

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

## 間葉幹細胞分化作用分子調控機制之探討(2/3) 期中進度報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 95-2313-B-002-023-  
執行期間：95年08月01日至96年07月31日  
執行單位：國立臺灣大學動物科學技術學系暨研究所

計畫主持人：鄭登貴

處理方式：期中報告不提供公開查詢

中 華 民 國 96年05月30日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ☐ 成果報告  
☒ 期中進度報告

間葉幹細胞分化作用分子調控機制之探討

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：NSC 94-2313-B-002-044-

執行期間：95 年 8 月 1 日 至 96 年 7 月 31 日

計畫主持人：鄭登貴

共同主持人：

計畫參與人員：蕭士翔

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：☒ 精簡報告 ☐ 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- ☐ 赴國外出差或研習心得報告一份
- ☐ 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- ☐ 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- ☐ 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

☐ 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：國立臺灣大學動物科學技術學系暨研究所

中 華 民 國 96 年 5 月 30 日

## 目 錄

|               |   |
|---------------|---|
| 一、緣由與目的.....  | 3 |
| 二、材料與方法.....  | 3 |
| 三、結果與討論.....  | 4 |
| 四、計畫成果自評..... | 4 |
| 五、參考文獻.....   | 5 |

## 一、緣由與目的

成體幹細胞普遍存在於各組織器官，它們透過取代失去生理活性、或者老化與受損細胞途徑來維持組織器官內的原狀恆定(homeostasis)。目前發現主要包括：造血幹細胞(hematopoietic stem cells)、間葉幹細胞(mesenchymal stem cells)、表皮幹細胞(epidermal stem cells)、肝臟幹細胞(hepatic stem cells)與神經幹細胞(neuron stem cells)等成體幹細胞(Barry, 2003)，其中造血幹細胞在細胞治療方面已成功應用於臨床研究，為幹細胞治療的典型範例，而目前研究另一類較多的幹細胞為間葉幹細胞；間葉幹細胞可分離自骨髓、臍帶、肌肉、脂肪與皮膚等基質組織，其中以骨髓分離之間葉幹細胞最為常見；彼等幹細胞在適當的環境條件下，可經由移植或體外培養與特殊分化因子之刺激分化誘導形成軟骨細胞(chondrocyte)、成骨細胞(osteoblast)、脂肪細胞(adipocyte)與肌肉細胞(myocyte)等間葉系細胞(mesenchymal cells)，這些細胞的分化能力亦受限於不同的分離方式(Pountos and Peter, 2005)。在骨髓顯微環境(microenvironment)中，間葉幹細胞扮演的角色在於維持造血系統的穩定狀態(steady-state)，其藉由表達大量的細胞黏著分子(cellular adhesion molecule)與細胞外基質(extracellular matrix)，直接與造血細胞受體蛋白參與反應，進一步維持造血組織生理功能與修復之正常機制(Majumdar *et al.*, 2003)。誠屬遺憾者，乃科學家迄未針對間葉幹細胞成功開發任何單一分子標幟，可以有效提供鑑定間葉幹細胞之使用；目前已知之若干細胞表面的分子標幟多半不具有專一性，而係同時具有間葉系細胞、上皮細胞與內皮細胞的特性，例如：間葉幹細胞對SB-10、SH-2、SH-3、SH-4、CD29、CD44、CD71、CD90、CD106、CD120a、CD124 的表現為陽性，而CD1a、CD31、CD34、CD14、CD45、CD56、

ESA 的表現則為陰性(Conget and Minguell, 1999; Pittenger *et al.*, 1999)，因此進一步利用彼等細胞表面抗原表現形象(profile)特性，可作為間葉幹細胞鑑別之有效依據。除此之外，間葉幹細胞亦具有免疫調節功能；應用流式細胞儀分析結果顯示，間葉幹細胞不表達主要組織相容複合物第二類(major histocompatibility complex class II, MHC class II)，並抑制同種異體T細胞與樹狀突細胞之增殖與專一性免疫辨識(Ryan *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2005)。再者，間葉幹細胞可抑制同種異體B細胞增殖與免疫球蛋白之產生，包括：IgM、IgG與IgA (Corcione *et al.*, 2006)。由此可知，間葉幹細胞本身可能發展一套特殊之免疫調節機制繼而避免由宿主產生之專一性免疫辨識；彼等生物學特性亦使間葉幹細胞在同種異體移植治療的研究上極具應用價值。職是之故，本年度研究之目的旨在建立一穩定之小鼠骨髓間葉幹細胞體外培養系統，亦擬透過端粒反轉錄酶基因轉染方式，令間葉幹細胞不朽化(immortalized)，並進一步應用cDNA 微陣列分析系統，就分子層次探討間葉幹細胞於分化前、後之基因體表現的差異性。透過本計畫之執行完成，未來並進一步對其分化作用相關分子調控機制將有更詳實深入之瞭解。此等研究成果，除有助於國人在哺乳動物分子發生學領域研究水平之邁向卓越外，且可為未來以豬做為動物模式，提供進行臨床前細胞治療、基因治療或組織工程用途等相關研究，奠定穩固基礎。

