

國立臺灣大學牙醫專業學院臨床牙醫學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Clinical Dentistry
School of Dentistry

National Taiwan University

Master Thesis

以基質細胞衍生因子-1 alpha 在再生技術中促進骨生成與傷口
癒合

Enhancement of bone formation and wound healing by stromal
cell-derived factor-1 alpha in regenerative technique

林靖倫

Ching-Lun Lin

指導教授：林思洸 教授

Advisor: Sze-Kwan Lin, Ph.D.

中華民國 104 年 6 月

June, 2015



國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

以基質細胞衍生因子-1 alpha 在再生技術中促進
骨生成與傷口癒合

Enhancement of bone formation and wound
healing by stromal cell-derived factor-1 alpha in
regenerative technique

本論文係林靖倫君（學號 R01422020）在國立臺灣大學
牙醫專業學院臨床牙醫學研究所完成之碩士學位論文，於民
國 104 年 06 月 03 日承下列考試委員審查通過及口試及格，
特此證明

口試委員：

林昱光

（簽名）

（指導教授）
林昱光
郭志雲

系主任、所長

郭志雲

（簽名）

誌謝



大學剛畢業的時候，我對自己的生涯規劃完全懵懂。從開始有了唸研究所這個想法，到著手、完成，這一路上遇到了不少不在預期之中的事。然而幸運的我因此也接受到了許多人的幫助，讓這三年時光的拼布也比預期中更為斑斕。

若論這三年的成長，背後那雙最有力的推手，當屬我的指導教授林思洸醫師。在多方嘗試的學習中，老師給了我最多的包容。在看似自由的學習中，老師不忘提點我需要補強的弱點；在迷失方向的時候，老師導引我回到前行的路上。推手，是回頭看才能完全感受到其重要性的角色，我何其幸運，在老師強力而又溫柔的推手下度過這三年。

謝謝李苑玲醫師循序漸進的教學。除了臨床上的指導，學姊更重視學生的思考和整合，把我從嗷嗷待哺逐漸推向獨當一面的醫師。感謝學姊像親人般細心的察覺學生所面臨的困境，在我低潮時拉起我、幫助我、鞭策我，給我這麼溫暖的學習環境。學姊帶給我的不僅是臨床和學業上的成長，更是生活態度上的成長。

謝謝陳雅惠主任和陳冠良醫師，是你們開啟了我走上研究所的路。感謝你們三年來不間斷的關心我，給予我許多寶貴的意見，修正了我許多不夠成熟的想法和做法。雖然南北相隔，你們永遠是我敬重的師長。

謝謝侯國亮學長帶著我在實驗室從一無所知到完成這篇碩論，對於我總是增加你的工作量，學長從來都是毫不計較的幫我，不論多忙，始終都耐心地從頭教起，衷心的感謝！

謝謝郭生興教授及洪志遠教授口試時精闢的評論和建議。謝謝林俊彬院長、鄭景暉主任、蔡宜玲醫師平日豐富的教學。謝謝怜琇學姊的支持和鼓勵，謝謝郁安陪我走過三年來每一個晴雨，謝謝總是見義勇為的莉婷，謝謝總幫我善後的凱哥，謝謝強哥、嫩媛、翰偉學長在實驗上的指點和協助，謝謝宛瑜學姊、惠萍、佑珊、竣為、嫵伊、鈴浩、馨慧、士緯、庭宜、慧君、家秀、純瑛等診間強力的後盾，謝謝祉吟學姊、叔吟、玉鈴、淳琇、佳玲、若婷、士傑等從各地送來的暖流。三年的生活有太多人陪同，或許我漏了誰，但請相信我把感謝放在心底。

最後我要把最深的感謝獻給最親愛的媽媽，謝謝您永遠把我放在第一位，用滿滿的愛為我點亮家的燈火，您也永遠是我心中最舉足輕重、無可替代的那一位。

中文摘要



引導組織再生術 (guided tissue regeneration, GTR) 已被廣泛應用於修復組織缺損的牙科手術治療中，但對於較大範圍的組織缺損，仍需缺損區有足夠的組織再生能力才可能癒合。過去利用在骨粉 (bone graft) 中加入生長因子 (growth factor) 來提升組織再生的能力，然而生長因子的使用仍面臨許多問題。但已知生長因子能夠促使幹細胞 (stem cells) 遷移 (migration)、分化 (differentiation)，而利用吸引幹細胞以促進組織再生已成為目前主要的發展方向。基質細胞衍生因子-1 α (stromal cell-derived factor-1 α , SDF-1 α) 被認為是重要的幹細胞趨化素 (chemokine)，位在血管四周的間質幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs)，能藉由產生基質細胞衍生因子-1 α 來維持造血幹細胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 的運送和成熟，與促進血管新生和骨再生都有相關。文獻也已證實其對軟組織和硬組織癒合都有正面影響，唯文獻多以蛋白質作為研究對象，蛋白質卻受限於作用效期短、安全性及成本昂貴等問題。因此本實驗以重新建構的SDF-1 α 質體 (plasmid) 取代SDF-1 α 蛋白質進行實驗，確認此質體確能釋放出SDF-1 α 蛋白質，並且和市售的SDF-1蛋白質一樣可以吸引幹細胞遷移。未來本實驗希望以聚乙炔亞胺 (polyethylenimine, PEI) 轉染 (transfection) 的方式，完成動物實驗，以期SDF-1 α 發揮未來在臨床上應用於再生技術上的優勢。

關鍵字：基質細胞衍生因子-1、間質幹細胞、引導組織再生術、基因傳遞、慢病毒載體

Abstract



Guided tissue regeneration (GTR) has been widely used to repair tissue defects in oral surgery. The healing tendency, however, won't occur without enough tissue regenerative potential in wider range of defects. In the past, growth factors were added into bone graft to enhance tissue regeneration, but the use of growth factors still faces many problems. It is known that the growth factor can promote stem cell migration and differentiation. Attracting stem cells in order to promote tissue regeneration has become the main direction of development. Stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) is considered an important stem cell chemokine. Mesenchymal stem cells (MSCs), which are located in perivascular position, can generate SDF-1 α to maintain the delivery and maturity of hematopoietic stem cells (HSCs); furthermore, promoting angiogenesis and bone regeneration are related. Literature has also been confirmed that SDF-1 α has a positive impact on soft tissue and hard tissue healing, though most of the studies using SDF-1 α protein as the research subject. Protein was restricted to the role of the short lasting time, safety and costly; therefore, the construction of SDF-1 α plasmid to replace SDF-1 α protein was done in this experiments. The experiment confirmed this plasmid DNA can release SDF-1 α protein, moreover, it can attract stem cell migration as commercial SDF-1 α protein does. In future prospect, it is expect to be able to use polyethyleneimine (PEI) transfection method to complete animal study, in order that

SDF-1 α plays to its advantages in regenerative technique of future clinical applications.



Keywords: stromal cell-derived factor-1, mesenchymal stem cell, guided tissue regeneration, gene delivery, lentiviral vector

目錄



口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	iv
目錄.....	vi
第一章 導論.....	1
1.1 引導組織再生術與生長因子.....	1
1.2 幹細胞與組織再生.....	3
1.3 基質細胞衍生因子-1 α	4
1.4 基因傳遞與活體影像追蹤.....	6
1.4.1 生物載體.....	6
1.4.2 非病毒技術.....	7
1.4.3 非侵入式活體分子影像系統與螢光選擇.....	7
第二章 實驗目的	9
第三章 材料與方法.....	10
3.1 試劑與抗體.....	10
3.2 實驗細胞株.....	10
3.3 基因重組.....	11
3.3.1 重組基因片段放大.....	11
3.3.2 DNA接合反應.....	11
3.3.3 大腸桿菌的轉型.....	11
3.3.4 確認pLenti-C-mCherry.....	12
3.3.5 重組pLenti-T2A-C-mCherry.....	12



3.3.6 重組pLenti-SDF-1-T2A-C-mCherry.....	12
3.3.7 純化小量質體.....	13
3.3.8 純化大量質體.....	13
3.4 細胞轉染.....	14
3.5 不含細胞培養基的收集.....	14
3.6 確認mCherry螢光.....	14
3.7 細胞內蛋白質的萃取.....	14
3.8 SDF-1 α 的酶聯免疫吸附試驗.....	16
3.9 西方點墨法.....	16
3.10 幹細胞遷移試驗.....	17
第四章 實驗結果.....	18
4.1 螢光顯微鏡下mCherry的螢光表現.....	18
4.2 細胞內的mCherry蛋白質表現.....	18
4.3 不含細胞培養基的SDF-1 α 表現.....	18
4.4 SDF-1 α 蛋白質刺激VEGF表現.....	19
4.5 幹細胞遷移試驗.....	19
第五章 結論.....	20
第六章 討論.....	21
5.1 SDF-1蛋白質和質體傳遞之異同.....	21
5.2 細胞轉染與聚乙烯亞胺的臨床應用.....	22
參考文獻.....	24
附錄.....	32

