

## 摘要

子宮內骨髓移植是將健康的骨髓造血幹細胞植入患有先天性遺傳疾病之胎兒的腹腔中，取代有缺陷的造血細胞達到治療的手術。但現階段所遇到的問題有植入的細胞數目太低、植入後細胞的存活時間短、植入的空間不足造成植入細胞沒有生長空間、受者無法產生對捐贈細胞的免疫耐受力與排斥反應的發生。因此提供造血幹細胞的植入、分化所需的微環境可能是骨髓移植成功的關鍵。多潛能性間葉系基質細胞 (Multipotent mesenchymal stroma cell ; MSCs) 已被證實具有提供造血幹細胞增生與分化所需的細胞激素以及重建造血幹細胞生長所需的微環境。此細胞在體外培養下能分化成脂肪細胞、硬骨細胞和軟骨細胞。並且，MSCs 已被證實在體外培養的實驗中，對異體 T 細胞具有免疫抑制性，因此在移植排斥或自體免疫疾病上有減輕癥狀的效果。最近有研究指出，由人類的羊水及胎盤所獲得貼附型細胞中，可找到具有多分化潛能的間葉系幹細胞。因此，本實驗的目的是分離及定性從 GFP 小鼠的羊水和胎盤所分離出的間葉系幹細胞。首先，建立了小鼠羊水及胎盤 MSC 分離細胞的技術，由懷孕 13 天的母鼠羊水中分離出的基質細胞命名為 AFSC-1；從胎盤分離出的基質細胞命名為 PDSC。利用 PCR 檢測方式證明兩株細胞均表現 Y 染色體上的特定序列 SRY (Sex-determining Region Y) 基因，說明兩株細胞皆來自胎兒。分析兩株細胞上幹細胞相關表面抗原的表現顯示，AFSC-1 與 PDSC 皆表現 Sca-1, CD34, CD44 和 CD106，但卻不表現內皮細胞、血液細胞與組織相容性等抗原。由免疫組織染色結果得知細胞表現 pan-cytokeratin 和 CXCR-4 等蛋白。另外，以 RT-PCR 方式分析幹細胞相關基因的表現發現兩株細胞都表現 Rex-1、Sca-1 和 Tert 等基因，但卻不表現 Nanog-1 和 Oct-4，而 Oct-4 和 eNOS 則在 PDSC 才有表現。進一步以體外洋菜膠群落形成和活體小鼠注射檢測細胞是否有癌化的可能性的實驗中發現，不論是體外培養實驗或是體內實驗，都沒有觀察到，細胞群落或是腫瘤的形成，此結果顯示 AFSC-1 與 PDSC 並不具有癌化的現象。

評估羊水與胎盤幹細胞分化成骨母細胞、脂肪細胞與神經細胞的結果顯示，兩株細胞都能成功的分化成骨母細胞、脂肪與神經細胞，而 AFSC-1 的分化效果比 PDSC 較顯著。另外，分析 AFSC-1 和 PDSC 的免疫抑制活性顯示，小鼠羊水與胎盤 MSC 均具抑制異體 T 淋巴球被活化增生的能力。綜合以上的結果，由羊水和胎盤所分離的 AFSC-1 與 PDSC 細胞具有多分化潛能幹細胞的特性並且具有免疫抑制的功能，未來可做為臨床醫學細胞療法中細胞提供的來源。



## Abstract

In utero hematopoietic stem cell transplantation (IUHSCT) was used as strategy to replace bone marrow transplantation without the need of toxic conditioning therapy. The major limitation of IUT to date is limited chimerism, too short the survival time and lack tolerance to alloantigen. Therefore, the key to successful transplantation probably is to provide the microenvironment of hematopoietic stem cells engraftment and differentiation. Mesenchymal stromal cells have the capability to support expansion of hematopoietic stem cells (HSC) through expressing cytokines and reconstructing hematopoietic microenvironment. Mesenchymal stem cells (MSCs) from placenta and amnion fluid have been reported that may retain the broad differentiation potential than previously thought. Mesenchymal stem cells or mesenchymal stromal cells (MSC) are pluripotent progenitors for a variety of mesoderm tissues. Furthermore, MSC also exhibit immunosuppressive effect on allogeneic T cells proliferation in vitro and reduce the potential graft rejections or autoimmune diseases. This study aimed at isolating and characterizing progenitors from placenta and amniotic fluid of C57BL/6-GFP mice. First, we established two cell lines from amniotic fluid and placenta of 13-day gestation and named as amniotic fluid stromal cells-1 (AFSC-1); and stromal cell lines from placenta named as placenta derived stromal cells (PDSC). Two cell lines were fetus origin with male chromosome Y (SRP) displayed. They are expressed surface markers of Sca-1, CD34, CD44 and CD106 and positive cytochemistry stain for pan-cytokeratin and CXCR 4, but lack SSEA-1 and Oct-4 expression. In addition, both of them were negative expression for the endothelial, lineage panel and hematopoietic cell related markers. However, three transcription factors as Rex-1, Sca-1 and Tert were expressed in both stromal cells but Oct-4 and eNOS were only found in PDSC line. In tumorigenic

assay, no colony and tumor growth were observed in agar medium culture or SCID mice at 3 months after AFSC-1 or PDSC transplantation. Both stromal cells can be differentiated into osteogenic, adipogenic, and neurogenic lineages. Furthermore, two stromal cells inhibited Con A or anti-CD3 Abs stimulated allogenic T cell proliferations in MLR culture assay. Thus, cells derived from amniotic fluid and placenta possess multipotent mesenchymal stromal cell characteristic and may provide an excellent alternative source for investigation of stem cell development. Moreover, The immunosuppressive of stromal cells maybe have a potential to solve problems of tolerance induction and transplant rejection.



# 第一章 研究背景資料

## 第一節 子宮內骨髓移植

### 1.1.1 子宮內骨髓移植的定義、應用和重要性

成體骨髓移植主要治療在小孩或成人的血液或代謝性遺傳疾病的主要治療方式，包括地中海型貧、先天性免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)、血友病(thalassemia)以及黏多醣(mucopolysaccharide)代謝不全等疾病。將捐贈者的骨髓植入患者體內，利用健康骨髓細胞取代有缺陷的細胞，以達到自療的效果。但由於免疫系統特異性和專一性的關係，使得此自療的方式面臨最大的限制，在骨髓移植前並需先經過 MHC 分子的配對，並且移植後的排斥(rejection)現象或是植入細胞會去破壞接受者體內的免疫細胞產生免疫反應(gaft verse host disease, GVHD)等現象，因此患者必須在骨髓移植前接受放射線照射，並在治療期間還要長期服用免疫抑制劑，使免疫反應降低，也往往使得患者在手術後面臨細菌或病毒感染的危險。

子宮內骨髓移植 (*in utero* transplantation, IUT)即指：在母體懷孕期間，若檢出所孕育之胎兒患有遺傳疾病時，選取健康適當的骨髓細胞以注射的方式植入胎兒腹腔中，讓植入的細胞與接受者本身有缺陷的細胞相互競爭，利用健康細胞具較佳競爭力的特性，取代原本缺陷的細胞，進而達到治療的目的。由於胎兒發育的早期，其免疫系統尚未發育完全，對於外來細胞的排斥性低 (Flake and Zanjani, 1999)，因此在進行骨髓移植之前，也不需先抑制患者的免疫反應。在 1945 年，Owen 發現在牛的異卵雙生的雙胞胎中，會共用胎盤的血液循環，使得出生後體內會存有其兄弟姊妹的血液細胞，此一現象稱為 chimerism。雙胞胎個體的 chimerism 會持續一生，並會造成該個體對特定對象產生免疫耐受力(Owen, 1945)，使此特定對象的皮膚或器官移植不會發生排斥現象(Anderson D, 1951; Simonsen., 1955)，而此一現象在人類和靈長類亦可發現(Picus *et al.*, 1985; van Dijk *et al.*, 1996)。

子宮內骨髓移植較成體骨髓移植有許多優勢，包括在母體懷孕時，胎兒發育早期，因胎兒免疫系統尚未發育完全，對於外來細胞的排斥性不如成體來的明顯 (Flake and Zanjani, 1999)，因此推測子宮內骨髓移植會比成體骨髓移植有較佳的移植成功率，由於此時胎兒的免疫系統尚未發育完全，所以不需要經過抑制免疫系統的療程，在植入細胞方面也由於移植對象為胎兒大大的降低了所需的細胞數，對於捐贈者也減輕了負擔。另外胎兒發育過程中，當發育至 5 到 7 週時，肝臟則為主要造血器官 (Migliaccio *et al.*, 1986)，當發育到 34 週之後，造血的功能便由肝臟轉移到骨髓(Tavassoli, 1991)。在造血功能由肝臟轉移到骨髓的這段期間中，胎兒的大小及細胞結構正在不斷的擴張，因而提供植入之細胞有足夠空間得以生長 (Muench and Barcena, 2004)。加上檢驗技術的進步，在母體懷孕第一期便可檢驗出胎兒是否具有遺傳上之缺陷，可以及早治療，以避免胎兒畸形，使胎兒的發育正常 (Evans *et al.*, 2002)。目前子宮內骨髓移植在研究及臨床上主要應用在治療免疫不全症，如 bare lymphocyte syndrome (Touraine *et al.*, 1989) 和 SCID (Flake *et al.*, 1996)；紅血球缺失，如  $\beta$ -thalaesemia (Touraine, 1996)和 Rh isoimmunization (Linch *et al.*, 1986)以及代謝性疾病，如 globoid cell leukodystrophy (Bambach *et al.*, 1997) 和 metachromatic leukodystrophy (Slavin *et al.*, 1992)。

### 1.1.2 子宮內骨髓移植的瓶頸與動物研究模式

子宮內骨髓移植較成體骨髓移植有許多優勢，因胎兒的免疫系統尚未完全建立，因此植入的細胞較容易被接受者所接受。所以，理論上子宮內骨髓移植應較成體骨髓移植更容易成功。但是迄今為止，在臨床上人類子宮內骨髓移植成功的案例僅約 45 例 (Muench, 2005)，這不禁使人疑惑，既然胎兒的免疫系統不完全，此時植入的細胞應該較容易被胎兒所接受，但事實卻不然，在大多數失敗的病例中發現，將骨髓細胞植入胎兒後，植入的細胞在被植入者體內存活的時間很短，而且植入後追蹤捐贈細胞，發現在接受者體內捐贈細胞所佔的百分比大約只有

0.01-2% (Chou *et al.*, 2001)，並且有排斥反應(graft rejection)或植入細胞對接受者本身的細胞產生免疫反應 (graft verse host disease, GvHD)的現象。

可能的原因有：1. 接受者體內的空間不足，無法提供足夠的空間讓捐贈者細胞生長 (Fleischman and Mintz, 1984); 2. 接受者體內的環境無法提供捐贈細胞生長所需，胎兒環境在發育中仍未成熟，造血的過程也許無法提供細胞生長的基本條件 (Slaper-Cortenbach *et al.*, 1987); 3. 植入的細胞無法引發接受者對捐贈細胞的免疫耐受力，所謂免疫耐受力即指免疫系統不會對某一特定抗原產生免疫反應的狀態，若能引發接受者對捐贈者產生免疫耐受力，那麼接受者對捐贈者細胞就不會有排斥反應，使其能一直存在於接受者體內，進而增生，甚至分化為具功能的細胞。另外可能的因素是，在進行移植的過程中，可能由於注射不當或其他因素，造成胎兒的損傷，如此一來，在胎兒體內可能會產生一些不利於植入細胞生長分化的因子，使得植入細胞無法於接受者體內生存 (Cowan, 1991)。

子宮內骨髓移植在研究上衍生出了許多動物模式，提供了我們更易了解接受者對植體的免疫反應和引發 chimerism 的機制，目前子宮內骨髓移植在同種異體的動物模式中有：綿羊→綿羊 (Flake *et al.*, 1986)，小鼠→小鼠 (Donahue *et al.*, 2001)，狗→狗 (Lutzko *et al.*, 1999)，猴→猴 (Duncan *et al.*, 1992)，人→人 (Touraine, 1996)，豬→豬 (Lee *et al.*, 2005)。而在異種移植中包含了將成人的骨髓或胎兒肝臟植入到胎羊中 (Bernstein *et al.*, 1997)，嬰兒的肝臟植入到胎猴 (Shields *et al.*, 1995)，嬰兒的肝臟植入至胎鼠 (Pallavicini *et al.*, 1992)，豬的骨髓植入至胎羊 (Hedrick *et al.*, 1993)，胎山羊的肝臟植入至胎綿羊 (Colas *et al.*, 1999) 中，人類臍帶血中的 CD34<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>細胞植入到胎羊 (Liang *et al.*, 2005; Chou *et al.*, 2006)，或將人類骨髓間質幹細胞打入到胎鼠中 (Chou *et al.*, 2006)。相對於健康動物的模式，在疾病動物模式下像是將人類細胞打入 NOD/SCID 老鼠中，人類細胞在這種環境下不會因排斥現象而得以生存，所以可以進一步探討人類細胞在活體中的活性或功用 (Archer *et al.*, 1997)。雖然在動物模式有許多成功的案例，但是發現即使捐贈細

胞可以植入，但其產生 chimerism 的程度都很低 (Lovell *et al.*, 2001) ，免疫耐受力也不易被引發。

而人類的間葉系幹細胞(Human mesenchymal stem cell, MSCs)可經由子宮內異體移植到胎羊體內並分化成各種組織型態的細胞(Liechty *et al.*, 2000; Mackenzie and Flake, 2001)。人類 MSCs 不只是移植到體內並留在組織中，同時也是造血幹細胞生長與分化所必需，而且還在移植後持續了其多功能分化的能力，因此 MSCs 被認為在異體移植體內環境具有獨特的免疫特性。

## 第二節 間葉系幹細胞的特性與應用

### 1.2.1 幹細胞的定義和特性

幹細胞(stem cells)被定義為一群尚未發育完全的分化細胞，並且擁有廣泛的能力像是能自我更新並且分化成多種特定功能和組織特性。幹細胞依據分化的能力與限制，又可以區分成全能性(totipotent)幹細胞、潛能性(pluripotent)幹細胞和多功能性(multipotent)幹細胞。全能性幹細胞是指具有發育成完整的生命個體的能力，以受精卵為例，一個受精卵會分裂成兩個完全相同的細胞，而這兩個細胞會再分裂成四個、八個細胞，此時若任何一個細胞單獨放入子宮中，都有能力可以發育成一個完整的個體；潛能性幹細胞是指這類細胞具有分化成中胚層(mesoderm)、內胚層(endoderm)和外胚層(ectoderm)三個胚層組織的能力，囊胚包括外胚層、中胚層及內質細胞團(inner cell mass)，外胚層會繼續發育形成胎盤以及其他組織以備胚胎在子宮發育所需，其中內質細胞團會繼續發育成為生命體中具有專一性功能的各種不同種類的器官組織；另外多功能幹細胞是從潛能性幹細胞分化而來，多功能幹細胞只能分化成為某一特定類型的組織細胞，像是神經細胞可分化成神經元細胞、神經膠細胞、寡樹突細胞等細胞。

此外，幹細胞一般被分類為兩種：一種為胚胎幹細胞(embryonic stem cells; ESCs)，是由囊胚團內層細胞所分離出來的；另一種則來自成體的各种組織稱為成體幹細胞 adult stem cell (Kim *et al.*, 2007)。最近十多年，已成功分離和培養出人類的 ESCs，因細胞本身的特性被應用為研究人類疾病的材料或作為許多修復器官組織的特殊療法(Thomson *et al.*, 1998)，然而，利用 ESCs 作為研究的材料則被許多宗教、社會倫理及道德規範的輿論質疑，另外 ESCs 要維持體外培養是非常困難的技術，ESCs 不只需要餵養細胞(feeder cells)，還要加入生長因子以提供生長環境和培養條件，而所需的生長時間也較常，並且經過人工的培養期間還會面臨因基因的改變或染色體變性等問題的挑戰(Hanson and Caisander, 2005; Maitra *et al.*, 2005)，最重要的是，到目前為止尚不能排除將 ESCs 細胞移植到人體所會發展成惡性腫瘤的可能性(Fujikawa *et al.*, 2005)。

利用成體幹細胞作為研究或治療目前較少造成爭議，這些細胞具有自我更新和專一性的分化成某一特定組織細胞的能力，但是相較於 ESCs 下，各組織的成體幹細胞數目少並且其分化的能力是較受到限制的。但成體幹細胞到目前為止被發現的組織已有，骨髓、臍帶血、周邊血、角膜、眼睛視網膜、牙齒的牙髓、肝臟、皮膚、腸胃道和胰臟...等組織；而其現今已成功分離出的成體幹細胞的種類目前有造血幹細胞、間葉系幹細胞、神經幹細胞、肝臟幹細胞、表皮幹細胞等(Korbling and Estrov, 2003)，成體幹細胞生長所需的激素比較少，生長速率較快，並且沒有形成腫瘤的危險性。因此，成體幹細胞被現今醫學界認為是一個新的細胞療法的來源。

### 1.2.2 間葉系幹細胞的特性

間葉系幹細胞(BM-MSCs)最早是在骨髓中被發現(Friedenstein, 1980)，當時稱之為 hematopoietic supportive cells 或基質細胞 (stromal cells)，之後有研究提出基質幹細胞的存在是為了維持提供造血幹細胞分化所需的環境(Owen and

Friedenstein, 1988), 隨後的研究陸續指出從人類骨髓中也可以獲得了非造血類的並且可塑性高的貼附型前驅細胞(Haynesworth *et al.*, 1992; Prockop, 1997), 這類細胞在發生學上是屬於一群多功能性細胞(multipotent cells), 可分化成多樣的細胞包括骨頭細胞(Osteocytes)、軟骨細胞(Chondrocytes)、脂肪細胞(Adipocytes)和心肌細胞(cardiomyocytes)。這群細胞的型態是紡錘狀(spindle-shaped)並類似於纖維母細胞(fibroblasts)。最初 MSCs 是在成體骨髓中被發現的, 但現今已在很多組織中發現像 MSCs 的細胞, 還包括成體和胎兒的周邊血、胎兒肝臟、胎兒脾臟、胎盤、臍帶、臍帶血、羊水、羊膜和關節潤滑液(Okita *et al.*, 1983; Campagnoli *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2003; Romanov *et al.*, 2003; Bilic *et al.*, 2004)。除了人類以外, 間葉系幹細胞已成功從其他動物分離出的有貓、狗、兔子、大鼠、雞、綿羊、山羊, 豬和小鼠 (Jessop *et al.*, 1994; Kadiyala *et al.*, 1997; Awad *et al.*, 1999; Schwarz *et al.*, 1999; Mosca *et al.*, 2000; Ringe, 2000; Devine *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2002)。

