

科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫 : 探討抑制 Irx11 基因對軟骨細胞增生、分化及型態的影響 *
* 名稱 響 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 鍾旻倪
學生計畫編號： NSC 102-2815-C-040-021-B
研究期間： 102年07月01日至103年02月28日止，計8個月
指導教授： 陳威仁

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 103年03月31日

摘要

Irx11 為一廣泛存在於各個物種中的 homeobox 基因。小鼠的 *Irx11* 基因表現在體節、間葉細胞、myoblast 及軟骨細胞中，剔除 *Irx11* 的小鼠會在肌腱組織的分化出現異常，顯示其可能與肌腱發育有關。在斑馬魚胚胎中，*Irx11* 的表現主要在咽喉總弓部位，且 *Irx11* knockdown 會出現咽喉總弓軟骨的型態異常，推測 *Irx11* 可能參與胚胎軟骨的發育。本計畫所使用的小鼠軟骨前驅細胞 ATDC5，具有可誘導分化成軟骨及硬骨細胞的能力。利用慢病毒轉染 sh*Irx11* 以弱化內生性 *Irx11* 基因，並探討 *Irx11* 基因對 ATDC5 細胞之型態變化、細胞增生、基因表現及細胞分化過程造成的影響。我們篩選到穩定表達 sh*Irx11* 的 ATDC5 細胞，其內生性 *Irx11* 表現量下降至兩成，分析其細胞增生速率並無太大差異，但在細胞貼附能力方面可以看到其 actin filament 排列異常，導致細胞不易進行貼附作用。另外，以 I.T.S 誘導細胞進行分化後，可以觀察到細胞分化堆疊產生的 cartilage nodule 較小，且 Alcian blue 與 Alizarin red 染色的結果顯示其細胞外基質：黏多糖 (glycosaminoglycan) 與鈣化物沉澱的含量有減少的趨勢、細胞分化的過程延緩、細胞分布的型態也發生改變。分析軟骨分化的 marker gene: *Col II*、*Col X*，顯示其表現量也是下降的。利用 Q-PCR 和 Western 分析，發現 *Irx11* knockdown 細胞之 Integrin $\beta 1$ 表現量減少，其下游蛋白 p-FAK 的表現量也減少了，同時，MMP-13 的表現量大幅上升。實驗中，我們發現 *Irx11* 會去調控 *MMP-13* promoter 的活性，knockdown *Irx11* 可能造成 MMP-13 大量表現而使細胞外基質被分解，進而影響細胞膜蛋白的功能。根據本實驗的結果推測，*Irx11* 可能與維持正常的細胞骨架與細胞外基質有關，細胞貼附能力的下降可能影響軟骨細胞的分化能力，若軟骨細胞在分化階段不能有效 condense 形成 cartilage nodule，則 ATDC5 細胞分化成軟骨、硬骨的過程即受到延緩；細胞外基質的減少可能使細胞膜蛋白的下游傳遞訊號受到影響，也可能導致軟骨細胞的分化受到延遲。然而，有關 *Irx11* 與 Integrin $\beta 1$ 間的調控關係還需要後續的實驗驗證。

背景介紹

ATDC5 細胞

ATDC5 細胞株是一種由老鼠畸胎瘤衍生出來的軟骨細胞，可以藉由 insulin 誘導分化成軟骨及硬骨。此細胞株在分化過程中分成三個階段，第一階段：早期細胞會快速增生，此階段細胞數目會大量增生且 Collagen I (Col I) 基因會大量表現；第二階段：細胞進入早期分化階段，此時細胞會開始聚集進而堆疊成 cartilage nodule，可以利用 Alcian Blue 進行染色，並觀察其細胞外基質：黏多醣 (glycosaminoglycan) 的堆積情形，此階段的 marker gene 為 Collagen II (Col II)；第三階段：細胞進入晚期分化階段，細胞開始肥大且礦化，可以利用 Alizarin Red 進行染色，觀察其硬骨鈣化物沉澱的情形，此階段的 marker gene 為 Collagen X (ColIX)，最後細胞會緩慢的 mineralization 礦化成硬骨[1]。

Iroquois(Irx/Iro)同源箱基因

Irx11 為一新穎基因，具有 homeodomain，屬於 homeobox gene 中的 TALE (three-amino acid-loop extension) 次家族。因其 homeodomain 與 IRX 家族最為相似，因此命名為 *Irx-like 1(Irx11)*[2]，又稱為 *Mkx*[3]。Irx 家族分別在不同時間與空間調控頭部區域：如中腦、後腦、小腦及耳石、脊索、界線及 rhombomeres 的形成、以及體節尾端等，主要是涉及中樞神經系統、心臟、體節、性腺、軟骨斗部位的發育，調控 proneural genes，進一步影響神經管前後與腹背形成，例如：*Irx* 調節 BMP-4，BMP-4 調節 GATA2[4,5]。在哺乳類動物有 6 個基因，可分為兩個聚集：*IrxA* (*Irx1*、*Irx2*、*Irx4*)、*IrxB* (*Irx3*、*Irx5*、*Irx6*)；在斑馬魚中則有 11 個，分為 *IrxAa* (*Irx1a*、*Irx2a*、*Irx4a*)、*IrxAb* (*Irx1b*、*Irx4b*)、*IrxBa* (*Irx 3a*、*aIrx5a*、*Irx6a*)、*IrxBb*(*Irx3b*、*Irx5b*) 四個聚集及 *Irx7*。*Irx11* 廣泛存在於各物種間，由生物資訊軟體預測顯示 *Irx11* 基因序列具有保留性，暗示 *Irx11* 可能在生物體內扮演重要的角色。

小鼠 *Mkx* 基因表現與功能

小鼠的 *Irx11* 同源基因稱為 *Mohawk(Mkx)*，*Mkx* 廣泛的表達在體軸、四肢、臍部、性腺與腎臟等部位，胚胎發育第九天 *Mkx* 在 somites 有表達，從背部到腹部呈濃度梯度的分布進而發育成骨骼肌，在內耳與下顎等顱面區域有大量的表現，而四肢方面則沿著趾骨從背側到腹側發育成肌腱，腎臟與睪丸也參與其中[3,6,7]，暗示 *Irx11* 可能參與這些位置發育的轉錄調控。在細胞的研究指出 *Mkx* 可扮演轉錄抑制的調控因子。在 10T1/2 纖維母細胞，*Mkx* 會抑制由 MyoD 主導的 myogenic conversion，且 *Mkx* 會與 Sin3A/HDAC 形成複合體去抑制下游的基因轉錄，影響肌肉細胞的分化[8]。最近的研究顯示，在小鼠的肌肉發育上 *Sox6* 扮演了重要因子，已知 *Mkx* 會形成 heterodimers，結合在 *Sox6* promoter (TGTnnACA) 序列上，並抑制骨骼肌分化過程，影響未來肌肉的發育[10]。在 in vivo 的研究顯示，*Mkx* 參與了

小鼠骨骼肌與肌腱的分化[10,11,12]。肌腱是連接骨骼和肌肉的，成熟的肌腱由膠原纖維組成最後連接到肌肉，而膠原纖維與鄰近細胞的連接是非常緊密的，在 *Mkx* 剔除的小鼠當中，其四肢及尾巴的發育會形成不正常的波浪狀[12]。在 *Mkx* 缺失的老鼠發現肌腱發育不全及減少 type I collagen 的產生。

Mkx 可能參與人類關節前十字韌帶退化

退化性關節炎(OA)是一種異常關節退化的疾病，大多好發於老年人，其症狀為關節疼痛、減少關節功能等，主要可能發生原因有遺傳、發育、代謝造成軟骨不正常的缺失，使得骨頭與骨頭之間缺少了軟骨的保護，骨表面互相摩擦而造成關節疼痛[13,14]。前十字韌帶主要由 type I collagen 細胞外基質(ECM)、小分子膠原、蛋白醣等所組成[15,16]。這些膠原蛋白分子可以抵抗壓力來保護關節，一旦這些膠原不正常的減少，就容易會發生關節炎[17]。最近研究顯示，在 OA 引起的前十字韌帶退化關節中，*Mkx* 的表現減少，此現象可能經由 *IL-1 β* 的調控[18]。*IL-1 β* 可抑制 *Mkx* 的表現及韌帶細胞的 ECM 基因，如 *COL1A1* 和 *TNXB*，相反的，*IL-1 β* 可上調軟骨細胞關鍵轉錄因子 *Sox9* 的表現。如果以 siRNA knockdown *Mkx*，則 *SOX9* 表現上升而 *COL1A1* 和 *TNXB* 表現下降。因此 *Mkx* 顯然對人類肌腱和韌帶中 ECM 的產生和維持其細胞分化的狀態是必須的。

細胞外基質 extracellular matrix(ECM)功能與組成

ECM(extracellular matrix)細胞外基質是由動物細胞分泌出來的一部分，其功能主要是來支持結構、細胞與細胞的調節，其主要是由 collagen、elastin、laminin、fibronectin 等纖維蛋白所組成，先前文獻有指出 integrin 會在細胞膜形成二聚體(α 與 β subunit) 的穿膜蛋白與細胞外基質交互作用，使細胞能貼附與細胞遷移 [20,21]，在不同細胞型態會有不同的組合，總共有 18 種 α subunits 及 8 種 β subunits，在成骨細胞則表達了許多 integrin 受體(α V β 3, α 2 β 1, and α 5 β 1)[22,23]。此外，Integrin β 1 不僅參與了細胞的增生，它在訊號傳遞過程中，在人類的胎兒胰島細胞透過 FAK/ERK 路徑調控了細胞的分化及存活[24]。Focal adhesion kinase (FAK)蛋白會直接結合在細胞膜上 Integrin β 1 受體蛋白，藉由下游 extracellular signal-regulated kinase (ERK)與 mitogen activated protein kinase (MAPK)路徑，影響其細胞增生以及存活。

