

國立台灣大學牙醫專業學院口腔生物科學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Oral Biology

School of Dentistry

National Taiwan University

Statin 可經由調控成骨細胞 Sirtuin/FoxO3a/Cyr61 反應途徑來

減緩膠原蛋白所誘導之關節炎的發展

Statin attenuates osteoblastic cell Cyr61 expression via
modulating Sirtuin/FoxO3a/Cyr61 signaling pathway: a
therapeutic potential for arthritis

侯國亮 撰

Kou-Lian Hou

指導教授：林思洸 教授

中華民國九十八年六月

June, 2009

國立台灣大學研究所博、碩士學位考試試卷 (口試紀錄表)

97 學年度第 2 學期

研究所組別：口腔生物科學研究所

學號：R96450006

姓名：侯國亮

論文題目：statin 可經由調控成骨細胞 Sirtuin/FoxO3a/Cyr61 反應途徑來

減緩膠原蛋白所誘導之關節炎的發展

考試日期：98 年 6 月 21 日

考試地點：牙科第一會議室

紀錄：黃韻芝

學位考試成績	捌拾捌						
	至多計算至小數點後一位						
考試委員簽章	張正祺	薛景昇	鄧志輝	林思浩			
備註							

謝誌

想當初剛進來口生所時，還是一個朦朧無懂得新生，對於研究這塊領域還跌跌撞撞的在摸索，沒想到轉眼瞬間就到了鳳凰花開、令人依依不捨的畢業季節了。在這兩年的研究生涯裡，有著許多貴人的相助，也有許多的成功以及失敗，最後才得以譜成這份研究的成果。

首先要感謝的台灣大學，學校所提供的資源以及學校老師所教導的知識奠定我基礎知識的豐富，在學校資源的提供及課堂上老師的教導之下，我學會了做科學所需要的知識以及開闊性，讓我在研究這塊領域裡得知還有更多有趣、深奧未知的學識等著我們去挖掘。再來要感謝的是這兩年來辛苦指導我的林思洸博士，在研究中遇到瓶頸及迷失方向時，透過研讀背景資料及老師的討論不時的引導我走向正確的方向，使我在這兩年中學習如何解決問題、克服並發現新的方向。感謝口試委員郭彥彬老師、張正琪老師、蕭宏昇老師在論文上的指導以及實驗上的建議，使這本論文能夠更完整的呈現。

這兩年中要感謝的人有很多，謝謝吳承恩學長帶我了解這個實驗室，學習實驗的技巧，感謝怡君學姊在我實驗不如意時給我的建議及安慰。謝謝偉良、文正、文宏、麗蓉、阿宗、小雅學姊指導我可以修正的地方。也感謝世緯、沙沙、GaGa、Billy學姊帶我了解七樓及學校附近的環境，讓我對這陌生的環境能夠慢慢的了解。謝謝希文、吳番番、史丹兩年的相伴，這兩年有你們的一起奮鬥讓我並不孤單。另外要感謝的是王志強學長，謝謝你帶我進入這間實驗室，在這兩年中不斷的帶我學習，不管在實驗上或是事情處理上都指導我很多，最後在論文的撰寫上也糾正很多需要修改的地方，使這份論文能夠更加完善，讓我成長很多。

最後，感謝我摯愛的父母默默的在我背後支持我，讓我可以這條研究的路上可以一直走下去，在這兩年所有的成果都是屬於你們的，謝謝。

一、目錄

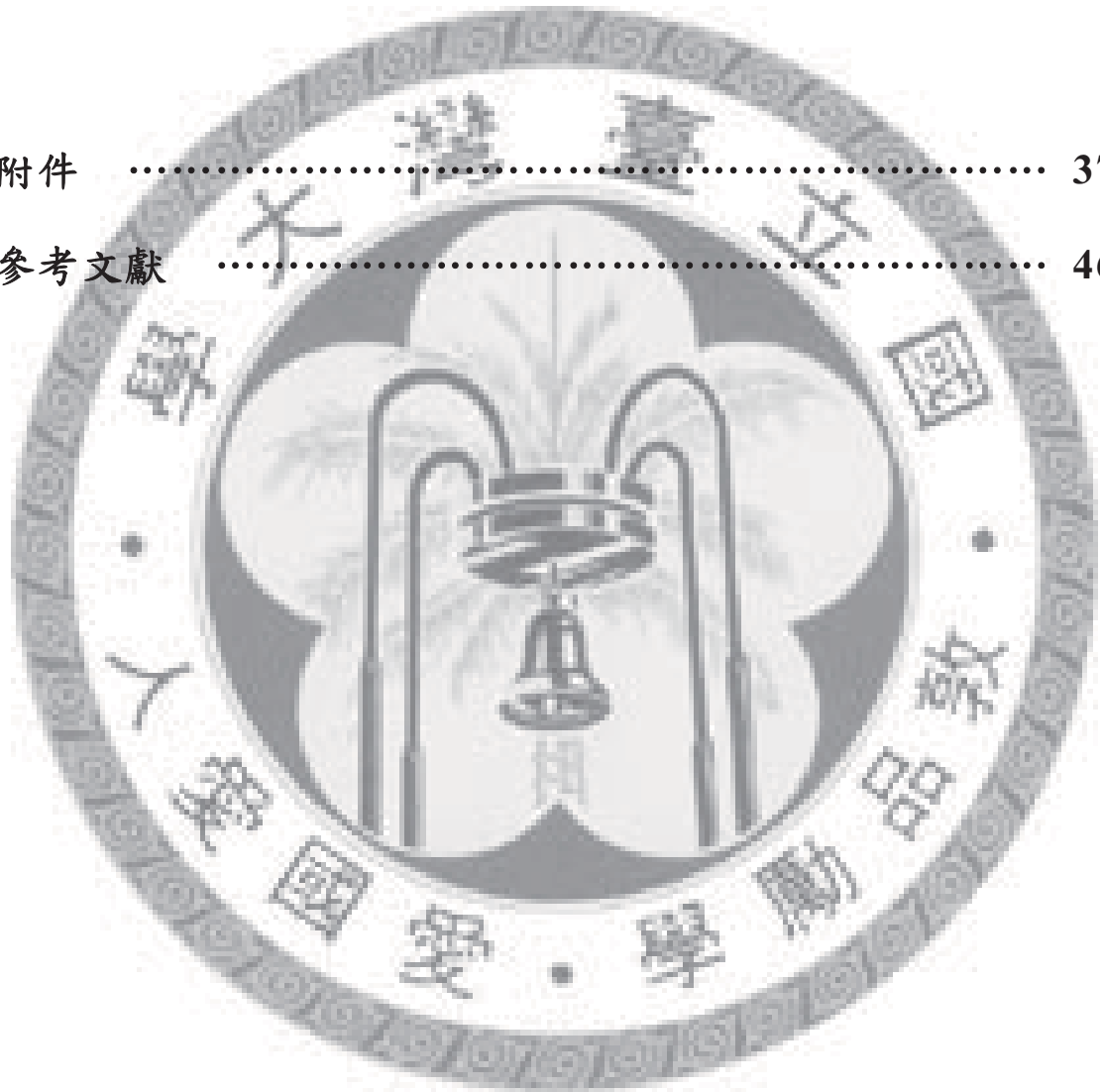
封面	1
口試記錄表	2
目錄	3
摘要	7
-中文摘要	
-英文摘要	
導論	11
1.1 類風濕性關節炎 (Rheumatoid Arthritis)	
1.2 Cyr61 與類風濕性關節炎	
1.3 Simvastatin 與類風溼性關節炎	
1.4 FoxO3a 與 Cyr61	
1.5 Sirtuin 與 FoxO3a	
實驗目的	16
2.1 Simvastatin 藉由 SIRT1/FoxO3a 抑制 Cyr61 蛋白質表現的機制	
2.2 Simvastatin 減緩 CIA 的進展	
材料與方法	17
3.1 試劑與抗體	

3.2	實驗細胞株	
3.3	Transient transfection	
3.4	細胞內蛋白質的萃取	
3.5	西方點墨法 Western blot	
3.6	免疫組織染色	
3.7	免疫沉澱法 (Immunoprecipitation)	
3.8	Collagen induced arthritis in Rat model and simvastatin treat	
3.9	染色質免疫沉澱法 Chromatin Immunoprecipitation	
實驗結果	23
4.1	TNF- α 誘導 Cyr61 在成骨細胞的表現	
4.2	Simvastatin 抑制 Cyr61 在成骨細胞的蛋白質表現	
4.3	Simvastatin 藉由 FoxO3a 調控 Cyr61 的蛋白質表現	
4.4	Simvastatin 促進 FoxO3a 的核轉移	
4.5	Simvastatin 並促進 FoxO3a 對 Cyr61 啟動子的結合親和力	
4.6	Simvastatin 促進 FoxO3a 的去乙酰化	
4.7	第二型膠原蛋白 Type II collagen 誘發類風濕性關節炎	
4.8	Simvastatin 緩和類風溼性關節炎的進展	
討論	31

5.1 Simvastatin 會抑制 Cyr61 蛋白的表現，且這個過程透過 FoxO3a 的核轉移機制。

5.2 Simvastatin 及 Cyr61 在 collagen induced arthritis Rat 中扮演的角色

附件	37
參考文獻	46



中文摘要

類風濕性關節炎(Rheumatoid arthritis,RA)是由於人體產生自體免疫導致在關節處產生慢性發炎所造成的現象。關節處不斷的發炎反應會導致滑膜組織不斷的增生，逐漸增大向其他位置侵襲，造成骨頭的損失。另外慢性發炎反應的持續進行，也會吸引巨噬細胞等免疫細胞浸潤達發炎處，促進蝕骨細胞(osteoclasts)的形成，進行骨吸收的作用。目前對於其詳細的研究機制則仍待更進一步的探討。

Cyr61 (Cysteine-rich angiogenic inducer 61), CCN 家族成員之一，目前已知在細胞生長、血管新生、腫瘤生長、發炎反應等等有關，相關文獻發現在關節炎患者中的B細胞中，Cyr61 會不正常的大量表現，且Cyr61 也會促進血管新生以及巨噬細胞的吸引，因此Cyr61 在關節炎中可能扮演一個重要的角色。有鑒於關節炎的致病機制還不清楚，我們希望能夠透過了解Cyr61 在關節炎中扮演的地位，在治療此疾病上能夠提供更有力的方法。

我們初步的研究顯示，在Collagen-Induced Arthritis(Chaplet et al.)的大鼠模式中，發現受侵蝕的骨頭周圍有大量Cyr61 的表現。此大量表現Cyr61 蛋白質的位置恰好符合巨噬細胞的所在，初步推論Cyr61 蛋白質可以吸引巨噬細胞到發炎處並進一步的破壞骨質。為了更進一步了解其中的調控機制，我們嘗試一種在治療高膽固醇疾病方面的藥物: statin。近年來，statin 在治療關節炎方面的確有其療效，但對其治療效果卻有很大的差異。我們利用 simvastatin 藥物以 matrigel 包裹注射至老鼠膝關節，使之穩定緩慢的釋放出來，發現經由 simvastatin 治療後，對關節炎的進展有舒緩的效果，證明 statin 在治療關節炎上極具潛力。另外在 *in vitro* 方面，發現 simvastatin 會經由促進 FoxO3a 的核轉移(nuclear translocation)，使 FoxO3a 活化後，對下游的Cyr61 啟動子進行轉錄抑制，造成Cyr61 蛋白表現量的減少。為了更進一步的了解 simvastatin 是透過何種機制來促進 FoxO3a 的活性，參考文獻中

發現，FoxO3a 主要是透過乙醯化(acetylation)及磷酸化(phosphorylation)的方式影響其核轉移，其中乙醯化可能是扮演 FoxO3a 的重要調控機制之一。另外，我們的研究也指出 SIRT 在冷光酶分析法(luciferase assay)中可以看到對 Cyr61 啟動子的抑制，而且 SIRT1 與 FoxO3a 蛋白質的交互作用，在共同免疫沉澱法(co-immunoprecipitation)實驗中，的確有結合的現象。顯示出 SIRT1 在 FoxO3a 活性的調控中，可能扮演另一個重要的角色。

未來，我們除了在 simvastatin 所引起下游 SIRT1、FoxO3a、Cyr61 的分子機制需要更清楚的釐清外。這些蛋白質在膠原蛋白所誘導的關節炎大鼠模式中，也待更進一步的了解其所扮演的地位。希望能夠建立一個完整的研究機制，試圖解釋 Simvastatin 是透過 SIRT1 來促進 FoxO3a 的活性，進而抑制下游基因 Cyr61 蛋白的表現，使得關節炎中骨頭的骨吸收程度有明顯的緩和作用。利用此完整的機制，對於未來在治療類風濕性關節炎中具有良好的效果。



Abstract

Rheumatoid arthritis is chronic, inflammatory, systemic, autoimmune diseases characterized by chronic arthritis leading to progressive joint erosions. Inflammation recruits immune cells such as macrophage to the site leading to bone erosion. The recruitment of inflammatory cell is the major risk factor in the arthritis and the mechanism is needed more research. Cyr61, the CCN family, named CCN1 has been reported plays an important role in RA patients. Cyr61 mRNA has a significant increase in RA patients and promotes macrophage migration. In our collagen-induced arthritis(CIA) model, Cyr61 expressed and seems to recruit macrophage to bone resorption area means that it may promote macrophage infiltration and resulted in CIA progression. *In vitro*, treatment of Cyr61 recombinant protein direct promoted macrophage migration and enhanced CCL2 chemokine expression in U2OS. Thus, Cyr61 has the ability to deteriorate RA progression.

