

國立臺灣大學

生物資源暨農學院動物科學技術學系

碩士論文

Department of Animal Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

安樂死後犬骨髓與骨骺間葉幹細胞之特性分析

The characteristics of bone marrow and epiphysis-derived
mesenchymal stem cells from canine body donation after
euthanasia

許慈宇

Tzu-Yu Hsu

指導教授：劉逸軒 博士

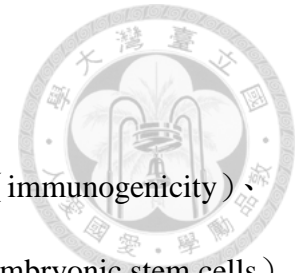
Advisor: I-Hsuan Liu, D.V.M., Ph.D.

中華民國 103 年 3 月

March, 2014




中文摘要



由於間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells) 之低免疫源性 (immunogenicity)、低癌化風險 (tumorigenic risk) 及取得容易, 因此較胚胎幹細胞 (embryonic stem cells) 來得適合應用於臨床細胞療法。本試驗將探討由安樂死後犬隻大體取得兩種不同來源之成體間葉幹細胞, 以建立一套流程能有效率擴展並維持幹細胞庫存以供學術研究、人類臨床前研究及伴侶動物臨床應用所需。

從安樂死捐贈大體所取得之骨髓液, 經由密度梯度離心後, 可將骨髓液內之單核細胞群 (mononuclear cells) 分離出, 並於培養期間利用更換新鮮培養液之方式, 即可得到具貼附性之單核細胞群。骨髓間葉幹細胞之分離, 則是以骨髓端海綿骨組織剪碎後, 未經任何酵素作用即可直接培養於培養皿中。對本試驗所分離之單核細胞群進行定性分析, 可發現此單核細胞群能行體外分化成硬骨細胞、脂肪細胞及軟骨細胞, 並經由流式細胞儀分析其表面抗原呈現間葉幹細胞特性 ($CD44^+$, $CD90^+$, $CD34^-$, $CD45R^-$), 證實其為間葉幹細胞。

為了確認間葉幹細胞其捐贈個體之年齡與繼代次數對細胞特性是否造成影響, 利用群落形成單位 (colony-forming unit) 代表分離效率 (isolation efficiency)、細胞倍增時間 (population doubling time, PDT) 表示增殖能力 (proliferation ability)、分化潛能 (differentiation potential) 代表細胞幹性 (stemness)、並調查表面抗原特性是否穩定。並且檢測趨化因子配體 5 (Chemokine ligand 5, CCL5) 表現量以判定內源性腫瘤轉移之風險。結果顯示, 捐贈個體年齡 (老年與幼年) 與採集部位 (肱骨及股骨) 並不影響安樂死後犬骨髓間葉幹細胞之分離效率與增殖能力, 而細胞幹性亦不受個體年齡影響。無論個體年齡差異, 隨著繼代數增加則細胞增殖速率

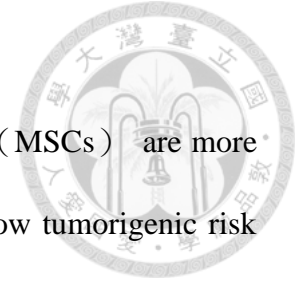


沒有明顯差異且表面抗原向性維持恆定，惟 CD44 陽性細胞比例於第 12 代 (passage 12, P12) 顯著較第四代 (passage 4, P4) 升高；已知 CD44 與細胞癌化有關，故此結果暗示 P12 之骨髓間葉幹細胞致癌率可能較高。而老年組之群落形成能力於 P12 相較於 P4 與 P8 則有顯著下降，暗示 P12 細胞轉化程度較高，因此其幹細胞特性降低。

綜合上述，以本試驗之分離法能成功取得安樂死後犬之間葉幹細胞，因此大體捐贈可成為另一項成體幹細胞供應來源，且分離效率與細胞增殖速率不受限於個體年齡及採集位置。以幹細胞特性分析，幼年個體與老年個體之骨髓間葉幹細胞其分化能力沒有差異。另一方面，隨著繼代數增加，其間葉幹細胞之癌化風險亦有可能增加。

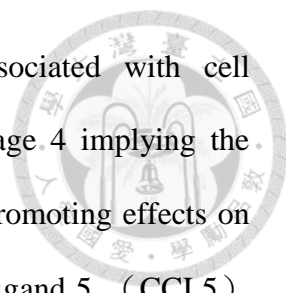
關鍵字：安樂死、犬、狗、骨髓間葉幹細胞、骨骺間葉幹細胞

ABSTRACT



Compared to embryonic stem cells, mesenchymal stem cells (MSCs) are more suitable for clinical cell therapy due to the low immunogenicity, low tumorigenic risk and better accessibility. In this study, two kinds of MSCs with different anatomical origins from canine body donations after euthanasia were investigated, aiming to establish a procedure to effectively expand and maintain the stem cell inventory for the potential clinical applications.

The cells from aspirated bone marrow were separated by density gradient centrifugation. Mononuclear cells were harvested from plasma interface and seeded in culture dish, while non-attached cells were removed by changing medium. Epiphysis-derived mesenchymal stem cells (EMSCs) can be harvested from epiphysis by directly culturing in dish without enzymatic digestion. In confirming that the cells isolated from the body donors are MSCs, the isolated cells were successfully induced differentiation into three lineages: osteocytes, adipocytes and chondrocytes. The flow cytometry of the surface markers showed consistent profiles as MSCs markers (CD44⁺, CD90⁺, CD34⁻, CD45R⁻). To elucidate the influence of age and anatomical origins on the harvest of MSCs, we collected MSCs from both humerus and femur with different ages. No difference in the numbers of colony-forming units (CFUs) as well as population doubling time between two anatomical locations and two age groups indicated that these factors do not affect the harvest efficiency of BMMSCs. Several tri-lineage marker genes were investigated by qPCR to assess the tri-lineage differentiation between age groups and no significant difference is detected. However, in old group, the number of CFUs in P12 is significantly decreased compared to P1 and P4 implying the clonogenicity is losing through passage. Among the surface markers, a



higher percentage of positive cells of CD44, which was associated with cell transformation, can be observed in passage 12 compared to passage 4 implying the higher tumorigenic risk in P12. To evaluate the potential tumor promoting effects on endogenous tumors in the recipients, the expression of chemokine ligand 5 (CCL5) was detected by qPCR, and there is no difference in the expression of CCL5 between age groups and various passages.


In summary, we successfully purified BMMSCs and EMSCs from canine after euthanasia in animal hospital and shelter. Our results indicated that age and anatomical origin do not affect the isolation efficiency, cell proliferations and potential of tri-lineage differentiation in MSCs. For clinical application, more studies such as nude mice inoculation are needed to confirm the tumorigenic risk of MSCs in the future. Furthermore, pathogen screening methods and profiles will be established as part of the cell donation protocol.

Key words: euthanasia, canine, bone marrow-derived mesenchymal stem cells, epiphysis-derived mesenchymal stem cells

目次



口試委員會審定書	
中文摘要	2
ABSTRACT	4
目次	6
圖次	8
表次	9
第 1 章 前言	10
1.1 幹細胞	10
1.1.1 間葉幹細胞	11
1.1.2 骨髓間葉幹細胞	13
1.1.3 骨髓間葉幹細胞	14
1.2 犬間葉幹細胞之研究進展	17
1.2.1 表面抗原分析	17
1.2.2 犬間葉幹細胞臨床應用之可行性	18
第 2 章 試驗目的	20
第 3 章 試驗研究	22
3.1 材料與方法	22
3.1.1 實驗動物	22
3.1.2 分組	22
3.1.3 安樂死後犬間葉幹細胞之建立與定性分析	23



3.1.4	流式細胞儀分析.....	25
3.1.5	細胞三系分化之體外誘導及分析.....	27
3.1.6	總核糖核酸抽取.....	28
3.1.7	反轉錄反應.....	28
3.1.8	即時定量聚合酶連鎖反應.....	29
3.1.9	群落形成能力分析.....	30
3.1.10	噻唑藍比色法.....	31
3.2	試驗結果.....	33
3.2.1	安樂死後犬骨髓間葉幹細胞之建立與定性分析.....	33
3.2.2	個體年齡差異與其骨髓間葉幹細胞特性之探討.....	39
3.2.3	安樂死後犬骨髓間葉幹細胞之建立與特性比較.....	48
第 4 章	討論.....	55
第 5 章	結論.....	59
第 6 章	未來展望.....	60
REFERENCES	61

圖次



圖 1 安樂死後犬隻群組依據之牙齒示意圖。	23
圖 2 吉姆薩染色分析之群落形成單位。	31
圖 3 安樂死後犬隻骨髓間葉幹細胞分離法流程圖。	34
圖 4 安樂死後犬骨髓間葉幹細胞之表面抗原分析。	36
圖 5 三系細胞分化之染色結果。	38
圖 6 安樂死後犬骨髓間葉幹細胞之群落形成能力。	40
圖 7 安樂死後犬骨髓間葉幹細胞之增殖能力。	42
圖 8 個體年齡與繼代數對表面抗原分布之影響。	44
圖 9 不同個體年齡之 cBMMSCs 其三系細胞分化標記基因表現量。	46
圖 10 不同年齡與繼代數其 CCL5 相對表現量之分析。	47
圖 11 安樂死後犬隻骨髓與骨髓間葉幹細胞分離法與細胞型態之比較。	51
圖 12 安樂死後犬骨髓間葉幹細胞之表面抗原分析。	52
圖 13 安樂死後犬骨髓間葉幹細胞之群落形成能力。	53
圖 14 犬骨髓與骨髓間葉幹細胞之生長能力比較。	54

表次



表 1 細胞表面抗原分析之抗體項目表	26
表 2 細胞表面抗原分析之同型抗體項目表	26
表 3 三系細胞分化液之配方表	28
表 4 qPCR 引子序列表	30
表 5 MTT 比色法之標準曲線接種示意表。	32
表 6 醫院捐贈大體採集紀錄。	48
表 7 收容所大體採集紀錄。	49

第1章 前言

1.1 幹細胞

幹細胞 (stem cells) 可泛稱一群尚未分化的細胞，依其來源可定義為胚胎幹細胞 (embryonic stem cells) 與成體幹細胞 (adult stem cells)。其中胚胎幹細胞是由胚胎發育至囊胚 (blastocyst) 期間之內質細胞群 (inner cell mass) 經體外培養而來，其可分化為構築成胎兒的所有細胞，又稱多能幹細胞 (pluripotent stem cells)。而成體幹細胞可由多種組織器官分離出來，其可依分化為多種、少數幾種或單一細胞，又稱之複能幹細胞 (multipotent stem cells)、寡能幹細胞 (oligopotent stem cells) 及單能幹細胞 (unipotent stem cells)。

這些具分化潛力的細胞群可於體內或體外經由生化與物理刺激 (Caplan, 1991; Caplan and Bruder, 2001) 而產生對稱分裂 (symmetric cell division) 行自我更新之能力，以維持幹細胞幹性 (stemness)，或產生不對稱分裂 (asymmetric cell division) 以形成一個或兩個特化細胞 (specialized cells)。

除了胚胎幹細胞存有道德考量 (ethical considerations) 而在學術研究上處處受限外，研究累積至今，已發現多能性幹細胞之分子生物機制有部分與腫瘤細胞相同 (Ben-Porath et al., 2008; Chiou et al., 2008; Sperger et al., 2003; Wong et al., 2008)，暗示了啟動多能性分化的同時亦有可能誘發腫瘤細胞之生成 (Knoepfler, 2009)。相較之下，成體幹細胞更適合於再生醫學及細胞療法研究。

成體幹細胞之所以廣泛存在於多種組織器官內，如：周邊血 (peripheral blood) (Till and McCulloch, 1980)、骨髓 (bone marrow) (Caplan, 1991)、肌肉 (muscle) (Williams et al., 1999)、脂肪組織 (adipose tissue) (Wickham et al., 2003; Zuk et al.,




2001)、甚至是神經系統 (nervous system) (Alexanian and Sieber-Blum, 2003; Bottai et al., 2003; Goh et al., 2003)等, 是由於生物體的一生中, 細胞不斷地老化則需更新、損壞亦須再生, 直至生命終止, 因此需要各種不同類群之成體幹細胞以供應組織器官內細胞汰換所需。

長久以來, 成體幹細胞一直被認定其僅能分化為少數幾種或是單一種細胞, 直到近年來研究發現, 某些特定來源之成體幹細胞除了能分化為預期的細胞外, 甚至能分化為其他系之組織細胞, 如: 造血幹細胞 (hematopoietic stem cells; HSCs) 除了能分化成血球細胞 (blood cells) 外, 尚可分化成肝臟卵母細胞 (hepatic oval cells) (Petersen et al., 1999); 神經幹細胞 (neural stem cells) 亦可分化為造血前驅細胞 (hematopoietic progenitors) (Bjornson et al., 1999), 證實了成體幹細胞於不同組織內仍保留一部分幹細胞仍具有複能性分化能力, 而間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 即為其中之一。

1.1.1 間葉幹細胞

間葉幹細胞於 1970 年首次被 Friedenstein 等人於骨髓中所發現 (Friedenstein et al., 1970), 為一具塑料貼附性 (plastic-attached) 且能自行分裂增生的細胞群, 並具有群落形成能力 (clonogenicity)。研究至今, 間葉幹細胞已被證實廣泛存在於臍帶血 (umbilical cord blood) (Erices et al., 2000)、羊水 (amniotic fluid) (In 't Anker et al., 2003)、牙髓 (dental pulp) (Gronthos et al., 2000)、脂肪組織 (adipose tissue) (Zuk et al., 2001)、胎肺 (fetal lung) (Fan et al., 2005)、胎肝 (fetal liver) (Campagnoli et al., 2001)、骨骼肌 (skeletal muscle) (Williams et al., 1999) 等其他成體組織中。

由於間葉幹細胞來源廣泛, 細胞分離方式與體外培養條件各有不同, 因此, 間



葉幹細胞的定義始終模糊並無一致性。直到 2006 年 Dominici 等人歸納出人類間葉幹細胞最主要需符合三個條件：(1)此單核細胞群具有貼附性(plastic-attached)，且可以細胞培養液於體外穩定培養；(2)其細胞表面需表現特殊抗原，以流式細胞分析法(flow cytometry)定量其細胞群於 CD105、CD73、CD90 呈陽性(positive, $\geq 95\%$)，且 CD34、CD45、CD11b 或 CD14、CD19 或 CD79a、HLA class II 呈陰性(negative, $\leq 2\%$)；(3)並具有體外誘導分化成硬骨細胞、脂肪細胞與軟骨細胞之能力(Dominici et al., 2006; Pittenger et al., 1999)。

此細胞群須以細胞培養液貼附性培養於培養皿中，並能保持細胞型態(morphology)穩定生長直至繼代或冷凍保存(Colter et al., 2000; Jiang et al., 2007)。根據表面抗原(surface antigen)之呈現，能快速並有效地辨識此單核細胞群，而研究至今尚無一間葉幹細胞特定標誌(specific marker)，因此需要一系列特殊抗原以茲證明，其中 CD105、CD73、CD90 與細胞貼附性有關，呈陽性；由於血球系細胞亦有貼附培養的可能，因此需確認部分特定抗原為陰性，其中 CD34 為造血幹細胞與內皮細胞標誌，CD45 為白血球標誌、CD11b 與 CD14 為單核球及巨噬細胞標誌、CD19 與 CD79a 為 B 細胞標誌。而人類白血球抗原二型(human leukocyte antigen class II, HLA class II)之表現與否與干擾素- γ (Interferon gamma, IFN- γ)是否存在有關，可用以判定間葉幹細胞是否受到干擾素刺激而表現 HLA class II。依據不同物種及來源，其表面抗原表現亦有所不同，因此，特殊抗原群的選擇彈性需要更多研究以茲佐證。此外，間葉幹細胞之三系細胞分化已被廣泛研究，其中包含體外誘導分化條件及檢定方式都有完整定義，因此會以三系細胞分化能力為間葉幹細胞所具備之基本幹性表現(Dominici et al., 2006)。


除了基本的三系細胞分化能力，已知在特定培養條件下，間葉幹細胞亦可分化

成類似肝細胞 (hepatocyte) (Schwartz et al., 2002)、胰島 (pancreatic islet) (Tang et al., 2004)、神經細胞 (neural cell) (Kopen et al., 1999a; Munoz-Elias et al., 2004)、皮脂腺導管細胞 (sebaceous duct cell) (Fu et al., 2006)及腎小管細胞 (renal tubular cell) (Morigi et al., 2004)等內胚層及外胚層系細胞形態及功能性，因此對組織損傷之修復有治療效果。

概觀成體幹細胞治療疾病模式動物之研究，常以骨髓與脂肪組織來源之間葉幹細胞為研究對象，乃因其組織採集容易、具可恢復性，不易影響捐贈者健康；另外，此二種來源之間葉幹細胞數量比例上較大於其他成體組織，體外培養後可於相同時間內取得相對多量之細胞，則較易達成在短時間內細胞移植需求。

1.1.2 骨髓間葉幹細胞

由骨髓而來之幹細胞主要可分為造血幹細胞 (hematopoietic stem cells; HSCs) 及間葉幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMMSCs)，前者能分化成所有血球系細胞，而後者能分化成構成造血微環境 (hematopoietic microenvironment) 之所有細胞，如：類血管平滑肌基質細胞 (vascular smooth muscle-like stromal cells) (Dezawa et al., 2005; Fujita et al., 2004)、成骨細胞 (osteoblasts)、脂肪細胞 (adipocyte) 及內皮細胞 (endothelial cells) (Oswald et al., 2004)。不僅如此，BMMSCs 尚可進行其他細胞之分化，包括源自中胚層 (mesoderm) 之軟骨細胞與心肌 (cardiac) 及骨骼肌細胞 (skeletal muscle cells)；神經外胚層 (neuroectoderm) 之神經元 (neuron)、星狀膠細胞 (astrocytes) 及寡樹突膠細胞 (oligodendrocytes) (Kopen et al., 1999b; Sanchez-Ramos et al., 2000)；內胚層之肝細胞 (hepatocytes) (Chagraoui et al., 2003; Chivu et al., 2009)。




相較於骨髓間葉幹細胞，造血幹細胞之移植已於 30 多年前應用於高劑量化療法或放射線療法後之造血功能恢復(Thomas, 1982)。而骨髓間葉幹細胞之研究仍處於臨床前及臨床試驗階段，已知於骨骼、肝臟、神經、心血管、免疫系統等不同器官及組織功能缺失皆具有治療效果(Hughey et al., 2012; Jung et al., 2009; Kanazawa et al., 2011; Ozawa et al., 2011; Shimer et al., 2005)。且已有研究證實骨髓間葉幹細胞與造血幹細胞共同移植至癌症病患有助於其造血功能之重建(Koc et al., 2000)。