實驗動機

已知*Irx11*被廣泛保留於各物種中，顯示其對生物體的重要性。先前實驗室的研究結果發現，*Irx11*從斑馬魚胚胎18-somite時期就開始表現，主要集中於頭部和咽喉總弓，若在胚胎早期以MO將*Irx11* knockdown，斑馬魚的下顎軟骨發育就會出現異常，顯示*Irx11*可能會直接或間接的參與下顎軟骨的發育[19]。最近文獻指出，*Irx11*可能參與了人類關節前十字韌帶的退化，前十字韌帶主要由type I collagen細胞外基質(ECM)、小分子膠原、醣蛋白等所組成[15]。在OA(退化性關節炎)引起的前十字韌帶退化關節中，可以發現*Irx11*的表現量減少了，此現象可能經由IL-1 β 的調控。IL-1 β 可抑制*Irx11*的表現及韌帶細胞的ECM基因，相反的卻能上調軟骨細胞關鍵轉錄因子*Sox9*的表現，所以如果以siRNA knockdown *Irx11*，則*Sox9*表現上升使COL1A1和TNXB表現下降，此結果顯示*Irx11*對人類肌腱和韌帶中ECM的重要性[18]。因此，我想要研究抑制內生性*Irx11*對ATDC5細胞的早期增生和晚期分化是否造成影響，進一步的去探討*Irx11* knockdown細胞株是否會調控ATDC5細胞貼附與其細胞外基質的產生，並探討其調控的分子機制。

材料方法

一、細胞培養 (Cell Culture)

ATDC5為老鼠軟骨前驅細胞株(chondroprogenitor cell)，生長的培養基成分為1：1比例的Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)及Nutrient Mixture F-12 (F12)，並含有5%胎牛血清蛋白(Fetal Bovine Serum)、1% penicillin及1% streptomycin，置於37°C、5% CO₂培養箱中培養。*Irx11* shRNA穩定細胞株培養於相同條件另加2 µg/ml puromycin的培養基。此細胞為貼覆型細胞，會出現些微細胞堆疊的情況。當細胞數佔培養皿面積之80%時，便以1% trypsin-EDTA處理，將細胞從培養皿取下，並取少量細胞放回培養皿繼續培養。此細胞株可利用I.T.S (insulin、transferrin、sodium selenite)誘發其分化。

二、慢病毒製備 (Production of VSVG-pseudotyped lentiviral particles)

我們從中研院 RNAi core購得針對老鼠內生性*Irx11* 這個基因的三個不同目標序列(target sequence)的shRNA質體，和一組控制組質體scramble shRNA control(pLKO.1-shRFP)，利用大腸桿菌大量複製並且抽取質體(lentiviral shRNA plasmid)。首先將HEK293T細胞種於10cm dish，待細胞長到七、八分滿後，以PBS緩衝溶液清洗後，置換10 ml新鮮的培養液。將所需的質體(8.1 µg pCMV-ΔR8.9、0.9 µg pMD、9 µg shRNA plasmid) 補水至450µl，加入50µl 2.5M CaCl₂後，室溫靜置5分鐘，緩慢加入500µl 2X HBS，室溫靜置7分鐘，再將以上溶液加入培養基當中，作用10小時後換成含有1%BSA培養液，在24、48小時各收集一次病毒液並以0.22µm filter過濾滅菌，保存在-80°C冰箱以供實驗使用。

三、慢病毒感染 (Lentiviral Infection)

將ATDC5細胞種於6 cm dish呈七、八分滿，加入3 µl的8 mg/ml polybrene於3 ml F12 medium後，緩慢地加入3 ml慢病毒液進行感染，隔天換成含有2 µg/ml puromycin的培養液篩選stable-shRNA cell lines，之後可以把細胞冰凍保存或進行下一步實驗。

四、Alcian Blue及Alizarin red染色

使用Alcian Blue的染劑可以染上細胞分泌出來的細胞外基質(Extracellular matrix)，作為軟骨分化的指標；而Alizarin red染劑則是可以染上細胞分泌出來的礦物質，藉此作為硬骨分化的指標。

A. Alcian Blue 8GX

把medium吸掉後用1X PBS清洗數次，再以95%MeOH作用30分鐘使細胞固定在盤底，之後再以1X PBS清洗，最後加入1% Alcian Blue (in 0.1N HCl)染色 overnight，以1X PBS清洗後即可拍照記錄。

B. Alizarin red S

把medium吸掉後用1X PBS清洗數次，再以95%MeOH作用30分鐘使細胞固定在盤底，之後再以1X PBS清洗，最後加入1% Alizarin red染色 over two night，以1X PBS清洗後即可拍照記錄。

五、細胞cDNA的製備

抽取RNA：加入1c.c. TRI-reagent(5 PRIME)於dish中靜置，把細胞沖刷下來後吸入1.5 ml eppendorf中，置於室溫後，加入chloroform(1/5 Volume TRI Reagent)，震盪一下，於室溫靜置，4°C 離心12000g。取上層水層至新的1.5 ml eppendorf，加入isopropanol(1/2 Volume TRI Reagent)混合均勻後，靜置於室溫，於4°C 離心12000g，移除上清液，加入75%酒精(1：1 Volume TRI Reagent)清洗，再於4°C 離心12000g，去掉酒精，使其在室溫乾燥，最後加入預熱的DEPC水回溶。

純化RNA：加入DNAase處理37°C，去除殘留的DNA，再加入phenol/chloroform(pH4.3)(1：1)萃取，輕輕地搖均勻，靜置，於4°C 離心12000g，取上清液至新的1.5ml eppendorf，加入3M NaOAc(1/10 Volume)，加入100%酒精(2~2.5 Volume)混合均勻後置於-80°C overnight。隔天，將eppendorf置於4°C 離心12000g，移除酒精，留下沉澱物再加入75%酒精混合均勻，於4°C 離心12000g，移除上清液，於空氣中乾燥，最後加入DEPC水回溶。

將RNA轉成cDNA：取1μl RNA以DEPC水稀釋200倍，使用光度比色計測量OD260並計算RNA濃度。之後每個sample取出5μg的RNA量加入oligo dT (primer)1μl，剩下體積補DEPC水至17μl，使用RevertAid™ Reverse Transcriptase(Fermentas; EP0442)進行轉錄反應，最後總體積為20μl。

六、及時定量之反轉錄聚合酵素連鎖反應 (Real-time qRT-PCR)

取100ng的cDNA做128倍稀釋，取稀釋後的cDNA溶液4μl當作模板，加入10μl的Power SYBR Green PCR Master Mix以及4μl 0.5μM的正、反股引子，混合均勻並確定沒有氣泡以免影響機器判讀，就可以放入機器中進行Q-PCR反應。PCR設定條件為50°C 2分鐘、95°C 10分鐘、進行35個循環的95°C 15秒以及60°C 1分鐘，再來95°C 15秒，60°C 20秒，最後95°C 15秒，再將所得到的數據套入Applied Biosystems所提供的公式，將個別的Ct值帶入公式計算，即可換算出基因表現的相對量，而所用之primer分別為*Irx11*、*Sox5*、*Sox6*、*Sox9*、*Col I*、*Col IIa*、*Col X*、*Integrin beta1*、*Integrin alpha5*、*MMP-13*、*GADPH*，其中*GADPH*為internal control。

計算公式：step1. Ct Target gene-Ct Endogenous gene=ΔCT

step2. ΔCT Sample-ΔCT Calibrator=ΔΔCT

step3. 2-ΔΔCT

七、MTT assay

先配置好所需要的溶液(10XMTT(5mg/ml)：medium=1：9)，混合均勻後，把dish內的medium移除，用PBS清洗幾次，接著加入所需的MTT液體，放入incubator作用4個小時，4個小時後把液體移除掉，再加入500 μl DMSO回溶(等結晶消失)，最後使用光度比色計測量OD570數值。

八、細胞計數(Cell counting)及細胞分裂時間(Cell doubling time)

將各細胞株種 3×10^4 於24 well中，隔天以1X trypsin處理，將細胞收集並且計算細胞總數，連續三天，並且以第0天作為基準，劃出生長曲線圖，並將第0天及第

3天細胞數目帶入公式計算細胞分裂一次所需要的時間(Td)。

$$Td = (T2-T1) * \frac{\log 2}{\log(N/n)}$$

Td : cell doubling time
T2 : last time point
T1 : first time point
N : the number of cells counted
n : the number of cells initially plated

九、免疫螢光染色(Immunofluorescence Staining)

前一天先在3cm dish中種植 6×10^4 個細胞數，隔天，先以PBS清洗數次，再用4% PFA固定15分鐘，移除後以PBS清洗，再加入0.5% triton X-100室溫作用10分鐘，PBS清洗後，再利用1X Casein blocking 30分鐘，PBS清洗數次後，就可加入一級抗體放置4°C反應overnight，之後用PBS洗2次、10分鐘，避光環境下加入二級抗體反應1~2小時，再以PBS清洗數次，以二次水rinse一下，即可加入 rhodamine-phalloidin solution反應60分鐘，再以PBS清洗，最後在載玻片上滴上含 DAPI的mounting buffer，就可以封片了，待風乾後，即可以利用螢光顯微鏡來觀察結果。

十、細胞蛋白質萃取

將3cm dish中的medium去除，以PBS清洗數次後，加入80 μ l RIPA buffer(25M Tris-HCl pH=7.5、150mM NaCl、1% Deoxycholic acid、0.1% SDS)置於冰上作用10分鐘，之後利用刮勺把細胞收集至1.5 ml eppendorf，以超音波震碎儀器震破細胞，4°C離心12000rpm 10分鐘，離心後取上清液至新的1.5 ml eppendorf，定量，最後與4X SDS sample buffer(40% glycerol、8% SDS、200mM Tris-HCl pH=6.8、0.4% Bromophenol Blue、400mM β -mercaptoethanol)混合後，100°C加熱5分鐘，即可保存在-20°C冰箱。另外，為了收取細胞分泌出來的蛋白質，在細胞繼代完隔天開始以無血清培養液培養24小時，再回收其培養液以Nanosep Centrifugal Devices濃縮蛋白。

十一、蛋白質定量

首先先配置標準品蛋白質bovine serum albumin(BSA，NEB)，分別以1X PBS將BSA(100mg/ μ l)稀釋為1 μ g/ μ l、2 μ g/ μ l、4 μ g/ μ l、6 μ g/ μ l、8 μ g/ μ l，再以1X PBS將蛋白質樣品稀釋100倍。各取1 μ l的標準品與待測蛋白加入96孔盤，然後將Bio-Rad protein assay染劑稀釋5倍，並取99 μ l與96孔盤中的蛋白混合均勻，接著以全波長酵素免疫分析儀測定出OD 570數值，繪置標準曲線並計算樣品蛋白質濃度。

十二、SDS聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)及西方點墨分析(Western blotting)

首先將電泳裝置(BioRad)組合完畢後，再去配置含有10% SDS的polyacrylamide下層膠體溶液，小心的加二次水(或酒精)於上層把膠體壓平；待膠體凝固後，移

