

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

豬脂肪幹細胞應用於異種移植改善小鼠肝纖維化之研究

The Potential of Porcine Adipose-Derived Stem Cells for
Xeno-Transplantation to Improve Liver Fibrosis in Mice

葛奕辰

I-Chen Ko

指導教授：吳信志 博士

丁詩同 博士

Advisor: Shinn-Chih Wu, Ph.D.

Shih-Torng Ding, Ph.D

中華民國 102 年 1 月

Jan, 2013

謝誌

本論文承蒙恩師 吳信志 老師以及 丁詩同 老師之指導，就學期間兩位老師給予諸多生活及課業上之關心及指導，使我得以完成本論文。亦感謝口試委員臺灣大學動物科學技術學系 鄭登貴 老師與 劉逸軒 老師，以及臺灣大學附設醫院內科部主治醫師 李宣晝 老師對於論文之指正和試驗上之建議。感謝臺灣大學動物科學技術學系 陳億乘 老師、朱有田 老師以及臺灣大學生物科技所 林劭品 老師大方出借儀器讓我完成試驗，感謝臺灣大學獸醫系病理檢驗室協助組織石蠟包埋切片，以及病理組織染色分析。特別感謝動物生殖科技研究室 楊卓真 學姊、林育聖 學長、周志任 學長、鄭淳淳 學姊、彭劭予 學長、王兆中 學長、沈盈姁 學姊、陳守真 學姊、李妍樺 學姊、曾哲揚 學長、陳碩甫 學長、張家駿、蕭冠宇、許慈宇、張乃云、王皓、林書毅、魏可軒、高藝榕，分子生物研究室的 林虹姁 學姊、王雅菁 學姊、陳郁仁 學長、劉利儒 學姊、林欣瑜 學姊、鄒逸萍 學姊、張晏嘉 學姊、張家菁 學姊、劉佳欣、蔡宜臻、張慧慧、簡幼欣 對於實驗上的協助以及生活上的扶持。感謝所有為實驗犧牲的小鼠與小豬，讓這篇論文得以完成。最後感謝我在台中的家人及朋友，一直以來的支持與協助。

中文摘要

慢性肝病為國人十大死因之一，其可能原因為病毒性肝炎、酒精或藥物濫用、以及飲食習慣。肝纖維化是慢性肝病惡化必經之過程，過去研究指出肝纖維化可逆轉，如何找出有效的治療方式也成為熱門研究。許多文獻證實骨髓間葉幹細胞 (BM-MSCs) 在肝纖維化動物模型上之治療潛力。脂肪間葉幹細胞 (AD-MSCs) 為另一類型之成體幹細胞，其擁有與骨髓間葉幹細胞相似之表面抗原表現以及轉分化潛能，由於其分離過程之侵入性小於其他細胞來源，AD-MSCs 在近期的再生醫學研究中極具吸引力。

本試驗自紅螢光蛋白轉基因豬脂肪組織中分離並純化出具有多分化潛能之脂肪幹細胞 AD-MSCs，經過流式細胞儀分析，證實其表現與間葉幹細胞相似之表面抗原 CD29、CD44 與 CD90，並可在體外經誘導分化為成骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞以及肝臟細胞，此外，AD-MSCs 穩定表現紅色螢光蛋白 DsRed，有利於體內試驗之後續追蹤，此結果使其在再生醫學以及細胞治療上極具應用價值。為在動物試驗中測試 AD-MSCs 是否具治療肝纖維化之潛能，本試驗採用八週齡之 ICR 小鼠，給予灌食四氯化碳溶液四週後，小鼠血清中 GOT、GPT 以及 ALB 顯著高於控制組 ($P < 0.05$)。此外，為增加 AD-MSCs 遷移入肝臟組織間之效率，以立體培養之方式將細胞培養成不同大小之立體團塊 (sphere)，並分為四十微米以下、介於四十至七十微米、七十微米以上以及未經立體培養之懸浮細胞等四組，經由肝門靜脈注射技術，以最直接之方式將脂肪幹細胞及其團塊移植入小鼠體內 (每隻小鼠 1×10^6 細胞)，使其隨血流立即流經肝臟，以期能在治療效果上有所突破。研究結果顯示，經過細胞移植手術兩週後，小鼠血清中 GOT、GPT 及 ALB 比起控制組顯著下降 ($P < 0.05$)，細胞移植手術四週後，取試驗小鼠肝臟組織，以梅森氏三色染

色法標定其肝臟組織病理切片中之纖維化組織，發現接受細胞移植之組別其肝臟組織中纖維化傷疤含量明顯減少，而羥脯胺酸含量檢測結果也支持前述試驗之發現，但在各項數值上，並未因細胞團塊大小不同而有顯著差異，其結果與前人使用骨髓間葉幹細胞團塊所得之結果不甚相同。

綜上所述，本試驗結果證明豬脂肪幹細胞確實有治療小鼠肝纖維化之潛能，並提供未來再生醫學研究發展之新方向，然而 AD-MSCs 之治療機制與細胞後續之命運尚待釐清，若能有更進一步之研究成果，相信在不久之將來，此一研究能造福許許多多為肝臟疾病所苦之患者

關鍵字：肝纖維化、異種移植、豬脂肪幹細胞



ABSTRACT

Chronic liver disease, which has reached the top 10 death causes for the past decades in Taiwan, might be caused by viral hepatitis, alcohol or drug abuse and diet preference. Liver fibrosis is the ineludible process of chronic liver disease deterioration. However, previous reports mentioned that liver fibrosis might be attenuated by stem cell therapy. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) were used in the previous study, which their therapeutic potential in a chemical induced liver fibrosis animal model had been demonstrated. The adipose-derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) is another type of somatic stem cells which shares several characteristics with BM-MSC. Due to its smaller invasion in collection process compare with acquiring cells from the bone marrow, the AD-MSCs became attractive in regenerative medicine.

In this study, we isolated AD-MSCs with multipotency from adipose tissue and performed mesenchymal stem cells surface antigen CD29, CD44 and CD90 analysis by flowcytometry. Besides, AD-MSCs could differentiate into osteocytes, chondrocytes, adipocytes and hepatocytes *in vitro*, suggesting their advantages to be applied to clinical plastic and reconstructed surgery. To assess the potential of AD-MSCs to ameliorate liver fibrosis *in vivo*, AD-MSCs were isolated from dorsal adipose tissue of transgenic pigs which globally express fluorescent protein DsRed, for further examination. To generate liver fibrosis models, male ICR mice were treated with CCl₄ via oral gavage for four weeks, and the levels of glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT) and albumin (ALB) in their serum were higher than the control group ($P < 0.05$) following chemical induction. To provide the transplanted AD-MSCs a massive affinity that could easily located in the liver after portal vein

injection, the AD-MSCs were cultured into advanced three dimensional spheres and were separated into three groups according to the diameter of the cell spheres. AD-MSCs spheres with diameter below 40 μ m, 40~70 μ m, over 70 μ m and single cells were injected via portal vein (1×10^6 cells/mouse) of transplanted mice with liver fibrosis, respectively. Two weeks after AD-MSCs transplantation, the serum GOT, GPT and ALB of recipient mice in AD-MSCs-injected groups were significantly decreased when compared with mice in the saline-injected group ($P < 0.05$). Additionally, the fibrotic tissues were evaluated by Masson's trichrome staining at 4 weeks after cell transplantation. The shrinkage of fibrotic area was observed in AD-MSCs-injected groups. The tissue repairing effects were also confirmed by hydroxyproline content analysis. However, there was no significant difference between single cells and cell spheres transplantation, the exhibited result indicate the divergence with previous study that BM-MSCs displayed better outcomes in sphered structure.

Overall, our results provided the intriguing implication that porcine AD-MSCs can ameliorate liver fibrosis in mice, aiming to provide insight into future development of regenerative medicine. However, the therapeutic mechanisms and cell fates in transplanted AD-MSCs still need to be explored.

Key words: Liver fibrosis, xeno- transplantation, porcine adipose-derived mesenchymal stem cells.

目次

	頁次
口試委員審定書.....	
謝誌.....	1
中文摘要.....	2
ABSTRACT.....	4
目次.....	6
圖次.....	8
第 1 章 緒論.....	10
第 2 章 文獻檢討.....	11
2.1 肝臟之構造與功能.....	11
2.1.1 肝臟解剖構造.....	11
2.1.2 肝臟之生理功能.....	13
2.2 肝臟疾病與傳統治療方式.....	14
2.2.1 猛爆性肝炎 (hepatitispage, or acute fulminating hepatitis).....	14
2.2.2 急性肝炎與慢性肝炎 (acute and chronic hepatitis).....	14
2.2.3 肝纖維化 (liver fibrosis).....	15
2.3 幹細胞簡介.....	17
2.3.1 幹細胞之分類.....	17
2.3.2 幹細胞之增生模式.....	18
2.3.3 間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs).....	18
2.3.4 脂肪幹細胞.....	20

2.4	四氯化碳介紹	20
第 3 章	試驗研究.....	21
3.1	紅色螢光蛋白質轉基因豬之脂肪幹細胞分離與純化	21
3.1.1	前言	21
3.1.2	材料與方法	22
3.1.3	結果與討論	25
3.2	紅色螢光蛋白質轉基因豬脂肪幹細胞誘導分化為類肝臟細胞之研究	27
3.2.1	前言	27
3.2.2	材料與方法	28
3.2.3	結果與討論	30
3.3	肝纖維化小鼠模式之建立及檢測	34
3.3.1	前言	34
3.3.2	材料與方法	35
3.3.3	結果與討論	37
3.4	異種移植 -豬脂肪幹細胞應用於改善小鼠肝纖維化之可行性探討	45
3.4.1	前言	45
3.4.2	材料與方法	46
3.4.3	結果與討論	53
第 4 章	綜合討論.....	65
第 5 章	結論.....	67
第 6 章	未來展望.....	68
	參考文獻.....	69

圖次

	頁次
圖 1. 肝臟之解剖構造。	12
圖 2. 慢性肝臟疾病之病程進展。	16
圖 3. 以流式細胞儀分析紅螢光蛋白轉基因豬脂肪幹細胞之表面抗原。	26
圖 4. 體外誘導 AD-MSCs 分化成為類肝臟細胞期間之形態變化。	31
圖 5. AD-MSCs 經過 12 天體外誘導分化後表現 HNF-1 蛋白質。	33
圖 6. 試驗期間各組別小鼠之體重差異。	38
圖 7. 試驗期間各組別小鼠血清中 GOT 之改變。	40
圖 8. 試驗期間各組別小鼠血清中 GPT 之改變。	41
圖 9. 試驗期間各組別小鼠血清中白蛋白 (ALB) 之改變。	42
圖 10. 試驗期間各組別肝臟組織病理切片。	44
圖 11. 紅螢光蛋白轉基因豬脂肪幹細胞團塊之製備。	47
圖 12. 細胞移植試驗之時間軸。	48
圖 13. 細胞移植試驗設計示意圖。	49
圖 14. 細胞移植手術流程圖。	50
圖 15. 試驗期間各組小鼠之體重變化差異。	54
圖 16. 試驗結束後各組小鼠肝體重比。	55
圖 17. 各組小鼠接受手術後 GOT 值之變化。	57
圖 18. 各組小鼠接受手術後 GPT 值之變化。	58
圖 19. 各組小鼠接受手術後 ALB 值之變化。	59
圖 20. 各組別於試驗結束時之肝臟組織病理切片。	61

- 圖 21. 各組別於試驗結束後其肝臟組織病理切片中相對纖維化面積。62
- 圖 22. 細胞移植 4 週後之試驗小鼠肝臟中羥脯胺酸含量之比較。64



第1章 緒論

全球約有三億人口為慢性肝炎患者，其中每年有 200 萬人死於此疾病，而在台灣，肝炎帶原者比例高達百分之二十，導致長久以來慢性肝炎一直被列為國人十大死因之一，因此，如何對抗危害健康與生命之肝臟疾病一直是熱門研究項目之一。

肝纖維化為慢性肝病之必經歷程，造成肝纖維化之可能原因有病毒性肝炎、酒精或藥物濫用、以及飲食習慣。以上原因皆會使肝臟中脂質代謝失調，造成肝臟內三酸甘油酯蓄積、過氧化物累積，最後強大的氧化壓力導致肝細胞膜破裂，並釋出發炎反應相關之細胞激素 (cytokine) 及化學激素 (chemokine) 等，進一步誘發庫佛氏細胞 (kuffer cell) 以及肝星狀細胞 (hepatic stella cell) 活化，除大量分泌發炎反應相關之細胞激素及化學激素外，持續性的肝臟損傷也使部分肝星狀細胞轉化為纖維細胞 (myofibroblast) 分泌細胞外基質 (extra cellular matrix, ECM) 以填補受損肝臟細胞之空隙、維持肝臟結構，肝臟中 ECM 大量蓄積，即稱之為肝纖維化 (Bataller and Brenner, 2005)，因缺乏有效之對症藥物，常惡化為肝硬化，此時患者只能依賴肝臟移植，然而，肝臟捐贈器官的缺乏以及成功配對的困難性造成肝纖維化晚期之患者有極高之死亡率。

最近研究顯示肝纖維化可以逆轉，但目前所用於治療慢性肝炎之藥物其成效不彰，有鑒於此，如何發展有效的治療方式成為目前最重要之研究課題。許多研究團隊所發表之文獻證實以幹細胞治療肝纖維化之可能性，包括以臍帶血幹細胞、骨髓間葉幹細胞以及脂肪幹細胞，皆被證實在動物模式上具有治療肝纖維化之潛力 (Hong *et al.*, 2005; Sgodda *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2005)。部分研究團隊也提出，由於肝纖維化發生時，肝臟中基質金屬蛋白酶 (MMPs) 會大量表現 (Takahara *et al.*, 1997)，而幹細胞遷移入受損肝臟後，以調控基質金屬蛋白酶表現量之方式，幫助清除肝臟中堆積之纖維化組織 (Boeker *et al.*, 2002; Sakaida *et al.*, 2004)。但移植後遷移入肝臟之幹細胞數量稀少，以及遷移入肝臟之幹細胞後續命運為何，皆需等待後續研究結果。為此，本試驗使用不同大小之幹細胞團塊，測試是否因細胞團塊大小增加，而提高其遷移入肝臟之比率，進而提升治療肝纖維化之效果，若能有更進一步之研究成果，相信對於再生醫學及細胞治療之發展必有相當大的助益，並在未來造福許許多多為肝纖維化所苦之患者。

第2章

文獻檢討

2.1 肝臟之構造與功能

2.1.1 肝臟解剖構造

肝臟位於腹腔右上緣，橫膈膜下方，胃及膽管上方，後方為食道、下腔靜脈與脊柱。肝臟又分為四葉，最大為右葉，其次有左葉，方葉以及位於肝臟下表面的尾葉。此四葉構成著個肝臟主體，由鐮狀韌帶、冠狀動脈與左右三角韌帶固定於腹腔。根據肝臟之構造與功能，有以下三種分葉情形。

2.1.1.1 肝小葉 (hepatic lobule)

肝小葉為構造上之單位，其排列為六角柱狀之結構 (圖 1)，中間有一貫穿之中央靜脈，肝臟細胞以靜脈為中心呈輻射狀排列，並層疊為名為肝索 (hepatic cord) 之板狀構造，各肝索彼此分離或是互相交接吻合，在相鄰之細胞間，部份分開形成一條微膽管 (bile canaliculus)，兩板狀構造之間隙稱為竇狀間隙 (sinusoid)，可容納來自肝動脈與門靜脈之血液，並由中央靜脈匯流而出。肝小葉之頂點處稱為肝門區 (portal area)，內含門靜脈 (portal vein)、肝動脈 (hepatic artery) 及膽管 (bile duct)，以上三者明顯且易於區別，故常合稱肝門三合體 (portal triad)。

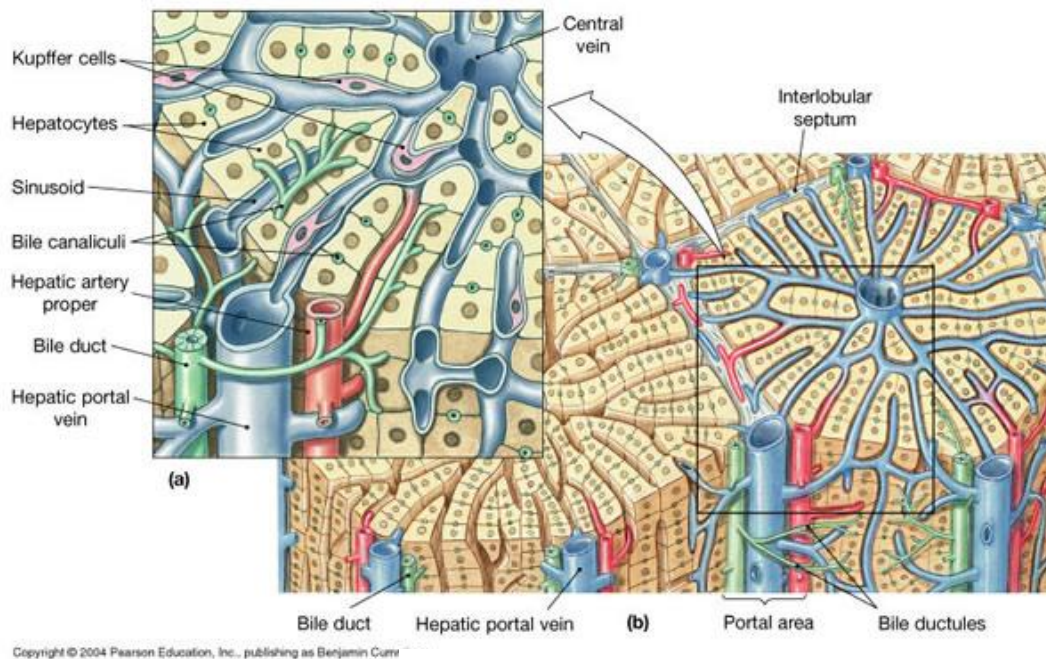
2.1.1.2 肝門小葉 (portal lobule)

為機能性單位，以肝門區為中心，中央靜脈為頂角之三角形區域，其涵蓋相鄰之三組肝小葉各一部分，系膽汁輸入肝門區中膽管內之區域範圍。

2.1.1.3 肝腺泡 (liver acinus)

為肝臟在血流上之功能單位，成菱形或是卵圓形，其兩頂點為肝門區，另兩頂點為中央靜脈，血液由肝門區流向中央靜脈。

肝臟擁有相當特殊的血液循環方式，雙循環系統。其一為大循環系統之肝動脈、肝靜脈，血液由腹腔主動脈 (abdominal aorta) 進入肝動脈後，經由竇狀隙流經肝索細胞後進入中央靜脈，進而匯流入下腔靜脈 (postcava vein) 回到心臟，大循環系統運輸一般養分及氧氣，用於供給肝索細胞所需之養分。其二為肝門靜脈系統，血液由胃靜脈、胰靜脈、脾靜脈及腸繫膜靜脈注入肝門靜脈，肝門靜脈進入肝臟後，即分枝成越來越小之門靜脈，同樣經由竇狀隙流經肝索細胞，爾後匯流入中央靜脈，並回到心臟。與大循環系統不同的是，門靜脈系統運輸來自小腸絨毛吸收之養分至肝臟，以作為生化合成使用，但其為缺氧血，氧氣的供應主要依賴大循環系統中肝動脈之供給。在肝索結構中，較靠近肝門區的肝索細胞由於血液流向的關係，會獲得較多的氧氣與養分，故此處合成與耗能之生化反應會較偏離處高，反之，偏離處肝索細胞之反應以分解及代謝毒素較多，而該處肝索細胞老化或是凋亡後，會由上游區具分裂再生能力之肝細胞替補。



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

<http://publichealth-line.blogspot.tw/2012/01/liver-structure-anatomy-of-liver-and.html>

圖 1. 肝臟之解剖構造。

肝臟解剖構造中，肝小葉之結構示意圖，其為六角柱狀結構，中央靜脈在中心，六角之頂點為肝門三合體之門靜脈、肝動脈及膽管所構成。

Figure 1. Anatomic structure of liver.

In the Anatomic structure, hepatic lobule contained central vein, and portal triad including portal vein, bile duct and artery.

