

第七章：胚幹細胞分化為心肌細胞

前言

心臟衰竭經常有的特性是失去具有功能的心肌細胞，但心肌細胞是分化完全的細胞，再生能力很有限。心臟移植是現行治療心臟衰竭的最後一招，但因捐贈器官有限，受惠患者不多，因此，發展新的治療技術，例如細胞治療就變得格外必要，可用體外培養出的心肌細胞植入心肌梗塞受損區域，使其回復正常功能。

心臟細胞治療的材料從何而來呢？胚幹細胞可能是一個重要來源，因為胚幹細胞可以分化成各種細胞，包括心肌細胞。目前而言大部分有關胚幹細胞分化為心肌細胞的實驗都是針對小鼠，但相同的技術也逐漸應用於人類胚幹細胞，假如大量使用胚幹細胞來促使其分化為心肌細胞，則心臟的細胞治療將能實現。不過同樣的，也有諸如是否會癌化，是否能夠排除免疫相容問題，是否符合倫理規範等問題需要釐清。

體外培養心肌細胞的來源

以小鼠的模式而言，從體外取得心肌細胞的可能來源是胚幹細胞(ES)或是胚胎生殖細胞株(EG)，胚幹細胞由囊胚的內細胞團培養取得，胚胎生殖細胞由原始的生殖細胞(PGC, primordial germ cell)取得，兩者皆有分化成三個胚層細胞的能力。另有一種細胞是EC cells (embryonic carcinoma)，是由自然長出的生殖細胞瘤分離出的，也有由上胚層取出後，植入子宮外的組織而得到的

EC cell 瘤，但是 EC cell 其分化能力較 ES 或是 EG 細胞差，其較好的優勢是容易培養，EC 一般不需要餵養細胞，但 ES 或 EG 細胞的培養條件需要就很高。

就人的模式而言，ES、EC、EG cells 都有被分離出來，但是僅有 ES cell 具有較廣泛分化的能力，而且人類胚幹細胞表現的標誌分子和小鼠的胚幹細胞有些微差異，例如 TRA-1-60、TRA-1-81、GCTM-2 以及階段特異性抗原 SSEA3、SSEA-4，這些是小鼠胚幹細胞不表現的。

就培養的技術層面而言，人和鼠的胚幹細胞有些差異。和培養小鼠胚幹細胞一樣，人類胚幹細胞也需要餵養細胞來支持其生長，同時也需要特定的培養液，培養液中有血清和 bFGF，有時也用無添加血清的培養液，不過和小鼠胚幹細胞不同的是人類胚幹細胞不需要 LIF，且細胞生長速度較慢，小鼠胚幹細胞長成雙倍時間需要 8~15 小時，人類胚幹細胞則要 25~30 小時，而且一般認為以酵素分散小鼠胚胎幹細胞不會有太大問題，但同樣操作用於分散人類胚幹細胞會造成染色體異常，因此通常人類胚幹細胞的次培養建議以機械方式，而非酵素方式分散細胞。