除膠體上層的二次水(或酒精)，再加入上層膠體溶液，並插入齒梳。待膠片凝固後，將膠片置於電泳槽中，注入電泳溶液(running buffer)，將40 μ g全蛋白加入4X SDS sample buffer混合成1X後，於100 $^{\circ}$ C加熱10分鐘後，立即置於冰上冷卻，再注入膠體樣本槽內，以80伏特進行SDS-PAGE電泳30分鐘進行集膠後，改換成110伏特進行1小時電泳分離。接著將海綿、濾紙浸泡至transfer buffer(25mM Tris、192mM glycine、20% methanol)，PVDF膜則以甲醇活化，將跑完電泳的膠體和準備好的海綿、濾紙、PVDF膜一同置入轉漬槽中，以110伏特、90分鐘進行轉漬。將轉漬好的PVDF膜置於1X blocking buffer(7%脫脂牛奶+TBST buffer(25mM Tris、137mM NaCl、0.2% Tween20 pH=7.8))室溫搖晃1小時，之後以TBST buffer清洗5分鐘數次，最後將PVDF膜浸泡在一級抗體中於4 $^{\circ}$ C作用overnight，隔天以TBST buffer清洗數次後，再加入接有HRP的二級抗體於室溫作用1小時，再以TBST buffer清洗數次，然後使用ECL system與PVDF膜上之二級抗體作用產生冷光。

一級抗體		
目標蛋白	稀釋倍數	來源
FAK	1:1000	Mouse
phospho-FAK (Tyr339)	1:1000	Rabbit
ERK	1:1000	Rabbit
p-ERK	1:1000	Rabbit
Integrin β 1	1:1000	Rabbit
p38	1:1000	Mouse
pp38	1:1000	Mouse
MMP-13	1:1000	Mouse
Anti-actin	1:10000	Mouse

二級抗體	
抗體	稀釋倍數
Anti-Mouse IgG	1:5000
Anti-Rabbit IgG	1:5000

結果

一、製作 *Irx11* knockdown 的 ATDC5 軟骨細胞

ATDC5 細胞是由老鼠畸胎瘤衍生而來的軟骨細胞，我們利用 siRNA 來抑制內生性 *mIrx11* 的表現，並探討 *Irx11* 對軟骨細胞增生和分化的影響。我們跟中研院 RNAi core 購買了三株 *Irx11* shRNA 的質體(shIrx11-43、shIrx11-44、shIrx11-47) 針對不同的 *mIrx11* 片段進行 knockdown，並利用 HEK293T 細胞株製作出病毒液，再將其感染 ATDC5 軟骨細胞並以 puromycin 篩選出 stable cell line。萃取三組 knockdown 細胞株及一組控制組 shRFP 的 RNA 製備成 cDNA 去分析內生性 *mIrx11* 的表現，發現針對 3'UTR 進行 knockdown 的 shIrx11-43 其 *mIrx11* 的表現有明顯的被抑制，僅剩下 25% 的表現量(Fig. 1)。所以往後的實驗就選擇由 shIrx11-43 這株 *mIrx11* knockdown 細胞株來進行分析。

二、Knockdown *Irx11* 使細胞骨架異常

在培養 shIrx11-43 細胞時，我們發現其外觀型態跟控制組有明顯的差異，在顯微鏡下看來細胞本體向上鼓起，向外貼附的觸角數量較少，細胞整體也較小，細胞較長呈現類似梭狀型態。此外，利用 Rhodamine-Phalloidin(標記 F-actin)染色可以發現 shIrx11-43 細胞株之細胞骨架明顯的減少(Fig. 2)，F-actin 排列不整齊且多集中在細胞核周圍，推測此結果可能與 integrin pathway 有關。

三、Knockdown *mIrx11* 使軟骨細胞的分化延緩

在培養 shIrx11-43 細胞時，除了細胞型態的差異外，我們發現細胞的生長速度也不如控制組，為此，我們將 3×10^4 顆 shIrx11-43 與控制組細胞(ATDC5 WT, shRFP) 種於 24well 中(為第 0 天，Day0)，隔天為第一天(Day1)，連續三天，每天以 1X trypsin 處理，將細胞收下後進行細胞計數，以第 0 天的細胞數目為基準換算相對倍數畫出細胞生長曲線圖，並將三天的結果做統計分析，結果顯示三株細胞株的細胞數目都隨著時間呈現上升的趨勢。接著，為了確定細胞數目減少的現象是否為細胞增生較慢所致，我們進一步利用 MTT assay 測定細胞的生長速率，我們在 24 孔盤中各種下 2×10^3 顆三株細胞株的細胞，分別於第 0、1、2、3 天加入 MTT 試劑至 well 中，以 ELISA reader 於 OD 570 nm 下測量吸光值，並依吸光值畫出細胞生長曲線，從結果來看，shIrx11-43 與控制組的細胞增生速率並沒有太大的差異，但 shIrx11-43 的 MTT assay 結果來看，其第一天的吸光值就比控制組低，因此我們推測此現象可能是細胞貼附能力異常所造成(Fig. 3)。另外，我們也計算了細胞的分裂時間(cell double time)，將第三天的細胞數目帶入公式計算每次分裂所需的時間，結果控制組平均是 1.2~1.3 天，而 shIrx11-43 細胞則延長到 1.5 天，顯示了抑制 *mIrx11* 後會對細胞生長速率造成影響。更進一步地，我們利用 insulin 誘導 ATDC5 細胞進行分化，觀察其 cartilage nodule 的形成，並以 Alcian blue 及 Alizarin red 染色確定此分化特徵的存在(Fig. 4)。接著我們比較 shIrx11-43 和控制

組細胞在分化過程中產生 cartilage nodule 的差異，在分化第 16 天開始即可觀察到明顯的 cartilage nodule，由結果來看，shIrx11-43 的 cartilage nodule 大小在外觀上比控制組小、較無明顯堆疊、細胞 condense 範圍較小(Fig. 5)。進行 Alcian blue 染色發現，在分化第 16 天時，shIrx11-43 的軟骨細胞外基質：黏多醣 (glycosaminoglycan) 的堆積與聚集較少。而 Alizarin red 染色的結果顯示，控制組細胞在分化第 16 天即可看到紅色硬骨鈣化物沉澱，到第 24 天、第 30 天會更為明顯，但 shIrx11-43 之硬骨鈣化物卻在分化第 24 天以前都不明顯，直到分化第 30 天才較明顯。結果都顯示出細胞整體之結構較為鬆散、細胞 condense 範圍較小、無緊密堆積的狀態，且 cartilage nodule 與 cartilage nodule 之間的空隙很大，形成類似網狀的型態(Fig. 6)。我們也分析了軟骨細胞早期及晚期的指標基因 (*Col II* 和 *Col X*)，在分化第 8 天時，shIrx11-43 的 *Col II* 表現量比控制組來的低，且分化第 16、24、30 天的 *Col X* 表現量也都比控制組低。此結果顯示在 *mIrx11* knockdown 的軟骨細胞內，其分化過程確實有受到抑制或延緩的趨勢(Fig. 7)。

四、 Knockdown *mIrx11* 使軟骨細胞的貼附能力下降

由於 shIrx11-43 細胞型態看起來較容易飄起來，且生長速率較慢，因此我們推測此現象是否與其細胞貼附能力下降有關，導致細胞無法完全貼至盤底而使細胞較容易死亡或延遲其生長。為了觀察細胞貼附的情況，我們將細胞種在 3cm 的 dish 中，分別於 0、30min、1hr、2hr、3hr 五個時間點在倒立顯微鏡下觀察並拍照，發現在 2hr 時，控制組的細胞幾乎都已貼至盤底，但是 shIrx11-43 細胞卻還有大部分的細胞漂浮在培養基中，另外，計算已貼附細胞佔所有細胞的比率，發現 shIrx11-43 細胞株的比例明顯較低，此結果符合先前的推測，顯示 shIrx11-43 細胞的貼附能力一開始就已經受到影響，所以才會在隔天計數細胞時有減少的情況。另外，為了證明此貼附差異是細胞本身的問題，我們先在 dish 上 coating 1% gelatin 使細胞較容易貼盤，但一樣在種完細胞後 2hr 時，控制組的細胞已幾乎全部貼盤，shIrx11-43 細胞株依舊有一半的細胞還未貼盤(Fig. 8)。

五、 ATDC5 軟骨細胞之 Integrin 表現

Integrin 膜蛋白是細胞與細胞外基質作連接的細胞受體，由 α 和 β 次單位組合而成，在不同的細胞株內會有不同的組合方式。測試各個 Integrin 次單位，我們發現軟骨細胞的 Integrin 主要是由 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 這兩個次單元所組成。由於 shIrx11-43 的細胞貼附能力較差，所以我們懷疑其細胞膜蛋白 Integrin 的表現或許受到了影響，所以我們利用 real-time RT-PCR 來偵測 shIrx11-43 及控制組 ATDC5 細胞內 Integrin 的表現量。實驗結果證實 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 次單位的表現量在 ATDC5 細胞中表現量較高，而其他次單元($\alpha 6$ 、 αV 、 $\beta 3$ 、 $\beta 5$)的表現量都相對較低(Fig. 9)。因此，我們針對 Integrin $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 這兩個次單位的表現量來比較 knockdown 細胞株跟控制組的差別。在 shIrx11-43 的 real-time RT-PCR 結果可以看到 Integrin $\beta 1$ 的表現量下降了四成，而 Integrin $\alpha 5$ 則上升了六成(Fig. 9)，顯示其 Integrin 的表現的確受

到 *mIrx11* 影響。

六、Integrin 下游訊號的表現

看到 shIrx11-43 的 Integrin $\beta 1$ 表現下降後，我們接著就針對 Integrin 下游的訊號傳遞分子做探討。ATDC5 細胞在培養 3 小時就會貼附至盤底，所以這些訊號分子的訊號傳遞應該是很早期的，因此我們在種下細胞後，於 1hr、2hr、3hr 分別萃取 shIrx11-43 和控制組的蛋白質，並分析 Integrin 下游的蛋白質：FAK、ERK、Src 的表現量。結果顯示：Integrin 蛋白的早期表現量在 shIrx11-43 細胞中的確是下降的，total FAK、pFAK 也都是下降的趨勢，pERK 呈現上升的趨勢，而 ERK 和 Src/p-Src 則沒有太大的差異(Fig. 10)。之前有文獻提到，在退化性關節炎組織中，MAPK 訊號傳遞路徑下游的磷酸化 p38、ERK、JNK 會受到影響，磷酸化的 ERK 表現會上升、p38 表現會下降，與正常組織相較，退化性關節炎的軟骨細胞會加強 Runx2、鹼性磷酸酶、osteocalcin 等指標基因的表達，這些指標的改變似乎是藉由磷酸化 ERK 的調控[25]。因此，我們收取 24 小時的 shIrx11-43 和控制組細胞的蛋白質跑 Western 分析，結果顯示：Integrin、pp38、p38、pERK 的表現量都呈現下降趨勢(Fig. 11)。