第一章 導論



1.1 引導組織再生術（Guided tissue regeneration，GTR）與生長因子

缺牙、牙周病（periodontitis）、根尖周圍疾病（periapical disease）會造成組織的缺損，影響美觀與治療的成效。缺損後的組織有修復（repair）和再生（regeneration）兩種不同的癒合反應，有些治療僅能達到修復的成效，意即傷口會被組織所覆蓋，但這類組織無法完全恢復原有的結構與功能。相對的，當組織再生，傷口重新生成原始組織，所代表的意義為恢復受損組織的結構與功能。1982年Nyman等學者在病人身上成功的使用微孔膜（Millipore membrane），防止上皮細胞向下生長至骨缺損的牙根表面，使破壞的牙周組織有時間重新生成¹。這是牙科臨床治療中首次利用隔離膜（barrier membrane）覆蓋組織缺損區，讓上皮和結締組織不會干擾組織再生，1986年Gottlow等學者正式將此術式命名為引導組織再生術²。

在組織缺損較大的範圍，上皮和結締組織仍可能會干擾骨骼生長³，需藉由吸引幹細胞（stem cell）分化成為成骨細胞（osteoblasts）、牙骨質母細胞（cementoblasts）和牙周韌帶細胞（periodontal ligament cells），才能促使傷口癒合⁴。因此將生長因子（growth factor）等加入骨粉（bone graft）中，希望藉此促進組織再生，成為目前主要的發展方向。生長因子是指一群可用來刺激細胞發生增殖（proliferation）、趨化（chemotaxis）、分化（differentiation）、製造胞外基質（extracellular matrix proteins）等反應的多肽類激素（polypeptide hormones）⁵，例如：能夠刺激纖維母細胞（fibroblasts）和成骨細胞增殖的血小板衍生生長因子（platelet-derived growth factor，PDGF）和胰島素生長因子（insulin growth factor，IGF），能刺激纖維母細胞分化、成骨細胞趨化及合成胞外基質的轉化生長因子（Transforming growth factor beta，TGF- β ），會刺激內皮細胞（epithelial cells）增殖和趨化的纖維母細胞生長因子-2（Fibroblast Growth Factor-2，FGF-2）和血管內皮生長因子（vascular

endothelial growth factor, VEGF), 以及最被廣泛使用的骨形成蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs)⁶。

過去多數文獻皆顯示BMPs對於提升牙骨質 (cementum) 的形成和骨再生有顯著的成效⁷⁻¹⁰, 並有文獻指出隨著BMP-2濃度提升, 促進骨形成的能力也隨之提升¹¹。然而BMPs濃度必須達到微克 (microgram) 以上才有成效, 造成成本昂貴, 而且濃度高的BMPs可能會引起軟組織紅腫、局部發炎和異位性骨化 (heterotopic ossification) 等問題¹²。而其他的生長因子VEGF、TGF- β 、TGF- β 2、TGF- β 3多半是作為BMP-2的輔助, 但是有部分的文獻認為成效與單獨使用BMP-2無明顯差異⁴。雖然生長因子在引導組織再生術上仍有很大的研究空間, 但已知BMPs 2-4、VEGF、PDGF、FGF-2等生長因子可藉由吸引間質幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 來促進骨再生¹³。



1.2 幹細胞與組織再生

植入幹細胞能促進組織再生在動物實驗上已獲得證實¹⁴。幹細胞的臨床運用始於骨髓移植，骨髓移植之所以使病人有重生機會，主要是因為骨髓內含有間質幹細胞和造血幹細胞（hematopoiesis stem cells, HSCs）¹⁵。造血幹細胞在適當的引導下可分化成為淋巴球（lymphocytes）、顆粒球（granulocytes）、吞噬細胞（macrophages）、血小板（platelets）和紅血球（red blood cells）等細胞，間質幹細胞則與骨再生有極大相關，能分化為成骨細胞及軟骨細胞（chondrocytes）。目前發現間質幹細胞的來源除了骨髓之外，包括：髓質骨（trabecular bone）¹⁶、關節中的滑液組織（synovial tissue）¹⁶以及美容手術中抽取的脂肪（liposuction fat）¹⁷等組織中都能獲取間質幹細胞。更有學者進一步指出，間質幹細胞可能存在人類所有組織當中，以維持各組織和器官的恆定。

除了上述這些來源之外，臍帶血（umbilical cord blood）中也可取得間質幹細胞。比起骨髓受限於取得數量，以及侵入式的取得方式可能會對個體造成傷害，脂肪間質幹細胞（adipose-derived MSCs）和源自臍帶基質的間質幹細胞（umbilical cord matrix-derived MSCs）開始成為研究的新方向。目前脂肪幹細胞的效用仍有待商榷，而源自臍帶基質的間質幹細胞則被證實增生速度和骨分化速度都優於骨髓幹細胞^{18, 19}，同時也適合用於基因轉染（transfection）¹⁹。這些位在血管四周的間質幹細胞，會藉由產生基質細胞衍生因子-1 α （stromal cell-derived factor-1 alpha, SDF-1 α ）來維持造血幹細胞的運送和成熟，進一步與促進血管新生和骨再生都有關連^{14, 20}。



1.3 基質細胞衍生因子-1 α

基質細胞衍生因子-1 又名 CXCL12，是屬於 CXC 家族的趨化素 (CXC family chemokines)，共有六種不同類型。最先被發現的 SDF-1 類型是 SDF-1 α 和 SDF-1 β ，之後陸續發現 SDF-1 γ 、SDF-1 δ 、SDF-1 ϵ 和 SDF-1 ψ 。組織中含量最高的以 SDF-1 α 和 SDF-1 β 為主，主要存在於肝臟、胰臟和脾臟。SDF-1 γ 是從大鼠中分離而來，只存在於心臟組織；SDF-1 δ 在成人組織中量極少，主要存在於胎兒的肝臟裡；SDF-1 ϵ 和 SDF-1 ψ 都是微量存在於成人的胰臟和胎兒的胰臟及腎臟。哺乳類動物中，SDF-1 蛋白序列有極高的相同度，雖然存在及作用於不同的組織，但功能大致類似，目前又以 SDF-1 α 的相關研究最多²¹。SDF-1 有二個主要受器，分別是 CXCR4 和 CXCR7，SDF-1 和受器結合後，會啟動一連串的下游反應，包括提升鈣離子濃度，促進目標細胞生長和存活，以及趨化淋巴細胞、巨噬細胞、間質幹細胞等等²²。

近年有研究將 SDF-1 應用在心血管再生^{23, 24}、神經組織再生^{25, 26}、以及肝臟組織再生^{27, 28}。在與軟組織癒合的相關動物實驗方面，在糖尿病小鼠皮膚 excisional wound 的實驗模型中，局部注射 lentiviral vector-SDF-1 基因，可發現局部組織中 SDF-1 的量有所提升，並可促進傷口癒合²⁹。2010 年在豬皮膚 incisional wound 實驗模型中，以 SDF-1 蛋白質或質體 加入傷口敷料中，發現傷口癒合可加速約 40-50%，並且癒合後的傷口疤痕較不明顯³⁰。2013 年在小鼠皮膚 burn wound 實驗模型中，發現以 CXCR4 的拮抗劑 AMD3100 抑制 SDF-1/CXCR4 訊息路徑，會降低骨髓間質幹細胞的補充以及抑制傷口癒合³¹。

在與骨再生相關的動物實驗方面，在小鼠脛骨骨折的模型中，單次注射 SDF-1 蛋白質於患部，可以加速骨折癒合³²。在兔頭蓋骨缺損實驗模型中，在骨缺損處植入自體骨，並送入 SDF-1 蛋白質，結果發現，在相同的癒合程度下，SDF-1 可減少自體骨的使用量³³。最近的一個研究，以大鼠頭蓋骨缺損的引導骨再生術為模型，

