

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E42186

**EFFECTS OF CHONDROITIN SULFATE PROTEOGLYCAN GENE  
DELETION AND PHYTOCHEMICALS ON CARTILAGE  
DEVELOPMENT AND DETERIORATION**

**KANYAMAS CHOOCHEEP**

**DOCTOR OF PHILOSOPHY  
IN BIOCHEMISTRY**

**THE GRADUATE SCHOOL  
CHIANG MAI UNIVERSITY  
OCTOBER 2010**



600251969



ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E42186

**EFFECTS OF CHONDROITIN SULFATE PROTEOGLYCAN GENE  
DELETION AND PHYTOCHEMICALS ON CARTILAGE  
DEVELOPMENT AND DETERIORATION**

**KANYAMAS CHOOCHEEP**

**A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN  
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF  
DOCTOR OF PHILOSOPHY  
IN BIOCHEMISTRY**

**THE GRADUATE SCHOOL  
CHIANG MAI UNIVERSITY**

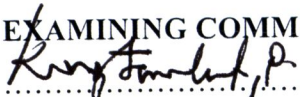
**OCTOBER 2010**

EFFECTS OF CHONDROITIN SULFATE PROTEOGLYCAN GENE  
DELETION AND PHYTOCHEMICALS ON CARTILAGE  
DEVELOPMENT AND DETERIORATION

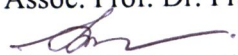
KANYAMAS CHOOCHEEP

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED  
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
IN BIOCHEMISTRY

EXAMINING COMMITTEE

 CHAIRPERSON

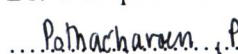
Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert

 MEMBER

Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ong-chai

 MEMBER

Dr. Waraporn Kasekarn

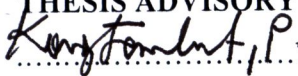
 MEMBER

Dr. Peraphan Pothacharoen

 MEMBER

Dr. Duriya Fongmoon

THESIS ADVISORY COMMITTEE

 ADVISOR

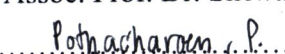
Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert

 CO-ADVISOR

Prof. Dr. Hideto Watanabe

 CO-ADVISOR

Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ong-chai

 CO-ADVISOR

Dr. Peraphan Pothacharoen

28 October 2010

© Copyright by Chiang Mai University

## ACKNOWLEDGEMENTS

This dissertation would not have been a real fulfillment without the backing and cooperation from various individuals through various means. The author wishes to express her sincere gratitude and deep appreciation to her advisor, Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert, for his invaluable assistance and helpful guidance throughout her study.

She would like to express her gracious thank to her co-advisor, Prof. Dr. Hideto Watanabe, Institute for Molecular Science of Medicine, Aichi Medical University, for his excellent training in molecular biology and animal model experiment, and also for his invaluable advice, and providing laboratory facilities and financial support during her stay there.

She wishes to express her gratitude to Prof. Dr. Koji Kimata for his precious advice and consideration. She would like to give special thanks to Dr. Sonoko Hatano, for her valuable guidance. Deepest gratitude are also due to the members at Institute for Molecular Science of Medicine, the Animal and Instrument Center at Aichi Medical University for their kind assistance, and friendship.

She would like to acknowledge the grant for foreign researcher at Aichi Medical University and the Royal Golden Jubilee (RGJ) scholarship for the financial support that made this work possible.

She would like to express her great appreciation to Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ongchai for her valuable suggestions. She also would like to thank Dr. Peraphan Pothacharoen for her good guidance and encouragement.



Special thanks also to all her senior, junior friends and colleagues in Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University for sharing the literature and invaluable assistance.

She wishes to express her love and deepest appreciation to her beloved family; for their understanding, patience, encouragement, assistance, and endless love, through the duration of her studies.

