

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



紅色螢光豬羊水幹細胞移植於巴金森氏症模式大鼠
之治療潛能

Therapeutic Potential of DsRed Porcine Amniotic Fluid
Stem Cells in Parkinsonian Model Rats

林姿萱

Tzu-Hsuan Lin

指導教授：吳信志 博士

Advisor: Shinn-Chih Wu, Ph.D.

中華民國 105 年 1 月

January, 2016

謝誌

本論文承蒙恩師 吳信志 老師之悉心指導，於就學期間老師除了專業知識的傳授外，在研究過程中對邏輯思考和實驗方向之引導與啟發，更使我獲益良多，也才能有此論文之完成。另感謝國防醫學院生物及解剖學研究所 馬國興 所長撥冗擔任此次學位考口試委員，且提供我必要之實驗設備與空間，讓我的研究得以順利完成；亦感謝國立屏東科技大學動物科學與畜產系 彭劭于 老師，亦師亦友的角色於碩士班期間給予我諸多實驗觀念上之啟發，更幫助我釐清研究方向。感謝口試委員們對此論文論述方向之指導及試驗上之建議，使本論文更臻於完整。

碩士班兩年半之求學生涯轉眼間已近尾聲，一路走來有幸受到許多人的幫助，皆銘感於心。感謝國防醫學院生物及解剖學研究所—紹儒 學長、宗達 學長、韻婷 學姊在實驗技術上之細心指導，以及諭燁 學姊、立筠 學姊、家望 學長、彭勃 學長、永琳、靖渝 在實驗期間所給予之協助，使我得以順利進行實驗。感謝動物生殖科技研究室所有曾經一起努力的成員和夥伴們—育聖 學長、志任 學長、妍樺 學姊、冠宇 學長、廉本 學長、奕臣 學長、佩軒 學姊、碩甫 學長、王皓 學長、歐陽 學長、可軒 學姊、乃云 學姊、藝榕 學姊、偉誠 學長在實驗技術、觀念與經驗上之帶領和傳承，使我在面臨實驗困境時能夠堅定並逐一突破，亦感謝昱愷、庭寬、明剛、雁茹、均霖、佳蓉、名媛、銓良 在研究室事務上之分擔與幫忙。另感謝所有為此研究犧牲的實驗動物們，為了科學研究奉獻出生命，也才有本論文之誕生。

特別感謝自始至終陪伴著我並給我鼓勵的朋友們，使我在感受到壓力和挫折時能夠重新振作、繼續向前。最後，最要感謝的是我摯愛的家人—爸爸、媽媽、妹妹、Latte，一直以來始終如一的支持、關愛與包容，是我最堅強的後盾，讓我得以無後顧之憂地追求夢想並順利完成學業，在面對各式挑戰的人生道路上披荊斬棘、勇往直前！

謹誌于

國立臺灣大學動物科學技術學系

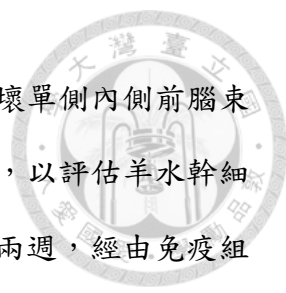
中華民國一百零五年一月



摘要

巴金森氏症 (Parkinson's disease) 為一漸進性的神經退化性疾病，其病因乃由於患者中腦黑質中的多巴胺神經元 (dopaminergic neuron) 死亡，無法製造足夠的多巴胺 (dopamine)，導致神經傳導出現問題，造成患者產生一些活動障礙，臨床上之症狀包括靜止性震顫 (resting tremor)、動作遲緩 (bradykinesia)、軀幹僵硬 (rigidity) 以及步態姿勢不穩定 (postural instability) 等；目前臨床上使用藥物治療和手術治療雖可於發病初期緩解其症狀，然隨病程之延長其療效將弱化，終將無法阻止病症之惡化。而近年研究指出，羊水幹細胞 (amniotic fluid stem cells, AFSCs) 具有分化為三胚層等不同組織細胞之能力，且表現多能性幹細胞之特異性分子標誌—Oct-4，經移植於體內後亦不會形成畸胎瘤，乃一新興且極具潛力之幹細胞來源。因此，探討以羊水幹細胞治療巴金森氏症之可行性並釐清其治療機轉，將有助於巴金森氏症新興療法之發展。

本研究使用來自於紅色螢光蛋白質轉基因豬 (DsRed transgenic pig) 的羊水幹細胞，進行異種移植至巴金森氏症模式大鼠中，以探討羊水幹細胞應用於治療巴金森氏症之可行性。首先，利用音蝟因子 (sonic hedgehog, SHH)、第八纖維母細胞生長因子 (fibroblast growth factor, FGF8)、鹼性成纖維細胞生長因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 及腦源性神經滋養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 等生長因子之添加於紅色螢光豬羊水幹細胞的培養液中以進行多巴胺神經分化 (dopaminergic neuronal differentiation)，結果可觀察到細胞外觀之轉變，開始出現類似神經細胞之細長形態且會表現神經細胞的特異性標誌— β -III 微管蛋白 (β -III tubulin)；直至誘導分化第 12 天時，可在誘導分化組中發現表現多巴胺神經元之特異性標誌—酪胺酸羥化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 的細胞，顯示紅色螢光豬羊水幹細胞已被成功誘導分化成為類多巴胺神經，此結果也暗示豬來源之羊水幹細胞應用於巴金森氏症新興療法開發之可行性。而後將紅色螢光豬羊水幹細



胞移植至使用六-羥基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 破壞單側內側前腦束 (medial forebrain bundle, MFB) 之巴金森氏症疾病模式大鼠腦中，以評估羊水幹細胞應用於巴金森氏症之治療效果。在進行六-羥基多巴胺破壞後兩週，經由免疫組織化學染色可見破壞側之黑質紋狀體徑路 (nigrostriatal pathway) 有明顯的多巴胺神經元缺失；續將紅色螢光豬羊水幹細胞移植至巴金森氏症模式大鼠腦中，並於移植後兩週經由阿樸嗎啡 (apomorphine) 誘發之旋轉行為評估其治療效果。結果顯示，接受細胞移植的組別之旋轉行為顯著地低於巴金森氏症模式大鼠控制組及接受磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) 注射的對照組 ($p < 0.01$)；而至移植後四週，巴金森氏症模式大鼠之旋轉行為的圈數下降約 40% 且極顯著地低於另兩個組別 ($p < 0.001$)。進一步觀察大鼠腦中多巴胺神經纖維之表現，結果顯示，接受紅色螢光豬羊水幹細胞移植的組別之多巴胺神經纖維密度顯著地高於未移植細胞的巴金森氏症模式大鼠控制組及接受 PBS 注射之對照組 ($p < 0.001$)。上述結果顯示，移植紅色螢光豬羊水幹細胞可顯著地改善巴金森氏症模式大鼠之旋轉行為缺陷並減緩其運動功能退化之進程。此外，欲釐清羊水幹細胞治療巴金森氏症之可能機轉，利用免疫螢光染色於移植後 24 小時、48 小時、72 小時及四週，追蹤腦組織切片中所移植進去的紅色螢光豬羊水幹細胞。結果在移植後 24 小時、48 小時和 72 小時，皆能在移植處發現許多表現紅色螢光的細胞，然此些紅色螢光豬羊水幹細胞並未開始往神經系 (neural lineage) 進行分化；至移植後四週時，雖於移植處所找到的表現紅色螢光的細胞大都為細胞碎屑 (cellular debris)，但仍可於週邊找到極少存活的紅色螢光豬羊水幹細胞，且分化為表現酪胺酸羥化酶之多巴胺神經元。

綜合上述，紅色螢光豬來源之羊水幹細胞可於體外適當培養環境下經誘導分化為類多巴胺神經，若移植至體內，紅色螢光豬羊水幹細胞於移植後四週仍可存活於大鼠紋狀體中，並分化為表現酪胺酸羥化酶之多巴胺神經元，且能顯著地改

善巴金森氏症模式大鼠之旋轉行為缺陷。是以羊水幹細胞乃一具有潛力之幹細胞來源應用於後續臨床上巴金森氏症細胞療法之開發。



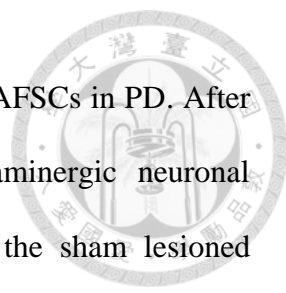
關鍵詞：羊水幹細胞、巴金森氏症、幹細胞療法、再生醫學、紅色螢光蛋白質轉
基因豬

ABSTRACT



Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative movement disorder characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra that leads to dopamine level decreases in the brain. Its clinical symptoms include resting tremor, rigidity, bradykinesia and postural instability. However, present pharmacological and surgical therapies can only postpone the emergence of motor symptoms, none have been able to reverse the degeneration of dopaminergic neurons. Recent studies have shown that amniotic fluid stem cells (AFSCs) are capable of differentiating into cell types from all three embryonic germ layers and expressing pluripotent stem cell marker, Oct-4. Most importantly, AFSCs won't induce teratoma formation *in vivo* when applied on clinical transplantation. Therefore, to investigate the therapeutic potential and possible mechanisms of AFSCs in PD is beneficial to developing a new and more effective way for treating PD.

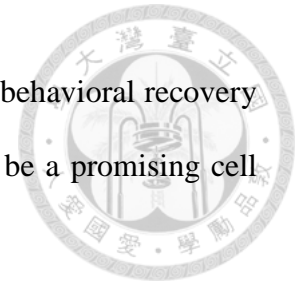
In this study, we used the AFSCs isolated from transgenic DsRed pigs for xenotransplantation in parkinsonian rats. First, we found that DsRed porcine AFSCs (pAFSCs) could differentiate into dopaminergic neuron-like cells *in vitro*. After induction with dopaminergic neuronal differentiation medium which was composed of sonic hedgehog, fibroblast growth factor 8, basic fibroblast growth factor, and brain-derived neurotrophic factor, the cells developed a neuronal morphology expressing the neuronal marker β -III tubulin. Additionally, the differentiated DsRed pAFSCs could express dopaminergic neuronal specific marker tyrosine hydroxylase (TH) 12 days after induction. These results implied the feasibility of using pAFSCs as a cell source for developing therapies of PD. Next, Sprague Dawley rats unilaterally lesioned by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in the medial forebrain bundle were used as



the parkinsonian model animal to evaluate the therapeutic effect of AFSCs in PD. After 2 weeks of 6-OHDA lesioning, the immunoreactivity of dopaminergic neuronal marker-TH reduced in the nigrostriatal pathway compared with the sham lesioned control group. Following DsRed pAFSCs transplantation into striatum, apomorphine-induced rotations were significantly less than the PD model control and sham grafted control group that only received PBS injection 2 weeks after transplantation ($p < 0.01$). Moreover, the rotations number of the DsRed pAFSCs transplanted group were reduced by about 40% and showed very significantly lower than the other two groups 4 weeks after transplantation ($p < 0.001$). TH positive dopaminergic neurons and fibers could be observed in the graft side by immunohistochemistry of the brain sections and the density of ipsilateral TH positive fibers were significantly increased after 4 weeks following transplantation of DsRed pAFSCs ($p < 0.001$). These results suggested that transplantation of DsRed pAFSCs could significantly alleviate the asymmetric rotational behavior of the PD rats and prevent further deterioration. Furthermore, we tracked the grafted cells by immunofluorescence staining of the brain sections at 24, 48, 72 hours and 4 weeks after cell transplantation in order to figure out the possible therapeutic mechanism. We found that the transplanted DsRed pAFSCs stayed around the graft site in striatum but had not yet started to differentiate into neural lineage at 24, 48 and 72 hours after transplantation. Until 4 weeks after transplantation, the xenografted cells could survive and differentiate into dopaminergic neurons though most of the grafts become cellular debris that left in the graft site.

In conclusion, the results show that DsRed pAFSCs could differentiate into dopaminergic neuron-like cells *in vitro* under the specific culture condition, and when transplanted *in vivo*, DsRed pAFSCs could not only survive and differentiate into

dopaminergic neurons but also significantly promote the functional behavioral recovery of the PD rats 4 weeks after transplantation. Hence, AFSCs might be a promising cell source for clinical cell therapy development of Parkinson's disease.



Key words: Amniotic fluid stem cells, Parkinson's disease, Stem cell-based therapy, Regenerative medicine, DsRed transgenic pigs

目次



口試委員會審定書	I
謝誌	II
摘要	III
ABSTRACT	VI
目次	IX
圖次	XI
表次	XIII
第一章 緒論	1
第二章 文獻探討	3
2.1 巴金森氏症	3
2.1.1 巴金森氏症簡介	3
2.1.2 巴金森氏症之成因	4
2.1.3 巴金森氏症之治療策略	6
2.2 巴金森氏症動物模式	8
2.2.1 六-羥基多巴胺簡介	8
2.2.2 六-羥基多巴胺誘導巴金森氏症之機制	8
2.2.3 阿撲嗎啡誘發之旋轉行為	9
2.3 幹細胞	11
2.3.1 幹細胞之分類	11
2.3.2 間葉幹細胞	14
2.3.3 羊水幹細胞及其臨床應用潛力	15

2.3.4 羊水幹細胞於巴金森氏症之相關研究進展	19
2.4 異種移植	21
第三章 試驗研究	22
3.1 紅色螢光豬羊水幹細胞體外誘導分化為類多巴胺神經之研究	22
3.1.1 前言	22
3.1.2 材料與方法	23
3.1.3 結果與討論	28
3.2 紅色螢光豬羊水幹細胞應用於異種移植治療巴金森氏症大鼠之可行性 ..	36
3.2.1 前言	36
3.2.2 材料與方法	37
3.2.3 結果與討論	44
3.3 紅色螢光豬羊水幹細胞移植入巴金森氏症大鼠後細胞命運之探討	52
3.3.1 前言	52
3.3.2 材料與方法	53
3.3.3 結果與討論	54
第四章 綜合討論	60
第五章 結論	63
第六章 未來展望	64
REFERENCES	65

圖次



圖 1. MPTP 造成多巴胺神經元死亡之機制.....	5
圖 2. 巴金森氏症之治療策略.....	7
圖 3. 六-羥基多巴胺之結構與造成神經毒性之機制.....	10
圖 4. 阿撲嗎啡誘發之旋轉行為示意圖.....	10
圖 5. 紅色螢光豬羊水幹細胞誘導分化為類多巴胺神經之培養液配方與流程圖	26
圖 6. 紅色螢光豬羊水幹細胞聚集而成之細胞懸浮球體及其貼底後所形成之細胞 群落形態.....	29
圖 7. 紅色螢光豬羊水幹細胞於體外誘導分化為類多巴胺神經期間與控制組之細 胞形態學上之比較.....	31
圖 8. 誘導分化第 9 天誘導分化組、控制組與第二抗體對照組之表現 β -III 微管蛋 白的細胞免疫螢光染色結果比較.....	33
圖 9. 紅色螢光豬羊水幹細胞於體外經誘導分化為類多巴胺神經.....	34
圖 10. 誘導分化第 12 天誘導分化組、控制組與第二抗體對照組之表現酪胺酸羥化 酶的細胞免疫螢光染色結果比較.....	35
圖 11. 6-OHDA 注射部位座標圖.....	38
圖 12. 以立體定位儀標定注射 6-OHDA 之示意圖.....	38
圖 13. 以自動旋轉行為記錄系統記錄大鼠的旋轉行為圈數之示意圖.....	40
圖 14. 細胞移植部位座標圖.....	40
圖 15. 以立體定位儀進行細胞移植手術之示意圖.....	41
圖 16. 巴金森氏症大鼠疾病動物模式建立及細胞移植之流程圖.....	41
圖 17. 6-OHDA lesioned 組與 sham lesioned 對照組於黑質紋狀體徑路之酪胺酸羥化 酶表現情形.....	45
圖 18. 各移植組別經阿撲嗎啡誘導的旋轉行為圈數之分析.....	47

圖 19. 移植紅色螢光豬羊水幹細胞四週後可於大鼠移植側的紋狀體中觀察到表現酪胺酸羥化酶之多巴胺神經元.....	49
圖 20. 移植後四週各處理組別於黑質紋狀體徑路之酪胺酸羥化酶表現情形	50
圖 21. 各處理組別於黑質紋狀體徑路中的多巴胺神經纖維密度之定量	51
圖 22. 紅色螢光豬羊水幹細胞於移植後 24 小時尚不具表現 β -III 微管蛋白及酪胺酸羥化酶之能力.....	55
圖 23. 紅色螢光豬羊水幹細胞於移植後 48 小時尚不具表現 β -III 微管蛋白及酪胺酸羥化酶之能力.....	55
圖 24. 紅色螢光豬羊水幹細胞於移植後 72 小時尚不具表現 β -III 微管蛋白及酪胺酸羥化酶之能力.....	56
圖 25. 於移植後四週可見紅色螢光豬羊水幹細胞之細胞碎屑殘留於移植處	58
圖 26. 紅色螢光豬羊水幹細胞於移植後四週仍可存活於大鼠紋狀體中，並分化為表現酪胺酸羥化酶之多巴胺神經元.....	59

表次

表 1. 羊水幹細胞與胚幹細胞、誘導式多能性幹細胞及間葉幹細胞之特性比較	17
表 2. 羊水幹細胞應用於再生醫學領域之研究案例	18




第一章 緒論



隨著現今醫療科技的發展，人類平均壽命延長，全球人口結構有高齡化之趨勢，一些老化相關疾病的患者數量也隨之增加。其中，巴金森氏症 (Parkinson's disease) 為一漸進性的神經退化性疾病 (neurodegenerative disease)，其病因乃由於患者中腦黑質中的多巴胺神經元 (dopaminergic neuron) 死亡，無法製造足夠的多巴胺 (dopamine)，導致神經傳導出現問題，造成患者產生一些活動障礙；臨床上之症狀包括靜止性震顫 (resting tremor)、動作遲緩 (bradykinesia)、軀幹僵硬 (rigidity) 以及步態姿勢不穩定 (postural instability) 等。根據統計，目前全球約有一千萬的人口患有巴金森氏症，且患病人數將會隨著世界人口結構高齡化而持續上升。目前臨床上使用藥物治療和手術治療雖可於發病初期緩解其症狀，然隨病程之延長其療效將弱化 (wearing off)，終將無法阻止病症之惡化，且於治療過程中又伴隨許多嚴重之副作用，因此發展一有效的治療方式遂成為當前十分重要之研究課題。

幹細胞具有自我更新 (self-renewal) 的特性與分化 (differentiation) 為多種組織細胞之能力，常應用於各種疾病損傷之修復，因此再生醫學中以幹細胞為主的細胞療法為當前最具有發展巴金森氏症新興療法之潛力。目前最被廣泛研究的幹細胞種類根據其來源主要可分為胚幹細胞 (embryonic stem cells, ESCs) 與體幹細胞 (somatic stem cells, SSCs) 兩大範疇，其中胚幹細胞相較於體幹細胞在取得來源上更具原始性，因此分化能力也更佳；然也因為胚幹細胞取自於受精卵發育到囊胚期的內細胞團，而使其一直有倫理道德上之爭議，且近年來有許多研究指出，胚幹細胞經移植至活體動物內有產生畸胎瘤 (teratoma) 之疑慮，進而降低胚幹細胞於臨床醫學上之應用性。另一方面，體幹細胞如骨髓間葉幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BM-MSCs) 之取得方式不具倫理道德上之爭議，移植至體內也無畸胎瘤產生之疑慮，且研究顯示其具有免疫相容性



(immunocompatibility)，應用於同種異體甚至是異種移植時較不易引起免疫排斥反應；雖然體幹細胞具上述之優點，然其分化潛能卻不及胚幹細胞，於臨床應用上也將有所侷限。

而近年研究指出，懷孕婦女進行羊膜穿刺 (amniocentesis) 時取得之羊水中可分離出一種異質性 (heterogeneous) 的幹細胞—羊水幹細胞 (amniotic fluid stem cells, AFSCs)，因其取得時間點早於來自於成體之體幹細胞，羊水幹細胞擁有更具原始性之分化潛能，普遍認為是介於多能性幹細胞與複能性幹細胞之間的細胞群。羊水幹細胞相較於來自成體的體幹細胞具有高度增殖性、較佳的端粒酶活性及較長的端粒長度等，經體外培養後也具有誘導分化為三胚層等不同組織細胞之能力，且表現多能性幹細胞之特異性分子標誌—Oct-4，更重要的是，羊水幹細胞經移植於體內之後不會有形成畸胎瘤的問題發生，是以羊水幹細胞乃近年來於再生醫學中一新興且極具潛力之幹細胞來源。

因此，本研究將以藥物誘導建立巴金森氏症大鼠疾病動物模式，再使用異種 (xenogeneic) 豬來源之羊水幹細胞作為移植的材料，且試驗豬隻為本研究室先前產製出之紅色螢光蛋白質基因轉殖豬，其所分離出之羊水幹細胞亦會表現紅色螢光；藉此除了可探討以羊水幹細胞治療巴金森氏症之可行性，尚能於移植後藉由追蹤表現紅色螢光的外來細胞以釐清其治療機轉，予往後相關研究提供一立基。

第二章 文獻探討



2.1 巴金森氏症

2.1.1 巴金森氏症簡介

巴金森氏症 (Parkinson's disease) 最早是在西元 1817 年由一位英國醫生—James Parkinson 首次發表的一篇論文 “An essay on the shaking palsy” 中所提到的臨床徵狀，當時他以震顫麻痺 (shaking palsy) 來統稱其於臨床上觀察到的運動行為缺失症狀 (Parkinson, 1817)。而後有學者對死亡的巴金森氏症患者進行病理檢查，發現其腦中的多巴胺 (dopamine)、正腎上腺素 (norepinephrine)、血清素 (serotonin) 等神經傳遞物質 (neurotransmitters) 含量低於正常人，尤以多巴胺降低的最為顯著，並進一步歸納出巴金森氏症是由於黑質緻密部 (substantia nigra pars compacta, SNpc) 投射至紋狀體 (striatum) 的多巴胺黑質紋狀體徑路 (nigrostriatal pathway) 產生退化所導致 (Hornykiewicz, 1972; Hornykiewicz, 1975)。

巴金森氏症患者常有下列典型的症狀，包括靜止時不自主地顫動 (resting tremor)、肌肉僵直 (muscular rigidity)、行動遲緩 (bradykinesia)、發起動作時困難 (akinesia)、軀幹和四肢呈現彎曲姿勢 (flexed posture of trunk and limbs)、喪失姿勢反射 (loss of postural reflexes) 及凍結現象 (freezing phenomenon) 等 (Fahn, 2003)。除了上述動作障礙相關症狀外，巴金森氏症患者也經常伴隨有非動作障礙相關之病徵，如憂鬱症 (depression)、焦慮 (anxiety)、幻覺 (hallucinations)、失智症 (dementia)、疲勞 (fatigue) 及睡眠障礙 (sleep disorders) 等 (Chaudhuri *et al.*, 2006; Jankovic, 2008)。雖非每一位巴金森氏症患者都會出現上述所有症狀，然隨著病程發展，症狀將逐漸加劇，進而嚴重影響到患者的生活品質，最終會導致失能 (disability)。



2.1.2 巴金森氏症之成因 (Etiology)

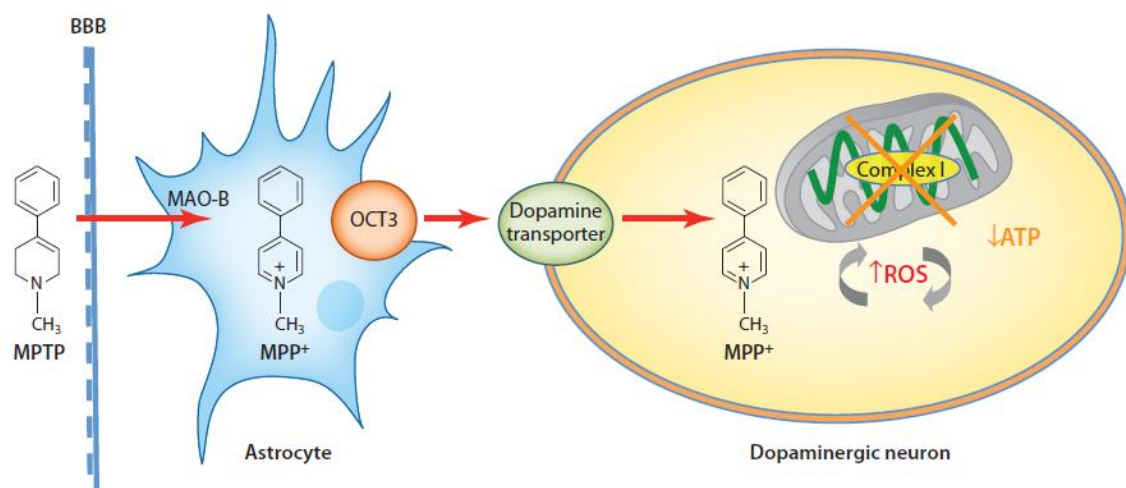
2.1.2.1 遺傳性巴金森氏症 (Familial Parkinson's disease)

目前巴金森氏症之成因尚未完全釐清，普遍認為有 5~10% 的巴金森氏症與遺傳性上的基因突變或缺失有關 (Wood-Kaczmar *et al.*, 2006)。其中染色體顯性的遺傳缺失如目前最被廣泛研究的 α -synuclein (SNCA)，為一腦中含量極為豐富之蛋白質，存在於神經前突觸終端 (presynaptic terminal) 中，與釋放含有神經傳遞物質的突觸囊泡 (synaptic vesicle) 有關 (Cabin *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2000)。研究指出， α -synuclein基因若發生錯義突變 (missense mutation)，其所編碼的第53個殘基上之胺基酸由丙胺酸 (Alanine, Ala) 變成羥丁胺酸 (Threonine, Thr) (A53T) 時，將導致此蛋白質的二級結構改變，由原本的 α -螺旋 (α -helix) 變為 β -摺板 (β -sheet) 而造成蛋白質錯誤摺疊，形成類澱粉蛋白結構 (amyloid-like structures) 之堆積，稱為路易氏體 (Lewy body) (Baba *et al.*, 1998; Polymeropoulos *et al.*, 1997)；此摺疊錯誤的蛋白質堆積於多巴胺神經元中具有細胞毒性，最終將造成多巴胺神經元死亡，而路易氏體也是巴金森氏症患者腦中一個常見的病理特徵 (Abou-Sleiman *et al.*, 2006; Spatola and Wider, 2014; Spillantini *et al.*, 1998; Stefanis, 2012)。

2.1.2.2 偶發性巴金森氏症 (Sporadic Parkinson's disease)

另有 90~95% 的病患是屬於偶發性巴金森氏症 (Dauer and Przedborski, 2003)，其成因複雜且牽涉諸多因子，如人種、年齡、性別、飲食與生活習慣、氧化性壓力 (oxidative stress) 及粒線體異常 (mitochondrial dysfunction) 等都可能為巴金森氏症之成因 (Blesa *et al.*, 2015; Olanow and Tatton, 1999; Tan, 2013; Wirdefeldt *et al.*, 2011)。此外，環境中的神經毒素 (neurotoxin) 也是一隱形的危險因子；西元 1983 年 Langston 等人發現，在製造一種人工合成、效果類似嗎啡的毒品—配西汀

(meperidine; 1-methyl-4-phenyl-4-propionoxypiperidine, MPPP) 的過程中會有一種雜質—MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) 產生，毒品成癮者若將此化合物注射至體內後會表現出類似巴金森氏症之症狀 (Langston *et al.*, 1983)。MPTP 為一種神經毒素，可以穿過血腦障壁 (blood-brain barrier, BBB) 後，由神經膠質細胞 (neuroglial cell) 中的單胺氧化酶-B (monoamine oxidase B, MAO-B) 轉化為具有毒性的陽離子形態—1-甲基-4-苯基吡啶 (1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP^+)， MPP^+ 再由有機陽離子轉運體-3 (organic cation transporter-3, OCT3) 送出神經膠質細胞，並透過多巴胺神經終端 (dopaminergic nerve terminal) 上之多巴胺轉運蛋白 (dopamine active transporter, DAT) 進入多巴胺神經元中； MPP^+ 遂聚集在粒線體，並抑制電子傳遞鏈 (electron transport chain) 中 complex I 的氧化磷酸化作用 (oxidative phosphorylation)，使粒線體減少 ATP 的生合成且產生自由基 (free radicals)，自由基不斷累積造成膜內脂質過氧化 (lipid peroxidation)，最終導致多巴胺神經元因生物能量衰竭 (bioenergetic failure) 而死亡 (Dauer and Przedborski, 2003; Goldman, 2014; Monte *et al.*, 2002) (圖 1)。



(Goldman, 2014)

圖 1. MPTP 造成多巴胺神經元死亡之機制。

Figure 1. Mechanism of MPTP toxicity to dopaminergic neurons.



