

行政院國家科學委員會補助  
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\*  
\* 計 畫  
\* : 利用 ATDC5 細胞株探討 Irx11 基因對軟骨分化的影響  
\* 名 稱  
\* \*\*\*\*\*

執行計畫學生： 林奕勳  
學生計畫編號： NSC 100-2815-C-040-030-B  
研究期間： 100年07月01日至101年02月28日止，計8個月  
指導教授： 潘惠錦

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 101年03月30日

行政院國家科學委員會補助  
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

\*\*\*\*\*  
\* 計畫 \*  
\* : 利用軟骨細胞探討 *Irx11* 基因對細胞增生、分化及型態的 \*  
\* 影響 \*  
\* 名稱 \*  
\*\*\*\*\*

執行計畫學生：林奕勳

學生計畫編號：NSC-100-2815-C-040 -030-B

研究期間：100年7月1日至101年2月底止，計8個月

指導教授：潘惠錦

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學

中華民國            年            月            日

# Abstract

*Irx11* 為一廣泛存在於各個物種中的新穎 homeobox 基因，在 TALE (three-amino acid-loop extension) 家族中其 homeodomain 與 IRO 最為相似。小鼠的 *Irx11* 表現在體節、間葉細胞、myoblast 及軟骨細胞中，剔除 *mIrx11* 的小鼠在肌腱組織的分化出現異常，顯示其可能與肌腱發育有關。先前實驗室利用斑馬魚來探討 *Irx11* 在胚胎發育上所扮演的角色，發現當 *Irx11* knockdown 後，斑馬魚胚胎下顎軟骨的組織會有嚴重缺失，顯示其可能與下顎軟骨的發育調控有關，因此我們想探討 *Irx11* 是否也可以調控軟骨細胞的分化。

ATDC5 是一種小鼠的軟骨前驅細胞，具有可以分化成軟骨及硬骨的能力。我們使用此細胞株，藉由抑制內生性 *Irx11* 基因，以探討 *Irx11* 對於 ATDC5 細胞增生及分化過程產生的影響。首先，我們觀察到明視野以及 phalloidin 染色的方式去發現到有經過 knock down 的細胞株，其細胞型態就和正常的細胞有所差異，而在 alcian blue 實驗發現有 knock down 的細胞其分化能力也受到抑制。而 MTT assay 的結果發現被穩定抑制 *Irx11* 的 ATDC5 細胞的確會影響細胞早期增生的情況，甚至到大約分化後 12 至 13 天時，細胞差不多都凋亡。另外，我們也觀察到 *Irx11* 會影響到細胞的貼附能力，進而影響到早期的細胞數目及分化能力。

細胞的貼附與 p-FAK 有關。先前文獻指出 N-cadherin 與軟骨分化有密切的關係，推測會使細胞分化成軟骨的能力大幅下降，但詳細機制目前尚未清楚。

# Introduction

Homeobox gene的共同特徵為含有homeodomain，此區域由180個保留的核苷酸序列組成，可轉譯出60個胺基酸，為一helix-turn-helix motif，可以與DNA結合，進而調控其下游基因[1-3]。Homeobox gene不論在植物、蕨類及動物中都可以發現在演化上有高度的保留性，這些基因藉由時間、空間和組織特異性的方式來調控胚胎發育，參與的過程包含：體軸生成、側肢發育、器官形成等[1]。

含有homeodomain之蛋白質為一龐大的蛋白家族，依其homeodomain序列之相似度可再細分為許多次家族。其中有一分支為非典型的TALE (three-amino acid-loop extension)家族。此家族的特色是在Homeobox的螺旋 I 和螺旋 II 之間多了三個胺基酸殘基所形成的loop，這些loop胺基酸序列在演化上是高度被保留的，演化上TALE家族Homeobox gene和其他的Homeobox gene有蠻多分子上的差異，但這些不同的性質還是被高度保留，顯示說TALE家族基因對於生物生存是相當重要的[1]。

先前在小鼠發現一homeobox gene，因其分類與Irx最為相近，因此命名為Iroquois homeobox-like 1 (*Irx1l*)[4, 5]，在其他文獻中則命名為Mkx[6]。科學家除了針對此基因結構以及演化上和TALE家族其他成員的相似度做探討之外，也利用了全胚胎原位雜交(whole mount *in situ* hybridization)技術分析在小鼠胚胎發育的過程中m*Irx1l*的表現模式，顯示m*Irx1l*會廣泛表現在小鼠胚胎中，例如：體節(somite)、肢芽(limb bud)、發育中的雄性性腺(gonad)、顎鼻隆起(frontonasal process)及顎間質(palatal mesenchyme)。這些觀察暗示m*Irx1l*可能參與這些位置發育的調控路徑。也有文獻指出m*Irx1l*和突變後會造成小鼠內耳發育異常和唇顎裂(cleft lip and/or cleft palate)有關的*Twirler*(*Tw*)基因有關，而m*Irx1l*是位於*Twirler* locus的基因之一，其表現在內耳發育的間葉細胞及下顎，因此m*Irx1l*有可能是*Tw*的候選基因[4]。

斑馬魚發現有兩種isoform，其分別為*Irx1la*、*Irx1lb*，*Irx1l*位於第12條染色體。*Irx1la*和*Irx1lb*的差別只在於蛋白質C端序列的不同，與Irx genes最為相近，但是沒有IRO box。*zIrx1l*從胚胎時期18小時開始表現，並一直持續至5天、且廣

泛表現於成魚的組織中，包括：腦、眼睛、肌肉、卵巢、睪丸與鰓等；而利用全胚體原位雜交的方式顯示，胚胎時期*zIrx11*主要表現在咽喉鰓弓。利用morpholino knock down *zIrx11*後的胚胎，會造成咽喉鰓弓的中胚層與軟骨組織型態發育異常。抑制*zIrx11*轉譯功能會造成咽喉鰓弓肌肉與頭部神經嵴細胞數目減少。Alcian blue染色結果顯示下顎軟骨組織嚴重缺陷，此情況與小鼠的*Twirler* mutation顎裂之外表型[4]非常相似，顯示*Irx11*基因可能會參與下顎形態發育[4,7]。

在哺乳類中大部分的骨骼組織是由軟骨分化所形成，由間葉細胞聚集分化形成軟骨組織之後漸漸被硬骨取代進而形成骨骼。從文獻中已知*Sox5*、*Sox6*、*Sox9*在軟骨的發育中皆扮演著重要的角色[9]。而斑馬魚的*Sox5*也會表現在早期胚胎[9]，並與*Irx11*表現的位置有相似地重疊部分，但其在胚胎發育的調控角色目前並不清楚。