Statin, a cholesterol synthesis inhibitor, has been reported to have a potential in therapy of arthritis. To investigate the effect of arthritis, we administrated simvastatin to joint space and led to alleviate CIA progression. By local injection of simvastatin, this way of administration can avoid the liver-specific characteristic. In U2OS cell, treatment of simvastatin decreased Cyr61 expression via activation FoxO3a. Simvastatin activated FoxO3a through promoting its nuclear translocation. FoxO3a activity is mediated by post-transcriptional modification that includes phosphorylation and acetylation. Phosphorylation at Thr32, Ser253 and Ser315 leads to nucleus export and acetylation attenuates FoxO3a DNA binding affinity. Simvastatin activated FoxO3a through decreasing its phosphorylation and acetylation. Thus, nuclear FoxO3a bound to Cyr61 promoter and repressed transcription. Deacetylation of FoxO3a seems to SIRT1-dependent manner. Treatment of Simvastatin enhanced SIRT1 activity and

promoted FoxO3a interaction. The references related to statins on FoxO3a phosphorylation are much clear than acetylation. We found a way that statins mediate FoxO3a acetylation

In summary, simvastatin represses Cyr61 expression through promoting FoxO3a deacetylation and nucleus translocation *in vitro*. In animal model, simvastatin alleviates CIA progression, decreases Cyr61 expression and promotes FoxO3a nuclear translocation that correlated with *in vitro* data. By confirming the SIRT1/FoxO3a/Cyr61 pathway, it will be a potential target in therapy of RA.



第一章 導論

1.1 類風濕性關節炎 (Rheumatoid Arthritis)

類風濕性關節炎(Rheumatoid arthritis)是一種自體免疫引起的慢性關節炎。正常情況下，關節腔裡有一層滑膜(Synovia membrane)，可分泌關節滑液以滋潤和保護關節。罹患類風濕性關節炎的病人，由於發炎反應持續發生，使得關節因發炎細胞的堆積產生紅、腫、痛、熱等現象。嚴重時會破壞關節內軟骨及骨骼，造成關節的變形而無法自由活動，甚至也會造成其他器官的發炎，可說是一種全身性的慢性發炎疾病。此病女性平均罹患率約為男性的三倍，台灣則約有十萬人罹患此疾病。

骨骼再造(Bone remodeling)描述骨骼更新的一個機制，其中包含了兩種機制骨吸收及骨生成(Bone resorption and Bone formation)，分別由蝕骨細胞(osteoclast)與成骨細胞(osteoblast)所達成。正常情況下骨骼再造會維持動態平衡，保持骨頭適當的密度與強度。但隨著年齡的增長骨吸收的作用會大於骨生成，導致骨的密度及強度開始下降。

1.2 Cyr61 與類風濕性關節炎

類風濕性關節炎所造成的發炎反應能夠破壞骨頭再造的平衡，慢性發炎的患處常會因為蝕骨細胞過度活化而造成硬骨組織的損傷(Bone erosion)。2006年 Christian S. Haas 利用 cDNA microarray 分析多位同卵雙生雙胞胎兄弟的關節腔液，發現其中一個血管新生因子，Cyr61 的表現有顯著增加¹。同年也有學者報導，Cyr61 在股骨頭壞死(osteonecrosis)當中也有高度的表現²。目前 Cyr61 在關節炎中扮演的角色仍有待更進一步的研究。

Cyr61 又名 IGFP-10，以微陣列分析(microarray)BALB/c 3T3 細胞在血清的刺

激下所調控的瞬間基因產物^{3,4}。CCN1/Cyr61 是 CCN 家族成員之一，CCN 家族還包括 CCN2/CTGF、CCN3/Nov、CCN4/WISP1、CCN5/WISP2 和 CCN6/WISP3⁵。CCN 家族皆為分泌性蛋白，分泌到細胞外後會和細胞基質(extracellular matrix)與細胞間受器結合以進行各種生理調控⁶。CCN 家族表現通常和血管新生(angiogenesis)以及發炎有關係。例如傷口癒合(wound healing)、關節炎(arthritis)、腫瘤(tumors)以及因為外科手術或動脈硬化所造成的血管損傷。

Cyr61 在關節炎(RA)病人的關節腔液有高度的表現。S. Radke 的研究團隊也觀察到 Cyr61 在發生股骨頭壞死(osteonecrosis)的股骨頭部分會表現。可以看到這個蛋白質在骨頭損傷及重建扮演的地位。並且也暗示 Cyr61 與 RA 之間或許是緊密相關，但是在 RA 進展(RA progression)中扮演的角色和地位仍然不清楚。目前已知發炎反應是造成關節炎(RA)的主要原因，而 Cyr61 表現的位置與發炎的位置有關。在發炎反應最後所進行的步驟中，受傷的組織被纖維母細胞(fibroblasts)所填補，並產生大量的胞外基質(extracellular matrix)包圍在細胞間。在這個過程中，TGF- β 及 CCN2 被認為會調控 ECM 的分解(deposition)。2005 年 Norifumi HM 團隊發現，chondrosarcoma-derived HXS-2/8 細胞(model of human articular chondrocytes)若處於 pro-inflammation 的狀態(以 TGF- β 處理)，Cyr61 及 CCN2 的表現量會增加。作者認為 Cyr61 的作用應該類似 CCN2，當成一個 regenerative molecule⁷，換言之，Cyr61 的表現能夠幫助關節炎(RA)患者修復發炎反應(inflammation)所造成的傷害。

關節腔內的血管(synovial blood vessels)密度與 synovial cells 的增生(hyperplasia)以及單核球的浸潤(infiltration of mononuclear cells)⁸有關，在關節炎疾病發展過程中發生的 synovial cells hyperplasia，造成增生的細胞與周邊血管的距離變大，這樣的情形會產生一個局部缺氧與缺血的环境(local hypoxia and hypoperfusion)⁹，而慢性發炎所造成關節腔液體積的增多，也會阻礙血管的血流以加重缺氧的情形。血

流減緩所造成的代謝物累積及缺氧的環境是血管增生的訊號¹⁰。Brown Ra 等人曾經報導在關節炎患者(RA patients)的關節腔液找到與腫瘤相似的血管增生因子(angiogenic factor)¹¹。血管增生會帶來更多的生長因子(growth factors)以及養分，提供細胞的浸潤(infiltration)並促成關節翳(pannus)侵犯速度增快，並造成關節的腫脹、對疼痛更敏感。來自關節炎病患的關節腔液，也被發現會使內皮細胞型態發生改變¹²。血管新生因而對於 RA 的發展以及維持有一定的貢獻。在 melanoma³、fetal bovine bladder smooth muscle cells¹³ 都曾經報導 Cyr61 也是一個促血管新生的因子，可以被低氧(hypoxia)所誘發。這樣的關聯，暗示我們 Cyr61 可能會因為促進血管的新生，促使 RA 疾病的發展。

1-3. Simvastatin 與類風溼性關節炎

Statin 為 HMG-CoA reductase inhibitor，為膽固醇(cholesterol)合成中速率決定(rate-limiting)酵素的抑制劑(inhibitor)。由日本東京的 Endo 及 Kuroda 所發展出來，目前已知有 mevastatin、lovastatin、simvastatin、fluvastatin、atorvastatin 等等不同藥物問世...。近年來在 statin 藥物的研究，除了發現可用於在抑制膽固醇生成方面¹⁴，許多文獻也指出 statin 藥物可用於抑制腫瘤的生長及轉移¹⁵、促進血管新生¹⁶、降低 β -amyloid 的量¹⁷、T 細胞的生長¹⁸ 等等。另外也有研究顯示 Simvastatin 會促進 osteogenic 基因的表現並促使軟骨的生成，進而抑制骨頭的破壞¹⁹。但也有學者持相反意見，一些研究認為 statin 在動物模式中對骨生成為負向的調控²⁰。截至目前為止，statin 藥物在骨頭缺失等疾病中，詳細的作用機制及療效並沒有很明確的研究，甚至多位不同的學者做出來的治療效果並不一致。在 simvastatin 的研究中，其中 2008 年一篇文獻指出 simvastatin 在骨頭的缺失方面，具有增加骨頭的密度傾向²¹。然而其中影響 statin 藥物治療效果的因素有很多，例如投藥方式、statin 藥物的種類、以及劑量的使用等等。被認為主要因素的是投藥方式，由於脂溶性 statin 藥物具有肝臟專一性的特性，導致口服、靜脈注射及皮下注射後肝臟代謝後

所釋放出來的 statin 不足以對骨頭破壞處產生作用，使得不同的學者對於 statin 的治療結果並不一致，因此作者認為選定一個正確及有效的投藥路徑可能是改善 statin 藥物治療效果的一個重點²¹。

1-4. FoxO3a 與 Cyr61

Fork head 基因最早在黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)中被發現，現今被發現有超過一百種不同的家族成員，大多都是扮演轉錄因子的角色。較為熟知的則是其中 Fox 家族中的 O family(FoxO)，FoxO 主要是藉由磷酸化、乙醯化及蛋白質降解所調控。在磷酸化方面，FoxO 上有三個 Akt/PKB 磷酸化位置，分別是 Ser259、Thr32 及 Ser315。細胞在富有養分的狀態之下，透過 Akt/PKB 的磷酸化訊息路徑，使細胞不斷的生長、複製。Akt/PKB 訊息路徑中磷酸化的 Akt 會對 FoxO 磷酸化，導致 FoxO DNA 結合位置被遮蔽並被 14-3-3 蛋白質所結合，以核外送(nuclear export)的機制從細胞核轉移到細胞質中²²，細胞質中的 FoxO 除了活性被抑制外，也會透過 ubiquitylation 進行蛋白質的降解，減少蛋白質的量。另外當細胞處於壓力的環境下，例如氧化壓力、UV 的照射及 DNA 損傷情況時，FoxO 則會被活化並且由細胞質轉移至細胞核中，對其不同下游的基因進行調控。目前已知 FoxO 在細胞凋亡(apoptosis)、細胞週期停止(cell cycle arrest)、DNA 修復(DNA repair)、抵抗氧化壓力(oxidative stress resistance)、壽命(longevity)以及肌肉的生長與萎縮(muscle growth and atrophy)等有關²³。已知在 FoxO 主要是透過 3 種修飾機制影響其活性，磷酸化(phosphorylation)、乙醯化(acetylation)以及 ubiquitylation，有越來越多的文獻對 FoxO 的功能及調控在持續進行中。就目前為止，FoxO3a 及 Cyr61 相關的文獻並不多，有報告證明 FoxO3a 在血管平滑肌細胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)中，對 Cyr61 扮演轉錄抑制者的角色(transcriptional repressor)²⁴。FoxO3a 會直接藉由結合到 Cyr61 啟動子進而抑制其轉錄作用，使 Cyr61 表現量下降。對於 FoxO 在 Cyr61 中則仍需更進一步探討。

1-5. Sirtuin 與 FoxO3a

Sirtuin, Silent information Regulator 2 protein (Sir2), 為 protein deacetylase。其中共有七種不同的異位體(isoform), 大多都是扮演對 acetyl-lysine 上去乙醯化的作用。已知大多作用在組蛋白(histone)上, 調控各種不同基因的轉錄作用²⁵。在 Sirtuin 的研究中目前認為 SIRT1 過量表現時會延長細胞的壽命²⁶, 對於其中詳細的機制仍須更多研究以待釐清。文獻指出, sirtuin 會和 FoxO1 轉錄因子結合並對其去乙醯化, 造成 FoxO1 的核轉移(nuclear translocation)²⁷, 或者對 FoxO3a 去乙醯化抑制對下游基因的轉錄。顯示出 sirtuin 除了在 histone 的調控之外, 也會對 FoxO 轉錄因子進行去乙醯化的修飾, 造成其不同功能的影響。對於 Sirtuin 在 FoxO 的影響則還需更多的研究來證實。



第二章 實驗目的

我們以 CIA 大鼠動物模式，模擬人類關節炎的病症，觀察在 CIA 大鼠模式下，simvastatin 對關節炎進展的影響，並且以免疫組織染色觀察 Cyr61 及 FoxO3a 扮演的角色。在 *in vitro* 方面，初步觀察到成骨細胞株(U2OS)在 TNF- α 所誘導的 Cyr61 會被 simvastatin 所抑制，顯示 simvastatin 透過某種機制抑制 TNF- α 所誘導的 Cyr61 表現。其中的機制，我們預期可能是透過 SIRT1 及 FoxO3a 的調控進而抑制 Cyr61 的表現。藉由釐清此 simvastatin、SIRT1、FoxO3a 及 Cyr61 的訊息傳遞路徑，期望在治療類風濕性關節炎中能夠具有治療潛力的目標。

