台灣二００五年國際科學展覽會

科　　別：醫學與健康科學

作品名稱：嘗試從小鼠胚胎幹細胞培養成生殖細胞

學　　校：國立臺南第一高級中學

作　　者：黃智彥

自　傳

我是黃智彥，來自台南一中。我喜歡新的知識，勇於接受挑戰，且靠自己的努力來解決問題。可能是耳濡目染於父親和姨丈們的醫學工作，我從小就醉心於人體健康或與生物有關的知識，期待有一天也能進入學術的殿堂，探討生命科學的奧秘。這次參與胚胎幹細胞的實驗，正是新知識與大挑戰的代表，實驗操作的過程很新鮮，也很有趣，覺得獲益良多。

作品名稱：嘗試從小鼠胚胎幹細胞培養成生殖細胞

壹、 中英文摘要：

一、 Abstract：

Scientists discovered ways to obtain or derive stem cells from early ***mouse*** embryos more than 20 years ago. Many years of detailed study of the biology of mouse stem cells led to the discovery of ***human*** embryonic stem cells in 1998. Through years of experimentation scientists have established some basic protocols or "recipes" for the directed differentiation of embryonic stem cells into some specific cell types. One major problem that must be solved before human stem cell therapy becomes a reality is the threat of rejection of the transplanted cells by the host's immune system. One way to avoid the problem of rejection is to use stem cells that are genetically identical to the host. This could be achieved by the same techniques of somatic cell nuclear transplantation (SCNT) that produced Dolly. Low efficiency less than 0.5% (1/242) in Korea this March brought some controversies in ethical issues. Where and how to procure the large amount of oocytes that will be required? One source of eggs could come from the generation of oocytes from embryonic stem cells (ESCs), as described by Hübner *et al*. (2003) in the mouse. By the selection of primordial germ cells (PGCs) and re-aggregation with their stromal cells, we hope to derive mature germ cells such as oocytes and sperm from ESCs in this study. In this study, we have demonstrated some PGCs after sequential selection by SSEA-1 antigen and optimal culture conditions. We also proved some FE-J1 positive cells but no further fertilization was obtained after all. Further investigation about this mechanism may be needed to derive these germ cells from ESCs.

二、 中文摘要

許多難纏的疾病，如神經退化性疾病與糖尿病，在 1998 年建立人類的胚胎幹細胞後，開始露出一線曙光。但就算科學家已經從胚胎幹細胞，成功引導出特殊種類與功能的細胞，預備做細胞治療時，需透過細胞核移植技術，使排斥的情形大大減少。所以當今年 3 月，韓國透過細胞核移植技術成功作出人類的胚胎幹細胞株時，轟動全世界。但是，他們從 242 顆卵，只做出一個胚胎幹細胞株，浪費這麼多卵子就牽涉到醫療倫理的層面了。既然，每一個人都要訂製自己的幹細胞株，那麼卵子的來源就很重要了。理論上，胚胎幹細胞可以分化成所有細胞與組織，當然也應該含生殖細胞在內。去年 5 月底，賓州大學就利用小鼠胚胎幹細胞，體外培養出型態上非常像卵子的細胞。所以，今年暑假利用兩個月時間，有個機會參與了台大醫學院婦產科的胚胎幹細胞研究團隊，稍稍瞭解了胚胎幹細胞製造成生殖細胞的過程。我們採取一種方法，先從胚胎幹細胞株，用類胚胎體(EB)的立體環境，加上 SSEA-1 的篩選，與維他命 A 的刺激，引導至初始生殖細胞，第二步利用細胞重組的方法，利用小鼠胚胎的性腺組織，來支持這些選擇過的細胞，希望可以培養出小鼠的卵子或精子。我們從 EB 得到 SSEA-1 細胞約為全體細胞的 10%，然後經過維他命 A 的刺激，得到 SSEA-1 細胞約為全體細胞的 5%，這時的細胞理論上是初始生殖細胞 (PGC)，但是之後的體外單獨培養或與胚胎性腺重組培養，發現成果並不是很理想。到最後，也許受限於時間還有能力，沒有得到明確的小鼠生殖細胞，但是過程中，我學習到生殖細胞的生理，胚胎幹細胞的特性，基本實驗室的細胞培養與組織染色，這些都令我印象深刻。我們認為，如果有一個適當的基因轉植的胚胎幹細胞株，例如 GFP 放進生殖細胞相關的基因裡頭，讓達到終點，或邁向目標的細胞群，可以自我顯現，實驗會更容易達成目標。

貳、內文

一、研究動機與目的

胚胎(embryo)是什麼呢？根據歐洲生殖內分泌學會（ESHRE）的定義，受精卵(zygote)是由卵子與精子受精而來，而分裂(cleavage)指的是由 zygote 細胞分裂而成一個一個的胚胎細胞(blastomeres)，大約受精三天後，當 12-16 個胚胎細胞形成實心個體，則稱之為桑椹胚(morula)，慢慢地胚胎中間有腔形成，這時候叫囊胚期(blastocyst stage) (見 Figure 1)，有三層胚胎板形成並原腸發生，叫做原腸胚(gastrula)，神經板包起來成為神經管，這時叫神經胚(neurula)，在受精後八週以前都稱之為胚胎(ESHRE, 2001)。

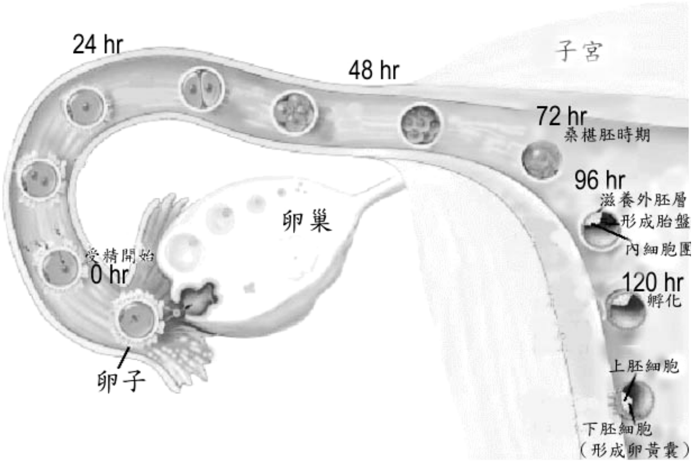


Figure 1 人類卵子從卵巢排出之後 12 小時內會受精，受精以後形成受精卵(zygote)，經過 20 小時左右會成為 4-cell 的胚胎，再過 48 小時就有囊胚(blastocyst)的形成，後來胚胎會孵出(hatching)，其中的滋養層細胞(trophectoderm)會變成胎盤，固定在子宮內膜上。

幹細胞（stem cells）是什麼呢？就是那些具有無限或可被延長自我修復能力的細胞，且能夠形成至少一種高分化的組織(Watt *et al.*, 2000)。在哺乳類動物身上，不論是從最早的胚胎時期，還是到成年期，都可以發現幹細胞，但是其潛能不同，例如受精卵是可以分化成完整的個體，所以稱之為全能的(totipotent)幹細胞；而胚胎幹細胞(ESC, embryonic stem cell)則次之，可以分化除了胎盤組織之外的所有細胞，謂之多能的(pluripotent) 幹細胞；還有一種取自於非常早期的流產胚胎的性腺組織，稱之為胚胎生殖細胞(EGC, embryonal germ cell)，也屬多能的幹細胞。至於最近在台灣流行的臍帶血幹細胞，或醫院行之多年的骨髓移植幹細胞，甚至脂肪、性腺組織找到的都屬於成體幹細胞，是多效性(multipotent)幹細胞。(見 Figure 2) (Anderson *et al*, 2001)

