

東海大學生命科學系

博士論文

使用陰道纖維母細胞製造組織工程人工筋膜以應用於
骨盆重建手術

**Tissue-engineered fascia from vaginal fibroblasts for
patients needing reconstructive pelvic surgery**

指導教授：鄭 蕙 博士

Vie Cheng, PhD

研究生：洪滿榮

Man-Jung Hung

中華民國九十九年五月三十一日

東海大學生命科學系
博士論文學位考試審定書

生命科學系博士班研究生 洪滿榮 君所撰寫之論文

使用陰道纖維母細胞製造組織工程人工筋膜以應用於骨盆重建手術

Tissue-engineered fascia from vaginal fibroblasts for patients needing
reconstructive pelvic surgery

經本委員會審定通過，特此證明。

學位考試委員會

召集人

劉意雯

(簽名)

委員

鄭如威

蔡云真

薛建麟

傅甫州

中華民國 99 年 5 月 31 日

目錄

I. <u>使用陰道纖維母細胞製造組織工程人工筋膜以應用於骨盆重建</u>	
<u>手術</u>	
I - 1. 中文摘要.....	6
I - 2. 英文摘要.....	8
I - 3. 前言.....	11
I - 4. 研究目的.....	14
I - 5. 實驗材料與方法.....	15
I - 6. 結果.....	21
I - 7. 結論.....	24
I - 8. 討論.....	25
I - 9. 參考文獻.....	32
I - 10. 圖表.....	37
II. <u>人類脂肪與臍帶間質幹細胞的纖維母細胞分化研究</u>	
II - 1. 中文摘要.....	46
II - 2. 英文摘要.....	48
II - 3. 前言.....	51
II - 4. 實驗材料與方法.....	54
II - 5. 結果.....	61

II- 6. 參考文獻.....	64
II- 7. 圖表.....	66
III. <u>脂肪與臍帶間質幹細胞之胰島素分泌細胞分化的研究</u>	
III- 1. 中文摘要.....	74
III- 2. 英文摘要.....	76
III- 3. 前言.....	78
III- 4. 實驗材料與方法.....	81
III- 5. 結果.....	83
III- 6. 參考文獻.....	85
III- 7. 圖表.....	87
IV. <u>個人資料</u>	93
V. <u>已發表論文</u>	98

Part I

使用陰道纖維母細胞製造組織工程人工筋膜以應用於

骨盆重建手術

**Tissue-engineered fascia from vaginal fibroblasts for patients
needing reconstructive pelvic surgery**

I - 1. 中文摘要

前言與研究假說

當今修復骨盆腔生殖器脫垂(POP)的盆底重建外科手術是利用合成網膜來增加手術效用的，但這個方法卻因網膜露出陰道的副作用而未能符合臨床需求。我們的假設是，若能以組織工程發展出一種具有吸收力的支架以及自體先驅/幹細胞的筋膜同等物，在手術過程中將其移植就能形成適當的結締組織並達到組織再生的功效。

方法

自十名子宮切除病患的人類陰道纖維母細胞(HVFs)於體外根據其細胞型態、膠原含量、增殖潛力、以及與聚丙烯人工網膜共同培養時的佔領能力將其分類。接著，我們用適合的 HVF 與具有吸收力的聚乳酸聚甘醇酸網膜於體外製造出一筋膜同等物並評估了這個產物於移植至實驗裸鼠皮下後的組織型態。另一方面，我們也以未植入細胞的術用網膜移植至相同的實驗裸鼠皮下作為控制組。

結果

經培養的 HVF 分成高細胞膠原 I/III 比例(n=6)以及低細胞膠原 I/III 比例(n=4)。高細胞膠原 I/III 比例 HVF 細胞具備較高的細胞增殖潛力並且與人工網膜共同培養時較能成功佔領人工網膜，而其中的差異性是具有統計意義的($p < 0.05$)。大多的高細胞膠原 I/III 比例 HVF

細胞在正常的共同培養條件下可在約莫六周內完全佔領人工網膜。然而，運用組織工程的技術後，可將合成高 HVF 細胞性的細胞植入支架的時間縮短為五天。支架經移植後，能形成組織完整的類筋膜樣組織，以 DiI 標示的 HVF 在術後 12 周仍能偵測得到。相較之下，控制組的人工網膜因為未經細胞植入的過程，手術結果較為不良也反映出了目前的臨床經驗中常見的副作用。

結論

我們建議以測試細胞膠原 I/III 的比例作為一種辨識具有醫療用潛力的 HVF 的新興方法。我們的實驗發現同時證實組織工程技術的運用在未來的 POP 治療中的曙光。

I - 2. Abstract

Introduction and hypothesis

The current status of using synthetic meshes to augment the effectiveness of reconstructive pelvic surgery for repairing pelvic organ prolapse (POP) does not meet the clinical expectation due to newly onset bothersome complications such as vaginal mesh erosion. We hypothesize it may be beneficial to develop a tissue-engineered fascia-equivalent with absorbable scaffold and autologous progenitor/stem cells that can be transplanted during operation and contribute to tissue regeneration by forming appropriate connective tissue.

Methods

Human vaginal fibroblasts (HVF) from 10 patients undergoing vaginal hysterectomy were characterized in vitro in regard to their cell morphology, collagen contents, proliferation potential and the occupying ability of polypropylene mesh on co-culture. Subsequently, we used eligible HVFs and the absorbable PLGA mesh to fabricate a fascia-equivalent in vitro and evaluated the histological outcomes after the subcutaneous transplantation of it in experimental nude mice.

Meanwhile, a controlled implantation of surgical meshes without cell-seeding was conducted in the same animals for comparison.

Results

The cultured HVFs were classified into groups with either high (n=6) or low (n=4) cellular collagen I/III ratios. HVFs of high ratios expressed better cell proliferation potential and occupying ability of mesh on co-culture than those of low ratios, and the difference is statistically significant ($p < 0.05$). It took about six weeks for most of HVFs with high collagen I/III ratios to fully occupy the mesh under normal co-culture condition. However, by using tissue-engineering techniques, the fabrication time of a HVFs-seeded scaffold with high cellularity could be shortened to within five days. The subsequent transplantation of the scaffold resulted in the formation of a well-organized fascia-like tissue with DiI-labeled HVFs could still be traced up to 12 weeks after. In contrast, the controlled implantation of surgical meshes without cell-seeding resulted in inferior outcomes that somehow reflected the current clinical experience.

Conclusions

We suggest that the analysis of cellular collagen I/III ratios may be a

novel method for identifying HVFs eligible for a potential therapeutic application. Our findings also support the promise of using tissue-engineering techniques for treatment of POP in the future.

I - 3. 前言

骨盆腔生殖器脫垂(POP)為影響女性生活的一種常見疾病。罹患 POP 的女性長期遭受骨盆疼痛、小便失禁、性功能異常、以及社會隔離之苦。而必須接受手術以矯正 POP 或小便失禁的風險為 11%，其中 30%的病患必須經歷不只一次的手術矯正[1]。儘管此疾病如此盛行，其背後的病理生理學機轉卻尚未明確。長久以來的猜測是陰道中出現了一種結構缺陷而其結締組織就是婦女好發 POP 的機轉之一[2]。在意圖改善手術後結果以及減少 POP 復發的前提下，許多合成材質的運用正逐漸增加中。第一類非吸收性聚丙烯人工網膜為目前之首選。在我們先前的研究中，末期及復發的陰道前壁脫垂中，運用聚丙烯人工網膜進行陰道前壁修補術的成功率高達 87%。然而，卻有 10.5%的機率會發生網膜露出陰道的情況，16.7%的機率會再度產生應力性尿失禁的情況[3]。Silva 及 Karram 重新探討文獻後，建議陰道重建手術中合成材質的運用因有網膜露出陰道的風險故仍需長期的進一步研究[4]。Baessler 及 Maher 也發現相較於那些高成功率的小規模研究來看，有越來越多的案例中記載著許多副作用如網膜腐蝕外露(高達 26%)、性交困難(高達 38%)、感染、排斥、及其他疼痛症狀，這些都需要更多的手術才能矯正並常常必須在手術中將移植的網膜完全移除[5]。美國食品及藥物管理局最近開始提醒警告民眾使用合

成網膜治療 POP 的可能副作用，並建議病患最好在手術前與醫師詳盡討論產生副作用的風險並且在術後若有任何副作用都應與 FDA 連絡[6]。

改用具有吸收力的合成網膜或生物移植物或許較有利，但後續研究並未證實其效用及安全性是否更為優異。最近的後設分析資料顯示陰道前壁之修復中，曾有短期的證據顯示使用網膜/移植物相較於未使用網膜/移植物的治療是能明顯降低脫垂的復發機率(相對風險 0.48, 95% CI 0.32–0.72)。非吸收性合成網膜(復發機率 8.8%, 48/548)相較於吸收性合成網膜(復發機率 23.1%, 63/273)以及生物移植物(復發機率 17.9%, 186/1041)的復發機率明顯較低；但以腐蝕外露的機率而言非吸收性合成網膜(外露機率 10.2%, 68/666)的機率卻高於吸收性合成網膜(外露機率 0.7%, 1/147)以及生物移植物(外露機率 6.0%, 35/581)[7]。因此，生物材料於骨盆重建手術中的應用可能會成為潮流，但目前仍未找到適當的材質。

目前生殖泌尿道重建的領域中正發展著再生藥物的效用。再生藥物的原理包括細胞移植、材料科學、以及組織工程技術的應用以製造能夠使患有疾病之受損組織或器官的生物替代品用以回復並維持其正常功能。De Filippo et al. 首先示範了體內陰道組織工程，他所使用的為來自母兔的陰道上皮細胞以及平滑肌細胞[8]。Atala et al. 以組織

工程自體膀胱移植成功的治療了七位需要膀胱成形術的病患[9]。近日，以尿道注射自體幹細胞及母細胞來治療女性 SUI 的方式已進入了臨床試驗的階段[10, 11]。然而，對於 POP 治療中再生藥物的使用，目前尚未突破。

我們假設可以發展出一種以組織工程技術植入自體先驅/幹細胞且具備生物相容性以及吸收性的支架。移植這種活化的支架來治療 POP 可能藉由生成適當的結締組織進而達到組織再生的結果。在此之前，必須先了解膠原的代謝過程是否會因陰道母細胞的缺陷而受損。若 POP 病患因其基因背景而導致自體母細胞無法生成品質良好的細胞外間質，可考慮使用同種異體的幹細胞。截至目前為止，POP 病患陰道纖維母細胞的相關資料很少。Poncet et al. 記載了子宮及陰道脫垂之婦女的陰道肌纖維母細胞欠缺伸縮性[12]。

在目前的研究中，我們希望能藉此(1)於體外分析罹患 POP 婦女陰道纖維母細胞之細胞型態、膠原含量、增殖潛力、以及與聚丙烯人工網膜共同培養時的佔領能力；(2)用 POP 患者適當的陰道纖維母細胞以組織工程技術於體外製造出筋膜同等物；(3)評估實驗動物中組織工程技術所製造之筋膜同等物移植至皮下後的組織型態以及未植入細胞的術用網膜移植至皮下後的組織型態。最後，我們的結果顯示未來 POP 治療中組織工程技術的運用很有希望。

I - 4. 研究目的

1. 於體外分析人類陰道纖維母細胞。了解來自 POP 病患之陰道母細胞是否能做為組織工程的細胞來源是很重要的，篩選合適之細胞也有特定之標準。
2. 於體外運用適當的人類陰道母細胞以組織工程製造出筋膜同等物。為了未來臨床上的運用，我們希望能發展出一種可在短期之內移植的筋膜同等物。
3. 評估實驗動物中組織工程技術所製造之筋膜同等物移植至皮下以及其他移植控制組的組織型態。其中的科學發現或許會有臨床意義。

I - 5. 實驗材料與方法

組織採集與細胞培養

三名罹患子宮良性腫瘤之病患(病患一、病患二與病患十)以及七名罹患重度骨盆器官脫垂之病患(病患三至病患九)於陰道子宮切除術的過程中自後陰道斷端進行了全層陰道壁的採集。組織檢體於採集後立即以磷酸鹽緩衝液(PBS)以洗淨血液之污染，然後再將其剪小。將陰道壁檢體以 2 mg/ml 的第一型膠原蛋白酶(Gibco, 紐約, USA)在 37°C 的溫度中隔夜處理酵素消化出人類陰道纖維母細胞(HVFs)。分離出之 HVF 之後於添加 10%胎牛血清(FBS, Gibco, 紐約, USA)以及 1%青黴素-鏈黴素溶液(Gibco, 紐約, USA)的 DMEM(Dulbecco' s Modified Eagle Medium, Gibco, NY, USA)培養基於培養瓶中培養。常規培養及實驗所需之 HVF 於 37°C 含有 5% CO₂、95%空氣、以及 99%相對濕氣條件下的培養箱中培養，每兩天更換培養基。之後的實驗使用的為第二或第三代的 HVF。所有牽涉人體的流程都經所有受測對象之同意，並為台中榮民總醫院醫學研究倫理委員會所核准，所有受測人皆簽署了同意書。

細胞型態與表現分類

將人類陰道母細胞培養於 24 槽培養盤底部的圓形玻璃上。HVF

在 4°C 以甲醇固定 15 分鐘，並用 PBS 沖洗三次。接著，加入老鼠抗人類母細胞表面蛋白(1:200, abcam, 劍橋, U.K.)在 4°C 中隔夜培養。以 PBS 沖洗三次後，在室溫中加入 FITC 標幟之山羊抗老鼠 IgG(1:200, Molecular Probes, U.S.)等待兩小時，之後再以 4',6-聯脒-3-苯吡啶二鹽酸鹽(DAPI)的核染料在室溫中染色 10 分鐘。玻片以 Prolong® Gold 抗熒光衰減封片劑(Invitrogen, Carlsbad, CA.)封片。以顯微鏡與螢光顯微鏡(蔡司 Axiovert 200M, Oberkochen, 德國)觀察個別的 HVF 之細胞型態及表現。

第一型及第三型細胞膠原分析

免疫染色

HVF 於六槽培養盤中培養以冰冷 PBS 沖洗三次並以冰冷甲醇固定 5 分鐘。HVF 於添加 1%牛血清白蛋白(DMEM, Gibco, 紐約, USA)的 PBS 中培養後以 PBS 沖洗三次用以阻斷非專一性之結合。HVF 與抗老鼠抗人類第一型膠原蛋白 (1:200, Sigma, USA)以及山羊抗人類第三型膠原蛋白(1:200, Sigma, USA) 初級抗體在 4°C 的條件下隔夜培養。再加入 FITC 標幟之山羊抗老鼠 IgG(1:200) 以及 FITC 標幟之兔子抗山羊 IgG(Molecular Probes, U.S.)二級抗體於室溫中培養兩小時。玻片以 Prolong® Gold 抗熒光衰減封片劑(Invitrogen, Carlsbad, CA.)