間葉系幹細胞其細胞表面分子的表現常被作為定性的方法之一。在人類的骨髓所分離的間葉系幹細胞, 被認為會表現 SH2 和 SH3, SH2 和 SH3 所辨認的 epitopes 分別是 CD105 和 CD73, 因此研究中常用可專一性識別的抗體來以辨別間葉系幹細胞的身份(Pittenger *et al.*, 1999)。除此之外, 大部分間葉系幹細胞上會表現 CD90 分子。但 MSCs 不表現造血細胞相關的的表面分子, 例如: CD45, CD11, CD34, CD14, CD19, CD3 等; 另外 MSCs 會表現 MHC class I (major histocompatibility complex, MHC) 分子, 但並不表現 MHC class II 及其他免疫輔助分子如 CD80, CD86, CD40 等。現今, 對人類間葉系幹細胞的細胞表面分子的標準化指標是 CD105<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD13<sup>-</sup>, HLA-ABC<sup>+</sup> 和 HLA-DR<sup>-</sup>。

儘管如此, 在小鼠的間葉系幹細胞方面至今仍沒有統一的表面分子的定義。甚至在小鼠中會因不同品系而有所差異。在 Peister 等人(2004 年)的研究中提出, 將由 C57BL/6、BALB/c、FVB/N 和 DBA1 等四種品系的小鼠骨髓中所分離出的間葉系幹細胞與人類間葉系幹細胞做比較, 小鼠所分離的間葉系幹細胞會表現不同

程度的 CD34、CD106 和 Sca-1 分子，而人類間葉系幹細胞只表現 CD106，而人類間葉系幹細胞會表現的 Flk-1 (VEGF-R2)和 CD90 等分子，但是在小鼠的 MSCs 則都不表現，而較一致的研究發現是人類或小鼠 MSCs 細胞都不會表現成熟分化的造血細胞表面分子。間葉系幹細胞同時也會持續性的分泌細胞激素 IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, GM-CSF, FLT-3 ligand 和 SCF ;若將 MSCs 經過 IL-1 $\alpha$ 處理後，則會誘導間葉系幹細胞表現 IL-1 $\alpha$ , LIF, G-CSF 和 GM-CSF (Hanyesworth *et al.*, 1996 ; Majumdar *et al.*, 1998 ; Deans and Moseley, 2000)

### 1.2.3 間葉系幹細胞在醫學上的研究和應用

間葉系幹細胞已被證實會分泌一些細胞激素和一些調節因子與造血過程不同的分化方向有關；而這些特性引起臨床的興趣，將間葉系幹細胞應用於提高造血幹細胞的植入率。另外，間葉系幹細胞可以提供重要的生長因子來提供不同組織微環境所需要的訊號，加上間葉系幹細胞具有免疫抑制的活性，綜合這些特點都可以說明為何間葉系幹細胞幫助移植成功的原因。

BM-MSCs 已被廣泛運用在臨床實驗，例如他們被移植到患有成骨不全症 (Osteogenesis imperfecta)的小孩身上，骨小樑(trabecular bone)是最典型的例子，移植骨母細胞三個月後形成較密的骨質，並且骨頭內的礦物質含量增加(Horwitz *et al.*, 1999)。因此推論，間葉系幹細胞可運用在硬骨或軟骨缺陷的疾病，甚至神經退化疾病上。還有相關的研究顯示，間葉系幹細胞會產生 alpha-L-iduronidase, arylsulphatase-A, arylsulphatase-B, glucocerebrosidase 和 adrenoleukodystrophy protein,因此間葉系幹細胞還可以應用在治療代謝異常的疾病，例如 Hurler's disease (Koc *et al.*, 1999)。由於間葉系幹細胞具有廣泛表現各種細胞因子的能力，這些因子包括一些造血因子、非造血生長因子、細胞激素、驅化因子...等，這也顯示了間葉系幹細胞對於維持骨髓為環境有很重要的作用(Deans and Moseley, 2000)。另外，當共同植入人類骨髓間葉系幹細胞與人類臍帶血中 CD34<sup>+</sup>細胞到先天免疫不

全鼠(NOD/SCID mice)時，結果顯示間葉系幹細胞能增加 CD34<sup>+</sup>細胞在 SCID 小鼠體內的植入率(Noort *et al.*, 2002)。因此推論，間葉系幹細胞可以幫助造血幹細胞成功移植的原因是，間葉系幹細胞藉由表現 homing receptor CXCR-4 和分泌 stromal-derived factor (SDF-1)，進而吸引被植入的造血幹細胞遷移(migration)進入接受者的骨髓內，之後間葉系幹細胞還會分泌出一些可溶性的細胞激素，促進遷移進入接受者骨髓內的造血幹細胞生長和分化(Jorgensen *et al.*, 2003)。而在臨床實驗中也發現，異體的骨髓間葉系幹細胞植入到一位患有 GVHD 第四期的病人體內，幫助了病人的生命多延續一年，但並沒有引發免疫耐受力(Le Blanc *et al.*, 2004)。

儘管來自骨髓所獲得的 MSCs 具有多項優點，然而，成體骨髓中的間葉系幹細胞數量很少，所獲得的細胞時期較晚，並且收集細胞對病人來說是侵入性的，因此，尋找可替代骨髓間葉系幹細胞來源成為成體幹細胞研究較重要的研究目標。而目前替代骨髓間葉系幹細胞來源的方案有：臍帶血、胎兒的血液和肝臟，近來，由羊水及胎盤收取 MSCs 成為幹細胞在臨床醫學研究中的新選擇來源。

### 第三節 羊水幹細胞的特性及其應用

#### 1.3.1 羊水

胎兒的生存與活動都被局限在子宮裡的羊膜腔內，存在羊膜腔裡的羊水會將腔內空間撐開，如此一來，胎兒在裡面就可以活動，伸展筋體了；另外，羊水也形成胎兒和子宮間的緩衝劑，當子宮收縮或遭受外力撞擊時，可以保護胎兒，避免胎兒受到傷害。此外，母體血液和羊水之間快速的交換，可以調節胎兒體溫，使之維持一定的溫度。除此之外，胚胎早期發育時，皮膚上有物質交換之時期，也是營養提供的地方。而呼吸道肺泡細胞的發育成熟，也是藉助羊水之伸張來進

行。羊水是由懷孕的各個時期中胎盤的羊膜和胎兒組織細胞和細胞分泌之產物而組成。其中細胞的來源主要由胎兒身上所脫落下來或是由胎盤所提供。

在懷孕第一期中，大部分的羊水是鈉和氯從羊膜和胎兒的皮膚穿越過的結果，同時伴隨著大量的水分一起移動。在懷孕的第二時期中，大部分的液體來自胎兒的代謝物及尿液或是來自胎兒呼吸道所分泌的，雖然來自胎兒口腔及腸胃道的分泌物雖然量不是很多，但也扮演組成羊水的角色之一(Fauza, 2004)。由於羊水里含有許多從胎兒身上脫落下來的細胞，包括有皮膚、上呼吸道、口腔粘膜、上消化道、泌尿道等細胞，所以，羊水中的細胞可以用來做為胎兒的細胞染色體檢查之用。

### 1.3.2 羊水前驅細胞和幹細胞在臨床上的應用

人類羊水的前驅細胞最早在 1993 年由 Torricelli 等人發現，羊水前驅細胞是一群小、有核的圓形細胞，過去的定義為造血前驅細胞，並認為細胞應該來自卵黃囊(yolk sac)。但後來發現在羊水中除了造血細胞外，還發現羊水中還存在一群非造血性且具多潛能分化特性的細胞，當時稱為 Amniocytes，並且發現其具有 myogenic 分化的特性(Streubel *et al.*, 1996)，而有關羊水的 MSCs 一直到 Kaviani 等人 (2002) 和 in't Anker 等人(2003)和 Tsai 等人(2004)才有明確的定義和應用的探討。

根據人類羊水細胞的型態和生長的特性，羊水細胞被定義成三種細胞型態：表皮型 (epithelioid)、羊水特異型(amniotic fluid-specific)和纖維母細胞型(fibroblastoid) (Milunsky, 1979)等三種型細胞；而在羊水平皮細胞也被證實除了可分化成神經細胞外還可分化成星狀細胞(astrocytes)和寡樹突狀細胞(oligodendrocytes)，因此被認為這類細胞可能成為治療神經損傷相關的疾病(Kakishita *et al.*, 2003)。其多樣的分化能力非常相似於從骨髓分離出來的間葉系幹細胞，能分化成脂肪細胞、骨頭細胞、軟骨細胞和神經細胞(Tsai *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007)，另外羊水 MSCs 也可以藉

由體外培養下成功分化成肝臟細胞、胰臟 $\beta$ 細胞和羊膜細胞(Toda *et al.*, 2007)。從羊水分離的幹細胞除了在體外培養下能分化成脂肪、骨頭、肌肉、皮、神經和肝臟細胞外，利用活體實驗也證實將羊水 MSCs 事先分化的細胞植入後，不但能長久維持在活體內，同時具有分化細胞應有的功能，並且具有修補受損組織和治療的效果，例如:神經分化後的細胞可分泌神經傳導物質或表現、肝臟細胞可代謝並產生尿酸、骨頭細胞則形成組織工程骨(tissue-engineered bone) (De Coppi *et al.*, 2007)。

綜合以上的報導可以說，羊水是一個可獲得豐富的胎兒間葉系幹細胞的來源，因此，被認為將可應用於治療的移植手術中(in't Anker *et al.*, 2003)。除此之外利用羊水獲得多功能型幹細胞(pluripotent stem cells)可作為似胚胎幹細胞(embryonic stem cells)的研究，也較無道德上的爭議，值得進一步推廣。

## 第四節 胎盤幹細胞的特性及其應用

### 1.4.1 胎盤

胎盤是一個母體與胎兒共同的器官(materno-fetal organ)，是有母體與胎兒共同形成的器官，胎盤的正常與否也是胎兒發育過程的關鍵，當囊胚植入子宮後開始發育，隨著胎兒的出生後也相繼的由子宮內被移除。胎盤細胞型態由不同的懷孕時期組成，在懷孕期間，胎盤具有提供養分、氣體交換和代謝物的移除等功用，並且幫助胎兒發育其內分泌及免疫系統。以人類胎盤為例，主要由三層細胞層所組成的，分別由外到內是羊膜層(amnion)、絨毛膜層(chorion)和蛻膜層(decidua)。每一層都各來自不同的來源，decidua 是來自母體所衍生而來的，然而 amnion 和 chorion 都是由胚胎衍生而來的。其中 chorion 是由 trophoblast layer 所構成。

amnion 最早是在授精過後 8 天由 epiblast 所衍生形成。而 epiblast 所構成的 amnion 是胚胎中最好的胚層，因為只有在原腸(gastrulation)期之前出現的細胞才有

可能是多功能型胚胎幹細胞(pluripotent) (Diwan, 1976)。原腸期發生在授精的三週後，而由 epiblast 所形成的 amnion 是在授精兩週的時間構成的，因此，羊膜細胞也有可能還具有 epiblast 的 pluripotent 的潛力。羊膜是一層很薄的膜排列組成的一個空腔，空腔中充滿了液體和供應的養分，讓胎兒在發育生長的過程中避免貼附在母體的組織構造上。

#### 1.4.2 胎盤前驅細胞和幹細胞在臨床上的應用

羊膜表皮細胞(Amniotic epithelial cells)，具有許多獨特的特性，類似於未分化的細胞或幹細胞，其組織相容性蛋白 MHC I 表現量很低，在一些分化條件培養下，可分化成成熟的神經細胞，並且能合成分泌出神經傳導物質，包括 acetylcholine、norepinephrine 和 dopamine。已知從胎盤中所分離出的幹細胞，有：trophoblastic、hematopoietic 與 mesenchymal stem cells 等，其中 trophoblastic stem cells 被證實具有幫助 trophoblast 和卵黃囊中部份細胞的分化，另外間葉系幹細胞也被證實可以分化成肌肉、脂肪、骨頭、腎臟、胰島、神經等細胞(Burgess AW, 1977; Kaviani *et al.*, 2002; Fauza, 2004; Zhang *et al.*, 2004)。在尋找取代胚胎幹細胞的來源過程中，除了羊水幹細胞，胎盤細胞成為另外的選擇，在分娩後獲得胎盤，不需經侵入性的進入體內獲得，且在道德輿論上較無爭議，此外，由胎盤獲得的間葉系幹細胞在體外培養下可成功形成細胞骨架(scaffolds)，其中胎盤分離出的間葉系幹細胞的生長速度較一般胚胎細胞快，但比羊水間葉系幹細胞慢(Kaviani *et al.*, 2002)，因此被認為可當做胎兒組織工程的來源。

人類胎盤可以分泌造血分化所需的生長激素，刺激造血分化形成細胞團(colony formation) (Burgess AW, 1977)，此外人類間葉系幹細胞可幫助臍帶血中的造血幹細胞，增生分化成更多的造血前驅細胞 (Zhang *et al.*, 2004)。人類胎盤間葉系幹細胞在對異體免疫細胞的抑制上都有明顯的效果，其中可能與間葉系幹細胞會分泌一些細胞激素有關，例如：stem cell factor (SCF)、flt-3/flt-2 (FL)、IL-6、

M-colony-stimulating factor (M-CSF)和 TGF- $\beta$ 1；另外細胞表面抗原則不表現 MHC I、MHCII 和 co-stimulatory molecules B7，也是造成異體淋巴細胞不反應的原因。若利用 transwell system 將免疫細胞與間葉系幹細胞以不接觸的方式培養，實驗結果顯示，免疫抑制的程度較直接接觸培養來的低，推測間葉系幹細胞的免疫抑制效果需要經由細胞間的接觸 (Li *et al.*, 2007)。因此，未來胎盤間葉系幹細胞除了可以幫助提供造血分化所需的微環境，也可以應用在自體免疫疾病和移植等調控相關的治療中。

## 第五節 間葉系幹細胞的免疫耐受性與免疫抑制性

### 1.5.1 懷孕與免疫耐受性的關係

免疫系統最重要的特性就是淋巴細胞與其他免疫細胞能夠區分自我及非自我的能力，在 1954 年 Medawar 提出了一個問題，具有一半抗原性(semiallogeneic)不同的胎兒是如何在母體的免疫系統中被忽略而躲避免疫反應。淋巴球是在新生兒時期的胸腺和周邊循環系統中，學習到辨識自我及非自我細胞的能力，而許多週邊組織表現表面分子給淋巴球是 self 的訊號，因此避開了那些躲過胸腺篩選的會辨認自體抗原的淋巴球而造成可能的危險。而胎盤的形成卻造成很大的抗原表現，但在懷孕的子宮內 T 細胞反而是缺少的，這可能是在胎盤與胎兒的生長扮演很重要的關鍵角色，另外滋養層母細胞(trophoblast)和母體所分泌的物質也是引起免疫耐受性的結果(Petroff, 2005)。

有許多實驗研究提出了各種理論，想解釋母體與胎兒之間免疫耐受性的問題。其中，在小鼠實驗中有研究結果顯示，讓 semiallogeneic 胎兒生存下來很重要的信號及角色包括了，indoleamine-2,3-dioxygenase 和新發現的 B7 family protein, B7-H1，並且他們也都可能參予母體調節性 T 細胞(regulatory T cells)的調控，而調節性 T 細胞也被認為是能成功懷孕的關鍵。另外參予的因子還有 Trophoblast 或母

體所表現的 FasL 和 MHC I (HLA) 分子的不表現(Petroff, 2005)。而除了上述的因子外，1954 年 Medawar's 所提出的(在懷孕期間調控母體免疫反應)假說中，另外列出以下論點 1. 母親與胎兒之間具有 chimerism，胎兒有一半的抗原呈現與母親相同 2. 解剖學上的屏障，母體與胎兒之間隔著滋養層細胞形成自然的物理屏障，沒有免疫細胞可以直接接觸到異體的抗原 3. 異體抗原表現不明顯，因 MHC I 不表現和表現量很低，造成的免疫不反應(Immune ignorance) 4. 部分專一性的免疫抑制性，包括了：Fas/FasL 在 Trophoblast 上的表現，將能辨認自體抗原的細胞給清除(Clonal deletion)；Tryptophan catabolism (indoleamine-2,3-dioxygenase) 可造成對自體抗原反應的淋巴球雖存在但不會對抗原產生反應 Clonal anergy 或 Clonal deletion；懷孕也使的體內偏向 Th2 反應的細胞激素環境，較不會產生發炎的免疫反應；非典型的 MHC 分子的表現(HLA-G 和 HLA-E)，蛋白質表現時能抑制毒殺型 T 細胞的活性並且降低自然殺手細胞的功能(Koch and Platt, 2003)。

### 1.5.2 間葉系幹細胞的免疫抑制性

由體外實驗中証實，來自人類、狒狒和小鼠骨髓間葉系幹細胞均具有抑制異體淋巴球增生的反應；而MSCs不論是利用分裂原PHA或Con A的刺激(Bartholomew *et al.*, 2002)、輔助刺激因子CD3/CD28、異體T細胞、甚至是樹突細胞所促進的T細胞活化均就不等程度的抑制作用(Di Nicola *et al.*, 2002; Farida Djouad, 2003; Krampera *et al.*, 2003; Tse *et al.*, 2003)。此外，間葉系幹細胞能引發T細胞分裂靜止的情形(Glennie *et al.*, 2005)，並藉由其他免疫細胞降低發炎細胞激素的產生(Aggarwal and Pittenger, 2005)。但就毒殺型T細胞(cytotoxic T cells)和自然殺手細胞(Natural killer cells)而言，MSCs抑制能力仍是有爭議的(Rasmusson *et al.*, 2003)。在狒狒的實驗模式中，發現異體的間葉系幹細胞能延長皮膚移植的存活率，而在小鼠的實驗模式中，也發現間葉系幹細胞能預防異體腫瘤細胞株的排斥反應(Djouad *et al.*, 2003)，但目前在這些效應下的免疫機制卻仍不清楚。雖然有關MSC免疫抑

制機制的研究結果有許多互相矛盾的結果被發表出來，但大部分的研究都同意應該是有有一些可溶性因子(soluble factors)參予其中，例如: hepatocyte growth factor (HGF)、transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)、免疫調控因子 IL-10和前列腺素 prostaglandin E2...等 (Di Nicola *et al.*, 2002; Tse *et al.*, 2003)。另外，也有研究顯示 MSCs可釋放indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)來抑制T淋巴細胞之tryptophan的合成或是促進其分解因而抑制了T淋巴球的分裂增生。