將帶有SDF-1蛋白質的隔離膜蓋於骨缺損上方，結果發現8週後SDF-1組別的骨癒合量比對照組多6倍，且部分集中於隔離膜下方³⁴。

由以上研究結果可得知SDF-1對於促進軟組織癒合和骨再生皆有效果。2012年則有研究團隊在100~400 ng/ml的SDF-1濃度下進行細胞遷移（migration）的測試，發現隨著濃度提升，牙周韌帶幹細胞（periodontal ligament stem cell）的遷移有顯著提升³⁵。可知SDF-1和牙周組織再生也有關連，因此SDF-1在引導組織再生術中所扮演的角色更值得深入探討。



1.4 基因傳遞 (Gene delivery) 與活體分子影像追蹤

過去與SDF-1相關的研究，多數以植入SDF-1蛋白質的方式。植入蛋白質的作用快，但是濃度高的時候有可能會對組織產生局部的毒性，而且作用效期也比較短。如果以DNA取代蛋白質進行基因傳遞，可以提高實驗的持久度和安全性，也能降低成本。不過DNA所需要克服的缺點，就是傳遞的效率比不上蛋白質，這是在後續的實驗中需要特別注意的部分之一³⁶。

基因傳遞的方法可分為生物載體 (viral vector) 和非生物載體 (non-viral vector)，甚至也可以不借助任何載體工具而直接進行。生物載體通常是指利用病毒作為載體將遺傳物質帶入細胞的工具，可在感染宿主後，將其基因嵌入宿主細胞使其表達，經常被利用的病毒載體可分為反轉錄病毒載體 (retroviral vector)、腺病毒 (adenoviral vector) 與慢病毒載體 (lentiviral vector)。

1.4.1 生物載體

反轉錄病毒載體是最常用於基因治療實驗中的病毒載體，優點是它的感染 (infection) 率幾乎能達到100%，但是它的目標細胞受限於必須要有反轉錄病毒受體，並且只適用於分裂中的細胞。腺病毒載體則是無論細胞處於有絲分裂期或靜止期都能感染，並且能夠攜帶的治療基因比反轉錄病毒更長，又能較長時間地被冷凍在-80°C，相對穩定也易於準備。然而腺病毒載體最大的缺點是可能引起人體免疫反應，使基因只能短暫的表現，也難以重複使用，因此如何避開人體的免疫機制成為腺病毒載體設計的重要課題。另外，腺病毒載體導致的感染範圍通常是廣泛性的，難以達到局部性的使用。慢病毒載體不僅作為一般載體進行轉染的效果穩定，並幾乎可以感染所有類型的細胞，包括分裂和不分裂的細胞，特別適合用於轉染效率低的細胞，安全性也高。目前慢病毒載體可藉由分為帶有目標基因的載體部分 (lentivector) 和包裝系統 (packaging system)，來構成無致病性的偽病毒 (pseudovirus)，提升其安全性³⁷，文獻亦指出慢病毒載體並無造成宿主惡性病

變的隱憂³⁸。然而因慢病毒載體將基因嵌入宿主細胞的位置無法預測³⁹，若使用於臨床上仍有疑慮。



1.4.2 非病毒技術 (non-viral technique)

雖然病毒載體具有許多優點且獲得廣泛應用，但病毒的安全性始終是需要注意的一個問題。因此非病毒載體始終是一個重要的研究方向，例如：以脂質體 (liposome) 或陽離子聚合物 (cationic polymers) 作為非生物性載體⁴⁰。使用這類方式時，載體和DNA之間的數量比例非常重要，因為DNA是靠靜電吸附到載體表面，所以太多比例的DNA會中和載體上的正電荷，使脂質體或陽離子聚合物與細胞膜之間的融合變得困難。

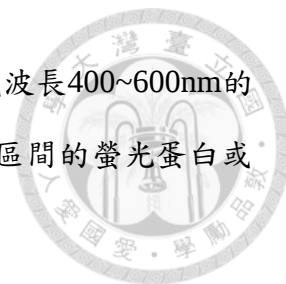
不需要借助載體的基因傳遞方式則包括磷酸鈣 (calcium phosphate) 共同沉降法和電穿孔法 (electroporation) 等等⁴⁰。然而前者傳遞效力有限，後者主要被廣泛用於各種真核細胞和細菌上，是一種適用於活體外的快捷基因傳遞方法。電穿孔法的原理是在強的脈衝電場作用下，細胞膜暫時被局部地擊穿，DNA等大分子因而可進入細胞質中，但過強或過久的電脈衝都會殺死細胞。

非病毒基因傳遞技術雖然通常效率不及病毒載體，但其除了低毒性和低免疫反應等優點外，更易於工程化、檢驗、大量生產純化的基因產物，在實驗與治療方面，越來越常作為研究方向。

1.4.3 非侵入式活體分子影像系統 (In Vivo Imaging System, IVIS) 與螢光選擇

由於實驗必須在活體動物上得到驗證，才能提升可信度及後續研究的價值，但傳統的動物實驗大多需要犧牲動物方能進行後續各項分析。IVIS是針對活體開發的非侵入式影像檢測系統，利用冷光酵素將受質代謝出生物冷光的原理，或植入螢光蛋白或染劑，利用其接受激發產生螢光之特性，以高敏感度CCD相機偵測訊號，來觀察與分析同一動物於特定時間點的反應。此系統可以降低動物使用量，並減少個體差異所造成的誤差⁴¹。以本實驗為例，IVIS可用以追蹤活體內mCherry

螢光訊息。然而以小鼠為例，因小鼠血液中的氧合血紅素會形成波長400~600nm的自體螢光，為避免干擾，使用IVIS系統的實驗設計應避開此一區間的螢光蛋白或染劑選擇⁴²。



第二章 實驗目的



已由文獻得知間質幹細胞釋出 SDF-1 α 後，SDF-1 α 便能藉由維持造血幹細胞的運送和成熟，進一步促進軟組織癒合和骨再生，甚至和牙周組織再生也有關連，未來應用於牙科治療的引導組織再生術大有可為。然而因為過去與 SDF-1 相關的研究，多數以植入 SDF-1 蛋白質的方式，然而植入蛋白質的持久度、安全性和成本考量都不及植入質體，因此本實驗的實驗目的即以 SDF-1 α 質體取代蛋白質，以足夠效率和安全性的方式進行基因傳遞，來了解 SDF-1 α 應用在再生技術上的優勢。

總結來說，本實驗要確認

1. 轉染效率是否足夠？
2. 本實驗建構的 SDF-1 α 質體是否能正確表現？
3. 經轉染後的 SDF-1 α 質體是否能釋放出 SDF-1 α 蛋白質？
4. SDF-1 α 與血管新生是否相關？
5. SDF-1 α 能否促進幹細胞的遷移？

第三章 材料與方法



3.1 試劑與抗體

OPTI-MEM (Invitrogen)、mCherry antibody (Clontech)、GAPDH antibody (Epitomics)、BCATM Protein Assay (Thermo)、OMNIfectTM (Transomic)、mSDF-1 ELISA kit (Abcam)、pLenti-C-mGFP vector plasmid (Origene)、pTRE-3G-BI-mCherry plasmid (SnapGene)、Plasmid Miniprep purification kit (GeneMark)、Maxi Plasmid Kit (Geneaid)、VEGF antibody (abcam)、HSP 70 antibody (GeneTex)、recombinant SDF-1 α protein (GeneTex)、transwell assay (Millipore)

3.2 實驗細胞株

實驗所採用的細胞株 HEK-293FT (kidney cell line from Homo sapiens and is highly transfectable) 及 U2OS (osteosarcoma from Homo sapiens with osteoblast phenotype)，均來自美國細胞庫收集中心 (ATCC) 所購得，以 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) complete growth medium (10%胎牛血清、L-glutamine、Antibiotics) 於 37 度，CO₂ 分壓 5%培養。cbMSC-Htert (imortalized human umbilical cord blood mesenchymal stem cell) 來自生物資源保存及研究中心 (BCRC)，以 α -Minimum essential medium (20%胎牛血清、Earle's BSS、L-glutamine、sodium bicarbonate、non-essential amino acids、sodium pyruvate、Human-bFGF、Hygromycin) 於 37 度，CO₂ 分壓 5%培養。



3.3 基因重組 (gene construction)