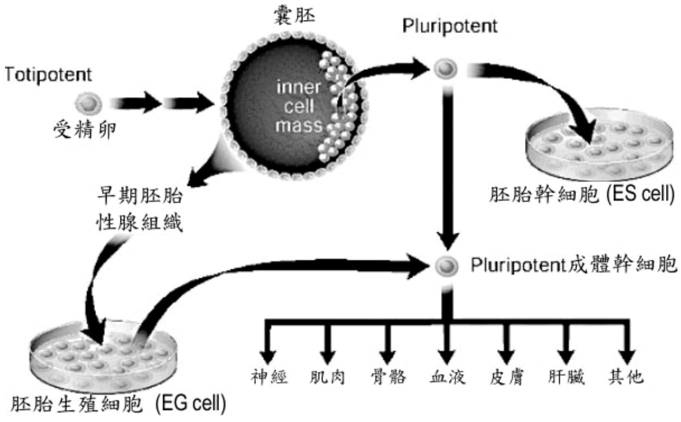


Figure 2 精子卵子受精以後形成受精卵，經過 80 小時左右會有囊胚的形成，其中 inner cell mass 將來會長成胚胎，如果將它取出，經過適當培養可得到胚胎幹細胞(ES cell)。第二種 取得幹細胞的方法，是從長成的胚胎內的性腺中，取得原始生殖細胞來培養，也可得到全能的幹細胞(EG cell)。但是從胚胎的血液，骨髓，肝臟或腦組織，得到的細胞，就只能有部分的幹細胞功能。

小鼠的胚胎幹細胞(mESC, mouse embryonic stem cell)在 1981 年就被成功培養出來(Martin, 1981)，其間科學家對於幹細胞的探討雖然不曾停止，但直到最近幾年才又變得更熱門起來。一方面是由於 1998 年人類的胚胎幹細胞被建立(Thomson *et al.*, 1998)，另一方面也是得力於近年來生物科學的飛躍進步。一百多年來的西方醫學，雖然幫人類解決了許多疾病與痛苦，延長了平均壽命好幾十年，但不可否認的，面對許多疾病，尤其是自然老化或基因帶來的，如 Huntington's disease, Parkinson's disease 或糖尿病等，醫學目前還是束手無策。直到人類的胚胎幹細胞被發現，才露出一線曙光。因此，目前胚胎幹細胞被研究最多的就是這兩個領域——神經退化性疾病與糖尿病。如今年 5 月哈佛大學認為胚胎幹細胞是對第一型糖尿病的唯一選擇(Dor *et al.*, 2004)，與今年 6 月日本岡山大學發表的移植胚胎幹細胞讓 Parkinson's disease 部分恢復的報告(Yoshizaki *et al.*, 2004)。

但問題來了，就算科學家已經從胚胎幹細胞，成功引導出特殊種類與功能的細胞，預備做細胞治療時，免疫排斥的問題怎麼辦？以台大醫院目前的移植手術而言，即使術前 HLA 配對成功，術後使用抗排斥的藥物，都仍然有 20-50% 的排斥率(吳明義 *et al.*, 2000)。因此，如何訂製一個屬於自己的幹細胞株呢？有三種方法可以改善胚胎幹細胞移植時的排斥現象(見 Figure 3)，第一，是去掉 HLA 的基因表現或改變成為與接受者一樣的 HLA。第二是細胞核移植，讓整個細胞變成自己的，再養成胚胎幹細胞，再分化成特定細胞。第三，製造與捐贈者相同 HLA 的血液免疫細胞一起移植。雖然有人說幹細胞比較容易被調控，使之不表現出 HLA 抗原，但人類胚胎幹細胞這方面技術仍不成熟，最好透過細胞核移植技術，會使排斥的情形大大減少，HLA 的配對就不是問題(Surbek *et al.*, 2001)。

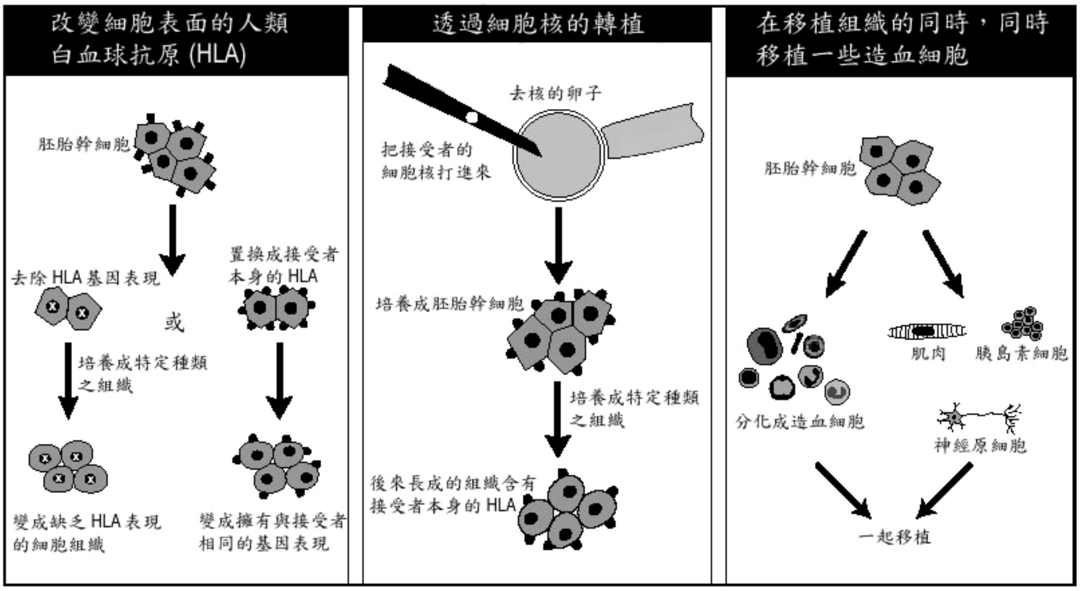


Figure 3 三種可以減少胚胎幹細胞移植時排斥的方法，其中第二種方法，是目前顯微技術發展後，比較有希望的途徑，事實上今年已經有研究團隊成功利用此一模式製造出第一株人類胚胎幹細胞。

但問題又來了，今年 3 月，我們的鄰國，韓國漢城國立大學曾這樣做過，透過細胞核移植技術成功作出人類胚胎幹細胞株(Hwang *et al*., 2004)。但是他們從 242 顆卵，只做出一個胚胎幹細胞株，而且這些卵還是人卵，就牽涉到醫療倫理的層面了。尤其今年五月初 Nature 還爆料指出一些醜聞，其中牽涉到該實驗室人員與學生被要求捐卵的事情。這些專家中的專家都必須『浪費』這麼多卵，一般的研究者，豈不要一將功成萬「卵」枯？既然每一個人都要訂製自己的幹細胞株，那麼卵子的來源就很重要了。雖然說這些卵子的用途是要建立胚胎幹細胞株，但有趣的是，胚胎幹細胞既然無所不能，我們何不就利用它來製造卵子生殖細胞，進一步為治療性複製（細胞核移植技術）做準備。

去年 5 月底，賓州大學有一群學者，就發現它的可行性(Hϋbner *et al*., 2003)，從小鼠胚胎幹細胞，體外培養出至少型態上非常像卵子的細胞，而且自動分裂成像胚胎的細胞。去年 9 月，日本學者也讓胚胎幹細胞在 nude mice 體內培養出精子細胞(Toyooka *et al*., 2003)，今年哈佛大學的一個團隊，更從體外培養出一些非常類似精子的生殖細胞(Geijsen *et al*., 2004)。雖然，到目前為止，這些生殖細胞，或看似生殖細胞的東西，尚未成功執行它的功能，即生育功能，但是透過不斷的探討與研究，我們相信謎底解開的時間不遠了。如果我們能成功從胚胎幹細胞，製造出卵子或精子，再回過頭去製造胚胎幹細胞株，那時，研究胚胎幹細胞的醫療倫理爭議相對就會減少很多，至少不用去殺害自然形成的胚胎，或浪費很多病人的捐卵。

