

豬胚幹細胞無血清培養系統之建立⁽¹⁾

楊鎮榮⁽²⁾⁽⁵⁾ 林鈺婷⁽²⁾ 謝伊琳⁽²⁾ 陳立人⁽²⁾⁽³⁾ 徐怡強⁽⁴⁾

收件日期：100 年 9 月 25 日；接受日期：101 年 1 月 10 日

摘要

本試驗之目的在探討無血清培養系統對豬胚幹細胞體外增生、群落形成效率、未分化狀態之維持、細胞毒性、分化多能性與細胞凋亡之影響，期建立穩定的無血清體外培養系統，做為胚幹細胞培養之用。本試驗以含有 16% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 之幹細胞培養液為對照組，試驗組則為無 FBS 或血清替代物 (serum replacement, SR) 的培養系統中，配合添加鹼性纖維母細胞生長因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 與轉化生長因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)，探討無血清培養系統對豬胚幹細胞生長之影響。試驗結果顯示：在無 FBS 或 SR 的培養系統中，添加 bFGF 與 TGF- $\beta 1$ 等生長因子，雖然生長曲線、群落形成與維持分化之效率，與對照組添加相較下並無促進增生與維持群落形成之效果，然添加 bFGF 與 TGF- $\beta 1$ 生長因子後，對於培養時並未對豬胚幹細胞產生 LDH 細胞毒性；以分化多能性抗體 Oct-4、AP、SSEA-3、SSEA-4、TRA 1-60 與 TRA 1-81 進行染色，顯示在添加生長因子 bFGF 與 TGF- $\beta 1$ 組均具陽性反應，故添加生長因子可維持豬胚幹細胞之分化多能性。利用流式細胞分析儀進行分析，發現添加 bFGF 與 TGF- $\beta 1$ 生長因子 24、36 與 48 h 後，豬胚幹細胞未出現細胞凋亡現象，因此在細胞毒性、分化多能性與細胞凋亡等特性上，則與添加 16% FBS 培養系統無顯著之差異 ($P < 0.05$)。基於上述結果，建議此一添加生長因子 bFGF 與 TGF- $\beta 1$ 之無血清培養系統，可作為未來豬胚幹細胞無血清培養之參考。

關鍵詞：豬胚幹細胞、無血清、生長因子、體外培養。

緒言

哺乳動物的胚幹細胞 (embryonic stem cells, ESCs) 為具有長期增殖能力，以及能夠進一步分化成為具有特定形態與生理功能之成體細胞，由於幹細胞具有分化為成體細胞的分化多能性 (pluripotency) 及分化可塑性 (plasticity)，因此除可作為探討胚胎發育之優良材料外，更可於適當的條件下誘導分化成其他胚層的細胞，以修復或重建生理功能，故可應用於再生醫學、癌症醫學、醫療性複製等相關領域的研究 (Reubinoff *et al.*, 2000; Schuldiner *et al.*, 2000)，且因為此一分化多能性，未來在細胞替代療法 (cell replacement therapy) 與生物醫學工程方面的應用，提供了一個極具價值的細胞來源。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1726 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 私立南台科技大學生物技術研究所。

(4) 私立長榮大學醫學研究所。

(5) 通訊作者，E-mail: jryang@mail.tlri.gov.tw。

在培養過程中維持胚胎幹細胞之分化多能性，可藉由添加 FBS 與飼養層細胞的共培養達成 (Chaudhry *et al.*, 2008)；然而此共培養系統所使用 FBS 與小鼠胎體纖維母細胞 (mouse embryonic fibroblasts, mEF)，因均源自於動物之衍生物質，致有反轉錄病毒與動物來源污染的危險性，限制其在人體移植應用的疑慮，則會有動物病原污染的危險性，造成胚胎幹細胞在治療應用上的疑慮 (Amit *et al.*, 2003；Amit *et al.*, 2004；Lee *et al.*, 2005；Chase and Firpo *et al.*, 2007)。此外，近年因發生狂牛症、FBS 來源的不確定性與批次間的變異，以及取材過程可能帶入黴漿菌、病毒等污染源，增加對細胞培養時污染的機會。因此建立無血清與無飼養層細胞的培養系統為胚胎幹細胞重要的培養技術。

雖然 FBS 為最常用的培養液添加物之一，但由於批次間的差異與組成份的不明確，常造成實驗結果不一致的困擾 (Chase and Firpo *et al.*, 2007；Rajala *et al.*, 2007)。因此希望以添加 SR 取代 FBS 的培養系統 (Chase and Firpo *et al.*, 2007；Chaudhry *et al.*, 2008)、或添加 bFGF (Xu *et al.*, 2005；Rajala *et al.*, 2007) 與 TGF (Yao *et al.*, 2006) 等生長因子，以解決細胞增生不易之問題。Amit *et al.* (2003) 與 Skottman *et al.* (2006) 以添加 SR 與 TGF，可維持人類胚胎幹細胞的增生、未分化狀態與表現分化多能性之特異標記如 Oct-4、Nanog、Cripto 與 DNMT3B 等。Xu *et al.* (2005) 與 Greber *et al.* (2007) 指出添加 bFGF 與 TGF 於無飼養細胞的培養環境下，可以長時間維持人類胚胎幹細胞的增生，其原因與調節 CDKN2B、GADD45A 細胞週期因子，以及 Nanog、FoxD1 轉錄因子有關。而 Rajala *et al.* (2007) 以添加 SR 與 bFGF 培養人類胚胎幹細胞時，發現可以維持其生長、未分化狀態以及高群落效率等。因此本研究擬以無 FBS、生長因子與 SR 的添加，探討其對豬胚胎幹細胞體外增生、群落形成、維持不分化狀態、分化多能性與細胞凋亡之影響，期能建立穩定的無血清體外培養系統。

材料與方法

I. 培養攜帶綠色螢光蛋白質基因 (green fluorescent protein, GFP) 之豬胚胎幹細胞 (porcine embryonic stem cells, pES) 攜有 GFP 報導基因之豬胚胎幹細胞 (pES/GFP⁺) 依衍生與培養係參照 Yang *et al.* (2009；2010) 所建立之方法進行。幹細胞培養液 (embryonic stem-cell medium, ESM) 使用 DMEM (DMEM, high glucose, no pyruvate, Invitrogen, NY, USA)、添加 16% FBS (Invitrogen)、0.1 mM β -巯基乙醇 (beta-2-mercaptoethanol, Sigma-Aldrich)、1% 非必需胺基酸 (nonessential amino acids, Sigma-Aldrich)、1 mM 麩胺醯胺 (L-glutamine, Sigma-Aldrich)、核苷酸混合液 (nucleotides mixture, Sigma-Aldrich) 等配製成的培養液，培養條件為 37°C，氣相條件為含 5% 二氧化碳的空氣。培養過程中每週重新繼代於新處理過的 mitomycin C (Sigma-Aldrich) 不活化處理之小鼠胎體纖維母細胞 (STO, ATCC CRL-1503, USA) 為飼養層細胞，培養期間觀察胚胎幹細胞生長情況，使細胞穩定生長以供日後之試驗分析。

II. 無 FBS、SR 與添加生長因子試驗

將 pES/GFP⁺ 之細胞數濃度調整至 2,000 cells/mL，並於上述培養環境中，以含有 16% FBS 之 ESM 培養液之正常培養系統做為對照組，先行培養 2 天後，再將培養系統進行如下分組設計：

- (i) ESM 添加不同濃度之 FBS (16%、10% 與 0%)。
- (ii) 以 Knock-out DMEM (KO, Invitrogen) 與 20% SR (Invitrogen) 所配製之 KO-ESM 培養液。
- (iii) 添加不同種類與濃度之生長因子：bFGF (Sigma-Aldrich)：1, 10, 50 與 100 ng/mL。TGF- β 1 (Sigma-Aldrich)：1, 10, 50 與 100 ng/mL。
- (iv) 添加與未添加 1,000 units 白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF, Sigma-Aldrich)。

並於更換不同培養液後，於試驗之第 0 與 6 天時分別計算細胞數目並觀察豬胚胎幹細胞群落分化形態之變化，以瞭解不同培養系統對豬胚胎幹細胞生長之影響。

III. 豬胚幹細胞之生長曲線

將上述不同培養系統所培養之pES/GFP⁺先以4%福馬林 (formalin) 靜置30 min使之形態固定，再以4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI, 1 : 150, Sigma-Aldrich) 進行豬胚幹細胞之細胞核螢光染色，加入DAPI染劑後靜置5 - 7 min後於螢光顯微鏡下計算細胞數目，並以含有16%FBS之ESM培養液之正常培養系統做為對照組，統計細胞生長曲線倍數。