2.1.2 肝臟之生理功能

肝臟在動物體中之主要生理功能可以分為以下幾項：

- (1) 代謝功能的合成與分解：糖類代謝中的糖解作用 (glycolysis)、糖質新生作用 (glyconeogenesis)，可將經由消化道吸收的葡萄糖，蛋白質與脂質等轉變為肝糖儲存，再依據血糖變化量調整肝糖合成及分解的速率，以維持血糖的恆定。蛋白質代謝中的胺基酸合成，轉胺作用 (transamination)，由蛋白質中的必需胺基酸合成其他非必需胺基酸，並在胺基酸被分解後將其毒性較高的胺基轉變成為毒性較低的尿素。脂質代謝中的膽固醇生合成以及三酸甘油酯 (triglycerides)，脂蛋白合成。體內膽固醇濃度維持恆定有助於其他臟器中固醇類激素的生成，而三酸甘油酯可作為骨骼肌或是內臟中肌肉的能量來源，脂蛋白則在脂質運送中扮演重要的角色。
- (2) 解毒功能：肝臟具有多種解毒系統，許多的酵素在此將體內的代謝物及外來毒素轉化成毒性較小或是水溶性較高的物質以利排出，如細胞色素 P450 (cytochrome P450)，穀胱甘肽 (glutathione)，酒精去氫酶 (alcohol dehydrogenase, ADH)，乳酸脫氫酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 等，將過氧化物，超氧化物，酒精及乳酸等對體內細胞造成傷害的物質進行解毒。
- (3) 儲存功能：肝臟不僅僅是儲存肝糖的重要器官，同時也儲存了三酸甘油酯、維生素 A、D、E、K、維生素 B12 (cobalamins)、鐵、銅等重要營養素及礦物質。
- (4) 轉化功能：部分維生素或是藥物進入血液中後，必須送至肝臟中轉化成活化型態，再由循環系送至其作用場所發揮功效，如維生素 D3 (cholecalciferol) 於肝臟中轉變為 25-OH-D3 等。
- (5) 膽汁之分泌；肝臟細胞合成膽汁後經由膽管運輸至膽囊，於膽囊濃縮後進入消化道，除了幫助脂肪消化分解以外，肝臟細胞也將血紅素 (hemoglobin) 分解成膽色素 (bilirubin)，並隨膽汁進入消化道，最後排出體外。
- (6) 分泌性蛋白質製造：白蛋白 (albumin)，胰島素樣生長因子 (insulin-like growth factor 1, IGF-1)，血小板生成素 (thrombopoietin) 等重要的分泌性蛋白質皆由肝臟製造，當肝臟發生病變時常伴隨著血液滲透壓失常，體重減輕和凝血異常的出血現象。

2.2 肝臟疾病與傳統治療方式

2.2.1 猛爆性肝炎 (hepatitispage, or acute fulminating hepatitis)

猛爆性肝炎在醫學上又稱為急性肝衰竭 (acute liver failure)，主因為肝炎病毒 (hepatitis virus) 感染或是過量使用藥物導致，而國人發生急性肝衰竭的主因為本身為 B 型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 帶原者，或是使用已醯胺酚 (acetaminophen) 類，抗黴菌藥物或是類固醇等藥物所致。初期症狀類似感冒或是一般肝炎，食慾不振、精神欠佳、噁心、嘔吐等，接著如同一般肝炎因膽汁無法排出而出現黃疸症狀，但其快速發展的病程於數週之內便由於體內毒素無法排除，出現肝性腦病變 (hepatic Encephalopathy) 及凝血功能異常，常併發多重器官衰竭 (multiorgan dysfunctional syndrome, MODS)。

目前治療方法只能仰賴肝臟移植，而在移植前給予支持性療法如抗氧化劑、抗發炎藥物及利尿劑等，合併使用人工肝臟支持，但因其肝臟細胞死亡遠遠超過再生速度，故未獲移植的患者其死亡率高達七至八成。

2.2.2 急性肝炎與慢性肝炎 (acute and chronic hepatitis)

與猛爆性肝炎不同的是，急性與慢性肝炎除感染肝炎病毒及過量使用藥物以外，也會因為酒精，或是高油高膽固醇的飲食攝取所引發。急性肝炎發病後，血清中麩醯胺酸丙酮酸轉胺酶 (glutamic-pyruvic transaminase, GPT/ALT) 及天門冬胺酸胺基轉移酶 (glutamic-oxaloacetic transminase, GOT/AST) 會急遽上升，甚至高達正常值的十倍以上，而二至三個月後會緩緩下降，最後回復至正常值。但若肝指數持續偏高超過六個月以上，便會轉變為慢性肝炎。

感染肝炎病毒 A 型、E 型或是藥物及酒精過量的患者，大多會造成急性肝炎，其癒後後遺症較小。而感染血清型肝炎病毒 B 型及 C 型，或是長期飲用過量酒精及攝取高油高膽固醇的患者則較容易轉變為慢性肝炎，慢性肝炎隨著病程發展會在死亡的的肝臟細胞周圍形成纖維化的疤痕組織 (fibrotic scar tissue)，即肝纖維化 (liver fibrosis) (圖 2)，故其癒後較不佳。不同於急性肝炎發病初期患者多有疲倦、嗜睡、食慾不振、嘔吐等症狀，大部分慢性肝炎患者發病初期是毫無徵兆的，必須依賴血液分析，使得慢性肝炎患者難以在病程早期或獲得確診。

2.2.3 肝纖維化 (liver fibrosis)

肝纖維化為慢性肝病必經之過程，其原因多為病毒性肝炎、酒精或藥物濫用、以及飲食習慣等，會造成脂質代謝失調，造成肝臟內三酸甘油脂蓄積、過氧化物 (ROS) 累積，最後強大的氧化壓力導致肝細胞膜破裂，並釋出發炎反應相關之細胞激素 (cytokine) 及化學激素 (chemokine) 如 TGF- β 1, IL-6 及 TNF- α 等，進一步誘發庫佛氏細胞 (kuffer cell) 以及肝星狀細胞 (hepatic stella cell) 活化，除大量分泌發炎反應相關之細胞激素及化學激素外，持續性的肝臟損傷也使部分肝星狀細胞轉化為纖維細胞 (myofibroblast) 分泌細胞外基質 (extra cellular matrix, ECM) 以填補受損肝臟細胞之空隙、維持肝臟結構 (Bataller and Brenner, 2005)。肝臟中 ECM 大量蓄積，即稱之為肝纖維化，是纖維增生 (fibrogenesis, 即細胞外基質合成增加) 和纖維分解 (fibrolysis, 即細胞外基質降解) 不平衡的結果。纖維增生是許多器官對於長期損傷的一種修復反應，一旦有害因素去除、細胞外基質成分得到恢復則纖維增生停止，急性肝病或單次的肝臟損傷即使很嚴重也不會導致肝纖維化。但各種病因所致反復或持續的慢性肝實質發炎及壞死可導致肝臟持續不斷地纖維增生而形成肝纖維化，持續惡化後肝臟大部分細胞轉由纖維化組織取代，肝小葉之結構破壞後形成結節，即成為肝硬化。

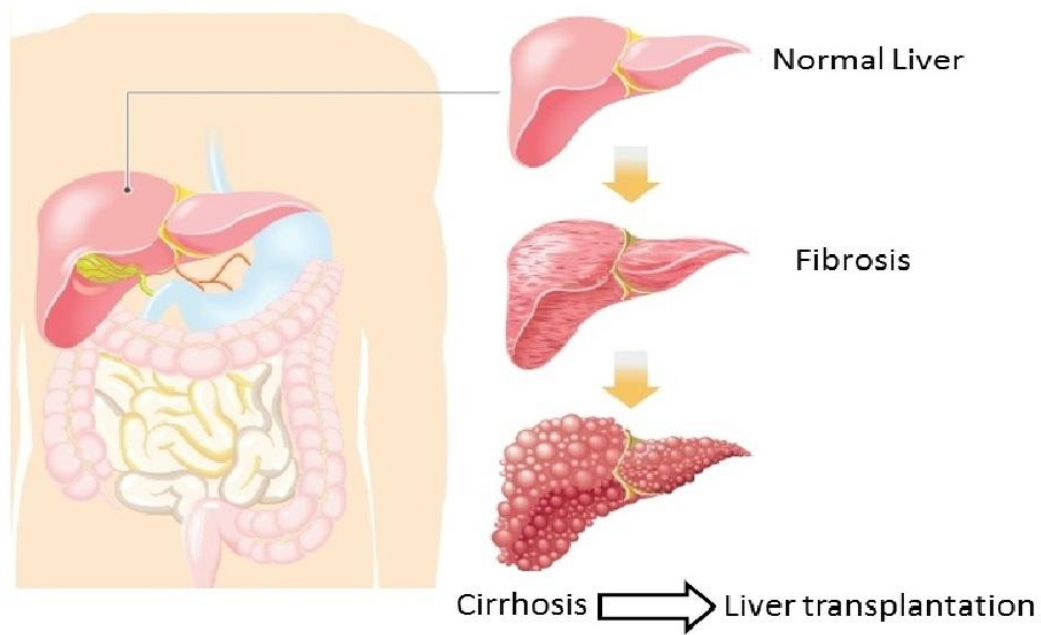


圖 2. 慢性肝臟疾病之病程進展。

肝纖維化 (fibrosis) 為慢性肝病必經之過程，常惡化成為肝硬化 (cirrhosis)，最終只能倚賴肝臟移植。

Figure 2. Deterioration of chronic liver disease.

Liver fibrosis is the ineludible process of chronic liver disease deterioration, mostly turn worse into cirrhosis, while it developed to cirrhosis stage, patients can only rely on liver transplantation.

2.3 幹細胞簡介

2.3.1 幹細胞之分類

幹細胞 (stem cells)，為動物體內一特殊細胞群，廣義的定義為“具有分裂增殖且擁有自我更新能力 (self-renewal)，並於適當之微環境 (niche) 下可分化為特異性細胞”。

2.3.1.1 依幹細胞分化能力分類

依據其分化能力的不同，可區分為以下四大類：(1)全能性幹細胞 (totipotent stem cells)：此類幹細胞可分化為內、中、外等三胚層之各種細胞，包括胎盤。例如受精卵。(2)多能性幹細胞 (pluripotent stem cells)：此類幹細胞可分化為內、中、外等三胚層之各種細胞，但不具有分化成胎盤之潛能。像是 embryonic stem cells、iPS 等。(3)複能性幹細胞 (multipotent stem cells)：此類幹細胞之分化潛能為單一胚層三種以上的細胞。(4)單能性幹細胞 (unipotent stem cells)：此類幹細胞具有分化為單一特定組織細胞之潛能，但仍具有自我更新之能力，動物體內大部分組織由此類幹細胞進行更新。

2.3.1.2 依幹細胞來源分類

依幹細胞來源之不同，可分成以下兩類：(1)胚幹細胞 (embryonic stem cells, ESC)：當受精後之胚胎發育至囊胚 (blastocyst) 時期時，其胚內的細胞全會聚集成為 inner cell mass，而由此聚集之細胞群中分離出的細胞即成為胚幹細胞。自 1981 年 Evans 與其研究團隊成功分離出小鼠胚幹細胞 (Evans and Kaufman, 1981)，Thompson 與其研究團隊也於 1998 年成功分離出人類胚幹細胞 (Thomson *et al.*, 1998)。如前所述，胚幹細胞屬於多能性幹細胞，其增生、分化與自我更新能力極強。在動物實驗中已證實 ESCs 可治療許多疾病如帕金森氏症 (Bjorklund *et al.*, 2002) 以及第一型糖尿病 (Dor *et al.*, 2004) 等，但由於胚幹細胞取得時會終止該胚胎發育或導致其死亡，未來應用在人類的臨床醫療上將產生相當嚴重的倫理以及道德爭議問題。再者，由於胚幹細胞的增生與分化能力太過強大，移入動物體內

後造成畸胎瘤之比率偏高 (Thomson *et al.*, 1998)，故大大限制了其臨床應用性。(2) 成體幹細胞 (adult stem cells)：在胚胎發育成動物體後，由各種器官組織中所分離出的幹細胞皆稱為成體幹細胞，目前分離出的成體幹細胞包括：造血幹細胞 (hematopoietic stem cells, HSC)、間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs)、表皮幹細胞 (epidermal stem cells)、肝臟幹細胞 (hepatic stem cells)、神經幹細胞 (neuron stem cells)、肺臟幹細胞、心臟幹細胞等。其中之間葉幹細胞可由許多器官及組織中分離出，如骨髓 (bone marrow)、脂肪 (Adipose tissue)、羊水 (Amniotic fluid)、臍帶血 (umbilical cord blood) 以及臍帶內膜 (umbilical cord lining) 等 (Pittenger *et al.*, 1999)。這些成體幹細胞大量存在於動物體內，以取代失去生理活性或是老化、受損之細胞，來維持器官及組織之穩定狀態 (homeostasis)。

而在各種不同來源之成體幹細胞中，研究較深入者為造血幹細胞以及間葉幹細胞，造血幹細胞在臨床免疫學科上已用來治療多種免疫疾病，以及化療後之免疫系統重建 (Koc *et al.*, 2000) 而間葉幹細胞中又以骨髓來源者被研究較脂肪來源者為多。

2.3.2 幹細胞之增生模式

幹細胞之增生可分為對稱分裂 (symmetric cell division) 與不對稱分裂 (asymmetric cell division)。對稱分裂指的是一幹細胞分裂成兩枚和原細胞相同之幹細胞，多用於增加該幹細胞之數量。非對稱分裂則會由一幹細胞分裂為一枚和原來相同之幹細胞，並同時分裂出一枚具有專一功能性之體細胞，動物體大多數器官及組織皆經由此種方式完成更新及修復。

2.3.3 間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs)

間葉幹細胞屬於複能性幹細胞，主要源自於骨髓基質 (Bianco *et al.*, 2001)、脂肪細胞基質 (Zuk *et al.*, 2002)、羊水 (In 't Anker *et al.*, 2003)、臍帶血及臍帶內膜 (Campagnoli *et al.*, 2001)。MSCs 為貼附型細胞，其外觀呈紡錘狀，其特性為易於

分離培養且在體外增生相當迅速。而經過適當的誘導可以分化為多種類型的細胞，包括硬骨，軟骨及脂肪細胞 (Caplan, 1991)，甚至可以跨胚層轉分化為神經細胞 (Sanchez-Ramos and Kaunitz, 2000)，肝臟細胞 (Lee *et al.*, 2004)，胰島細胞 (Sun *et al.*, 2007) 及心肌細胞 (Saito *et al.*, 1995) 等。故在再生醫學中之細胞治療上極具應用價值，先前將間葉幹細胞應用於人類疾病動物模式的研究已證實可治療包括心肌梗塞、再生不良性貧血、第一型糖尿病、帕金森氏症及肝纖維化等疾病 (Schaffler and Buchler, 2007)。

大部分 MSCs 在 CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, MHC I 及 Stro-1 等表面抗原呈現陽性反應，而不表現 CD4a, CD11, CD14, CD18, CD31, CD34, CD40, CD45, CD80 及 CD86 (Chamberlain *et al.*, 2007)。就免疫學研究而言，MSCs 雖然會表現主要組織相容性複合體 (major histocompatibility complex, MHC) class I，但是不會表現 MHC class II 中之 CD80 及 CD86，故以 MSCs 進行同種異體或是異種移植之研究中可能較不會產生免疫排斥之問題 (Di Nicola *et al.*, 2002)。

目前將間葉幹細胞移入受體內的方式大多經由淺層靜脈注射方式，使移植之細胞隨著血流移動至受損器官或是組織中，在先前研究中發現，受損之組織以及細胞所分泌的細胞激素 (cytokine) 或是化學激素 (chemokine)，具有調控幹細胞遷移 (migration) 能力 (Hoehn *et al.*, 2002)。例如細胞凋亡 (apoptosis)、壞死 (necrosis) 或是發炎反應發生時所分泌的 TNF- α 以及 IL-1 β 與間葉幹細胞表面受體結合後，引發的訊息傳遞會使得第一型基質細胞衍生因子 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) 之表現量增加，進而經由自泌作用 (autocrine)，與間葉幹細胞本身之化學激素受體 (chemokine receptor 4, CXCR4) 結合，及促進間葉幹細胞往受傷組織移動 (Bittner *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2001; Menon *et al.*, 2007)。

相較於胚幹細胞，間葉幹細胞移植並未有畸胎瘤產生的紀錄，唯一需注意的是，在小鼠實驗上，將癌細胞與間葉幹細胞共同移植，會增加罹癌之風險 (Djouad *et al.*, 2003)。故在臨床應用上需格外注意，患者體內是否有大量癌細胞存在。

2.3.4 脂肪幹細胞

2002 年 Zuk 的研究團隊成功分離出具有分化潛能的脂肪幹細胞，也證實脂肪幹細胞屬於間葉幹細胞群 (Zuk *et al.*, 2002)，目前研究已顯示脂肪幹細胞應用於動物模式中可治療腦神經、心臟、肝臟、糖尿病等相關疾病 (Schaffler and Buchler, 2007)，相較於骨髓來源之間葉幹細胞，脂肪來源之幹細胞取得較容易，其單次可取得的量也較大，於抽取過程中，患者的不適感也較小，在臨床應用中脂肪幹細胞移植已被核可作為整形手術之用 (Fang *et al.*, 2007)，未來臨床應用性極大。

2.4 四氯化碳介紹

四氯化碳為無色澄清易流動的液體，工業上有時因含雜質呈微黃色，具有芳香氣味，易揮發。密度 (20°C) 1.595 g/cm³、熔點 -22.8°C，沸點 76~77°C。四氯化碳的蒸氣較空氣重約 5 倍，且不會燃燒。四氯化碳的蒸氣有毒，它的麻醉性較氯仿為低，但毒性較高。吸入人體 2~4 毫升就可使人死亡。四氯化碳在水中的溶解度很小，且遇濕氣及光即逐漸分解生成鹽酸。易溶於各種有機溶劑，能與醇、醚、氯仿、苯等任意混合。對於脂肪、油類及多種有機化合物為一極優良的溶劑。細胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP)，是四氯化碳 (CCl₄) 在體內進行代謝活化的主要酶類。研究表明，CCl₄ 的活化產物，如 CCl₃ 等對 CYP 酶類本身也產生破壞作用，兩者皆會使肝臟中蛋白質合成受阻、脂質代謝失調，造成肝臟內三酸甘油脂蓄積、過氧化物 (ROS) 累積 (Recknagel, 1967)，最後強大的氧化壓力導致肝細胞膜破裂，並釋出發炎反應相關之細胞激素 (cytokine) 及化學激素 (chemokine) 等，進一步誘發庫佛氏細胞 (kuffer cell) 以及肝星狀細胞 (hepatic stella cell) 活化，除大量分泌發炎反應相關之細胞激素及化學激素外，持續性的肝臟損傷也使部分肝星狀細胞轉化為肌纖維母細胞 (myofibroblast) 分泌細胞外基質 (extra cellular matrix, ECM) 以填補受損肝臟細胞之空隙、維持肝臟結構 (Sheweita *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2003)。肝臟中 ECM 大量蓄積，即稱之為肝纖維化，為慢性肝病發展之必經過程。動物試驗上多以單次高劑量之 CCl₄ 注射模擬急性肝臟損傷，以多次中低劑量之 CCl₄ 注射模擬慢性肝損傷 (Slater and Sawyer, 1971)。

第3章 試驗研究

3.1 紅色螢光蛋白質轉基因豬之脂肪幹細胞分離與純化

3.1.1 前言

脂肪幹細胞被認為與間葉幹細胞群相似，包括其表面抗原表現，轉分化潛能以及免疫調節能力等。間葉幹細胞屬成體幹細胞中之一員，先前研究已證明可由骨髓、羊水、脂肪與臍帶血等組織間分離出間葉幹細胞 (Bianco *et al.*, 2001; Campagnoli *et al.*, 2001; In 't Anker *et al.*, 2003; Zuk *et al.*, 2002)，此類細胞於體外培養增生快速，及擁有分化為其他種類細胞之能力。在先前的研究中，改變培養間葉幹細胞之微環境，可使其轉分化為胚胎中胚層來源之其他細胞，包括脂肪、硬骨以及軟骨細胞等，甚至跨胚層轉分化為神經、心肌、肝臟細胞等其他胚層之細胞 (Lee *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 2007)。

本研究室於 2011 年所建立之脂肪幹細胞分離程序，可由豬之背部脂肪中分離具有自我更新 (self-renewal) 能力且可於體外誘導分化為軟骨細胞、成骨細胞及脂肪細胞之間葉幹細胞 (Wang, 2011)。本試驗欲自紅色螢光蛋白質轉基因豬之背部脂肪組織中，分離出高純度之脂肪幹細胞，希望於後續細胞治療之動物試驗中，以其穩定表現之紅色螢光蛋白質，作為細胞遷移及其命運之追蹤標記。並以流式細胞儀分析其表面抗原 (clusters of differentiation, CD) 表現特性，以證實吾人所純化出之脂肪幹細胞與間葉幹細胞具有相似之表面抗原表現，且未受到脂肪組織中其他細胞之雜混。