二、研究材料與方法步驟

本實驗是根據 Geijsen (2004)的理論，由 ESC 培養一段時間，根據特殊抗原 SSSEA-1 的表現，篩檢出 PGCs 或接近 PGCs 的細胞，在進一步與自然條件下，小鼠胚胎的性腺細胞，相組合，期待有進一步的分化。依規定，本實驗尚未進行活體試驗，如將細胞植入活體(SCID 小鼠)之步驟。茲將實驗方法簡述成以下五個部分：

1、ICR小鼠自然交配繁殖：

因為 ICR 品系之小鼠可得到較多之卵子(Canning et al., 2003)。選擇 6-8 週的原因是，這個時期，卵子數與胚胎著床數，適合要求。觀察其陰道分泌狀況，潮濕者易交配，分批放入公鼠籠中，自然交配，記錄成功交配者。但無交配者，也可能 false negative，所以也要做記錄。公鼠原則上不連續使用，至少間隔一至兩天不交配。選擇自然交配的原因是，雖然藥物（如 PMSG, hCG）刺激會增加卵子數目，但著床狀況不穩定，甚至有大半胚胎萎縮的案例(Ertzeid & Storeng, 1992)。有人說是因為著床時間點附近，TIMP-3 增加的原因 (Ku et al., 2003)。採自然交配的另一個理由是，卵巢經過刺激，下一次反應就會不好(Van Blerkom & Davis, 2001)，也有人說體外培養時，卵巢經過刺激會影響減數分裂的能力(Combelles & Albertini, 2003)，而減數分裂的能力正是我們這實驗中最重要的部分。

2. 取 13 天半的ICR小鼠胚胎性腺：

雖然各研究單位都正在進行類似實驗，直到目前 2004 年為止，成熟的精子或卵子尚未從胚胎幹細胞得來(Geijsen et al., 2004; Hübner et al., 2003)。其中牽涉到基因控制的部分，我們尚未全然明瞭。因此，我們從胚胎幹細胞得到的初始生殖細胞(primordial germ cell, PGC)，藉由已經自然形成的性腺組織來支持(Eppig & Wigglesworth, 2000)，繼續發展到成熟的生殖細胞，例如精子與卵子，才有可能養育出下一代。雖然有人認為肉眼能清楚分辨雄性與雌性的性腺，最早約在 12.5 dpc (days post coitum)，但個人經驗認為還是有點困難（見Figure 4），甚至有人主張 15.5 dpc前都要做DNA鑑定(Pesce et al., 1998)。所以我們原則上選擇 13 天半大的胚胎來做實驗。當然 14-18 天將來實際做實驗時，或許也可以當作比較，不一定越原始的性腺越好，尤其是雄性部分(McLean et al., 2003)。交配後 13 天，理論上每隻小鼠應懷有 10 個胚胎左右，肉眼可看出其肚子變大了，沒有受孕的母鼠可以再使用一次。懷孕 13.5 dpc時，母鼠經過CO_2犧牲後，無菌技術下，取出胚胎，在解剖顯微鏡下分離出性腺，將卵巢與睪丸分別放在不同的培養皿中，然後用Trypsin/EDTA/DNase I打散成單細胞，但打散過程要小心，常常會有時間太短，分不開，太長細胞死掉的作用。經過兩次黏附過程後，生殖細胞都去除了，只剩下gonadal stromal cell，然後再與PGC相結合。

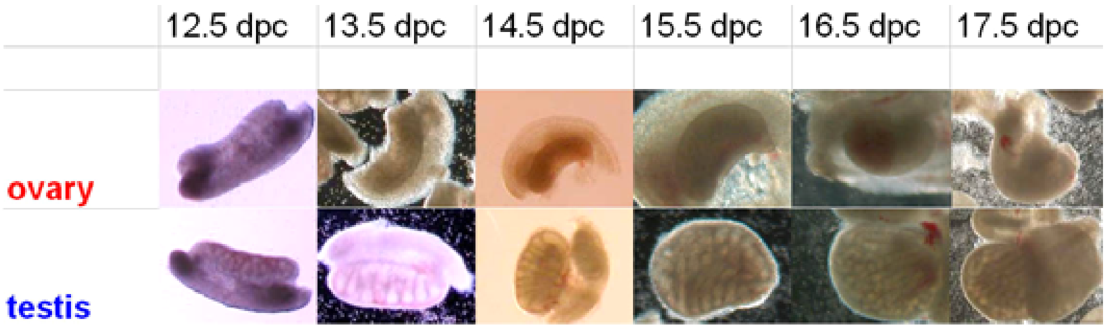


Figure 4 ICR 小鼠不同懷孕週數之胚胎性腺，可以看到雄性的性腺，在早期都是長條形，然後慢慢變成球形，但是雄性的睪丸，明顯有紋路，而且比較大。但這些差別在 12.5 天大的時候，並不是很明顯。

3、初始生殖細胞(PGC)的獲得：

我們從 7AC5/EYFP 或 129/6-FUGW-5 含GFP螢光表現的胚胎幹細胞株(吳醫師的實驗室擁有的細胞株），分別雄性與雌性各一株，在培養皿中擴大細胞數目到 10^7以上時，做成類胚胎體(embryoid body)，培養 96 小時，使之初步進入分化的過程，再用Trypsin/EDTA/DNase I打散成單細胞，然後用SSEA-1 抗體選擇出陽性的細胞(使用MACS或FACS)，約有 5-10%的細胞為SSEA-1$^+$。再於含有 2 μM的vitamin A與 1,000 U/ml的LIF中培養 7 天，如果仍然保有SSEA-1 抗原者，即為PGC或其前身細胞(Geijsen et al., 2004)，其SSEA-1$^+$細胞比率約可達到 10%左右(見Figure 5)。

4、重組性腺(re-aggregation):

利用 Eppig JJ 等人重組性腺的理論(Eppig & Wigglesworth, 2000)，將雄性與雌性PGC 分別與雄性與雌性性腺的 stromal cells 相緊密結合。因為要緊密結合，所以需要 10,000g 的離心力，受限於儀器關係，固定角度的離心管往往只能拿到『片狀』，而非球狀的沈積物，而且為避免離心過程中，細胞遭擠壓破碎，我們加了PHA 在裡面。雌性部分也可嘗試不把卵子去除來結合，因為有人認為卵子對於濾泡生成有相當重要角色(Eppig, 2001)。他們多年來都是用「卵子」來跟 stromal cells 相重組，但我們得到的是卵子的前身 PGC，而成熟度的差異會不會得到有效的結果，需進一步實驗。或者在重組前，可嘗試不同天數的 PGC 培養，即含有 SCF, LIF, bFGF, TNF-α的培養液刺激一段時間，觀察效果。雄性部分，也有人認為不必移去生殖細胞反而比較好(Ohta et al., 2004)。也可嘗試大一點的胚胎，或成鼠，尤其是雄性部分，因為睪丸是在成年之後才進行成熟與減數分裂，所以有人認為成鼠比較有用(McLean et al., 2003)。還有應該在 dish 上，feeder 上，cellulose membrane 上或 Matrigel 中培養，需更進一步測試。

