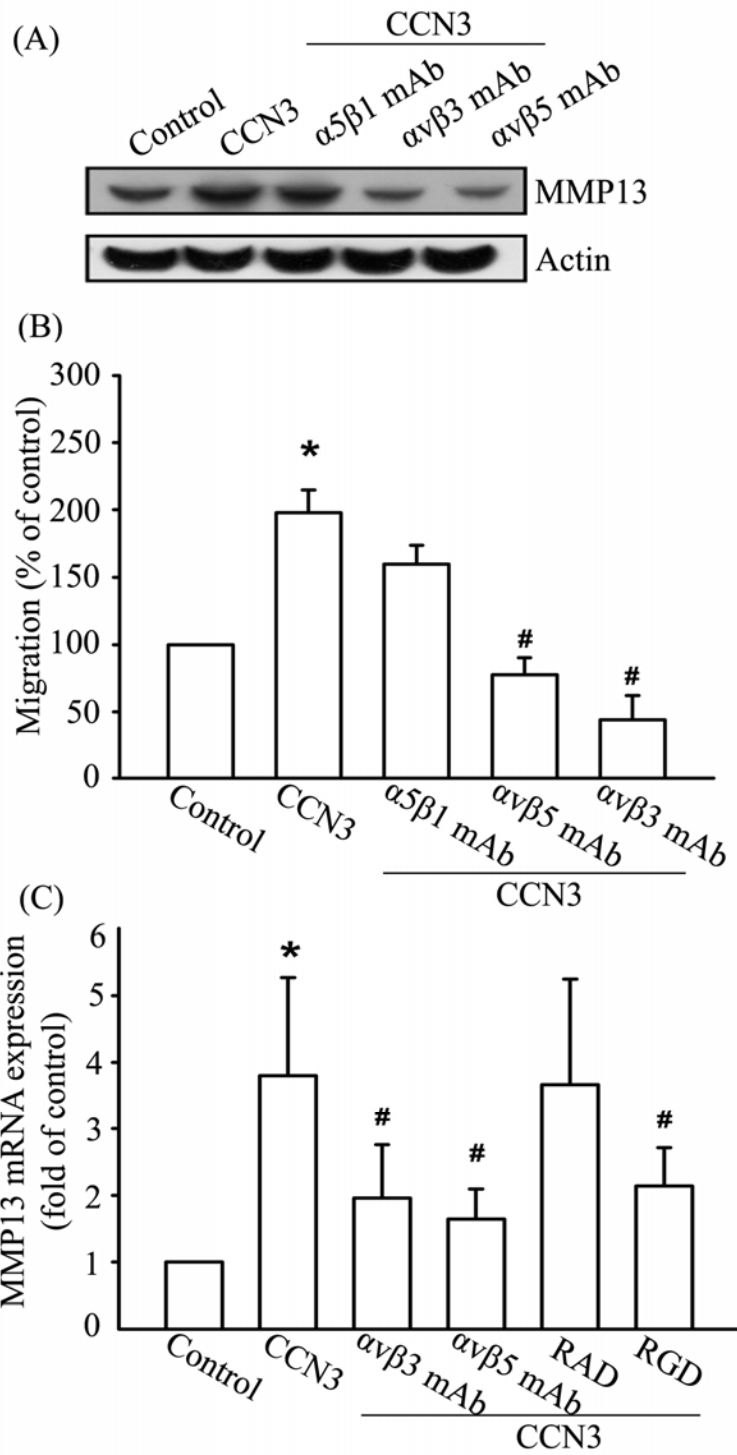
JJ012 cells were incubated with various concentrations of CCN3, and in vitro migration activities measured with the Transwell after 24 h showed that CCN3 (30 ng/ml) increased cell migration significantly (A). JJ012 cells were stimulated by indicated concentration intervals (0, 10, 30 and 100 ng/ml) and proliferation was determined by MTT assay (B). Results are presented as Mean±S.E. (n=3). \*  $p < 0.05$  was compared with control.





