

# 成體幹細胞治療 之模式動物—螢光豬

文·圖／吳信志

成體幹細胞 (adult stem cells) 應用於再生醫學研究常面臨的問題包括：細胞經螢光報導基因 (reporter gene) 轉染 (transfection) 及後續繼代篩選後，表現螢光蛋白質之變化型式、細胞移植治療之數量不足及分化潛能改變等，且經報導基因轉染之成體幹細胞，在擴增3至5次後，其螢光蛋白質表現不一致，會發生短暫性表現之狀況，即使部分細胞持續表現螢光蛋白質，其分化潛能仍隨細胞擴增次數增加而下降，以此幹細胞進行細胞治療的效果及可用於治療或移植之細胞數量將大受限制。此時，若能將綠色螢光報導基因嵌入早期豬胚原核之染色體中，並進行胚移置，以產生全身性表現綠色螢光之基因轉殖豬，如此可進行低侵入性之活體採樣，自綠色螢光豬之骨髓或其他體組織分離出一致及持續性地表現螢光蛋白質之成體幹細胞，作為再生醫學研究之用，幹細胞治療之模式動物—綠色及紅色螢光豬之誕生即源自於此。

## 幹細胞來源及特性

幹細胞乃指一群可自我更新 (self-renewal) 及尚未完全分化的細胞，同時具有可分化成特定細胞或組織之能力，發育生物學將其歸於較原始期階段之細胞。幹細胞由胚胎發育至成熟個體的過程扮演最關鍵性的角色，即使發育成熟，幹細胞仍然普遍存在於生命體中，擔負個體之各種組織及器官的細胞更新及損傷修復等角色。由早期胚之胚葉細胞、囊胚期之內細胞群細胞及胎兒、新生兒臍帶血及其他特定組織、甚至發育至成體階段之特定組織，如：骨髓、肌肉、皮膚、脂肪…等，均可分離出表現不同細胞表面抗原 (surface

antigen) 及不同分化潛能之幹細胞。幹細胞尚可因其於體內及體外所處環境條件之不同而改變分化方向—分化之可塑性 (plasticity)，經移植入體內亦具有返位 (homing) 至其原始來源組織及跨胚層 (germ-layer) 轉分化 (trans-differentiation) 之特性。

## 幹細胞之分類

依幹細胞之分化潛能，可分為：

- (1) **全能性幹細胞 (totipotent stem cells)**：具有可發育成一完整生物個體之能力，包括胎兒及胎盤兩部分，如精子和卵子結合成為受精卵後，一個受精卵分裂成為兩個完全相同的胚葉細胞 (blastomere)，兩個細胞再分裂成為四個細胞。理論上在此時期任何一個細胞被移置於同物種且同期化處理之雌性生殖道中，均具有單獨發育成為完整個體之能力，此種細胞即稱為全能性幹細胞。
- (2) **多能性幹細胞 (pluripotent stem cells)**：細胞具有分化成多種細胞或組織能力，可發育成胎兒所有胚層 (內胚層、中胚層及外胚層) 之組織及生殖細胞的潛力，但未具單獨發育成胎盤組織之能力。例如由早期囊胚之內細胞群所分離及建立之胚幹細胞株 (embryonic stem cells) 即是，在適當培養條件下具無限增殖及可分化為個體所有組織細胞之潛能，惟在胎生動物中，此細胞必須與可輔助發育成胎盤之滋養層細胞結合，由胎盤供應胎兒發育所需之營養，才能發育成完整個體。若將小鼠胚幹細胞植入同期化處理之假孕母小鼠子宮內，已證實將發展成為畸胎瘤



## 研究發展～幹細胞

(teratoma)，在畸胎瘤中可清楚辨別三胚層組織及臟器，甚至毛髮、牙齒均可辨識，但無法形成完整個體。

**(3)寡能性幹細胞 (oligopotent stem cells)：**指可以分化成特異性組織之不同細胞，但卻失去了單獨發育成完整個體之能力，包括造血幹細胞、間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells) 及神經幹細胞等不同來源之成體幹細胞。

**(4)單能性幹細胞 (unipotent stem cells)：**此種幹細胞只能分化成單一類型或與其相關之多種類型之細胞，如上皮組織基底層之幹細胞、肌肉中之成肌細胞、成熟前之T-細胞及B-細胞等。分化潛能雖有差異性，不過於體外適當環境條件及訊息因子誘導下，其分化潛能正逐漸擴增中，此現象可由2006年Dyce等人將豬皮膚幹細胞分離並於體外培養確認具有被誘導分化為卵母細胞之能力所證實。

