

第二章：人類胚幹細胞培養的新方法

人類的胚幹細胞(hESCs, human embryonic stem cells)是由 3 到 5 天的囊胚中的內細胞團(ICM, inner cell mass)分離培養而得，第一株人類的胚幹細胞株是由美國威斯康辛大學麥迪生分校的 Thomson 等人所分離，之後陸續有人類胚幹細胞被發表，截至 2006 年元月一日止，於美國 NIH 的 PubMed 資料庫中曾經有相關論文發表的 hESCs 有 163 株，至於尚未發表的，那就更多了。

人類胚幹細胞的特性已經於剛開始的章節介紹過了。基本上，其特性包括高核質比、明顯的核仁，且具有明顯的細胞株型態。人類的胚幹細胞與小鼠的胚幹細胞一樣，有高度的終端酶(telomerase)活性表現和特殊的表面標誌分子，例如 SSEA4、Tra-1-60、Tra-1-81，不過和小鼠胚幹細胞不同的是沒有 SSEA-1 的表現。此外，人類胚幹細胞也高度表現 POU、Oct-4 和 Nanog。在適當培養條件下，人類的胚幹細胞會持續增殖，且在體外和體內系統中皆有分化成三胚層細胞的能力，這在類胚胎體(EB)的相關實驗中有很充分的證明，另有一些證據來自於將胚幹細胞注射進入 SCID 小鼠而形成畸型瘤的實驗結果，SCID 小鼠因為嚴重的複合性的免疫缺陷，可容許胚幹細胞生長，因此可作為一種研究模式，而這一類的研究模式在未來的藥物發展、毒性試驗及再生醫學研究中皆扮演重要角色。

在分離人類的胚胎幹細胞時，所用的培養技術和小鼠的胚胎幹細胞很相似，不過研究人員很快就發現小鼠胚幹細胞可以不用餵養細胞培養，只要培養液中加入 LIF(Leukemia inhibitory factor)即可，但是同樣的方法不適用於人類胚幹細胞，因為 LIF 所活化的 STAT3/gp130 訊息傳遞並不足以讓人類胚幹細胞保存自

我更新的能力，也因此，人類的胚幹細胞大都由餵養細胞來支持，不過這樣的培養技術難免會有小鼠胚胎纖維母細胞(作為餵養細胞)帶來的污染危險，雖然 Amit 及其同事於 2005 年發表並沒有人類胚幹細胞受污染的證據，特別是餵養細胞帶來的病毒污染目前尚未發現，不過同樣的 2005 年也有 Martin 及同事發表人類胚幹細胞受到小鼠基因感染的報告，因此展望未來，如果人類胚幹細胞想應用於臨床疾病治療，防止污染是必需開發的技術。

有沒有其他的餵養細胞？

既然小鼠胚胎纖維母細胞(MEFs)有污染之疑慮，取用其他餵養細胞可能是較佳的選擇，因此，於 2002~2005 年中，有 20 餘株細胞株被開發用以作為人類胚幹細胞的餵養細胞。例如 STO 是一株小鼠胚胎纖維母細胞，於 2004 年被開發出，其相對於 MEFs 的優勢是其為不死細胞株，因此容易複製取得。將人類胚幹細胞培養於 STO 細胞上和於培養 MEFs 一樣，生長狀態類似，表現的表現抗原類似，且長期培養不會導致染色體異常。不過 Xu 等人於 2004 年發現以 STO 細胞處理過的細胞培養液會增加胚幹細胞的分化比率，因此 STO 細胞大概僅能作為降低準備 MEFs 工作量的暫時取代物，而不能完全取代 MEFs。

爲了完全去除用小鼠細胞作為餵養細胞所帶來的可能感染危機，Hovatta 等人於 2003 年用新生兒的人類皮膚纖維母細胞來分離胚幹細胞，並獲得相當成功。使用該細胞已成功維持人類胚幹細胞 9 個月之久，並且維持其應有特性，包

括正常的染色體分析結果，正常的表現標誌分子及維持植入 SCID 鼠會長出畸型瘤的能力，最重要的是，它是由人類細胞得來的而非小鼠細胞。另外，Richards 等人曾比較各種細胞餵養 hESCs 的結果，發現胎兒的皮膚細胞和成年的輸卵管上皮細胞皆能支持分化的人類胚幹細胞達 20 個繼代。這些餵養細胞是由人的血清代替胎牛血清來培養的，不過後來的研究發現以人的血清培養 10 個繼代胚幹細胞後，會使其逐漸分化，因此後來的實驗在血清部份改為用 KSR (knockout serum replacer) 或是 FBS (fetal bovine serum)。