**Fig 7. CCN3-directed migration activity of human chondrosarcoma cells involves upregulation of MMP-13.**

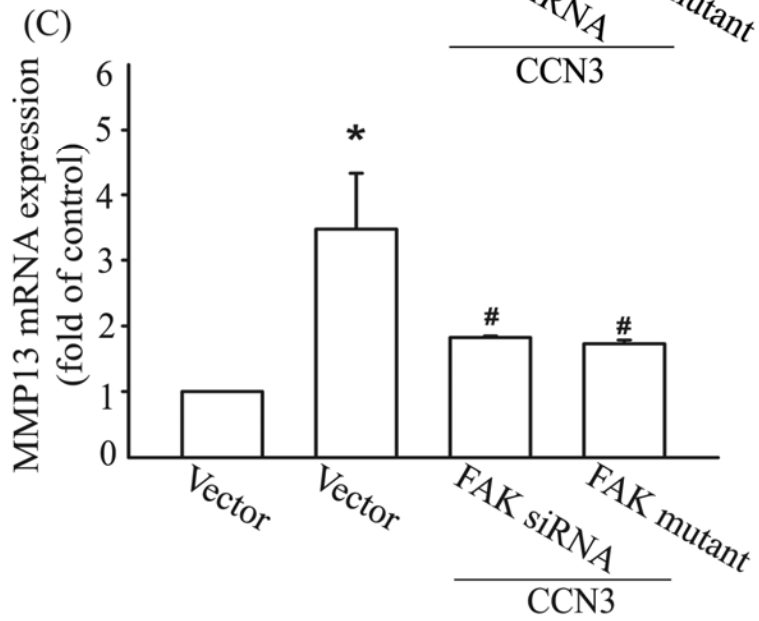
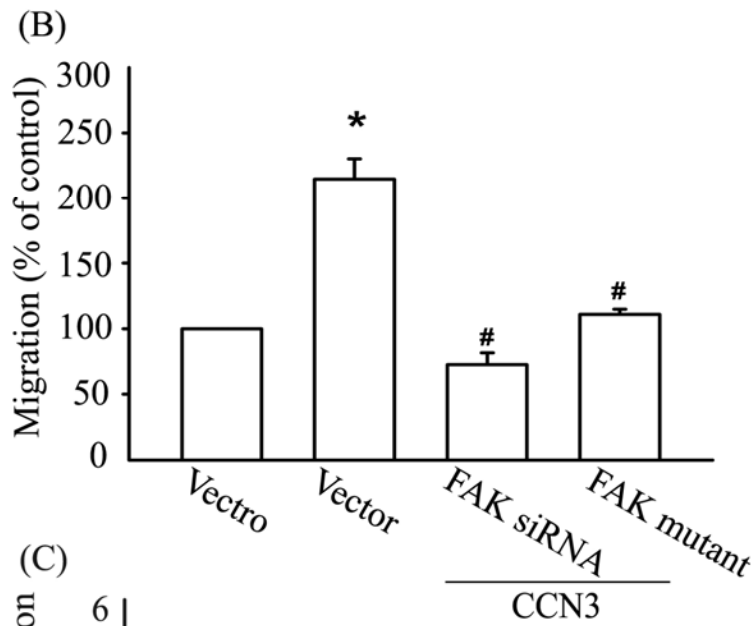
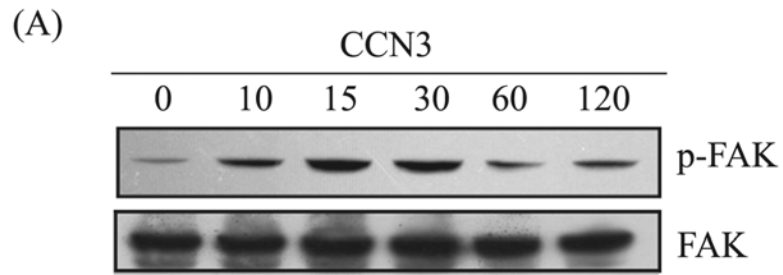
JJ012 cells were incubated with CCN3 (30 ng/ml) for 24h or for indicated time intervals, cell lysates were then collected and the mRNA level of MMP-1, -2, -3, -9 and -13 was determined using qPCR (A). Cells were incubated with CCN3 (30 ng/ml) for indicated time intervals .The cultured medium and cell lysates were then collected. Both the protein level of MMP-13 in cell lysates determined by Western blot analysis and the enzyme activity of MMP-13 in cell lysates and supernatant determined using zymography were increased in a time-dependent manner (B). Cells were transfected with MMP-13 or control siRNA for 24 h, and in vitro migration was measured with the Transwell after 24 h (C) Cells were transfected with MMP-13 or control siRNA for 24 h, and the mRNA and protein levels of MMP-13 were examined using Western blot analysis (D). Results are presented as Mean±S.E. (n=3). \* p<0.05 was compared with control. # p<0.05 was compared with CCN3.