## 產製螢光豬的方法

綠色螢光蛋白質 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 基因係自水母 (jellyfish *Aequorea Victoria*) 所選殖出，該蛋白質不需輔因子及受質，僅經藍光激發，即可於動物體內及體外表現出螢光。採用豬胚原核基因顯微注射之方法 (圖



圖1：豬胚原核基因顯微注射：(A) 基因顯微注射前豬胚(800X)；(B) 基因顯微注射後之原核明顯脹大豬胚(800X)。

1) 產製攜帶由  $\beta$ -肌動蛋白基因啟動子 ( $\beta$ -actin promoter) 及巨細胞病毒增強子 (cytomegalovirus enhancer) 所調控之綠色螢光蛋白質外源基因 ( $\beta$ -actin-EGFP) 之轉基因豬。在綠色螢光基因轉殖豬 (圖2) 產製之試驗中，共完成265個豬原核胚之基因注入，並分別移置於8頭發情同期化之受胚豬，其中4頭受胚母豬懷孕，合計分娩36頭仔豬；經分別抽取初生仔豬之基因組DNA進行聚合鏈鎖反應 (polymerase chain reaction) 及南方吸漬 (Southern blot) 分析，結果證實其中3頭仔公豬確係帶有  $\beta$ -actin-EGFP轉基因者。經螢光影像系統及螢光蛋白質分析，確認該螢光蛋白質於體內及體外培養之成纖維母細胞及源自骨髓之間葉幹細胞皆能穩定表現。相同方法也被應用於紅色螢光豬 (圖2) 之產製，合計進行54個豬胚之基因顯微注射，經胚移置後一頭受胚豬懷孕，並順利產下7頭小豬，其中兩頭為表現紅色螢光蛋白質之母豬，目前皆已繁衍至第三代。



圖2：表現綠色螢光或紅色螢光蛋白質之基因豬。左為綠色螢光蛋白質基因轉殖豬；右為紅色螢光蛋白質基因轉殖豬。

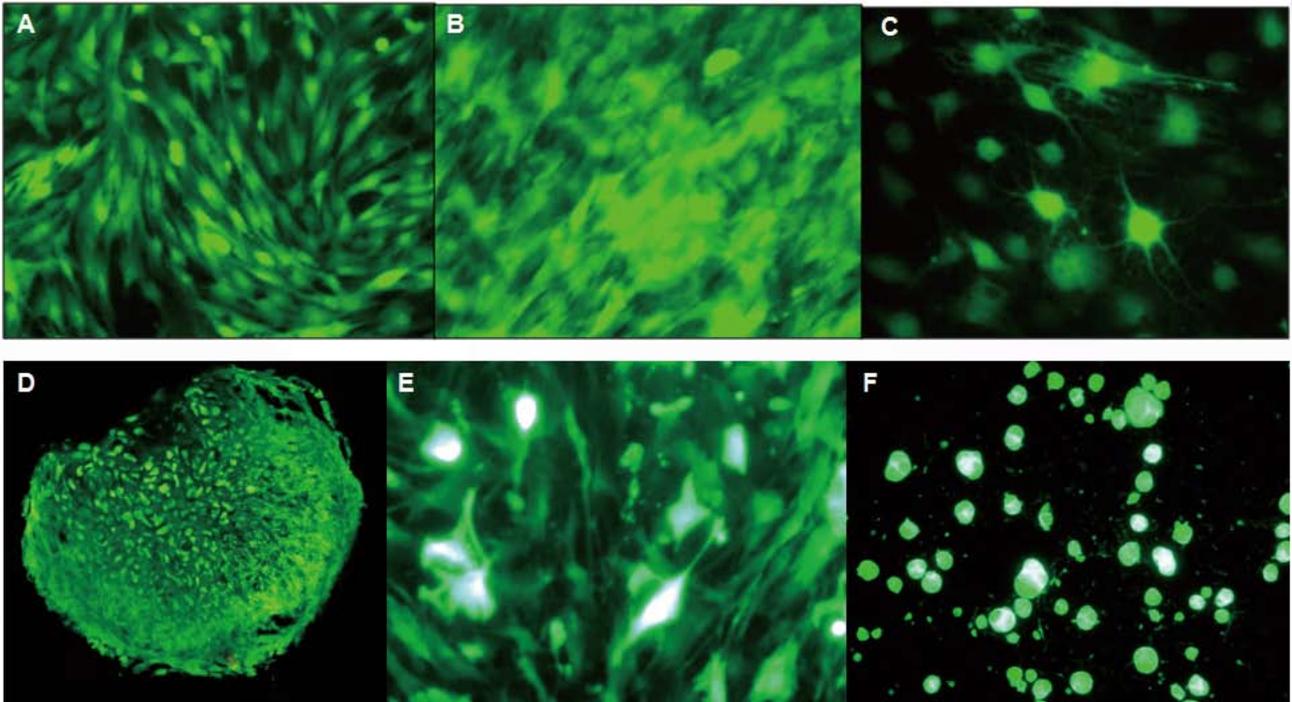


圖3：綠色螢光豬骨髓分離之間葉幹細胞：(A)及經體外誘導分化後之成骨細胞(B)、神經細胞(C)、軟骨細胞(D)、脂肪細胞(E)及產生胰島素細胞(F)之外觀形態及綠色螢光蛋白質之一致性表現。