一、 Simvastatin 藉由 SIRT1/FoxO3a 抑制 Cyr61 蛋白質表現的機制

1. Simvastatin 對 Cyr61 蛋白質表現的影響
2. Simvastatin 對 SIRT1 和 FoxO3a 結合能力
3. Simvastatin 對 SIRT1 活性
4. SIRT1 對 FoxO3a 去乙酰化的調控機制

二、 Simvastatin 減緩 CIA 的進展

1. 探討局部注射 simvastatin 到老鼠膝關節對 CIA 進展的影響
2. Simvastatin 對 FoxO3a 核轉移
3. Simvastatin 對 Cyr61 的表現的影響

第三章 材料與方法

3.1 試劑與抗體

Simvastatin (Merck)、Proteinase inhibitor cocktail (Roche)、Immunization Grade Bovine Type II Collagen、Incomplete Freund's Adjuvant (Chondrex)、Matrigel™ Basement Membrane Matrix, LDEV-Free (BD)、BCA Protein Assay Reagent (Pierce)、Arrest-In reagent (Openbiosystem)、OPTI-MEM (Invitrogen) Dual-Luciferase kit (Promega)、Chromatin immunoprecipitation kit (Upstate)、SIRT1 activity assay (Sigma)、FoxO3a (Millipore、Abcam、Abnova)、pThr32-FoxO3a (Millipore)、Cyr61 (Santa Cruz)、 α -tubulin (Sigma)、SIRT1 (Abnova)、Lamin B (Abcam)、Acetyl-lysine (Abcam)、CD68 (Chemicon)、BCA™ Protein Assay (Thermo)。

3.2 實驗細胞株

實驗所採用的細胞株為 U2OS (osteosarcoma from Homo sapiens with osteoblast phenotype) 來自美國細胞庫收集中心(ATCC)所購得，以 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) complete growth medium(10%胎牛血清、L-glutamine、Antibiotics) 於 37 度 C，CO₂ 分壓 5% 培養。

3.3 Transient transfection

利用血球細胞計數盤計算細胞顆數。6X10⁵ cells/6cm 在 10% FBS/DMEM (不含抗生素) 培養隔夜。將培養基置換成 OPTI-MEM。取 21 μ l Arrest-In+50 μ l OPTI-MEM 與 4 μ g DNA+50 μ l OPTI-MEM，混合上述兩種溶液，常溫下靜置 10 分鐘，溶液緩慢加入培養皿中混合均勻。6 小時後更換成 DMEM/Complete medium。待細胞轉染 24 小時後，收集細胞以萃取細胞內的蛋白質。

3.3 細胞內蛋白質的萃取

細胞以冷卻的 PBS 清洗兩次後，吸乾後加入適量的 RIPA lysis buffer (50mM Tris pH 8.0、150mM NaCl、1% NP-40、0.5% Sodium deoxycholate、0.1% SDS、Proteinase inhibitor 現配)，以細胞刮勺將培養盤上的細胞收集到 1.5 ml 離心管，短暫的以超音波震盪器震碎細胞，離心 12000 rpm，低溫 10 分鐘後收取上清液。並以 BCA 蛋白質測定組測定蛋白質濃度，取 30 μ g 蛋白質混合 Sample loading dye (0.5M Tris-HCl、20% Glycerol、10% SDS、20% β -mercaptoethanol、1% bromophenol blue)沸水水浴 10 分鐘，冰上 10 分鐘後以西方點墨法分析。

3.4 細胞核/質蛋白質的萃取(Macnaughton TB, J Virol., 2002 3928-35)

細胞以冷卻的 PBS 清洗兩次後，吸乾並加入 1ml PBS (含蛋白酶抑制劑)，以細胞刮勺收集到 1.5ml 離心管。離心 6000rpm，4 $^{\circ}$ C，20 秒後去掉上清液。加入 1500 μ l Nucleus extraction buffer (100mM NaCl、10mM Tris-HCl pH 7.4、1mM EDTA、1% NP-40、proteinase inhibitor)，以 P1000 pipette 小心均勻混合後冰上作用 4 分鐘，離心 6500rpm，20 秒，4 $^{\circ}$ C，將上清液收集至新的 1.5 ml 離心管，此即為細胞質蛋白。再離心 9000 rpm，1 分鐘，4 $^{\circ}$ C，仔細去掉殘留的液體後加入 100 μ l RIPA lysis buffer(含 proteinase inhibitor)，震盪 10 秒至均勻混和，冰上作用 10 分鐘後離心 12000 rpm，20 分鐘，4 $^{\circ}$ C，上清液即為核蛋白。核質比例在成骨細胞約為 1 比 4。

3.5 西方點墨法 Western blot

實驗所使用的為含有丙烯醯胺(polyacrylamide)的電泳膠體，依據分析蛋白質分子量的不同，配置不同濃度的電泳膠體，一般而言介於 6~15%之間。進行 loading 前的蛋白質先混合 sample loading dye，以高溫 100 $^{\circ}$ C 的沸水加熱 10 分鐘，冰上靜置 10 分鐘之後加入 SDS-PAGE 電泳槽進行電泳。並且以蛋白質分子基準液

(Fermentas)做基準，待蛋白質分子於膠體內移動到適當位置，進行蛋白質的轉漬。本實驗所使用的轉漬膜(transfer membrane)為 Hybond C-extra nitrocellulose (Amersham Pharmacia Biotech)，將跑完電泳的膠片取下，使用溼式轉漬設備(Hofer)注入轉漬緩衝液(Glycine 43.23g; Tris 9.08g; Methanol 600ml; H₂O to 3L)以電壓 100 伏特進行 90~120 分鐘，使全部蛋白質轉漬到轉漬膜上，完成後以 5%的脫脂奶粉(溶於 TBST)blocking 一小時，填補膜上多餘的孔洞。

取適當蛋白質與抗體比例在 4 度 C 中反應至隔天，一級抗體結束後以 TBST(Tween-20 0.25%、Tris)緩衝液清洗一小時，每 20 分鐘更換一次新鮮緩衝液。再以二級抗體(HRP-labeled antibody)1 比 8000 室溫下作用一小時，以 TBST 清洗一小時(條件如上)，最後加入 ECL 感應試劑(Pierce)，以 X 光底片適度感光。

常用的一集抗體比例

抗體	比例	Catalog	Source
Cyr61	1:2000	Sc-13100	Santa Crus
FoxO3a	1:2000	#07-702	Upstate
FoxO3a(Thr32)	1:500	#07-695	Upstate
α -Tubulin	1:3000	T5168	Sigma
Lamin B	1:2000		Abcam
SIRT1	1:1000		Abnova

3.6 免疫組織染色

切片事前以 56 度 C 烘箱置放隔夜，以 xylene 脫蠟 30 分鐘後覆水(100%、75%、

50%、2dH₂O)分別一分鐘，以 PBS 清洗兩次後加入 citrate buffer 95 度 C 水浴 10 分鐘使蛋白質抗原裸露，隔水緩慢降溫 10 分鐘。PBS 清洗 3 分鐘兩次後室溫泡在 3% H₂O₂ 10 分鐘，再以 PBS 清洗 5 分鐘兩次。0.1% Triton-X100 室溫 5 分鐘後 PBS 清洗 5 分鐘兩次。以 CAS blocking buffer 室溫作用 10 分鐘後加入 1 級抗體 FOX3a (abcam ; ab47409) 1:300，Cyr61 (Santa cruz ; sc-13100) 1:200，CD68 (CHEMICON ; MAB1435) 1:200，4°C 作用隔夜。隔天室溫靜置 30 分鐘後以 wash buffer (0.05% tween-20 in PBS)清洗 5 分鐘三次，加入 Envision Dual Link system peroxidase 室溫 15 分鐘。DAB 呈色 1.5 至 2.5 分鐘(顯微鏡下觀察)後以二次水清洗。加入 Hematoxylin conterstain 10 至 15 分鐘，以 running buffer 清洗後風乾並封片即可觀察。

3.7 免疫沉澱法 (Immunoprecipitation)

細胞處理 simvastatin 或 TNF- α 後加入 600 μ l Co-IP lysis buffer 4°C 作用 20 分鐘，將上清液收集到 1.5ml 離心管。以 BCA 定量組測定蛋白質濃度，取 1mg 蛋白質調整成 1 μ g/ml，加入 30 μ l Protein-A 4°C 作用 30min 作為 pre-clear。4°C 離心 12000rpm 將上清液置換到新的 1.5ml 離心管，加入 1 級抗體 2.5 μ g 4°C 均勻旋轉隔夜。加入 30 μ l Protein-A 後 4°C 旋轉 30 分鐘後離心 6000rpm 1 分鐘，去掉上清液以 500 μ l PBS 清洗兩次，以扁頭 Tip 將殘留液體吸乾，加入 2X protein sample loading dye 沸水水浴 10 分鐘，離心 8000rpm 1 分鐘後取上清液以 western blot 偵測。

3.8 Collagen induced arthritis in Rat model and simvastatin treat

Collagen preparation，配置 5ml 中含有 2mg/ml protein solution: 取 5 ml 0.05M acetic acid 與 10mg collagen，在 4°C 緩慢的混勻隔夜。為避免蛋白質的變性與降解，於 4°C 約能保存一個禮拜。Protein solution:adjuvant = 1:1，最終濃度為 1mg/ml。以雙向閥與針筒製作乳劑，過程必須維持低溫。為了測試乳劑的穩定性，可以拿一個接水的燒杯，將一滴乳劑滴入，穩定狀態下乳劑會保持固定的形狀而不會散掉。

配置好之後，於大鼠背部三點及尾部皮下注射各 200 μ l 乳劑。為了確保高效率的誘發與關節炎的嚴重程度，我們在第一次免疫之後的第七天再給予一次的注射。

Simvastatin/Matrigel preparation, Matrigel 在 4 $^{\circ}$ C 為液態，在低溫下取 200 μ l matrigel Solution 加到 simvastatin 瓶中調整成 25mg/ml, 均勻混合後放置冰上避免形成固體。

第七天在老鼠的膝關節部以 90 度將 5mg simvastatin 注射至關節腔內，並在第 14 天再注入 4mg Simvastatin，另一部分關節則以 PBS 注射 200 μ l 做為控制組，於第 43 天將老鼠犧牲擷取膝關節做後續實驗。

3.9 染色質免疫沉澱法 Chromatin Immunoprecipitation

所有材料根據 CHIP assay kit 所配置 (Upstate, #17-295), Salmon Sperm DNA/Protein A Agarose (Upstate, #16-157C) 另外購買。引子設計 5'-CCAACCAGCATTCTGAGAT-3', 5'-CGTATAAAAGGCGGGCTCC-3'。U2OS 細胞以 TNF- α 或 Simvastatin 處理後，直接加入 formaldehyde (1%) 到培養液中 37 度 C 固定 10 分鐘。冷的 PBS 洗兩次之後加入 1 ml PBS (含蛋白酶抑制劑) 以細胞刮勺收集至 1.5ml 離心管內，離心 2000 rpm、4 度 C、10 分鐘後去鈎上清液。加入 200 μ l SDS lysis buffer (1% SDS、10mM EDTA、50mM Tris-HCl pH8.1) 回溶。以超音波震盪器震斷 DNA (輸出功率 25~30%、作用時間 5 秒、冰上 5 秒、總時間作用 2 分鐘)。離心 13000 rpm、4 度 C、10 分鐘，將上清液轉換至新的 1.5ml 離心管並以 10 倍 CHIP dilution buffer (0.01% SDS、1.1% Triton X-100、2mM EDTA、16.7mM Tris-HCl pH8.1、167mM NaCl) 稀釋。加入 75 μ l salmon sperm DNA/Protein A agarose-50% slurry 4 度 C，30 分鐘旋轉作為 pre-clear 的動作，短暫離心後將上清液置換到新的離心管後。加入 1 級抗體 2 μ g, 4 度 C, 均勻旋轉隔夜。加入 60 μ l salmon sperm DNA/Protein A agarose-50% slurry, 3 小時 4 度 C, 低溫離心 1000rpm 1 分鐘，去掉上清液。分別以 low salt (0.1% SDS、1% Triton-X100、2mM EDTA、20mM