**Fig 8. CCN3 increased human chondrosarcoma cells migration and MMP-13 expression through  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$  integrin receptor.**

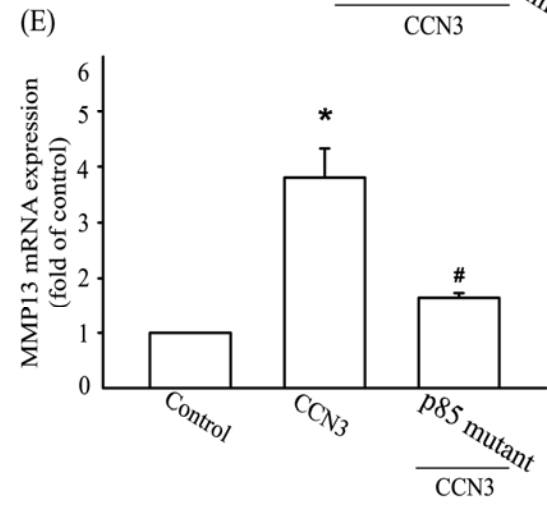
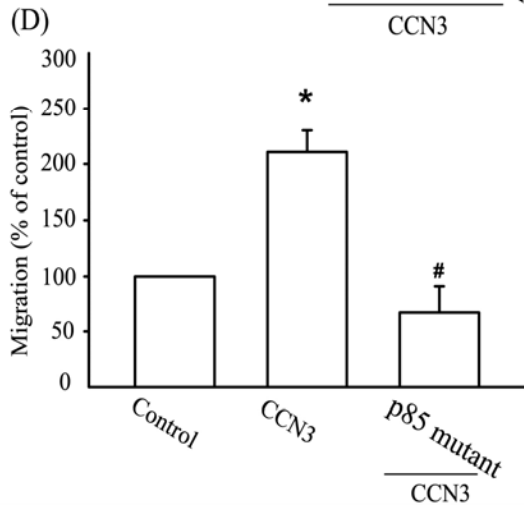
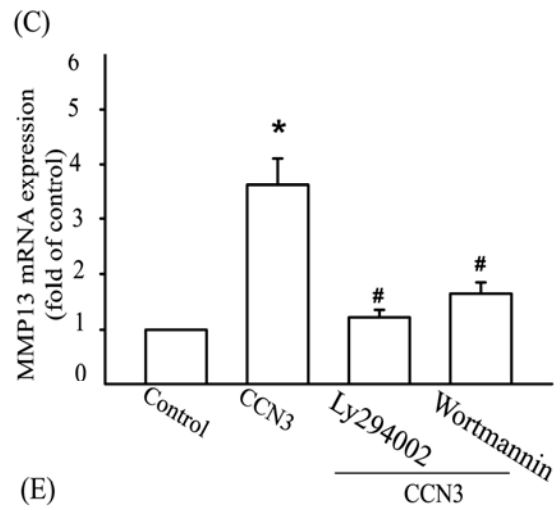
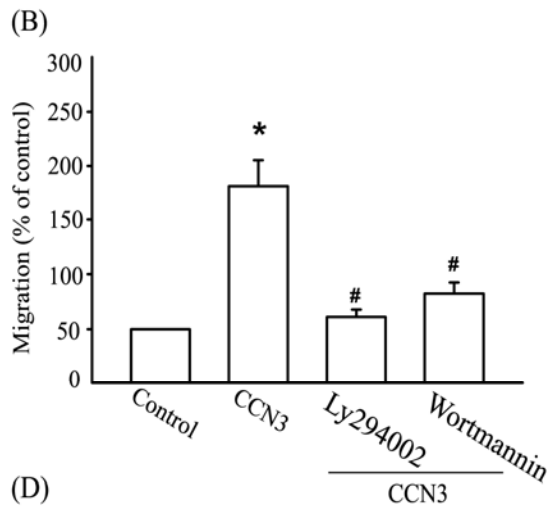
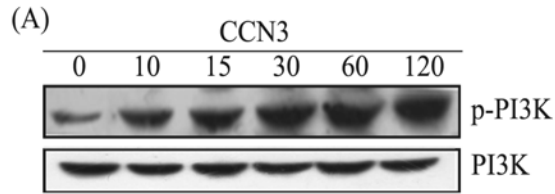
JJ012 cells were pretreated with  $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$  or  $\alpha v \beta 5$  antibody (5  $\mu\text{g/ml}$ ) after treating with CCN3 (30  $\text{ng/ml}$ ) for 24h, and MMP-13 expression was determined by Western blot analysis (A). JJ012 cells were pretreated with  $\alpha v \beta 3$  mAb (5  $\mu\text{g/ml}$ ),  $\alpha v \beta 5$  mAb (5  $\mu\text{g/ml}$ ) cyclic RGD (10 nM) and cyclic RAD (10 nM) for 30 min followed by stimulation with CCN3 (30  $\text{ng/ml}$ ). The in vitro migration activity measured after 24 h showed that  $\alpha v \beta 3$  mAb、 $\alpha v \beta 5$  mAb could inhibit the cell migration (C). The qPCR result show that  $\alpha v \beta 3$  mAb,  $\alpha v \beta 5$  mAb and cyclic RGD but not  $\alpha 5 \beta 1$  mAb and cyclic RAD could inhibit the MMP-13 expression (C). Results are presented as Mean $\pm$ S.E. (n=3). \*  $p < 0.05$  was compared with control. #  $p < 0.05$  was compared with CCN3.