## 二、材料與方法

### 1. mBMMSCs分化前後之基因體功能分析

#### a. RNA抽取：

將純化之間葉幹細胞分別進行形成骨細胞、軟骨細胞與脂肪細胞之誘導分化，並獲得分化前、後之樣品處理，每個處理各三重

覆。對照組、脂肪與硬骨細胞之處理以Trizol處理，將萃取物保存在-80°C。軟骨細胞以團塊(aggregate)方式進行分化處理，每一團塊約有 $2.5 \times 10^5$  cells，因此直接將分化後之團塊於液態氮中磨碎，進行RNA抽取。

#### b. 基因表現差異性分析：

Whole Mouse Genome Oligo Chip晶片反應與晶片數值分析皆由威健生技公司(Welgene Biotech Co.)進行。

### 2. 不朽化mBMMSCs細胞株之建立

1.) 小鼠骨髓間葉幹細胞之分離純化：將小鼠骨髓細胞以 $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 密度接種，96小時後更換培養基，再繼續培養3-5天，待細胞生長融合(confluence)後，以1：2比例進行繼代(subculture)，同時改以生長培養基( $\alpha$ -MEM with 10% FBS and 10ng/ml bFGF)繼續培養；取第三代以後的細胞群體，利用CD44、Sca-1與c-kit為標的分子，進一步經應用流式細胞儀檢測，確認其間葉幹細胞之純度超過90%以上者，始克提供進行後續試驗之使用。

2.) 透過表達hTERT載體之構築，再轉染初代業經純化的間葉幹細胞使其不朽化。

3.) 轉染細胞株之製備：將前述之間葉幹細胞，置於96孔培養盤中培養24小時，待細胞完整貼附後，更換轉染培養液(1 ug hTERT, 0.3% LF2000與2%血清)，並繼續培養48小時，待轉染完畢後，更換為新鮮培養液繼續培養，直到細胞群落形成為止；其後再將群落予以分離，並進行體外培養增殖。

4.) 彼等增殖之細胞株，再以脂肪、硬骨與軟骨細胞培養液進行分化處理，俾確認其分化潛能之完整性。

### 三、結果與討論

#### 1. mBMMSCs分化前後之基因體功能分析

mBMMSCs於分化前後之基因體功能分析，包括總RNA之抽取、Whole Mouse Genome Oligo Chip晶片反應與晶片數值分析皆由威健生技公司(Welgene Biotech Co.)進行。初步結果顯示，彼等抽取各處理之總RNA完整度均為標準(RIN值 $\geq 7$ )，然軟骨分化處理組之18S/28S比例仍低於標準(表1、圖1)，推測可能是收限於該處理之細胞需以團塊方式進行培養( $2.5 \times 10^5/\text{pellet}$ )；因此，於樣品收集時，需以研磨方式進行總RNA抽取。唯彼等分化處理之樣品數目仍須放大，俾以同批次之細胞進行晶片分析，冀能獲得最佳化品質之晶片實驗結果。

### 2. 不朽化mBMMSCs細胞株之建立

鑑於許多研究指出，長期培養之骨髓間葉幹細胞會隨著培養代數增加而逐漸衰老，繼而喪失其再生與分化之能力，為了進一步獲得一能長期維持正常間葉幹細胞生物學功能的表現模型，除了建立穩定的間葉幹細胞體外培養系統，作為分化作用分子機制之研究基礎；另一部分則藉由建立之間葉幹細胞，以端粒反轉錄酶基因轉染方式，同時建立一不朽化間葉幹細胞株，以作為長期研究之有用工具。研究結果顯示，彼等業經hTERT載體轉染之mBMMSCs株可於體外連續培養超過40 PDs，彼等株化之細胞呈現穩定之間葉幹細胞型態，細胞之倍增時間、生長速度與細胞型態並無明顯改變(表2)。以分化培養基經行誘導分化後，均可順利分化形成脂肪、硬骨與軟骨細胞(圖2)，其顯示株化後之mBMMSCs可於體外長期培養並保留其複分化潛能之特性。

### 四、計畫成果自評

本試驗自小鼠骨髓分離純化其間葉幹細胞，並送交安捷倫公司進行 whole mouse genome oligo microarray 分析，繼而檢測mBMMSCs於分化前、後基因體表現形象之

差異性。試驗結果顯示，送交各處理樣品之 RNA QC 均為標準，唯軟骨分化處理組樣品均為細胞團塊，需以研磨方式進行總 RNA 抽取，藉以獲得足量之總 RNA，唯該部分需以同批次樣品送交分析，俾能獲得最佳化品質之晶片分析結果。此外，本試驗成功以端粒反轉錄酶(hTERT)基因轉染方式，建立不朽化 mBMMSCs，彼等株化 mBMMSCs 可於體外連續培養超過 40 PDs，其生長速度與細胞型態並無明顯改變，並保留其複分化潛能特性包括脂肪細胞、硬骨細胞與軟骨細胞之分化，為一穩定之間葉幹細胞株，該部份已達成預期目標。