2.1.3 巴金森氏症之治療策略

2.1.3.1 藥物治療

目前巴金森氏症最主要的治療方式為藥物治療，使用的是左多巴 (levodopa, L-DOPA) 這種藥物。左多巴為多巴胺之前驅物，可通過血腦障壁並藉由多巴脫羧酶 (DOPA decarboxylase) 代謝轉為多巴胺 (圖 2A)，藉此以補充腦中多巴胺含量的不足，達到減緩患者動作障礙相關症狀之功效。左多巴於患病初期之療效顯著，然隨著病程之進展，則需增加劑量以維持治療效果；使用 5~10 年後，約有 60% 的患者會出現異動症 (dyskinesia) 和藥效弱化現象 (wearing-off phenomenon) (Fahn, 2003; Marsden and Parkes, 1977; Obese *et al.*, 1989)，約有 40% 的患者出現精神相關併發症 (neuropsychiatric complications) 如幻覺 (hallucinations) 和譫妄症 (delirium)，另有約 30% 的患者會伴隨失智症 (dementia) (Fénelon *et al.*, 2000; Hughes *et al.*, 2000; Obeso *et al.*, 2000)。

2.1.3.2 手術治療

巴金森氏症的手術治療為「腦深層刺激術」(deep brain stimulation, DBS)，是藉由在腦中埋入電極，透過高頻率的電脈衝抑制活動量過於旺盛的視丘下核 (subthalamic nucleus, STN)，以達到緩解巴金森氏症的顫抖和運動困難等症狀 (圖 2B)，其優點為可以降低對使用左多巴的依賴並間接減少服用左多巴所導致的併發症；研究指出，腦深層刺激術可以減少至少 50% 的異動症且可以有效改善動作障礙相關症狀 (Østergaard *et al.*, 2002; Rodriguez-Oroz *et al.*, 2005; Schüpbach *et al.*, 2005; Wolters, 2007)。然其缺點包含感染 (infection) 的風險、腦出血 (haemorrhage) 和癲癇 (epilepsy) 等，且手術價格昂貴，後續還須定期追蹤和進行零件之保養，因此需耗費大量時間和金錢 (Ashkan *et al.*, 2004; Breit *et al.*, 2004; Dams *et al.*, 2013; Ghika *et al.*, 1998; Umemura *et al.*, 2003)。



2.1.3.3 細胞移植療法

自西元 1980 年代開始，有部分研究將發育中之胚胎中腦組織 (fetal mesencephalic tissue) 移植至巴金森氏症病患的紋狀體 (striatum) 中，盼能藉此替代缺失的多巴胺神經元。Lindvall 等人將來自懷孕期八至九週大之人類胎兒的中腦組織移植到巴金森氏症患者腦中，結果發現其可於患者腦中存活並可顯著改善患者軀幹僵硬 (rigidity) 和行動遲緩 (bradykinesia) 的症狀，藉由正子電腦斷層造影 (Positron Emission Tomography, PET) 可見多巴胺重新合成並儲存於腦中之移植區域 (Lindvall *et al.*, 1990)。其後也陸續有研究顯示胚胎中腦組織經移植後可存活於巴金森氏症患者腦部並且促進多巴胺神經的再生 (Brundin *et al.*, 2000; Kordower *et al.*, 1995; Mendez *et al.*, 2005; Neto *et al.*, 2012)。另有研究團隊於移植後對患者進行長期的追蹤，發現在移植之後經過 15 年和 18 年，正子電腦斷層造影之結果顯示患者腦中的多巴胺神經重新分佈，原有的動作障礙症狀有明顯的改善，且已不需要再服用任何治療巴金森氏症之藥物，為此療法提供一有效且可行之立基 (Kefalopoulou *et al.*, 2014)。惟此療法之限制乃缺乏一個穩定且大量的細胞來源，胚胎中腦組織僅能由墮胎或流產之胎兒中取得，於此也有諸多倫理道德上之爭議，因此如何找到一個合適、穩定且有效的細胞來源遂成為目前細胞移植療法中所面臨到的最重要之課題。

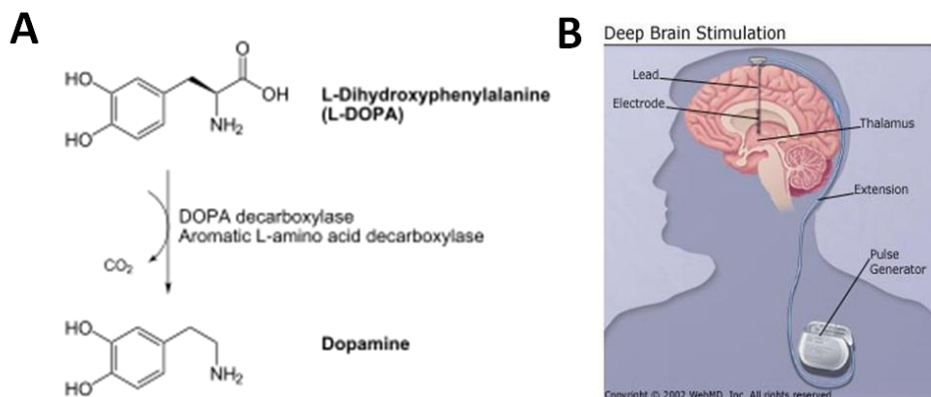


圖 2. 巴金森氏症之治療策略。(A) 藥物治療—左多巴 (B) 腦深層刺激術。

Figure 2. Therapeutic strategies of Parkinson's disease.




2.2 巴金森氏症動物模式

2.2.1 六-羥基多巴胺簡介

六-羥基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 是第一個藉由直接注射至大鼠黑質 (substantia nigra) 中造成整個黑質紋狀體多巴胺系統退化進而建立巴金森氏症動物模式的藥物 (Ungerstedt, 1968)。6-OHDA 是一種對兒茶酚胺類神經元 (catecholamine neurons) 有高度專一性的神經毒素，其結構與多巴胺相似，唯一不同為在苯環第六號碳上多了一個羥基 (hydroxyl group) (圖 3A)。有研究指出，將 6-OHDA 直接注射到大鼠中腦黑質或內側前腦束 (medial forebrain bundle, MFB)，多巴胺神經元在 12 小時內開始退化，且紋狀體中多巴胺含量將在 2~3 天後下降 (Faull and Laverty, 1969)；若是將 6-OHDA 注射到大鼠紋狀體中，其黑質多巴胺神經元會漸進性地死亡，與對側相比，破壞側的黑質多巴胺神經元在 6-OHDA 注射後兩週只剩下約 59%、四週後剩下約 35%、八週後剩下約 23%，直到十六週後只剩下約 15%，顯示此動物模式可模擬人類巴金森氏症漸進性的多巴胺神經退化 (Sauer and Oertel, 1994)。此外，6-OHDA 與多巴胺一樣無法直接穿過血腦障壁，因此必須藉由立體定位手術直接注射到破壞處，若只進行單側破壞 (unilaterally lesioned)，之後則可以藉由藥物誘導出因兩側多巴胺神經元活性不一而造成的旋轉行為，以作為後續治療效果之評估和分析；故時至今日，單側注射 6-OHDA 仍然是目前最常見也最被廣泛使用來誘導巴金森氏症動物模式的方式 (Beal, 2001; Dauer and Przedborski, 2003; Jackson-Lewis *et al.*, 2012; McGonigle, 2014; Torres and Dunnett, 2011)。

2.2.2 六-羥基多巴胺誘導巴金森氏症之機制

6-OHDA 造成多巴胺神經死亡進而誘導出巴金森氏症動物模式之機制與前述提到的 MPTP 類似，皆與氧化壓力 (oxidative stress) 有關 (Adams *et al.*, 1972; Sachs

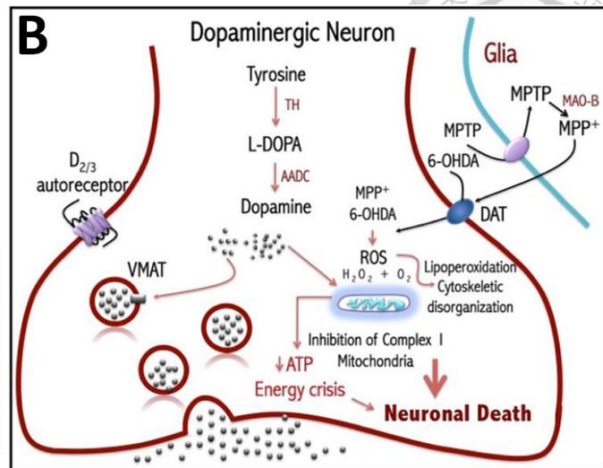
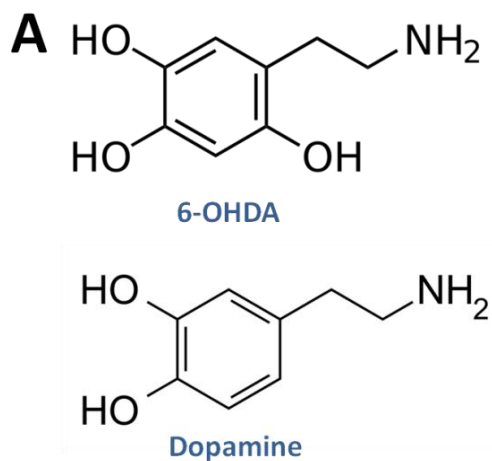


and Jonsson, 1975)。簡言之，6-OHDA無法像MPTP一樣直接穿過血腦障壁，因此必須藉由立體定位手術直接注射至試驗動物腦中欲破壞的區域，此時6-OHDA可以直接透過多巴胺神經突觸終端上之多巴胺轉運蛋白 (dopamine active transporter, DAT) 進入多巴胺神經元中並抑制粒線體內電子傳遞鏈 (electron transport chain) 中complex I的氧化磷酸化作用，使粒線體減少ATP之合成；此外，6-OHDA也會在多巴胺神經元中產生活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS) 造成脂質過氧化 (lipoperoxidation) 和細胞骨架解體 (cytoskeletal disorganization)，最終導致多巴胺神經元的死亡 (Blandini *et al.*, 2008; Blum *et al.*, 2001; Rangel-Barajas *et al.*, 2015; Schober, 2004) (圖 3B)。

2.2.3 阿撲嗎啡誘發之旋轉行為

阿撲嗎啡 (apomorphine) 是一種多巴胺受體的催動劑 (dopamine receptor agonist)，經注射後可以刺激多巴胺神經元突觸後的多巴胺受體 (Schultz and Ungerstedt, 1977; Marshall and Ungerstedt, 1977)，特別是在黑質紋狀體徑路被破壞後，患側的多巴胺受體結合位數量增多 (Creese *et al.*, 1977)，使巴金森氏症模式大鼠破壞側 (ipsilateral) 的動作輸出 (motor output) 活性大於正常側 (contralateral) 而由患側朝向對側旋轉 (Dunnett and Torres *et al.*, 2011; Deumens *et al.*, 2001; Hudson *et al.*, 1993; Schober, 2004) (圖 4)；且阿撲嗎啡誘發之旋轉行為在黑質紋狀體徑路上的多巴胺神經元受損達 80% 以上才會出現 (Schwartz and Huston, 1996)，故可以此量化的旋轉行為作為治療效果之評估。

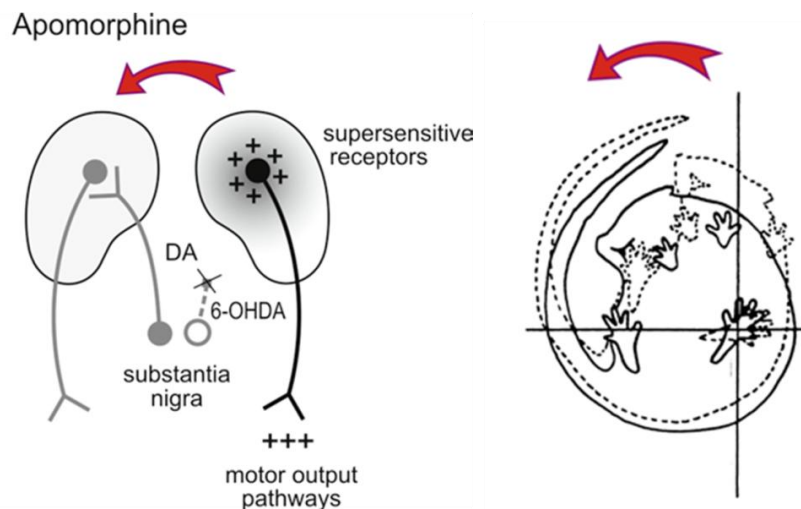
綜觀上述，以 6-OHDA 進行單側黑質紋狀體破壞後，再藉由阿撲嗎啡誘發之旋轉行為篩選出巴金森氏症的模式大鼠，是應用於研究巴金森氏症相關療法之一種理想的疾病動物模式。



(Rangel-Barajas *et al.*, 2015)

圖 3. 六-羥基多巴胺之結構與造成神經毒性之機制。(A) 六-羥基多巴胺與多巴胺之結構式 (B) 六-羥基多巴胺造成神經毒性之機制。

Figure 3. The structure and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. (A) The structural formula of 6-OHDA and dopamine. (B) The neurotoxicity of 6-OHDA.



(Dunnett and Torres *et al.*, 2011)

圖 4. 阿樸嗎啡誘發之旋轉行為示意圖。(A) 阿樸嗎啡誘發旋轉行為之機制 (B) 阿樸嗎啡誘發向健側旋轉之旋轉行為。

Figure 4. Apomorphine-induced rotational behavior. (A) Mechanism of apomorphine-induced rotational behavior. (B) Apomorphine-induced contralateral rotation behavior.



2.3 幹細胞

幹細胞 (stem cells) 為生物體內具有自我更新 (self-renewal) 及分化潛能 (differentiation potential) 之特殊細胞群。幹細胞自我更新的方式可分為對稱性分裂 (symmetric cell division) 及非對稱性分裂 (asymmetric cell division)；其中對稱性分裂為一幹細胞進行複製分裂產生二個與原細胞特性相同之幹細胞，此分裂方式可增加同種幹細胞之數量，而非對稱性分裂除了可產生一個和原幹細胞相同之細胞外，另可產生一個特化細胞 (specialized cell)，透過此機制，生物體可調控體內幹細胞之數目以維持體內組織器官之修復與更新。

2.3.1 幹細胞之分類

2.3.1.1 依分化潛能分類

幹細胞依其分化潛能可分為五大類，包括：

(1) 全能性幹細胞 (totipotent stem cells)

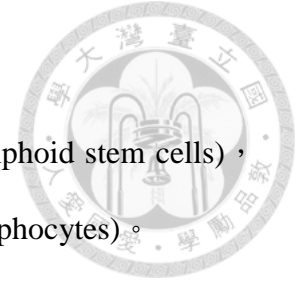
具有分化成內胚層、中胚層和外胚層等三胚層之各種細胞種類及胎盤之潛能，可獨自發育成為一完整個體，如受精卵。

(2) 多能性幹細胞 (pluripotent stem cells)

具有分化成內胚層、中胚層和外胚層等三胚層之各種細胞種類之潛能，但無法形成胎盤，故不具有發育成為一完整個體之能力，如胚幹細胞 (embryonic stem cells, ESCs) 及誘導式多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPS)。

(3) 複能性幹細胞 (multipotent stem cells)

具有分化成單一胚層三種以上細胞種類之潛能，如造血幹細胞 (hematopoietic stem cells, HSCs)，其可分化成紅血球 (red blood cells)、血小板 (platelets) 及巨噬細胞 (macrophages) 等。



(4) 寡能性幹細胞 (oligopotent stem cells)

具有分化成少數特定細胞種類之潛能，如淋巴幹細胞 (lymphoid stem cells)，其可分化成 T 淋巴球 (T lymphocytes) 及 B 淋巴球 (B lymphocytes)。

(5) 單能性幹細胞 (unipotent stem cells)

僅具有分化成單一種細胞之潛能，如纖維母細胞 (fibroblasts)，其可分化成纖維細胞 (fibrocytes)。

2.3.1.2 依取得來源分類

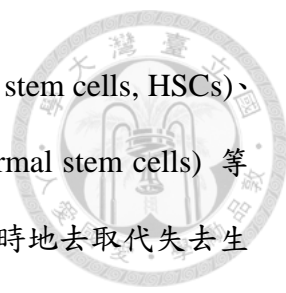
幹細胞依其取得來源之方式可分為三大類，包括：

(1) 胚幹細胞 (embryonic stem cells, ESCs)

ESCs 來自於受精卵發育至囊胚期 (blastocyst) 時之內細胞群 (inner cell mass)，係一多能性幹細胞。於西元 1981 年時，Evans 與其研究團隊成功分離出小鼠胚幹細胞 (Evans and Kaufman, 1981)，而後 Thomson 等人也於 1998 年成功分離出人類胚幹細胞 (Thomson *et al.*, 1998)。ESCs 之增殖、分化與自我更新能力極佳，於動物實驗中已證實 ESCs 可治療巴金森氏症 (Björklund *et al.*, 2002) 及第一型糖尿病 (Dor *et al.*, 2004)；然 ESCs 的取得方式會造成胚胎發育中止及死亡，在臨床上之應用將涉及倫理道德之爭議與法律規範等問題。此外，由於胚幹細胞之增生及分化潛能極佳，移植入動物體內後易造成畸胎瘤 (teratoma) 之生成 (Thomson *et al.*, 1998)，故目前多數研究僅停留在動物實驗之階段，未來若欲應用於人體臨床治療上，則首要條件即是尋找能穩定調控 ESCs 增生及分化相關之機制 (Young, 2011)。

(2) 體幹細胞 (somatic stem cells, SSCs)

體幹細胞又稱為成體幹細胞 (adult stem cells, ASCs)，可分離自成體體內的各種組織及器官中，目前分離出的 SSCs 種類眾多，包括間葉幹細胞



(mesenchymal stem cells, MSCs)、造血幹細胞 (hematopoietic stem cells, HSCs)、神經幹細胞 (neural stem cells, NSCs) 及表皮幹細胞 (epidermal stem cells) 等 (Crisan *et al.*, 2008)。這些 SSCs 大量存在於動物體內，可適時地去取代失去生理活性或是老化、受損之細胞，以確保動物體的生理機能維持於穩定之持衡狀態 (homeostasis)。相較於 ESCs，SSCs 的取得來源較不具倫理道德上之爭議，移植於動物體內也不會導致畸胎瘤之產生，故於臨床應用上為一極具潛力之細胞來源。

(3) 誘導式多潛能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPS)

西元 2006 年，Yamanaka 等人以帶有 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 等四個基因的反轉錄病毒為載體，誘導體細胞 (somatic cells) 經過再程序化 (reprogramming) 而產製出具有與 ESCs 相似型態、自我更新能力、增殖性 (proliferation)、端粒酶活性與分化潛能之 iPS (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007)。iPS 不僅不具 ESCs 的道德倫理規範限制，分化潛能又較 SSCs 為佳，遂成為再生醫學研究領域中眾所矚目的新興材料來源，目前 iPS 多應用於疾病治療及病患個體對於藥物反應之測試等研究 (Robinton and Daley, 2012)。然 iPS 於移植治療之安全性及再程序化的發生機制尚未完全釐清，故未來若欲廣泛運用於臨床醫學，尚需進一步深入研究 (Ratcliffe *et al.*, 2013)。



2.3.2 間葉幹細胞

間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 屬於複能性幹細胞，外觀為紡錘狀 (spindle-shaped)，於體外培養時會呈現成纖維細胞群落形成單元 (colony forming unit-fibroblasts, CFU-F)，並具有下列幾項特性 (Dominici *et al.*, 2006)：

- (1) 在標準培養環境下，細胞具貼附性 (plastic-adherent)。
- (2) 表現特定細胞表面分子標誌 (cell surface markers)，如 CD105、CD73 及 CD90，且不表現 CD45、CD34、CD14、CD19 及 HLA-DR 等標誌。
- (3) 具有三系分化 (trilineage differentiation) 的能力，可於適當培養環境下，於體外經誘導分化為硬骨 (osteoblast)、脂肪 (adipocyte) 及軟骨 (chondrocyte) 等細胞。

MSCs 來源眾多，可取自骨髓 (Kagami *et al.*, 2011)、臍帶血 (Martin-Rendon *et al.*, 2008)、臍帶內膜 (Baksh *et al.*, 2007)、胎盤 (Fukuchi *et al.*, 2004)、脂肪組織 (Eirin *et al.*, 2012)、牙髓 (dental pulp) (Huang *et al.*, 2009) 及胎兒羊水 (amniotic fluid) (De Coppi *et al.*, 2007) 等組織。於體外進行分化時，MSCs 不僅有硬骨、軟骨及脂肪細胞等三系分化之能力，甚至能跨胚層轉分化 (transdifferentiate) 為神經細胞、肝臟細胞、心肌細胞及胰島細胞等，故於再生醫學的研究領域中極具應用價值與潛力。

在細胞表面分子標誌上，大部分 MSCs 皆會表現 CD29、CD44、CD71、CD73、CD90、CD105、CD106、CD166 及 MHC-I 等表面分子標誌，而不表現 CD4a、CD11、CD14、CD18、CD31、CD34、CD40、CD45、CD80 及 CD86 (Chamberlain *et al.*, 2007)。而 MSCs 在動物試驗上已證實能改善多種疾病，包括心肌梗塞 (Orlic *et al.*, 2001)、第一型糖尿病 (Lee *et al.*, 2006)、巴金森氏症 (Herrmann and Sturm, 2014)、成骨不全症 (osteogenesis imperfecta) (Guillot *et al.*, 2008) 及肝纖維化 (Jung *et al.*, 2013) 等。



2.3.3 羊水幹細胞及其臨床應用潛力


羊水幹細胞 (amniotic fluid stem cells, AFSCs) 是從懷孕婦女於妊娠期間進行羊膜穿刺 (amniocentesis) 時所抽取之羊水中而來，其中所分離出的細胞種類主要有以下幾種 (Prusa and Hengstschläger, 2002)：

- (1) 上皮類型細胞 (epitheloid type cells)：此類細胞多來自於胎兒的皮膚及尿液。
- (2) 羊水類型細胞 (amniotic fluid specific type cells)：此類細胞多來自於胎膜 (fetal membranes) 及滋養層 (trophoblast)。
- (3) 纖維類型細胞 (fibroblastic type cells)：此類細胞多來自於纖維結締組織 (fibrous connective tissues) 及真皮纖維母細胞 (dermal fibroblasts)。