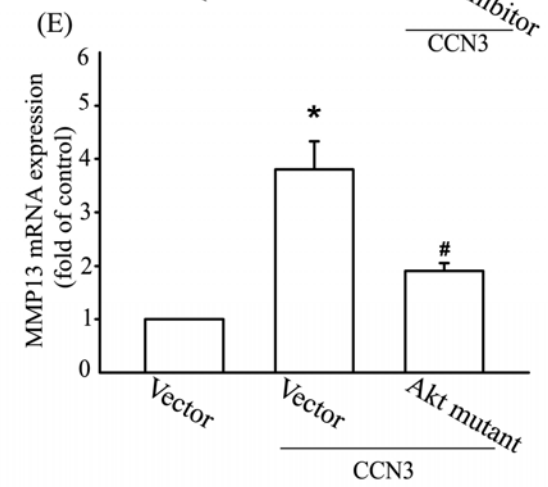
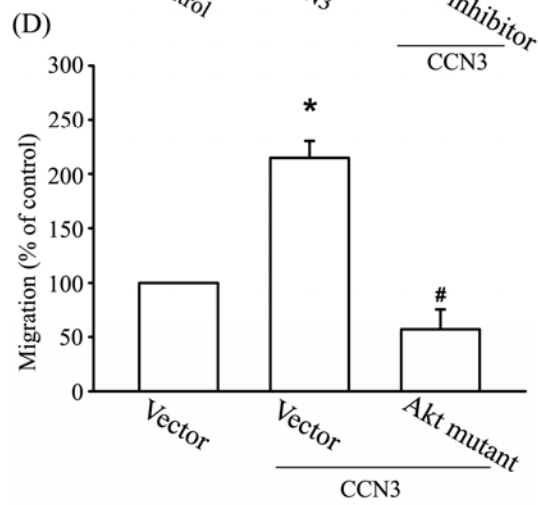
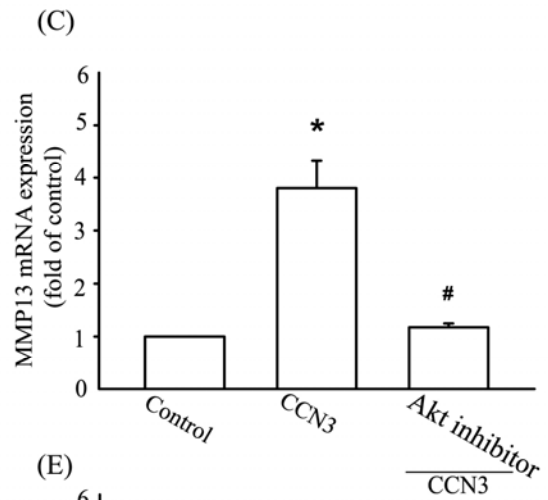
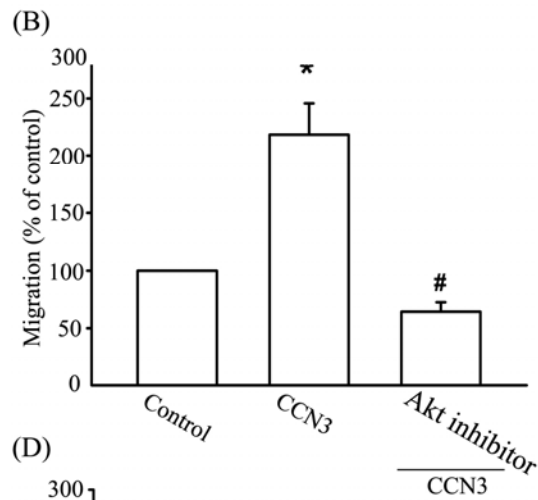
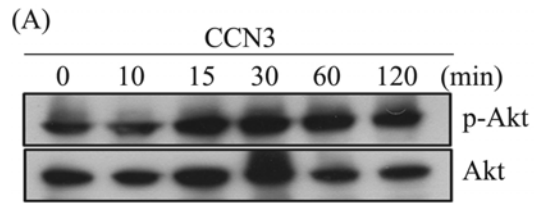
**Fig 9. Involvement of FAK-signaling pathway in response to CCN3 in chondrosarcoma cells.**

(A) JJ012 cells were incubated with CCN3(30 ng/ml) for indicated time intervals, and p-FAK expression was determined by Western blot analysis. Note that CCN3 activated the FAK pathway in JJ012 cells. (B) Cells were transfected with mutant and siRNA of FAK for 24 h followed by stimulation with CCN3 (30 ng/ml), and in vitro migration was measured with the Transwell after 24 h. (C) JJ012 cells were transfected with mutant of FAK for 24 h followed by stimulation with CCN3 (30 ng/ml), and the mRNA level of MMP-13 were determined by using qPCR. Results are presented as mean±S.E. (n=3). \* p<0.05 was compared with control. # p <0.05 was compared with CCN3.



