

豬胚幹細胞無飼養層培養系統之建立⁽¹⁾

楊鎮榮⁽²⁾⁽⁵⁾ 廖御靜⁽²⁾ 陳怡秀⁽²⁾ 劉仁澤⁽²⁾ 陳立人⁽²⁾⁽³⁾ 徐怡強⁽⁴⁾

收件日期：101 年 7 月 1 日；接受日期：101 年 11 月 1 日

摘 要

本試驗之目的在探討無飼養層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，期建立穩定的無飼養層體外培養系統做為胚幹細胞培養之用。試驗之豬胚幹細胞培養於小鼠胎源纖維母細胞為飼養層之培養環境，並以胚幹細胞培養液添加 16% 胎牛血清為對照組，ESM 添加 mEF 調節培養液或鹼性纖維母細胞生長因子 1 ng/mL 等不同成分，再以 laminin、collagen IV、fibronectin 及 Matrigel® 等飼養層替代性貼附物質，探討無飼養層培養系統對豬胚幹細胞體外培養系統之影響。試驗結果顯示：（1）生長曲線：ESM 添加 16% FBS 之無飼養層培養系統，其生長曲線為對照組之 0.17 – 0.26 倍；ESM 添加 16% FBS 及 mEF CM 之生長曲線為對照組之 1.00 – 1.85 倍；ESM 添加 16% FBS 及 bFGF 1 ng/mL 者則為對照組之 1.51 – 1.95 倍。（2）群落形成效率與其維持未分化狀態分析：ESM 添加 16% FBS 為培養液之無飼養層培養系統，於第 6 天時均無法維持豬胚幹細胞之正常群落形態，但添加 16% FBS 與 mEF CM 者可維持 5.6 – 11.1% 的群落效率；ESM 添加 16% FBS 及 bFGF 1 ng/mL 則可維持 5.6 – 23.5% 的群落效率。（3）LDH 毒性分析：ESM 添加 16% FBS 為培養液之無飼養層培養系統，其細胞毒性為對照組之 1.45 – 1.48 倍；ESM 添加 16% FBS 及 mEF CM 的細胞毒性為對照組之 1.38 – 1.43 倍；ESM 添加 16% FBS 及 bFGF 1 ng/mL 則為對照組之 1.37 – 1.43 倍。（4）分化多能性分析：以分化多能性標幟之抗體 Oct-4、AP、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60 及 TRA-1-81 進行染色分析，經染色後均具陽性反應，顯示無飼養層之替代性貼附物質可維持豬胚幹細胞之分化多能性。（5）細胞凋亡分析：無飼養層之替代性貼附物質對豬胚幹細胞未發現具有增加細胞凋亡現象。本試驗以 laminin、collagen IV、fibronectin 及 Matrigel® 等飼養層替代性貼附物質進行豬胚幹細胞培養，配合以 ESM 添加 16% FBS 及 bFGF 1 ng/mL 之培養液，可獲得較佳之生長曲線、群落形成、未分化狀態與較低的細胞毒性，並能維持分化多能性與避免細胞凋亡等優點，此研究結果可作為未來豬胚幹細胞無飼養層培養系統之參考。

關鍵詞：豬胚幹細胞、無飼養層、體外培養。

緒 言

自小鼠與人類胚幹細胞建立以來（Evans and Kaufman, 1981；Martin, 1981；Thomson *et al.*, 1998），胚幹細胞培養系統中，常使用添加胎牛血清以及使用經過絲裂黴素（mitomycin C）不活化處理後之小鼠胎源纖維母細胞（mouse embryonic fibroblast, mEF）為飼養層之培養系統，此體外培養系統可保有胚幹細胞的無限自我更新與維持分化多能性（pluripotency）；然而胎牛血清與小鼠胎源纖維母細胞係源自於動物細胞及其衍生物質，若以胚幹細胞移植於人體時，則有動物病原污染與免疫反應的危險性，造成胚幹細胞在治療應用上的疑慮。因此，建立無血清與無飼養層細胞的培養系統為培養胚幹細胞極欲突破的技術。

在胚幹細胞的培養系統中，常見以衍生自小鼠胎源纖維母細胞之 STO 細胞株（ATCC CRL-1503, USA）做為飼養層細胞。STO 細胞株係經過不朽化處理（immortalize），因此較初級培養的小鼠胎源纖維

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1862 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。

母細胞更易維持與繼代。使用 STO 細胞株做為飼養層進行人類胚幹細胞的培養，發現人類胚幹細胞之生長速度與分化多能性標記，均與使用初級培養的小鼠胎源纖維母細胞無異，且長期培養並未出現異常的染色體核型 (Park *et al.*, 2004)。雖然以小鼠胎源纖維母細胞作為胚幹細胞之飼養層細胞，可以維持胚幹細胞之不分化特性，並且可以移除培養系統中的代謝產物，提供胚幹細胞的良好生長環境；然而小鼠胎源纖維母細胞亦屬於動物來源之細胞，會有動物性病源污染之疑慮；且若以無飼養層體外培養系統，將來於幹細胞移植治療試驗時，可避免來自飼養層細胞之干擾，並可減化操作流程。因此，近年來胚幹細胞培養系統發展之目標主要為：(1) 以無飼養層培養系統維持胚幹細胞之正常生長；(2) 以無飼養層培養系統維持胚幹細胞之未分化狀態；(3) 使用人類胎源纖維母細胞、成體輸卵管上皮細胞或成體包皮細胞做為飼養層細胞，以達成無飼養層培養之目標 (Amit *et al.*, 2000；Xu *et al.*, 2001；Richards *et al.*, 2002；Hovatta *et al.*, 2003；Inzunza *et al.*, 2005)。