另一個可能的餵養細胞來源是從成年人的骨髓，這是因為成年人的骨髓本身就是許多不同種類幹細胞的來源，因此骨髓提供優良的微環境，維持幹細胞處於不分化的狀態。Cheng 等人就於 2003 年發表過以人類骨髓的實質細胞培養人類胚幹細胞的結果，hESC 以實質細胞餵養可以達 9 代之久。

以人類的細胞來作餵養細胞可能最重要的理由是人類的細胞不會刺激過多的免疫反應，這樣將可避免以後臨床應用時免疫排斥的問題，因為就算把餵養細胞連同胚幹細胞移植入人體，也比將小鼠細胞植入人體要好，不過人類的細胞當然還是有感染的危險，而且目前的結果只能讓骨髓實質細胞支持到第 6 代，之後要再重新分離新的骨髓實質細胞，這樣會增加很多工作量，於長期培養人類胚幹細胞時較不具有優勢。

最近 Stojkovic 等人於 2005 年發表一株很好玩的餵養細胞，是由人類胚幹細胞分化而來的，實驗結果顯示可支持人類胚幹細胞達 44 個繼代，且以此細胞

處理過的培養液和 Matrigel 同時使用，可以支持人類胚幹細胞約 12~14 個繼代，這表示可能可以為個別的 hESC 細胞株量身定做其餵養細胞，沒有外來物的危險，而且不像是小鼠胚胎纖維母細胞(MEFs)，僅能在 4 到 6 個繼代內使用，常常要重新由小鼠胚胎分離新的細胞株。

儘管目前已有許多餵養細胞供選擇，但是除了污染的危機以外，餵養細胞本身的穩定性是一個大問題，因此有許多研究者試著嘗試非餵養細胞的系統來培養胚幹細胞，以下我們就對非餵養細胞的系統簡要介紹。

非餵養細胞的培養系統

雖然 MEFs 用於餵養 hESCs 已行之有年，但為什麼它能夠支持 hESCs 呢？其原因並不全然清楚。基於前面提到過的原因，有許多研究者正在開發非餵養細胞的培養系統。一般認為非餵養細胞的培養系統首要考量是在培養液中加入那些生長因子，並且需要培養於什麼樣的細胞外基質(ECM, Extracellular Matrix)較合適。細胞外基質以 Matrigel 最先被使用，Matrigel 其實是商品名，由 Kleinman 等人於 1982 年於 Engelbrth-Holm-Swarm 腫瘤中分離出來，其成分大部份為 laminin 和 collagen，因此也有研究者直接以 laminin 和 collagen 當作培養胚幹細胞的基質，預防 Matrigel 批號不同時成分稍有改變的可能困擾。至於培養液方面，有使用 MEFs 處理過的培養液，也有加入特定生長因子於培養液中的方法，現就這兩個方法分別介紹如下。

(一) 以 MEFs 處理過的培養液(MEFs-conditioned medium)

目前已有一些處理過的培養液被嘗試使用於支持 hESCs。Xu 等人於 2001 年發表比較數種細胞外基質對 hESCs 的影響，包括 Matrigel、laminin、fibronectin、collagen IV 合併用於 MEFs 處理過的培養液。結果他們發現以 gelatin 為基質時，細胞存活率不佳，但分化很快速(以維持 hESCs 為目標作培養，分化其實是不佳的結果)，反之，以 laminin 和 Matrigel 可以支持 hESCs 的培養，另外以其他細胞株(例如 STO 細胞)處理過的培養液並不能支持 hESCs，同樣的，以 MEFs 處理過的培養液也無法支持 hESCs。

Xu 等人的論文發表後，有很多進一步的實驗測試使用人類的餵養細胞來處理培養液使其適當化，例如有由一種人類胚幹細胞分化出的纖維母細胞，命名為 HEF1，經由反轉錄病毒感染 TERT(人類染色體終端反轉錄酶)使其為不朽細胞株後，被用來處理培養液，結果被發現可支持 H7 和 H9(WA07 和 WA09)這兩株 hESCs 於 matrigel 上生長，而且於 13 個繼代培養後，這些胚幹細胞還維持相關的表面抗原表現，且染色體穩定，因此利用這樣的培養系統可排除非人類細胞所帶來的污染，同時又可省去準備初始培養細胞的負擔，可謂一舉兩得，唯一的缺點可能是以細胞來處理培養液，其中所含的生長因子種類和數量是未知的，因此個別差異是難以避免的。