**Fig 10. PI3K is involved in CCN3-mediated human chondrosarcoma migration and MMP-13 expression.**

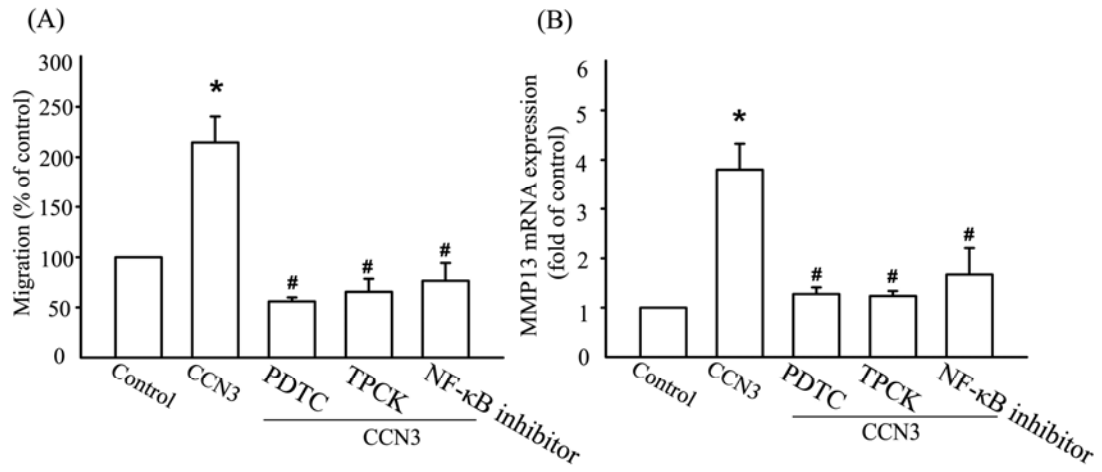
JJ012 cells were incubated with CCN3 (30 ng/ml) for indicated time intervals, and p-PI3K expression was determined by Western blot analysis (A). JJ012 cells were pretreated with Ly294002 (10 $\mu$ M) and wortmannin (10 $\mu$ M) for 30 min followed by stimulation with CCN3 (30 ng/ml) for 24 h, and in vitro migration was measured with the Transwell after 24 h (B). JJ012 cells were pretreated with Ly294002 (10 $\mu$ M) and wortmannin (10 $\mu$ M) for 30 min followed by stimulation with CCN3 (30 ng/ml) for 24 h, and the mRNA level of MMP-13 were determined by using qPCR (C). Cells were transfected with mutant of PI3K (p85) for 24 h followed by stimulation with CCN3 (30 ng/ml), and in vitro migration was measured with the Transwell after 24 h (D). JJ012 cells were transfected with mutant of PI3K (p85) for 24 h followed by stimulation with CCN3 (30 ng/ml), and the mRNA of MMP-13 were determined by using qPCR (E). Results are presented as mean $\pm$ S.E. (n=3). \* p<0.05 was compared with control. # p <0.05 was compared with CCN3.



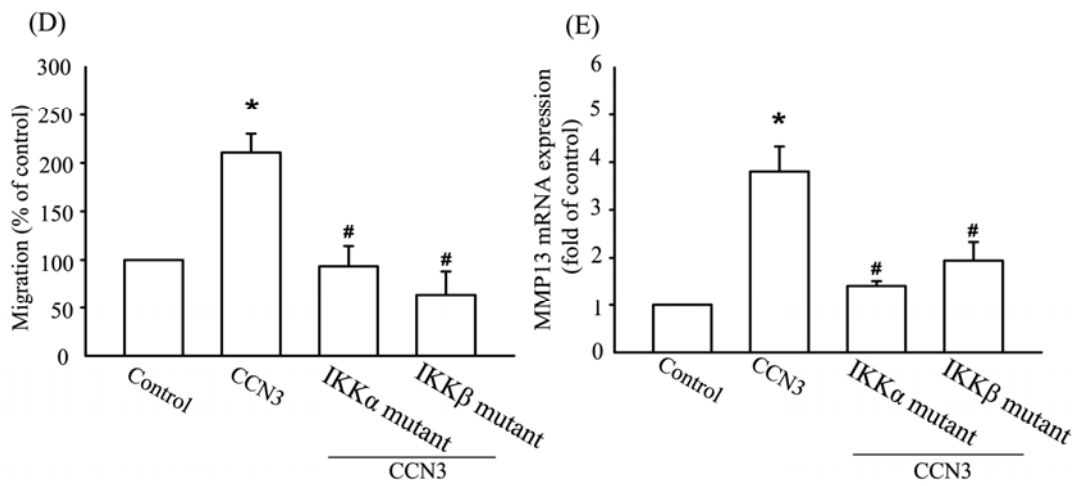
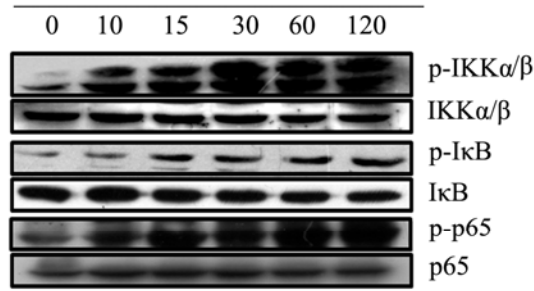
**Fig 11. Akt is involved in CCN3-mediated human chondrosarcoma migration and MMP-13 expression.**