Tris-HCl pH8.1、150mM NaCl), high salt(0.1% SDS、1% Triton-X100、2mM EDTA、20mM Tris-HCl pH8.1、500mM NaCl), LiCl immune complex(0.25M LiCl、1% IGEPAL-CA630、1% deoxycholic acid、1mM EDTA、10mM Tris-HCl pH8.1)洗 3 分鐘。加入 250 μ l 新鮮配置 elution buffer(1% SDS、0.1M NaHCO₃)室溫旋轉 15 分鐘，重複兩次後總體積約 500 μ l。加入 20 μ l 5M NaCl，65 度 C 水浴 4 小時將 DNA 與蛋白質鍵結破壞。加入 10 μ l 0.5M EDTA、20 μ l Tris-HCl pH6.5、2 μ l 10mg/ml proteinase K，45 度 C 水浴 1 小時降解蛋白質後以 DNA 純化試劑組純化後跑 PCR 確認結果。



第四章 實驗結果

4.1 TNF- α 誘導 Cyr61 在成骨細胞的表現

一些文獻指出 Cyr61 和 arthritis 有密切的關係，2006 年的一篇文獻說明在同卵雙胞胎中罹患 RA 病患者其 Cyr61 表現量明顯較高。另外也有文獻指出 Cyr61 能促進血管新生²⁸，也與發炎反應有關²⁹。說明 Cyr61 在 arthritis 中可能扮演重要的角色。因此研究 Cyr61 在 arthritis 中扮演的角色以及其如何調控是我們主要的研究目標。

Arthritis 病患大多是由自體免疫所引起的，在關節處不斷持續的產生發炎反應，導致骨頭因為發炎而持續的遭到破壞，如何減緩發炎反應所引起的骨頭破壞就成為了治療 arthritis 中重要的目標。發炎反應其中一個被了解透徹的藥物為 TNF- α 。當細胞經過 TNF- α 的刺激之後，會走數個不同的路徑，其中包括 NF κ B、MAPK、death signaling，導致細胞產生發炎反應、細胞增生、細胞凋亡等等不同現象。因此在我們的實驗裡，接下來皆會利用 TNF- α 為模擬關節發炎的環境。

以 TNF- α 為促進發炎物質的藥物刺激成骨細胞，觀察 TNF- α 對 Cyr61 蛋白質表現時間的影響。可以看到不管是在 U2OS(osteosarcoma) 或者正常成骨細胞 HOB(human osteoblast) 中，TNF- α 對 Cyr61 的表現隨著時間而有顯著的上升 (Fig.1A, B)。顯示利用 TNF- α 為促進發炎物質的特性可以拿來做我們模擬發炎的環境。

4.2 Simvastatin 抑制 Cyr61 在成骨細胞的蛋白質表現

2009 年 Je-Ken Chang 發表的文獻指出 simvastatin 會促進 osteogenic 基因的表現，並抑制骨頭的損失¹⁷。但也有一些研究認為 statin 在動物模式中對骨生成為負向的調控²⁰。截至目前為止，statin 藥物在骨頭缺失等疾病中，詳細的作用機制及療效並沒有很明確的研究。其中 2008 年的一篇 review 文章指出在治療骨頭的缺失方面，simvastatin 大多都會增加骨頭的密度，減少骨頭的侵蝕²¹。但也說明了 statin 在治療關節炎效果不一致，其中影響治療的效果因素有很多，例如投藥方式、statin 藥物的種類、以及劑量的使用等等，但其中影響最大的是投藥方式，如何選定一個正確及有效的投藥路徑可能是改善 statin 藥物治療效果的一個重點。其中文獻指出 simvastatin 觀察到會抑制 T 細胞的生長並抑制發炎反應的進行，顯示出 simvastatin 可能是治療 arthritis 中一個重要的目標藥物。

為了更進一步了解 simvastatin 在 Cyr61 蛋白表現扮演什麼角色，U2OS 事先處理 simvastatin 不同濃度(1, 10 μ M)三小時，再加入 TNF- α 刺激 24 小時，可以看到隨著 simvastatin 濃度的增加，Cyr61 蛋白質的表現隨著劑量上升有很明顯的被抑制 (Fig.2A,B)。這說明 simvastatin 可能透過一些機制抑制 Cyr61 蛋白質表現。

4.3 Simvastatin 藉由 FoxO3a 調控 Cyr61 的蛋白質表現

為了更進一步的調查 Simvastatin 是如何調控 Cyr61 的表現，根據的研究指出，Cyr61 會被 Forkhead 家族成員中的 O family FoxO3a 所抑制²⁴。根據文獻的研究，我們將 FoxO3a 短暫的(transient)轉染到細胞內，在 TNF- α 的刺激之下，發現在 48 小時之後 Cyr61 的蛋白質表現仍然有很明顯的下降(Fig.3A)。另外根據的研究指出，FoxO3a 的作用機制是透過核轉移的過程，FoxO3a 活化時會藉由從細胞質轉移到細胞核，對目標基因進行轉錄或抑制的功能，造成下游訊息傳遞路徑的改變。目前文獻指出調控 FoxO3a 活性及核轉移的機制，大多認為可藉由磷酸/去磷酸化的機制影響，主要透過 AKT/PKB 的磷酸化的機制抑制 FoxO3a 的活性，將 FoxO3a 磷酸化後會從細胞核轉移到細胞質中。因此我們也觀察 U2OS 在 TNF- α 的刺激之下，在 30 分鐘的時候 FoxO3a 的磷酸化達到最大(Fig.3B)表示 TNF- α 會抑制 FoxO3a 的活性。另外也加入不同濃度 Simvastatin (1, 10 μ m)也觀察到隨著濃度的增加，FoxO3a 的磷酸化也會被抑制(Fig.3C)。顯示出 simvastatin 可能會促進 FoxO3a 的活性。

4.4 Simvastatin 促進 FoxO3a 的核轉移

根據以上的實驗發現，simvastatin 會抑制經由 TNF- α 所引起的 FoxO3a 磷酸化。而 FoxO3a 的磷酸化是影響核質轉移重要的調控。在 TNF- α 的刺激之下，加入不同濃度的 simvastatin 刺激，觀察到在 TNF- α 所刺激的情況下，隨著 simvastatin 濃度的上升，FoxO3a 的核轉移量也很明顯的增多(Fig.4)。顯示出 simvastatin 可能透過抑制 FoxO3a 的磷酸化促進其活性，使 FoxO3a 轉移到細胞核進行對下游基因的調控。

4.5 Simvastatin 並促進 FoxO3a 對 Cyr61 啟動子的結合親和力

根據以上的實驗結果，我們看到 simvastatin 會藉由抑制 FoxO3a 的磷酸化進而促進轉移到細胞核內，對下游基因促進轉錄或抑制。2007 年文獻指出在血管平滑肌細胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)中，Cyr61 的啟動子有 FoxO3a 的結合位，而 FoxO3a 會直接結合到 Cyr61 的啟動子並抑制其基因表現，進而抑制血管平滑肌細胞的生長及內皮新生的功能。參考 2007 的文獻，FoxO3a 的結合序列為 AAAGCAAACA 在 Cyr61 啟動子上游 610 base pair 的位置(Fig.5A)。為了了解 FoxO3a 是透過調控其他分子或者直接結合到 Cyr61 啟動子而調控轉錄功能，我們以染色質免疫沉澱法(chromatin immunoprecipitation)的方式觀察 FoxO3a 在 Cyr61 啟動子的情形，在有或無 TNF- α 的刺激，以 simvastatin 處理 3 小時，發現在 simvastatin 處理的組別，FoxO3a 結合到 Cyr61 啟動子的親和力有明顯的上升(Fig.5B)。綜合以上的實驗結果，可以初步說明 simvastatin 可藉由抑制 FoxO3a 的磷酸化，促進其活性而轉移到細胞核內，進行對 Cyr61 啟動子的抑制作用。

4.6 Simvastatin 促進 FoxO3a 的去乙醯化

雖然確定 FoxO3a 可透過磷酸化的修飾抑制活性，促使 FoxO3a 從細胞核轉移到細胞質。最近越來越多的文獻指出乙醯化也是調控 FoxO3a 的一個因子。K245 位置被乙醯化的 FoxO3 及 FoxO1 其 DNA 結合能力會下降，對下游基因的功能產生改變³⁰。除了透過已知的磷酸化可以調控 FoxO 的核質轉移作用之外，為了更清楚了解乙醯化或去乙醯化對 FoxO3a 的影響，文獻指出 FoxO3a 去乙醯化中作用的調控者為 SIRT1³¹，透過 SIRT1 對 FoxO3a 的去乙醯化對影響其對下游基因的結合能力，大部份的研究皆認為說透過 SIRT1 的作用會影響 FoxO3a 對下游基因的影響促使從細胞凋亡轉移到細胞週期調控³²。因此我們也感到好奇，FoxO3a 的去乙醯化對於我們目標基因 Cyr61 的調控為何，我們觀察到 FoxO3a 在 TNF- α 的刺激之下乙醯化有上升的作用，然 simvastatin 則有下降的趨勢(Fig. 6)。表示 simvastatin 對於 FoxO3a 的乙醯化情形扮演抑制的角色。就目前而言，磷酸化對於 FoxO3a 的核質轉移機制較為清楚外，乙醯化或去乙醯化在 FoxO3a 扮演的角色仍需更進一步的了解。

4.7 第二型膠原蛋白 Type II collagen 誘發類風濕性關節炎

膠原蛋白所引起的關節炎(collagen induced arthritis)是廣為人知的疾病模式。最先是 1997 年 David 所發表，作者利用 type II collagen 混合 Freund's adjuvant，在老鼠背部皮下注射 4 至 6 點誘發 Rat 發生自體免疫，四肢關節處產生發炎腫脹的情況，模擬人類類風濕性關節炎的疾病，至今在研究動物關節炎都是使用此模式生物¹²。

在我們先前的老鼠關節炎研究，以 CIA 模式生物中誘導關節炎可看到膝關節的確被血管翳(pannus)所侵蝕，在關節炎破壞的組織中，軟骨(cartilage)及硬骨(bone)則有明顯的破壞(Fig.7A,B)。pannus 是一種因發炎而增生的組織，其中內含一些間質或骨髓所衍生的細胞(mesenchyme and bone marrow-derived cells)，會持續的發炎腫脹分泌一些細胞激素(cytokine)並吸引免疫細胞到達關節處，持續的發炎反應會破壞軟骨(cartilage)及硬骨(bone)。進一步的以免疫組織染色觀察 Cyr61 分布的情形，發現在骨頭被侵蝕(bone erosion)處周圍有大量 Cyr61 蛋白的表現(Fig.7C)，以 CD68 染色進一步確定這些 Cyr61 分布的位置和巨噬細胞(macrophage)的不謀而合(Fig.7D)，顯示 Cyr61 可能會吸引巨噬細胞到發炎位置參與骨頭吸收的反應。

4.8 Simvastatin 緩和類風溼性關節炎的進展

Statin 除了在降膽固醇藥物已經被廣泛應用外，在近幾年也慢慢有被探討在治療 arthritis 有初步的成效³³。Statin 藥物目前在人體試驗上也有看到對關節炎病人有舒緩的作用³⁴。但截至目前為止，對於 statin 在治療關節炎的機制仍需更進一步的研究。

影響 statin 藥物作用最大的因素是投藥方式，目前已知 statin 藥物經過口服或腹腔注射之後，透過肝臟的代謝釋放到血液濃度的量過低，導致關節炎處的微環境(microenvironment)藥物的量不足以對關節炎造成影響²¹。因此我們第一次嘗試著以 matrigel 包裹 simvastatin，利用其在低溫為液體的特性注射到老鼠的關節腔內，使之成為固體留在患處局部，預期 simvastatin 會緩慢的釋放出來達到治療關節炎的作用。實驗利用同一隻老鼠 CIA model 的兩肢後腳，分別以 normal saline 及 simvastatin 注射。在 X 光方面，simvastatin 處理過的關節處骨頭較為平滑沒有破損(Fig.8A)，而 normal saline 處理過的組別則有不平整的現象(Fig.8B)。進一步的以免疫組織染色觀察，在 normal saline 處理的組別，和 simvastatin 處理比較，其關節腔幾乎被發炎組織所佔據，而軟骨及硬骨則有被侵蝕的現象(Fig.8C,E)。Simvastatin 處理的組別可以很明顯的看到其關節腔還保有相當的完整性，發炎組織的侵襲也較 normal saline 較為緩和，軟骨及硬骨組織也都還可觀察到(Fig.8D,F)。顯示出 simvastatin 在整個關節炎的進展具有緩和的作用。

進一步的我們以免疫組織染色觀察 Cyr61 及 FoxO3a 在 CIA 中表現的情形，在 simvastatin 處理的組別中，除了關節炎的進展有明顯的緩和，FoxO3a 分布的情形和控制組(Fig.9A)比較有明顯的集中在細胞核的趨勢(Fig.9B)。表示說在關節炎的進展中，FoxO3a 的確是大多分布在細胞質並處於去活化的狀態，而 simvastatin 的處理，除了關節炎上有緩和的趨勢，同時也促進了 FoxO3a 的核轉移，對照我們之前在成骨細胞株中所做出的結果(Fig.4)，結果也是符合的。而在 Cyr61 的染色方面。