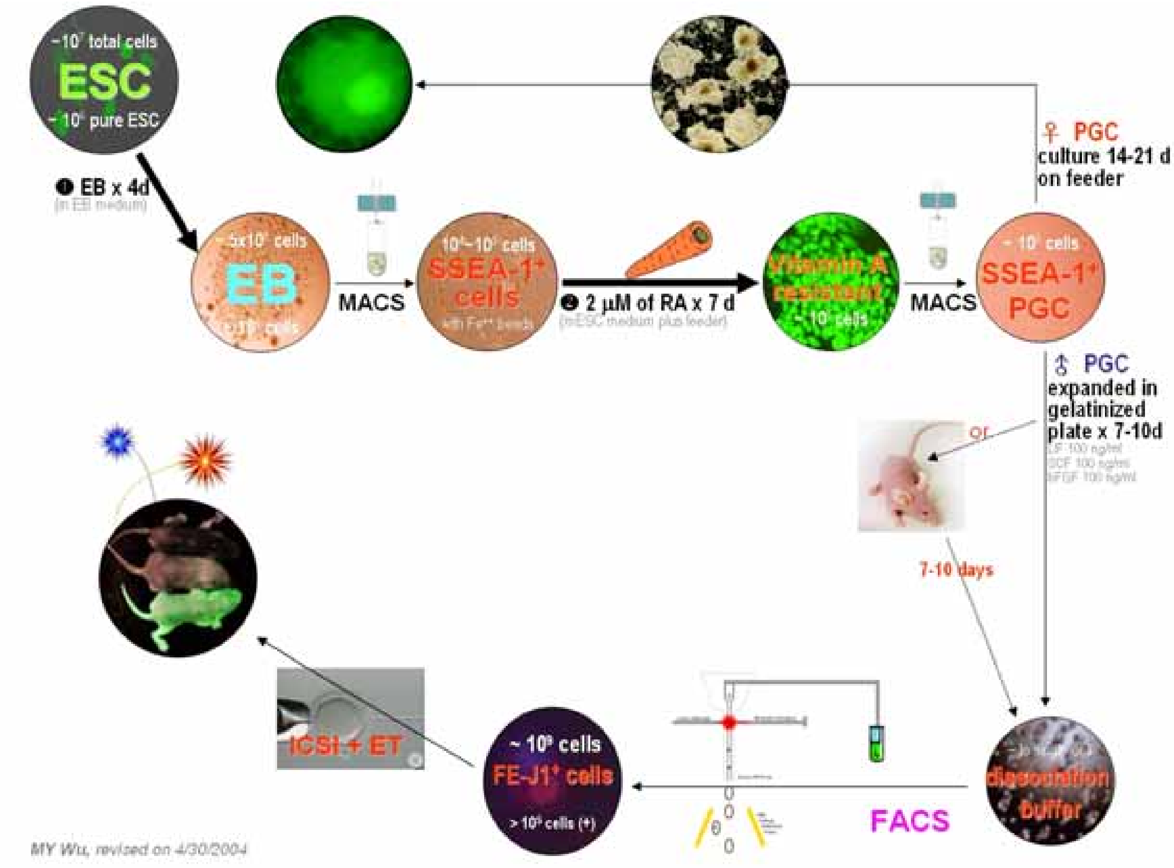


Figure 5 根據哈佛大學 Geijsen 等人有關生殖細胞篩檢理論，利用 SSEA-1 的表現，去篩選 PGC，與之後推測可行的步驟，最後的終極目標是要產生一隻帶有『綠色螢光』的小鼠，它的基因是來自胚胎幹細胞。

5、生殖細胞的辨識和取得：

生殖細胞的辨識可藉助於其細胞抗原的表現(見 Table 1)。組織化學免疫染色(IHC)的部分，是採取螢光染色比較方便。主要一次抗體有 SSEA-1 (mouse anti-mouse IgM)、Oct-4 (mouse anti-human IgG)、FE-J1 (mouse anti-mouse IgM)、GCNA-1 (rat anti-mouse IgM)、c-kit (rat anti-mouse IgG)，二次抗體有 Cy-5 donkey anti-mouse IgG、Texas Red goat anti-rat IgG+IgM 這兩種。卵子可以用型態來分辨，Hübner K 等人曾發表這類照片(Hübner et al., 2003)，但長時間的體外培養過程，自然發生了孤雌生殖(parthenogenesis)現象，最後也沒有證實它是否為正常卵子，可不可以受精產生正常胚胎。精子部分則比較簡單，早期精子可用 FE-J1 抗體篩檢而得到(Geijsen et al., 2004)，雖然 MACS 方法比較簡單，但是磁鐵顆粒對於顯微注射(ICSI)的影響未知。但是，如果用 FACS 則需要比較多量的細胞，Geijsen 等人的方法，只拿到很少的細胞(0.01%)，而且不夠成熟。或者我們可以嘗試 nude mice 皮下來植入，可藉助於 in vivo 的環境，讓它們有更有效的條件製造精子。然後，在顯微鏡下使用類似臨床上 TESE (Testicular Sperm Extraction)切碎睪丸組織的方法，這方面本實驗室已有成熟之經驗。可藉由精子或較晚期的 spermatid 的活

動力而辨識，取得來做 ICSI，假如有受精後，可在解剖顯微鏡下做胚胎輸卵管植入(TET)。

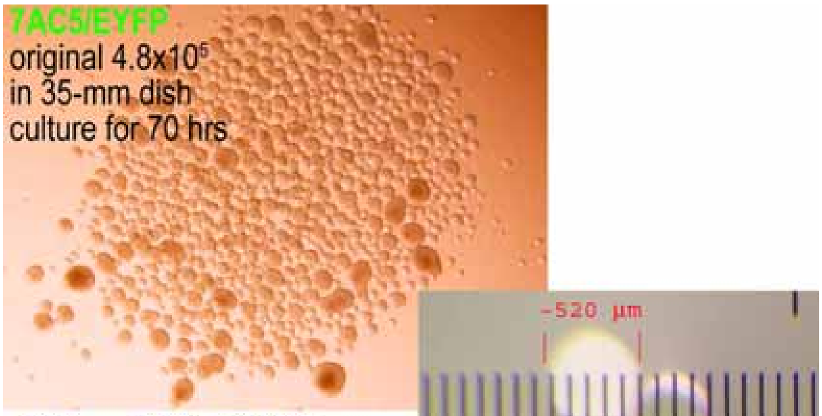
Table 1 利用各種不同細胞抗原，來確認或分別生殖細胞的生長與分化 (Wu et al., 2004)

dpc	AP	Oct-4	c-kit	SSEA-1	MVH	GCNA1	FIGα	MSY2
7.5	+	+	+	-	-	-	-	-
8.5	+	+	+	±	-	-	-	-
9.5	+	+	+	+	-	-	-	-
10.5	+	+	+	+	±	-	-	-
11.5	+	+	+	+	+	+	-	-
12.5	+	+	+	+	+	+	-	-
13.5 (♂/♀)	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-
14.5 (♂/♀)	+/+	+/±	-/±	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-
15.5 (♂/♀)	+/+	+/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-
16.5 (♂/♀)	-/-	+/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-
17.5 (♂/♀)	-/-	+/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-
18.5 (♂/♀)	-/-	+/-	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+
newborn (♂/♀)	-/-	+/±	±/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+
adult (♂/♀)	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/-	-/±	+/+

三、研究結果

<u>1、EB的培養 4 天結果仍有 10%細胞表現出SSEA-1：</u>

類胚胎體(EB)的培養，一向都是細胞分化研究中常用的一個方法。通常大家使用的是懸吊的小培養液體，約 20-40 µl，兩天之後再去蒐集聚合成一塊的細胞。本實驗採取另一個較簡單的方法，使用 10^5-10^6的細胞數，放進 35-mm直徑的培養液 2 ml中四天，這個培養敏的底部光滑，不容易附著細胞。根據實際操作，通常很少的細胞附著，如果多的話(> 10%)，可以把培養液部分換一個盤子。換液體時，可以把EB輕微震盪到盤子中間，再吸取旁邊的液體，約 90%的液體可以每天更換。這樣得到的EB約為 0.2-0.5 mm的大小(見Figure 6)。在適合EB的培養液之中四天之後，經過酵素打散後分析SSEA-1，仍有 10%左右的細胞保持陽性(約有一半的細胞在這過程中會破碎掉)，這些有可能是生殖細胞的前身。這個步驟很簡單，結果也很穩定。



