

第一章：胚幹細胞簡介

前言：

在過去 25 年內，細胞生物或是發育生物學最大的成就是什麼呢？可以用下列 4 項成就作為代表：(1) 建立小鼠和人類的胚幹細胞 (2) 以同型基因重組 (homologous recombination) 的方式改變胚幹細胞的 DNA (3) 以核移轉技術將體細胞的細胞核導入去核的卵細胞並且讓基因體再次重新啟動 (4) 使胚幹細胞分化生成生殖細胞。因為上面的 4 項重大突破，開始了所謂「再生醫學」領域，許多現在醫學上無法處理的疾病，例如糖尿病、巴金森氏症、脊髓損傷、神經退化等疾病，在概念上而言可由「再生醫學」加以解決，充滿了無限希望。

上述的科技發展，許多是來自於小鼠的胚胎發育研究。生命的啟端是一顆受精卵，由此，建立了整個個體，這個特性可稱作受精卵的「全能性」

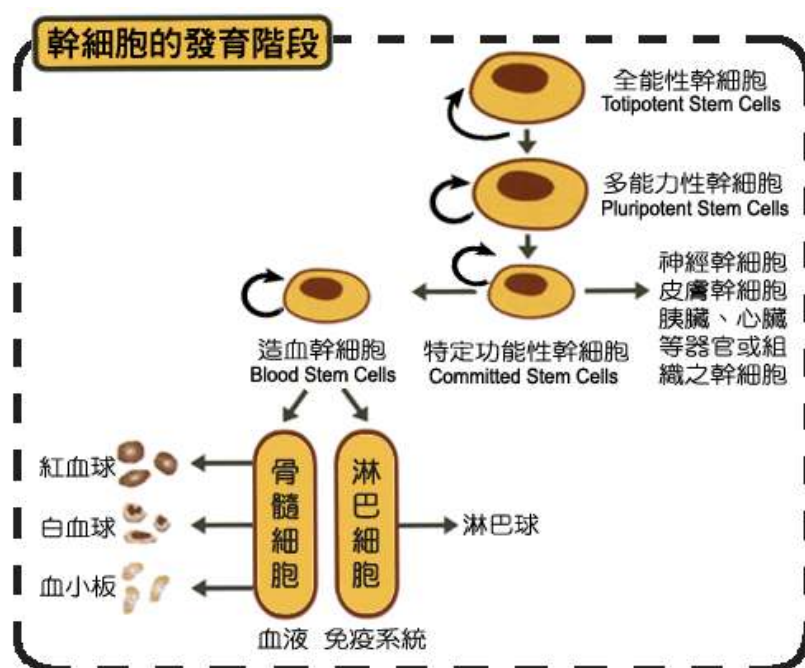
(totipotency)。在小鼠，這種「全能性」保留到 8 個細胞期，也就是受精卵經過 3 次有絲分裂後，每一個細胞還是保留這個「全能性」，將其個別分開培養後，都還保留成為一個完整個體的能力。在靈長類的胚細胞也有這個特性，不過大約僅保留到 4 個細胞期，曾經有恆河猴於 4 個細胞期時，個別細胞分離後，由單一細胞(稱為胚葉細胞)再生出健康猴寶寶的報告，由此證明在靈長類的胚細胞中，「全能性」至少是保留到 4 個細胞期。

受精卵經過數次有絲分裂後就會形成桑葚胚，之後形成囊胚。在囊胚內有一團細胞聚集，稱為內細胞團(inner cell mass; ICM)，內細胞團雖然已經失去「全

能性」，不會長出個別的完整胚胎，但是內細胞團仍具有「多能性」

(pluripotency)，可長出內胚層細胞、外胚層細胞、中胚層細胞以及生殖細胞，因此極具有應用價值。「全能性」的細胞中有大部份的細胞會隨著發育階段演進而分化為「多能性」細胞，之後再更進一步分化為特定功能性幹細胞 (committed stem cells)，例如神經幹細胞、皮膚幹細胞、心臟等器官或組織之幹細胞。特定功能性幹細胞的特性是僅能再分化為特定族群的細胞，因此，神經幹細胞只分化出不同階段的神經細胞，最後再更進一步變為成熟的神經細胞，同樣的，其餘的特定功能性幹細胞也是如此，這是在定義上要釐清的，釐清之後在閱讀文獻上就不會混淆(參考圖 1-1)。

圖 1-1 幹細胞的發育階段和全能性、多能性、及特定功能性幹細胞之關係



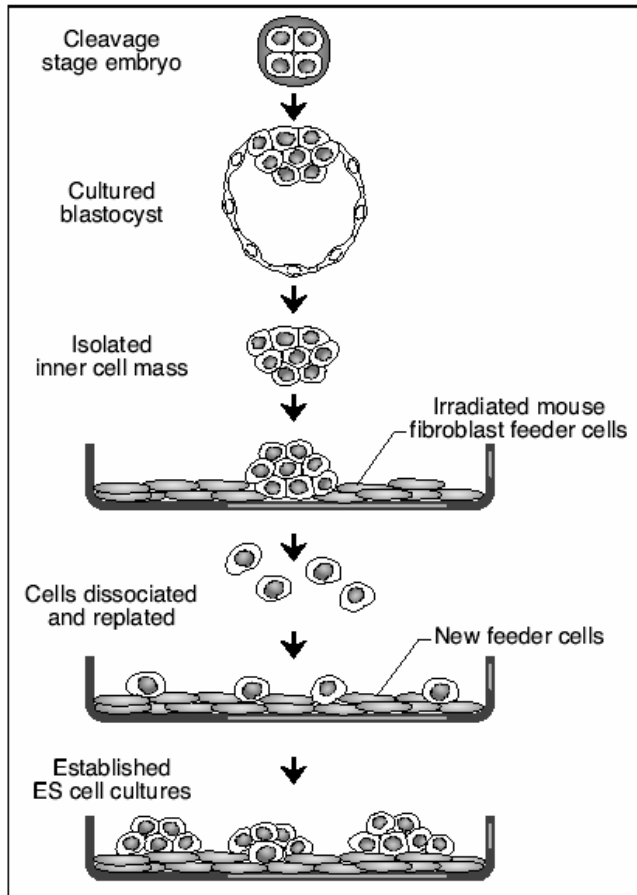
資料來源: <http://www.sinocell.com.tw/cell.php>

胚幹細胞的相關研究起自於 1970 年代早期，不過當時沒有真正的胚幹細

胞，但是有性質相近的胚癌細胞（EC；embryonic carcinoma cell）和畸型瘤（teratocarcinoma cell）細胞株。將 EC 細胞移植於小鼠子宮外的區域，例如皮下，會長出良性或是惡性瘤，之後將這些長出的瘤細胞分離後再培養，發現可長出三個胚層的各种細胞，更好玩的是，如果將 EC 細胞和 ICM 併在一起，會發現 EC 細胞竟然可以貢獻於胚胎發育，並且在生出的小鼠體內找到，形成所謂的「嵌合小鼠」（意指身上的細胞由不同來源所組成）。不過 EC 細胞的染色體並不正常，而且失去分化能力或僅能於培養狀態下加入特殊化合物刺激其分化，且僅在偶然的狀態下可貢獻於「嵌合小鼠」的生殖細胞，這些特性都說明了 EC 細胞並不容易維持早期胚幹細胞的多能性。

因為 EC 細胞的不穩定度，迫使研究人員想辦法建立較好的細胞株。理論上，可以取用胚胎細胞直接培養，應該較 EC 細胞為佳。在各方努力之下，於 1981 年有兩個實驗室同時建立了小鼠的胚幹細胞株，一個是 Evans 和 Kaufman 於劍橋大學的實驗室，他們使用小鼠胚胎的纖維母細胞（MEFs；mouse embryonic fibroblasts）來當作餵養細胞（feeder cells），另一個是加州大學的 Gail Martin 實驗室，將 EC 細胞拿來處理培養液，再將處理過的培養液用來培養胚胎的早期細胞。兩個實驗用各自的方法培養由內細胞團（ICM）分離出的細胞株，並將之稱為胚幹細胞（ES cell；embryonic stem cell），其特性是可於體外培養系統維持，並且不會失去分化的能力（參考圖 1-2）。

圖 1-2: 胚幹細胞是由胚胎的內細胞團 (ICM) 分離並培養於小鼠胚胎的纖維母細胞作為餵養細胞(feeder cells)而建立的



為什麼我們說不會失去分化的能力？可以由兩項重要特性判斷，第一是將其併入另一個胚胎的囊胚後，胚幹細胞完全可以貢獻於這個胚胎（接受者）的各種細胞，包括生殖細胞。如果在體外培養的狀況下，讓胚幹細胞進行分化，同樣可以得到各種細胞，包括近年來証實可以由胚幹細胞於體外分化為生殖細胞。

除了 EC 和 ES 細胞外，還有第三種胚胎細胞具有類似「多能性」的特性，第三種細胞源於發育中的性腺（稱為生殖嵴；genital ridge）內的生殖細胞，移作原始生殖細胞 (PGC；primordial germ cell)。將小鼠的原始生殖細胞分離培

養後，可以得到胚胎生殖細胞株（EG；embryonic germ cell），其特色和由囊胚分離出的 ES 細胞很像，細胞分裂能力強，且具高度分化特性，並且具有幹細胞的標誌分子表現。

將人類 5~7 週大的胎兒 PGC 細胞分離後，同樣可以建立 EG 細胞株，而且於體外培養環境中具有多能性。不過其細胞增殖能力較小鼠的 EG 細胞差，需要先形成類胚胎體(Embryoid Body)後才能繼續增殖。將人類的 EG 細胞移植到受損的神經，可見到局部的再生現象，因此，人類的 EG 細胞似乎可用作治療。

上述所說的 EC、EG 細胞是 ES 細胞出現之前的旁支研究，在許多特定的研究課題上仍然深具價值，不過接下來，我們主要還是介紹 ES 胚幹細胞。

未分化的 ES 細胞之特性

(四) 小鼠的 ES 細胞之特性

小鼠胚幹細胞最早於 1980 年代初被建立，最早需要使用囊胚期的胚胎，培養於小鼠的胚胎纖維母細胞(Mouse Embryonic Fibroblasts)上(如圖 1-3 所示)。

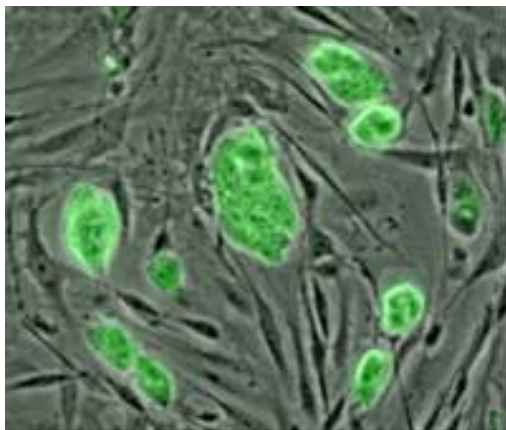


圖 1-3：小鼠胚幹細胞培養於小鼠的胚胎纖維母細胞上方，胚幹細胞呈現出胖

胖橢圓形，胚胎纖維母細胞和一般纖維母細胞類似，呈現出梭狀，兩者極易分別。

資料來源: www.nsf.gov/od/lpa/news/03/pr03142_images.htm

用這個方法建立胚幹細胞成功與否和小鼠的品系很有關係，有些小鼠品系較容易建立，例如 129 品系是最容易建立胚幹細胞的小鼠品系。一旦胚幹細胞建立後，在體外培養系統中，幾乎可以無限擴充而且保持其全能性，同時也維持正常的染色體，細胞繼代時間較一般短，約在 12~15 小時之間，因為 G₁ 細胞週期縮短之故。