七、Irx11 對軟骨細胞產生之細胞外基質的影響

根據以上的結果，我們推測 knockdown *mIrx11* 造成的影響或許是透過細胞貼附的機制而造成，integrin 的下降使得細胞與環境蛋白或細胞分泌出來的細胞外基質無法有效的作用，而使細胞的貼附能力降低；或者 knockdown *mIrx11* 可能透過其他基因的調控使細胞外基質的表現量降低並 block 住 integrin，進而使細胞貼附能力降低。在 MMP 酵素家族中，軟骨細胞主要是表達 MMP-13，此酵素會降解細胞分泌出的細胞外基質 Col II 及 fibronectin，結果顯示 shIrx11-43 細胞之細胞外基質的表現量有明顯的減少。此結果暗示 *mIrx11* knockdown 細胞株中的 MMP 酵素可能有高度的表現，以致影響了細胞外基質的產生，進而影響細胞貼附的機制。以 Q-PCR 分析後發現，shIrx11-43 細胞之 MMP-13 RNA 表現量的確明顯高於控制組 8 倍以上，在 MMP-13 的蛋白表現量上也能看到其明顯的上升趨勢(Fig. 12)。2013 年的研究發現，分析退化性關節炎患者之前十字韌帶可以看到其 *Irx11(MKX)* 基因表現量下降，且 MMP-13 的表現量上升[18]。此結果正好符合了文獻所指出的基因表現現象。有鑒於此，我們進一步去探討 *Irx11* 跟 *MMP-13* 之間的關係，我們在 *MMP-13* 的 promoter 上找到多個 *Irx11* 的 binding site，並將這些 binding site 分成三個主要的區域：-2931/+345、-973/+345、-647/+345，利用 Luciferase assay 分析 *MMP-13* 在 shIrx11-43 和控制組細胞中的 promoter 活性。結果顯示 shIrx11-43 中 *MMP-13* 的 promoter 活性明顯高於控制組，接著，為了證明 *MMP-13* 與 *Irx11* 間的直接關係，我們以 Luciferase assay 分析 transfect p3XFlag 或 p3XFlag-MKX 質體的 HeLa cell，由此結果發現，*Irx11* 對 *MMP-13* promoter 的確存在調控關係，且調控的位置似乎是在 -973/+345 此一區域中(Fig. 13)。

討論

Irx11 是一個新穎的基因，在各個物種間都被高度保留下來，其對胚胎發育具有重大意義，先前在斑馬魚胚胎上也觀察到它參與了腦部及軟骨的發育。

先前文獻指出，細胞可藉由 NELL-1 蛋白促進 Integrin $\beta 1$ 訊號途徑調控細胞的貼附以及增生，加強細胞的貼附能力與增生速度[26]。我們在 *Irx11* knockdown 細胞中發現其細胞貼附能力較差，進而分析其 Integrin $\beta 1$ 的表現，然而不管在 RNA 還是蛋白質層次其表現都是下降的，且 Integrin $\beta 1$ 下游的 p-FAK、p-ERK、p38 表現也同樣呈現下降趨勢，因此我們推測 *Irx11* knockdown 細胞之 actin 結構異常可能是經由 Integrin $\beta 1$ 的途徑所造成的(Fig.14)。

另外，在 *Irx11* knockdown 細胞中，其 MMP-13 的表現量非常高，由 Luciferase assay 的結果發現 *Irx11* 可以藉由 MMP-13 promoter 來調控 MMP-13 的表現，我們推測：*Irx11* 被抑制會使得 MMP-13 的表現量增加，大量的 MMP-13 蛋白被切割後以活化態的形式送到細胞外分解細胞外基質，使 Integrin $\beta 1$ 的訊號被抑制而影響軟骨細胞的貼附能力。但是 *Irx11* 跟 Integrin $\beta 1$ 的直接關係目前還不清楚，因此未來可能會去探討 *Irx11* 是否藉由其他基因去影響 Integrin $\beta 1$ 的表現，或是 *Irx11* 直接去控制 Integrin $\beta 1$ 的表現。

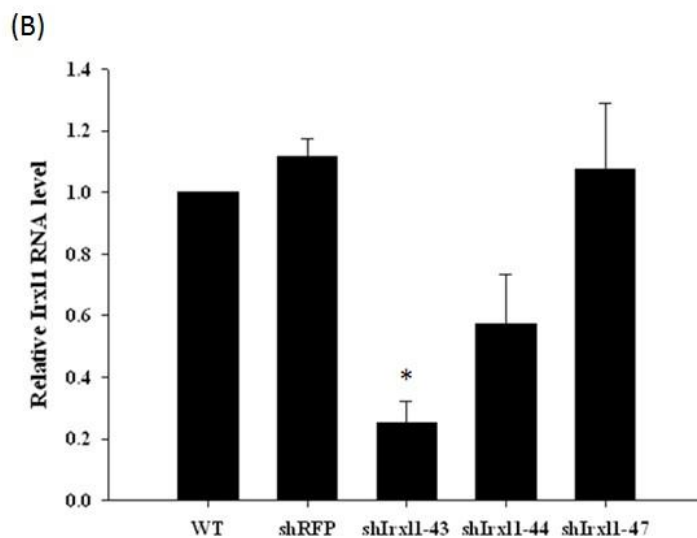
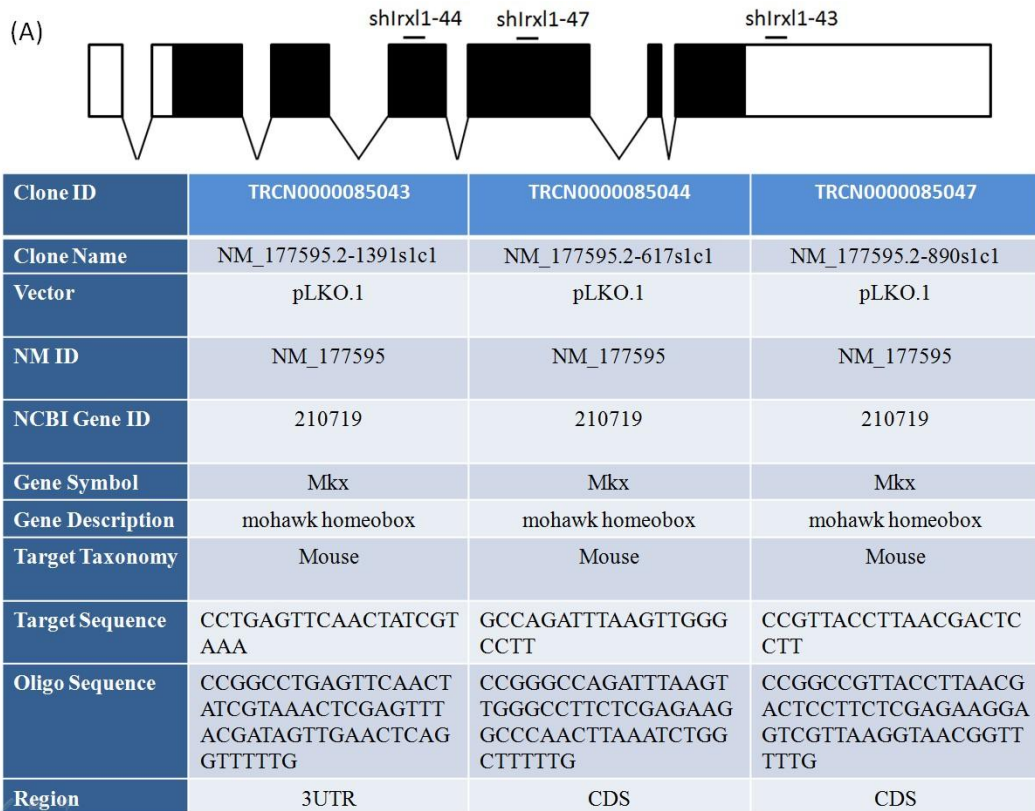


Figure 1. 利用 Q-PCR 分析 knockdown 的 ATDC5 細胞株的 *Irx1* 表現量。
 (A)向中研院 RNAi core 購買的三株 *Irx1* shRNA 質體(shIrx1-43、shIrx1-44、shIrx1-47)序列，這三種質體分別針對不同的 *mIrx1* 片段進行 knockdown，除了 shIrx1-43 的作用位置在 3'-UTR 外，其餘兩個序列的作用位置都在 CDS。利用 HEK293T 細胞株製作出病毒液，再將其感染 ATDC5 軟骨細胞，並以 puromycin 篩選出 stable cell line。(B)分析向中研院購買的 3 株 shIrx1 感染細胞，結果 shIrx1-43 此細胞株的 *Irx1* 被抑制後僅剩 2 成的表現量，因此未來實驗選擇使用此細胞株。*：p<0.05。

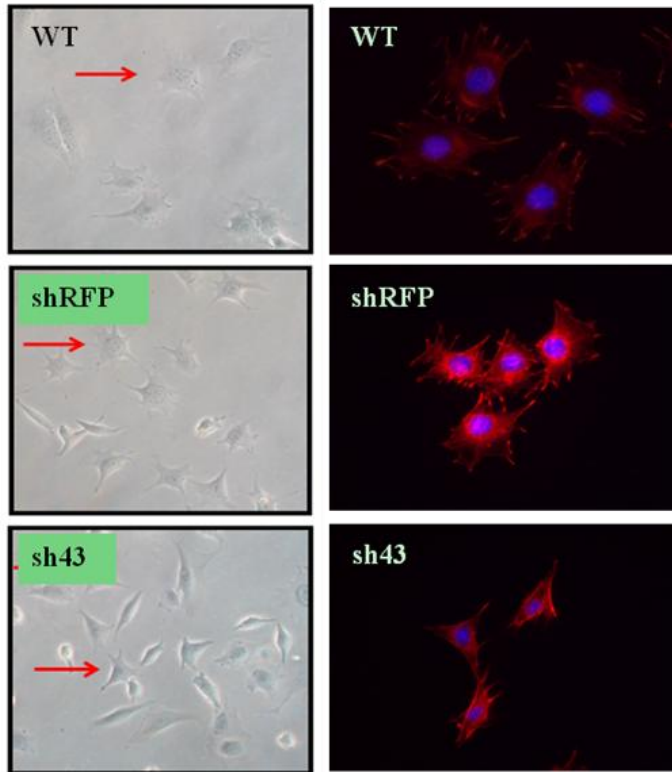


Figure 2. Knockdown *Irx11* 影響 ATDC5 的細胞型態。

左圖：shIrx11-43(sh43)的細胞型態較圓，且細胞貼附在盤底的觸角數目明顯少於控制組(WT 及 shRFP)；右圖：利用免疫螢光染色標定，shIrx11-43(sh43)的細胞骨架蛋白明顯減少、細胞體型較小，且 actin 幾乎都集中在細胞核周圍。F-actin (red)、Nucleus (blue)。