JJ012 cells were incubated with CCN3 (30 ng/ml) for indicated time intervals, and p- Akt expression was determined by Western blot analysis (A). JJ012 cells were pretreated with Akt inhibitor (10  $\mu$ M) for 30 min followed by stimulation with CCN3 (30 ng/ml) for 24 h, and in vitro migration was measured with the Transwell after 24 h (B). JJ012 cells were pretreated with Akt inhibitor (10 $\mu$ M) for 30 min followed by stimulation with CCN3 (50 ng/ml) for 24 h, and the mRNA level of MMP-13 were determined by using qPCR (C). Cells were transfected with p85 mutant for 24 h followed by stimulation with CCN3 (30 ng/ml), and in vitro migration was measured with the Transwell after 24 h (D). JJ012 cells were transfected with p85 mutant for 24 h followed by stimulation with CCN3 (30 ng/ml), and the mRNA of MMP-13 were determined by using qPCR (E). Results are presented as Mean $\pm$ S.E. (n=3). \* p<0.05 was compared with control. # p<0.05 was compared with CCN3.



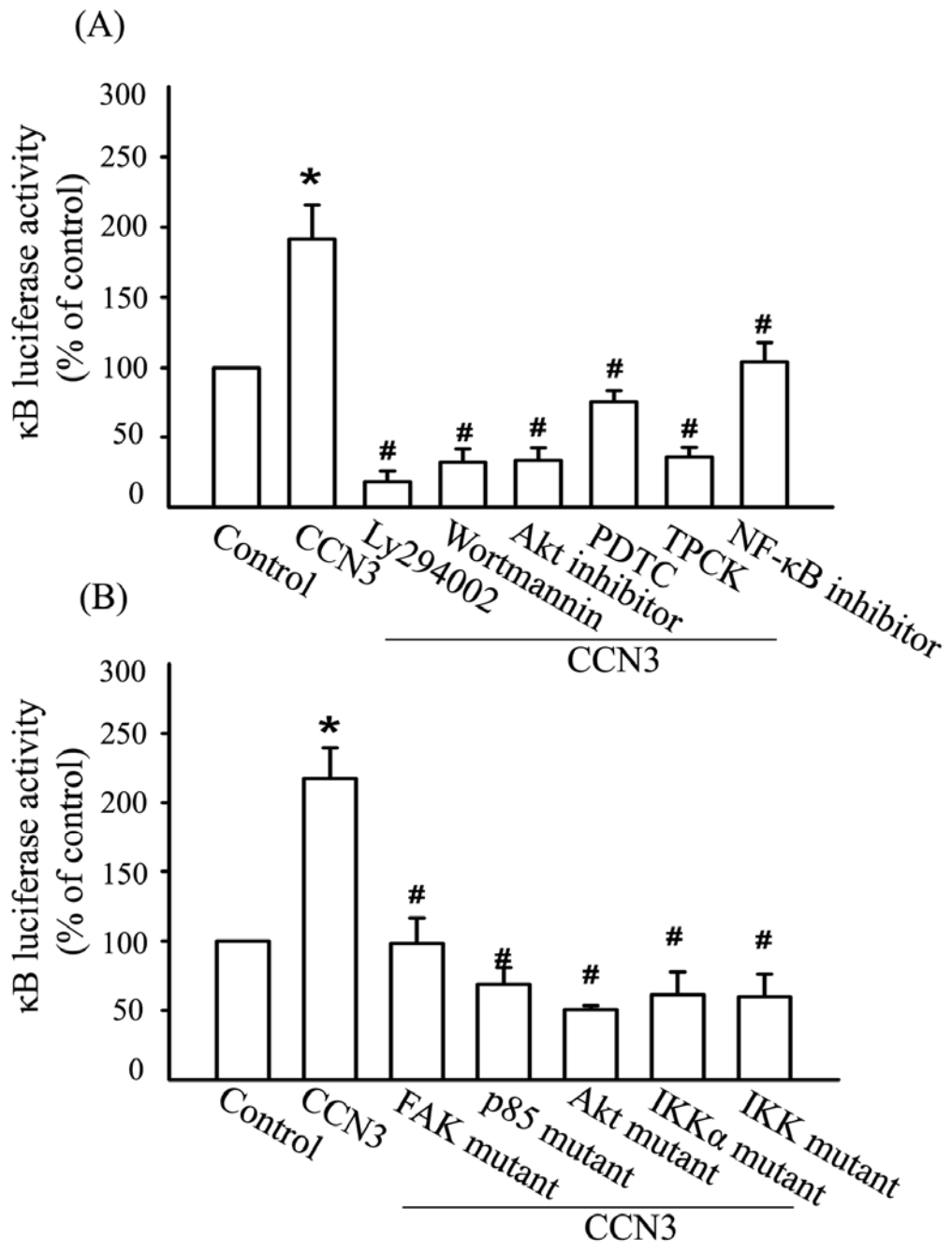


(C) CCN3



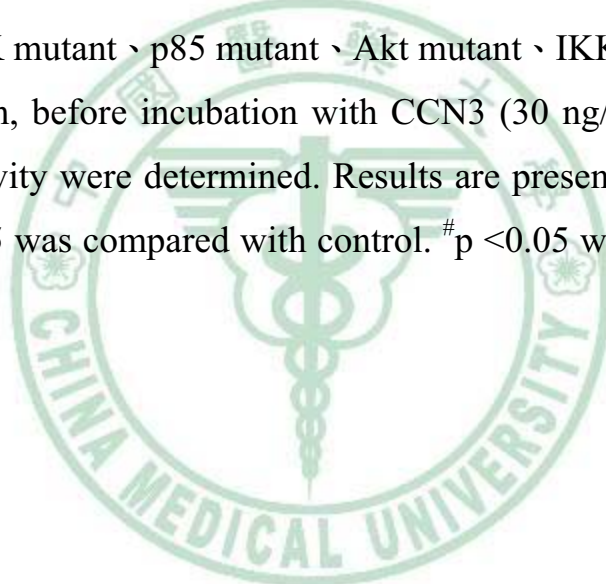
**Fig 12. NF- $\kappa$ B involved in CCN3-mediated human chondrosarcoma migration and MMP-13 expression.**