因為小鼠的胚幹細胞是建立於 MEFs 上，所以可以推論 MEFs 的作用應該是提供胚幹細胞自我更新的重要因子，或者是抑制胚幹細胞的分化，使它可以維持「全能性」。基於這個思考，之後有兩個實驗室同時發現這種抑制胚幹細胞分化的重要因子，稱作 LIF，又稱作 DIA (Leukemia inhibitory factor 和 Differentiation inhibitory activity)。LIF 是一種屬於 IL-6 細胞激素的溶解性糖蛋白，藉由細胞膜上的 gp130 活化 STAT 訊息傳遞路徑來調控許多細胞生理功能。這一類的細胞激素還包括 IL-11、oncostatin M(OSM)、ciliary neurotrophic factor(CNTF) 和 cardiolipin-1 (CT-1)，都具有維持小鼠胚幹細胞(mES; mouse embryonic stem cell)多功能性的特性，因此，如果將 MEFs、IL-6 細胞激素家族的分子抽離或是阻斷 STAT 路徑，則 ES 細胞會在培養盤中自然分化，無法維持其胚幹細胞「全能性」或「多能性」的狀態。

基於許多研究者之前對造血系統幹細胞的瞭解，可以作出一個維持幹細胞持

續擴充的數目，但又同時不分化的通則，那就是用高濃度細胞激素或是讓細胞自己表現細胞激素，如果沒有這種條件，那麼進行分化的可能性就會增高，但是如果條件充足，幹細胞會選擇自我更新和擴充，不會走分化路線。LIF 所扮演的角色是什麼呢？將 ES 細胞於不同濃度的 LIF 作用下培養，我們會發現 LIF 其實不太管細胞的擴充速度，而是控制細胞的自我更新或是分化路徑的選擇。

胚幹細胞的最重要特性是其「幹細胞特徵」，但是在操作上要用什麼來確定某株細胞就是幹細胞？最重要且最常見的確證方式是看其表現的標誌分子 (molecular marker)。小鼠胚幹細胞最重要的標誌分子包含 SSEA-1、gp-130 和 ALP (鹼性磷酸酶)，還有染色體終端酶 (telomerase)，另外最重要的轉錄因子表現是 Oct-3/4、Oct-3 和 Oct-4 同時也是小鼠胚幹細胞上胚層 (epiblast) 和生殖細胞 (germ cell) 的重要標誌分子。在胚幹細胞中，持續而且適時適量的表現 Oct-3/4 是維持胚幹細胞特性的必要條件，將表現量提高到將近原來的兩倍會讓胚幹細胞分化為原始內胚層和中胚層，反之，如果將 Oct-3/4 的活性去掉，會讓胚幹細胞分化為胚盤前驅細胞，並且失去全能性。最近也有研究者指出另一種蛋白質 Nanog 也是維持幹細胞全能性的重要分子，於著床前胚胎中，Nanog 的表現位於上胚層，且受限於上胚層，其作用似乎是在於決定細胞激素的調節作用。

Nanog 和 Oct-3/4 是維持 ES 特性的必要條件，但 LIF 活化的 STAT3 則為輔助條件。將 LIF 加入於無血清的 ES 細胞培養中，可以維持其多能性，且會抑制神經分化路徑，若將 LIF 和 BMP 併用，則可維持自我更新、多能分化，形成嵌合

體胚胎，而且可貢獻於嵌合體胚胎的生殖細胞。另外，MEK/MRK 訊息傳遞也和 ES 細胞的自我更新和分化調控有關，將以 ERK 路徑用 MEK 的抑制劑 PD098059 處理後，會抑制胚幹細胞之分化能力，使其維持胚幹細胞的自我更新能力，其作用被認為是和 STAT3 相反，因此，MEK/MRK 路徑是傾向分化的，不過這個 MEK/MRK 路徑如何和 Nanog、Oct-3/4 或是 LIF 之間取得平衡，目前仍不清楚。

最近有研究者提出 Wnt 訊息傳遞也和 ES 細胞的維持有關，Wnt 可由抑制 GSK-3 的特殊藥物(BIO；6-bromoindirubin-3-oxime)活化，可使小鼠或是人類的 ES cell 維持不分化狀態，而且維持 Nanog 和 Oct-3/4 的表現。BIO 這種藥物的作用具有可逆性，因此可用 BIO 來進行暫時性的不分化調控，可能對日後於再生醫學上的應用有幫助。

總之，ES 細胞的自我更新能力和全能性/多能性的維持是建立在一堆調控因子的微妙平衡上，這種微妙平衡失去後，會讓 ES 細胞的特性消失。

(五) 人類的胚幹細胞株(hESCs, human Embryonic Stem cells)

從建立小鼠胚幹細胞株的技術上延伸，人類胚幹細胞株的建立就比較容易了。人類胚幹細胞株和小鼠胚幹細胞株有許多類似的特性，像是 Oct-3/4、染色體終端酶和全能性，並且於長期培養後仍然維持染色體的正常和細胞增殖功能，不過和小鼠胚幹細胞不同的是人類的胚幹細胞於懸浮培養液中主要形成中空狀的類胚胎體(EB；embryoid body)(參考圖 1-4)，而非實心的 EB，而且人胚幹細

胞表現 TRA-1-60、TRA-1-81、GCTM-2 及 SSEA-3 和 SSEA-4，這是鼠胚幹細胞所沒有的。

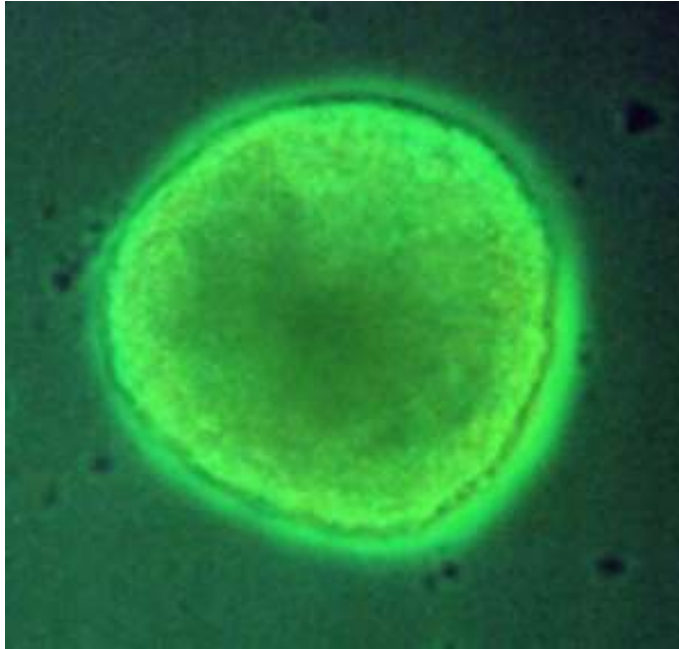


圖 1-4: 人類胚幹細胞(hESCs)所形成的類胚胎體，呈球狀結構，由胚幹細胞培養於懸浮培養液中聚集而成，具有初步分化為外、中、內三個胚層的細胞，是許多進行於體外系統將胚幹細胞分化為特定細胞，例如皮膚、肝臟、心肌細胞等實驗所必需先獲得的材料。

資料來源: www.nsf.gov/od/lpa/news/03/pr03142_images.htm

除此之外，有些可能很重要的差異包括：(1) hESCs 增殖成倍的時間較長(大約 30 ~ 35hr 相對於小鼠胚幹細胞的 12 ~ 15hr)，(2) mESCs 可以完全用 LIF 取代 MEFs 餵養細胞，但 hESCs 目前無法用 LIF 取代 MEFs，不過這並不代表 hESCs 沒有 LIF/STAT-3 的訊息傳遞路徑，最近的研究顯示 hESCs 也有具功能性的 LIF/STAT-3 活化，只是還不足以維持 hESCs 不分化的狀況；有研究者將 hESCs

培養於細胞外基質，例如 Matrigel 和 laminin 上，再加上 MEFs 處理過的培養液，發現可使 hESCs 表現高量的 α_6 -和 β_1 -integrins，integrins 和細胞外基質 laminin 有連結關係，這個結果顯示可能可以利用細胞外基質來幫助維持 hESCs 的幹細胞狀況。最近研究更有開發出不需要血清和細胞外基質的 hESCs 培養系統，可以想見的，未來培養 hESCs 的技術將更加發達。

到底目前全世界有多少株已經建立的 hESCs 細胞株？沒有人可以回答，許多細胞株是實驗室自行公佈的，其胚幹細胞的特性有待進一步證實，不過有跡可循的是 2001 年底時，約有 70 株 hESCs 已經被建立，且幾乎全部是利用 MEFs 所建立的，因此，有些疑慮在其中，例如有許多 MEFs 可能會帶來小鼠反轉錄病毒感染，這可能會為未來的臨床應用帶來嚴重的問題，也因為這種疑慮，在 2004~2005 年之間，約有 10 篇論文報告開發出不使用血清(通常是胚牛血清)的培養技術。

雖然培養和操作 hESCs 的主要技術已經被建立多年，hESCs 的冷凍保存、基因轉殖、基因打靶(gene targeting)或是單一細胞的分離和選殖仍有很大的進步空間，而且每一株 hESCs 的生長特性、分化能力、繼代能力都各有差異，因此，以分子標誌為基礎的「幹細胞特性」定義更形重要，不過最近分析很多 hESCs 的結果發現以非餵養的細胞或長期培養下的 hESCs 變異性更大，要適當定義可能不容易。最近也有研究者希望以轉錄體(transcriptome；相對於基因體 genome 的概念)的方式來分析 hESCs 的「幹細胞性」(stemness)，以確立研究上或是將來臨床應用上的標準化。

(六) 其他物種的胚幹細胞株

除了小鼠和人類的 ESCs 之外，現在有哪些動物的胚幹細胞株已經被建立？

目前已知的有雞、倉鼠、兔子和大白鼠的胚幹細胞株，不過僅有小鼠和雞的 ESCs 被證實導入胚胎後，可貢獻於生殖細胞，當然，要能夠貢獻於生殖細胞才能將我們轉殖進去的基因帶給下一代，會比較有研究價值。

對人類胚幹細胞研究有較直接意義的是靈長類 ESCs 的建立和應用。猴子的 ESCs 和人類的很相似，也表現分子標誌 Oct-4、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81，且可保持正常的染色體組成，並且於體外培養系統中進行分化，因此，可以將猴子的 ESCs 當作人類的來研究。最近有研究者將猴子的胚幹細胞用孤雌生殖的方式建立起來，稱作 Cyno-1 細胞，其特性和 hESCs 非常類似，是研究的好材料，甚至有人思考用孤雌生殖的方式所建立的 ESCs 來當作未來細胞治療的材料，畢竟孤雌生殖的囊胚是未受精的卵細胞所生長出來的，因此沒有倫理上的問題，不過也有人指出使用孤雌生殖建立的 ESCs 會讓母系基因表現大量增加，而父系基因表現相對減弱，而且孤雌生殖建立的 ESCs 增殖能力較差，是另一個考驗。

胚幹細胞的基因操作

過去由細胞生物學累積的實驗技術對胚幹細胞的分離、培養和分化鑑定幫助很大，除了將 ESCs 培養成神經細胞之外，想要讓 ESCs 分化成其他細胞，大抵上都要讓其先形成所謂的類胚胎體(EB, embryoid body) (參考圖 1-4)。在技術上

有兩大問題要克服：第一，我們對在培養液中的細胞分化和胚胎體內的細胞分化之間的差別瞭解有限，因此過去對胚胎體內分化的知識未必能應用在體外系統中，例如：我們知道胚胎體內的血管分化有哪些重要的調控因子，將這些調控因子拿來體外培養系統中使用，未必就能將 hESCs 或 mESC 養出血管，這是必須要實驗證實的。第二，往往體內分化的結果並不能如預期的得到單純的細胞，而是一堆不同的細胞株，在研究上或應用上會有很大的限制，想要突破這些限制，利用基因操作的方式是絕對必須的，不管是體內或是體外系統，基因操作意指將基因轉殖入 ESCs，並建立暫時性或是永久性的細胞株，體內細胞則是將基因轉殖入 ESCs 後，再讓這些 ESCs 帶到小鼠體內，並且期望這些基因轉殖鼠能夠一代一代繁殖下去。