為建立胚幹細胞之無飼養層培養系統，常用細胞外間質 (extracellular matrix) 組成分如 laminin、collagen IV 與 fibronectin 做為替代性貼附物質，以培養不易貼附的胚幹細胞或是誘導多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS cell)。文獻報告指出，培養系統中先以替代性貼附物質處理後，可促進胚幹細胞之細胞生長並維持未分化狀態 (Rodin *et al.*, 2010；Bergström *et al.*, 2011)。此外一種合成的細胞外間質 – Matrigel[®]，此產品是製造商從 Engelbreth-Holm-Swarm 腫瘤細胞的細胞外間質所萃取出來的物質 (Kleinman *et al.*, 1982)，大部分的組成是 laminin 與 collagen。Matrigel[®] 因成分固定而避免了實驗批次間的差異，提供做為胚幹細胞培養時的替代飼養層物質時，可維持小鼠或人類胚幹細胞之自我更新與分化多能性 (Ullmann *et al.*, 2007)。因此本研究擬以 laminin、collagen IV、fibronectin 以及 Matrigel[®] 等作為無飼養層培養系統之替代性貼附物質，探討無飼養層之培養系統對維持豬胚幹細胞增生、群落形成、不分化狀態、分化多能性與細胞凋亡之影響，期建立穩定的無飼養層培養系統，以做為胚幹細胞培養之用。

材料與方法

I. 培養攜帶綠色螢光蛋白質基因 (green fluorescent protein, GFP) 之豬胚幹細胞 (porcine embryonic stem cells, pES cells)

攜有 GFP 報導基因之豬胚幹細胞 (pES/GFP⁺) 之衍生與培養係參照 Yang *et al.* (2009；2010) 所建立之方法進行。幹細胞培養液 (ESM) 使用 DMEM (DMEM, high glucose, no pyruvate, Invitrogen, NY, USA) 添加 16% FBS (Invitrogen)、0.1 mM β - 巰基乙醇 (beta-2-mercaptoethanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、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，細胞培養於 37°C 與含 5% CO₂ 的培養箱。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 STO 小鼠胎源纖維母細胞株為飼養層細胞 (ATCC CRL-1503, USA)，培養期間觀察胚幹細胞生長情況，使細胞穩定生長以供日後分析。

II. 無飼養層培養試驗

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 ESM 培養液含有 16% FBS 之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) 對照組：以 STO 小鼠胎源纖維母細胞株飼養層
- (ii) 處理組：以 laminin (20 μ g/mL, Sigma-Aldrich)、collagen IV (10 μ g/mL, Sigma-Aldrich)、fibronectin (5 μ g/mL, Sigma-Aldrich) 以及 Matrigel[®] (Becton Dickinson, Bedford, MA, USA. 1 : 20, diluted in DMEM) 等替代性貼附物質為無飼養層培養系統。
- (iii) 培養液：培養液 1：ESM 添加 16% FBS
(ESM + 16% FBS)
培養液 2：ESM 添加 16% FBS 與 10% mEF 飼養層細胞培養 4 天後取其上清液所製備而成的調節培養液 (mEF Conditioned Medium, mEF CM)
(ESM + 16% FBS + mEF CM)

培養液 3：ESM 添加 16% FBS 與 bFGF (1 ng/mL, Sigma-Aldrich)
(ESM + 16% FBS + bFGF)

並於更換不同培養液後，於試驗第 0 與 6 天時分別計算細胞數目並觀察豬胚幹細胞群落生長形態之變化，以瞭解不同的無飼養層培養系統對豬胚幹細胞生長之影響。

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 trypan blue 計算細胞總數與存活率。所得之結果以含有 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. 群落形成效率與未分化狀態維持分析

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，於顯微鏡下觀察胚幹細胞是否形成典型的群落型態，以計算群落形成之數量；並且由胚幹細胞群落與飼養層細胞之界線是否消失等特徵，判斷胚幹細胞群落是否已出現分化現象，若此界線不明顯或是已消失時，則表示胚幹細胞處於分化中或是已分化狀態。所得之結果以含有 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未分化群落比例之比例。

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 (catalyst, 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，以得知添加無飼養層培養系統對豬胚幹細胞之細胞毒性影響。所得之結果以含有 16% FBS 之 ESM 培養液之正常培養系統做為對照組，統計細胞毒性之倍數。

VI. 分化多能性分析

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 (CoolSNAPHQ2 Monochrome, Photometrics, USA) 與分析處理系統 MetaMorph 6.Or5 (Universal Imaging, USA) 記錄結果。

VII. 細胞凋亡分析

細胞凋亡之分析係利用流式細胞分析儀 (FACSCalibur Flow Cytometry, BD Biosciences, CT, USA) 進行。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乾。此外，細胞凋亡的早期時，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。分析後數據使用 Cellquest Pro 軟體進行分析，以得知無飼養層培養系統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) 模式進行統計分析 (SAS Enterprise Guide 4.1. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA)，當 $P < 0.05$ 則為差異顯著性。