骨髓間葉幹細胞於自體、異體移植研究上能產生治療效果，除了在於其能正確返回 (homing) 至骨髓內(Devine et al., 2001; Wynn et al., 2004)或遷移 (migrating) 至損傷部位(Herrera et al., 2007; Mahmood et al., 2003; Orlic et al., 2001)，藉由分化或分泌滋養因子以幫助組織修復或再生外，尚可分泌多種細胞因子以抑制宿主免疫系統，紓解發炎反應以減輕損傷程度(Aggarwal and Pittenger, 2005b; Bi et al., 2007; Di Nicola et al., 2002; Raffaghello et al., 2008)。

1.1.3 骨髓間葉幹細胞

在 2008 年 Uccelli 等人提及骨髓中的骨小樑 (trabecular bone) 乃造血微環境之所在，已被證實將骨髓間葉幹細胞移入骨髓腔內，可於體內分化為週細胞 (pericytes)、肌纖維細胞 (myofibroblasts)、骨髓間質細胞 (bone marrow stromal cells)、硬骨細胞 (osteocytes) 及內皮細胞等構成造血微環境的細胞，以支持造血功能(Muguruma et al., 2006)。此造血微環境可分為兩種不同意義之微小環境 (niches)，其中骨內微小環境 (endosteal niches) 存在於骨小樑骨內表面，主要在於維持造血幹細胞自我更新，並保持一定數量於細胞靜止期 (G0 phase)，避免造



血幹細胞分化(Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003)；而血管微小環境 (vascular niches) 存在於血竇 (sinusoids)，主要在於維持造血幹細胞增殖，並分化進入血液中(Kiel and Morrison, 2008; Mitsiadis et al., 2007; Sacchetti et al., 2007; Wilson and Trumpp, 2006)。而支撐此二種微小環境所需之間葉細胞，即由骨髓間葉幹細胞分化增生而形成。因此，骨髓間葉幹細胞在造血微環境中亦有不同分化需求以維持兩種作用不盡相同之微小環境，暗示骨髓間葉幹細胞可能會因體內所在之原始位置不同，導致其細胞幹性有所差別。此外，間葉幹細胞之細胞分裂屬於不對稱分裂，每當經過一次細胞周期便產生一個或兩個特化的子代細胞，一旦處於長時間體外培養，維持原有幹性之間葉幹細胞數量便大幅下降，以至於影響細胞增殖能力與分化能力，甚至出現多核等不正常細胞型態即屬於細胞衰老。因此，尚有研究嘗試由密質骨 (compact bone) (Short et al., 2003; Zhu et al., 2010)與骨小梁 (Sakaguchi et al., 2004; Song et al., 2005)等分離出間葉幹細胞以克服血球系細胞污染及細胞老化的問題。

骨骺間葉幹細胞 (epiphysis-derived mesenchymal stem cells; EMSCs) 於 2012 年被分離，鄭等人發現從小鼠脛骨 (tibia) 及股骨 (femurs) 骨骺處，不用任何酵素消化作用 (enzymatic digestion)，直接進行體外培養，即可分離出此新型間葉幹細胞群。該研究指出，相較於小鼠骨髓間葉幹細胞，其有相似之表面抗原特性、較優異之群落形成 (clonogenic formation)、細胞增殖 (cell proliferation) 效率及分化能力、且保有細胞貼附性、免疫抑制 (immunosuppression) 與抗發炎 (anti-inflammatory) 之間葉幹細胞固有特性，並在小鼠模式上：骨折 (bone fracture)、皮膚及後肢缺血性組織損傷 (ischemic tissue damage)，經由皮內 (intradermal) 及肌內 (intramuscular) 注射細胞，能有效促進骨再生修復與血管新生以降低壞死區

域，且皆具有優於骨髓間葉幹細胞之治療及減緩損傷的效果 (Cheng et al., 2012)。






1.2 犬間葉幹細胞之研究進展

犬間葉幹細胞於 1997 年第一次由 Kadiyala 等人於骨髓中分離出來(Kadiyala et al., 1997)。近十幾年來，犬間葉幹細胞之研究如火如荼展開，除了骨髓外，亦可從脂肪(Neupane et al., 2008)、肌肉、骨膜(periosteum)(Kisiel et al., 2012)、牙周膜(periodontal ligament)(Wang et al., 2012)、臍靜脈(umbilical cord vein)(Zucconi et al., 2010)、臍帶血(umbilical cord blood)(Kang et al., 2012)、Wharton's jelly(Seo et al., 2012)、羊膜(amniotic membrane)(Park et al., 2012)、羊水(amniotic fluid)、臍帶基質(umbilical cord matrix)(Filioli Uranio et al., 2011)、胎犬之卵黃囊(yolk sac)以及肝臟(liver)(Wenceslau et al., 2011)發現間葉幹細胞之存在。其除了能分化為脂肪細胞、硬骨細胞、軟骨細胞外，尚有分化為類肝臟細胞(hepatocyte-like cell)(Choi et al., 2012)、血管上皮細胞(vascular endothelial cell)(Li et al., 2007)，亦有神經分化(neural differentiation)的潛能(Park et al., 2012)。由此可知，相較於人類、小鼠，犬間葉幹細胞亦具有複能性分化能力，因此犬間葉幹細胞有潛力推動伴侶動物再生醫學及細胞療法研究進程。

1.2.1 表面抗原分析

就細胞表面抗原(cell surface antigen)而言，常用以定義 MSCs 之抗原中，CD44 與 stro-1 呈陽性(positive)；而 HSCs 之抗原 CD34 與 CD45 則呈陰性(negative)，結合兩種特定抗原之分析，可以避免造血幹細胞之污染(Dominici et al., 2006)。

至於其他 MSCs 之標誌性抗原，如 CD73、CD90、CD105、CD146 常呈陽性者，於犬間葉幹細胞系群(canine mesenchymal stem cells, cMSCs)中並無專一性，例如 CD90 與 CD105 有呈現陽性與陰性之可能；CD73 於人類間葉幹細胞為一典型陽




性抗原，於 cMSCs 則可能為陰性(Kamishina et al., 2006; Oh et al., 2011; Seo et al., 2009); CD146 於小鼠及人類間葉幹細胞之陽性標誌抗原，於 cMSCs 則可能為陰性(Kisiel et al., 2012)，且犬造血幹細胞系群其 CD90 亦有呈陽性之可能(Lamerato-Kozicki et al., 2006)。

而不同來源之犬間葉幹細胞其細胞表面抗原特性亦有可能不同，由 Vieira 等人及 Oh 等人由脂肪所分離之間葉幹細胞，其 CD34 呈陽性 (Oh et al., 2011; Vieira et al., 2010)。從其他組織所分離之間葉幹細胞，如骨髓、羊水、羊膜等，CD34 則呈陰性(Oh et al., 2011; Vieira et al., 2010)。綜合前人研究結果可知，犬間葉幹細胞之表面抗原特性尚未歸納成一明確之定義，故犬間葉幹細胞之標誌抗原分析可能須以來源分類並經由多方考證。

1.2.2 犬間葉幹細胞臨床應用之可行性

幹細胞療法中，常以自體幹細胞移植作為優先考量，卻有因免疫缺陷疾病、損傷嚴重程度與治療時效等因素，須使用異體幹細胞移植以彌補幹細胞本身之缺陷或數量不足。間葉幹細胞移植於臨床應用能產生功效之主要原因在於其重建胞外基質 (extracellular matrix)，並藉由分泌滋養因子 (trophic factors) 及趨化因子 (chemokines)，直接或間接刺激宿主細胞之增生及修復作用(Caplan and Dennis, 2006)。有研究指出，間葉幹細胞可經由分泌基質金屬蛋白酶 (Matrix Metalloproteinases, MMPs) 改變損傷微環境，避免受損組織累積過多生長抑制因子，以利於細胞自行修復及更生(Mias et al., 2009; Won et al., 2007)。更勝於此，其尚能經由表面抗原直接接觸或間接分泌趨化因子抑制免疫細胞增生與活化，以降低免疫反應所帶來之炎症與損傷組織纖維化(Aggarwal and Pittenger, 2005a; Akiyama et



al., 2012; Carrade and Borjesson, 2013)。研究至今，犬間葉幹細胞經體外培養後，異體移植治療骨缺陷(Arinzeh et al., 2003; Jang et al., 2008; Kang et al., 2012)、脊髓損傷(Lim et al., 2007)，常有減輕損傷程度、促進細胞修復與增生，以達成行為與功能上的療效。甚至是異種移植於肝損傷小鼠，犬間葉幹細胞亦可藉由抗氧化活性保護肝細胞，以降低肝纖維化程度(Quintanilha et al., 2013)。

臨床研究於組織工程及細胞療法搭配疾病模式應用於犬，相較於齧齒類動物，更符合人類疾病之實際狀況，且亦可模擬療法中可能出現之副作用。已證實利用犬模擬心血管疾病(cardiovascular diseases)(Perin et al., 2008)、骨缺陷(bone defect)(Cui et al., 2007)、慢性骨關節炎(chronic osteoarthritis)(Guercio et al., 2012b)、脊髓損傷(spinal cord injury)(Lim et al., 2007; Nishida et al., 2011; Park et al., 2011; Ryu et al., 2009)，並以間葉幹細胞合併醫工材料或基因療法，皆有助於細胞增生、損傷減緩，甚至有修復作用(Guercio et al., 2012a; Yao et al., 2011)。

另外，在犬的遺傳疾病中亦有部分與人類同源(Homologous)，如 X 性聯遺傳嚴重複合型免疫缺乏症(X-linked severe combined immunodeficiency, XSCID)(Henthorn et al., 1994)及裘馨氏肌肉萎縮症(Duchenne muscular dystrophy)(Childers et al., 2001; Cooper et al., 1988; Sharp et al., 1992)，而幹細胞療法於犬裘馨氏肌肉萎縮症中有實際療效(Rouger et al., 2011)，且在間葉幹細胞研究中亦暗示了其抗炎性有助於治療(Ichim et al., 2010; Markert et al., 2009)。因此，無論是在人類或伴侶動物之臨床應用上，犬間葉幹細胞皆有其重要性。




第2章 試驗目的

近年來，大體捐贈成為重要的同種異體移植器官來源。相較於器官移植，幹細胞移植之成功率與低風險是取代器官移植之優異條件；相較於胚胎幹細胞，成體間葉幹細胞 (adult MSCs) 由於其低免疫原性 (immunogenicity)、低癌化風險且較易取得，更適合於臨床細胞治療 (cell therapy) 應用。

另一方面，以犬模擬人類疾病模式之研究 (Ostrander et al., 2000; Songsasen and Wildt, 2007; Travis et al., 2009) 常見於新藥測試、人類臨床前研究，且累積至今已有超過 370 件犬遺傳缺陷之研究發表，其中多數與人類遺傳疾病發生進程相似 (Songsasen and Wildt, 2007)，由此可見犬在未來再生醫學與臨床前細胞療法之應用不容小覷。因此，本試驗將探討由安樂死後犬隻大體取得兩種不同來源之成體間葉幹細胞，以建立一套流程能有效率擴展並維持幹細胞庫存以供學術研究、人類臨床前研究及伴侶動物臨床研究所需。

第一階段試驗目的在於取得安樂死後犬隻骨髓液樣本，從中養成單核細胞群並以定性實驗：三系細胞分化、細胞表面抗原分析之結果證明其為間葉幹細胞，以建立安樂死後犬骨髓間葉幹細胞 (canine bone marrow derived mesenchymal stem cells, cBMSCs) 分離與培養標準程序。本階段試驗將參考豬骨髓間葉幹細胞之分離法 (Hsiao et al., 2011b)，取得安樂死後犬隻骨髓間葉幹細胞，經體外培養繼代取得相對多量細胞後，以同等繼代數做相關定性分析。

第二階段試驗目的在於探討不同採集部位所取得之骨髓間葉幹細胞數量多寡及個體年齡是否造成分離效率之差異，並確立最佳之大體骨髓捐贈者年齡與採集位置，以取得相對多量之間葉幹細胞；此外，亦調查不同捐贈年齡之大體其骨髓間葉幹細胞特性：表面抗原分析、群落形成能力、細胞增殖速率、三系細胞分化



能力、安全性分析，並隨其繼代數增長加以觀察，以確立不同年齡大體骨髓捐贈者其骨髓間葉幹細胞繼代之安全代數，作為後續學術研究與臨床應用之參考。因此，本階段試驗將安樂死後之犬骨髓間葉幹細胞分別自肱骨（humerus）及股骨（femur）採集，並個別進行體外培養，以同等繼代數進行純化效率之評估。以股骨來源之骨髓間葉幹細胞為分析對象，依年齡區分老年組（大於八歲）及幼年組（小於三歲），且個別進行體外培養至 P4、P8、P12，對於個體年齡（age）及繼代數（passage）進行若干幹細胞特性之評估。

第三階段試驗目的在於探討安樂死後犬骨骺間葉幹細胞（canine epiphysis derived mesenchymal stem cells, cEMSCs）之建立，並比較其與骨髓間葉幹細胞之特性是否有所差異，評估分離安樂死後骨骺間葉幹細胞之可行性後，以建立捐贈大體骨骺間葉幹細胞分離之標準執程序，使於間葉幹細胞臨床應用上提供另一種新選擇。因此，本階段試驗將安樂死後之犬骨骺間葉幹細胞以股骨來源為分析對象，並個別進行體外培養，以同等繼代數進行評估。

第3章 試驗研究



3.1 材料與方法

3.1.1 實驗動物

基於人道關懷，病畜經獸醫診斷建議進行安樂死。在畜主的同意進行安樂死的前提下，徵詢是否同意大體捐贈並取得畜主簽屬之台灣大學附設動物醫院大體捐贈同意書後，隨即施以人道安樂，而後比照活體手術進行樣品採集。本試驗樣本主要源自於國立台灣大學附設動物醫院（National Taiwan University Veterinary Hospital）之捐贈大體與台北市動物保護處（Taipei Animal Protection Office）日常執行人道毀滅之大體。

3.1.2 分組

將樣本依其年齡分為老年（大於7歲）及幼年（小於3歲）兩組。若捐贈大體生前沒有資料紀錄其絕對年齡，其年齡分組則以大體牙齒損耗比例與牙結石累積程度進行推估，牙齒狀況較惡劣者歸為老年組（圖 1A）；反之則為幼年組（圖 1B）。

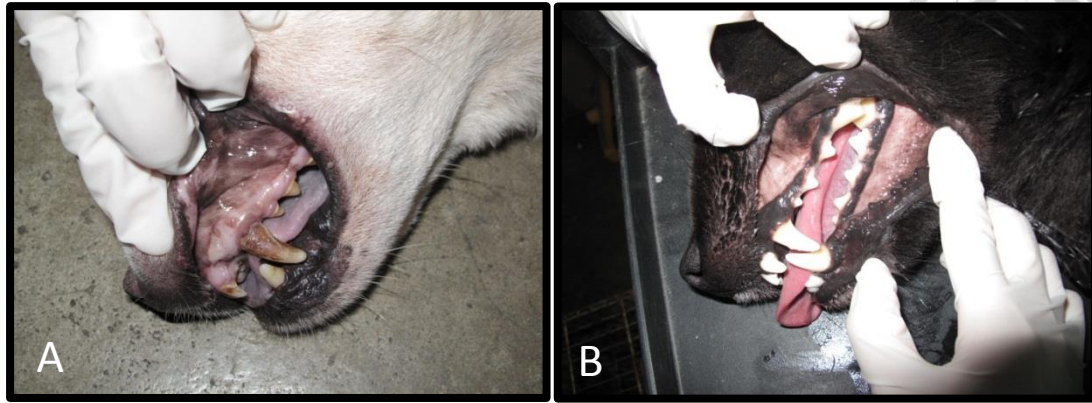


圖 1 安樂死後犬隻群組依據之牙齒示意圖。

老年犬其牙結石累積嚴重，如圖 A 所示牙齒呈現黃褐色；幼年犬其牙型完整較無牙結石累積，如圖 B 所示牙齒潔白且銳利。

Fig. 1 The teeth analysis for grouping


(A)The old groups were evaluated more than 8 year-old by serious teeth depletion and calculus accumulation, and(B)the young groups which were evaluated under 3 year-old had healthier teeth structure than old groups.