IV. 群落形成與維持分化之效率分析

將pES/GFP⁺以trypsin-EDTA處理後形成單一細胞懸浮液，再將細胞濃度調整為2,000 cells/mL，分別於上述不同培養系統培養6天後，計算群落形成之數量與細胞群落形態是否出現分化現象，並以含有16%FBS之ESM培養液之正常培養系統做為對照組，統計群落形成效率與分化群落比例之倍數。

V. 細胞毒性分析

細胞毒性分析係使用 LDH Cytotoxicity Detection Kit (630117, Clontech, CA, USA)，分析測量細胞被破壞時釋放到上層液中的 LDH 之濃度，用以測定 LDH 活動及細胞死亡量化。分析過程為將 96 孔細胞培養之細胞懸浮液濃度調整到 2×10^6 cells/mL 後，每孔加入 100 μ L 含有催化劑 (atalyst, S4858, Clontech) 與染劑分析液 (dye solution, S4859, Clontech) 之 LDH 分析液，再將 96 孔培養盤置於 37°C，5% CO₂，90% 濕度之培養箱中進行 30 min 反應，再以波長 490 nm 測定吸光度，並計算三次的平均吸光度，以得知添加無血清培養系統對豬胚幹細胞之細胞毒性影響。

VI. 豬胚幹細胞分化多能性之分析

利用免疫細胞化學染色法 (immunocytochemical staining, ICC) 進行豬誘導多能性幹細胞之分化多能性分析，所選用之幹細胞分化多能性之專一性抗體有 Octamer-binding transcription factor-4 (Oct-4, Chemicon Cat. # AB3209, Temecula, CA, USA)、alkaline phosphatase (AP, Chemicon Cat. # MAB4349)、stage specific embryonic antigen-3 (SSEA-3, Chemicon Cat. # MAB4303)、stage specific embryonic antigen-4 (SSEA-4, Chemicon Cat. # MAB4304)、tumor related antigen 1-60 (TRA 1-60, Chemicon Cat. # MAB4360) 與 tumor related antigen 1-81 (TRA 1-81, Chemicon Cat. # MAB4381)。進行免疫細胞化學染色時，先將細胞以10%福馬林於室溫下固定30 min，再加入0.3% Triton X-100反應10 min，再加入5% FBS反應2 h，之後加入一級抗體於4°C下反應隔夜後，以二級抗體 rhodamine (TRITC)-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L) (for Oct-4, Jackson ImmunoResearch Cat # 111-025-003, West Baltimore Pike, PA, USA)、rabbit anti-mouse IgG (H+L) (for AP and SSEA-4 staining, Jackson ImmunoResearch Cat # 315-025-003)、rabbit Anti-Rat IgM (for SSEA-3 staining, Jackson ImmunoResearch Cat # 312-025-020) 與rabbit anti-mouse IgM+IgG (for TRA 1-60 and TRA 1-81 staining, Jackson ImmunoResearch Cat # 315-025-044) 進行螢光分析。免疫細胞化學染色之結果以倒立式螢光顯微鏡 (DMIRB, Leica, Germany) 與超高感度冷卻式數位影像系統 (CoolSNAP^{HQ2} Monochrome, Photometrics, USA) 與分析處理系統MetaMorph 6.0r5 (Universal Imaging, USA) 記錄結果。

VII. 細胞凋亡分析

細胞凋亡之分析係於添加生長因子 bFGF 與 TGF- β 1 後之第 24、36 與 48 h，利用流式細胞分析儀 (FACSCalibur Flow Cytometry, BD Biosciences, CT, USA)，進行豬胚幹細胞凋亡之分析。由於細胞粒腺體上的 succinate reductase 之活性為判斷細胞是否存活之依據，當細胞死亡時此酵素之活性亦隨之消失，

可作為細胞存活率之判定。此外，細胞凋亡早期時，phosphatidyl-serine (PS) 會由細胞膜之內側向外翻，後期則有粒腺體膜電位的改變，最後導致 DNA 片段化，因此以細胞增生偵測與細胞凋亡分析套組，可以進行細胞之存活與凋亡之分析。分析套組係以 FITC Annexin V (556419, BD Biosciences) 與 propidium iodide staining solution (PI, 556463, BD Biosciences) 試劑，每個細胞樣品加入 2.5 μ L 之染色劑後，再加入稀釋 12.5 倍之緩衝液至 5 mL 並反應 5 min，再以 12 x 75 mm 含過濾網之圓底試管 (5 mL Polystyrene round-bottom tube with cell-strainer cap, REF 352235, BD Biosciences) 進行過濾，即可利用流式細胞儀進行細胞凋亡之分析。分析後數據係使用 Cellquest Pro 軟體進行分析，以得知添加生長因子 bFGF 與 TGF- β 1 對豬胚幹細胞凋亡之影響。

VIII. 統計分析

所有試驗數據以 mean \pm SEM 表示，並且依據 SAS 之 General Linear Model (GLM) 模式進行數據統計與差異顯著性檢測分析 (SAS Institute, 1996)，當 $P < 0.05$ 則為差異顯著性。

結果與討論

本試驗以含有 16% FBS 之 ESM 培養液之培養系統做為對照組，試驗組則為無 FBS 或 SR 的培養系統中，配合添加 bFGF 與 TGF- β 1 生長因子，以探討不同培養系統對豬胚幹細胞生長之影響。試驗結果如下：

I. 生長曲線：

- (i) 不含 LIF 之培養系統：無 FBS 並添加 bFGF 生長因子組，豬胚幹細胞於第 6 天之生長曲線，與對照組比較下為 0.15 - 0.18%；添加 TGF- β 1 生長因子組則為 0.03 - 0.26%，均顯著低於對照組 ($P < 0.05$)。添加 10% FBS 與 bFGF 生長因子組則為 0.81 - 1.18%；添加 TGF- β 1 生長因子組則為 0.04 - 0.38%，顯示在 10% FBS 的培養系統下，添加低濃度的 bFGF (1, 10, 50 ng/mL) 可維持與對照組相近的生長曲線 ($P > 0.05$)，但在高濃度的 bFGF (100 ng/mL) 下，其生長曲線則顯著低於對照組 ($P < 0.05$)，而添加 TGF- β 1 生長因子組同樣顯著低於對照組之結果 ($P < 0.05$)。若以 20% SR 並添加 bFGF 生長因子組則為 0.36 - 0.57%；添加 TGF- β 1 生長因子組則為 0.07 - 0.19%，均顯著低於對照組 ($P < 0.05$) (表 1)。
- (ii) 添加 LIF 之培養系統：無 FBS 並添加 bFGF 生長因子組則於第 6 天之生長曲線為對照組之 0.30 - 0.45 倍；添加 TGF- β 1 生長因子組則為 0.21 - 0.42%，均顯著低於對照組 ($P < 0.05$)。添加 10% FBS 與 bFGF 生長因子組則為 0.40 - 0.69%；添加 TGF- β 1 生長因子組則為 0.11 - 0.34%，亦同樣均顯著低於對照組 ($P < 0.05$)。若以 20% SR 並添加 bFGF 生長因子者則為 0.39 - 0.65%；添加 TGF- β 1 生長因子組則為 0.12 - 0.46 倍，亦同樣均顯著低於對照組 ($P < 0.05$) (表 1)。
- (iii) 不含 LIF 之培養液，同時添加 bFGF 1, 10, 50, 100 ng/mL 與 TGF- β 1 1 ng/mL 的試驗中，對豬胚幹細胞生長曲線在無 FBS 組為 0.26 - 0.54%；10% FBS 組為 0.27 - 0.55%；20% SR 組則為 0.19 - 0.47%，均顯著低於對照組 ($P < 0.05$) (表 2)。

試驗結果顯示，無論在 0% 或是 10% FBS，以及 20% SR 之培養系統下，添加 bFGF 與 TGF- β 1 生長因子均未能得到較佳的生長曲線，顯示 16% FBS 是豬胚幹細胞的最佳培養條件。然而在添加 10% FBS 與 bFGF 1, 10, 50 ng/mL 之濃度下，可維持與對照組相近的生長曲線 (表 1)。