由上述可知，AFSCs 為一異質性 (heterogeneous) 的細胞群，可同時表現胚幹細胞及體幹細胞之特性，普遍認為其分化潛能介於多能性幹細胞及複能性幹細胞之間 (De Coppi *et al.*, 2007; Joo *et al.*, 2012; Prusa *et al.*, 2003)。另有研究顯示，AFSCs 具有高度增值性、較來自於成體之體幹細胞有更佳的端粒酶活性 (telomerase activity) 及較長之端粒 (telomere) 長度等近似於原始細胞之特性 (Guillot *et al.*, 2007) (表 1)，亦可經由體外誘導分化成肌肉、骨骼、脂肪、神經和肝臟等細胞 (Joerger-Messerli *et al.*, 2015; Joo *et al.*, 2012; Loukogeorgakis and De Coppi, 2015)。

在細胞表面分子標誌之分析顯示，AFSCs 會表現多能性幹細胞表面分子標誌如 SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA1-60、TRA1-81、Klf4、SOX2、c-Myc、Nanog 及 Oct-4 等，此外也會表現間葉幹細胞之表面分子標誌如 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105 和 MHC-I 等；而不表現血球細胞表面分子標誌如 CD45、CD34、CD14 及輔助刺激因子 (costimulatory molecules) 之分子標誌如 CD80、CD86 等 (Loukogeorgakis and De Coppi, 2015; Dziadosz *et al.*, 2016; Pozzobon *et al.*, 2014)。

在移植安全性方面，AFSCs 在移植入重症聯合免疫缺陷小鼠 (severe



combined immunodeficiency mice; SCID mice) 後，體內無誘發畸胎瘤產生之現象 (De Coppi *et al.*, 2007; Moschidou *et al.*, 2013)。目前AFSCs已成功應用於皮膚、肌肉、神經、腎臟、肺臟、心臟、心臟瓣膜、橫膈膜 (diaphragm)、硬骨、軟骨組織及血管新生 (angiogenesis) 等疾病修復之研究 (Joerger-Messerli *et al.*, 2015; Joo *et al.*, 2012; Loukogeorgakis and De Coppi, 2015) (表 2)。

綜觀上述，AFSCs 擁有諸多優點使其成為再生醫學研究領域中之新起之秀，未來若欲應用於臨床則可於懷孕婦女進行羊膜穿刺時將檢查後剩餘之羊水經分離培養後取得 AFSCs，並可保存於液態氮中以建立為細胞庫，則可獲得穩定且大量的細胞來源；然目前仍需更充分的證據來確認AFSCs於移植後之安全性和有效性，並須通過美國食品藥物管理局 (U.S. Food and Drug Administration, FDA) 之核可以啟動臨床前之人體試驗，未來才能真正於臨床上建立一套安全且有效的羊水幹細胞療法 (Dziadosz *et al.*, 2016)。

表 1. 羊水幹細胞與胚幹細胞、誘導式多能性幹細胞及間葉幹細胞之特性比較

Table 1. Main characteristics of different stem cell populations: ESCs, iPS, AFSCs and MSCs

	ES cells	iPS cells	AFS cells	MSC
Source	Early stage embryo	Somatic cells	Amniotic fluid	Bone marrow and other adult tissues
Feeder cells	Required	Required	Not required	Not required
Markers	SSEA3/4, OCT-3/4, SOX2	SSEA3/4, OCT-3/4, SOX2	SSEA4, OCT4, c-kit, CD44, CD105	CD44, CD73, CD90, CD105
Plasticity	Pluripotent	Pluripotent	Broadly multipotent	Multipotent
Teratoma formation	Yes	Yes	No	No
Doubling time (h)	31-57	48	36	Variable
Lifespan <i>in vitro</i>	Long	Long	Long	Short
Ethical issues	Yes	No	No	No
Clinical trials	No	No	No	Yes

(Joo *et al.*, 2012)

表 2. 羊水幹細胞應用於再生醫學領域之研究案例



Table 2. Various applications of AFSCs to regenerative medicine

	Cell types	Scaffolds	Animal model and outcomes	Refs.
Muscle	Rat AFS	n/a	Cryo-injured rat bladder walls, prevention of cryo-injury induced hypertrophy of smooth muscle cells	(De Coppi et al., 2007b)
Nerve	Neuronally –induced hAFS	n/a	<i>Twitchee</i> mice, integration with host neural cells	(De Coppi et al., 2007a)
	Rat AFS	n/a	Extensive thoracic crush injury of E2.5 chick embryo, reduction of hemorrhage and increased survival	(Prasongchean et al., 2011)
Kidney	Human AFS	n/a	Mice with glycerol-induced rhabdomyolysis and acute tubular necrosis (ATN), amelioration of ATN and decrease of damaged tubules and apoptosis	(Perin et al., 2010)
Lung	Human AFS	n/a	Mice with hyperoxia and naphthalene injury, plasticity of AFS to respond to different lung damage	(Carraro et al., 2008)
Heart	Rat AFS	n/a	Rat heart infarction by ischemia/reperfusion, improvement of ejection fraction	(Bollini et al., 2011)
	Human AFS and AFS-derived cellular structures	n/a	Heart infarction in immune-suppressed rats, improved cardiac function	(Yeh et al., 2010b, Yeh et al., 2010a, Lee et al., 2011)
Heart valve	Human AFS	Synthetic polymeric scaffold	<i>In vitro</i> formation of neo-tissues by conditioning in bioreactor system	(Weber et al., 2011)
Diaphragm	Ovine AFS	Collagen hydrogel	Partial diaphragmatic replacement of newborn lambs, mechanical and functional outcomes	(Fuchs et al., 2004)
Bone	Human AFS	Alginate/collagen	Subcutaneous implantation into immunodeficient mice, ectopic bone formation	(De Coppi et al., 2007a)
	Osteogenic differentiation of human AFS by rhBMP-7	PLLA nanofibers	Subcutaneous implantation into athymic mice, ectopic bone formation	(Sun et al., 2010)
	Rabbit AFS	PLLA nanofibers	Full-thickness sternal defects, postnatal reconstruction of chest wall	(Steigman et al., 2009)
	Human AFS	Porous PCL	Subcutaneous implantation into athymic rats, ectopic bone formation	(Peister et al., 2009)
Cartilage	Human AFS	Pellet or alginate hydrogel	<i>In vitro</i> cartilage formation	(Kolambkar et al., 2007, Kunisaki et al., 2007)
Angiogenesis	CM of human AFS	n/a	Hind-limb ischemia in mice, tissue repair by host stem cell recruitment mediated by stem cell-secreted factors	(Teodelinda et al., 2011)

rhBMP-7: recombinant human bone morphogenetic protein-7; PLLA: poly(L-lactic acid); PCL: poly(ϵ -caprolactone); CM: conditioned medium; n/a: non-applicable.


(Joo *et al.*, 2012)



2.3.4 羊水幹細胞於巴金森氏症之相關研究進展

羊水幹細胞 (amniotic fluid stem cells, AFSCs) 為近年來新興之幹細胞來源,其分化潛能介於多能性幹細胞及複能性幹細胞之間,已被證實可分化為三胚層各式種類的細胞,故於再生醫學領域中極具潛力與應用價值 (Joo *et al.*, 2012)。過去研究指出,人類AFSCs由第二孕期 (second trimester) 之懷孕婦女做羊膜穿刺 (amniocentesis) 剩餘的廢棄羊水中分離並經初代培養後,即有表現神經系相關蛋白質之能力,例如Nestin (神經前驅細胞標誌)、 β -III tubulin (神經細胞骨架)、GFAP (星狀細胞標誌)、GALC (寡樹突細胞標誌) 及CD133 (神經幹細胞標誌) 等 (Prusa *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2006), 表示AFSCs具有神經系細胞之特性,應用於神經相關疾病上極具潛力。另有研究證實,AFSCs可於特定培養環境下分化成類神經細胞 (neural-like cells) (Kim *et al.*, 2007; Orciani *et al.*, 2008; Orciani *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2010), 若進一步利用特定生長因子之添加則可將AFSCs分化為具有近似神經細胞之細長軸突形態且表現中腦多巴胺神經元特異性標誌—酪胺酸羥化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 之類多巴胺神經細胞 (dopaminergic neuron-like cells) (Kim *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2011; McLaughlin *et al.*, 2006; Pfeiffer and McLaughlin, 2010), 因此可應用於巴金森氏症幹細胞療法之開發 (Rosner *et al.*, 2012)。

於體內試驗之研究結果顯示,AFSCs經移植至大鼠腦中可存活達90天且具有遷移 (migrate) 至腦中受損區域之能力 (Cipriani *et al.*, 2007)。另有研究指出,AFSCs與骨髓來源之間葉幹細胞相比對於干擾素- γ (γ -interferon) 之反應較低,表示AFSCs若移植至宿主體內較不易引起免疫排斥反應;將此AFSCs移植至巴金森氏症模式大鼠腦中,於移植後三週之旋轉行為相較於未接受細胞移植的控制組已顯著降低,其改善效果更可持續達十二週,且與移植前之旋轉圈數相比約下降75%;進一步追蹤所移植的AFSCs之結果顯示,於移植後六週可於大鼠腦中找到存活的AFSCs且此



些AFSCs已分化為表現多巴胺神經元特異性標誌—酪胺酸羥化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 及多巴胺轉運蛋白 (dopamine active transporter, DAT) 之多巴胺神經，可見AFSCs於巴金森氏症之治療潛力 (Chang *et al.*, 2013)。另有研究團隊將AFSCs移植至由MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) 所誘導之巴金森氏症模式小鼠的腦中，結果顯示，在移植後四週有接受細胞移植的小鼠在行為測試中相較於未接受細胞移植的控制組有顯著的改善，且可於小鼠紋狀體中之移植處附近找到移植前以螢光染劑—PKH26標定之AFSCs，經免疫染色之結果發現此些AFSCs已分化為表現TH之多巴胺神經；進一步分析小鼠紋狀體中之腦源性神經滋養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 含量，巴金森氏症模式小鼠紋狀體中之BDNF濃度顯著低於正常小鼠，而接受AFSCs移植二週後，小鼠紋狀體中之BDNF濃度則顯著回升至近似於正常小鼠，故作者推斷AFSCs可能是透過分泌BDNF等神經滋養因子 (neurotrophins) 來達到改善巴金森氏症模式小鼠的行為缺失之效 (Kong *et al.*, 2008)。

綜合上述，AFSCs 具有分化為類神經細胞甚至是類多巴胺神經之潛能，移植於巴金森氏症動物模式中可有效改善動作行為上之缺失，並可能是藉由分泌神經滋養因子來促進神經再生 (nerve regeneration) (Kim *et al.*, 2014)，顯示 AFSCs 確實有應用於治療巴金森氏症之潛力，然其中之治療機轉仍待進一步研究以釐清 (Yee *et al.*, 2015)。



2.4 異種移植

隨著再生醫學之發展，以幹細胞療法進行疾病損傷之修復效果與潛力與日俱增，若未來欲將幹細胞療法應用至臨床，則勢必要能建立一完整之細胞儲存庫，然人類細胞來源之取得相對於動物細胞更為困難且法律規範上之限制極為嚴謹，因此如何取得穩定的細胞來源遂成為一重要課題。靈長類試驗動物雖與人類基因背景最為接近，然其於實驗室中繁殖不易且維持成本高；豬隻於生理解剖特性如臟器大小近似於人類，數量眾多且繁殖相對容易，故為一合適之候選細胞來源，惟異種移植可能發生免疫排斥反應將導致治療效果不彰，因此需於臨床應用前進一步深入研究以評估其可行性。

從免疫學之角度而言，由於羊水幹細胞 (amniotic fluid stem cells, AFSCs) 表現第一型主要組織相容性複合體 (major histocompatibility complex class I, MHC-I)，但不表現第二型主要組織相容性複合體 (major histocompatibility complex class II, MHC-II) 及輔助刺激因子 (costimulatory molecules)，因此理論上在異體移植時不會發生宿主免疫抑制 (immunosuppression) 之現象；另有文獻指出，經 CD117 表面分子標誌篩選後之 AFSCs 具有調節免疫反應之作用 (Moorefield *et al.*, 2011)。故本試驗使用豬隻來源之羊水幹細胞 (porcine amniotic fluid stem cells, pAFSCs) 進行異種移植至巴金森氏症模式大鼠腦中，盼能藉此瞭解 AFSCs 應用於異種移植治療巴金森氏症之可行性。

第三章 試驗研究



3.1 紅色螢光豬羊水幹細胞體外誘導分化為類多巴胺神經之研究

3.1.1 前言

幹細胞除了具自我更新的特性之外，還具有轉分化為其他胚層細胞之能力。研究指出，包括胚幹細胞、誘導式多能性幹細胞、骨髓間葉幹細胞、臍帶血間葉幹細胞、牙髓幹細胞及羊水幹細胞等不同來源的幹細胞，皆能在特定培養條件下分化成類多巴胺神經 (Barzilay *et al.*, 2008; Ko *et al.*, 2015; Konagaya *et al.*, 2015; Perrier *et al.*, 2004; Pfeiffer *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010)。

過去研究指出，音蝟因子 (sonic hedgehog, SHH) 可促使腹側前腦神經元 (ventral forebrain neurons) 之分化 (Ericson *et al.*, 1995)，且可於體外或體內環境調控神經前驅細胞 (neural progenitors) 的增殖，於神經系統的發育中扮演重要之角色 (Lai *et al.*, 2003)。另有研究顯示，第八纖維母細胞生長因子 (fibroblast growth factor 8, FGF8) 於中腦多巴胺神經元之發育與分化過程中為一關鍵因子 (Hynes and Rosenthal *et al.*, 1999; Mason, 2007; Ye *et al.*, 1998)。而鹼性成纖維細胞生長因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 可促進中腦神經元 (mesencephalic neurons) 的存活與發育 (Ferrari *et al.*, 1988)，並增加中腦多巴胺神經元對多巴胺之重吸收 (reuptake) (Knusel *et al.*, 1990)。另腦源性神經滋養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 被發現廣泛分布於紋狀體中的神經終端 (nerve terminals) (Altar *et al.*, 1997)，除了可促進多巴胺神經元之存活及分化 (Knusel *et al.*, 1991)，更可於體外培養環境下刺激由間葉幹細胞所誘導分化出之多巴胺前驅神經進一步成熟為具功能性的成熟多巴胺神經 (Trzaska *et al.*, 2009)。故本試驗使用 SHH、FGF8、bFGF 和 BDNF 等生長因子之添加進行體外多巴胺神經之誘導分化，以探討紅色螢光豬來源之羊水幹細胞是否有分化成為類多巴胺神經之潛能。



3.1.2 材料與方法

3.1.2.1 試驗動物飼養環境及條件

試驗豬隻飼養於本系專用畜舍內，每日六時與十七時飼予完全配合飼料（統一），並且全天候給予乾淨自由飲水。每日五時與十六時固定清潔畜舍，並以大型風扇維持畜舍良好之通風；另於畜舍出入口放置消毒踏墊，進出人員均需著整齊實驗裝備，以確保畜舍之環境衛生。

3.1.2.2 紅色螢光豬羊水幹細胞來源

本試驗所使用之紅色螢光蛋白質轉基因豬 (DsRed transgenic pigs) 乃由本研究室利用原核胚基因顯微注射技術 (pronuclear microinjection)，於原核時期之豬胚中注射入帶有雞 β -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，而後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，其腦、心臟、肺臟、肝臟、腎臟、腸道及肌肉等全身組織器官皆穩定表現紅色螢光蛋白質 (Chou *et al.*, 2014)。

紅色螢光蛋白質轉基因豬之羊水幹細胞已由本研究室前人成功分離及建立 (Chou *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2014)，簡述其流程如下，將懷孕期 70 天之母豬麻醉後經由外科手術剖開腹腔並自子宮角中抽取表現紅色螢光蛋白質胎豬羊水，羊水經過濾及離心後，取得細胞沉澱物 (cell pellet) 並以 2×10^5 cells/cm² 之密度進行培養。此羊水幹細胞具形成群落單元 (colony) 及貼附 (adherent) 特性，約經過 8~10 天的初代培養及繼代後，即可得純化之紅色螢光豬羊水幹細胞。後續經流式細胞儀 (flowcytometry) 分析其表面抗原，紅色螢光豬羊水幹細胞不表現淋巴球特有標誌 CD4a 及血小板和內皮細胞標誌的 CD31，但會表現與細胞貼附相關的標誌 CD44 和間葉幹細胞特有標誌 CD90；另於體外誘導分化實驗中證實紅色螢光豬羊水幹細胞具有分化成硬骨、軟骨及脂肪細胞之三系分化 (trilineage differentiation) 的能力，

且分化後仍會持續表現紅色螢光，可利於移植後之後續追蹤。上述方法建立之紅色螢光豬羊水幹細胞保存於液態氮桶中，待試驗需要時再解凍及重新培養以進行後續使用。



3.1.2.3 紅色螢光豬羊水幹細胞培養液之配置

本試驗中培養紅色螢光豬羊水幹細胞之基礎培養液為 α MEM (Sigma M0894, USA)，並且添加 1% 抗生素 (Pen/Strep; Gibco 1103911, USA) 以及 3.7 g/L 碳酸氫鈉 (sodium bicarbonate, NaHCO_3 ; Sigma S5761, USA)，配置完成後以孔徑 0.22 μm 之濾杯 (Millipore MP010543, USA) 進行過濾，以確保培養液為無菌狀態；另須於使用前添加 20% 的胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS; Hyclone ARH27209, USA) 於基礎培養液中，並保存於 4°C 冰箱，待使用前再於水浴槽回溫至 37°C 備用。

3.1.2.4 紅色螢光豬羊水幹細胞之體外培養及保存

羊水幹細胞具有貼附特性，當細胞培養增殖至滿盤 (100% confluence) 時需繼代 (passage) 或將其冷凍保存。細胞進行繼代時，先以玻璃吸管吸除培養液後，加入 0.25% trypsin-EDTA (Gibco 917999, USA)，並置於 37°C 培養箱 5 分鐘，待化學反應完全後，輕敲培養皿盤緣利用物理性力量使細胞懸浮，再加入等量之基礎培養液以中止 trypsin 持續作用而傷害細胞。續以 1200 rpm 離心 5 分鐘，移除上清液後以含有 20% 胎牛血清之培養液將細胞重新打散懸浮，並以稀釋比例為 1:3 種於新培養皿中。若欲冷凍保存細胞，則可將離心後之細胞團塊懸浮於含 10% 二甲亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO; Sigma RNBC1435, USA) 之胎牛血清中，放至細胞冷凍保存管並置於保麗龍盒中於 -80°C 冰箱中緩慢降溫，待 24~48 小時後始可移入液態氮桶內保存。



3.1.2.5 細胞計數

自均勻懸浮之細胞液中吸取 20 μl 之細胞液，與等量之錐藍 (trypan blue; Gibco 15250-061, USA) 混和均勻使之染色，而後取 20 μl 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，由於死亡之細胞會因 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，因此可計算未呈色之細胞數再經由稀釋倍率換算後得知約略細胞總數。

3.1.2.6 紅色螢光豬羊水幹細胞體外誘導分化為類多巴胺神經及其培養液之配置

本試驗之基礎培養液為 DMEM (Gibco 31600-034, USA)，內含 1% 抗生素及 3.7 g/L 碳酸氫鈉，配置完成後以孔徑 0.22 μm 之濾杯過濾，並保存於 4°C 冰箱備用。誘導分化試驗分為兩階段，第一階段之誘導分化培養液為 10% FBS DMEM 並額外添加 250 ng/ml SHH (R&D systems, 461-SH)、100 ng/ml FGF8 (R&D systems, 423-F8) 及 50 ng/ml bFGF (R&D systems, 233-FB)；第二階段誘導分化培養液則以在培養神經細胞過程中經常會使用的神經基礎培養液 (Neurobasal® Medium (1X); Gibco 21103-049, USA) 與 B-27 添加劑 (B-27® Serum-Free Supplement (50X); Gibco 17504-044, USA) 為基底，再額外添加 250 ng/ml SHH、100 ng/ml FGF8、50 ng/ml bFGF 及 50 ng/ml BDNF (R&D systems, 248-BD/CF)。

由液態氮桶中取出先前建立好之紅色螢光豬羊水幹細胞，解凍後以 5×10^4 cells/cm² 之密度重新種於細胞培養皿，待其長滿後以 0.25% trypsin-EDTA 重新懸浮細胞，離心後之細胞團塊再以每 2×10^3 cells/ 30 μl 20% FBS DMEM 的濃度混合均勻，並取 30 μl 此細胞液滴於細胞培養皿之上蓋為一顆細胞懸滴 (hanging drop)，每顆 drop 間之距離約為 2 公分以避免因間隙過近而讓多顆 drop 溶在一起，另於細胞培養皿內加入約 5~8 ml 內用之無菌 PBS，可避免細胞懸滴在培養箱培養期間乾

掉導致其中細胞死亡，而後將載有多顆細胞懸滴之培養皿上蓋快速翻過重新蓋回細胞培養皿，再置於細胞培養箱中。4 天之後，紅色螢光豬羊水幹細胞已藉由此懸滴培養方式 (hanging-drop culture method) 形成細胞懸浮球體 (cell spheres)，再利用 pipette 搭配寬口 tip 將這些 cell spheres 移至表面有特殊處理過之玻片 (Superfrost™ Plus Microscope Slides; Fisherbrand™ 12-550-15, USA) 上並加入第一階段誘導分化培養液開始進行類多巴胺神經之誘導分化，培養 3 天後換入第二階段誘導分化培養液續培養 9 天，期間每 3 天更換一次培養液，並使用顯微鏡觀察細胞外觀形態 (cell morphology) 之變化同時照相記錄 (圖 5)。

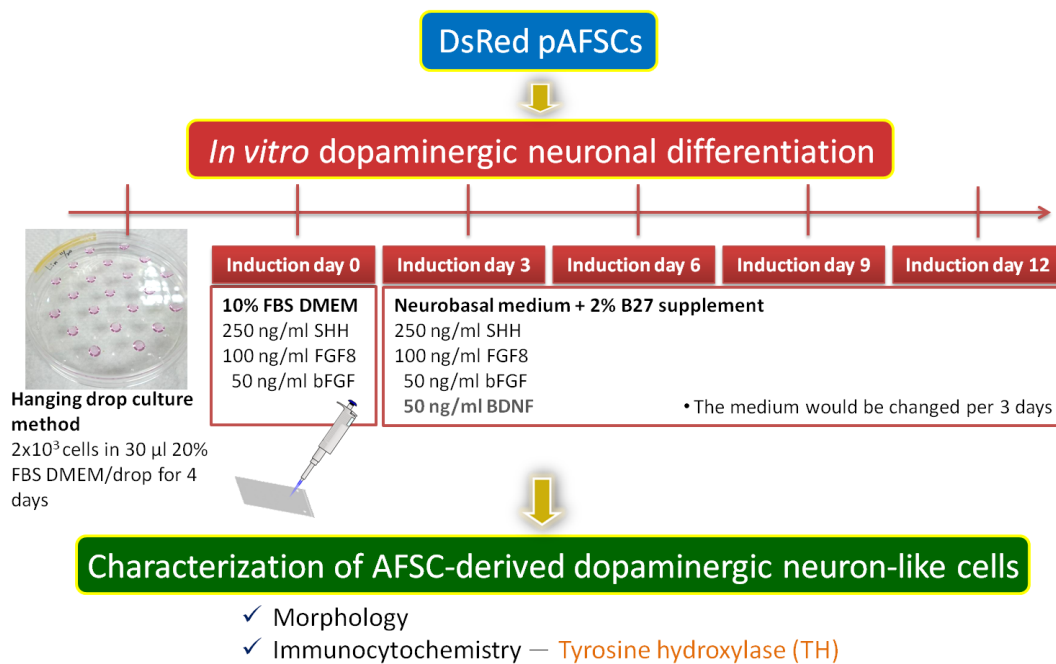
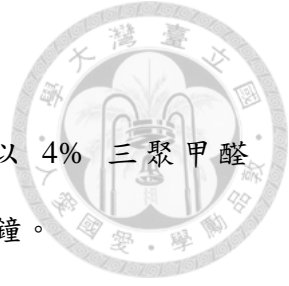


圖 5. 紅色螢光豬羊水幹細胞誘導分化為類多巴胺神經之培養液配方與流程圖。

Figure 5. *In vitro* dopaminergic neuronal differentiation medium formula and steps of DsRed porcine amniotic fluid stem cells.