我們在此所用的ATDC5細胞株是一種老鼠畸胎瘤衍生出來的有能力可以分化成軟骨細胞的細胞株，其分化過程大概可以分為四期，第一期增生，此階段細胞數目會大量增生且*Col I*基因會表現；第二期細胞則會接近肥大前的階段，且*Col II*、*Col IX*基因會表現，之後肥大期會產生隨著時間增多及體積變大的cartilage nodules，並且大量表現*Col X*及*Runx2*基因(同時*Col II*表現量下降)，最後會藉由mineralization慢慢被硬骨取代。因此本計畫的目的即是探討當*Irx11*被抑制的情況下，ATDC5細胞的細胞增生及軟骨分化過程是否受到影響。[8]

而有文獻指出N-cadherin是cadherin家族中第一個被發現的，有三個domain，其功能是在細胞之間的附著及發育過程中都扮演重要角色，近來，另有文獻指出N-cadherin參與到軟骨分化的過程中，在分化過程中的N-cadherin會被切割而形成一種訊號造成軟骨分化，其第一次切割是被a disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10)這個蛋白所切割，切割位置於細胞外domain，之後另一種蛋白presenilin1 (PS1)/csecretase會再細胞內切割第二次形成的分子叫Ncad/C-terminal fragment 2 (CTF2)，CTF2類似一種訊號進入細胞核中，進而影響到軟骨的分化能力，也因為先前實驗室發現*Irx11*會去影響到於下顎軟骨的分化情形，所以也會去探討*Irx11*是否和N-cadherin有直接或間接的調控等其他關係。[13]

# Rationale

*Irx11* 為一新發現的homeobox基因，屬於非典型家族中的一重要分枝--TALE (three-amino acid-loop extension) 家族，其homeodomain和IRO(*Irx/Iro*)次家族最為相似，但*Irx11*缺乏IRO(*Irx/Iro*)次家族成員皆共同擁有的IRO box，因此被命名為 *Irx-like 1(Irx11)*。已知*Irx11*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鰓弓，若在胚胎早期以MO將*Irx11* knockdown，則斑馬魚的下顎軟骨發育出現異常，顯示*Irx11*可能會直接或間接的參與下顎軟骨的發育[7]。

在哺乳類動物裡，骨骼的發育是從軟骨開始，之後硬骨取代軟骨，最後形成所謂的骨骼，而軟骨則是由間葉細胞的聚集及分化所形成。間葉細胞接收到分化的訊號，決定了組織的大小、形狀、聚合的細胞數目進而聚集形成軟骨組織，並進一步分化成肥大軟骨細胞，最後硬骨形成。而軟骨細胞是軟骨初級的細胞型態，軟骨的增大是因為軟骨細胞增生及細胞外基質的累積所致。隨著軟骨分化的進展，會有不同的基因表現，例如*Col II a*、*Col X*皆表現在分化的較後期，*Sox9*則表現在所有的軟骨細胞，而在軟骨肥大的晚期表現量則會下降[8,9]。

關於軟骨細胞的分化，目前已知*Sox*轉錄因子基因家族可參與其調控。文獻指出，把小鼠胚胎*Sox5*、*Sox6*基因剔除，其胚胎的軟骨發育會有缺失，甚至在胚胎時期就死亡[9]。目前認為*Sox9*為*Sox5*以及*Sox6*的上游調控基因，*Sox9*負責調控間葉細胞與促進間葉細胞的聚合，之後*Sox5*和*Sox6*則促進間葉細胞的分化形成軟骨細胞。由於*Irx11*基因的調控序列有多個*Sox5*結合位置，我們推測或許*Sox5*可藉由調控*Irx11*來調控軟骨細胞的分化。

因此，我想要研究當*Irx11* knock down時，是否會影響到軟骨的發育。我利用質體(Fig.)製成病毒來感染ATDC5細胞株，使用siRNA來抑制ATDC5細胞株內生性的*Irx11(Mkx)*，以探討其對於軟骨發育所扮演的角色；我將設計實驗來回答下列所想探討的問題：

## 研究問題：

1. 抑制內生性的*Irx11(Mkx)*，對於ATDC5分化早期的細胞增生是否有影響？
2. *Irx11*是否對於軟骨細胞的分化扮演重要的角色？

# Material and Method

## 1. 細胞培養

ATDC5為老鼠軟骨前驅細胞株(chondroprogenitor cell)，生長培養基含有5% FBS(fetal bovine serum)、penicillin(10unit/mL)/streptomycin (10µg/mL)，Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Nutrient Mixture F-12 (F12)內，置於37°C、5%CO<sub>2</sub>培養箱培養。為貼覆型細胞，會出現些微細胞堆疊的情況。當細胞出現高堆疊程度或佔培養皿面積80%，便將細胞以1% trypsin-EDTA將細胞從培養皿取下，取少量細胞放回培養皿繼續培養。加入ITS (insulin、transferrin、sodium selenite) (sigma)可誘發軟骨的分化。

## 2. 篩選穩定表達*Irx11*之ATDC5細胞株

ATDC5 cell培養在dish內，24小時後利用Lipofectamine 2000™ reagent (Invitrogen) 將選殖好的p3Xflag-*Irx11*(hMkx、z*Irx11a*) (2µg) 送入ATDC5 cell中表現，利用500µg/ml G418篩選。選殖成功穩定表達的細胞株則以250µg/ml G418維持。

## 3. Alcian Blue

利用Alcian Blue的染劑可以染軟骨，藉此推測細胞有分化成軟骨。

### A. Alcian Blue 8GX(Sigma-Aldrich A5268)

把medium吸掉後用PBS清洗數次，再以95%MeOH浸泡，之後使其適應在酸性環境中(0.1N HCl)，最後加入1%Alcian Blue (in 0.1N HCl) 染劑，隔夜，最後PBS再洗兩次即可拍照記錄結果。

## 4. 細胞cDNA的製備

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。最後加入加熱的DEPC水回溶。加入DNAase處理37°C，去除殘留的DNA。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 隔夜。於4°C 離心12000g，並移除酒精，留下沉澱物在加入75% 酒精混合均勻後，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。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。之後把每管定量完後取出5µg的RNA量加入 oligo dT (primer) 1µl及剩下補DEPC水，使用RevertAid™ Reverse Transcriptase(Fermentas; EP0442)進行轉錄反應，總體積為20µl。

## 5. 及時定量之反轉錄聚合酵素連鎖反應(Real-time PCR)

取100ng的first-strand cDNA做64倍稀釋，取稀釋後的cDNAs溶液5µl當作模板，加入12.5µl的Power SYBR Green PCR Master Mix以及各0.5µl的正、負股引子，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，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秒即結束，再將所得到的數據套入Applied Biosystems所提供的公式，將個別的Ct值代入公式即可換算出基因表現的相對量，而所用之primer分別為*Irx11*、*Sox5*、*Col I*、*Col II a*、*col X*、*GADPH*，其中*GADPH*為internal control。