結果與討論

本研究以 laminin、collagen IV、fibronectin 及 Matrigel® 作為培養系統之替代性貼附物質，探討無飼養層培養系統對豬胚幹細胞體外增生、群落形成、未分化狀態、分化多能性與細胞凋亡之影響。試驗結果為：

I. 生長曲線

- (i) ESM 添加 16% FBS 為培養液之無飼養層培養系統，於第 6 天時之生長曲線為對照組之 0.17 – 0.26 倍，均顯著低於對照組以 mEF 細胞為飼養層者 ($P < 0.05$) (表 1)。
- (ii) ESM 添加 16% FBS 及 mEF CM 之無飼養層培養系統，於第 6 天時之生長曲線為對照組之 1.00 – 1.85 倍，除了以 collagen 進行無飼養層之培養結果與對照組無顯著差異外，其餘各組均高於對照組以 mEF 細胞為飼養層者 ($P < 0.05$) (表 1)。
- (iii) ESM 添加 16% FBS 及 bFGF 1 ng/mL 為培養液之無飼養層培養系統，於第 6 天時之生長曲線為對照組之 1.51 – 1.95 倍，均顯著高於對照組以 mEF 細胞為飼養層者 ($P < 0.05$) (表 1)。

II. 群落形成效率與未分化狀態維持分析

- (i) ESM 添加 16% FBS 為培養液之無飼養層培養系統，於第 6 天時均無法維持豬胚幹細胞之群落形成，豬胚幹細胞群落完全失去未分化幹細胞群落形態，顯著差於對照組 ($P < 0.05$) (表 2)。
- (ii) ESM 添加 16% FBS 及 mEF CM 之無飼養層培養系統，於第 6 天時雖可維持 5.6 – 11.1% 的群落效率，然而以 Matrigel® 培養之組別亦完全失去未分化幹細胞群落之形態，上述結果均顯著差於對照組 ($P < 0.05$) (表 2)。
- (iii) ESM 添加 16% FBS 及 bFGF 1 ng/mL 為培養液之無飼養層培養系統，於第 6 天時則可維持 5.6 – 23.5% 的群落效率，其中以 laminin 與 collagen 培養之豬胚幹細胞之未分化幹細胞群落雖優於以 fibronectin 與 Matrigel® 者，然其效果仍顯著差於對照組 ($P < 0.05$) (表 2)。

III. LDH 毒性分析

- (i) ESM 添加 16% FBS 為培養液之無飼養層培養系統，第 6 天時所產生的細胞毒性達 1.45 – 1.48 倍，顯著高於對照組 ($P < 0.05$)，顯示對於豬胚幹細胞有細胞毒性之產生 (表 3)。
- (ii) ESM 添加 16% FBS 及 mEF CM 之無飼養層培養系統，第 6 天時所產生的細胞毒性達 1.38 – 1.43 倍，顯著高於對照組 ($P < 0.05$)，顯示對於豬胚幹細胞有細胞毒性之產生 (表 3)。
- (iii) ESM 添加 16% FBS 及 bFGF 1 ng/mL 為培養液之無飼養層培養系統，第 6 天時所產生的細胞毒性達 1.37 – 1.43 倍，顯著高於對照組 ($P < 0.05$)，顯示對於豬胚幹細胞有細胞毒性之產生 (表 3)。

IV. 分化多能性分析

以分化多能性抗體 Oct-4、AP、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60 及 TRA-1-81 進行豬胚幹細胞群落之分化多能性分析，經染色後均具陽性反應之結果，顯示以 laminin、collagen IV、fibronectin 及 Matrigel® 等替代性貼附物質之無飼養層培養系統，可維持豬胚幹細胞之分化多能性 (圖 1)。

表 1. 無飼養層體外培養系統對豬胚幹細胞培養生長曲線之影響 (mean \pm SEM)Table 1. The effects of feeder-free in vitro culture systems on the growth curve of pES cells (mean \pm SEM)

Basal medium	Feeder types	D0	D6
Medium 1			
ESM + 16% FBS	mEF	1.00	1.00 ^a
	Laminin	0.94 \pm 0.09	0.26 \pm 0.06 ^b
	Collagen	0.90 \pm 0.10	0.22 \pm 0.04 ^b
	Fibronectin	0.97 \pm 0.08	0.25 \pm 0.06 ^b
	Matrigel [®]	0.94 \pm 0.08	0.17 \pm 0.03 ^b
Medium 2			
ESM + 16% FBS + mEF CM	mEF	1.00	1.00 ^a
	Laminin	0.96 \pm 0.28	1.54 \pm 0.16 ^b
	Collagen	1.09 \pm 0.23	1.00 \pm 0.25 a
	Fibronectin	1.04 \pm 0.40	1.85 \pm 0.22 ^b
	Matrigel [®]	1.07 \pm 0.21	1.67 \pm 0.15 ^b
Medium 3			
ESM + 16% FBS + bFGF	mEF	1.00	1.00 ^a
	Laminin	1.01 \pm 0.14	1.82 \pm 0.33 ^{b, c}
	Collagen	0.95 \pm 0.07	1.95 \pm 0.25 ^c
	Fibronectin	1.06 \pm 0.17	1.51 \pm 0.23 ^b
	Matrigel [®]	1.08 \pm 0.11	1.87 \pm 0.08 ^c

^{a, b, c} Values (mean \pm SEM) in the column within the same basal medium group without common superscripts were significantly different compared to the mEF feeder group ($P < 0.05$).