封片。以顯微鏡與螢光顯微鏡(蔡司 Axiovert 200M, Oberkochen, 德國)觀察個別的 HVF 之細胞型態及表現。

西方點墨分析

以 8% 聚丙烯醯胺膠電泳分離出等量的蛋白質並轉印到 PVDF(polyvinylidene difluoride)轉漬膜(Millipore, MA, U.S.)。轉漬膜於室溫中用含有 5%牛血清白蛋白之 PBS 阻斷一小時。之後轉漬膜再加入初級抗體溶液於 4°C 中隔夜培養。轉漬膜以 PBS 沖洗過後，與結合辣根過氧化氫酶(HRP)的次級抗體於室溫下共同培養一小時。以 ECL 冷光基質(Perkain Elmer, Boston, U.S.)與 Fujifilm E1000 成像系統偵測訊號。資料以 Fujifilm Image Gauge V4.0 (Fuji film Science Lab 2001)分析。西方墨點分析所用之抗體為老鼠抗人類第一型膠原蛋白(1:1000, Sigma, USA)、山羊抗人類第三型膠原蛋白(1:1000, Sigma, USA)、結合 HRP 的山羊抗老鼠次級抗體(1:4000, Sigma, USA)、以及結合 HRP 兔子抗山羊次級抗體(1:4000, Sigma, USA)。

細胞生長動力學決定

HVF 於 24 槽培養盤中以每槽 2×10^4 個細胞的密度植入後待 90 分鐘讓細胞進行黏附。在 0 時以位相差顯微鏡在五個視角隨機拍攝培養

盤。於 12、24、48、及 72 時，將細胞預冷，即在 4°C 下反應 30 分鐘，以甲醇固定 5 分鐘，再以 DAPI 進行核染色。算出個別時間點的 HVF 平均細胞數量。HVF 數量於不同時間點所增加的百分比是以個別時間點(12、24、48 與 72 小時)的細胞數量除以 0 時的細胞而得。HVF 的細胞增加百分比與培養時間製成生長曲線。實驗在取自個別病患的細胞中皆重複三次。

HVF 與聚丙烯人工網膜之共同培養

為了解 HVF 於聚丙烯人工網膜上的生長動力學，將 6.25×10^5 的 HVF 細胞與 1.2 cm^2 的聚丙烯人工網膜於 24 槽培養盤中共同培養。將被 HVF 佔領之網膜孔洞隨機拍攝(蔡司 Axiovert 200M, Oberkochen, Germany)並每周計算數量。紅色的部份為全部的網膜孔洞而藍色部分為 HVF 所佔領之網膜孔洞(圖 2A)。紅色及藍色部份之大小以 Fuji Image Gauge Version 4.0 (Fuji film Science Lab 2001)的程式評估。網膜之佔領比例以下列方程式算出：藍色/紅色=網膜孔洞佔領比例(圖 3A)。

體外製造組織工程筋膜同等物

製備過程是以 Nakanishi et al [13]之方法修訂而成。簡而言之，將

1. 5 ml 的冰凍豬第一型膠原蛋白溶液(BD Bioscience, Bedford, U.S.)、0.5ml 的 5.7×DMEM (Gibco, NY, USA)、0.5ml HEPES、0.25ml NaHCO₃、50μl CaCl₂、以及 50μl 0.1 N NaOH 混合製備一膠原蛋白膠。37°C 的條件下在膠尚未與薄膜聚合前，將加 HVF 懸浮液(將 23.3% FBS(Gibco, NY, USA)添加於 5×10⁵ 細胞/ml 在 2.15 ml 的 1×DMEM 中)加入膠原蛋白溶液(最終膠原蛋白濃度為 1.1 mg/ml)中。之後將此含有膠原蛋白的 HVF 溶液應用於可生物分解的 PLGA 網膜上(Ethicon, Edinburgh, UK)。1×10⁶ 個 HVF 細胞先依照製造商所指示之方式以 1:200 稀釋的二烷基碳花青螢光溶液(Vybrant® DiI, Molecular Probes, U.S.)標訂。含有膠的 HVF 聚合後，添加含有 10% FBS 以及抗壞血酸(最終濃度：50 ng/ml)的 DMEM。HVF 植入多孔性支架(筋膜同等物)在標準培養條件下深層培養五天後才進行動物試驗。取自各個病人的 HVF 製備了三組(每組四片)筋膜同等物。未經 HVF 細胞植入的 PLGA 網膜混以膠原蛋白膠為控制組。

移植物移植與組織採集

動物試驗是根據本機構的動物研究實驗委員會所公佈之標準流程進行。移植物於八週大地裸鼠背上進行皮下移植。每之裸鼠都同時移植 HVF 細胞植入筋膜(左側)與無細胞植入筋膜(右側)。動物於移植

後的第 2、4、8、及 12 周進行宰殺。

組織學分析

所有檢體皆以福馬林固定並以石蠟封片。組織切片用以組織學觀察。所有玻片經彩色數位相機拍攝後數位化並使用影像軟體處理 (Spot, version 2.1, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, Michigan)。

使用螢光顯微鏡(蔡司 Axiovert 200M, Oberkochen, 德國)以 546/590 nm 激發濾鏡觀察局部的 Dil 標幟細胞。細胞核以 DAPI 對比染色，HVF 同時以 Dil 進行辨識。

統計分析

以配對學生氏 T 檢定進行統計分析。統計顯著性訂為 $P < 0.05$ 。

I - 6. 結果

陰道組織檢體自十位病患取得。病患之平均年齡為55.5歲(介於40-69歲之間)而POP病程中間點為2(介於0-3之間)。培養出的HVF純度相當高並於二代及三代時皆表現均勻生長及典型的細胞型態。HVF之表現型又以母細胞表面蛋白之免疫染色做了進一步的鑑定(圖一)。第一型與第三型膠原蛋白透過免疫染色及西方墨點法鑑定。採集自十名變換之HVF依據西方墨點法之結果被分為兩組：高膠原蛋白I/III比例(比例 >1.0 ；病患一、二、五、六、七、十； $n=6$)；或低膠原蛋白I/III比例(比例 <1.0 ；病患3、4、8、9； $n=4$)(圖2A、2B、以及2C)。高膠原蛋白I/III比例組之膠原蛋白I/III比例之平均為 1.26 ± 0.08 而低膠原蛋白I/III比例組之膠原蛋白I/III比例之平均為 0.56 ± 0.13 。高膠原蛋白比例之HVF再72小時的次培養後相較於低膠原蛋白比例之HVF具有顯著較高的細胞增值潛力(7.83 ± 1.18 對上 3.12 ± 0.96 、 $P<0.01$ ；圖2D)。十名病患HVF之膠原蛋白I/III比例以及生長比例的臨床資料彙整於表一。

取自十名中的七名病患(病患一、二、三、五、六、七、十)之HVF量足而得以應用於接下來的聚丙烯網膜共同培養實驗。然而取自其他三名病患(病患四、八、九)的HVF卻不足夠。取自六名病患(病患一、二、五、六、七、十)的高膠原蛋白I/III比例組HVF花了大約六週即完

全佔領網膜。然而來自病患三的低膠原蛋白I/III比例HVF卻未能完全佔領網膜。以顯微鏡觀察到，在共同培養初期時，大多的HVF皆穿過網膜孔洞並與網膜產生些許連結。在黏附網膜纖維後，HVF及細胞外間質自周圍延伸到了開口的中心點(圖3A及3B)。佔領網膜之量性資料做了分析。在第一、二、三、四、五、六周的共同培養佔領比例分別為 $2.0 \pm 0.95\%$ 、 $45.7 \pm 7.8\%$ 、 $70.2 \pm 8.4\%$ 、 $91.7 \pm 4.3\%$ 、 $94.8 \pm 4.3\%$ 、以及 $99.2 \pm 0.9\%$ (圖3C)。

取自罹患具症狀之POP的三名病患(病患五、六、七)其高膠原蛋白I/III HVF於特定培養條件下表現出高增殖潛力及網膜佔領能力。這些HVF之後於接下來的實驗中於體外合成組織工程筋膜同等物。以顯微鏡觀察合成初期時，HVF出現於PLGA網膜開口上的膠原蛋白膠(圖4A與4A1)。體外培養五天後，即採集富含細胞分佈均勻之組織工程筋膜同等物(圖4B與4B1)。同時利用螢光顯微鏡在體外培養五天後觀察組織工程筋膜同等物中以Dil標幟的HVF(圖4C)。圖5A-D顯示皮下移植後十二周的組織工程筋膜同等物的組織學結果。完整覆蓋網膜同的新筋膜形成在三組移植當中皆可見。新形成的筋膜組織為平滑多層結構(圖5C)或組織良好具備豐富細胞量之薄層結構，兩者皆與宿主本身的組織有所融合(圖5D)。相較於結果成功的體內組織工程筋膜同等物移植，控制組三組欠缺細胞植入的膠原蛋白膠包覆之PLGA網膜中

只有一組形成了邊界清楚的新生組織(圖5E-H)。然而，新組織的結構較無組織，不均勻，上面分布的細胞也零零落落(圖5G)。同時在控制組中，沒有明顯形成新組織的部位，可見含有發炎細胞的肉芽腫(圖5H)。除此之外，體內移植組織工程筋膜同等物後所形成的新筋膜於螢光顯微鏡下觀察Dil標幟之HVF時，被認定與人體自生組織相等(圖6A與6B)。同時，以膠原蛋白特殊染色後發現新筋膜中的膠原成分含量也相當高(圖6C)。

I - 7. 結論

總結來說，我們建議使用細胞膠原蛋白I/III之比例來作為篩選試驗作為HVF於再生醫學中進行治療應用的篩選試驗。高膠原蛋白I/III比例(>1.0)組的HVF表現出高度增殖潛能以及網膜佔領能力並為治療POP的組織工程中的候選細胞。另一方面，也應找出具有低膠原蛋白I/III比例(<1.0)的HVF而無法使用此治療之病患的其他治療選擇或是替代細胞來源。體內移植組織工程筋膜同等物所得到的組織良好新筋膜形成為相當成功的案例，這也代表著前途光明的POP未來治療方案。

I - 8. 討論

以我們目前的認知來判斷，這是第一個能成功於體內合成含有良好HVF的組織工程筋膜。我們發現培養出的高膠原蛋白I/III比例(>1.0)組的HVF相較於低高膠原蛋白I/III比例(<1.0)組表現出高度增殖潛能以及網膜佔領能力。接著，我們使用採集自罹患具症狀POP病患的高膠原蛋白I/III比例的HVF來合成組織工程筋膜同等物。接著將這些組織工程筋膜同等物皮下移植至實驗裸鼠中得到了組織良好新筋膜的 formed，而此筋膜也證實可視為與人類組織同源。

人類纖維母細胞容易取得，容易培養，也容易於體外增殖，這就代表人類纖維母細胞為再生醫學中的理想細胞來源。在此研究中，我們發現將HVF次培養至第二及第三繼代可得到具有典型細胞型態的同質細胞。將這些次培養的HVF用以發展出組織工程筋膜同等物以增強修復POP骨盆重建手術後的陰道支持或懸吊組織是個相當有希望的治療方法。相較之下，De Filippo et al.所使用的為陰道上皮細胞及來自母兔的平滑肌細胞來合成第一個體內組織工程陰道組織。然而，其作用針對矯正先天陰道異常以及泄殖腔畸型[8]。最近，有一些臨床試驗以自體纖維母細胞作為細胞治療之用。Weiss et al. 進行了一項研究展示注射自體纖維母細胞來治療不同的臉型缺陷之有效性及安全性[14]。Mitterberger et al.使用了雙重注射將自體肌母細胞及纖維母

細胞注射於123名婦女以治療SUI。在超因波的引導下分別將將纖維母細胞注射至尿道黏膜下層並將肌母細胞注射至尿道括約肌細胞後，有79%知病患在一年後的追蹤檢查中顯示為痊癒[10]。

我們最新的發現顯示具有高細胞膠原蛋白I/III比例(> 1.0)相較於低比例(<1.0)的HVF組別表現出顯著的高增殖潛力以及高網膜佔領能力。然而，體外與罹患POP女性(體內)的纖維母細胞的增殖與膠原蛋白代謝之改變仍需進一步的探討。截至目前為止，對於HVF的膠原蛋白代謝之研究有限。Makinen et al. [15] 研究了患有POP病患的纖維母細胞經培養後之膠原蛋白合成率與膠原纖維原的mRNA量。他們發現這些纖維母細胞的膠原蛋白合成率等同、甚至高於同年齡對照組的膠原蛋白合成率。他們的研究發現顯示POP並不會對陰道纖維母細胞合成或處理膠原纖維原能力有所損害。然而，他們在研究中卻也無法排除膠原亞型可能的質性變化。另外，罹患腹股溝疝氣病患中的皮膚纖維母細胞之膠原合成已有透徹的相關研究。POP被認為與疝氣的情況擁有病理學上的相似性。Zheng et al. [16] 研究了來自罹患復發性腹股溝疝氣病患所培養出的皮膚纖維母細胞，他發現其膠原纖維原mRNA I/III(0.75 ± 0.02 versus 1.74 ± 0.21 , $p < 0.01$)以及膠原蛋白I/III(1.02 ± 0.24 versus 1.69 ± 0.26 , $p < 0.01$)相較於控制組明顯減少。相對於HVF膠原蛋白代謝的有限研究，對於POP病患之陰道或骨盆組

織的膠原蛋白代謝研究不勝枚舉。Jackson et al. [17]就是第一個詳細研究POP病患中的膠原蛋白代謝過程之改變。他們分析了罹患POP婦女之陰道組織並從基質金屬蛋白酶(MMP)活性的正調節中發現POP與總膠原蛋白含量之減少以及膠原蛋白分解增加相關。這些重要的發現在近年的研究中得到了證實，同時也顯示POP與陰道及骨盆組織中膠原蛋白亞型之改變相關。其中顯示，膠原蛋白I/III比例會因為膠原蛋白III的增加以及膠原蛋白I的減少而降低。通常結締組織中膠原蛋白I/III比例的降低代表著支撐力較弱，反之亦然。

我們將HVF與聚丙烯網膜共同培養並發現佔領的過程由網膜開口之週邊延伸至中心導致生長不均的情況產生。在Chen et al.[18] 的研究中也發現類似情況，他們在進行一項膠原蛋白海綿-PLGA混合網膜與單純PLGA網膜上的人類纖維母細胞培養之比較實驗。纖維母細胞在唇PLGA網膜上由周圍纖維開始至中心生長，而膠原蛋白海綿-PLGA網膜上的生長方式則是自網膜開口之膠原蛋白海綿上生長，其生長較為均勻。網膜上生長不均的纖維母細胞以及細胞外間質可能造成網膜相關副作用如陰道腐蝕與陰道後縮[19]。因此，利用生物組件合成改良的網膜，將網膜上之孔洞填補可能有助於改善術後復原之情況並降低術後的網膜相關副作用。近來，Abed et al.使用了實驗動物來評估新的鑲嵌多醣膠的聚丙烯網膜之使用效能，得到了副作用減少

以及組織結構較為完整的結果[20]。

另一方面，使用共同培養的方式於體外合成同等於筋膜的結構顯現出品質不良且耗時(於本研究中平均耗時六周)的缺點，而這兩項缺點不利於臨床之應用。我們將Nakanishi et al. [13]的組織工程方法改良後，得以在五天內於體外合成同等於筋膜又具有高度分部以及均勻生長的細胞。組織工程技術所帶來的效能可能歸功於細胞外間質培養基之使用，例如本研究中的膠原蛋白膠，就是增加細胞與網膜多孔性多孔性支架間連結的要角。可以說在組織工程下，網膜多孔性多孔性支架提供了支撐力而細胞外間質培養基提升了細胞生長速率以及均勻分布的能力。Nakanishi et al.在其研究中成功的以組織工程合成了膀胱壁，他們將豬泌尿道上皮細胞植入膠原蛋白海綿-PLGA網膜以及平滑肌細胞植入膠原蛋白海綿-PLGA網膜多孔性多孔性支架[13]。Ananta et al. [21] 以類似方法成功的在短短七天內塑造出一個可應用且等同於增殖組織的結構成果。其組織等同物不但具有良好的細胞增殖能力同時也並未顯示任何後縮之跡象，同時也展現了均勻的細胞分部以及良好的生物相容性。