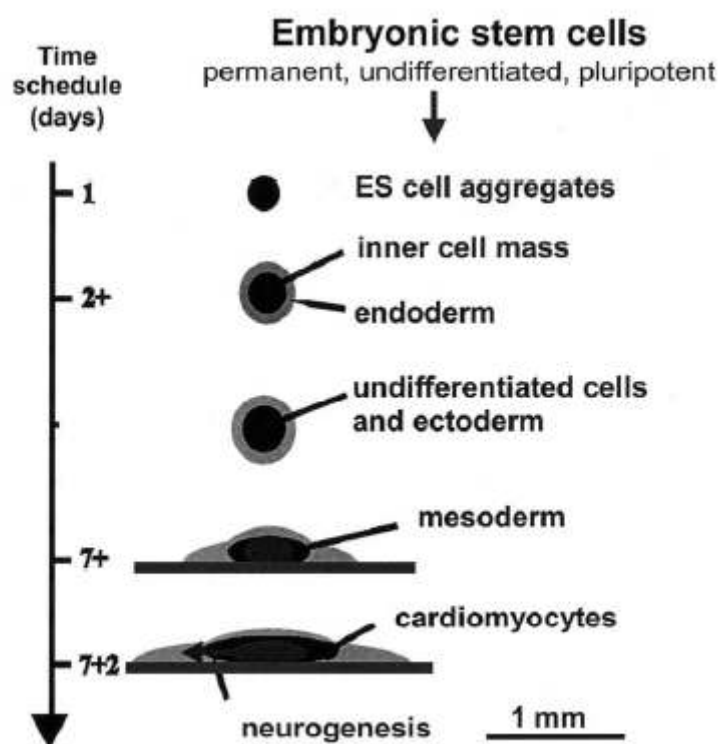
用胚幹細胞分化為心肌細胞之研究現況

(一) 將小鼠胚幹細胞分化為心肌細胞之現況

早在 1985 年 Doetschman 等人將小鼠的胚幹細胞培養於懸浮培養液後，就發現它們會形成類胚胎體 (EB) 細胞團塊，而且這些團塊生成似乎是胚幹細胞開啟

分化過程所必需的動作，胚幹細胞於形成類胚胎體之後，即會分化為三個胚層的細胞(參考圖 7-1)。心肌細胞的分化也依循這個過程，而且可利用添加物或是物理方法促進其分化。在類胚胎體中，心肌細胞會於較外面的黏膜上皮和較中心的實質細胞中間被分化出來，通常於開始培養後 1~4 天內，就可見到很有趣的細胞收縮的現象，且持續培養下可觀察收縮約一個月之久，等到心肌細胞分化完全後會停止收縮，但可存活約 3 個月。

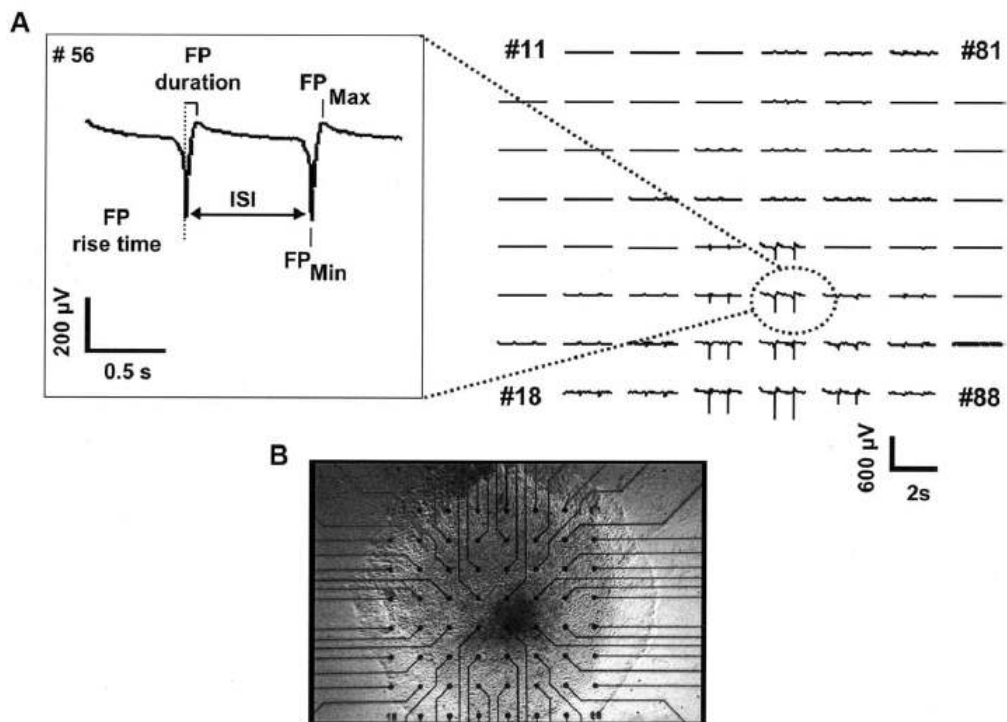
圖 7-1: 胚幹細胞於分化形成心肌細胞的過程包含類胚胎體之形成以及分化為三個胚層的細胞的過程



資料來源: Hescheler J, Halbach M, Egert U, Lu ZJ, Bohlen H, Fleischmann BK, Reppel M. Determination of electrical properties of ES cell-derived cardiomyocytes using MEAs. J Electrocardiol. 37 Suppl:110-6, 2004.