計算公式：step1. Ct Target gene-Ct Endogenous gene= $\Delta$ CT

step2.  $\Delta$ CT Sample- $\Delta$ CT Calibrator= $\Delta\Delta$ CT

step3.  $2^{-\Delta\Delta CT}$

## 6. MTT assay

先配置好所需要的溶液(10XMTT(5mg/ml)：medium=1：9)，混合均勻後，接著把細胞的medium移除後用PBS清洗幾次，接著加入所需的MTT液體加入dish中，放入incubater 4個小時，4個小時後把液體移除掉在加入500 µl DMSO回溶(等結晶消失)，使用光度比色計測量OD570記錄。

## 7. 細胞全蛋白萃取

利用 ATDC5 細胞轉染 p3xflag-*Irx11* 的質體。移除 medium，用 PBS 清洗 2 次、10 分鐘，再用 PBS 把細胞從 dish 收至新的 1.5 ml 離心管，離心 2000rpm、3 分鐘，去掉上清液。加入 gold lysis buffer(10% glycerol、1% triton X-100、1mM PMSF、10ug/ml Na<sub>3</sub>vo<sub>4</sub>、1mM EGTA、10mM NaF、1mM sodium



pyrophosphate、100  $\mu$ M  $\beta$ -Glycerophosphate、20mM Tris-HCl、137mM sodium chloride、5mM EDTA, pH7.9) 100 $\mu$ l，以超音波震碎細胞，放冰上 10 分鐘，離心 12000rpm、4 $^{\circ}$ C 15 分鐘，將上清液移至新的離心管，定量，最後與 5X SDS-sample buffer 混合後，加熱 100 $^{\circ}$ C 5 分鐘，冰-20 $^{\circ}$ C 保存。

## 8. 蛋白質定量

首先先配置標準品濃度蛋白質 bovine serum albumin(BSA, NEB)，以 1XPBS 將 BSA(100mg/ $\mu$ l)稀釋為 0.1 mg/ $\mu$ l、0.2mg/ $\mu$ l、0.4mg/ $\mu$ l、0.6mg/ $\mu$ l、0.8mg/ $\mu$ l，蛋白質樣品以 1XPBS 稀釋 100 倍，各取 10 $\mu$ l 加入 96 孔盤，且將 Bio-Rad protein assay(Catalog #500-0006)染劑稀釋 5 倍並取 90 $\mu$ 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，並繪置標準曲線，利用標值曲線來算出蛋白質濃度。

## 9. SDS 聚丙烯醯氨凝膠電泳 (SDS-PAGE)

首先電泳裝置(BioRad)組合完畢後，再去配置好含有 10% SDS 的 polyacrylamide 下層膠體溶液，小心加二次水於上層把膠壓平穩；待膠體凝固後，移除上層酒精，加入上層膠體溶液，並插入齒梳；待膠片凝固後，置於電泳槽中，並注入電泳溶液(running buffer)，將定量好的蛋白加入 loading dye 於 105 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘後並注入 well 中，固定電壓於 80 伏特進行電泳，待染劑跑至焦集膠體再將電壓升至 100 伏特。當電泳結束後，即可取出膠體，進行西方墨點分析。

## 10. 西方點墨分析(Western blotting)

經過 SDS-PAGE 電泳之膠體，浸泡於轉印緩衝液中，接著從正極的方向以多孔性海綿-濾紙-PVDF 濾膜-膠片-濾紙-多孔性海綿之組合裝置於蛋白質轉漬裝置(mini-Trans-Blot Cell, BioRad)內，膠片在負極，PVDF 濾膜，加入轉印緩衝液，固定電壓於 100V 進行轉印 90 分鐘。轉印完之 PVDF 濾膜以 7% 脫脂牛奶浸泡半小時後，加入以 1xCasein 稀釋之一級抗體(附表二)，在室溫一小時或 4 $^{\circ}$ C 反應隔夜。隔日以 TTBS 洗三次後，每次 10 分鐘，再加 HRP-conjugated 之二級抗體，室溫反應 1 至 2 小時後，以 TTBS 清洗三次後，再以 SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate Kit (Pierce)呈色在室溫下反應後，以冷光螢光數位分析系統進行冷光偵測。

## 11. 免疫螢光染色(Immunofluorescence Staining)

前一天先在3cm的dish中種植 $6 \times 10^4$ 個細胞，隔天，用PBS洗個數次，用4%PFA固定30分鐘，再PBS洗數次，接著利用PBSTX、10分鐘後再以PBS洗數次，之後5% goat serum blocking solution放置室溫30分鐘，再來用一級抗體(附表二)放置 $4^{\circ}\text{C}$ 反應隔夜，之後用PBS洗個2次各10分鐘，在暗的環境下加入1:200fluorescein isothionate-conjugated的二級抗體(in 1Xcasein)反應45分鐘，再以PBS洗個數次後，加入rhodamine-phalloidin solution反應45分鐘，最後在加入DAPI rinsed 15分鐘，用清水洗一下後就封片就加入mounting solution，之後就可以利用螢光顯微鏡來觀察結果。

## 12. 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 Mx 這個基因三個不同目標序列(target sequence)的 shRNA 質體細菌株(shIrx11-43 / shIrx11-44 / shIrx11-47)，之後將細菌養大量後抽出質體(lentiviral shRNA plasmid)，並將質體送定序確認，而 scramble shRNA control (pLKO.1-shLuc)則是由學姐所提供，為控制組。下一步將 H293T 細胞種於 10 cm dish，待細胞長約七、八滿，以 PBS 清洗後置換 10 ml 新鮮的 medium，配置製造病毒所需的因子 (pCMV  $\Delta$ R8.9:pMD=9:1)(附圖一、二)並分別與 shLuc、shIrx11-43 / shIrx11-44 / shIrx11-47 / LentiIg(以 pLKO AS3W.neo 質體攜帶(附圖三)以 1 比 1 的比例合成後補水至  $450 \mu\text{l}$ ，隨後加入  $\text{CaCl}_2$   $50 \mu\text{l}$  使 Ca 離子與 DNA 片段結合，室溫 5 分鐘，之後再緩緩加入 HBS  $500 \mu\text{l}$  使其與 Ca 離子結合，室溫 7 分鐘，緩慢加入細胞的培養液中，培養 12 小時，更換培養液培養 36 到 48 小時，收集培養液過  $0.45 \mu\text{m}$ (PVDF)過濾膜，分裝保存於 $-80^{\circ}\text{C}$ 。

## 13. 慢病毒感染(Lentiviral Infection)

將  $4 \times 10^4$  個 ATDC5 細胞種於 6 cm dish，加入慢病毒液進行感染，利用含有  $3 \mu\text{g}/\text{ml}$  puromycin 的培養基，加入 G418 進行篩選成 stable-shRNA cell lines，可把細胞冰凍保存或進行下一步實驗。