3.1.2 材料與方法

3.1.2.1 實驗動物飼養環境及條件

豬隻飼養於本系傳統畜舍內，於每日六時及十七時飼予完全配合飼料（統一），並給予乾淨飲水，每日五時及十六時固定清潔畜舍，並以大型風扇維持畜舍良好之通風。

3.1.2.2 紅螢光蛋白質轉基因豬之產製

由本研究室利用原核胚基因顯微注射技術，於原核時期之豬胚中注射入帶有雞 beta-actin 啟動子及珊瑚紅螢光蛋白質之 cDNA 所構築而成的轉殖基因片段，再將胚移置入代理孕母體內，可產製出全身性表現紅螢光蛋白質之轉基因豬，如脂肪、肌肉、肝、腎、腦、腸道、胰臟及骨髓間質細胞等皆穩定表現紅色螢光蛋白質。

3.1.2.3 豬脂肪幹細胞培養液之配置

本試驗中分離純化以及培養豬脂肪幹細胞之基礎培養液為 DMEM/F12 (Gibco, 1012698)，內含 1% 抗生素 (PenStrep, Gibco, 1103911)，以及 2.438 g/L sodium bicarbonate，配置完成後以 0.22 μ m 之過濾杯 (Millipore, MP010543SA) 過濾以確保無菌，並保存於攝氏四度；欲培養豬之脂肪幹細胞則須先加入百分之十的胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS, Hyclone, ARH27209)。

3.1.2.4 豬脂肪幹細胞之分離與純化

- (1) 取八週齡之紅螢光轉基因豬，給予皮下注射賜靜靈 (Stresnil, Janssen Pharm, AP132G00.) 及硫酸阿托品 (Atropine sulfate, 信東藥品, 2RS2950) 後，肌肉注射舒泰 (VIRBAC, 06516, France)，將豬之移至使手術台上俯臥，背部剃毛、消毒，並塗佈適量碘酒，以手術單布罩住其他部位，露出腰椎附近。

- (2) 以 10 號手術刀做 T 字切開，下刀深度至皮下組織即可，勿傷至肌肉組織，寬度各約六公分，以開創器翻開，並以手術刀分離肌膜與脂肪組織。
- (3) 以 10 號刀小心切下背脂組織，取得約兩公克置於預溫攝氏 37 度之脂肪組織運送緩衝液中，並以 2-0 絲線縫合背部傷口，給予皮下注射盤尼西林抗生素溶液（中化製藥, 88P712），隨後移至乾淨畜欄，觀察術後恢復情形。
- (4) 將取下之脂肪組織連同緩衝液移至細胞培養室，以物理性剪碎方式將之切成約直徑一毫米以下之碎塊，並置於十毫升 KRB-G 中，加入第二型膠原蛋白酶 (300IU/ml, sigma, 104453)，於攝氏三十七度下作用九十分鐘，作用完畢以無菌雪紡紗濾掉大塊組織，以 800xg 離心十五分鐘，去除上層油滴及上清液，以 DMEM/F12 回溶後用 70 μ m 之細胞分離篩 (BD falcon, 1182751) 過濾，再以離心方式清洗兩次，將細胞以 5x10³/cm² 之密度種植於細胞培養盤中。
(註：以上分離步驟需儘快完成，以免影響細胞活性。)

3.1.2.5 豬脂肪幹細胞之體外培養及保存

脂肪幹細胞屬於間葉幹細胞群，與間葉幹細胞依樣具有貼附性，當細胞增生至滿盤時需繼代或是以冷凍方式將其保存。繼代時先移除培養液，以磷酸鹽緩衝液潤洗兩次，移除緩衝液後，加入 0.25% 之 trypsin-EDTA (Gibco, 917999)，靜待一分鐘後輕敲盤緣使細胞懸浮，再加入等量含有胎牛血清之培養液中中止反應，接著以 700xg 離心五分鐘，去除上清液後以含有胎牛血清之培養液將細胞重新懸浮並培養於新容器中，繼代稀釋比例為三倍稀釋，若欲保存細胞，則可將細胞懸浮於含有 10% 二甲基亞砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO, Sigma, RNBC1435) 之胎牛血清中，置於保麗龍盒中於攝氏負八十度冰箱緩緩降溫，待二十四小時後始可移入液態氮中保存。

3.1.2.6 細胞計數

由已懸浮之細胞液中吸取 10ul，與 10ul 之錐蘭 (trypan blue, Gibco 15250-061, USA) 混和均勻使其染色，取 10ul 染色後之細胞液注入血球計數盤 (hemocytometer)，於顯微鏡下計算活細胞數，死亡之細胞會因 trypan blue 滲入而呈現藍色，而活細胞

則因細胞膜完整故不會呈色，可由計算未呈色之細胞並乘上稀釋倍率後得到細胞總數。

3.1.2.7 流式細胞儀 - 表面抗原分析

- (1) 首先去除培養液，並以 Phosphate-buffer saline (PBS) 潤洗兩次，加入 0.25% Trypsin-EDTA 使細胞懸浮，以等量含有血清之培養液中止反應後，再以 700xg 離心五分鐘。
- (2) 離心後去除上清液，以 washing buffer (49.5 ml PBS + 0.5 ml FBS) 重新懸浮細胞，再次以 700xg 離心五分鐘。
- (3) 將抗體稀釋至指定濃度，並與細胞均勻混合成 100 μ l 之體積並置入離心管中。
(抗體濃度參照原廠 data sheet，細胞量為 2×10^5 以上。) 檢測豬脂肪幹細胞所使用之抗體為 CD4a-PE, CD29-PE, CD31-PE, CD44-PE, CD45-PE, CD90-PE, MHC-I-PE 以及 MHC-II-PE。
- (4) 將裝有抗體及細胞混合液之離心管以鋁箔紙包覆避光，置入攝氏 4 度冰箱靜置 30 分鐘。
- (5) 加入 500 μ l 之 washing buffer 並混勻，以 700xg 離心五分鐘，吸去上清液。重複此步驟兩次，無需添加二級抗體者直接跳至步驟十。
- (6) 加入以完成稀釋之二級抗體，與細胞混合成 100 μ l 之體積至入離心管中。
- (7) 將裝有抗體及細胞混合液之離心管以鋁箔紙包覆避光，靜置於攝氏 4 度冰箱，30 分鐘。
- (8) 加入 500 μ l 之 washing buffer 並混勻，以 700xg 離心五分鐘，吸去上清液，重複此步驟兩次。
- (9) 加入 500 μ l 之 fixing buffer (48.1ml PBS + 0.5ml FBS + 1.35 ml of formaldehyde 37% w/w) 使細胞懸浮後即可進行流式細胞儀分析 (FACS scan flow cytometer, FACS Aria Becton-Dickson)。

3.1.3 結果與討論

紅色螢光蛋白轉基因豬脂肪幹細胞之分離與純化

本試驗由紅色螢光蛋白轉基因豬之背部脂肪組織中，分離出高純度之脂肪幹細胞，在取下紅螢光蛋白轉基因豬部分背部脂肪組織後，以物理性剪碎，並伴隨著第二型膠原蛋白酶作用九十分鐘後，發現脂肪組織中大部分之組織間質皆被消化，成熟並帶有油滴之脂肪細胞均勻散佈在作用溶液之中，再以離心之方式將脂肪油滴去除，分離出含有脂肪幹細胞之 Stromal-vascular fraction (SVF) 呈現團塊狀沉積在離心管底部，爾後利用脂肪幹細胞特有之貼附特性，以及在體外培養環境下快速增殖之特點，將 SVF 中之細胞以極稀釋 (extremely dilute) 的密度種植於直徑十公分之細胞培養盤中，培養約六天後可觀察到數個脂肪幹細胞所形成的聚落。在本試驗中以兩克之脂肪組織約可分離出 6×10^5 之脂肪幹細胞，經過貼附性培養並於培養液置換時去除雜細胞後，經過六天增值，可以得到 1×10^7 經純化後之脂肪幹細胞，以流式細胞儀分析其表面抗原表現特性，其中，CD29, CD44, CD90, MHC I 等表面抗原呈現陽性，CD4a, CD31, CD45 以及 MHC II 等表面抗原呈現陰性 (圖 3)。此結果顯示吾人所純化之脂肪幹細胞與先前研究所發表之骨髓間葉幹細胞具有相似之表面抗原 (clusters of differentiation, CD) 表現 (Baddoo *et al.*, 2003; Phinney *et al.*, 1999; Tropel *et al.*, 2004)，且與本研究室於 2011 年所建立之具有自我更新 (self-renewal) 能力且可於體外誘導分化為軟骨細胞、成骨細胞及脂肪細胞之間葉幹細胞 (Wang, 2011) 具有相同之表面抗原表現。

在培養過程中培養液的置換可將不具貼附性的紅細胞去除，而免疫細胞及內皮細胞則是由於極稀釋後生長速度緩慢，且在進行幾次繼代後期所占比率更低，進而獲得高純度之脂肪幹細胞。其呈現陽性之表面抗原中，CD29 (β -integrin)、CD44 為細胞遷移及貼附性的指標，此二者與 CD90 (Thy-1) 同為間葉性細胞特有之表面抗原，在多數幹細胞研究中用以區分出間葉幹細胞與其他細胞間的不同；而呈陰性表現之表面抗原中，CD4a 為免疫細胞特有之表面抗原，可與 MHC II 共同作用以辨識外來抗原之侵略；CD31 (PECAM-1) 為微血管內皮細胞及血小板特有之表面抗原；CD45 為白細胞 (leucocyte) 及紅細胞 (erythrocyte) 特有之表面抗原。在試驗中 CD29, CD44 及 CD90 之表現為陽性，所呈現的結果與前人所發表的

間葉幹細胞特性相關，容證明試驗中所分離之脂肪幹細胞具有與骨髓間葉幹細胞相似之特性。而 CD4a, CD31 與 CD45 的不表現，也說明吾人所純化之脂肪幹細胞並沒有受到免疫細胞、紅血球、血小板及血管內皮細胞之汙染。

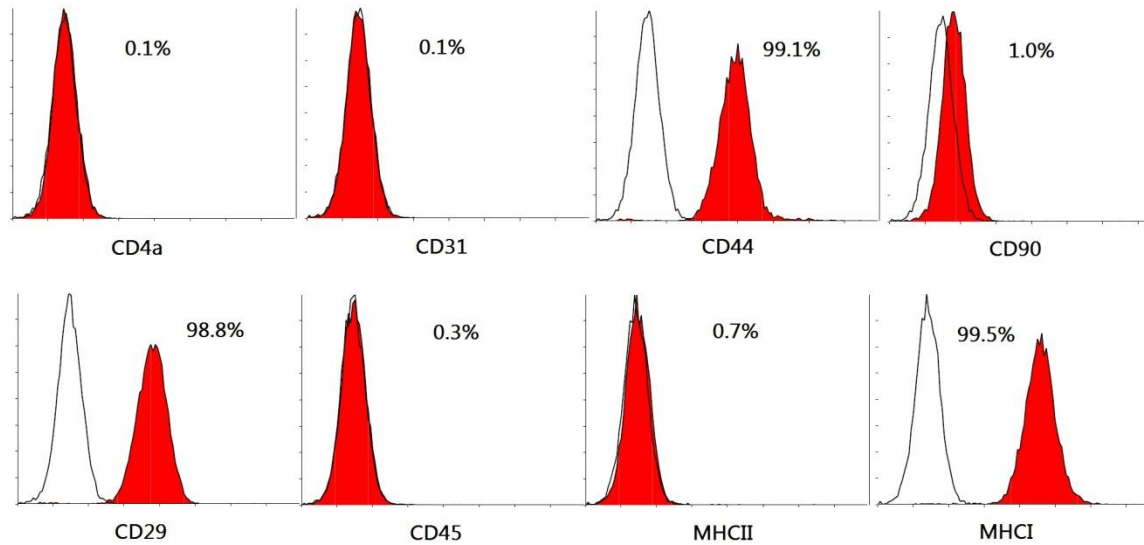


圖 3. 以流式細胞儀分析紅螢光蛋白轉基因豬脂肪幹細胞之表面抗原。

其中 CD4a, CD31, CD45 及 MHCII 呈陰性表現，而 CD44, CD90, CD29 及 MHC I 呈陽性表現。

Figure 3. Surface antigen expression of adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from DsRed transgenic porcine analyzed by Flow cytometry.

The surface antigen CD4a, CD31, CD45 and MHCII were negative, CD44, CD90, CD29 and MHC I were positive expressed.

3.2 紅色螢光蛋白轉基因豬脂肪幹細胞誘導分化為類肝臟細胞之研究

3.2.1 前言

先前研究指出，幹細胞具有轉分化為其他胚層細胞之能力，研究團隊使用骨髓間葉幹細胞為材料，於體外誘導其轉分化為類肝臟細胞 (Lee *et al.*, 2004)，而跨胚層之轉分化能力為複能性幹細胞 (multipotent stem cells) 特性之一。Hepatocyte Growth Factor (HGF) 為肝臟細胞生長因子，在 Schmidt 等人所發表的文獻中提及其對肝臟細胞生長之重要性 (Schmidt *et al.*, 1995)，其可透過受體 C-met 之交互作用使得多種細胞開始進行有絲分裂及分化，許多將幹細胞轉分化為肝臟細胞的研究皆添加此一生長因子。Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) 及 Fibroblast Growth Factor 4 (FGF4) 為第二型及第四型纖維母細胞生長因子，其於胚胎時期之肝臟發育中扮演相當重要之角色 (Ruhnke *et al.*, 2003)，在先前研究亦加入此兩種生長因子以促進幹細胞分化成為肝臟細胞 (Schwartz *et al.*, 2002)。因此本試驗擬將 HGF、FGF2 以及 FGF4 此三種生長因子添加於培養液中，以測試試驗一所分離及純化之脂肪來源幹細胞是否具有跨胚層轉分化為類肝臟細胞之潛能，希望藉此進一步證明其跨胚層分化為肝臟細胞之潛能，做為後續肝纖維化小鼠幹細胞治療試驗之參考依據。

3.2.2 材料與方法

3.2.2.1 實驗動物飼養環境及條件

此試驗採用本研究室所產製之 DsRed 紅色螢光蛋白質轉基因豬，產製及飼養條件如試驗一所述。

3.2.2.2 豬脂肪幹細胞之分離與純化

此試驗所採用之紅色螢光蛋白質轉基因豬脂肪幹細胞，分離以及純化步驟如試驗一所述。

3.2.2.3 分離自紅色螢光蛋白質轉基因豬之脂肪幹細胞體外誘導分化為類肝臟細胞之培養液配置

本試驗中分離純化以及培養豬脂肪幹細胞之基礎培養液為 DMEM/F12，內涵 1% P/S 抗生素，以及 2.438 g/L sodium bicarbonate，配置完成後以 0.22 μ m 之過濾杯過濾以確保無菌，並保存於 4 °C；欲將豬脂肪幹細胞於體外誘導分化為類肝臟細胞時，則須先加入 10% 的胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)、160 ng/ml 之 FGF2 (prospec. CYT-085)、50 ng/ml 之 FGF4 (prospec. CYT-312) 以及 100 ng/ml 之 HGF (peprotech 100-31)。

3.2.2.4 細胞免疫螢光染色

- (1) 將一級抗體 (rabbit anti porcine HNF-1, Santa Cruz, sc-8986) 加入含有 1% BSA 及 0.25% Triton-X 100 之 PBS 中，標記為 1st ready solution，一級抗體之稀釋倍率為 200 倍。
- (2) 將二級抗體 (Alexa Flour 488, Goat anti rabbit IgG, Invitrogen, A11008) 與 DAPI 加入 PBS 中，標記為 2nd ready solution，二級抗體之稀釋倍率為 200 倍，DAPI 之稀釋倍率為 6000 倍。
- (3) 將細胞置入 PCR tube 中，以 4% paraformaldehyde 固定十分鐘，以 PBS 潤洗。

- (4)加入 1st ready solution，靜置 4°C，避光，overnight。
- (5)以 PBS 潤洗一次，加入 2nd ready solution，靜置 4°C，避光，overnight。
- (7)PBS 潤洗一次，以 25 μ l 之 PBS 懸浮細胞，並至於載玻片上，以蓋玻片及指甲油封片，即可以光學顯微鏡觀察之。



3.2.3 結果與討論

3.2.3.1 紅螢光蛋白質轉基因豬脂肪幹細胞於體外誘導分化為類肝臟細胞期間其形態學上之評估

本試驗使用紅螢光蛋白質轉基因豬脂肪幹細胞，以體外培養之方式，於培養液中添加肝細胞生長因子 (hepatocyte growth factor, HGF)，第二型纖維母細胞生長因子 (fibroblast growth factor II, FGF-2) 以及第四型纖維母細胞生長因子 (fibroblast growth factor IV, FGF-4)，經過 12 天體外誘導分化試驗後，其細胞型態有明顯之改變，由紡錘狀之間葉幹細胞型態，轉變為圓形外觀。並於試驗期間的觀察可發現，隨著誘導分化的時間增加，其細胞型態改變之數量也上升 (圖 4)。

先前研究顯示，體外培養人類骨髓間葉幹細胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSC)、臍帶血幹細胞 (umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, UCB-MSCs) 以及人類脂肪幹細胞 (human adipose-derived mesenchymal stem cells, hAD-MSCs)，可在適當環境下誘導分化為類肝臟細胞 (Banas *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2005; Schwartz *et al.*, 2002)，並可表現肝臟細胞特有之蛋白質，及具有攝取低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL)，尿素分泌等類似肝臟細胞之功能，其體外誘導分化過程中細胞型態之轉變與本試驗相似，除外觀轉變為類似肝臟細胞之卵圓形外，細胞間發展出類似膽小管 (bile canaliculi) 之結構也被認為是轉分化為類肝臟細胞之象徵，但其是否有相似於肝臟細胞之功能，則需檢測其是否表現肝臟特异性表現之蛋白質，以獲得進一步之結果。

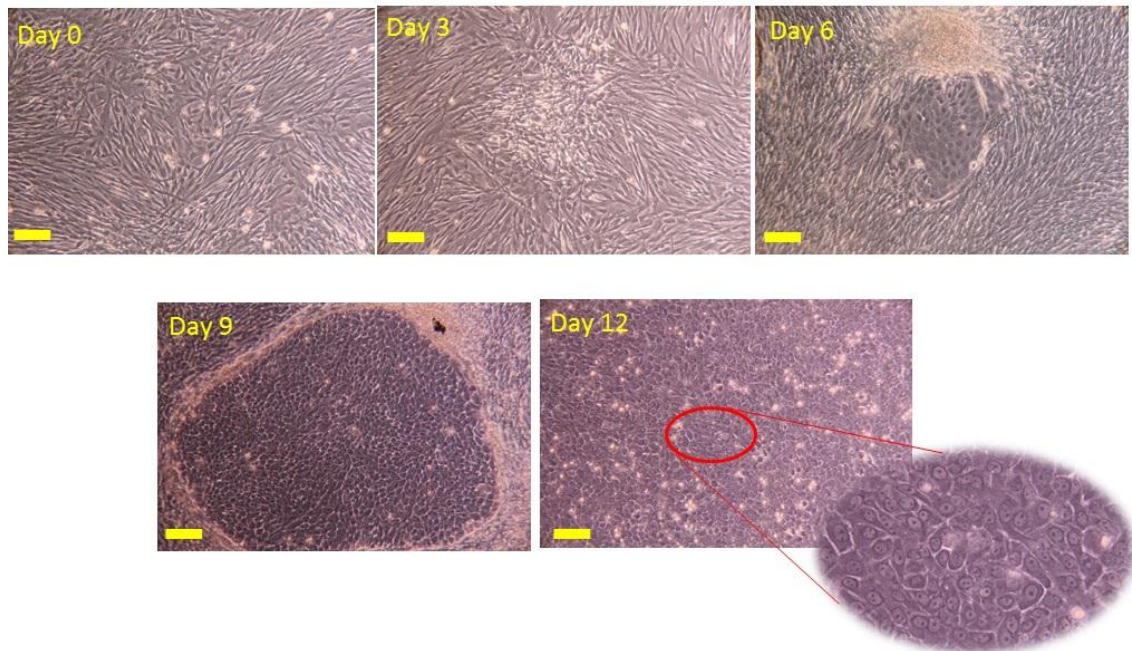


圖 4. 體外誘導 AD-MSCs 分化成為類肝臟細胞期間之形態變化。

於誘導分化第三天後，細胞開始發生聚集，第六天已有部分細胞出現類似肝臟細胞之外觀，第九天此種外觀之細胞增加，至第 12 天大部分細胞皆呈現類似肝臟細胞之外觀。(比例尺為一百微米)

Figure 4. Morphologic changes of AD-MSCs trans-differentiated into hepatocytes like cells *in vitro*.