3.3.1 重組基因片段放大

將原本建構於 pLenti-C-mGFP 上的基因 mGFP 利用限制酶 XhoI、PmeI 切下，其餘部分留下作為載體。設計兩端引子：Forward primer AACTCGAGATGGTGAGC AAGGGCGAG，Reverse primer AAGTTTAAACCTACTTGTACAGCTC。PCR 反應條件如下：Forward primer and reverse primer：1μl，Template：1μl，10X PCR buffer：5μl，dNTP：5μl，Taq polymerase：1μl，ddH₂O：37μl，Total volume：50μl。溫度條件：(步驟一) 95℃ 2 分鐘；(步驟二) 溫度變化依序為 95℃ 20 秒；37℃ 20 秒；72℃ 90 秒，反覆進行 40 次循環 (步驟三) 72℃ 3 分鐘。反應結束後溫度維持於 4℃。再將原本建構於 pTRE-3G-BI-mCherry 上的基因 mCherry，利用相同限制酶 XhoI、PmeI 切下 711bp 作為模板。

3.3.2 DNA 接合反應

經瓊脂凝膠電泳檢測 PCR 產物後，將載體與純化後的 PCR 產物依 1：3 的比例混合，於室溫下放置 15 分鐘以上。反應條件為：PCR DNA (insert) 3μl，vector 1μl，ligase 1μl，5X dilution buffer 2μl，2X ligation buffer 10μl，Total volume 20μl。溫度條件同 3.3.1。

3.3.3 大腸桿菌的轉型 (transformation)

自 -80℃ 冰箱取出勝任細胞 (competent cell) ECOS101 加入到養菌管中，震盪 1 秒後，置於 42℃ 45 秒，放置在冰上 2 分鐘後，將培養的菌液均勻塗抹於含濃度 80μg/ml Ampicillin 的固態培養基上，將培養基移入 37℃ 培養箱倒置培養 16~18 小時。隔天從固態培養基中挑取數個 colony 至 96 孔盤，每個 colony 分別以含 50μg/ml Ampicillin 50μl LB 於 200rpm，37℃ 培養箱中培養 40 分鐘。



3.3.4 確認 pLenti-C-mCherry

取 1 μ l 的 DNA 進行 colony PCR，PCR 反應條件如下：菌液 1 μ l，forward and reverse primer 1 μ l，10X buffer 2 μ l，2.5mM dNTP 2 μ l，ddH₂O 12.8 μ l，Total volume 20 μ l。溫度條件：(步驟一) 95 $^{\circ}$ C 5 分鐘；(步驟二) 溫度變化依序為 95 $^{\circ}$ C 60 秒；40 $^{\circ}$ C 30 秒；72 $^{\circ}$ C 60 秒，反覆進行 30 次循環 (步驟三) 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘。反應結束後溫度維持於 4 $^{\circ}$ C。以瓊脂凝膠來確認 DNA 是否正確，並各取 96 孔盤中對應號碼之菌液放入各 2ml LB/Amp 管中進行定序。

3.3.5 重組 pLenti-T2A-C-mCherry

定序確認後，利用限制酶 XhoI、MluI 切開 pLenti-C-mCherry，去除小片段 DNA，純化 backbone。另由廠商 (基龍米克斯) 合成 5'-MluI-T2A-XhoI-3'，T2A 序列：5'-GAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCT-3'。取 0.5 μ l 載體和 200 ng T2A 進行接合。

3.3.6 重組 pLenti-SDF-1-T2A-C-mCherry

將原本建構於 pLenti-T2A-C-mGFP 上的基因 RRBp1 利用限制酶 SgfI、XhoI 切下，其餘部分留下作為載體。同時將原本建構於 pcDNA3.1-mSDF-1 上的基因 SDF-1 利用相同限制酶 SgfI、XhoI 切下 270bp 作為模板，並設計兩端引子：Forward primer AAGCGATCGCATGGACGCCAAGGTCGTC，Reverse primer AAACGCGTCTTGTTTAAAGCTTTCTC。PCR 反應條件及溫度條件同 3.3.1。經瓊脂凝膠電泳檢測 PCR 產物後，將載體與純化後的 PCR 產物依 1：3 的比例混合，於室溫下放置 15 分鐘以上。反應條件及溫度條件同 3.3.2。重複大腸桿菌轉型和 PCR 確認 pLenti-SDF-1-T2A-C-mCherry 後，以瓊脂凝膠來確認酶切好的質體是否正確，並各取 96 孔盤中對應號碼之菌液放入各 2ml LB/Amp 管中，一管進行定序，另一管則放入培養箱，預備之後作為少量及大量表達。

3.3.7 純化少量質體

隔天，取 1.5ml 至 1.5ml 離心管中，離心 12000rpm 60 秒，去除上清液。加入 200μl PD1 buffer，震盪後使菌均勻懸浮。再加入 200μl PD2，翻轉十次使溶液混合均勻。加入 200μl PD3 buffer，翻轉十次後，離心 12000rpm 30 秒。取出上清液到新的過濾管中，並將過濾管事先放置於 2ml 收集管之上，離心 12000rpm 30 秒，移除濾下的溶液。再加入 600μl 含有乙醇的 wash buffer 至過濾管中，離心 12000rpm 30 秒後，再次移除濾下的溶液。接著利用離心 12000rpm 5 分鐘後讓過濾膜乾燥後，再加入 50μl 的 elution buffer 到過濾管中，靜置至少 2 分鐘後離心 12000rpm 1 分鐘，得到質體。

3.3.8 純化大量質體

將剩餘 500μl 菌液倒到預先分裝好含 50μg/ml Ampicillin 的 250ml LB，於 37℃、200 rpm 震盪培養 16~18 小時。隔天，將菌液取出至 250ml 離心瓶中，離心 4℃ 8000rpm 15~20 分鐘。去除上清液後，加入 10ml 含 RNase 的 PM I buffer 沖散沉積物，再加入 10ml PM II，小心翻轉十次後室溫下靜置 2~5 分鐘後，加入 10ml PM III buffer，翻轉十次使溶液混合均勻，再離心 4℃ 8000rpm 30 分鐘。取出上清液通過管柱使蛋白質附於過濾膜上，加入 PW buffer 30ml 清洗，在新的收集管中加入 12ml PEL buffer 後分兩管，各自加入 4.5ml isopropanol 混合均勻後，靜置室溫 30 分鐘。離心 4℃ 12000rpm 30 分鐘後去除上清液，以 75%酒精沖下沉澱物去水，離心 4℃ 12000rpm 5 分鐘後自然風乾 10 分鐘，加入 500μl TE buffer 回溶，得到目標 DNA。



3.4 細胞轉染

利用血球細胞計數盤計算細胞顆數。以 7.5×10^6 cells/10cm dish 在 10% FBS/DMEM 培養隔夜。取 24 μ l OMNIfect+600 μ l OPTI-MEM 與 12 μ g DNA+200 OPTI-MEM，混合上述兩種溶液，常溫下靜置 10 分鐘，溶液緩慢加入培養皿中混合均勻。待細胞轉染 24 小時後，將培養基置換成 OPTI-MEM。

3.5 不含細胞培養基的收集

經過轉染之細胞在經過 8、12、24、48、72 小時的培養後，收取不含細胞之培養基 (supernatant) 至 15ml 離心管，室溫下離心 1000 rpm 3 分鐘後收取上清液，以 Millipore 15ml 3KD Centrifugal Filter Unit 進行濃縮至 200 μ l 後 (3000 rpm, 4°C)，以 BCATM Protein Kit 進行定量。

3.6 確認 mCherry 螢光

將經過轉染的 293FT 細胞在螢光顯微鏡下，以綠光激發，觀察 mCherry 受激發所發出的紅光，觀察轉染的效率。

3.7 細胞內蛋白質的萃取

細胞以 PBS 清洗兩次後，吸乾後加入 1ml 的 Trypsin，置入培養箱中 5-10 分鐘，以 2ml DMEM 沖下細胞後，離心 (1000 rpm, 3 分鐘, RT) 後移除上清液，以 DMEM 回溶，利用血球細胞計數盤計算各盤細胞顆數。再離心後 (1000 rpm, 3 分鐘, RT) 移除上清液，以冷卻的 PBS 清洗，吸乾後加入適量的 RIPA lysis buffer，以細胞刮勺

將培養皿 (dish) 上的細胞收集到1.5 ml微量離心管 (ependorf tube)，離心 (12000 rpm，20分鐘，4℃) 後收取上清液。



RIPA lysis buffer

50 mM	Tris pH8.0
-------	------------

150 mM	NaCl
--------	------

1%	NP-40
----	-------

0.5%	Sodium deoxycholate
------	---------------------

Proteinase inhibitor cocktail (Roche, #04693 132 001) stock conc. 25X 於細胞收集前加入
--