DNA 如何導入胚幹細胞？可以使用傳統的方式，利用感染或是轉染或是使用電子打洞法(electroporation)(參考圖 1-5，見下一頁)。DNA 導入 ESCs 後，可能會以隨機方式插入 ESCs 的基因體內，其結果是讓某些基因突變、高度表現或是帶上追蹤蛋白(例如綠色螢光蛋白)，另外一種方式是利用 DNA 序列類似的方式導入特定片段的 DNA，稱作「同型重組」或是「類似序列重組」(homologous recombination)，因為其具有針對特定 DNA 序列的置換特定，又可稱為「基因打靶」(gene targeting)，意指針對特定的 DNA 片段或是基因來處理，成功的改變 ESCs 內的這段基因就是正中靶心。

把 DNA 導入 ESCs 或是小鼠體內讓研究者可以充分利用，研究特定基因的功

能，是研究上一大利器。

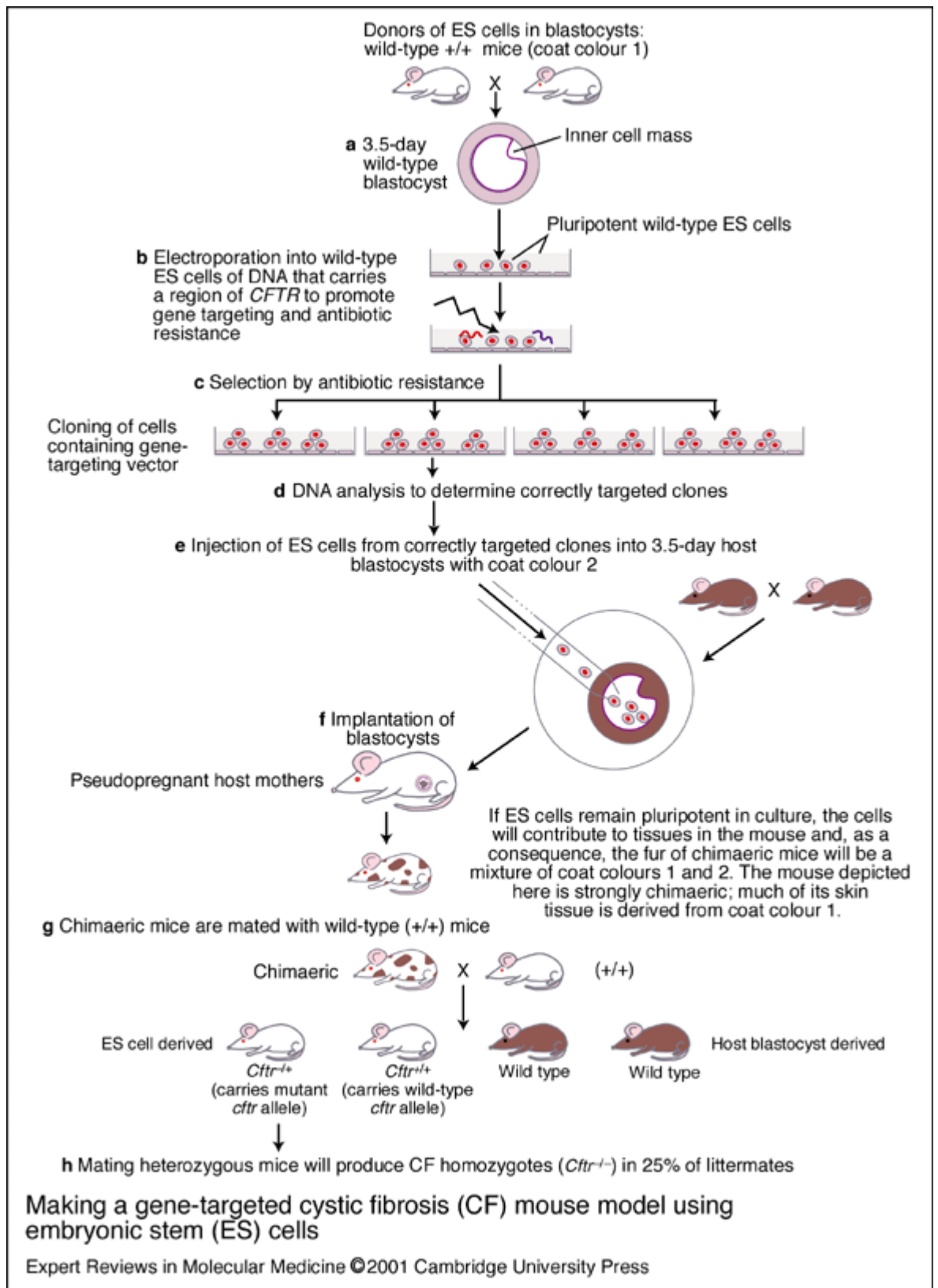


圖 1-5: 以電子打洞法(electroporation)將外來基因導入小鼠胚幹細胞的操作流程，在這個例子中是將異常的 CFTR 基因片斷導入胚幹細胞後，和正常片斷作交換，之後再用抗生素將已經導入成功的胚幹細胞株篩選出，再將這種細胞株植入囊胚(blastocyst)中，使這種囊胚著床生出嵌合小鼠(chimaeric mice)，再讓小鼠交配後，就可製造出同型合子(homozygous)的遺傳變異胚胎。有許多人類疾病的小鼠研究模式就是這樣做出的，這個例子作出的是纖維囊腫(cystic fibrosis)的小鼠。

資料來源: www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002575h.htm

以下就隨機基因轉殖(random transgenesis)和基因打靶(gene targeting)再進一步介紹。

(三) 隨機基因轉殖(random transgenesis)

隨機基因轉殖的結果是讓 DNA 以隨機方式併入胚幹細胞中，經常使用的篩選藥物是 neomycin、puromycin、hygromycin、HSV-TK，有時也利用標誌蛋白(例如綠色螢光蛋白，GFP 或是 LacZ)來分離或是追蹤已經基因轉殖成功的胚幹細胞(參閱圖 1-6)，另外，也有使用特製的重組 DNA，轉殖進入胚幹細胞來過度表現特定的轉錄因子(如 GATA4、Twist)，訊息傳達因子(例如 insulin-like growth factor II, Cripto)或是分化成熟後的特定蛋白質(如紅血球、肌肉細胞、胰臟細胞、心肌細胞等)，不過以病毒的啟動子(promotor)或是哺乳動物細胞的啟動子來驅動胚幹細胞的特定蛋白質表現往往很難建立較穩定的細胞株。

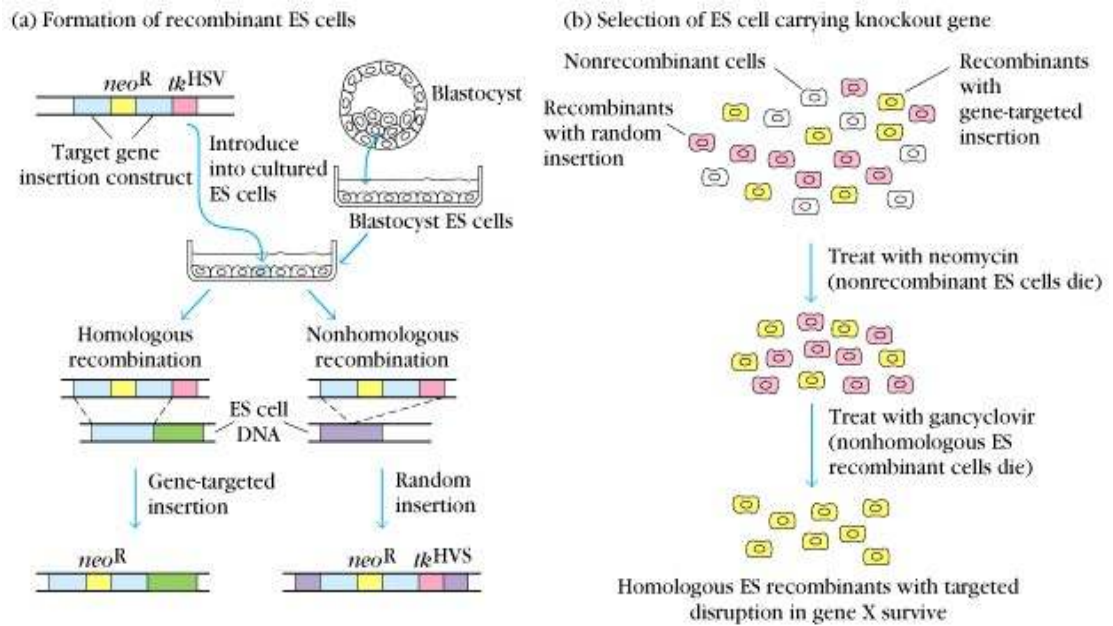


圖 1-6: 基因打靶 (gene targeting; homologous recombination)和隨機基因轉殖(random transgenesis; nonhomologous recombination)之操作流程和篩選。在此例子中，將基因導入胚幹細胞後，先用 neomycin 篩選掉無外來基因的胚幹細胞株，再使用 gancyclovir 篩選掉基因打靶失敗的胚幹細胞株，最後得到的即是基因打靶成功的胚幹細胞株，用以製造基因轉殖小鼠。

資料來源: faculty.oxy.edu/.../immuno_s01/figure23-20.htm

以反轉錄病毒載體來導入基因已經應用約 20 年了，其優點是可以確定 DNA 序列，且可以穩定、高效率，長效性的導入細胞內，而這也是第一個成功將外來基因導入 ES 細胞報告所用的方法，不過，使用反轉錄病毒導入的基因並不穩定，ES 細胞在 CpG 雙核苷酸上有高度的胞嘧啶甲基化現象，而這往往會壓抑病毒的 LTRs 之表現，因此，反轉錄病毒導入基因的方法有些限制。

基於反轉錄病毒的限制，更複雜的 lentivirus 載體被發展出來，相對於反轉錄病毒僅能感染正在分裂的細胞之限制，lentivirus 可感染正在分裂及不是正在分裂中的細胞，且轉殖進入 ES cell 的基因不會停住而沒有活化，目前 lentivirus 載體已被成功導入於 hESCs 中，而且更重要的是導入的基因不會因為 ESCs 形成類胚胎體或是植入體內形成畸形瘤而失去活性，更重要的是以 lentivirus 導入基因的胚幹細胞也會貢獻於生殖細胞，且不會停止表現該導入基因，這個現象大大提升了以 lentivirus 導入外來基因的可行性，可望成為取代目前主流方法的一項有利選擇，因為目前想導入基因於 ESCs 最主要的方式還是用電子穿洞法，將 ESCs 置於培養液中，加入想要導入的 DNA 片段，然後再以電擊方式使 ESCs 的細胞膜出現破洞，將 DNA 片段導入，這個方法效率很高，不過通電的結果經常會導致 ESCs 死亡，是它的一大缺點。

另一個可以選擇的方法是利用脂質體(liposome)導入 DNA，先將 DNA 和脂質體混合，再讓其帶入 ESCs 中，但效率低於 10%，因此，lentivirus 可能是目前最佳的導入載體，可望成為技術上的主流。

在操作隨機基因轉殖時，可設計組織特異性的啟動子於 DNA 片段，讓導入的基因僅在特定細胞表現，例如將心肌特異性的啟動子導入，則日後 ESCs 形成的胚胎內心肌細胞才有機會表現導入的基因，不過，以此方式得到的實驗在解釋上要特別小心，畢竟體外系統和體內系統有時會相差懸殊。舉例而言，vimentin 在體內中通常僅表現於實質細胞，但在體外培養系統中大部分細胞皆會表現。另

一個例子是輕鍊的 myosin 啟動子，曾經被用於鑑定 ESCs 分子分化出來的心肌細胞，不過這個鑑定其實僅適用於成年鼠的心肌，因此可能不太適用。

此外，操作隨機基因轉殖時，DNA 的併入狀況也會影響表現，單一片段併入或是多重片段併入會影響表現量，而且隨機併入的基因表現通常會逐漸降低，導致有些表現量高，有些表現量低，會有不穩定的結果，最後也可能完全不表現，這個現象限制了操作隨機基因轉殖的研究用途或是臨床用途。

(四) 基因打靶 (gene targeting)