# Result

## 1. 利用定量PCR去檢查shIrx11-43及shIrx11-44及shIrx11-47有無knock down效力如何：

發現到shIrx11-43及shIrx11-47是有下降的趨勢，shIrx11-43下降到剩0.13的效力，而shIrx11-47則下降到剩下0.2的效力，但是奇怪的是，shIrx11-44反而增加效力到有8倍之多，卻變成有點over expression的現象(fig.1)。

## 2. 觀察ATDC5正常細胞和shLuc、shIrx11-43、shIrx11-44、shIrx11-47細胞株的細胞型態：

初步觀察進行有經knock down的ATDC5型態，發現其細胞外觀上已經有明顯的變化了，shIrx11-43的細胞觸角沒正常細胞多且形狀較圓，shIrx11-44的細胞較扁平且緊貼，最後shIrx11-47的細胞觸角明顯變得很少且更不易貼盤(fig.2)。

## 3. 經由Alcian Blue染色觀察期分化成軟骨的能力：

經由ITS的誘導分化後，可以發現WT的細胞，其會隨著時間的增加，它形成的nodules會越來越大，進而分化成軟骨，但是看到shIrx11-43及shIrx11-47的細胞，它們在分化的能力上似乎被影響到，比較分散且又比較小，所以推測Irx11會影響細胞的細胞骨架進而影響分化能力(fig.3)。

## 4. 利用免疫螢光染色來觀察在不同細胞株中其細胞骨架(actin)有無不一樣的地方：

可以看到WT的細胞，其細胞骨架看起來很正常，actin很明顯有延伸，但是shIrx11-44的細胞株，發現到其骨架延伸能力好像比WT還要來的好，導致細胞型態呈現扁平狀，跟在明視野看到的情況是吻合的，而有被knock down的shIrx11-43及shIrx11-47細胞株，他們的細胞骨架和WT比起來，有明顯縮短許多且又骨架延伸能力又不太好，且細胞的型態也較偏圓形，推測此現象是會影響到細胞分化的能力(fig.4)。

## 5. 藉由MTT assay測量出ATDC5一段時間(1天~24天)的細胞生長情形：

使ATDC5被轉染入shLuc、shIrx11-43、shIrx11-44及shIrx11-47不同質體後，在未下分化劑的狀況下，觀察不同時間點的細胞數目變化。shLuc為control，在生長的培養基中培養第一天各細胞數目皆無明顯差異，第二天之後shIrx11-47的細胞數目增生的比其它細胞株還快速，到了第三天及第四天時shIrx11-44的細胞數目反而是下降，最後看到shIrx11-43在培養中跟控制組的差異並無太大差異(fig.5)。

而當ATDC5經ITS誘導而開始分化時，其細胞還是會增生並且進入分化的過程中，而分化到四天和八天左右，每株細胞株的生長情況都差不多，但是再分化後第十三天時，發現shIrx11-44及shIrx11-47這兩株細胞死亡率大量上升，在圖表上第十六天就可以看到兩種細胞的細胞數目大幅下降，而第二十四天shIrx11-43及shIrx11-47都快死光。而shIrx11-44其細胞數目都跟WT差不多，甚至到第二十四天有比WT還要快的現象發生(fig.6)。

## 6. 利用western blotting來觀察跟細胞骨架及分化相關的蛋白(N-cadherin以及Rac1)表現量：

在N-cadherin方面，可以看到shIrx11-43及shIrx11-47細胞株的蛋白表現量比WT細胞還要低，而shIrx11-44的表現量則沒有明顯的下降，推測此的現象會影響細胞的分化能力(fig.7)。

另一方面在Rac1表現上，因為有文獻指出當細胞要分化時會先進行聚集，然後形成所謂nodules的動作，此時會藉由Rac1來調控，因此我們也去觀察Rac1的蛋白表現量，發現在分化前期時，WT的細胞其Rac1表現量會隨時間上升，但是shIrx11-43及shIrx11-47的Rac1表現量卻明顯的大幅下降，使Rac1不能表現而導致分化能力下降(fig.7)。

## 7. *Irx11*影響ATDC5軟骨細胞分化的影響：

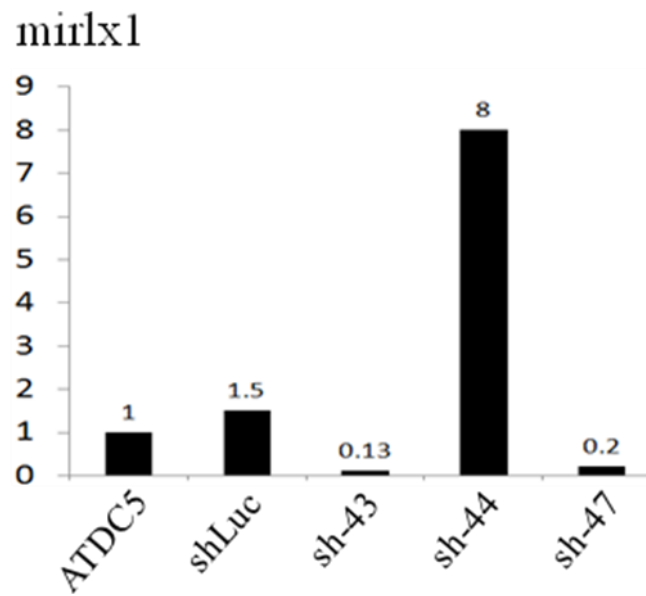
因為從MTT的結果顯示有被knock down的細胞株在分化到12至13天時，細胞都會死亡，所以我們利用PCR的方式去觀察在細胞分化前期，其增生和分化的marker，其表現量的差異。

*Col I* 主要會表現在細胞分化前期的增生時期，在*Col I* 基因表現上，可以看到正常WT細胞在分化前期有比較多的表現，到了分化第4天之後，則有下降

的趨勢，但兩株knock down的細胞株和WT細胞表現趨勢是相反的現象，而其中更以shIrx11-43上升最多，是否可以推測當*Irx11*被抑制，會使細胞增生能力變好(fig.8)。