Simvastatin 處理的組別(Fig.9D)相較於控制組(Fig.9C)有明顯的表現量較低。在參考文獻中所提到的 Cyr61 在關節炎中扮演重要的角色恰好可以說明，關節發炎處 Cyr61 的表現可能會促進血管增生、吸引免疫細胞等作用，這種在慢性發炎中反而會造成免疫作用的持續進行，造成骨頭的破壞，對照我們所看到的結果，Cyr61 的確是在關節炎中扮演促發炎的地位，未來或許在治療關節炎的策略時，可針對 Cyr61 做為減緩或治療的目標。



第五章 討論

5.1 Simvastatin 會抑制 Cyr61 蛋白的表現，且這個過程透過 FoxO3a 的核轉移機制。

由 TNF- α 模擬發炎反應中所誘導的 Cyr61 隨著時間的刺激有很明顯的上升 (Fig.1A, B)。文獻中也指出在類風溼性關節炎中 Cyr61 有大量的表現¹，顯示出 Cyr61 的表現在發炎反應中扮演重要的角色。而發炎反應所誘導的 Cyr61 表現，可透過 Simvastatin 藥物所抑制 (Fig.2A,B)，然而其中的機制仍不清楚。根據 2004 年的文獻，Forkhead family 的 FoxO3a 可直接結合到 Cyr61 的啟動子以進行轉錄抑制的作用²⁴。我們也發現在成骨細胞株 (U2OS) 中轉染 FoxO3a 對 Cyr61 有很明顯的抑制作用 (Fig.3A)，對於 simvastatin 是否透過 FoxO3a 影響 Cyr61 基因的表現是我們所著重的地方。目前已知 FoxO3a 的活性是透過 post-translational modification 的機制調控，其中包括磷酸化、乙酰化及蛋白質降解影響功能。細胞在含有 insulin、IGF-1、IL-3、EGF、NGF 等生長因子的情況之下會被磷酸化²²。目前已知 FoxO3a 磷酸化的三個位置 (Thr32、Ser253 及 Ser315) 會導致 DNA 結合能力受到影響，NLS 訊號被阻擋以及造成 14-3-3 的結合從細胞核轉移到細胞質中，進行蛋白質降解或去活化³⁵。Ser253 主要是由 Akt kinase 所磷酸化³⁶，而 Ser315 主要是由 SGK kinase 調控³⁷，Thr32 則皆受 Akt 及 SGK 的調控。細胞在生長因子的刺激之下，透過活化的 Akt 或者 SGK 的路徑，對 FoxO 的這三個位置磷酸化，導致在核內磷酸化的 FoxO DNA 結合能力變弱以及被 14-3-3 蛋白質結合轉移至細胞質失去活性或者進一步的降解²³。

透過 FoxO3a 不同的修飾作用，對於其活性以及細胞內位置會有很大的影響，我們以 TNF- α 刺激 U2OS 細胞株，可以觀察到 TNF- α 所誘導的 FoxO3a 磷酸化 (Thr32) 在 30 分鐘即達到最強 (Fig.3B)，顯示在發炎反應環境之下，成骨細胞株

FoxO3a 活性有被抑制的現象。在 TNF- α 刺激中以 simvastatin 處理，也觀察到 FoxO3a 隨著 simvastatin 刺激濃度提高，而核轉移的量提高(Fig.4B)，顯示 simvastatin 在 FoxO3a 中是扮演促進的角色。而其詳細的機制則需更進一步的研究。

除了磷酸化對 FoxO 的影響外，乙醯化(acetylation)目前也知道對 FoxO 是一個重要的調控，一般認為乙醯化會促進 DNA 轉錄作用，透過乙醯化將染色體解開，使一些轉錄因子能夠結合到 DNA 序列進行轉錄作用。但乙醯化對於轉錄因子的探討則鮮有文獻說明。目前已知 FoxO 會被不同的 histone acetyltransferase 乙醯化，其中包括 p300/CBP 及 p300/CBP-associated factor (PCAF)³⁸。相反的也會被一些 histone or non-histone deacetylases 去乙醯化，例如 SIRT1 或其他 HDACs³⁹。乙醯化目前對於 FoxO 的活性及細胞內位置的影響仍需更進一步的研究釐清，有些學者偏向乙醯化會抑制 FoxO 的活性⁴⁰ 並且透過 SIRT1 的作用活化 FoxO 的功能，另一派的學者則持相反意見⁴¹，甚至有其他的學者認為乙醯化對 FoxO 的影響是細胞在不同的環境刺激之下，而乙醯化在 FoxO 就扮演不同的角色，也就是 context-specific manner⁴²。FoxO 的下游基因影響層面有很多，例如影響醣質新生中 phosphoenolpyruvate (PEPCK)及 glucose 6 phosphate 的表現、抗氧化壓力 catalase、細胞凋亡中 Fas ligand (FasL)及 tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL)，顯示出 FoxO 在細胞內扮演各式各樣的角色。

為了更進一步的了解 simvastatin 在 FoxO3a 的調控機制，U2OS 細胞株在 simvastatin 的刺激下，利用免疫沉澱法純化 FoxO3a，以 Acetyl-lysine 抗體偵測 FoxO3a 的乙醯化情形，發現在 simvastatin 的處理之下，FoxO3a 的乙醯化很明顯的被抑制()。目前除了已經確定磷酸化對 FoxO3a 的位置及轉錄活性扮演負向調控的效果外，在我們的目標基因 Cyr61 中，在 simvastatin 的刺激之下，乙醯化對 FoxO3a 在調控 Cyr61 方面可能是扮演負向的調控。

就我們目前的研究資料顯示出 U2OS 在 simvastatin 的作用之下，可能透過去磷酸化及去乙醯化的作用活化 FoxO3a，並且促進核轉移，促使 FoxO3a 調控下游基

因 Cyr61。但在這部分未來仍需更進一步的研究以確定 simvastatin 是如何影響 FoxO3a 的功能。



5.2 Simvastatin 及 Cyr61 在 collagen induced arthritis Rat 中扮演的角色

對於 Cyr61 以及 simvastatin 藥物在 CIA 模式中扮演的角色為何是我們感到興趣的方向，透過前人所建立的模式利用 bovine type II collagen 以佐劑混合後以皮下注射的方式打入老鼠體內誘發自體免疫，並加以 booster 增強免疫反應。實驗過程中，老鼠體內的 collagen 產生 cross reaction 導致體內免疫細胞功及自身，而產生類似人類類風濕性關節炎的發展過程。隨著免疫的時間增加，外觀上在關節處已經有紅腫且僵化的現象發生，這代表該處已經產生強烈的免疫反應，破壞關節的構型使之無法執行正常的功能。發炎過程中會形成 granulation tissue。RA 的形成是慢性發炎反應所導致的結果，組織修復及發炎現象會同時發生，在組織受到傷害的局部可以觀察到血管新生(neovasculation)及更加明顯，發炎細胞增多，也就是 granulation tissue infiltration 的現象。在這浸潤到骨頭的組織中，包括內皮細胞及巨噬細胞都發現 Cyr61 的存在。這與文獻所提到的 Cyr61 會促進血管新生及 chemotaxis 的效果不謀而合，表示 Cyr61 在 RA 的進展中的確扮演重要的角色。在 RA 疾病發展過程中由於自體免疫所產生的肉芽組織(pannus)的形成，會導致增生的發炎組織分泌 collagenase 等酵素破壞軟骨組織，是 RA 病患中就明顯的病徵，利用此 RA 進展中明顯的病徵就為我們建立 CIA 模式中的指標。

我們依據以上的模式建立了 CIA 在大鼠身上模擬的成果，並且開始嘗試釐清 statin 藥物對於 CIA progression 的影響。就先前的文獻研究中，以有許多研究指出 statin 藥物除了在降低膽固醇的應用外，也具有抗發炎反應以及促進骨質生成的機制，並且在動物實驗上也有一些結論。但是對於 statin 在處理動物實驗上骨質生成的部分結果似乎有各種的說法，有一派的學者說 statin 的確可以增加骨頭的密度，且會透過 BMP-1 的活化使軟骨增加⁴³，其他學者則認為 statin 藥物在動物模式上並沒有如想像中的效用，對於骨頭生長的方面沒有顯著的增加⁴⁴。造成如此不同的差異，2006 年的文獻指出 statin 藥物具有 liver specificity 以及 low oral bioavailability，

經由口服、皮下或者靜脈注射的 statin 藥物會大量累積在肝臟代謝，使得 statin 到達骨頭微環境(bone microenvironment)的量過低，無法達到預期的功效。因此作者也建議在促進 statin 藥物治療骨質吸收的部分，需要尋找能夠取代或改善口服投藥的注射方式以達到更好的療效。

為了改善 statin 藥物的功效，我們嘗試利用 matrigel 包裹 statin 藥物的方式投藥，在老鼠誘發免疫反應的第三天，以每 100 μ l matrigel 中含有 4 mg 的 simvastatin 藥物在老鼠膝關節處直接將此混合液體注射至關節腔內，並於第 14 天在追加一次投藥，在第四十天犧牲觀察 simvastatin 對 CIA 進展的影響。結果在同一隻老鼠的左右膝關節部分，可以看到處理 simvastatin 的組別骨頭破壞的程度明顯的較控制組(normal saline)緩和，不管是在外觀上(Fig.8B)、X 光(Fig.8A)及 HE staine(Fig.8C,D,E,F))其 CIA 的進展都明顯的改善，初步的顯示 simvastatin 的確可以緩和 CIA 的惡化程度。進一步的以免疫染色觀察 Cyr61 的表現以及 FoxO3a 的分布情形，在 simvastatin 的組別 Cyr61 表現的量明顯的較控制組低，另外在 FoxO3a 部分可以觀察到在控制組中 FoxO3a 大多是表現在細胞質的部分(Fig9A)。相較於控制組，simvastatin 處理的組別則明顯的累積在細胞核(Fig9B)。顯示出 CIA 模式中，在發炎環境下，FoxO3a 被不正常的抑制而 Cyr61 則有大量表現的情形，*in vivo* 所得到的結果符合我們在 *in vitro* 中成骨細胞所觀察到的情形。

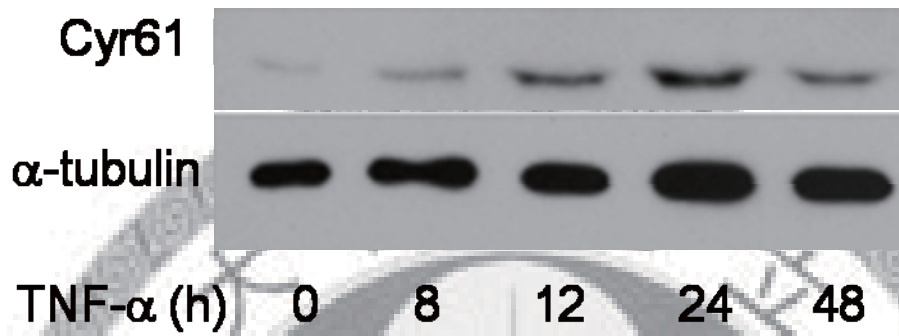
就目前為止，我們不管是在成骨細胞株 U2OS 或者 CIA 模式中都發現 simvastatin 會抑制發炎反應所造成的 FoxO3a 質轉移，並且也會抑制 Cyr61 的表現，進而使 CIA 的進展有明顯的緩和。未來除了更清楚釐清 simvastatin 是否透過這條路徑達到緩和 CIA 的惡化，也會更進一步的了解 Cyr61 如何造成發炎組織的侵犯及骨頭的破壞。截至目前為止，有文獻指出 Cyr61 具有吸引巨噬細胞趨化作用的能力，或許在 CIA 模式中，發炎反應所誘導的 Cyr61 表現可能會吸引巨噬細胞到達患處並進一步的形成蝕骨細胞(osteoclasts)破壞骨頭的結構，是我們未來要更了解的部分，期待透過此一路徑可以在治療人類類風濕性關節炎上扮演具有潛力

的目標。



附件

A.



B.