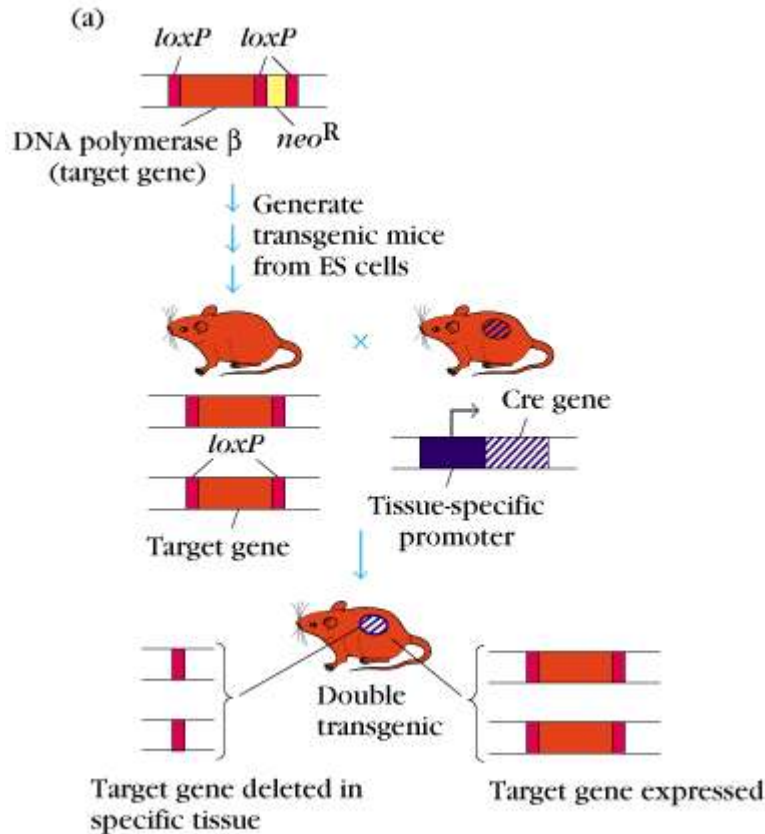
基因打靶較隨機基因轉殖更能於 ESCs 中製造出基因突變，最早是由 Thomas 和 Capecchi 於 1987 年發展出來，而後在 1989 年時，由基因打靶方式導入的轉殖基因第一次被證實可藉由生殖細胞傳給下一代的小鼠，開啟了製造基因轉殖鼠技術的新紀元。目前，用基因打靶導入轉殖基因於 ESCs 中已成為製作基因轉殖鼠的標準方法，被廣泛應用於大部分的實驗室。

可修改小鼠身上的基因對研究許多基因功能是很有利的，因為許多細胞培養的實驗成果往往不能完全反應到體內的狀況，不過修改小鼠體內的基因有時也不能完全回答某些問題，最簡單的例子就是，如果被動手腳的基因是早期發育所必需的話，那麼小鼠胚胎在子宮中，於很早的發育階段就死掉了，如此，要研究某些基因在晚期的胚胎內的功能其實是不可能的，此外，某些基因的功能在成年體內與在胚胎內是不同的，例如前面所提到的 LIF 和 vimentin，如果在胚胎發育早期就讓這類基因失去功能，那麼晚期的功能研究可能受到掩蓋，為了解決此類

問題，基因打靶的技術在開發之後不斷地被修改，以因應研究所需。

如果改變胚胎基因會導致早期死亡，那麼可行之解決方法是導入特殊的設計，讓特定的狀況下，基因才會被啟動或是被關閉，早期時不給予這樣的特定狀況(例如給予某種藥物)，胚胎就不會死亡，等到晚期時再給予這個特定狀況，如此，就能讓胚胎存活到我們想要研究的發育階段，供我們研究。這種修改小鼠基因的技術稱作「狀況型」(conditional)的基因改造，可能是「狀況型」敲掉某個基因或是「狀況型」殖入某個基因。最常見的「狀況型」小鼠基因改造是將基因安插一小段 DNA 序列，稱作 loxP 或是 frt，loxP 通常安插於一段基因序列的兩側，當 loxP 序列遇到 Cre DNA 重組酶(Cre Recombinase)時，會進行 DNA 序列的插入、複製、刪除或是序列倒轉，這些變化可以讓基因活化或是失去功能。在這裡，Cre 重組酶存在時，就是基因改造的「狀況」，因此，稱為「狀況型」的基因改造。另一例子是使用 frt，原理和 loxp 類似，不過啟動 frt 的「狀況」是 Flp 重組酶存在時。

我們可以設計讓 Cre 或是 Flp 在特定發育階段或是特定細胞中才會啟動，如此，就可以調控「狀況」發生時的時間(特定的發育階段)，或是空間(特定的器官或是組織)(參考圖 1-7)。



資料來源: faculty.oxy.edu/.../immuno_s01/figure23-20.htm

圖 1-7: 以 Cre-loxP 系統進行「狀況型」的基因改造，這個圖中的例子是針對標的基因 DNA polymerase β ，先於胚幹細胞中導入兩側帶有 loxP 之標的基因，經過篩選後製作基因轉殖鼠，再讓此基因轉殖鼠和帶有組織特異性啟動子所調控的 Cre 基因轉殖鼠交配，其子代就具備有 Cre 活性，提供了必要「狀況」，因此在特定的組織(最底下小鼠體內打斜線的部份)中，標的基因 DNA polymerase β 會被刪除掉，但是其餘部份則保留標的基因的活性。

近年來的 ESCs 基因操作的新發展

早期利用基因打靶，透過 ESCs 製造的「敲掉基因的小鼠」經常被拿來

當作是研究人類疾病的動物模式，這樣的觀念是對的，但也可以說是錯的，因為接下來的研究往往證明基因和環境的因素很重要，小鼠的基因環境私人有些是有大差異的，這樣的講法很抽象，舉例來說較容易瞭解。例如小鼠的纖維囊腫 (cystic fibrosis) 疾病模式是將相關的基因 CFTR 突變或是敲掉的結果，如果同樣的基因出現問題，在人類體內會於死亡前出現肺部病變，導致肺部積水而呼吸困難，但是同樣的 CFTR 在小鼠身上突變卻看不到肺部的病理現象由上述的例子可見以小鼠的疾病來當作人類疾病的研究模式，有時不是那麼直接，有些是可以直接當作研究模式，但有些還要經過一些轉折。成大的吳昭良教授和中研院分生所的李鴻教授都曾經製造過人類疾病的小鼠研究模式，但是都是經過一些轉折（再處理），才得到類似人類疾病的病理現象，另外我們也必需要知道，同樣的基因突變在人類身上會導致疾病，但在小鼠身上往往沒事，反之亦然。

到目前為止，全世界約有 7000 隻以上的基因轉殖突變鼠，當然並非所有的這些基因突變鼠都有用處，不過利用這些基因轉殖突變鼠真的帶給我們很大的知識突破，而這些新知可作為發展基因治療或是藥物治療的基礎。以下我們就近年來的 ESCs 基因操作新發展作一簡介。

（一）染色體外的基因表現

如前所述，將外來基因引入 ESCs 中會對基因表現不利，通常外來的基因會於一定的繼代之後表現減弱，或是完全不表現，結果導致嵌合的基因型和表現

型，也就是說同一株的 ESCs 中又分出表現強者、弱者、或是完全不表現外來基因者，結果導致 ESCs 的特性難以掌握，無法用以研究或是臨床應用。為了解決上述問題，染色體外的基因表現被發展出來，而其最大的特色就是沒有逐漸減弱的現象，且不影響 ESCs 的多能性和分化能力。

如何作染色體外的基因表現？使用多瘤病毒（polyoma virus）是一個例子。多瘤病毒的突變種，包括失去整個 large T 的 intron 或是失去生成完整中型 T 或是小型 T RNA 的突變種，他們會失去使細胞變形癌化的能力，但是只要大 T 的 RNA 存在（雖然不完整），多瘤病毒就會於細胞核外進行複製，而且不會併入小鼠細胞的染色體，有如在細胞核外建構小型的染色體一樣。例如 Gassmann 等人就發展出一套會自行複製的載體系統，專門用來建構 ESCs 的核外基因表現，經由 Aubert 等人實際使用，證實可以讓 SERP2 轉殖基因於 ESCs 的染色體外持續穩定表現，且證明比一般的併入細胞核內的隨機插入方式穩定，且成功的效率約在 1~5%，也較傳統的導入方式的成功率（<0.1%）要高，最重要的是，這種染色體外的 DNA 複製和基因表現不會影響 ESCs 的自我更新和多能性，因此使用染色體外的載體可說克服了以隨機方式插入外來基因的一些技術上的難題。

（二）ESCs 基因的再組合工程（recombineering）

不管是基因轉殖是用隨機插入的方式或是基因打靶的方式，總是需要花費時間於大腸桿菌 E. Coli 內的 DNA 重組及建構，可謂工作非常繁重，經常是耗費很多時日，而且有時候沒有適當的核酸限制內酶辨認位置可供操作，更難於其中插

入篩選序列或是 loxP 位置。為克服上述困難，最近有所謂的染色體再組合工程技術的建立 (chromosome recombineering)，大大的減少了建構載體的時間，且讓插入篩選序列於染色體任何位置變為可能。

怎麼操作 ESCs 的染色體再組合工程呢？我們可以用將 Olig-2 這個基因「敲入」(knock-in) ESCs 的染色體來作說明。研究者將 Olig-2 由 BAC library 中分離出，再將其於建構於一個酵母菌載體中，於酵母菌中發生重組後將載體送入 E. Coli 中擴充，分離修飾後再導入 ESCs。

雖然重組可於酵母菌中進行，但實際上也可於 E. Coli 中進行，而且可利用噬菌體的 DNA 重組系統，更能有效利用線形的雙股 DNA 片斷，例如：lox P 或是篩選序列的插入於任何 DNA，例如：plasmid，BACs 或是 PACs，然後再利用這些 DNA 來當載體或是建構載體，如此可以省去由基因體 DNA 抓出來建構載體的巨大工程，可謂短線操作但效果類似，而且這個方法最近已經由研究者證實可用於小鼠的 mESCs，但是否可用於人類的 hESCs 有待報告證實。

(三) RNA 干擾術 (RNA interference, RNAi)

RNAi 是以雙股 RNA 導入細胞，導致細胞內原有序列類似的 RNA 工作停擺，而達到干擾某個特定基因的功能之目的，剛開始被發展時純粹是研究用途，但技術發展由線蟲開始應用，逐次發展為使用於植物和哺乳動物細胞，目前已經是治療癌症的一個重要的實驗技術，並經多次修改成為一個被廣泛應用的技術平台，並且成為許多生物技術公司的主要利基。

RNAi 應用主要的困難是如何導入細胞內，一旦導入成功後，雙股的 RNA 就會非常特異性的干擾宿主細胞 RNA 類似的序列。實際應用上，RNAi 已被應用於著床前胚胎和卵細胞的實驗，將綠色螢光蛋白 GFP 的 RNAi 片段導入小鼠的受精卵，這隻原本帶有 GFP 表現序列的小鼠胚胎本來必會顯現出的綠色螢光會被抑制，直到胚胎發育第 6.5 天才可再見 GFP 再次被偵測出。

RNAi 針對已經分化或是尚未分化的 ESCs 來操作也有不錯的成績，因此有許多學者對以 RNAi 來研究 ESCs 分化過程抱持極大的興趣，這可以由近年來大量使用 RNAi 於 ESCs 的分化論文篇數可以看得出來；更樂觀者甚至要以 RNAi 來嘗試基因治療，不過當然有許多問題是值得再討論的。

ESCs 的基因表現綜觀 (expressing profiling)