此外，相關研究指出間葉系幹細胞表面的免疫分子，如人類組織相容性抗原 HLA (human leukocyte antigen)的表現量很低，且也不表現輔助刺激因子 (costimulatory molecules)如CD40, CD80和CD86，因此推測，異體淋巴細胞對間葉系幹細胞的增生反應就不會發生，換句話說間葉系幹細胞原本就是低免疫性(low immunogenicity)的細胞類型。因此利用間葉系幹細胞的這些低免疫特性將可廣泛的運用在各種細胞治療及再生醫學應用上。



## 第二章 實驗目的和重要性

懷孕的過程中，母體與胎兒之間有一半的抗原是不同的，但卻不會產生排斥現象，這引起我們對懷孕的其中子宮與胎兒所構成的微環境產生興趣，認為其中的羊水與胎盤與免疫耐受性的調控有關，人類胎盤所分離的間葉幹細胞研究上已證實，這類的細胞除了能成功分化成硬骨細胞、軟骨細胞和脂肪細胞等細胞外，另外還具有免疫抑制的能力，與異體 T 細胞共同培養下，能抑制異體 T 細胞的增生能力(Nauta and Fibbe, 2008)；另外有研究顯示來自人類骨髓或臍帶血的間葉幹細胞能提供造血幹細胞生長所需的微環境因而提升造血幹細胞的移植率(Le Blanc *et al.*, 2007)。因此推測，這類的細胞具有克服子宮內骨髓移植所面臨的瓶頸的可能性。來自羊水與胎盤的細胞，在懷孕的時期可提供母體與胎兒之間互動的微環境。相關的研究結果顯示羊水與胎盤的細胞具有免疫調節的功用，但目前為止，有關羊水或胎盤幹細胞對協助造血幹細胞移植的研究並不多，因此，本研究想利用胎兒的骨髓移植模式來評估分離自羊水或胎盤間葉幹細胞對造血幹細胞植入率的影響。然而針對小鼠的羊水或胎盤分離之間葉系幹細胞的文獻不多，對小鼠羊水或胎盤間葉幹細胞也沒有明確的定義，也無法瞭解小鼠羊水或胎盤間葉系幹細胞的功能是否與人類的相同？因此，首先我們必需先建立羊水或胎盤間葉幹細胞分離的技術，若我們能從小鼠羊水或胎盤中分離出間葉系幹細胞，將有助於進一步瞭解控制幹細胞分化或幹細胞參與組織修復和調控的機制，未來也可在小鼠模式上探討子宮內骨髓移植的效用或是在其他移植排斥反應上的運用，甚至現今人類幹細胞無法在活體上直接探討的疾病，可先在小鼠的模式下進行研究探討，使得未來將幹細胞運用在臨床上可能會遇到的危險降到最低。

## 第三章 實驗材料與方法

### 第一節 實驗設計

本實驗主要分兩階段進行：

第一階段目的是由小鼠的羊水及胎盤等組織分離並建立基質細胞：

將 C57BL/6-GFP 基因轉殖小鼠進行交配，觀察有無陰道栓塞(plaque)，觀察的當日以 day 0 計算，本研究以懷孕 13 天母鼠為來源，取其羊水及胎盤組織，經由一連串的分離步驟與酵素消化作用、並利用 Ficoll-paque 溶液分離出單核性細胞等流程，最後經過適當的生長因子培養後，獲得數株貼附型的基質細胞株，其中兩株分別命名為 Amniotic fluid stromal cells (AFSC-1)及 Placenta derived stromal cells (PDSC)，並以此兩株細胞進行後續的定性相關研究。

第二階段則針對所獲得之小鼠羊水及胎盤基質細胞進行定性的評估：

獲得羊水或胎盤基質細胞後，為了進一步瞭解所獲得之細胞的生物特性，因此對該細胞是否具有幹細胞或前驅細胞的特性作分析。首先，利用了流式細胞儀偵測此兩株細胞在造血幹細胞、內皮細胞或表皮細胞等細胞表面分子的表現狀況，也利用 RT-PCR 的方式檢測細胞是否表現幹細胞相關的轉錄基因來分析，另外檢測細胞中鹼性磷酸酶(Alkaline phosphatase)及酸性磷酸酶 (Acid phosphatase) 活性及分佈，還有利用免疫螢光細胞染色法觀察細胞中表皮細胞蛋白 pan-cytokeratin 與幹細胞相關表面分子 Sca-1 的表現。另外，也分析該細胞在生長因子 FGF-b 與 EGF 下生長的狀況，而對於細胞是否有癌化能力的測試則分別以體外洋菜膠群落實驗及小鼠注射實驗進行確認，最後有關細胞功能性評估方面，則針對 AFSC-1 與 PDSC 在硬骨細胞、脂肪細胞與神經細胞的分化能力，與對異體 T 細胞的抑制活性分別進行評估。

### 第二節 實驗材料

## 一、實驗動物

本實驗共使用到四種品系的實驗小鼠：BALB/c (H-2<sup>d</sup>)、C57BL/6J (H-2<sup>b</sup>)、帶有 GFP 基因之 C57BL/6Tg(ACTbEGFP)1Osb/J (H-2<sup>b</sup>)和 NOD/SCID (H-2<sup>d</sup>)免疫不全鼠；主要以懷孕 11-13 天的 C57BL/6-GFP 懷孕母鼠作為分離羊水及胎盤之基質細胞的來源，活體外實驗中異體 T 細胞的實驗主要是選用出生 10~12 週，體重約 25~30 克重之 BALB/c 與 C57BL/6J 小鼠，另外以皮下注射待測細胞到 NOD/SCID 小鼠來進行細胞癌化的檢測工作。BALB/c 與 C57BL/6 小鼠購自財團法人國家實驗動物中心及樂斯科動物中心，C57BL/6-GFP 及 NOD/SCID 小鼠則由美國 Jackson Laboratory 提供。待動物抵達後，將所有老鼠飼養於基因轉殖飼養籠中 (IVC; individual ventilation cage)，每日給予 12 小時的光照週期，飼養室溫度維持在 22~25°C，溼度維持在 60~70%之間，換氣率維持 16-18 次/小時。按時給予食物 (Altromin 1326 實驗鼠飼料，Altromin 公司，德國)，交配、懷孕及哺乳中的小鼠則給予繁殖用飼料 (Altromin 1316 實驗鼠飼料，Altromin 公司，德國)以及酸性飲用水 (pH = 2~3)。所有動物之操作皆依照標準實驗動物操作法執行。動物之管理與飼養參照 “Guide for care and use of laboratory” (NRC 1996)規則辦法施行。

## 二、實驗藥品、培養基及各類試劑

### (一)實驗藥品 (縮寫, 廠商, 編號, 國家)

Acridine orange (Fluka, 01660, USA)

Agarose (J.T. Baker, S426, USA)

Ammonium chloride (Sigma, A4514, USA)

Ammonium sulfide solution (Fluka, 09981, USA)

Ascorbic acid-2-phosphate (Sigma, A8960, USA)

Advantage™ RT-PCR kit (Clontech, 639506, USA)

Cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside (AraC, Sigma, c-6645, USA)  
BCIP/NBT Liquid Substrate System (Sigma B1911, USA)  
Bovine serum albumin (BSA, Sigma A3803, USA )  
Calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ , 31214, USA)  
Concanavalin A (Con A, Sigma C5275, USA)  
Collagenase Type II (Sigma, C6885, USA)  
Cobalt nitrate ( J.T.Baker, 1680-01, Japan )  
Cesium chloride ( $\text{CsCl}$ , Amresco, 0415, USA)  
Dexamethasone (Sigma D4902, USA)  
Dispase II (Roche, 11 276 921 001, USA)  
dNTP mix (Gene teks, GTD200, USA)  
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (D-PBS, Gibco BRL, 21600-010, USA)  
Fetal bovine serum (FBS, PAA, A15-101, USA)  
Ethanol (台灣菸酒公賣局)  
Ethidium bromide (EtBr, Amresco, 0492-5G, USA)  
Ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA, Sigma, E6511, USA)  
Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech 300677, SWEDEN)  
Glucose (J.T. Baker, 1916, USA)  
Glycerol (Amresco, 0854, USA)  
Glutaraldehyde solution ( AO, Fluka, 49630, Japan )  
 $\beta$ -glycerophosphate ( Sigma, G6251, USA )  
Gel Mount<sup>TM</sup> Aqueous Mounting Medium (Sigma, G0918, USA)  
 $\text{H}_2\text{SO}_4$  (J.T. Baker, 9681-01, USA)  
 $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Riedel-dehaen, 30417, USA)  
HCl (J.T. Baker, 9535-01, USA)

Heparin (Sigma, H3149, USA)

Hepes (Hyclone, SH30237, USA)

3-Isobutyl-1-methylxanthin, mind.99% (IBMX, Sigma, I5879, USA)

Insulin, from Bovine Pancreas (Sigma, I6634, USA)

Ionomycin (Sigma, I0634, USA)

Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM, Gibco Invitrogen Corporation, 12200, USA)

Indomethacin (Sigma, I7378, USA)

Isoflurane (Baxter, 15C204, USA)

Isopropanol (J.T Baker, 9084-3, USA)

L-glutamine (Hyclone, SH30034, USA)

Lead nitrate (Riedel-deHaen, 31137, USA)

Nuclear Fast Red solution (Sigma, N3020, USA)

NP-40 (igepal CA-630, Sigma, I-3021, USA)

Mitomycin C (Sigma, M0503, USA)

Magnesium Chloride ( $MgCl_2$ , Sigma, M2393, USA)

Magnesium Sulfate hydrate (Fluka, 63139, Japan)

Naphthylethylene diamine dihydrochloride (Sigma, N9125, USA)

Paraformaldehyde (Sigma, 158127, USA)

Penicillin-Streptomycin-Glutamine (Gibco Invitrogen Corporation, 10378-016, USA)

Prime Taq polymerase (Genet Bio, G-1000, USA)

Potassium chloride (J.T.Baker, 3040-01, Japan)

Proteinase K (Worthington, PIE4886, USA)

Recombinant FGF basic (RandD systems, 3139-FB, USA)

Recombinant mouse IL-10 (RandD systems, 417-ML, USA)

Recombinant mouse IL-6 (RandD systems, 406-ML, USA)

Recombinant human TGF- $\beta$ 1 (RandD systems, 240-B-002, USA)

Retinoic acid, minimum 98% HPLC (Sigma, R2624, USA)

RPMI-1640 medium (Gibco Invitrogen Corporation, 11835, USA)

Saponin (J.T. Baker, S0746, USA)

Silver nitrate (Sigma, S6506, USA)

Sodium azide (NaNH<sub>3</sub>, Riedel-dehaen, 13412, USA)

Sodium bicarbonate (Sigma, S5761, USA)

Sodium chloride (Sigma, S5886, USA)

Sodium thiosulfate (Sigma, S7026, USA)

Sodium hydroxide (J.T. Baker, 3722-01, USA)

Sodium phosphate dibasic anhydrous (J. T. Baker, 3828-01, USA)

Sodium pyruvate (Gibco, 11360, USA)

Sucrose (J.T. Baker, 4097-04, Japan)

Sulfanilamide (Sigma, S9251, USA)

Tris-base (J.T. Baker, 4109-01, Japan)

Tetramethylbenzidine (MA 02048, USA)

Tris-base (J.T. Baker, 4109-01, USA)

TritonX-100 (J.T. Baker, X198-07, USA)

Trypan Blue (Sigma, T614, USA)

Trypsin (Sigma, T4799, USA)

Tween-20 (polyoxyethylene-sorbitan monolaurate, Sigma, P1379, USA)

100bp DNA ladder (One Star, e-100bp, Taiwan)

2-Mercaptoethanol (2-ME, Sigma, M7522, USA)

2-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue  
(MTT, Sigma, M2128, USA)

(二)緩衝溶劑與各類試劑

1、細胞培養液 (Culture medium)

羊水基質細胞 IMDM 細胞培養液：

2-ME	5 $\mu$ M
L-glutamine	2 mM
Pencillicn-Streptomycin	50 U/ml – 50 $\mu$ g/ml
FBS	10%
溶於IMDM 培養液	
外加 recombinant mouse FGF-basic (rmb-FGF)	10 ng/ml

胎盤基質細胞 IMDM 細胞培養液：

2-ME	5 $\mu$ M
L-glutamine	2 mM
Pencillicn-Streptomycin	50 U/ml – 50 $\mu$ g/ml
FBS	2%
溶於IMDM 培養液	
外加recombinant mouse FGF-basic (rmb-FGF)	10 ng/ml

RPMI-1640 細胞培養液：

Hepes	10 mM
L-glutamine	2 mM
Pencillicn-Streptomycin	100 U/ml – 100 $\mu$ g/ml
FBS	10%
溶於RPMI-1640 培養液	

羊水及胎盤收集緩衝液：

EDTA	2 mM
Penicillin-Streptomycin	100 U/ml - 100 µg/ml
FBS	2%
溶於D-PBS	

胎盤digestion medium：

Collagenase II	2 mg/ml
Dispase II	2.4 U/ml
Heparin	8 U/ml
溶於IMDM 培養液	

骨母細胞分化培養液：

FBS	10%
Ascorbic acid-2-phosphate	0.2 mM
β-glycerol phosphate	10 mM
Dexamethasone	0.1 µM
溶於IMDM 培養液	

脂肪細胞分化培養液：

FBS	10%
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	0.5 mM
Insulin	10 µM
Indomethacin	60 µM
Dexamethasone	1 µM

溶於IMDM 培養液

神經細胞分化培養液(一階段)：

FBS	10%
-----	-----

all- <i>trans</i> -retinoic acid	0.5 $\mu$ M
溶於IMDM 培養液	

## 2、細胞計算試藥

<u>0.2% Trypan blue</u>	0.2 g
溶於D-PBS	100 ml

### 100X EtBr/AO :

Acridine orange	15 mg
Ethidium bromide	50 mg

先溶解於1 ml 95% 酒精，再溶於49ml ddH<sub>2</sub>O，使用時以PBS 做100倍稀釋

## 3、細胞增殖反應試藥 (Reagents of Cell Proliferation Assay)

<u>MTT solution</u>	500 mg
溶於D-PBS	100 ml
<u>Acid-isopropanol</u>	0.06 N HCl
溶於isopropanol	

### PBS working buffer :

Pencillicn-Streptomycin	100 U/ml - 100 $\mu$ g/ml
-------------------------	---------------------------

FBS	2%
-----	----

溶於 D-PBS

### 10 X Lysing buffer :

Ammonium chloride	150 mM
-------------------	--------

Sodium bicarbonate	10 mM
--------------------	-------

EDTA	1 mM
------	------

溶於二次蒸餾水

## 4、免疫染色用藥

3% paraformaldehyde/PBS

秤 0.3g paraformaldehyde 於 50ml 離心管中，加入 PBS 至 10ml 在 65°C 水浴下加熱至完全融解，最後保存於 4°C。

1% PBST

TritonX-100 0.1 ml

溶於 PBS 100 ml

5.5% Blocking buffer

脫脂奶粉 5.5 g

溶於 PBST 100 ml

**5、磷酸酵素活性染色試劑**

固定液 2% glutaldehyde

Glutaldehyde 1 ml

溶於 D-PBS 中 50 ml

酸性磷酸酵素基質液

Solution A :

$\beta$ -glycerophosphate 3%

溶於一次蒸餾水中

Solution B :

Lead nitrate 0.01 g

Sucrose 0.1 g

溶於 0.05 M Acetate buffer (pH5) 中 10 ml

2% Coblt nitrate

Coblt nitrate 2 g

溶於一次蒸餾水中 100 ml

1% ammonium sulfide



Ammonium sulfide	1 g
溶於一次蒸餾水中	100 ml
<u>甘油封片液</u>	
Glycerol 50%	50 ml
Sucrose 4%	4 g
溶於 PBS 中	

## 6、DNA 萃取試劑 (Reagents of DNA extraction)

### Saponin lysis solution

Saponin	0.4%
Sodium chloride	0.5 g
溶於無菌水中，pH7.4	

### DNA extraction solution

Solution A:

Potassium chloride	100 mM
Magnesium chloride	2.5 mM
溶於 10 mM Tris buffer (pH8.3) 中	

Solution B :

Magnesium chloride	2.5 mM
Tween-20	1 ml
NP-40	1 ml
Proteinase K	0.4 mg/ml
溶於 10 mM Tris buffer (pH8.3) 中	100 ml

## 7、尼龍羊毛管柱製備 (Nylon Wool Column)



秤 0.5 g 之尼龍羊毛 (Nylon Wool, Perkin Elmer Life Science Cat No. NCC-600, USA), 將原本規則排列的羊毛撕亂再以不規則的方向收集羊毛, 塞到無菌 10 ml 的針筒中, 以滅菌袋包裝, 在滅菌烘乾後使用。

### (三) 小鼠單株抗體

anti-mouse B220 PE (Southern Biotechnology, 1665-09, USA)

anti-mouse CD3e biotin (eBioscience, 13-0031, USA)

anti-mouse CD11b PE (eBioscience, 12-0112, USA)

anti-mouse CD13 PE (BD Pharmingen, 558745, USA)

anti-mouse CD31 PE (eBioscience, 12-0311, USA)

anti-mouse CD34 biotin (eBioscience, 13-0341, USA)

anti-mouse CD44 PE (eBioscience, 12-0441, USA)

anti-mouse CD45 biotin (eBioscience, 13-0451, USA)

anti-mouse CD90 biotin (eBioscience, 13-0900, USA)

anti-mouse CD105 biotin (eBioscience, 13-1051, USA)

anti-mouse CD106 biotin (eBioscience, 13-1061, USA)

anti-mouse CD117 biotin (eBioscience, 13-1171, USA)

anti-mouse CXCR-4 PE (eBioscience, 14-9991, USA)

anti-mouse Flk-1 biotin (eBioscience, 13-5821, USA)

anti-mouse Gr-1-biotin (eBioscience, 13-5931, USA)

anti-mouse H-2K<sup>b</sup> PE (BD Pharmingen, 06105A, USA)

anti-mouse I-A<sup>d</sup> FITC (BD Pharmingen, 553547, USA)

anti-mouse Ly6A/E biotin (eBioscience, 13-5981, USA)

anti-mouse NK-1.1 biotin (eBioscience, 13-5941, USA)

anti-human/mouse Oct-3/4 (RandD, MAB1759, USA)

anti-mouse/human SSEA-1 PE (eBioscience, 12-8813, USA)

anti-mouse/human PGP 9.5 (Ultraclone, 31, USA)

anti-mouse/human pan-cytokeratin (D-12): (Santa Cruz ,sc-17843, USA)

goat anti-rat IgG (RandD, F0105B, USA)

streptavidin PE (eBioscience, 12-4317, USA)