4X Sample loading dye

0.5 M	Tris-HC
-------	---------

2 %	Glycerol
-----	----------

10%	SDS
-----	-----

20%	β -ME
-----	-------------

1%	Bromophenol blue
----	------------------



3.8 SDF-1 α 的酶聯免疫吸附試驗 (ELISA)

將標準品分別稀釋為 9.38~600 pg/ml，再分別自不同時間點所收上清液稀釋樣品中各取 50 μ g，以 OPTI-MEM 各自稀釋到 100 μ l。完成所有樣品製備後，將 100 μ l 的標準品和樣品分別放入已預先 coating 上專一性抗體的 96 孔盤中，在室溫下培養 2.5 小時，之後加入 300 μ l/well 清洗緩衝液清洗四次，再加入一次抗體在室溫下放置 1 小時，接著再用清洗緩衝液清洗四次，加入二次抗體在室溫下放置 45 分鐘，最後加入 tetramethylbenzidine (TMB) 100 μ l/well 顯色，室溫下避光放置 30 分鐘後，樣品顏色會變成水藍色，隨即加入停止溶液 (stop solution) 50 μ l/well，樣品顏色會變成黃色，即可放入 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 分光光譜儀在波長 450nm 下測吸光值，OD 值再與標準曲線換算濃度。

3.9 西方點墨法 (Western blot)

實驗所使用的為含有 SDS-PAGE，丙烯醯胺 (polyacrylamide) 的電泳膠體，依據分析蛋白質分子量的不同，配置 12~15% 不同濃度的電泳膠體。進行 loading 前的蛋白質先混合 sample loading dye，以 100 $^{\circ}$ C 的沸水加熱 10 分鐘，冰上靜置 10 分鐘，之後加入 SDS-PAGE 電泳槽進行電泳。以蛋白質分子基準液 (formula protein marker) 做為基準，待蛋白質分子於膠體內移動到適當位置，進行蛋白質的轉漬。

本實驗所使用的轉漬膜 (transfer membrane) 為 Hybond C-extra nitrocellulose (Amersham Pharmacia Biotech)。將跑完電泳的膠片取下，使用溼式轉漬設備 (Hofer) 注入轉漬緩衝液 (Glycine 43.23g, Tris 9.08g, Methanol 600ml, 補 2dH₂O 至 3L) 以電壓 100 伏特進行 120~180 分鐘，使全部蛋白質轉漬到轉漬膜上。完成後以 5% 的安佳脫脂奶粉 (溶於 TBST 中) blocking 一小時，以填補膜上多餘的孔洞。取適當蛋白質與一級抗體比例於冷房中反應至隔天，一級抗體結束後以 1X

TBST (1X TBS + 0.25% tween-20) 緩衝液清洗一小時，每 10~20 分鐘更換一次新鮮緩衝液。接著再以二級抗體 (HRP-labeled antibody) 於室溫下作用一小時，以 TBST 清洗一小時 (清洗條件同上)，最後加入 ECL 感應試劑 (Pierce, #34080)，以 X 光底片感光。

常用的一級抗體比例

抗體	比例	Catalog	Source
mCherry	1:500	632543	Clontech
GAPDH	1:6000	75834	Epitomic
VEGF	1:500	ab46154	abcam
HSP70	1:3000	GTX104126	GeneTex

3.10 幹細胞遷移試驗 (Transwell assay)

先將24孔下層培養盤分別加入600μl含0、10、100 ng/ml SDF-1 α 蛋白質的培養基，再將transwell chamber放入已加培養基的24孔下層培養盤中，接著計數間質幹細胞 2.0×10^4 懸浮於不含血清 (serum free) 的細胞培養液中，控制各組體積至200μl，在37°C 培養箱中培養48小時後，將transwell拿起並吸掉細胞培養液，以70%酒精固定細胞，用結晶紫 (crystal violet) 染色30分鐘後，以二次水退染，以棉花棒用旋轉的方式將上層的細胞完全擦去，利用顯微鏡觀察染色狀況可觀察薄膜下層細胞。

第四章 實驗結果



4.1 螢光顯微鏡下 mCherry 的螢光表現

0、12、24、48、72 小時的細胞數介在 $1.24 \times 10^7 \sim 1.73 \times 10^7$ 之間，0~48 小時之間呈微幅成長，到 72 小時細胞數最少，然而彼此之間落差不大，表示培養盤中種下的 293FT 細胞數量沒有太大差別，肉眼判斷約為八成滿。在螢光顯微鏡下以綠光激發，mCherry 呈現紅光，24 小時以內紅光較為黯淡，肉眼判斷螢光比例約佔細胞量 70%。24~72 小時紅光較為耀眼，肉眼判斷螢光約佔細胞量 80%，視覺上 24~72 小時之間螢光表現差異不大（圖 1）。

4.2 細胞內的 mCherry 蛋白質表現

經 SDF-1 α 轉染後的 293FT 細胞，在經過 12、24、48、72 小時的培養後，萃取細胞內蛋白質，並以西方點墨法觀察細胞內 SDF-1 α 蛋白質的變化。本實驗發現 mCherry 的表現在轉染後 12 小時內不甚明顯，在 24 小時開始上升，在 48 小時的情況下達到高峰，接著在 72 小時 mCherry 的表現反而會下降（圖 2）。西方墨點法再次確認螢光顯微鏡下所見的 mCherry 螢光蛋白質確實有表現，間接證實本實驗所建構的質體能夠成功轉錄、轉譯。

4.3 不含細胞培養基的 SDF-1 α 表現

經 SDF-1 α 轉染後的 293FT 細胞，在經過 12、24、48、72 小時的培養後，收集不含細胞的培養基，並以酶聯免疫吸附試驗觀察培養基中 SDF-1 α 量的變化，發現 SDF-1 α 累積釋放的量隨著培養基收集的時間延長而上升（圖 3），12 小時之後的 SDF-1 α 釋放的量和沒有送入 SDF-1 α 的 control 組相比，已有顯著的提升，24

小時後更加明顯，在 24~72 小時之間則呈現微幅成長。



4.4 SDF-1 α 蛋白質刺激 VEGF 表現

血管內皮生長因子 (VEGF) 是可在體內誘導血管新生的生長因子。在 SDF-1 α 的刺激之下，VEGF 有明顯上升的趨勢，在加入 10 ng/ml 的組別 VEGF 的表現量約是對照組的 1.7 倍，100 ng/ml 的組別 VEGF 的表現量則大約是對照組的 1.3 倍 (圖 4)，可得知 SDF-1 α 可能會促進血管新生，但無法肯定高濃度的蛋白質劑量是否會對細胞造成影響。

4.5 幹細胞遷移試驗

比較分別加入 0、10、100 ng/ml SDF-1 α 的組別，可發現隨著 SDF-1 α 蛋白質濃度的增加，間質幹細胞遷移的能力有明顯的提升 (圖 5) 表示 SDF-1 α 確實可有效促進間質幹細胞的遷移。

第五章 結論

本實驗結果可知 SDF-1 α 以 OMNifect™ 轉染至 293FT 的效率良好，所建構的 SDF-1 α 質體能正確表現，且可釋放出 SDF-1 α 蛋白質。本實驗也確認 SDF-1 α 與血管新生相關，並能促進間質幹細胞的遷移，可證明所建構的 SDF-1 α 質體具有功能性。為了臨床應用，未來會將 OMNifect™ 轉染改以聚乙烯亞胺 (polyethylenimine, PEI) 作為基因傳遞的方式，並期望 SDF-1 α 質體傳遞至成骨細胞或牙齦纖維母細胞 (gingival fibroblast) 等細胞中也能執行組織修復的功能。

第六章 討論



6.1 SDF-1 蛋白質和質體傳遞之異同

根據文獻，不論是 SDF-1 蛋白質或重組的質體，至少都需要 15.8 小時之後才會釋放 40%-60% 的 SDF-1³⁰，並將持續緩慢釋放至 7-9 天^{30, 43}。質體的釋放與蛋白質相比，在 24 小時以內，蛋白質的釋放速率略高於質體，然而在 24 小時之後，蛋白質的釋放幾乎停滯，質體則仍能持續釋放。在 *in vivo* 實驗中，SDF-1 的釋放會比 *in vitro* 實驗中更慢，即使是 SDF-1 蛋白質也需要四天的時間才達到 50% 的釋放率，SDF-1 質體更需遲至六天才達此釋放量，這可能是因為體內有些生物反應會將分泌出的 SDF-1 置換掉³⁰。