胚幹細胞分化出的心肌細胞特性為何？其實已經有很多相關的研究，比如說這種分化出的心肌細胞皆具有原始的心肌細胞特性，和發育中的心肌細胞特性很相似，且在分化較完全的狀況下，其電生理特性和心房、心室、室房結很類似(參考圖 7-2)，分子特性也相似。比如說用 RT-PCR 可偵測到 GATA-4 和 Nkx2.5，及心肌特異性基因，包括 Cardiac troponin I 和 T，和心房輕鍵蛋白 (Ventricular myosin light chains MLCs)，而且肌纖維和肌節的排列會隨著分化程度益加成熟，和正常的心肌發育過程很相像，最重要的是，分化完全的心肌細胞會對 β -adrenergic 刺激作出反應，且細胞之間有功能性的 gap junctions 出現，且收縮有時間節律上的調控，並具有多核細胞生成，這些特性都和 in vivo 的心肌細胞分化一樣。

圖 7-1: 胚幹細胞分化出的心肌細胞電生理特性和心房、心室、室房結類似



資料來源: Hescheler J, Halbach M, Egert U, Lu ZJ, Bohlen H, Fleischmann BK, Reppel M. Determination of electrical properties of ES cell-derived cardiomyocytes using MEAs. J Electrocardiol. 37 Suppl:110-6, 2004.

(二) 將人類胚幹細胞分化為心肌細胞的現況

早在 1998 年，威斯康新大學 Thomson 的研究團隊將人類胚幹細胞分離出後，就開啟了將其於 *in vitro* 狀況下分化為心肌細胞的可能性。將人類胚幹細胞培養後會自然形成類胚胎體，也可以將人類胚幹細胞和小鼠的 END-2 細胞共同培養，也可得到類胚胎體，不過目前的分化效率相當低，低到考慮用以作人體治療的可行性幾乎不可能。

不過，就人類胚幹細胞分化出的心肌細胞特性加以分析，其收縮能力、分子特性、電生理特性和細胞型態皆顯示出其為真正的心肌細胞。這些細胞通常每分鐘收縮 30~130 次，且和控制心搏的藥理特性符合。人類胚幹細胞分化出的心肌細胞的電生理特性也和心房、心室和房室結細胞相同，有些報告指出約有 85% 的分化細胞和心室肌細胞相似。

和小鼠胚幹細胞的分化相比，人類胚幹細胞分化為心肌細胞的效率及速度皆較慢，且功能性分化也較差，不過這個差別並不令人意外，只要想到說兩種物種發育所需時間差別很大就不難理解。正常的人胚胎心臟於受精後 35 天完成，小鼠胚胎心臟則於 12 天內完成發育，因此胚幹細胞的分化的差異可能來自於物種

的不同，當然，也有可能來自於細胞株不同，或者是培養及誘導分化的狀況不一樣。如何讓人類胚幹細胞分化為心肌細胞的效率或速度可以提昇呢？有人建議加入生長因子，或是於分化過程中增加細胞的機械負荷來改善，也有人提倡將本來平面的培養方式改為 3-D 培養，我們可由這些基本的問題的提出發現到，其實將人類胚幹細胞分化為心肌細胞的研究領域目前尚屬於起始階段，可開發作進一步探討的問題相當多。