表 2. 無飼養層體外培養系統對豬胚幹細胞群落形成效率與未分化狀態維持之影響 (mean \pm SEM)Table 2. The effects of feeder-free in vitro culture systems on the colony formation and maintenance of undifferentiation status of pES cells (mean \pm SEM)

Basal medium	Feeder types	D0	D6
Medium 1			
ESM + 16% FBS	mEF	33.3 \pm 17.7 ^a	95.0 \pm 3.7 ^a
	Laminin	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b
	Collagen	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b
	Fibronectin	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b
	Matrigel [®]	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b
Medium 2			
ESM + 16% FBS + mEF CM	mEF	38.9 \pm 16.2 ^a	77.4 \pm 16.4 ^a
	Laminin	0.0 \pm 0.0 ^b	9.3 \pm 6.7 ^b
	Collagen	0.0 \pm 0.0 ^b	11.1 \pm 8.8 ^b
	Fibronectin	0.0 \pm 0.0 ^b	5.6 \pm 4.9 ^b
	Matrigel [®]	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b
Medium 3			
ESM + 16% FBS + bFGF	mEF	55.2 \pm 10.7 ^a	71.9 \pm 11.3 ^a
	Laminin	0.0 \pm 0.0 ^b	16.6 \pm 7.4 ^c
	Collagen	0.0 \pm 0.0 ^b	23.5 \pm 9.1 ^c
	Fibronectin	0.0 \pm 0.0 ^b	11.6 \pm 6.2 ^b
	Matrigel [®]	0.0 \pm 0.0 ^b	5.6 \pm 3.6 ^b

^{a, b, c} Values (mean \pm SEM) in the column within the same basal medium group without common superscripts were significantly different compared to the mEF feeder group ($P < 0.05$).

表 3. 無飼養層體外培養系統對豬胚幹細胞群落 LDH 細胞毒性之影響 (mean \pm SEM)Table 3. The effects of feeder-free in vitro culture systems on the LDH cytotoxicity of pES cells (mean \pm SEM)

Basal medium	Feeder types	D0	D6
Medium 1			
ESM + 16% FBS	mEF	1.00 ^a	1.00 ^a
	Laminin	1.29 \pm 0.01 ^b	1.46 \pm 0.05 ^b
	Collagen	1.13 \pm 0.02 ^b	1.47 \pm 0.05 ^b
	Fibronectin	1.14 \pm 0.01 ^b	1.48 \pm 0.05 ^b
	Matrigel [®]	1.14 \pm 0.01 ^b	1.45 \pm 0.05 ^b
Medium 2			
ESM + 16% FBS + mEF CM	mEF	1.00 ^a	1.00 a
	Laminin	1.05 \pm 0.01 ^a	1.43 \pm 0.09 ^b
	Collagen	1.06 \pm 0.02 ^a	1.38 \pm 0.05 ^b
	Fibronectin	1.06 \pm 0.02 ^a	1.40 \pm 0.05 ^b
	Matrigel [®]	1.05 \pm 0.02 ^a	1.43 \pm 0.06 ^b
Medium 3			
ESM + 16% FBS + bFGF	mEF	1.00 ^a	1.00 ^a
	Laminin	1.09 \pm 0.03 ^{a, b}	1.38 \pm 0.07 ^b
	Collagen	1.15 \pm 0.05 ^b	1.37 \pm 0.07 ^b
	Fibronectin	1.14 \pm 0.03 ^b	1.43 \pm 0.07 ^b
	Matrigel [®]	1.11 \pm 0.03 ^b	1.40 \pm 0.07 ^b

^{a, b} Values (mean \pm SEM) in the column within the same basal medium group without common superscripts were significantly different compared to the mEF feeder group ($P < 0.05$).

V. 細胞凋亡分析

利用流式細胞分析儀進行豬胚幹細胞之細胞凋亡分析，經分析後細胞的分析點均集中分佈於的第三象限中，與對照組之結果相近，顯示以 laminin、collagen IV、fibronectin 及 Matrigel[®] 等替代性貼附物質之無飼養層培養系統，對豬胚幹細胞未見細胞凋亡之現象（圖 2）。

本研究以 laminin、collagen IV、fibronectin 及 Matrigel[®] 等作為無飼養層培養系統之替代性貼附物質，並以 ESM 添加 16% FBS、mEF CM 及 bFGF 1 ng/mL 為不同培養液組成，探討無飼養層之培養系統對豬胚幹細胞體外增生、群落形成、未分化狀態維持、分化多能性與細胞凋亡之影響，期建立穩定的無飼養層體外培養系統，做為胚幹細胞培養之用。先前的研究發現，人類胚幹細胞（human embryonic stem cell, hESC）若經無飼養層培養系統培養將導致自發性分化（spontaneous differentiation）（Xu *et al.*, 2001；Rosler *et al.*, 2004；Stojkovic *et al.*, 2005；Ludwig *et al.*, 2006），若無添加調節培養液，hESC 於培養 48 小時後將全部分化（Xu *et al.*, 2005）。而 hESC 培養於含細胞外間質與調節培養液之系統中，分化之 hESC 呈類似纖維母細胞狀，並圍繞著未分化之 hESC 群落。此現象為細胞進行上皮細胞 - 間質細胞之過渡轉型（epithelial-mesenchymal transition, EMT）之分化過程，即細胞所擁有之上皮細胞特性轉變為間質細胞特性時，過程中改變了細胞形態與增加遷移能力等（Guarino, 1995; Lee *et al.*, 2006），hESC 直接培養於此種培養系統，將增加 EMT 轉化過程，進而促進幹細胞之分化（Philp *et al.*, 2005；Ludwig *et al.*, 2006；Ullmann *et al.*, 2007）。此外，不同的細胞外間質其蛋白質組成亦不同，可產生不同的生化訊息引起特定的分化路徑（Philp *et al.*, 2005）。