由以上文獻可知，不論在 *in vitro* 或 *in vivo* 的實驗中，SDF-1 蛋白質的釋放都比質體快速，但長時間之下，質體的釋放量卻較為穩定³⁰。然則不論是蛋白質或質體傳遞，最晚在兩周後，兩者的蛋白質釋放量都會趨近相同^{30, 44}。2010 年 Rabbany 的研究團隊在豬皮膚 incisional wound 的實驗模型中，分別以 SDF-1 α 蛋白質和質體加入傷口敷料中，九天後兩者的癒合程度相去不遠³⁰，顯示蛋白質和質體於動物實驗上的治療成效也相當。

在本實驗的實驗當中，SDF-1 α 質體轉染過後 12 小時的 SDF-1 α 釋放量和沒有送入 SDF-1 α 的 control 組相比已有顯著提升，和 72 小時相比約為 60%，24 小時到 72 小時之間的 SDF-1 α 釋放量則呈微幅上揚，24 小時約為 72 小時試放量的 80%。而在細胞遷移試驗中，不論是 SDF-1 α 蛋白質或是質體，兩者同樣具有促進幹細胞遷移的能力。



6.2 細胞轉染與聚乙烯亞胺的臨床應用

細胞轉染是指以非病毒感染方式，將核酸送入活細胞內的方法，最終目的是希望送入細胞的核酸能進行大量外源性基因表現，或是抑制內源性基因表現。第一個被應用的化學性轉染方式是磷酸鈣共同沈降法，利用帶正電的鈣離子結合帶負電的 DNA 磷酸骨架形成沈澱物形式的複合物，複合物再經由胞吞作用(endocytosis)進入細胞內，是相當節省成本的方式，但轉染效力有限。而後被發現較有效率的細胞轉染方法，包括陽離子脂質體或是帶正電聚合物。脂質體是類似細胞膜結構的脂質微粒，可以把 DNA 包覆在裡面，雖然轉染效率好，但會對細胞產生相當大的毒性，這些毒性即使在顯微鏡下無法觀察，還是有可能影響轉染後續的基因表現⁴⁵。

陽離子聚合物則是細胞轉染的另一個選擇，同樣與帶負電的核酸縮合形成帶正電的微粒，這些微粒藉由其電性黏合到細胞膜表面帶負電的醣蛋白、蛋白多醣之上，形成的複合物經由胞吞作用攝入細胞內，並透過核內體(endosome)保護核酸不被分解，直到 RNA 移動到細胞質或 DNA 移動到細胞核後釋放核酸。與陽離子脂質體相比，使用陽離子聚合物製作的轉染試劑細胞毒性較小，並且在大部分情況下都能夠在含有血清及抗生素的環境下進行細胞轉染，能夠減少更換培養基的步驟，節省實驗所需花費的時間⁴⁵。

聚乙烯亞胺屬於陽離子聚合物轉染試劑的一種，為人工合成的含有極高密度正電荷之有機巨分子。Boussif 等學者於 1995 年的實驗結果顯示聚乙烯亞胺可以作為有效載體，將 DNA 和 RNA 轉移到神經元細胞內⁴⁶。聚乙烯亞胺作為載體時，其複合物在進入細胞後，因結構上的胺質子化，導致氫離子大量進入核內體中，滲透壓不平衡造成核內體破裂釋放出核酸，達到表現基因的目的⁴⁷。聚乙烯亞胺分為分枝狀和線性兩種，線性聚乙烯亞胺可通過水解 poly(2-ethyl-2-oxazoline)合成，成為臨床上認可用於治療上的轉染試劑：jetPEI⁴⁴，臨床上已經應用在膀胱內藥物

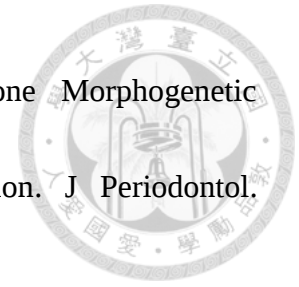
灌注，對於治療膀胱癌有顯著效果⁴⁸，本實驗也期待將來可以將 PEI 應用在牙科治療上。



參考文獻



1. Nyman S, Lindhe J, Karring T, and Rylander H. New Attachment Following Surgical Treatment of Human Periodontal Disease. J Clin Periodontol. 1982;9:290-6.
2. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, and Wennstrom J. New Attachment Formation in the Human Periodontium by Guided Tissue Regeneration. Case Reports. J Clin Periodontol. 1986;13:604-16.
3. Andreasen JO, and Rud J. Modes of Healing Histologically after Endodontic Surgery in 70 Cases. Int J Oral Surg. 1972;1:148-60.
4. Grzesik WJ, and Narayanan AS. Cementum and Periodontal Wound Healing and Regeneration. Crit Rev Oral Biol Med. 2002;13:474-84.
5. Terranova VP, and Wikesjo UM. Extracellular Matrices and Polypeptide Growth Factors as Mediators of Functions of Cells of the Periodontium. A Review. J Periodontol. 1987;58:371-80.
6. Cochran DL, and Wozney JM. Biological Mediators for Periodontal Regeneration. Periodontol 2000. 1999;19:40-58.
7. Ripamonti U, and Reddi AH. Periodontal Regeneration: Potential Role of Bone Morphogenetic Proteins. J Periodontal Res. 1994;29:225-35.
8. Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K, Turek TJ, Wozney JM, and Wikesjo UM.



- Periodontal Repair in Dogs: Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Significantly Enhances Periodontal Regeneration. *J Periodontol.* 1995;66:131-8.
9. Wikesjo UM, Xiropaidis AV, Thomson RC, Cook AD, Selvig KA, and Hardwick WR. Periodontal Repair in Dogs: Space-Providing ePTFE Devices Increase rhBMP-2/ACS-Induced Bone Formation. *J Clin Periodontol.* 2003;30:715-25.
 10. Wikesjo UM, Xiropaidis AV, Thomson RC, Cook AD, Selvig KA, and Hardwick WR. Periodontal Repair in Dogs: rhBMP-2 Significantly Enhances Bone Formation under Provisions for Guided Tissue Regeneration. *J Clin Periodontol.* 2003;30:705-14.
 11. Khojasteh A, Behnia H, Naghdi N, Esmaeelinejad M, Alikhassy Z, and Stevens M. Effects of Different Growth Factors and Carriers on Bone Regeneration: A Systematic Review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013;116:405-23.
 12. Haidar ZS, Hamdy RC, and Tabrizian M. Delivery of Recombinant Bone Morphogenetic Proteins for Bone Regeneration and Repair. Part A: Current Challenges in Bmp Delivery. *Biotechnol Lett.* 2009;31:1817-24.
 13. Lang NP, Lindhe J, Karring T. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 5th ed., Blackwell: Munksgaard, 2007, pp 87.

- 
14. Jones E, and Yang X. Mesenchymal Stem Cells and Bone Regeneration: Current Status. *Injury*. 2011;42:562-8.
 15. Herzog EL, Chai L, and Krause DS. Plasticity of Marrow-Derived Stem Cells. *Blood*. 2003;102:3483-93.
 16. Song L, Young NJ, Webb NE, and Tuan RS. Origin and Characterization of Multipotential Mesenchymal Stem Cells Derived from Adult Human Trabecular Bone. *Stem Cells Dev*. 2005;14:712-21.
 17. Shin YW, Im GI, Lee KB. Do Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Have the Same Osteogenic and Chondrogenic Potential as Bone Marrow-Derived Cells? *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13:845-53.
 18. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, and Chen TH. Isolation of Multipotent Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood. *Blood*. 2004;103:1669-75.
 19. Baksh D, Yao R, and Tuan RS. Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow. *Stem Cells*. 2007;25:1384-92.
 20. Morrison SJ, and Scadden DT. The Bone Marrow Niche for Haematopoietic Stem Cells. *Nature*. 2014;505:327-34.
 21. Yu L, Cecil J, Peng SB, Schrementi J, Kovacevic S, Paul D, Su EW, and Wang J.

Identification and Expression of Novel Isoforms of Human Stromal Cell-Derived Factor 1. *Gene*. 2006;374:174-9.