表1. 無血清與SR培養液添加bFGF與TGF- β 1生長因子對豬胚幹細胞生長曲線之影響 (mean \pm SEM)Table 1. The effects of bFGF and TGF- β 1 on pES cell growth in serum-free and SR culture system (mean \pm SEM)

Basal medium	Supplement (ng/mL)	without LIF	with LIF
ESM+ 16% FBS	-	1.00 ^a	1.00 ^a
ESM + 0% FBS	-	0.15 \pm 0.06 ^{bc}	0.40 \pm 0.07 ^{bc}
	bFGF 1	0.16 \pm 0.05 ^{bc}	0.45 \pm 0.07 ^b
	bFGF 10	0.17 \pm 0.05 ^{bc}	0.42 \pm 0.08 ^{bc}
	bFGF 50	0.15 \pm 0.06 ^{bc}	0.43 \pm 0.05 ^c
	bFGF 100	0.18 \pm 0.07 ^{bc}	0.30 \pm 0.05 ^{cd}
	TGF- β 1 1	0.26 \pm 0.11 ^b	0.42 \pm 0.06 ^{bc}
	TGF- β 1 10	0.12 \pm 0.04 ^{bc}	0.26 \pm 0.03 ^{dc}
	TGF- β 1 50	0.03 \pm 0.01 ^c	0.19 \pm 0.02 ^{dc}
	TGF- β 1 100	0.03 \pm 0.01 ^c	0.21 \pm 0.04 ^{dc}
ESM + 10% FBS	-	1.18 \pm 0.15 ^a	0.67 \pm 0.05 ^b
	bFGF 1	1.05 \pm 0.11 ^{ab}	0.69 \pm 0.10 ^b
	bFGF 10	1.07 \pm 0.10 ^a	0.59 \pm 0.06 ^b
	bFGF 50	1.12 \pm 0.13 ^a	0.40 \pm 0.06 ^{cd}
	bFGF 100	0.81 \pm 0.08 ^b	0.52 \pm 0.09 ^{bc}
	TGF- β 1 1	0.38 \pm 0.10 ^c	0.34 \pm 0.07 ^d
	TGF- β 1 10	0.05 \pm 0.01 ^d	0.18 \pm 0.05 ^e
	TGF- β 1 50	0.06 \pm 0.02 ^d	0.11 \pm 0.02 ^e
	TGF- β 1 100	0.04 \pm 0.01 ^d	0.12 \pm 0.02 ^e
KO + 20% SR	-	0.48 \pm 0.10 ^b	0.65 \pm 0.08 ^b
	bFGF 1	0.57 \pm 0.09 ^{bc}	0.49 \pm 0.03 ^{cd}
	bFGF 10	0.45 \pm 0.08 ^{bc}	0.45 \pm 0.09 ^{bc}
	bFGF 50	0.34 \pm 0.05 ^c	0.42 \pm 0.09 ^{cd}
	bFGF 100	0.36 \pm 0.04 ^c	0.39 \pm 0.07 ^{cd}
	TGF- β 1 1	0.19 \pm 0.02 ^d	0.46 \pm 0.02 ^{cd}
	TGF- β 1 10	0.10 \pm 0.01 ^d	0.32 \pm 0.06 ^{dc}
	TGF- β 1 50	0.08 \pm 0.03 ^d	0.20 \pm 0.06 ^{ef}
	TGF- β 1 100	0.07 \pm 0.02 ^d	0.12 \pm 0.02 ^f

^{a, b, c, d, e, f} Values within the same column without common superscripts were significantly different compared to the ESM + 16% FBS group (P < 0.05).

表2. 不含LIF的無血清與SR培養液添加生長因子bFGF與TGF- β 1對豬胚幹細胞生長曲線之影響
(mean \pm SEM)

Table 2. The effects of bFGF concentrations on pES cell growth in serum-free and SR culture system supplemented with TGF- β 1 but without LIF (mean \pm SEM)

Basal medium	Supplement (ng/mL)	without LIF
ESM+ 16% FBS	-	1.00 ^a
ESM + 0% FBS	bFGF 0 + TGF- β 1	0.26 \pm 0.11 ^b
	bFGF 1 + TGF- β 1	0.54 \pm 0.13 ^b
	bFGF 10 + TGF- β 1	0.51 \pm 0.17 ^b
	bFGF 50 + TGF- β 1	0.32 \pm 0.06 ^b
	bFGF 100 + TGF- β 1	0.28 \pm 0.07 ^b
ESM + 10% FBS	bFGF 0 + TGF- β 1	0.38 \pm 0.10 ^c
	bFGF 1 + TGF- β 1	0.55 \pm 0.10 ^b
	bFGF 10 + TGF- β 1	0.48 \pm 0.05 ^c
	bFGF 50 + TGF- β 1	0.28 \pm 0.03 ^c
	bFGF 100 + TGF- β 1	0.27 \pm 0.04 ^c
KO + 20% SR	bFGF 0 + TGF- β 1	0.19 \pm 0.02 ^c
	bFGF 1 + TGF- β 1	0.47 \pm 0.07 ^{bc}
	bFGF 10 + TGF- β 1	0.44 \pm 0.06 ^{bc}
	bFGF 50 + TGF- β 1	0.45 \pm 0.10 ^{bc}
	bFGF 100 + TGF- β 1	0.38 \pm 0.03 ^c

^{a, b, c} Values within the same column without common superscripts were significantly different compared to the ESM + 16%FBS group ($P < 0.05$).

II. 群落形成與維持分化之效率分析：

- (i) 不含LIF之培養系統：無FBS並添加bFGF生長因子組，豬胚幹細胞於第6天之群落形成與維持分化之效率為5.9 – 15.1%；添加TGF- β 1生長因子組則為0.0 – 8.7%，均顯著低於對照組 ($P < 0.05$)。添加10% FBS與bFGF生長因子組則為47.5 – 53.9%；添加TGF- β 1生長因子組則在添加1 ng/mL組可維持40.7%，其餘10, 50, 100 ng/mL組，於第6天時均未發現有豬胚幹細胞群落之形成，其中並以10% FBS並添加bFGF 10 ng/mL生長因子組，其可維持53.9%之群落效率，優於其他處理組，雖低於對照組之77.4%之群落效率，但彼此間無差異顯著性。若以20%SR並添加bFGF生長因子組則為9.2 – 23.9%；添加TGF- β 1生長因子組則為0.0 – 10.2%，均顯著低於對照組 ($P < 0.05$) (表3)。
- (ii) 添加LIF之培養系統：無FBS並添加bFGF生長因子組，豬胚幹細胞於第6天之群落形成與維持分化之效率為4.2 – 14.4%；添加TGF- β 1生長因子組則為0.0 – 4.4%，均顯著低於對照組 ($P < 0.05$)。添加10%FBS與bFGF生長因子組則為32.7 – 46.4%；添加TGF- β 1生長因子組則在添加1與10 ng/mL組可分別維持34.6與13.8%，添加50與100 ng/mL組，於第6天時均未發現有豬胚幹細胞群落之形成，其中並以10%FBS並添加bFGF 1 ng/mL生長因子組，其分化群落之效率可維持46.4%，優於其他處理組，但仍低於對照組之72.9%之群落效率 ($P < 0.05$)。若以20%SR並添加bFGF生長因子組則為0.0 – 18.7%；添加TGF- β 1生長因子組則為則無法維持群落效率，均顯著低於對照組 ($P < 0.05$) (表3)。
- (iii) 不含LIF之培養液，同時添加bFGF 1, 10, 50, 100 ng/mL與TGF- β 1 1 ng/mL的試驗中，對豬胚幹細胞群落效率之分析，在無FBS組為0.0 – 19.9%；10% FBS組為2.2 – 58.6%；20% SR組則為13.7 – 27.8%。其中以10% FBS並添加組bFGF 1 ng/mL與TGF- β 1 1 ng/mL之58.6%群落效率為最佳，但

顯著低於對照組 ($P < 0.05$) (表4)。

試驗結果顯示，無論在0%或是10% FBS，以及20% SR之培養系統下，添加bFGF與TGF- β 1生長因子均未能得到較佳的群落效率，顯示16% FBS濃度是豬胚幹細胞的最佳培養系統。然而在添加10% FBS與 bFGF 1 ng/mL與TGF- β 1 1 ng/mL之濃度下，可維持58.6%之群落效率為最佳（表4），為可參考之培養方式。