一般研究 ESCs 的學者都相信或是假設 ESCs 的生物學是由基因轉錄機制所調控的，不過現在的幹細胞都是由細胞的功能性來作定義的，這中間有一段差距。ESCs 的發展能力所用的一套調控基因應該是和一般細胞的調控基因不同，但是我們現在對 ESCs 的調控基因所知有限，僅知道一些已知的 Oct3/4、LIF、BMP、Wnt 等訊息傳遞因子。理論上，用轉錄體 (transcriptome) 的概念和方法將可有效提供 ESCs 的定義，將所有 ESCs 可能表現的 mRNA 列出來，再找出和一般細胞的差異，應該可以找到一些 ESCs 的特定調控基因，不過目前的已知研究報告卻沒有指出可靠的單一或是某些特定的基因和 ESCs 的「幹細胞特性」(stemness)

可以直接關連，或許是所謂的幹細胞基因（stemness gene）會受到細胞株種類、培養方式、微陣列或基因晶片的分析方式、資料處理或者可能存在的操作過程污染，等因素之影響，總之到目前為止，沒有任何基因可用以直接定義所謂的「幹細胞特性」。以下我們簡介幾個常用的分析基因表現綜觀的實驗方法。

（一） 微陣列（或微矩陣）

Ramalho-Santos 等人和 Ivanova 等人是首先利用微陣列分析 ESCs 的兩個實驗團隊，而這兩篇論文於 2002 年發表，離現在也才不過約 4~5 年，可見使用微陣列來作 ESC 基因表現的綜觀分析不過是近幾年的事。

Ramalho-Santos 等人將小鼠的 mESCs 和造血系統幹細胞（HSCs）以及神經前驅細胞（NPCs）作比較，發現 216 個基因轉錄，Ivanova 等人則發現 283 個基因轉錄在上述三種細胞中特別豐富，而且非常令人驚奇的是僅有 6 個基因在兩組（216 和 283）中有重複出現，而且當他們將和幹細胞特性有關的基因於三組名單中（mESCs、HSCs 和 NPCs）抽出比較時，發現有相當的共通性。

其共通性是有一堆被轉錄的基因是和轉錄、轉譯、DNA 修補、蛋白質降解、蛋白折疊有關，此外還有一些共通表現的基因是我們已經知道功能的，更進一步分析可發現和幹細胞特性相關的基因有許多位於第 17 條染色體上，可見調控幹細胞特性的基因可能位於某個特定的染色體區塊。

Fortunel 等研究者也發表過 385 個轉錄 RAN 被高度表現於 mESCs 中，但只

有 $\alpha 6$ -integrin 被列於 Ramalho-Santos 等人所發表的名單中，結果令人驚訝。其後 Sharov 等人於 2003 年發表另一篇報告，在報告中最重要的結果符合 ESCs 具有某一套基因來維持其幹細胞特性的概念，和成年幹細胞相比，ESCs 具有全能性，而成年幹細胞具有多能性或單能性，其原因可能是某些基因被轉錄的量差異擴大的結果，而且之後針對 hESCs 的研究基本上也支持這個概念。

(二) 基因表現之序列分析(SAGE; Serial Analysis of Gene Expression)

SAGE 是利用小段的轉錄出來的 RNA 來追蹤或找出可能含有意義的被表現基因，其操作原理是基於兩項假設，第一，小片段的 DNA 序列（約 10~14bp）已足夠用以分離被轉錄的基因，第二，是將小片段的 DNA 連結起來作定序分析可能有助於提昇分離被表現基因的效率，基於上述的兩項假設，SAGE 實際的操作方法是將 ESCs 內的 mRNA 先行 RT-PCR 後，得到 cDNA，再使用限制內酶將 cDNA 切斷，切斷後的小段 cDNA 再利用磁珠 (magnetic beads)，收集帶有 biotin primer 的片段 (RT-PCR, primer 上已帶上 biotin)，之後再根據限制內酶的辨認序列和 poly-A primer 將這些用磁珠收集到的小片段 cDNA 以 PCR 放大，之後再將放大後的 DNA 串起來，拿去定序後再跟現有的網路上的 SAGE library 資料庫比對，可望找出重要的調控基因(如圖 1-9)。

圖 1-9: SAGE 實際的操作方法是先行得到 cDNA，再將放大後的 DNA 串起來，拿去定序後再跟現有的網路上的 SAGE library 資料庫比對，可望找出重要的調控基因。

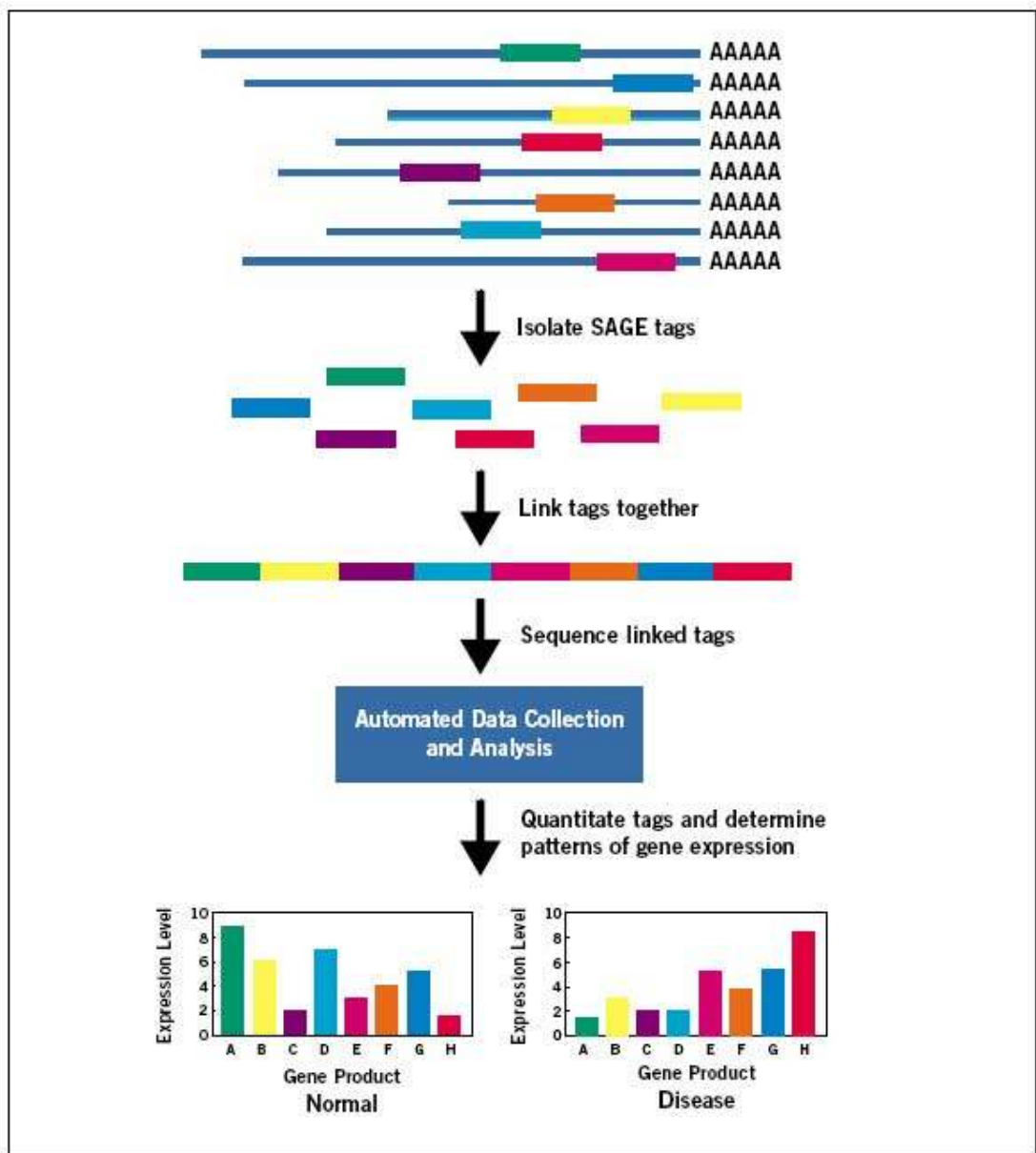


Figure 1. Schematic of SAGE method (Courtesy of sagenet.org)³

資料來源: www.biocompare.com/technicalarticle/1327/Seri...

第一篇利用 SAGE 分析的報告由 Boheler 等人發表於 2002 年之後，目前網路上約有 40 個小鼠的 SAGE library，由各種 mESCs 被建構出來。將 SAGE 的資料和其他網路資源相比對 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE>)，可大致推論某些基因是否和幹細胞特性有關，例如：將用微陣列方式找出的一套基因拿來和 40 個 SAGE library 中的資料比對其表現量，可發現 Mdr1 和 LIF 受體不是幹細胞特性相關度很高的基因，倒是 UTF-1、Dppa-5、Sox 2、Tdgf、Oct-3/4 和 Nanog 是真正的幹細胞特性相關基因，另外像是 Thy1，則可以說和幹細胞特性較不相關，因為 Th1 在小腸和睪丸中也有很豐富的表現。

由現在的一堆基因轉錄體 (transcriptome) (包括微陣列和 SAGE) 的資料庫比較看來，似乎 ESCs 的幹細胞特性 (stemness) 的維持僅有少數基因相關，當然，細胞要決定維持幹細胞特性還是走往分化路徑也可能是一大堆基因共同抉擇的結果，這個問題的答案需要足夠的功能性分析才能提供。

(三) 蛋白質體分析

任何細胞的生命現象皆和蛋白質有關，因此蛋白質學當然和 ESCs 的研究有關。Elliot 等人曾將 R1 mES 細胞株作為材料，建立了第一個 ESCs 的資料庫，他們利用 2 維電泳和質譜實驗，分析了 700 個電泳膠點，由其中辨別出 218 種蛋白質，

而其中約一半和 DNA 的維持、轉錄、轉譯以及蛋白質的熟成有關，21%和轉譯後的修飾作用有關，雖然 Elliot 等人的報告代表性有待評估，但至少證明了 ESCs 有很豐富的轉譯活化，並且有很活躍的轉譯後蛋白修飾作用，而且單靠轉譯體學 (transcriptome)，也就是單靠 RNA 的研究是不足以描述 ESCs 的分子和細胞生物學的幹細胞特性。

ESCs 於藥理學和胚胎毒理學上的應用

胚幹細胞的治療潛能已經被許多媒體廣泛討論過，然而其實取胚幹細胞作為開發新藥或是胚胎毒理研究上的應用也很有潛力。

人類的胚幹細胞在這個觀點上應用，有三個重要的考慮，第一是體外的毒性測驗系統往往不足以反應體內的特定器官的毒性反應；第二，非人類的胚胎毒性試驗用來反應某些藥物對人類胚胎的效應，有時無法完全一致；第三，使用人類胚幹細胞來試驗藥物也可以減少實驗動物的消耗量。這邊所說的三個考慮是就長期而言，就短期來說，人類胚幹細胞可立即對醫學研究作出貢獻，不過，目前這方面的研究還是以小鼠胚幹細胞為主力。

第一個針對 mESCs 的藥理實驗是探討藥物對 ESCs 分化取得的心肌細胞的效應，也有研究者以心臟藥物探討不同分化階段的心肌細胞對這些藥物的反應，而且因為心肌細胞的收縮特性，也可以使用自動影像拍攝系統來篩選對心肌細胞有促進或抑制收縮的藥物。

就胚胎毒性試驗而言，ESCs 對造成畸型胎的藥物試驗就特別重要，目前最有效致畸型的化合物之一就是視黃醛酸 (retinoic acid)，而 RA 早已被用於 EC 細胞分化為神經細胞的刺激藥物。RA 於不同 EB 時期給予不同劑量的條件下會影響 EB 中細胞分化，高濃度的 RA 於早期時加入可促使 EB 細胞分化為神經細胞，低濃度於晚期給予則傾向往骨骼肌和心肌的方向走。

ESCs 也被應用於分析抗血管生成藥物的活性，例如 Sauer 等人利用 ESCs 作材料，提供一個非常有名的致畸型藥物—莎麗豆邁 (thalidomide) 的毒理資訊，發現該藥物會抑制血管生成，導致四肢生長不全。