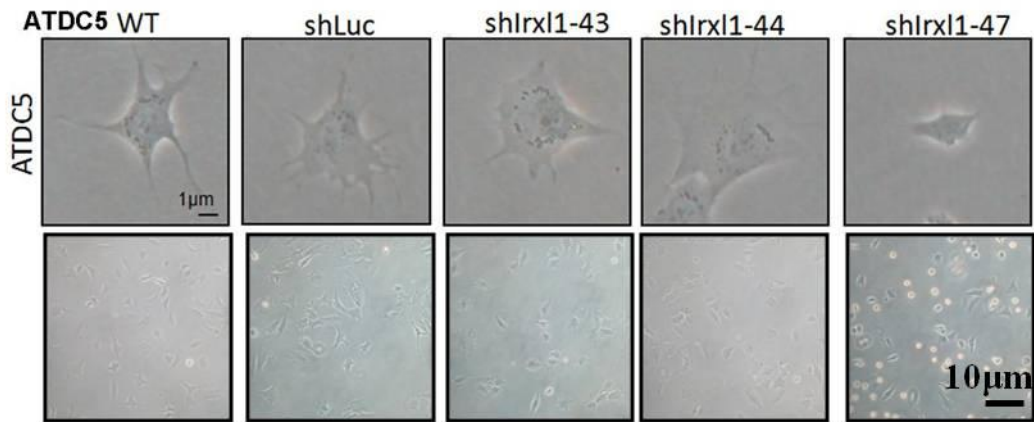
而*Col II*則主要表現在分化前期的分化時期，所以在*Col II*基因表現上，正常WT細胞會隨著時間的增加，表現量有持續穩定的上升，而但兩個被knock down的細胞株卻呈現相反的現象，shIrx11-43細胞是有下降的趨勢，但是shIrx11-47反而是隨時間增加，表現量卻大幅增加，會造成兩者很不一樣的趨勢，原因不是很清楚，未來會更進一步卻探討其中的原因(fig.8)。

## Figure

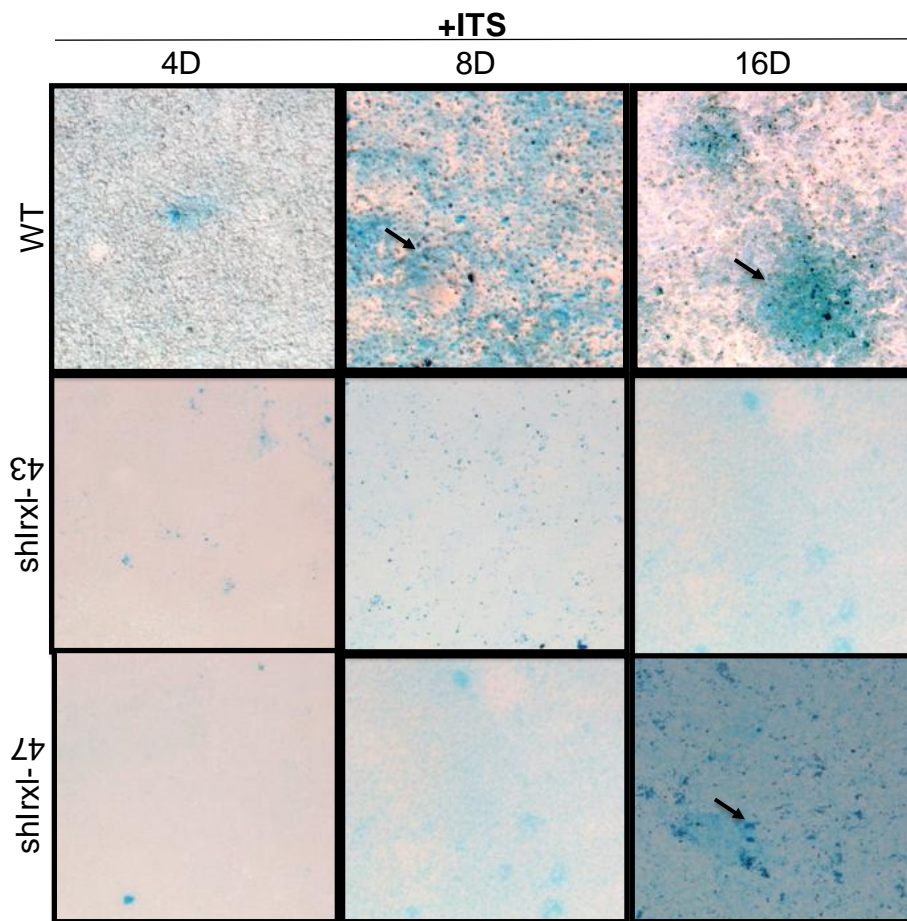


**Fig.1** 利用定量PCR去檢查shIrx11-43及shIrx11-44及shIrx11-47有無knock down效力如何。發現到shIrx11-43及shIrx11-47是有下降的趨勢，但shIrx11-44反而變成有點over expression的現象。

GM



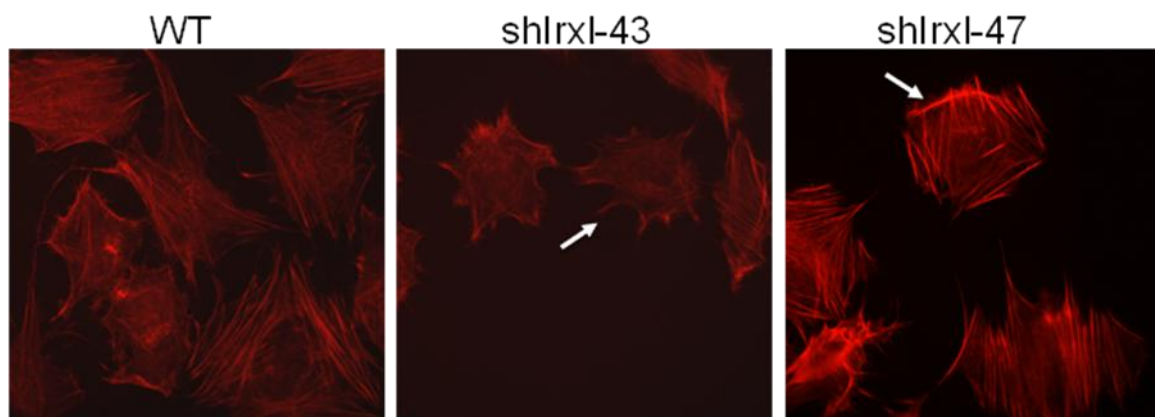
**Fig.2** 經knock down的ATDC5與WT的細胞型態比較。看到在growth medium中可觀察到經knock down的細胞株之型態變化，shLuc的細胞觸角較短但變多，shIrx11-43的細胞觸角沒正常細胞多且形狀較圓，shIrx11-44的細胞較扁平且緊貼，最後shIrx11-47的細胞觸角明顯變得很少且更不易貼盤。上圖的Bar代表1µm.下圖的Bar代表10µm.