(二) 確定成份的培養液

用餵養細胞處理後的培養液固然很好，但是有沒有可完全不使用餵養細胞的

培養方法呢？答案是有的，而且有些最近開發的技術甚至不使用 Matrigel。因為人類的胚幹細胞會表現各種生長因子的受體，包括 bFGF、SCF、Flt3L 等等，Xu 和 Rosler 等人曾試著加入這些生長因子，將 hESCs 培養於 Matrigel 上，發現 40ng/ml 的 bFGF 就可以維持胚幹細胞 15 個繼代，並且其胚幹細胞的特性不變。其後 Xu 和 Peck 等人又發現其實 MEFs 處理過的培養液會使 BMP 的訊息傳遞活性下降，因此，他們利用 BMP 的拮抗物 Noggin(500ng/ml)和 bFGF(40ng/ml)，將兩者加入於培養液中，發現可以將數株 hESCs 維持於 Matrigel 上而不分化。

另外在美國 NIH 的幹細胞實驗室，Mallon 等研究者曾嘗試過用 40ng/ml 的 bFGF 將兩株 hESCs(TE03 和 UC06)培養於 Matrigel 上，結果狀況良好，Oct-4、Nanog、SSEA4 皆於這些細胞高度表現，並且 SSEA1 呈低度表現，表示這些細胞仍然處於未分化的狀態。

另外一個可以改善的地方可能是使用 Matrigel 以外的基質，主要是因為 Matrigel 含未知因子及由小鼠細胞而來，因此也有人想用來源於人類細胞的基質來替代 Matrigel。Amit 等人於 2004 年就報告使用人類的 fibronectin 為基質的培養盤，再加上 15%的血清替代品，以及 TGF β 1、LIF、bFGF，並且成功地維持 I3、I6 和 H9 人類胚幹細胞的生長達到 50 個繼代。Beattie 等人也使用類似的方法，他們將 hESCs 養於 laminin 上，並加入 activin A、nicotinamide 和 KGF，可以維持超過 20 個繼代。Activin 似乎可以抑制分化，因為在這個培養系統上如果刪除掉 activin，hESCs 就會出現分化現象，但是其他因子刪去則不

受影響。

使用確定性成分的培養液無疑會使各種實驗較容易控制，標準化的結果使得再現性增加，上述的各種確定成份培養液也提供了維持胚幹細胞自我更新和維持其多能性的一些重要訊息傳遞路徑的相關知識。這使得日後不必使用大量生長因子來維持胚幹細胞，只要針對特定訊息路徑來調控即可，增加大量培養的可能性。無疑的，從大量培養的觀點來思考，使用確定成份的培養液成功的機會較大。

改變基質的 hESCs 維持系統

上面所述皆在討論是否要使用餵養細胞，餵養細胞的種類，以及是否使用經餵養細胞處理過的培養液，或者是確定成份的培養液。其實還是有其他改善 hESCs 的培養系統的方法，那就是改善細胞外基質。

Kilmanskaya 等人於 2005 年報告以 MEFs 取得的細胞外基質，發展出無血清、無餵養細胞的培養系統，經測試可以支持 hESCs 生長而且沒有分化現象發生。最近的文獻顯示針對細胞外基質改變的培養方法增加很多，包括使用人工合成的 3-D 細胞外基質來培養，不過大部份的人工細胞外基質都有誘導分化的疑慮，儘管如此還是有比較成功的例子，例如有一種稱作 UltraWeb 的人工細胞外基質用來培養小鼠的胚幹細胞效果還不錯。我們可以想見，假如人工細胞外基質可以成功的話，其變異性可以獲得充分解決，希望細胞外基質用來複製人胚幹細胞真的可以成功。

結論

我們可以由近年來的胚幹細胞培養系統的發展看出現在有很大的研究能量投入於這個領域，為什麼呢？胚幹細胞要能夠應用於臨床的先決條件包括大量的，無污染，穩定，標準化，不會刺激分化，且長期培養後染色體保持穩定狀況，這些都是必備條件，目前的培養系統快速發展將會為未來的各種藥物測試及再生醫學研究鋪路，而這些努力將是必需的，也是值得的。

參考資料

1. Draper JS and Nagy A. Improved embryonic stem cell technologies. *Handb Experimental Pharmacology* 178:107-128, 2007.
2. Amit M and Itskovitz-Eldor J. Sources, derivation, and culture of human embryonic stem cells. *Seminars of Reproductive Medicine* 24(5):298-303, 2006.
3. Turksen K and Troy TC. Human embryonic stem cells: isolation, maintenance, and differentiation. *Methods in Molecular Biology* 331: 1-12, 2006.
4. Oh SK and Choo AB. Human embryonic stem cells: technological challenges towards therapy. *Clinical Experimental Pharmacology and Physiology*

33(56):489-495, 2006.