接下來的動物研究以及組織分析，我們也展現了移植組織工程筋膜等同物在全部三組的實驗中皆可存活。除此之外，新形成的筋膜組織良好並與宿主細胞融合情況良好。相較之下，膠原蛋白膠-PLGA網

膜多孔性多孔性支架於三組實驗中僅於一組中存活而其組織型態也較不優異。Salman et al.進行了一項試驗，以顯微鏡，來評估罹患POP以及未罹患POP婦女的樞紐韌帶。他們發現大多POP病患(8/10)都具有結締組織特性改變，其中包括排列鬆散的結締組織纖維以及較不緻密的細胞外間質伴隨零星分布的纖維母細胞[22]。在膠原蛋白膠-PLGA網膜多孔性支架控制植入後新生成的組織與Salman et al.所發現的影像有些許雷同。比要之下，我們的研究中體內移植筋膜同等物所新生的筋膜呈現出組織完整的薄型結構，其就如正常組織一般富含細胞及膠原蛋白成分。這些結果顯示組織工程筋膜同等物移植較傳統的網膜/移植物移植優異，組織工程筋膜同等物移植不但成功率較高同時也具有較好的組織型態。

我們體內實驗的另一項重要的組織學發現就是以Dil標幟的HVF全然的占領了體內移植組織工程筋膜同等物所形成的新生筋膜。此結果表示真正參予再生過程的為移植入體內的HVF而不是宿主自身細胞。故使用自體細胞在再生醫學中作為組織工程的應用時，應事先篩選其細胞之適合度以確保最佳結果。如同我們的實驗一樣，組織工程所適合使用的細胞為高膠原蛋白I/III比例(> 1.0)的HVF。然而，我們實驗中罹患具病徵POP的病患大多(4/7)為低高膠原蛋白I/III比例(< 1.0)的。Zong et al. [23, 24] 研究了自罹患POP婦女採集培養的骨盆纖

維母細胞並發現活化型的MMP-1及MMP-13是被伴隨增加的二氫基女性素與黃體素所抑制，這就是其保護膠原蛋白不被分解的方式。Connelle et al. [25] 示範了HOXA11的表現會促使人類纖維母細胞的增殖並抑制腫瘤抑制基因p53的表現。這些研究發現或許對於POP治療方法的選擇有所幫助。同時也顯示POP可以用自己幹細胞做治療。這些幹細胞可分化成類纖維母細胞並植入生物相容多孔性支架上以合成出筋膜同等物[26]。最近，取自人類骨髓之間葉幹細胞以顯示能夠成功分化成纖維母細胞體系的細胞[27]。

在目前的研究中，我們也進行了單純具吸收性PLGA網膜以及非吸收性聚丙烯網膜於實驗裸鼠的皮下植入。當單純植入PLGA網膜時，網膜迅速被吸收且組織形成量很低。我們的研究發現可能反應統合分析結果，指出吸收性網膜的植入在臨床上的手術成功機率雖低，但其陰道網膜腐蝕的風險最低[7]。另一方面，在實驗動物中植入非吸收性聚丙烯網膜時，造成了傷口癒合功能異常，如過度結疤以及肌膚網膜腐蝕的情況。我們的研究發現與臨床的觀察一致並且或許能有助於解釋病患惱人的症狀。

總結以上的論點，我們建議將細胞膠原蛋白I/III比例做為篩選試驗以辨識出再生醫學進行醫療所適合應用之HVF。高膠原蛋白I/III比例(>1.0)的HVF同時顯現出高度增生前能以及網膜佔領能力，可應用

於POP治療中組織工程所需細胞。另外，應替具有低膠原蛋白I/III比例(<1.0)HVF的病患尋求治療方法或替代細胞來源，因為其細胞無法應用於此治療法中。組織工程筋膜同等物在體內移植所能得到最好的組織型態為形成組織完整的新生筋膜，而這樣的結果對於POP治療的選擇帶來了光明的未來。

I - 9. 參考文獻

1. Olsen AL, Smith VJ, Bergstrom JO, Colling JC, Clark AL (1997) Epidemiology of surgically managed pelvic organ prolapse and urinary incontinence. *Obstet Gynecol* 89:501-506
2. Bump RC, Norton PA (1998) Epidemiology and natural history of pelvic floor dysfunction. *Obstet Gynecol Clin North Am* 25:723-46
3. Hung MJ, Liu FS, Shen PS, Chen GD, Lin LY, Ho ES. Factors that affect recurrence after anterior colporrhaphy procedure reinforced with four-corner anchored polypropylene mesh. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2004;15(6):399-406.
4. Silva WA, Karram MM (2005) Scientific basis for use of grafts during vaginal reconstructive procedures. *Curr Opin Obstet Gynecol* 17:519-529
5. Baessler K, Maher CF (2006) Mesh augmentation during pelvic-floor reconstructive surgery: risks and benefits. *Curr Opin Obstet Gynecol* 18:560-6
6. Dwyer PL (2009) Minimally invasive surgery in urogynecology. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 20:485–486
7. Jia X, Glazener C, Mowatt G, MacLennan G, Bain C, Fraser C, Burr

- J (2008) Efficacy and safety of using mesh or grafts in surgery for anterior and/or posterior vaginal wall prolapse: systematic review and meta-analysis. *Br J Obstet Gynaecol* 115:1350-1361
8. De Filippo RE, Yoo JJ, Atala A. Engineering of vaginal tissue in vivo (2003) *Tissue Eng* 9:301-306
 9. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB (2006) Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 367:1241-1246
 10. Mitterberger M, Marksteiner R, Margreiter E, Pinggera GM, Colleselli D, Frauscher F, Ulmer H, Fussenegger M, Bartsch G, Strasser H (2007) Autologous myoblasts and fibroblasts for female stress incontinence: a 1-year follow-up in 123 patients. *Br J Urol Int* 100:1081-1085
 11. Carr LK, Steele D, Steele S, Wagner D, Pruchnic R, Jankowski R, Erickson J, Huard J, Chancellor MB (2008) 1-year follow-up of autologous muscle-derived stem cell injection pilot study to treat stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 19:881-883

12. Poncet S, Meyer S, Richard C, Aubert JD, Juillerat-Jeanneret L. The expression and function of the endothelin system in contractile properties of vaginal myofibroblasts of women with uterovaginal prolapse. *Am J Obstet Gynecol.* 2005 Feb;192(2):426-32.
13. Nakanishi Y, Chen G, Komuro H, Ushida T, Kaneko S, Tateishi T, Kaneko M (2003) Tissue-engineered urinary bladder wall using PLGA mesh-collagen hybrid scaffolds: a comparison study of collagen sponge and gel as a scaffold. *J Pediatr Surg* 38:1781-1784
14. Weiss RA, Weiss MA, Beasley KL, Munavalli G (2007) Autologous cultured fibroblast injection for facial contour deformities: a prospective, placebo-controlled, Phase III clinical trial. *Dermatol Surg* 33:263-268
15. Mäkinen J, Kähäri VM, Söderström KO, Vuorio E, Hirvonen T (1987) Collagen synthesis in the vaginal connective tissue of patients with and without uterine prolapse. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 24:319-325
16. Zheng H, Si Z, Kasperk R, Bhardwaj RS, Schumpelick V, Klinge U, Klosterhalfen B (2002) Recurrent inguinal hernia: disease of the collagen matrix? *World J Surg* 26:401-8

17. Jackson SR, Avery NC, Tarlton JF, Eckford SD, Abrams P, Bailey AJ (1996) Changes in metabolism of collagen in genitourinary prolapse. *Lancet* 347:1658-1661.
18. Chen G, Sato T, Ohgushi H, Ushida T, Tateishi T, Tanaka J (2005) Culturing of skin fibroblasts in a thin PLGA-collagen hybrid mesh. *Biomaterials* 26:2559-2566
19. Jacquetin B, Cosson M (2009) Complications of vaginal mesh: our experience. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 20:893-896
20. Abed A, Deval B, Assoul N, Bataille I, Portes P, Louedec L, Henin D, Letourneur D, Meddahi-Pellé A (2008) A biocompatible polysaccharide hydrogel-embedded polypropylene mesh for enhanced tissue integration in rats. *Tissue Eng Part A* 14:519-527
21. Ananta M, Aulin CE, Hilborn J, Aibibu D, Houis S, Brown RA, Mudera V (2009) A poly(lactic acid-co-caprolactone)-collagen hybrid for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part A* 15:1667-1675
22. Salman MC, Ozyuncu O, Sargon MF, Kucukali T, Durukan T (2009) Light and electron microscopic evaluation of cardinal

- ligaments in women with or without uterine prolapse. *Int Urogynecol J* (in press)
23. Zong W, Zyczynski HM, Meyn LA, Gordy SC, Moalli PA (2007) Regulation of MMP-1 by sex steroid hormones in fibroblasts derived from the female pelvic floor. *Am J Obstet Gynecol* 196:349.e1-11
 24. Zong W, Meyn LA, Moalli PA (2009) The amount and activity of active matrix metalloproteinase 13 is suppressed by estradiol and progesterone in human pelvic floor fibroblasts. *Biol Reprod* 80:367-374
 25. Connell KA, Guess MK, Chen HW, Lynch T, Bercik R, Taylor HS (2009) HOXA11 promotes fibroblast proliferation and regulates p53 in uterosacral ligaments. *Reprod Sci* 16:694-700
 26. Bhatia NN, Ho MH (2004) Stem cell therapy for urinary incontinence and pelvic floor disorders: a novel approach. *Curr Opin Obstet Gynecol* 16:397–398
 27. Lee CH, Moioli EK, Mao JJ (2006) Fibroblastic differentiation of human mesenchymal stem cells using connective tissue growth factor. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 1:775-77

I - 10. 圖表

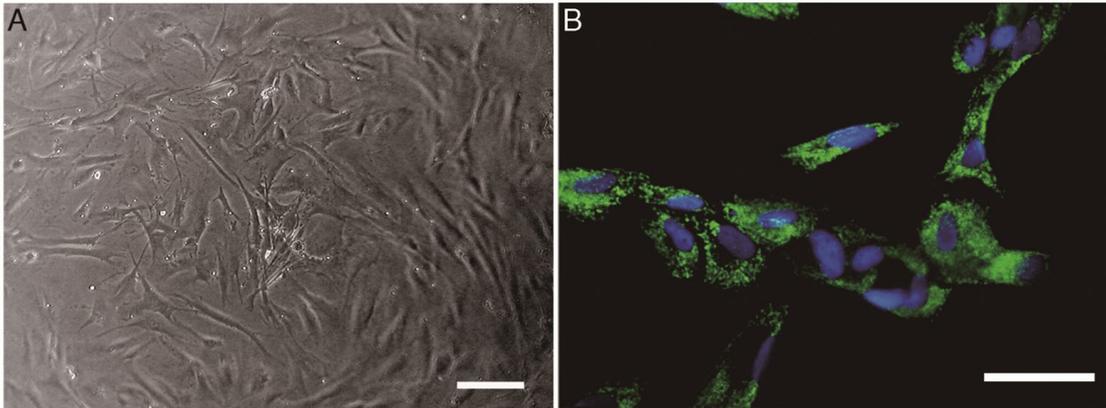


圖 1。細胞型態及表現型。(A)次培養的第二及第三繼代，人類陰道纖維母細胞均勻分布並且表現出典型的細胞型態(Bar = 40 μ m)。(B) 人類陰道纖維母細胞使用纖維細胞表面蛋白(綠色)以及 DAPI 核對比染色(藍色)的免疫染色做進一步的辨識(Bar = 10 μ m)。

表 1。臨床資料，經陰道子宮切除術的十名病患其陰道纖維母細胞膠原蛋白 I/III 比例及生長率。

Patient	Age	POP stage	Surgery	Collagen I/III Ratio	Growth Ratio
1	40	0	LAVH	1.22 ± 0.08	9.95 ± 1.20
2	54	0	LAVH	1.25 ± 0.09	8.00 ± 1.10
3	69	3	VTH	0.83 ± 0.07	4.85 ± 1.33
4	60	3	VTH	0.33 ± 0.06	0.97 ± 1.01
5	43	2	VTH	1.39 ± 0.05	7.83 ± 1.20
6	54	3	VTH	1.18 ± 0.07	10.10 ± 1.50
7	65	3	VTH	1.39 ± 0.06	4.96 ± 0.66
8	59	2	VTH	0.44 ± 0.08	3.85 ± 1.01
9	63	3	VTH	0.63 ± 0.05	2.82 ± 0.66
10	48	0	LAVH	1.10 ± 0.05	6.15 ± 0.55
Mean	55.5 ±	2		0.98 ± 0.06	5.95 ± 1.02

3.2

LAVH: Laparoscopically assisted vaginal hysterectomy; VTH: Vaginal total hysterectomy.

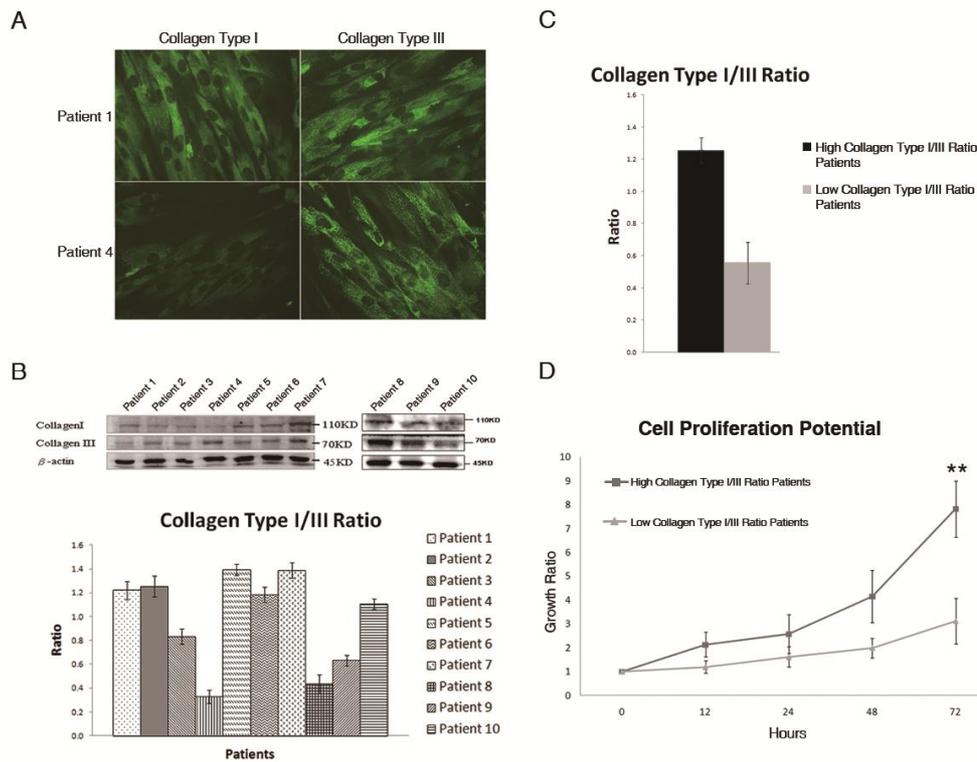


圖 2。第一型及第三型細胞膠原蛋白的決定以及人類陰道纖維母細胞之生長治療法。(A) 個別病患之細胞經免疫染色可見其第一型及第三型膠原蛋白之表現不一，其中病患四(POP 案例)的第一型膠原蛋白減少而第三型膠原蛋白增加，與病患一(非 POP 案例)的膠原蛋白表現不同。(B) 西方墨點結果顯示第一型膠原蛋白減少、第三型膠原蛋白增加的病患為三、四、八、及九；其膠原蛋白 I/III 比例低(<1.0)。(C) 病患被分成兩組，分別為高膠原蛋白 I/III 比例(比例 >1.0 , $n=6$)或低膠原蛋白 I/III 比例(比例 <1.0 , $n=4$)，而平均值具有統計差異($p<0.001$)。(D) 高膠原蛋白 I/III 比例的人類陰道纖維母細胞同時表現出較佳的細胞增生潛力，而其與低高膠原蛋白 I/III 比例的差異性於次培養 72 小時時顯現出統計差異性($p<0.01$)。