Cell line	Origin no.	SSEA-1 (+)	%
7AC5/EYFP	1.32x10[illegible]	6.6x10[illegible]	5.0
129/6-FUGW-5	6.8x10[illegible]	2.6x10[illegible]	3.8
7AC5/EYFP	7.0x10[illegible]	8.4x10[illegible]	12.0
7AC5/EYFP	2.05x10[illegible]	1.32x10[illegible]	6.4
129/6-FUGW-5	3.07x10[illegible]	1.21x10[illegible]	3.9
7AC5/EYFP	3.7x10[illegible]	6.8x10[illegible]	18.4
129/6-FUGW-5	4.5x10[illegible]	8.4x10[illegible]	18.7

Figure 6 適當濃度的幹細胞(2-5x10^5 in 2 ml of 35-mm dish)可以得到適當大小的類胚胎體(EB)，大小約為 0.2-0.5 mm直徑，在適合的EB的培養液之中四天之後，經過打散分析SSEA-1，仍有 10%左右的細胞保持陽性，這些有可能是生殖細胞的前身。

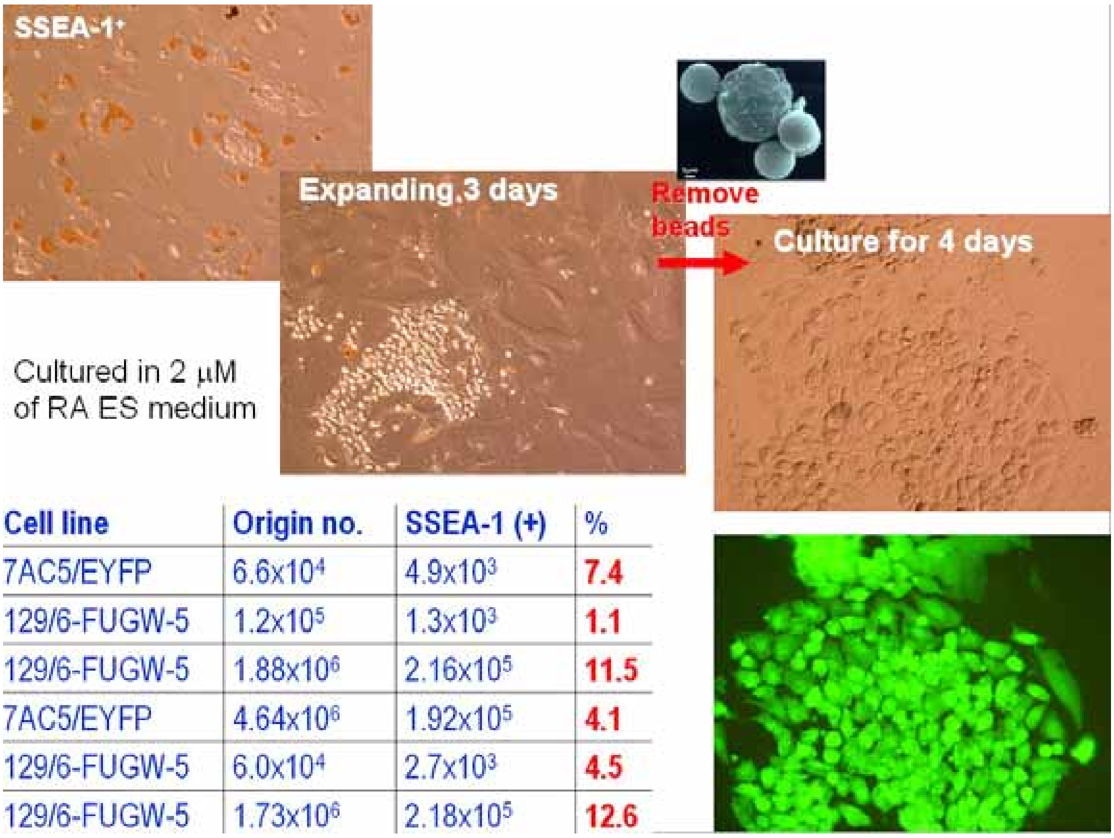
<u>2、用MACS可以幾乎完全回收SSEA-1 陽性的細胞：</u>

要從一大堆細胞中去取得特定細胞，如SSEA-1 陽性的細胞，有MACS與FACS兩種，當然，如果有基因(transgenic)轉植的細胞會更好。不過，本實驗室採取的是比較簡單的MACS，而且採用的是間接的方法(indirect method)，簡單的說，就是先把SSEA-1 IgM抗體，與Dynal公司提供的磁鐵溶液相混合，這磁鐵大小約 4-5 µm，約為細胞的 1/2~1/4 大小，顯微鏡下清楚可見，它已經附有抗小鼠IgM的二次抗體，所以能跟SSEA-1 抗體緊緊結合，結合後兩個禮拜內會分開的機會很少，所以可以準備一次，用個五六次沒問題。另外，會選擇這個方法的另一個理由是，磁鐵溶液通常含有防腐劑，在清洗過量SSEA-1 抗體過程需要好幾次的wash，防

腐劑也剛好可以洗掉，比較省時間。另外，這些細胞，在結合抗體時通常需要低溫，CO_2濃度也不對的體外待三十分鐘，如果事先把一抗二抗先結合好，既可以省時間，也避免細胞變性。第四個理由是這些細胞，幾天之後要再做第二次篩檢，如果有殘餘的SSEA-1 覆蓋在細胞表面，會在第二次篩檢出現偽陽性的結果。最後一個考慮是，我們不太容易控制適當的抗體濃度，太多，細胞會死掉，太少吸附不易，回收細胞可能沒效率，如果我們用indirect方法，因為每一個 SSEA-1都已經附上磁鐵，所以看得見，因此濃度很容易調配。做完SSEA-1 的選擇之後，那些陰性的細胞，去染SSEA-1，結果 99%以上都是陰性，可見 MACS吸附效果相當完全。

3、經過七天的 Vitamin A刺激，仍有 5%的細胞維持SSEA-1 陽性：

適當的 Vitamin A 濃度(1-10 μg/ml)可以促進細胞的分化，這在神經細胞分化的研究，尤其使用得多。在生殖細胞的分化，依然有它的用途，可以促進生殖細胞的分裂，但也可以使幹細胞分化，七天之後，一些非生殖細胞的部分，已經忍受不住 RA (retinoic acid, Vitamin A)的誘惑，分化成各種細胞，當然胚胎幹細胞的本色(SSEA-1)就消失殆盡了，如果還保有 SSEA-1 的，應該就是 PGC 了(見 Figure 7)。



Cell line	Origin no.	SSEA-1 (+)	%
7AC5/EYFP	6.6×10^4	4.9×10^3	7.4
129/6-FUGW-5	1.2×10^5	1.3×10^3	1.1
129/6-FUGW-5	1.88×10^6	2.16×10^5	11.5
7AC5/EYFP	4.64×10^6	1.92×10^5	4.1
129/6-FUGW-5	6.0×10^4	2.7×10^3	4.5
129/6-FUGW-5	1.73×10^6	2.18×10^5	12.6

Figure 7 從 EB 得到一些 SSEA-1 陽性的細胞，在有 feeder cell 的培養皿上養一天之後，如左上圖，會有很多磁鐵在上面，但是磁鐵太多的細胞不容易存活，過三天之後，一些磁鐵比較少的細胞，會慢慢長大其聚落(如中間圖)，這時將它用酵素打散，再用磁鐵吸掉有磁鐵的部分，再養個四天，細胞會長成一個個聚落，但細胞大小不一(如右上圖)，在螢光顯微鏡下，其 GFP 的表現亦強弱不一(如右下圖)。檢測其 SSEA-1 抗原約有 5%還是陽性的(如左下)。

Vitamin A 的刺激分化效果，非常快速與明顯，舉例來說，胚胎幹細胞 100%是 SSEA-1 陽性，經過 48 小時，幾乎一大半的細胞都會變得肥大，拉長，細胞核與細胞質的形狀都變了，如果看這些細胞株含有的 GFP 蛋白質分佈，會發覺細胞核之內的 GFP 濃度升高，但細胞質濃度減低(這兩株細胞的 GFP 是含在 β-actin 內)。如果這時看 SSEA-1 表現，幾乎 80%以上的 SSEA-1 會在這時就消失了。