Cells were clustered after 3 days trans-differentiated, part of cells showed hepatocytes like morphology in day 6 and increased during the experiment, after 12 days trans-differentiation, most of AD-MSCs showed hepatocytes like morphology. (scale bar = 100 μm)

3.2.3.2 紅螢光蛋白質轉基因豬脂肪幹細胞經體外誘導分化為類肝臟細胞後其肝臟細胞特異性蛋白質之表現

紅螢光蛋白質轉基因豬脂肪幹細胞經過 12 天體外誘導分化後，為了解其是否表現肝臟細胞特定表現之蛋白質，以細胞免疫螢光染色之方式，標記第一型肝細胞核因子 (hepatocyte nuclear factor I, HNF-1) 之表現，其為肝臟細胞生長時所表現之特異性蛋白質。試驗結果顯示，經過 12 天誘導分化後，多數細胞皆表現 HNF-1 蛋白質 (圖 5C)，此外，DsRed 轉基因所表現之紅色螢光蛋白質在大多數已分化之細胞中依然穩定表現 (圖 5B)。

先前研究顯示，肝細胞成熟過程中，需 HNF 之參與以維持 hepatic sinusoidal architecture，此外，HNF 之表現也促使肝細胞外 adhesion molecules 透過 cell-cell interaction 形成肝細胞間獨特的 junction，以維持 sinusoidal capillaries 之結構 (Parviz *et al.*, 2003)，因此許多文獻中將其視為細胞轉分化為類肝臟細胞之標記。本試驗結果除證明試驗一所分離及純化出之紅螢光蛋白質轉基因豬脂肪幹細胞，具有跨胚層分化為類肝臟細胞之潛能外，其紅色螢光蛋白質之穩定表現，也可提供後續試驗作為標定細胞位置以及追蹤細胞命運之用途。

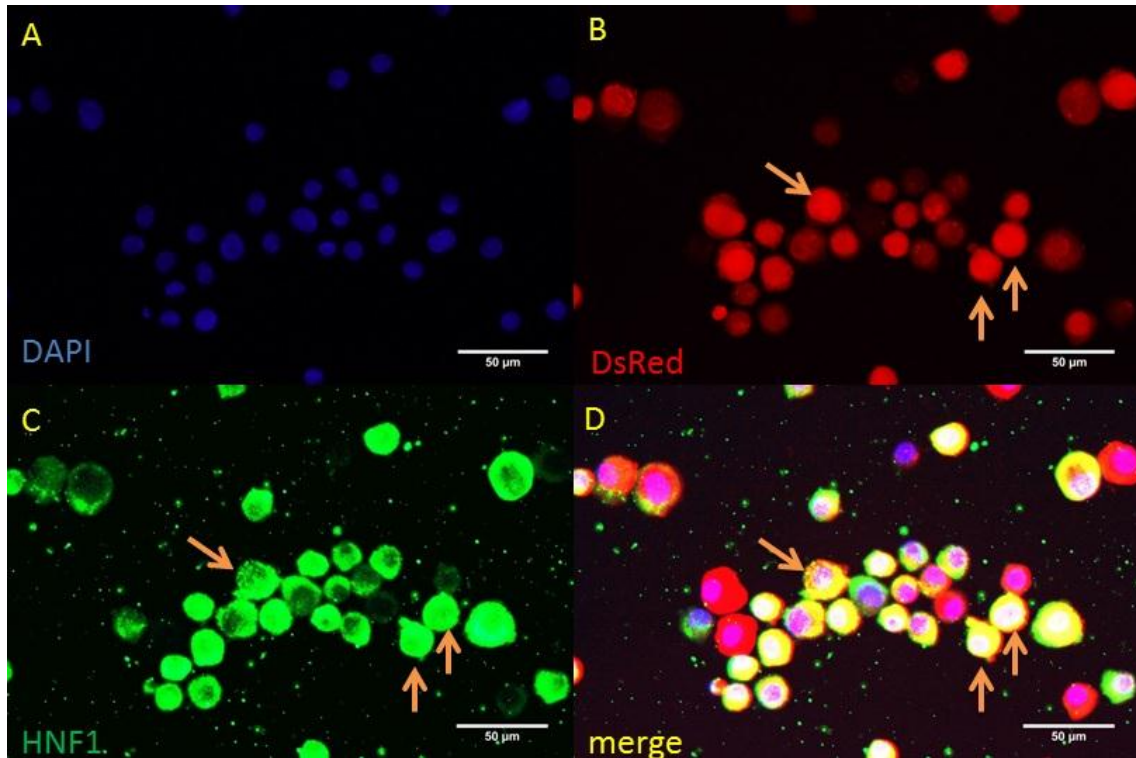


圖 5. AD-MSCs 經過 12 天體外誘導分化後表現 HNF-1 蛋白質。

經過 12 天體外誘導分化後，以細胞免疫螢光染色之方式，偵測到其表現肝臟細胞特異性表現之 HNF-1 蛋白質。(A) 為 DAPI 所標示出之細胞核位置，(B) 為紅螢光蛋白質 DsRed 之表現，(C) 為經由綠色螢光二級抗體標記之肝臟特異性蛋白質 HNF-1 之表現，(D) 為以上三者之疊圖。結果顯示許多細胞同時表現 DsRed 以及 HNF-1 兩種蛋白質。(比例尺為五十微米)

Figure 5. AD-MSCs expressed HNF-1 protein after 12 days trans-differentiation.

Expression of hepatocyte specific protein HNF-1 in induced AD-MSCs detected by immunocytochemistry after 12 days culture. (A) DAPI, (B) red fluorescent protein DsRed expression, (C) HNF-1 protein expression detected by Alexa Fluor 488 secondary antibody, (D) merge. The results shown most of cells express both DsRed and HNF-1 protein. (scale bar = 50 μ m)

3.3 肝纖維化小鼠模式之建立及檢測

3.3.1 前言

先前的研究已證實間葉幹細胞應用於動物模式上可治療包括心肌梗塞、再生不良性貧血、第一型糖尿病、帕金森氏症及肝纖維化等疾病 (Nakagami *et al.*, 2006)。本試驗為測試所分離之紅螢光蛋白質轉基因豬之脂肪幹細胞，是否具有修復受損器官或組織之功能，以慢性肝病作為細胞治療之疾病模式，期能深入研究脂肪幹細胞在細胞治療中所扮演之角色、移植入宿主體內之細胞的後續命運，及如何提升細胞治療之效果。

在肝損傷動物模式之建立中，常使用四氯化碳 (CCl₄) 作為肝損傷處理之藥物，四氯化碳具有肝毒性，經由血液運送至肝臟後，經肝微粒酵素分解為三氯甲烷，會使肝臟中蛋白質合成受阻、脂質代謝失調，造成肝臟內三酸甘油脂蓄積、過氧化物 (Reactive oxygen species, ROS) 累積，最後強大的氧化壓力導致肝細胞膜破裂，並釋出發炎反應相關之細胞激素 (cytokine) 及化學激素 (chemokine) 等，進一步誘發庫佛氏細胞 (kuffer cell) 以及肝星狀細胞 (hepatic stella cell) 活化，除大量分泌發炎反應相關之細胞激素及化學激素外，持續性的肝臟損傷也使部分肝星狀細胞轉化為纖維細胞 (myofibroblast) 分泌細胞外基質 (extra cellular matrix, ECM) 以填補受損肝臟細胞之空隙、維持肝臟結構。肝臟中 ECM 大量蓄積，即稱之為肝纖維化，為慢性肝病發展之必經過程，先前研究多以單次高劑量之 CCl₄ 注射模擬急性肝臟損傷，以多次中低劑量之 CCl₄ 注射模擬慢性肝損傷。

本試驗為建立完整並穩定的肝纖維化小鼠模式，參考本研究室先前建立肝纖維化小鼠模式之處理劑量，以每公斤體重灌食二毫升四氯化碳溶液 (2ml/kg B.W.)，每週給予兩次 (Shen, 2010)，並於每週嚴密監測其肝臟相關血液生化值及肝臟組織病理切片，以期能訂定此動物模式建立程序之精確時間點。

3.3.2 材料與方法

3.3.2.1 實驗動物飼養環境及條件

本試驗所使用之小鼠皆購自台灣大學醫學院實驗動物中心，並飼養於台灣大學動物科學與技術學系動物舍中之標準飼育籠內，採任食方式並提供充足之食物與乾淨飲水，並給予小鼠專用飼糧 (#5001, PMI Feeds Inc., USA)，每周兩次更換墊料 (NPD 301, Lasco co., TWN) 以清除排泄物及維持飼育環境之整潔。小鼠舍採自動光照控制系統控制光照週期 (14L:10D)，於每日六時亮燈並於二十時熄燈。舍內溫度維持攝氏二十三至二十五度，伴以負壓通風扇維持其空氣清新，相對溼度維持 40%~60%。所購入之小鼠皆預先於舍內適應兩週，後始作為試驗對象使用。

3.3.2.2 肝纖維化小鼠動物模式之建立

自台灣大學醫學院實驗動物中心購入之四週齡 ICR 小鼠，預先於舍內安置兩週，待其穩定後給予標記耳號及腳號，並自八週齡起每週給予灌食二次四氯化碳葵花油溶液，以每公斤體重二毫升之劑量 (2ml/kg) 給予，連續四週。

3.3.2.3 小鼠偽灌食處理組

為確定灌食處理之步驟及作為溶質載體 (vehicle) 之葵花油溶液並不會造成其他副作用以至於影響試驗之判讀，在建立肝纖維化小鼠動物模式時同時處理偽灌食處理組，使用同週齡之 ICR 小鼠灌食予同樣劑量但不含四氯化碳之葵花油。

3.3.2.4 血液生化值檢測

於六、八、九、十、十一以及十二週齡時採集實驗小鼠血液靜置 30 分鐘後，以 1100xg 離心可取得其血清，以全自動血液生化分析儀 (ARKRAY, SPOTCHEM EZ SP-4430) 分析其血清中麩胺酸草胺酸轉胺酶 (glutamic-oxalocetic transaminase, GOT)、麩胺酸丙酮酸轉胺酶 (glutamic-pyruvic transaminase, GPT) 以及血清中白蛋白 (serum albumin, ALB) 之含量。

3.3.2.5 小鼠體重監控

於每週量測試驗小鼠之體重，除可依當週之體重給予其適用之藥物灌食劑量外，可由體重變化之趨勢了解小鼠在健康因素上之變化。

3.3.2.6 肝組織石蠟包埋切片

小鼠經超量麻醉 (1.2% tribromoethanol, Sigma) 犧牲後，去除腹部毛皮及肌肉，將肝臟右葉取下，以 PBS 潤洗後浸泡於 4% 三聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 中三天，待肝組織固定後進行石蠟包埋及切片。

3.3.2.7 梅森氏三色染色法 Masson's Trichrome stain

- (1) 將切片以二甲苯 (xylene, Sigma 62190, USA) 脫蠟二次，每次十分鐘。
- (2) 置入不同濃度之酒精 (100%、95%、90%、80%、70%) 復水。
- (3) 將切片置入 Bouin's solution (Sigma, HT10132, USA) 再次固定，靜置隔夜。
- (4) 以流水洗淨 Bouin's solution 至黃色染痕消失。
- (5) 以 Weigert's iron hematoxylin (Sigma, HT1079, USA) 染色 5 分鐘，以流水輕洗。
- (6) 以 bieberich scalet-acid fuchsin solution (Sigma, HT15-1, USA) 染色 5 分鐘，以流水輕洗。
- (7) 以 phosphomolybdic-phosphotungstic acid solution (Sigma, HT15-2, 15-3, USA) 分色 5 分鐘，以流水輕洗。
- (8) 以 aniline blue solution (Sigma, HT15-4, USA) 染色 5 分鐘，以流水輕洗。
- (9) 以 1% acetic acid solution (Merck, 100058, Germany) 分色 2 分鐘，以流水輕洗。
- (10) 迅速地經過 95% 酒精、100% 酒精脫水 (此步驟過久會使 bieberich scalet-acid fuchsin solution 褪色)，並置入二甲苯中透明化。
- (11) 以不含二甲苯之非親水性封片膠封片，並觀察之。

3.3.2.8 統計分析

本試驗之數據以 Excel 軟體之 Student's t-test 統計法將實驗組及對照組加以比較並以平均值±標準偏差 (Mean±SD) 方式表示，定義 $P < 0.05$ 時具顯著差異。

3.3.3 結果與討論

3.3.3.1 小鼠於肝纖維化動物模式建立期間之體重變化

本試驗使用六週齡之 ICR 小鼠 50 隻，隨機分為三組，分別為無處理組 (wild type)、四氯化碳灌食組 (CCl₄) 以及偽灌食組 (Oil control)，CCl₄ 組自八週齡起每週灌食二次 CCl₄ 葵花油溶液，單次灌食劑量為 CCl₄ 每公斤體重二毫升 (2ml/kg B.W.)，Oil control 組給予相同次數且相同劑量之葵花油，以確認作為溶質載體 (vehicle) 之葵花油溶液並不會影響試驗之判讀。

經過四週之試驗後，CCl₄ 組小鼠之體重明顯較其他組別低，並呈現下降趨勢 (CCl₄ v.s. wild type v.s. Oil control ; 36.6±2.6 v.s. 43.5±3.2 v.s. 44.6±3.9) (圖 6)。目前在臨床診斷上，肝臟疾病之其中一項病徵即為體重減輕，由於肝臟是體內重要代謝及消化器官，肝損傷會導致脂質及醣類代謝失調，以及影響血糖、血液滲透壓之恆定，進而使患者體重減輕，故由此試驗結果可推斷，小鼠經過四週 CCl₄ 處理後，已明顯產生體重下降之病徵，而偽灌食組與無處理組則無顯著差異，但 CCl₄ 處理是否損傷肝臟造成肝細胞死亡，則需以血清病理學診斷中肝臟相關指標作進一步之確認。

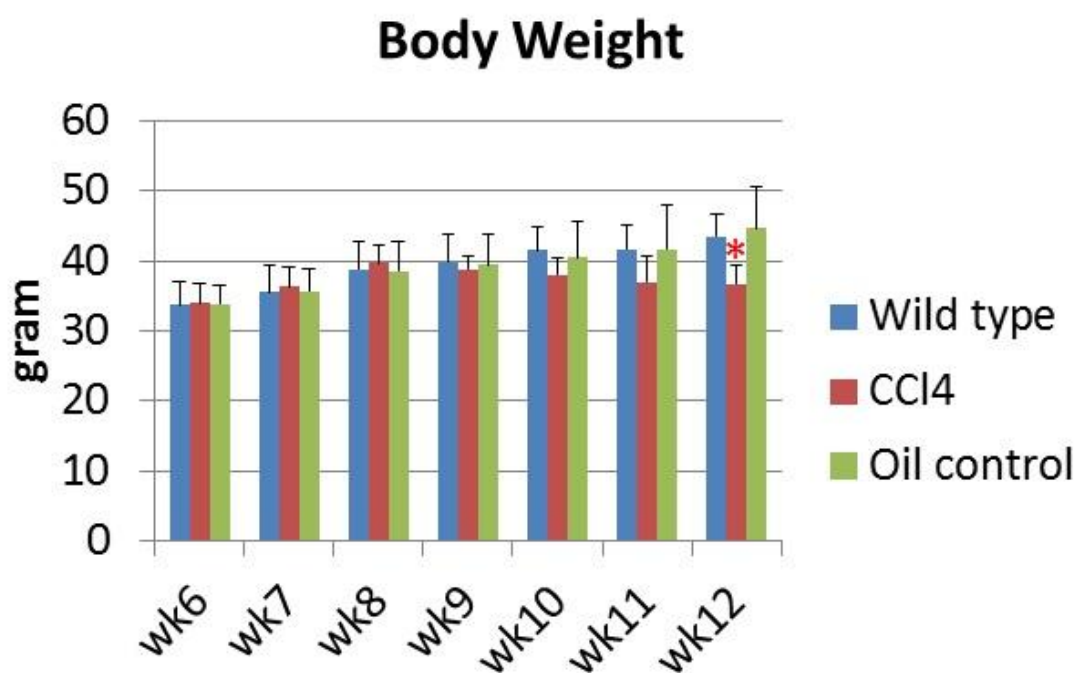


圖 6. 試驗期間各組別小鼠之體重差異。

CCl₄ 組別之小鼠於第八週開始灌食四氯化碳溶液，持續四週後，與其他控制組已有顯著差異。而作為溶質載體 (vehicle) 之葵花油則不影響試驗之判讀。(*p<0.05, n=6)

Figure 6. Body weight shift of mice treated by CCl₄ for four weeks within CCl₄, Wild type and Oil control groups.

The mice in CCl₄ treatment group started treat with CCl₄ oral gavage in week 8 for four weeks, the body weight loss significantly in week12, compared with other groups, but no significant differences between Oil control group and Wild type. (*p<0.05, n=6)

3.3.3.2 小鼠於肝纖維化動物模式建立期間血液生化值之改變

血清中麩胺酸草胺酸轉胺酶 (glutamic-oxalocetic transaminase, GOT)、麩胺酸丙酮酸轉胺酶 (glutamic-pyruvic transaminase, GPT) 以及血清中白蛋白 (serum albumin, ALB) 之含量判讀為肝臟相關疾病的主要診斷方法之一。本試驗之結果顯示，小鼠在經過四氯化碳處理二週後，血清中 GOT, GPT 皆有上升之趨勢，而經過四週之處理後，CCl₄ 組血清中 GOT, GPT 皆已超過正常範圍之數倍，且顯著高於其他組別，而偽灌食組與無處理組則無顯著差異 (CCl₄ v.s. Wild type v.s. Oil control ; GOT: 426.5±148 v.s. 59.3±16.2 v.s. 64.3±21.5; GPT: 681±148.4 v.s. 47.3±10.3 v.s. 43.6±7.6) (圖 7、圖 8)，說明小鼠經過四氯化碳灌食四週後，可造成其肝臟細胞大量死亡，而溶質載體 (vehicle) 之葵花油溶液並不會影響血清中肝臟相關指數之判讀。然而，CCl₄ 處理組之 ALB (2.5±0.16) 雖顯著高於其他組別 (wild type: 2.03±0.1; oil control: 1.89±0.18) (圖 9)，但仍未超出正常範圍 (1.3~ 6.5 g/dl) (Peters, 1985)。

肝損傷造成肝臟細胞大量死亡後，其存在於肝細胞內之功能性蛋白質會因為肝臟細胞破裂而釋出至血液中，故檢測其在血清中之含量可推斷是否發生肝臟細胞大量死亡，其中 GOT 及 GPT 為肝臟細胞特有之轉胺酶，負責胺基酸代謝中之轉胺程序，ALB 為分泌性蛋白質，由肝臟細胞分泌，在血液中具穩定滲透壓與運送脂肪酸、膽紅素、類固醇荷爾蒙、金屬離子、磺胺藥、青黴素 G、雙香豆素、阿斯匹林等藥物之功能。先前研究顯示，若肝臟遭到損傷，分泌白蛋白之肝臟細胞大量死亡，可能導致血清中白蛋白含量降低，在慢性肝病末期因血液滲透壓失衡而產生腹水症狀，但也有文獻表示慢性肝病初期至中期由於部分肝臟細胞死亡，產生的代償性作用會使血清中白蛋白濃度升高。此研究結果顯示，小鼠經過 CCl₄ 處理三至四週後，血清病理學檢測中肝臟相關指標 GOT 及 GPT 皆顯著上升，證實受到 CCl₄ 處理後小鼠肝臟細胞大量死亡，但其肝臟組織間是否累積足夠之纖維化傷疤達到肝纖維化中期之病癥，尚需透過肝臟組織病理切片進一步確認。

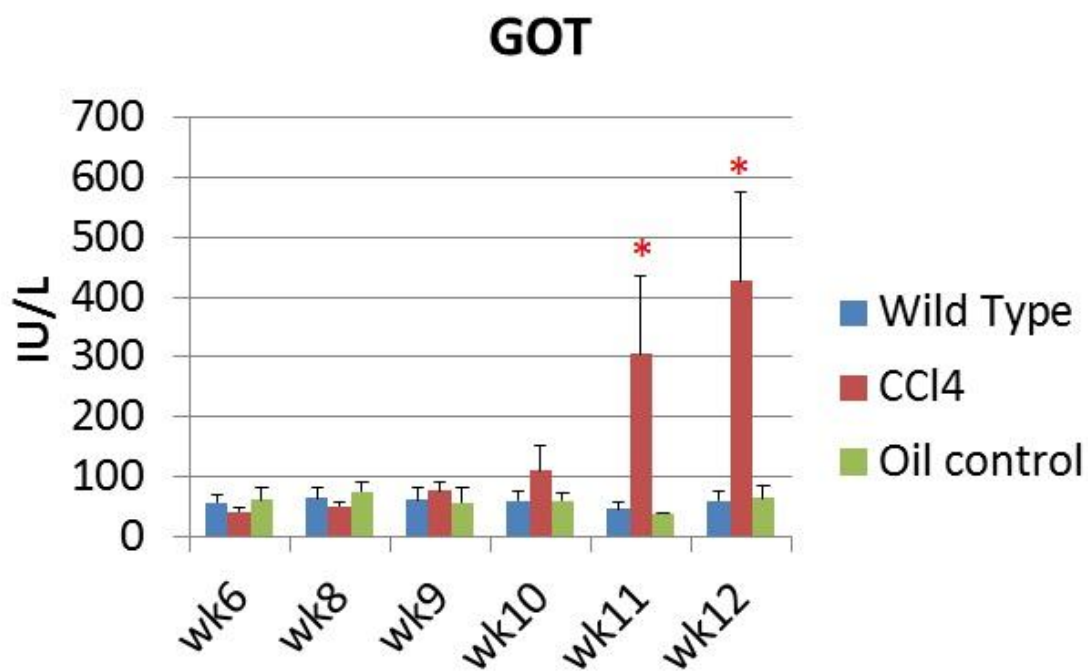


圖 7. 試驗期間各組別小鼠血清中 GOT 之改變。

CCl₄ 處理組血清中之 GOT 值於第十一週 (灌食三週後) 顯著上升，Oil control 組則與 Wild type 組無顯著差異。(**p*<0.05, n=6)

Figure 7. Serum GOT levels of mice during CCl₄ treatment.