Kanyamas Choocheep

**Thesis Title** Effects of Chondroitin Sulfate Proteoglycan Gene Deletion and  
Phytochemicals on Cartilage Development and Deterioration

**Author** Miss Kanyamas Choocheep

**Degree** Doctor of Philosophy (Biochemistry)

**Thesis Advisory Committee**

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert	Advisor
Prof. Dr. Hideto Watanabe	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ong-chai	Co-advisor
Dr. Peraphan Pothacharoen	Co-advisor

**ABSTRACT**

**E 42186**

Versican/Pg-M is a large chondroitin sulfate proteoglycan in the extracellular matrix, which is transiently expressed in mesenchymal condensation areas during tissue morphogenesis. Here, versican conditional knockout mice *Prx1-Cre/Vcan<sup>fllox/fllox</sup>*, in which *Vcan* was pruned out by site-specific Cre recombinase driven by *Prx1* promoter were generated. Although *Prx1-Cre/Vcan<sup>fllox/fllox</sup>* mice were viable and fertile, they developed distorted digits. Histological analysis of newborn mice revealed hypertrophic chondrocytic nodules in cartilage, tilting of the joint and a slight delay of chondrocyte differentiation in digits. By immunostaining, whereas the joint interzone of *Prx1-Cre/Vcan<sup>+/+</sup>* showed an accumulation of TGF- $\beta$ , concomitant with versican, that of *Prx1-Cre/Vcan<sup>fllox/fllox</sup>* without versican expression exhibited a decreased incorporation of TGF- $\beta$ . In a micromass culture system of mesenchymal



cells from limb bud, whereas TGF- $\beta$  and versican were co-localized in the perinodular regions of developing cartilage in *Prx1-Cre/Vcan*<sup>+/+</sup>, TGF- $\beta$  was widely distributed in *Prx1-Cre/Vcan*<sup>flox/flox</sup>. These results suggested that versican facilitates chondrogenesis and joint morphogenesis, by localizing TGF- $\beta$  in the extracellular matrix and regulating its signaling. The failure of joint morphogenesis which found in conditional deletion of versican might later make mice suffer from joint anomaly as seen in human joint diseases.

Taking into consideration, rheumatoid arthritis (RA) is one of the common joint diseases that primarily affects the joints and results in the progressive destruction of articular structures, particularly cartilage and bone. Synovial fibroblasts (SFs) in the most superficial lining layer of the hyperplastic RA synovium have been indicated to play an important role in the pathogenesis of RA. During the pathological events in RA, the activated synovial fibroblasts in the lining layer of the synovial membrane invade deeply into the articular cartilage and bone, and release several cytokines or matrix metalloproteinases (MMPs) that in turn contribute to cartilage deterioration and joint destruction. Reportedly, several studies have indicated that *A. galanga* has a potential anti-rheumatic activities, however, the precise action of the extract on arthritic diseases is not yet fully understood. Hence, the inflammatory model was independently established as a clinical study for investigation the effects of *A. galanga* extracts on the expression of genes involved in catabolic activities in an IL-1 $\beta$ -induced human SFs. In this model, primary human synovial fibroblasts were treated for 24 h with *A. galanga* hexane extracts in the presence of recombinant human IL-1 $\beta$ . MMPs in the culture medium were monitored by gelatin zymography. Total RNA was isolated from the cell lysate and analyzed by semi-quantitative RT-

PCR. After treatment with *A. galanga* extract fraction 4, MMP-2 activity in the culture medium was significantly decreased. In addition, MMP-1, MMP-3, MMP-13, and Cox-2 expression were down-regulated by 10 µg/ml that of the fraction. These data suggested that the decrease of gene expression and production of MMPs in synovial fibroblasts against inflammatory stimuli could be due to the effects of the *A. galanga* extract fraction 4. Therefore, fraction 4 of *A. galanga* extracts may contain some active compounds which could be worth as anti-arthritic agent.



**E42186**

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์      ผลของการขาดหายไปของยีนคอนทรอยดินซัลเฟตโปรตีโอไกลแคนและ  
 ผลของสารพิษเคมีต่อการเจริญและการเสื่อมของกระดูกอ่อน

ผู้เขียน                      นางสาวกันขามาส ชูชีพ

ปริญญา                      วิทยาศาสตร์ดุขฎิบัณเจิต (ชีวเคมี)

### คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. ปรัชญา กงทวีสล	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
Prof. Dr. Hideto Watanabe	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ.ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร. พีรพรรณ โปธาเจริญ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