常見的無飼養層體外培養系統中於培養皿中使用 Matrigel[®] 以替代飼養層細胞。Chunhui *et al.* (2001) 以 Matrigel[®] 或 gelatin 代替飼養層細胞，並以經 mEF 調節培養液培養 hESC，發現其群落起初較以飼養層細胞培養者為小且鬆散，培養數代後群落大小與數目始慢慢地增加並趨於緊實，而分化之 hESCs 同樣有圍繞未分化之 hESC 的現象；相反地，本實驗結果顯示，以 Matrigel[®] 代替飼養層細胞並以 mEF 調節培養液或直接添加 bFGF 培養 pES 細胞，雖此條件皆可維持其生長，然無法有效維持未分化狀態。此原因或許為物種間最適條件的差異性所致，例如 Matrigel[®] 滲透壓條件不適合 pES 細胞。Matrigel[®] 組成成分除含

laminin 與 collagen IV 外，尚有少量的 heparan sulfate proteoglycan 與 fibronectin 等，其中 laminin 為小鼠胚胎 2 至 4 細胞期時表現的細胞外間質蛋白，亦為脊椎動物 basal lamina 的細胞外間質組成分之一（Cooper *et al.*, 1983；Ekblom *et al.*, 1986），藉由與細胞表面之 integrin heterodimers（如 $\alpha 1 \beta 1$ 、 $\alpha 2 \beta 1$ 、 $\alpha 3 \beta 1$ 、 $\alpha 6 \beta 1$ 及 $\alpha 6 \beta 4$ ）作用，可促進細胞黏附、生長與遷移等。Collagen IV 則可促進中胚層發育，誘導小鼠與人類胚胎幹細胞分化成內皮、心血管與造血細胞等（Giorgia *et al.*, 2011）。

Fibronectin 亦為 basal lamina 的組成分之一，常用來增加細胞與培養皿的黏附程度（Schuldiner *et al.*, 2000），其亦經由與 integrin 受體作用，調節細胞與細胞外間質蛋白的黏附力。此外 integrin 亦會引發一連串訊息傳遞，進而調節細胞增生、凋亡、形態、極性、運動力、基因表現與分化等（Hynes, 2002）。hESC 培養於 laminin、fibronectin 或 collagen IV，同樣可得到未分化之群落，然以 fibronectin 或 collagen IV 培養，其未分化之群落數目較以 Matrigel® 或 laminin 培養者少。此外，以 Matrigel® 或 laminin 代替飼養層細胞，但未以 mEF 調節培養液培養 hESC，培養兩代後將全部分化。故 Matrigel® 或 laminin 尚必需與 mEF 條件化培養液配合，方能支持胚幹細胞於未分化狀態（Chunhui *et al.*, 2001）。

培養胚幹細胞需提供飼養層細胞或額外添加調節培養液（Xu *et al.*, 2001）。飼養層細胞所分泌的因子，有些已知可抑制細胞分化，然許多因子尚未完全瞭解（Amit *et al.*, 2004；Sato *et al.*, 2004；Xu *et al.*, 2005）。若未額外添加調節培養液，直接添加鹼性 FGF 亦可促進 hESC 增殖（Wang *et al.*, 2005；Xu *et al.*, 2005），故無飼養層的培養系統中常添加 bFGF，以促進胚幹細胞之遷移、增生以及分化等現象。來自纖維母細胞之生長因子主要由多胜肽所組成，而其中酸性 FGF（acidic FGF, aFGF）與鹼性 FGF 最被廣泛探討與應用。在訊息傳遞上，FGF 可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。本試驗結果顯示，無飼養層培養系統中添加 bFGF 1 ng/mL 於培養第 6 天時，豬胚幹細胞生長曲線最高可達對照組之 1.95 倍，且可維持 5.6 – 23.5% 之群落效率，故 bFGF 於胚幹細胞培養系統中，可維持胚幹細胞於不分化狀態，為無飼養層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）。此外，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亦扮演著重要的角色（Fortunel *et al.*, 2000），主要可抑制內胚層與外胚層細胞之分化，但可促進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）。在人類胚幹細胞無飼養層培養系統中，添加 bFGF 與 TGF- β 1 可以維持其生長與分化多能性長達 6 個月之久（Amit *et al.*, 2004）。