## 五、參考文獻

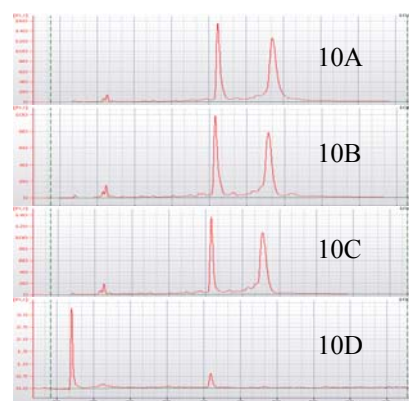
1. Barry F. P. 2003. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res.* 69:250-256.
2. Conget P.A., and J. J. Minguell. 1999. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Phys.* 181: 67-73.
3. Corcione, A., F. Benvenuto, E. Ferretti, D. Giunti, V. Cappiello, F. Cazzanti, M. Risso, F. Gualandi, G. L. Mancardi, V. Pistoia, and A. Uccelli. 2006. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107:367-372.
4. Jiang, X. X., Y. Zhang, B. Liu, S. X. Zhang, Y. Wu, X. D. Yu, and N. Mao. 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105:4120-4126.
5. Pittenger F., A. Mackay, S. Beck et al. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284: 143-147.
6. Pount, I, and Peter V. G. 2005 Biology of mesenchymal stem cells. *Int. J. Care Injured.*

36S:S8-S12.

7. Majumdar M. K., M. Keane-Moore, D. Buyaner, W. B. Hardy, M. A. Moorman, K. R. McIntosh, and J. D. Mosca. 2003. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Sci.* 10: 228-241.
8. Ryan, J. M., F. P. Barry, J. M. Murphy, and B. P. Mahon. 2005. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J. Inflamm.* 26:1-11.

**表 1. 分化前後 mBMMSCs 之 RNA QC 結果。**  
**10A：對照組，10B 脂肪分化處理組，10C：硬骨分化處理組，10D：軟骨分化處理組。**

| Sample name | RNA conc. (ug/ $\mu$ l) | RNA Quantity ( $\mu$ g) | OD260/280 Ratio | 28S/18S Ratio | RIN |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-----------------|---------------|-----|
| 10A         | 0.03753                 | 1.1259                  | 1.82            | 1.2           | 9.6 |
| 10B         | 0.04908                 | 1.4724                  | 1.67            | 1.1           | 9.3 |
| 10C         | 0.07201                 | 2.1603                  | 1.76            | 1.4           | 9.4 |
| 10D         | 0.03789                 | 1.1367                  | 1.51            | 0             | 7.3 |



**圖 1. 分化前後 mBMMSCs 之 Bioanalyzer chip gel like 結果。**  
**10A：對照組，10B 脂肪分化處理組，10C：硬骨分化處理組，10D：軟骨分化處理組。**

表 2. hTERT-mBMMSCs 於不同代數培養之二倍時間。

| Passage no. | Population doubling (hours) |
|-------------|-----------------------------|
| 5           | $25.68 \pm 0.55$            |
| 10          | $26.71 \pm 2.72$            |
| 15          | $28.32 \pm 3.31$            |
| 20          | $24.15 \pm 2.38$            |

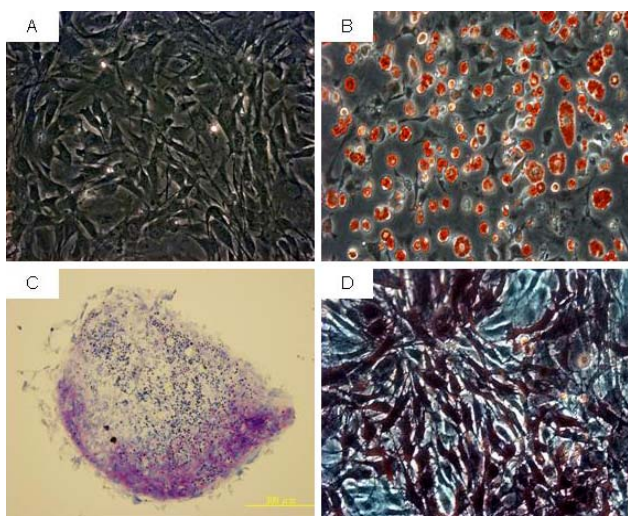


圖 2. hTERT-mBMMSCs (A)；經脂肪細胞分化誘導後，其分化之脂肪油滴可為油紅染成紅色(B)；細胞團塊經軟骨分化誘導後，細胞外基質累積之蛋白多糖可為 toluidine blue 異染(metachromatic staining)成紫色(C)；經成骨分化誘導後，鹼性磷酸酶之活性可為 BCIP/NBT 基質染成暗灰色(D)。