目前已有整套利用 ESCs 來作藥物試驗系統的建立，通稱 EST (embryonic stem test or ES cell test)，因為 EST 系統耗費鉅大的人力物力，也有實驗室用螢光活化流式細胞技術(FACS)先將特定的已分化細胞分離出來再作測試，也可以使用基因體學或蛋白體學的方法，以 ESCs 為操作平台來測試藥物的毒性或是致畸型性。

ESCs 於體外分化的能力

在小鼠的胚胎發育過程中，原始的上胚層形成三個胚層—外胚層、中胚層和內胚層，這三個胚層互相作用，最後長成胚胎內所有組織和器官，這種胚胎內組織的生長和互相影響的過程無疑是相當複雜的，而胚幹細胞的分化則可以提供相對簡單的系統，特別是在體外培養的狀況下是較容易觀察的。

讓 ESCs 於體外進行分化作用，首先要去掉餵養細胞或是 LIF 的補充，可讓 ESCs 在無餵養細胞供應的狀態下，進行懸浮液培養或是培養於甲基纖維素 (methylcellulose) 上，或者是近來年發展出的 PA6 基質細胞上，都可讓 ESCs 變成類胚胎體 (EB, embryoid body)，近年來也有研究者以培養盤進行改良為生物反應器的方式，擴充類胚胎體培養的規模。

一旦分化被啟動，三種胚層的細胞會自然被分化出來。剛開始會有外面一層類似內胚層細胞 (endoderm-like cells) 形成於 EB 上，然後數天之後 EB 的邊緣長出類似外胚層細胞，最後才是類似中胚層細胞的分化，此時若將 EB 內的細胞打散，分盤再培養，則可以得到各式各樣的特化細胞，包括心肌、平滑肌、骨骼肌、造血細胞、胰臟細胞、肝臟細胞、脂肪細胞、軟骨、神經、神經膠原細胞等等，而且各個細胞的分化特性和分子標誌就仿如在胚胎內一樣。

分化的效率和分化後的成果和 ESCs 於培養過程中的環境有關，包括 ESCs 的密度、培養液成分方面的影響因素包括葡萄糖濃度 (通常至少需要 4.5g/glucose/Liter 的高濃度葡萄糖)、胺基酸的種類和濃度、生長因子、細胞外基質、pH 值、滲透壓、胎牛血清的濃度都會影響到 ESCs 的分化、甚至不同批號的胎牛血清都會影響到分化的結果。因為上述影響因素的差異造成胚幹細胞培養的不確定性，有許多研究致力於改善這種不確定性，例如開發以 dextran-coated charcoal 處理胎牛血清，除掉胞外基質和生長因子的活性，或是使用已知成份的培養液 (去除掉血清的不確定性)，或是以 BSA fraction V 來

取代胎牛血清，都有人發表過研究成果。

另外一個研究早期分化的模式是 EPL(early primitive ectoderm-like，早期原始類外胚層細胞)細胞株，EPL 是將 ESCs 培養於肝癌細胞株 HepG₂ 處理過的培養液中發展而來，培養後分析 EPL 細胞發現具有許多原始胚胎外胚層的特性，但因 EPL 細胞和胚胎內細胞團 ICM 或是 ESCs 有所區隔，而且打入囊胚中也不會參與胚胎發育，因此 EPL 僅可作為早期分化的研究模式，不適合用來製造基因轉殖鼠。EPL 聚集成 EB 後會失去分化為臟層內胚層和神經外胚層的能力，取而代之的是較晚期的原始外胚層、壁層內胚層和中胚層細胞的分化，這顯示 EPL-EB 這個分化模式可適用於研究體外中胚層的發育，而且也顯示在胚胎發育時，如果失去臟層內胚層可能導致外胚層細胞無法生長。有趣的是，外胚層無法生長可由培養於 MED II -CM (亦即 HepG₂ 處理過的培養液)讓它長出來，使 EPL-EB 也能長出神經外胚層細胞，包括原始外胚層、神經板和神經管，而且以 MED II -CM 處理的 EPL 細胞株幾乎完全抑制掉中胚層和外胚層的分化，是很好的分析外胚層細胞分化相關因子的研究材料。

在人的 ESCs 方面(human ESCs，hESCs)，體外分化的實驗可先將其和飼養細胞分開之後再以機械方式或是酵素方式分開 ESC 細胞團，然後培養於懸浮液中形成 EB。這種方式長出的 EB 為囊狀結構，內有許多不同的細胞，例如神經、心肌或是胰臟細胞，都是報告過的被分化出的細胞(參閱圖 1-8)。這樣的實驗操作看似簡單，不過到目前為止，我們卻沒有促使 EB 長出單一細胞種類的辦法，比如

說，已知 activin-A 和 TGF- β 主要會促使 EB 長出中胚層細胞，而 RA、EGF、BMP4 和 bFGF 可刺激 EB 長成外胚層細胞和中胚層細胞，NGF 和 HGF 則會促使 EB 分化為三個胚層的細胞。BMP-4 則會刺激 hESCs 分化為類似滋養細胞 (trophoblast-like cells)，滋養細胞是早期的胚盤細胞，這一點和以 BMP-4 刺激小鼠的 mESCs 所得到的結果是不一樣的。

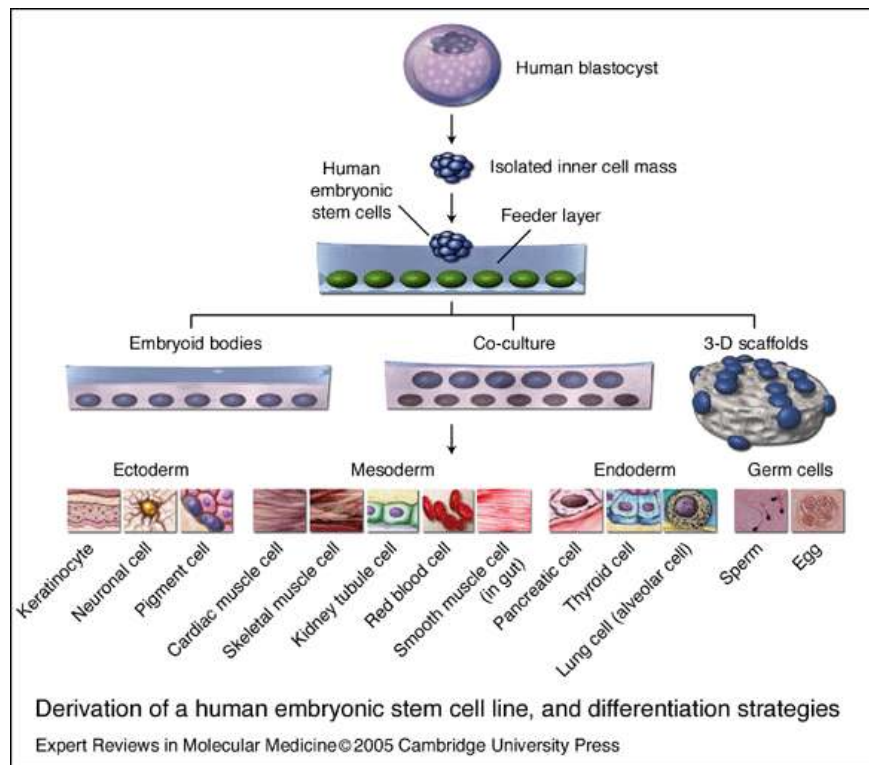


圖 1-8: ESCs 可藉由形成類胚胎體(embryoid bodies)、和其他細胞共同培養 (co-culture)、或是培養於立體骨架(3-D scaffolds)的方式分化為外胚細胞、中胚細胞、內胚細胞和生殖細胞。

資料來源: www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/05009816h.htm

下面僅就 ESCs 分化為外胚、中胚、內胚細胞和生殖細胞的研究現況作簡介：

(一) ESCs 分化為外胚層細胞

在小鼠胚胎發育過程中，外胚層最後的分化路徑是變成中樞和周邊神經以及表皮和一部份的血管平滑肌細胞。

ESCs 分化為上皮細胞可由角質細胞中級纖維(intermediate filament)和角質細胞特異的 involucrin 表現來確定，分化方法是將 ESCs 培養於適當的胞外基質(extracellular matrix)，然後以 BMP-4 合併或單獨使用維生素 C 處理，將這些細胞培養於空氣和培養液的交界面，則會長出複層上皮細胞，形態類似於胚胎的上皮，而且表現出上皮細胞的標誌分子和纖維母細胞的標誌分子，和胚胎剛分化出的上皮層類似，這個結果顯示可以由 ESCs 在體外培養的系統中，培養出分化完全的皮膚。

外胚層細胞分化另外一個重要的主角是神經細胞和神經膠原細胞，早在 1995 年就有三個實驗室發表將 ESCs 分化為神經細胞的報告，不過在自發狀態下，ESCs 分化為神經細胞數量極少，要加入一些生長因子，例如 RA (retinoic acid；視黃醛酸，為維生素 A 的衍生物)，才能促使大量的神經細胞長出來。

雖然高濃度的 RA 可刺激 ESCs 有效分化為神經細胞，其存活率很有限，且這些受 RA 刺激分化來的神經細胞後續的發育能力有限，不太適合拿來作細胞植入治療；另一個問題是 RA 本身所具有的致畸型特性，也是一項疑慮。因此，其他取代方法也陸續被開發出，有些採取多重步驟刺激分化，有些僅針對分化到神經前驅細胞為目標。以分化到神經前驅細胞舉例而言，於 EB 形成後將血清去除可

以抑制中胚層細胞的分化，之後再用加入刺激神經分化因子，例如 bFGF 及 EGF 來刺激神經前驅細胞生成，之後再以 GDNF、NT、TGF- β 3 和 IL-1 β 來維持這些細胞。使用上述方法已經成功的將 ESCs 有效分化為具有多巴胺分泌功能的細胞。另外也有研究者合併使用 RA 處理再加上 PA6 基質細胞共用培養，或是使用上述的 EPL-EB 模式，也可以培養出神經細胞或是具有分泌多巴胺能力的神經細胞。

當然，以上面所說方法培養出的神經細胞是要經過嚴格確認的，最常見的確認方法是使用基因表現和神經生理學方法來確認，兩者皆已確定可將 ESCs 分化為腦內三種主要的細胞類型—腦神經細胞、星狀體細胞和寡突觸細胞，但是想要使 ESCs 分化為單純一種細胞的嘗試，目前還沒有成功，不過倒是可以先將 ESCs 分化為神經前驅細胞，之後再促使其往單一類型細胞方向分化，可以得到較單純的細胞株。在分化過程中參與的因子包括生長因子(RA、NGF、bFGF、EGF)、細胞基質蛋白(Matrigel、laminin)或是基質細胞株，例如將 hESCs 培養於 MS5 基質細胞上，然後添加 FGF₈、SHH、BDNF，會得到有效的分化成為神經上皮結構，稱為「神經團」(neural rosettes)，將神經團培養後，可得到成熟的神經細胞，具有分泌多巴胺的能力，並且表現應該要有的中腦神經細胞標誌分子，例如 Pax₂、Pax₅、engrailed-1，這種分化過程已經在人及猴子等高等靈長類的 ESCs 細胞株證實可行。我們可以試想，由 ESCs 分化取得的多巴胺分泌細胞如果移植到巴金森氏症患者(其腦中分泌多巴胺的神經細胞退化掉)的腦中將對該患者提

供很大的幫助，因此這方面的研究前景應該相當樂觀。

(二) 將 ESCs 分化為中胚層細胞

中胚層細胞在胚胎中的分化路徑是肌肉、骨骼、軟骨、血液和結締組織，在脊椎動物胚胎中，血液和血管內皮細胞是首先被分化的中胚層細胞，於鼠胚第 6.5 天時，位於卵黃囊中。造血細胞和血管細胞的來源一般認為是從「血液血管母細胞」(hemangioblast)開始，將 ESCs 於體外培養也會仿照體內的動作進行分化，於 EB 中可見到血島細胞，內含紅血球和巨噬細胞；如果將 ESCs 培養於半固態的培養液中，則可得到中性球、漿細胞、巨噬細胞和紅血球細胞。如果使用胎牛血清再加上細胞激素(IL-3、IL-1、GM-CSF)，會得到早期的造血細胞。另外就紅血球品系而言，有些細胞會同時表現胎兒血紅素和成年紅血素。也有研究者使用會分泌某些刺激因子的 OP9 細胞，也會促使 ESCs 分化為紅血球、白血球、淋巴球和自然殺手細胞。最近的研究顯示 Wnt3 的活化是讓 ESCs 分化為血液細胞的重要因素。