3.1.3 安樂死後犬間葉幹細胞之建立與定性分析

3.1.3.1 安樂死後犬骨髓間葉幹細胞之分離、培養與保存

完成安樂死後立即執行樣品採集，其流程比照活體動物骨髓採取手術進行。於肱骨（humerus）與股骨（femur）近體端（proximal）關節處開創，將關節囊與周邊結締組織剝離移除後，以骨髓抽取針（T-Lok™ Bone Marrow Biopsy Needle, DBMNJ1104TL）從關節面垂直長骨入針約三分之一針頭長度後，將內針抽出置換成內含 5000 I.U./ mL 肝素（heparin）（B.Braun Melsungen AG, D-34209）0.3 mL 之 20 mL 針筒，利用負壓抽出骨髓液。

取得之骨髓液以內含 2% FBS 之 PBS 稀釋三倍，利用 Ficoll-paque®（17-1440-02,



GE Healthcare) 以密度梯度離心，起始轉速為 210 g，每 30 秒增加 30 g 至 510 g 後離心 25 分鐘，即可分離出存在於血清與 Ficoll-paque® 交界面之單核細胞群 (mononuclear cells, MNCs)。取得之 MNCs 以細胞培養液： α -MEM (minimum essential medium alpha-modification) (Sigma, M0894)，其內含 100 單位/毫升 (U/mL) 青黴素 (penicillin) 及 100 微克/毫升 ($\mu\text{g/mL}$) 鏈黴素 (streptomycin) (Gibco, 15140)、3.7 毫克/毫升 (mg/mL) 碳酸氫鈉 (sodium bicarbonate, NaHCO_3) (Sigma, S5761)、及 20% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (SAFC bioscience, 12003C) 稀釋六倍後再次以 300 g 離心 5 分鐘，去除殘餘 Ficoll 上清液後，以每 2 mL 骨髓原液接種於一個直徑 10 公分 (cm) 之細胞培養皿中，於細胞培養箱以攝氏 37 度 (37°C)、5% 二氧化碳 (Carbon dioxide, CO_2) 培養。爾後，每三天更換細胞培養液以去除貼附能力較差之血球系細胞，待細胞成長至 80~90% 滿盤程度時即可以 1:2~3 之比例繼代。

於繼代前使用磷酸鹽緩衝液 (Phosphate Buffer Saline, PBS) 沖洗盤面去除殘留細胞培養液後，以 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid, trypsin-EDTA) (Gibco, 2500056) 37°C 作用約 1 分鐘便使細胞懸浮，而後用等量之培養液中止作用。細胞懸浮液以 300 g 離心約五分鐘，將細胞團 (cell pellet) 以新鮮培養液再次懸浮 (resuspend)，即可以 1:2~3 之比例接種於培養液中。而細胞需長期保存於液態氮桶中，乃先將細胞懸浮於內含 10% 二甲基亞砷 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) (Sigma, D2650) 之 FBS，以每分鐘降溫 1°C 之速率，待細胞凝結後即可移置液態氮桶保存。

3.1.3.2 安樂死後犬骨骺間葉幹細胞之分離

骨骺樣品之取得，以環鑽 (trephine) 從近體端生長板垂直下針以取出海綿骨組織 (spongy bone tissue)。將組織塊剪碎成直徑約 2 mm 之組織塊後，不經任何酵素作用即可直接以細胞培養液： α -MEM，其內含 100 U/mL 青黴素及 100 μ g/mL 鏈黴素，3.7 mg/mL 碳酸氫鈉及 20% 胎牛血清培養於細胞培養皿中，於細胞培養箱以 37°C、5 % CO₂ 培養。爾後，每三天更換細胞培養液以去除貼附能力較差之血球系細胞，待細胞成長至 80~90 % 滿盤程度時即可以 1:2~3 之比例繼代。

於繼代前使用磷酸鹽緩衝液 (Phosphate Buffer Saline, PBS) 沖洗盤面去除殘留細胞培養液後，以 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid, trypsin-EDTA) (Gibco,2500056) 37°C 作用約 5 分鐘便使細胞懸浮，而後用等量之培養液中止作用，並以 70 μ m 細胞過濾器 (cell strainer 70 μ m Nylon) (BD Falcon™, REF352350) 去除組織塊。細胞懸浮液以 300 g 離心約五分鐘，將細胞團以新鮮培養液再次懸浮，即可以 1:2~3 之比例接種於培養液中。而細胞需長期保存於液態氮桶中，乃先將細胞懸浮於內含 10 % DMSO 之 FBS，以每分鐘降溫 1°C 之速率，待細胞凝結後即可移置液態氮桶保存。

3.1.4 流式細胞儀分析

將待測細胞懸浮後，300 g 離心 5 分鐘，再以沖洗緩衝液 (washing buffer：內含 2% FBS 之 PBS) 懸浮細胞，使 3 \times 10⁵ 顆細胞之懸浮液分別與特定抗體 (表 1) 及其所對應之同型抗體 (isotype) (表 2) 混勻，並於 4°C 靜置 30 分鐘。爾後，以 washing buffer 沖洗，離心後去上清液，使清除未結合之抗體，最後使用固定緩衝液 (fixing buffer：含 1% 多聚甲醛 (paraformaldehyde) 之 washing buffer) 懸浮細

胞團即完成染色。其結果分析儀器使用為台灣大學生農學院共同儀器中心之流式細胞分析儀 (Beckman Coulter FC500)，並使用 FCS express 4 flow research edition 軟體分析結果。



表 1 細胞表面抗原分析之抗體項目表

Table 1. The datasheet of antibody for flow cytometric analysis

antibody	Cat. No.	Application test	vender
CD73-FITC	12-0340	5 μ L (0.25 μ g) /10 ⁵⁻⁸ cells	eBioscience
CD34-PE	12-5451	5 μ L (0.25 μ g) /10 ⁵⁻⁸ cells	eBioscience
CD45R-PE	11-5440	5 μ L (0.0075 μ g) /10 ⁵⁻⁸ cells	eBioscience
CD44-FITC	12-5900	5 μ L (0.125 μ g) /10 ⁵⁻⁸ cells	eBioscience
CD90-PE	11-1469	5 μ L (0.5 μ g) /10 ⁵⁻⁸ cells	eBioscience

表 2 細胞表面抗原分析之同型抗體項目表

Table 2. The datasheet of isotype for flow cytometric analysis

isotype	Cat. No.	Application test	vender
Mouse IgG1-PE	12-4714	5 μ L (0.125 μ g) /10 ⁵⁻⁸ cells	eBioscience
Rat IgG2b -PE	12-4031	5 μ L (0.5 μ g) /10 ⁵⁻⁸ cells	eBioscience
Rat IgG2a -FITC	553929	5 μ L (0.5 μ g) /10 ⁵⁻⁸ cells	eBioscience



3.1.5 細胞三系分化之體外誘導及分析

3.1.5.1 硬骨細胞體外誘導分化及染色分析

培養細胞至 50% 滿盤程度時以硬骨細胞分化液 (osteogenic differentiation medium) (表 3) 取代細胞培養液，且每三天更換新鮮分化液，7 天後可觀察到細胞型態改變 (cell morphology shifting)，即可以 10% 甲醛溶液 (formaldehyde solution, 10% in aqueous phosphate buffer) (MACRON™ chemicals, H121-08) 固定細胞 10 分鐘後，以 PBS 清洗，加入適量茜素紅 (Alizarin Red S, ARS) (Sigma, A5533) 於室溫靜置 20 分鐘後，以 PBS 沖洗殘留染劑即完成染色。

3.1.5.2 脂肪細胞體外誘導分化及分析

培養細胞至 50% 滿盤程度時以脂肪細胞分化液 (adipogenic differentiation medium) (表 3) 取代細胞培養液，且每三天更換新鮮分化液，約 30 天則細胞型態改變，即可以 10% 甲醛溶液固定細胞 10 分鐘後，以 ddH₂O 清洗，加入適量油紅 (Oil Red O) (SIGMA, O9755) 於室溫靜置 20 分鐘後，以 ddH₂O 沖洗殘留染劑即完成染色。

3.1.5.3 軟骨細胞體外誘導分化及分析

將 2×10^5 之細胞懸浮液接種於 15mL 尖底離心管內，以 300 g 離心 5 分鐘後，使細胞聚積於管底，直接以軟骨分化液 (chondrogenic differentiation medium) (表 3) 培養，21 天後收集細胞團塊。細胞團塊經石蠟切片後以苯胺藍 (Toluidine Blue O) (SIGMA, 19816-1) 染色。

將切片先行脫蠟，以二甲苯 (xylene) 浸泡兩次，每次 10 分鐘，而後進行復



水，依序浸泡 100 %、95 %、90 %、80 %、70 % 之酒精各 5 分鐘，最後至於 PBS 內即可開始染色。將適量 Toluidine blue O 覆蓋於組織上，室溫靜置三分鐘後，以 PBS 沖洗殘留染劑即完成染色。

表 3 三系細胞分化液之配方表

Table 3. The composition of differentiation medium


differentiation medium	composition
adipogenic	α MEM contain 10% FBS, 10 μ g/mL insulin, 1 μ M Dexamethasone, 0.5mM IBMX, 100 μ M Indomethacin
osteogenic	α MEM contain 10% FBS, 0.1 μ M Dexamethasone, 10mM Glycerol-2-phosphate, 50 μ M Ascorbate-2-phosphate
chondrogenic	α MEM contain 1% FBS, 10ng/mL TGF- β 1, 6.25 μ g/mL insulin, 50nM Ascorbate-2-phosphate

3.1.6 總核糖核酸抽取

將硬骨分化至第四天，脂肪分化第六天之細胞個別懸浮於 200 μ L TRIzol reagent (ambion, 15596) 中，室溫靜置 10 分鐘後加入 50 μ L 1-溴-3-氯丙烷 (1-Bromo-3-chloropropane, BCP) (MRC, BP151) 震盪 15 秒並以 120000 g，於 4 $^{\circ}$ C 下離心 15 分鐘，收集上清液後加入等體積之異丙醇 (isopropanol) (Merck, 1.09634.1000) 以沉澱 RNA，輕混勻並於室溫靜置 5 分鐘，以 12000 g 離心 15 分鐘後去除上清液，加入 1 mL 70% 酒精漂洗沉澱物後，8500 g 離心 5 分鐘以去除殘餘有機溶劑，風乾約 5 分鐘即將 RNA 沉澱回溶於 nuclease-free water 中。

3.1.7 反轉錄反應

取 1 μ g 之總 RNA 以 QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit (Quiagen, 205314)



反轉錄成互補去氧核糖核酸 (complementary deoxyribonucleic acid, cDNA)。以 RNA (1 μg) 12 μL 加入 2 μL 7× gDNA Wipeout buffer 混勻並於 42 °C 靜置 5 分鐘以去除 DNA，爾後以總體積 20 μL (14 μL DNA-free RNA, 1 μL Reverse-transcription master mix, 4 μL 5× Quantiscript RT buffer, 1 μL RT primer mix) 進行反轉錄反應 (reverse transcription)，42 °C 30 分鐘、95 °C 3 分鐘後之 cDNA 產物即可於 -20 °C 保存。

3.1.8 即時定量聚合酶連鎖反應

依照 DyNAmo™ Flash SYBR Green qPCR Kit (FINNZYMES, F415) 之說明，將 cDNA 稀釋 4 倍後，以總反應體積 10 μL，內含 4 μL 稀釋後之 cDNA、5 μL 2× qPCR master mix、1 μL 之 20 μM 引子 (primer) (表 4)，進行即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)，其反應起始於 95 °C 7 分鐘，並以 95 °C 10 秒、60 °C 30 秒進行 40 個循環，而後以 60 °C 反應 1 分鐘，且於 95 °C 終止反應。

表 4 qPCR 引子序列表

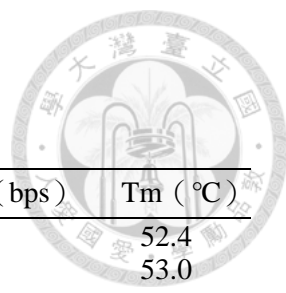


Table 4. The primer sequence for qPCR

Gene		Primer sequence (5'-3')	Amplicon (bps)	Tm (°C)
FABP4	Forward	ATCAGTGTAACGGGGATGTG	117	52.4
	Reverse	GACTTTTCTGTCATCCGCAGTA		53.0
LPL	Forward	ACACATTCACAAGAGGGTCAC	132	52.4
	Reverse	CTCTGCAATCACACGGATG		51.1
Leptin	Forward	GCTCACCCAAACAAGACCAT	183	60.0
	Reverse	AAAACCCAAGCCTCCTTGTT		60.0
PPAR- γ	Forward	TTCTCCAGCATTTCCTACTCC	123	51.8
	Reverse	AGGCTCCACTTTGATTGCAC		51.8
COL2A	Forward	GAAACTCTGCCACCCTGAATG	156	54.1
	Reverse	GCTCCACCAGTTCTTCTTGG		53.8
SOX9	Forward	GCTCGCAGTACGACTACACTGAC	101	58.8
	Reverse	GTTCATGTAGGTGAAGGTGGAG		54.8
AGC	Forward	ATCAACAGTGCTTACCAAGACA	122	51.1
	Reverse	ATAACCTCACAGCGATAGATCC		53.0
OPN	Forward	CATATGATGGCCGAGGTGATAG	114	54.8
	Reverse	CAAGTGATGTGAAGTCCTCCTC		54.8
COL1A1	Forward	CTGGTGAACAGGGTGTTCCT	158	60.0
	Reverse	ACCCTTAGCACCATCATTGC		60.0
OPG	Forward	TGTCTATACTGCAGGCCGGTG	120	56.3
	Reverse	TCAGGCAGAACTCAAGCTCCA		54.4
GAPDH	Forward	AAGGTCATCCCTGAGCTGAA	192	59.8
	Reverse	ACCACCTGGTCCTCAGTGT		60.1
CCL5	Forward	CACCCACGTCCAGGAGTATT	168	59.8
	Reverse	TCAGGTTCCAGATGCCCTAC		60.0

FABP4, fatty acid binding protein 4; PPAR- γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; COL1A1, collagen type I alpha 1; OPG, osteoprotegerin; OPN, osteopontin; COL2A, collagen type II alpha; SOX9, SRY (sex determining region Y) -box 9; AGC, aggrecan; CCL5, chemokine (C-C motif) ligand 5, also called RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted)

3.1.9 群落形成能力分析

將細胞懸浮後，以 200 顆細胞接種於 6 孔盤中，培養 10 天後以吉姆薩染液染色 (Giemsa stain) (Invitrogen, 10092-013) 使細胞群落呈紫色 (圖 2)，即可肉眼觀察，直徑 2 mm 以上之群落形成單位 (colony-forming unit, CFU) 得以計數。

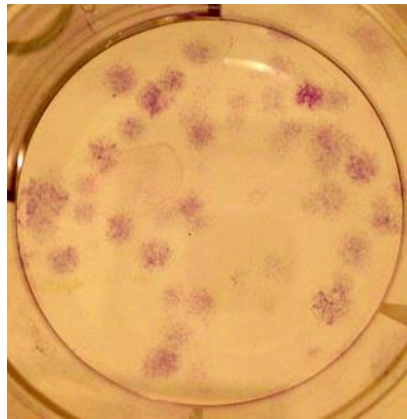


圖 2 吉姆薩染色分析之群落形成單位。

細胞群落呈紫色，即可肉眼觀察，直徑 2 mm 以上之群落形成單位 (colony-forming unit, CFU) 得以計數。

Fig. 2 The colony-forming units with Geimsa staining.

The colony-forming units were counted by visual that could indicate the numbers of stem cells we harvested from primary culture.

3.1.10 噻唑藍比色法

以 1000 顆細胞接種於 96 孔盤中，持續觀察六天。每隔 24 小時添加噻唑藍 (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT.) (Sigma, M5655) 10 μ L (5 mg/mL) 培養 4 小時後，以 200 μ L 之 DMSO 替換培養液。以分光光度計測量 OD₅₇₀₋₆₉₀，其所測得之吸光值即可以標準曲線回推相對應之細胞數。細胞標準曲線之接種如表 5 所示，與待測細胞同時處理，其所測得知吸光值與細胞數呈線性正相關。其結果可得一細胞之生長曲線並在其指數生長期 (log phase) 推得一天內細胞倍增時間 (population doubling time, PDT)，其公式為 doubling number=

$$\frac{\log (N_t - N_0)}{\log 2} / t \text{。} (N_t = t \text{ 時間後細胞數量，} N_0 = t \text{ 時間前細胞數量，} t \text{ unit=days)。$$

表 5 MTT 比色法之標準曲線接種示意表。

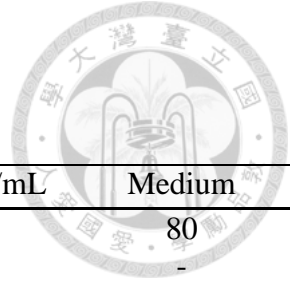


Table 5. Standard curve of MTT assay for cell proliferation

Cell num. ($\times 10^4$ cells)	10^6 cells/mL	10^5 cells/mL	10^4 cells/mL	Medium
2	20	-	-	80
1	-	100	-	-
0.5	-	50	-	50
0.1	-	-	100	-
0.05	-	-	50	50

unit : μL

10^3 Cells seeding in 96-well.

Treat MTT $10 \mu\text{L}/\text{well}/\text{day}$, after 4hrs was detected under OD $570-690$.



3.2 試驗結果

3.2.1 安樂死後犬骨髓間葉幹細胞之建立與定性分析

本階段試驗設計在於探討安樂死後犬骨髓間葉幹細胞之分離流程之可行性，利用定性分析證實分離所得之單核細胞群為間葉幹細胞群，以建立捐贈大體骨髓間葉幹細胞分離之標準執行程序。

3.2.1.1 犬骨髓間葉幹細胞之建立

安樂死後犬骨髓液之抽取比照活體動物手術施行，而犬骨髓間葉幹細胞之分離則以豬骨髓間葉幹細胞之分離法做為參考，流程如圖 3A 所示。將骨髓液稀釋後經由 Ficoll 以密度梯度離心方式取得之單核細胞群除了間葉幹細胞外，淋巴球 (lymphocyte) 及單核球 (monocyte) 亦存在於其中，則需利用塑料貼附之差異性並配合更換細胞培養液以避免血球系細胞污染。

第一代培養約 5 天即可看見貼盤生長之細胞，其細胞型態成紡錘型 (圖 3B) 並能自我更新且具群落形成能力，與 Friedenstein 等人(Friedenstein et al., 1970)所發現之細胞特性相符。

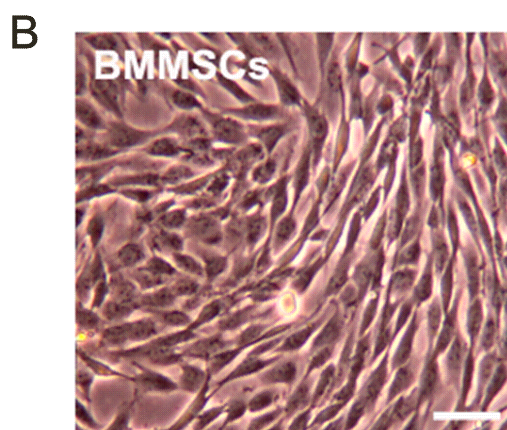
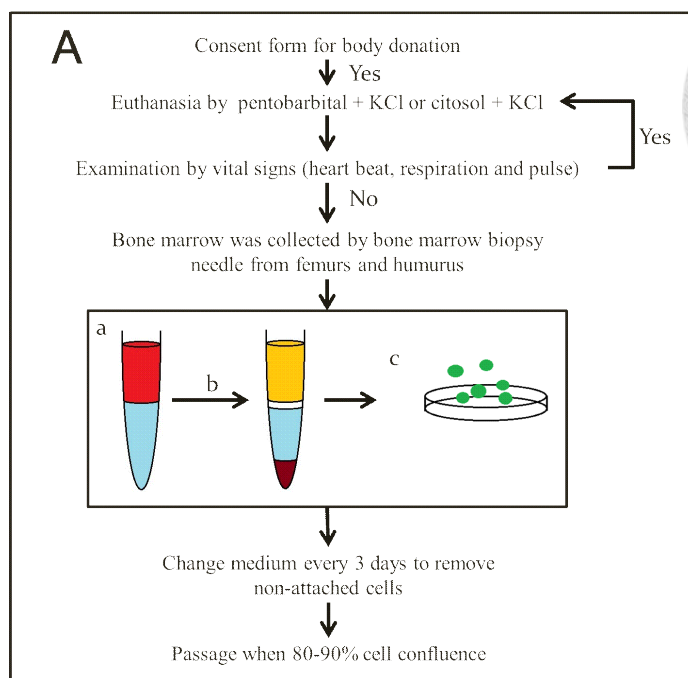


圖 3 安樂死後犬隻骨髓間葉幹細胞分離法流程圖。

(A) (a) 取得之骨髓液以內含 2% FBS 之 PBS 稀釋三倍 (紅色)，(b) 利用 Ficoll-paque® 以密度梯度離心分離出存在於血清(黃色)與 Ficoll-paque® (淺藍色) 交界面之單核細胞群 (白色)，(c) 此單核細胞群以每 2mL 骨髓原液接種於一個直徑 10 cm 之細胞培養皿中，每三天更換細胞培養液以去除貼附能力較差之血球系細胞，待細胞成長至 80~90 % 滿盤程度時即可以 1:2~3 之比例繼代。(B) 第一代培養之單核細胞群可貼盤並形成群落，且細胞外形成紡錘狀者即為 BMMSCs。

Fig.3 The method flowchart for the preparation of BMMSCs from canine body donors after euthanasia.