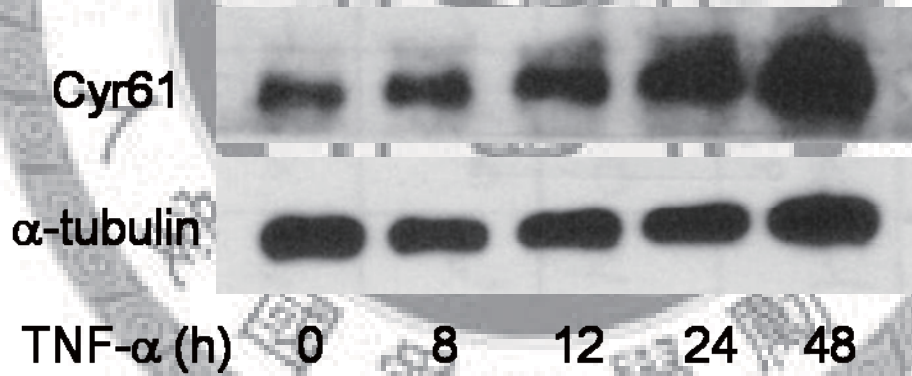
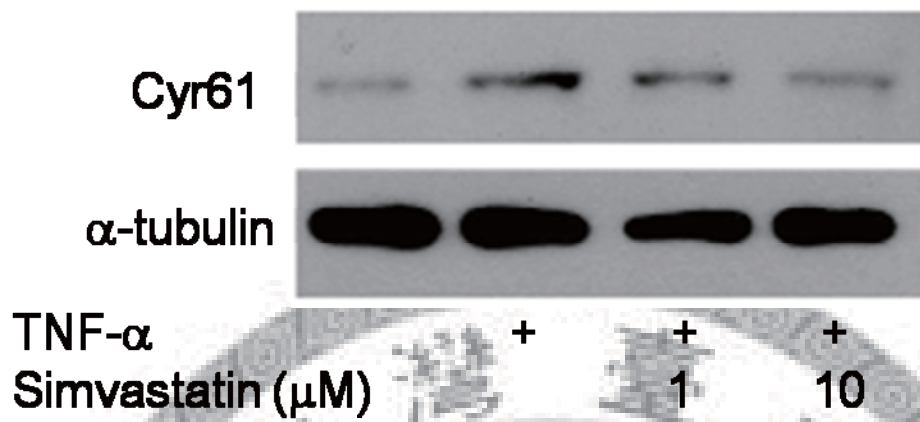


Fig.1 TNF- α 影響成骨細胞中 Cyr61 蛋白質表現

U2OS 及 HOB 細胞 starvation 隔夜後，以 TNF- α 刺激 20 ng/ml 不同時間，加入 RIPA lysis buffer 收下來，BCA 蛋白質測定組定量後，WB blot 偵測 Cyr61 蛋白質量。

A) human osteoblast , B) U2OS

A.



B.

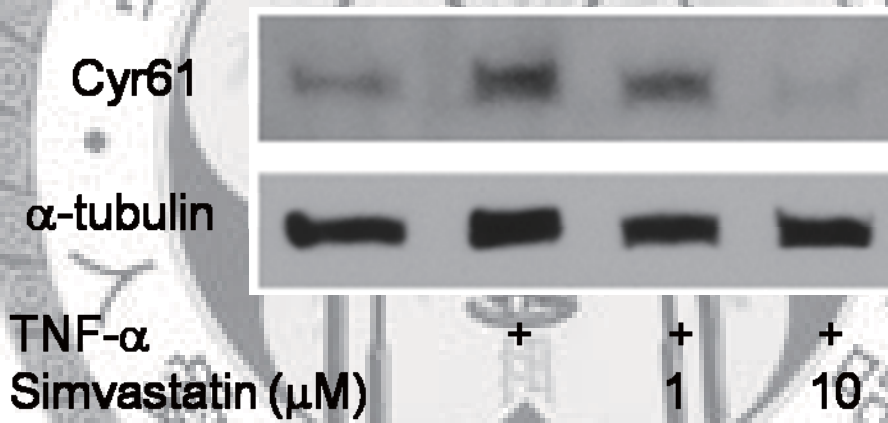


Fig.2 Simvastatin 抑制 TNF- α 誘導之 Cyr61 表現

U2OS 及 HOB 細胞 starvation 隔夜後，以 simvastatin 不同濃度事先處理 3 小時，加入 TNF- α 刺激 20 ng/ml 24 小時，以 RIPA lysis buffer 收下來，BCA 蛋白質測定組定量後，Western blot 偵測 Cyr61 蛋白質量。A) human osteoblast，B) U2OS

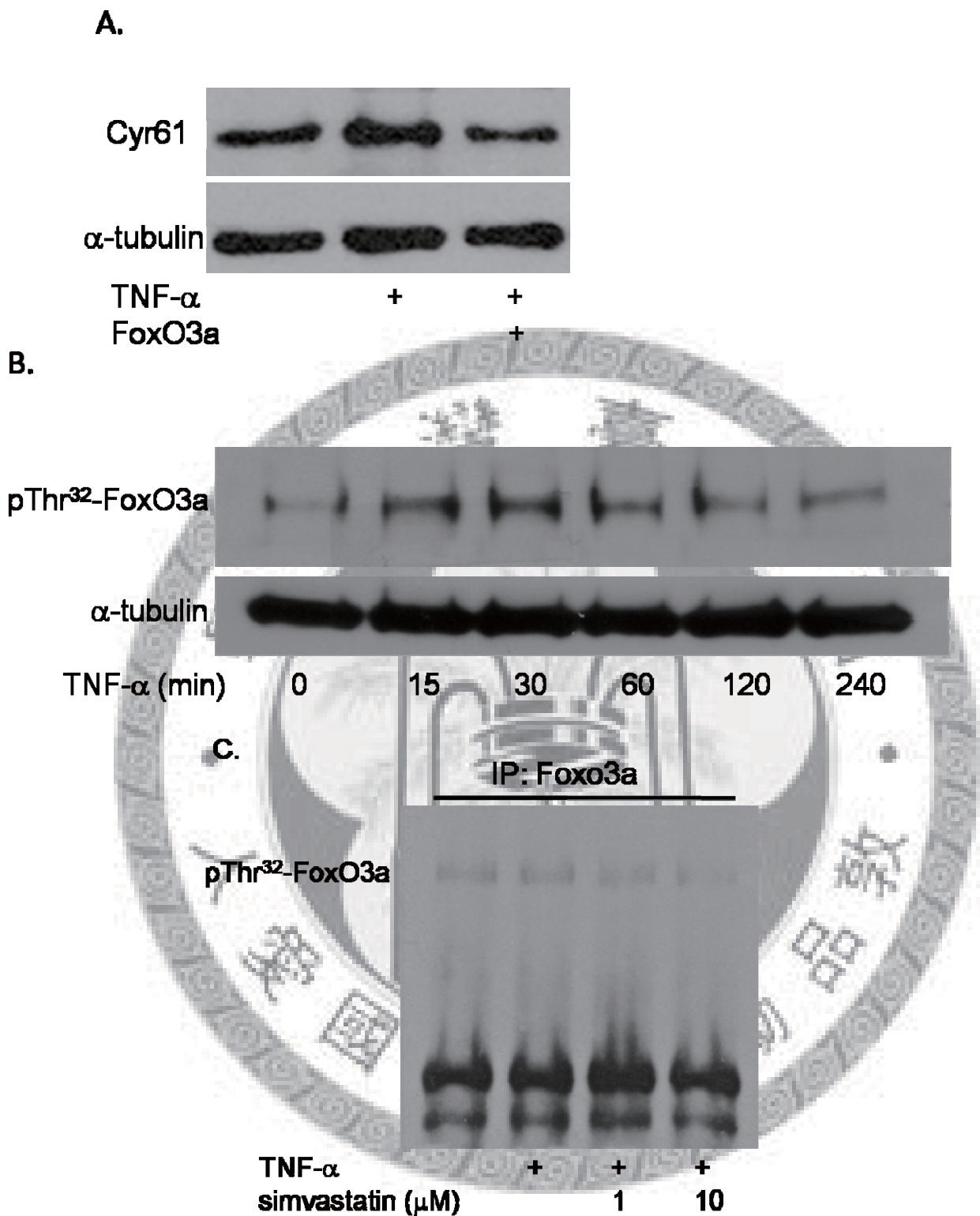


Fig.3 Simvastatin 藉由抑制 FoxO3a 的磷酸化而抑制 Cyr61 蛋白質表現

A) U2OS 轉染 FoxO3a 後處理 TNF- α (20ng/ml) 24 小時。B) U2OS starvation 隔夜，處理 TNF- α (20ng/ml) 不同時間。C) U2OS starvation 隔夜，事前處理 simvastatin 不同濃度 3 小時，再加入 TNF- α (20ng/ml) 30 分鐘

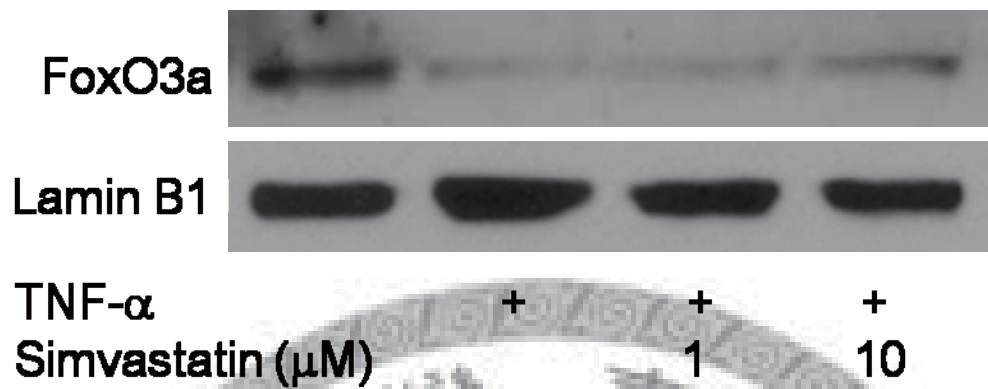


Fig.4 Simvastatin 促進 FoxO3a 轉移到細胞核

U2OS starvation 隔夜，事前處理 simvastatin 不同濃度 3 小時，再加入 TNF- α (20ng/ml)30 分鐘，以核質分離技術抽取核質蛋白，偵測 FoxO3a 核/質轉移的變化。

A. Cyr61 promoter sequence

```

CCTCCTGCCCCGGGAGGGGAGGCGGGAAGGGCTTACCCCGTCTCCTGCATCCGTGAGGAAGT
ATAAGTCAGCCTCCCGGAGAAGTCCCGCGTTCGTTTCTCTCGGACTTCAACCCAGGCAGT
GGGCTGGAACATAAGTGGGAACCTCCAAAAACAAACAAGTACAACATACCCAAAAGAGGGA -972
AGGGCTGGAGGAGTGGGGGAGACCTCTGCCTGGGAATTTGCCAGACGATGGGCAAGTTTCC
CCCCGCCACCCCCCCCCCGCTTTTCATTATAAATGCCACTGTGGGTATTAATTTGCAATTC
ACTGAACTTTGCTAATAAACATCATGCCAAAGCTTTGGGACTTGTCCGAACACGCCTCTTTGA -766
AGTCCACAATATTCTGACTCAGAGACACTCCTCTTCCCGTCTACTCTTTCAACAGATAA
CTTGCTCTCACCTTCGCTGTAA↑AAAGCAAACA↓GCTCACTGCCTCCCGGTGAGGGCTTCA
GTGGCTGCCCGTCAACTCGCATCACAAACAAAACGACTTTTGTCTCCTCCTCAGGTCCT
CCCACCCACCCAGTCCAGGCAAAGTTCTGAACTGGCCCCCTCGCCCCCTCACGACCCCTCAAC
TACCATCACACCATCACGCCCAAGAACCCTTCCCAACATAAGTCGTAATTTAAGTGGAAG -429
AAACGAACTGTTTTCTTACGGCTCTGGACACACACACACACACACACACACACACACACA
CCCCCGAACTGTTGGGAGACAGACACACACACACACACACACACACACACACACACACA
CACACACACACACACACACACACACACACACACACAAAGGTGCAATGGAGCCAGG -208
GGAGGCGCTTGGCAGCAGCCCGCGCAACCAGCATTCTGAGATGTTTGAGAATTCTGGAAC
GCGCAGACAGAGCCGACGTCACTGCAACACGCGGCGCTCCGCCGCCCGTATAAAAGGCG
GGCTCCGGGGCGCTGGGCAGACCGCGAGCGAGCGCCCGGAGCAGCGCCCGCGCCCT
CCGCGCCTTCTCC
  
```

B.