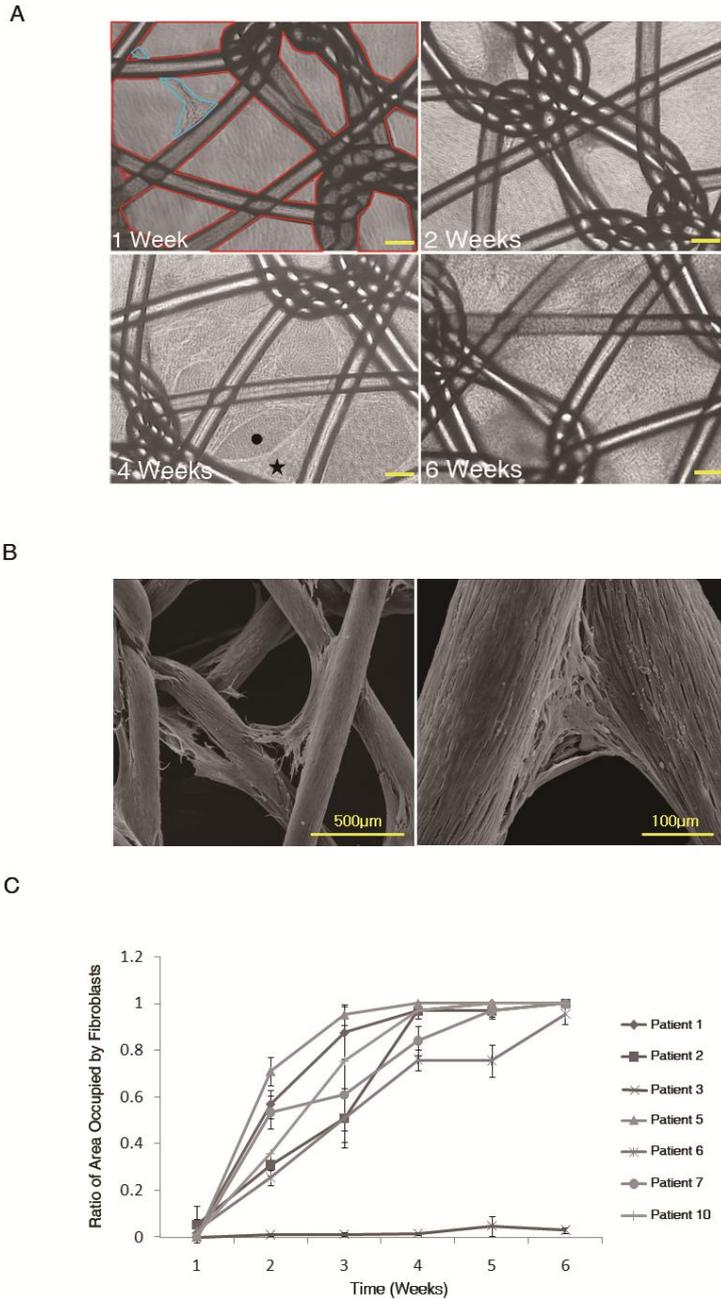


圖 3。人類陰道纖維母細胞於聚丙烯網膜上之生長。(A)網膜孔洞被黏附的細胞以及其製造的細胞外間質所佔領。佔領比例(藍色/紅色)以電腦自動計算而得。(B)早期細胞生長之 SEM 影像。(C)共同培養六周後，大多取自病患(6/7)之 HVF 幾乎佔領了整個網膜，病患三支 HVF 例外。

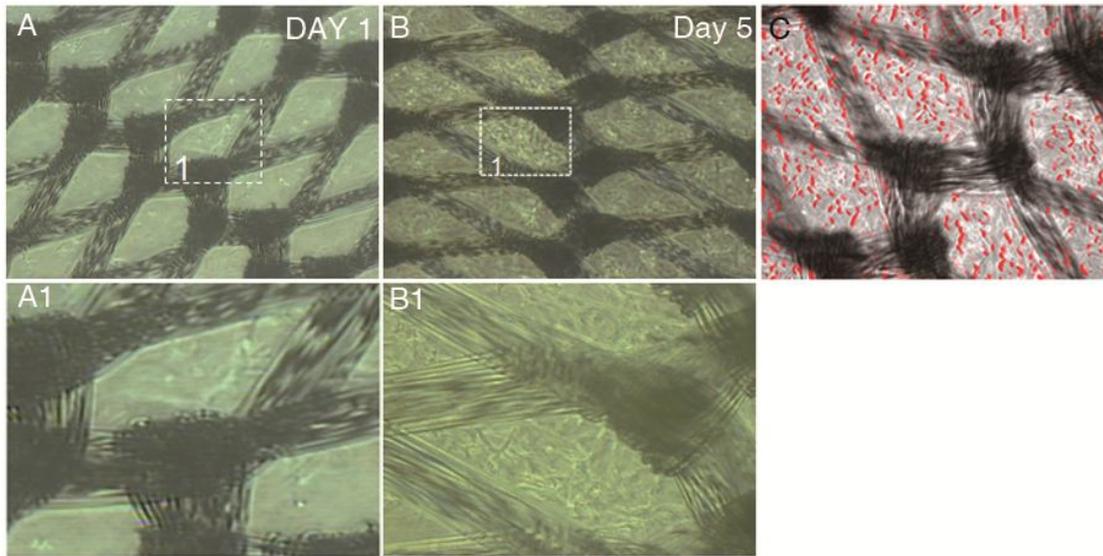


圖 4。於體外合成組織工程筋膜同等物。(A, B)體外培養五天後，形成了成熟且富含細胞的筋膜同等物。(A1, B1)為(A, B)之放大。(C)HVF 以 DiI (紅色)標幟可用於體內移植後追蹤細胞之功用。

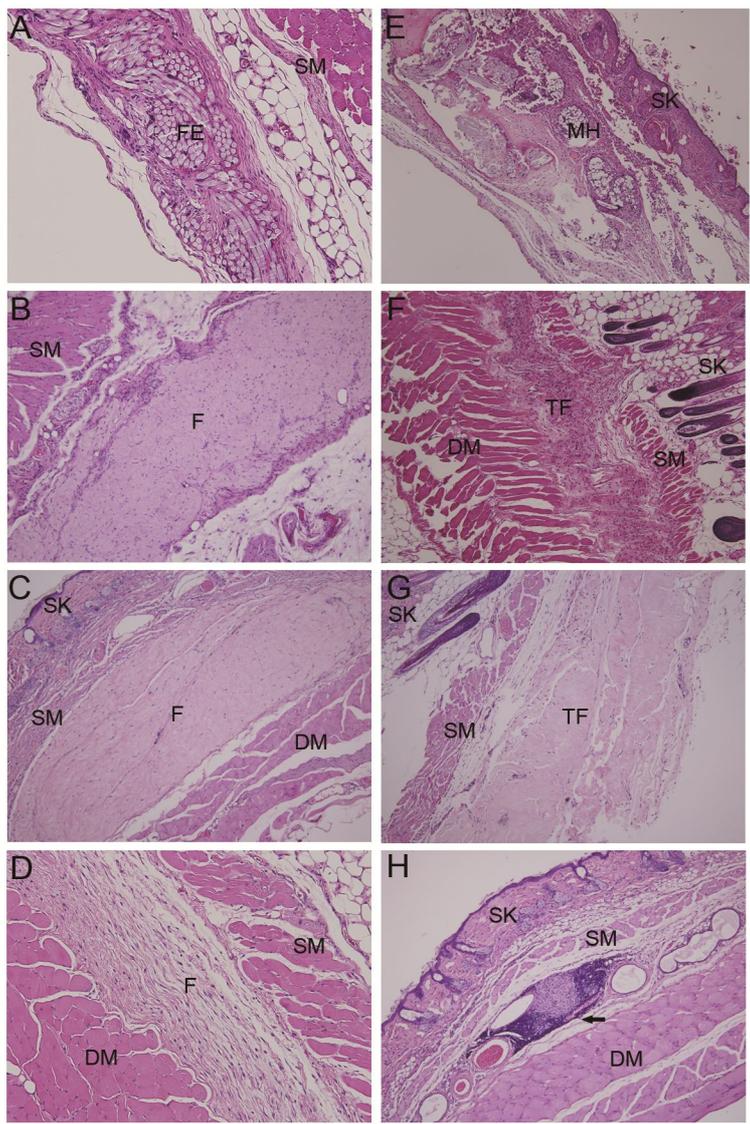


圖 5。組織工程筋膜同等物體內移植的 H&E 染色結果(A-D)以及對照組結果(E-H)。(A)兩週後，筋膜同等物與形成的表面多孔性支架類筋膜組織仍保持連結。同時(E)對照組中植入宿主的可見網膜快速分解的情形。(B)第八週，可見節結型帶莢膜形成的新生筋膜。同時(F)標幟的纖維組織於對照組中之反應。(C)十二週後，形成平滑且多層的新生筋膜或(D)組織良好多孔性支架新生筋膜於筋膜同等物移植後形成。相較之下(G)無組織性，塊狀的新生組織形成，其細胞含量稀少

分布零落或(H)肉芽腫形成於對照組中。(原始放大倍數× 100; A 與 D
× 200; SK:皮膚; SM:表面肌肉; DM:深層肌肉; F:筋膜; FE:筋膜同等物;
MH: 網膜; TF:組織形成; 箭頭: 肉芽腫)。

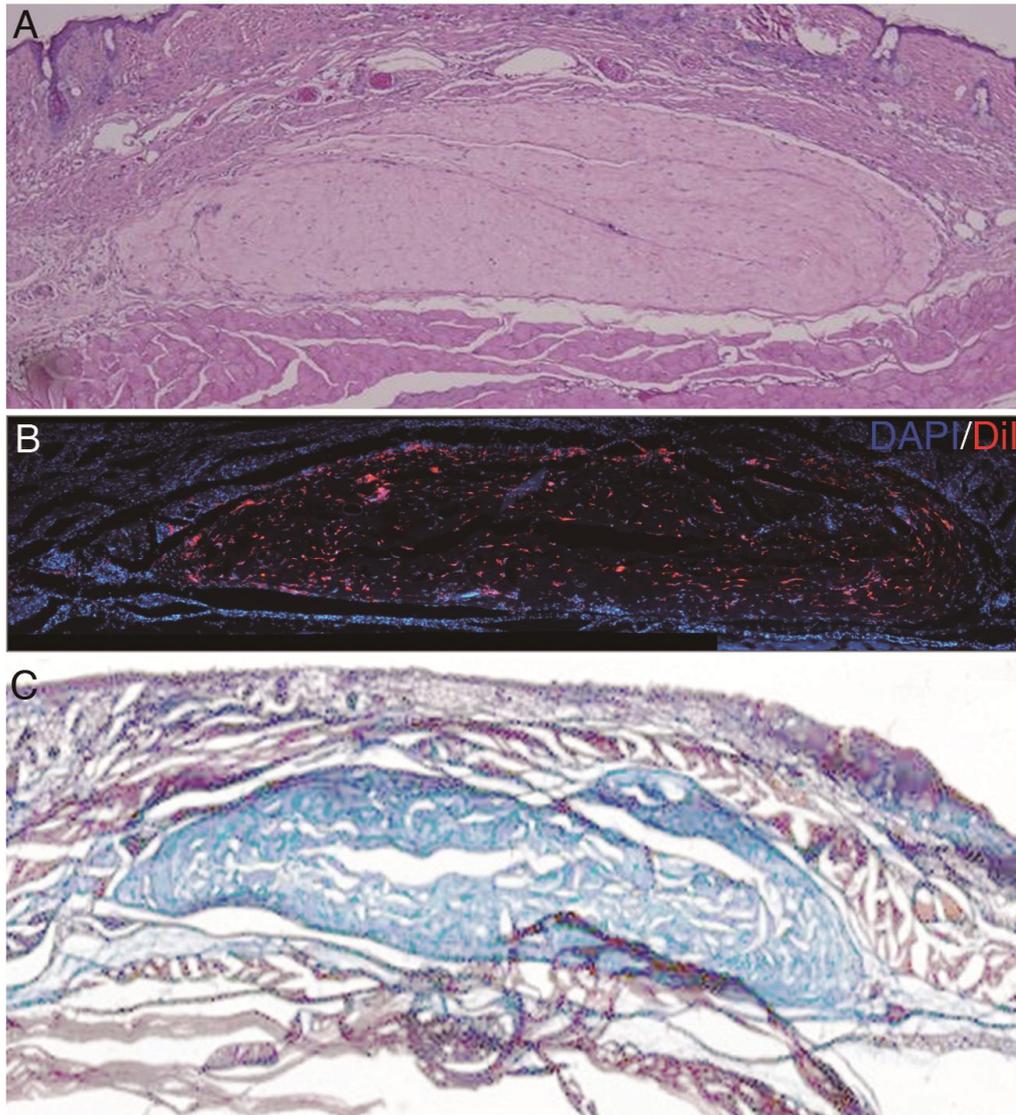


圖6。 H&E染色，於移植後12周採集筋膜樣組織以螢光顯微鏡觀察並以膠原纖維染色做染色。(A)於表面及深層肌肉層之間發現明顯為新形成的組織。(B)在螢光顯微鏡下，組織充滿著Dil標幟之細胞。(C)膠原纖維染色顯示出組織中富含膠原蛋白基質。

Part II

人類脂肪與臍帶間質幹細胞的纖維母細胞分化研究

**The fibroblastic differentiation of mesenchymal stem cells derived
from human adipose tissue and umbilical cord**

II-1. 中文摘要

現代的骨盆重建以及尿失禁手術的趨勢是以人工生醫材料植入人體來加強手術成效。其優點為能改善手術成功率，同時修復正常的骨盆腔功能。而人類纖維母細胞(fibroblasts)在植入人工網膜的骨盆重建手術以及尿失禁手術的傷口癒合過程中扮演重要角色。一般認為，當手術性的人工網膜植入人體時，植入部位的人類纖維母細胞首先需著床於此一模板(scaffold)上，然後進行一連串的組織反應而形成新的結締組織結構，而達成加強手術效果的目的。因此，在前項的研究中我們分離人類陰道纖維母細胞將之培養於手術性人工網膜，來研究細胞於此生醫材料著床後的組織形態變化與新陳代謝作用等。簡單來說，我們將病人的陰道纖維母細胞培養於PLGA人工網膜上所形成的人工筋膜植入裸鼠皮下，以及同時植入單純的PLGA人工網膜為對照組實驗。經過2、4、8、12週後再取樣作組織學分析檢查，結果顯示：植入裸鼠皮下的組織工程人工筋膜於裸鼠皮下形成新生組織並與周邊組織融合，相對的，植入單純的PLGA人工網膜的對照組實驗並沒有顯示任何組織新生現象。以上實驗結果透露出組織工程技術在將來也許能被應用於製造自體筋膜移植以加強骨盆重建手術的成效。但根據我們之前研究結果顯示大部份病人(4/7)陰道纖維母細胞產生的膠原蛋白(collagen) I /III 比例小於1，此比例明顯低於其他病人或正常