A. (a) Aspirated bone marrow was diluted with PBS containing 2% FBS (red) which is on the top of ficoll-paque® (light blue). (b) The cells were separated by centrifugation: plasma (yellow), mononuclear cells (white) and red cells (dark red).

(c) Mononuclear cells were harvested from plasma interface and seeded in 10 cm-dish/2 mL bone marrow at 37°C with 5% CO₂. B. Plastic-attached cells with spindle shape can be observed in primary culture. Scale bar represents 100 μm.

3.2.1.2 犬骨髓幹細胞之定性分析

為了確認本試驗所使用之分離流程能確實取得間葉幹細胞，即利用血球系細胞之特定表面抗原：CD34（造血幹細胞標記）與 CD45R（淋巴球抗原）與間葉幹細胞常見表面抗原：CD44（基質貼附分子）與 CD90（胸腺細胞抗原）以流式細胞儀分析其表面抗原分布；而後以三系細胞分化液進行體外誘導分化後，使用特定染劑：Oil Red O、Alizarin Red S 及 Toluidine Blue O，個別使脂肪細胞內油滴分子呈紅色、硬骨細胞所分泌之鈣離子呈紅色、軟骨細胞所分泌之蛋白多醣（proteoglycans）與醣胺多醣（glycosamioglycans）呈紫色，以佐證其擁有至少三系分化之潛能。

第一代培養之貼附性紡錘狀細胞經體外培養至第 4 代，其表面抗原以螢光染色並經由流式細胞儀分析之結果顯示（圖 4），CD34(0.02 % of positive cells)與 CD45(0 % of positive cells) 為陰性，證明經本試驗之分離法所得到之單核細胞群並非血球系細胞；而 CD44(97.31 % of positive cells)與 CD90(98.26 % of positive cells) 為陽性，證明經本試驗之分離法所得到之單核細胞群來自於間葉幹細胞系群。

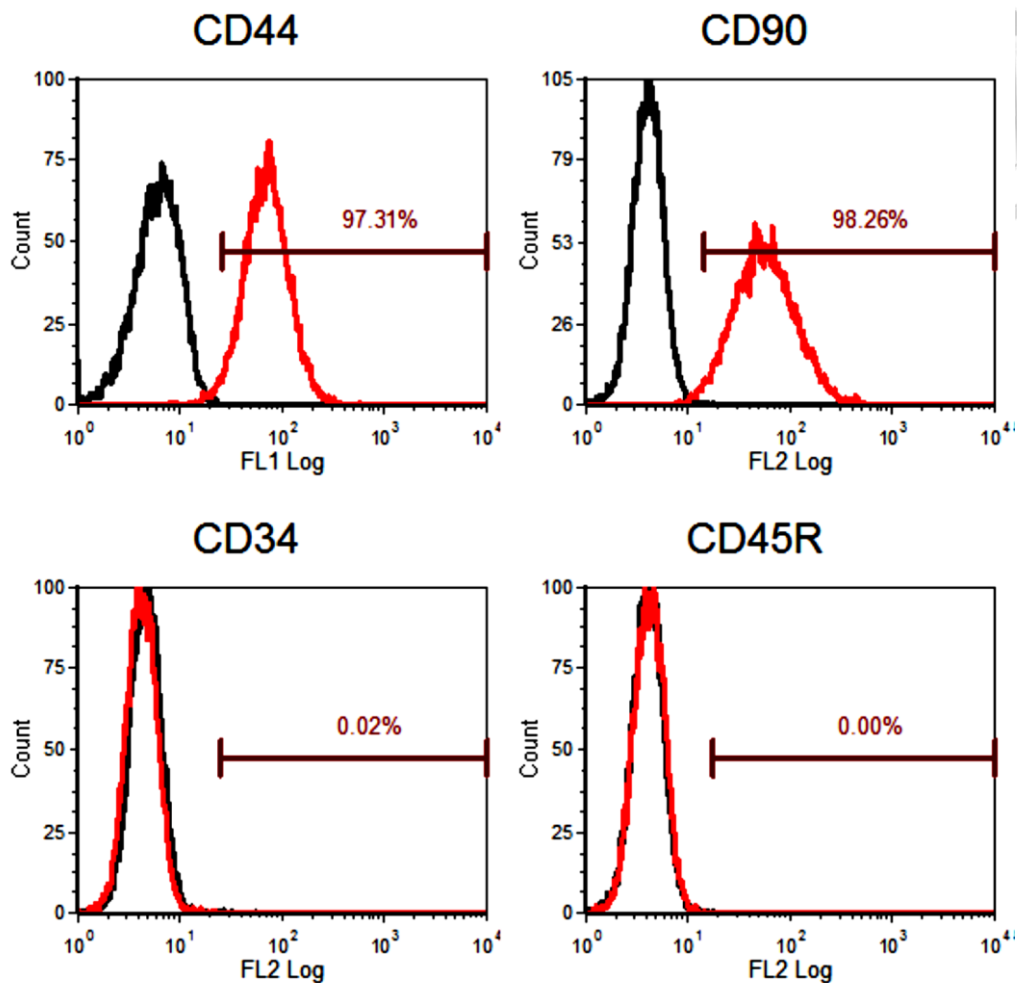



圖 4 安樂死後犬骨髓間葉幹細胞之表面抗原分析。

結果顯示依本試驗分離方式所得之單核細胞群其 CD34 與 CD45R 為陰性；CD44 及為陽性。且此表面抗原分布性向不會因個體年齡或細胞繼代數而有所差異。

Fig.4 Identical immunophenotypes as defined MSCs.

The immunophenotypes were examined by flow cytometric analysis. Both CD90 (thymus cell antigen) and CD44 (matrix adhesion molecule) are known as positive makers in BMMSCs, whereas CD45R (an isoform of CD45 which is lymphocyte common antigen) and CD34 (hematopoietic stem cell marker) are negative. Our data showed BMMSCs harvested from euthanized dogs possessed consistent profile pattern as defined MSCs and identical results throughout individuals and cell passages.



安樂死後犬骨髓間葉幹細胞經體外培養至第五代，即分別處理不同分化液，並以特定染色法個別分析。結果顯示，脂肪細胞分化至第 30 天，細胞外觀從紡錘狀轉變為渾圓且貼附性稍差的型態，以 Oil Red O 染色可發現其渾圓細胞內含有較多紅色染劑累積，表示其油滴分子累積旺盛（圖 5A）；硬骨細胞分化至第 7 天，細胞型態轉變為平板狀，以 Alizarin Red S 染色可發現細胞外有紅色染劑累積，表示其分泌之鈣離子堆積於胞外基質中（圖 5B）；軟骨細胞分化至第 21 天，透過石蠟切片以 Toluidine Blue O 可發現細胞外有部分紫色染劑，表示其分泌之蛋白多醣與醣胺多醣累積於胞外基質中（圖 5C）。茲可證明由此分離法所取得之單核細胞群具有三系細胞分化之潛能。

綜合上述，本試驗所使用之骨髓間葉幹細胞分離法所取得之具有塑料貼附性且成紡錘狀之細胞群，能自我更新且具群落形成能力，與前人所發現之細胞特性相符。經由表面抗原分析，可證實此細胞群之表面抗原分布與間葉幹細胞相符，且能以體外誘導分化成至少三系細胞，更進一步證實此細胞群擁有間葉幹細胞特有之三系分化潛能，即可證實本試驗所使用之分離法所取得之單核細胞群為骨髓間葉幹細胞群。

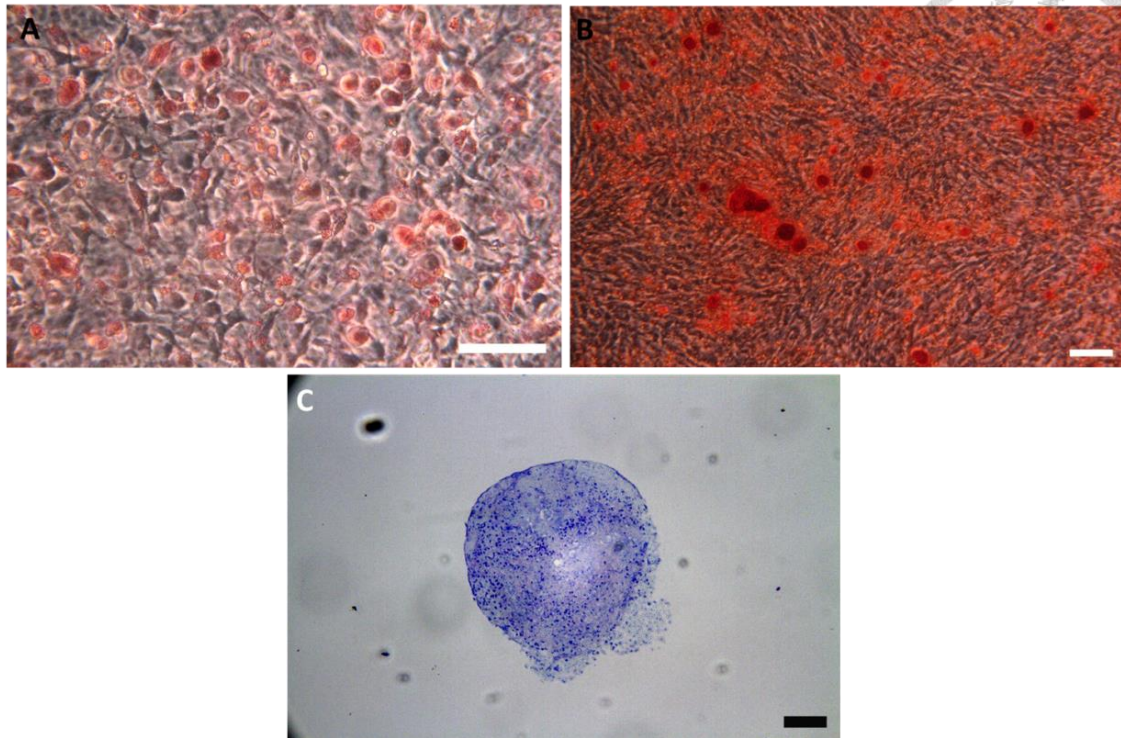


圖 5 三系細胞分化之染色結果。

(A) 脂肪分化：經油紅呈色之油滴分子累積於細胞內，且細胞外型轉變為圓形。
(B) 硬骨分化：經茜素紅呈色之鈣離子堆積於胞外基質中，且細胞外型轉變為平板狀。
(C) 軟骨分化：經苯胺藍呈色之膠原蛋白累積於胞外基質中。比例尺為 100 μm 。

Fig.5 Tri-lineage differentiation potentials.

BMMSCs collected from euthanized dogs could be induced to differentiate into (A) adipocytes as stained by Oil Red O, (B) osteocytes as stained by Alizarin Red S, and (C) chondrocytes as stained by Toluidine Blue O. Scale bar represents 100 μm



3.2.2 個體年齡差異與其骨髓間葉幹細胞特性之探討

本階段試驗設計在於探討安樂死大體之個體與其骨髓間葉幹細胞特性是否存在年齡差異，針對分離效率 (isolation efficiency)、生長能力 (cell proliferation)、表面抗原穩定性 (surface marker stability)、分化潛能 (differentiation potential) 及安全性進行分析，以找出最適捐贈個體之年齡範圍及臨床細胞療法應用之安全繼代數。

3.2.2.1 分離效率分析

安樂死後犬之骨髓間葉幹細胞依捐贈個體年齡及採集位置個別進行體外培養後，利用 Giemsa 染色計算群落形成單位以代表其群落形成能力，暗示在同等細胞數中其具有自我更新能力之細胞數量，以茲表示不同部位 (humerus and femur) 與個體年齡 (old and young) 之分離效率，並探討不同繼代數間自我更新之能力。

結果顯示，不同個體年齡及採集部位之安樂死後犬骨髓間葉幹細胞皆可形成群落形成單位，經過肉眼計算其數量並進行統計分析，可得知在肱骨 (24.45 ± 4.882 CFUs) 及股骨 (23.25 ± 4.371 CFUs) 所取得之骨髓間葉幹細胞其群落形成單位數量沒有顯著差異 (圖 6A)，且於不同個體年齡亦無顯著差異 (圖 6B)；在老年組則可發現其 P12 群落形成單位數量 (6.178 ± 3.847 CFUs) 顯著低於 P1 (32.87 ± 6.210 CFUs) 與 P4 (33.89 ± 10.86 CFUs)。

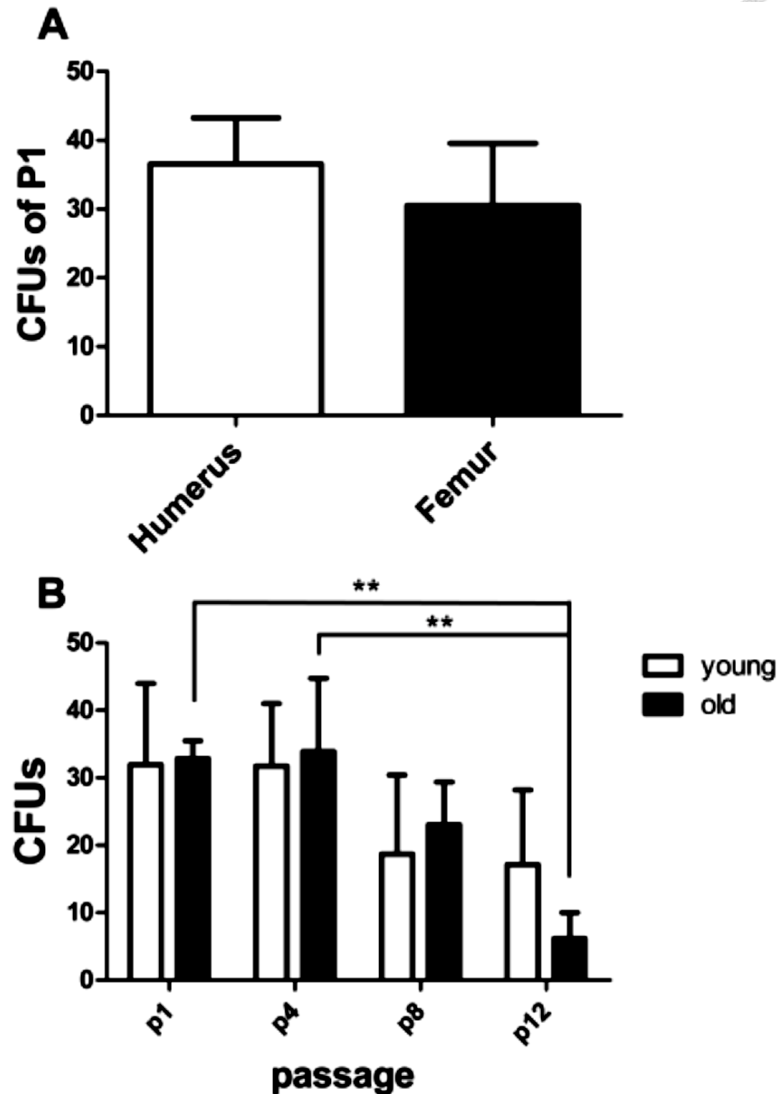


圖 6 安樂死後犬骨髓間葉幹細胞之群落形成能力。

(A) 安樂死後犬骨髓間葉幹細胞之群落形成數量在採集位置 (humerus and femur) 上無顯著差異，(B) 而個體年齡亦不影響其群落形成能力。在老年組則可發現 P12 之群落形成能力顯著低於 P1 及 P4 ($P < 0.01$)。

Fig.6 Clonogenicity of cBMMSCs

A, The numbers of colony-forming unit from cBMMSCs have no difference among different sites. B, there is no difference in the number of CFU from cBMMSCs between ages. However, the CFUs in P12 of old group are significant lower than P1 and P4 ($P < 0.01$). (mean ± SD; A, n=4, unpaired *t*-test; B, n=3; one way- ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test, * represent $P < 0.05$)

3.2.2.2 生長能力分析

個別將犬骨髓間葉幹細胞體外培養至不同的繼代數 (P4、P8、P12)，以同等細胞數接種，並利用 MTT 比色法分析特定時間點內細胞之總數，即可得一細胞之生長曲線，並可推算出細胞倍增時間 (population doubling time, PDT)，以探討不同個體年齡與繼代數對 MSCs 生長能力之影響。

由細胞生長曲線可知，不同採集位置之骨髓間葉幹細胞其生長曲線相似 (圖 7A)，因此細胞倍增時間無差異 (圖 7B)；且無論個體年齡差異，骨髓間葉幹細胞在 P4 (圖 7C) 及 P8 (圖 7D) 皆在接種後 48 小時觀察到細胞數量急遽上升，表示進入指數生長期，而 P12 (圖 7E) 須待 72 小時才能觀察到此現象發生。取其指數生長期推算細胞倍增時間 (圖 7F)，可得知犬骨髓間葉幹細胞約 24 小時倍增一次，且個體年齡與繼代數於細胞倍增時間沒有顯著差異。