4、雌性PGC的後續培養，沒有看到明顯的卵子形狀的細胞出現：

接下來的動作就一翻兩瞪眼了，有沒有卵子細胞出現？結果是沒有。原因有幾個，第一，卵子需要很久時間才能看到，有人說要 50 天，這是一個短期研究，所以暫時沒看到。第二，我們培養環境不適合，我們用的是劍橋大學 McLaren 教授長期使用的方法，她們可能是為了研究 PGC，而不是為了卵子，所以測試培養液可能需要幾個月，甚至幾年。第三，我們好像看到一些細胞，從細胞聚落底部浮起來，大小在 30 μm 左右，但是 GFP 變弱甚至消失，所以我們懷疑它們是一些死掉的細胞，但後來發現，在生殖細胞抗原較強的細胞，細胞 GFP 反而變弱(見 Figure 8)。而且聽說美國有一些大實驗室，其體外培養所產生的卵子(或像卵子的細胞)是會浮在培養液中的。第四，我們是用含有 feeder cells 的培養皿來養這些細胞，而賓州大學去年的研究，好像是沒有 feeder cells，而是採人工切開一片一片的組織，在培養皿上，而這更花時間了。對短期研究而言，沒有辦法把每一種可能性都去嘗試，這可能留待以後有機會，有更多的時間才來證明。

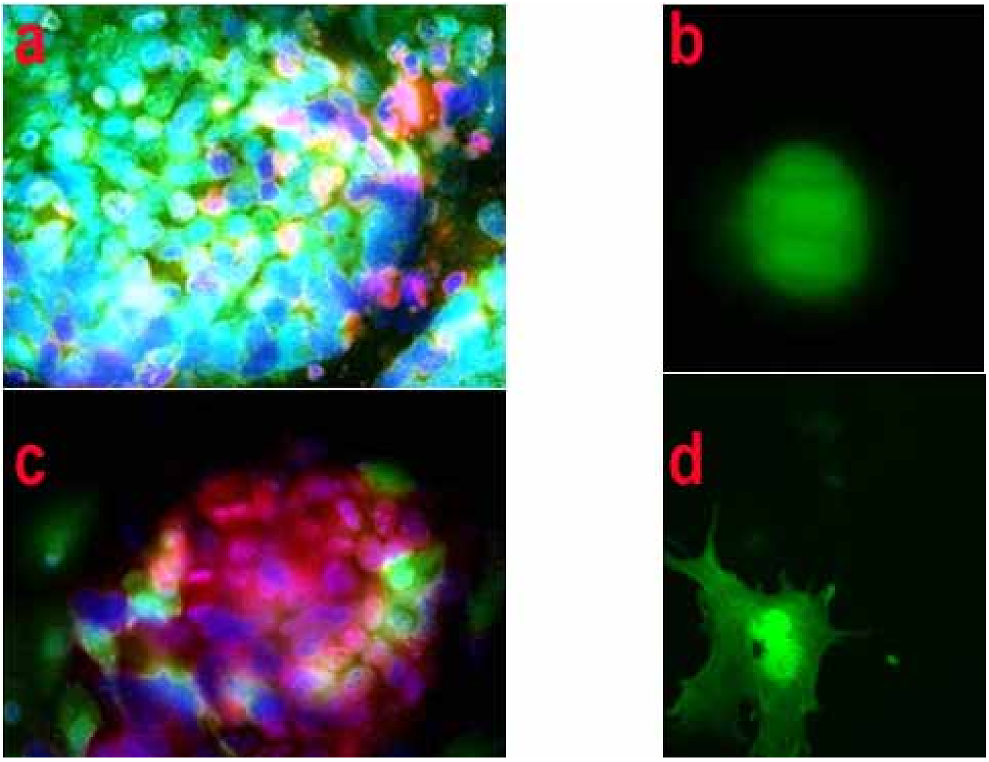
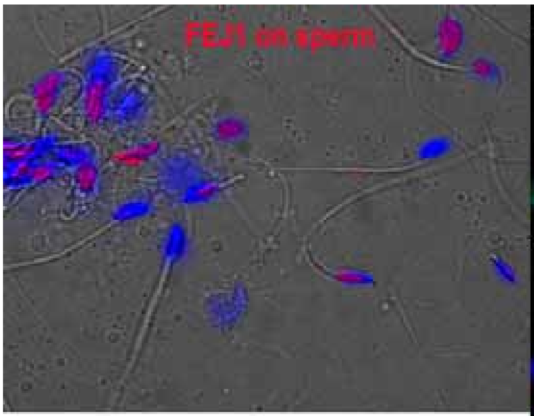
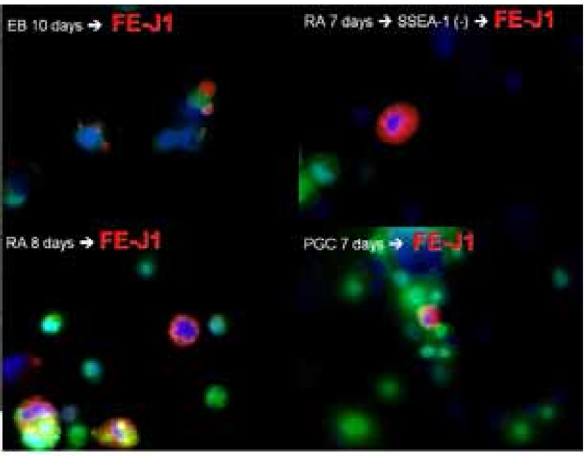


Figure 8 當胚胎幹細胞培養成聚落時，幾乎每個細胞都是 Oct-4 陽性，而且 GFP 也都是陽性(a)，其細胞核與細胞質的 GFP 強度並不會差太多(b)。當胚胎幹細胞經 EB 四天，取 SSEA-1 陽性細胞，再經 RA 刺激七天，再取出其中 SSEA-1 陽性細胞，在 PGC 培養液中八天之後，聚落中 Oct-4 依然陽性，可是 GFP 幾乎已經消失(c) ，而且殘留的 GFP 陽性細胞，其細胞核與細胞質的 GFP 強度就會差很多(d)，而且細胞形狀也有很大改變。

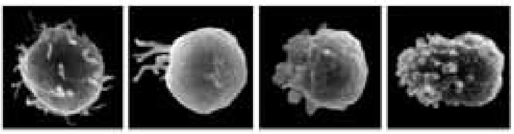
5、<u>雄性PGC的後續培養，有看到FE-J1^{+}的細胞出現，但沒有讓卵子受精</u>

FE-J1 是一個老抗原了，但自從今年初哈佛大學在Nature雜誌裡報告它的用途之後，它又開始變得熱門起來。這個抗原跟SSEA-1 一樣，是屬於細胞表面抗原，但是其抗原強度不強，所以用MACS的吸附效率就沒有那麼可靠。它據說是跟精蟲頭部的頂體有關，從次級精子細胞(secondary spermatocyte)其實就有表現，但是還是在成熟精子頭部表現比較穩定明顯(見Figure 9)。在最初的EB或其次的RA的培養環境中，都可以看到FE-J1 陽性的細胞，比例約有 5%左右。文獻上最快出現FE-J1 是EB第十三天的培養細胞，可是我們在第十天就有出現(Figure 9 右上圖)。但是在RA培養之後選取SSEA-1^{+}細胞繼續培養，FE-J1^{+}比率並沒有如預期一樣升高，因此這個步驟是不是PGC值得懷疑，或者RA要短一點的時間，因為正常PGC在某一段時期，SSEA-1 先變成陰性，後來才陽性(見Table 1)。而我們用FE-J1 加上MACS得到的細胞，有些細胞形狀有拉長的趨勢，好像跟spermatid有點像，可惜還是太大，做ICSI時常讓卵子破掉，這點可能需要更多的時間來練習，或者卵子需要活化，或者可以用FACS來取代MACS，因為染色體的染色，可以讓我們挑選到染色體單套細胞，可能會更好。





conditions	Origin no.	FE-J1 (+) no.	%
Post RA 7 days	$3.6x10^4$	$5.3x10^3$	14.7
Post RA 7 days	$1.8x10^5$	$8.0x10^3$	4.4
Post PGC 8 days	$1.1x10^6$	$6x10^3$	0.55
Post PGC 7 days	$1.77x10^5$	$6.4x10^3$	3.6
Post PGC 7 days	$2.37x10^6$	$2.7x10^3$	0.1
Post PGC 11 days	$5.88x10^5$	$3.3x10^3$	0.56
Post RA 7 days	$1.9x10^5$	$5.8x10^3$	3.1
Post PGC 7 days	$2.08x10^5$	$2.22x10^3$	1.1