本試驗之 LDH 細胞毒性與細胞凋亡分析結果顯示，無飼養培養系統雖增加細胞毒性，然細胞並無凋亡現象，亦皆能表現 Oct-4、AP、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60 及 TRA-1-81 等分化多能性標記，顯示此培養系統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，發現以無飼養培養系統培養之豬胚幹細胞未出現細胞凋亡現象，故在 LDH 細胞毒性、分化多能性與細胞凋亡等特性，均與對照組 ESM 添加 16% FBS 者無異。故本試驗所使用之飼養層替代物質進行豬胚幹細胞培養，配合以 ESM 添加 16% FBS 及 bFGF 1 ng/mL 之培養液，可獲得較佳之生長曲線、群落形成、未分化效率與降低細胞毒性，並能維持分化多能性與避免細胞凋亡等優點。因此，此一無飼養培養系統可做作為進行豬胚幹細胞研究之體外培養系統。

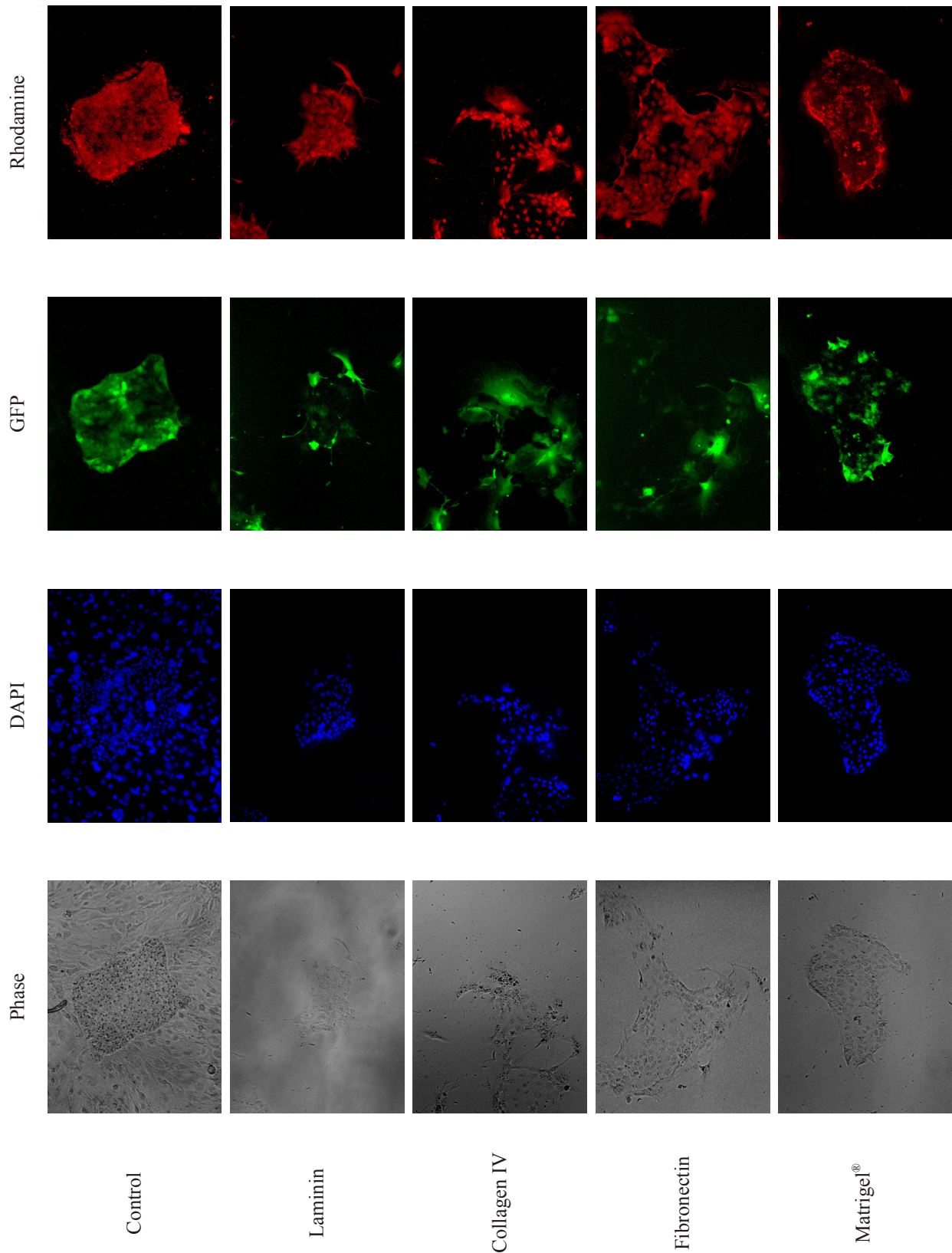


圖 1. 以無飼養層培養系統培養豬胚幹細胞第 6 天之群落，經分化多能性抗體 Oct-4 染色後具陽性反應，顯示可維持豬胚幹細胞之分化多能性。

Fig. 1. The colony of pES cells showed positive staining detected by immunocytochemical analysis with Oct-4 pluripotent marker and those results indicated they can maintain pluripotency after 6 days culture in the feeder-free *in vitro* culture system.