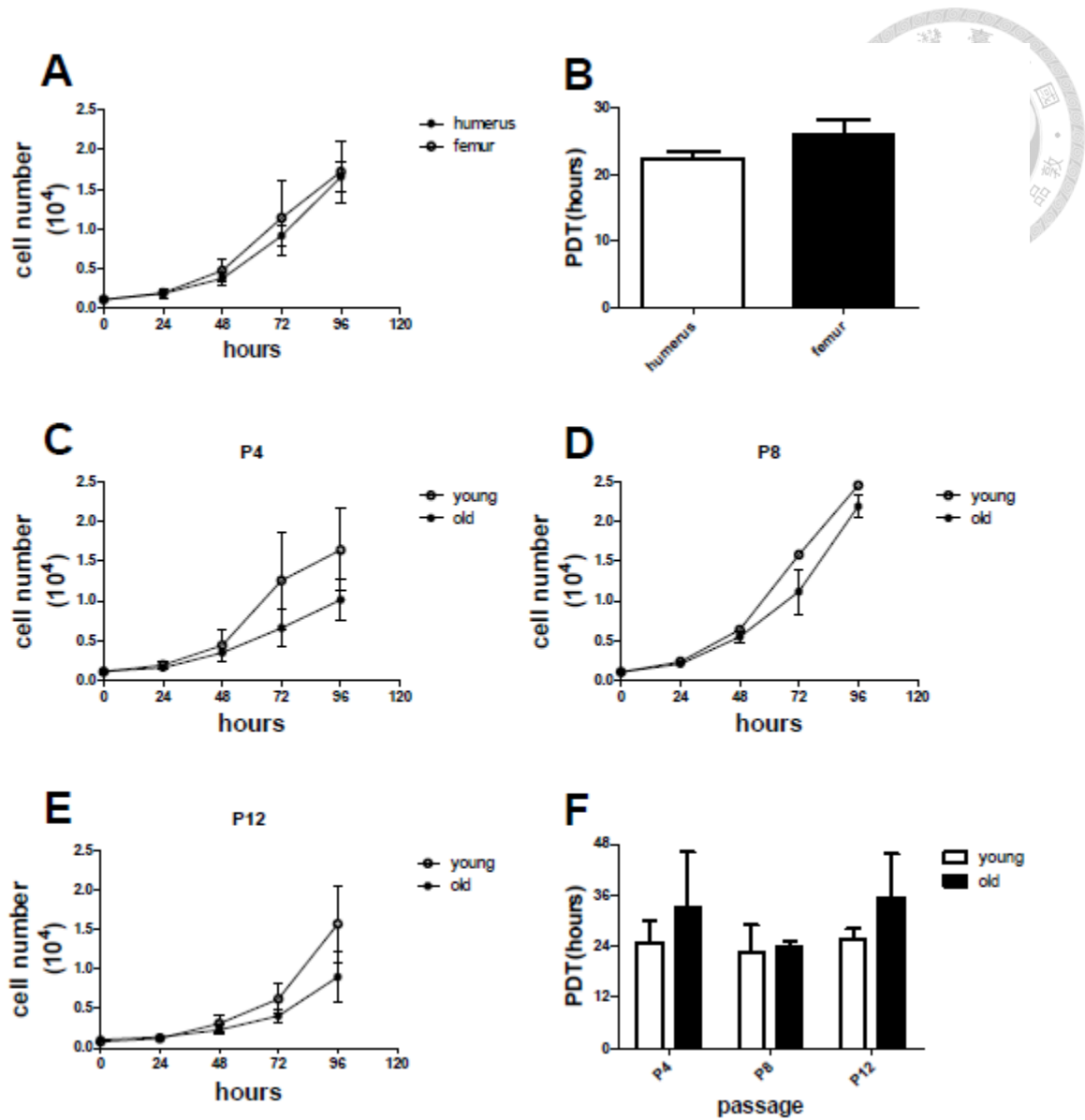


圖 7 安樂死後犬骨髓間葉幹細胞之增殖能力。

由生長曲線 (A) 可知，骨髓間葉幹細胞其細胞倍增時間於不同採集部位 (B)

沒有顯著差異，繼代數間 (C, D, E) 其個體年齡有相似之走向，進而推算其細胞

倍增時間 (F) 可知於繼代數與個體年齡間皆無顯著差異。

Fig 7. Cell proliferation of cBMMSCs

We can observe the growth curve in BMMSCs between different isolation location, ages and passages (A, C, D, E) shared the same trend. According to log phase of growth curve, the PDT of BMMSC (B, F), with no difference between locations, ages and passages. (mean \pm SD; A, n=3, unpaired *t*-test; B, n=3 unpaired *t*-test; C, n=3 unpaired *t*-test; D, n=2, 3 unpaired *t*-test; E, n=3, 3, 3 two way- ANOVA)

3.2.2.3 表面抗原穩定性分析

將各年齡層之骨髓間葉幹細胞個別進行體外培養至 P4、P8、P12 後，進行表面抗原染色並以流式細胞儀分析，以調查在骨髓間葉幹細胞於體外培養一段時間後其細胞之穩定性。

結果顯示，各年齡層之細胞隨著繼代數增加其 CD34、CD45R 維持恆定地呈陰性，而 CD90、CD44 除了恆定地呈陽性外，CD44 尚有隨著繼代數而改變之陽性細胞比例 (percentage of positive gated cells)，相較於 P12，P4 其所佔之陽性細胞比例較低且有顯著差異 ($P < 0.05$) (圖 8A)。若將 CD44 資料呈現以年齡區分，則可發現幼年組有隨繼代數增加，其陽性細胞比例亦增加之趨勢；而老年組亦然，惟 P4 時略高於 P8 (圖 8B)。



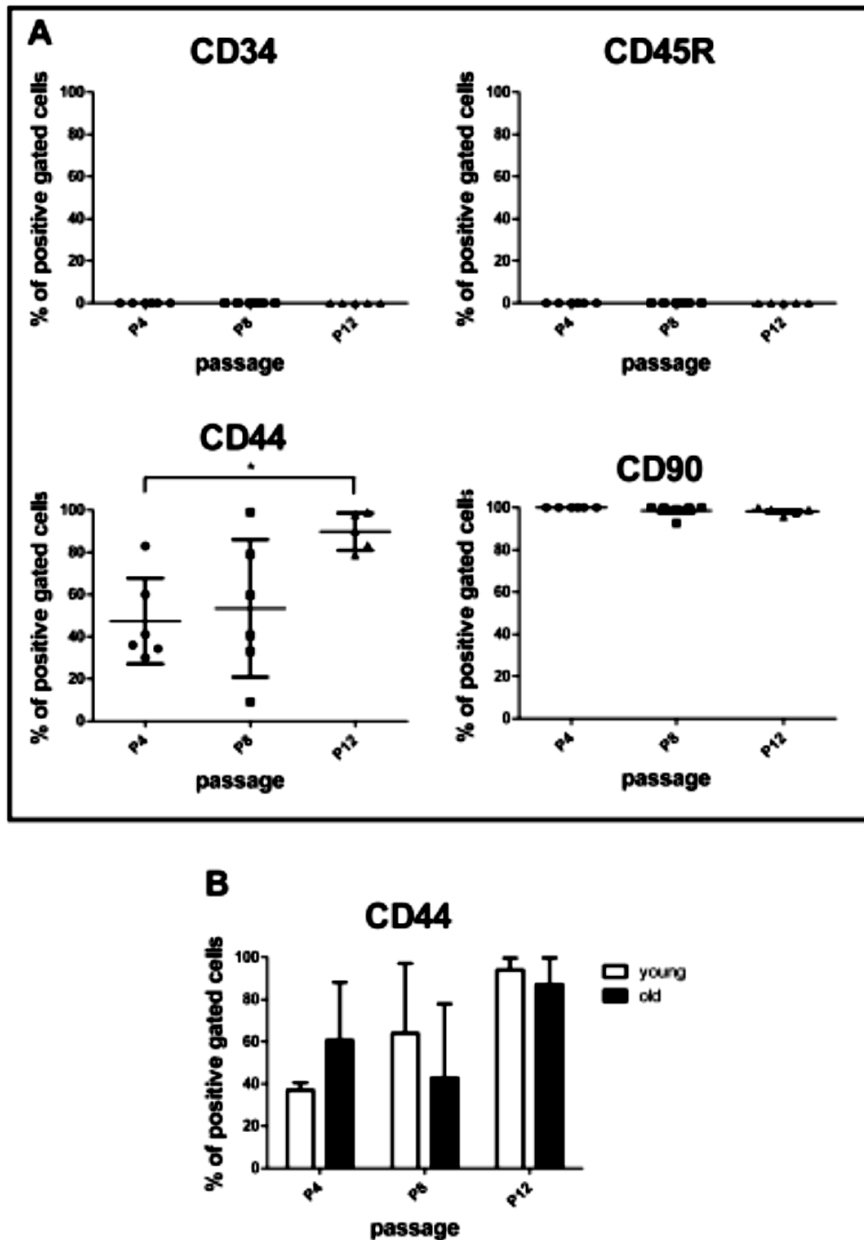


圖 8 個體年齡與繼代數對表面抗原分布之影響。

(A) 安樂死後骨髓間葉幹細胞以體外培養直至 P12 亦維持穩定的向性：CD34 及 CD45R 呈陰性；CD44、CD90 呈陽性。唯 P12 之 CD44 陽性細胞比例 ($89.84 \pm 8.858\%$) 高於 P4 ($47.38 \pm 20.35\%$) 且具有顯著差異 ($P < 0.05$)；(B) 而在個體年齡則不具差異。

Fig.9 The immunophenotyping profile between ages and passages in cBMMSCs

A, The profile of cBMMSCs shows a consistent pattern until passage 12. Both CD45R and CD34 are negative; CD90 and CD44 are positive. Compare to P12 ($89.84 \pm 8.858\%$), the percentage of CD44 positive cells in P4 ($47.38 \pm 20.35\%$) was lower than P12. B, the percentage of CD44 positive cells in cBMMSCs was no difference between ages (mean \pm SD, n=6, 6, 5; one way-ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test, * represent $P < 0.05$)



3.2.2.4 分化潛能分析

依據個體年齡不同探討其安樂死後骨髓間葉幹細胞之分化潛力。以相同繼代數處理硬骨及脂肪分化液，進行體外誘導分化，而後以 qPCR 個別進行不同分化階段之標誌基因 (marker genes) 表現量之相對定量，以茲代表其分化程度。

硬骨分化於分化第四天取樣，標誌基因以分化早期 COL1A1 (collagen type I alpha 1)，中期 OPN (osteopontin)、OPG (osteoprotegerin)，晚期 osteocalcin 進行相對表現量定量 (圖 9A)。結果顯示，不同個體年齡之骨髓間葉幹細胞其不同硬骨分化階段之標誌基因表現量沒有顯著差異。

脂肪分化於分化第六天取樣，標誌基因以分化早期 PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)、LPL (lipoprotein lipase)，中期 FABP4 (fatty acid binding protein 4)，晚期 leptin 進行相對表現量定量 (圖 9B)。結果顯示，不同個體年齡之骨髓間葉幹細胞其不同脂肪分化階段之標誌基因表現量沒有顯著差異。

軟骨分化於分化第四天取樣，標誌基因以分化早期 SOX9 (sex determining region Y-related high mobility group-box gene 9)，中期 AGC (aggrecan)，晚期 COL2A (collagen type II alpha) 進行相對表現量定量 (圖 9C)。結果顯示，不同個體年齡之骨髓間葉幹細胞其不同軟骨分化階段之標誌基因表現量沒有顯著差異。

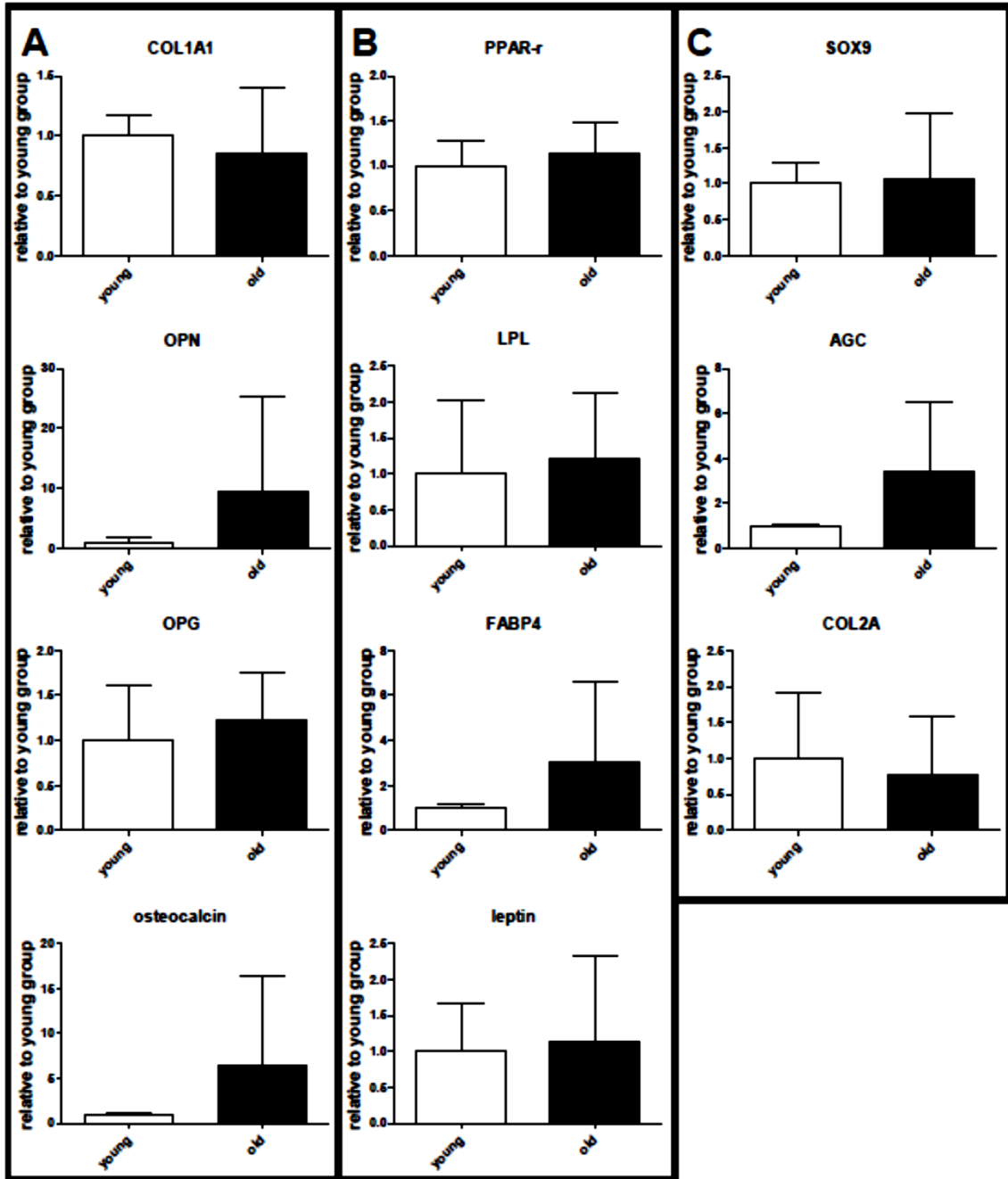


圖 9 不同個體年齡之 cBMSCs 其三系細胞分化標記基因表現量。

不同個體年齡之骨髓間葉幹細胞分化後於(A)硬骨分化標誌基因：早期 COL1A1，中期 OPN、OPG，晚期 osteocalcin；(B)脂肪分化標誌基因：早期 PPAR- γ 、LPL、中期 FABP4、晚期 leptin 及 (C)軟骨分化標誌基因：早期 SOX9、中期 AGC，晚期 COL2A 之表現量沒有顯著差異。

Fig.9 The expression profile of differentiation marker genes in cBMSCs between ages.

The data show no difference in the expression profiles of (A) osteogenesis, (B) adipogenesis, (C) chondrogenesis marker genes between ages. (mean \pm SD, n=3, unpaired *t*-test)



3.2.2.5 安全性分析

根據前人於小鼠之研究，CCL5 於骨髓間葉幹細胞之表現與移植受體內源性腫瘤細胞增生與轉移有密切之正相關(Karnoub et al., 2007)。故利用測定 CCL5 之表現量以推估不同個體年齡其相對安全之繼代數。結果顯示如圖 10，以幼年組 P4 為依準而得之各組 CCL5 表現相對量，幼年組經體外培養後其 CCL5 表現量皆略高於年老組且 CCL5 並不會隨繼代數而有表現量之差異。

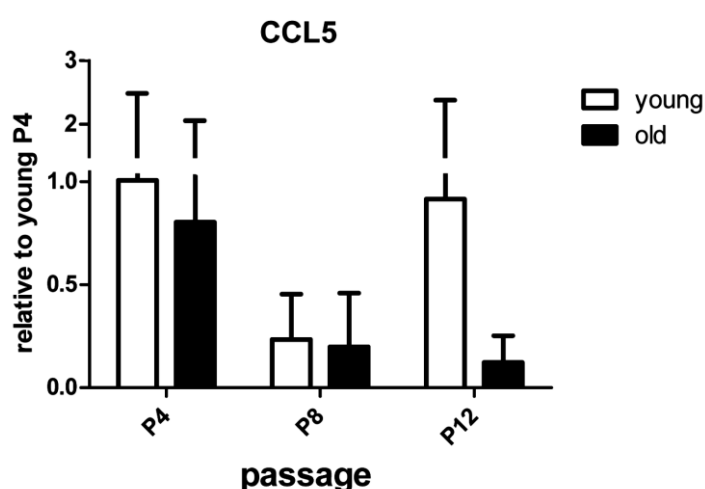


圖 10 不同年齡與繼代數其 CCL5 相對表現量之分析。

結果顯示，各組別相對於幼年組 P4 CCL5 之相對表現量並沒有差異，且隨著繼代數增加，其 CCL5 表現量亦沒有顯著變化。

Fig.10 The CCL5 expression level in cBMSCs between ages and passages

The result indicates CCL5 expression level of old group is lower than young group, and there is no difference between ages and passages. (mean±SD, n= 3; two way-ANOVA)



3.2.3 安樂死後犬骨髓間葉幹細胞之建立與特性比較

在樣本數累積期間，由台大動物醫院捐贈大體採集紀錄可知（表 6），於兩年多來共有 11 位捐贈大體，成功獲取 cBMMSCs 的案件有 6 例（54.55 %），剩餘 5 例（45.45 %）骨髓抽取失敗；而成功獲取 cEMSCs 的案件有 8 例（72.73 %），剩餘 3 例（27.27 %）則受到微生物汙染。11 位大體安樂死之原因中，有 6 例（54.55 %）患有惡性腫瘤，接受長期藥物治療的則有兩例（18.18 %）。由收容所執行安樂死之大體紀錄可知（表 7），7 位大體捐贈中，成功獲取 cBMMSCs 的案件有 6 例（85.79 %），剩餘 1 例（14.28 %）骨髓抽取失敗；而成功獲取 cEMSCs 的案件有 5 例（71.43 %），剩餘 2 例（28.57 %）則受到微生物汙染。

表 6 醫院捐贈大體採集紀錄。

Table 6 Background information of the euthanasia case from hospital.

case	BMMSC	EMSC	The reason of euthanasia
20110115	-	+	CNS inflammatory disease (NME) *
20110225	+	+	Tumor (Bladder&Testicles)
20111102	-	+	Spinal fracture and subluxation
20120418	+	+	spinal subluxation
20110125	+	+	Brain disease
20111220	-	+	suspected spinal meningioma*
20111201	-	×	cryptorchidism, testicular tumor
20120712	+	×	suspected meningioma
20111020	-	×	tumor (Brain)
20120830	+	+	T13 spinal fracture
20121201	+	+	tumor metastasis

+ represent MSCs isolation is successful, - represent none bone marrow harvested or isolated, * represent long-term medication, × represent microorganism contamination.

表 7 收容所大體採集紀錄。

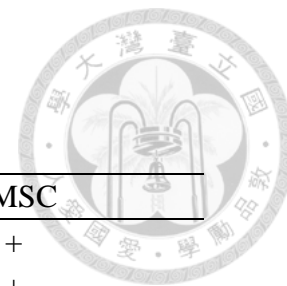


Table 7 Information of euthanasia case from shelter.

case	BMMSC	EMSC
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	-	×
5	+	+
6	+	×
7	+	+

+ represent MSCs isolation is successful, - represent none bone marrow harvested, × represent microorganism contamination.