PE rat IgG2a isotype (eBioscience, 12-4321, USA)

PE rat IgG2b isotype (eBioscience, 12-4031, USA)

PE rat IgG1 isotype (eBioscience, 12-4301, USA)

PE rat IgM isotype (eBioscience, 12-4341, USA)

PE mouse IgG2a isotype (eBioscience, 12-4724, USA)

- (四) 聚合酵素連鎖反應之引子 (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES, INC. USA, 每得科技有限公司)  
所有 primer 資料整理於表一。



### 第三節 儀器設備

- 1、二氧化碳恆溫培養箱 ( 5430, NUAIRE, USA )
- 2、連續波長微孔盤分析系統 (SPECTRA max 340 PC, Tekon Technologies, USA)
- 3、水平電泳槽 ( MP-250, MAJOR Science, Taiwan )
- 4、倒立位相差顯微鏡 ( IX 50-S8F2, Olympus, Japan )
- 5、倒立位相差顯微鏡 ( IX 71, Olympus, Japan )
- 6、正立位相差顯微鏡 ( BX 51, Olympus, Japan )
- 7、桌上型光學顯微鏡 ( YS2-T, Nikon, Japan )
- 8、無菌操作台 ( 造鑫, Taiwan )
- 9、恆溫水浴槽 ( BH-230, YIH DER, Taiwan )
- 10、酸鹼測定儀 ( SP-2200, SUNTEX, Taiwan )
- 11、桌上型微量離心機 ( Z220M/H, HERMLE, Germany )
- 12、低速低溫離心機 ( 05PR-22, HITACHI, Japan )
- 13、超高離心機 ( CP80 MX, Beckman Coulter, USA )
- 14、盤式離心機 ( TJ-25 centrifuge, Beckman Coulter, USA )
- 15、血球計數器 ( Hausser Scientific Horsham, USA )
- 16、震盪器 ( Genie-2, Scientific, USA )
- 17、VDS 紫外線照相裝置 ( 9710-U-513, Pharmacia Biotech )
- 18、流式細胞儀 ( CyFlow, Partec, Germany )
- 19、流式細胞儀管 ( 55.484, SARSTEDT, Germany )
- 20、針頭銷毀機 ( IE1-VI3000, Taiwan )
- 21、持針器 ( ST-NO14, Germany )
- 22、骨剪 ( ST-L017, Germany )

- 23、縫合器 (ST-C300, USA)
- 24、縫合夾 (ST-C301, USA)
- 25、手術剪刀 ( ST-S214, Germany )
- 26、有鉤鑷子 ( ST-A112, Germany )
- 27、無鉤鑷子-彎 (ST-D318, Germany)
- 28、無鉤鑷子-直 (ST-D118, Germany)
- 29、剪刀 (ST-S011, Germany)
- 30、記號鉗 ( ST-H160, Germany )
- 31、鉻化腸線 ( ST-CT402, Taiwan )
- 32、毛細管拉針器 (MODEL P-87, SUTTER INSTRUMENT, USA)
- 33、PCR machine (T1 Thermocycler, Biometra, USA)
- 34、分光光度計 (UV-Visible Spectrophotometer )
- 35、滾動搖晃器 ( VI-3000, VADI, Taiwan )
- 36、動物麻醉機 (VIP 3000, MDS matr, USA)
- 37、真空乾燥機 (Milli-Dry;Perospetive Biosystems,U.S.A)
- 38、顯微鏡照相系統 (DP 70, Olympus, Japan)
- 39、顯微鏡照相系統 (DP 71, Olympus, Japan)
- 40、照相系統軟體 (OPController and OPManager)

## 第四節 實驗方法

### (I) 羊水和胎盤間葉系基質細胞的分離與培養

#### 一、小鼠羊水間葉系基質細胞分離與培養

犧牲懷孕 11-13 天的母鼠，將二側子宮角取出腹壁之外，用 D-PBS 洗去紅血球，先以 29G 胰島素針穿透子宮壁收集羊水，並且將子宮壁撕開可看見胎盤及胎鼠，將胎鼠與胎盤置於 collecting buffer 中分開胎盤及胎鼠，同時收集游離的羊水細胞。由胰島素針收集到的羊水以 4°C，500g，離心 10 分鐘，將羊水及細胞分開，離心後收集上清液儲存在 -20°C，將細胞團拍散加入 collecting buffer 中與其他的羊水細胞混合均勻，以 20°C，1500rpm，離心 5 分鐘，去上清液加入 5ml lysing buffer 作用 2 分鐘，加入細胞培養液中中和反應，再以細胞培養液洗兩次，計算細胞數，依  $3-5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> 培養細胞，在培養 72 小時後，去掉未貼附的細胞，加入新鮮的羊水細胞培養液，細胞密度培養至 6 分滿左右，以 0.25% Trypsin-EDTA 在 37°C 作用 2 分鐘，加入細胞培養液中中和反應並收集游離出的細胞液離心(1500rpm，5 分鐘，20°C)，去掉上清液，拍散細胞後，加入新鮮細胞培養液，以 0.2% trypan blue 染色計算細胞數，最後以  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 細胞密度進行繼代培養。

#### 二、小鼠胎盤間葉系基質細胞分離與培養

犧牲懷孕 13-15 天的母鼠，在 collecting buffer 中將胎盤與胎鼠分離，收集胎盤至 IMDM serum free medium 中，以解剖用具剝去胎盤的羊膜那一側，接著保留胎盤絨毛層和蛻毛層利用解剖刀將組織盡量切碎，將切碎組織以 20°C，2000 rpm，離心 10 分鐘收集，加入 digestion medium，37°C 作用 1.5 小時，加入 IMDM serum free medium 稀釋 digestion medium，離心 20°C，2000 rpm，

10 分鐘，去上清液加入 0.25% Trypsin-EDTA in IMDM，37°C 作用 shake 30 分鐘，收集組織液加入等體積細胞培養液終止反應，並將組織液離心 20°C，2000 rpm，10 分鐘，將組織液稀釋以 100  $\mu$ m nylon mesh 過濾，並計算細胞數，將細胞稀釋到  $2 \times 10^7$  cells/ml 以再緩慢的加入 Ficoll-paque 溶液中進行單核性細胞的分離，在 20°C 下，進行 800 g 離心，20 分鐘，收集細胞層，以細胞培養液洗兩次，計算細胞數，依  $3-5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> 培養細胞，在培養 48 小時後，去掉上清液，加入新鮮的胎盤細胞培養液，細胞培養至 6~8 分滿左右，以 0.25% Trypsin-EDTA 在 37°C 作用 1 分鐘，加入細胞培養液中中和反應並離心(1500 rpm，5 分鐘，20°C)，去掉上清液，拍散細胞沈澱後加入細胞培養液，以 trypan blue 染色計算細胞數，細胞則以  $1-1.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 細胞密度進行繼代培養。

## (II) 羊水或胎盤間葉系基質細胞生物特性的評估

### 一、小鼠羊水及胎盤細胞表面抗原分析

小鼠羊膜及胎盤細胞經繼代後，獲得的懸浮細胞在 shaker 上待其細胞穩定約 30 分鐘，以 FASC buffer 清洗兩次，將細胞平均分配到 FASC tubes 中 ( $5 \times 10^5$  cells/tube)，冰浴 3 分鐘。分別加入適當濃度的抗體：B220, CD3e, CD11b, CD13, CD31, CD34, CD44, CD45, CD90, CD105, CD106, CD11, CXCR-4, Flk-1, Gr-1, H-2K<sup>b</sup>, I-A<sup>d</sup>, Ly6A/E, NK-1.1, Oct-4, SSEA-1，4°C 避光作用 30 分鐘，再以 FASC buffer 洗兩次，最後把細胞懸浮於 1 ml 的 FASC buffer 中，利用細胞流質儀對實驗結果進行測量與分析。

### 二、利用聚合酶連鎖反應(PCR)鑑定細胞來源

1. DNA 的萃取：將細胞(P10~15)繼代下來後，收集  $5 \times 10^6$  細胞以 D-PBS 清

洗兩次，轉至 eppendorft 離心去掉上清液，打散 pellet 儲存-20°C。DNA 萃取之法參考(Chou *et al.* 2001)，並加以修飾。由-20°C冰箱中取出檢體，置於冰上待其解凍。當其完全解凍後，加入等體積之 saponin lysis solution，混合均勻必要時可用 pippet 抽吸，離心（7000 rpm、5 分鐘），抽掉上清液並打散細胞沈澱後，加入 1 ml 的 solution A，離心（7000 rpm、5 分鐘），移除上清液並打散細胞後，加入 50  $\mu$ l 的 solution A 及 50  $\mu$ l 的 solution B，60°C 下作用 2 小時，每 15 分鐘要搖晃一次，接著於 95°C 作用 30 分鐘，作用完畢後，以 TE buffer 稀釋 DNA 萃取物，測量 260nm 之吸光值，藉以換算 DNA 濃度，公式為：DNA 濃度 = (OD<sub>260</sub> 值  $\times$  稀釋倍數)  $\times$  50  $\mu$ g/ml  $\times$  0.001，即可得到 DNA 之濃度（單位為  $\mu$ g/ $\mu$ l），其中 50  $\mu$ g/ml 為當 OD<sub>260</sub> 之吸光值為 1 時，DNA 濃度為 50  $\mu$ g/ml。以無菌水將 DNA 稀釋成 10 ng/ $\mu$ l，置於-20°C 備用。

2. 聚合酶連鎖反應（PCR）：各取 1  $\mu$ l primer、0.25  $\mu$ l Taq、1  $\mu$ l dNTP、2.5  $\mu$ l 10X buffer 及 9.3  $\mu$ l 無菌水混合，再取 10  $\mu$ l 濃度為 10 ng/ $\mu$ l DNA 溶液加入，混合均勻。聚合酶連鎖反應條件參照表一。以 Chromosome Y (SRP) primer 確認細胞來源為母體或胎兒、以 H<sub>2</sub>Kb primer 確認細胞來自 C57BL/6 strain 的小鼠並利用  $\beta$ -actin 作為對照組，確認 DNA 萃取無誤。
3. 電泳分析：將聚合酶連鎖反應之產物連同 100 bp DNA ladder 同時以 1.5% 洋菜膠（agarose gel）進行電泳分析，在 100 V 之電壓下，電泳 40-50 分鐘，洋菜膠以 EtBr (Ethidium Bromide) 染色 5 分鐘，用水退染 10 分鐘，利用 VDS 紫外線照相裝置拍照。

### 三、利用反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)鑑定幹細胞相關基因的表現

1. RNA 的萃取：收集  $5 \times 10^6$  P9~P15 繼代的 AFSC-1 或 PDSC 細胞以 D-PBS 清洗兩次，轉至 eppendorft 離心去掉上清液，打散 pellet 加入 950  $\mu$ l RNazol

B, 輕輕 shake 後凍於-80°C 冰箱儲存。一個月內解凍萃 RNA, 加入 100  $\mu$ l chloroform 劇烈搖晃 30 秒後靜置於冰上 5 分鐘, 離心 12000 g, 15 分鐘, 收集上清液 500  $\mu$ l 轉到新的 eppendorf 加入 500  $\mu$ l isopropanol 搖晃均勻室溫靜置 15 分鐘使 RNA 沉澱, 以 12000 g, 15 分鐘離心, 倒掉上清液加入 1 ml 75% DEPC 酒精清洗 RNA, 利用 vortex 將 RNA pellet 旋起來, 再以 7500 g, 5 分鐘離心, 倒掉上清液的酒精並儘量扣乾, 可利用真空乾燥機將水分儘量抽乾直到液體剩下三分之一米粒大小, 加入 12  $\mu$ l DEPC 水回溶 RNA 並取 2  $\mu$ l 以 500 倍稀釋, 利用分光光度計測量 RNA 濃度。

2. RNA 反轉錄為 cDNA: 將 mRNA 稀釋到 1  $\mu$ g/12.5  $\mu$ l 依照 Clontech RT-PCR kit 進行 reverse transcription 將 mRNA 轉錄成 cDNA。將 1  $\mu$ g/12.5  $\mu$ l mRNA 加入 1  $\mu$ l oligo (dT) primer 於 70°C 下作用 2 分鐘, 再依序加入 4  $\mu$ l 5X buffer、2  $\mu$ l dNTP、0.5  $\mu$ l recombinant RNase inhibitor 和 1  $\mu$ l MMLV reverse transcriptase, 進行反轉錄條件為: 42°C 1 小時, 94°C 5 分鐘、終止於 4°C。
3. PCR: 將 cDNA 取 10  $\mu$ l 加入 9.3  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O、2.5  $\mu$ l 10X buffer、1  $\mu$ l 10 mM forward primer、1  $\mu$ l 10 mM reverse primer、1  $\mu$ l 10 mM dNTP mix 和 0.2  $\mu$ l Taq polymerase 混合均勻後進行 PCR 反應。
4. 電泳分析: 取 5  $\mu$ l PCR 產物與 1  $\mu$ l DNA loading dye 混合均勻, 以 1.2~1.5% agarose gel 在 100 伏特電壓下進行電泳 50 分鐘, gel 以 EtBr 染色, 並利用 VDS 紫外光照相裝置拍照並以其軟體分析。

#### 四、鹼性與酸性在磷酸酵素活性染色

利用可與細胞中鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase) 或酸性磷酸酵素 (acid phosphatase) 作用的化學藥品來檢測羊水或胎盤基質細胞中這兩種酵素的活性與分

佈，利用酵素基質與酵素間結構性之結合，再以呈色劑使之呈色，藉由所呈現出顏色的強弱來偵測酵素之活性。

(A) 鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase stain) 染色

先將基質細胞作單層均勻培養於無菌之蓋玻片上，經過約 24 小時，待細胞完全貼附於蓋玻片上後，將蓋玻片取出，以 PBS 清洗數次後，以 3.7% Formaldehyde 室溫作用 30 分鐘來固定細胞。再以 PBS 將固定液洗掉後，加入 1% Triton-X100 室溫作用 5 分鐘，以 PBS 清洗數次後加入 BCIP/NBT substrate 室溫作用 20 分鐘，以 PBS 將清洗數次，將蓋玻片上之液體吸乾，於載玻片上滴上一滴甘油封片液，將蓋玻片有細胞之一面沿甘油封片液覆蓋於載玻片上，利用光學顯微鏡觀察並照相。

(B) 酸性磷酸酵素 (acid phosphatase) 染色

把細胞作單層均勻培養於無菌蓋玻片上，待細胞完全貼上，並長至 8 至 9 成滿時，取出蓋玻片以 PBS 清洗數次，以 3.7% Formaldehyde 室溫作用 30 分鐘固定細胞，移除固定液後加入 PBS 清洗，清洗數次後，加入新鮮配製之酸性磷酸酵素基質溶液 (10 ml solution B 加入 18 滴 solution A) 室溫作用 1 小時，PBS 清洗數次後，加入 1% ammonium sulfide 室溫作用 1 至 2 分鐘，加入 PBS 清洗數次，將蓋玻片上之液體吸乾，於載玻片上滴上一滴甘油封片液，將蓋玻片有細胞之一面沿甘油封片液覆蓋於載玻片上，利用光學顯微鏡觀察並照相。

## 五、免疫染色(Immunofluorescence staining)

將細胞從 incubator 取出，移除培養液後以 D-PBS 清洗兩次，加入 3% paraformaldehyde 在 4°C overnight 或室溫 20 到 30 分鐘，再用冰的 PBS 清洗兩次後加入 0.3% TritonX-100/PBS 作用 5 分鐘，同樣以 PBS 清洗兩次後加入 blocking buffer，一小時後去掉 blocking buffer 加入一抗作用(室溫下作用一小時或 4°C 下作

用 overnight)，用 PBST 清洗三次每次 5 分鐘，再加入二抗和 DAPI 避光作用 45 分鐘，再用 PBST 清洗三次，最後用 Mounting buffer 將玻片固定在載玻片上。

#### 六、羊水或胎盤間葉系基質細胞癌化測試 (Tumorigenic assay)

A. 活體外實驗 (*in vitro*)：微波溶解 1% Agar 後放到水浴槽維持 40°C (但不能超過 40°C)，並將 2X IMDM 內含 20% FBS 培養液同樣於水浴槽中保溫，30 分鐘後將 Agar 和 IMDM 溶液兩者以 1:1 混合，可得到含 1X IMDM、10% FBS、0.5% 洋菜膠之混合液。將其注入 6 孔細胞盤中約 1.5 ml，靜置使其凝固。接著混合 2X IMDM、20% FBS 與 0.7% 洋菜膠，得到 1X IMDM、10% FBS 與 0.35% 洋菜膠混合液，同時將陽性組的腫瘤細胞株或特測的樣本細胞稀釋到  $2 \times 10^5$  cells/ml 後，取 0.1 ml 之細胞混合液與 6 ml 之 1X IMDM、10%FBS 與 0.35% 洋菜膠混合液混合，再以每孔 1.5 ml 的量加入先前已有 0.5% 洋菜膠之 6 孔細胞盤中，故每孔中約有 5000 個細胞。將 6 孔細胞盤置 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中於 37°C 培養約 10~14 天，腫瘤群落的形成與否可在倒立式顯微鏡下觀察評估。

B. 活體內實驗 (*in vivo*)：於實驗前一天將 NOD/SCID 小鼠接受全身性放射線照射(CS<sub>137</sub>, 350cGy)，於 24hr 內完成細胞物注射，腫瘤細胞株(BNL 1ME.7R.A 以  $1 \times 10^7$  cells 注射或 CT-26 以  $1 \times 10^4$  cells 注射) 與待測細胞株( $1 \times 10^7$  cells) 主要以皮下注射的方式注入於右大腿的部位，每組作 2 重複。經 4-12 週後，觀察注射部位是否有腫瘤形成。

### (III) 羊水或胎盤間葉系基質細胞功能性的評估

#### 一、基質細胞分化能力的評估

AFSC-1 與 PDSC 在細胞分化或特定組織細胞的特性，可利用將 AFSC-1 或 PDSC 培養在特定組織分化所需的培養基中，經過一段時間後評估 AFSC-1 或 PDSC 分化成特定組織細胞的能力，評估方式可利用細胞的型態與分化後所形成之各特定組織細胞表現的相關分子或產物來確認，此實驗是針對 AFSC-1 或 PDSC 分化成骨母細胞、脂肪細胞與神經細胞等三種組織的能力作分析。