表 3. 無血清與 SR 培養液添加 bFGF 與 TGF- β 1 生長因子對豬胚幹細胞群落形成與維持分化之影響 (mean \pm SEM)

Table 3. The effects of bFGF and TGF- β 1 on colony formation and maintenance of undifferentiated status of pES cells in serum-free and SR culture system (mean \pm SEM)

Basal medium	Supplement (ng/mL)	without LIF	with LIF
ESM+ 16% FBS	-	77.4 \pm 8.3 ^a	72.9 \pm 6.2 ^a
ESM + 0% FBS	-	5.9 \pm 3.2 ^b	3.3 \pm 3.7 ^c
	bFGF 1	10.4 \pm 5.7 ^b	14.4 \pm 3.4 ^b
	bFGF 10	9.6 \pm 5.3 ^b	5.7 \pm 3.9 ^c
	bFGF 50	11.7 \pm 6.4 ^b	5.1 \pm 4.1 ^c
	bFGF 100	15.1 \pm 7.2 ^b	4.2 \pm 4.6 ^c
	TGF- β 1 1	8.7 \pm 4.6 ^b	4.4 \pm 3.2 ^c
	TGF- β 1 10	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^c
	TGF- β 1 50	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^c
	TGF- β 1 100	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^c
ESM + 10% FBS	-	48.5 \pm 11.2 ^b	43.0 \pm 7.1 ^b
	bFGF 1	45.9 \pm 11.1 ^b	46.4 \pm 12.5 ^b
	bFGF 10	53.9 \pm 11.5 ^{ab}	40.5 \pm 9.1 ^b
	bFGF 50	47.5 \pm 11.7 ^b	39.2 \pm 7.9 ^b
	bFGF 100	49.1 \pm 11.5 ^b	32.7 \pm 9.3 ^{bc}
	TGF- β 1 1	40.7 \pm 13.9 ^b	34.6 \pm 6.0 ^b
	TGF- β 1 10	0.0 \pm 0.0 ^c	13.8 \pm 7.4 ^{cd}
	TGF- β 1 50	0.0 \pm 0.0 ^c	0.0 \pm 0.0 ^d
	TGF- β 1 100	0.0 \pm 0.0 ^c	0.0 \pm 0.0 ^d
KO + 20% SR	-	19.8 \pm 10.6 ^{bc}	21.9 \pm 3.3 ^b
	bFGF 1	23.9 \pm 8.2 ^b	18.7 \pm 3.1 ^b
	bFGF 10	23.8 \pm 7.9 ^b	8.9 \pm 6.4 ^c
	bFGF 50	20.8 \pm 9.0 ^{bc}	0.0 \pm 0.0 ^c
	bFGF 100	9.2 \pm 5.6 ^{bc}	0.0 \pm 0.0 ^c
	TGF- β 1 1	10.2 \pm 4.7 ^{bc}	0.0 \pm 0.0 ^c
	TGF- β 1 10	1.4 \pm 1.5 ^c	0.0 \pm 0.0 ^c
	TGF- β 1 50	0.0 \pm 0.0 ^c	0.0 \pm 0.0 ^c
	TGF- β 1 100	0.0 \pm 0.0 ^c	0.0 \pm 0.0 ^c

^{a, b, c} Values within the same column without common superscripts were significantly different compared to the ESM + 16% FBS group ($P < 0.05$).

表 4. 不含 LIF 的無血清與 SR 培養液添加生長因子 bFGF 與 TGF- β 1 對豬胚胎幹細胞群落形成與維持分化之影響 (mean \pm SEM)

Table 4. The effects of bFGF concentrations on the colony formation and undifferentiation status of pES cells in serum-free and SR culture system supplemented with 1 ng/mL TGF- β 1 but without LIF (mean \pm SEM)

Basal medium	Supplement (ng/mL)	without LIF
ESM + 16% FBS	-	77.4 \pm 8.3 ^a
ESM + 0% FBS	bFGF 0 + TGF- β 1	8.7 \pm 4.6 ^c
	bFGF 1 + TGF- β 1	18.6 \pm 4.9 ^b
	bFGF 10 + TGF- β 1	19.9 \pm 6.6 ^b
	bFGF 50 + TGF- β 1	0.0 \pm 0.0 ^c
	bFGF 100 + TGF- β 1	0.0 \pm 0.0 ^c
ESM + 10% FBS	bFGF 0 + TGF- β 1	40.7 \pm 13.9 ^b
	bFGF 1 + TGF- β 1	58.6 \pm 8.4 ^b
	bFGF 10 + TGF- β 1	41.1 \pm 8.4 ^b
	bFGF 50 + TGF- β 1	7.4 \pm 5.2 ^c
	bFGF 100 + TGF- β 1	2.2 \pm 2.4 ^c
KO + 20% SR	bFGF 0 + TGF- β 1	10.2 \pm 4.7 ^c
	bFGF 1 + TGF- β 1	27.8 \pm 7.1 ^{bc}
	bFGF 10 + TGF- β 1	27.6 \pm 2.0 ^{bc}
	bFGF 50 + TGF- β 1	14.4 \pm 7.1 ^c
	bFGF 100 + TGF- β 1	13.7 \pm 5.0 ^c

^{a, b, c} Values within the same column without common superscripts were significantly different compared to the ESM + 16% FBS group ($P < 0.05$).

III. LDH毒性分析：

- (i) 不含LIF之培養系統：無FBS並添加bFGF生長因子組，培養系統於第6天時，對豬胚胎幹細胞所造成之LDH細胞毒性分析，與對照組比較下為0.64 – 0.70%；添加TGF- β 1生長因子組則為0.68 – 0.72%，均顯著低於對照組 ($P < 0.05$)。添加10% FBS與bFGF生長因子組則為0.68 – 0.74%；添加TGF- β 1生長因子組則為0.72 – 0.83%，顯著低於對照組 ($P < 0.05$)。若以20% SR並添加bFGF生長因子組則為0.67 – 0.68%；添加TGF- β 1生長因子組則為0.71 – 0.73，均顯著低於對照組 ($P < 0.05$) (表5)。
- (ii) 添加LIF之培養系統：無FBS並添加bFGF生長因子組，於第6天之所造成之LDH細胞毒性分析為對照組之0.51 – 0.53%；添加TGF- β 1生長因子組則為0.54 – 0.56%，顯著低於對照組 ($P < 0.05$)。添加10% FBS與bFGF生長因子組則為0.41 – 0.52%；添加TGF- β 1生長因子組則為0.43 – 0.53%，亦同樣均顯著低於對照組 ($P < 0.05$)。若以20% SR並添加bFGF生長因子者則為0.45 – 0.49%；添加TGF- β 1生長因子組則為0.46 – 0.49%，亦同樣均顯著低於對照組 ($P < 0.05$) (如表5所示)。
- (iii) 不含LIF之培養液，同時添加bFGF 1, 10, 50, 100 ng/mL與TGF β 1 1ng/mL的試驗中，對豬胚胎幹細胞之LDH毒性分析，在無FBS組為0.66 – 0.70%；10% FBS組為0.70 – 0.83%；20% SR組則為0.58 – 0.72%，均顯著低於對照組 ($P < 0.05$) (表6)。

試驗結果顯示，無論在 0%或是 10% FBS，以及 20% SR 之培養系統下，添加 bFGF 與 TGF- β 1 生長因子，對於豬胚胎幹細胞並未產生 LDH 細胞毒性之影響，為可參考之培養方式。

表 5. 不含 LIF 的無血清與 SR 培養液添加 bFGF 與 TGF- β 1 生長因子對豬胚幹細胞之細胞毒性分析
(mean \pm SEM)

Table 5. The effects of bFGF and TGF- β 1 on the LDH cytotoxicity of pES cells in serum-free and SR culture system (mean \pm SEM)