**Fig.3** 經由Alcian Blue染色觀察期分化成軟骨的能力。

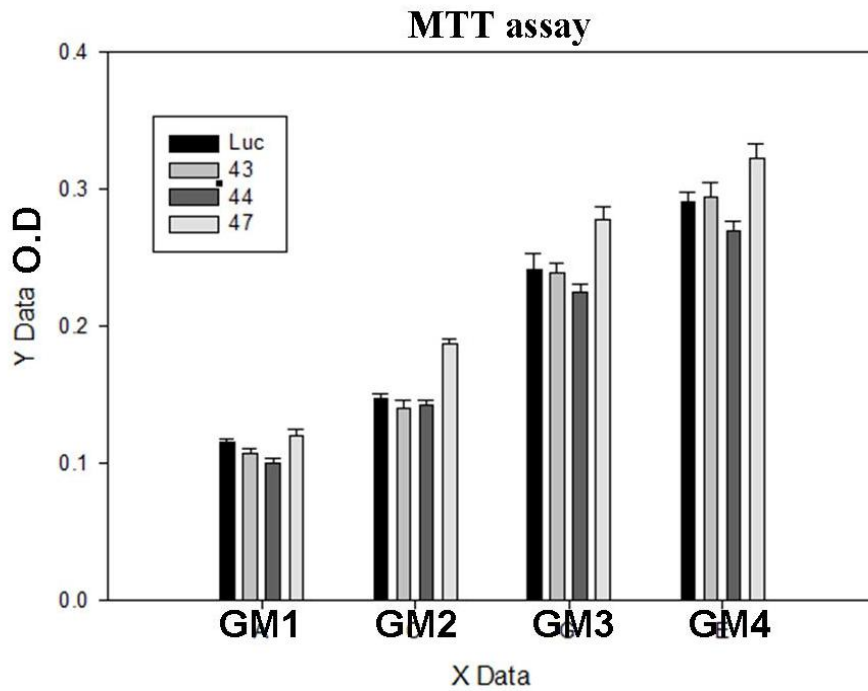
經由ITS的誘導分化後，可以發現WT的細胞，其會隨著時間的增加，它所形成的nodules(箭頭所指處)會越來越大，進而分化成軟骨，但是看到shIrx11-43及shIrx11-47的細胞，它們在分化的能力上似乎被影響到，比較分散且又比較小，所以推測Irx11會影響細胞的細胞骨架進而影響分化能力。





**Fig.4** 利用免疫螢光染色來看不同細胞株的細胞骨架(actin)的差異。

WT的細胞，其細胞骨架看起來很正常，而sh43及sh47的細胞株，他們的細胞骨架WT比起來，有明顯縮短許多(箭頭所指處)，且細胞的型態也偏圓形，以上結果都可以跟上述Fig.1的結果吻合。

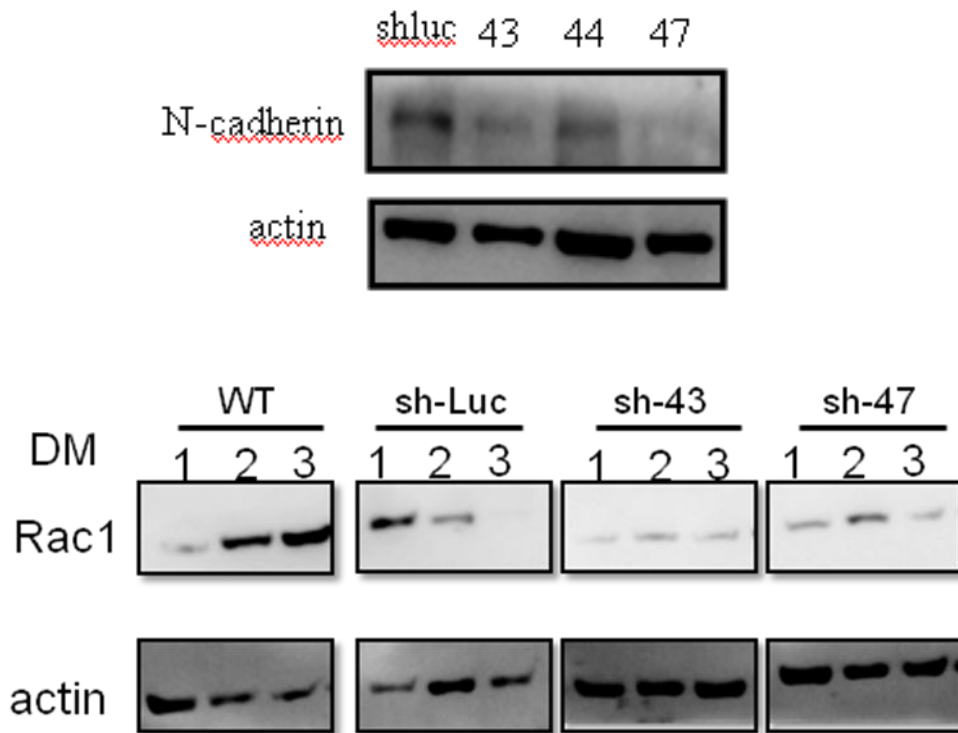


**Fig.5** 利用MTT assay觀察在生長的培養基中，不同細胞株的生長情形。

shLuc、shIrx11-43、shIrx11-44及shIrx11-47不同細胞株在未下分化劑的狀況下培養第一天各細胞數目皆無明顯差異，第二天之後shIrx11-47的細胞數目增生的比其它細胞株還快，到了第三天之後shIrx11-44的細胞數目反而是下降，而shIrx11-43在培養中跟控制組的差異並不大。

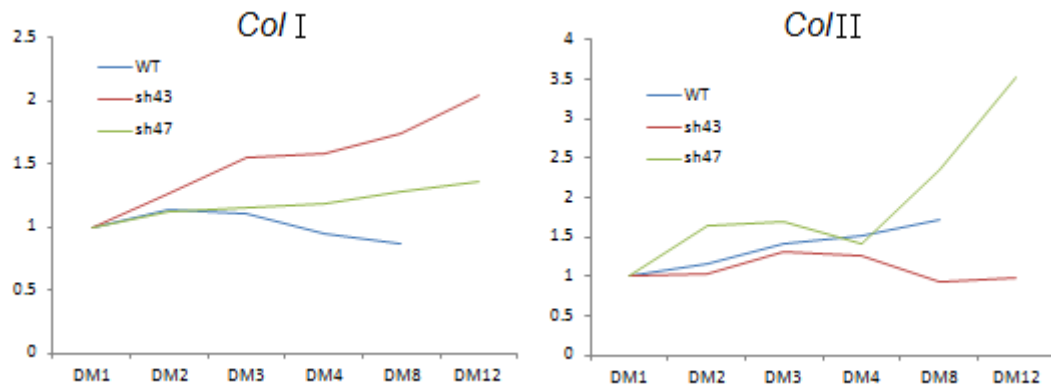


**Fig.6** 利用MTT assay觀察在分化的培養基中，不同細胞株的生長情形。分化到四天和八天左右，每株細胞株的生長情況都差不多，但是再分化後第十三天時，發現shIrx11-43及shIrx11-47這兩株細胞死亡率大量上升，在圖表上第十六天就可以看到兩種細胞的細胞數目大幅下降，而第二十四天shIrx11-43及shIrx11-47都快死光。而shIrx11-44其細胞數目都跟WT差不多，甚至到第二十四天有比WT還要快的現象發生。