### บทคัดย่อ

เวอร์ซีเคนหรือ พีจีเอ็ม เป็นคอนทรอยดินซัลเฟตโปรตีโอไกลแคน ซึ่งพบได้ในองค์ประกอบ  
 ภายนอกเซลล์ และพบว่ามีารแสดงออกเพียงชั่วคราวในบริเวณที่มีการกระชับของกลุ่มเซลล์  
 mesenchymal ในระหว่างการพัฒนาโครงสร้างของเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาหน้าที่ของเวอร์ซีเคนใน  
 ช่วงเวลาดังกล่าวจึงได้ทำการดัดยีนเวอร์ซีเคนออกด้วยเทคนิค Cre/LoxP recombination ภายได้  
 พีอาร์เอ็กซ์วัน (*Prx-1*) ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่จำเพาะ ส่งผลให้มีการดัดยีนเวอร์ซีเคนออกไปตาม  
 สภาวะและเนื้อเยื่อที่จำเพาะได้ หนูที่ถูกดัดยีนเวอร์ซีเคนออกไปเรียกว่าหนู *Prx1-Cre/Vcan<sup>fllox/fllox</sup>*  
 แม้หนู *Prx1-Cre/Vcan<sup>fllox/fllox</sup>* มีชีวิตรอดและสืบพันธุ์ได้ตามปกติแต่พบพัฒนาการนิ้วเท้าที่มี  
 ลักษณะผิดปกติ เมื่อวิเคราะห์ชิ้นเนื้อของหนู *Prx1-Cre/Vcan<sup>fllox/fllox</sup>* แรกเกิดทำให้ทราบว่าการ

**E42186**

คคของนิ้วในบริเวณดังกล่าวเกิดจากการรวมกลุ่มของคอนโดรซัยต์ชนิดไฮเปอร์โทรฟิคในกระดูกอ่อนและส่งผลให้มีการเรียงของข้อต่อรวมถึงเซลล์ในบริเวณนั้นมีการพัฒนาไปเป็นเซลล์คอนโดรซัยต์ได้ช้าลง เมื่อทำการข้อมด้วยวิธีทางอิมมูโนพบว่าบริเวณที่จะกลายเป็นข้อต่อของหนูกลุ่มควบคุมมีการแสดงออกเวอร์ซิแคนร่วมกับทีจีเอฟเบต้า (TGF- $\beta$ ) แต่ไม่พบการแสดงออกดังกล่าวในหนู *Prx1-Cre/Vcan<sup>flx/flx</sup>* นอกจากนั้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ mesenchymal จากรยางค์อ่อนในระบบขนาดเล็กและมีจำนวนมาก (micromass) พบว่าทีจีเอฟเบต้าและเวอร์ซิแคนในกลุ่มควบคุม มีการแสดงออกในบริเวณ perinodular เดียวกัน แต่ในหนู *Prx1-Cre/Vcan<sup>flx/flx</sup>* ไม่พบการแสดงออกของทีจีเอฟเบต้าเป็นบริเวณกว้าง ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เวอร์ซิแคนช่วยให้เซลล์ mesenchymal พัฒนาไปเป็นเซลล์คอนโดรซัยต์และช่วยในการพัฒนาของข้อต่อโดยจับกับทีจีเอฟเบต้าไว้ในองค์ประกอบนอกเซลล์ รวมทั้งควบคุมการส่งสัญญาณของทีจีเอฟเบต้าเข้าสู่ภายในเซลล์ ในหนูที่ถูกตัดเอ็นเวอร์ซิแคนออกไปทำให้ไม่สามารถพัฒนาข้อต่อได้ตามปกติจึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มันได้รับผลกระทบจากความผิดปกตินี้ในภายหลังเช่นเดียวกับที่พบในโรคข้อของมนุษย์