人。由於其生長速率慢及代謝異常，使用自體的纖維母細胞移植可能無法有很好的效果。因此我們考慮其他替代細胞，而間質幹細胞 (mesenchymal stem cells) 正提供組織工程另一個具有潛力的細胞來源。在本研究當中，我們預計將從脂肪及臍帶分離所得之間質幹細胞，誘導分化成纖維母細胞。在前驅實驗當中，我們發現脂肪和臍帶所分離的間質幹細胞在誘導成纖維母細胞分化後，膠原蛋白 I/III 比例增高，顯示誘導分化為纖維母細胞之間質幹細胞可能具有高度的潛力，應用於此類病人組織工程人工筋膜移植。因此本研究將比較脂肪與臍帶間質幹細胞分化為纖維母細胞能力、進一步分析細胞內膠原蛋白 (I, III, V)、彈力蛋白 (Elastin)、Tenascin-C、纖維黏蛋白 (Fibronectin) 的變化，最後將上述細胞結合人工網膜植入裸鼠皮下，分析新生的結締組織結構形成能力。將來，我們希望將間質幹細胞的細胞治療與組織工程技術運用於臨床之骨盆重建與尿失禁手術，為有需要的病人執行自體移植。

II - 2. Abstract

The use of artificial biomaterials in pelvic reconstructive and anti-incontinence surgeries is an evolving field. The proposed advantage of employing a graft in this situation is that it will optimize surgical outcome without compromising vaginal capacity or coital function. Reconstructive surgeries with the reinforcement of an artificial mesh undergo a complex healing process that is still not fully understood but may depend heavily on the tolerance of the host. It is believed that when mesh is implanted into the human body, it acts as a scaffold on which fibroblast invades and connective tissue grows. In our previous study, to investigate the interactions between human cells and the implanted artificial biomaterials, we conducted this experiment to assess the different behavior of in vitro cultured human vaginal fibroblasts, seeded on specimens of commercially available surgical meshes. Cell morphology, distribution and viability, histology, metabolic activity and DNA synthesis are assessed in laboratory according to the methods described by Ng et al. Briefly, after one week of in vitro culture, the tissue-engineered fascia-equivalent was transplanted subcutaneously on the back of the experimental nude mice with the concomitant

implantation of bare PLGA mesh as control study. Two, four, eight and twelve weeks after transplantation, the grafts were harvested and were submitted for histological examination. Histological evidences showed that a neo-fascia formation with well incorporation into the host's tissue was noted with the implantation of tissue-engineered vaginal fascia-equivalent but not with the implantation of bare PLGA mesh. The previous data of our study suggest that fabrication of tissue-engineered fascia-equivalent for autologous transplantation is promising for the augmentation of the effectiveness of pelvic reconstructive surgery. However, our previous results showed that vaginal fibroblasts harvested from the majority of patients may not be eligible to be used in the regenerative process due to a low growth potential and abnormal metabolic activity. In these situations, mesenchymal stem cells are envisioned as being an alternative source because therapeutic cloning offers a potentially limitless source of cells for tissue engineering and cell therapy applications. The aims of our future study are to try to apply human ADSCs and UCMSCs based regenerative medicine into the potential therapy for pelvic floor dysfunction by series of fibroblastic differentiation experiments. In our preliminary results, induced

fibroblastic differentiation, the producing ratio of collagen I/III could be increased in ADSCs and UCMSCs. The data of our study suggest that induced fibroblastic differentiation of ADSC and UCMSCs for autologous transplantation is promising for the augmentation of the effect of pelvic reconstructive surgery. Moreover, a comparison between adult stem cells (ADSCs) and fetal stem cells (UCMSCs) is also critical to understand the difference that may present in the differentiation of fibroblast components. In the future, we may have the ability to engineer human vaginal tissues in vitro and in vivo. Autologous transplantation can be applied in patients who need reconstructive pelvic surgery.

II-3. 前言

脂肪組織是間質幹細胞的一種替代來源。皮下脂肪可以最少侵入抽脂手術程序取得，是可取得、含量豐富及可補充的，對每個人提供可能的成體幹細胞儲存處[1-3]。受損組織的再生是組織工程的主要目標。組織再生的關鍵是能取得建構細胞[1]。報告也已指出脂肪組織衍生的成體幹細胞(ADSC)於實驗室中能分化成脂肪細胞、軟骨細胞、內皮細胞、表皮細胞、肝細胞、神經細胞、肌細胞與成骨細胞家族[3]。尤其是已知脂肪組織衍生的成人幹細胞在實驗室中培養可維持長時間，且能穩定的倍增、及具低的衰老程度[4]。脂肪組織衍生的成體幹細胞對再生療法開啟有希望的前景。

另一方面，臍帶/胎盤組織也能提供幹細胞：臍帶血以及也稱為瓦頓氏凝膠(Wharton's jelly)的臍帶基質[5]。Wang 等人的研究中誘使人類臍帶基質細胞 (HUCSC) 分化成間質細胞家族，例如心肌細胞、軟骨細胞、成骨細胞及脂肪細胞[6]。最近Carlin等人的研究，首次證實豬的臍帶基質細胞中具有Oct-4、Sox-2及Nanog等一些胚胎幹細胞標記[7]。瓦頓氏凝膠細胞要能被視為是臨床使用的幹細胞的可能替代來源，所以應對這些細胞進行更多研究，來判定其能否作為細胞療法使用的幹細胞來源[8]。當把人類臍帶基質細胞植入異體接受者體內時，證實具有低的免疫原性，甚至具有局部免疫抑制功能。此幹細胞

來源具有易取得(通常是丟棄處理)的優點，且其使用不會使母親或新生兒罹病。此類細胞因可在無倫理的考量下，分離出大量的幹細胞而能無限供應。臍帶細胞的這些特性，最適用於目前幹細胞庫的規範[5]。

於我們最近的研究中，已成功分離出脂肪組織衍生的成體幹細胞與臍帶間質幹細胞，並在實驗室中可分化成脂肪細胞、軟骨細胞與成骨細胞。我們日後研究的目標是試圖將人類脂肪組織衍生的成體幹細胞與臍帶間質幹細胞為基礎的再生醫學，以一系列的纖維母細胞分化實驗施行於骨盆腔功能不良的可能療法上。為檢定此假設，應進行一系列的逆轉錄聚合酶鏈式反應、西方點墨、與免疫組織化學(IHC)分析，來證實細胞外基質蛋白(膠原蛋白 I/III/V、彈力蛋白與tenascin-C)於纖維母細胞誘發的人類脂肪組織衍生的成體幹細胞與臍帶間質幹細胞中的分化表現。此外，人類脂肪組織衍生的成體幹細胞是成人組織，而人類臍帶間質幹細胞是胎兒組織。在此研究中關切的是對這兩種幹細胞進行比較，以了解成人幹細胞與胎兒幹細胞在日後臨床應用上的可能差異。

綜合來說，我們日後研究的特定目標為：(1).人類脂肪組織衍生的成體幹細胞與臍帶間質幹細胞的分離、(2).於實驗室中定性脂肪組織衍生的成體幹細胞與臍帶間質幹細胞，及判定在長期培養時其細

胞表面標記及形態特徵，及纖維母細胞的分化能力、(3).以一系列的
反轉錄聚合酶鏈式反應、西方點墨、與免疫組織化學分析，於體內
及試管中比較纖維母細胞誘發的脂肪組織衍生的成體幹細胞與臍帶
間質幹細胞間的細胞外基質含量，與膠原蛋白 I/III的比率、4.研發動
物模式中皮下植入的以細胞為基礎的組織工程植入物，以判定此功
能植入物建構於尿失禁手術，與骨盆重建手術中的影響。

II-4. 材料與方法

自人類脂肪組織與臍帶的間質幹細胞的分離

脂肪組織是取自於台中榮民總醫院實施婦科手術及抽脂手術的女性病患。將脂肪組織切成小片，並以3毫克/毫升的第I型膠原蛋白酶(Gibco)於攝氏37度下培育1小時。於1,200g 離心10分鐘後收集細胞，並植入加入10% FBS /2毫莫耳L-穀氨酸/100單位/毫升盤尼西林/100毫克/毫升鏈黴素的Dulbecco修改的Eagle培養皿內，接著於5%二氧化碳中在攝氏37度下培育。24小時後更換培養皿並沖掉未附著的細胞[4]。

人類臍帶間質幹細胞的分離程序是一先前研究程序加以修改[8]。新鮮人類臍帶是於出生後取得，並在組織處理以取得間質細胞前，先以Hanks'的鹽類均衡溶液沖洗。在切成2至3公分的小段並除去血管後，小段的臍帶以3毫克/毫升的第I型膠原蛋白酶(Gibco)於攝氏37度下處理2小時。於1200g 離心10分鐘後收集細胞，並植入加入10% FBS /2毫莫耳L-穀氨酸/100單位/毫升盤尼西林/ 100毫克/毫升鏈黴素的Dulbecco修改的Eagle培養皿內，接著於5%二氧化碳中在攝氏37度下培育。

細胞累積倍增計算

附著細胞維持在對照培養基內，直至80%的細胞聚集為止。細胞於聚集時採集，並以 $\log N1/\log N2$ 公式計算細胞的倍增量，其中N1 代表傳代前聚集的細胞數，而N2代表傳代後播種的細胞數。細胞的累積倍增是以保持在培養基內直至繼代10次後判定。從捐贈者取得的平均細胞累積倍增數，是以傳代數的函數表示。

衰老分析

細胞種入 6 孔培養盤內，直至 80%的細胞聚集為止。衰老細胞是用衰老 β -半乳糖苷酶染色組(Cell signaling, Beverly, MA)偵測，且處理過程依製造商的方案實施。完成分析後，每個處理拍攝 5 張照片，並計算每張照片中的細胞總數與染色細胞的數目。重複實施 3 次後，以 student 檢定法計算及分析衰老百分比。

以流式細胞計分析人類脂肪組織衍生的成體幹細胞及人類臍帶間質

幹細胞的細胞標記

為了進行流式細胞計分析，細胞以用 0.25% 胰蛋白酶(PAA Laboratories GmbH, Pasing, Austria)處理，以 PBS 沖洗、及在室溫下於暗處以下列各種抗體培育 30 分鐘：螢光素異硫氰酸鹽(FITC)或藻紅蛋白(PE)鍵結的老鼠抗人類抗體，包括 HLA-DR、CD14、CD19、

CD29、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105、CD117、CD166，並以 IgG1 作為同型對照抗體(BD Bioscience)方式來採集。最後，細胞以 PBS 沖洗 2 次，接著以 500 微升的 PBS 使細胞再懸浮。以 A FAC 掃瞄儀(BD bioscience)分析抗體的鍵結。

為了於試管內特徵化間質幹細胞 (人類脂肪組織衍生的成體幹細胞與人類臍帶間質幹細胞)，依下列方式測量特定表面抗原的表現度：當以行流式細胞計測量時，95%以上的間質幹細胞族群需以 CD105、CD73、CD90 及 CD44 表現。此外，CD45、CD34、CD14 或 CD11b、CD79 α 或 CD19 及 HLA-DR 不可表現(陽性率低於 2%)。所有的抗體均取自加州 Becton Dickson 公司。

脂肪細胞、軟骨細胞與成骨細胞分化的誘發

繼代 3 次的培養細胞分別置於脂肪細胞分化培養基(DMEM 及含 10% FBS、50 微克/毫升抗壞血酸-1 磷酸鹽、 10^{-7} M 糖皮質類固醇 (dexamethasone)及 50 微克/毫升 indomethacin 的 1 克/毫升葡萄糖 [DMEM-LG])、軟骨細胞分化培養基(作為細胞小囊) (含有 insulintransferrin- selenium (ITS) 加 premix 及 10 奈克/毫升轉型生長因子 [TGF]- β 1 的無血清 DMEM-LG)、及成骨細胞分化培養基 (含 10% FBS、50 微克/毫升抗壞血酸-1 磷酸鹽、 10^{-8} M 糖皮質類固醇

(dexamethasone)及 10 毫莫耳 β -glycerophosphate 的 DMEM-LG)，並以添加 10% FBS 的 DMEM-LG 作為對照組。培養基每 3 天更換一次，及以形態證實分化完成的細胞用於組織化學染色與免疫化學研究 [8]。

組織化學染色

分化後的細胞s以PBS沖洗2次後，以4%福馬林於室溫下固定20分鐘，接著以PBS充分沖洗。為了評估分化程度，細胞以油及紅O 染料染色來判定是否為脂肪細胞、以Alcian Blue 染料染色判定是否為軟骨細胞、及以Alizarin Red S染料判定是否為成骨細胞，並用Nikon的Diaphot與D40X數位相機攝影。所有的化學物質均取自Sigma-Aldrich 公司。

纖維母細胞分化的誘發 (圖一)

在細胞長至接近全滿時，人類間質幹細胞以添加0與100奈克/毫升重組人類 CTGF (PROSPEC Protein Specialists) 與50微克/毫升抗壞血酸的MesenPRO RSTM 培養基處理，並每週更換2次來調整培養基。接著以CTGF與抗壞血酸處理2至4週，接著分子標記以酵素連結免疫吸附分析法進行分析：第I型膠原蛋白(Chondrex, Redmond,

WA) 及tenascin-C (Tn-C; IBL-America, Minneapolis, MN), 作為與纖維母細胞鍵結的選定標記。選定細胞外基質的溶解, 是以0.5 M醋酸溶液實施。膠原蛋白的蓄積是以三色染色來目視觀察[9]。

反轉錄聚合酶鏈鎖反應

所有的核糖核酸是以PureLink™ Micro-to Midi 總核糖核酸純化系統萃取(Invitrogen)。cDNA是以SuperScript™ First-Strand 合成系統合成以進行逆轉錄聚合酶鏈式反應, 並依下列所述程序實施。聚合酶鏈式反應放大是以表中所列的引子組實施。所有引子的順序是以建立的基因庫順序判定。此反應是以2720 型熱循環機 (應用生物系統公司)操作。一開始於攝氏95度下處理10分鐘是用來啟動酵素活化, 接下來以攝氏95度/10秒、57度/5秒及72度/秒的順序循環40次。所有反應均重複3次, 並以GAPDH的表現程度標準化。

實驗室中組織工程筋膜的製備

膠原蛋白膠體是以6份冰的豬的第1型膠原蛋白溶液、1份8×DMEM、10份添加20% FBS的1×DMEM、及一份0.1 N氫氧化鈉混合來製備。將1毫升的此溶液加至6孔培養盤的每個培養插入物內 (Transwel-COL, 膜的孔徑為3微米)。在插入物內的膠體於攝氏37度

下聚合後，將2份的細胞懸浮液(5×10^5 細胞/每毫升添加10% FBS 的 1×DMEM)加至8份的膠原蛋白溶液(膠原蛋白的最終濃度為0.8毫克/毫升)，接著將含膠原蛋白溶液的細胞3.5毫升施於每個插入物內。當含膠體的細胞聚合後，加入已添加10% FBS與抗壞血酸的DMEM(最終濃度為50奈克/毫升)。接著將此膠體塗於聚半乳糖篩孔上，並將複合物保存於培養基上7天。

植入培養的組織工程筋膜 (圖二)