由此可知安樂死後犬骨髓液之取得，可能因血液凝結等因素而導致取樣較受限制，因此參考鄭等人(Cheng et al., 2012)於小鼠研究中發現，骨骺亦可分離出間葉幹細胞，且骨骺來源之間葉幹細胞生長與分化能力皆優於骨髓間葉幹細胞。本階段試驗設計在於調查安樂死後犬骨骺間葉幹細胞之分離流程之可行性，並探討其細胞特性是否與異於骨髓間葉幹細胞，以建立捐贈大體骨骺間葉幹細胞分離之標準執程序，並於間葉幹細胞臨床應用上提供另一種新選擇。

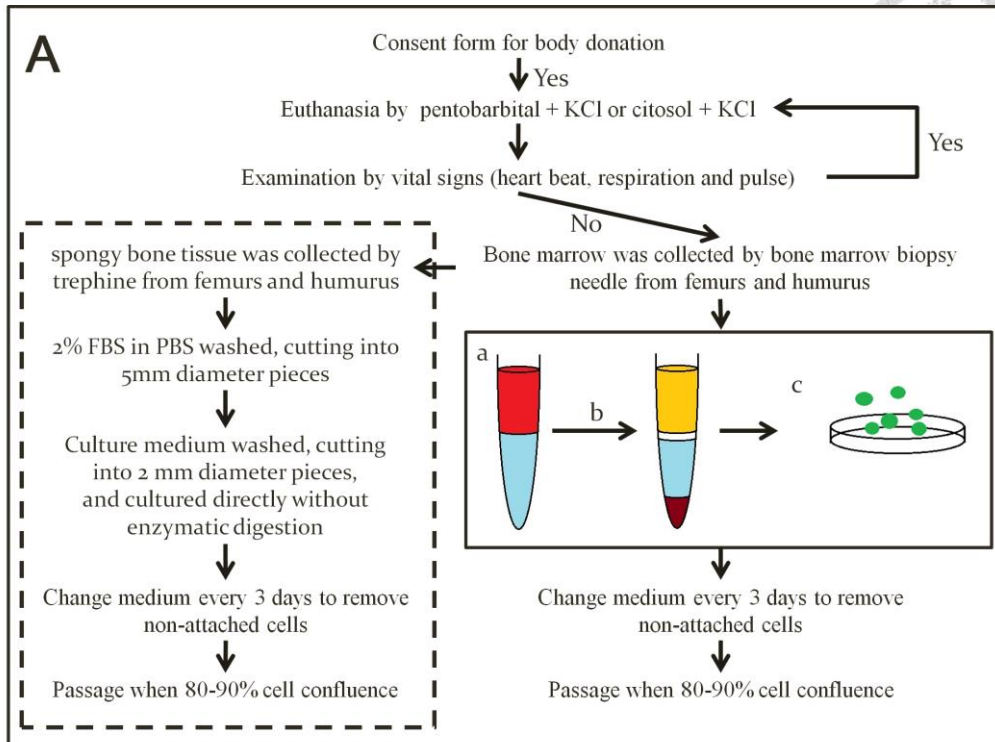
3.2.3.1 犬骨骺間葉幹細胞之建立與定性分析

骨骺樣品源自於骨骺內生長板之海綿組織，將其剪碎後不需經由任何酵素作用即可直接培養於細胞培養液中，流程如圖 11A 中之虛線框線內所示。由於是以組織塊直接培養，可發現在第一代培養過程中有其他型態之細胞參雜其中，須利用塑料貼附性差異經由更換培養液來去除脂肪油滴及其他貼附性較差之血球細胞；並於繼代時利用 trypsin 作用，將貼附性較強之血球細胞去除。相較於骨髓間葉幹細胞，其第一代培養約 5 天亦可看見貼盤生長之細胞，其細胞型態相似於骨髓間葉幹細胞（圖 11B），能自我更新且具群落形成能力，與 Friedenstein 等人

(Friedenstein et al., 1970)所發現之細胞特性相符。

骨髓間葉幹細胞經體外培養至第 4 代，而後以相同方式進行表面抗原染色並以流式細胞儀分析。結果顯示(圖 12)，血球系細胞標誌抗原 CD34(0.01 % of positive cells)與 CD45R(0.73 % of positive cells)呈陰性；間葉幹細胞常見抗原 CD44(92.92 % of positive cells)與 CD90 (99.92 % of positive cells) 呈陽性，與骨髓間葉幹細胞表面抗原分布情形相同。





B

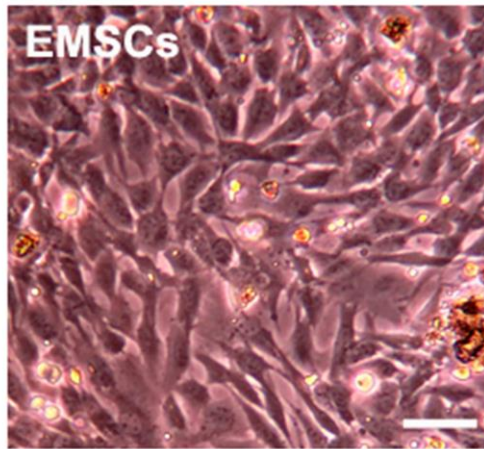


圖 11 安樂死後犬隻骨骺與骨髓間葉幹細胞分離法與細胞型態之比較。

(A) 虛線框線：骨髓液採取完畢之後，以環鑽從近體端生長板垂直下針將骨骺剖開，以取出海綿骨組織。將組織塊以含 2% FBS 之 PBS 沖洗並清除周圍結締組織後，剪碎成直徑約 2 mm 之組織塊後，不經任何酵素作用即可直接以細胞培養液。

(B) 第一代培養之 EMSCs 與 BMMSCs 有相同的細胞特性與相似的細胞型態。

Fig. 11. The comparison of both isolation method and cell morphology in cEMSCs and cBMMSCs.

A. Dash-line figure: After bone marrow harvest, sponge bone tissue was harvested by trephine from proximal humerus and femur. Tissue was washed with PBS contained 2% FBS and cut into 2 mm diameter pieces, then cultured directly in culture medium without enzymatic digestion. B. Plastic-attached cells of primary culture shared the same morphology of BMMSCs were called EMSCs. Scale bar represents 100 μm .

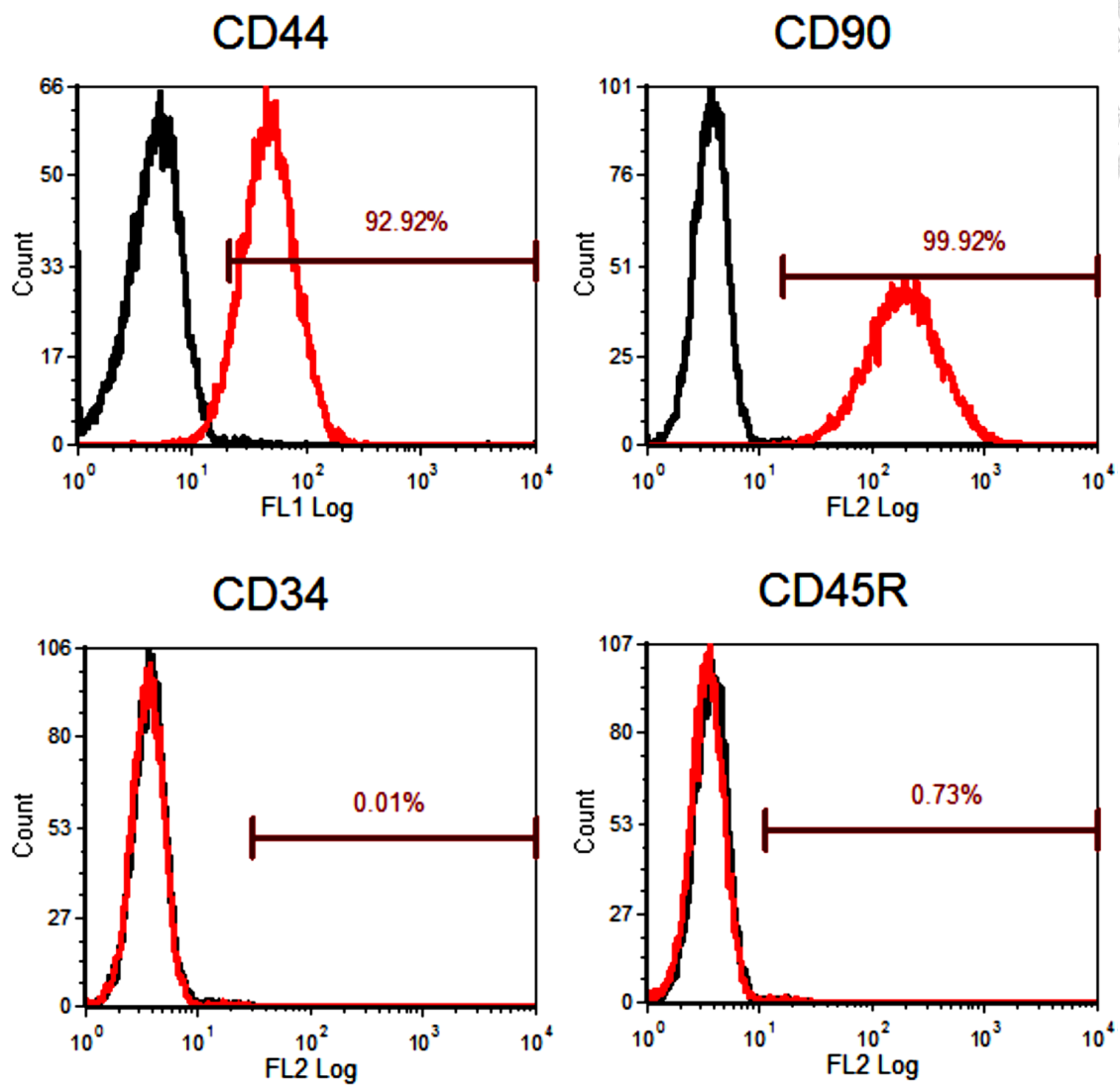


圖 12 安樂死後犬骨骺間葉幹細胞之表面抗原分析。

結果顯示骨骺間葉幹細胞之表面抗原分布情形與骨髓間葉幹細胞相同。

Fig.12 The immunophenotype profile of cEMSCs

The surface marker profile of cEMSCs is the same as cBMMSCs.

3.2.3.2 犬骨骺與骨髓間葉幹細胞之特性比較

將骨骺間葉幹細胞依採集位置個別進行體外培養後，利用 Giemsa 染色計算群落形成單位以代表其群落形成能力，暗示在同等細胞數中其具有自我更新能力之細胞數量，以茲表示不同部位之分離效率，並與骨髓間葉幹細胞比較。結果顯示，骨髓間葉幹細胞 (30.53 ± 9.010 CFUs) 與骨骺間葉幹細胞 (24.32 ± 8.357 CFUs) 其群落形成能力沒有顯著差異 (圖 13A)，而骨骺間葉幹細胞在部位 (圖 13B) 及個體年齡 (圖 13C) 間其群落形成能力亦沒有顯著差異。

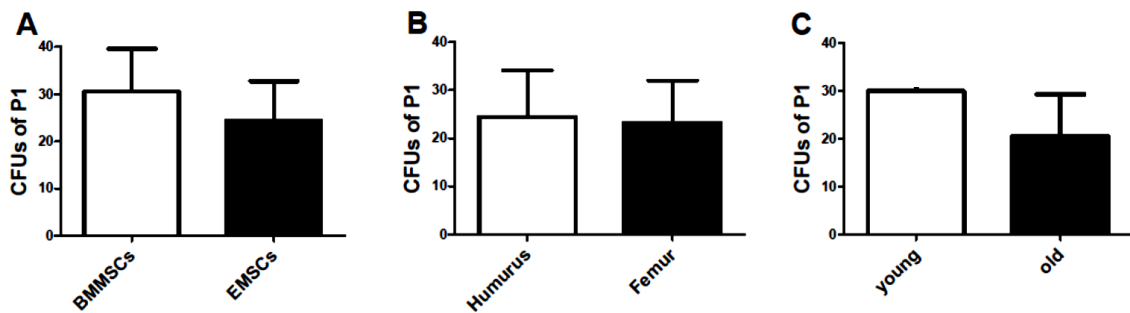


圖 13 安樂死後犬骨骺間葉幹細胞之群落形成能力。

骨髓與骨骺間葉幹細胞其群落形成能力 (A) 沒有明顯差異，在部位 (B) 及個體年齡 (C) 間，骨骺間葉幹細胞之群落形成能力亦沒有明顯不同。

Fig.13 Clonogenicity of cEMSCs

A, There is no difference in clonogenic formation ability between cEMSCs and cBMMSCs. B, C There is no difference in clonogenicity of cEMSCs from various anatomical origins (B) and ages of donors (C). (mean±SD; A, n=6,5; unpaired *t*-test; B, n=4,4; unpaired *t*-test; C, n=2,3; unpaired *t*-test)

將骨骺間葉幹細胞經體外培養至第 4 代後以同等起始細胞數培養，並以 MTT 比色法測定細胞總數，以比較骨骺與骨髓間葉幹細胞之生長能力。由生長曲線可知（圖 14A）骨骺與骨髓間葉幹細胞於 48 小時起進入指數生長期且骨骺間葉幹細胞之細胞增殖速度於 72 小時有略高於骨髓間葉幹細胞之傾向。從指數生長期推算之細胞倍增時間可發現，骨骺間葉幹細胞之倍增時間（ 17.58 ± 6.290 hrs）與骨髓間葉幹細胞（ 24.48 ± 4.464 hrs）沒有差異（圖 14B）。

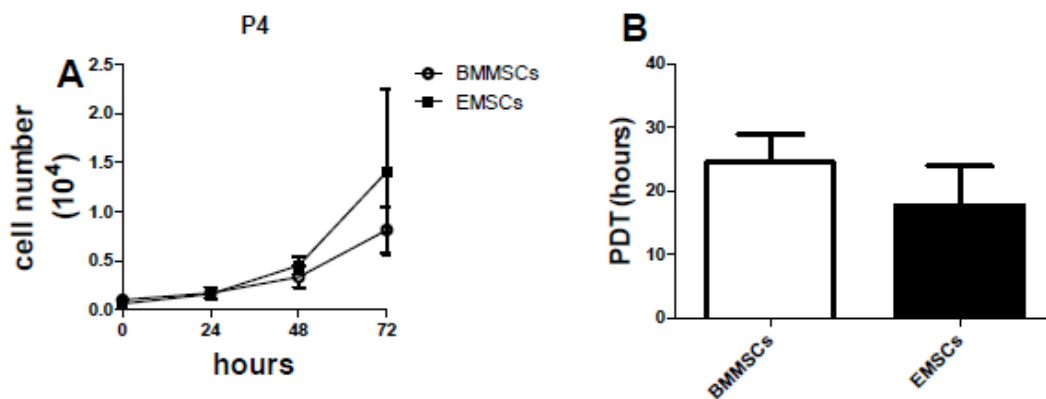


圖 14 犬骨骺與骨髓間葉幹細胞之生長能力比較。

由生長曲線（A）可知骨骺與骨髓間葉幹細胞於 48 小時後進入指數生長期，進而推算其細胞倍增時間（B）可知骨骺間葉幹細胞之倍增時間（ 12.21 ± 1.366 hrs）與骨髓間葉幹細胞（ 25.82 ± 4.554 hrs）沒有差異。

Fig.14 Cell proliferation of cEMSCs

A, After 48 hours, we can observe the growth curve in both cBMMSCs and cEMSCs the entered log phase. B, According to log phase of growth curve, the PDT is no difference between cBMMSCs and cEMSCs. (mean \pm SD; A, n=4; unpaired *t*-test; B, n=4; unpaired *t*-test)

第4章 討論




由以上試驗可知，安樂死過後取得之犬骨髓液，以參考豬骨髓間葉幹細胞分離法(Hsiao et al., 2011a)可以成功分離出具塑材貼附性之單核細胞群，並能在體外培養與保存，且具有分化為三系細胞之潛能，其表面抗原之分布型態更證明此細胞群並非來自造血幹細胞系，而是屬於間葉幹細胞之系群。而與骨髓液採集過後所取得之骨骺樣本，以模擬小鼠骨骺間葉幹細胞分離法(Cheng et al., 2012)亦可成功分離出犬骨骺間葉幹細胞，其細胞外型與犬骨髓間葉幹細胞相似且具有相同表面抗原特性。

由醫院採集之樣本紀錄可發現（表 6），綜觀醫院大體捐贈數量不足且獲取 cBMMSCs 的健康程度令人存疑。另一方面而言，基於撫卹捐贈大體畜主情緒考量下，使得安樂死後的骨髓抽取手術延宕推測為骨髓液樣本因血液凝固而較難取得的因素之一，另有因疾病或藥物治療導致骨髓生成受到抑制的可能。種種因素之相較，cEMSCs 相對高的採集成功率，在建立醫院間葉幹細胞庫期間亦是值得收集的幹細胞來源之一。但是，病犬本身之疾病對其間葉幹細胞的影響，是否會對受贈犬帶來副作用，則需要進一步研究證明之。

反觀收容所大體採集紀錄（表 7）則可發現，由於安樂死後隨即進行骨髓採集以至於採集成功率相較於醫院有增加的趨勢；但骨骺間葉幹細胞的養成率則低於骨髓間葉幹細胞，可能原因在於收容所採集環境為室外露天開放場所，相較於醫院手術室，易受外源微生物污染。更有甚者，收容所安樂死之大體其病歷亦未如醫院般周全。然而，其個體健康程度一般而言應較優於醫院安樂死之大體，因此，收容所例行安樂死之大體亦可是大體來源之一。

骨髓液存在於紅骨髓中，主要存在於扁骨（flat bone）與長骨（long bone）骨



髓端鬆骨質 (spongy substance) 內。採集位置之決定，除了須能採集到足夠骨髓液外，更要求避開臟器且穿刺部位需貼近表皮以便於定位，故於人類臨床常見之採取位置為髌骨 (ilium)，其密骨質 (compact substance) 薄使進針容易、骨髓腔大使骨髓液豐富較不易被周邊血稀釋。本試驗初期亦曾嘗試自安樂死後犬隻之髌骨採集骨髓液，但發現犬髌骨骨型複雜不如人類，且採集成功率遠較股骨與肱骨低，與臨床活體採集情況並不相符，故於後續實驗中骨髓液採集位置僅為股骨與肱骨，並不包含髌骨。