## 間葉幹細胞於再生醫學之應用

間葉性幹細胞最初是由Friedenstein等於1970年所發現，且證明其在體外分化成為硬骨骼及脂肪細胞，後續由其他的研究團隊發現，此類幹細胞更可以分化成為肝臟、軟骨、肌肉組織細胞，乃至神經系統的細胞。間葉性幹細胞的分化可塑性表現，徹底改變了原先對於成體幹細胞分化能力受限制的看法，更大幅提升了間葉性幹細胞在細胞療法、組織工程及再生醫學的研究與應用價值，未來可用於組織修復、更換受傷或病變器官中的細胞或組織，改善目前束手無策的重大疾病之治療，如脊髓受傷、肝硬化、中風、老年性痴呆症、惡性腫瘤如腦與腎臟腫瘤、帕金森氏症等。間葉性幹細胞的重要性及發展潛力，與日俱增。相較於大部分成體幹細胞，間葉性幹細胞具有較佳的自我更新及增生的能力，除了作為疾病的直接治療劑之外，亦被用於基因治療研究，可將經過基因修飾的細胞與之融合，再植入自體的

組織中進行修復及治療。

## 螢光豬骨髓間葉幹細胞之分離及體外誘導分化

豬間葉幹細胞可分離自骨髓液、關節滑液、脂肪組織、胎盤、骨小樑、骨膜、胎兒之臍帶血及周邊血液等，不同組織來源所分離之間葉幹細胞有細胞增殖及分化潛能之差異性；從臍帶血及胎盤組織分離之幹細胞具有較佳之增殖及分化潛力，但因需剖腹手術，取得不易；次為骨髓液中之間葉幹細胞，此等細胞具有易於分離培養、體外增生快速與免疫耐受（immune-tolerance）調節等特性，因此在再生醫學領域廣泛被研究及應用。螢光豬骨髓間葉幹細胞之分離方法係將螢光豬全身氣體麻醉後，自其股骨髓腔抽出骨髓液，利用過濾膜濾除多餘雜質與細胞團塊，將過濾後之骨髓液重新混勻，經離心去除上清液，以培養液回沖離心後之細胞沉澱顆粒，然後緩慢加入Ficoll-Paque™ PLUS梯度離心裝置，再經離心處



## 研究發展～幹細胞

理使其分層，取出單核球細胞並計算細胞數，依細胞數選擇種植面積，利用貼附特性差異即可將造血幹細胞與間葉幹細胞分離，並於培養7天後再進行繼代。

間葉幹細胞在適當的體外培養環境下，可經由特殊分化因子之刺激而誘導形成諸如軟骨細胞、成骨細胞、脂肪細胞與肌肉細胞等。因此，經由產製表現螢光蛋白質之轉基因豬，自其骨髓液分離間葉幹細胞，並建立一套穩定表現螢光蛋白質基因之體外培養系統，便能提供臨床前有效監控細胞走向與分化分析之應用。研究結果顯示，表現螢光蛋白質之幹細胞可於體外特定誘導分化條件下，順利分化形成脂肪細胞、成骨細胞、軟骨細胞與非間葉系之類神經細胞及產生胰島素細胞（圖3），並證實可表達該組織細胞特異性之分子標誌。應用流式細胞儀分析結果亦證明，間葉幹細胞於分化前後確實可持續表達螢光蛋白質。

### 螢光豬骨髓間葉幹細胞應用於再生醫學

再生醫學即利用健康的細胞進行修復、取代已受損或壞死的細胞及因疾病、外傷所受損的組織或器官，其所涉及的領域以幹細胞、組織工程、細胞治療為主軸。綠色螢光轉基因豬之骨髓間葉幹細胞，經由靜脈或腹腔注入骨質疏鬆症小鼠體內，3個月後採樣分析證實皆可遷移（migrate）至骨組織且參與骨骼之新生成，依此推論，綠色螢光轉基因豬之骨髓間葉幹細胞可能具有抑制免疫反應之特性，經移植於骨質疏鬆症小鼠體內，藉由微電腦斷層掃描及病理組織切片結果證實可改善小鼠骨質疏鬆症（Hsiao 等，2010）。在第一型糖尿病小鼠之細胞治療上，將表現螢光蛋白質之骨髓間葉幹細胞於體外所誘導分化之可分泌胰島素細胞，埋植於第一型糖尿病小鼠皮下，結果亦證實可明顯改善血糖濃度達90