動物植入方案已經台中榮民總醫院倫理委員會核准。8週大的雌性 BALB/cAnN-Foxn1nu/CrINarl 裸鼠(取自國家實驗動物中心)以腹膜注射0.3毫升的Avertin (1.25% 三溴甲醇、2.5% 2-甲基-2-丁醇溶液)麻醉。將一片組織工程人類筋膜 (1×1 公分)以切開實驗裸鼠的背部皮下植入。一次處理4隻裸鼠。於植入第4、8、12週時分別採集植入物。每個植入物的一份包埋於石臘內並切成8微米。一些區段以HE染色，及一些區段除去石臘以阻斷內生性過氧化酶的活性，接著血管依Histofine SAB-AP (R)組(Nichirei, Tokyo, Japan)的處理方案，用兔子的抗第IV型膠原蛋白抗體染色。最後，各區段以hematoxylin對細胞核抗染色。每個植入物的一份也加以處理，以用電子顯微鏡進行分析。

組織學與免疫化學

為進行組織學與免疫化學分析，每次將三份檢體包埋於組織冷凍培養基並用液態氮固定。取得6毫米厚的區段，並固定以Haematoxylin及依紅染料(H&E)染色，並用第I型膠原蛋白、第III型膠原蛋白、及纖維黏蛋白實施免疫染色。使用的主要抗體為：(1)單株老鼠抗人類第I型膠原蛋白抗體1:100、(2)多株兔子抗人類第III型膠原蛋白抗體1:20、(3)單株老鼠抗人類纖維黏蛋白替體1:100，於濕室攝氏4度下處理一晚。二級抗體染色是以HRP鍵合的抗老鼠組，或HRP鍵合的抗兔子組實施。陰性對照組以類似的方式染色，來取代以PBS對主抗體染色。所有的玻片均以haematoxylin抗染色，並在觀看前先載入。

II-5. 結果

組織採集與細胞產量

組織標本採集自6位因良性骨盆腫瘤接受婦科手術病患與另外6位接受剖腹生產病患。(表1)提供採集組織的重量、附著細胞數，及每克脂肪組織中附著細胞量等數據的摘要。

細胞型態、族群倍增能力及抗衰老能力 (圖三)

來自兩種來源所培養出的附著細胞，於顯微鏡下觀察時具有相同的型態。為了了解後期增生差異的情況，我們測試第1、5及9代細胞的衰老情況。以衰老 β -半乳糖苷酶染色組判定的細胞衰老分析結果，2種細胞族群間也不同。來自臍帶衍生的成體幹細胞的衰老比例，顯示有較高比例為老化細胞。衰老細胞以藍色染料染色時，在亮顯微鏡下顯現大及扁平的細胞型態。依據目前的結果，來自腹部脂肪的培養附著細胞顯現類似纖維母細胞的型態、具較高的增生率、及有較佳的抗衰老。

細胞表面標記的表現 (圖四)

兩種細胞族群的細胞表面標記的表現非常類似。細胞計分析顯示腹部與網膜的脂肪組織衍生的成體幹細胞對被視為是間質幹細胞標

記的CD29、CD44、CD73、CD90 (Thy-1)、CD105 (Endoglin)及CD166呈陽性反應，而對人類白血球抗原 HLA-DR、造血(CD14、CD19、CD34、CD45與CD117)及內皮細胞標記(CD31)呈陰性反應。此外，我們對兩種細胞不同傳代時重要標記(CD73、CD90與CD105)的表現進行分析，結果顯示來自不同來源的細胞顯現幾乎一致的結果，但來自網膜的細胞於第3傳代時CD105的表現明顯較低，但CD105於網膜的細胞表面表現於第8傳代時比腹部脂肪組織衍生的成體幹細胞為高。另一方面，對兩種細胞族群來說，CD90 (Thy-1) 是主要的細胞標記，與脂肪組織衍生的成體幹細胞先前的研究報告一致。

多功能細胞分化的效率 (圖五)

接下來我們評估脂肪組織衍生的成體幹細胞三線分化的能力及多重功效。在細胞分化時，我們先嘗試將這些細胞誘發成三種希望的系列，包括脂肪細胞、軟骨細胞與成骨細胞的分化。此結果從對脂肪細胞以油及紅 O 染料染色、軟骨細胞以 Alcian blue 染色及成骨細胞以 Alizarin red S 染色得到證實。

纖維母細胞分化的效率 (圖六)

在前驅實驗當中，我們發現脂肪和臍帶所分離的間質幹細胞在誘

導成纖維母細胞分化後，膠原蛋白 I/III 比例增高，顯示誘導分化為纖維母細胞之間質幹細胞可能具有高度的潛力，應用於此類病人細胞組織工程人工筋膜移植。

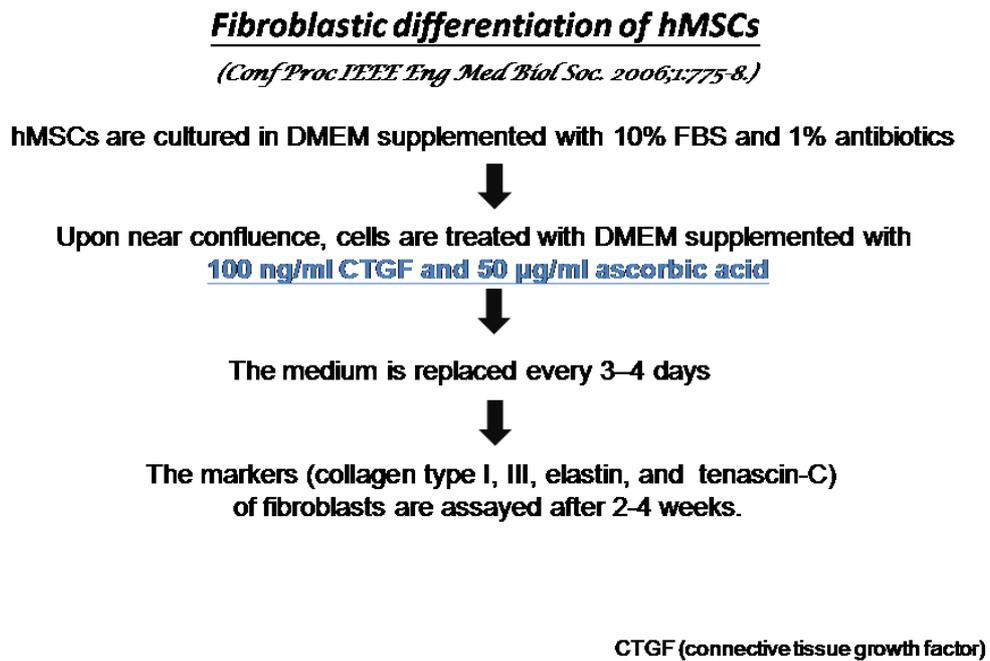
II - 6. 參考文獻

1. Gomillion, C. T., Burg, K. J.: Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*, **27**: 6052, 2006
2. Kim M Fau - Choi, Y. S., Choi Ys Fau - Yang, S. H., Yang Sh Fau - Hong, H.-N. et al.: Muscle regeneration by adipose tissue-derived adult stem cells attached to injectable PLGA spheres. *Biochem Biophys Res Commun*, **348**: 386, 2006
3. Mitchell Jb Fau - McIntosh, K., McIntosh K Fau - Zvonic, S., Zvonic S Fau - Garrett, S. et al.: Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*, **24**: 376, 2006
4. Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H. et al.: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, **7**: 211, 2001
5. Bajada S Fau - Mazakova, I., Mazakova I Fau - Richardson, J. B., Richardson Jb Fau - Ashammakhi, N. et al.: Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*, **2**: 169, 2008
6. Wang Hs Fau - Hung, S.-C., Hung Sc Fau - Peng, S.-T., Peng St

- Fau - Huang, C.-C. et al.: Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, **22**: 1330, 2004
7. Cannon Tw Fau - Lee, J. Y., Lee Jy Fau - Somogyi, G., Somogyi G Fau - Pruchnic, R. et al. Improved sphincter contractility after allogenic muscle-derived progenitor cell injection into the denervated rat urethra. *Urology*, **62**: 958, 2003
 8. Carlin R, Davis D, Weiss M, Schultz B, Troyer D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol.* **4**:1-13, 2006
 9. Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E. et al.: Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*, **25**: 319, 2007
 10. Lee, C. H., Moioli, E. K., Mao, J. J.: Fibroblastic differentiation of human mesenchymal stem cells using connective tissue growth factor. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, **1**: 775, 2006