Serum GOT significantly increase in CCl₄ treatment group after 3 weeks treatment (week 11), there was no significant differences between Oil control group and Wild type. (**p*<0.05, n=6)

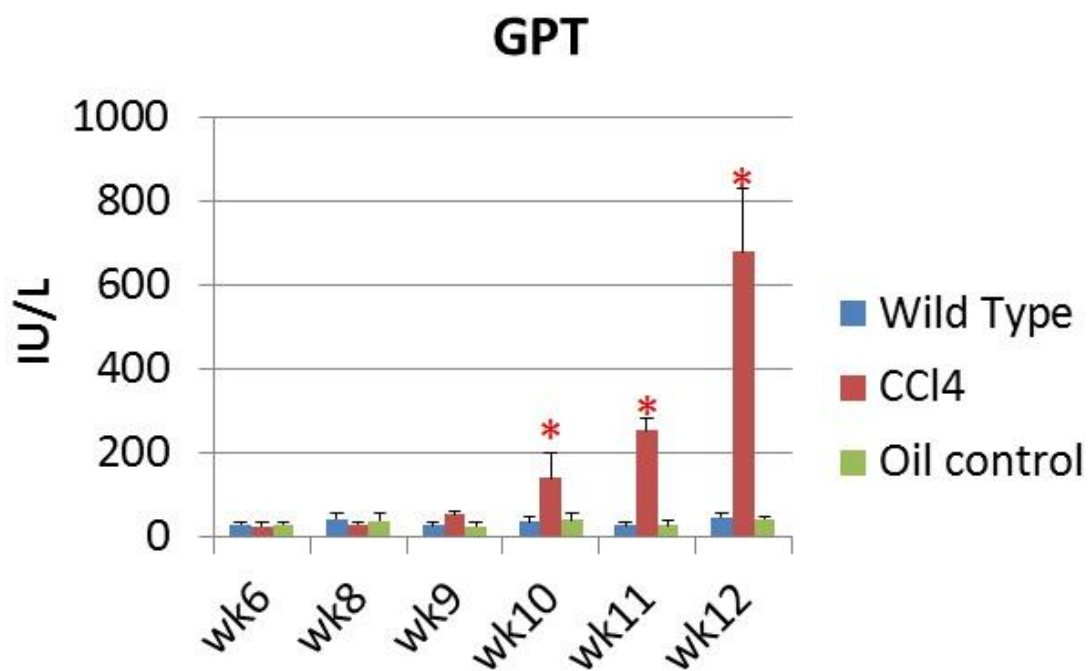


圖 8. 試驗期間各組別小鼠血清中 GPT 之改變。

在 CCl₄ 處理組之 GPT 值於第十週 (灌食二週後) 顯著上升, Oil control 組則與 Wild type 組無顯著差異。(**p*<0.05, n=6)

Figure 8. Serum GPT levels of mice during CCl₄ treatment.

Serum GPT significantly increase in CCl₄ treatment group after 2 weeks treatment (week 10), there was no significant differences between Oil control group and Wild type. (**p*<0.05, n=6)

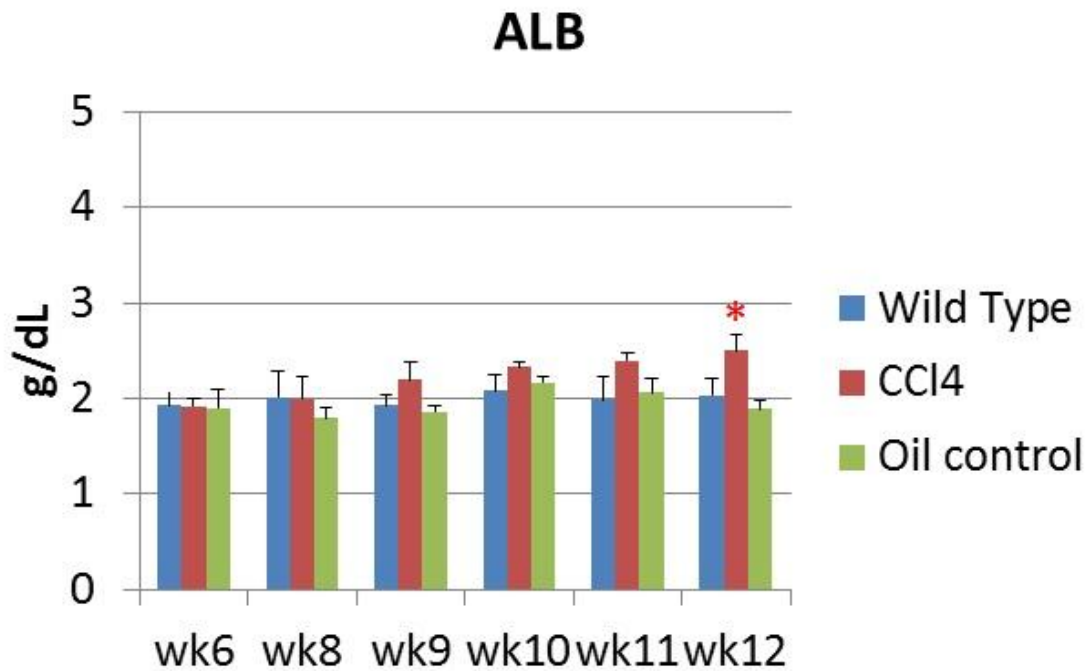


圖 9. 試驗期間各組別小鼠血清中白蛋白 (ALB) 之改變。

在 CCl₄ 處理組之 ALB 值於十二週 (灌食四週後) 顯著上升, Oil control 組則與 Wild type 組無顯著差異。但各組之 ALB 值仍未超出正常生理標準 (1.3~ 6.5 g/dl) (Peters, 1985)。(*P<0.05, n=6)

Figure 9. Serum albumin (ALB) levels of mice during CCl₄ treatment.

Serum ALB significantly increase in CCl₄ treatment group after 4 weeks treatment (week 12), there was no significant differences between Oil control group and Wild type, however, all the levels did not cross the normal range. (*p<0.05, n=6)

3.3.3.3 肝纖維化小鼠動物模式建立後之肝組織病理學診斷

為確診本試驗中小鼠是否發生肝纖維化之症狀，於灌食開始後，每週犧牲至少三隻小鼠，並取其肝臟組織，作為病理切片檢測使用。臨床上為確診病評估肝纖維化之嚴重程度，常使用肝臟組織之病理切片並以梅森氏三色染色法 (Masson's Trichrome stain) 標記纖維化組織之位置以及含量，由於持續性的肝損傷會造成肝臟中 ECM 蓄積產生纖維化傷疤，而其纖維化傷疤之主要成分為膠原蛋白，經 Masson's Trichrome stain 染色後之組織病理切片其細胞核呈褐色，細胞質呈紅色，膠原蛋白呈藍色，故在觀察肝臟組織病理切片時可以明顯區分出纖維化傷疤與一般組織之不同。本試驗之結果顯示，小鼠經過灌食 CCl₄ 處理兩週後，其肝臟組織病理切片以可觀察到少許之纖維化傷疤 (圖 10B)，而經過 CCl₄ 灌食處理四週後，小鼠肝臟組織病理切片中之纖維化程度惡化，並可於切片中觀察到門靜脈血管附近之纖維狀傷疤最為嚴重，且與其他門靜脈周圍之傷疤間產生橋狀連接 (cross bridges) (圖 10D)，此一結果符合病理診斷學上之肝纖維化中期 (Ishak score= 3~4) (Westin *et al.*, 1999)，另外，Oil control 組並未產生任何纖維化傷疤堆積之現象，故可由此試驗結果得知建立肝纖維化之疾病動物模式之時間點，小鼠經過每公斤體重二毫升之 CCl₄ 灌食，連續四週後，其 GOT 及 GPT 值已顯著上升，且纖維化傷疤之堆積符合肝纖維化中期之病癥，此動物模型建立之時間可供吾人作為後續細胞移植試驗使用。

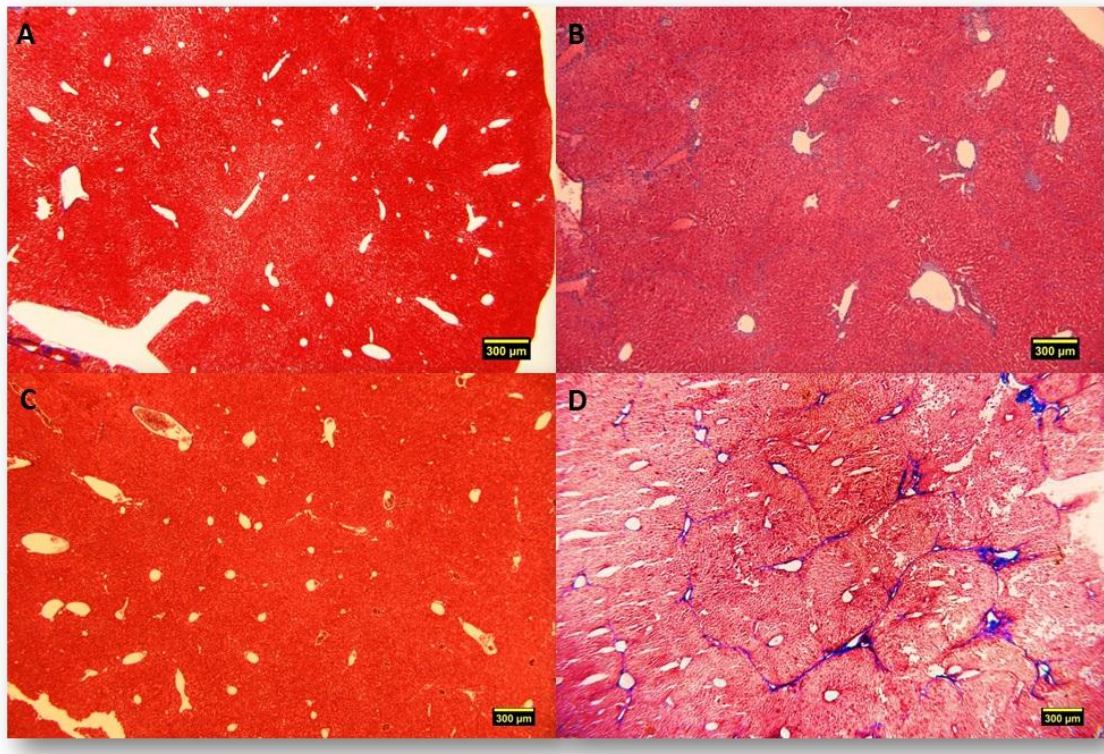


圖 10. 試驗期間各組別肝臟組織病理切片。

四週試驗期間，每週犧牲各組別小鼠各三隻，取其肝臟組織做病理切片並以梅森氏三色染色法標定纖維化之組織。(A) 為 Wild type 組別之小鼠經過四週試驗後之肝臟切片，(B) 為 CCl₄ 組小鼠經過二週實驗之肝臟切片，(C) 為 Oil control 組別經過四週試驗後之肝臟切片，(D) 為 CCl₄ 組小鼠經過四週試驗後之肝臟切片。結果顯示，經過 CCl₄ 灌食處理四週後，小鼠肝臟組織病理切片中之纖維化程度惡化，並可於切片中觀察到門靜脈血管附近之纖維狀傷疤最為嚴重。(比例尺為 300 微米)

Figure 10. Histological staining of liver sections during CCl₄ treatment.

Three mice were sacrificed per week during the experiment to obtain their liver section in order to observe the fibrotic area, which is indicated by Masson's Trichrome stain, (A) Wild type mice liver section after 4 weeks experiment, (B) liver section of CCl₄ treated group after 2 weeks treatment, (C) Oil control group after 4 weeks treatment, (D) CCl₄ treated group after 4 weeks treatment. The results indicated the deterioration of 4 week CCl₄ treated mice, which have severe liver fibrosis around the portal area. (scale bar = 300 μm)

3.4 異種移植 – 豬脂肪幹細胞應用於改善小鼠肝纖維化之 可行性探討

3.4.1 前言

在慢性肝病病程中，肝纖維化為其必經之過程，肝臟組織受到長期且連續性之傷害，細胞外基質 (extra cellular matrix, ECM) 降解失衡，其主要成分之膠原蛋白大量蓄積，導致肝組織間滿佈纖維化傷疤，破壞正常肝小葉之功能，同時因為纖維化傷疤阻礙血流造成的門脈高壓，更加深了肝臟細胞內的氧化壓力，使得大量的肝臟細胞死亡，此惡性循環最終將導致肝硬化。近年來研究已證實肝纖維化可以經過適當治療逆轉，但藥物治療中僅能以支持性療法治療，使得肝臟疾病之治癒率偏低，因此，發展有效的療法成為當前重要的研究課題。許多研究報告指出以間葉幹細胞移植入肝纖維化之小鼠及大鼠體內，可減緩肝纖維化病情之惡化 (Bianco *et al.*, 2001)，甚至進一步達到治療之效果，惟植入細胞遷入至肝臟組織中之數量稀少，其治療效果尚有改善空間。

有鑑於此，本試驗擬採用本研究室所產製之紅螢光蛋白質轉基因豬之脂肪幹細胞，作為治療肝纖維化小鼠模型之材料，除其穩定表現之紅色螢光蛋白質，除可作為細胞遷移及其命運之追蹤標記外，其表面抗原 MHC I 呈陽性表現與 MHC II 不表現之特性與間葉幹細胞相同，可推測進行異種移植可能較不會產生免疫排斥之問題 (Di Nicola *et al.*, 2002)，故將其應用於異種移植修復小鼠肝纖維化之研究中，此外，為增加脂肪幹細胞遷移入肝臟組織間之效率，本試驗採用立體培養之策略，將細胞培養成不同大小之立體團塊 (sphere)，並經由肝門靜脈注射技術，以腸繫膜靜脈注入之方式將脂肪幹細胞及其團塊移植入小鼠體內，使其隨血流立即流經肝門脈至肝臟微血管以造成局部阻塞，以期能提升植入之幹細胞遷移至肝組織之效率，並改善肝纖維化治療效果。

3.4.2 材料與方法

3.4.2.1 肝纖維化小鼠模型

肝纖維化小鼠之動物模式建立如試驗三所述。

3.4.2.2 豬脂肪幹細胞之分離與純化

此試驗所採用之紅色螢光蛋白質轉基因豬脂肪幹細胞，分離以及純化步驟如試驗一所述。

3.4.2.1 紅螢光蛋白質轉基因豬脂肪幹細胞團塊之製備

取試驗一所分離及純化之紅螢光蛋白質轉基因豬脂肪幹細胞，以 5×10^4 cells/cm² 之密度種於超低貼附性細胞培養盤 (Corning, 35011035) 中培養 24 小時，細胞形成球狀團塊 (sphere)，經過細胞分離篩 (BD falcon, 1182751) 分離後可得到不同大小之細胞團塊，直徑為四十微米以下、介於四十至七十微米間、大於七十微米等三種 (圖 11)，將其懸浮於磷酸鹽緩衝液中，以供細胞移植試驗使用。

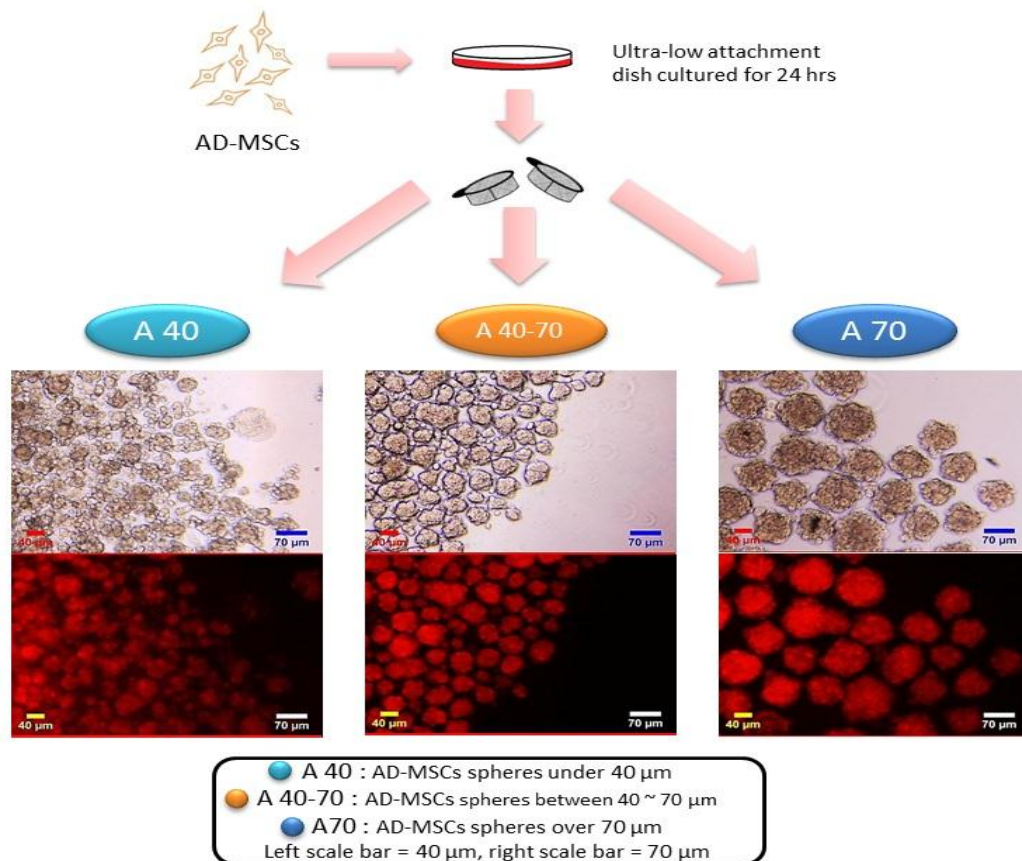


圖 11. 紅螢光蛋白轉基因豬脂肪幹細胞團塊之製備。

經過立體培養之紅螢光轉基因豬脂肪幹細胞團塊，經細胞分離篩分為三組，四十微米以下、介於四十至七十微米之間、以及大於七十微米，培養成團塊之細胞仍穩定表現紅色螢光。(左比例尺為四十微米，右比例尺為七十微米)

Figure 11. Size dependent cell Clusters prepared from AD-MSCs isolated from adipose tissue of DsRed transgenic porcine.