- (A) 骨母細胞分化實驗：將細胞以  $3-4 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> 種入 6 cm dish 中，24 小時後置換成骨母細胞分化培養液，每 2 天換一次，當類骨母細胞形成並且細胞長約八九分滿後停止培養細胞，移除培養液用 D-PBS 清洗細胞數次並進行 Von Kossa stain 來確認。方法簡述如下，將細胞以 10% formalin 在室溫中固定作用 20-30 分鐘，再以 dH<sub>2</sub>O 清洗數次，加入 2 ml 2% silver nitrate 後用 UV(laminar flow UV 燈管)照 1 小時使之氧化產生黑褐色沉澱物，先以 dH<sub>2</sub>O 清洗數次並加入 5% sodium thiosulfate 作用 5 分鐘以洗去多餘的 silver，再以 dH<sub>2</sub>O 清洗數次，最後加入 nuclear fast red 容易作用 30 秒後再以 dH<sub>2</sub>O 清洗數次，以光學顯微鏡觀察結果並照相。
- (B) 脂肪細胞分化實驗：將  $3-4 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> 種入 6 cm dish 中，24 小時後置換成脂肪細胞分化培養液，每 2 天換一次，當類脂肪細胞形成後停止分化，移除培養液用 D-PBS 清洗細胞數次並進行 Oil-red O 染色的程序，首先係包先以 10% formalin 在室溫中固定作用 5 分鐘，去掉 formalin，再加入 10% formalin 作用 1 小時，去掉 formalin 並將細胞置換於 60% isopropanol 溶液中，將 dish 置於 hood 中風乾，待完全風乾後加入 Oil red O working solution 染色 10 分鐘，時間到後移除所有 Oil red O 並且馬上加入 dH<sub>2</sub>O 清洗數次，以光學顯微鏡觀察結果並照相。
- (C) 神經細胞分化實驗：神經細胞的誘導分化可以是一階段和二階段誘導的方式進行，一階段式是直接將 AFSC-1 或 PDSC 培養在有 all trans-retinoic acid

的培養液中；而二階段式誘導是將細胞先用 NCM 溶液誘導再利用 all-trans-retinoic acid 誘導。本研究是採用二階段式誘導的方式進行，首先，先備製 neuro condition medium (NCM)；取出生一週大的 C57BL/6 新生鼠的大腦，以 collecting buffer 清洗一次，並利用 40  $\mu\text{m}$  cell strainer 將大腦在 10% FBS IMDM 細胞培養液中研磨成單一懸浮細胞，接著將來自兩顆大腦細胞的懸浮液 20 ml 種入一個 75T flask，隔天加入 2  $\mu\text{M}$  AraC 繼續培養五天後，收集其上清液即為 NCM。接著將細胞以  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 種入 24well 中，24 小時後置換成 NCM 繼續培養 2~3 天，移除 NCM 再加入含有 0.5  $\mu\text{M}$  all-trans-retinoic acid 的細胞培養液繼續培養 2~3 天，顯微鏡下觀察待細胞分化成類似神經的細胞後即停止培養。有關神經細胞分化的結果是利用免疫螢光染色技術以可辨識神經細胞特有蛋白 PGP (Protein Gene Product) 9.5 抗體作標定，再利用帶有螢光物質 Rodamine 123 的 2 級抗體來呈現結果。

## 二、羊水和胎盤基質細胞之免疫抑制活性的分析

### (A) 羊水及胎盤間葉幹細胞對單向異體淋巴球混合實驗 (One-way allogeneic mixed lymphocyte reaction, one-way MLR)

異體淋巴球混合實驗之免疫反應原理為兩群來自不同品系的淋巴球細胞，因組織相容性複合分子(Major Histocompatibility Complex, MHC;小鼠為 H-2)不同，因此雙方的 T 淋巴球會將對方視為外來物而產生細胞增生的反應，而為了區分二者的反應，培養前會將其中一方 T 細胞的增生能力先用 mitomycin C 或放射線抑制住，因此命名為單向淋巴球混合實驗。本研究是利用此特性將基因型為 H-2<sup>d</sup> 的 T 細胞與基因型為 H-2<sup>b</sup> 的基質細胞共同培養，如果羊水或胎盤的間葉幹細胞具有免疫抑制的活性時，T 細胞的增生能力就會降低。實驗前一天先將基質細胞繼代下來，計算完細胞數後以 1% P/S 的 IMDM 培養液清洗

細胞兩次，將細胞調整在 1 ml 中加入 Mitomycin C (50 mg/ml 處理  $5 \times 10^7$  個細胞)於 37°C 作用 20 分鐘，接著以細胞培養液清洗細胞三次，去除 mitomycin C，再以細胞培養液將細胞稀釋成所需之細胞濃度種到培養盤中。第二天以頸椎脫位法犧牲 BALB/c 及 C57BL/6 小鼠，取得其脾臟將其研磨成單一懸浮細胞，靜置 5 分鐘後轉到新的離心管，以 EtBr/AO 染色並利用螢光顯微鏡計算細胞死活，將細胞稀釋成  $2-3 \times 10^7$  cells/ml，再以等體積比的方式以 Ficoll-Paque 溶液，以 800 g 離心 20 分鐘分離出單核性白血球，將所分離出的細胞以培養液清洗細胞 2 次後再以 EtBr/AO 染色計算細胞的數目待用。在檢測方法中，以 BALB/c 小鼠之脾臟單核性細胞為接受者細胞 (responder)，另外以 BALB/c 小鼠脾臟單核性細胞、C57BL/6 小鼠的脾臟單核性細胞為 syngenic 和 allogenic 的刺激者 (stimulator)，其中以 BALB/c 小鼠脾臟細胞作為實驗之陰性對照組 (syngenic stimulator)，其接受者的 T 淋巴球不會產生增生反應，另外 C57BL/6 小鼠脾臟細胞作為異體刺激之陽性對照組 (allogenic stimulator)，其接受者的 T 細胞淋巴球會受刺激而產生增生反應。基質細胞羊水 AFSC-1 或胎盤 PDSC 則作為實驗測試組的刺激者。C57BL/6 小鼠脾臟細胞為刺激者需先以 Mitomycin C 處理來抑制細胞本身的增生能力，接著以細胞培養液清洗細胞三次，去除 mitomycin C，再以細胞培養液將細胞稀釋成所需之細胞濃度。取  $4 \times 10^5$  的接受者細胞分別與 syngenic 組細胞 ( $8 \times 10^5$ )、allogenic 組細胞 ( $8 \times 10^5$ ) 或基質細胞 ( $1 \times 10^4$ 、 $2.5 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ ) 混合共同培養 3 天，細胞增殖之程度是利用 MTT 的分析方法來檢測接受者細胞增殖的情形，MTT 為一種水溶性黃色化合物會被細胞內的粒線體脫氫酶 (mitochondrial dehydrogenase) 還原而形成紫色結晶，這個紫色結晶物質經由酸性有機溶劑 (acid-isopropanol) 溶解後會在 OD570nm 產生吸光值，因此當細胞活性越高時相對的紫色結晶就越多，而 OD 值也就越高。方法簡述如下：將共同培養後的 96 孔盤從培養箱取出，去掉上清液 100  $\mu$ l，加入 15  $\mu$ l/well 的 MTT 之後放入 5% CO<sub>2</sub> 的 37°C 培養箱中避光培養 40 分鐘，時間

到後取出 96 孔盤加入 100  $\mu\text{l}$ /well 的 acid-isopropanol 在室溫下避光培養 20 分鐘，利用微量吸取器將紫色的結晶物質繳散溶解，最後利用 ELISA (SPECTRA max 340 PC)分析儀測量 OD570nm 吸光值。

## (B) 羊水或胎盤間葉幹細胞對 Con A 或 anti-CD3 Abs 活化 T 細胞增生反應的測試

為了進一步確認基質細胞可抑制活化的異體 T 細胞的增生作用，並不是因為缺乏細胞受體訊號的接觸所造成，因而利用非專一性的 T 細胞分裂原與抗 CD3 的 T 細胞專一性抗體於 MLR 反應中加強 T 細胞刺激增生作用來確定羊水或胎盤間葉幹細胞抑制異體 T 細胞的活性。

### 1. 脾臟 T 細胞的純化

將無菌的尼龍羊毛管柱裝上三路活塞與 18G 針頭架在鐵架固定器上，以 50ml D-PBS 通管路，D-PBS 約高於尼龍羊毛 1ml 將整個管柱放進 incubator 培養 1 小時，時間到後取出將 D-PBS 全部擠乾，將 lysing 後的脾臟細胞( $1 \times 10^8$  cells/ml)注入管柱中的尼龍羊毛，再加入適量 RPMI-1640 培養液其體積高於尼龍羊毛 1ml，再將整個管柱放進 incubator 培養 55 分鐘，時間到後將管柱取出換上 22G 針頭，收集滴落出的細胞，即為初步純化過的 T 細胞，T 細胞的純度可由 anti-mouse CD3-FITC Abs 染色後利用流式細胞儀鑑定，T 細胞的純度平均為  $80\% \pm 2.1$ 。

### 2. 羊水或胎盤間葉幹細胞對 Con A 活化 T 細胞增殖反應的測試

Concanavalin A (Con A)來自豆科植物 jack bean (*Canavalia ensiformis*)的種子，具有與 $\alpha$ -D-mannose 及 $\alpha$ -D-glucose 的親和力，可與 T 淋巴細胞表面的醣類接受器結合，因而刺激細胞由 G0 近入 G1，進行細胞分裂，因此利用 Con A (Mitogen)能刺激引發 T 細胞的增生情形設計以下實驗。此實驗的反應者為純化的 T 細胞( $2 \times 10^5$  cells/well)；刺激者為經 Mitomycin C 作用的羊水或胎盤基質

細胞( $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ )，將反應者與刺激者在含  $2 \mu\text{g/ml}$  Con A 培養液中共同培養 3 天，利用 MTT 的方法測量反應者 T 細胞的增殖情形。實驗結果以 OD570nm 之吸光值表示。

### 3. 羊水或胎盤間葉幹細胞對 anti-CD3 Abs 活化 T 細胞增殖反應的測試

不同於 Mitogen 造成的非專一性刺激，利用 anti-CD3 antibody 直接與 T 細胞接受器(T cell receptor)結合所產生的訊號而使之活化，能造成專一性的 T 細胞免疫反應，羊水或胎盤間葉幹細胞是否同樣具有抑制 T 細胞增值的能力。實驗前一天預先將  $2 \mu\text{g/ml}$  anti-CD3 antibody 加在 96 孔盤中  $4^\circ\text{C}$  作用隔夜，隔天將 96 孔盤取出，利用  $200 \mu\text{l/well}$  的 D-PBS 將多餘沒有吸附在盤子上的抗體洗掉，之後種入反應者 T 細胞( $2 \times 10^5$  cells/well)和經過 Mitomycin C 作用的基質細胞( $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ )共同培養 3 天，反應者 T 細胞增殖之程度利用 MTT 來檢測接受者細胞增殖的情形。實驗結果以 OD570nm 之吸光值表示。

## (IV) 統計分析

本實驗所得各組織間的差異，以平均值 $\pm$ 標準差(SE)表示，並以 student t-test 分析各個實驗組與實驗控制對照組之間是否有顯著差異，若  $p \leq 0.05$  表示兩組數值之間在統計上有顯著差異。

## 第四章 實驗結果

### 第一節 羊水與胎盤基質細胞之定性分析

#### 一、細胞型態與生長曲線

羊水及胎盤基質細胞的來源是由 C57BL/6 品系的 GFP 基因轉殖小鼠之中所分離出來的。前者命名為 amniotic fluid derived stroma cells (AFSC-1)，後者命名為 placenta derived stroma cells (PDSC)，將 P10 代的 AFSC-1 與 PDSC 細胞以  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 密度培養，分別於 24、48、72、96 小時後在倒立式位像差顯微鏡下觀察細胞型態，將高與低兩種不同細胞密度照相與紀錄(Figure 1, A-1 與 A-2.)。在顯微鏡下兩株細胞的細胞型態並非呈現均質的細胞型態，而是由不同族群的細胞所構成的，但最主要的細胞族群呈現出的細胞型態較類似於纖維母細胞(fibroblast)的型態，細胞呈細長的、紡錘狀的樣子。若進一步利用細胞流質儀分析細胞的大小(Forward scatte)與顆粒性(Sideward scatte)，兩株細胞其大小及顆粒性的分布卻均呈現在單獨均質的一群細胞族群(結果未呈現)。

此兩株細胞分離後可以穩定的以  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 細胞密度培養一段時間，均可進行 60 代的繼代培養而不會改變細胞的型態與生長的狀況。其中取 P10 代的 AFSC 與 PDSC 細胞，各自將細胞培養於 6 孔盤中，待細胞約八分滿後轉至 25T flask 培養、再轉至 10 公分培養盤、再轉至 75T flask 最後到 175T flask，每一次繼代後都將所有細胞種到更大底面積的培養環境中，以記錄細胞生長的數量及時間，並計算出細胞生長至兩倍細胞數所需的時間(doubling time)，AFSC-1 需要 26.4 小時的時間可成長到兩倍細胞數量，而 PDSC 則需要 39.8 小時的時間才能成長兩倍的數量(Figure 1B)。

#### 二、細胞表面抗原之分布

細胞表面分子的表現在不同胚層的發生階段與不同組織中，均會呈現不同的表現，因此利用細胞表面分子(cluster differentiation, CD) 在各種細胞上各有其特定的細胞表面抗原之特性，而對於一個未知的細胞便可利用這些抗原表現與否，進而成為定性該細胞身份的依據。針對此將 P10 的羊水或胎盤的細胞收集起來，以 FASC buffer 將細胞培養液洗去，並利用帶有 PE 螢光的單株抗體 (B220, CD3e, CD11b, CD13, CD31, CD34, CD44, CD45, CD90, CD105, CD106, CD117, CXCR-4, Flk-1, Gr-1, H-2K<sup>b</sup>, I-A<sup>d</sup>, Ly6A/E, NK-1.1, Oct-4, SSEA-1) 在 4°C 冰浴下進行染色，以流式細胞儀對 AFSC-1 及 PDSC 進行細胞表面抗原之分析。由實驗結果得知，AFSC-1 及 PDSC 細胞會表現幹細胞相關的分子如 Sca-1 (AFSC-1 =  $83.9 \pm 1.9$ ; PDSC =  $29.9 \pm 2.7$ )，CD34 (AFSC-1 =  $65.3 \pm 5.9$ ; PDSC =  $57.3 \pm 10.1$ )，但不表現 SSEA-1 及 Oct-4 等表面分子，另外，AFSC-1 及 PDSC 均會呈現高濃度的內皮細胞的抗原 CD106 (AFSC-1 =  $99.4 \pm 0.5$ ; PDSC =  $99.8 \pm 0.1$ ) 和細胞 adhesion receptor CD44 (AFSC-1 =  $99.7 \pm 0.4$ ; PDSC =  $99.7 \pm 0.2$ )，但不會表現內皮細胞分子 CD13 與 CD31，兩株細胞均不會表現造血細胞相關的表面分子如 CD3, CD45, CD11b, CD45, Gr-1, NK, B220 等表面抗原，也不表現組織相容性抗原 MHC I 與 II (Figure 2 與 3)。

另外，許多幹細胞或前驅細胞具備有 EMT (Epithelial mesenchymal transition) 的特性，同樣利用免疫染色的方法，觀察羊水及胎盤細胞是否表現表皮細胞 pan-cytokeratin，因此從染色後的結果得知，這兩株細胞皆明顯表現 pan-cytokeratin 蛋白，而圖中為 pan-cytokeratin 紅色螢光重疊上細胞本身的綠色螢光，呈現出明顯的黃色螢光(Figure 7)。

### 三、 生長因子對羊水或胎盤基質細胞的影響

在細胞分離過程初期，因沒有加入生長因子，細胞的型態不如預期，也無法正常生長繼代，細胞也慢慢走向死亡。參考了多數培養間葉系幹細胞的研究方法，

大部分的實驗會加入 b-FGF (basic-fibroblast growth factor) 這個生長因子，有些研究建議可同時加入 EGF (epidermal growth factor) 或是只加 EGF... 等等。因此為了證明羊水及胎盤所分離出來的基質細胞對生長因子 b-FGF 與 EGF 的要求狀況，將羊水及胎盤基質細胞培養在四種不同條件的培養液中，進而觀察羊水及胎盤之細胞型態的變化，及細胞表面抗原的表現與分佈是否會有所不同。四種條件的培養液均以 IMDM complete medium 為共同基本組成，其不同之處分別是：(1) 不含 b-FGF 或 EGF；(2) 加入 10 ng/ml b-FGF；(3) 加入 10 ng/ml EGF；(4) 共同加入 10 ng/ml b-FGF 與 10 ng/ml EGF。細胞在不同條件培養液中培養 48 小時後，以倒立式位相差顯微鏡觀察並利用 DP71 照相系統紀錄與使用 OPController and OPManager 軟體分析影像結果。結果顯示，兩株細胞在無 b-FGF 的狀況下，細胞型態明顯不立體也變的比較大，細胞生長速度變慢且密度較低(Figure 4A. 與 5A.)；將細胞以 Trypsin 作用收集後發現，細胞生長速度有明顯差異，細胞生長速度是 b-FGF > b-FGF + EGF > EGF > no growth factor (結果未呈現)。

另外在細胞表面分子分佈與表現的結果得知，在四種培養條件下 AFSC-1 在 CD106, CD44, c-kit 與 CXCR-4 等抗原表現上並無任何顯著差異，而 Sca-1 的表現程度因含 b-FGF 的有無而略有差異(no growth factor = 72.8%, b-FGF = 85.1%, EGF = 85.2%, b-FGF+EGF = 73.9%)，而 CD34 會因為加入 b-FGF 或 EGF 於生長環境而顯著的增加表現，其中 b-FGF 的影響扮演主要的控制因子(no growth factor: 4.2%, b-FGF: 41.8%, EGF: 17.8%, b-FGF+EGF: 40.7%) (Figure 4B)。另外，PDSC 在不同培養條件下也都不會影響其 c-kit, CD106 和 CD44 等抗原在細胞上的表現，而 Sca-1 和 CXCR-4 的表現會因 b-FGF 的加入而增加，Sca-1 在不同培養條件的表現(no growth factor = 17.6%, b-FGF = 28.7%, EGF = 18.7%, b-FGF+EGF = 28.5%)，另外在 CXCR-4 (no growth factor = 0.6%, b-FGF = 3.5%, EGF = 0.2%, b-FGF+EGF = 0.5%)，同樣的，CD34 的表現會因為 b-FGF 或 EGF 或 2 者的加入有明顯的提升(no growth factor = 7.5%, b-FGF = 63.9%, EGF = 14.0%, b-FGF+EGF = 67.8%)，其中對

PDSC 細胞來說 b-FGF 生長因子也是扮演主要的角色(Figure 5B)。綜合以上結果，b-FGF 能提供羊水及胎盤分離之基質細胞生長所必須的生長因子，也是維持細胞表面抗原表現的主要元素之一，因此在 AFSC-1 與 PDSC 的繼代中我們以加入 b-FGF 來維持這兩種細胞的特性。