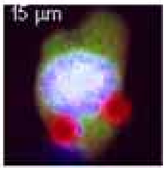


Figure 9 在精子的頭部FE-J1 的染色明顯(左上)，在EB或RA的培養環境中，也可以看到FE-J1 陽性的細胞(右上)，比例約有 5%左右(左下表)，但是在RA培養之後選取SSEA-1^{+}細胞繼續培養，FE-J1^{+}比率並沒有如預期一樣升高。反而，當在RA培養之後選取SSEA-1^{-}細胞繼續培養，仍可以看到一些細胞表現出FE-J1 陽性(右上)。精子分化成spermatid的過程中，需要變形成橢圓形，甚至尾巴(右中)，而我們用FE-J1 加上MACS得到的細胞，有些是符合這種變形的趨勢。(右下)利用FE-J1 加上磁鐵分離出的細胞，再去做FEJ1 的染色，可以看到細胞表面可以染上顏色，圖內兩個紅點是磁鐵顆粒，細胞形狀有拉長的趨勢。

四、討論建議

國父孫中山曾遭遇 10 次革命失敗，但比起科學實驗來，他可幸運多了。同樣在武昌起義那一年，1911 年，科學家終於發現一種可以治療梅毒的藥『606』，它可是失敗了 605 次之後才成功的。現在也有一種血清卵巢癌檢查，叫做 CA125，是在 1983 年之前，曾失敗了 124 次才分離成功的一種抗體檢查。這次暑假的實驗，以最終的結果而言是失敗的，因為沒有達到要生出一隻綠色老鼠的目標。但失敗一次算什麼？要是它成功了，不只梅毒可以治好，卵巢癌可以痊癒，甚至腦中風，肝癌，心臟病都可以輕易解決，所以失敗一兩次，甚至一兩百次也是值得的的。

暑期實驗，時間有限，知識經驗也有限，在指導老師的幫忙下，充其量也只能略窺堂奧，談不上整體實驗設計規劃，只是我一直對生物的奧秘，有莫名的憧憬，所以在因緣際會之下，七月初到台灣大學醫學院去見習一段時間。雖然，之前比較少接觸生物實驗，尤其是組織培養，但是那裡環境還不錯，許多技術都可以找到人諮詢，我是從只知其然，不知其所以然開始的。不過一段時間之後，慢慢地，也知道他們在玩什麼把戲，也有機會提出問題，然後得到解答，從過程中，更讓我領略到自然界的奧秘，醫學的有趣。即使最後沒有什麼偉大的結果出現，但過程就已經讓我覺得收穫良多。

這個實驗給我的第一個心得是，為什麼要千方百計去做生殖細胞？因為要治病，需要不同於以往的器官移植，以後需要的是「細胞移植」，而細胞移植需要胚胎幹細胞來完成，而胚胎幹細胞必須量身訂製，必須透過卵子這個最原始的環境，來生產胚胎幹細胞，有了每個人自己的胚胎幹細胞，去製造特定的組織細胞，例如胰島素細胞或神經原細胞才有用途。這一點比較容易了解，因為這個不用作實驗，參考參考文獻就可以知道的。

第二個是去見識見識胚胎幹細胞是什麼？平常在網路上，很多 information 講到幹細胞，以為臍帶血就是幹細胞的全部，其實不然。觀於渤海者難為水，其實胚胎幹細胞才是科學家們的最愛。在實驗室，第一天就是看到一堆細胞在培養瓶裡面，以為它就是主角。錯了，它只是 feeder cells，是配角，是讓胚胎幹細胞長在自己頭上的一種細胞，這些細胞的取得必須是早期的小鼠胚胎，而且培養的時間不能太久。配角就要這麼講究了，主角幹細胞就更值得我們的尊敬了。

第三個是幹細胞原始狀態的維持是什麼？溫度濕度與 CO_2 濃度，培養液裡面需要 LIF 等因子，酵素溶解開來的條件，還有這些細胞的特性，譬如商業化細胞所具有的 GFP 螢光，究竟長的什麼樣子？如果染一些 SSEA-1，Oct-4，或 c-kit，AP，GCNA-1 會是什麼樣子？當然有的老手已經有二十年經驗，做細胞染色駕輕技熟，但我有興趣的倒不是這些步驟怎麼做，而是這些染色的含意是什麼？

接下來，是分化(differentiation)。為什麼大家想用EB來做分化的第一步？標準化應該是考量的步驟吧。在EB的培養中發生了什麼事？像SSEA-1 培養幾天就很快減低陽性率，但Oct-4 就不會，這兩種多能的(pluripotent)指標，有什麼不同的意義？這個步驟在整個實驗裡，算是比較簡單的部分，但是也是有一些可以學習的。例如，細胞濃度必須在 $1\text{-}2x10^5$/2 ml的 35-mm dish中，比較不會黏成一團，但如果細胞太少，下一步能得到的細胞數就不夠，所以換大一點的盤子，細胞數雖然可以多一些，但要適當地搖動，免得它們黏在一起或黏在底部，沒辦法形成漂亮的EB。

再進一步是用 SSEA-1 篩選我們要的細胞。當然 MACS 是很方便沒錯，半小時內就可以搞定，但是 SSEA-1 是 IgM，而 IgM 黏細胞黏得很緊，我們必須要在三天之後犧牲掉那些還黏有磁鐵的細胞，通常會浪費八九成的細胞。如果有IgG 的篩檢用抗體，也許會好一些。還有利用 FACS 來篩檢可能就比較好，但是FACS 也必須用抗體，細胞上的 SSEA-1 抗原，會不會被抗體過飽和了，到底幾天會消失？會不會影響下一步驟的篩檢？所以後來有一個結論，如果買來的細胞株，本來就有 GFP 的 reporter gene，而且這些 GFP 是嵌在適當位置，譬如 Oct-4或 c-kit 跟生殖細胞很有相關，把 GFP 放到 Oct-4 或 c-kit 的 promoter 上，如果細胞有一天快要成為生殖細胞了，它就會自己顯出綠色，不是很好嗎？聽說這個蠻麻煩的，通常是屬於博士班的題目，一段短時間的實驗，是不太可能有結果的。

接下來是RA的刺激，維他命A確實有證明會幫忙生殖細胞的生長發育(Koshimizu et al., 1995)。但是，幾天？濃度？在文獻上並沒有很多資料，甚至哈佛大學的方法(Geijsen et al., 2004)有建議這樣做，可是他們拿到end-product類似精子的細胞，卻是從 20 天的EB直接培養得來，所以這樣做是對的嗎？而且這是精子的理論，卵子形成的機制一樣嗎？因為我們在實驗中，發現了一些矛盾的現象，例如在第二階段RA培養完，其實就可以找到一些$FE\text{-}J1^+$的細胞，如果特意去挑出其中$SSEA\text{-}1^+$的細胞(理論上這些RA-resistant細胞應該就是PGC)，到PGC培養液去培養，應該更高比率是FE-J1 陽性才對，結果不然，$FE\text{-}J1^+$細胞反而比較少。更有趣的事情是如果第二階段RA培養完選的是SSEA-1 陰性的細胞去培養，結果後來發現FE-J1 陽性的機會還比前者多(見Figure 10)。這當然有個理由可以解釋，我們知道，PGC發育成生殖細胞的過程中，SSEA-1 會從陽性轉成陰性，幾天之後又會轉成陽性(Wu et al, 2004)，所以我們之前用RA刺激七天，會不會太久了？是不是四天或五天就夠了？其實這些需要test各種狀況。當然，短時間的實驗沒辦法回答這些問題。