人類骨髓捐贈者有適當年齡之考慮，在於年長者在損失一定量骨髓後有恢復不良之風險，因此進而探討年齡老化對於其間葉幹細胞特性是否存有差異，有研究發現年齡老化會使其骨髓間葉幹細胞之增殖能力與硬骨分化能力下降(Zhou et al., 2008)，亦有研究指出此種差異於長期體外培養下而消失(Fickert et al., 2011)。本試驗之樣本源自動物醫院與收容所，在樣本累積的過程中可發現源自動物醫院之安樂死大體年齡偏向老年，而源自收容所之安樂死大體年齡偏向壯年。為排除疾病與藥物干擾以求樣本之一致性，本試驗以收容所來源為主，其年齡分組以壯年 (3 歲以下) 與老年 (7 歲以上) 作為比較，體外培養則於本試驗培養條件下，以細胞外形正常為基準，訂定特定培養代數作為比較，以代表體外培養時間長短。由群落形成單位分析可知所分離之細胞其具有幹細胞特性：自我再生之複製能力，而可產生群落形成單位以推估第一代培養之單核細胞群含有幹細胞之比例，其群落形成單位與幹細胞比例呈正相關，若群落形成單位較多則於相同細胞數中所含幹細胞比例較高。故從試驗結果可知，第一代培養之犬骨髓與骨骺間葉幹細胞之群落形成能力並不會受個體年齡差異與採集位置而有所影響，可暗示年齡與採集位置並不會影響安樂死後之犬間葉幹細胞密度。由年老組可知，經過體外培養至第

12 代，其間葉幹細胞之群落形成能力顯著變差，表示隨著繼代數增加，幹細胞喪失其幹細胞特性。

由細胞生長曲線所推估之細胞倍增時間可知細胞增殖能力，其群落形成單位與細胞增殖能力呈負相關，若細胞倍增時間較短則細胞增殖速率較快，表示其細胞增殖能力較佳。而安樂死後犬骨骺間葉幹細胞之細胞倍增時間與骨髓間葉幹細胞相較之下沒有差異，且骨髓間葉幹細胞在年齡與採集位置上亦無顯著差異，表示年齡與採集位置並不會影響犬間葉幹細胞之細胞增殖速率。就骨髓採集位置而言，犬肱骨及股骨近體端之骨髓間葉幹細胞其數量與增殖速率沒有差異，可視為一相似骨髓間葉幹細胞群，於往後單一大體骨髓之採集量有加成效果。

經過體外培養，無論個體年齡差異，其犬骨髓間葉幹細胞仍具有穩定的表面抗原特性直到第 12 代，且發現 CD44 陽性細胞之比例會隨著繼代數增加而增長。根據前人之研究，CD44 除了為間葉幹細胞常見表面抗原外，亦與細胞癌化有關；因此，隨著繼代數增加其間葉幹細胞 CD44 陽性細胞比例之增加，可暗示其誘發細胞癌化之風險越高。故對安樂死後骨髓間葉幹細胞於臨床應用上而言，CD44 之表現量亦可成為篩選條件之一。

由分化能力分析可知，不同年齡個體之犬骨髓間葉幹細胞皆具有硬骨及脂肪分化之潛能，表示其所分離出之間葉幹細胞系群仍保有一定程度之幹性(stemness)。經由檢測不同分化時期其標誌基因表現量以表示其在相同時間內之分化程度，若分化程度較高則分化潛能較佳，表示其幹細胞轉化程度較低，保留有較原始之幹性。故以分化能力分析，可發現犬間葉幹細胞之分化能力與個體年齡沒有顯著差異，可暗示個體年齡的老化並不會影響其幹細胞分化能力，此與 Zhou 等人於人類骨髓間葉幹細胞的研究發現年齡老化會使硬骨分化能力下降(Zhou et al., 2008)不

符，但有 Fickert 等人之研究指出此種差異於長期體外培養下而消失(Fickert et al., 2011)，因此若縮短體外培養時間，亦有可能出現與 Zhou 等人相同的結果。

根據前人之研究(Karnoub et al., 2007)，小鼠骨髓間葉幹細胞所分泌 CCL5 會藉由 CCR5(chemokine receptor 5)增加移植受體內源性乳癌細胞的行動力(mobility)、侵入 (invasion) 及轉移 (metastasis)。因此，藉由觀察 CCL5 表現量以評估犬間葉幹細胞經體外培養一段時間後於臨床應用之安全性。由本試驗結果可知，安樂死後犬骨髓間葉幹細胞之 CCL5 表現量並不會隨繼代數增加與個體年齡不同而有所差異，幼年組之 CCL5 表現量綜合而言有略高於老年組之趨勢，暗示間葉幹細胞經體外培養後其誘發移植受體罹癌風險不受個體年齡的影響。

將以上各試驗結果作圖分析，可看出各樣本數據之標準偏差頗大，乃因於捐贈個體並非實驗動物，因此個體年齡差異之因素並非絕對單純，亦可能有疾病或藥物治療等其他因素介入，尚需要更多的樣本數以確定實驗真實性。


第5章 結論

本試驗參考豬骨髓間葉幹細胞及小鼠骨骺間葉幹細胞之分離方式所取得之安樂死後犬間葉幹細胞，並不會受個體年齡、採集位置而影響到分離效率與細胞增殖速率。

伴隨體外培養，其細胞表面抗原特性仍維持恆定且與個體年齡無關，且 CD44 之陽性細胞比例無論個體年齡皆會與繼代數呈正相關，以 CD44 之作用而言，其表現量增加亦有可能增加癌化風險，可作為選拔條件之一。以分化能力分析得知，本試驗分離出之安樂死後骨髓間葉幹細胞仍保有一定程度之幹性，且其分化能力與個體年齡老化沒有關係。而 CCL5 之表現量並未隨繼代數與個體年齡增加而有所差異，幼年個體之 CCL5 表現量有略高於老年個體之趨勢。

綜合上述，以本試驗之分離法能成功取得安樂死後犬之間葉幹細胞，於此大體捐贈成為另一項成體幹細胞供應來源，且分離效率與細胞增殖速率不受限於個體年齡。以幹細胞特性分析，幼年個體與老年個體之骨髓間葉幹細胞其分化能力沒有差異，且隨著繼代數增加，其間葉幹細胞之癌化風險亦有可能增加。

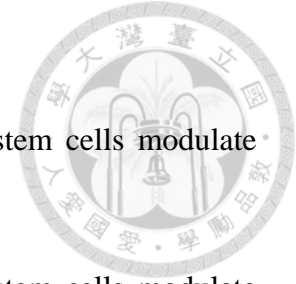
第6章 未來展望



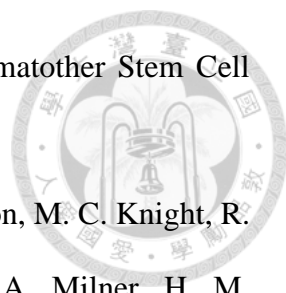
本試驗所分離出之骨髓間葉幹細胞其細胞特性仍有許多尚未明瞭之處。根據前人之研究，相較於小鼠骨髓間葉幹細胞，小鼠骨髓間葉幹細胞其細胞增殖效率、分化能力皆較優異，可視為另一群潛力較高之間葉幹細胞系群。且安樂死後犬骨髓液在一段時間之後便難以取得，於此，骨髓組織之取得則容易許多。因此，骨髓間葉幹細胞於安樂死後之個體採集之成功率是大於骨髓間葉幹細胞，其仍有一定程度之重要性。而個體年齡差異是否確實造成其骨髓間葉幹細胞分化能力之差異，仍需要更多的樣本數以期達成統計上之分析。至於安全性分析尚有不足，檢測其端粒酶活性、活體皮下注射分析腫瘤生成之可能性是未來勢必要探討的試驗之一。

另外，相似於人類骨髓捐贈中心，捐贈者會先以血樣做特定病原分析以避免受贈者傳染疾病之風險；安樂死後犬隻生前若無詳盡病歷可循，如：來自收容所安樂死之大體，亦可比照人類以血樣先做病原分析。由於骨髓為造血中心，有遭受經血液傳播之病原感染的可能性及採集骨髓液過程中亦有可能受到周邊血污染，因此，感染篩檢病原之選擇，應以會藉由血液傳播之病原為主要篩檢對象，而後進一步做到特定病原分析。

REFERENCES



- Aggarwal, S., and M. F. Pittenger. 2005a. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105: 1815-1822.
- Aggarwal, S., and M. F. Pittenger. 2005b. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105: 1815-1822.
- Akiyama, K., C. Chen, D. D. Wang, X. T. Xu, C. Y. Qu, T. Yamaza, T. Cai, W. J. Chen, L. Y. Sun, and S. T. Shi. 2012. Mesenchymal-Stem-Cell-Induced Immunoregulation Involves FAS-Ligand-/FAS-Mediated T Cell Apoptosis. *Cell stem cell* 10: 544-555.
- Alexanian, A. R., and M. Sieber-Blum. 2003. Differentiating adult hippocampal stem cells into neural crest derivatives. *Neuroscience* 118: 1-5.
- Arinze, T. L., S. J. Peter, M. P. Archambault, C. van den Bos, S. Gordon, K. Kraus, A. Smith, and S. Kadiyala. 2003. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 85-A: 1927-1935.
- Ben-Porath, I., M. W. Thomson, V. J. Carey, R. Ge, G. W. Bell, A. Regev, and R. A. Weinberg. 2008. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature genetics* 40: 499-507.
- Bi, B., R. Schmitt, M. Israilova, H. Nishio, and L. G. Cantley. 2007. Stromal cells protect against acute tubular injury via an endocrine effect. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18: 2486-2496.
- Bjornson, C. R. R., R. L. Rietze, B. A. Reynolds, M. C. Magli, and A. L. Vescovi. 1999. Turning brain into blood: A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283: 534-537.
- Bottai, D., R. Fiocco, F. Gelain, L. Defilippis, R. Galli, A. Gritti, and L. A. Vescovi.

- 
2003. Neural stem cells in the adult nervous system. *J Hematother Stem Cell Res* 12: 655-670.
- Calvi, L. M., G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F. R. Bringhurst, L. A. Milner, H. M. Kronenberg, and D. T. Scadden. 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425: 841-846.
- Campagnoli, C., I. A. Roberts, S. Kumar, P. R. Bennett, I. Bellantuono, and N. M. Fisk. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98: 2396-2402.
- Caplan, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 9: 641-650.
- Caplan, A. I., and S. P. Bruder. 2001. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in molecular medicine* 7: 259-264.
- Caplan, A. I., and J. E. Dennis. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of cellular biochemistry* 98: 1076-1084.
- Carrade, D. D., and D. L. Borjesson. 2013. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells in Veterinary Species. *Comparative Med* 63: 207-217.
- Chagraoui, J., A. Lepage-Noll, A. Anjo, D. Uzan, and P. Charbord. 2003. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. *Blood* 101: 2973-2982.
- Cheng, C. C., W. S. Lian, F. S. Hsiao, I. H. Liu, S. P. Lin, Y. H. Lee, C. C. Chang, G. Y. Xiao, H. Y. Huang, C. F. Cheng, W. T. Cheng, and S. C. Wu. 2012. Isolation and characterization of novel murine epiphysis derived mesenchymal stem cells. *Plos One* 7: e36085.

Childers, M. K., C. S. Okamura, D. J. Bogan, J. R. Bogan, M. J. Sullivan, and J. N. Kornegay. 2001. Myofiber injury and regeneration in a canine homologue of Duchenne muscular dystrophy. *American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists* 80: 175-181.

Chiou, S. H., C. C. Yu, C. Y. Huang, S. C. Lin, C. J. Liu, T. H. Tsai, S. H. Chou, C. S. Chien, H. H. Ku, and J. F. Lo. 2008. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14: 4085-4095.

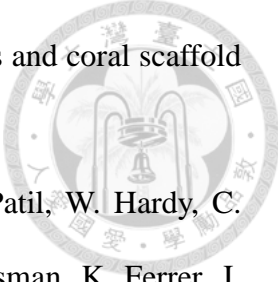
Chivu, M., S. O. Dima, C. I. Stancu, C. Dobrea, V. Uscatescu, L. G. Necula, C. Bleotu, C. Tanase, R. Albulescu, C. Ardeleanu, and I. Popescu. 2009. In vitro hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells under differential exposure to liver-specific factors. *Transl Res* 154: 122-132.

Choi, S. A., H. S. Choi, K. J. Kim, D. S. Lee, J. H. Lee, J. Y. Park, E. Y. Kim, X. Li, H. Y. Oh, and M. K. Kim. 2012. Isolation of canine mesenchymal stem cells from amniotic fluid and differentiation into hepatocyte-like cells. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*.

Colter, D. C., R. Class, C. M. DiGirolamo, and D. J. Prockop. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *P Natl Acad Sci USA* 97: 3213-3218.

Cooper, B. J., N. J. Winand, H. Stedman, B. A. Valentine, E. P. Hoffman, L. M. Kunkel, M. O. Scott, K. H. Fischbeck, J. N. Kornegay, R. J. Avery, and et al. 1988. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* 334: 154-156.

Cui, L., B. Liu, G. Liu, W. Zhang, L. Cen, J. Sun, S. Yin, W. Liu, and Y. Cao. 2007.

- 
- Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials* 28: 5477-5486.
- Devine, S. M., A. M. Bartholomew, N. Mahmud, M. Nelson, S. Patil, W. Hardy, C. Sturgeon, T. Hewett, T. Chung, W. Stock, D. Sher, S. Weissman, K. Ferrer, J. Mosca, R. Deans, A. Moseley, and R. Hoffman. 2001. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 29: 244-255.
- Dezawa, M., H. Ishikawa, Y. Itokazu, T. Yoshihara, M. Hoshino, S. Takeda, C. Ide, and Y. Nabeshima. 2005. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* 309: 314-317.
- Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, M. Magni, M. Milanese, P. D. Longoni, P. Matteucci, S. Grisanti, and A. M. Gianni. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99: 3838-3843.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, D. S. Krause, R. J. Deans, A. Keating, D. J. Prockop, and E. M. Horwitz. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317.
- Erices, A., P. Conget, and J. J. Minguell. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109: 235-242.
- Fan, C. G., F. W. Tang, Q. J. Zhang, S. H. Lu, H. Y. Liu, Z. M. Zhao, B. Liu, Z. B. Han, and Z. C. Han. 2005. Characterization and neural differentiation of fetal lung mesenchymal stem cells. *Cell transplantation* 14: 311-321.
- Fickert, S., U. Schroter-Bobsin, A. F. Gross, U. Hempel, C. Wojciechowski, C. Rentsch, D. Corbeil, and K. P. Gunther. 2011. Human mesenchymal stem cell

- proliferation and osteogenic differentiation during long-term ex vivo cultivation is not age dependent. *Journal of bone and mineral metabolism* 29: 224-235.
- Filioli Uranio, M., L. Valentini, A. Lange-Consiglio, M. Caira, A. C. Guaricci, A. L'Abbate, C. R. Catacchio, M. Ventura, F. Cremonesi, and M. E. Dell'Aquila. 2011. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. *Molecular reproduction and development* 78: 361-373.
- 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 and tissue kinetics* 3: 393-403.
- Fu, X., L. Fang, X. Li, B. Cheng, and Z. Sheng. 2006. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 14: 325-335.
- Fujita, J., H. Kawada, K. Kinjo, Y. Matsuzaki, Y. Itabashi, M. Yoshioka, S. Yuasa, K. Hayashida, T. Manabe, K. Matsumura, H. Kawaguchi, J. Endou, M. Ieda, Y. Hisaka, T. Yagi, H. Kanazawa, M. Yata, K. Shimoji, M. Tsuma, H. Miyatake, Y. Muguruma, H. Okano, T. Hotta, K. Andou, and K. Fukuda. 2004. The origin of bone marrow-derived cardiomyocytes is nonhematopoietic: Possible contribution of mesenchymal stem cells. *Circulation* 110: 70-70.
- Goh, E. L., D. Ma, G. L. Ming, and H. Song. 2003. Adult neural stem cells and repair of the adult central nervous system. *J Hematother Stem Cell Res* 12: 671-679.
- Gronthos, S., M. Mankani, J. Brahimi, P. G. Robey, and S. Shi. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*

97: 13625-13630.

Guercio, A., P. Di Marco, S. Casella, V. Cannella, L. Russotto, G. Purpari, S. Di Bella, and G. Piccione. 2012a. Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell Biol Int* 36: 189-194.

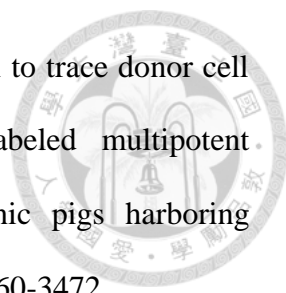
Guercio, A., P. Di Marco, S. Casella, V. Cannella, L. Russotto, G. Purpari, S. Di Bella, and G. Piccione. 2012b. Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell Biol Int* 36: 189-194.

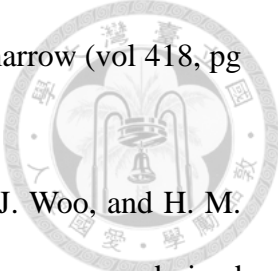
Henthorn, P. S., R. L. Somberg, V. M. Fimiani, J. M. Puck, D. F. Patterson, and P. J. Felsburg. 1994. IL-2R gamma gene microdeletion demonstrates that canine X-linked severe combined immunodeficiency is a homologue of the human disease. *Genomics* 23: 69-74.

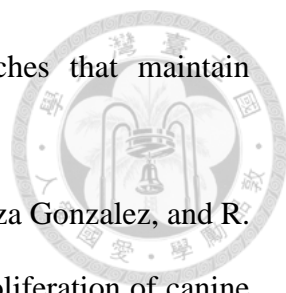
Herrera, M. B., B. Bussolati, S. Bruno, L. Morando, G. Mauriello-Romanazzi, F. Sanavio, I. Stamenkovic, L. Biancone, and G. Camussi. 2007. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. *Kidney international* 72: 430-441.

Hsiao, F. S., W. S. Lian, S. P. Lin, C. J. Lin, Y. S. Lin, E. C. Cheng, C. W. Liu, C. C. Cheng, P. H. Cheng, S. T. Ding, K. H. Lee, T. F. Kuo, C. F. Cheng, W. T. Cheng, and S. C. Wu. 2011a. Toward an ideal animal model to trace donor cell fates after stem cell therapy: production of stably labeled multipotent mesenchymal stem cells from bone marrow of transgenic pigs harboring enhanced green fluorescence protein gene. *J Anim Sci* 89: 3460-3472.

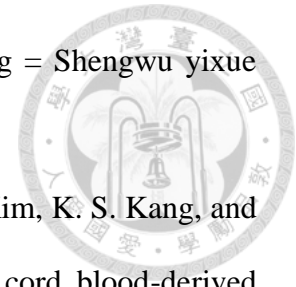
Hsiao, F. S. H., W. S. Lian, S. P. Lin, C. J. Lin, Y. S. Lin, E. C. H. Cheng, C. W. Liu, C. C. Cheng, P. H. Cheng, S. T. Ding, K. H. Lee, T. F. Kuo, C. F. Cheng, W. T. K.