Basal medium	Supplement (ng/mL)	without LIF	with LIF
ESM+ 16% FBS	-	1.00 ^a	1.00 ^a
ESM + 0% FBS	-	0.70 \pm 0.01 ^b	0.51 \pm 0.03 ^b
	bFGF 1	0.70 \pm 0.01 ^b	0.51 \pm 0.03 ^b
	bFGF 10	0.69 \pm 0.01 ^b	0.53 \pm 0.02 ^b
	bFGF 50	0.68 \pm 0.01 ^b	0.52 \pm 0.03 ^b
	bFGF 100	0.64 \pm 0.01 ^c	0.52 \pm 0.02 ^b
	TGF- β 1 1	0.70 \pm 0.01 ^b	0.54 \pm 0.03 ^b
	TGF- β 1 10	0.70 \pm 0.01 ^b	0.55 \pm 0.03 ^b
	TGF- β 1 50	0.72 \pm 0.01 ^b	0.56 \pm 0.04 ^b
	TGF- β 1 100	0.68 \pm 0.02 ^b	0.54 \pm 0.03 ^b
ESM + 10% FBS	-	0.73 \pm 0.01 ^{bc}	0.51 \pm 0.06 ^b
	bFGF 1	0.74 \pm 0.01 ^{bc}	0.52 \pm 0.06 ^b
	bFGF 10	0.73 \pm 0.02 ^{bc}	0.46 \pm 0.06 ^b
	bFGF 50	0.70 \pm 0.02 ^c	0.41 \pm 0.09 ^b
	bFGF 100	0.68 \pm 0.02 ^c	0.48 \pm 0.06 ^b
	TGF- β 1 1	0.83 \pm 0.04 ^{bc}	0.53 \pm 0.06 ^b
	TGF- β 1 10	0.72 \pm 0.01 ^{bc}	0.43 \pm 0.09 ^b
	TGF- β 1 50	0.79 \pm 0.06 ^b	0.45 \pm 0.08 ^b
	TGF- β 1 100	0.74 \pm 0.02 ^{bc}	0.44 \pm 0.09 ^b
KO + 20% SR	-	0.68 \pm 0.03 ^b	0.49 \pm 0.04 ^b
	bFGF 1	0.68 \pm 0.03 ^b	0.45 \pm 0.04 ^b
	bFGF 10	0.68 \pm 0.03 ^b	0.45 \pm 0.04 ^b
	bFGF 50	0.67 \pm 0.03 ^b	0.47 \pm 0.03 ^b
	bFGF 100	0.68 \pm 0.03 ^b	0.47 \pm 0.03 ^b
	TGF- β 1 1	0.72 \pm 0.03 ^b	0.47 \pm 0.05 ^b
	TGF- β 1 10	0.73 \pm 0.03 ^b	0.46 \pm 0.04 ^b
	TGF- β 1 50	0.72 \pm 0.03 ^b	0.46 \pm 0.04 ^b
	TGF- β 1 100	0.71 \pm 0.03 ^b	0.49 \pm 0.03 ^b

^{a, b, c} Values within the same column without common superscripts were significantly different compared to the ESM + 16% FBS group ($P < 0.05$).

表 6. 不含 LIF 的無血清與 SR 培養液添加生長因子 bFGF 與 TGF- β 1 對豬胚幹細胞之細胞毒性分析 (mean \pm SEM)

Table 6. The effects of bFGF concentrations on the LDH cytotoxicity of pES cells in serum-free and SR culture system without LIF but 1 ng/mL of TGF- β 1 (mean \pm SEM)

Basal medium	Supplement (ng/mL)	without LIF
ESM+ 16% FBS	-	1.00 ^a
ESM + 0% FBS	bFGF 0 + TGF- β 1	0.70 \pm 0.01 ^b
	bFGF 1 + TGF- β 1	0.68 \pm 0.01 ^{bc}
	bFGF 10 + TGF- β 1	0.67 \pm 0.01 ^{bc}
	bFGF 50 + TGF- β 1	0.67 \pm 0.01 ^{bc}
	bFGF 100 + TGF- β 1	0.66 \pm 0.01 ^c
ESM + 10% FBS	bFGF 0 + TGF- β 1	0.83 \pm 0.04 ^b
	bFGF 1 + TGF- β 1	0.83 \pm 0.04 ^b
	bFGF 10 + TGF- β 1	0.83 \pm 0.05 ^b
	bFGF 50 + TGF- β 1	0.70 \pm 0.06 ^b
	bFGF 100 + TGF- β 1	0.72 \pm 0.06 ^b
KO + 20% SR	bFGF 0 + TGF- β 1	0.72 \pm 0.02 ^b
	bFGF 1 + TGF- β 1	0.62 \pm 0.02 ^b
	bFGF 10 + TGF- β 1	0.60 \pm 0.02 ^b
	bFGF 50 + TGF- β 1	0.58 \pm 0.02 ^b
	bFGF 100 + TGF- β 1	0.58 \pm 0.02 ^b

^{a, b, c} Values within the same column without common superscripts were significantly different compared to the ESM + 16% FBS group ($P < 0.05$).

IV. 分化多能性之分析：

以分化多能性抗體 Oct-4、AP、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60 與 TRA-1-81 進行染色分析，在添加生長因子 bFGF 與 TGF- β 1 組，經染色後均具陽性反應之結果（圖 1, 2），顯示添加生長因子可維持豬胚幹細胞之分化多能性。

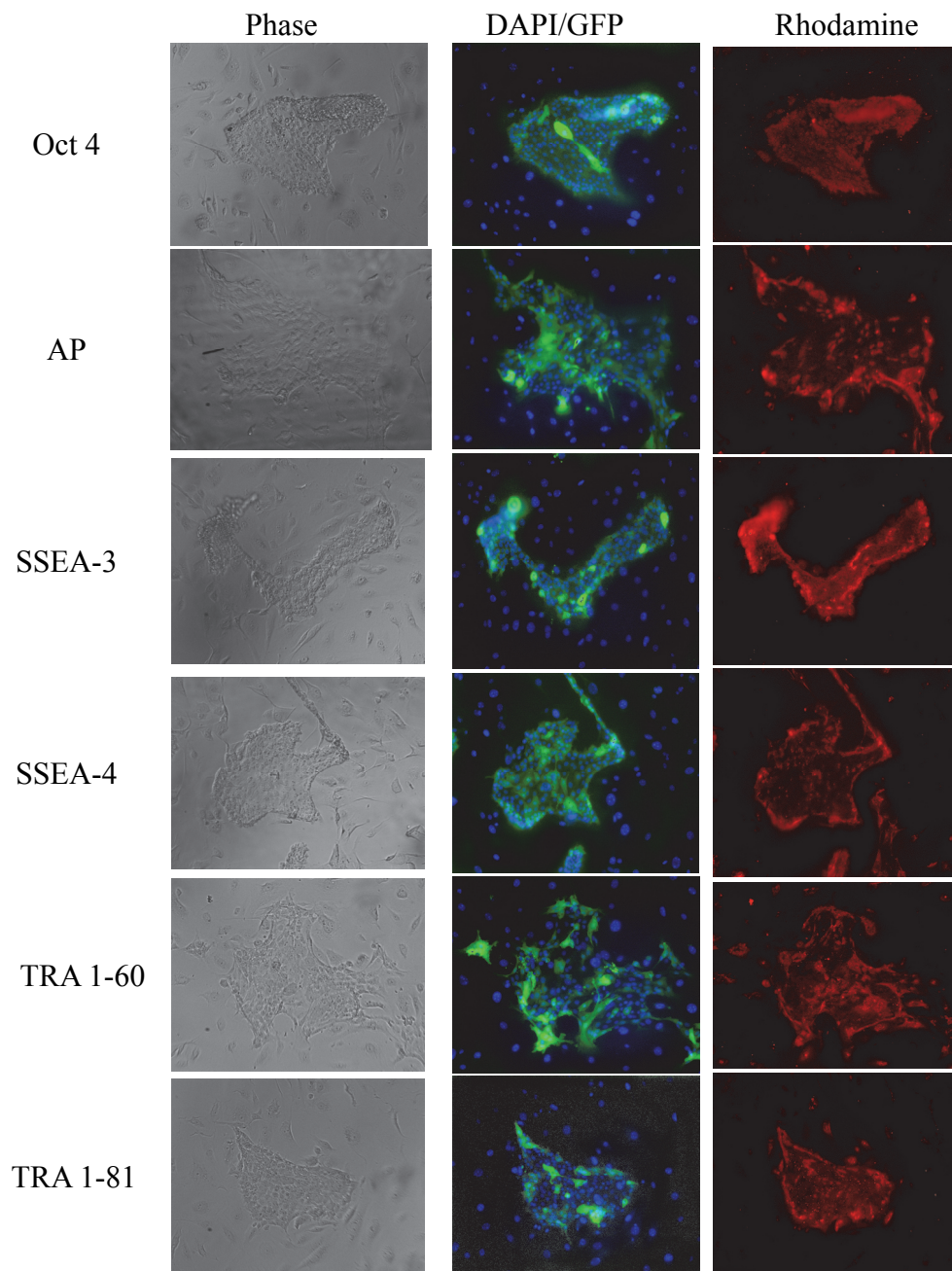


圖 1. 添加 bFGF 生長因子對於豬胚幹細胞分化多能性之影響。細胞群落經染色後均能表現分化多能性標記，顯示仍可維持胚幹細胞之分化多能性。

Fig. 1. The pluripotency of pES cells showed positive staining by immunocytochemical analysis with Oct-4, AP, SSEA-3, SSEA-4, TRA 1-60, and TRA 1-81 pluripotent markers, and the results indicated they can maintain pluripotency in the culture system supplemented with bFGF.