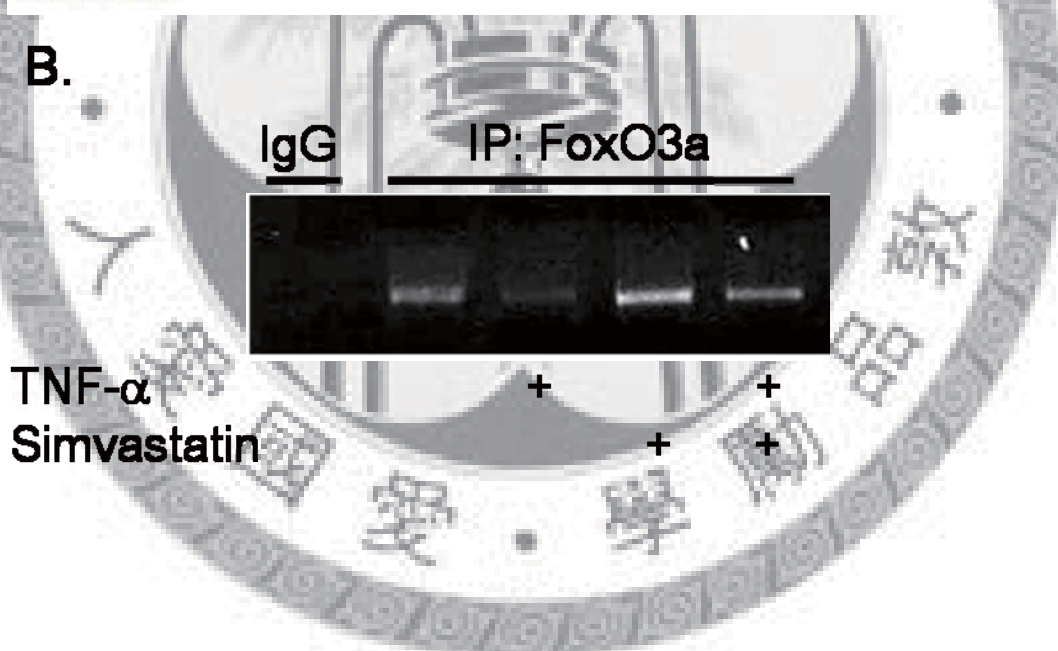


Fig.5 Simvastatin 促進 FoxO3a 對 Cyr61 啟動子的結合

A) Cyr61 啟動子上的 FoxO3a 結合位。B) 細胞處理 TNF- α 30 分鐘，染色質免疫沉澱法純化 FoxO3a，以 Fox 結合位的引子進行 PCR，偵測 FoxO3a 在 Cyr61 啟動子的結合能力。

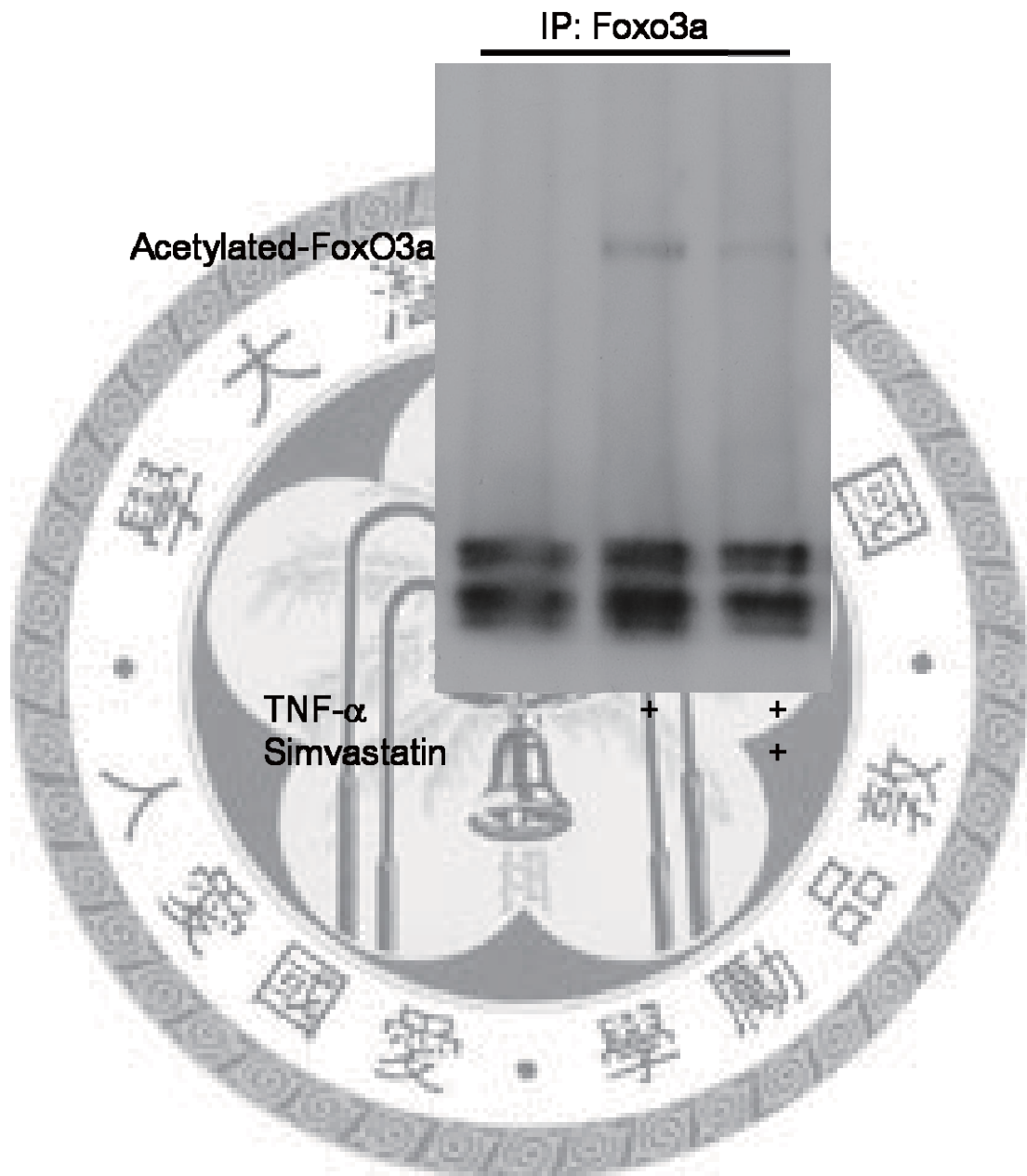


Fig.6 Simvastatin 促進 FoxO3a 去乙酰化

細胞 starvation 隔夜後處理 TNF- α (20ng/ml)或 simvastatin (10 μ m) , IP: FoxO3a ,
Western blot: acetyl-lysine

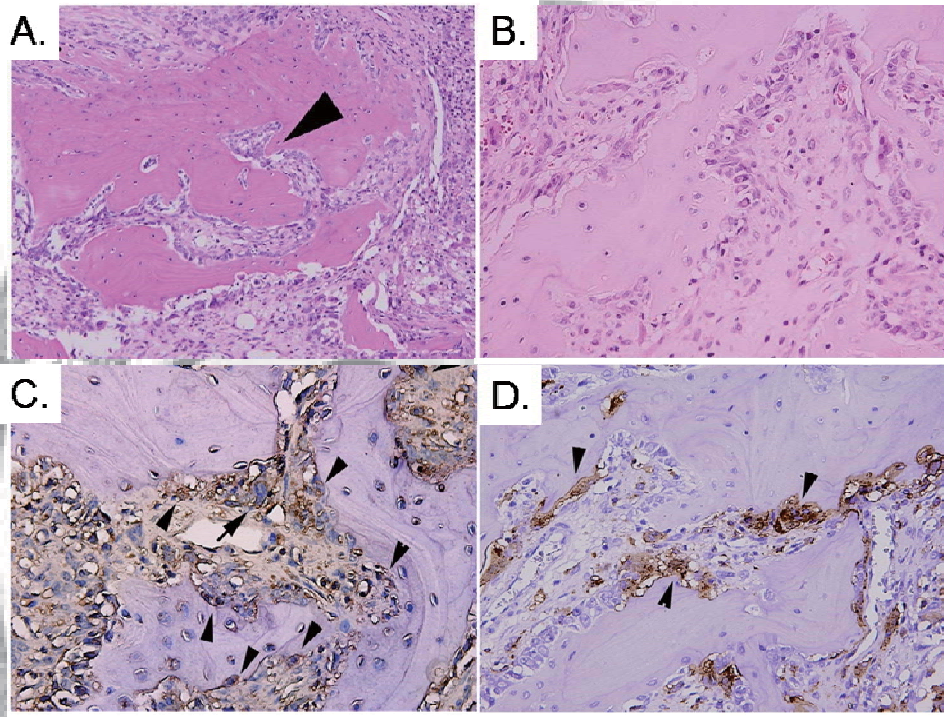


Fig.7 CIA 模式中 Cyr61 吸引巨噬細胞到骨頭破壞周圍

CIA 大鼠膝關節染色。A,B) HE stain。C)免疫染色 Cyr61。D) 免疫染色巨噬細胞 CD68。

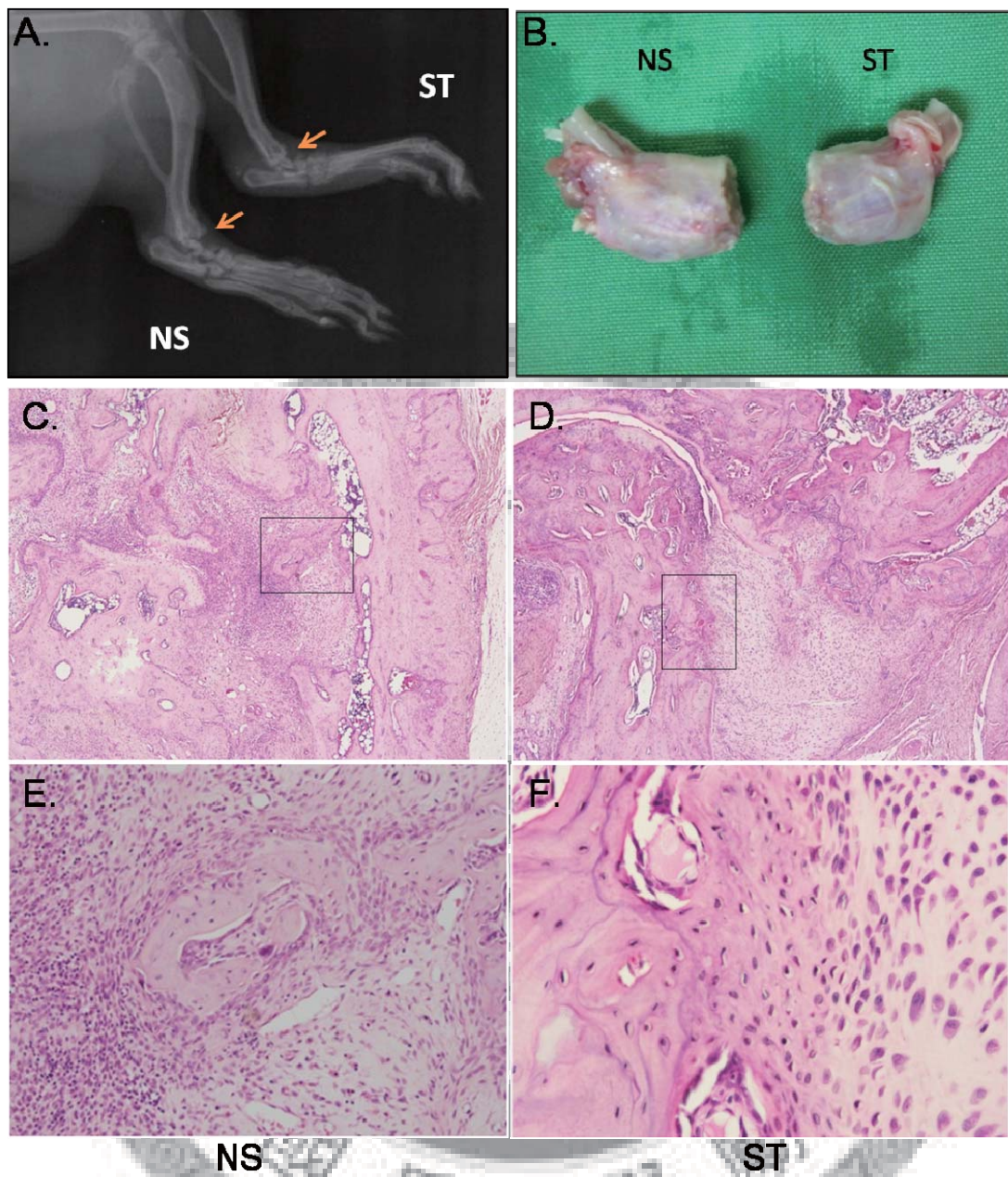


Fig 8. Simvastatin 舒緩 CIA 模式關節炎的進展

NS: normal saline 、 ST: simvastatin treat , A) X 光圖 。 C, D, E, F) HE stain

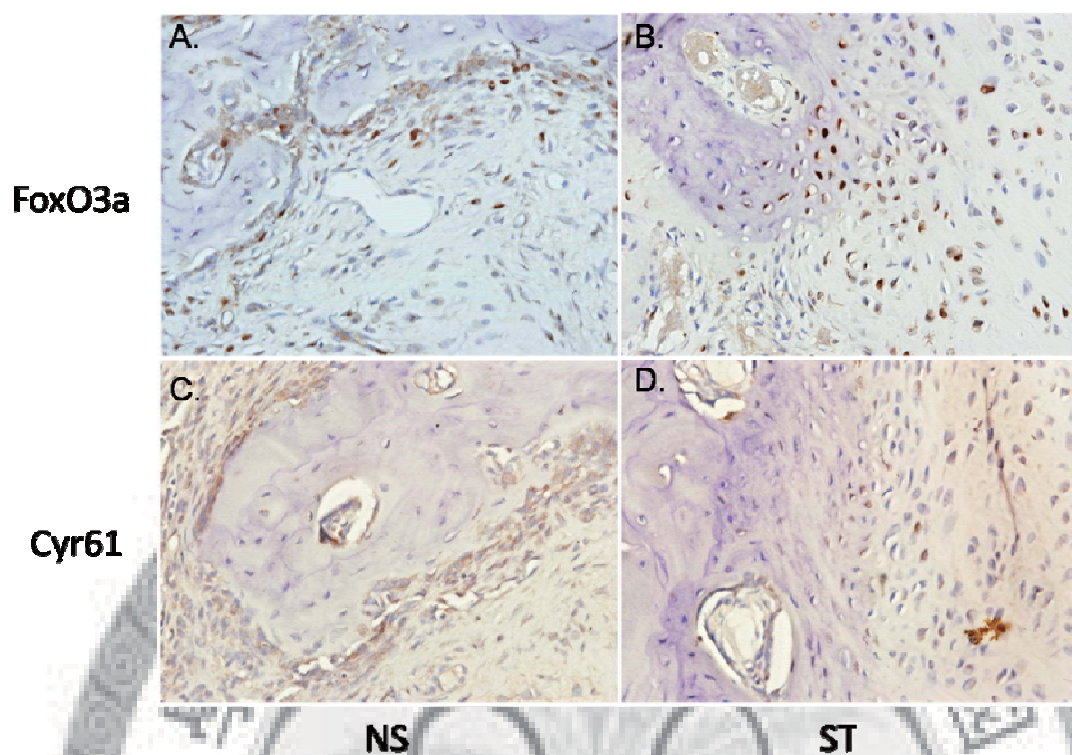


Fig.9 Simvastatin 影響 FoxO3a 的核轉移及調控 Cyr61 蛋白質的表現
 免疫組織染色，A，B) FoxO3a 染色，C，D) Cyr61 染色。