- 
- Cheng, and S. C. Wu. 2011b. Toward an ideal animal model to trace donor cell fates after stem cell therapy: Production of stably labeled multipotent mesenchymal stem cells from bone marrow of transgenic pigs harboring enhanced green fluorescence protein gene. *J Anim Sci* 89: 3460-3472.
- Hughey, C. C., V. L. Johnsen, L. L. Ma, F. D. James, P. P. Young, D. H. Wasserman, J. N. Rottman, D. S. Hittel, and J. Shearer. 2012. Mesenchymal stem cell transplantation for the infarcted heart: a role in minimizing abnormalities in cardiac-specific energy metabolism. *Am J Physiol-Endoc M* 302: E163-E172.
- Ichim, T. E., D. T. Alexandrescu, F. Solano, F. Lara, N. Campion Rde, E. Paris, E. J. Woods, M. P. Murphy, C. A. Dasanu, A. N. Patel, A. M. Marleau, A. Leal, and N. H. Riordan. 2010. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cellular immunology* 260: 75-82.
- In 't Anker, P. S., S. A. Scherjon, C. Kleijburg-van der Keur, W. A. Noort, F. H. Claas, R. Willemze, W. E. Fibbe, and H. H. Kanhai. 2003. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102: 1548-1549.
- Jang, B. J., Y. E. Byeon, J. H. Lim, H. H. Ryu, W. H. Kim, Y. Koyama, M. Kikuchi, K. S. Kang, and O. K. Kweon. 2008. Implantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells mixed with beta-tricalcium phosphate enhances osteogenesis in bone defect model dogs. *Journal of veterinary science* 9: 387-393.
- Jiang, Y. H., B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. B. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada, and C. M. Verfaillie. 2007.

- 
- Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow (vol 418, pg 41, 2002). *Nature* 447: 879-880.
- Jung, D. I., J. Ha, B. T. Kang, J. W. Kim, F. S. Quan, J. H. Lee, E. J. Woo, and H. M. Park. 2009. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *Journal of the neurological sciences* 285: 67-77.
- Kadiyala, S., R. G. Young, M. A. Thiede, and S. P. Bruder. 1997. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell transplantation* 6: 125-134.
- Kamishina, H., J. Deng, T. Oji, J. A. Cheeseman, and R. M. Clemmons. 2006. Expression of neural markers on bone marrow-derived canine mesenchymal stem cells. *American journal of veterinary research* 67: 1921-1928.
- Kanazawa, H., Y. Fujimoto, T. Teratani, J. Iwasaki, N. Kasahara, K. Negishi, T. Tsuruyama, S. Uemoto, and E. Kobayashi. 2011. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Hepatic Ischemia Reperfusion Injury in a Rat Model. *Plos One* 6.
- Kang, B. J., H. H. Ryu, S. S. Park, Y. Koyama, M. Kikuchi, H. M. Woo, W. H. Kim, and O. K. Kweon. 2012. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *Journal of veterinary science* 13: 299-310.
- Karnoub, A. E., A. B. Dash, A. P. Vo, A. Sullivan, M. W. Brooks, G. W. Bell, A. L. Richardson, K. Polyak, R. Tubo, and R. A. Weinberg. 2007. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449: 557-563.

- 
- Kiel, M. J., and S. J. Morrison. 2008. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 8: 290-301.
- Kisiel, A. H., L. A. McDuffee, E. Masaoud, T. R. Bailey, B. P. Esparza Gonzalez, and R. Nino-Fong. 2012. Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. *American journal of veterinary research* 73: 1305-1317.
- Knoepfler, P. S. 2009. Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells* 27: 1050-1056.
- Koc, O. N., S. L. Gerson, B. W. Cooper, S. M. Dyhouse, S. E. Haynesworth, A. I. Caplan, and H. M. Lazarus. 2000. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 18: 307-316.
- Kopen, G. C., D. J. Prockop, and D. G. Phinney. 1999a. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10711-10716.
- Kopen, G. C., D. J. Prockop, and D. G. Phinney. 1999b. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *P Natl Acad Sci USA* 96: 10711-10716.
- Lamerato-Kozicki, A. R., K. M. Helm, C. M. Jubala, G. C. Cutter, and J. F. Modiano. 2006. Canine hemangiosarcoma originates from hematopoietic precursors with potential for endothelial differentiation. *Exp Hematol* 34: 870-878.
- Li, Q., X. Xu, Z. Wang, W. Liu, and Z. Li. 2007. [Investigation of canine mesenchymal stem cells differentiation to vascular endothelial cell in vitro]. *Sheng wu yi xue*

gong cheng xue za zhi = Journal of biomedical engineering = Shengwu yixue
gongchengxue zazhi 24: 1348-1351.



Lim, J. H., Y. E. Byeon, H. H. Ryu, Y. H. Jeong, Y. W. Lee, W. H. Kim, K. S. Kang, and O. K. Kweon. 2007. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. *Journal of veterinary science* 8: 275-282.

Mahmood, A., D. Lu, M. Lu, and M. Chopp. 2003. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* 53: 697-702; discussion 702-693.

Markert, C. D., A. Atala, J. K. Cann, G. Christ, M. Furth, F. Ambrosio, and M. K. Childers. 2009. Mesenchymal stem cells: emerging therapy for Duchenne muscular dystrophy. *PM & R : the journal of injury, function, and rehabilitation* 1: 547-559.

Mias, C., O. Lairez, E. Trouche, J. Roncalli, D. Calise, M. H. Seguelas, C. Ordener, M. D. Piercecchi-Marti, N. Auge, A. N. Salvayre, P. Bourin, A. Parini, and D. Cussac. 2009. Mesenchymal Stem Cells Promote Matrix Metalloproteinase Secretion by Cardiac Fibroblasts and Reduce Cardiac Ventricular Fibrosis After Myocardial Infarction. *Stem Cells* 27: 2734-2743.

Mitsiadis, T. A., B. Omella, A. Rochat, Y. Barrandon, and C. Bari. 2007. Stem cell niches in mammals. *Experimental cell research* 313: 3377-3385.

Morigi, M., B. Imberti, C. Zoja, D. Corna, S. Tomasoni, M. Abbate, D. Rottoli, S. Angioletti, A. Benigni, N. Perico, M. Alison, and G. Remuzzi. 2004. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 15: 1794-1804.

Muguruma, Y., T. Yahata, H. Miyatake, T. Sato, T. Uno, J. Itoh, S. Kato, M. Ito, T. Hotta, and K. Ando. 2006. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood* 107: 1878-1887.

Munoz-Elias, G., A. J. Marcus, T. M. Coyne, D. Woodbury, and I. B. Black. 2004. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 4585-4595.

Neupane, M., C. C. Chang, M. Kiupel, and V. Yuzbasiyan-Gurkan. 2008. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. Part A* 14: 1007-1015.

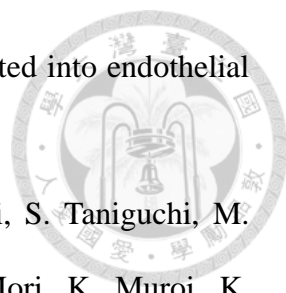
Nishida, H., M. Nakayama, H. Tanaka, M. Kitamura, S. Hatoya, K. Sugiura, Y. Suzuki, C. Ide, and T. Inaba. 2011. Evaluation of transplantation of autologous bone marrow stromal cells into the cerebrospinal fluid for treatment of chronic spinal cord injury in dogs. *American journal of veterinary research* 72: 1118-1123.

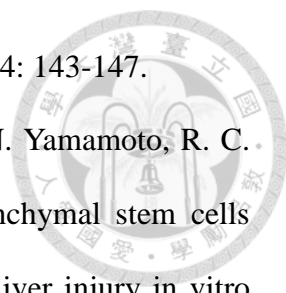
Oh, H. J., J. E. Park, M. J. Kim, S. G. Hong, J. C. Ra, J. Y. Jo, S. K. Kang, G. Jang, and B. C. Lee. 2011. Recloned dogs derived from adipose stem cells of a transgenic cloned beagle. *Theriogenology* 75: 1221-1231.

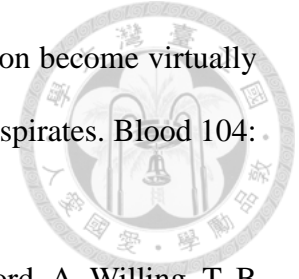
Orlic, D., J. Kajstura, S. Chimenti, F. Limana, I. Jakoniuk, F. Quaini, B. Nadal-Ginard, D. M. Bodine, A. Leri, and P. Anversa. 2001. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10344-10349.

Ostrander, E. A., F. Galibert, and D. F. Patterson. 2000. Canine genetics comes of age. *Trends in genetics : TIG* 16: 117-124.

Oswald, J., S. Boxberger, B. Jorgensen, S. Feldmann, G. Ehniger, M. Bornhauser, and

- 
- C. Werner. 2004. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 22: 377-384.
- Ozawa, Y., T. Goto, K. Ohashi, M. Murata, T. Eto, N. Kobayashi, S. Taniguchi, M. Imamura, K. Ando, S. Kato, T. Mori, T. Teshima, M. Mori, K. Muroi, K. Miyamura, and K. Ozawa. 2011. Mesenchymal Stem Cells As a Treatment for Steroid-Resistant Acute Graft Versus Host Disease (aGVHD); A Multicenter Phase I/II Study. *Blood* 118: 1311-1312.
- Park, S. B., M. S. Seo, H. S. Kim, and K. S. Kang. 2012. Isolation and characterization of canine amniotic membrane-derived multipotent stem cells. *Plos One* 7: e44693.
- Park, S. S., Y. E. Byeon, H. H. Ryu, B. J. Kang, Y. Kim, W. H. Kim, K. S. Kang, H. J. Han, and O. K. Kweon. 2011. Comparison of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell transplantation times: Involvement of astrogliosis, inflammation, intracellular actin cytoskeleton pathways, and neurotrophin. *Cell transplantation*.
- Perin, E. C., G. V. Silva, J. A. Assad, D. Vela, L. M. Buja, A. L. Sousa, S. Litovsky, J. Lin, W. K. Vaughn, S. Coulter, M. R. Fernandes, and J. T. Willerson. 2008. Comparison of intracoronary and transendocardial delivery of allogeneic mesenchymal cells in a canine model of acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 44: 486-495.
- Petersen, B. E., W. C. Bowen, K. D. Patrene, W. M. Mars, A. K. Sullivan, N. Murase, S. S. Boggs, J. S. Greenberger, and J. P. Goff. 1999. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284: 1168-1170.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak. 1999. Multilineage

- 
- potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.
- Quintanilha, L. F., T. Takami, Y. Hirose, K. Fujisawa, Y. Murata, N. Yamamoto, R. C. Goldenberg, S. Terai, and I. Sakaida. 2013. Canine mesenchymal stem cells show antioxidant properties against thioacetamide-induced liver injury in vitro and in vivo. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*.
- Raffaghello, L., G. Bianchi, M. Bertolotto, F. Montecucco, A. Busca, F. Dallegri, L. Ottonello, and V. Pistoia. 2008. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* 26: 151-162.
- Rouger, K., T. Larcher, L. Dubreil, J. Y. Deschamps, C. Le Guiner, G. Jouvion, B. Delorme, B. Lieubeau, M. Carlus, B. Fornasari, M. Theret, P. Orlando, M. Ledevin, C. Zuber, I. Leroux, S. Deleau, L. Guigand, I. Testault, E. Le Rumeur, M. Fiszman, and Y. Cherel. 2011. Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs. *The American journal of pathology* 179: 2501-2518.
- Ryu, H. H., J. H. Lim, Y. E. Byeon, J. R. Park, M. S. Seo, Y. W. Lee, W. H. Kim, K. S. Kang, and O. K. Kweon. 2009. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *Journal of veterinary science* 10: 273-284.
- Sacchetti, B., A. Funari, S. Michienzi, S. Di Cesare, S. Piersanti, I. Saggio, E. Tagliafico, S. Ferrari, P. G. Robey, M. Riminucci, and P. Bianco. 2007. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131: 324-336.
- Sakaguchi, Y., I. Sekiya, K. Yagishita, S. Ichinose, K. Shinomiya, and T. Muneta. 2004.



Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestion become virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates. *Blood* 104: 2728-2735.

Sanchez-Ramos, J., S. Song, F. Cardozo-Pelaez, C. Hazzi, T. Stedeford, A. Willing, T. B. Freeman, S. Saporta, W. Janssen, N. Patel, D. R. Cooper, and P. R. Sanberg. 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164: 247-256.

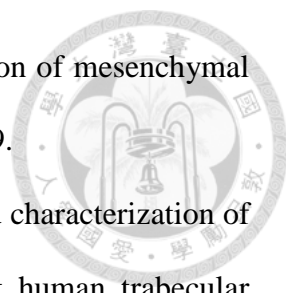
Schwartz, R. E., M. Reyes, L. Koodie, Y. Jiang, M. Blackstad, T. Lund, T. Lenvik, S. Johnson, W. S. Hu, and C. M. Verfaillie. 2002. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *The Journal of clinical investigation* 109: 1291-1302.


Seo, M. S., Y. H. Jeong, J. R. Park, S. B. Park, K. H. Rho, H. S. Kim, K. R. Yu, S. H. Lee, J. W. Jung, Y. S. Lee, and K. S. Kang. 2009. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Journal of veterinary science* 10: 181-187.

Seo, M. S., S. B. Park, and K. S. Kang. 2012. Isolation and characterization of canine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*.

Sharp, N. J., J. N. Kornegay, S. D. Van Camp, M. H. Herbstreith, S. L. Secore, S. Kettle, W. Y. Hung, C. D. Constantinou, M. J. Dykstra, A. D. Roses, and et al. 1992. An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* 13: 115-121.

Shimer, K. S., B. Landis, L. O'Rear, S. Aakula, L. Longobardi, D. Jansen, H. Moses, and A. Spagnoli. 2005. Adult bone marrow derived mesenchymal stem cell (MSC) migration in response to a fracture regeneration cue. *J Bone Miner Res* 20: S18-S18.

- 
- Short, B., S. Nilsson, N. Brouard, and P. Simmons. 2003. Purification of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Exp Hematol* 31: 99-99.
- Song, L., N. J. Young, N. E. Webb, and R. S. Tuan. 2005. Origin and characterization of multipotential mesenchymal stem cells derived from adult human trabecular bone. *Stem cells and development* 14: 712-721.
- Songsasen, N., and D. E. Wildt. 2007. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. *Animal reproduction science* 98: 2-22.
- Sperger, J. M., X. Chen, J. S. Draper, J. E. Antosiewicz, C. H. Chon, S. B. Jones, J. D. Brooks, P. W. Andrews, P. O. Brown, and J. A. Thomson. 2003. Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13350-13355.
- Tang, D. Q., L. Z. Cao, B. R. Burkhardt, C. Q. Xia, S. A. Litherland, M. A. Atkinson, and L. J. Yang. 2004. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes* 53: 1721-1732.
- Thomas, E. D. 1982. The Use and Potential of Bone-Marrow Allograft and Whole-Body Irradiation in the Treatment of Leukemia. *Cancer* 50: 1449-1454.
- Till, J. E., and E. A. McCulloch. 1980. Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochimica et biophysica acta* 605: 431-459.
- Travis, A. J., Y. Kim, and V. Meyers-Wallen. 2009. Development of new stem cell-based technologies for carnivore reproduction research. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 44 Suppl 2: 22-28.
- Vieira, N. M., V. Brandalise, E. Zucconi, M. Secco, B. E. Strauss, and M. Zatz. 2010. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell transplantation* 19: 279-289.

- 
- Wang, W. J., Y. M. Zhao, B. C. Lin, J. Yang, and L. H. Ge. 2012. Identification of multipotent stem cells from adult dog periodontal ligament. *European journal of oral sciences* 120: 303-310.
- Wenceslau, C. V., M. A. Miglino, D. S. Martins, C. E. Ambrosio, N. F. Lizier, G. C. Pignatari, and I. Kerkis. 2011. Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues: yolk sac, liver, and bone marrow. *Tissue engineering. Part A* 17: 2165-2176.
- Wickham, M. Q., G. R. Erickson, J. M. Gimble, T. P. Vail, and F. Guilak. 2003. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clinical orthopaedics and related research*: 196-212.
- Williams, J. T., S. S. Southerland, J. Souza, A. F. Calcutt, and R. G. Cartledge. 1999. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *The American surgeon* 65: 22-26.
- Wilson, A., and A. Trumpp. 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 6: 93-106.
- Won, J. H., C. H. Kim, M. K. Cho, S. C. Lee, C. K. Kim, N. S. Lee, D. S. Hong, and H. S. Park. 2007. Mesenchymal stem cells improve wound healing via early activation of the matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor: using a 3-dimensional collagen gel model. *Blood* 110: 1080a-1080a.
- Wong, D. J., H. Liu, T. W. Ridky, D. Cassarino, E. Segal, and H. Y. Chang. 2008. Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell stem cell* 2: 333-344.
- Wynn, R. F., C. A. Hart, C. Corradi-Perini, L. O'Neill, C. A. Evans, J. E. Wraith, L. J. Fairbairn, and I. Bellantuono. 2004. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of

- promoting migration to bone marrow. *Blood* 104: 2643-2645.
- Yao, Y., G. Wang, Z. Wang, C. Wang, H. Zhang, and C. Liu. 2011. Synergistic enhancement of new bone formation by recombinant human bone morphogenetic protein-2 and osteoprotegerin in trans-sutural distraction osteogenesis: a pilot study in dogs. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 69: e446-455.
- Zhang, J. W., C. Niu, L. Ye, H. Y. Huang, X. He, W. G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng, S. Harris, L. M. Wiedemann, Y. Mishina, and L. H. Li. 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425: 836-841.
- Zhou, S., J. S. Greenberger, M. W. Epperly, J. P. Goff, C. Adler, M. S. Leboff, and J. Glowacki. 2008. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging cell* 7: 335-343.
- Zhu, H., Z. K. Guo, X. X. Jiang, H. Li, X. Y. Wang, H. Y. Yao, Y. Zhang, and N. Mao. 2010. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat Protoc* 5: 550-560.
- Zucconi, E., N. M. Vieira, D. F. Bueno, M. Secco, T. Jazedje, C. E. Ambrosio, M. R. Passos-Bueno, M. A. Miglino, and M. Zatz. 2010. Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein--a novel source for cell therapy studies. *Stem cells and development* 19: 395-402.
- Zuk, P. A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz, and M. H. Hedrick. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211-228.