Spheres were separated in to three groups after three-dimension cultured for 24 hrs, including the spheres diameter under 40 μ m, diameter between 40 to 70 μ m and over 70 μ m, DsRed protein stably expressed in sphered cells. (left scale bar = 40 μ m, right scale bar = 70 μ m)

3.4.2.2 細胞移植之試驗設計

將肝纖維化小鼠 (12 週齡) 隨機分為六組，每組至少六隻，依序為 CCl₄ 處理且無接受移植手術組、施以磷酸鹽緩衝液 (PBS) 注射組、移植紅色螢光蛋白轉基因豬脂肪幹細胞組 (A single)、移植直徑四十微米以下之細胞團塊組別 (A 40)、移植之細胞團塊直徑介於四十微米至七十微米間之組別 (A 40-70) 以及移植直徑七十微米以下之細胞團塊組別 (A 70)，另有無處理組 (Wild type) 作為試驗對照組 (圖 13)。前述六組小鼠在施以細胞移植或 PBS 注射後，持續給予四週之 CCl₄ 處理，於 16 週齡時犧牲，並收集其血液作為肝臟相關血液生化值分析，以及肝組織作為組織病理切片使用 (圖 12)。

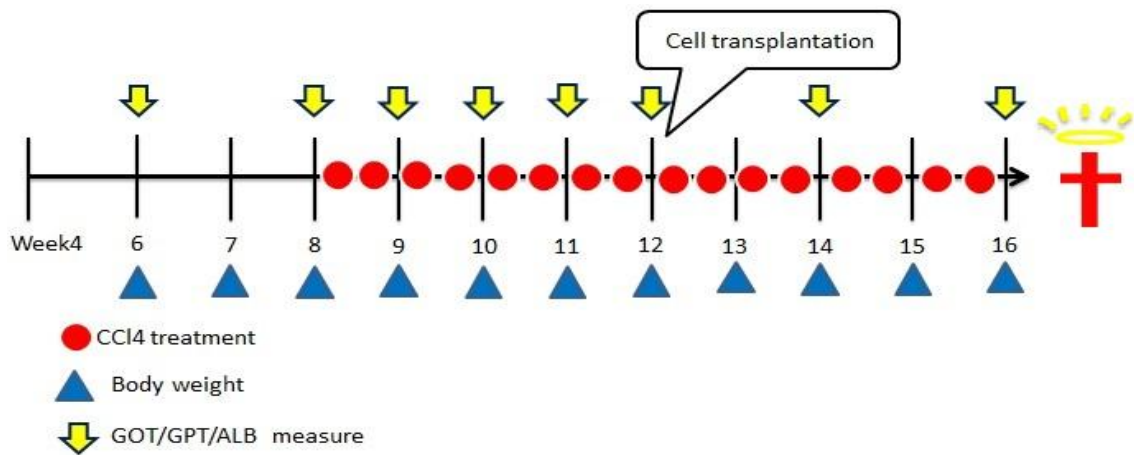


圖 12. 細胞移植試驗之時間軸。

小鼠自八週齡開始接受 CCl₄ 灌食，每週兩次，處理四週後，於十二週齡實施細胞移植手術，並於術後四週 (十六週齡) 犧牲，試驗期間每週量測其體重，並於固定時間採集小鼠血液量測其血液生化值。

Figure 12. Timeline of cell transplantation trials.

Mice were treated CCl₄ twice a week for 4 weeks since 8-week-old, and received cell transplant procedure at 12-week-old, sacrificed 4 weeks after surgery, the body weight were measure every week, and the blood collection timing see as above.

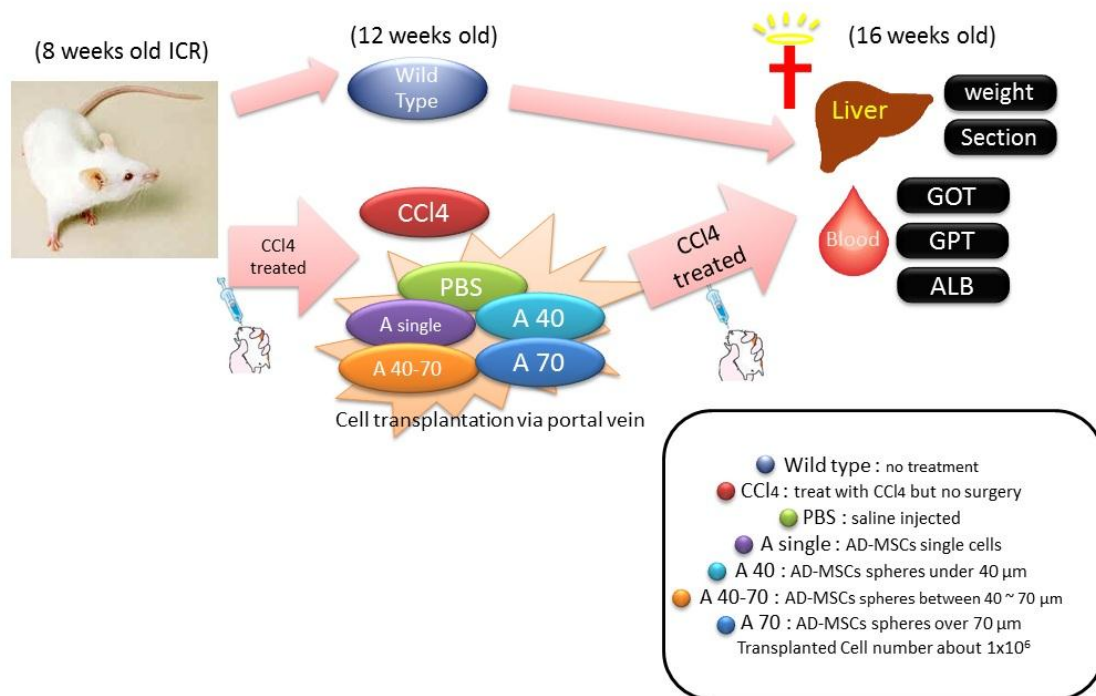


圖 13. 細胞移植試驗設計示意圖。

小鼠自八週齡起處理 CCl_4 ，四週後隨機分為六組，其中四組接受不同大小之細胞及團塊移植，PBS 控制組僅接受 PBS 注射，以排除因手術因素影響試驗判讀， CCl_4 組不接受手術，另有 Wild type 組做為試驗對照。

Figure 13. Grouping of mice and experiment design in the cell transplantation trials.

Mice received CCl_4 treatment since 8-week-old, split into 6 groups randomly after 4 week treatment, four of them received cell transplantation surgery, including single cells, and three different sphere size of AD-MSCs. PBS group only received saline injection through portal vein, CCl_4 group with continuing CCl_4 oral gavage but no surgery, also wild type as a negative control.

3.4.2.1 細胞移植手術流程

以氣體麻醉 Isofrane (ABBOTT, 6009260) 將小鼠施以氣體麻醉後，剔除腹部毛髮並消毒開創部位，於小鼠之下腹部開創 0.8 公分，直至腹部肌肉層，以眼科夾輔助取出空腸前段，並使用 28G 之胰島素注射針，將內含約 1×10^6 細胞之 $100 \mu\text{l}$ 之細胞懸浮液注入腸繫膜靜脈中，使其匯流入肝門靜脈 (圖 14)。注射過程中，約以 $100 \mu\text{l} / 30 \text{ sec}$ 之速度注射，需視血流情形調整注射速度，以避免因注射壓力過大造成血管破裂或是細胞液溢出，下圖 (圖 14) 為注射 0.25% Trypan blue 作為手術流程示範，注射完畢後，需確實止血以防止內出血之可能。止血完畢將小腸推回原位，並以 5-0 之鉻化腸線縫合肌肉層及表皮，於縫合處塗抹優點膏後，將小鼠至於白熾燈下保溫，給予適當水分補充，並觀察其恢復情形。

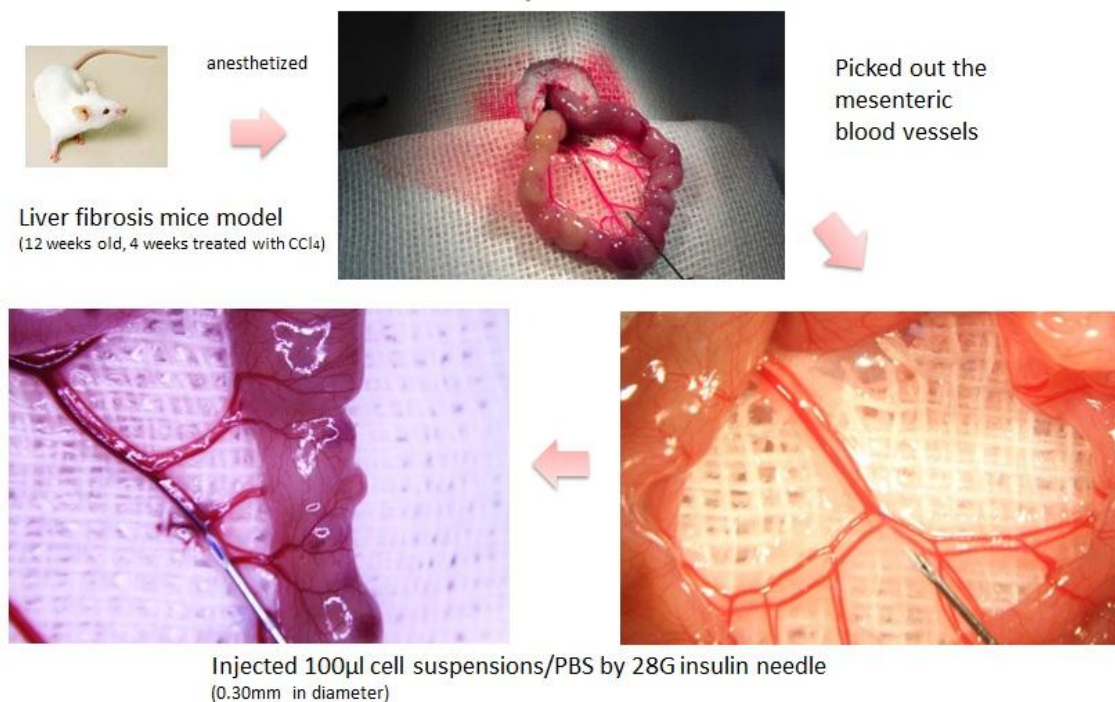


圖 14. 細胞移植手術流程圖。

此圖為注射 0.25% Trypan blue 作為示意，於左下圖可見注入之藍色液體隨腸繫膜靜脈血液流向下游，而其下游為肝門靜脈，藉此將細胞送入肝臟中。

Figure 14. Flowchart of cell transplantation surgery.

The picture shows we use 0.25% Trypan blue as an indicator to test the injection procedure while transfer the cells into liver through portal vein.

3.4.2.2 小鼠體重監控

於每週量測實驗小鼠之體重，除可依當週之體重給予其適用之藥物灌食劑量外，可藉由體重變化之趨勢了解小鼠在健康因素上之變化。

3.4.2.3 血液生化值檢測

本試驗所使用之血液生化值檢測方法如同試驗三所述。

3.4.2.4 肝組織石蠟包埋切片

本試驗所使用之肝組織石蠟包埋切片流程如同試驗三所述。

3.4.2.5 梅森氏三色染色法 Masson's Trichrome stain

本試驗所使用之梅森氏三色染色法如試驗三所述。

3.4.2.6 肝纖維化組織相對比率分析

每隻小鼠隨機取得三片之肝臟組織病理切片，經梅森氏三色染色法染色後，於顯微鏡下拍攝至少六張之低倍率照片 (25X)，以影像處理軟體 Image J 及其外掛軟件 Colour deconvolution 分析後可得到藍色之纖維化傷疤所佔之像素面積，以點陣位元數表示，以無處理組 (Wild type) 之小鼠肝臟組織病理切片所分析出之數據為基準，計算其他組別中，肝纖維化組織所佔面積之相對比率。

3.4.2.7 羥脯胺酸 (hydroxyproline) 檢測

取小鼠肝臟組之 10mg，加入 100 μ l 之純水混勻，取 100 μ l 之混和液加入 100 μ l 之 10N 鹽酸，於攝氏 120 度下水解三小時，後取 10 μ l 之水解液，以真空乾燥機乾燥。以 6 μ l 之 chloramine T concentrate 加上 94 μ l 之 oxidation buffer 混合成為 chloramine T reaction solution，以 50 μ l 之 DAB 加上 50 μ l 之 isopropanol 成為 DAB reaction solution。將 100 μ l 之 chloramine T reaction solution 加入乾燥後之水解物中，

置於室溫靜置五分鐘，再加入 100 μ l 之 DAB reaction solution，並於攝氏 60 度下反應 90 分鐘後，以分光光度計測量其 560nm 波長下之吸光值，使用 hydroxyproline 標準品所作出的回歸曲線計算其每克肝組織所含之羥脯胺酸含量。

3.4.2.8 統計分析

本試驗之數據使用 SAS 軟體中之鄧氏新多變域測驗法 (Duncan' s New Multiple Range Test) 將處理均值兩兩比較，並以平均值 \pm 標準誤差 (mean \pm standard error)的方式表示， $P<0.05$ 時則定義為兩者兼具顯著差異。



3.4.3 結果與討論

3.4.3.1 試驗期間內小鼠體重及肝臟體重比之改變

目前在臨床診斷上，肝臟疾病之其中一項病徵即為不明原因之體重減輕，由於肝臟是體內重要代謝及消化器官，肝損傷會導致脂質及醣類代謝失調，以及影響血糖、血液滲透壓之恆定，進而使患者體重減輕。本試驗對肝纖維化之小鼠施以細胞移植手術後，可明顯看出經過細胞移植手術之組別其體重回升，相較於 CCl₄ 及 PBS 二組控制組，在術後第四週之體重已有顯著之差異 (Wild type: 46.11±3.7 v.s CCl₄: 32.3±6.2 v.s. PBS:29.5±3 v.s A single: 41.5±2.3 v.s A40: 41.6±2.2 v.s A4070: 41.05±2.3v.s. A70: 40.25±2.5; P<0.05) (圖 15)，由此結果可觀察到接受細胞移植之組別，其體重減輕之病徵已緩緩消退，在移植手術後二週已有回復之趨勢，然而，移植不同大小細胞團塊之組別間並無顯著差異。

而在先前研究中，肝臟組織中纖維化傷疤之累積，會增加肝臟本體之體積及重量 (Banas *et al.*, 2007)，進而造成肝臟重量佔動物體重之比率上升，由此試驗結果顯示，經過細胞移植組別之肝臟體重比相較於控制組有顯著的下降 (CCl₄: 8.1%±0.78 v.s.PBS:8.2%±0.93 v.s A single: 6.31%±0.8 v.s.A40: 6%±2.2 v.s. A4070: 6.2%±0.28v.s. A70: 6.09%±0.86; P < 0.05) (圖 16)，並與未處理組 (Wild type: 6.05%±0.68) 差異不顯著 (P > 0.05)，說明肝纖維化之小鼠經過細胞移植後，其肝臟重量降低並趨於正常值，但其是否肇因於纖維化傷疤組織的減少，尚需肝組織中纖維化傷疤含量之分析結果佐證。

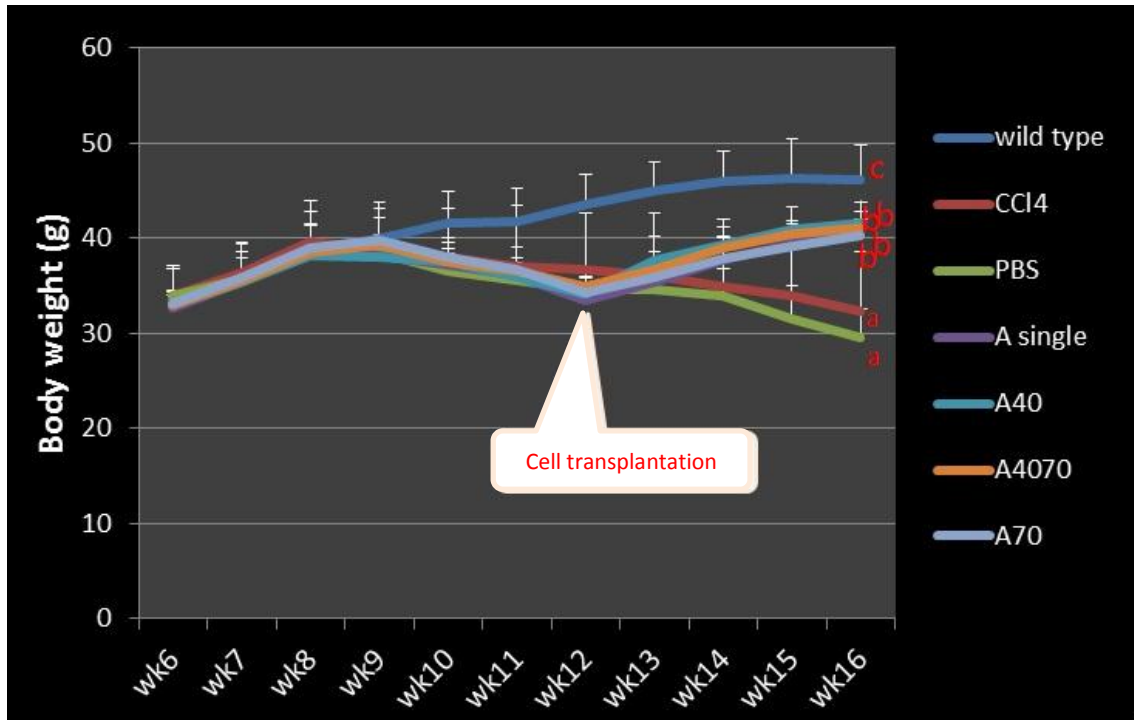


圖 15. 試驗期間各組小鼠之體重變化差異。

記錄各組小鼠自六週齡至十六週之試驗期間之體重變化，小鼠自第八週起接受 CCl₄ 灌食後體重逐漸下降，而在十二週接受細胞移植之組別，其體重逐漸回升。(P<0.05, n=6)

Figure 15. Body weight shift of mice in each treated group.

Data showed the body weight records from 6-week-old until 16-week-old, the results indicated that the body weight dropped off after mice treated with CCl₄ oral gavage, and progressively increased after cell transplantation. (P<0.05, n=6)

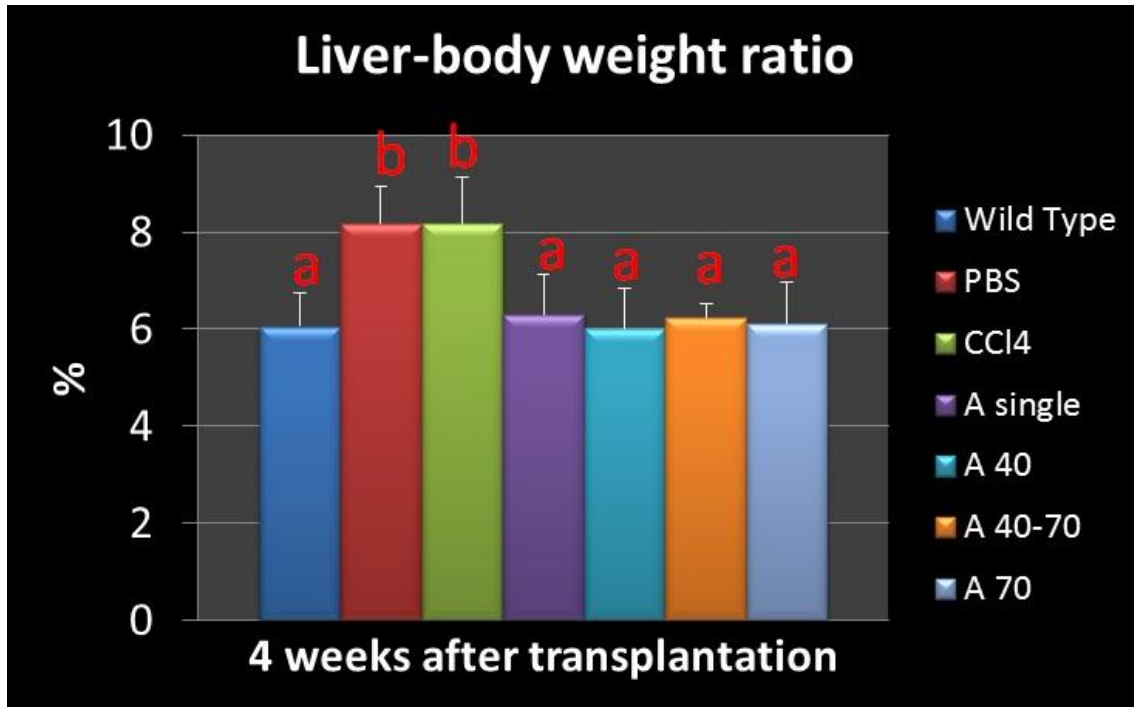


圖 16. 試驗結束後各組小鼠肝體重比。

經過為期八週試驗後將小鼠犧牲，取小鼠肝臟量測出肝臟體重比，結果顯示 PBS 組別與 CCl₄ 組別之肝臟體重比顯著高於接受細胞移植之組別，而接受細胞移植之組別則與 Wild type 組沒有顯著差異。(P<0.05, n=6)

Figure 16. Liver-body weight ratio after 8 weeks of the experiment.