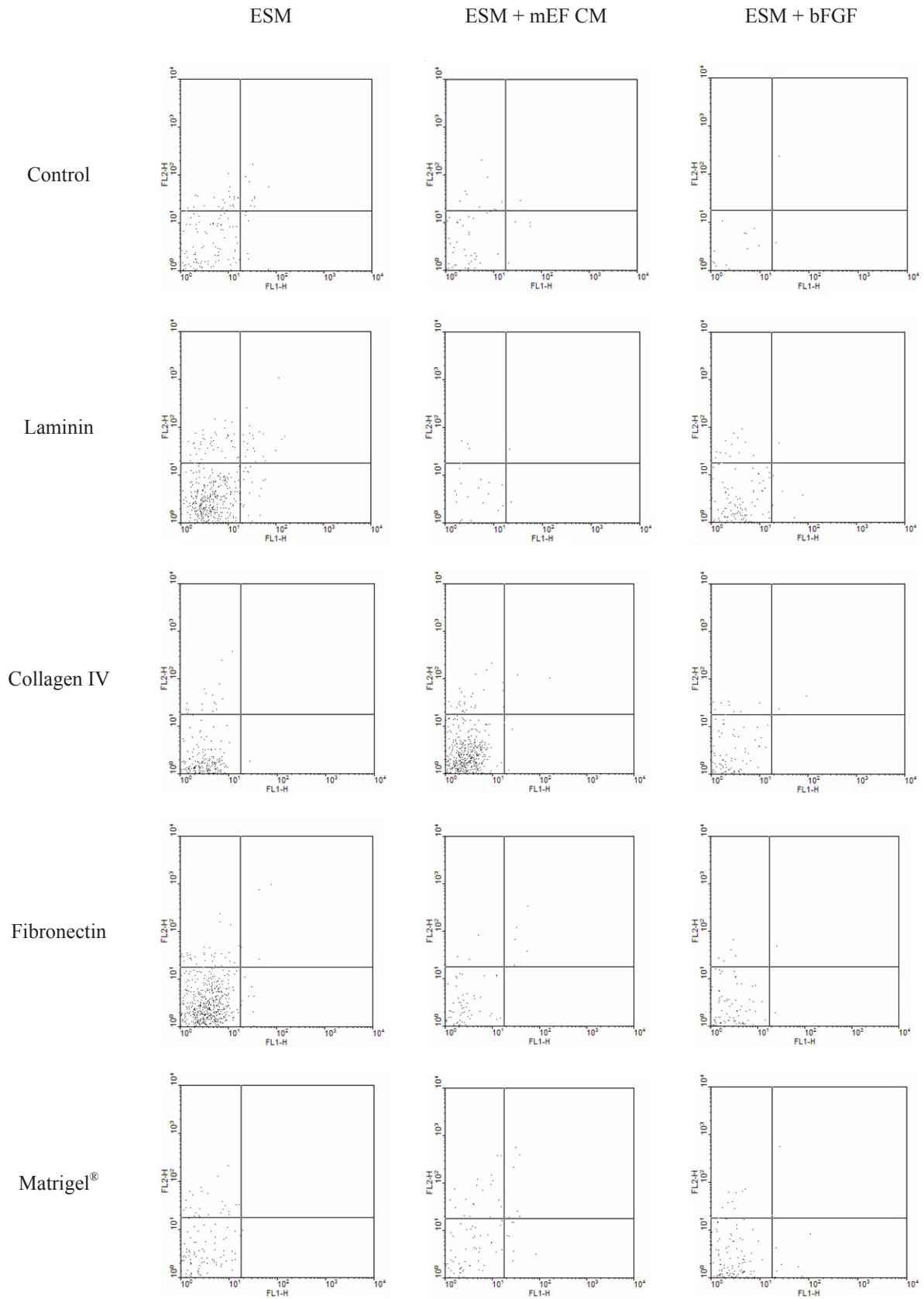


圖 2. 利用流式細胞分析儀進行豬胚幹細胞之細胞凋亡分析。豬胚幹細胞的分析點均集中分佈於第三象限中，與對照組之結果相近，顯示豬胚幹細胞未出現細胞凋亡現象。

Fig. 2. The apoptosis analysis of porcine embryonic stem cells detected by flow cytometry. All of the analysis dots distributing in the third quadrant were similar with control group, and that showed no apoptosis in porcine embryonic stem cells.

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., 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.
- Bergström, R., S. Ström, F. Holm, A. Feki and O. Hovatta. 2011. Xeno-free culture of human pluripotent stem cells. *Methods Mol. Biol.* 767: 125-136.
- Chunhui, X., 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.
- Cooper, A. R. and H. A. MacQueen. 1983. Subunits of laminin are differentially synthesized in mouse eggs and early embryos. *Dev. Biol.* 96: 467-471.
- Eklblom, P., D. Vestweber and R. Kemler. 1986. Cell-matrix interactions and cell adhesion during development. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2: 27-47.
- 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.
- Giorgia, S., S. Burton¹, C. A. Daigh, D. Rajesh, I. I. Slukvin and N. J. Seay. 2011. A defined, feeder-free, serum-free system to generate *in vitro* hematopoietic progenitors and differentiated blood cells from hESCs and hiPSCs. *PLoS one* 6: e17829.
- Guarino, M. 1955. Epithelial-to-mesenchymal change of differentiation. *Histol. Histopathol.* 10: 171-184.
- 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.
- Hynes, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673-687.
- 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.
- Kleinman, H. K., M. L. McGarvey, L. A. Liotta, P. G. Robey, K. Tryggvason and G. R. Martin. 1982. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin and heparin sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 21: 6188-6193.
- Lee, J. M., S. Dedhar, R. Kallouri and E. W. Thompson. 2006. The epithelial mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J. Cell Biol.* 172: 973-981.
- 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.
- Ludwig, T. E., M. E. Levenstein, J. M. Jones, W. T. Berggen, E. R. Mitchen, J. L. Frane, L. J. Crandall, C. A. Daigh, K. R. Conard, M. S. Piekarczyk, R. A. Llanas and J. A. Thomson. 2006. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* 24: 185-187.
- 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.
- Park, S. P., Y. J. Lee, K. S. Lee, H. Ah Shin, H. Y. Cho, K. S. Chung, E. Y. Kim and J. H. Lim. 2004. Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO feeder layers. *Hum. Reprod.* 19: 676-684.