於體外培養狀況下將人類胚幹細胞分化為心肌細胞的調控因子

很顯然的，由於人類胚幹細胞分化成心肌細胞的效率非常有限，如何提高效率的研究乃是當務之急，問題是究竟有那些因子參與分化成心肌細胞過程的調控呢？

使用含血清的培養液，因為血清本身就有生長因子和細胞激素，會使這種研究複雜化，因此有些研究者使用不含血清的培養液來作實驗，結果發現了一些重要的調控因子(參考圖 7-3)，比如說使用不含血清培養液加上 insulin 和 transferrin，結果會促進分化，使心肌特異性的 α -MHC 和 β -MHC 表現增加為原來的 6 倍，也有研究者用添加 PDGF-BB 和 SPP 的方法增加收縮細胞的數目，效果顯著。

以下再針對幾個已經較清楚的調控因子分述如下：

(一) BMP (Bone Morphogenic Protein): BMP 訊息傳遞於脊椎動物中會促進心肌細胞生成，且是體外培養長成中胚層細胞和心肌細胞所必需的。TGF- β 和 BMP 會使心肌特定基因表現出來，比如說 NKx2-5 和 MEF2C 以及 Brachyury。EB 加入 TGF- β 和 BMP 也會顯著增加及收縮細胞及肌纖維蛋白的表現，於體外培養的狀況下，如將 TGF- β /BMP 阻斷掉，則胚幹細胞分化為心肌細胞也會受阻，可見其重要性。

(二) LIF (Leukeunia Inhibitory Factor): LIF 是 IL-6 細胞激素家族的成員之一，和造血、神經外胚層生成、骨頭發育、幹細胞自我更新以及急性發炎有關。後來的研究也發現和人類胚幹細胞的心肌細胞分化有關，而且是負面的作用。研究顯示，胚幹細胞如果沒有 LIF，都給穩定地形成具有分化成心肌細胞的 EB，但是如果在培養的前面 4 天有 LIF 存在，中胚層細胞的生成會受到抑制，心肌細胞是中胚層來源，因此也會抑制心肌細胞的分化；相反的，如果在前 4 天過後再加入 LIF，則作用剛好相反，反而會促進心肌細胞分化，另外，不同劑量的 LIF 也會導致不同效應，低劑量的 LIF 於 LIF 缺乏或 LIF 受體缺乏的胚幹細胞會讓本來不會有心肌分化作用的細胞可以進行分化，但高劑量則會減緩分化作用。

(三) RA (retinoic acid) 視黃醛酸和 DMSO (dimethylsulfoxide): RA 和 DMSO

是廣受瞭解可以促進心肌細胞分化的化合物，而且其作用和 LIF 很像，也有一個特定作用時間期，如果於 EB 形成的前 5 天加入 RA，則有抑制作用，但是 5 天之後再加入，則有促進作用。RA 的作用主要是針對心室的細胞，特別是高血清濃度的培養狀況下，這是很有趣的現象。不過吊詭的是在低血清的狀況下，完全去除 RA 也會促進心肌細胞分化，因此結論是 RA 會影響心肌細胞的分化，而且具有特定的時間效應和劑量效應。

(四) Cripto-1 : Cripto-1 包含 EGF 的分子結構特性，是小鼠胚層形成和前後軸生成的重要調控因子，在胚胎發育這兩個動作之後，Cripto-1 的表現就主要存於中胚層細胞。在小鼠胚幹細胞中，Cripto-1 的 RNA 含量豐富，但失去 Cripto-1 的表現又似乎不影響小鼠胚幹細胞的分化，然而 Cripto-1^{-/-}的小鼠胚幹細胞會失去分化為具有收縮能力的心肌細胞，儘管其餘重要的基因，像 NKx2.5、GATA-4 和 MEF2C 都還有表現，因此 Cripto-1 的角色有待進一步評估。

(五) Kappa opioid receptor : Kappa opioid receptor 和心肌分化有關，而且是促進的。實驗上，用其刺激藥物會促使 GATA-4 和 NKx2.5 的活性增加，使胚幹細胞往心肌細胞的方向分化，目前被認為是由 Kappa opioid receptor 啟動 GATA-4 和 NKx2.5 之後在活化細胞內 protein kinase (PKC)，促使胚幹細胞分化為心肌細胞。這個活化路徑目前被認為是最主要的路徑。