**Fig.7** 利用western blotting來觀察N-cadherin以及Rac1的蛋白表現量。

在N-cadherin方面，可以看到shIrx11-43及shIrx11-47細胞株的蛋白表現量比WT細胞還要低。另一方面在Rac1表現上，發現在分化前期時，WT的細胞其Rac1表現量會隨時間上升，但是shIrx11-43及shIrx11-47的Rac1表現量卻明顯的大幅下降，使Rac1不能表現而導致分化能力下降。



**Fig.8** 利用 PCR 來檢測有關分化 marker 的表現量。

在 *Col I* 基因表現上，可以看到正常 WT 細胞在分化前期有比較多的表現，到了分化第 4 天之後，則有下降的趨勢，但兩株 knock down 的細胞株和 WT 細胞表現趨勢是相反的現象，而其中更以 shIrx11-43 上升最多，是否可以推測當 *Irx11* 被抑制，會使細胞增生能力變好。而在 *Col II* 基因表現上，正常 WT 細胞會隨著時間的增加，表現量有持續穩定的上升，但是兩個被 knock down 的細胞株卻呈現相反的現象，shIrx11-43 細胞是有下降的趨勢，但是 shIrx11-47 反而是隨時間增加，表現量卻大幅增加。

## Discussion

經由knock down的方式去抑制ATDC5細胞內生性的*Irx11*想要去看說是否對細胞產生什麼影響，一開始在倒立顯微鏡下發現到說，有被knock down的細胞其細胞型態跟正常的WT細胞有一些差異，即觸角變少等變化，這個結果也利用了免疫螢光染色的方式去標定細胞骨架(actin)，shIrx11-43及shIrx11-47的actin都明顯的縮短且細胞型態都偏圓形，所以更可以證實在倒立顯微鏡下所看到的結果。

接著我們在MTT assay發現到說細胞growth medium時，shIrx11-47細胞生長速率是全部細胞中最快的，而shIrx11-44反而是最慢的，至於shIrx11-43和控制組並無太大差異，接著經由ITS誘導細胞分化後，發現剛開始分化到四天和八天左右，每株細胞株的生長情況都差不多，之後在分化第第十三天時，發現shIrx11-44及shIrx11-47這兩株細胞死亡率大量上升，導致細胞數目迅速下降，而shIrx11-43其細胞數目都跟WT差不多，甚至到第二十四天有比WT還要快的現象發生。此現象有點跟在growth medium中互相矛盾，推測*Irx11*在不同階段可能扮演的角色有所不同。

再來我們利用western blotting去發現到說，和細胞貼附及分化相關的N-cadherin在shIrx11-43及shIrx11-47有下降的趨勢，之前也有文獻指出當軟骨細胞要進行分化的時候，細胞會先堆疊聚集行成所謂的nodules，而這過程中，Rac1扮演了一個調控的角色，我們也發現在shIrx11-43及shIrx11-47剛分化的階段，Rac1的表現比起WT的細胞是下降的趨勢。

最後也利用PCR來檢測有關分化marker的表現量，在*Col I* 基因表現上，可以看到正常WT細胞在分化前期有比較多的表現，到了分化第4天之後，則有下降的趨勢，但兩株knock down的細胞株和WT細胞表現趨勢是相反的現象，而其中更以shIrx11-43上升最多，是否可以推測當*Irx11*被抑制，會使細胞增生能力變好。而在*Col II* 基因表現上，正常WT細胞會隨著時間的增加，表現量有持續穩定的上升，但是兩個被knock down的細胞株卻呈現相反的現象，shIrx11-43細胞是有下降的趨勢，但是shIrx11-47反而是隨時間增加，表現量卻大幅增加。從以上的結果都可以推測說*Irx11*被抑制之後，細胞骨架的確會受到發生影響，進而

去影響到細胞增生能力以及最重要分化成軟骨甚至是硬骨細胞的能力。

# Appendix

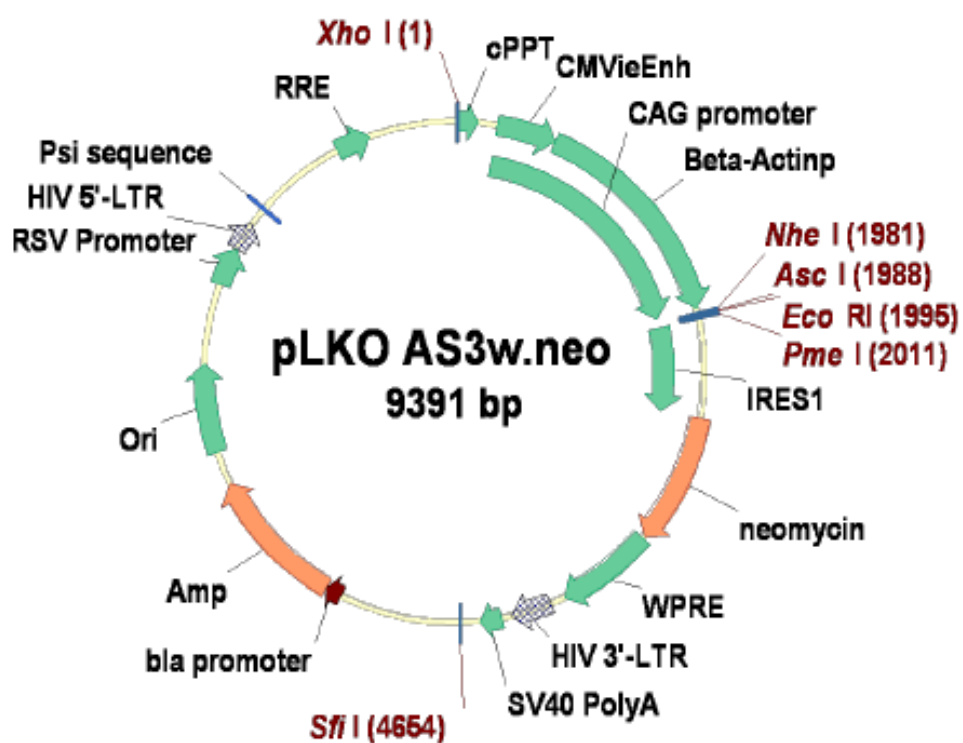
附表一、Q-PCR所用的primer

<b>name</b>		<b>sequence</b>
Col I	forward	5'-CCGTGCTTCTCAGAACATCA-3'
	reverse	5'-GAGCAGCCATCGACTAGGAC-3'
Col II	forward	5'-GAACAGCATCGCCTACCTGG-3'
	reverse	5'-TGTTTCGTGCAGCCATCCT-3'
GADPH	forward	5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'
	reverse	5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTGA-3'