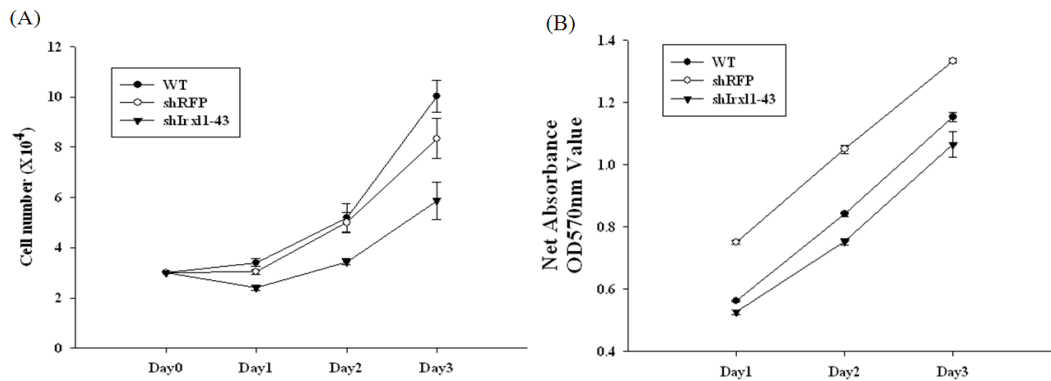


Figure 3. Knockdown *Irx11* 對 ATDC5 細胞增生的影響。

(A)種相同數目(3×10^4)顆細胞，分別在第 1、2、3 天計算細胞數目畫出細胞生長曲線圖。(B)種相同數目(3×10^4)顆細胞，分別在第 1、2、3 天以 ELISA reader 測定吸光值所畫出的曲線圖。由結果來看，shIrx11-43 的生長速率與控制組並無太大差異，但在 MTT assay 的第 1 天吸光值就比控制組低，可能是細胞貼附有問題而造成吸光值的較低。

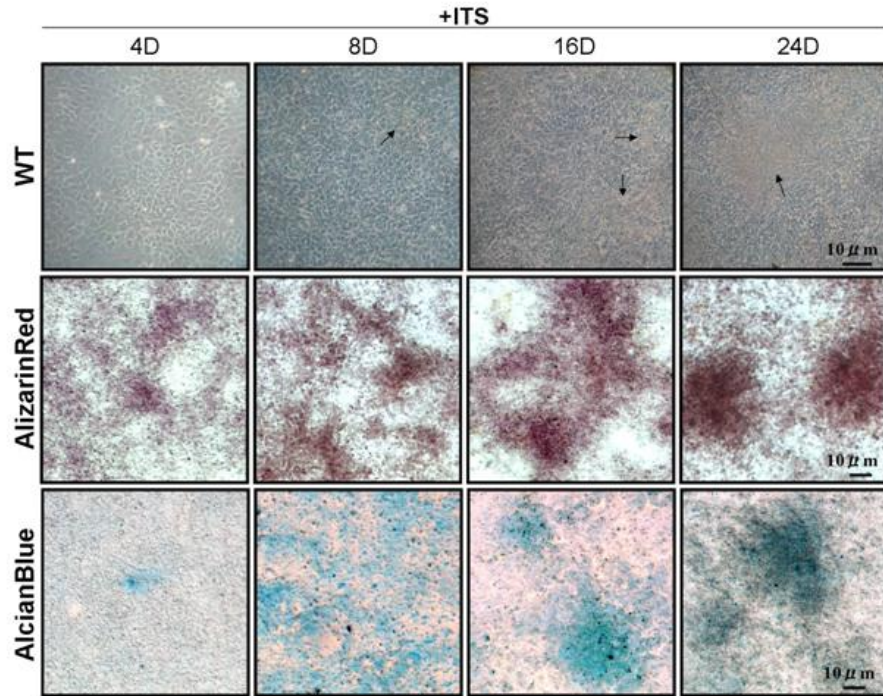


Figure 4. 確定 ATDC5 細胞的分化特性。

為了建立ATDC5的標準分化過程，加入I.T.S使ATDC5 WT細胞進行細胞分化，明視野下，可以看見細胞產生的cartilage nodule位置如箭頭所示，其分化後分泌的細胞外基質和鈣化沉澱物可藉由Alizarin red及Alcian blue的染色來觀察。

Alizarin red及Alcian blue染色的倍率皆為63X。Bar代表10 μm 。

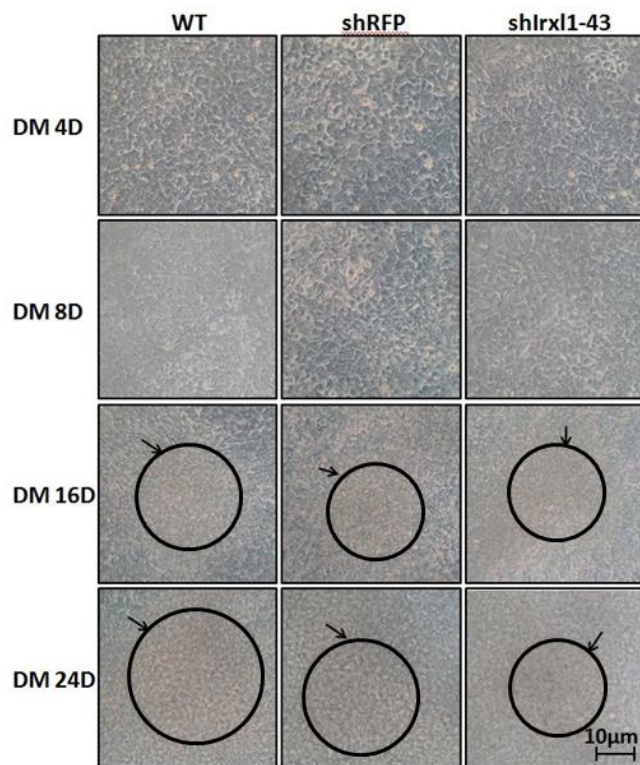


Figure 5. Knockdown *Irx11* 影響 ATDC5 軟骨細胞的堆疊。

加入 I.T.S 使 ATDC5 WT、shRFP、shIrx11-43 三株細胞分化後，分別在 4 個時期 (4、8、16、24 天) 觀察細胞堆疊的狀況。以 ATDC5 WT 細胞來講，從分化第 8 天開始細胞便會開始 condense，到了分化第 16 天，細胞明顯產生堆疊，而形成直徑約 20 μ m 的 nodule，並且在分化第 24 天觀察到最大的 nodule 形成，直徑約 40 μ m。由上圖來看，shIrx11-43 在細胞 condense 及堆疊上都沒有問題，但是到了分化第 24 天時，可以發現其 nodule 並不像對照組般明顯的堆疊，反而較為疏鬆、細胞 condense 範圍較小。Bar 代表 10 μ m。

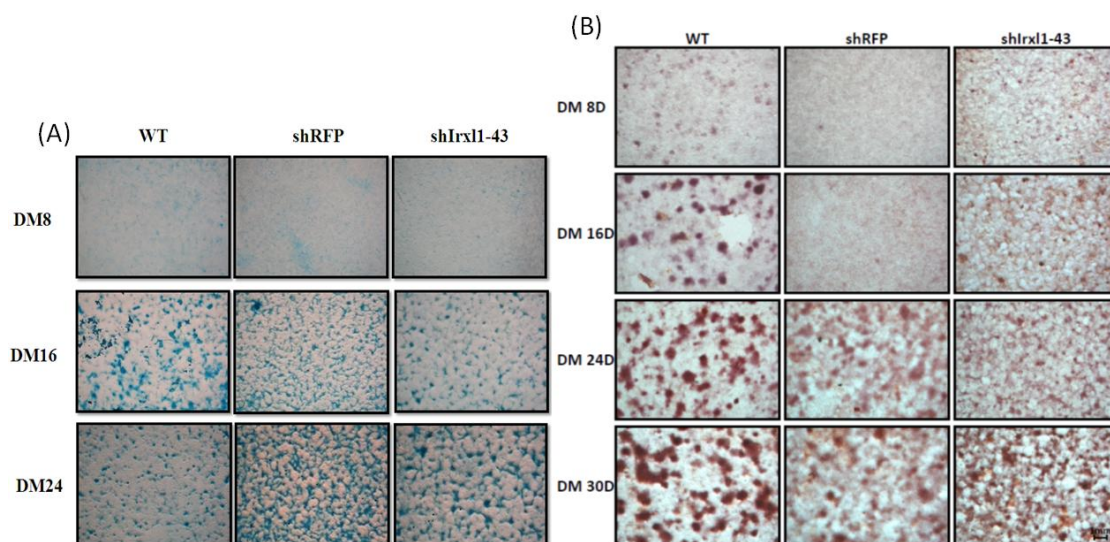


Figure 6. 抑制 *Irx11* 使 ATDC5 軟骨細胞延緩分化過程。

(A) 在分化第 8、16、24 天利用 Alcian blue 進行染色。(B) 在分化第 8、16、24、30 天利用 Alizarin red 進行染色。可以觀察到 shIrx11-43 的染色結果較控制組弱，且細胞堆疊的分布零散，空隙大但聚集少。