ข้ออักเสบรูมาตอยด์เป็นโรคข้อที่มีอุบัติการณ์สูง พยาธิสภาพของโรคเริ่มจากการอักเสบของข้อต่อจนส่งผลให้มีการทำลายกระดูกอ่อนหุ้มข้อและกระดูกได้ในภายหลัง เซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อซึ่งพบในชั้นผิวนอกของเยื่อหุ้มข้อ ถูกชี้บ่งว่าเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการดำเนินไปของโรค โดยเซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อที่ถูกกระตุ้นในบริเวณเยื่อหุ้มข้อจะถูกลำเลียงไปทำลายกระดูกอ่อนหุ้มผิวข้อและกระดูก โดยการปล่อยไซโตไคน์และเอนไซม์ matrix metalloproteinases (MMPs) ประกอบกับมีรายงานถึงฤทธิ์ด้านการอักเสบของข้อรูมาตอยด์จากสารสกัดของข่า (*A. galanga*) อย่างไรก็ดีตามยังไม่ทราบถึงกลไกที่แน่ชัดในฤทธิ์ด้านการอักเสบ ดังนั้นจึงสนใจที่จะ



**E42186**

ศึกษาในลักษณะที่เป็นแบบจำลองทางคลินิก โดยศึกษาผลของสารสกัดพฤษเคมีที่ได้จากข่าต่อ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายกระดูกอ่อน ในรูปแบบการทดลองครั้งนี้ เซลล์สร้าง เส้นใยในไขข้อของมนุษย์จะถูกเลี้ยงในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคินวันเบต้า (IL-1 $\beta$ ) ร่วม กับการใส่สารพฤษเคมีที่ได้จากข่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดกัมมันตภาพของเอนไซม์ MMPs ซึ่งหลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยวิธี gelatin zymography ส่วนอาร์เอ็นเอที่ได้จาก เซลล์ถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR ผลการทดลองด้วยข่า fraction 4 ที่ ความเข้มข้นตั้งแต่ 10  $\mu\text{g/ml}$  พบว่าทำให้กัมมันตภาพของเอนไซม์ MMP-2 ในน้ำเลี้ยงเซลล์ลดลง และยังพบการแสดงออกของยีน MMP-1, MMP-3, MMP-13 และ Cox-2 ลดลงอีกด้วย จึงสรุป ได้ว่าการลดลงของเอนไซม์เหล่านี้น่าจะเป็นผลมาจากฤทธิ์ของสารพฤษเคมีในข่า fraction 4 ดังนั้นสารพฤษเคมีจากข่าดังกล่าวจึงอาจมีสารออกฤทธิ์ซึ่งสามารถใช้เป็นสารต้านโรคข้ออักเสบได้

## TABLE OF CONTENT

ACKNOWLEDGMENTS	iii
ENGLISH ABSTRACT	v
THAI ABSTRACT	viii
LIST OF TABLES	xvii
LIST OF FIGURES	xviii
ABBREVIATIONS	xxii
CHAPTER I INTRODUCTION	
1.1 Statement of the problem	1
1.2 Literature reviews	5
1.2.1 Cre/ <i>loxP</i> and <i>Prx1</i> gene	5
1.2.2 Proteoglycan	9
1.2.2.1 Proteoglycan classification	9
1.2.2.1.1 Interstitial proteoglycans and the aggrecan family	9
1.2.2.1.2 Secretory granule proteoglycans	12
1.2.2.1.3 Basement membrane proteoglycans	12
1.2.2.1.4 Membrane-bound proteoglycans	12
1.2.2.2 Proteoglycan functions	14
1.2.3 Gene and protein structure of versican	16
1.2.4 The role of versican in cell behavior	19



1.2.5	The interaction of versican with its extracellular matrix binding and cell surface molecules	22
1.2.6	Cartilage development	29
1.2.6.1	Mesenchymal condensations	30
1.2.6.2	Chondrocyte differentiation and proliferation	35
1.2.6.3	Chondrocyte maturation	36
1.2.7	Joint formation	37
1.2.7.1	Joint specification	37
1.2.7.2	Joint cavitation	43
1.2.7.3	Joint morphogenesis	46
1.2.8	Joint deterioration	46
1.2.8.1	Rheumatoid arthritis and pathology	46
1.2.8.2	Role of synovial fibroblast in rheumatoid arthritis	49
1.2.9	Phytochemicals	51
1.2.9.1	<i>A. galanga</i> and its characteristic	51
1.3	Objectives	54