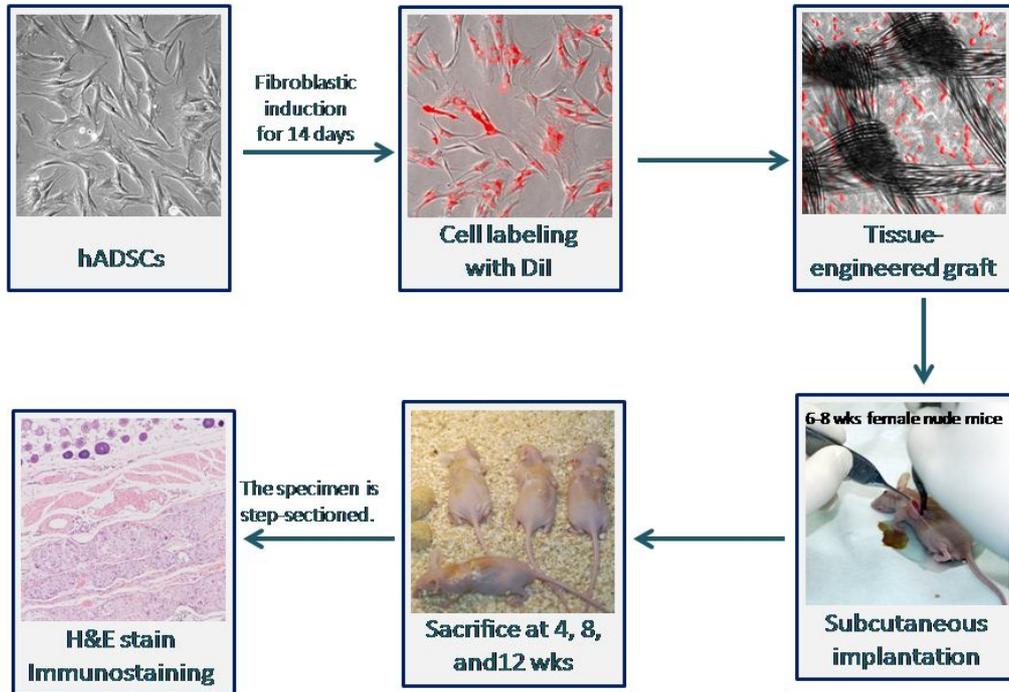
II - 7. 圖表

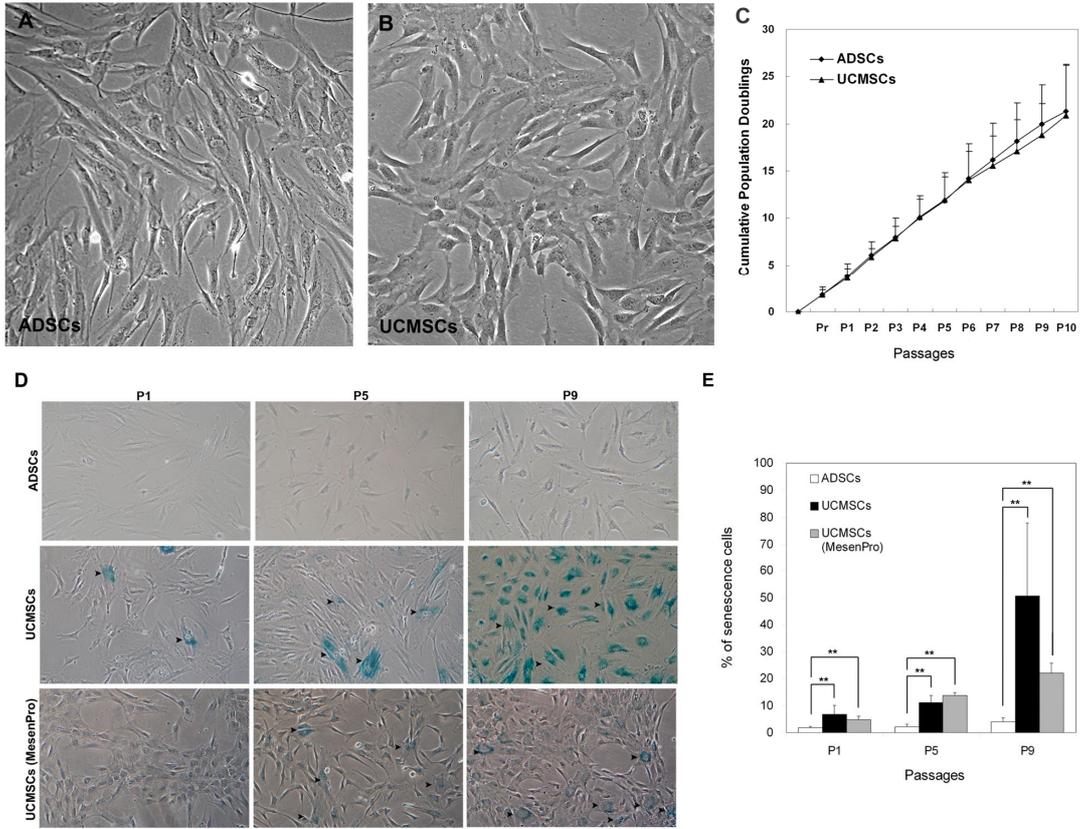
圖一（分化的實驗流程取自 Lee et al.等人的研究[10]）



圖二

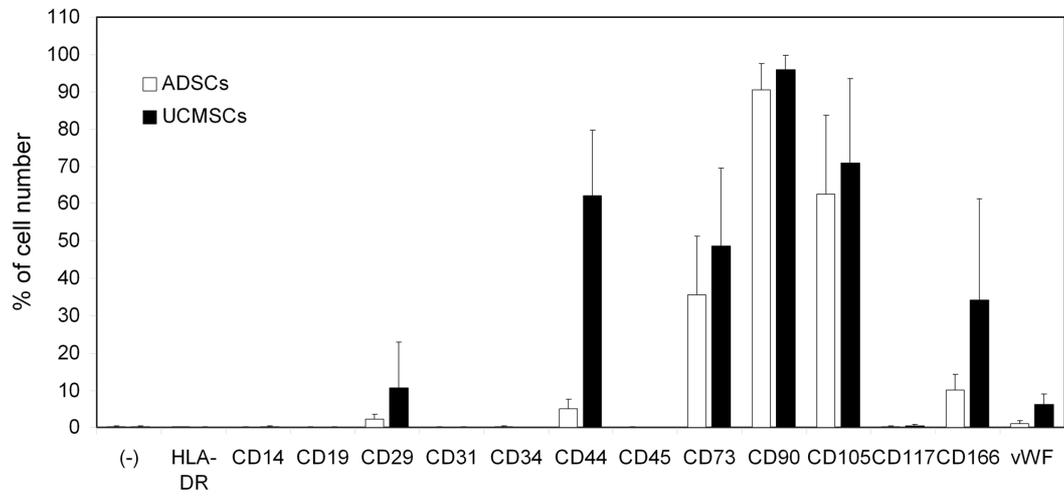
In vivo cell transplantation study



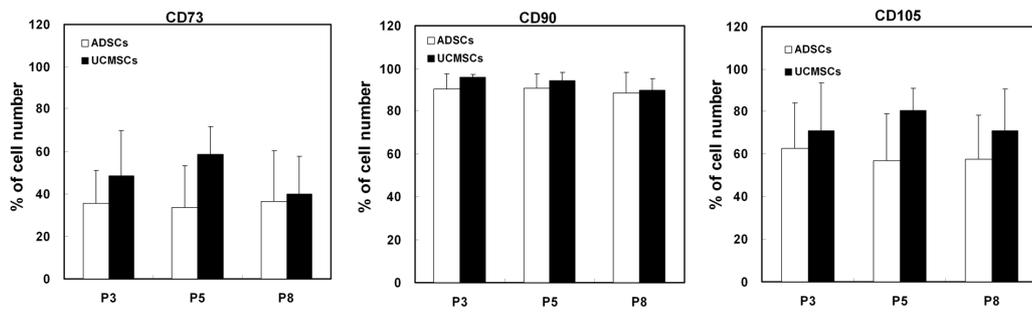


圖四

A

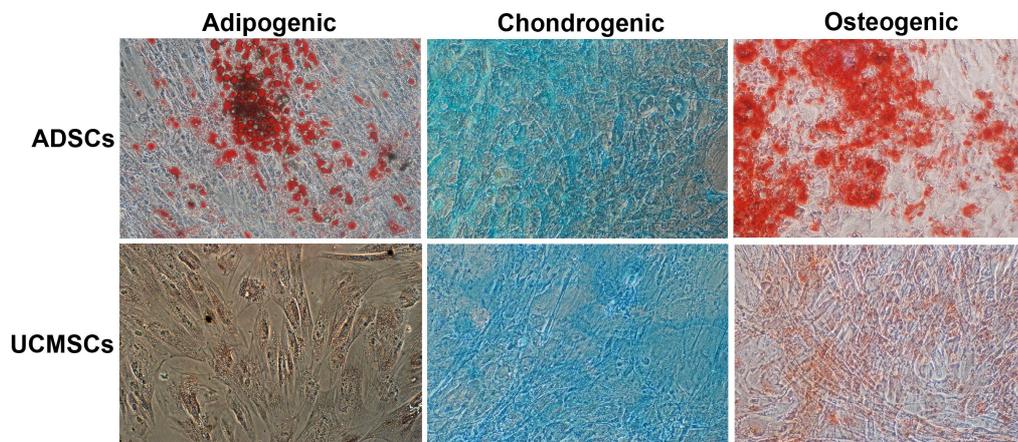


B

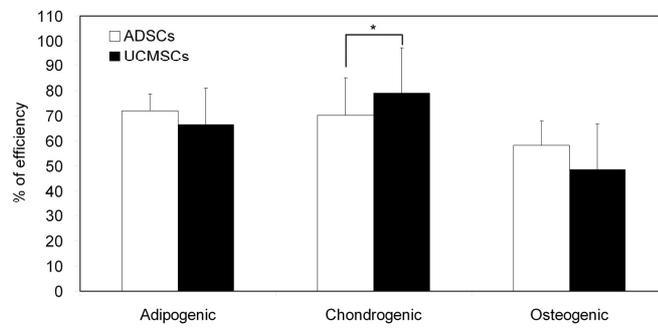


圖五

A

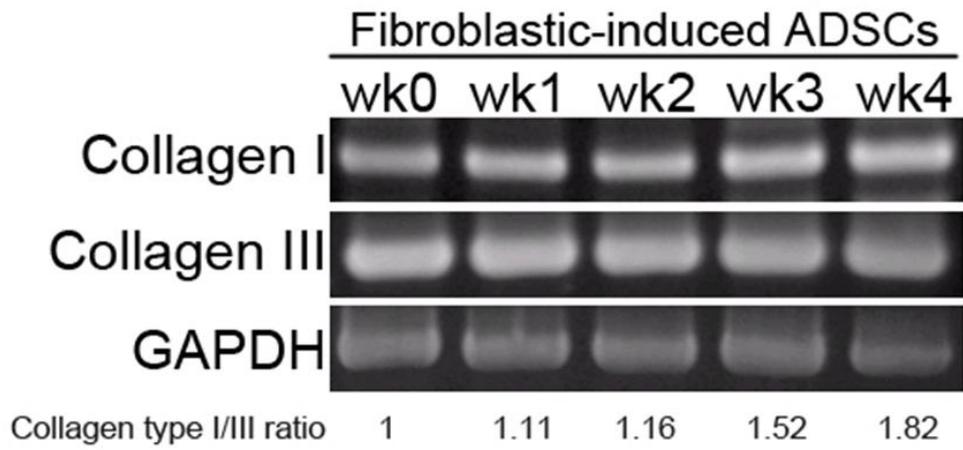


B



圖六

Increased collagen I/III ratios after fibroblastic differentiation



表一

No.	ADSCs			UCMSCs		
	Mass of harvested tissue (g)	Number of adherent cells (10 ⁵)	Yield adherent cells (10 ⁵)/g	Mass of harvested tissue (g)	Number of adherent cells (10 ⁵)	Yield adherent cells (10 ⁵)/g
1	8.14	6.87	0.84	19.40	0.92	0.05
2	5.93	4.89	0.82	26.90	0.31	0.01
3	6.13	2.85	0.46	10.00	0.21	0.02
4	4.53	4.35	0.96	27.20	0.35	0.01
5	4.90	5.52	1.13	31.80	0.37	0.01
6	3.20	2.53	0.79	20.00	0.69	0.03
Average	5.47	4.50	0.83	22.55	0.48	0.02

Part III

脂肪與臍帶間質幹細胞之胰島素分泌細胞分化的研究

The insulin-producing-cell (IPC) differentiation study of

mesenchymal stem cells derived from

human adipose tissue and umbilical cord

III-1. 中文摘要

糖尿病近年來對於國人在健康以及經濟上是一個相當大的負擔，無論是第一型或第二型糖尿病都因胰島素分泌不足使血糖無法受到控制而導致體內血糖過高，並且可能併發糖尿病酮酸血症。到目前為止尚無有效的療法可以根治糖尿病，糖尿病患者須透過飲食的控制以及胰島素的注射，來控制病情。近年來，胰島素分泌細胞的移植使得糖尿病的治療有了新的希望，因此取得足量的胰島素分泌細胞相當重要。根據以往的研究，我們認為在抽脂手術的脂肪、產後臍帶中的臍帶間質等醫療廢棄物的間質幹細胞可以應用在糖尿病的治療上，這兩種幹細胞除了可以分化成中胚層的細胞型態，如軟骨、硬骨和脂肪外，同時也可以分化成外胚層的神經以及內胚層的細胞型態。Timper 等人在2006年成功的在體外實驗中將脂肪幹細胞誘導分化成胰島素分泌細胞。除此之外，許多的研究指出，透過幹細胞的移植，成功的在動物實驗中分化成胰島素分泌細胞。在我們的初步研究結果中發現，poly-D-lysine可以促進這兩中間質幹細胞分化成似胰島細胞團，並且綜合由免疫螢光染色以及RT-PCR的結果，似胰島細胞團表現許多胰島細胞基因和蛋白，如Isl1, PDX1, Ngn3, Nkx2.2, GLUT2和insulin。在in vivo和in vitro的功能測試結果顯示，分化後的細胞會受葡萄糖的濃度刺激調整分泌胰島素的濃度，並且植入糖尿病模式大鼠

中，高血糖的狀況下降約15%，由以上的結果得知脂肪與臍帶間質幹細胞可以分化為具有功能性的胰島素分泌細胞。在本研究當中將進一步研究改善目前這兩種幹細胞在胰島素分泌細胞的分化程序，以增進分化後的細胞在糖尿病鼠動物中分泌足量的胰島素並降血糖降至正常狀態，並且將以糖尿病裸鼠，來進行試驗。同時也將比較來自成人組織的脂肪間質幹細胞與來自胎兒組織臍帶間質幹細胞在胰島素分泌細胞的分化之差異。

III - 2. Abstract

Diabetes mellitus is a huge burden for several countries. No matter type I or type II diabetes, the insufficient of insulin causes the dysfunction of regulating blood sugar and leads to hypoinsulinemia and life threatening ketoacidosis. Until now, no effective treatment to cure diabetes and most diabetic patients still need to rely on the long-term injection of insulin. Recently, the differentiation potentials of human adipose derived stromal cells (hADSCs) and human umbilical cord derived mesenchymal stem cells (hUCMSCs) give rise to a new hope of diabetes treatment. In our studies, hADSCs and hUCMSCs showed several characteristics of MSCs included spindle attachable morphology, immunophenotype of MSCs, and potential of tri-lineage differentiation. Both stem cells were able to differentiate into insulin producing cells (IPCs) and formed islet-like clusters on poly-D-lysine coated glasses with the same induction medium. In the results of immunofluorescence, several pancreatic endocrine markers were expressed in mature islet-like clusters (PDX1, NKX2.2, ISL1, and Ngn3) and final products, insulin and glucagon, were also produced. The ELISA results showed that high concentration glucose were able to stimulate mature islet-like clusters to secrete insulin in vitro functional assay. In contrast, on fibronectin and collagen type I coated glasses, no islet-like clusters were formed and PDX1, and NKX2.2 were not expressed. Final products also were not able to be detected after complete induction processes. In function test, IPCs were able to response to glucose concentration in vitro and reduced about 15% blood glucose concentration in the STZ rat. Taken all, hADSCs

and hUCMSCs were differentiated into islet-like cells and function in STZ rat. In this study, we are going to improve and short induction processes to acquire sufficient and healthy IPCs. Thus, we also expect to reduce blood glucose concentration of STZ rat to reach normal level. Moreover, to investigate new transplantation site, such as subcutaneous and omentum on STZ nude mice is also critical in our further study.

III-3. 前言

糖尿病是造成許多國家重度負擔的主要疾病之一，無論是第一型或第二型糖尿病都因胰島素功能降低及分泌不足，而導致血糖過高[1]。於第一型糖尿病，自體免疫造成 β 細胞重度破壞，及 β 細胞的量減少而導致低血胰島素症，及可能對生命造成威脅的糖尿病酮酸血症[2-3]。於第二型糖尿病，胰島素的缺乏是相對的，但功能仍不足以使血糖維持在正常範圍[2-3]。是以重要的是在生活中應了解如何保持 β 細胞的量，而非只是將其視為生物性的難題，而應作為減少 β 細胞流失的前驅，及研發 β 細胞再生的最佳策略來作為糖尿病的可能療法。最近，糖尿病的一種有效療法是2001年研究報告指出的移植蘭氏小島[4]。但來自病患的蘭氏小島細胞的數量不足以移植[5]。隨後的數年中，已對數種取得蘭氏小島細胞的方法進行研究，包括來自胚胎幹細胞[6-11]、間質幹細胞[5,12-14]、蘭氏小島先驅物、膽囊表皮細胞的分化[15]，及來自膽管細胞的分化[16]。在本研究中，繼續把重點放在誘發來自脂肪組織與臍帶的間質幹細胞，在適當的誘發培養基與包覆表面下，分化成胰島素分泌細胞(IPCs)。

胚胎內的一系列轉錄因子能促成多功效胰臟前驅物的分化、外分泌、膽管或內分泌分化，而最後分化成蘭氏小島細胞家族，包括 β 細胞在內。胚胎中的胰臟是由表皮細胞組成的類似分支膽管結構我組

成，表現轉錄因子 pancreas-duodenal homeobox 1 (Pdx1)[17]。基本的螺旋—環—螺旋轉錄因子 neurogenin 3 (Ngn3)的表現與否，控制胚胎中胰臟中央內的這些細胞變成內分泌細胞的命運。缺少 Ngn3 導致不具蘭氏小島，其異位表現會導致早熟成內分泌細胞的命運[18]。一系列位於 Ngn3 下流的轉錄因子，將內分泌先驅物分化成 β 細胞。促進子與強化子區域的特徵，已證實是由標的基因 Ngn3 直接調節，例如 neurod1、Pax4、NK 家族成員 Nkx2.2 及 Ia1，當其不活化時均會使分化受損。NGN3 於成人膽管細胞的異位表現，無論在癌細胞系或新鮮成人胰臟細胞的製備上，均已證實能再現於胚胎發育時分化成正常 β 細胞的情況[19-29]。

間質幹細胞與 ESC 分化的包覆表面，在使間質幹細胞或 ESC 分化成準確的家族、形態的改變與各種家族多種分化的功能上扮演重要的角色[30-32]。研究已指出在 IPC 分化時，需有細胞外基質膠體包覆的表面[33]。此外，以纖維黏蛋白實施的懸浮培養，可使來自間質幹細胞分化的 IPC 的胰島素分泌量增加[13]。所以在本研究中，對來自兩種間質幹細胞，人類脂肪組織衍生的成體幹細胞及人類臍帶間質幹細胞在界定的誘發培養基中分化時的纖維粘蛋白、第 I 型膠原蛋白、及聚 D-離氨酸包覆表面進行比較，以了解 IPC 在各種包覆表面上分化的效率及形態上的變化。

此外在本研究也證實了來自成人組織與胎兒組織的間質幹細胞—人類脂肪組織衍生的成體幹細胞與人類臍帶間質幹細胞在細胞型態、免疫表現型、三線分化的能力、生長動力學、及IPC分化效率的比較。本研究的目的是了解來自人類脂肪組織衍生的成體幹細胞與人類臍帶間質幹細胞的胰島素分泌細胞在體內及試管中的分化能力，以提供糖尿病可能的細胞療法。依據先前的研究結果顯示人類脂肪組織衍生的成體幹細胞與人類臍帶間質幹細胞的多重功效，使其是分化成胰島素分泌細胞的良好來源。此外，人類脂肪組織衍生的成體幹細胞是成人組織，而人類臍帶間質幹細胞是胎兒組織。所以比較這兩種幹細胞於日後臨床應用上的差異，是本研究關切的重點。此外，在本研究中也將處理IPC於動物模式，及在STZ裸鼠新植入部位的功能。

III- 4. 材料與方法

分化成胰島素分泌細胞

第2至5代的人類脂肪組織衍生的成體幹細胞與人類臍帶間質幹細胞收集來進行胰島素分泌細胞(IPCs) 分化。分化程序稍微修改先前研究的程序。在第一個分化過程中，細胞是依Gao研究小組的方案處理。接著人類脂肪組織衍生的成體幹細胞與人類臍帶間質幹細胞以胰蛋白酶處理，並將 2×10^4 細胞/平方公分置於包覆有聚D-離氨酸、纖維黏蛋白、第I型膠原蛋白、及膠原蛋白膠體的低附著培養基內[29]。誘發培養基是修改的L-DMEM (GIBCO)，添加10% FBS (GIBCO)、10毫莫耳/L nicotinamide (Sigma)、20奈克/毫升表皮生長因子及B27(GIBCO)作為第二階段6天。在IPCs 分化的最後成熟步驟，L-DMEM (GIBCO)，添加10% FBS (GIBCO)與10奈克/毫升的exedin-4作為第3步驟的培養基使用6天。在完成分化過程後，細胞聚集至類蘭氏小島群內。收集成熟的類蘭氏小島群，以進行免疫螢光分析與試管內功能測試。

胰島細胞的免疫表現型

為決定細胞於誘發過程時的基因表面，使用的主抗體為rabbit anti-PDX1 1:1000 (abcam)、rabbit anti-NKX2.2 1:100 (Chemicon)及

mouse anti-insulin 1:1000 (Sigma)。次級抗體為goat anti-rabbit Alexa Fluor 488與594 (Molecular probe)及 goat anti-mouse Alexa Fluor 488與594 (Molecular probe)。影像是以Zeiss Axiovert 200取得。

胰島素分泌分析

胰島素分泌分析是依先前報告所述方案實施。成熟的類蘭氏小島群是用PBS沖洗使其剝離，並收集懸浮部分進行胰島素分泌分析。類蘭氏小島群隨機分成以含2% FBS的高葡萄糖(25mM) DMEM 處理，或以含2% FBS的低葡萄糖(25mM) DMEM 處理。24小時後收集懸浮部分，進行ELISA分析來偵測胰島素濃度(Mercodia, Sweden)。