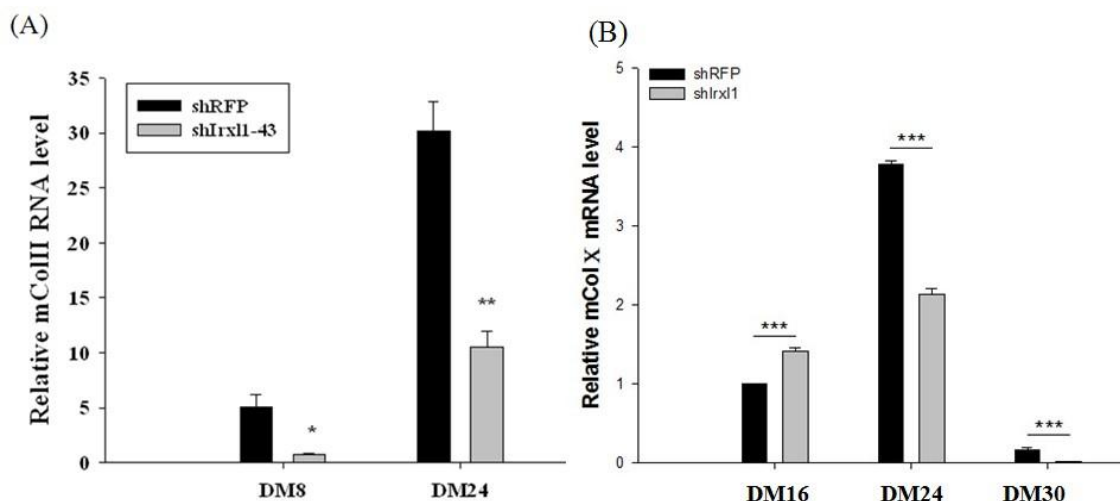


Figure 7. 分析軟骨細胞中 marker 基因的表現。

利用 Q-PCR 偵測 shIrx11-43 和控制組細胞內的 marker gene。(A) 分化第 8 天和第 24 天 *mCol II* 的表現。(B) 分化第 16、24、30 天 *mCol X* 的表現。

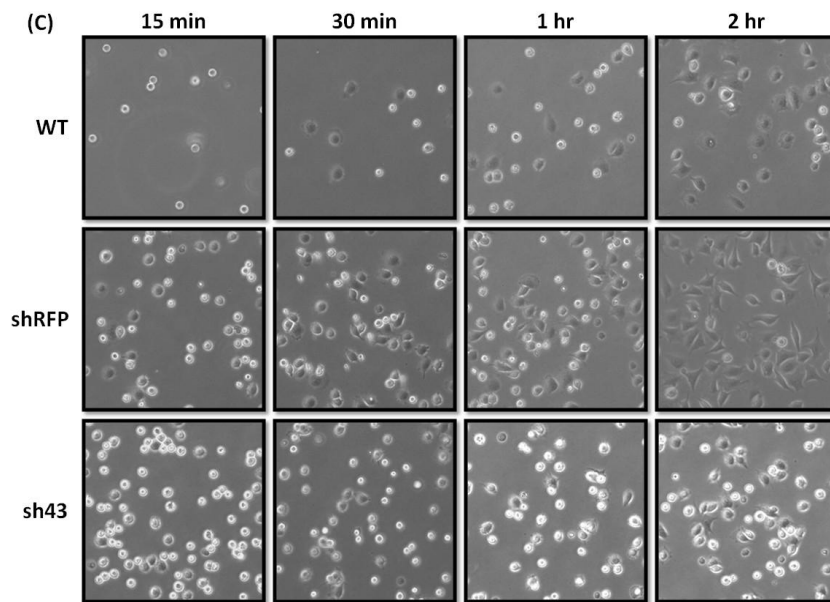
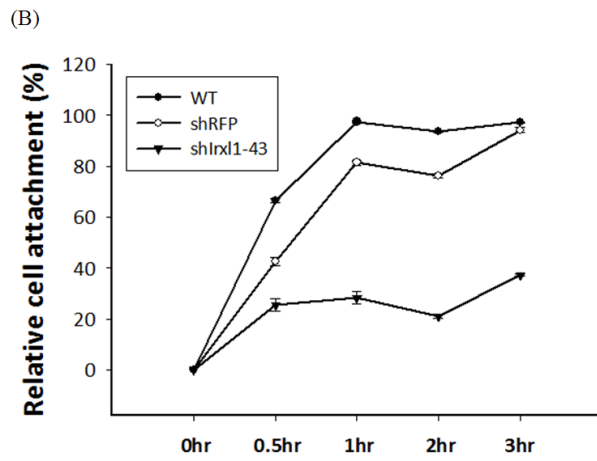
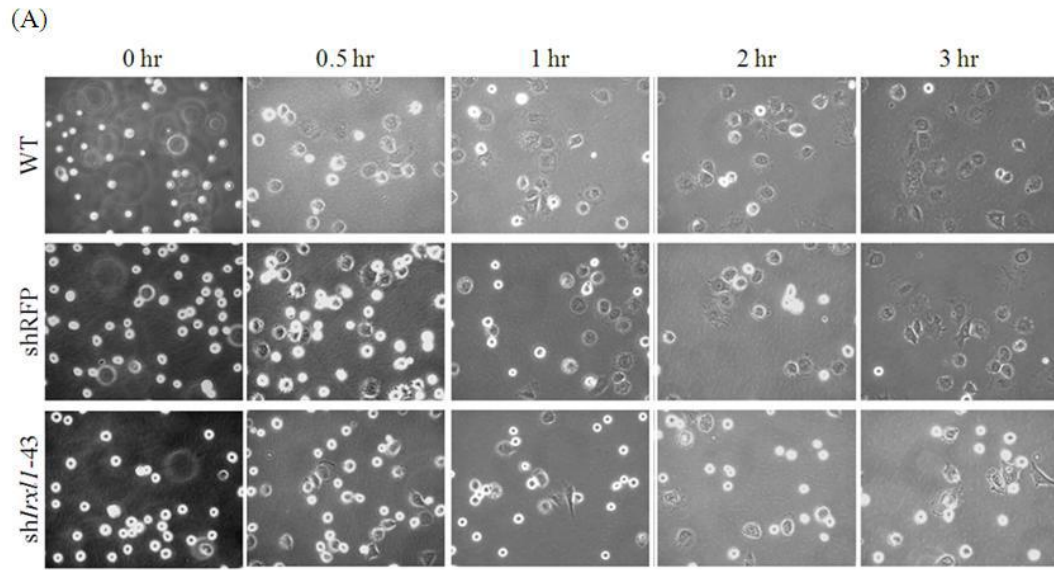


Figure 8. Knockdown *Irx11* 影響 ATDC5 細胞的貼附能力。

在同一時間種同樣數量的細胞數，分別在第 0、30min、1hr、2hr、3hr 觀察細胞

貼附在盤底的情況(A)並計算有貼附的細胞比例(B)。另外，在 dish 上 coating 1% gelatin 後再種入相同的細胞數，分別在第 0、30min、1hr、2hr 觀察細胞貼附在盤底的情況(C)，可以看到 shIrx11-43(sh43)的貼附能力較差。

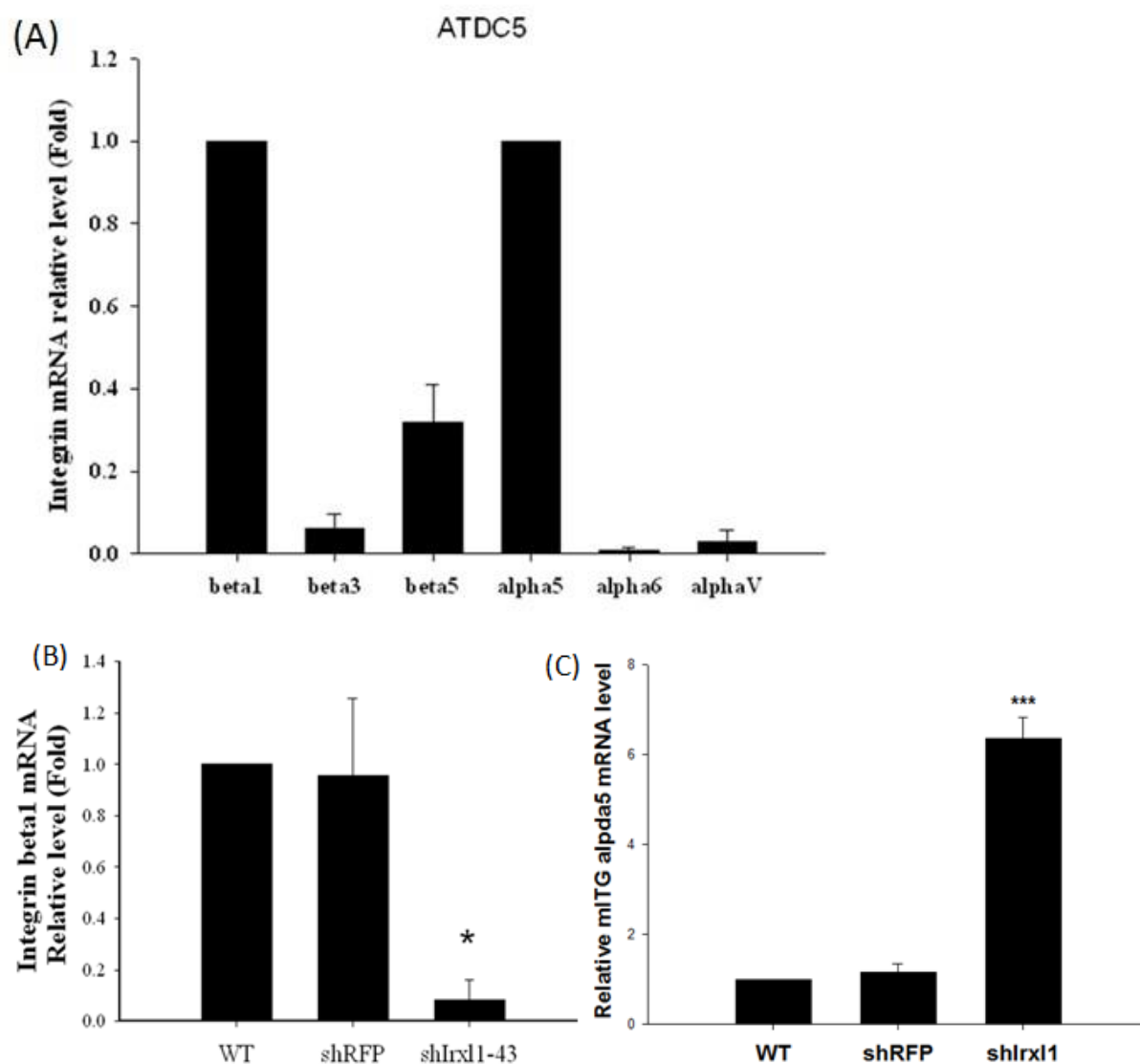


Figure 9. Integrin 在 ATDC5 軟骨細胞的表現。

(A)利用 Q-PCR 分析 ATDC5 WT 細胞株內主要表現的 Integrin 次單元，可以發現，在 ATDC5 裡主要表現的 Integrin 次單元為：beta1 和 alpha5，其他次單元的表現量都較低。另外，用 Q-PCR 去看 shIrx11-43 細胞內的 Integrin β 1 和 α 5 表現量，可以發現其 Integrin β 1 表現下降到一成(B)，而 Integrin α 5 則上升了五倍左右(C)。