## CHAPTER II MATERIALS AND METHODS

2.1	Materials	55
2.2	Methods	55
2.2.1	Generation and preparation methods	55
2.2.1.1	Generation of conditional <i>Vcan</i> knockout mice	55
2.2.1.2	Preparation of <i>Alpinia galanga</i> hexane extracts	56
2.2.2	Identification methods	58

2.2.2.1	DNA extraction	58
2.2.2.2	Genotyping of versican transgenic mice	58
2.2.2.3	Genotyping of <i>Prx1</i> -Cre mice	59
2.2.2.4	Genotyping of ROSA26 mice	59
2.2.2.5	DNA sequencing	60
2.2.3	Analytic methods	61
2.2.3.1	Analysis of <i>Prx1</i> -Cre activity	61
2.2.3.2	X-ray and histological analysis	62
2.2.3.3	Cryosectioning and X-gal staining	62
2.2.3.4	Immunostaining and hyaluronan detection	63
2.2.3.5	Micromass culture	64
2.2.3.6	Western blot analysis	65
2.2.3.7	Alcian blue staining	66
2.2.3.8	Phytochemical analysis by HPLC	66
2.2.3.9	Human synovial fibroblast and treatments	67
2.2.3.10	Viability assay	67
2.2.3.11	Gelatin zymography	68
2.2.3.12	Gene expression analysis	68

## CHAPTER III RESULTS

3.1	Generation and identification of <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup>fl<sup>ox</sup>/fl<sup>ox</sup></sup> mice	71
3.1.1	Generation of <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup>fl<sup>ox</sup>/fl<sup>ox</sup></sup> mice	71
3.1.2	Genotyping	75
3.1.2.1	Genotyping of versican transgenic mice	75

3.1.2.2	Genotyping of <i>Prx1</i> -Cre mice	75
3.1.3	DNA sequencing	77
3.2	Phenotype investigations	83
3.2.1	X-ray examination	83
3.2.2	Gross observation	83
3.2.3	Histological analyses	88
3.2.3.1	Delayed cartilage development at newborn	88
3.2.3.2	Delayed cartilage development at E15.5, E16.5, and E 18.5	91
3.3	Versican distribution in mice digits	100
3.3.1	The absent of versican in <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup><i>fllox/fllox</i></sup> digits	100
3.3.2	Cre immunostaining and $\beta$ -galactosidase activity	102
3.4	Distribution of hyaluronan and its binding molecules in joint interzone	106
3.5	Alteration of TGF- $\beta$ signaling in joint interzone	111
3.6	Impaired mesenchymal condensations in <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup><i>fllox/fllox</i></sup> micromass culture	113
3.6.1	$\beta$ -galactosidase activity in micromass culture	113
3.6.2	Versican expression patterns in micromass culture at day 3, day 6, and day 9	115
3.6.3	Delayed chondrocyte differentiation in micromass culture	117
3.7	Impaired mesenchymal condensations and altered TGF- $\beta$ signaling in <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup><i>fllox/fllox</i></sup> micromass culture	119
3.7.1	Expression patterns of TGF- $\beta$ and its related molecules in micromass culture at day 3, day 6	119



3.7.2	Alteration of TGF- $\beta$ signaling in micromass culture	122
3.8	Localization of TGF- $\beta$ in the extracellular matrix by versican	126
3.9	Phytochemical profiles of <i>A. galanga</i> hexane extracts	128
3.10	Effect of <i>A. galanga</i> hexane extracts on IL-1 $\beta$ -reduced gelatinases production	131
3.11	Effect of <i>A. galanga</i> hexane extracts on IL-1 $\beta$ -reduced gelatinases expression	135
3.12	Effect of <i>A. galanga</i> hexane extracts on the IL-1 $\beta$ -induced COX-2 and MMPs expression	137
 <b>CHAPTER IV DISCUSSION AND CONCLUSION</b>		
4.1	Discussion for conditional knockout mice of versican model	139
4.1.1	Versican is required for TGF- $\beta$ signaling during joint morphogenesis	139
4.1.2	Versican accumulates TGF- $\beta$ to perinodular regions in mesenchymal condensation	142
4.1.3	Functional domain of versican	143
4.2	Discussion for the effects of <i>A. galanga</i> on an inflammatory model of human synovial fibroblasts	145
<b>REFERENCES</b>		151
<b>APPENDICES</b>		185
<b>APPENDIX A</b>		186
<b>APPENDIX B</b>		190
<b>APPENDIX C</b>		192