III-5. 結果

IPC 於各種包覆表面的分化效率 (圖一、二)

IPC 於各種包覆表面的分化效率尚未強調。為了解 IPC 於包覆表面的分化效率，我們以研究胰臟內分泌標記的型態與表現，來比較聚 D-離氨酸、纖維黏蛋白、第 I 型膠原蛋白包覆表面對促使 IPC 分化的效率。在分化初期階段，在纖維黏蛋白包覆表面上只發現較少的群落。此外，在以纖維黏蛋白及第 I 型膠原蛋白包覆處理中，並未發現成熟的類蘭氏小島群。反之，在聚 D-離氨酸包覆表面上，人類脂肪組織衍生的成體幹細胞與人類臍帶間質幹細胞會進行胰臟性分化，且在成熟的類蘭氏小島群中，胰臟內分泌標記的表現很顯著。

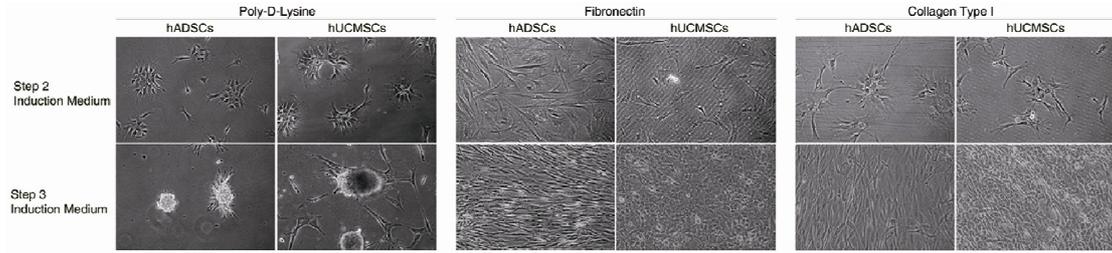
成熟的類蘭氏小島群表現胰臟內分泌標記

為判定人類脂肪組織衍生的成體幹細胞及人類臍帶間質幹細胞能否分化成胰臟細胞家族，我們於分化過程中以免疫螢光法及 RT-PCR 對胰臟標記進行分析。結果調節 β 細胞的數種標記的 PDX1，於第 2 步驟的第 4 天於兩種分化幹細胞的核上表現，且在同一階段促進 β 細胞分化的 NKX 2.2 高度分佈於細胞質與細胞核的內部。但在 IPC 分化的初期過程，在兩種幹細胞中並未測出胰島素。依據本研究的結果，人類脂肪組織衍生的成體幹細胞與人類臍帶間質幹細胞在分化初

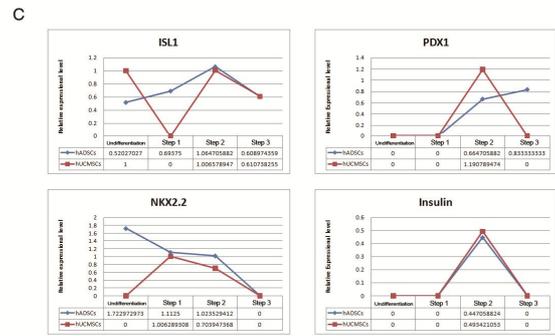
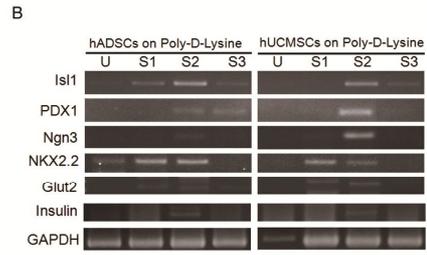
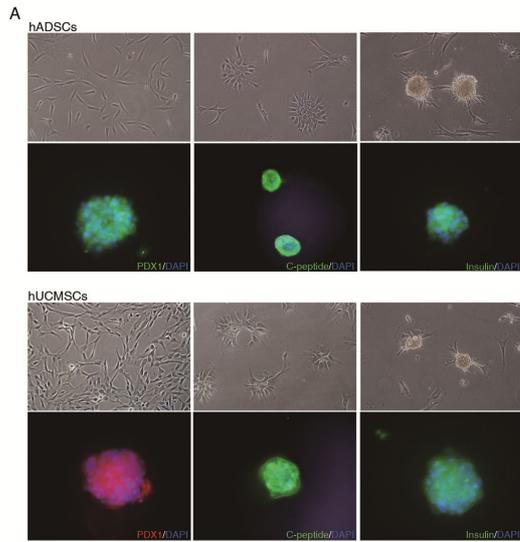
期階段會分化成胰臟細胞家族，但分化的成熟仍需進一步誘發。

III-6. 圖表

圖一



圖二



III- 6. 參考文獻

1. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001;414:782-787.
2. Hanley NA, Hanley KP, Miettinen PJ, et al. Weighing up beta-cell mass in mice and humans: self-renewal, progenitors or stem cells? *Mol Cell Endocrinol*. 2008;288:79-85.
3. Oliver-Krasinski JM, Stoffers DA. On the origin of the beta cell. *Genes Dev*. 2008;22:1998-2021.
4. Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, et al. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes*. 2001;50:710-719.
5. Wu LF, Wang NN, Liu YS, et al. Differentiation of Wharton's Jelly Primitive Stromal Cells into Insulin-Producing Cells in Comparison with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part A*. 2009.
6. Wang X, Ye K. Three-Dimensional Differentiation of Embryonic Stem Cells into Islet-Like Insulin-Producing Clusters. *Tissue Eng Part A*. 2009.
7. Zulewski H. Differentiation of embryonic and adult stem cells into

- insulin producing cells. *Panminerva Med.* 2008;50:73-79.
8. Naujok O, Francini F, Picton S, et al. A new experimental protocol for preferential differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Cell Transplant.* 2008;17:1231-1242.
 9. Naujok O, Francini F, Jorns A, et al. An efficient experimental strategy for mouse embryonic stem cell differentiation and separation of a cytokeratin-19-positive population of insulin-producing cells. *Cell Prolif.* 2008;41:607-624.
 10. Jiang W, Shi Y, Zhao D, et al. In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Res.* 2007;17:333-344.
 11. Jiang J, Au M, Lu K, et al. Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2007;25:1940-1953.
 12. Chang C, Niu D, Zhou H, et al. Mesenchymal stem cells contribute to insulin-producing cells upon microenvironmental manipulation in vitro. *Transplant Proc.* 2007;39:3363-3368.
 13. Chang CF, Hsu KH, Chiou SH, et al. Fibronectin and pellet suspension culture promote differentiation of human mesenchymal

- stem cells into insulin producing cells. *J Biomed Mater Res A*. 2008;86:1097-1105.
14. Karnieli O, Izhar-Prato Y, Bulvik S, et al. Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells*. 2007;25:2837-2844.
 15. Nagaya M, Katsuta H, Kaneto H, et al. Adult mouse intrahepatic biliary epithelial cells induced in vitro to become insulin-producing cells. *J Endocrinol*. 2009.
 16. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, et al. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*. 2008;455:627-632.
 17. Murtaugh LC. Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. *Development*. 2007;134:427-438.
 18. Schwitzgebel VM, Scheel DW, Connors JR, et al. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development*. 2000;127:3533-3542.
 19. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, et al. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the

- pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:1607-1611.
20. Apelqvist A, Li H, Sommer L, et al. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature*. 1999;400:877-881.
 21. Huang HP, Liu M, El-Hodiri HM, et al. Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3. *Mol Cell Biol*. 2000;20:3292-3307.
 22. Mellitzer G, Bonne S, Luco RF, et al. IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas. *EMBO J*. 2006;25:1344-1352.
 23. Smith SB, Watada H, German MS. Neurogenin3 activates the islet differentiation program while repressing its own expression. *Mol Endocrinol*. 2004;18:142-149.
 24. Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, et al. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature*. 1997;386:399-402.
 25. Sussel L, Kalamaras J, Hartigan-O'Connor DJ, et al. Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development*. 1998;125:2213-2221.

26. Gasa R, Mrejen C, Leachman N, et al. Proendocrine genes coordinate the pancreatic islet differentiation program in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:13245-13250.
27. Heremans Y, Van De Casteele M, in't Veld P, et al. Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. *J Cell Biol*. 2002;159:303-312.
28. Davani B, Ikonomou L, Raaka BM, et al. Human islet-derived precursor cells are mesenchymal stromal cells that differentiate and mature to hormone-expressing cells in vivo. *Stem Cells*. 2007;25:3215-3222.
29. Gao F, Wu DQ, Hu YH, et al. In vitro cultivation of islet-like cell clusters from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Transl Res*. 2008;151:293-302.
30. Ma W, Tavakoli T, Derby E, et al. Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Dev Biol*. 2008;8:90.
31. Ho M, Yu D, Davidson MC, et al. Comparison of standard surface chemistries for culturing mesenchymal stem cells prior to neural

- differentiation. *Biomaterials*. 2006;27:4333-4339.
32. Qian L, Saltzman WM. Improving the expansion and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells through culture surface modification. *Biomaterials*. 2004;25:1331-1337.
33. Gao F, Wu DQ, Hu YH, et al. Extracellular matrix gel is necessary for in vitro cultivation of insulin producing cells from human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells. *Chin Med J (Engl)*. 2008;121:811-818.

個人資料表

中文姓名	洪滿榮	英文姓名	Hung, Man-Jung (Joe)		
			(Last Name) (First Name) (Middle Name)		
國籍	Taiwan, ROC.	性別	<input checked="" type="checkbox"/> 男 <input type="checkbox"/> 女	出生日期	1965年01月18日
聯絡地址	40705 台中市中港路三段160號				
聯絡電話	(公).04-23592525 ext 5801		(宅).0933-690049		
E-MAIL	mjhung@vghtc.gov.tw				

二、主要學歷 請填學士級以上之學歷或其他最高學歷均可，若仍在學者，請在學位欄填「肄業」。

畢／肄業學校	國別	主修學門系所	學位	起訖年月(西元年/月)
國立陽明大學	Taiwan,	醫學系	學士	1983/09 至 1990/06
私立東海大學	Taiwan,	生命科學系	博士候選人	2005/09 至 2010/05

三、現職及與專長相關之經歷 指與研究相關之專任職務，請依任職之時間先後順序由最近者往前追溯。

服務機關	服務部門／系所	職稱	起訖年月(西元年/月)
現職：			
台中榮民總醫院	婦產部	婦科主任	2008/09 迄今
國立陽明大學	醫學系	助理教授	2007/02 迄今
經歷：			
			____/____ 至 ____/____
台灣婦女泌尿暨骨盆醫學會		秘書長	2006/05 迄今
台灣婦產科醫學會		監事	2008/03 迄今

四、專長 請自行填寫與研究方向有關之學門名稱。

1. 婦產科學	2. 婦女泌尿學	3. 幹細胞與再生醫學	4.
---------	----------	-------------	----

CURRICULUM VITAE

NAME Man-Jung (Joe) Hung

BIRTHDAY 1965.01.18.

NATIONALITY Taiwan, ROC.

CURRENT POSITION:

Chief of Gynecology Taichung Veterans General Hospital

Assistant Professor National Yang-Ming University

Secretary General Taiwan Urogynecology Association

Scientific Committee Taiwan Association of OBS/GYN

EDUCATION & TRAINING:

1983-1990 M.D., College of Medicine, National Yang-Ming
University

1990-1992 Residency in Obs & Gyn, Chai-Yi Veterans Hospital

1992-1997 Residency in Obs & Gyn, Taichung Veterans General
Hospital

1998-2008 Visiting Staff in Obs & Gyn, Taichung Veterans General

Hospital

2006-2010 Ph.D. candidate, Department of Life Science, Tunghai

University

AREAS OF INTEREST:

Urogynecology & Reconstructive Pelvic Surgery

Stem Cell Biology & Regenerative Medicine

PUBLICATIONS: (SCI Papers)

1. Liu FS*, Dong JT, Chen JT, Hsieh YT, Ho ESC, Hung MJ (2000)
Frequent down-regulation and lack of mutation of the KAI1
metastasis suppressor gene in epithelial ovarian carcinoma.
Gynecologic oncology 78:10-15.
2. Hung MJ*, Huang CH, Chou MM, Liu FS, Ho ESC (2000)
Ultrasonic diagnosis of ureteral injury after laparoscopically-assisted
vaginal hysterectomy. Ultrasound obstet Gynecol 16:279-283.
3. Ho ESC, Lai CR, Hsieh YT, Chen JT, Lin AJ, Hung MJ, Liu FS*
(2001) P53 mutation is infrequent in clear cell carcinoma of the ovary.
Gynecologic oncology 80:189-193.

4. Liu FS*, Hsieh YT, Chen JT, Ho ESC, Hung MJ, Lin AJ (2001) FHIT (Fragile Histidine Triad) Gene Analysis in Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Gynecologic oncology* 82:283-290.
5. Liu FS*, Chen JT, Dong JT, Hsieh YT, Lin AJ, Ho ESC, Hung MJ, Lu CH (2001) KAI1 metastasis suppressor gene is frequently down-regulated in cervical carcinoma. *Am J Patho* 159:1629-1634.
6. Liu FS*, Dong JT, Chen JT, Hsieh YT, Ho ES, Hung MJ, Lu CH, Chiou LC (2003) KAI1 Metastasis Suppressor Protein Is Down-Regulated during the Progression of Human Endometrial Cancer. *Clin Cancer Res* 9(4):1393-8.
7. Liu FS*, Chen JT, Hsieh YT, Ho ES, Hung MJ, Lu CH, Chiou LC (2003) Loss of smad4 protein expression occurs infrequently in endometrial carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 22(4):347-52.
8. Hung MJ*, Liu FS, Shen PS, Chen GD, Lin LY, Ho ESC (2004) Analysis of two sling procedures using polypropylene mesh for treatment of stress urinary incontinence. *Int J Gynecol Obstet* 84(2):133-141.
9. Liu FS*, Ho ES, Hung MJ, Hwang SF, Lu CH, Ke YM (2004) Triplet combination of gemcitabine, carboplatin, and paclitaxel in previously

treated, relapsed ovarian and peritoneal carcinoma: an experience in Taiwan. *Gynecol Oncol* 94(2):393-7.

10. Hung MJ*, Liu FS, Shen PS, Chen GD, Lin LY, Ho ESC (2004)

Factors that affect recurrence after anterior colporrhaphy procedure reinforced with four-corner anchored polypropylene mesh. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 15:399-406.

11. Liu FS*, Hung MJ, Hwang SF, Lu CH, Ke YM, Ho ES (2005)

Management of pelvic lymphocysts by ultrasound-guided aspiration and minocyclin sclerotherapy. *Gynecol Obstet Invest* 59:130-3.

12. Hung MJ, Ho ESC, Shen PS, Sun MJ, Lin ATL, Chen GD*; Taiwan

OAB Club (2006) Urgency is the core symptom of female overactive bladder syndrome, as demonstrated by a statistical analysis. *J Urol* 176(2):636-40.

13. Hung MJ, Wen MC, Hung CN, Ho ESC, Chen GD, Yang VC* (2010)

Tissue-engineered fascia from vaginal fibroblasts for patients needing reconstructive pelvic surgery. *Int Urogynecol J* (in press).

已發表論文

Hung MJ, Wen MC, Hung CN, Ho ESC, Chen GD, Yang VC* (2010)

Tissue-engineered fascia from vaginal fibroblasts for patients needing reconstructive pelvic surgery. Int Urogynecol J (In press).