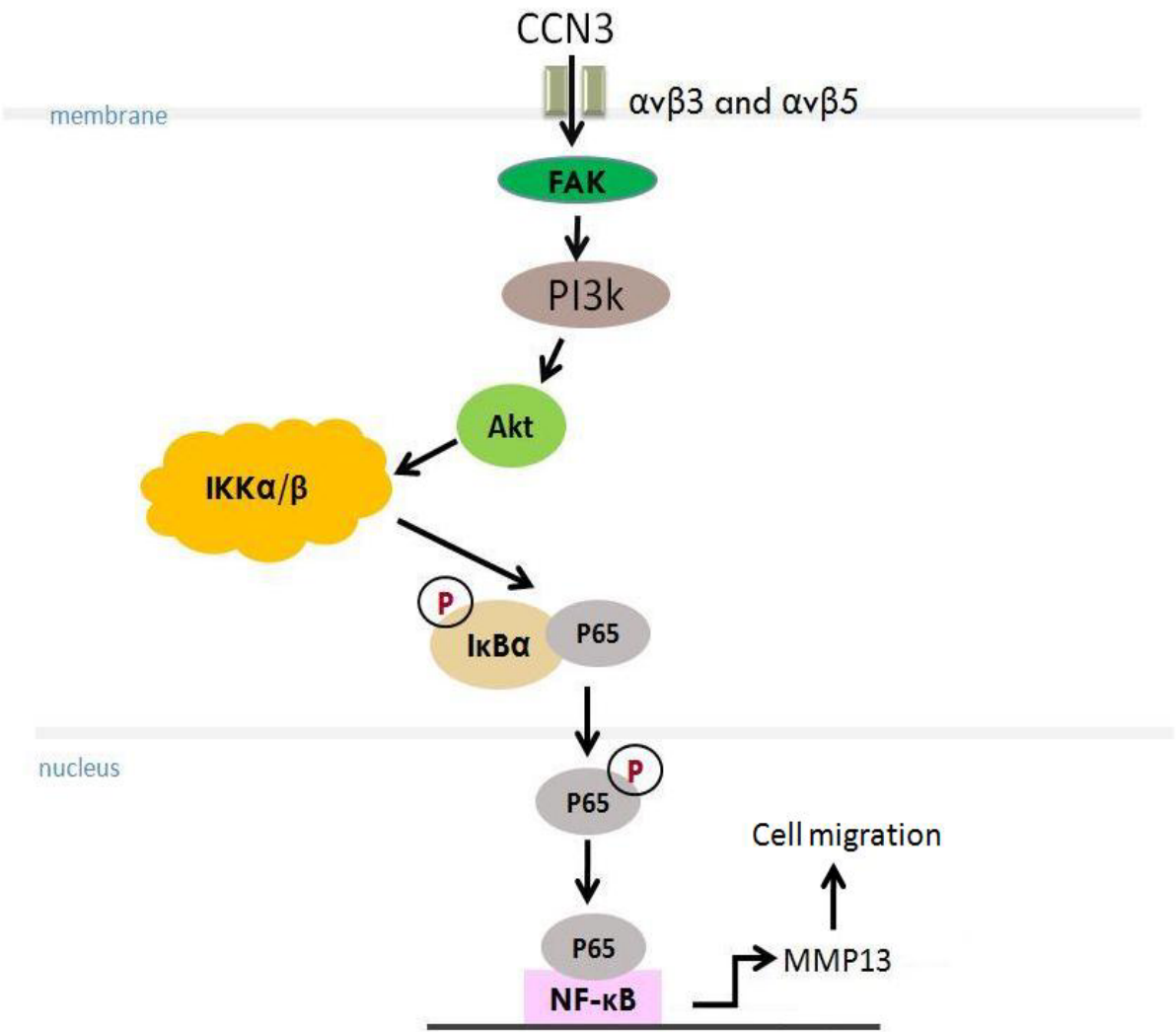
JJ012 cells were pretreated with NF- $\kappa$ B inhibitor [PDTC (10  $\mu$ M) · TPCK (3  $\mu$ M), and NF- $\kappa$ B inhibitor peptide (10  $\mu$ M)] for 30 min followed by stimulation with CCN3 (30 ng/ml) for 24 h, and in vitro migration was measured with the Transwell after 24 h (A). JJ012 cells were pretreated with NF- $\kappa$ B inhibitor [PDTC (10  $\mu$ M) · TPCK (3  $\mu$ M), and NF- $\kappa$ B inhibitor peptide (10  $\mu$ M)] for 30 min followed by stimulation with CCN3 (30 ng/ml) for 24 h, and the mRNA level of MMP-13 were determined by using qPCR (B). JJ012 cells were incubated with CCN3 (30 ng/ml) for indicated time intervals, and pIKK $\alpha/\beta$ , p-I $\kappa$ B and p-p65 expression was determined by Western blot analysis (C). Cells were transfected with mutant of IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  for 24 h followed by stimulation with CCN3 (30 ng/ml), and in vitro migration was measured with the Transwell after 24 h (D). JJ012 cells were transfected with mutant of IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  for 24 h followed by stimulation with CCN3 (30 ng/ml), and the mRNA of MMP-13 were determined by using qPCR (E). Results are presented as Mean $\pm$ S.E. (n=3). \* p<0.05 was compared with control. # p<0.05 was compared with CCN3.