<b>PUBLICATIONS FOR THESIS</b>	195
<b>CURRICULUM VITAE</b>	196

**LIST OF TABLES**

<b>Table</b>	<b>Page</b>
1.1 Examples of chondrotin sulfate proteoglycans	11
1.2 Major classes of genes and gene products associated with skeletogenic condensations along with their functions and stages of action	34
2.1 Primers for semi-quantitative RT-PCR	70
3.1 Alignment-hit table of nucleotide sequence using primer 001	80
3.2 Alignment-hit table of nucleotide sequence using primer 002	80



## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 Schematic of Cre/ <i>loxP</i> mediated recombination and excision	7
1.2 Schematic of cell-specific Cre-mediated gene targeting in mice	8
1.3 Protein structure of versican	18
1.4 Organization of the mouse PG-M gene and alignment of isolated genomic DNA clones	19
1.5 Interaction of versican with other molecules	23
1.6 Illustration of cartilage development	29
1.7 Illustration of joint formation, showing the joint interzone specification, cavitation and joint morphogenesis	39
1.8 Illustration of cytokine signaling pathways involved in RA	48
1.9 Photographs of trunk, blossom, and rhizome of <i>A. galanga</i>	53
2.1 Diagram of <i>Alpinia galanga</i> hexane extract preparation	57
2.2 Genomic mapping for conditional deletion of the floxed stopper sequence of ROSA26 reporter mice	61
3.1 Genomic construct for conditional deletion of the <i>Vcan</i> mice	73
3.2 Illustration of the generation of transgenic mice	74
3.3 Genotyping of <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup>+/+</sup> , <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup>+/<i>lox</i></sup> , and <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup><i>lox/lox</i></sup>	76
3.4 PCR analysis of <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup>+/<i>lox</i></sup> for DNA sequencing	78
3.5 Schematic of 001 forward and 002 reverse primers alignment	79

3.6	Chromatogram of DNA sequencing using 001 forward primer	81
3.7	Chromatogram of DNA sequencing using 002 reverse primer	82
3.8	X-ray visualization of 8-month-old mice	84
3.9	Gross observation of 1-month-old, 2-week-old, and 1-week-old mice	85
3.10	Gross observation of <i>Prx1-Cre/Vcan</i> <sup>+/+</sup> and <i>Prx1-Cre/Vcan</i> <sup>flx/flx</sup> limbs at 1-month-old, 2-week-old, and 1-week-old mice	86
3.11	Histological analysis of hind limbs at newborn by H&E staining	89
3.12	Histological analysis of fore limbs at newborn by H&E staining	90
3.13	Histological analysis of hind limbs at various embryonic stages by H&E staining	93
3.14	Histological analysis of hind limbs at E16.5 and E15.5 by H&E staining	95
3.15	Alcian blue staining of hind limbs at E15.5 by H&E staining	96
3.16	Histological analysis of hind limbs at E14.5 by H&E staining	97
3.17	Immunostaining for Ki67 of hind limbs at E15.5	99
3.18	Immunostaining for versican of hind limbs at newborn, E16.5, E15.5, and E13.5	101
3.19	Immunostaining for versican of hind limbs at E15.5	103
3.20	Immunostaining for Cre enzyme of hind limbs at E15.5	104
3.21	$\beta$ -galactosidase staining of hind limbs at E14.5	105
3.22	Distributions of HA and HA-binding molecules in the joint interzone at E15.5	108
3.23	Immunofluorescent staining for CD44 of hind limbs at E15.5	110
3.24	Immunostaining for pERK1/2 and $\beta$ -catenin in joint interzone at E15.5	110