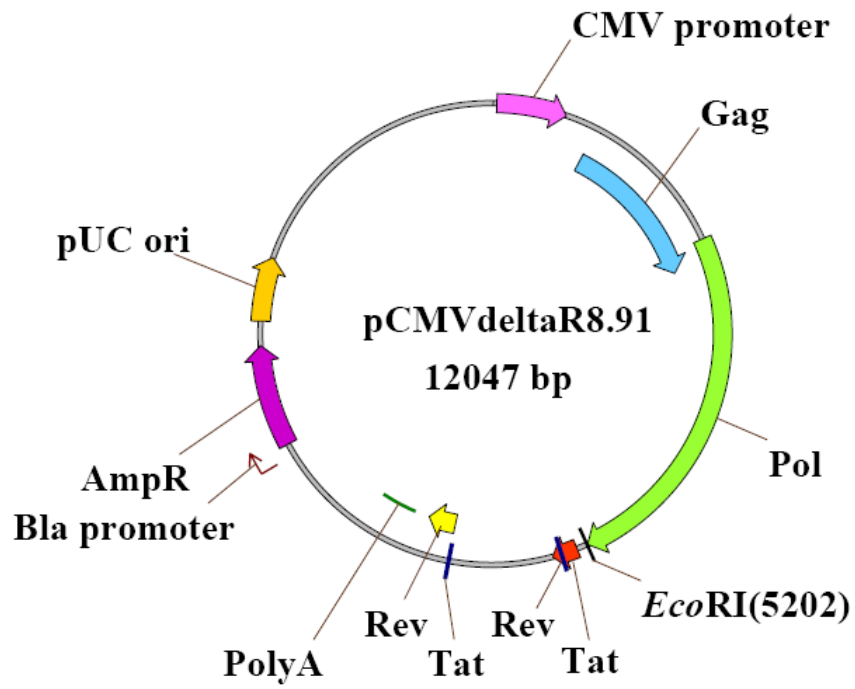
附表二、所用的primary antibody

<b>name</b>	<b>Company</b>	<b>Category</b>	<b>Dilution ratio</b>
N-cadherin	Santa Cruz	cat.#sc-53488	WB:1 : 1000
Rac1	-	-	WB:1 : 2000
Actin	MILLIPORE	cat.#MAB1501	WB:1 : 10000

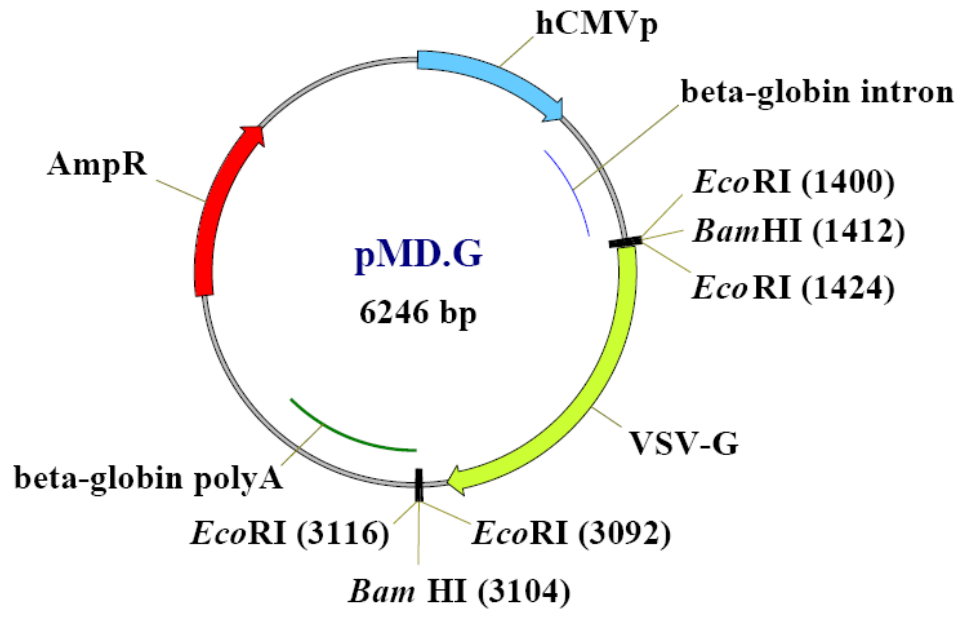




附圖一、用來攜帶shLuc/sh43/sh44/sh47/Lenti-Ig所使用之質體。



附圖二、用來表現HIV-1 Gag和Polymerase(RT)的質體。



附圖三、用來表現VSV-G envelope glycoprotein的質體。

## Reference

1. Mukherjee, K. and T.R. Burglin, *Comprehensive analysis of animal TALE homeobox genes: new conserved motifs and cases of accelerated evolution*. J Mol Evol, 2007. **65**(2): p. 137-53.
2. Scott, M.P., J.W. Tamkun, and G.W. Hartzell, 3rd, *The structure and function of the homeodomain*. Biochim Biophys Acta, 1989. **989**(1): p. 25-48.
3. Weinmann, A., P.R. Galle, and A. Teufel, *In silico characterization of an Iroquois family-related homeodomain protein*. Int J Mol Med, 2005. 16(3): p. 443-8.
4. Liu, H., et al., Identification and developmental expression analysis of a novel homeobox gene closely linked to the mouse Twirler mutation. Gene Expr Patterns, 2006. 6(6): p. 632-6.
5. Takeuchi, J.K. and B.G. Bruneau, *Irx11*, a divergent Iroquois homeobox family transcription factor gene. Gene Expr Patterns, 2007. 7(1-2): p. 51-6.
6. Anderson, D.M., et al., Mohawk is a novel homeobox gene expressed in the developing mouse embryo. Dev Dyn, 2006. 235(3): p. 792-801.
7. Chuang, H.N., et al., *The zebrafish homeobox gene irx11 is required for brain and pharyngeal arch morphogenesis*. Dev Dyn ,2010. **239**(2): p. 639-50.
8. Challa, T.D., Y. Rais, and E.M. Ornan, *Effect of adiponectin on ATDC5 proliferation, differentiation and signaling pathways*. Mol Cell Endocrinol,2010. **323**(2): p. 282-91.
9. Ikeda, T., et al., *Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation*. J Bone Miner Metab, 2005. **23**(5): p. 337-40.
10. Karaplis A.C., J.P Bilezikian, L.G Raisz , G.A Rodan et al (2009) Embryonic development of bone and the molecular regulation of intramembranous and endochondral bone formation. *Principles of Bone Biology*, 2nd ed., vol. 1. Academic, San Diego, pp 33–58
11. Jun K. Takeuchi et al.(2007), *Irx11*, a divergent *Iroquois homeobox* family transcription factor gene
12. Wataru Kimura et al (2011), *Irx11* Mutant Mice Show Reduced Tendon Differentiation and No Patterning Defects in Musculoskeletal System

Development.

13. Shigeto Nakazora et al(2010) , The cleavage of N-cadherin is essential for chondrocyte differentiation.