- 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.
- Philp, D., S. S. Chen, W. Fitzgerald, J. Orenstein, L. Margolis and H. K. Kleinman. 2005. Complex extracellular matrices promote tissue-specific stem cell differentiation. *Stem Cells* 23: 288-296.
- 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.
- Rodin, S., A. Domogatskaya, S. Ström, E. M. Hansson, K. R. Chien, J. Inzunza, O. Hovatta and K. Tryggvason. 2010. Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511. *Nat. Biotechnol.* 28: 611-615.
- Rosler, E. S., G. J. Fisk, X. Ares, J. Irving, T. Miura, M. S. Rao and M. K. Carpenter. 2004. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev. Dyn.* 229: 259-274.
- Sato, N., L. Meijer, L. Skaltsounis, P. Greengard and A. H. Brivanlou. 2004. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* 10: 55-63.
- 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.
- Stojkovic, P., M. Lako, R. Stewart, S. Przyborski, L. Armstrong, J. Evans, A. Murdoch, T. Strachan and M. Stojkovic. 2005. An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23: 306-314.
- 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.
- Ullmann, U., P. In't Veld, C. Gilles, K. Sermon, M. De Rycke, H. Van de Velde, A. Van Steirteghem and I. Liebaers. 2007. Epithelial-mesenchymal transition process in human embryonic stem cells cultured in feeder-free conditions. *Mol. Hum. Reprod.* 13: 21-32.
- Wang, G., H. Zhang, Y. Zhao, J. Li, J. Cai, P. Wang, S. Meng, J. Feng, C. Miao, M. Ding, L. Dongsheng and D. Hongkui. 2005. Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330: 934-942.
- 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, C., E. Rosler, J. Jiang, J. S. Lebkowski, J. D. Gold, C. O' Sullivan, K. Delavan-Boorsma, M. Mok, A. Bronstein and M. K. Carpenter. 2005. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells* 23: 315-323.
- 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.
- 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 feeder-free culture system for porcine embryonic stem cells⁽¹⁾

Jenn-Rong Yang⁽²⁾⁽⁵⁾ Yu-Jing Liao⁽²⁾ Yi-Shiou Chen⁽²⁾ Ren-Ze Liu⁽²⁾
Lih-Ren Chen⁽²⁾⁽³⁾ and Yi-Chiang Hsu⁽⁴⁾

Received: Jul. 1, 2012; Accepted: Nov. 1, 2012

Abstract

The purposes of this study were to establish a stable feeder-free in vitro culture system and to investigate the effects of laminin (20 mg/mL), collagen IV (10 mg/mL), fibronectin (5 mg/mL) and Matrigel® (1:20) on the cell proliferation, colony formation, undifferentiation status, pluripotency, and apoptosis of porcine embryonic stem cells. The results shown: (1) Growth curve: the growth curves in the feeder-free culture systems which containing 16% FBS, 16% FBS supplemented with mEF conditional medium, and 16% FBS supplemented with bFGF 1 ng/mL were 0.17-0.26, 1.00-1.85 and 1.51-1.95 fold, respectively. (2) Colony efficiency and maintain undifferentiation status: the ESM supplemented with 16% FBS could not maintain the undifferentiated status of pES colonies. The colony efficiency of ESM containing 16% FBS, supplemented with mEF conditional medium or bFGF 1 ng/mL were 5.6-11.1% and 5.6-23.5%, respectively. (3) LDH toxicity: the LDH toxicity shown 1.45-1.48, 1.38-1.43, and 1.37-1.43 fold between the three different medium. (4) Pluripotency: the feeder-free culture system shown positive staining by ICC analysis with Oct-4, AP, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, and TRA-1-81 pluripotent markers, that indicated they could maintain the pluripotency of pES colonies. (5) Apoptosis analysis: there were no apoptosis when used laminin, collagen IV, fibronectin and Matrigel® as feeder-free culture system. Those results could provide as feeder-free culture system for culturing porcine embryonic stem cells. Porcine embryonic stem cells cultured on feeder replacement and ESM containing 16% FBS and bFGF 1 ng/mL in this study performed the better growth curve, colony formation, undifferentiation status, and low cytotoxicity. Furthermore, this strategy could maintain pluripotency and avoid apoptosis. The stable feeder-free culture system can provide as an optimal system for culturing porcine embryonic stem cells.

Key words: Porcine embryonic stem cell, Feeder-free, *In vitro* culture.

(1) Contribution No. 1862 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physiology Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 71246, Taiwan, R.O.C.

(3) Institute of Biotechnology, Southern Taiwan University, Tainan 71005, Taiwan, R.O.C.

(4) Institute of Medical Research, Chang Jung Christian University, Gueiren, Tainan 71101, Taiwan, R.O.C.

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