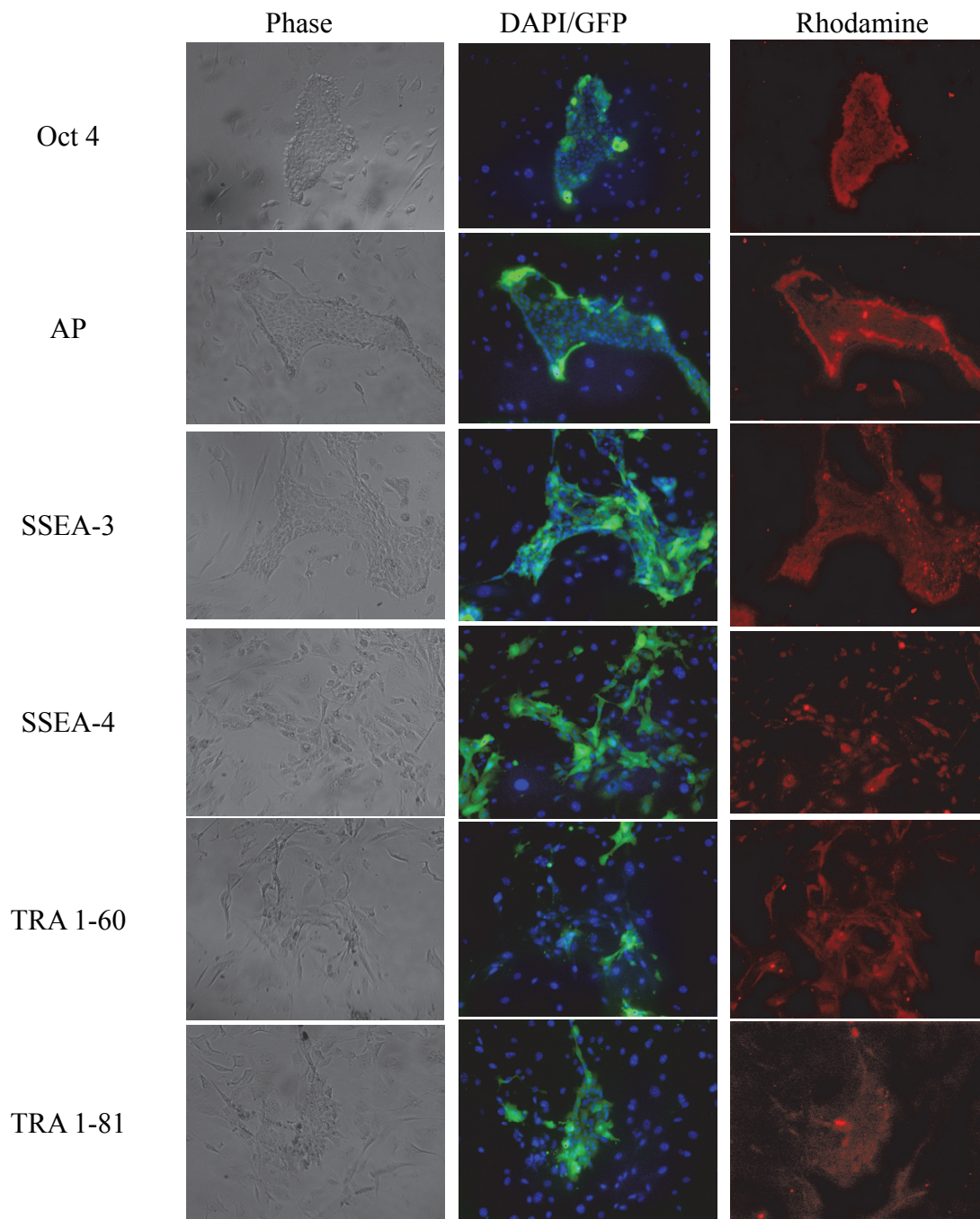
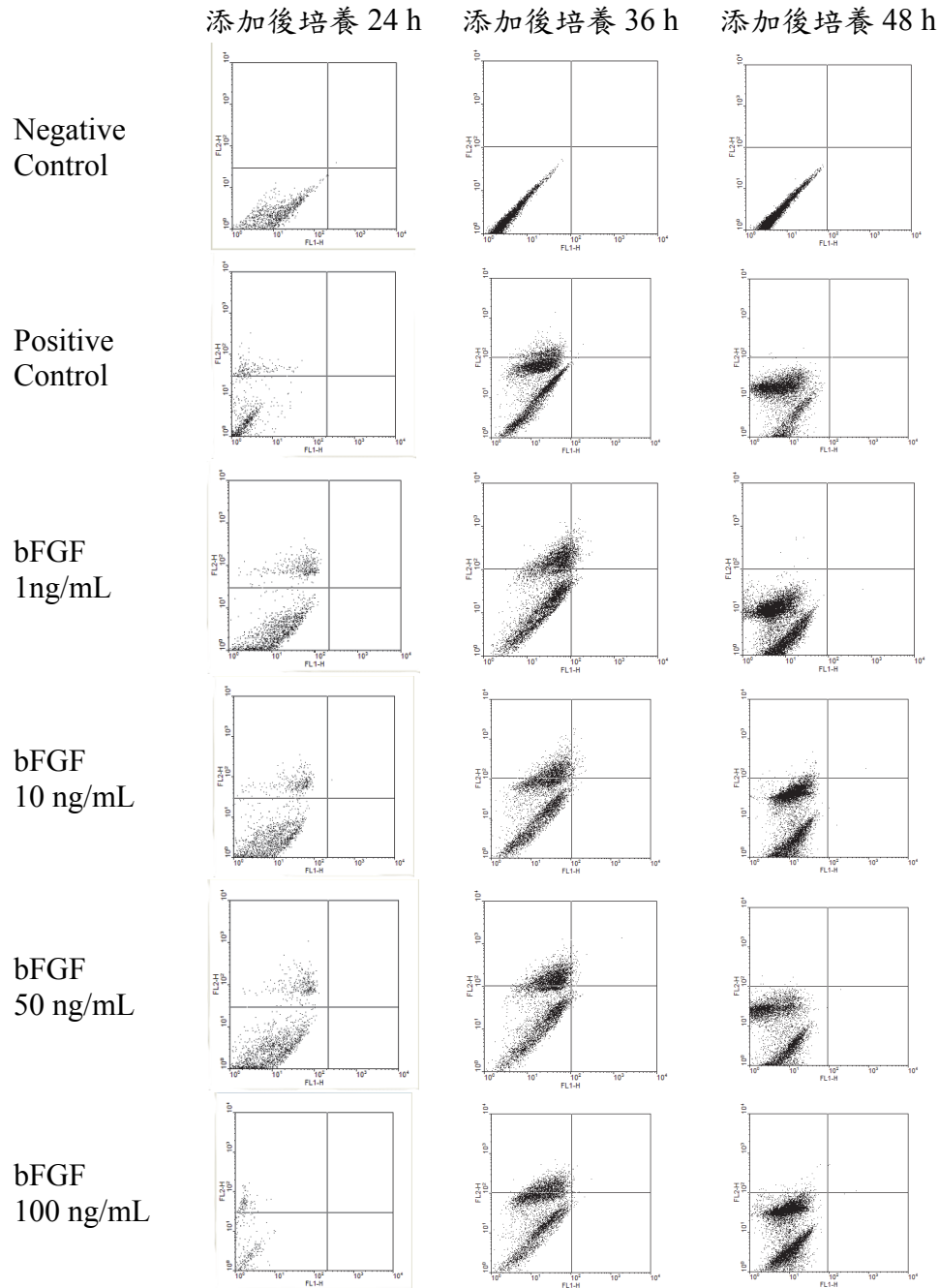


圖 2. 添加 TGF- β 1 生長因子對於豬胚胎幹細胞分化多能性之影響。細胞群落經染色後均能表現分化多能性標記，顯示仍可維持胚胎幹細胞之分化多能性。

Fig. 2. The pluripotency of pES cells showed positive staining by immunocytochemical analysis with Oct-4, AP, SSEA-3, SSEA-4, TRA 1-60, and TRA 1-81 pluripotent markers, and the resulted indicated they can maintain the pluripotency in the culture system supplemented with TGF- β 1.