3.25	Immunostaining patterns of TGF- $\beta$ , T $\beta$ RII, and phospho-Smad2/3 in the joint interzone at E15.5	112
3.26	Alcian blue staining of hind limbs at E13.5	114
3.27	$\beta$ -galactosidase staining of micromass culture	114
3.28	Staining patterns of versican and PNA in <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup>+/+</sup> micromass cultures at day 3, 6, and 9 (lower magnification)	116
3.29	Staining patterns of versican and PNA in <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup>+/+</sup> micromass cultures at day 3, 6, and 9 (higher magnification)	116
3.30	Patterns of micromass stained by Alcian blue at day 3, 6, and 9 of <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup>+/+</sup> and <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup>flox/flox</sup>	118
3.31	Patterns of immunostaining for TGF- $\beta$ , T $\beta$ RII, and pSmad2/3 in <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup>+/+</sup> micromass cultures at day 3	120
3.32	Patterns of immunostaining for TGF- $\beta$ , T $\beta$ RII, and pSmad2/3 in <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup>+/+</sup> micromass cultures at day 6	120
3.33	Patterns of immunostaining for versican, TGF- $\beta$ , T $\beta$ RII, and pSmad2/3 in <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup>+/+</sup> micromass cultures at day 6	121
3.34	Immunofluorescent staining for versican, TGF- $\beta$ , T $\beta$ RII, and phospho-Smad2/3 at day 6 of culture of <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup>+/+</sup> and <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup>flox/flox</sup>	123
3.35	Western blot analysis of TGF- $\beta$ in micromass	125
3.36	Immunofluorescent staining of versican and TGF- $\beta$ of <i>Prx1</i> -Cre/ <i>Vcan</i> <sup>+/+</sup> micromass untreated and treated with chondroitinase ABC	127
3.37	HPLC-chromatograms of <i>A. galanga</i> extracts	130
3.38	Effect of <i>A. galanga</i> extracts, fractions 1, on the production of MMP-2	132

3.39	Effect of <i>A. galanga</i> extracts, fractions 2, on the production of MMP-2	132
3.40	Effect of <i>A. galanga</i> extracts, fractions 3, on the production of MMP-2	133
3.41	Effect of <i>A. galanga</i> extracts, fractions 4, on the production of MMP-2	133
3.42	Viability of human synovial fibroblasts treated with <i>A. galanga</i> extracts	134
3.43	Effect of <i>A. galanga</i> extracts, fractions 1-4, on MMP-2 and MMP-9 expression	136
3.44	Effect of <i>A. galanga</i> extracts, fractions 1-4, on COX-2 and MMP-1, -3, and MMP-13 expression	138





## LIST OF ABBREVIATIONS

bp	base pair
$\beta$ -gal	beta-galactosidase
BSA	bovine serum albumin
$\text{CaCl}_2$	calcium chloride
cbEGF	calcium-binding epidermal growth factor
$\text{CO}_2$	carbondioxide
CRP	complement regulatory protein
CS	chondroitin Sulfate
Da	dalton
DAB	diaminobenzidine
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DNA	deoxyribonucleic acid
ECM	extracellular matrix
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
En	embryonic day n
ES	embryonic stem

FAK	focal adhesion kinase
FCS	fetal calf serum
GAG	glycosaminoglycan
h	hour
HA	hyaluronan
HABP	hyaluronan binding protein
HBR	hyaluronan binding region
HAS	hyaluronan synthase
HCl	hydrochloric acid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hydrogen peroxide
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
HS	heparan sulfate
ICD	intracellular domain
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
KS	keratan sulfate
LTBP	latent TGF-beta-binding protein
M	molar
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEFs	mouse embryonic fibroblasts
min	minute
MgCl <sub>2</sub>	magnesium chloride
ml	milliliter

mM	millimolar
MMP	matrix metalloproteinase
μg	microgram
ml	microliter
NaCl	sodium chloride
NaOH	sodium hydroxide
ng	nanogram
nm	nanometer
OA	osteoarthritis
PBS	phosphate buffer saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PG	proteoglycan
RA	rheumatoid arthritis
RNA	ribonucleic acid
rpm	round per minute
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
s	second
SF	synovial fibroblast
Tg	transgenic
U	unit
UV	ultraviolet
TβRII	transforming growth factor β-2 receptor
TGF-β1	transforming growth factor beta 1

X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl-beta galactopyranoside
WT	wild type