針對血管內皮細胞的分化而言，使用內皮細胞特定的啟動子可讓我們從 EB 的研究中獲得更多的血管內皮細胞分化的相關知識。例如有研究人員將 ESCs 中的 brachury 基因打掉，並標上綠色螢光蛋白，brachury 是中胚層特定的轉錄因子，因此，可由這個方式將培養盤中的中胚層和神經外胚層細胞區分出來。

以 ESCs 培養出的中胚層細胞當然也要有標誌分子的表現來作驗證，不過最後的確認還是在於其功能。ESCs 分化之後的細胞必需要可以長期維持，並且具

備多能性，可以分化出各種類型的血液細胞，才算是已經培養出造血系統幹細胞。早期的實驗結果傾向於僅維持可以分化為淋巴球的特性，不過最近的報告已證實使用 ESCs 分化得到的造血幹細胞可以長期保有分化為各種血液細胞的能力。

另外一種由 ESCs 分化而得到的重要細胞是心肌細胞，將具有 400~800 顆細胞的 EB 拿來分析，會發現其內含有一定比例的心肌細胞，而這種 EB 是由高濃度的胎牛血清(約佔 20%)培養得到的，可能的解釋是胎牛血清內含促進 ESCs 分化為心肌細胞的成分。分析這些 EB 中的心肌細胞可發現其具有下列特性：(1)表現心肌細胞的基因，就與正常發育過程一樣；(2)有肌節的結構特徵；(3)用離子通道刺激方法可使其收縮。EB 中的心肌細胞可由自發分化(也就是不作任何處理)獲得或是加入 DMSO、RA、Dynorphin B 或是心臟萃取物來刺激其進行分化。

有趣的是以電生理分析可見到階段性的分化過程，剛開始分化得到的是原始心肌細胞，之後是心房/心室細胞，再來是 Purkinje 細胞，最後才是類似節律點的心肌細胞。

由 hESCs 分化的心肌細胞和 mESCs 分化得到的心肌細胞類似，會有自發性收縮，先是形成單核的圓形細胞，慢慢長出具有肌節的合體細胞，具有心肌細胞的標誌分子表現，並對調控分子作出典型反應。不過由 hESCs 分化為心肌細胞在一般實驗狀況下效率不高，因此最近有人將 EB 培養於 END-2 細胞上，END-2 被認為會提供內胚層細胞所分泌的因子，可幫助得到較有效率的心肌細胞分化。

除了上述可由 ESCs 分化的中胚層細胞外，還有一些中胚層細胞可由 ESCs 分化得來，包括脂肪、軟骨、生骨母細胞、肌肉母細胞等等，一般而言要刺激這些細胞分化皆需要特定的分化因子，而且需要數個階段的生長因子或細胞外基質。也有些實驗正致力於開發中胚層細胞分化的生物反應器，用以製造大量的中胚層細胞，例如血管內皮細胞，這類型的研究可作為以後開發體外血管組織工程的基礎。

(三) 由 ESCs 分化為內胚層細胞

內胚層細胞於胚胎發育過程中會貢獻於胰臟、肝臟及腸胃道上皮，其中胰臟和肝臟具有很大的臨床意義，主要是肝病和糖尿病的關係，因此到目前為止，已有許多由 ESCs 分化為胰臟內分泌細胞、外分泌細胞或是分化為胰臟細胞的報告。

由 mESCs 的分化實驗可以得到肝臟內的三種細胞—肝細胞、膽管上皮細胞和卵圓細胞，且都有表現適當的標誌分子，並且在這些實驗當中，意外發現了一株肝臟的前驅細胞，可由 ESCs 分化得來。

就胰臟分泌細胞而言，這是許多研究 ESCs 者的夢想，有人將 insulin-promotor 導入 ESCs 中，幫助選擇分化成功的胰島素分泌細胞，將得到的細胞植入小鼠體內，發現會幫助糖尿病小鼠恢復正常的血糖。另外一個可能可以增加取得胰島素分泌細胞效率的方法是以 nestin 為篩選標誌分子，不過這樣子篩選出的細胞會有部分往神經分化的方向走，且不易存活，結果不但沒有分泌出很多胰島素，反而從培養液中消耗掉大量的胰島素。

另一種增加由 ESCs 分化出胰島素分泌細胞的方法是利用基因轉殖，Blyszczuk 等人於 2004 年曾嘗試導入 Pax4 於 ESCs 中讓它持續表現，結果得到會分泌胰島素和 C-peptide 的細胞，植入糖尿病小鼠體內可讓小鼠回復正常血糖，同樣的，導入 NKx6.1 也有類似效果。

在 hESCs 的實驗上，約可得到 1% 的細胞具有分泌胰島素的能力，並有胰臟內分泌細胞的特性。以 NGF 處理 hESCs 可讓它大量表現 Pdx-1，而 Pdx-1 其實就是控制 insulin 基因轉錄和 insulin 蛋白質分泌的重要調控因子，因此，目前的結果還算樂觀。

(四) 由 ESCs 分化得到生殖細胞

分化為生殖細胞是 ESCs 於體外系統分化技術較晚發展的一項，原因是其困難度較高，一直到 2003 年還有很多實驗室認為要將 ESCs 分化為生殖細胞幾乎是不可能的，但是到了 2004 年底，Science 期刊就將於體外系統由 ESCs 分化出生殖細胞列為當年度的十大突破之一，再次驗證了許多科學上的夢想往往可以實現。

在體外觀察生殖細胞生成，以往較缺乏可直接使用的標誌分子，後來 Hübner 等人於 2003 年發表的一篇 Science 文章中，使用生殖細胞會特異表現的 Oct-4 基因(稱為 gcOct 4; germ cell Oct 4)的 CR2 和 CR3 調節序列建構 gcOct 3/4-GFP，利用 GFP 螢光特性來觀察生殖細胞的分化。將 ESCs 培養 12 天後，會形成大小不一的細胞團塊，於培養液上層形成聚集，具有綠色螢光且表現

Vasa(一種胚胎發育過程中生殖細胞移動到生殖器官之後的標誌分子),然後將這些聚集分離之後再培養,就可以得到結構上類似卵泡的生長物,且會分泌雌性激素,顯示和卵泡的功能相似,再仔細分析這些類似卵泡的生長物可發現其易碎,且表現透明帶蛋白 ZP2 和 ZP3。持續再培養,經過 43 天後可得到類似著床前胚胎的結構,因為沒有經過授精,這些生長物應該像是孤雌生殖(parthenogenesis)的胚胎。

男性的生殖細胞也可以由 ESCs 分化獲得,且具有受精能力。EB 中的細胞可分離出類似原始生殖細胞(PGC),且可得到具有單套染色體的細胞(僅有生殖細胞具有單套染色體),將這種細胞利用顯微操作技術注射到卵細胞中,可成功受精得到具有雙套染色體的早期胚胎,進而發育成為著床前的囊胚。另外,EG 細胞培養後可讓已經被甲基化的基因,例如 Igf2r 和 H19 回復到未被甲基化的狀態,也就是說由基因打印(gene imprinting)的狀態恢復打印前的狀態,而這種打印前的狀態就是生殖細胞的特性。

將 ESCs 分化為生殖細胞,無疑地,將提供很好的生殖細胞分化過程中的研究材料,而且所得到的卵細胞可用以作體細胞核植入之後,遺傳物質啟動的研究模式,不需要仰賴捐贈的卵細胞。

上面所說的生殖細胞分化都是小鼠胚幹細胞(mESCs)的研究成果,那麼人類的胚幹細胞(hESCs)有沒有辦法在體外分化成生殖細胞?目前 hESCs 已被證實可在體外培養系統中發現減數分裂的活性。Clark 等人於 2004 年發表了一份報告

指出，將 hESCs 養出的 EB 進行分化，可得到表現出 SCP1 和 SCP3 的細胞，而 SCP1 和 SCP3 是減數分裂的標誌分子，接下來也可得到減數分裂後的標誌分子表現，例如 GDF9 和 TEKT1，可見 EB 中的細胞有減數分裂的活性，而祇有生殖細胞才會有減數分裂，因此，由目前的成果來看，想要由 hESCs 分化取得人類的生殖細胞，技術上的突破應該是指日可待的。

以胚幹細胞作為發育和病理的研究模式

胚胎發育過程中有許多基因的調控功能需要用遺傳學的策略來研究，針對某個特定基因，我們可能想要知道它在發育過程中扮演什麼角色？如果發育異常時，是不是特定的基因出了什麼問題？而這些特定基因是由哪些啟動子和促進子序列調控的？我們可不可以用分子生物學的方法把這些調控序列找出來？另外，我們也想知道針對特定的基因促進其活性或完全除去其活性，結果會是如何？上面的問題在細胞學領域的實驗中早已行之有年，但是將上面的問題搬到胚胎的平台上來問或是來操作，基本上，要有 ESCs 的建立才有可能。

以下我們就以兩種較常見的 ESCs 作為發育和病理的研究模式應用方式，作概要的介紹。

(一) 基因缺陷(gene trapping)

將一段任意取得的 DNA 序列帶上篩選抗生素系列，然後將其導入 ESCs 的 DNA，讓這一段序列隨機插入 ESCs 的基因體中，再利用加入培養液中的抗生素來

篩選。具有外來插入 DNA 序列的 ESCs 因為有抵抗篩選抗生素的基因，得以存活下來，不具插入序列的 ESCs 則於篩選過程中死亡，如此就可以將外來基因導入 ESCs 中，之後將 ESCs 打到小鼠的囊胚，就可讓外來的基因貢獻於小鼠的基因體中。

基因缺陷的意義就是說，隨機插入的 DNA 序列可能會剛好插入某一段基因中，讓這段基因的功能因為這個無厘頭的序列加入而減少或甚至完全失去功能，如此，這個基因就被「陷」掉了。同樣的，如果隨機插入的基因插到啟動子或是促進子，則會導致啟動子被「陷」掉(promoter trapping)或是促進子被「陷」掉(enhancer trapping)。

用基因缺陷的方法，已經讓研究人員分離出許多和發育有關的基因，只要將插入的序列帶上標記，例如 GFP、LacZ，就可將被「陷到」的基因序列選殖出來，不過其缺點是必須製造出大量的小鼠，但結果僅篩選出少量的重要發育調控基因，因此，Bonaldo 等人曾就篩選技術加以改善，他們將被「陷」過的 ESCs 先拿來作特性分析，先看看分化能力有沒有受到影響，之後再將受到影響的 ESCs 引導入鼠胚中，再看看這些鼠胚於發育過程中的變化，且可針對特定的組織分離重要的調控基因。舉例來說，將被「陷」過的 ESCs 拿來促進心肌細胞的分化，或是針對特定分化階段可觀察到的特性來檢查，如果發現有異常，則由這一株被「陷」掉的 ESCs 中分離出調控心肌細胞分化的相關基因，成功率應該就很大了。

近年來的發展是結合生物資訊、利用電腦資訊處理 DNA 微陣列(DNA

microarray)和核酸原位雜交法(nucleic acid in situ hybridization)，其研究成果累積的速度相當驚人。舉例來說，最近有研究者建構出具有約兩千株已被「陷」過的小鼠胚幹細胞庫，用此分析和高血壓有關的基因，更有研究者開發出可針對活細胞偵測其是否已被「陷」過的技術，因此未來基因缺陷技術將會被更廣泛應用。

(二) 胚胎致死遺傳的體外研究模式

如前所述，改變 ESCs 的基因有時會導致胚胎死亡，因此才有所謂「狀況式」的基因修改模式，在特定條件之下，基因才會在特定的組織或是器官於特定的發育階段產生修改。使用鼠胚觀察「狀況式」的基因修改固然理想，但是如果其影響是在胚胎發育早期，有時候也可以用較為方便的研究材料來進行，利用 mESCs 當作突變致死的研究模式，不必用到鼠胚胎。