3.1.2.7 細胞免疫螢光染色 (Immunocytochemistry)

- (1) 移除細胞培養液後，先以 PBS (1X) 潤洗一次，再以 4% 三聚甲醛 (paraformaldehyde; Sigma P6148, USA) 於室溫下固定 15 分鐘。
- (2) 去除 paraformaldehyde，以 PBS 潤洗三次，每次須靜置 5 分鐘。
- (3) 加入 blocking buffer – 0.25% Triton X-100/PBS 及 1% BSA/PBST (bovine serum albumin; Sigma A7030, USA) 作用 30 分鐘，用以通透細胞膜並避免抗體非專一性的結合。
- (4) 將一級抗體 (mouse anti- β -III tubulin, Abcam AB7751, UK; rabbit anti-tyrosine hydroxylase, Millipore AB152, Germany) 以稀釋倍率為 1 : 500 倍稀釋於 blocking buffer 中。
- (5) 加入稀釋後之一級抗體，靜置於 4°C 反應隔夜。只添加二級抗體 (2nd antibody only) 的組別，添加液中將不含一級抗體。
- (6) 將二級抗體 (donkey-anti-mouse IgG, alexa flour® 488, Invitrogen A21202, USA; goat-anti-rabbit IgG, alexa flour® 488, Invitrogen A11008, USA) 以稀釋倍率為 1 : 300 倍稀釋於 blocking buffer 中。
- (7) 移除一級抗體後，以 PBS 潤洗一次，加入稀釋後之二級抗體，於室溫下避光靜置 1 小時。
- (8) 移除二級抗體後，以 PBS 潤洗三次，每次須靜置 5 分鐘，而後加入以 PBS 稀釋 1000 倍之 DAPI (Invitrogen D3571, USA)，於室溫下避光靜置 1 分鐘。
- (9) 移除 DAPI 後以 PBS 潤洗一次，再使用封片膠 (mounting medium; Abcam AB104135, UK) 封片後，即可於光學顯微鏡下觀察細胞是否表現螢光受質反應。



3.1.3 結果與討論

3.1.3.1 紅色螢光豬羊水幹細胞經懸滴培養方式培養後所形成之細胞懸浮球體形態之觀察

過去研究指出，胚幹細胞為一具分化多能性 (pluripotent) 的幹細胞，其在體外培養過程中一旦脫離飼養層細胞 (feeder layer) 且培養基中無添加白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 等抑制分化因子的情況下，胚幹細胞將會自發性走向分化路徑並形成一特殊結構—類胚體 (embryoid bodies, EBs)，此三維 (three dimensional, 3D) 的立體球狀結構中會有三個胚層—外胚層 (ectoderm)、中胚層 (mesoderm) 及內胚層 (endoderm) 的細胞，是許多進行胚幹細胞體外誘導分化試驗中經常會出現的分化手法與過程。本試驗首先將紅色螢光豬羊水幹細胞進行懸滴培養 (hanging-drop culture)，目的即在使紅色螢光豬羊水幹細胞形成類似於 EBs 結構的細胞懸浮球體 (cell spheres, CSs)，並能自發性往三胚層初步分化，而後再使用培養神經細胞常用的神經基礎培養液為基底，使 CSs 中的外胚層神經系細胞可以存活下來，並藉由特定生長因子 (growth factors) 之添加進一步誘導分化出類多巴胺神經。

紅色螢光豬羊水幹細胞藉由懸滴培養方式培養 4 天之後，已形成細胞懸浮球體 (圖 6A、B)，再利用 pipette 搭配寬口 tip 將這些 CSs 移至 Superfrost™ Plus Microscope Slides 並加入第一階段之誘導分化培養液以進行後續體外誘導分化試驗。紅色螢光豬羊水幹細胞的 CSs 於移至玻片後隔天，可於光學顯微鏡下觀察到 CSs 會貼附於玻片表面，並形成一個細胞群落 (colony) (圖 6C、D)。

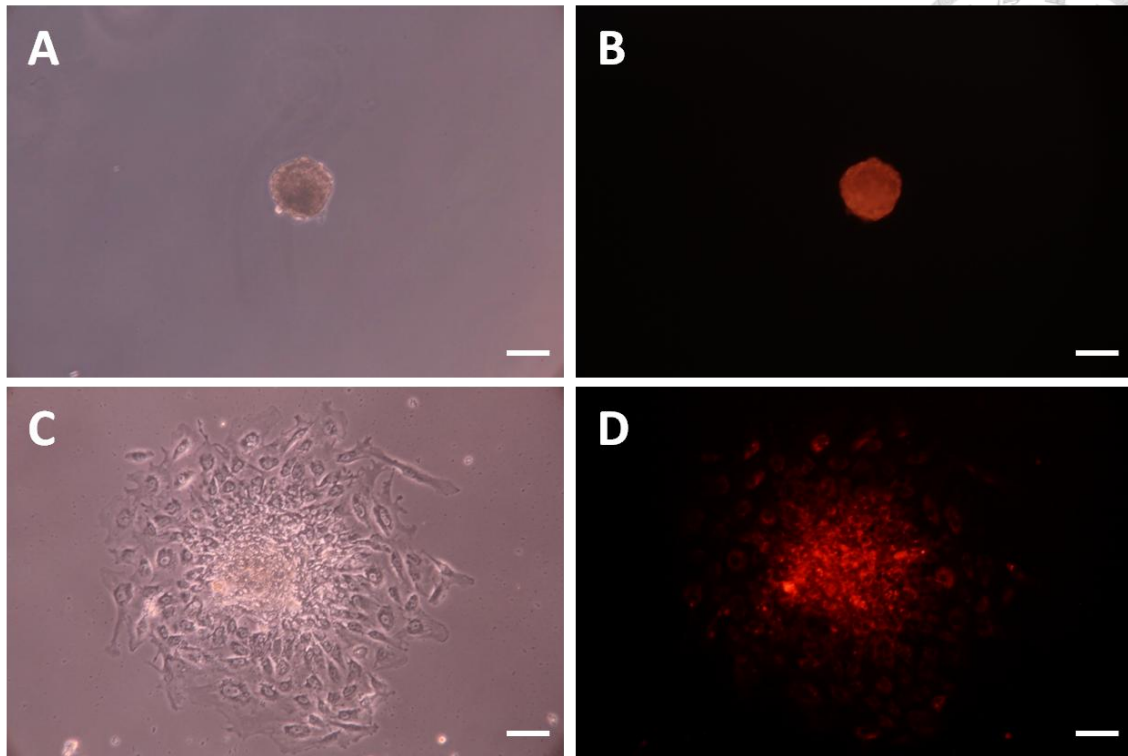


圖 6. 紅色螢光豬羊水幹細胞聚集而成之細胞懸浮球體及其貼底後所形成之細胞群落形態。(比例尺為 100 微米)

Figure 6. DsRed pAFSC cell spheres and the colonies formed by the spheres. (scale bar = 100 μ m)

3.1.3.2 紅色螢光豬羊水幹細胞體外誘導分化為類多巴胺神經之形態學評估

本試驗使用紅色螢光豬羊水幹細胞藉由懸滴培養方式所形成之細胞懸浮球體，加入含音蝟因子 (sonic hedgehog, SHH)、第八纖維母細胞生長因子 (fibroblast growth factor 8, FGF8)、鹼性成纖維細胞生長因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 與腦源性神經滋養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 等生長因子之誘導分化培養液，於表面經特殊處理的玻片上進行類多巴胺神經之體外誘導分化。於分化期間藉由顯微鏡觀察細胞分化之外觀形態，首先使用第一階段誘導分化培養液，在分化第 3 天時，可見細胞懸浮球體所形成之細胞群落 (cell colonies, CCs) 逐漸由群落中心向外擴張，此時換入第二階段誘導分化培養液；至分化第 6 天時，可發現無論在控制組或誘導分化組的 CCs 之間及週邊有少許類似神經細胞的細長細胞形態出現；接著至分化第 9 天時，CCs 外圍有更加明顯之細長且似軸突突起之細胞形態；直至分化第 12 天時，此細長的細胞形態比例有增加之趨勢，且排列也更為延伸，而在誘導分化組的細長細胞形態有部分在兩端具有少許細小的分支，此結果相較於控制組只有單一細長的排列有所差異 (圖 7)。然此些具細長外觀形態之細胞是否為類神經細胞甚至是類多巴胺神經，尚需進一步檢測這些細胞能否表現神經系相關的特異性蛋白質後，才能再次確認試驗結果。

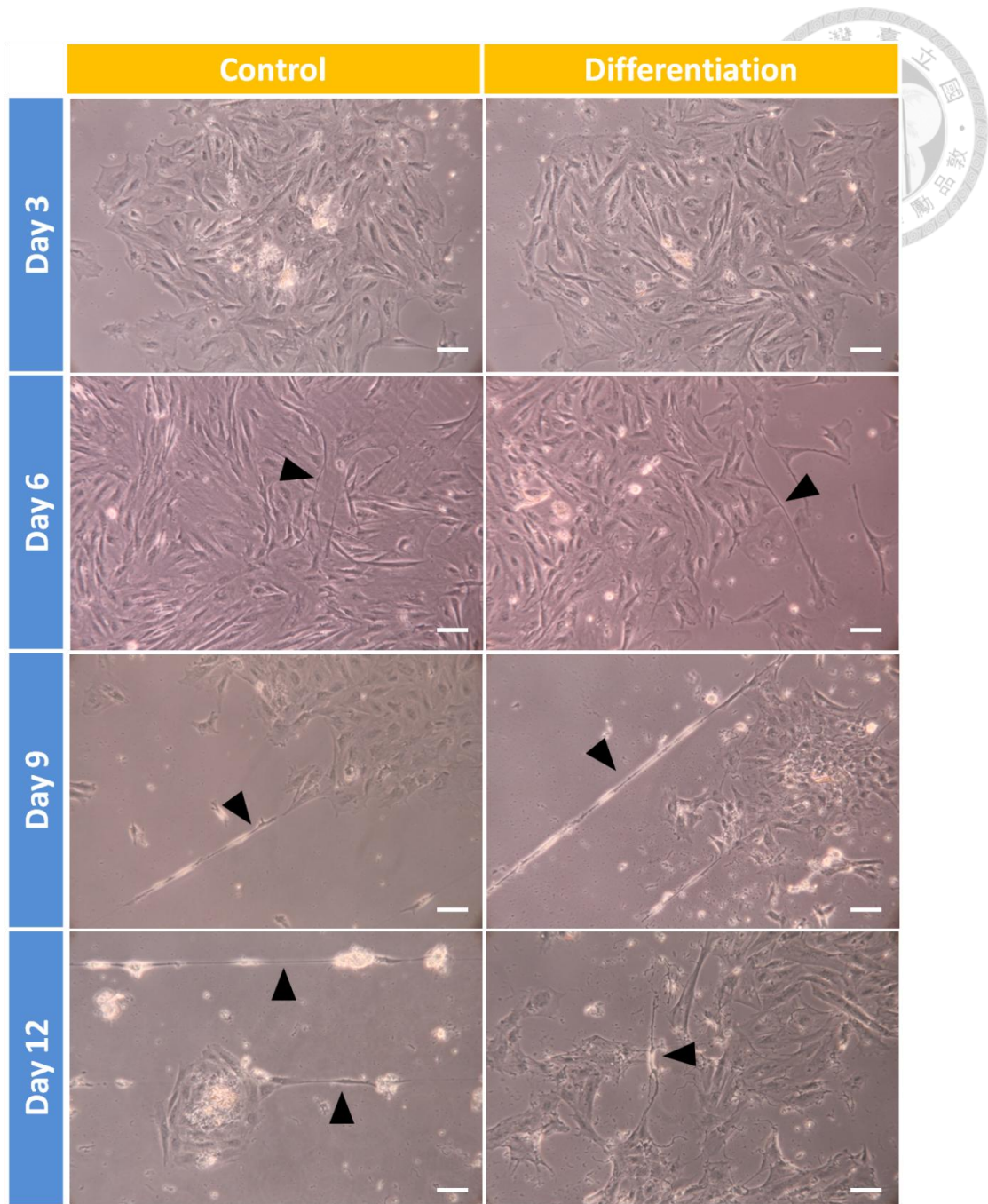


圖 7. 紅色螢光豬羊水幹細胞於體外誘導分化為類多巴胺神經期間與控制組之細胞形態學上之比較。箭號為類似神經細胞之細長、似軸突突起之細胞形態。(比例尺為 100 微米)

Figure 7. Cell morphological comparison of dopaminergic neuronal differentiation group and control group by using DsRed pAFSCs *in vitro*. The arrows indicate the morphology of neural-like cells with thin and long axon-like processes. (scale bar = 100 μm)

3.1.3.3 紅色螢光豬羊水幹細胞體外誘導分化為類多巴胺神經之神經系 相關特異性蛋白質之表現

本試驗使用紅色螢光豬羊水幹細胞，進行二階段式添加生長因子之體外類多巴胺神經誘導分化，於分化期間除了觀察細胞外觀形態上的變化，也藉由細胞免疫螢光染色法偵測分化細胞是否會表現神經系相關的特異性蛋白質。在許多研究中，經常使用 β -III 微管蛋白 (β -III tubulin) 作為神經細胞的特異性標誌，另使用酪胺酸羥化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 作為多巴胺神經元特定分泌與表現的蛋白質，以此標誌確認是否為多巴胺神經。經細胞免疫螢光染色之試驗結果顯示，在誘導分化第 9 天時，控制組和誘導分化組皆會表現 β -III tubulin，且在只有二級抗體反應的對照組中沒有偵測到表現 β -III tubulin 的細胞，表示此時已有部分紅色螢光豬羊水幹細胞分化成為類神經細胞 (圖 8)。直至誘導分化第 12 天時，可在誘導分化組中發現表現 TH 的細胞 (圖 9)，而在控制組與只有二級抗體反應的對照組中則無此發現，顯示紅色螢光豬羊水幹細胞已成功被誘導分化成為類多巴胺神經 (圖 10)。

因此根據上述試驗結果，藉由懸滴培養方式所得之紅色螢光豬羊水幹細胞的細胞懸浮球體，可以自發地分化成類神經細胞；而額外添加在培養液中 SHH、FGF8、bFGF 和 BDNF 等特定生長因子可誘導紅色螢光豬羊水幹細胞進一步分化為類多巴胺神經。綜合上述，證實在體外環境下給予適當的培養條件，紅色螢光豬羊水幹細胞具有分化成為類多巴胺神經之潛能，可作為後續應用於異種移植治療大鼠巴金森氏症疾病模式之細胞來源。

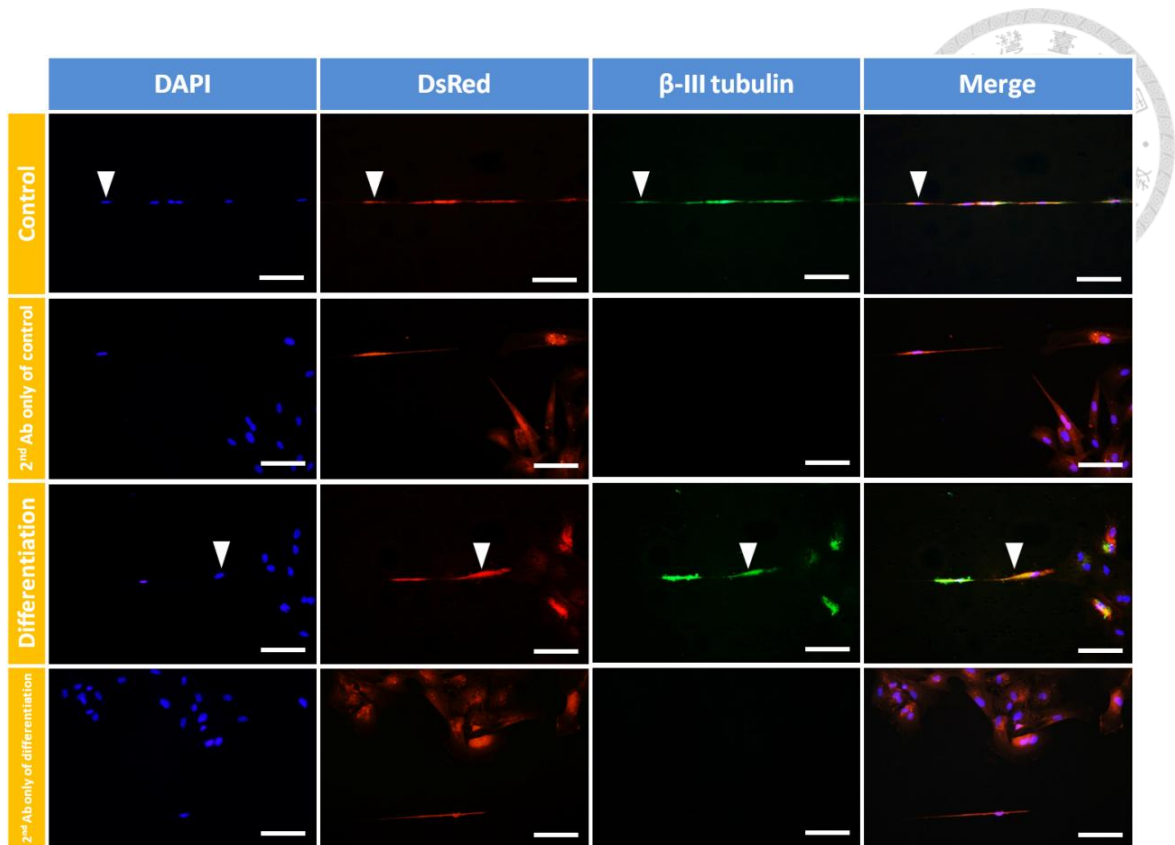


圖 8. 誘導分化第 9 天誘導分化組、控制組與第二抗體對照組之表現 β -III 微管蛋白的細胞免疫螢光染色結果比較。箭號為一顆由紅色螢光豬羊水幹細胞所誘導分化出之類神經細胞。(比例尺為 100 微米)

Figure 8. Comparison of β -III tubulin expression between the dopaminergic neuronal differentiation group, control group and 2nd antibody (Ab) only group by immunocytochemistry staining 9 days after induction. The arrows indicate one neuron-like cell differentiated from DsRed pAFSC. (scale bar = 100 μ m)

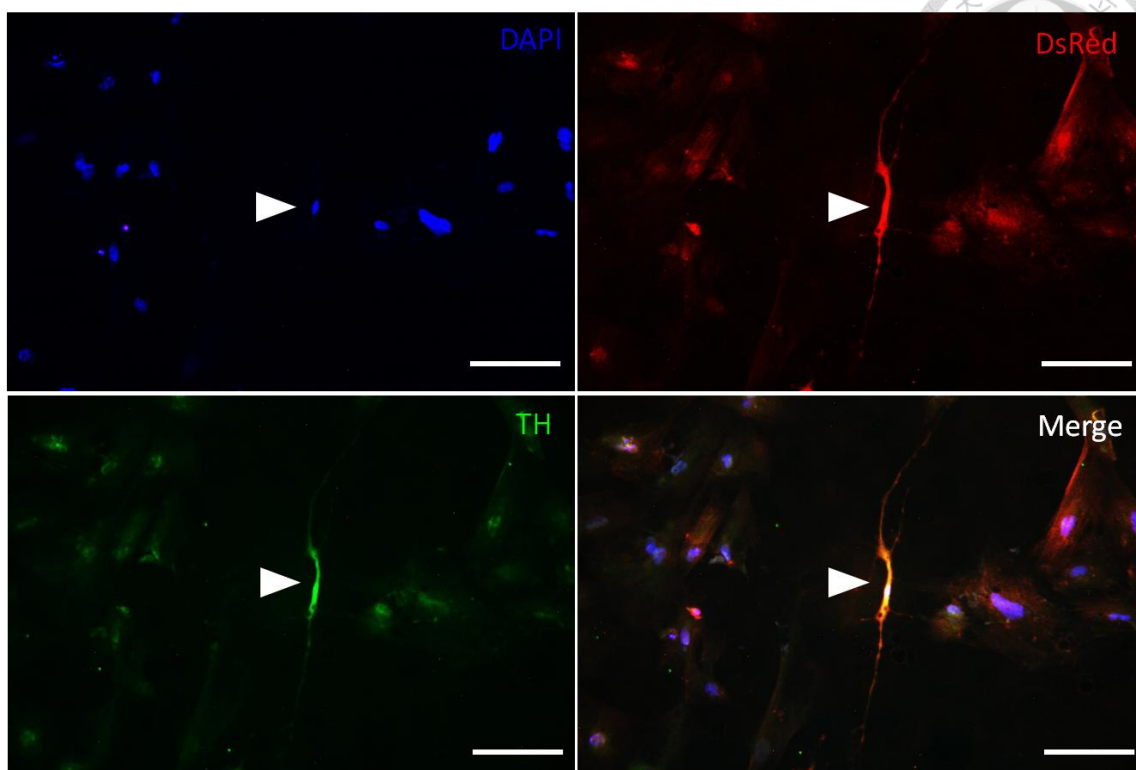


圖 9. 紅色螢光豬羊水幹細胞於體外經誘導分化為類多巴胺神經。

誘導分化第 12 天時，紅色螢光豬羊水幹細胞於螢光燈源及濾片下，利用 DAPI 確定細胞核之位置 (A)，而 DsRed pAFSCs 本身即帶有紅色螢光 (B)，另經由酪胺酸羥化酶 (TH) 的一級抗體與綠色螢光二級抗體反應後可偵測到 TH 之表現 (C)，(D) 為 (A)、(B)、(C) 之疊合圖。箭號為一顆由紅色螢光豬羊水幹細胞所誘導分化出之類多巴胺神經。(比例尺為 100 微米)

Figure 9. DsRed pAFSCs were capable of differentiating into dopaminergic neuron-like cells *in vitro* 12 days after induction.

(A) Nucleuses were labeled by DAPI. (B) Red fluorescent expression of DsRed pAFSCs. (C) The TH positive dopaminergic neuron-like cell was demonstrated by immunocytochemistry staining. (D) Indicate the merge image of (A), (B) and (C). The arrows indicate one dopaminergic neuron-like cell differentiated from DsRed pAFSC. (scale bar = 100 μm)

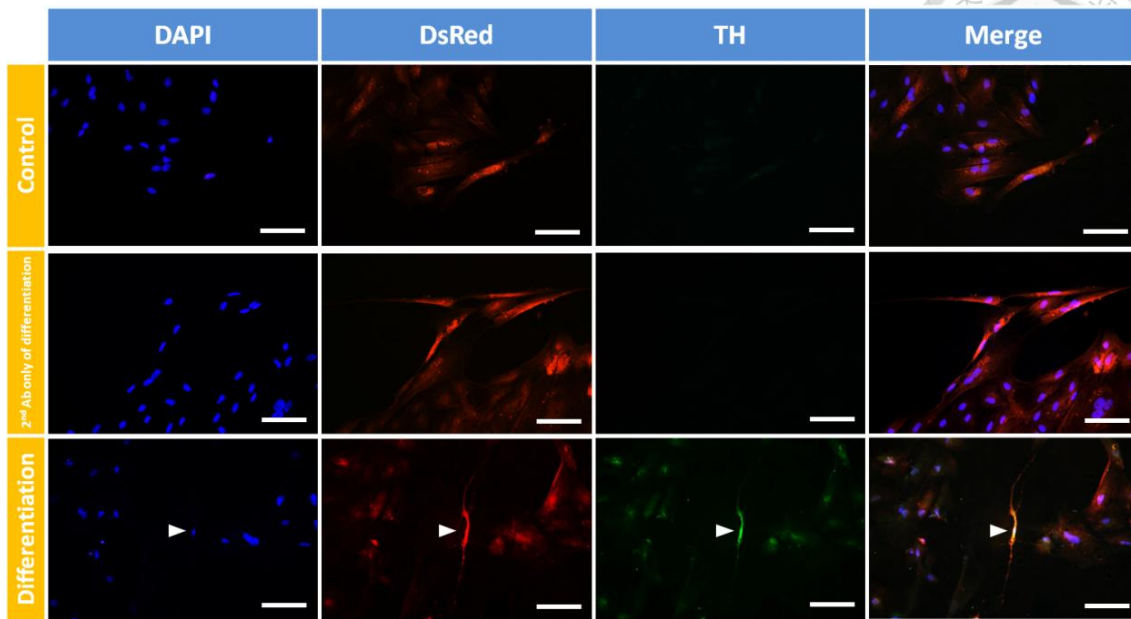


圖 10. 誘導分化第 12 天誘導分化組、控制組與第二抗體對照組之表現酪胺酸羥化酶的細胞免疫螢光染色結果比較。箭號為一顆由紅色螢光豬羊水幹細胞所誘導分化出之類多巴胺神經。(比例尺為 100 微米)

Figure 10. Comparison of tyrosine hydroxylase (TH) expression between the dopaminergic neuronal differentiation group, control group and 2nd antibody (Ab) only group by immunocytochemistry staining 12 days after induction. The arrows indicate one dopaminergic neuron-like cell differentiated from DsRed pAFSC. (scale bar = 100 μ m)



3.2 紅色螢光豬羊水幹細胞應用於異種移植治療巴金森氏症

大鼠之可行性

3.2.1 前言

巴金森氏症為一漸進性的神經退化性疾病，其病因乃由於患者中腦黑質中的多巴胺神經元 (dopaminergic neuron) 死亡，無法製造足夠的神經傳遞物質—多巴胺，導致神經傳導出現問題，造成患者產生一些動作障礙。目前臨床上使用藥物治療和手術治療雖可於發病初期緩解其症狀，然隨病程之延長其療效將弱化，終將無法阻止病症之惡化，且於治療過程中又伴隨許多嚴重之副作用，因此發展一有效的治療方式遂成為當前十分重要之研究課題。

幹細胞具有自我更新的特性與分化為多種組織細胞之能力，常應用於各種疾病損傷之修復，因此於再生醫學研究領域中，以幹細胞為主的細胞療法為當前最具有發展巴金森氏症新興療法之潛力。本試驗將以藥物誘導建立巴金森氏症大鼠疾病動物模式，再使用異種 (xenogenic) 豬來源之羊水幹細胞作為移植的材料，藉此探討羊水幹細胞應用於治療巴金森氏症之可行性。



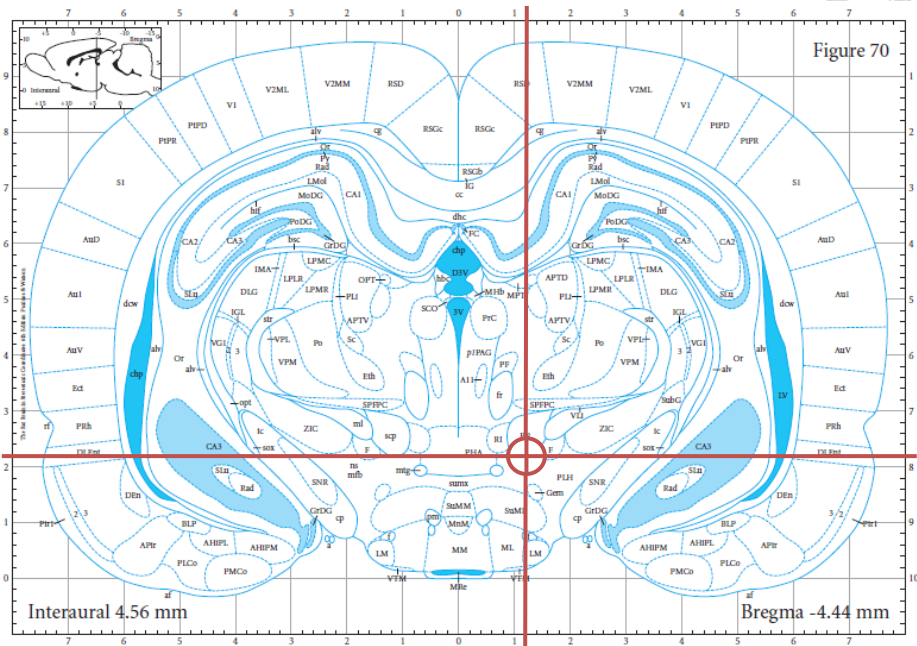
3.2.2 材料與方法

3.2.2.1 試驗動物來源及飼養條件

本試驗使用 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠，年齡約六至八週齡，體重約 250~300 公克，購自樂斯科生物科技股份有限公司 (BioLASCO Taiwan Co., Ltd., Taipei, Taiwan)，飼養於國防醫學院動物中心，動物舍控制恆溫為 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，每日上午七時至下午七時為固定光照週期，2~3 隻分裝一籠並給予無限制的標準飼糧與乾淨飲水，每週定期更換墊料及水瓶以維持飼養環境之整潔。試驗大鼠購入後皆需預先安置於動物舍中一週以上，待其適應環境後始得進行試驗。試驗動物各項操作程序皆符合實驗動物照護及使用委員會之各項規範。