After 8 weeks experiment, mice were sacrificed and the liver weight were measured in order to analyze liver-body weight ratio, the result showed the ratio of PBS group and CCl₄ group were significantly higher than cells transplanted groups, while the ratio of these groups were close to wild type. (P<0.05, n=6)

3.4.3.2 試驗期間內小鼠血液生化值之改變

血清中麩胺酸草胺酸轉胺酶 (glutamic-oxalocetic transaminase, GOT)、麩胺酸丙酮酸轉胺酶 (glutamic-pyruvic transaminase, GPT) 以及血清中白蛋白 (serum albumin, ALB) 之含量判讀為肝臟相關疾病的主要診斷方法之一。本試驗收集細胞移植手術後 2 週及 4 週隻小鼠血液，取其血清並測試其肝臟相關血液生化值，結果顯示經過移植手術 2 週後，接受細胞移植之組別其 GOT (A single: 83.1 ± 21.6 ; A40: 63.5 ± 18 ; A4070: 70.1 ± 30.7 ; A70: 91 ± 11.3) 及 GPT (A single: 44.3 ± 13.2 ; A40: 58.5 ± 9.5 ; A4070: 60.7 ± 23.1 ; A70: 65.2 ± 15.5) 已呈現下降之趨勢，手術後四週，此二項指標已與對照組 (CCl₄: 460.6 ± 125.3 v.s 687.6 ± 166 ; PBS: 465 ± 111.9 v.s 679 ± 131) 有顯著之差異 ($P < 0.05$)，並接近於 Wild type 小鼠所測得之之正常值 (59.3 ± 25.5 v.s 27 ± 17.6) (圖 17、圖 18)。

肝損傷造成肝臟細胞大量死亡後，其存在於肝細胞內之功能性蛋白質會因為肝臟細胞破裂而釋出至血液中，故檢測其在血清中之含量可推斷是否發生肝臟細胞大量死亡，其中 GOT 及 GPT 為肝臟細胞特有之轉胺酶，負責胺基酸代謝中之轉胺程序，ALB 為分泌性蛋白質，由肝臟細胞分泌，在血液中具穩定滲透壓與運送脂肪酸、膽紅素、類固醇荷爾蒙、金屬離子、磺胺藥、青黴素 G、雙香豆素、阿斯匹林等藥物之功能。先前研究顯示，若肝臟遭到損傷，分泌白蛋白之肝臟細胞大量死亡，可能導致血清中白蛋白含量降低，在慢性肝病末期因血液滲透壓失衡而產生腹水症狀，但也有文獻表示慢性肝病初期至中期由於部分肝臟細胞死亡，產生的代償性作用會使血清中白蛋白濃度升高。本試驗證明受到細胞移植之組別，其肝臟細胞大量死亡之現象已減輕。而在 ALB 方面，因其未脫離正常範圍 (圖 19)，故僅能從細胞移植組與控制組之不同變化量，觀察其趨勢，並推測可能因肝臟機能恢復，而趨近於未處理組 (wild type) 所測得之值。另外，接受細胞移植之各組別中，並未因移植不同大小細胞團塊而有顯著差異。此結果僅呈現肝臟細胞停止大量死亡，而移植入肝臟中之脂肪幹細胞是否具降低纖維化傷疤堆積並修復受損肝組織之功能，則需以肝臟組織病理切片中之纖維化傷疤含量作進一步分析。

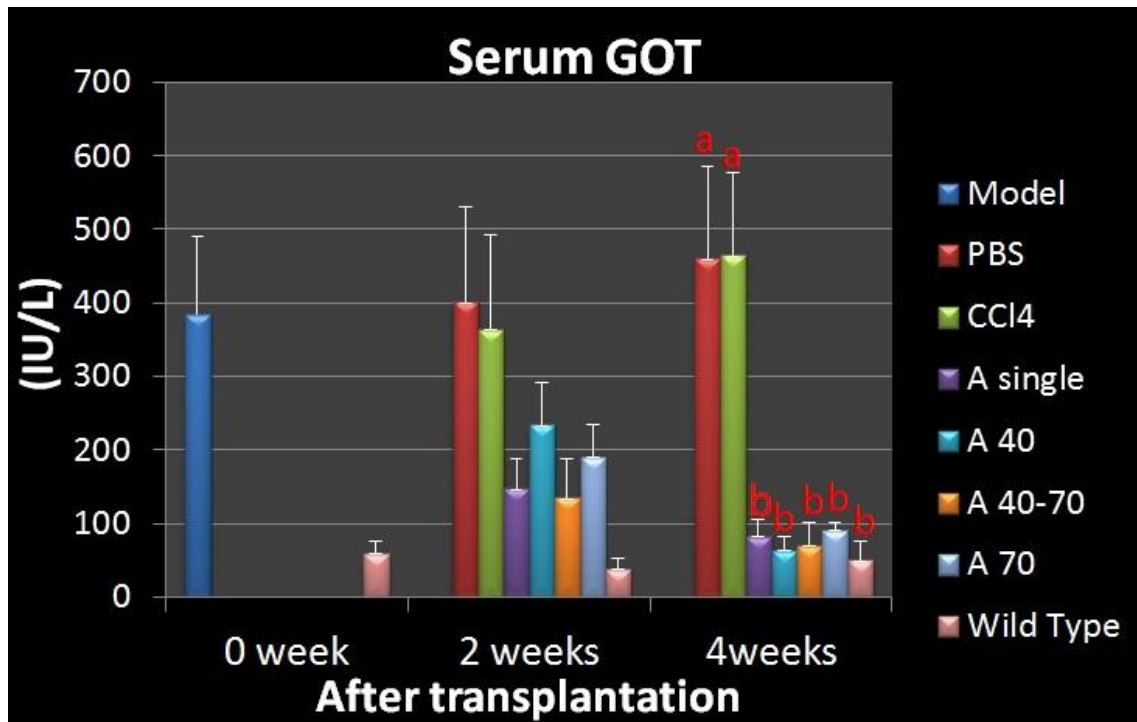


圖 17. 各組小鼠接受手術後 GOT 值之變化。

圖表僅呈現手術當週 (0 week)、術後二週以及術後四週之血清中 GOT 值之變化，結果顯示，相較於控制組 (PBS、CCl₄)，接受細胞移植組別之 GOT 值顯著下降，分組實施手術前 (Model) 之 GOT 值與控制組無顯著差異。(P<0.05, n=6)

Figure 17. Serum GOT levels of mice after cell transplantation surgery.

Data showed GOT levels in pre-surgery (0 week), 2 weeks post-surgery and 4 weeks post-surgery, the result indicated GOT levels of cell transplantation groups were significantly decreased, compared with the control groups (PBS and CCl₄), which remained high level as pre-surgery (Model). (p<0.05, n=6)

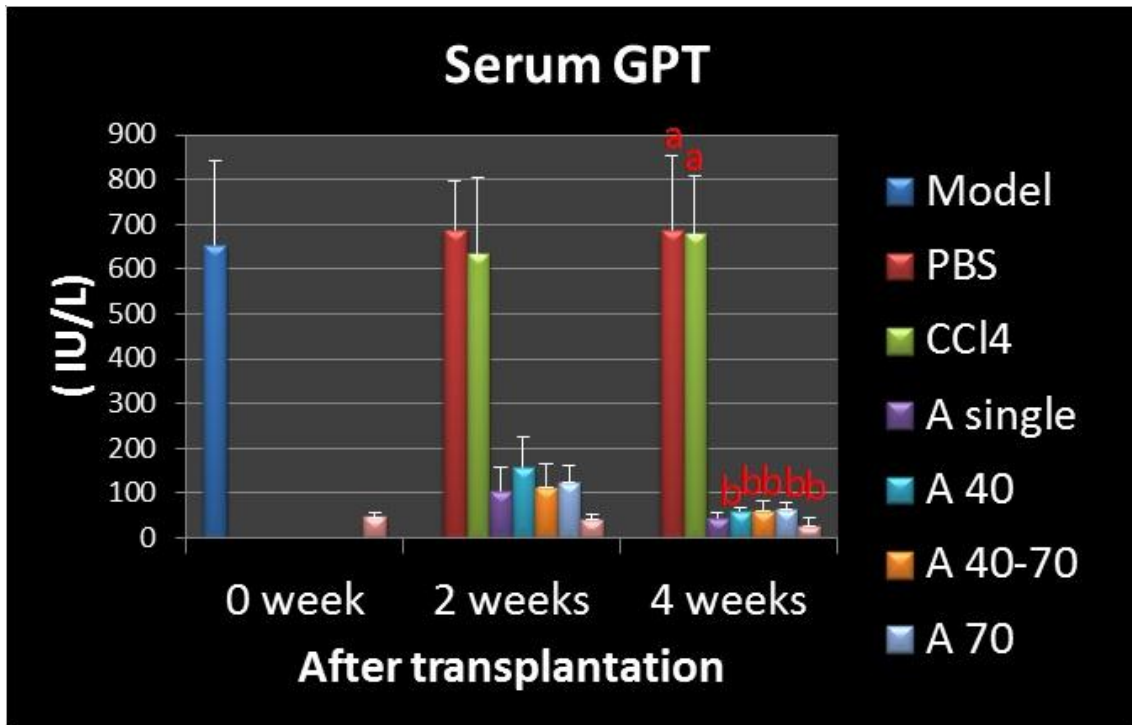


圖 18. 各組小鼠接受手術後 GPT 值之變化。

圖表僅呈現手術當週 (0 week)、術後二週以及術後四週之血清中 GPT 值之變化，結果顯示，相較於控制組 (PBS、CCl₄)，接受細胞移植組別之 GPT 值顯著下降，分組實施手術前 (Model) 之 GPT 值與控制組無顯著差異。(P<0.05, n=6)

Figure 18. Serum GPT levels of mice after cell transplantation surgery.

Data showed GPT levels in pre-surgery (0 week), 2 weeks post-surgery and 4 weeks post-surgery, the result indicated GPT levels of cell transplantation groups were significantly decreased, compared with the control groups (PBS and CCl₄), which remained high level as pre-surgery (Model). (p<0.05, n=6)

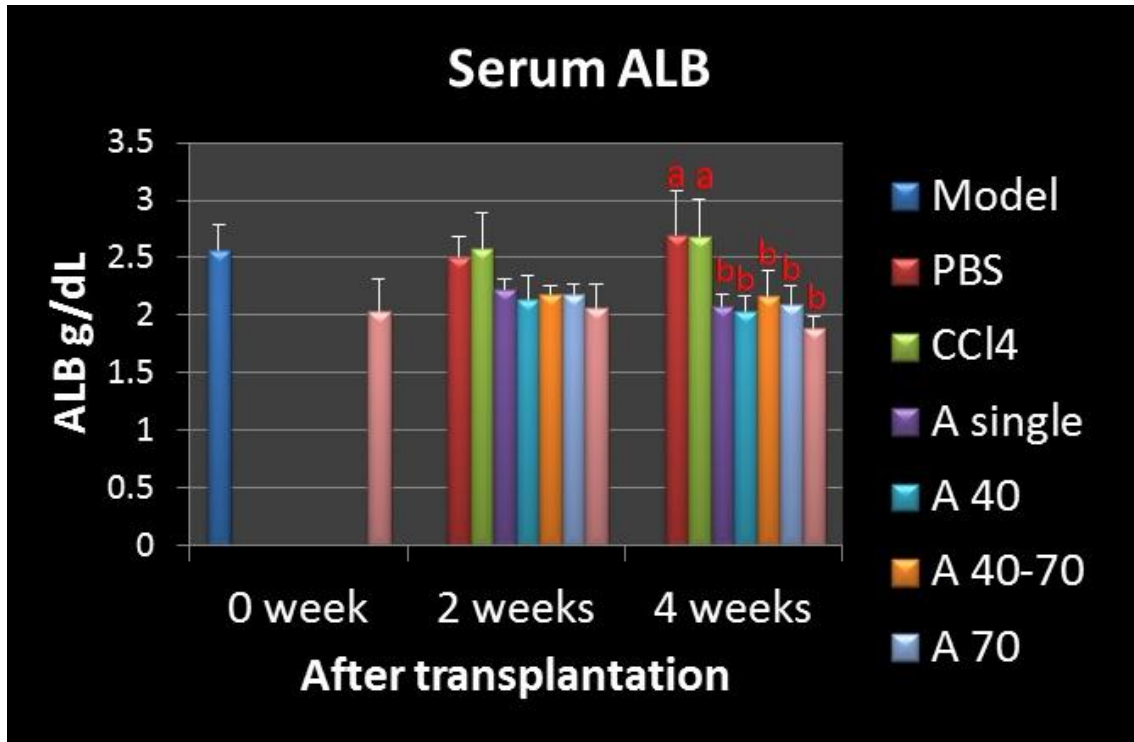


圖 19. 各組小鼠接受手術後 ALB 值之變化。

圖表僅呈現手術當週 (0 week)、術後二週以及術後四週之血清中白蛋白 (ALB) 變化，結果顯示，相較於控制組 (PBS、CCl₄)，接受細胞移植組別之 ALB 值呈現下降趨勢，但所有組別之 ALB 值仍屬正常生理範圍內。(P<0.05, n=6)

Figure 19. Serum albumin levels of mice after cell transplantation surgery.

Data showed serum albumin levels in pre-surgery (0 week), 2 weeks post-surgery and 4 weeks post-surgery, the result indicated albumin levels of cell transplantation groups were significantly decreased, compared with the control groups (PBS and CCl₄), which remained high level as pre-surgery (Model). However, all the levels did not cross the normal range. (p<0.05, n=6)

3.4.3.3 各處理組肝臟組織病理切片中纖維化程度之比較

臨床上為確實評估肝纖維化之嚴重程度，常使用肝臟組織之病理切片並以梅森氏三色染色法 (Masson' s Trichrome stain) 標記纖維化組織之位置以及含量。由於持續性的肝損傷會造成肝臟中 ECM 蓄積產生纖維化傷疤，而其纖維化傷疤之主要成分為膠原蛋白，經 Masson' s Trichrome stain 染色後之組織病理切片其細胞核呈褐色，細胞質呈紅色，膠原蛋白成藍色，故在觀察肝臟組織病理切片時可以明顯區分出纖維化傷疤與一般組織之不同。本試驗之結果顯示，肝纖維化小鼠經過細胞移植手術四周後，其肝臟組織病理切片中纖維化傷疤較控制組減少 (圖 20)，且可觀察到少許之傷疤組織復原之跡證，而只給予磷酸鹽緩衝液注射之組別，其纖維化程度更加惡化 (圖 20B)，趨向肝纖維化末期 (Ishak score=6)，此外，纖維化相對比率之分析結果顯示，接受細胞移植之組別之纖維化相對比率 (A single: 1.38 ± 0.13 ; A40: 1.3 ± 0.23 ; A4070: 1.52 ± 0.18 ; A70: 1.26 ± 0.29) (圖 21)，相較於控制組 (CCl₄: 5.17 ± 0.79 ; PBS: 4.5 ± 0.59) 顯著降低 ($P < 0.05$)。此結果證實，肝纖維化小鼠接受細胞移植四週後，雖然仍可於肝臟組織病理切片中發現少許傷疤組織，但接受細胞移植確實可以降低其肝臟內原本蓄積之纖維化傷疤含量，但未接受細胞移植之 PBS 組，其肝纖維化更加惡化。無論如何，接受細胞移植之組別並未因移植不同大小細胞團塊而有顯著差異。

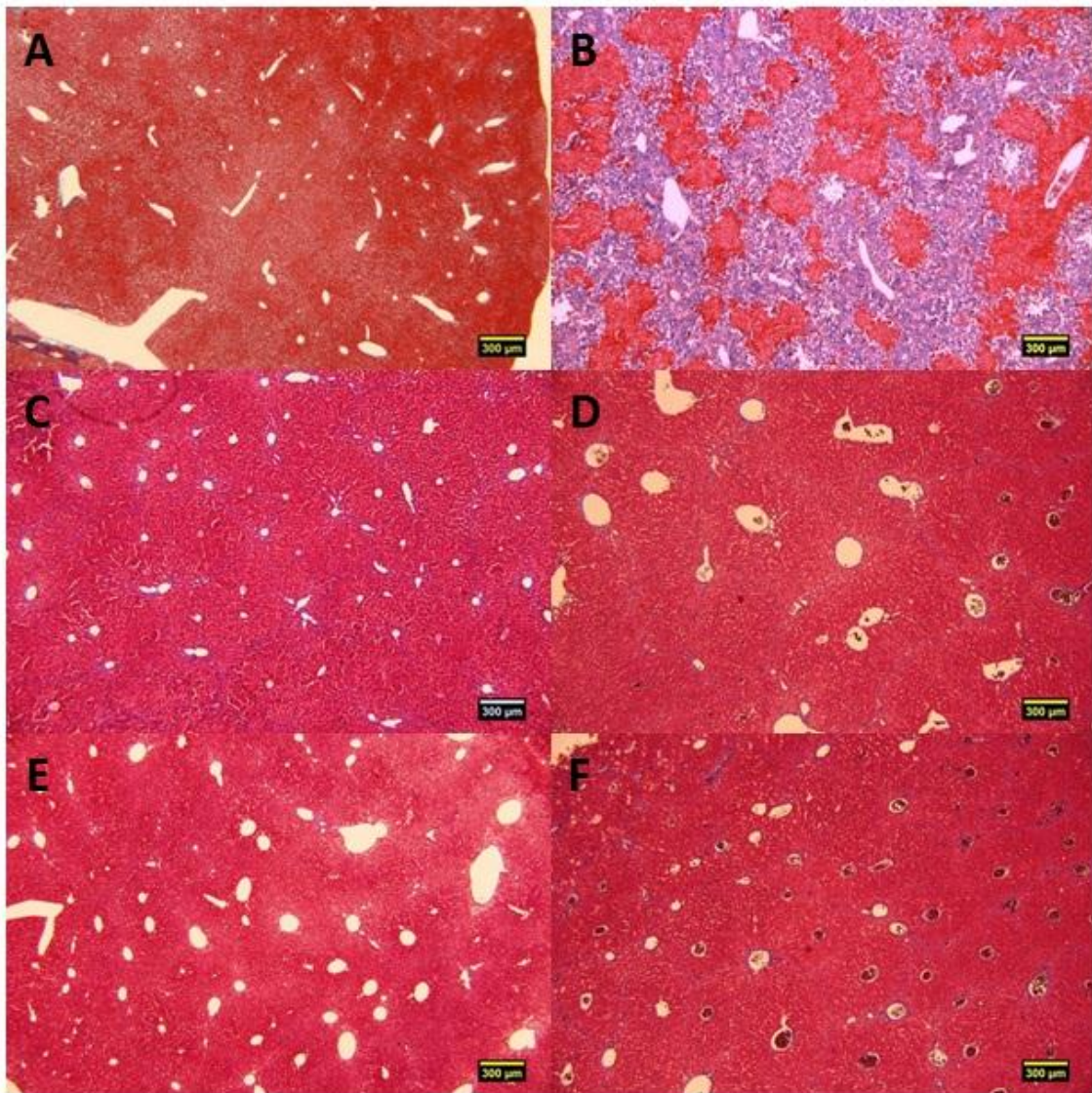


圖 20. 各組別於試驗結束時之肝臟組織病理切片。

各組別於十六週齡，即手術後四週犧牲後之肝臟組織病理切片，並以梅森氏三色染色法標定出纖維化傷疤組織，(A) 為作為對照之 Wild type 組別，(B) 為注射 PBS 之組別，其纖維化傷疤所佔比例相當高，(C) 為移植 single cell 脂肪幹細胞之組別，(D) 為移植細胞團塊小於四十微米之組別，(E) 為移植細胞團塊介於四十微米至七十微米之組別，(F) 為移植細胞團塊大於七十微米之組別。結果顯示，相較於 PBS 組別，接受細胞移植之組別其纖維化組織較少，但仍有少許疤痕組織存在於肝小葉之間。(比例尺為三百微米)

Figure 20. Histological staining of liver sections after cell transplantation for 4 weeks.