另外，我們也利用免疫細胞染色的方式來呈現 b-FGF 對 Sca-1 與 CXCR-4 等分子表現的影響，其結果是以螢光正立式顯微鏡及照相系統 DP70 觀察紀錄，若細胞表現 Sca-1 或 CXCR-4 則會看到紅色螢光，由於細胞本身呈現綠色螢光，所以當兩個顏色重疊時會呈現黃色螢光(Figure 4B 與 5B)。由結果顯示，AFSC-1 及 PDSC 均會顯著的呈現不同程度的 Sca-1 分子在細胞表面與細胞質中。值得注意的是 CXCR-4 的表現在細胞表面與細胞質的呈現不同，以細胞流質儀分析結果發現，未固定的 AFSC-1 及 PDSC 細胞表面，其 CXCR-4 表現很少，甚至不表現 CXCR-4 分子，但細胞經過固定後或以免疫螢光固定後再染帶有螢光的抗體後，發現在 AFSC-1 與 PDSC 細胞質中卻有大量 CXCR-4 蛋白的堆積(Figure 6A 與 6B)。

#### 四、 幹細胞相關或免疫耐受性相關基因表現的檢測

除了檢查細胞表面分子的表現外，還可以由分析細胞內幹細胞或前驅相關轉錄因子的表現作為辨認該細胞身份的指標方法之一。因為有些轉錄因子的表現是具有組織性的專一性或分化階段性的特定性，只會在某一類的細胞或某個發生階段中才會表現，例如 Oct-4 與 SSEA-1 是胚胎幹細胞上常見的表現基因，而有些基因則是成熟分化的體細胞才會表現，例如 Albumin。另外，為了評估 AFSC-1 及 PDSC 等細胞與免疫耐受力相關性，HLA-G 與 CD200 等免疫耐受性相關分子的表現，也會進行檢測。這部份的實驗是以 RT-PCR 的方式來進行評估。因此，收集 P10 繼代的細胞(約  $1 \times 10^7$  細胞)，萃取其 mRNA 並轉為 cDNA 後，利用專一性的引子進行聚合酶連鎖反應 (PCR)。結果得知，AFSC-1 會顯著表現與幹細胞有關的基因 Sca-1、Rex-1 和 Tert，但並不表現 Oct-4、FGF-4 和 Nanog-1，而在 eNOS

的表現較不明顯。而 PDSC 會明顯表現幹細胞相關的基因 Oct-4、sca-1、Tert、Rex-1 和 eNOS，但不表現 Nanog-1 和 FGF-4 (Figure 8A)。另外，針對免疫耐受性相關分子分析的結果發現，兩株細胞均有明顯的表現 HLA-G 和 CD200 分子(Figure 8B)。

## 五、羊水或胎盤基質細胞之磷酸酵素活性的檢測

在許多發生細胞學的研究中，為了將細胞發生的階段區分為早期未成熟細胞或是已成熟細胞，常常以細胞表現的磷酸酵素活性來辨別，當細胞表現較強的鹼性磷酸酵素時被認為是較早期或未成熟的細胞；若細胞表現的是較強的酸性磷酸酵素則被當作成熟的細胞。首先，將細胞分離後進行培養繼代，分別對 P10 與 P20 代的細胞進行酸性磷酸酵素(acid phosphatase)和鹼性磷酸酵素(alkaline phosphatase)的活性分析，該方法是加入特定酵素所需的基質溶液來進行染色分析。在正立式光學顯微鏡下觀察結果，並使用 DP70 照相系統紀錄實驗結果。實驗結果顯示，不論是 P10 或 P20 代兩個年齡的細胞皆含有較強的酸性磷酸酵素，而細胞會呈現深褐色的染色結果(Figure 9A-b 與 9B-b)；而鹼性磷酸酵素的活性則不明顯(Figure 9A-b 與 9B-b)，與未和基質溶液反應的細胞顏色沒有差異。為了確認實驗中基質溶液配製無誤，在酸性磷酸酵素反應以小鼠巨噬細胞 RAW264.7 為陽性控制組；而鹼性磷酸酵素反應以小鼠胚胎幹細胞 ES-J1 細胞為陽性控制組(結果未呈現)。

## 六、 羊水與胎盤基質細胞之組織親源性的鑑定

AFSC-1 與 PDSC 等細胞分離的來源是羊水及胎盤，羊水細胞被視為胎兒表皮所脫落細胞的一部分，而胎盤有兩面，一面與母親相連，另一面與胎兒相連，雖然胎盤與羊水的形成是來自受精卵的發育過程，但為了進一步確認從羊水及胎盤分離出來的細胞確實來自胎兒本身而非母親的細胞。因此，利用 H-2K<sup>b</sup> 及 Y 染色體上的特定序列 SRY 等專一性的引子，進行聚合酶連鎖反應(PCR)，檢測細胞來源。由結果得知，AFSC-1 及 PDSC 兩株細胞都表現 H-2K<sup>b</sup>，可確認細胞的確來自

C57BL/6 小鼠這個品系，並且因為兩株細胞都檢測到 Y 染色體上的特定序列 SRY 基因，可證明細胞的來源是來自胎兒本身，而不是來自母親的細胞(Figure 10)。也因此證明了這兩株細胞並非母體的細胞，而是來自胎兒時期的早期細胞。

## 七、 基質細胞癌化測試

AFSC-1 與 PDSC 等細胞癌化的測試 (Tumorigenicity) 主要由兩種方式來做測試，該測試方法的依據分別利用了癌細胞的兩種特性：(一)、癌細胞不需要接觸性的刺激 (如培養皿的接觸、細胞與細胞間的接觸)，即可於半固態的基質 (如洋菜膠) 中分裂、生長，最後形成細胞團 (colony)；(二)、癌細胞具有轉移的特性，當將癌細胞再植入動物體內，癌細胞會分裂、生長，進而產生腫瘤。

C. 活體外實驗 (*in vitro*)：利用低濃度 (0.35%) 之洋菜膠來培養細胞。如果細胞已有癌化的傾向，則單一的細胞將會在沒有其他接觸條件的情況下於低濃度洋菜膠中分裂、生長進而產生細胞團塊；反之，如細胞不具癌化的傾向，單一的細胞無法於低濃度洋菜膠中分裂、生長，但也不會死亡。實驗中於低濃度之洋菜膠培養的細胞中，控制組以小鼠結腸癌細胞株 CT-26 細胞生長速度最快，約培養兩週的時間即形成明顯的細胞團塊，而小鼠肝癌細胞株 BNL 1ME.7R.A 則約三週的時間才形成較大的細胞團塊，其餘實驗組 AFSC-1 和 PDSC 兩株細胞在培養了四週後，都沒有觀察到任何細胞團的發生，都是單獨的一顆存在於洋菜膠中。最後，以結晶紫染色，利用倒立式顯微鏡及照相系統紀錄結果(Figure 11A)。在體外實驗的結果顯示，AFSC-1 及 PDSC 兩株細胞並沒有癌化的情形發生。

D. 活體內實驗 (*in vivo*)：將 AFSC-1, PDSC 或小鼠腫瘤細胞製作成單一細胞懸浮液，將其以皮下注射的方式注射到 NOD/SCID 小鼠的右側大腿皮下的方法 (n=2)，觀察細胞是否會在注射位置形成腫瘤，或甚至擴散、轉移至其他組織或器官中，進而判斷是否為癌細胞的可能。將細胞植入小鼠體內後，持續觀

察小鼠腿部外觀的變化，在 CT-26 ( $1 \times 10^4$  cells) 植入後 3 週便觀察到大腿外側有個圓形凸起，4 週後圓形凸起明顯變大，將其犧牲後解剖取得腫瘤測量大小結果直徑約有 14 mm；而在 BNL 1ME.7R.A ( $1 \times 10^7$  cells) 植入後 7 週，腫瘤明顯變大影響了小鼠的行動能力，犧牲後取得腫瘤並測得其直徑大小約有 10mm，同時進行植入的 AFSC-1 和 PDSC 細胞( $1 \times 10^7$  cells) 在持續觀察 3 個月後，大腿外觀看起來都無腫瘤形成的跡象 (Figure 11B)，犧牲後解剖觀察也沒有任何轉移的情形發生，因此，活體實驗再次證明了 AFSC-1 及 PDSC 兩株細胞並不是癌化的細胞株。

## 第二節 羊水和胎盤基質細胞之功能性分析

### 一、 羊水與胎盤基質細胞分化能力評估

幹細胞或前驅細胞常被認為具有分化成特定組織或胚層細胞的能力，因此許多研究幹細胞的實驗，都會以細胞能分化成其他細胞的能力，來定義或區分該細胞在幹細胞分類上的依據。基質細胞中的間葉幹細胞早已被證實具有分化成中胚層細胞的能力，例如骨母細胞、脂肪細胞和軟骨細胞...等。另外，像是神經細胞、心肌細胞或是肝臟細胞...等，也都是分化實驗做過的指標型細胞。因此，將細胞成功誘導引發分化成特定組織細胞的實驗，便可證明該細胞在發生學上分化的潛能，也可以釐清該細胞在未來研究發展或生物醫學的應用方向。

A. 骨母細胞的分化：將細胞以  $3 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> 培養於骨頭分化的培養液中，每三天置換一次培養液，於誘導分化中 6 天，AFSC-1 和 PDSC 的細胞型態變成寬大扁平之多邊形細胞，培養了 12-14 天觀察細胞密度達到九分滿時，將培養液移除，進行 Von Kossa staining。若細胞分化成骨頭細胞，細胞會產生許多鈣或是鈣鹽的產物，而染色溶液中的 silver nitrate 則會與鈣反應產生沈澱，經 UV 照射後形成黑褐色沈澱物(Figure 12A)。實驗結果顯示，AFSC-1 和 PDSC 細胞

皆觀察到有黑色沈澱物形成，說明此 2 株細胞均具有分化成骨母細胞的能力，而 AFSC-1 誘導分化能力比 PDSC 強。

- B. 脂肪細胞的分化：將細胞以  $3 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> 培養於脂肪分化的培養液中，每三天置換一次培養液，待細胞形成具有脂肪油滴時，停止培養並將其固定後進行 Oil-red O 染色，當染劑與脂肪油滴作用後，紅色染劑能專一性的針對油滴的部份進行染色，而不會與細胞中其他部份反應。而實驗結果得知，在 AFSC-1 細胞進行分化的結果有看到明顯油滴的形成，但並不是所有細胞都能分化成有油滴的細胞；而 PDSC 細胞在經由分化培養的過程中，細胞死亡率較高，且形成油滴的時間較長，而形成的油滴也比較小 (Figure 12B)。因此，根據實驗的結果顯示 AFSC-1 和 PDSC 均可誘導分化成脂肪細胞，其中 AFSC-1 細胞具有明顯的分化成脂肪細胞的能力而 PDSC 分化能力較弱。
- C. 神經細胞的分化：此實驗分為兩種方式來進行：(1)一階段式誘導 (2)二階段式誘導，所謂一階段式是直接利用含 0.5  $\mu$ M all-*trans*-retinoic acid 的細胞培養液來培養羊水或胎盤基質細胞，一週後將誘導後的細胞與神經細胞的專一性抗體 PGP 9.5 進行免疫染色，觀察到 AFSC-1 與 PDSC 細胞皆有部份表現 PGP 9.5，但螢光強度較弱，且細胞型態的改變並不明顯，沒有形成神經細胞突觸的型態呈現 (Figure 13A)。因此，修正細胞培養液的成份，利用新生鼠大腦均質液來製備神經細胞培養液 (neuron condition medium, NCM)，先將 AFSC-1 或 PDSC 加入含有 NCM 的培養液，六天後將培養液置換成只含有 0.5  $\mu$ M all-*trans*-retinoic acid 的細胞培養液再繼續培養細胞 3 天，此為二段式誘導法，結果顯示，顯微鏡下可觀察到部份 AFSC-1 和 PDSC 細胞拉長並伸出長型突觸，將細胞停止培養並經固定後，同樣以神經原專一性蛋白 PGP 9.5 抗體進行免疫染色。實驗結果發現，細胞幾乎都有染到 PGP 9.5 產生紅色的螢光，若與綠色螢光影像重疊的部份則將顯現黃色的螢光，並且細胞型態上也與平常培養的細胞有所不同，細胞較長、較細，部份細胞還有類似突觸的型態 (Figure 13B)。因此，AFSC-1

與 PDSC 細胞在神經細胞分化的培養條件下培養，可分化成類似神經細胞的細胞型態，因此具有分化成神經細胞的潛力。

## 二、 羊水與胎盤基質之免疫抑制活性的分析

異體淋巴球混合反應的原理為，來自兩群同種不同個體的淋巴球細胞，因為彼此組織相同性複合體分子(MHC)不同，會將對方視為外來物而使自己增殖。相關證據顯示，懷孕時母體環境與胎兒可呈現較強的免疫耐受性，因而不會排斥異體胎兒，使得胎兒得以生存，為了想瞭解由羊水或胎盤所分離出來的基質細胞是否具有抑制異體淋巴球增生的能力，因此將分離出來的羊水或胎盤基質細胞與異體 T 淋巴球進行混合性淋巴球反應。混合性淋巴球實驗的第一步是將脾臟細胞經 Ficoll 溶液分離獲得的單核性白血球細胞與 AFSC-1 或 PDSC 各自共同培養三天，由於刺激者先以 mitomycin C 抑制了細胞增生的能力，因此，細胞增生的結果代表反應者 T 細胞的反應，而反應者 T 細胞增生反應是利用 MTT 的方法來評估，也同時利用核酸染料 EtBr/AO 染劑，在螢光顯微鏡下直接計算各組實驗中的細胞存活率。反應中會設立 Syngenic 陰性組與 Allogeneic 陽性組，Syngenic 表示刺激者細胞與反應者細胞具有相同的 MHC 背景，反應者 T 淋巴球是不會有增生的反應，可作為陰性控制組；而 Allogeneic 表示刺激者與反應者的 MHC 分子不同，因此反應者 T 細胞會有明顯刺激增生作用，可作為陽性控制組；而待評估的實驗組則是以不同細胞數( $1 \times 10^4$ ,  $2.5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ )的 AFSC-1 和 PDSC 細胞為刺激者。與 allogeneic 陽性控制組比較的實驗結果顯示，AFSC-1 與 PDSC 細胞均具有顯著抑制異體 T 淋巴球增生的作用 ( $p \leq 0.05$ )，而且隨著細胞數目的增加，T 淋巴細胞增生的抑制作用就會越加明顯 ( $p \leq 0.01$ )，說明該抑制效果具有 cell number-dependent 的關係(Figure 14)。而進一步比較 AFSC-1 與 PDSC 在免疫反應，發現 AFSC-1 在低劑量就有明顯的抑制效果，因此其抑制 T 淋巴細胞增生的能力比 PDSC 來的強。而分析 2 者細胞反應中細胞存活率上也都達到 95%以上，這說

明 AFSC-1 與 PDSC 在不會導致 T 細胞死亡的狀況下可抑制異體 T 細胞活性的能力。

### 三、 羊水或胎盤基質細胞對 Con A 或 CD3 抗體引發異體 T 細胞增生的抑制作用評估

由於異體 T 淋巴細胞混合實驗的實驗結果顯示 AFSC-1 與 PDSC 可抑制異體 T 淋巴細胞的增生情形，因此想進一步探討若將 T 淋巴細胞利用 anti-CD3 抗體或是 Con A 分裂原的刺激活化下，AFSC-1 與 PDSC 細胞是否同樣能抑制異體 T 細胞被 Con A 或 CD3 抗體活化所引發的增生作用。因此，第一步即是將脾臟細胞先利用 Nylon Wool 純化出高比例的 T 淋巴球細胞(CD3<sup>+</sup>細胞佔 80%)，將 AFSC-1 或 PDSC 細胞各自與 T 細胞培養在已有 2 µg/ml anti-CD3 抗體的細胞盤中或是含有 2 µg/ml Con A 的培養液中共同培養三天，之後利用 MTT 的方法來評估反應者 T 淋巴球的增殖情形。同時利用核酸染料 EtBr/AO 染劑，在螢光顯微鏡下直接計算各組實驗中的細胞存活率。結果顯示，AFSC-1 與 PDSC 細胞在 CD3 或分裂原(Con A)所引發的 T 細胞增生實驗中，均能顯著的抑制異體 T 細胞增生的情形( $p \leq 0.05$ )，此抑制作用會隨著細胞濃度增加而明顯增強( $p \leq 0.01$ )。其中也發現 PDSC 在抑制由 CD3 或分裂原(Con A)所引發的異體 T 細胞的增生能力比 AFSC 1 來的強，因其在低濃度細胞數目下就有明顯的抑制效果。而 2 種細胞在抑制 T 細胞的作用並不是藉由毒殺的活性來達到抑制作用，因為各組在細胞存活率均維持百分之百。綜合以上結果得知，無論是在 MHC 所引起的免疫反應或是經由 T cell receptor (TCR) 路徑引起的 T 細胞增生情形下，由羊水及胎盤所分離的基質細胞都具有顯著的免疫抑制效果。

## 第五章 討論

子宮內骨髓移植目前所遇到的瓶頸中，主要是捐贈者的骨髓細胞無法長時間存活在接受者的體內並且無法造成免疫耐受性與排斥反應的發生，推測其中原因認為，胎兒本身的造血器官中的微環境無法提供捐贈者的骨髓細胞生存，因此提供造血幹細胞的植入、分化所需的微環境可能是移植成功的關鍵所在。在許多有關骨髓基質細胞研究中已經證實了造血器官中的基質細胞確實可以提供骨髓造血幹細胞分化所需的微環境，並且在骨髓移植時共同植入該基質細胞，具有提昇造血幹細胞植入率及植入後的存活時間(El-Badri *et al.*, 1998; Peister *et al.*, 2004)。先前，研究室已證明由成鼠骨髓分離的 CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> 基質細胞具有提昇造血幹細胞植入的細胞數，但卻無法穩定長期存活且也無法引發免疫耐受力(黃柏揚, 2004)。認為此基質細胞仍不理想，尚需分離更多新的基質細胞株。相關的證據顯示，懷孕的母體環境具有免疫活性調節的功效，可抑制母體 T 細胞對異體胎兒的攻擊，這其中與懷孕時期母親與子宮內組織或細胞提供的微環境有關。