22. Moll NM, and Ransohoff RM. CXCL12 and CXCR4 in Bone Marrow Physiology. *Expert Rev Hematol*. 2010;3:315-22.
23. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, and Penn MS. Effect of Stromal-Cell-Derived Factor 1 on Stem-Cell Homing and Tissue Regeneration in Ischaemic Cardiomyopathy. *Lancet*. 2003;362:697-703.
24. Zhang G, Nakamura Y, Wang X, Hu Q, Suggs LJ, and Zhang J. Controlled Release of Stromal Cell-Derived Factor-1 Alpha in Situ Increases C-Kit⁺ Cell Homing to the Infarcted Heart. *Tissue Eng*. 2007;13:2063-71.
25. Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller FJ, Nieto M, Teng YD, Frenkel D, Li J, Sidman RL, Walsh CA, Snyder EY, and Khoury SJ. Directed Migration of Neural Stem Cells to Sites of Cns Injury by the Stromal Cell-Derived Factor 1alpha/Cxc Chemokine Receptor 4 Pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:18117-22.
26. Li S, Deng L, Gong L, Bian H, Dai Y, and Wang Y. Upregulation of CXCR4 Favoring Neural-Like Cells Migration Via Akt Activation. *Neurosci Res*. 2010;67:293-9.

- 
27. Hong F, Tuyama A, Lee TF, Loke J, Agarwal R, Cheng X, Garg A, Fiel MI, Schwartz M, Walewski J, Branch A, Schecter AD, and Bansal MB. Hepatic Stellate Cells Express Functional CXCR4: Role in Stromal Cell-Derived Factor-1alpha-Mediated Stellate Cell Activation. *Hepatology*. 2009;49:2055-67.
28. Liu Z, Lei Y, Han Q, Kang W, Zhang L, Lou S..G-CSF Enhanced SDF-1 Gradient between Bone Marrow and Liver Associated with Mobilization of Peripheral Blood CD34+ Cells in Rats with Acute Liver Failure. *Dig Dis Sci*. 2010;55:285-91.
29. Badillo AT, Chung S, Zhang L, Zoltick P, and Liechty KW. Lentiviral Gene Transfer of SDF-1alpha to Wounds Improves Diabetic Wound Healing. *J Surg Res*. 2007;143:35-42.
30. Rabbany SY, Pastore J, Yamamoto M, Miller T, Rafii S, Aras R, and Penn M. Continuous Delivery of Stromal Cell-Derived Factor-1 from Alginate Scaffolds Accelerates Wound Healing. *Cell Transplant*. 2010;19:399-408.
31. Hu C, Yong X, Li C, Lu M, Liu D, Chen L, Hu J, Teng M, Zhang D, Fan Y, and Liang G. CXCL12/CXCR4 Axis Promotes Mesenchymal Stem Cell Mobilization to Burn Wounds and Contributes to Wound Repair. *J Surg Res*. 2013;183:427-34.
32. Li X, Gao Z, and Wang J. Single Percutaneous Injection of Stromal Cell-Derived



- Factor-1 Induces Bone Repair in Mouse Closed Tibial Fracture Model. Orthopedics. 2011;34:450.
33. Zhou S, Liu X, Li Y, Yan J. Stromal Cell Derived Factor-1 α Enhances Bone Formation Based on in Situ Recruitment: A Histologic and Histometric Study in Rabbit Calvaria. Biotechnol Lett. 2012;34:387-95.
34. Yang F, Ji W, Ma J, Bouma MJ, Boerman OC, Chen Z, van den Beucken JJ, Jansen JA. Incorporation of Stromal Cell-Derived Factor-1 α in PCL/Gelatin Electrospun Membranes for Guided Bone Regeneration. Biomaterials. 2013;34:735-45.
35. Yang P, Du L1, Ge S. Stromal Cell-Derived Factor-1 Significantly Induces Proliferation, Migration, and Collagen Type I Expression in a Human Periodontal Ligament Stem Cell Subpopulation. J Periodontol. 2012;83:379-88.
36. Bonadio J, Smiley E, Patil P, and Goldstein S. Localized, Direct Plasmid Gene Delivery *in vivo*: Prolonged Therapy Results in Reproducible Tissue Regeneration. Nat Med. 1999;5:753-9.
37. Kafri T, van Praag H, Gage FH, and Verma IM. Lentiviral Vectors: Regulated Gene Expression. Mol Ther. 2000;1:516-21.
38. Montini E, Cesana D, Schmidt M, Sanvito F, Ponzoni M, Bartholomae C, Sergi L, Benedicenti F, Ambrosi A, Di Serio C, Doglioni C, von Kalle C, and



- Naldini L. Hematopoietic Stem Cell Gene Transfer in a Tumor-Prone Mouse Model Uncovers Low Genotoxicity of Lentiviral Vector Integration. *Nat Biotechnol.* 2006;24:687-96.
39. Matrai J, Chuah MK, and VandenDriessche T. Recent Advances in Lentiviral Vector Development and Applications. *Mol Ther.* 2010;18:477-90.
40. Felgner PL. Nonviral Strategies for Gene Therapy. *Sci Am.* 1997;276:102-6.
41. Massoud TF, and Gambhir SS. Molecular Imaging in Living Subjects: Seeing Fundamental Biological Processes in a New Light. *Genes Dev.* 2003;17:545-80.
42. Doyle TC, Burns SM, and Contag CH. In Vivo Bioluminescence Imaging for Integrated Studies of Infection. *Cell Microbiol.* 2004;6:303-17.
43. Sievers RE, Yu J, Lee RJ. Effects of Scaffold-Delivered SDF-1 Alpha Protein in Chronic Rat Myocardial Infarction Model. *J. Med. Biol. Eng.* 2014;34:224-9.
44. Brissault B, Kichler A, Guis C, Leborgne C, Danos O, and Cheradame H. Synthesis of Linear Polyethylenimine Derivatives for DNA Transfection. *Bioconjug Chem.* 2003;14:581-7.
45. Luo D, and Saltzman WM. Synthetic DNA Delivery Systems. *Nat Biotechnol.* 2000;18:33-7.
46. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, and Behr JP. A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells

in Culture and in Vivo: Polyethylenimine. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:7297-301.

- 
47. Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, and Gopferich A. Polyethylenimine-Based Non-Viral Gene Delivery Systems. Eur J Pharm Biopharm. 2005;60:247-66.
48. Sidi AA, Ohana P, Benjamin S, Shalev M, Ransom JH, Lamm D, Hochberg A, and Leibovitch I. Phase I/II Marker Lesion Study of Intravesical Bc-819 DNA Plasmid in H19 over Expressing Superficial Bladder Cancer Refractory to Bacillus Calmette-Guerin. J Urol. 2008;180:2379-83.

附錄

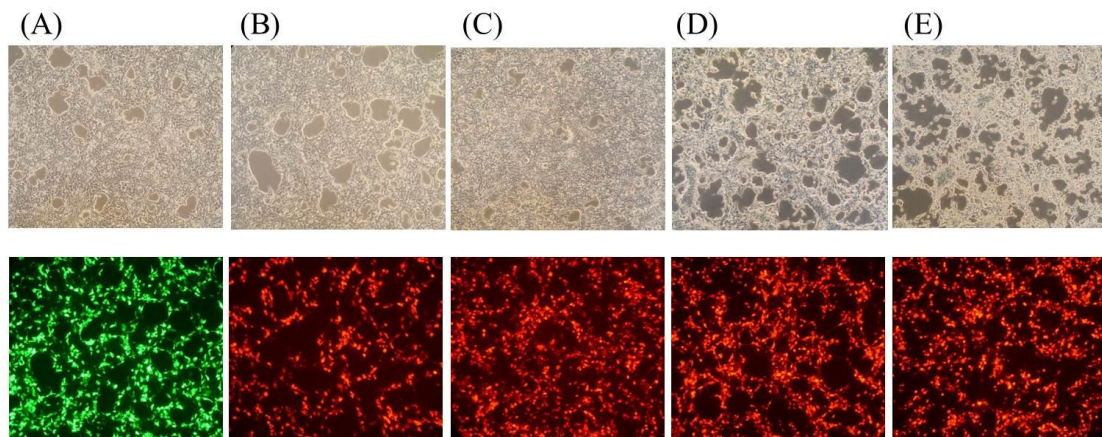


圖 1 螢光顯微鏡下確認 mCherry 螢光蛋白的表現

將建構的 pLenti-SDF1 α -T2A-mCherry 質體經由轉染送入 293FT 細胞中，分別在 12、24、48、72 小時的時間點，在螢光顯微鏡下確認 mCherry 是否如預期被激發出紅光，以確認轉染效率。(A) eGFP/293FT (對照組)，(B~E) pLenti-mSDF1 α -T2A-mCherry/293FT 12、24、48、72 小時