**Fig 13. NF- $\kappa$ B involved in CCN3-mediated human chondrosarcoma migration and MMP-13 expression.**

JJ012 cells were transfected with  $\kappa$ B-luciferase expression vector and then pretreated with inhibitor of Ly294002 (10  $\mu$ M) wortmannin (10  $\mu$ M) 、Akt (10  $\mu$ M) 、PDTC (10  $\mu$ M) 、TPCK (10  $\mu$ M) and NF- $\kappa$ B inhibitor peptide (10  $\mu$ M) for 30 min, before incubation with CCN3 (30 ng/ml) for 24 h (A). JJ012 cells were co-transfected with  $\kappa$ B-luciferase expression vector and FAK mutant 、p85 mutant 、Akt mutant 、IKK $\alpha$  mutant 、IKK $\beta$  mutant for 24 h, before incubation with CCN3 (30 ng/ml) for 24 h (B). Luciferase activity were determined. Results are presented as mean $\pm$ S.E. (n=3). \* p<0.05 was compared with control. # p <0.05 was compared with CCN3.





**Fig 14. Schematic presentation of the signaling pathways involved in CCN3-induced migration and MMP-13 expression of human chondrosarcoma cells.**

CCN3 activates PI3K and Akt pathway, which in turn induces IKK $\alpha/\beta$  phosphorylation, p65 Ser<sup>536</sup> phosphorylation, which leads to MMP-13 expression and increases the migration through  $\alpha\beta3$  and  $\alpha\beta5$  integrin.