3.2.2.2 巴金森氏症大鼠疾病動物模式之建立

本試驗採用單側損害方式建立巴金森氏症大鼠疾病動物模式。首先以 6% 水合氯醛 (chloral hydrate; Riedel-de Haën 15307, Germany) 腹腔注射將大鼠麻醉後，以電動剃毛刀剃除其頭頂毛髮並固定於立體定位儀 (stereotaxic apparatus) 上，取手術刀劃開顱頂正中處之皮膚並剝離骨膜使顱骨暴露。以十字縫 (bregma) 為參考原點，向後 4.4 毫米、向右 1.2 毫米、自腦膜 (dura) 向下 7.8 毫米為破壞處 (Strömberg *et al.*, 1989; Weng *et al.*, 2013) (圖 11)，以牙科鑽小心鑽開顱骨，再使用架置於立體定位儀上之微量注射器 (microsyringe) 將 4 μl 的六-羥基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA; 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 0.02% ascorbic acid; Sigma H4381, USA) 緩慢注射入大鼠右腦之內側前腦束 (medial forebrain bundle, MFB)，注射速率為 0.5 $\mu\text{l}/30$ sec，待注射完畢後靜置 3 分鐘使其穩定，再以 2 mm/20 sec 之速率抽出針頭 (圖 12)。隨後將大鼠頭部傷口縫合並置於保溫燈下，待其甦醒後即可送回動物舍。



(Paxinos and Watson, 2007)

圖 11. 6-OHDA 注射部位座標圖。(注射處：bregma 向後 4.4 毫米、中線向右 1.2 毫米、腦膜向下 7.8 毫米)

Figure 11. The coordinate graph of the lesion site. (4.4 mm posterior to bregma, 1.2 mm lateral to the midline, and 7.8 mm below the dura)

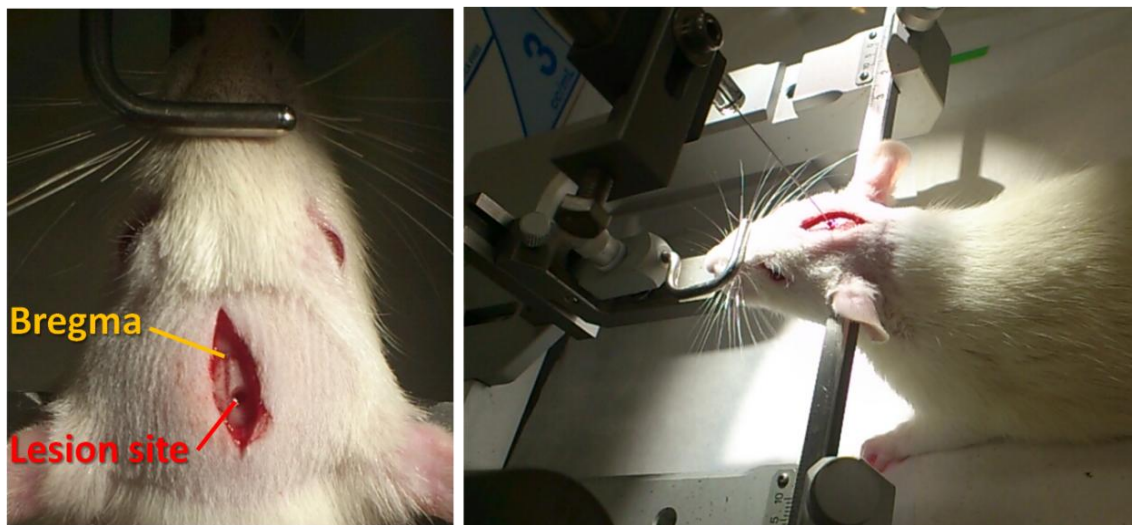


圖 12. 以立體定位儀標定注射 6-OHDA 之示意圖。

Figure 12. Injection of 6-OHDA by stereotaxic apparatus.



3.2.2.3 阿樸嗎啡誘發之旋轉行為

以6-OHDA破壞大鼠單側黑質紋狀體徑路 (nigrostriatal pathway) 兩週後，於腹腔注射 0.5 mg/kg 的阿樸嗎啡 (apomorphine; Sigma A4393, USA)，隨後以束帶固定大鼠胸部並連接旋轉記錄器，利用自動旋轉行為記錄系統 (automated rotometer system; MED Associates, Inc., St. Albans, VT, USA) 記錄大鼠的旋轉圈數 (圖 13)。總測試時間為60分鐘，其中以連續40分鐘、平均每分鐘大於4轉之大鼠即判定為單側巴金森氏症大鼠模式 (Herrera-Marschitz and Ungerstedt, 1984; Lessner *et al.*, 2010)。

3.2.2.4 紅色螢光豬羊水幹細胞來源

紅色螢光豬羊水幹細胞來源如試驗一所述。

3.2.2.5 細胞移植手術分組及流程

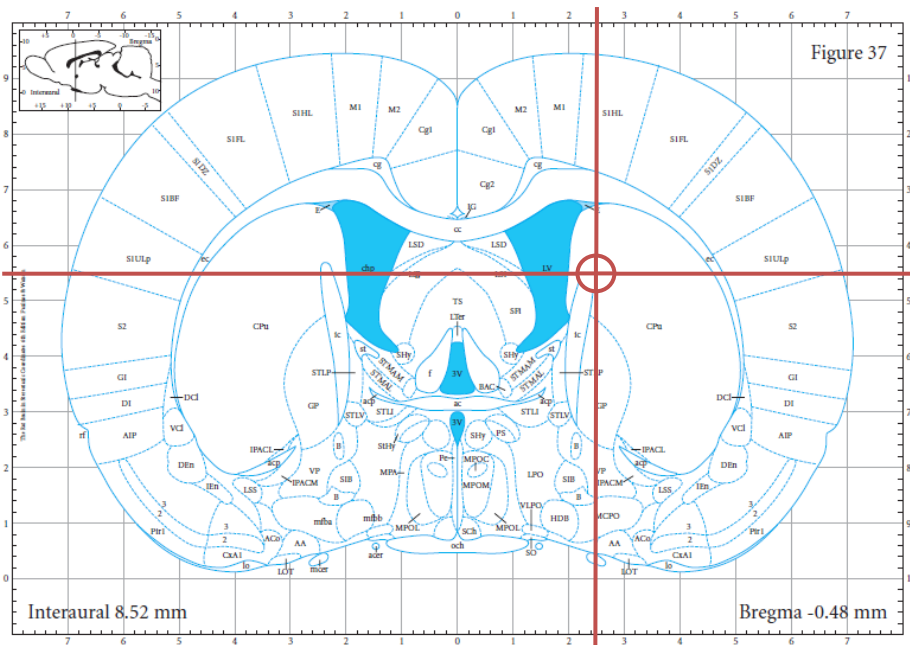
本試驗使用六至八週齡、體重約 250~300 公克之 SD 大鼠，以 6-OHDA 破壞大鼠單側黑質紋狀體徑路後，經阿樸嗎啡誘發之旋轉行為篩選出巴金森氏症模式大鼠，並隨機分為：(1) 巴金森氏症模式大鼠控制組 (PD rat control group, n = 3)、(2) 接受磷酸鹽緩衝液 (PBS) 注射之對照組 (Sham grafted group, n = 3)、(3) 接受紅色螢光豬羊水幹細胞移植組 (DsRed pAFSCs transplantation group, n = 6)。

細胞移植手術流程基本如前述之 6-OHDA lesion 手術，惟移植處為大鼠之紋狀體 (striatum)，其立體定位座標乃以十字縫 (bregma) 為參考原點，向後 0.5 毫米、向右 2.5 毫米、自腦膜 (dura) 向下 4.5 毫米 (Weng *et al.*, 2013) (圖 14)。欲移植之細胞懸浮於 PBS 中，移植之細胞量為 $3 \sim 4 \times 10^5$ cells in 4 μ l PBS (圖 15)。移植細胞後兩週及四週時，皆進行阿樸嗎啡誘發之旋轉行為測試以評估治療效果 (圖 16)。



圖 13. 以自動旋轉行為記錄系統記錄大鼠的旋轉行為圈數之示意圖。

Figure 13. Recording apomorphine-induced rotational behavior turns by automated rotometer system.



(Paxinos and Watson, 2007)

圖 14. 細胞移植部位座標圖。(注射處:bregma 向後 0.5 毫米、中線向右 2.5 毫米、腦膜向下 4.5 毫米)

Figure 14. The coordinate graph of the transplantation site. (0.5 mm posterior to bregma, 2.5 mm lateral to the midline, and 4.5 mm below the dura)

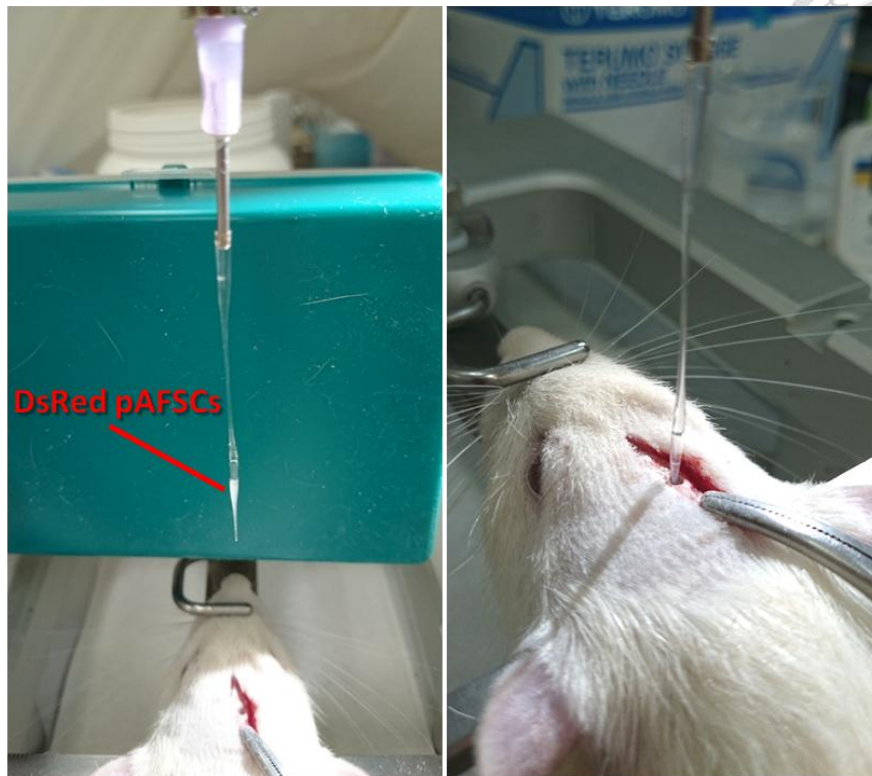


圖 15. 以立體定位儀進行細胞移植手術之示意圖。

Figure 15. Transplantation of DsRed pAFSCs by stereotaxic apparatus.

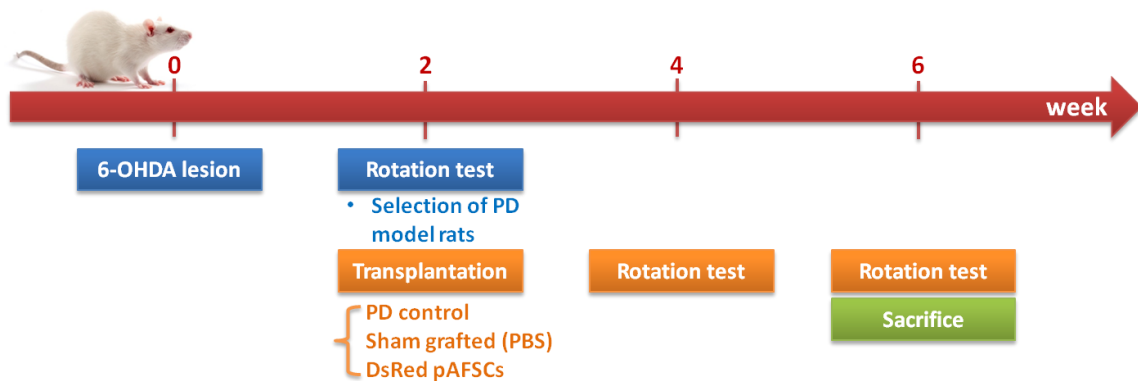


圖 16. 巴金森氏症大鼠疾病動物模式建立及細胞移植之流程圖。

Figure 16. Flow chart of establishment of Parkinsonian rat model and cell transplantation.




3.2.2.6 免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry)

以 6% 水合氯醛 (chloral hydrate; 8 ml/kg) 腹腔注射將大鼠麻醉後置於灌流台上，用鑷子夾起劍突並向左右兩側剪開皮膚與肌肉層，接著把橫膈膜剪開使心臟露出，將灌流針頭插入左心室 (需避免刺穿) 並以蠕動幫浦將 0.9% 的生理食鹽水經左心室始進行灌流，同時需剪開右心耳讓血液流出。灌流約與體重相當容積的生理食鹽水，遂將灌流溶液更換為新鮮配置之 4% PFA (pH 7.2-7.4)，續灌流至大鼠全身變硬 (約 400 ml) 即可。灌流完成後，將大鼠腦組織取出置於 4% PFA 於 4°C 浸泡固定隔夜，再換以 20% 蔗糖 (sucrose) 溶液進行脫水，待腦組織完全沉降後置換成 30% 蔗糖溶液進行第二次脫水，待腦組織再次沉降後即可進行冷凍切片。

經過脫水之腦組織以冷凍包埋劑 (optimum cutting temperature, OCT; Sakura Finetek 4583, USA) 完全包埋後，使用冷凍切片機 (Leica CM1860 UV, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany) 於 -24°C 以 30 μm 的厚度進行冠狀切片，並選取 nigrostriatal pathway 以懸浮法 (free floating) 進行免疫組織化學染色。染色步驟如下：

- (1) 腦組織切片置於 24 well dish 中，先以 PBS (1X) 潤洗三次，再以 0.1% 雙氧水 (hydrogen peroxide, H_2O_2 ; Calbiochem 386790, Germany) 於室溫下反應 30 分鐘以上，以去除腦組織中之內生性過氧化酶 (peroxidase)。
- (2) 去除 0.1% H_2O_2 ，以 PBS 潤洗三次。
- (3) 加入 blocking buffer—0.5% Triton X-100/PBS 及 1% 山羊血清 (normal goat serum; Vector S-1000, USA) 作用 1 小時，用以通透細胞膜並阻斷非專一性的抗體結合。
- (4) 將一級抗體 (rabbit anti-tyrosine hydroxylase; Millipore AB152, Germany) 以稀釋倍率為 1 : 2000 倍稀釋於 blocking buffer 中。
- (5) 加入稀釋後之一級抗體，置於 4°C 震盪反應隔夜。

- 
- (6) 將二級抗體 (biotinylated anti-rabbit IgG; Vector BA-1000, USA) 以稀釋倍率為 1 : 200 倍稀釋於 blocking buffer 中。
 - (7) 移除一級抗體後，以 PBS 潤洗三次，加入稀釋後之二級抗體，於室溫下震盪反應 1 小時。
 - (8) 在二級抗體反應完成前 30 分鐘，需預先配置 ABC kit (avidin-biotin complex, ABC; Vector PK-6100, USA)，將配置好的 ABC kit 於室溫下震盪反應 30 分鐘。
 - (9) 移除二級抗體後，以 PBS 潤洗三次，再加入 ABC kit，於室溫下震盪反應 1 小時。
 - (10) 移除 ABC kit 後，以 0.05% 二氨基聯苯胺 (diaminobenzidine, DAB; Sigma D5637, USA) 進行呈色反應 5 分鐘。
 - (11) 移除 DAB 後，以 PBS 潤洗三次，將已呈色之切片撈至玻片上攤平，待乾燥後再使用 mounting medium 封片，即可於光學顯微鏡下觀察。

3.2.2.7 神經纖維密度定量

將免疫組織染色完成後之切片以 10X 照相後，利用光學軟體 (Image-Pro® Plus Version 6.0; Media Cybernetics, Inc., USA) 進行神經纖維密度之定量。取紋狀體之切片，每間隔約 360 μm 取一片，共選取六片，圈選腦切片兩側的紋狀體區域計算數值，以胼胝體 (corpus callosum) 作為背景值，將正常側定為 100% 並計算移植後受損側表現的多巴胺神經纖維密度。

3.2.2.8 統計分析

本試驗之數據使用 GraphPad Prism 軟體進行分析，以 ANOVA 及 Tukey's multiple comparisons test 統計法將實驗組及對照組加以比較並以平均值 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) 方式表示，當 $p < 0.05$ 時定義兩者具顯著差異。



3.2.3 結果與討論

3.2.3.1 巴金森氏症模式大鼠之黑質紋狀體徑路中多巴胺神經之表現情形

本試驗以單側損害方式建立巴金森氏症大鼠疾病動物模式，使用 6-OHDA 破壞大鼠右側黑質紋狀體徑路 (nigrostriatal pathway) 兩週後，利用自動旋轉行為記錄系統記錄由阿樸嗎啡 (apomorphine) 誘發之對側旋轉圈數，總測試時間為 60 分鐘，其中以連續 40 分鐘、平均每分鐘大於 4 轉之大鼠即判定為巴金森氏症模式大鼠。

經灌流犧牲後以免疫組織化學染色觀察大鼠腦中的多巴胺神經分布情形，透過酪胺酸羥化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 作為多巴胺神經元之專一性標記，6-OHDA lesioned 組與只接受 0.02% ascorbic acid 注射之 sham lesioned 對照組相比，確實在破壞側的 nigrostriatal pathway 有明顯的多巴胺神經元缺失 (圖 17)，證實以 6-OHDA 單側損害方式之巴金森氏症大鼠疾病動物模式已成功建立，可進一步應用於後續細胞移植之治療效果探討。

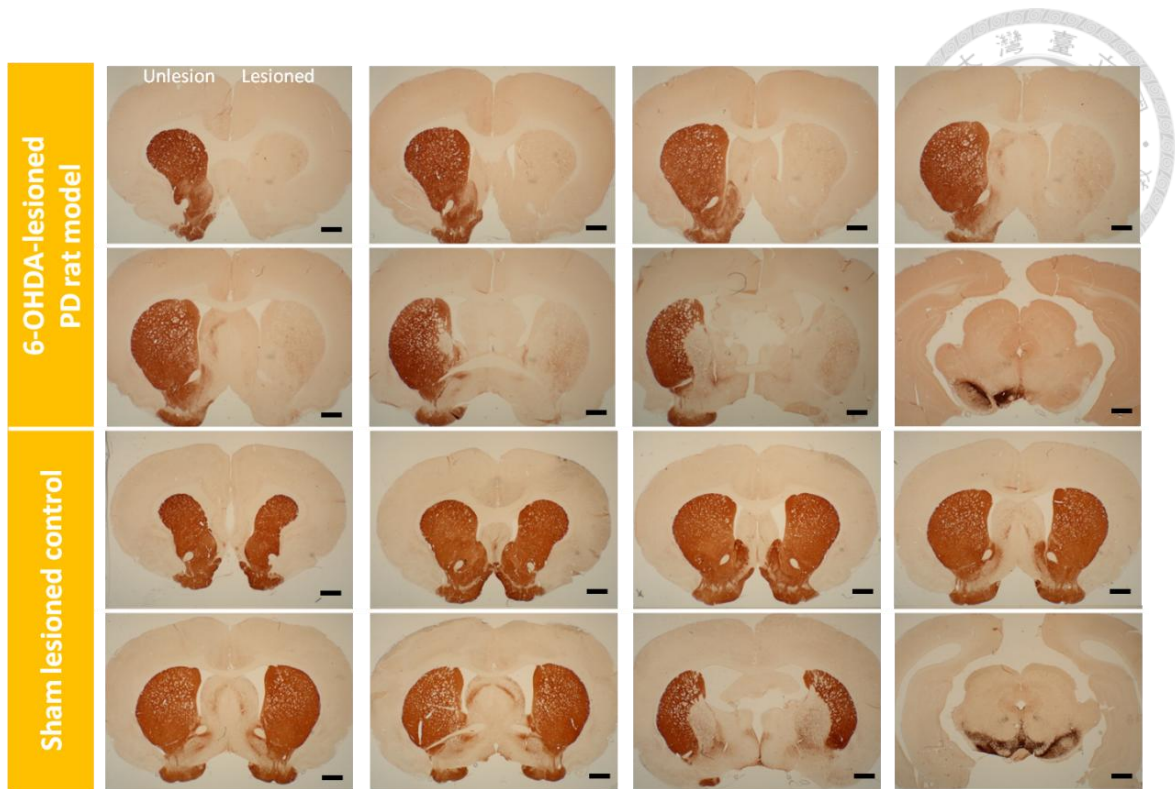


圖 17. 6-OHDA lesioned 組與 sham lesioned 對照組於黑質紋狀體徑路之酪胺酸羥化酶表現情形。(比例尺為 1 毫米)

Figure 17. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the nigrostriatal pathway of 6-OHDA-lesioned PD rat model and sham lesioned control group. (scale bar = 1 mm)

3.2.3.2 巴金森氏症模式大鼠接受細胞移植後旋轉行為之改善

以 6-OHDA 破壞大鼠單側黑質紋狀體徑路所得到之巴金森氏症模式大鼠，隨機分為巴金森氏症模式大鼠控制組 (PD rat control group)、接受磷酸鹽緩衝液 (PBS) 注射之對照組 (Sham grafted group) 及接受紅色螢光豬羊水幹細胞移植組 (DsRed pAFSCs transplantation group)，並進一步進行細胞移植手術以探討紅色螢光豬羊水幹細胞於巴金森氏症大鼠模式之治療潛能。細胞移植處為大鼠右腦之紋狀體 (striatum)，移植之細胞量為 $3 \sim 4 \times 10^5$ cells，於移植細胞後兩週及四週時，皆進行阿撲嗎啡誘發之旋轉行為測試以評估治療效果。

結果顯示，巴金森氏症模式大鼠控制組和接受 PBS 注射的對照組之旋轉行為會隨著時間增加而有上升的趨勢，而接受紅色螢光豬羊水幹細胞移植的大鼠，在移植後兩週的旋轉圈數即顯著低於另外兩組 ($p < 0.01$)，到移植後四週則更加顯著 ($p < 0.001$) (圖 18A)；若將移植前之旋轉圈數訂為 100%，則接受紅色螢光豬羊水幹細胞移植的大鼠在移植後四週之旋轉圈數已降至 54.05%，即移植細胞後四週可使巴金森氏症模式大鼠之旋轉行為的圈數下降約 40% (圖 18B)。上述結果顯示，移植紅色螢光豬羊水幹細胞可顯著地改善巴金森氏症模式大鼠之旋轉行為缺陷，是以羊水幹細胞乃一具有潛力之幹細胞來源，可應用於巴金森氏症新興療法之開發。