參考文獻

- ¹ Haas, C. S., Creighton, C. J., Pi, X., Maine, I., Koch, A. E., Haines, G. K., Ling, S., Chinnaiyan, A. M., and Holoshitz, J., Identification of genes modulated in rheumatoid arthritis using complementary DNA microarray analysis of lymphoblastoid B cell lines from disease-discordant monozygotic twins. *Arthritis Rheum* **54** (7), 2047 (2006).
- ² Radke, S., Battmann, A., Jatzke, S., Eulert, J., Jakob, F., and Schutze, N., Expression of the angiogenic matrix and angiogenic proteins CYR61, CTGF, and VEGF in osteonecrosis of the femoral head. *J Orthop Res* **24** (5), 945 (2006).
- ³ Kunz, M., Moeller, S., Koczan, D., Lorenz, P., Wenger, R. H., Glocker, M. O., Thiesen, H. J., Gross, G., and Ibrahim, S. M., Mechanisms of hypoxic gene regulation of angiogenesis factor Cyr61 in melanoma cells. *J Biol Chem* **278** (46), 45651 (2003).
- ⁴ O'Brien, T. P., Yang, G. P., Sanders, L., and Lau, L. F., Expression of cyr61, a growth factor-inducible immediate-early gene. *Mol Cell Biol* **10** (7), 3569 (1990).
- ⁵ Brigstock, D. R., The CCN family: a new stimulus package. *J Endocrinol* **178** (2), 169 (2003).
- ⁶ Yang, G. P. and Lau, L. F., Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface. *Cell Growth Differ* **2** (7), 351 (1991).
- ⁷ Moritani, N. H., Kubota, S., Sugahara, T., and Takigawa, M., Comparable response of ccn1 with ccn2 genes upon arthritis: An in vitro evaluation with a human chondrocytic cell line stimulated by a set of cytokines. *Cell Commun Signal* **3** (1), 6 (2005).

- 8 Rooney, M., Condell, D., Quinlan, W., Daly, L., Whelan, A., Feighery, C., and
Bresnihan, B., Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid
arthritis. *Arthritis Rheum* **31** (8), 956 (1988).
- 9 Lund-Olesen, K., Oxygen tension in synovial fluids. *Arthritis Rheum* **13** (6), 769
(1970); Paleolog, E. M., Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* **4**
Suppl 3, S81 (2002).
- 10 Jawed, S., Gaffney, K., and Blake, D. R., Intra-articular pressure profile of the
knee joint in a spectrum of inflammatory arthropathies. *Ann Rheum Dis* **56** (11),
686 (1997).
- 11 Brown, R. A., Weiss, J. B., Tomlinson, I. W., Phillips, P., and Kumar, S.,
Angiogenic factor from synovial fluid resembling that from tumours. *Lancet* **1**
(8170), 682 (1980).
- 12 Semble, E. L., Turner, R. A., and McCrickard, E. L., Rheumatoid arthritis and
osteoarthritis synovial fluid effects on primary human endothelial cell cultures. *J*
Rheumatol **12** (2), 237 (1985).
- 13 Zhou, D., Herrick, D. J., Rosenbloom, J., and Chaqour, B., Cyr61 mediates the
expression of VEGF, alphav-integrin, and alpha-actin genes through
cytoskeletally based mechanotransduction mechanisms in bladder smooth
muscle cells. *J Appl Physiol* **98** (6), 2344 (2005).
- 14 Goldstein, J. L. and Brown, M. S., Regulation of the mevalonate pathway.
Nature **343** (6257), 425 (1990).
- 15 Matar, P., Rozados, V. R., Roggero, E. A., and Scharovsky, O. G., Lovastatin
inhibits tumor growth and metastasis development of a rat fibrosarcoma. *Cancer*
Biother Radiopharm **13** (5), 387 (1998).
- 16 Kureishi, Y., Luo, Z., Shiojima, I., Bialik, A., Fulton, D., Lefer, D. J., Sessa, W.

- C., and Walsh, K., The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* **6** (9), 1004 (2000).
- 17 Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K., and Hartmann, T., Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (10), 5856 (2001).
- 18 Kwak, B., Mulhaupt, F., Myit, S., and Mach, F., Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med* **6** (12), 1399 (2000).
- 19 Ho, M. L., Chen, Y. H., Liao, H. J., Chen, C. H., Hung, S. H., Lee, M. J., Fu, Y. C., Wang, Y. H., Wang, G. J., and Chang, J. K., Simvastatin increases osteoblasts and osteogenic proteins in ovariectomized rats. *Eur J Clin Invest* **39** (4), 296 (2009).
- 20 LaCroix, A. Z., Cauley, J. A., Pettinger, M., Hsia, J., Bauer, D. C., McGowan, J., Chen, Z., Lewis, C. E., McNeely, S. G., Passaro, M. D., and Jackson, R. D., Statin use, clinical fracture, and bone density in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Observational Study. *Ann Intern Med* **139** (2), 97 (2003); Bjarnason, N. H., Riis, B. J., and Christiansen, C., The effect of fluvastatin on parameters of bone remodeling. *Osteoporos Int* **12** (5), 380 (2001); von Stechow, D., Fish, S., Yahalom, D., Bab, I., Chorev, M., Muller, R., and Alexander, J. M., Does simvastatin stimulate bone formation in vivo? *BMC Musculoskelet Disord* **4**, 8 (2003).
- 21 Tang, Q. O., Tran, G. T., Gamie, Z., Graham, S., Tsialogiannis, E., Tsiroidis, E., and Linder, T., Statins: under investigation for increasing bone mineral density

- and augmenting fracture healing. *Expert Opin Investig Drugs* **17** (10), 1435 (2008).
- 22 Essaghir, A., Dif, N., Marbehant, C. Y., Coffey, P. J., and Demoulin, J. B., The transcription of FOXO genes is stimulated by FOXO3 and repressed by growth factors. *J Biol Chem* **284** (16), 10334 (2009).
- 23 Huang, H. and Tindall, D. J., Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* **120** (Pt 15), 2479 (2007).
- 24 Lee, H. Y., Chung, J. W., Youn, S. W., Kim, J. Y., Park, K. W., Koo, B. K., Oh, B. H., Park, Y. B., Chaqour, B., Walsh, K., and Kim, H. S., Forkhead transcription factor FOXO3a is a negative regulator of angiogenic immediate early gene CYR61, leading to inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circ Res* **100** (3), 372 (2007).
- 25 Inoue, T., Hiratsuka, M., Osaki, M., and Oshimura, M., The molecular biology of mammalian SIRT proteins: SIRT2 in cell cycle regulation. *Cell Cycle* **6** (9), 1011 (2007).
- 26 Salminen, A. and Kaarniranta, K., SIRT1: Regulation of longevity via autophagy. *Cell Signal* (2009).
- 27 Frescas, D., Valenti, L., and Accili, D., Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem* **280** (21), 20589 (2005).
- 28 Estrada, R., Li, N., Sarojini, H., An, J., Lee, M. J., and Wang, E., Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61. *J Cell Physiol* **219** (3), 563 (2009).
- 29 Juric, V., Chen, C. C., and Lau, L. F., Fas-Mediated Apoptosis is Regulated by the Extracellular Matrix Protein CCN1 (CYR61) in vitro and in vivo. *Mol Cell*

- Biol* (2009).
- 30 Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Aoyama, H., Yoshimochi, K., and
Fukamizu, A., Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and
sensitivity to phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (32), 11278 (2005).
- 31 Kim, M. J., Ahn, K., Park, S. H., Kang, H. J., Jang, B. G., Oh, S. J., Oh, S. M.,
Jeong, Y. J., Heo, J. I., Suh, J. G., Lim, S. S., Ko, Y. J., Huh, S. O., Kim, S. C.,
Park, J. B., Kim, J., Kim, J. I., Jo, S. A., and Lee, J. Y., SIRT1 regulates tyrosine
hydroxylase expression and differentiation of neuroblastoma cells via FOXO3a.
FEBS Lett **583** (7), 1183 (2009).
- 32 Giannakou, M. E. and Partridge, L., The interaction between FOXO and SIRT1:
tipping the balance towards survival. *Trends Cell Biol* **14** (8), 408 (2004).
- 33 Bansback, N., Ara, R., Ward, S., Anis, A., and Choi, H. K., Statin therapy in
rheumatoid arthritis: a cost-effectiveness and value-of-information analysis.
Pharmacoeconomics **27** (1), 25 (2009).
- 34 Paraskevas, K. I., Statin treatment for rheumatoid arthritis: a promising novel
indication. *Clin Rheumatol* **27** (3), 281 (2008).
- 35 Calnan, D. R. and Brunet, A., The FoxO code. *Oncogene* **27** (16), 2276 (2008).
- 36 Yamagata, K., Daitoku, H., Takahashi, Y., Namiki, K., Hisatake, K., Kako, K.,
Mukai, H., Kasuya, Y., and Fukamizu, A., Arginine methylation of FOXO
transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. *Mol Cell* **32** (2), 221
(2008).
- 37 Gomis, R. R., Alarcon, C., He, W., Wang, Q., Seoane, J., Lash, A., and Massague,
J., A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes. *Proc Natl Acad
Sci U S A* **103** (34), 12747 (2006).
- 38 van der Heide, L. P. and Smidt, M. P., Regulation of FoxO activity by

- CBP/p300-mediated acetylation. *Trends Biochem Sci* **30** (2), 81 (2005).
- 39 Salminen, A., Ojala, J., Huuskonen, J., Kauppinen, A., Suuronen, T., and Kaarniranta, K., Interaction of aging-associated signaling cascades: inhibition of NF-kappaB signaling by longevity factors FoxOs and SIRT1. *Cell Mol Life Sci* **65** (7-8), 1049 (2008).
- 40 Kobayashi, Y., Furukawa-Hibi, Y., Chen, C., Horio, Y., Isobe, K., Ikeda, K., and Motoyama, N., SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int J Mol Med* **16** (2), 237 (2005).
- 41 Zhao, W., Kruse, J. P., Tang, Y., Jung, S. Y., Qin, J., and Gu, W., Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature* **451** (7178), 587 (2008).
- 42 Onuma, H., Vander Kooi, B. T., Boustead, J. N., Oeser, J. K., and O'Brien, R. M., Correlation between FOXO1a (FKHR) and FOXO3a (FKHRL1) binding and the inhibition of basal glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene transcription by insulin. *Mol Endocrinol* **20** (11), 2831 (2006).
- 43 Alam, S., Ueki, K., Nakagawa, K., Marukawa, K., Hashiba, Y., Yamamoto, E., Sakulsak, N., and Iseki, S., Statin-induced bone morphogenetic protein (BMP) 2 expression during bone regeneration: an immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **107** (1), 22 (2009).
- 44 Giampietro, P. F., McCarty, C., Mukesh, B., McKiernan, F., Wilson, D., Shuldiner, A., Liu, J., Levasseur, J., Ivacic, L., Kitchner, T., and Ghebranious, N., The role of cigarette smoking and statins in the development of postmenopausal osteoporosis: a pilot study utilizing the Marshfield Clinic Personalized Medicine Cohort. *Osteoporos Int* (2009).