(一)Rb 和 LEK1：Rb 和 LEK1 的結合會活化心肌細胞的分化路徑，在 Rb 缺陷的心肌細胞，其收縮活性會延遲，且重要的分化因子像 GATA、MEF2、NKx2.5 的表現會下降，顯示出 Rb 和 LEK1 在早期心肌細胞分化的重要性。

上述的研究是以和心肌細胞分化有關的調控因子為主軸的研究方向，另有一種方式是直接篩選會促使胚幹細胞分化為心肌細胞的藥物，其方法是將和心肌細胞分化直接相關的基因，例如 GATA-4 和 NKx2.5 帶上綠色螢光蛋白（EGFP），然後將欲篩選的藥物加入胚幹細胞中，如此只要促使心肌細胞的藥物就可以讓綠色螢光顯著出來，目前使用此方法篩選出的藥物包含有 ascorbic acid、cardiogenol A-D。

儘管有上述的一些調控因子被發現，不過上述的實驗都是以小鼠的胚幹細胞為材料，有研究者將 DMSO、RA 或是 BMP-2 應用於人類胚幹細胞但效果不彰，目前原因仍在探討中。

使用胚幹細胞治療心臟病的研究現況

心臟病的最終治療方法是什麼？目前可以想的大概就是心臟移植，不過捐贈移植器官的人畢竟有限，僅有少數患者受惠，因此發展新的治療方法是絕對必需的，細胞治療就是最新的嘗試。

第一個證明使用胚幹細胞可以治療心臟病的報告來自逾 1996 年，由 Loren

Field 的研究團隊所發表的結果，這個結果證實理論上的可行性，但是於實驗上產生 100% 的單純且穩定的心肌細胞則尚未成功，離臨床應用仍待相當大的進展。之後陸續有許多技術上的報告，比如說 Kehat 及同事的研究指出人的胚胎幹細胞分化出的心肌細胞可在培養狀況下和大白鼠的心肌細胞相連結，並形成電生理及機械上的功能連結，另外一個 Xue 和同事們所提的報告，胚幹細胞於體內和體外狀況下分化成的心肌細胞皆能和原來的心肌細胞作功能性的連結，並具有規律的收縮活性。

未來要能實際應用這些胚幹細胞培養分化得到的心肌細胞可能得通過許多挑戰，要治療心臟病需要大量的心肌細胞，因此現在實際上僅限於實驗室的分化規模需要加以擴充，另外，如何運送這些細胞？如何預防排斥作用？是否會有癌化細胞形成於其中？是否有分化不完全的問題？都是需要加以解決的。

胚幹細胞以外的幹細胞治療心臟病的可能

上面所說的都是由胚幹細胞提供心肌細胞來源，有許多困境待突破，但同時也有許多潛能，現在我們想問的是——難道除了胚幹細胞外，沒有其他幹細胞來源可以用作心臟疾病的細胞治療嗎？

答案是有的！目前較被看好的有兩大來源，一是骨髓幹細胞，另一種是心臟本身存在的心臟組織幹細胞，他們現在的研究狀況如何呢？以下我們分開來討論。

(一) 骨髓幹細胞作為心肌細胞之來源

Friedenstein 於 1966 年首先發現骨髓中有基質幹細胞(MSC)，並將之命名為骨髓生成前驅細胞。之後基質幹細胞被發現約佔骨髓有核細胞的 0.001%~0.01%，比造血幹細胞少得多，當時一般相信骨髓基質幹細胞(BM-MSCs)是生骨母細胞、軟骨母細胞、脂肪細胞及結締組織的幹細胞，不過近年來的研究證明骨髓基質幹細胞也可以於體內和體外環境下分化為神經、骨骼肌和心肌細胞。