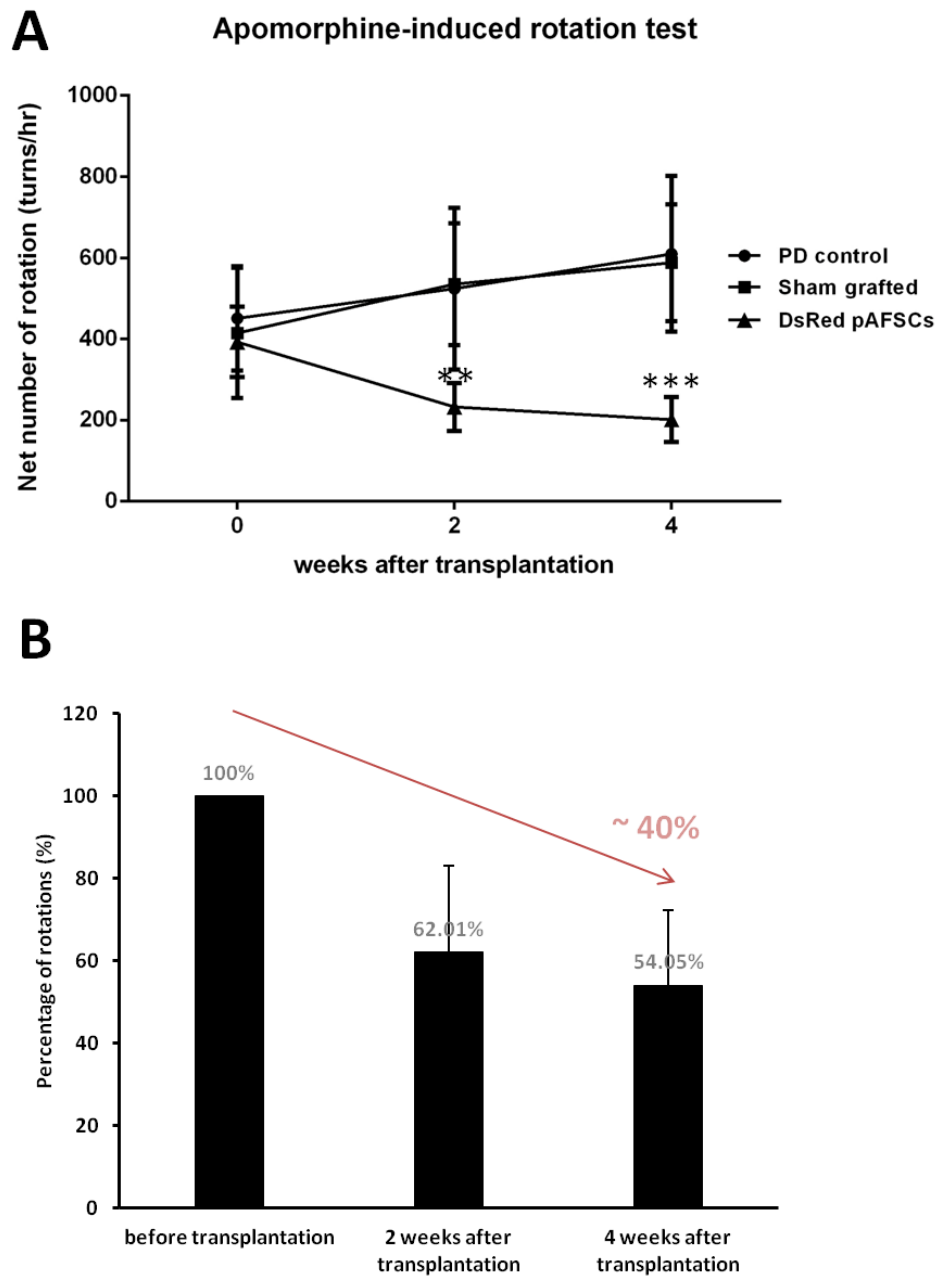


圖 18. 各移植組別經阿樸嗎啡誘導的旋轉行為圈數之分析。

Figure 18. Apomorphine-induced rotation test analysis of different experimental groups. (PD control group, $n = 3$; Sham grafted group, $n = 3$; DsRed pAFSCs transplantation group, $n = 6$) (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.2.3.3 細胞移植後四週巴金森氏症模式大鼠黑質紋狀體徑路中多巴胺神經之表現情形及神經纖維密度定量

移植紅色螢光豬羊水幹細胞可顯著地改善巴金森氏症模式大鼠之旋轉行為缺失，於細胞移植四週後將大鼠灌流犧牲，取腦組織做切片並以免疫組織化學染色進一步觀察大鼠腦中表現酪胺酸羥化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 的多巴胺神經之恢復情形。結果可在接受紅色螢光豬羊水幹細胞移植組別的大鼠移植側之紋狀體中觀察到表現 TH 的多巴胺神經元，且有明顯的細胞本體與神經突起伸出 (圖 19)。

而在整個黑質紋狀體徑路 (nigrostriatal pathway) 上多巴胺神經纖維之表現結果顯示，未移植細胞的巴金森氏症模式大鼠控制組及接受 PBS 注射之對照組在破壞側並無觀察到表現 TH 的多巴胺神經纖維，而接受紅色螢光豬羊水幹細胞移植的組別則可在移植側觀察到大面積的多巴胺神經纖維之表現 (圖 20)。若進一步以光學軟體定量其神經纖維密度，圈選兩側的紋狀體區域計算數值 (圖 21A、B、C)，並將正常側訂為 100%，另以胼胝體作為背景值，經量化且統計後之結果顯示，接受紅色螢光豬羊水幹細胞移植的組別之多巴胺神經纖維密度顯著地高於未移植細胞的巴金森氏症模式大鼠控制組及接受 PBS 注射之對照組 ($p < 0.001$) (圖 21D)。

上述結果指出，紅色螢光豬羊水幹細胞經移植後可促使巴金森氏症模式大鼠腦中 nigrostriatal pathway 的多巴胺神經與纖維之恢復，進而達到改善大鼠運動功能上之缺失；然羊水幹細胞於巴金森氏症治療機轉中所扮演之角色仍需進一步實驗以釐清。

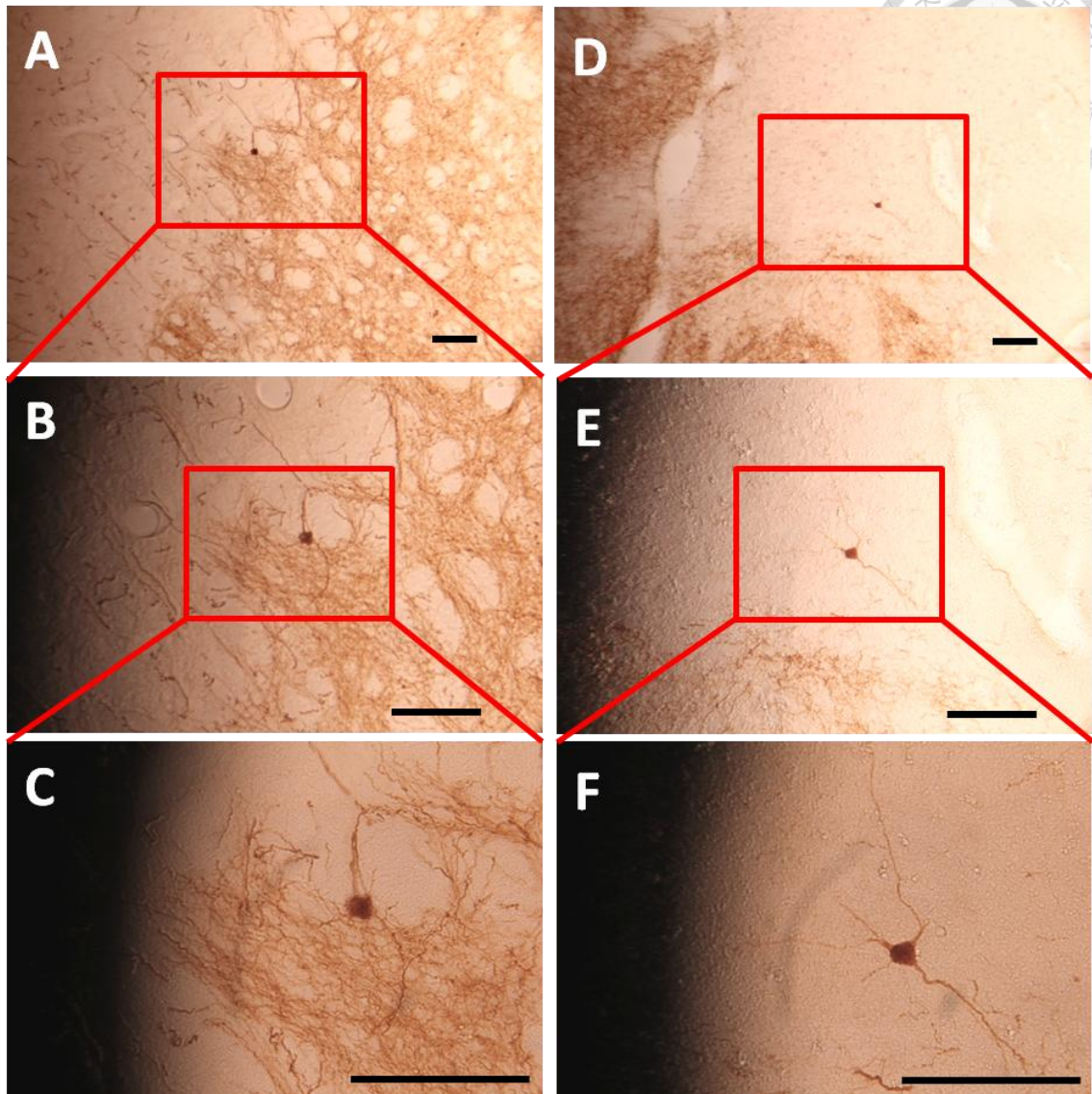


圖 19. 移植紅色螢光豬羊水幹細胞四週後可於大鼠移植側的紋狀體中觀察到表現酪胺酸羥化酶之多巴胺神經元。(比例尺為 100 微米)

Figure 19. Tyrosine hydroxylase (TH) positive dopaminergic neurons could be observed in the striatum after 4 weeks following transplantation of DsRed pAFSCs.
(scale bar = 100 μ m)

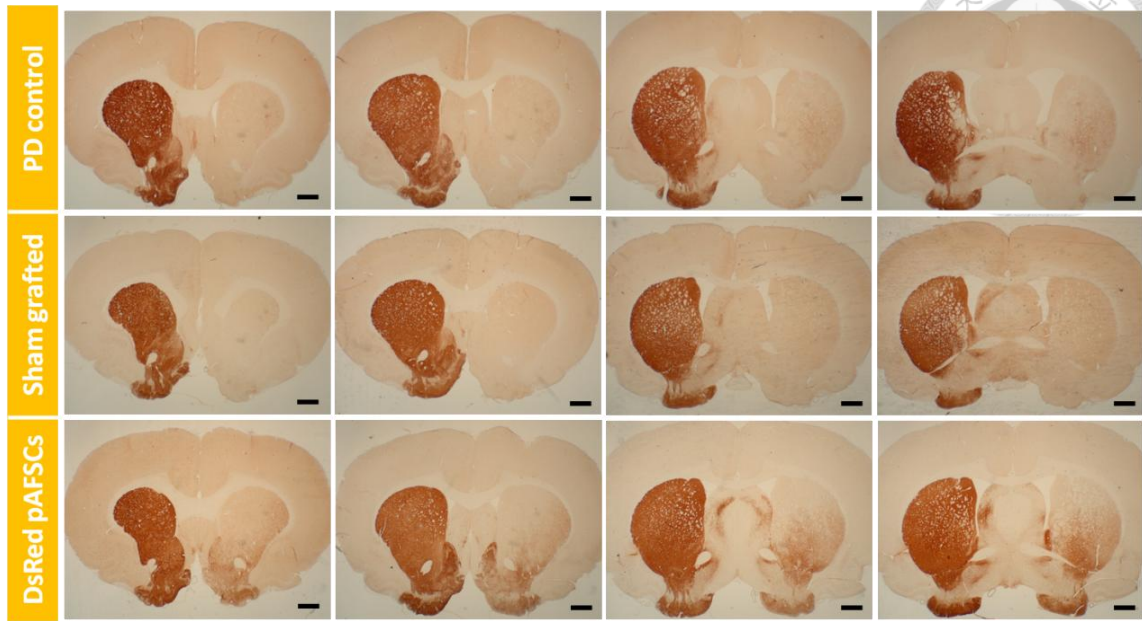


圖 20. 移植後四週各處理組別於黑質紋狀體徑路之酪胺酸羥化酶表現情形。(比例尺為 1 毫米)

Figure 20. Tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity in the nigrostriatal pathway of different experimental groups 4 weeks after of transplantation. (scale bar = 1 mm)

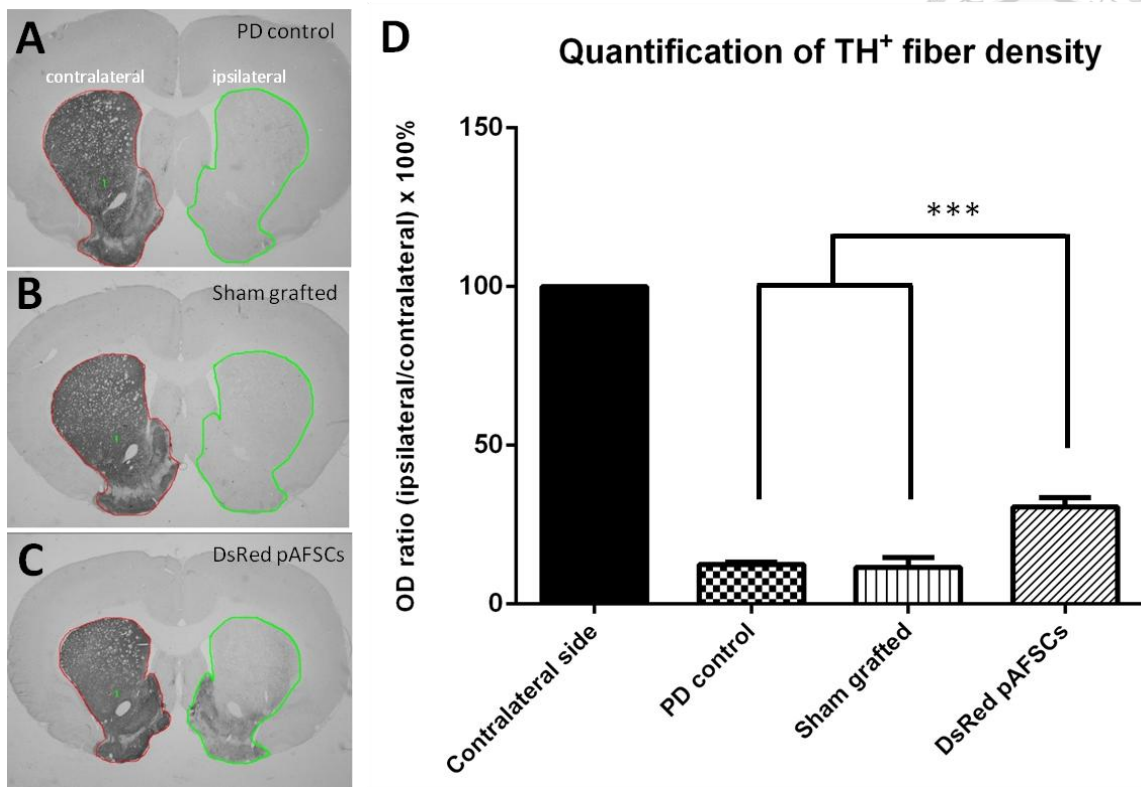


圖 21. 各處理組別於黑質紋狀體徑路中的多巴胺神經纖維密度之定量。

Figure 21. Quantification of tyrosine hydroxylase (TH) positive neural fiber density of striatum in different experimental groups. (***) $p < 0.001$



3.3 紅色螢光豬羊水幹細胞移植入巴金森氏症大鼠後細胞命

運之探討

3.3.1 前言

若欲真正將幹細胞療法應用於臨床治療，則除了評估其治療潛能外尚需進一步釐清其間之治療機轉以確保細胞移植之有效性和安全性。目前在探討使用間葉幹細胞治療巴金森氏症的可能機轉上，主要有兩大方向，第一大方向認為間葉幹細胞會分泌一些旁分泌因子 (paracrine factors)，這些旁分泌因子可能具有抗細胞凋亡 (antiapoptotic) 的效果，可以減緩多巴胺神經元之死亡，亦可能有促進神經再生 (neuroregenerative) 的效果，或是能啟動患者本身的恢復機制，如神經生成 (neurogenesis) 和血管生成 (angiogenesis)，以及可能會有免疫調節或抗發炎反應的效果；另一個研究方向則認為，移植進體內の間葉幹細胞可能會進行分化去填補受損處原本宿主細胞死亡後所出現之空缺，或是直接與宿主本身的即將死亡或已受損之神經元融合，以進行修復 (Glavaski-Joksimovic and Bohn, 2013)。

故本試驗使用本研究室先前產製出之紅色螢光蛋白質基因轉殖豬所分離出之羊水幹細胞，此羊水幹細胞亦會表現紅色螢光，藉此可於移植後藉由追蹤表現紅色螢光的外來細胞以釐清羊水幹細胞應用於巴金森氏症之治療機轉。



3.3.2 材料與方法

3.3.2.1 試驗動物來源及飼養條件

試驗動物來源及飼養條件如試驗二所述。

3.3.2.2 巴金森氏症大鼠疾病動物模式之建立

巴金森氏症大鼠疾病動物模式之建立如試驗二所述。

3.3.2.3 阿樸嗎啡誘發之旋轉行為

阿樸嗎啡誘發之旋轉行為如試驗二所述。

3.3.2.4 紅色螢光豬羊水幹細胞來源

紅色螢光豬羊水幹細胞來源如試驗一所述。

3.3.2.5 細胞移植手術及流程

細胞移植手術及流程如試驗二所述。

3.3.2.6 免疫螢光染色 (Immunofluorescence)

免疫螢光染色之灌流步驟如試驗二所述，惟冷凍切片之厚度為 5~10 μm 。而染色流程則如試驗一所述，然此腦組織於切片前已經過 4% PFA 灌流及後固定隔夜，故可不需再進行固定之步驟，以 PBS 潤洗三次後即可進行 blocking 及後續程序。



3.3.3 結果與討論

3.3.3.1 移植後 24 小時、48 小時、72 小時紅色螢光豬羊水幹細胞於巴金森氏症大鼠紋狀體中之細胞命運

於試驗二時，將紅色螢光豬羊水幹細胞移植入巴金森氏症模式大鼠腦中，在移植後四週之結果顯示，移植紅色螢光豬羊水幹細胞可顯著改善大鼠運動功能上之缺失，且可促使巴金森氏症模式大鼠腦中黑質紋狀體徑路 (nigrostriatal pathway) 上的多巴胺神經與纖維之恢復，然仍需進一步釐清羊水幹細胞於巴金森氏症治療機轉中所扮演之角色以確立後續臨床上應用之可行性。本試驗旨在追蹤所移植進去的紅色螢光豬羊水幹細胞，因其帶有紅色螢光，故試驗大鼠於犧牲後取出腦組織製成切片後即可直接透過顯微鏡於螢光燈源激發及濾片下尋找帶有紅色螢光之細胞。

結果顯示，在移植後 24 小時、48 小時和 72 小時，皆能在移植處發現許多表現紅色螢光的細胞，此即為所移植進去的細胞，這些細胞成團狀聚集於紋狀體中之移植處附近。欲進一步了解此些移植進去的紅色螢光豬羊水幹細胞是否有開始分化為神經細胞或多巴胺神經，續進行免疫螢光染色，以 β -III 微管蛋白 (β -III tubulin) 作為神經細胞之標誌，另使用酪胺酸羥化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 作為多巴胺神經之特異性標誌。結果顯示，所有移植進去的紅色螢光豬羊水幹細胞皆未表現 β -III tubulin 及 TH (圖 22、23、24)，表示在移植後 24 小時、48 小時和 72 小時時，所移植的紅色螢光豬羊水幹細胞並未往神經系 (neural lineage) 進行分化。

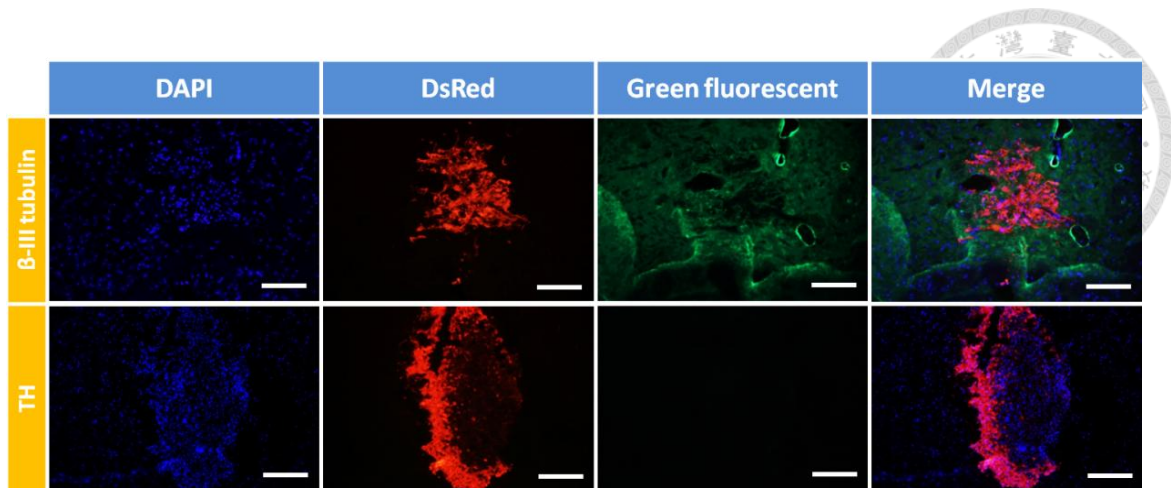


圖 22. 紅色螢光豬羊水幹細胞於移植後 24 小時尚不具表現 β -III 微管蛋白及酪胺酸羥化酶之能力。(比例尺為 100 微米)

Figure 22. DsRed pAFSCs were not capable of expressing β -III tubulin and TH at 24 hours after transplantation. (scale bar = 100 μ m)

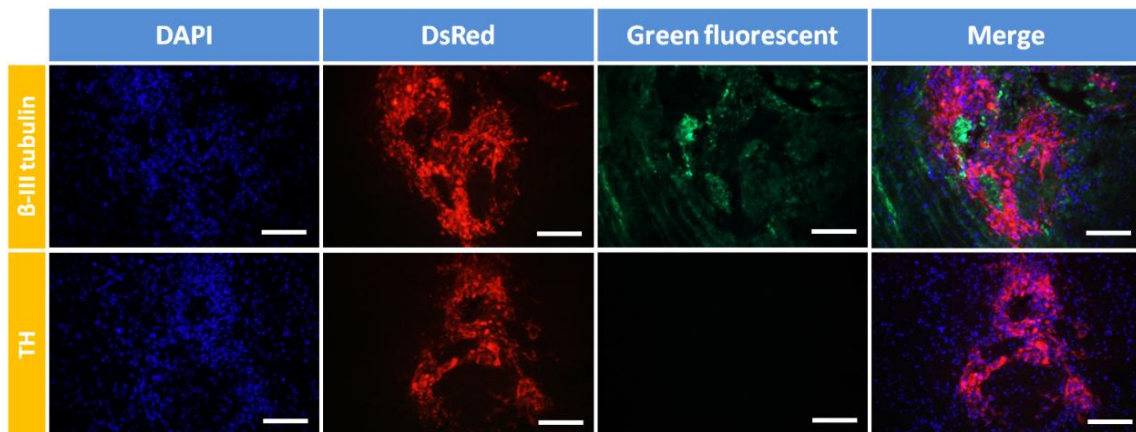


圖 23. 紅色螢光豬羊水幹細胞於移植後 48 小時尚不具表現 β -III 微管蛋白及酪胺酸羥化酶之能力。(比例尺為 100 微米)

Figure 23. DsRed pAFSCs were not capable of expressing β -III tubulin and TH at 48 hours after transplantation. (scale bar = 100 μ m)

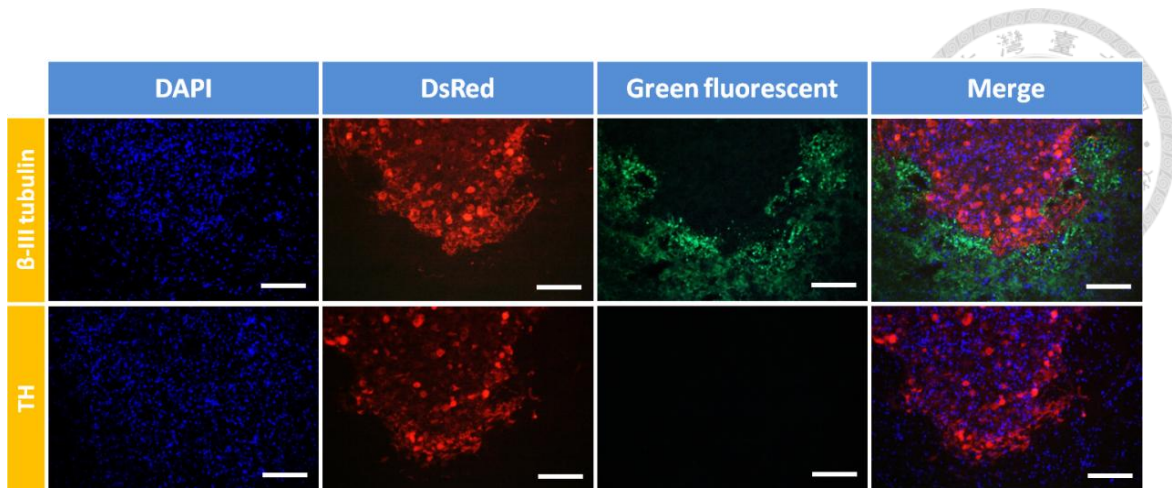


圖 24. 紅色螢光豬羊水幹細胞於移植後 72 小時尚不具表現 β -III 微管蛋白及酪胺酸羥化酶之能力。(比例尺為 100 微米)

Figure 24. DsRed pAFSCs were not capable of expressing β -III tubulin and TH at 72 hours after transplantation. (scale bar = 100 μ m)

3.3.3.2 移植後四週紅色螢光豬羊水幹細胞於巴金森氏症大鼠紋狀體中之細胞命運

試驗二於細胞移植後四週犧牲並取腦組織做切片時，亦由切片中尋找帶有紅色螢光之細胞。結果發現在移植後四週，在移植處仍能找到表現紅色螢光的細胞，然其數量與移植後 24 小時、48 小時和 72 小時相比已大幅減少，推測外來的豬來源羊水幹細胞於大鼠腦中可能受到免疫排斥作用而導致細胞數量於移植後四週時已所剩無幾。進一步以免疫螢光染色進行分析，發現此時紅色螢光豬羊水幹細胞會同時表現酪胺酸羥化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 二級抗體的綠色螢光，然與代表細胞核之 DAPI 的藍色螢光作疊合圖時，即發現此些表現紅色和綠色螢光的訊號已不如正常細胞形態，無法與呈現藍色螢光之細胞核配對，且其體積大小與細胞核相當甚至零碎不一，故判定此為紅色螢光豬羊水幹細胞所殘留之細胞碎屑 (cellular debris) (圖 25)。