V. 細胞凋亡分析：

利用流式細胞分析儀，探討添加生長因子 bFGF 與 $TGF-\beta 1$ 對豬胚幹細胞細胞凋亡之分析，添加後 24、36 與 48 h 後，豬胚幹細胞並未發現細胞凋亡之現象（圖 3）。



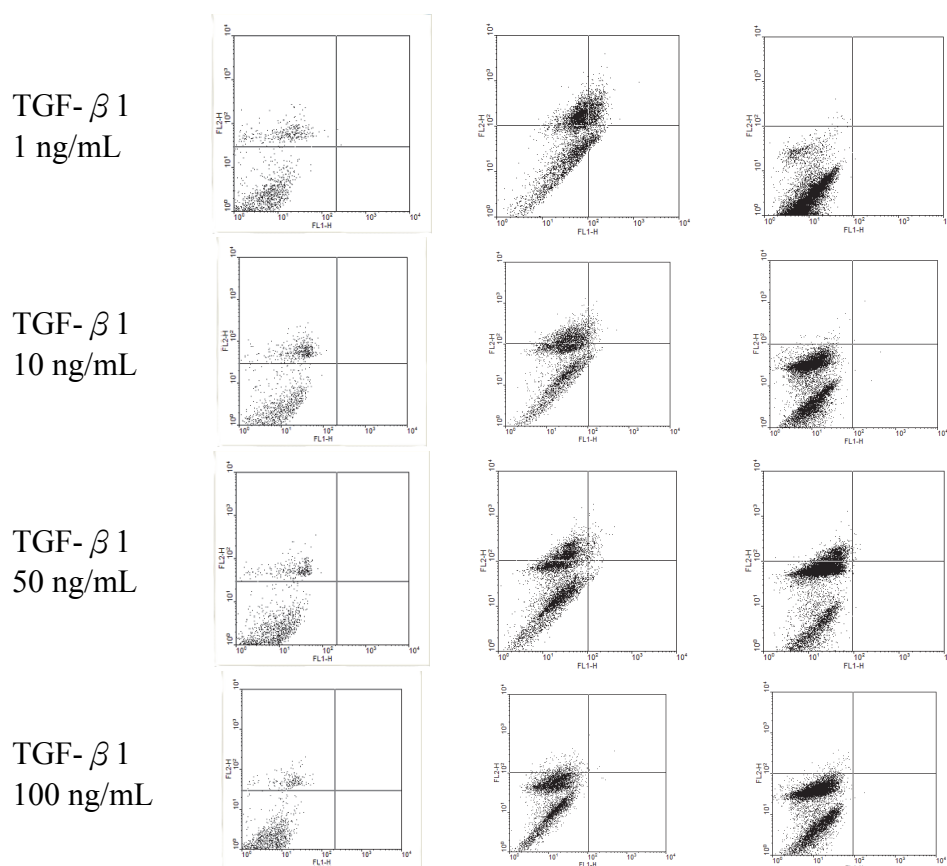


圖 3. 利用流式細胞分析儀進行豬胚胎幹細胞細胞凋亡分析。培養液中添加 bFGF 與 TGF- β 1 生長因子經 24、36 與 48 h 培養後，皆未偵測出細胞凋亡現象。

Fig. 3. There are no pES cells showing apoptosis in 24, 36, and 48 h culture period after bFGF and TGF- β 1 supplementation.

自從小鼠與人類胚胎幹細胞建立以來 (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson *et al.*, 1998)，胚胎幹細胞之培養系統常添加FBS，以及使用經過絲裂黴素 (mitomycin C) 不活化處理後之mEF為飼養層細胞之培養系統。然而，在含有FBS的培養系統下，常導致胚胎幹細胞過度分化之現象 (Amit *et al.*, 2000; Reubinoff *et al.*, 2000; Amit and Itskovitz-Eldor, 2002)。因此近年來為改善胚胎幹細胞之培養系統，期達成 (1) 在無血清培養系統下仍能維持胚胎幹細胞之生長；(2) 在無飼養層培養系統下仍能維持胚胎幹細胞之未分化狀態；(3) 使用人類胚胎纖維母細胞、成體輸卵管上皮細胞或成體包皮細胞，做為飼養層細胞 (Amit *et al.*, 2000；Xu *et al.*, 2001；Richards *et al.*, 2002；Hovatta *et al.*, 2003；Inzunza *et al.*, 2005)。培養系統中添加的FBS，主要作用為提供多種生長因子與營養物質，並且可以改變培養液的生化特性，可促進胚胎幹細胞之生長、貼附效率與控制分化 (Chaudhry *et al.*, 2008)；然而由於FBS的批次間與來源間的差異，以及FBS組成份不明確，常會造成實驗結果不一致性的困擾 (Rajala *et al.*, 2007)。因此，以添加生長因子或是SR，建立胚胎幹細胞無血清體外培養系統，為胚胎幹細胞培養之目標。

在無血清的培養系統中常添加 bFGF，胚胎幹細胞受到 bFGF 的刺激後產生遷移、增生以及分化等現象。纖維母細胞生長因子主要由多勝所組成，而其中酸性 FGF (acidic FGF, aFGF) 與鹼性 FGF (basic

bFGF) 最為廣泛探討。在訊息傳遞上, FGF 會與細胞表面具有特異性的 tyrosine kinase receptors 結合, 調控 FGF 的作用, 進而活化 Ras/Raf/MEK/MAPK 途徑而致使細胞增生, 並且可抑制 bone morphogenetic proteins (BMP) 所引發的分化現象。因此 bFGF 在胚幹細胞培養系統中, 可維持胚幹細胞未分化狀態, 是無血清培養系統中重要的生長因子之一 (Pereira *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2006; Yeoh and Haan *et al.*, 2007)。TGF- β 1 在細胞增生、細胞分化、胚胎發育與免疫系統之調節上扮演著重要的角色 (Fortunel *et al.*, 2000), TGF- β 1 主要為抑制內胚層與外胚層細胞之分化, 但可允許中胚層肌肉細胞之分化, 由於 TGF- β 1 可以減少特定胚層細胞基因的表現量, 因此可降低胚幹細胞之分化 (Schuldiner *et al.*, 2000)。在人類胚幹細胞無血清培養系統中, 添加 bFGF 與 TGF- β 1 可以促進人類胚幹細胞之生長與分化多能性, 並且可維持長達 6 個月之久 (Amit *et al.*, 2004)。除了在無血清的培養系統下添加生長因子維持胚幹細胞之生長與未分化外, 亦有開發取代血清之添加物, Price *et al.* (1998) 即提出 SR 做為胚幹細胞培養液之添加物, 可促進胚幹細胞生長, 並且降低胚幹細胞自發性的分化機制 (spontaneous differentiation), 然而因為專利保護之故, 因此 SR 的確切配方並無法取得。Koivisto *et al.* (2004) 使用 SR 進行人類胚幹細胞之培養, 發現添加 20% SR 對於人類胚幹細胞生長為最佳濃度, 並且可以避免 FBS 批次間差異之影響, 提供了穩定且標準化的培養環境; 然而 SR 仍含有牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的成分, 並非完全無動物性來源之成分 (Price *et al.*, 1998), 依舊是無法滿足無動物性來源之要求。取而代之的則是直接使用人類血清進行胚幹細胞的培養試驗, 直接以人類血清取代 FBS, 發現在含有人類血清的培養系統下, 可以維持人類胚幹細胞未分化狀態達 20 代以上 (Richards *et al.*, 2002; Ellerstrom *et al.*, 2006)。