All mice were sacrificed in the end of experiment to obtained their liver section in order to

observed the fibrotic area, which indicated by Masson's Trichrome stain, (A) Wild type mice liver section, (B) liver section of PBS injection group, (C) AD-MSCs single cells transplantation group, (D) transplanted AD-MSCs under $40\ \mu\text{m}$ (E) transplanted AD-MSCs between $40\ \mu\text{m}$ to $70\ \mu\text{m}$, (F) transplanted AD-MSCs over $70\ \mu\text{m}$ in diameter. The results indicated the liver fibrosis were deteriorated of in PBS injection group, liver fibrosis decreased in those groups which received cell transplanted. (scale bar = $300\ \mu\text{m}$)

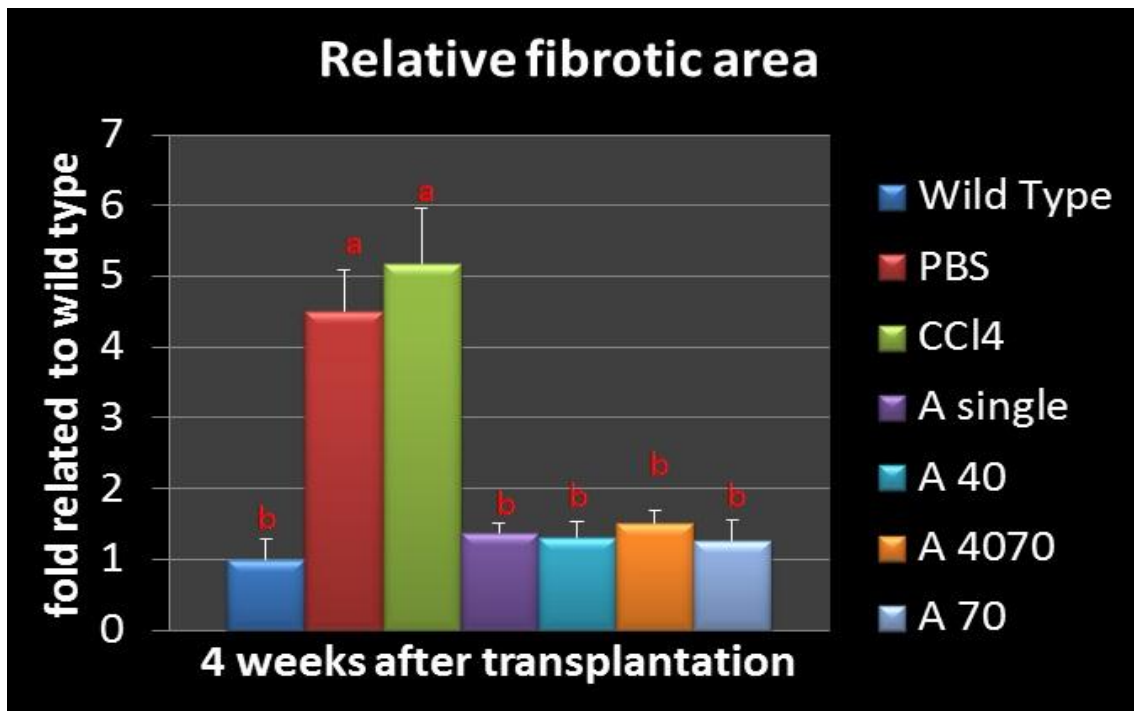


圖 21. 各組別於試驗結束後其肝臟組織病理切片中相對纖維化面積。

各組小鼠之肝臟組織病理切片，經過梅森氏三色染色法染色後標定出之纖維化傷疤區域，以影像處理軟體 Image J 計算出相對於 Wild type 組別之纖維化面積比率，結果顯示接受細胞移植之組別其相對纖維化比率顯著低於控制組。(P<0.05, n=6)

Figure 21. Relative fibrotic area analysis in histological liver section within each group after performing trial procedure of cell transplantation

The liver sections were dyed with Masson's Trichrome stain, then analyzed by image analysis program, Image J. all results compared with wild type group to obtain relative fibrotic area, data showed the relative fibrotic area of cell transplanted group significantly lower than PBS injection and CCl₄ treatment groups. (P<0.05, n=6)

3.4.3.4 羥脯胺酸含量之比較

羥脯胺酸 (hydroxyproline) 為構築膠原蛋白之主要胺基酸之一，其在膠原蛋白中含量約為 14%，且在動物體內其他組織中非常罕見，故常被用作於標定組織間膠原蛋白之含量。本試驗收集各組別小鼠於 16 週齡犧牲後之肝臟組織，以膠原蛋白定量試劑 (Biovision, 61255)，量測肝臟組織中膠原蛋白之含量，藉此可以定量出纖維化傷疤含量之不同。試驗結果顯示，接受細胞移植之組別其羥脯胺酸含量 (A single: 78 ± 10.3 ; A40: 76.9 ± 7.6 ; A4070: 71.6 ± 11.9 ; A70: 75.6 ± 8.4) 相較於控制組 (CCl₄: 126.1 ± 20.6 ; PBS: 130.1 ± 19.1)，顯著地降低 ($P < 0.05$)，證明本試驗所移植之豬脂肪幹細胞可修復受損肝臟組織，並降低肝纖維化小鼠肝組織中羥脯胺酸之含量，惟其含量仍高於無處理組 (wild type: 52 ± 6.5)，且羥脯胺酸之含量未因移植不同大小細胞團塊而有顯著差異 (圖 22)。故由以上試驗結果可得出，本試驗所分離及純化之紅螢光蛋白質轉基因豬之脂肪幹細胞，經移植入肝纖維化小鼠體內後，可降低小鼠血清中 GOT、GPT，並減少小鼠肝臟中纖維化傷疤，降低肝組織中羥脯胺酸之含量，達到修補肝臟中纖維化損傷之目的。



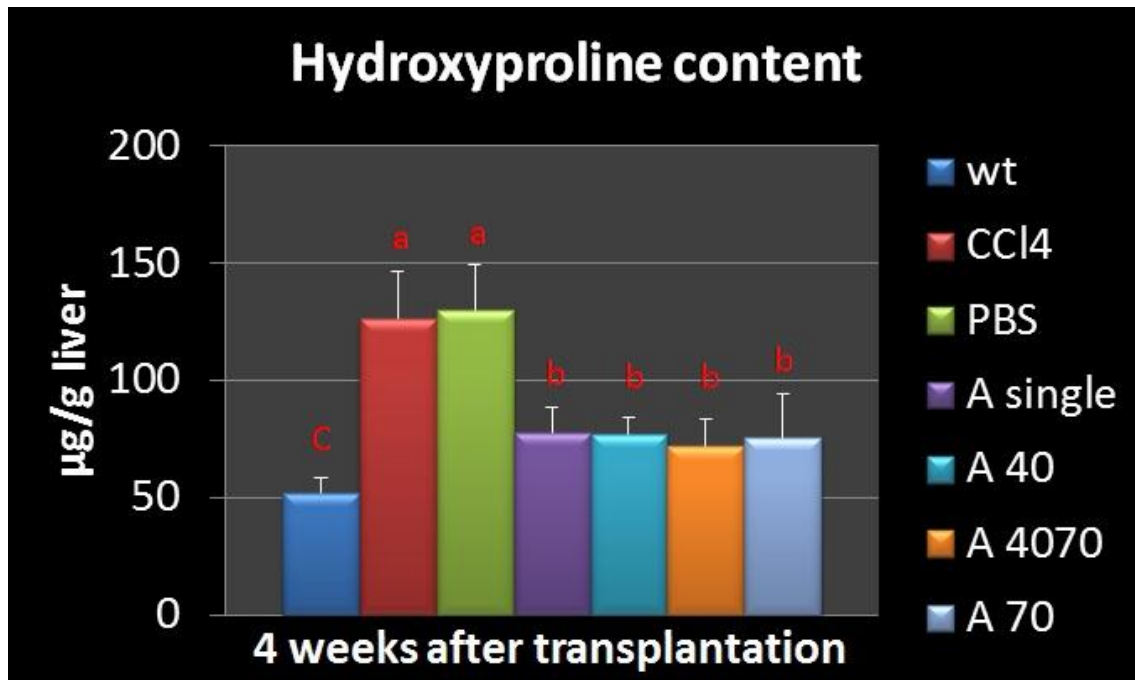


圖 22. 細胞移植 4 週後之試驗小鼠肝臟中羥脯胺酸含量之比較。

各組別小鼠於試驗結束後，測定其肝臟組織中羥脯胺酸之含量，其中接受細胞移植之各組別羥脯胺酸含量顯著低於控制組，但仍高於 Wild type 組別。(P<0.05, n=6)

Figure 22. Hydroxyproline content of liver within each group after cell transplantation for 4 weeks.

All mice were sacrificed and the hydroxyproline content in liver tissue were measured, data showed the hydroxyproline content of cell transplanted group significantly lower than PBS injection and CCl₄ treatment groups, but there still a gap compared with wild type mice. (P<0.05, n=6)

第4章 綜合討論

近年來，許多研究結果顯示可由動物體內不同組織分離出具有自我更新、增值快速及具有轉分化能力之幹細胞群，由此開啟了再生醫學與細胞治療之研究熱潮，其中研究團隊們以臍帶血、羊水、骨髓、脂肪、血液、以及各臟器中成功分離出幹細胞，並可用於治療如肝臟、心臟、腦神經、生殖障礙等相關疾病。

近年來脂肪幹細胞之研究蓬勃發展，主要原因為其不僅取得容易，且相較於其他來源之幹細胞，單次取得之量較多，且對於患者之侵入性最小。2010年美國食品藥物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 核准由脂肪組織分離含有脂肪幹細胞之 stromal-vascular fraction 可用於整形手術中之自體脂肪移植，為脂肪幹細胞研究與再生醫學中自體細胞移植開啟了新的契機，為此，脂肪幹細胞對於各種疾病之治療效果以及其治療相關機制，成為目前熱門研究主題。

本試驗由紅螢光蛋白轉基因豬之脂肪組織分離並純化出高純度脂肪幹細胞，並經過流式細胞儀分析其表面抗原，其結果相似於前人所發表之間葉幹細胞抗原表現，並證實其具有轉分化成為類肝臟細胞之能力，經過誘導分化培養之細胞表現肝臟細胞特異性蛋白質，經過誘導分化後之細胞其紅色螢光蛋白依然穩定表現。

進一步之試驗證實，本試驗所分離出之紅螢光蛋白轉基因豬脂肪幹細胞，經過細胞移植進入肝纖維化小鼠體內後，可降低小鼠血清中 GOT、GPT 之含量，並使其趨近於正常值，同時減少小鼠肝臟中纖維化傷疤之含量，達到修補受損肝臟，並改善肝纖維化病徵之目的。此外，本試驗使用不同大小之細胞團塊，測試是否因細胞團塊大小增加，而提高其遷移入肝臟之比率，進而提升治療肝纖維化之效果，惟其結果顯示，在各項數值上，並未因細胞團塊大小不同而有顯著差異，其結果與先前本研究室 (Shen, 2010) 使用骨髓間葉幹細胞團塊所獲得之試驗結果不甚相同，推測可能由於不同來源之幹細胞其遷移能力與治療能力不同而有所差異。

綜上所述，脂肪幹細胞具有分化為類肝臟細胞之潛能，並於試驗中被證實可用於減緩小鼠之肝纖維化症狀，達到降低肝臟中纖維化傷疤之效果，但其治療機制尚待釐清，仍需後續研究以探討移植入肝臟細胞後續之命運及其發展，若能

更進一步之研究成果，對再生醫學及細胞治療之發展必有相當大的助益，並有機會進入臨床研究階段，以造福肝臟纖維化之患者。



第5章 結論

本試驗結果顯示吾人所分離及純化之紅螢光蛋白轉基因豬脂肪幹細胞不僅表現與間葉幹細胞相似之表面抗原，且具有轉分化為類肝臟細胞之潛力，並於誘導分化後表現肝臟細胞特異性表現之蛋白質。此外，紅螢光蛋白轉基因豬脂肪幹細胞經異種移植進入肝纖維化小鼠體內後，可降低小鼠血清中 GOT、GPT，減少小鼠肝臟中纖維化傷疤，降低肝組織中羥脯胺酸之含量，惟不同團塊大小並未造成治療成效上之顯著差異，雖然此一結果與前人使用骨髓間葉幹細胞團塊所得之結果不甚相同，但仍能證實，由紅螢光蛋白轉基因豬脂肪組織分離出之脂肪幹細胞，具有可透過異種移植改善小鼠肝纖維化病症之能力。



第6章 未來展望

在台灣，每年有許多患者死於並非不治之症的慢性疾病，其中，慢性肝病就是其中一項，由於目前所發展出的藥物皆以輔助治療為主，在缺乏對症藥物的情況下，嚴重至肝硬化之患者往往只能等待肝臟移植。由於台灣法律對於器官捐贈的諸多限制，以及配對資料庫的不健全，讓許多患者等不到器官移植之機會。

醫學發展日益進步的當下，許多新療法因應而生，幹細胞治療為其中一種，雖然在科學家眼中前景看好，但因其充滿太多未知，故各國之醫療總署遲遲無法開放幹細胞治療進入正式醫療療程。近年來，美國食品藥物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 核准由脂肪組織分離含有脂肪幹細胞之 stromal-vascular fraction 可用於整形手術中之自體脂肪移植，同時開放許多自體幹細胞修補手術，如胎兒皮膚幹細胞修補新生兒兔唇、心外露、氣管缺陷等，使得自體細胞治療向前邁進了一大步。

科學領域需要不斷的投入以發現新知，也許在不久的將來，我們不再需要人造器官或是器官移植，能以自體幹細胞治療，修補許多具有缺陷，或是功能不佳的器官，期待在未來，生醫科學的進步，能帶給全世界的人們幸福。

參考文獻

- Baddoo, M., Hill, K., Wilkinson, R., Gaupp, D., Hughes, C., Kopen, G. C. and Phinney, D. G. 2003. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *Journal of cellular biochemistry* 89: 1235-1249.
- Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Quinn, G., Okochi, H. and Ochiya, T. 2007. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology* 46: 219-228.
- Bataller, R., and D. A. Brenner. 2005. Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 115: 209-218.
- Bianco, P., M. Riminucci, S. Gronthos, and P. G. Robey. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19: 180-192.
- Bittner, R. E., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Ivanova, S., Streubel, B., Hauser, E., Freilinger, M., Hoger, H., Elbe-Burger, A. and Wachtler, F. 1999. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anatomy and embryology* 199: 391-396.
- Bjorklund, L. M., Sanchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I. Y., McNaught, K. S., Brownell, A. L., Jenkins, B. G., Wahlestedt, C., Kim, K. S. and Isacson, O. 2002. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 2344-2349.
- Boeker, K. H., Haberkorn, C. I., Michels, D., Flemming, P., Manns, M. P. and Lichtinghagen, R. 2002. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clinica chimica acta; International Journal of Clinical Chemistry* 316: 71-81.

- Campagnoli, C., Roberts, I. A., Kumar, S., Bennett, P. R., Bellantuono, I. and Fisk, N. M. 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.
- Chamberlain, G., J. Fox, B. Ashton, and J. Middleton. 2007. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25: 2739-2749.
- Chan, S. L., Choi, M., Wnendt, S., Kraus, M., Teng, E., Leong, H. F. and Merchav, S. 2007. Enhanced in vivo homing of uncultured and selectively amplified cord blood CD34⁺ cells by cotransplantation with cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Stem Cells* 25: 529-536.
- Chen, J., Li, Y., Wang, L., Zhang, Z., Lu, D., Lu, M. and Chopp, M. 2001. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke; A Journal of Cerebral Circulation* 32: 1005-1011.
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S. and Gianni, A. M. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99: 3838-3843.
- Djouad, F., Ponce, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Noel, D. and Jorgensen, C. 2003. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102: 3837-3844.
- Dor, Y., J. Brown, O. I. Martinez, and D. A. Melton. 2004. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429: 41-46.

- Evans, M. J., and M. H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.
- Fang, D., Seo, B. M., Liu, Y., Sonoyama, W., Yamaza, T., Zhang, C., Wang, S. and Shi, S. 2007. Transplantation of mesenchymal stem cells is an optimal approach for plastic surgery. *Stem Cells* 25: 1021-1028.
- Hoehn, M., Kustermann, E., Blunk, J., Wiedermann, D., Trapp, T., Wecker, S., Focking, M., Arnold, H., Hescheler, J., Fleischmann, B. K., Schwindt, W. and Buhrle, C. 2002. Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 16267-16272.
- Hong, S. H., Gang, E. J., Jeong, J. A., Ahn, C., Hwang, S. H., Yang, I. H., Park, H. K., Han, H. and Kim, H. 2005. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330: 1153-1161.
- In 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., Noort, W. A., Claas, F. H., Willemze, R., Fibbe, W. E. and Kanhai, H. H. 2003. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102: 1548-1549.
- Koc, O. N., Gerson, S. L., Cooper, B. W., Dyhouse, S. M., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I. and Lazarus, H. M. 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. *Journal of clinical oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 18: 307-316.

- Lee, K. D., Kuo, T. K., Whang-Peng, J., Chung, Y. F., Lin, C. T., Chou, S. H., Chen, J. P., Chen, Y. P. and Lee, O. K. 2004. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 40: 1275-1284.
- Menon, L. G., Picinich, S., Koneru, R., Gao, H., Lin, S. Y., Koneru, M., Mayer-Kuckuk, P., Glod, J. and Banerjee, D. 2007. Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells. *Stem Cells* 25: 520-528.
- Nakagami, H., Morishita, R., Maeda, K., Kikuchi, Y., Ogihara, T. and Kaneda, Y. 2006. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 13: 77-81.
- Parviz, F., Matullo, C., Garrison, W. D., Savatski, L., Adamson, J. W., Ning, G., Kaestner, K. H., Rossi, J. M., Zaret, K. S. and Duncan, S. A. 2003. Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nature Genetics* 34: 292-296.
- Peters, T., Jr. 1985. Serum albumin. *Advances in protein chemistry* 37: 161-245.
- Phinney, D. G., G. Kopen, R. L. Isaacson, and D. J. Prockop. 1999. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* 72: 570-585.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.
- Recknagel, R. O. 1967. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacological Reviews* 19: 145-208.

- Ruhnke, M., Ungefroren, H., Zehle, G., Bader, M., Kremer, B. and Fandrich, F. 2003. Long-term culture and differentiation of rat embryonic stem cell-like cells into neuronal, glial, endothelial, and hepatic lineages. *Stem Cells* 21: 428-436.
- Saito, T., J. E. Dennis, D. P. Lennon, R. G. Young, and A. I. Caplan. 1995. Myogenic Expression of Mesenchymal Stem Cells within Myotubes of mdx Mice in Vitro and in Vivo. *Tissue Engineering* 1: 327-343.
- Sakaida, I., Terai, S., Yamamoto, N., Aoyama, K., Ishikawa, T., Nishina, H. and Okita, K. 2004. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 40: 1304-1311.
- Sanchez-Ramos, L., and A. M. Kaunitz. 2000. Misoprostol for cervical ripening and labor induction: a systematic review of the literature. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 43: 475-488.
- Schaffler, A., and C. Buchler. 2007. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 25: 818-827.
- Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E. and Birchmeier, C. 1995. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373: 699-702.
- Schwartz, R. E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W. S. and Verfaillie, C. M. 2002. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *The Journal of Clinical Investigation* 109: 1291-1302.
- Sgodda, M., Aurich, H., Kleist, S., Aurich, I., Konig, S., Dollinger, M. M., Fleig, W. E. and Christ, B. 2007. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo. *Experimental Cell Research* 313:

2875-2886.

- Sheweita, S. A., M. Abd El-Gabar, and M. Bastawy. 2001. Carbon tetrachloride-induced changes in the activity of phase II drug-metabolizing enzyme in the liver of male rats: role of antioxidants. *Toxicology* 165: 217-224.
- Slater, T. F., and B. C. Sawyer. 1971. The stimulatory effects of carbon tetrachloride on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. Inhibitory effects of free-radical scavengers and other agents. *The Biochemical Journal* 123: 823-828.
- Sun, Y., Chen, L., Hou, X. G., Hou, W. K., Dong, J. J., Sun, L., Tang, K. X., Wang, B., Song, J., Li, H. and Wang, K. X. 2007. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells in vitro. *Chinese Medical Journal* 120: 771-776.
- Takahara, T., Furui, K., Yata, Y., Jin, B., Zhang, L. P., Nambu, S., Sato, H., Seiki, M. and Watanabe, A. 1997. Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers. *Hepatology* 26: 1521-1529.
- Thomson, J. A. , Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147.
- Tropel, P., Noel, D., Platet, N., Legrand, P., Benabid, A. L. and Berger, F. 2004. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Experimental Cell Research* 295: 395-406.
- Weber, L. W., M. Boll, and A. Stampfl. 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology* 33: 105-136.
- Westin, J., L. M. Lagging, R. Wejstal, G. Norkrans, and A. P. Dhillon. 1999.

Interobserver study of liver histopathology using the Ishak score in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Liver* 19: 183-187.

Zhao, D. C., Lei, J. X., Chen, R., Yu, W. H., Zhang, X. M., Li, S. N. and Xiang, P. 2005. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World Journal of Gastroenterology* : WJG 11: 3431-3440.

Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P. and Hedrick, M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell* 13: 4279-4295.