在性染色體上操作基因修改(經常是突變)，需要的祇是單一的基因打靶動作即可完成，例如針對 X 染色體上的某個基因，一次基因打靶即可操作完成。不過大部分的情況都是藉由 ESCs 的多次基因打靶，先打掉對偶基因的其中之一，再打掉另一對偶基因，或是先製造出打掉其中之一的小鼠($^{+/-}$, heterozygotes)，再藉由 $^{+/-} \times ^{+/-}$ 交配方式取得 $^{-/-}$ (同型分子, homozygotes)的小鼠，這樣的操作經常是要大費周章。簡易的做法是以 ESCs 來作為遺傳基因致死的模式，例如 Mitsui 等人曾於 2003 年於 Cell 期刊發表用 ESCs 為模式，探討 Nanog 維持小鼠上胚層和 ESCs 多能性的重要性，是一個典型的例子。

ESCs 於藥理學和胚胎毒理學上的應用

胚幹細胞的治療潛能已經被許多媒體廣泛討論過，然而其實以胚幹細胞作為開發新藥或是胚胎毒理研究上的應用也很有潛力。人類胚幹細胞在這個觀點上的應用，有三個重要的考慮，第一是體外的毒性測驗系統往往不足以反應體內的特定器官的毒性反應；第二，非人類的胚胎毒性試驗用來反應某些藥物對人類胚胎的效應，有時無法完全一致；第三，使用人類胚幹細胞來試驗藥物也可以減少實驗動物的消耗量。這邊所說的三個考慮是就長期而言，就短期來說，人類胚幹細胞可立即對醫學研究作出貢獻，不過，目前這方面的研究還是以小鼠胚幹細胞為主力。

第一個針對小鼠胚幹細胞的藥理實驗是探討藥物對胚幹細胞分化取得的心肌細胞的效應，也有研究者以心臟藥物探討不同分化階段的心肌細胞對這些藥物的反應，而且因為心肌細胞的收縮特性，也可以使用自動影像拍攝系統來篩選對心肌細胞有促進或抑制收縮的藥物。

就胚胎毒性試驗而言，胚幹細胞對造成畸型胎的藥物試驗特別重要，目前最有效致畸型的化合物之一就是視黃醛酸 (retinoic acid)，而 RA 早已被用於 EC 細胞分化為神經細胞的刺激藥物。RA 於不同 EB 時期，不同劑量給予的條件下，會影響 EB 中細胞分化，高濃度的 RA 於早期時加入，可促使 EB 細胞分化為神經細胞，低濃度於晚期給予則傾向往骨骼肌和心肌的分化方向走。

ESCs 也被應用於分析抗血管生成藥物的活性，Sauer 等人利用 ESCs 作材料，提供一個非常有名的致畸型藥物—莎麗豆邁（thalidomide）的毒理資訊，發現該藥物會抑制血管生成，導致四肢生長不全。

目前已有整套利用 ESCs 來作藥物試驗系統的建立，通稱 EST（embryonic stem test or ES cell test），因為 EST 系統耗費鉅大的人力物力，也有實驗室用流式細胞儀先將特定的已分化細胞分離出來再作測試，也可以使用基因體學或蛋白體學的方法，以 ESCs 為操作平台來測試藥物的毒性或是致畸型性。

早期利用基因打靶，透過 ESCs 製造的「敲掉基因的小鼠」經常被拿來當作研究人類疾病的動物模式，這樣的觀念是對的，但也可以說是錯的，因為接下來的研究往往證明基因和基因所處的環境因素兩者都很重要。小鼠的基因所處的環境與人的基因所處的環境有些是有大差異的，這樣的講法很抽象，舉例來說較容易瞭解：例如小鼠的纖維囊腫(cystic fibrosis)疾病模式是將相關的基因 CFTR 突變或是敲掉的結果，如果同樣的基因出現問題，在人類體內會於死亡前出現肺部病變，導致肺部積水而呼吸困難，但是同樣的 CFTR 在小鼠身上突變卻看不到肺部的病理現象，由上述的例子可見以小鼠的疾病來當作人類疾病的研究模式，有時不是那麼直接，正確的講法是有些是可以直接當作研究模式，但有些還要經過一些轉折。例如成功大學的吳昭良教授和中研院分生所的李鴻教授都曾經製造過人類疾病的小鼠研究模式，但是都是經過一些轉折（再處理），才得到類似人類疾病的病理現象，另外，我們也必需要知道，同樣的基因突變在人類身上會導

致疾病，但在小鼠身上往往沒事，反之亦然。

到目前為止，全世界約有 7000 隻以上的基因轉殖突變鼠，當然，並非所有的這些基因突變鼠都有用處，不過利用這些基因轉殖突變鼠真的帶給我們很大的知識突破，而這些新知可作為未來發展基因治療或是藥物治療的基礎。

人類胚幹細胞和小鼠胚幹細胞之差異和相似特性

人類胚幹細胞和小鼠胚幹細胞在許多文獻上都會由作者於討論上作比較，這是因為許多小鼠的研究成果最終還是想應用於人類，但是我們經常會發現在小鼠胚幹細胞的觀察或是研究成果，往往不適用於人類胚幹細胞，這是我們在閱讀文獻時要謹記在心的。我們現在舉一些例子來說明兩者的相似和相異之處。

小鼠因為遺傳上的背景知識已經被瞭解較多，且可操作其生殖，一向被用於哺乳類胚胎發育的研究，不過雖然小鼠胚胎很有用，早期人類的胚胎和小鼠胚胎發育有很大差異。例如，在基因表現的時間上就有顯著差別，胚胎自己本身的基因體啟動，小鼠是在兩個細胞期的中間期，人類的胚胎則在 4~8 個細胞期之間。其餘差異還包括胚胎外膜（包括胎盤）的形成，胚層於原腸形成時的安排，人類早期胚胎形成胚胎盤（embryonic disc），小鼠早期胚胎則形成卵黃柱（egg cylinder），因此，人胚和鼠胚的諸多差異還待我們去瞭解。

到目前為止，我們至少知道人類的胚幹細胞和小鼠的胚幹細胞分化過程中，其細胞表面抗原就是不一樣。人類的胚幹細胞會表現 SSEA-3 和 SSEA-4（階段特

異性抗原)，以及 TRA-1-60，TRA-1-81 和 GCTM2（皆為醣蛋白）。相對的，小鼠的內細胞團（ICM）和胚幹細胞則表現 SSEA-1，目前這個表面抗原尚未於人類胚幹細胞中被發現過。可以想見，在兩者在生化特性上更進一步分析之後，可讓吾人更加瞭解早期發育過程中的變化。

人類胚幹細胞和小鼠胚幹細胞另一個不同處在於對 LIF（血癌抑制因子）和 IL-6（第六型介白素）的反應不同。小鼠胚幹細胞以培養液中補充 LIF 或是其他可以活化 LIF 受體訊息傳遞的因子，例如 oncostatin M，CNF（ciliary neurotropic factor），或是用 IL-6 和 IL-6 受體，就可以維持其存活，其原理在於 LIF 和小鼠胚幹細胞上的 LIFB/gp130 異合受體結合後活化 JAK/Stat3 訊息路徑，促使 ES cell 再生，且抑制其分化，但是人類的 ES cell 對這個抑制分化的訊息傳遞路徑並不敏感（其它靈長類的 ES cell，例如恆河猴的 ES cell 也有相同特性），這種差異究竟是物種之間的差別，還是發育階段不同所造成，仍待繼續研究。

ES cell 既然能夠分化成各種細胞，當然就有人想利用它來作藥物開發，細胞治療或是引導基因進入體內的利用，為達到這些目的，有若干系統可以當作研究模式，不過，目前最有效的研究模式還是前面提到過的類胚胎體（EB）。如果把餵養的細胞去除或是培養液中不加入 LIF，那麼小鼠的 ES cell 會自動分化為一個球形的細胞團，稱為類胚胎體，而且 EB 的形成傾向很強，不管是用懸浮液，還是半固態的甲基纖維培養液來養，EB 都會自然生成。EB 形成和自然的胚胎發

育其實有某些相似之處，以小鼠 ES cell 而言用懸浮液培養 2~4 天後，就會有內胚層的細胞出現在 EB 的表現，這時被稱作「簡單型 EB」，如果再持續培養，會長出柱狀上皮細胞，具有基底膜，且形成中空球狀，被稱為「囊狀 EB」，更進一步培養後，中胚層細胞會被分化出來，且外胚層和內胚層的分化細胞種類也會增加。目前 EB 的研究模式被用以分化成分泌胰島素的 β 細胞、心肌細胞、神經細胞、內皮細胞、腸壁細胞、肝細胞、軟骨和生骨細胞、脂肪細胞和第二型的支氣管細胞等等，不過這種分化實驗並不能有 100% 再現性，想要分離特定的細胞可能尚有困難，不過儘管離實用很遠，這一類實驗不失為控制分化路徑的初步探討。上面說的是小鼠的 EB 研究模式，但是人類的 EB 研究模式目前狀況如何呢？人類的 EB 分化研究模式變化更大，更難掌握，常常無法由小鼠的 EB 分化研究結果類推到人類，所以我們要謹記在心的。

無論如何，人和鼠的 ES cell 仍然有許多相似之處。兩者皆以非常類似的方法分離，而且使用 MEFs（小鼠胚胎纖維母細胞）來維持其生長但不分化的培養方法幾乎完全相同。進一步而言，兩者皆有自發性分化的傾向，和其於正常發育中的胚胎體內的過渡性狀態類似，而且兩者也都表現多能性相關的轉錄因子 Oct-4，總括而言，兩者都可以生長成多能細胞，最後分化成各種各樣的細胞，顯出由其中之一研究所獲得知識很可能可以應用於另一種。

本章摘要

本章啟始於介紹胚幹細胞(ES cell)是由早期胚胎在囊胚內的內細胞團分離而來，並且介紹胚癌細胞 (EC cell)和畸型瘤細胞 (teratocarcinoma cell)以及原始生殖細胞(PGC)和胚胎生殖細胞(EG cell)，並且和胚幹細胞(ES cell)作比較。接下來介紹未分化的 ES cell 的特性，包括小鼠、人類、和其他物種的胚幹細胞株。讀者於閱讀這些介紹後，當可獲得這些細胞的基本概念，在閱讀相關文章時不易再有混淆。

之後介紹胚幹細胞基因操作的最基本概念，分為隨機基因轉殖和基因打靶，這兩種概念是以胚幹細胞製造基因轉殖鼠最常見的操作方式。接下來再介紹由胚幹細胞在體外培養系統下，可以分化為外胚層、中胚層、和內胚層細胞以及生殖細胞的發展概況，讀者於閱讀這些介紹後應該會發現胚幹細胞含蓋到全身上下所有的細胞，也可以見到其運用潛能是全面性的，而這也正胚幹細胞迷人之處。

最後我們介紹胚幹細胞在研究上的應用，以基因缺陷和胚胎致死遺傳兩個簡單例子來說明，讀者在之後的章節中會慢慢體會到其實這才是目前胚幹細胞最重要的應用。

參考資料

1. Cedar SH, Cooke JA, Luo Z, Patel MJ, Minger SL. From embryos to embryonic stem cells: biopolitics and therapeutic potential. *Reprod Biomed Online*. 3(5):725-31, 2006.
2. Damjanov I. The road from teratocarcinoma to human embryonic stem cells. *Stem cell review* 1(3):273-276, 2005.

3. Ko K and Scholer HR. Embryonic stem cells as a potential source of gametes. Seminar of Reproductive Medicine 24(5):322-329, 2006.
4. Suemori H. Establishment and therapeutic use of human embryonic stem cell lines. Human cell 19(2):65-70, 2006.
5. Taupin P. Derivation of embryonic stem cell for cell therapy. Medical Science Monitor 12(4) RA75-78, 2006.
6. Semb H. Human embryonic stem cells: origin, properties, and applications. APMIS 113(11-12), 743-750, 2005.