天；以綠色螢光轉基因豬之骨髓間葉幹細胞進行李宋豬椎間盤再生之豬模式研究亦獲得具體之成效（Chen 等，2009）。上述結果提示，自綠色螢光蛋白質轉基因豬之骨髓所分離之間葉幹細胞，可作為臨床前細胞治療、組織修補及組織工程等與再生醫學相關研究之用途。

雖然豬是靈長類以外最適用於人類醫學研究之模式動物，然而在豬成體幹細胞之研究進行過程中，常遭遇幹細胞經過誘導分化及移植後，不易取得明確證據來證實新生組織確實由外源幹細胞分化所生成。因此，採用一致及持續性表現螢光報導基因之豬成體幹細胞進行人類疾病之豬模式試驗，可加速再生醫學領域之研究發展，目前全球幹細胞治療的相關研究正積極進行中，同時行政院國家科學委員會生物處也將幹細胞／再生醫學領域入工程醫學學門，配合組織工程技術共同發展幹細胞於再生醫學之臨床前應用研究。

### 結語

幹細胞的醫療應用，對許多目前醫藥無法完全治癒的疾病，如：心臟衰竭、帕金森氏症、脊髓損傷或腦中風及糖尿病等，帶來一線曙光。成體幹細胞雖然分化能力非全能性，且較不易於體外長期培養增生，但因其可能自體取得，故現階段幹細胞移植之醫療應用，仍以成體幹細胞移植手術或臨床試驗為主，這些移植幹細胞的主要來源尚包括取自骨髓中之間葉幹細胞。另由於骨髓間葉幹細胞具有增殖、遷移、分化、轉分化、返位及分化可塑性等特性，非一般細胞所能輕易取代，且經證實具有分化成內、中及外胚層組織細胞的能力，未來間葉幹細胞極有可能取代現行移植後可能發生腫瘤爭議的胚胎幹細胞，而成為未來細胞療法與再生醫學的發展主流，作為對抗多種重大疾病的利器，而螢光豬的誕生則可望加速幹細胞於再生醫學的研究與應用。☞（本專題策畫／植微系林長平教授）

## 參考文獻：

- [1] Chen, W. H, H. Y. Liu, W. C. Lo, S. C. Wu, C. H. Chi, H. Y. Chang, S. H. Hsiao, C. H. Wu, W. T. Chiu, B. J. Chen, W. P. Deng. 2009. Intervertebral disc regeneration in an ex vivo culture system using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Biomaterials* 30(29):5523-33.
- [2] Dyce, P. W., L. H. Wen, and J. L. Li. 2006. *In vitro* germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nature cell Biol.* 8(4):384-390.
- [3] Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, and K. S. Lalykina. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3:393-403.
- [4] Hsiao, S. H., C. C. Cheng, S. Y. Peng, H. Y. Huang, W. S. Lian, M. L. Jan, Y. T. Fang, E. C. S. Cheng, K. H. Lee, W. T. K. Cheng, S.-P. Lin, and S. C. Wu. 2010. Isolation of therapeutically functional mouse bone marrow mesenchymal stem cells within 3 hours by an effective single-step plastic-adherent method. *Cell Proliferation* (in press)
- [5] Lin, C. J., P. H. Cheng, S. H. Hsiao, C. H. Cheng, Y. S. Lin, C. W. Liu, W. T. K. Cheng, and S. C. Wu. 2006. Generation and analysis of transgenic pigs harboring the green fluorescent protein. *Proceedings of the 12th Animal Science Congress, The Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. XIth AAAP Animal Science Congress 2006 Korea, C10-OP-07-1-3.*



吳信志與妻子和3位小壯丁在苗栗香格里拉樂園合影。

## 吳信志小檔案

2004年8月1日轉任臺大畜產系（今動物科學技術學系）助理教授。基於對基因轉殖及複製動物好奇及興趣，以過去累積之經驗，於2005年2月開始進行螢光豬之試驗，於同年10月獲得3頭綠色螢光豬，由此轉型切入成體幹細胞及再生醫學研究領域。2007年著手進行紅色螢光豬試驗，經多次嘗試，於該年底終於產下兩頭表現紅色螢光蛋白質之母豬，並開始繁衍其後代。承臺大邁向頂尖計畫案支持，讓研究室之幹細胞研究得以持續並擴展至校外合作，量產成果豐碩。