骨髓基質幹細胞存在於骨髓實質細胞，很容易可和血液細胞於培養盤中分離出。最近的螢光活化細胞分離術(FACS)經常被用於分離造血幹細胞，也可應用於分離骨髓基質幹細胞，使這類型的實驗變得更容易處理。不過，利用這些細胞於臨床上，還有一大段路要走。大約有三個項目需要突破。第一，骨髓基質幹細胞的特異標誌蛋白目前還缺乏，而這會影響分化後或分化前的分離，如果沒有完善的分離方法，則要應用於臨床自然困難重重。第二，是缺乏體外培養大量擴充的技術，小鼠的骨髓基質幹細胞大量培養似乎還可以，但人的骨髓基質幹細胞大量培養技術則仍有待開發。第三，是如何利用特定的培養方法使其完全分化為心肌細胞，目前也仍在努力當中，而如果不用加入特定生長因子的方式促進其分化為心肌細胞，則骨髓基質幹細胞自然的傾向是從骨髓細胞的方向走，這也是有待突破的。

(二)自然存在於心臟內的心組織幹細胞(cardiac tissue stem cell)作為心肌細胞之來源

在 2001 年時，Beltrami 及其同事分析某個心肌梗塞的心臟組織時，意外發現該人類的心臟組織也有細胞分裂的現象，這個發現讓許多研究人員聯想到成年人的心臟是否也有幹細胞存在，在心肌受損時，擔負起修補的任務。不過這個假設爭議很大，有許多研究者認為是循環的骨髓細胞存於心臟內作細胞分裂，也有人認為是血中的幹細胞轉分化、或是血中的幹細胞和心肌細胞融合後，再進行細胞分裂。也有另一派假說認為是內皮幹細胞(endothelial stem cell)於心臟中作細胞分裂，不過這些爭議目前都尚未有定論。理論上，幹細胞存在於許多器官中，用以修補受損，這是廣被接受的概念。不過這個概念可否用於心臟這個器官，目前還不清楚。另外，也有學者指出有一部分移入心臟的神經嵴細胞(神經外胚層衍生的一群細胞，於正常發育過程中會形成色素細胞和周邊神經)，仍保留有幹細胞的特性，因此給這些細胞命名為「神經嵴幹細胞」。目前的理論是這些神經嵴幹細胞移入心臟後，仍保留幹細胞的特性，於適當的刺激後，他們有能力分化為神經、或是神經膠細胞、或是肌肉細胞。

儘管有上述的爭議，目前一般仍認為心臟自己本身也有幹細胞存在，若能啟動其自己的幹細胞族群，不管是單一族群或是複合族群，在概念上而言，不失為治療心臟疾病的良方。或許我們可以說用胚幹細胞分化為心肌細胞可能不是唯一最有希望的方式，至少到目前為止是如此。

參考資料

1. Hescheler J, Halbach M, Egert U, Lu ZJ, Bohlen H, Fleischmann BK, Reppel M. Determination of electrical properties of ES cell-derived cardiomyocytes using MEAs. *J Electrocardiol.* 2004;37 Suppl:110-6. Review.
2. Bettioli E, Clement S, Krause KH, Jaconi ME. Embryonic and adult stem cell-derived cardiomyocytes: lessons from in vitro models. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2006;157:1-30. Review.
3. Garry DJ, Olson EN. A common progenitor at the heart of development. *Cell.* 2006 Dec 15;127(6):1101-4. Review.
4. van Laake LW, Hassink R, Doevendans PA, Mummery C. Heart repair and stem cells. *J Physiol.* 2006 Dec 1;577(Pt 2):467-78. Epub 2006 Sep 28. Review.
5. Wei H, Juhasz O, Li J, Tarasova YS, Boheler KR. Embryonic stem cells and cardiomyocyte differentiation: phenotypic and molecular analyses. *J Cell Mol Med.* 2005 Oct-Dec;9(4):804-17. Review.
6. Pasumarthi KB, Field LJ. Cardiomyocyte enrichment in differentiating ES cell cultures: strategies and applications. *Methods Mol Biol.* 2002;185:157-68. Review.