最近有研究指出，由人類的羊水及胎盤所獲得貼附型細胞中，可找到具有分化成中胚層組織的幹細胞，稱為間葉系幹細胞。此細胞不僅可分化成三胚層的體細胞，還具有抑制異體 T 細胞的能力，因此，臨床上考慮使用此幹細胞來抑制移植排斥反應的發生。至目前為止對羊水及胎盤的間葉系幹細胞的認識仍以人類為主要的模式，並且也多半侷限於分離及定性的研究結果，礙於人體臨床實驗的規範，有關該類細胞在人體疾病的應用或植入時的機轉仍缺乏資訊。有關小鼠的羊水分間葉系幹細胞研究報導較少，多半侷限表面分子的報告或分化能力的檢測(Nadri and Soleimani, 2007 ; Coppi *et al.*, 2007)因此本研究想建立小鼠的羊水或胎盤間葉系幹細胞的方法並對其進行定性分析以利未來活體研究之用。首先本實驗針對小鼠羊水及胎盤進行基質細胞的分離培養，我們參考了人類羊水分間葉系幹細胞與胎盤

間葉系幹細胞的分離方式，發現老鼠間葉系幹細胞的分離模式與人類不太相同，因此做了分離與培養條件的修正，最後獲得數株基質細胞，並對該細胞進行一連串的生物活性的檢測與評估。其中 AFSC-1 及 PDSC 在細胞型態上屬於較均質的細胞株，與文獻發表過的人類間葉系幹細胞型態相似，而小鼠羊水及胎盤基質細胞生長速率相較於文獻上人類間葉系幹細胞來的快，在眾多間葉系幹細胞的報導指出幹細胞繼代的代數是有限的，但本實驗分離的基質細胞可繼代培養超過 60 代並且，其細胞型態及生長狀況都沒有變化，此外在磷酸酵素的表現上，AFSC-1 及 PDSC 都有酸性磷酸酶活性的表現而沒有鹼性磷酸酶的活性，這與人類羊水或胎盤的 MSC 不相同。

間葉系幹細胞在其本質和發生的來源或是體內的功能至今仍不清楚(Bianco *et al.*, 2001)，因此為了更進一步了解這些問題的答案及應用於治療人類疾病發展的可能性，從不同物種分離間葉系幹細胞和各種廣泛臨床前的研究是被需要的。而所謂典型的間葉系幹細胞，是以人類間葉系幹細胞為範例，因人類間葉系幹細胞無論從骨髓、臍帶、臍帶血、周邊血、胎盤等組織獲得，其細胞表面分子的表現的一致性相當高，但對小鼠而言，由骨髓獲得的間葉系幹細胞在不同小鼠品系中就有很大的差異，如由 C57BL/6 和 FVB 小鼠的骨髓所建立的間葉系幹細胞會表現 CD34, Sca-1 和 CD106，但不表現 CD45, CD31, CD90, CD117。而由 BALB/c 和 DBA1 小鼠的骨髓所分離出的間葉系幹細胞只會表現低量的 CD34 與 CD106 (Peister *et al.*, 2004)；也有不同研究指出由 C57BL/6 品系小鼠骨髓中分離的間葉系幹細胞，其細胞表面分子表現 Flk-1<sup>low</sup>, Sca-1<sup>low</sup>, Thy-1<sup>low</sup>, CD13<sup>+</sup>, SSEA-1<sup>+</sup> 但在 CD34, CD44, CD45, c-kit 和其他造血細胞相關表面分子及 MHC I 和 II 則都不表現，並且表現轉錄因子 Oct-4 和 Rex-1 (Jiang *et al.*, 2002)；也有研究指出由 C57BL/6 品系小鼠的骨髓所分離出的間葉系幹細胞細胞表面分子呈現 CD34<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, Vcam-1 (CD106)<sup>+</sup> 但不表現 CD11b 和 CD45 (Nadri and Soleimani, 2007)；另外由 FVB/N 品系

小鼠的骨髓所分離的間葉系幹細胞會表現 Sca-1<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD81<sup>+</sup>, CD106<sup>+</sup>和幹細胞標的 nucleostemin (NST), 但不表現 CD11b, CD31, CD34, CD45, CD48, CD90, CD117, CD135 和轉錄因子 Oct-4 (Baddoo *et al.*, 2003); 也有實驗結果顯示由 BABL/c 品系小鼠骨髓間葉系幹細胞會表現 Sca-1<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>和 CD106<sup>+</sup>表面分子, 但不表現 CD34 和 c-kit (Eslaminejad *et al.*, 2006)。因此, 到目前為止不論是在細胞表面分子或是基因的層次, 小鼠的間葉系幹細胞的定義仍無法統一(整理參考表二), 綜合大部分的研究結果可知由小鼠骨髓所獲得的間葉系幹細胞會表現 Sca-1、CD44 和 CD106 的表面分子但不表現 CD11b 和 CD45, 並且在細胞分化上均具有分化成硬骨細胞、軟骨細胞和脂肪細胞的能力。有關羊水幹細胞的特性目前所知會表現 Sca-1, CD90, CD44, Oct-4 與 SSEA-1 (De Coppi *et al.*, 2007), 而本實驗的結果顯示, 來自在羊水及胎盤的間葉幹細胞表面分子會表現 Sca-1, CD34, CD106 和 CD44 等分子, 但細胞表面卻不表現其他幹細胞相關的分子 Oct-4 和 SSEA-1, 另外如其他內皮細胞、表皮細胞、造血細胞和組織相容性抗原 MHC 等表面分子也都不表現。與前人研究相比, 羊水及胎盤分離之基質細胞的確有部份分子表現情形是一致的, 例如 CD106 和 Sca-1, 但也有些分子的表現是有差異的, 例如 CD34, SSEA-1, Oct-4 的表現。因此, 以細胞表面分子的表現上來說, 來自羊水及胎盤分離之 AFSC-1 與 PDSC 細胞的確具有部分間葉系幹細胞的 phenotype。另外, 實驗中也證實小鼠羊水及胎盤基質細胞是屬於 b-FGF dependent 的細胞, 而 b-FGF 是常見的培養間葉系幹細胞所需的生長因子之一, 在不含 b-FGF 的培養條件下, AFSC-1 與 PDSC 細胞生長型態會產生變化, 不僅生長速度也降低, 甚至在細胞表面分子的表現上也有影響, 尤其在 CD34 的表現上出現明顯的降低, 而 Sca-1 的表現量略有改變; 然而 EGF 對兩株細胞的影響並不大。

進一步以 RT-PCR 方式來確認幾個已知與幹細胞有關基因在羊水及胎盤所分離之基質細胞細胞的表現, 結果發現, AFSC-1 細胞會表現 Sca-1, Rex-1, Tert 等

基因；在 PDSC 則有表現 Oct-4, Sca-1, Rex-1, Tert 和 eNOS 這些基因，但 2 者細胞均不表現 Nanog-1 和 FGF-4，Oct-4 與 Nanog-1 都是常見於胚胎幹細胞中具有指標性的轉錄因子，若表現這兩個轉錄因子就能將羊水或胎盤基質細胞的發生時期來源往前推進，但有趣的是同樣為胚胎幹細胞指標性的基因 Rex-1 在 AFSC-1 及 PDSC 細胞中都有表現。為了釐清 AFSC-1 與 PDSC 細胞不是 fibroblast，我們分析其 FGF-4 基因的表現情形，發現 AFSC-1 與 PDSC 細胞均不會表現 FGF-4，而在其他研究中發現這兩株細胞均會表現 SDF-1 (stroma-derived factor) (結果未呈現)。因此 AFSC-1 及 PDSC 細胞與纖維母細胞(fibroblast)之間的關係，有待進一步的確認。根據表面分子與幹細胞相關分子的表現結果，AFSC-1 與 PDSC 細胞雖然是一種由懷孕 11-13 天的羊水和胎盤所分離出的間葉系幹細胞，但其具有部份胚胎幹細胞的特性。

為了評估 AFSC-1 與 PDSC 細胞在心血管分化或應用的潛力，我們也測定兩株細胞在 eNOS 的表現，而 eNOS 的表現被認為與內皮細胞的分化有關，其中有實驗證明間葉系幹細胞可分化成內皮細胞及心肌細胞來治療心肌梗塞，並發現間葉系幹細胞能產生某些因子使內皮細胞內 eNOS 的表現量增加 (Ladage *et al.*, 2007)；在羊水及胎盤之基質細胞中只有 PDSC 有明顯的表現 NOS，因此認為 PDSC 在未來可應用於內皮細胞的分化研究及相關生物醫學的應用。

另外由免疫染色的方法結果得知，AFSC-1 及 PDSC 都有表現 pan-cytokeratin，而 pan-cytokeratin 是廣泛表現在表皮細胞的特殊蛋白也因此被當作表皮細胞的標的，也因此 AFSC-1 及 PDSC 有可能具有表皮細胞的特性，有文獻指出有些間葉系幹細胞具有 EMT (epithelial mesenchymal transition) 的特性，也就是說該間葉系幹細胞會具有在中胚層和外胚層之間轉換的特性。而 EMT 最常發生在胚胎發育過程中，神經脊(neural crest)、心臟和肌肉骨骼系統(musculoskeletal system)發育的時期 (Shook and Keller, 2003)，EMT 的發生過程使得表皮細胞經過一個型態的轉換變成

間葉細胞，並且加速胚胎的發育，之後在體外實驗發現EMT在腫瘤的形成和轉移扮演重要的角色(Huber *et al.*, 2005)。而由羊水及胎盤獲得之基質細胞也可能是一群在發生學上為早期的表皮前驅細胞或表皮幹細胞，因此細胞同時具有表皮細胞及間葉系幹細胞的特徵，由於來自成體的間葉系幹細胞其生長速度較慢，然而AFSC-1及PDSC的doubling time較短又高度表現Tert (Telomerase reverse transcription)基因，加上幹細胞常被懷疑具有癌化的可能性，於是將羊水及胎盤基質細胞進行癌化測試，並與其他小鼠腫瘤細胞相比，結果顯示無論在體外培養或在體內注射細胞，都無腫瘤形成，因此證明羊水及胎盤基質細胞並無癌化的情況。

有研究提出，基質細胞會分泌出 SDF-1 (stromal-derived factor)去吸引一些帶有 CXCR-4<sup>+</sup>的細胞靠近，而通常帶有 CXCR-4<sup>+</sup>的細胞是：造血幹細胞或前驅細胞和其他組織的前驅細胞，而 CXCR-4<sup>+</sup>的細胞在體內的循環如何維持一定的數量也會由 SDF-1 來調控得到平衡(Ratajczak *et al.*, 2003)。本研究中分別以細胞流式儀及免疫染色的方式檢測 CXCR-4 分子在羊水及胎盤細胞的表現，其結果發現 AFSC-1 及 PDSC 在細胞表面分子的檢測中並沒有明顯的表現 CXCR-4 蛋白，但細胞經過固定及免疫染色後發現，羊水及胎盤基質細胞質中含有大量的 CXCR-4 蛋白的表現，此外以西方墨點法檢測 SDF-1 的表現時發現，羊水及胎盤基質細胞內都有 SDF-1 蛋白的堆積，但在培養液中的釋放量卻很低，綜合以上結果推測，羊水及胎盤基質細胞有可能在特定條件下才會分泌 SDF-1 蛋白，在近距離的作用下(paracrine)吸引靠近的幹細胞互相作用或使得遠端造血幹細胞或其他前驅細胞可以駐足待在他們的附近，進一步與 AFSC-1 或 PDSC 產生互相調控的現象，因此羊水及胎盤基質細胞具有吸引其他類型幹細胞 homing 的能力。

因現今無法從表面分子和轉錄因子就直接定義小鼠間葉系幹細胞，而間葉系幹細胞主要的生物特性就是其分化能力，若細胞能分化成硬骨細胞、軟骨細胞和

脂肪細胞時，就可以定義該細胞為一株間葉系幹細胞。本實驗也針對羊水 AFSC-1 及胎盤 PDSC 細胞在骨母細胞、脂肪細胞和神經細胞的分化上進行評估，實驗結果得知，羊水 AFSC-1 可成功分化成骨母細胞、脂肪細胞和神經細胞；而胎盤 PDSC 細胞 PDSC 在骨母細胞和脂肪細胞的分化能力較 AFSC-1 弱，而神經細胞的分化與 AFSC-1 沒有差異。相較於發表的文獻，一般組織間葉系幹細胞的分化時間至少需要三週至四週的時間，而本實驗的羊水及胎盤基質細胞分化時間較短約只需二週的時間就完成，這或許與其生長速度快有關，將來或許能應用在相關的組織工程或細胞療法中而較快獲得疾病改善的效果。

實驗最初的目的是要尋找能幫助子宮內骨髓移植的基質細胞，除了能幫助骨髓在胎兒的植入外，也提供其生長分化所需的微環境，更重要的是能提高胎兒對異體骨髓造血幹細胞的免疫耐受力。有關間葉系幹細胞的免疫抑制作用早已報導 (Gotherstrom, 2007; Nauta and Fibbe, 2007)，在前人研究中也發現，人類胎盤間葉系幹細胞對異體 T 細胞也具有明顯的免疫抑制力 (Li *et al.*, 2007)，因此對小鼠羊水 AFSC-1 和胎盤 PDSC 細胞的免疫抑制力做進一步的評估，我們首先利用異體淋巴球混合實驗證明了羊水 AFSC-1 或胎盤 PDSC 細胞均具有抑制異體淋巴球的增生能力，並且呈現劑量的正相關性，但此二株細胞表面分子參與活化 T 細胞的受器分泌量較少甚至缺乏，因此以分裂原或 CD3 抗原的刺激活化異體 T 淋巴球的增生方式進一步確認 AFSC-1 與 PDSC 的免疫抑制活性，發現羊水 AFSC-1 或胎盤 PDSC 細胞均可以將 Con A 或 CD3 活化異體 T 細胞增生的活性抑制下來，因此證明羊水 AFSC-1 及胎盤 PDSC 細胞的確具有免疫抑制的能力，但其阻斷 T 細胞的增生能力主要的機制為何，則並不清楚，有待進一步的確認。

另外經由檢測免疫耐受性相關的因子表現的結果發現，AFSC-1 與 PDSC 都明顯表現 HLA-G 和 CD200 轉錄因子；而 HLA-G 為非典型的第一型組織相容性蛋白，

目前已知 HLA-G 會表現在胎兒與母體的接觸面上，當細胞表現 HLA-G 蛋白時具有抑制 T 細胞的活性和 NK 細胞的功能；另外 CD200 為細胞表面第一型膜蛋白接受器，會表現在胸腺、神經系統、血管內皮細胞、卵巢和免疫細胞上，當細胞表現 CD200 並與 CD200R 結合時，會減弱發炎反應的發生提昇免疫耐受力。另外，AFSC-1 與 PDSC 細胞其表面並不表現 MHC I and II 等分子，由於 AFSC-1 與 PDSC 均表現 Sca-1 分子，Sca-1 又稱為 Ly-6 A/E 是一個 GPI-linked 細胞表面蛋白，在小鼠造血幹細胞和間葉系幹細胞中可以發現，相關的文獻指出 Sca-1 分子可參與抑制 T 細胞活化的訊息途徑，而該抑制 T 細胞的增生是透過 TCR 來改變訊息傳遞路徑 (Ivanov *et al.*, 1994)，因此 AFSC-1 與 PDSC 的免疫抑制能力可能是透過 HLA-G, CD200, Sca-1 或相關免疫分子缺乏的原因所造成的，另外也有文獻指出間葉系幹細胞是透過分泌的激素來抑制 T 細胞增生的情形，但本研究並未針對這部份進行檢測，由於目前臨床已初步進行利用間葉系幹細胞在減低 GVHD 的前臨床實驗 (Le Blanc *et al.*, 2004)，因此有關羊水或胎盤間葉系幹細胞如何抑制異體 T 細胞增生的機制值得進一步探討。

本實驗已確定兩株來自小鼠的羊水及胎盤分離之基質細胞是來自胎兒本身，而被認為在發生學上屬於早期的細胞，也由於細胞的特性中有許多與間葉系幹細胞相似，也具有分化脂肪、骨母細胞和神經細胞的能力，因此將細胞定義為多潛能性的間葉基質細胞 (multipotent mesenchymal stroma cells)，加上這兩株細胞在異體 T 細胞具有很強的免疫抑制效果，因此說明來自羊水及胎盤的細胞在將來可以成為新的幹細胞研究選擇來源，我們可利用這兩株細胞在發生學的控制機制上作進一步探討，另外也可以進一步探討在活體上應用的相關機制，而所得的資訊可提供未來在生物醫學應用的參考。

## 參考文獻

黃柏楊 (2004). 基質細胞對小鼠子宮內骨髓移植之植入率的評估. 輔仁大學生命科學系碩士論文

Aggarwal S and Pittenger MF. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105, 1815-1822.

Anderson D BR, Lampkin Gand Medawar P. (1951). The use of skin grafting to distinguish between monozygotic and dizygotic twins in cattle. *Heredity* 5, 379-397.

Archer DR, Turner CW, Yeager AM and Fleming WH. (1997). Sustained multilineage engraftment of allogeneic hematopoietic stem cells in NOD/SCID mice after in utero transplantation. *Blood* 90, 3222-3229.

Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B and Caplan AI. (1999). Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue engineering* 5, 267-277.

Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC and Phinney DG. (2003). Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *Journal of cellular biochemistry* 89, 1235-1249.

Bambach BJ, Moser HW, Blakemore K, Corson VL, Griffin CA, Noga SJ, Perlman EJ, Zuckerman R, Wenger DA and Jones RJ. (1997). Engraftment following in utero bone marrow transplantation for globoid cell leukodystrophy. *Bone marrow transplantation* 19, 399-402.

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A and Hoffman R. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology* 30, 42-48.

- Bernstein J, Boyle DW, Srour EF, Cooper R, Jacobs C, Freie B, Liechty E and Clapp DW. (1997). Variation in long-term engraftment of a large consecutive series of lambs transplanted in utero with human hematopoietic cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 3, 247-254.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S and Robey PG. (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 19, 180-192.
- Bilic G, Ochsenbein-Kolble N, Hall H, Huch R and Zimmermann R. (2004). In vitro lesion repair by human amnion epithelial and mesenchymal cells. *American journal of obstetrics and gynecology* 190, 87-92.
- Burgess AW WE, Metcalf D. (1977). Stimulation by human placental conditional medium of hematopoietic colony formation by human marrow cells. *Blood* 49, 573-583.
- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I and Fisk NM. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98, 2396-2402.
- Chou SH, Chawla A, Lee TH, Zhou Y, Busch MP, Balassanian R, Ferrell L and Cowan MJ. (2001). Increased engraftment and GVHD after in utero transplantation of MHC-mismatched bone marrow cells and CD80<sup>low</sup>, CD86(-) dendritic cells in a fetal mouse model. *Transplantation* 72, 1768-1776.
- Chou SH, Kuo TK, Liu M and Lee OK. (2006). In utero transplantation of human bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells in mice. *J Orthop Res* 24, 301-312.
- Colas G, Hollands P, Locatelli A, Le Vern Y, Cotinot C, Canepa S, Kerboeuf D, Thomas A, Pisselet C, Dacheux JL, Popescu P and Salmon H. (1999). The xenotransplantation of goat and human hematopoietic cells to sheep fetuses. *Transplantation* 67, 984-990.
- Cowan MJ. (1991). Bone marrow transplantation for the treatment of genetic diseases. *Clinical biochemistry* 24, 375-381.