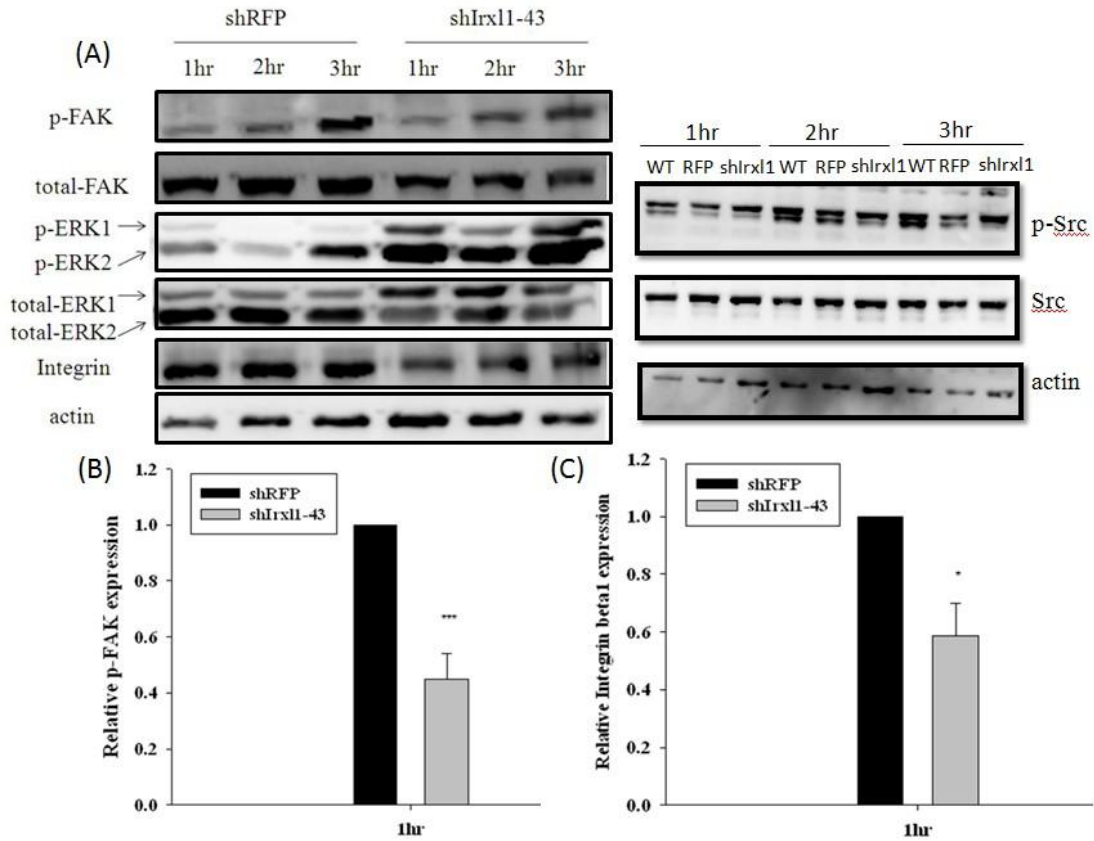


Figure 10. Integrin beta1 下游蛋白在細胞貼附 1hr、2hr、3hr 後的表現情形。
 (A)將細胞 lysis 後萃取其全蛋白質，定量後跑 10%SDS-PAGE 進行西方點墨法分析，分析細胞貼附後 1hr、2hr、3hr 的 Integrin、FAK、ERK、Src 的蛋白質表現量。(B)(C)為(A)量化後的結果，可以發現 shIrx11-43 細胞株之 Integrin beta1、p-FAK 的表現量在細胞進行貼附的 1hr 內都有顯著的下降。以 actin 當 internal control。

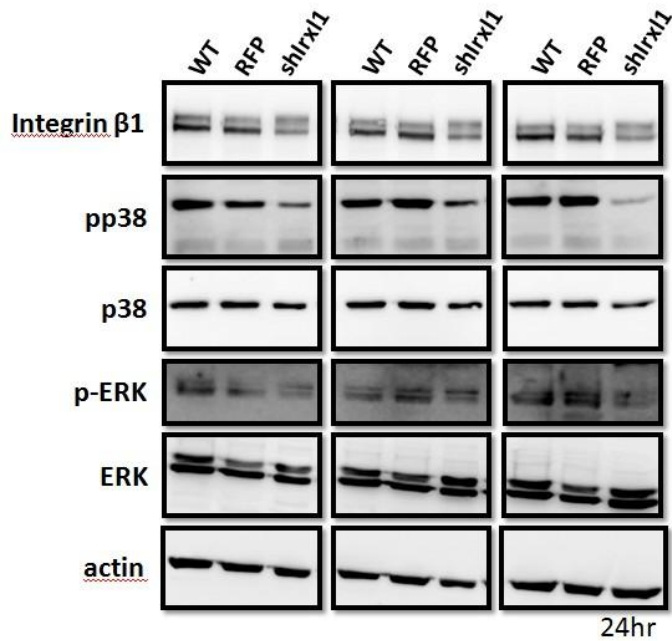


Figure 11. Integrin beta1 下游蛋白在細胞貼附 24hr 後的表現情形。

將細胞 lysis 後萃取其全蛋白質，定量後跑 10%SDS-PAGE 進行西方點墨法分析，分析細胞貼附後 24hr 的 Integrin、p38、ERK 的蛋白質表現量，結果顯示 shIrx1-43 細胞在細胞進行貼附 24hr 後的 Integrin、pp38、p-ERK 表現量都比控制組低。以 actin 當 internal control。

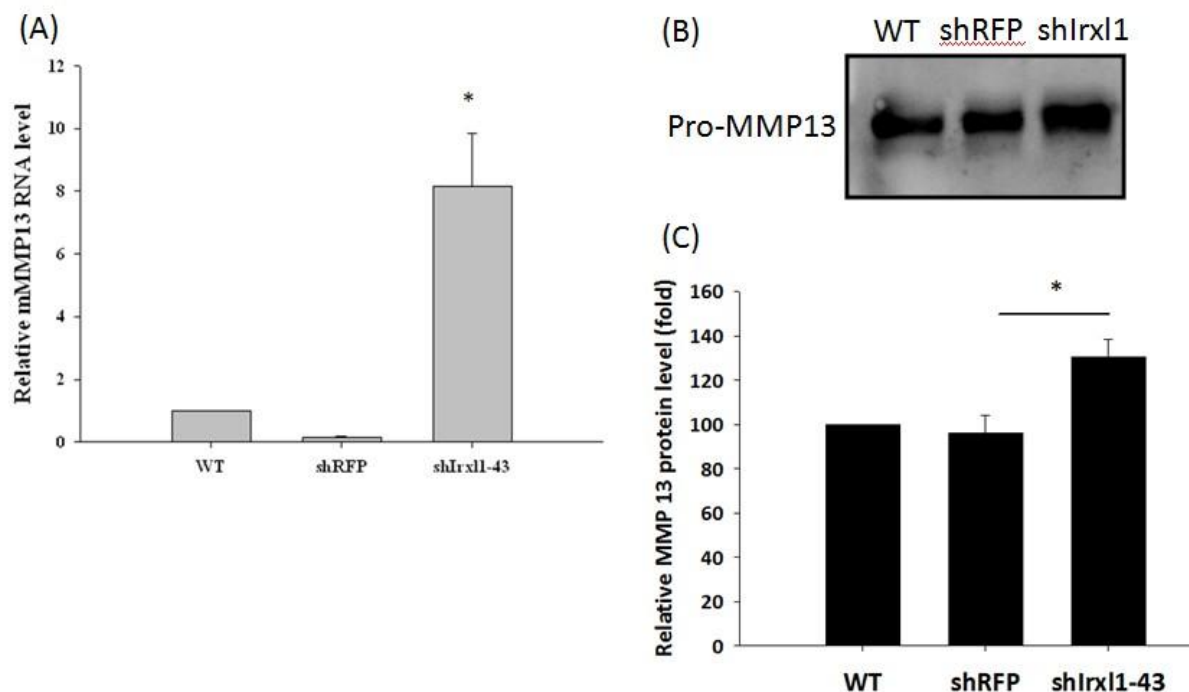
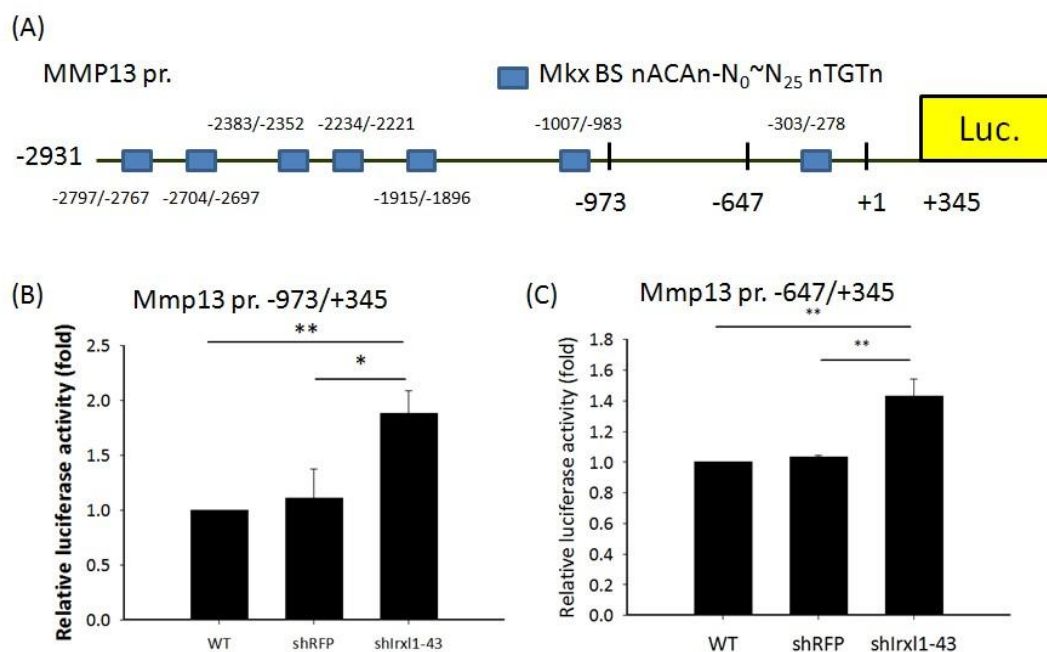