pLenti-mSDF1 α -T2A-mCherry/293FT

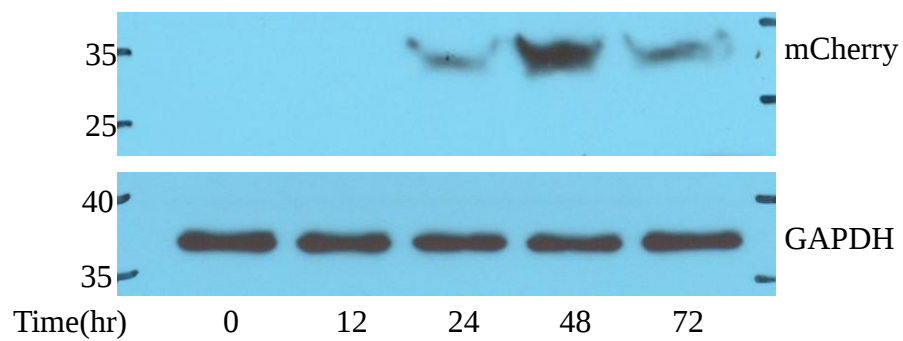
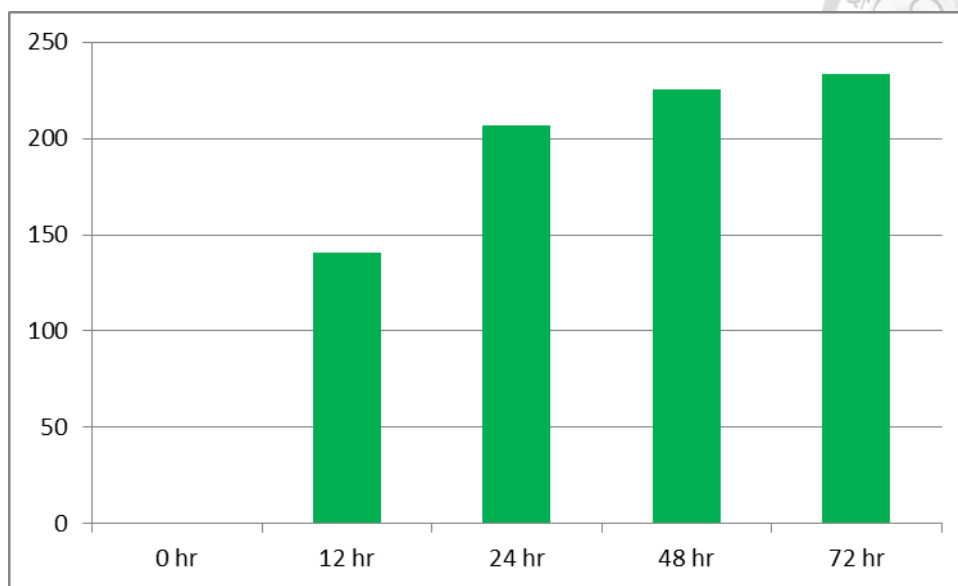


圖 2 mCherry 蛋白質確有表現

將建構的 pLenti-SDF1 α -T2A-mCheery 質體經由轉染送入 293FT 細胞中，分別在 12、24、48、72 小時的時間點，以 RIPA lysis buffer 收下來，BCA 蛋白質測定組定量後，西方點墨法偵測 mCherry 蛋白質量。



	Concentration (pg/ml)	Fold
0 hr	0.485	1
12 hr	140.493	290
24 hr	206.924	427
48 hr	225.300	465
72 hr	233.289	481

圖 3 SDF-1 α 蛋白質累積釋放的量

將建構的 pLenti-SDF1 α -T2A-mCheery 質體經由轉染送入 293FT 細胞中，分別在 12、24、48、72 小時的時間點，收集不含細胞的培養基，以酶聯免疫吸附試驗觀察培養基中 SDF-1 α 蛋白質累積釋放量的變化。

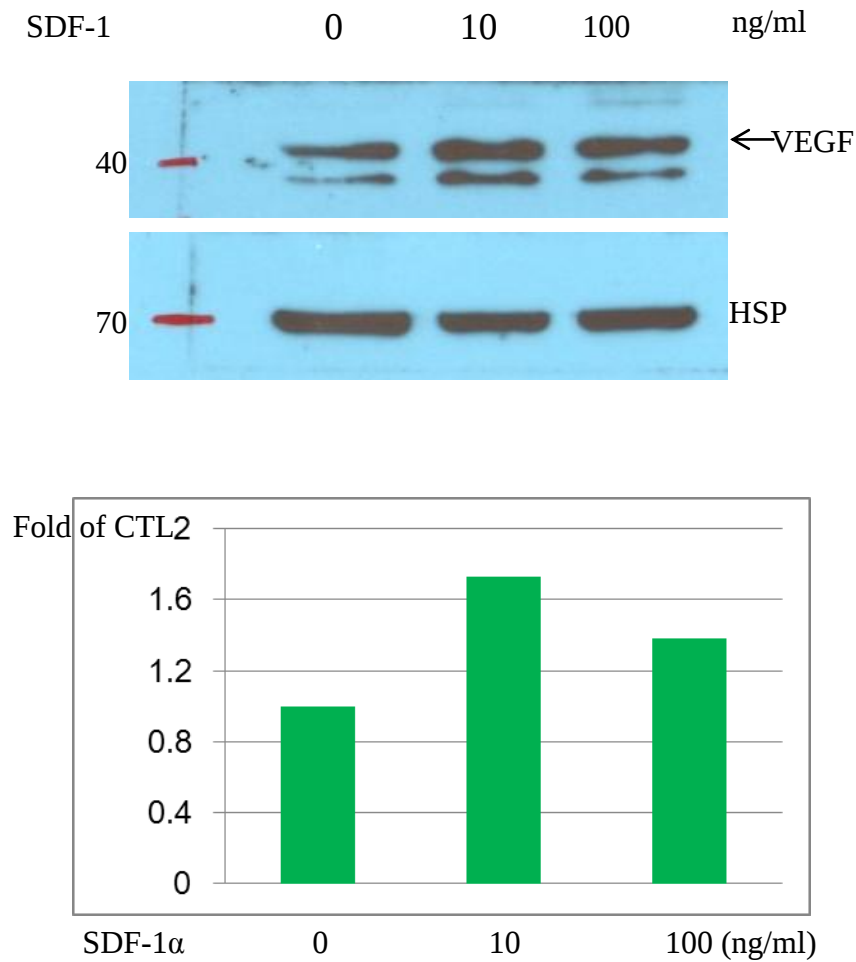
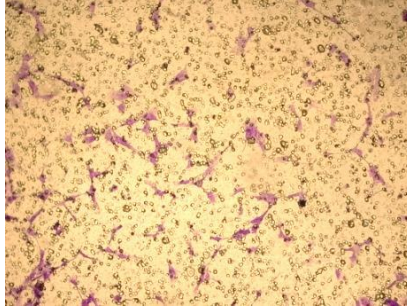


圖 4 SDF-1 α 蛋白質促進 VEGF 表現

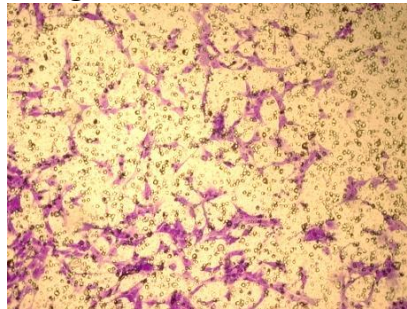
將 10、100 ng/ml 的 SDF-1 α 蛋白質加入 U20S 的培養基，於 37°C、CO₂ 分壓 5% 培養 24 小時後，以 RIPA lysis buffer 收下來，BCA 蛋白質測定組定量後，西方點墨法偵測 VEGF 蛋白質量，並與對照組比較。



control



10 ng/ml



100 ng/ml

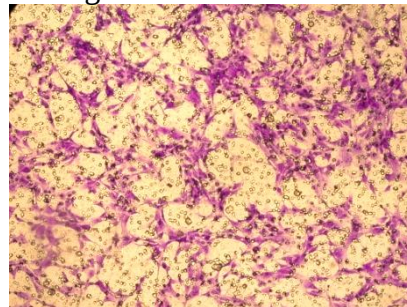


圖 5 SDF-1 α 蛋白質促進間質幹細胞遷移

利用transwell assay測定含0、10、100 ng/ml SDF-1 α 蛋白質的培養基，對間質幹細胞遷移造成的影響。