本試驗中, 無 FBS 或 SR 的培養系統中, 添加 bFGF 與 TGF- β 1 等生長因子, 雖然生長曲線、群落形成與維持分化效率雖未比對照組添加 16% FBS 佳, 然添加生長因子後, 亦未對豬胚幹細胞產生細胞毒性, 且皆能表現 Oct-4、AP、SSEA-3、SSEA-4、TRA 1-60 與 TRA 1-81 等標記, 顯示添加生長因子可維持豬胚幹細胞之分化多能性。利用流式細胞分析儀分析顯示, 發現添加 bFGF 與 TGF- β 1 24、36 與 48 h 後, 豬胚幹細胞未出現細胞凋亡現象, 故在細胞毒性、分化多能性與細胞凋亡等特性, 與添加 16% FBS 者無異。因此, 建議當培養系統中需以無 FBS 方式進行培養試驗時, 此無血清培養系統可做為未來豬胚幹細胞無血清培養之參考。

參考文獻

- Amit, M., M. K. Carpenter, M. S. Inokuma, C. P. Chiu, C. P. Harris, M. A. Waknitz, J. Itskovitz-Eldor and J. A. Thomson. 2000. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev. Biol.* 227: 271-278.
- Amit, M. and J. Itskovitz-Eldor. 2002. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *J. Anat.* 200: 225-232.
- Amit, M., V. Margulets, H. Segev, K. Shariki, I. Laevsky, R. Coleman and J. Itskovitz-Eldor. 2003. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* 68: 2150-2156.
- Amit, M., C. Shariki, V. Margulets and J. Itskovitz-Eldor. 2004. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* 70: 837-845.
- Chase, L. G. and M. T. Firpo. 2007. Development of serum-free culture systems for human embryonic stem cells. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11: 367-372.
- Chaudhry, M. A., T. Z. Vitalis, B. D. Bowen and J. M. Piret. 2008. Basal medium composition and serum or serum replacement concentration influences on the maintenance of murine embryonic stem cells. *Cytotechnology* 58: 173-179.
- Ellerstrom, C., R. Strehl, K. Moya, K. Andersson, C. Bergh, K. Lundin, J. Hyllner and H. Semb. 2006. Derivation of a xeno-free human ES cell line. *Stem Cells* 24: 2170-2176.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.
- Fortunel, N. O., A. Hatzfeld and J. A. Hatzfeld. 2000. Transforming growth factor beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* 96: 2022-2036.
- Greber, B., H. Lehrach and J. Adjaye. 2007. Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. *Stem Cells* 25: 455-464.
- Hovatta, O., M. Mikkola, K. Gertow, A. M. Stromberg, J. Inzunza, J. Hreinsson, B. Rozell, E. Blennow, M. Andang and L. Ahrlund-Richter. 2003. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum. Reprod.* 18: 1404-1409.
- Inzunza, J., K. Gertow, M. A. Stromberg, E. Matilainen, E. Blennow, H. Skottman, S. Wolbank, L. Ahrlund-Richter and O. Hovatta. 2005. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells* 23: 544-549.
- Koivisto, H., M. Hyvarinen, A. M. Stromberg, J. Inzunza, E. Matilainen, M. Mikkola, O. Hovatta and H. Teerijoki. 2004. Cultures of human embryonic stem cells-serum replacement medium or serum-containing media and the effect of basic fibroblast growth factor. *Reprod. Biomed. Online.* 9: 330-307.
- Lee, J. B., J. E. Lee, J. H. Park, S. J. Kim, M. K. Kim, S. I. Roh and H. S. Yoon. 2005. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition. *Biol. Reprod.* 72: 42-49.
- Liu, Y., Z. Song, Y. Zhao, H. Qin, J. Cai, H. Zhang, T. Yu, S. Jiang, G. Wang, M. Ding and H. Deng. 2006. A novel chemical-defined medium with bFGF and N2B27 supplements supports undifferentiated growth in human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346: 131-139.

- Martin, G. R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78: 7634-7638.
- Pereira, R. C., A. N. Economides and E. Canalis. 2000. Bone morphogenetic proteins induce gremlin, a protein that limits their activity in osteoblasts. *Endocrinology* 141: 4558-4563.
- Price, P., M. Goldsborough and M. Tilkins. 1998. Embryonic stem cell serum replacement. International Patent Application WO98/30679.
- Rajala, K., H. Hakala, S. Panula, S. Aivio, H. Pihlajamäki, R. Suuronen, O. Hovatta and H. Skottman. 2007. Testing of nine different xeno-free culture media for human embryonic stem cell cultures. *Hum. Reprod.* 22: 1231-1238.
- Reubinoff, B. E., M. F. Pera, C. Y. Fong, A. Trounson and A. Bongso. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* 18: 399-404.
- Richards, M., C. Y. Fong, W. K. Chan, P. C. Wong and A. Bongso. 2002. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 20: 933-936.
- Schuldiner, M., O. Yanuka, J. Itskovitz-Eldor, D. A. Melton and N. Benvenisty. 2000. Effect of eight-growth factors on the differentiation of cells derived from human ES cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 11307-11312.
- Skottman, H., A. M. Stromberg, E. Matilainen, J. Inzunza, O. Hovatta and R. Lahesmaa. 2006. Unique gene expression signature by human embryonic stem cells cultured under serum-free conditions correlates with their enhanced and prolonged growth in an undifferentiated stage. *Stem Cells* 24: 151-167.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147.
- Xu, C., M. S. Inokuma, J. Denham, K. Golds, P. Kundu, J. D. Gold and M. K. Carpenter. 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19: 971-974.
- Xu, R. H., R. M. Peck, D. S. Li, X. Feng, T. Ludwig and J. A. Thomson. 2005. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat. Methods* 2: 185-190.
- Yang, J. R., C. H. Liao, C. Y. Pang, L. L. H. Huang, Y. T. Lin, Y. L. Chen, Y. L. Shiue and L. R. Chen. 2010. Directed differentiation into neural lineages and therapeutic potential of porcine embryonic stem cells in rat Parkinson's disease model. *Cell. Reprogram.* 12: 447-461.
- Yang, J. R., Y. L. Shiue, C. H. Liao, S. Z. Lin and L. R. Chen. 2009. Establishment and characterization of novel porcine embryonic stem cell lines expressing hrGFP. *Cloning Stem Cells* 11: 235-244.
- Yao, S., S. Chen, J. Clark, E. Hao, G. M. Beattie, A. Hayek and S. Ding. 2006. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103: 6907-6912.
- Yeoh, J. S. and G. de Haan. 2007. Fibroblast growth factors as regulators of stem cell self-renewal and aging. *Mech. Ageing Dev.* 128: 17-24.

Establishment of serum-free culture system for porcine embryonic stem cells ⁽¹⁾

Jenn-Rong Yang ⁽²⁾⁽⁵⁾ Yu-Ting Lin ⁽²⁾ Yi-Lin Shieh ⁽²⁾
Lih-Ren Chen ⁽²⁾⁽³⁾ and Yi-Chiang Hsu ⁽⁴⁾

Received: Sep. 25, 2011; Accepted: Jan. 10, 2012

Abstract

The purpose of this study was to establish a stable serum-free *in vitro* culture system and to investigate the effects of serum-free, serum replacement and growth factors on the cell proliferation, efficiency of colony formation, maintenance of undifferentiation status, cytotoxicity, pluripotency, and apoptosis of porcine embryonic stem (pES) cells. The results showed that the growth curve, colony formation and undifferentiation status did not have significant improvement in the culture systems supplement with bFGF and TGF- β 1 growth factors. However, there was no difference on the LDH cytotoxicity when compared to the control. The pluripotency of pES cells showed positive staining by immunocytochemical analysis with Oct-4, AP, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, and TRA-1-81 pluripotent markers, which indicated they could maintain the pluripotency in the culture system supplemented with bFGF and TGF- β 1. There were also no apoptosis in 2, 36, and 48 hours after bFGF and TGF- β 1 supplementation. Those results provided a basis for developing a serum-free culture system for culturing porcine embryonic stem cells.

Key words: Porcine embryonic stem cells, Serum-free, Growth factor, *In vitro* culture.

(1) Contribution No. 1726 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan, R. O. C.

(2) Physiology Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R. O. C.

(3) Institute of Biotechnology, Southern Taiwan University, Tainan 710, Taiwan, R. O. C.

(4) Institute of Medical Research, Chang Jung Christian University, Gueiren, Tainan 711, Taiwan, R. O. C.

(5) Corresponding author, E-mail: jryang@mail.tlri.gov.tw