Figure 12. 分析軟骨細胞內 *MMP-13* 基因的表現。

(A)利用 Q-PCR 偵測 shIrx1-43 和控制組細胞內 *MMP-13* 的表現量，可以看到 shIrx1-43 之 *MMP-13* 的 RNA 表現量比控制組高出 8 倍之多。(B)以西方點墨法分析軟骨細胞所分泌出的 Pro-*MMP13* 蛋白表現量。(C)量化(B)圖的結果，可以看到 shIrx1-43 所表達的 *MMP13* 蛋白的確比控制組高。



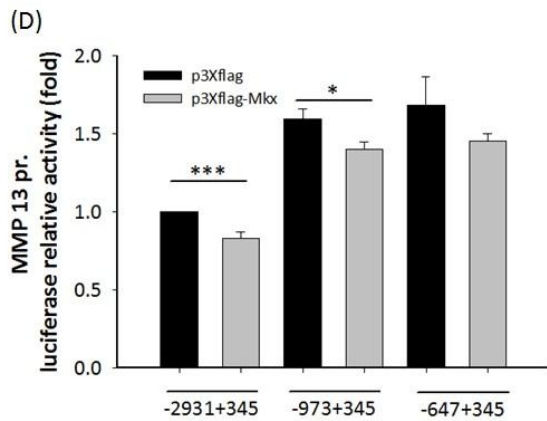


Figure 13. *Irx11* 與 *MMP-13* 的調控關係。

(A)預測 *MMP-13* promoter 上的 *Irx11* binding site(Mkx BS)。 (B)(C)利用 Luciferase assay 分析 sh*Irx11*-43 和控制組細胞內 *MMP-13* 的 promoter 活性。 (D)在 HeLa cell 中，利用 Luciferase assay 分析 *Irx11* 主要調控 *MMP-13* promoter 的位置。

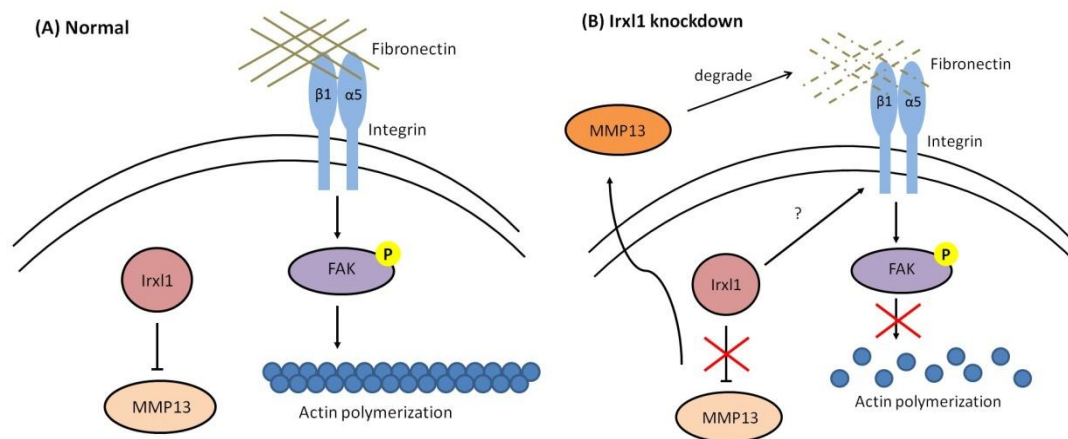


Figure 14. *Irx11* 與 Integrin、*MMP-13* 之間的關係。

推測 Integrin beta1 下降會使下游 p-FAK 表現量下降，進而使 actin polymerization 無法順利進行，造成 actin fiber 的型態異常；而 *Irx11* 的下降會使 *MMP-13* 表現量上升，活化後的 *MMP-13* 被釋放到細胞外分解細胞外基質，更進一步使 Integrin 的訊號被抑制。

Reference

1. Challa, T.D., Rais, Y., and Ornan, E.M. (2010). Effect of adiponectin on ATDC5 proliferation, differentiation and signaling pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 323, 282-291.
2. Delgado-Olguin, P., Takeuchi, J.K., and Bruneau, B.G. (2006). Chromatin modification and remodeling in heart development. *Sci. World J.* 6, 1851-1861.
3. Anderson, D.M., Arredondo, J., Hahn, K., Valente, G., Martin, J.F., Wilson-Rawls, J., and Rawls, A. (2006). Mohawk is a novel homeobox gene expressed in the developing mouse embryo. *Dev. Dyn.* : 235, 792-801.
4. Feijoo, C.G., Manzanares, M., de la Calle-Mustienes, E., Gomez-Skarmeta, J.L., and Allende, M.L. (2004). The *Irx* gene family in zebrafish: genomic structure, evolution and initial characterization of *irx5b*. *Dev. Genes Evol.* 214, 277-284.
5. Lecaudey, V., Anselme, I., Dildrop, R., Ruther, U., and Schneider-Maunoury, S. (2005). Expression of the zebrafish Iroquois genes during early nervous system formation and patterning. *J. Comp. Neurol.* 492, 289-302.
6. Liu, H., Liu, W., Maltby, K.M., Lan, Y., and Jiang, R. (2006). Identification and developmental expression analysis of a novel homeobox gene closely linked to the mouse Twirler mutation. *Gene Expr. Patterns* : 6, 632-636.
7. Takeuchi, J.K., and Bruneau, B.G. (2007). *Irx11*, a divergent Iroquois homeobox family transcription factor gene. *Gene Expr. Patterns* : 7, 51-56.
8. Anderson, D.M., Beres, B.J., Wilson-Rawls, J., and Rawls, A. (2009). The homeobox gene Mohawk represses transcription by recruiting the sin3A/HDAC co-repressor complex. *Dev. Dyn.* : 238, 572-580.
9. Ito, Y., Toriuchi, N., Yoshitaka, T., Ueno-Kudoh, H., Sato, T., Yokoyama, S., Nishida, K., Akimoto, T., Takahashi, M., Miyaki, S., et al. (2010). The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 10538-10542.
10. Anderson, D.M., George, R., Noyes, M.B., Rowton, M., Liu, W., Jiang, R., Wolfe, S.A., Wilson-Rawls, J., and Rawls, A. (2012). Characterization of the DNA-binding properties of the Mohawk homeobox transcription factor. *J. Biol. Chem.* 287, 35351-35359.
11. Kimura, W., Machii, M., Xue, X., Sultana, N., Hikosaka, K., Sharkar, M.T., Uezato, T., Matsuda, M., Koseki, H., and Miura, N. (2011). *Irx11* mutant mice show reduced tendon differentiation and no patterning defects in musculoskeletal system development. *Genesis* 49, 2-9.

12. Liu, W., Watson, S.S., Lan, Y., Keene, D.R., Ovitt, C.E., Liu, H., Schweitzer, R., and Jiang, R. (2010). The atypical homeodomain transcription factor Mohawk controls tendon morphogenesis. *Mol. Cell Biol.* 30, 4797-4807.
13. Lotz, M.K., and Carames, B. (2011). Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and OA. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 579-587.
14. Yano, F., Hojo, H., Ohba, S., Fukai, A., Hosaka, Y., Ikeda, T., Saito, T., Hirata, M., Chikuda, H., Takato, T., et al. (2013). A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 748-753.
15. Laurencin, C.T., and Freeman, J.W. (2005). Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach. *Biomaterials* 26, 7530-7536.
16. Petersen, W., and Tillmann, B. (1999). Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint. *Anat. Embryol.* 200, 325-334.
17. Hasegawa, A., Otsuki, S., Pauli, C., Miyaki, S., Patil, S., Steklov, N., Kinoshita, M., Koziol, J., D'Lima, D.D., and Lotz, M.K. (2012). Anterior cruciate ligament changes in the human knee joint in aging and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 64, 696-704.
18. Nakahara, H., Hasegawa, A., Otabe, K., Ayabe, F., Matsukawa, T., Onizuka, N., Ito, Y., Ozaki, T., Lotz, M.K., and Asahara, H. (2013). Transcription factor Mohawk and the pathogenesis of human anterior cruciate ligament degradation. *Arthritis Rheum.* 65(8):2081-9.
19. Ikeda, T., Kawaguchi, H., Kamekura, S., Ogata, N., Mori, Y., Nakamura, K., Ikegawa, S., and Chung, U.I. (2005). Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation. *J. Bone Miner. Metabolism* 23, 337-340.
20. Ilic, D., Almeida, E.A., Schlaepfer, D.D., Dazin, P., Aizawa, S., and Damsky, C.H. (1998). Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J. Cell Biol.* 143, 547-560.
21. Juliano, R.L., and Haskill, S. (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 120, 577-585.
22. Hughes, D.E., Salter, D.M., Dedhar, S., and Simpson, R. (1993). Integrin expression in human bone. *J. Bone Miner. Res.* 8, 527-533.
23. Hultenby, K., Reinholt, F.P., and Heinegard, D. (1993). Distribution of integrin subunits on rat metaphyseal osteoclasts and osteoblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 62, 86-93.
24. Saleem, S., Li, J., Yee, S.P., Fellows, G.F., Goodyer, C.G., and Wang, R. (2009). beta1 integrin/FAK/ERK signalling pathway is essential for human fetal islet cell differentiation and survival. *J. Pathol.* 219, 182-192.

25. Prasadam, I., Friis, T., Shi, W., van Gennip, S., Crawford, R., and Xiao, Y. (2010a). Osteoarthritic cartilage chondrocytes alter subchondral bone osteoblast differentiation via MAPK signalling pathway involving ERK1/2. *Bone* 46, 226-235.
26. Shen, J., James, A.W., Chung, J., Lee, K., Zhang, J.B., Ho, S., Lee, K.S., Kim, T.M., Niimi, T., Kuroda, S., et al. (2012). NELL-1 promotes cell adhesion and differentiation via Integrinbeta1. *J. Cell. Biochem.* 113, 3620-3628.