雖於移植處找到之表現紅色螢光的細胞大都為細胞碎屑，但仍可於週邊找到極少存活的紅色螢光豬羊水幹細胞，且會同時表現 TH 的綠色螢光，經影像重疊後呈現黃色，並可與 DAPI 作疊合成為一具正常形態之細胞 (圖 26)。此結果顯示，紅色螢光豬羊水幹細胞於移植後四週仍可存活於大鼠紋狀體中，並失去原有的幹性，分化為表現 TH 的多巴胺神經元，也可能藉由此方式達到改善巴金森氏症模式大鼠之行為缺陷，顯現羊水幹細胞應用於巴金森氏症之治療潛能。

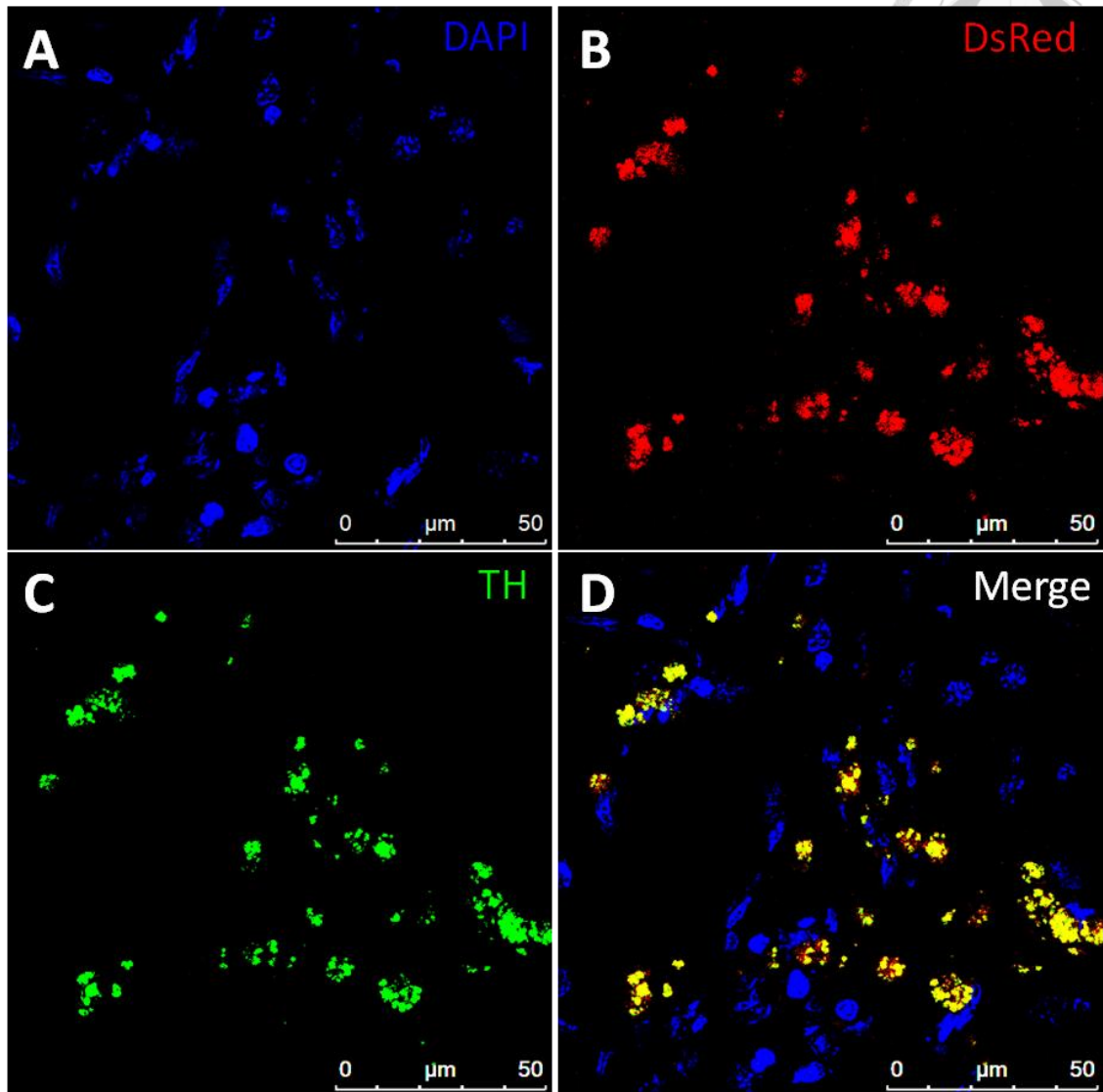


圖 25. 於移植後四週可見紅色螢光豬羊水幹細胞之細胞碎屑殘留於移植處。

Figure 25. The cellular debris of DsRed pAFSCs left in the graft site at 4 weeks after transplantation.

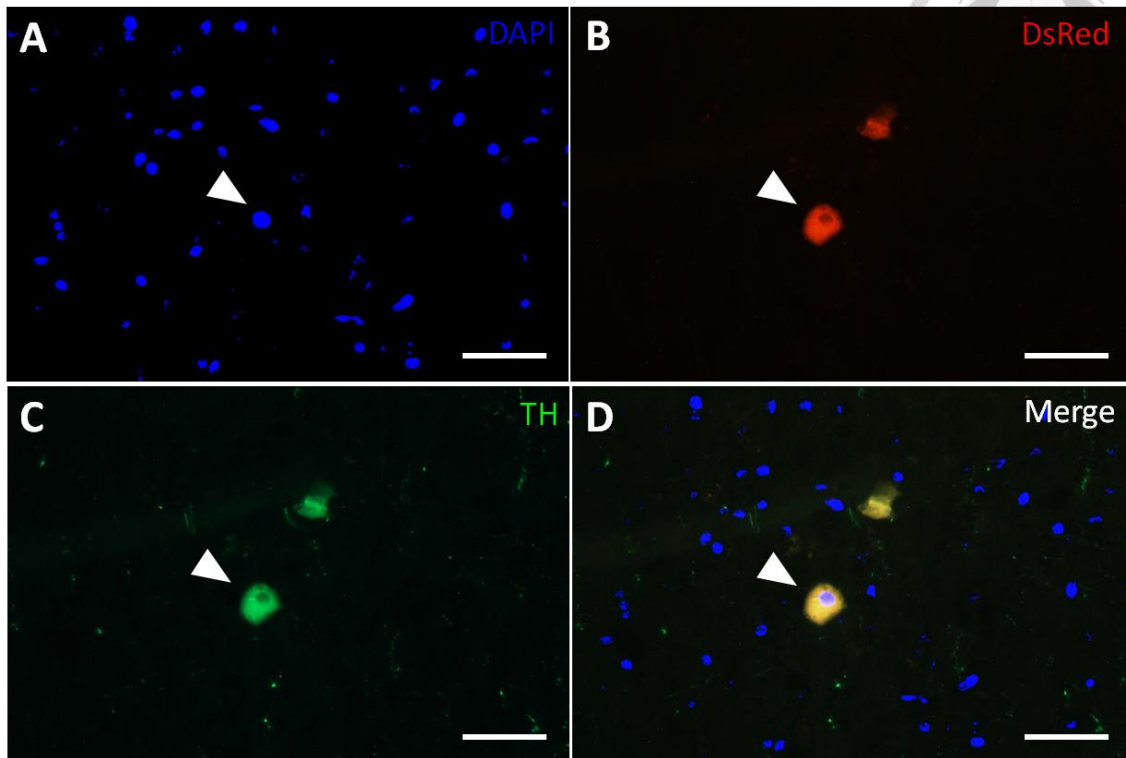


圖 26. 紅色螢光豬羊水幹細胞於移植後四週仍可存活於大鼠紋狀體中，並分化為表現酪胺酸羥化酶之多巴胺神經元。

於移植後四週時，大鼠紋狀體之切片於螢光燈源及濾片下，利用 DAPI 確定細胞核之位置 (A)，而 DsRed pAFSCs 本身即帶有紅色螢光 (B)，另經由酪胺酸羥化酶 (TH) 的一級抗體與綠色螢光二級抗體反應後可偵測到 TH 之表現 (C)，(D) 為 (A)、(B)、(C) 之疊合圖。箭號為一顆紅色螢光豬羊水幹細胞分化出之多巴胺神經元。(比例尺為 50 微米)

Figure 26. DsRed pAFSC survived and differentiated into TH positive dopaminergic neuron at 4 weeks after transplantation.


(A) Nucleuses were labeled by DAPI. (B) Red fluorescent expression of DsRed pAFSCs. (C) The DsRed pAFSC-differentiated TH positive dopaminergic neuron was demonstrated by immunofluorescence. (D) Indicate the merge image of (A), (B) and (C). The arrows indicate one dopaminergic neuron differentiated from DsRed pAFSC. (scale bar = 50 μ m)

第四章 綜合討論




本研究使用來自於紅色螢光蛋白質轉基因豬的羊水幹細胞，進行異種移植至巴金森氏症模式大鼠中，以探討羊水幹細胞應用於治療巴金森氏症之可行性。首先於體外試驗中，利用 SHH、FGF8、bFGF 及 BDNF 等生長因子添加於紅色螢光豬羊水幹細胞的培養液中以進行多巴胺神經分化，結果在誘導分化第 9 天時可觀察到細胞外觀之轉變，開始出現類似神經細胞之細長形態且會表現神經細胞的特異性標誌— β -III tubulin；直至誘導分化第 12 天時，可在誘導分化組中發現表現多巴胺神經元之特異性標誌—TH 的細胞，顯示紅色螢光豬羊水幹細胞已成功被誘導分化成為類多巴胺神經。過去有許多在胚幹細胞分化相關的研究中，會先使胚幹細胞形成類胚體的結構再開始進行誘導分化，藉此可成功分化出神經系細胞或類多巴胺神經 (Bibel *et al.*, 2004; Carpenter *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2006)；而本試驗先將紅色螢光豬羊水幹細胞在開始進行多巴胺神經分化之前使用 hanging drop 的培養方法使細胞形成細胞懸浮球體之後才將培養基更換為誘導分化液，目的即在模擬胚幹細胞的分化手法使紅色螢光豬羊水幹細胞形成類似於類胚體結構的細胞懸浮球體，並能自發性往三胚層初步分化，而後再使用培養神經細胞常用的神經基礎培養液為基底，使細胞懸浮球體中的外胚層神經系細胞可以存活下來，並藉由特定生長因子之添加進一步誘導分化出類多巴胺神經，而本試驗之結果也顯示此分化方法為可行的。

於體內試驗中，將紅色螢光豬羊水幹細胞移植至以 6-OHDA 誘導之巴金森氏症模式大鼠紋狀體中，並於移植後兩週經由阿樸嗎啡 (apomorphine) 誘發之旋轉行為評估其治療效果。結果顯示，移植紅色螢光豬羊水幹細胞可顯著地改善巴金森氏症模式大鼠之旋轉行為缺陷並減緩其運動功能退化之進程。然至移植後四週時，雖可於移植處找到極少存活的紅色螢光豬羊水幹細胞，且已分化為表現酪胺酸羥化酶之多巴胺神經元，但大部分所找到的表現紅色螢光的細胞只剩下細胞碎




屑；推測其可能原因為，雖已有許多文獻證實羊水幹細胞具有免疫調節功能，且在本試驗中有接受異種細胞移植的大鼠於術後無出現任何異常，惟就時間長遠來看，這些異種移植之外來細胞最終仍可能被宿主的免疫排斥反應排斥掉，不過若要下此定論仍需要再進一步的追蹤和試驗結果去證實。

目前在以幹細胞療法治療巴金森氏症之修復機轉上，過去文獻可歸納出兩大面向，其一為所移植的幹細胞在宿主體內可能會進行分化去填補受損處原本宿主細胞死亡後所出現之空缺 (Alexanian *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2013; Dezawa *et al.*, 2004; Kong *et al.*, 2008; Mezey *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2012)，或是直接與宿主本身的即將死亡或已受損之神經元融合，以進行修復 (Alvarez-Dolado *et al.*, 2003; Terada *et al.*, 2002; Vassilopoulos *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003)；其二則為幹細胞會分泌一些旁分泌因子 (paracrine factors)，這些旁分泌因子可能具有抗細胞凋亡的效果，可以減緩多巴胺神經元之死亡，亦可能有促進神經再生的效果，或是能啟動患者本身的恢復機制，如神經生成和血管生成，以及可能會有免疫調節或抗發炎反應的效果 (Blandini *et al.*, 2010; Bouchez *et al.*, 2008; Chao *et al.*, 2009; Cova *et al.*, 2010; Glavaski-Joksimovic and Bohn, 2013; Kim *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2012; Shintani *et al.*, 2007)。而於本試驗中，在移植後四週可於移植處找到極少存活的紅色螢光豬羊水幹細胞，且已分化為表現酪胺酸羥化酶之多巴胺神經元，然此存活且已分化之細胞比例極少，又於免疫組織化學染色之結果中可見重新長回的多巴胺神經纖維並非出現在移植處且不帶有紅色螢光，故推測這些重新長回的多巴胺神經纖維應為內源性；此外，於移植後24小時、48小時及72小時皆能在移植處找到許多所移植進去的表現紅色螢光之細胞，然這些紅色螢光豬羊水幹細胞並未開始往神經系進行分化，於此推測紅色螢光豬羊水幹細胞可能是停留在移植處並分泌旁分泌因子，調節受損處的微環境 (niche)，並藉此幫助內源性的多巴胺神經纖維再生而進一步改善大鼠運動功能上之缺失。



綜觀上述試驗結果，紅色螢光豬來源之羊水幹細胞可於體外適當培養環境下經誘導分化為類多巴胺神經，若移植至體內，紅色螢光豬羊水幹細胞於移植後四週仍可存活於大鼠紋狀體中，並分化為表現酪胺酸羥化酶之多巴胺神經元，且能顯著地改善巴金森氏症模式大鼠之旋轉行為缺陷。然其存活並分化之細胞比例極少，可能不足以達到治療之效，另於移植後 72 小時內紅色螢光豬羊水幹細胞尚未往神經系細胞進行分化，故推測羊水幹細胞治療巴金森氏症模式大鼠之治療效果可能是來自於其所分泌的旁分泌因子，藉由調節受損處之微環境促進內源性多巴胺神經纖維之再生，然此推測仍需更進一步的研究以確認，究竟羊水幹細胞治療巴金森氏症之治療機轉是否真如同上述，尚無法果斷言之。惟可確定的是，羊水幹細胞乃一具有潛力之幹細胞來源，可應用於後續臨床上巴金森氏症細胞療法之開發，盼能對飽受疾病所苦的病患有助。

第五章 結論



本研究結果證實，紅色螢光豬羊水幹細胞於體外經由 SHH、FGF8、bFGF 及 BDNF 等生長因子之添加進行誘導分化後具有類神經細胞之外觀形態，並表現多巴胺神經之專一性蛋白質。而後將紅色螢光豬羊水幹細胞移植至使用 6-OHDA 誘導之巴金森氏症疾病模式大鼠紋狀體中，移植後可促使巴金森氏症模式大鼠腦中黑質紋狀體徑路的多巴胺神經纖維之顯著恢復 ($p < 0.001$)，進而達到改善大鼠運動行為上功能缺陷之效 ($p < 0.001$)。此外，經追蹤後之結果顯示，於移植後 24 小時、48 小時和 72 小時，皆能在移植處發現許多表現紅色螢光的細胞，然此些紅色螢光豬羊水幹細胞並未開始往神經系進行分化；而至移植後四週時，紅色螢光豬羊水幹細胞仍可存活且分化為表現酪胺酸羥化酶之多巴胺神經元。

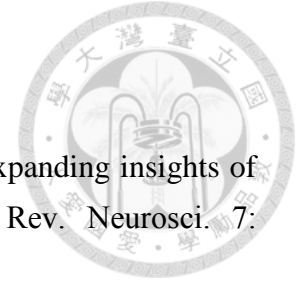
第六章 未來展望



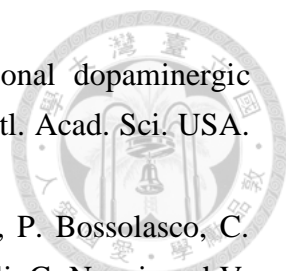
隨著現今醫療科技之迅速進展，人類平均壽命延長，人口結構變化已是全球性的議題，高齡人口因生理老化所引起的緩慢衰退，或因疾病所引起的快速衰退導致各個國家對於老年人口所耗費的醫療支出費用不斷攀升。根據統計，目前全球約有一千萬的人口患有巴金森氏症，而在美國每年就有約 63 萬人被確診患病，估計一年就需花費約 15 億美金的醫療資源。然目前臨床上使用藥物治療和手術治療皆非長遠之計，僅可於發病初期緩解其症狀，隨病程之延長其療效將弱化，終將無法阻止病症之惡化，又於治療過程中會伴隨許多嚴重之副作用，因此發展一有效的治療方式遂成為當前十分重要之研究課題。

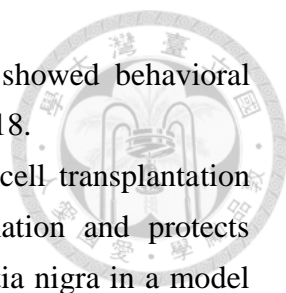
以幹細胞為主之再生醫學在過去幾十年來迅速發展，且一直被認為是當前各種疾病損傷修復的希望，於此領域中，如何在幹細胞原始性、分化能力與癌化風險甚至是取得來源之倫理道德等議題間權衡並選擇出最合適之細胞來源乃首要面對的問題。本研究以近年新興的具有優於一般體幹細胞分化潛能和細胞特性之羊水幹細胞作為細胞來源，移植至巴金森氏症疾病模式大鼠腦中，結果發現羊水幹細胞的確可以在患鼠腦中存活且能分化成多巴胺神經元並改善患鼠之運動功能缺失，代表以羊水幹細胞治療巴金森氏症是一條可行且具有潛力之路。目前學界的研究結果皆顯示幹細胞療法的確對大多數的疾病損傷都有正面之療效，然其中的治療機制卻始終尚未完全掌握。迄今，全世界的科學家們仍致力於釐清幹細胞於各種疾病損傷之修復機轉，期有朝一日能於臨床上建立一套安全、穩定、有效且完善的幹細胞療法，進而造福全人類。

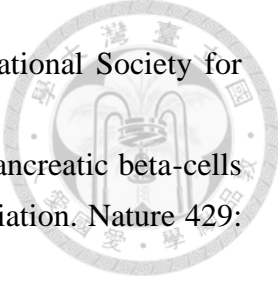
REFERENCES

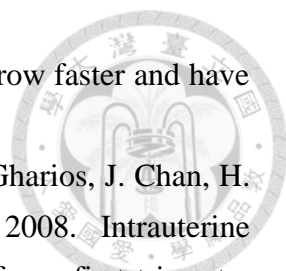


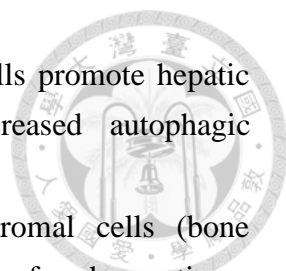
- Abou-Sleiman, P. M., M. M. K. Muqit, and N. W. Wood. 2006. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 207-219.
- Adams, R. N., E. Murrill, R. McCreery, L. Blank, and M. Karolczak. 1972. 6-Hydroxydopamine, a new oxidation mechanism. *Eur. J. Pharmacol.* 17: 287-292.
- Alexanian, A. R., D. J. Maiman, S. N. Kurpad, and T. A. Gennarelli. 2008. *In vitro* and *in vivo* characterization of neurally modified mesenchymal stem cells induced by epigenetic modifiers and neural stem cell environment. *Stem Cells Dev.* 17: 1123-1130.
- Altar, C. A., N. Cai, T. Bliven, M. Juhasz, J. M. Conner, A. L. Acheson, R. M. Lindsay, and S. J. Wiegand. 1997. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389: 856-860.
- Alvarez-Dolado, M., R. Pardal, J. M. Garcia-Verdugo, J. R. Fike, H. O. Lee, K. Pfeffer, C. Lois, S. J. Morrison, and A. Alvarez-Buylla. 2003. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425: 968-973.
- Baba, M., S. Nakajo, P. H. Tu, T. Tomita, K. Nakaya, V. M. Y. Lee, J. Q. Trojanowski, and T. Iwatsubo. 1998. Aggregation of α -synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol.* 152: 879-884.
- Baksh, D., R. Yao, and R. S. Tuan. 2007. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem cells* 25: 1384-1392.
- Barzilay, R., I. Kan, T. Ben-Zur, S. Bulvik, E. Melamed, and D. Offen. 2008. Induction of human mesenchymal stem cells into dopamine-producing cells with different differentiation protocols. *Stem Cells Dev.* 17: 547-554.
- Beal, M. F. 2001. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 325-334.
- Bibel, M., J. Richter, K. Schrenk, K. Lee Tucker, V. Staiger, M. Korte, M. Goetz, and Y. A. Barde. 2004. Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nat. Neurosci.* 7: 1003-1009.
- Björklund, L. M., R. Sanchez-Pernaute, S. Chung, T. Andersson, I. Y. Chen, K. S. McNaught, A. L. Brownell, B. G. Jenkins, C. Wahlestedt, K. S. Kim, and O.

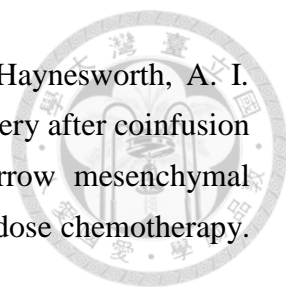
- 
- Isacson. 2002. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 2344-2349.
- Blandini, F., L. Cova, M. T. Armentero, E. Zennaro, G. Levandis, P. Bossolasco, C. Calzarossa, M. Mellone, B. Giuseppe, G. L. Deliliers, E. Polli, G. Nappi, and V. Silani. 2010. Transplantation of undifferentiated human mesenchymal stem cells protects against 6-hydroxydopamine neurotoxicity in the rat. *Cell Transplant.* 19: 203-217.
- Blandini, F., M. T. Armentero, and E. Martignoni. 2008. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat. D.* 14: S124-S129.
- Blesa, J., I. Trigo-Damas, A. Quiroga-Varela, and V. R. Jackson-Lewis. 2015. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front. Neuroanat.* 9: 91.
- Blum, D., S. Torch, N. Lambeng, M. F. Nissou, A. L. Benabid, R. Sadoul, and J. M. Verna. 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 65: 135-172.
- Bouchez, G., L. Sensebé, P. Vourc'h, L. Garreau, S. Bodard, A. Rico, D. Guilloteau, P. Charbord, J. C. Besnard, S. Chalon. 2008. Partial recovery of dopaminergic pathway after graft of adult mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* 52: 1332-1342.
- Brundin, P., O. Pogarell, P. Hagell, P. Piccini, H. Widner, A. Schrag, A. Kupsch, L. Crabb, P. Odin, B. Gustavii, A. Björklund, D. J. Brooks, C. D. Marsden, W. H. Oertel, N. P. Quinn, S. Rehncrona, and O. Lindvall. 2000. Bilateral caudate and putamen grafts of embryonic mesencephalic tissue treated with lazarets in Parkinson's disease. *Brain* 123: 1380-1390.
- Cabin, D. E., K. Shimazu, D. Murphy, N. B. Cole, W. Gottschalk, K. L. McIlwain, B. Orrison, A. Chen, C. E. Ellis, R. Paylor, B. Lu, and R. L. Nussbaum. 2002. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking α -synuclein. *The J. Neurosci.* 22: 8797-8807.
- Caplan, A. I., and J. E. Dennis. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem.* 98: 1076-1084.
- Carpenter, M. K., M. S. Inokuma, J. Denham, T. Mujtaba, C. P. Chiu, and M. S. Rao. 2001. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp. Neurol.* 172: 383-397.
- Chang, Y. J., T. Y. Ho, M. L. Wu, S. M. Hwang, T. W. Chiou, and M. S. Tsai. 2013.