- De Coppi P, Bartsch G, Jr., Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S and Atala A. (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature biotechnology* 25, 100-106.
- Deans RJ and Moseley AB. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Experimental hematology* 28, 875-884.
- Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, Sturgeon C, Hewett T, Chung T, Stock W, Sher D, Weissman S, Ferrer K, Mosca J, Deans R, Moseley A and Hoffman R. (2001). Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Experimental hematology* 29, 244-255.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S and Gianni AM. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99, 3838-3843.
- Diwan SB SL. (1976). Development of teratomas from the ectoderm of mouse egg cylinders. *J Natl Cancer Inst* 57, 937-942.
- Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noel D and Jorgensen C. (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102, 3837-3844.
- Donahue J, Gilpin E, Lee TH, Busch MP, Croft M and Carrier E. (2001). Microchimerism does not induce tolerance and sustains immunity after in utero transplantation. *Transplantation* 71, 359-368.
- Duncan BW, Harrison MR, Crombleholme TM, Clemons G, Tavassoli M and Zanjani ED. (1992). Effect of erythropoietic stress on donor hematopoietic cell expression in chimeric rhesus monkeys transplanted in utero. *Experimental hematology* 20, 350-353.

- El-Badri NS, Wang BY, Cherry and Good RA. (1998). Osteoblasts promote engraftment of allogeneic hematopoietic stem cells. *Experimental hematology* 26, 110-116.
- Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S and Massumi M. (2006). Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Development, growth and differentiation* 48, 361-370.
- Evans MI, Harrison MR, Flake AW and Johnson MP. (2002). Fetal therapy. *Best practice and research* 16, 671-683.
- Farida Djouad PP, Claire Bony, Philippe Tropel, Florence Apparailly, Jacques Sany, Danièle Noël, and Christian Jorgensen (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102, 3837-3844.
- Fauza D. (2004). Amniotic fluid and placental stem cells. *Best practice and research* 18, 877-891.
- Flake AW, Harrison MR, Adzick NS and Zanjani ED. (1986). Transplantation of fetal hematopoietic stem cells in utero: the creation of hematopoietic chimeras. *Science (New York, NY)* 233, 776-778.
- Flake AW, Roncarolo MG, Puck JM, Almeida-Porada G, Evans MI, Johnson MP, Abella EM, Harrison DD and Zanjani ED. (1996). Treatment of X-linked severe combined immunodeficiency by in utero transplantation of paternal bone marrow. *The New England journal of medicine* 335, 1806-1810.
- Flake AW and Zanjani ED. (1999). In utero hematopoietic stem cell transplantation: ontogenic opportunities and biologic barriers. *Blood* 94, 2179-2191.
- Fleischman RA and Mintz B. (1984). Development of adult bone marrow stem cells in H-2-compatible and -incompatible mouse fetuses. *The Journal of experimental medicine* 159, 731-745.
- Friedenstein AJ. (1980). Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematology and blood transfusion* 25, 19-29.

- Fujikawa T, Oh SH, Pi L, Hatch HM, Shupe T and Petersen BE. (2005). Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells. *The American journal of pathology* 166, 1781-1791.
- Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW and Dazzi F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 105, 2821-2827.
- Gotherstrom C. (2007). Immunomodulation by multipotent mesenchymal stromal cells. *Transplantation* 84, S35-37.
- Hanson C and Caisander G. (2005). Human embryonic stem cells and chromosome stability. *Apmis* 113, 751-755.
- Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM and Caplan AI. (1992). Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13, 81-88.
- Hedrick MH, Jennings RW, MacGillivray TE, Rice HE, Flake AW, Adzick NS and Harrison MR. (1993). Chronic fetal vascular access. *Lancet* 342, 1086-1087.
- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE and Brenner MK. (1999). Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature medicine* 5, 309-313.
- Hu Y, Liao L, Wang Q, Ma L, Ma G, Jiang X and Zhao RC. (2003). Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 141, 342-349.
- Huber MA, Kraut N and Beug H. (2005). Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Current opinion in cell biology* 17, 548-558.
- in't Anker SAS, Carin Kleijburg-van der Keur,, Willy A. Noort FHJC, RoelofWillemze, Willem E. Fibbe, and and Kanhai HHH. (2003). Amniotic fluid

as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102, 1548-1549.

Ivanov V, Fleming TJ and Malek TR. (1994). Regulation of nuclear factor-kappa B and activator protein-1 activities after stimulation of T cells via glycosylphosphatidylinositol-anchored Ly-6A/E. *J Immunol* 153, 2394-2406.

Jessop HL, Noble BS and Cryer A. (1994). The differentiation of a potential mesenchymal stem cell population within ovine bone marrow. *Biochemical Society transactions* 22, 248S.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA and Verfaillie CM. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.

Jorgensen C, Djouad F, Apparailly F and Noel D. (2003). Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy. *Gene therapy* 10, 928-931.

Kadiyala S, Young RG, Thiede MA and Bruder SP. (1997). Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell transplantation* 6, 125-134.

Kakishita K, Nakao N, Sakuragawa N and Itakura T. (2003). Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Brain research* 980, 48-56.

Kaviani A, Perry TE, Barnes CM, Oh JT, Ziegler MM, Fishman SJ and Fauza DO. (2002). The placenta as a cell source in fetal tissue engineering. *Journal of pediatric surgery* 37, 995-999; discussion 995-999.

Kim J, Lee Y, Kim H, Hwang KJ, Kwon HC, Kim SK, Cho DJ, Kang SG and You J. (2007). Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell proliferation* 40, 75-90.

Koc ON, Peters C, Aubourg P, Raghavan S, Dyhouse S, DeGasperi R, Kolodny EH, Yoseph YB, Gerson SL, Lazarus HM, Caplan AI, Watkins PA and Krivit W.

- (1999). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Experimental hematology* 27, 1675-1681.
- Koch CA and Platt JL. (2003). Natural mechanisms for evading graft rejection: the fetus as an allograft. *Springer Seminars in Immunopathology* 25, 95.
- Korbling M and Estrov Z. (2003). Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *The New England journal of medicine* 349, 570-582.
- Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E and Dazzi F. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory T cells to their cognate peptide. *Blood* 101, 3722-3729.
- Ladage D, Brixius K, Steingen C, Mehlhorn U, Schwinger RH, Bloch W and Schmidt A. (2007). Mesenchymal stem cells induce endothelial activation via paracrine mechanisms. *Endothelium* 14, 53-63.
- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M and Ringden O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363, 1439-1441.
- Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, Remberger M, Sundberg B, Arvidson J, Ljungman P, Lonnies H, Nava S and Ringden O. (2007). Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 21, 1733-1738.
- Lee PW, Cina RA, Randolph MA, Goodrich J, Rowland H, Arellano R, Kim HB, Sachs DH and Huang CA. (2005). Stable multilineage chimerism across full MHC barriers without graft-versus-host disease following in utero bone marrow transplantation in pigs. *Experimental hematology* 33, 371-379.
- Li C, Zhang W, Jiang X and Mao N. (2007). Human-placenta-derived mesenchymal stem cells inhibit proliferation and function of allogeneic immune cells. *Cell and tissue research* 330, 437-446.

- Liang Y, Huang T, Zhang C, Todorov I, Atkinson M, Kandeel F, Forman S and Zeng D. (2005). Donor CD8<sup>+</sup> T cells facilitate induction of chimerism and tolerance without GVHD in autoimmune NOD mice conditioned with anti-CD3 mAb. *Blood* 105, 2180-2188.
- Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR and Flake AW. (2000). Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nature medicine* 6, 1282-1286.
- Linch DC, Rodeck CH, Nicolaides K, Jones HM and Brent L. (1986). Attempted bone-marrow transplantation in a 17-week fetus. *Lancet* 2, 1453.
- Lovell KL, Kraemer SA, Leipprandt JR, Sprecher DJ, Ames NK, Nichols-Torrez J, Carter KD, Rahmani DK and Jones MZ. (2001). In utero hematopoietic stem cell transplantation: a caprine model for prenatal therapy in inherited metabolic diseases. *Fetal diagnosis and therapy* 16, 13-17.
- Lutzko C, Omori F, Abrams-Ogg AC, Shull R, Li L, Lau K, Ruedy C, Nanji S, Gartley C, Dobson H, Foster R, Kruth S and Dube ID. (1999). Gene therapy for canine alpha-L-iduronidase deficiency: in utero adoptive transfer of genetically corrected hematopoietic progenitors results in engraftment but not amelioration of disease. *Human gene therapy* 10, 1521-1532.
- Mackenzie TC and Flake AW. (2001a). Human mesenchymal stem cells persist, demonstrate site-specific multipotential differentiation, and are present in sites of wound healing and tissue regeneration after transplantation into fetal sheep. *Blood cells, molecules and diseases* 27, 601-604.
- Mackenzie TC and Flake AW. (2001b). Multilineage differentiation of human MSC after in utero transplantation. *Cytotherapy* 3, 403-405.
- Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N, Ikeda M, Stastny V, Kassauei K, Sui G, Cutler DJ, Liu Y, Brimble SN, Noaksson K, Hyllner J, Schulz TC, Zeng X, Freed WJ, Crook J, Abraham S, Colman A, Sartipy P, Matsui S, Carpenter M, Gazdar AF,

- Rao M and Chakravarti A. (2005). Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nature genetics* 37, 1099-1103.
- Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP and Baker HJ. (2002). Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Experimental hematology* 30, 879-886.
- Milunsky A. (1979). Amniotic fluid cell culture. *Genetic Disorder of the fetus New York: Plenum Press* 75.
- Mosca JD, Hendricks JK, Buyaner D, Davis-Sproul J, Chuang LC, Majumdar MK, Chopra R, Barry F, Murphy M, Thiede MA, Junker U, Rigg RJ, Forestell SP, Bohnlein E, Storb R and Sandmaier BM. (2000). Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Clinical orthopaedics and related research*, S71-90.
- Muench MO. (2005). In utero transplantation: baby steps towards an effective therapy. *Bone marrow transplantation* 35, 537-547.
- Muench MO and Barcena A. (2004). Stem cell transplantation in the fetus. *Cancer Control* 11, 105-118.
- Nadri S and Soleimani M. (2007). Isolation murine mesenchymal stem cells by positive selection. *In vitro cellular and developmental biology* 43, 276-282.
- Nauta AJ and Fibbe WE. (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110, 3499-3506.
- Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA, Heemskerk MH, Lowik CW, Falkenburg JH, Willemze R and Fibbe WE. (2002). Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Experimental hematology* 30, 870-878.
- Okita JR, Sagawa N, Casey ML and Snyder JM. (1983). A comparison of human amnion tissue and amnion cells in primary culture by morphological and biochemical criteria. *In vitro* 19, 117-126.

- Owen M and Friedenstein AJ. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Foundation symposium* 136, 42-60.
- Owen R. (1945). Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine cattle twins. *Science (New York, NY)* 102, 400-401.
- Pallavicini MG, Flake AW, Madden D, Bethel C, Duncan B, Gonzalgo ML, Haendel S, Montoya T and Roberts L. (1992). Hemopoietic chimerism in rodents transplanted in utero with fetal human hemopoietic cells. *Transplantation proceedings* 24, 542-543.
- Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF and Prockop DJ. (2004). Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 103, 1662-1668.
- Petroff MG. (2005). Immune interactions at the maternal-fetal interface. *Journal of reproductive immunology* 68, 1-13.
- Picus J, Holley K, Aldrich WR, Griffin JD and Letvin NL. (1985). A naturally occurring bone marrow-chimeric primate. II. Environment dictates restriction on cytolytic T lymphocyte-target cell interactions. *The Journal of experimental medicine* 162, 2035-2052.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, NY)* 284, 143-147.
- Prockop DJ. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science (New York, NY)* 276, 71-74.
- Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B and Le Blanc K. (2003). Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 76, 1208-1213.
- Ratajczak MZ, Majka M, Kucia M, Drukala J, Pietrkowski Z, Peiper S and Janowska-Wieczorek A. (2003). Expression of functional CXCR4 by muscle

satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 21, 363-371.

Ringe J, Kaps, C., Schmitt, B. et al. (2000). Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell and tissue research* 307, 321-327.

Romanov YA, Svintsitskaya VA and Smirnov VN. (2003). Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 21, 105-110.

Schwarz EJ, Alexander GM, Prockop DJ and Azizi SA. (1999). Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease. *Human gene therapy* 10, 2539-2549.

Shields LE, Bryant EM, Easterling TR and Andrews RG. (1995). Fetal liver cell transplantation for the creation of lymphohematopoietic chimerism in fetal baboons. *American journal of obstetrics and gynecology* 173, 1157-1160.

Shook D and Keller R. (2003). Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mechanisms of development* 120, 1351-1383.

Simonsen. M. (1955). The acquired immunity concept in kidney homotransplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 59, 448-452.

Slaper-Cortenbach I, Ploemacher R and Lowenberg B. (1987). Different stimulative effects of human bone marrow and fetal liver stromal cells on erythropoiesis in long-term culture. *Blood* 69, 135-139.

Slavin S, Naparstek E, Ziegler M and Lewin A. (1992). Clinical application of intrauterine bone marrow transplantation for treatment of genetic diseases--feasibility studies. *Bone marrow transplantation* 9 Suppl 1, 189-190.

Streubel B, Martucci-Ivessa G, Fleck T and Bittner RE. (1996). [In vitro transformation of amniotic cells to muscle cells--background and outlook]. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)* 146, 216-217.

- Tavassoli M. (1991). Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview. *Blood cells* 17, 269-281; discussion 282-266.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS and Jones JM. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, NY)* 282, 1145-1147.
- Toda A, Okabe M, Yoshida T and Nikaido T. (2007). The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *Journal of pharmacological sciences* 105, 215-228.
- Touraine JL. (1996). In utero transplantation of fetal liver stem cells into human fetuses. *Journal of hematotherapy* 5, 195-199.
- Touraine JL, Raudrant D, Royo C, Rebaud A, Roncarolo MG, Souillet G, Philippe N, Touraine F and Betuel H. (1989). In-utero transplantation of stem cells in bare lymphocyte syndrome. *Lancet* 1, 1382.
- Tsai MS, Lee JL, Chang YJ and Hwang SM. (2004). Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human reproduction (Oxford, England)* 19, 1450-1456.
- Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC and Guinan EC. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 75, 389-397.
- van Dijk BA, Boomsma DI and de Man AJ. (1996). Blood group chimerism in human multiple births is not rare. *American journal of medical genetics* 61, 264-268.
- Zhang Y, Li C, Jiang X, Zhang S, Wu Y, Liu B, Tang P and Mao N. (2004). Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells. *Experimental hematology* 32, 657-664.

表一、用於 PCR 與 RT-PCR 偵測幹細胞相關基因與免疫相關基因表現之引子的序列與條件

PCR primer		sequence (5'-->3')	product size (bp)	Annealing Temp (°C)	cycles
chromosome Y (SRY)	F	gag agg cac aag ttg gcc c	230	56	29
	R	ctt tag ccc tcc gat gag gc			
H-2K <sup>b</sup>	F	cca ggt agg ccc tga gtc t	200	56	29
	R	cac tat tca ggt gat ctc t			
β-actin	F	egg gac ctg act gac tac	219	60	29
	R	gaa gga agg ctg gaa gag			
RT-PCR primer		sequence (5'-->3')	product size (bp)	Annealing Temp (°C)	cycles
Oct-4	F	ggc gtt ctc ttt gga aag gtg ttc	1124	55	38
	R	ctc gaa cca cat cct tet ct			
Nanog-1	F	atg agt gtg ggt ctt cct ggt	880	52	38
	R	tat ttc acc tgg agt cac a			
Tert	F	tgt acc aaa ttt gtg cca cca cgg	944	58	38
	R	ttc ctg cag tga tag ctt gcc gta			
Rex-1	F	acg gag agc tgg aaa cta aag	243	58	38
	R	tca gca ttt ctt ccc tgc ctt tgc			
Sca-1	F	aaa gag ctc agg gac tgg agt	280	58	38
	R	tac att gca gag gtc ttc ctg gca			
FGF-4	F	tac tgc aac gtg ggc atc gga tt	248	58	38
	R	tag gcg ttg tag ttg ttg ggc aga			
eNOS	F	tac cag ctg gcc aaa gtg acc	342	60	32
	R	cag aat ggt tgc ctt cac acg ctt			
CD200	F	cct tga ttg tga cat ggc aga a	553	56	35
	R	aat gct tag caa cag tgg aac			
HLA-G	F	cgc aca gag cta cta caa cca ga	757	56	29
	R	gca gct gtc ttc atg ctg gag			
GAPDH	F	acc aca gtc cat gcc atc ac	500	56	38
	R	tcc acc acc ctg ttg ctg ta			

表二、不同品系小鼠骨髓或羊水間葉系幹細胞之表面分子的比較

Strain	cell source	Sca-1	CD34	CD106	CD44	CD90	CD117	CD45	Oct-4	SSEA-1	Reference
C57BL/6	BM <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	-	-	ND <sup>3</sup>	+	Prockop, 2004
	BM <sup>1</sup>	+	+	+	+	-	+	-	+	+	Jiang, 2002
	AF <sup>2</sup>	+	-	ND <sup>3</sup>	+	+	-	-	+	+	Coppi, 2007
BALB/c	BM <sup>1</sup>	+	+	+	+	-	-	-	ND <sup>3</sup>	ND <sup>3</sup>	Prockop, 2004
	BM <sup>1</sup>	+	-	+	+	-	-	-	ND <sup>3</sup>	ND <sup>3</sup>	Eslaminejad, 2006
FVB/N	BM <sup>1</sup>	+	+	+	+	-	-	-	ND <sup>3</sup>	ND <sup>3</sup>	Prockop, 2004
	BM <sup>1</sup>	+	+	+	+	-	-	-	+	ND <sup>3</sup>	Baddoo 2003
DBA1	BM <sup>1</sup>	+	+	+	ND <sup>3</sup>	-	-	-	ND <sup>3</sup>	ND <sup>3</sup>	Prockop, 2004

<sup>1</sup> BM as Bone Marrow; <sup>2</sup> AF as Amniotic Fluid; <sup>3</sup> ND as non detection