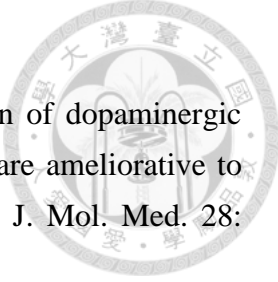
- 
- Amniotic fluid stem cells with low γ -interferon response showed behavioral improvement in Parkinsonism rat model. *PLoS ONE* 8: e76118.
- Chao, Y. X., B. P. He, and S. S. Tay. 2009. Mesenchymal stem cell transplantation attenuates blood brain barrier damage and neuroinflammation and protects dopaminergic neurons against MPTP toxicity in the substantia nigra in a model of Parkinson's disease. *J. Neuroimmunol.* 216: 39-50.
- Chaudhuri, K. R., D. G. Healy, and A. H. V. Schapira. 2006. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 5: 235-245.
- Chou, C. J., S. Y. Peng, M. H. Wu, C. C. Yang, Y. S. Lin, W. T. K. Cheng, S. C. Wu, and Y. P. Lin. 2014. Generation and characterization of a transgenic pig carrying a DsRed-monomer reporter gene. *PLoS ONE* 9: e106864.
- Cipriani, S., D. Bonini, E. Marchina, I. Balgkouranidou, L. Caimi, G. G. Zucconi, and S. Barlati. 2007. Mesenchymal cells from human amniotic fluid survive and migrate after transplantation into adult rat brain. *Cell Biol. Int.* 31: 845-850.
- Cova, L., M. T. Armentero, E. Zennaro, C. Calzarossa, P. Bossolasco, G. Busca, G. L. Delilieri, E. Polli, G. Nappi, V. Silani, and F. Blandini. 2010. Multiple neurogenic and neurorescue effects of human mesenchymal stem cell after transplantation in an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1311: 12-27.
- Creese, I., D. R. Burt, and S. H. Snyder. 1977. Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity. *Science* 197: 596-598.
- Dauer, W., and S. Przedborski. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39: 889-909.
- De Coppi, P., G. Bartsch, M. M. Siddiqui, T. Xu, C. C. Santos, L. Perin, G. Mostoslavsky, A. C. Serre, E. Y. Snyder, J. J. Yoo, M. E. Furth, S. Soker, and A. Atala. 2007. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat. Biotechnol.* 25: 100-106.
- Deumens, R., A. Blokland, and J. Prickaerts. 2002. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp. Neurol.* 175: 303-317.
- Dezawa, M., H. Kanno, M. Hoshino, H. Cho, N. Matsumoto, Y. Itokazu, N. Tajima, H. Yamada, H. Sawada, H. Ishikawa, T. Mimura, M. Kitada, Y. Suzuki, and C. Ide. 2004. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J. Clin. Invest.* 113: 1701-1710.
- Dominici, M., K. L. Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, and E. Horwitz. 2006. Minimal criteria for

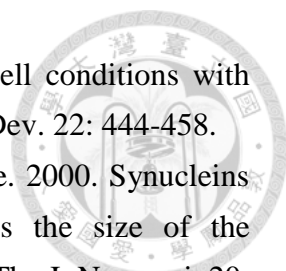
- 
- defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317.
- Dor, Y., J. Brown, O. I. Martinez, and D. A. Melton. 2004. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429: 41-46.
- Dunnett, S. B., and E. M. Torres. 2011. Rotation in the 6-OHDA-lesioned rat. *Neuromethods* 61: 299-315.
- Dziadosz, M., R. S. Basch, and B. K. Young. 2016. Human amniotic fluid: a source of stem cells for possible therapeutic use. *Am. J. Obstet. Gynecol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.12.061>.
- Eirin, A., X. Y. Zhu, J. D. Krier, H. Tang, K. L. Jordan, J. P. Grande, A. Lerman, S. C. Textor, and L. O. Lerman. 2012. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve revascularization outcomes to restore renal function in swine atherosclerotic renal artery stenosis. *Stem cells* 30: 1030-1041.
- Ericson, J., J. Muhr, M. Placzek, T. Lints, T. M. Jessell, and T. Edlund. 1995. Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* 81: 747-756.
- Evans, M. J., and M. H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.
- Fahn, S. 2003. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 991: 1-14.
- Faull, R. L. M., and R. Laverly. 1969. Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra. *Exp. Neurol.* 23: 332-340.
- Fénelon, G., F. Mahieux, R. Huon, and M. Ziegler. 2000. Hallucinations in Parkinson's disease: prevalence, phenomenology and risk factors. *Brain* 123: 733-745.
- Ferrari, G., M. C. Minozzi, G. Toffano, A. Leon, and S. D. Skaper. 1989. Basic fibroblast growth factor promotes the survival and development of mesencephalic neurons in culture. *Dev. Biol.* 133: 140-147.
- Fukuchi, Y., H. Nakajima, D. Sugiyama, I. Hirose, T. Kitamura, and K. Tsuji. 2004. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem cells* 22: 649-658.
- Glavaski-Joksimovic, A. M., and C. Bohn. 2013. Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 247: 25-38.
- Goldman, S. M. 2014. Environmental toxins and Parkinson's disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 54: 141-164.
- Guillot, P. V., C. Gotherstrom, J. Chan, H. Kurata, and N. M. Fisk. 2007. Human

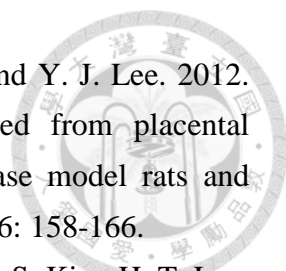
- 
- first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem cells* 25: 646-654.
- Guillot, P. V., O. Abass, J. H. D. Bassett, S. J. Shefelbine, G. Bou-Gharios, J. Chan, H. Kurata, G. R. Williams, J. Polak, and N. M. Fisk. 2008. Intrauterine transplantation of human fetal mesenchymal stem cells from first-trimester blood repairs bone and reduces fractures in osteogenesis imperfecta mice. *Blood* 111: 1717-1725.
- Herrera-Marschitz, M., and U. Ungerstedt. 1984. Evidence that apomorphine and pergolide induce rotation in rats by different actions on D1 and D2 receptor sites. *Eur. J. Pharmacol.* 98: 165-176.
- Herrmann, R. P., and M. J. Sturm. 2014. Adult human mesenchymal stromal cells and the treatment of graft versus host disease. *Stem Cells Cloning.* 7: 45-52.
- Hornykiewicz, O. 1975. Parkinson's disease and its chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* 24: 1061-1065.
- Huang, G. T., S. Gronthos, and S. Shi. 2009. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J. Dent. Res.* 88: 792-806.
- Hudson, J. L., C. G. Horne, I. Strömberg, S. Brock, J. Clayton, J. Masserano, B. J. Hoffer, and G. A. Gerhardt. 1993. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res.* 626: 167-174.
- Hughes, T. A., H. F. Ross, S. Musa, S. Bhattacharjee, R. N. Nathan, R. H. S. Mindham, and E. G. S. Spokes. 2000. A 10-year study of the incidence of and factors predicting dementia in Parkinson's disease. *Neurology* 54: 1596-1602.
- Hynes, M., and A. Rosenthal. 1999. Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 26-36.
- Jackson-Lewis, V., J. Blesa, and S. Przedborski. 2012. Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. D.* 18S1: S183-S185.
- Jankovic, J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79: 368-376.
- Joerger-Messerli, M. S., C. Marx, B. Oppliger, M. Mueller, D. V. Surbek, and A. Schoeberlein. 2015. Best Pract. Res. Cl. Ob. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2015.07.006>.
- Joo, S., I. K. Ko, A. Atala, J. J. Yoo, and S. J. Lee. 2012. Amniotic fluid-derived stem cells in regenerative medicine research. *Arch. Pharm. Res.* 35: 271-280.
- Jung, J., J. H. Choi, Y. Lee, J. W. Park, I. H. Oh, S. G. Hwang, K. S. Kim, and G. J.

- 
- Kim. 2013. Human placenta-derived mesenchymal stem cells promote hepatic regeneration in CCl₄-injured rat liver model via increased autophagic mechanism. *Stem cells* 31: 1584-1596.
- Kagami, H., H. Agata, and A. Tojo. 2011. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for bone tissue engineering: basic science to clinical translation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43: 286-289.
- Kefalopoulou, Z., M. Politis, P. Piccini, N. Mencacci, K. Bhatia, M. Jahanshahi, H. Widner, S. Rehncrona, P. Brundin, A. Björklund, O. Lindvall, P. Limousin, N. Quinn, and T. Foltynie. 2014. Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease - two case reports. *JAMA Neurol.* 71: 83-87.
- Kim, E. Y., K. B. Lee, and M. K. Kim. 2014. The potential of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane and amniotic fluid for neuronal regenerative therapy. *BMB Rep.* 47: 135-140.
- Kim, E. Y., K. B. Lee, J. Yu, J. H. Lee, K. J. Kim, K. W. Han, K. S. Park, D. S. Lee, and M. K. Kim. 2014. Neuronal cell differentiation of mesenchymal stem cells originating from canine amniotic fluid. *Human Cell* 27: 51-58.
- Kim, J., Y. Lee, H. Kim, K. J. Hwang, H. C. Kwon, S. K. Kim, D. J. Cho, S. G. Kang, and J. You. 2007. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Prolif.* 40: 75-90.
- Kim, Y. J., H. J. Park, G. Lee, O. Y. Bang, Y. H. Ahn, E. Joe, H. O. Kim, and P. H. Lee. 2009. Neuroprotective effects of human mesenchymal stem cells on dopaminergic neurons through anti-inflammatory action. *Glia* 57: 13-23.
- Knüsel, B., J. W. Winslow, A. Rosenthal, L. E. Burton, D. P. Seid, K. Nikolics, and F. Hefti. 1991. Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 961-965.
- Knusel, B., P. P. Michel, J. S. Schwaber, and F. Hefti. 1990. Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development *in vitro* by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin-like growth factors I and II. *The J. Neurosci.* 10: 558-570.
- Ko, T. L., Y. Y. Fu, Y. H. Shih, Y. H. Lin, M. H. Ko, T. W. Fu, T. Y. Lin, H. S. Hsiao, P. M. Chu, and Y. S. Fu. 2015. A high efficiency induction of dopaminergic cells from human umbilical mesenchymal stem cells for the treatment of hemiparkinsonian rats. *Cell Transplant.* 24: 2251-2262.

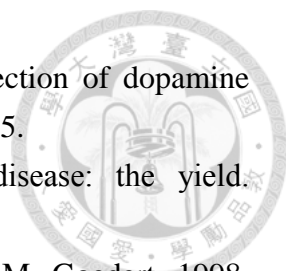
- 
- Koc, O. N., S. L. Gerson, B. W. Cooper, S. M. Dyhouse, S. E. Haynesworth, A. I. Caplan, and H. M. Lazarus. 2000. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 18: 307-316.
- Konagaya, S., and H. Iwata. 2015. Microencapsulation of dopamine neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1850: 22-32.
- Kong, X. Y., Z. Cai, L. Pan, L. Zhang, J. Shu, Y. L. Dong, N. Yang, Q. Li, X. Huang, and P. Zuo. 2008. Transplantation of human amniotic cells exerts neuroprotection in MPTP-induced Parkinson disease mice. *Brain Res.* 1205: 108-115.
- Kordower, J. H., T. B. Freeman, B. J. Snow, F. J. G. Vingerhoets, E. J. Mufson, P. R. Sanberg, R. A. Hauser, D. A. Smith, G. M. Nauert, D. P. Perl, and C. W. Olanow. 1995. Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 332: 1118-1124.
- Lai, K., B. K. Kaspar, F. H. Gage, and D. V. Schaffer. 2002. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Neurosci.* 6: 21-27.
- Langston, J. W., P. Ballard, J. W. Tetrud, and I. Irwin. 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219: 979-980.
- Larsen, K. E., Y. Schmitz, M. D. Troyer, E. Mosharov, P. Dietrich, A. Z. Quazi, M. Savalle, V. Nemani, F. A. Chaudhry, R. H. Edwards, L. Stefanis, and D. Sulzer. 2006. α -Synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. *The J. Neurosci.* 26: 11915-11922.
- Lee, R. H., M. J. Seo, R. L. Reger, J. L. Spees, A. A. Pulin, S. D. Olson, and D. J. Prockop. 2006. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 17438-17443.
- Lessner, G., O. Schmitt, S. J. P. Haas, S. Mikkat, M. Kreutzer, A. Wree, and M. O. Glocker. 2010. Differential proteome of the striatum from hemiparkinsonian rats displays vivid structural remodeling processes. *J. Proteome Res.* 9: 4671-4687.
- Lindvall, O., P. Brundin, H. Widner, S. Rehncrona, B. Gustavii, R. Frackowiak, K. L. Leenders, G. Sawle, J. C. Rothwell, C. D. Marsden, and A. Björklund. 1990. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in

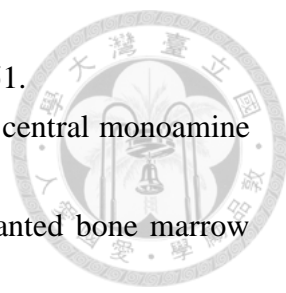
- 
- Parkinson's disease. *Science* 247: 574-577.
- Liu, T., L. Guo, Z. Liu, Y. Huang, and W. Cheng. 2011. Induction of dopaminergic neuronal-like cells from CD44⁺ human amniotic fluids that are ameliorative to behavioral recovery in a Parkinson's disease rat model. *Int. J. Mol. Med.* 28: 745-752.
- Loukogeorgakis, S. P., and P. De Coppi. 2015. Stem cells from amniotic fluid - Potential for regenerative medicine. *Best Pract. Res. Cl. Ob.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2015.08.009>.
- Marsden, C. D., and J. D. Parkes. 1977. Success and problems of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease. *The Lancet* 309: 345-349.
- Marshall, J. F., and U. Ungerstedt. 1977. Supersensitivity to apomorphine following destruction of the ascending dopamine neurons: quantification using the rotational model. *Eur. J. Pharmacol.* 41: 361-367.
- Martin-Rendon, E., D. Sweeney, F. Lu, J. Girdlestone, C. Navarrete, and S. M. Watt. 2008. 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes *in vitro* at high frequencies. *Vox. Sang.* 95: 137-148.
- Mason, I. 2007. Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Nat. Rev. Neurosci.* 8: 583-596.
- McGonigle, P. 2014. Animal models of CNS disorders. *Biochem. Pharmacol.* 87: 140-149.
- McLaughlin, D., E. Tsirimonaki, G. Vallianatos, N. Sakellaridis, T. Chatzistamatiou, C. Stavropoulou-Gioka, A. Tsezou, I. Messinis, and D. Mangoura. 2006. Stable expression of a neuronal dopaminergic progenitor phenotype in cell lines derived from human amniotic fluid cells. *J. Neurosci. Res.* 83: 1190-1200.
- Mendez, I., R. Sanchez-Pernaute, O. Cooper, A. Vinuela, D. Ferrari, L. Björklund, A. Dagher, and O. Isacson. 2005. Cell type analysis of functional fetal dopamine cell suspension transplants in the striatum and substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Brain* 128: 1498-1510.
- Mezey, E., S. Key, G. Vogelsang, I. Szalayova, G. D. Lange, and B. Crain. 2003. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 1364-1369.
- Monte, D. A. D., M. Lavasani, and A. B. Manning-Bog. 2002. Environmental factors in Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 23: 487-502.
- Moschidou, D., S. Mukherjee, M. P. Blundell, G. N. Jones, A. J. Atala, A. J. Thrasher, N. M. Fisk, P. De Coppi, and P. V. Guillot. 2013. Human mid-trimester

- 
- amniotic fluid stem cells cultured under embryonic stem cell conditions with valproic acid acquire pluripotent characteristics. *Stem Cells Dev.* 22: 444-458.
- Murphy, D. D., S. M. Rueter, J. Q. Trojanowski, and V. M. Y. Lee. 2000. Synucleins are developmentally expressed, and α -synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *The J. Neurosci.* 20: 3214-3220.
- Neto, S. C., A. Salti, Z. Puschban, N. Stefanova, R. Nat, G. Dechant, and G. K. Wenning. 2012. Cell fate analysis of embryonic ventral mesencephalic grafts in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. *PLoS ONE* 7: e50178.
- Obeso, J. A., C. W. Olanow, and J. G. Nutt. 2000. Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 23: S2-S7.
- Obeso, J. A., F. Grandas, J. Vaamonde, M. R. Luquin, J. Artieda, G. Lera, M. E. Rodriguez, and J. M. Martinez-Lage. 1989. Motor complications associated with chronic levodopa therapy in Parkinson's disease. *Neurology* 39: 11-19.
- Olanow, C. W., and W. G. Tatton. 1999. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 123-144.
- Orciani, M., C. Morabito, M. Emanuelli, S. Guarnieri, D. Sartini, S. R. Giannubilo, R. D. Primio, A. L. Tranquilli, and M. A. Mariggiò. 2011. Neurogenic potential of mesenchymal-like stem cells from human amniotic fluid: the influence of extracellular growth factors. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 25: 115-130.
- Orciani, M., M. Emanuelli, C. Martino, A. Pugnali, A. L. Tranquilli, and R. D. Primio. 2008. Potential role of culture mediums for successful isolation and neuronal differentiation of amniotic fluid stem cells. *Int. J. Immunopath. Ph.* 21: 595-602.
- Orlic, D., J. Kajstura, S. Chimenti, D. M. Bodine, A. Leri, and P. Anversa. 2001. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410: 701-705.
- Østergaard, K., N. Sunde, and E. Dupont. 2002. Effects of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in patients with severe Parkinson's disease and motor fluctuations. *Movement Disord.* 17: 693-700.
- Park, H. J., J. Y. Shin, B. R. Lee, H. O. Kim, and P. H. Lee. 2012. Mesenchymal stem cells augment neurogenesis in the subventricular zone and enhance differentiation of neural precursor cells into dopaminergic neurons in the substantia nigra of a parkinsonian model. *Cell Transplant.* 21: 1629-1640.
- Park, H. J., P. H. Lee, O. Y. Bang, G. Lee, and Y. H. Ahn. 2008. Mesenchymal stem cells therapy exerts neuroprotection in a progressive animal model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 107: 141-151.

- 
- Park, S., E. Kim, S. E. Koh, S. Maeng, W. Lee, J. Lim, I. Shim, and Y. J. Lee. 2012. Dopaminergic differentiation of neural progenitors derived from placental mesenchymal stem cells in the brains of Parkinson's disease model rats and alleviation of asymmetric rotational behavior. *Brain Res.* 1466: 158-166.
- Park, S., K. S. Lee, Y. J. Lee, H. A. Shin, H. Y. Cho, K. C. Wang, Y. S. Kim, H. T. Lee, K. S. Chung, E. Y. Kim, and J. Lim. 2004. Generation of dopaminergic neurons *in vitro* from human embryonic stem cells treated with neurotrophic factors. *Neurosci. Lett.* 359: 99-103.
- Parkinson, J. 2002. An essay on the shaking palsy. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 14: 223-236.
- Peng, S. Y., Y. H. Chen, C. J. Chou, Y. H. Wang, H. M. Lee, W. T. K. Cheng, S. W. S. Shaw, and S. C. Wu. 2014. Cell fusion phenomena detected after in utero transplantation of Ds-red-harboring porcine amniotic fluid stem cells into EGFP transgenic mice. *Prenat. Diagn.* 34: 487-495.
- Perrier, A. L., V. Tabar, T. Barberi, M. E. Rubio, J. Bruses, N. Topf, N. L. Harrison, and L. Studer. 2004. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 12543-12548.
- Pfeiffer, S., and D. McLaughlin. 2010. *In vitro* differentiation of human amniotic fluid-derived cells: augmentation towards a neuronal dopaminergic phenotype. *Cell Biol. Int.* 34: 959-967.
- Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, E. Leroy, S. E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E. S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W. G. Johnson, A. M. Lazzarini, R. C. Duvoisin, G. D. Iorio, L. I. Golbe, and R. L. Nussbaum. 1997. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045-2047.
- Pozzobon, M., M. Piccoli, and P. De Coppi. 2014. Stem cells from fetal membranes and amniotic fluid: markers for cell isolation and therapy. *Cell Tissue Bank.* 15: 199-211.
- Prusa, A. R., and M. Hengstschläger. 2002. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. *Med. Sci. Monit.* 8: RA253-257.
- Prusa, A. R., E. Marton, M. Rosner, D. Bettelheim, G. Lubec, A. Pollack, G. Bernaschek, and M. Hengstschläger. 2004. Neurogenic cells in human amniotic fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 191: 309-314
- Prusa, A. R., E. Marton, M. Rosner, G. Bernaschek, and M. Hengstschläger. 2003. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell

- research? *Hum. Reprod.* 18: 1489-1493.
- Rangel-Barajas, C., I. Coronel, and B. Florán. 2015. Dopamine receptors and neurodegeneration. *Aging Dis.* 6: 349-368.
- Ratcliffe, E., K. E. Glen, M. W. Naing, and D. J. Williams. 2013. Current status and perspectives on stem cell-based therapies undergoing clinical trials for regenerative medicine: case studies. *Brit. Med. Bull.* 108: 73-94.
- Robinton, D. A., and G. Q. Daley. 2012. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481: 295-305.
- Rodriguez-Oroz, M. C., J. A. Obeso, A. E. Lang, J. L. Houeto, P. Pollak, S. Rehncrona, J. Kulisevsky, A. Albanese, J. Volkmann, M. I. Hariz, N. P. Quinn, J. D. Speelman, J. Guridi, I. Zamarbide, A. Gironell, J. Molet, B. Pascual-Sedano, B. Pidoux, A. M. Bonnet, Y. Agid, J. Xie, A. L. Benabid, A. M. Lozano, J. Saint-Cyr, L. Romito, M. F. Contarino, M. Scerrati, V. Fraix, and N. V. Blercom. 2005. Bilateral deep brain stimulation in Parkinson's disease: a multicentre study with 4 years follow-up. *Brain* 128: 2240-2249.
- Rosner, M., M. Mikula, A. Preitschopf, M. Feichtinger, K. Schipany, and M. Hengstschläger. 2012. Neurogenic differentiation of amniotic fluid stem cells. *Amino Acids* 42: 1591-1596.
- Sachs, C., and G. Jonsson. 1975. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem. Pharmacol.* 24: 1-8.
- Sauer, H., and W. H. Oertel. 1994. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59: 401-415.
- Schober, A. 2004. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 318: 215-224.
- Schultz, W., and U. Ungerstedt. 1977. Striatal cell supersensitivity to apomorphine in dopamine-lesioned rats correlated to behaviour. *Neuropharmacology* 17: 349-353.
- Schüpbach, W. M. M., N. Chastan, M. L. Welter, J. L. Houeto, V. Mesnage, A. M. Bonnet, V. Czernecki, D. Maltete, A. Hartmann, L. Mallet, B. Pidoux, D. Dormont, S. Navarro, P. Cornu, A. Mallet, and Y. Agid. 2005. Stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease: a 5 year follow up. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 76: 1640-1644.
- Schwartz, R. K. W., and J. P. Huston. 1996. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog. Neurobiol.* 50: 275-331.

- 
- Shintani, A., N. Nakao, K. Kakishita, and T. Itakura. 2007. Protection of dopamine neurons by bone marrow stromal cells. *Brain Res.* 1186: 48-55.
- Spatola, M., and C. Wider. 2014. Genetics of Parkinson's disease: the yield. *Parkinsonism Relat. D.* 20S1: S35-S38.
- Spillantini, M. G., R. A. Crowther, R. Jakes, M. Hasegawa, and M. Goedert. 1998. α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 6469-6473.
- Stefanis, L. 2012. α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4: a009399.
- Strömberg, I., P. Almqvist, M. Bygdeman, T. E. Finger, G. Gerhardt, A. C. Granholm, T. J. Mahalik, A. Seiger, L. Olson, and B. Hoffer. 1989. Human fetal mesencephalic tissue grafted to dopamine-denervated striatum of athymic rats: light- and electron-microscopical histochemistry and in viva chronoamperometric studies. *J. Neurosci.* 9: 614-624.
- Takahashi, K., and S. Yamanaka. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.
- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872.
- Tan, L. C. S. 2013. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol. Asia* 18: 231-238.
- Terada, N., T. Hamazaki, M. Oka, M. Hoki, D. M. Mastalerz, Y. Nakano, E. M. Meyer, L. Morel, B. E. Petersen, and E. W. Scott. 2002. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416: 542-545.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, and J. M. Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147.
- Torres, E. M., and S. B. Dunnett. 2011. 6-OHDA lesion models of Parkinson's disease in the rat. *Neuromethods* 61: 267-279.
- Trzaska, K. A., C. C. King, K. Y. Li, E. V. Kuzhikandathil, M. C. Nowycky, J. H. Ye, and P. Rameshwar. 2009. Brain-derived neurotrophic factor facilitates maturation of mesenchymal stem cell-derived dopamine progenitors to functional neurons. *J. Neurochem.* 110: 1058-1069.
- Tsai, M. S., J. L. Lee, Y. J. Chang, and S. M. Hwang. 2004. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum. Reprod.* 19: 1450-1456.
- Tsai, M. S., S. M. Hwang, Y. L. Tsai, F. C. Cheng, J. L. Lee, and Y. J. Chang. 2006. Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both

- 
- mesenchymal and neural stem cells. *Biol. Reprod.* 74: 545-551.
- Ungerstedt, U. 1968. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 5: 107-110.
- Vassilopoulos, G., P. R. Wang, and D. W. Russell. 2003. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422: 901-904.
- Wang, J., X. Wang, Z. Sun, X. Wang, H. Yang, S. Shi, and S. Wang. 2010. Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. *Stem Cells Dev.* 19: 1375-1383.
- Wang, X., H. Willenbring, Y. Akkari, Y. Torimaru, M. Foster, M. Al-Dhalimy, E. Lagasse, M. Finegold, S. Olson, and M. Grompe. 2003. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422: 897-901.
- Weng, S. J., C. Y. Shiue, W. S. Huang, C. Y. Cheng, S. Y. Huang, I. H. Li, C. C. Tao, T. K. Chou, M. H. Liao, Y. P. Chang, and K. H. Ma. 2013. PET imaging of serotonin transporters with 4-[¹⁸f]-adam in a Parkinsonian rat model. *Cell Transplant.* 22: 1295-1305.
- Wirdefeldt, K., H. O. Adami, P. Cole, D. Trichopoulos, and J. Mandel. 2011. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur. J. Epidemiol.* 26: S1-S58.
- Wolters, E. C. 2007. Deep brain stimulation and continuous dopaminergic stimulation in advanced Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. D.* 13: S18-S23.
- Wood-Kaczmar, A., S. Gandhi, and N. W. Wood. 2006. Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. *Trends Mol. Med.* 12: 521-528.
- Ye, W., K. Shimamura, J. L. R. Rubenstein, M. A. Hynes, and A. Rosenthal. 1998. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93: 755-766.
- Yee, J. Z., K. W. Oh, and S. H. Kim. 2015. Stem cell therapy for neurodegenerative diseases. *Hanyang Med. Rev.* 35: 229-235.
- Young, R. A. 2011. Control of the embryonic stem cell state. *Cell* 144: 940-954.
- Zhang, S. C., M. Wernig, I. D. Duncan, O. Brüstle, and J. A. Thomson. 2001. *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19: 1129-1133.
- Zhao, H. E., J. J. Li, C. H. Zhen, L. Y. Feng, and X. Y. Ding. 2006. Effect of leukemia inhibitory factor on embryonic stem cell differentiation: implications for supporting neuronal differentiation. *Acta Pharm. Sinic.* 27: 80-90.
- Zheng, Y. M., X. E. Zhao, and Z. X. An. 2010. Neurogenic differentiation of EGFP gene transfected amniotic fluid-derived stem cells from pigs at intermediate and late gestational ages. *Reprod. Dom. Anim.* 45: e78-e82.