目前第三階段 PGC 的培養方法是對的嗎？劍橋大學 McLaren 教授的團隊從前都是做 PGC 的，但是他們也沒有做出完整的卵子，了不起也是 12.5dpc左右的生殖細胞，所以如果我們目標是成熟可以用的生殖細胞，那這種培養條件是適當的嗎？FE-J1 雖然可以找出精子的頭部，但更先前的 spermatid 或spermatocyte 就不是那麼明顯，所以 MACS 的陽性陰性就不是那麼可靠，甚至Geijsen 等人發表的照片也非常模糊，要不是頂著哈佛大學的光環，實在很難讓

人相信該實驗的結果。如果改 FACS 會不會好一些？他們就是採 FACS 的方法，但是據說只有 0.01%的細胞是 FE-J1 陽性。這一點也很怪，難道沒有更有效的方法嗎？有的，日本人習慣用 Mvh 來定義生殖細胞，卵子精子都一體適用(見 Table 1)，美國人喜歡用 GCNA-1 來找生殖細胞，但是這兩種都不是細胞表面的抗原，無法用 MACS 或 FACS 等細胞分離的工具，來簡單完成，所以又回到原點，如果我們能得到 Mvh 基因內放一個 GFP 基因來顯示綠色的細胞株，事情就簡單多了。但是這件事情不簡單，因為隨便放個外來基因進去，這個 Mvh 蛋白質的表現還跟原來的一樣嗎？這一點日本人做得不錯，將來這方面的技術，他們應該會領先。

我們也曾經嘗試將這些理論上是 PGC 的細胞，加上適當的胚胎性腺，予以細胞重組，再給予培養一段時間。可是並沒有明顯的卵子或精子出現。不同天數的胚胎性腺，如 12.5 dpc 或我們比較常用的 13.5 dpc，都有試過。有沒有含 mesonephros，或有沒有剔除生殖細胞，都在考慮範圍之內。但是，我們有碰到一個問題，正如 Figure 8 所顯示，GFP 會在某些特定培養條件下變淡，甚至消失，雖然我們的 GFP 是放在β-actin 內，理論上應該非常穩定，這個問題讓我們考慮到如果把支持組織中生殖細胞不剔除的話，將來生殖細胞會不容易辨認是來自胚胎幹細胞，或者是小鼠性腺原有的生殖細胞。

最後是 ICSI 的問題。小鼠卵比較小，比較脆弱，比起人類的精蟲顯微注射(ICSI)更困難。好在有 Piezo 儀器的幫忙，可是這是一個昂貴的儀器，操作它更需要經驗與技術。可能要有專業人士合作，才可以做得比較好，我想這樣一個大規模的實驗，應該包納更多人進來，才能把實驗作得更好。這次，細胞都比較大，大於 10 μm，做 ICSI 對於卵子傷害相對比較大，應該可以考慮做 DNA 染色，用 FACS 找出單套，小細胞，才可能會有大的突破。

這次參與這一個『簡單的』、『有趣的』、『短期的』實驗，有什麼實質上的收穫呢？ 有以下幾點：

一、組織培養技術的瞭解：

因為長期而複雜的培養過程，需要穩定的操作技術，與非常清楚的條件控制。要不然想要重覆出現結果，會有困難。在每一個環節，如細胞打散的程度，會不會把細胞弄死了？細胞多大濃度最適合？要不要有 feeder cells，免得細胞過度伸展？培養液的溫度與酸鹼度？分離細胞時的抗體濃度多高才恰當？太高細胞會死，太少又得不到細胞。這些技術的養成，需要時間，雖然一年時間好像不太夠，但是因為能夠專心，不需要兼顧平常的臨床業務，所以也是有一點點的心得。

二、免疫組織化學技術的瞭解：

每一個步驟都要確定細胞的屬性，因此準確有效的 IHC 技術是必須的。否則時間與金錢浪費之外，可能到頭來，做不出結果，白搭了。這些工作當然依靠病理科專業人士的幫忙，但是可能由於他們人力也吃緊，所以常常沒有滿意的結果。既然要做實驗，有些技巧仍要自己摸索才好。

三、顯微操作卵子技術的瞭解：

這些技術是實驗所必須，尤其 ICSI 技術在小鼠比人類 ICSI 困難多了，因此，我只是見習，從見習中瞭解到，這需要一年甚至兩年才能成熟此技術。而且我們這次碰到 immature germ cells，因為細胞比一般精子大，所以沒有辦法克服這困難。

四、更了解生殖細胞的發生與發育過程：

參與此實驗之後，才知道它牽涉的到一系列的細胞分化，生殖細胞的產生，移動，甚至減數分裂到成熟的精子或卵子。所以，不得不需要去了解其過程，而且每個步驟或其抗原表現，都必須十分確定。這更加深了我們對生殖細胞的了解，因此，這一段短時間不只技術上學了一點點，學識上也累積了一點小小心得。

結論：如果談一般基礎研究，條件台灣差國外，尤其美國是有一大節，但是今年韓國漢城國立大學，成功建立了全世界第一株經細胞核轉植(SCNT)後的胚胎幹細胞株，轟動全世界。而韓國國民平均生產毛額只有我們平均所得的70%，從這一點來看，我們研究這個題目還是有希望的。有三個原因，一、它主題明確，範圍小。二、台灣關於胚胎幹細胞法律規定，相對寬鬆。三、台灣生殖科技在亞洲來講，算得上是已開發國家。如果我們能找對方向，用對我們的投資，還是有可為的。在這一個暑期實驗中，得到一些有關生物學，生理學，甚至醫學的一些相關知識，瞭解什麼是實驗，實驗過程與實驗結果的落差，原來實驗是可以這樣做的。這是我這個實驗的收穫。

參、參考文獻

吳明義，楊友仕．認識胚胎幹細胞 J Reprod Infertil 2000; 9:179-190.

Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? Nature Med 2001; 7:393-5.

Canning J, Takai Y, Tilly JL. Evidence for genetic modifiers of ovarian follicular endowment and development from studies of five inbred mouse strains. Endocrinol 2003;144:9-12.

Combelles CM, Albertini DF. Assessment of oocyte quality following repeated gonadotropin stimulation in the mouse. Biol Reprod 2003; 68:812-21.

Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic β-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. Nature 2004; 429:41-6.

Eppig JJ, Wigglesworth K. Development of mouse and rat oocytes in chimeric reaggregated ovaries after interspecific exchange of somatic and germ cell components. Biol Reprod 2000; 63:1014-23.

Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. Reproduction 2001; 122:829-38.

Ertzeid G, Storeng R. Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre- and postimplantation development in mice. J Reprod Fertil 1992; 96:649-55.

ESHRE Task Force on Ethics and Law. I. The moral status of the pre-implantation embryo: ESHRE Task Force on Ethics and Law. Hum Reprod 2001; 16: 1046-1048.

Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. Nature 2004; 427:148-54.

Hübner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF III, Boiani M, Scholer HR. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. Science 2003; 300:1251-6.

Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM, Jeon HY, Lee BC, Kang SK, Kim SJ, Ahn C, Hwang JH, Park KY, Cibelli JB, Moon SY. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. Science 2004; 303:1669-74.

Koshimizu U, Watanabe M, Nakatsuji N. Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells. Dev Biol 1995; 168:683-5.

Ku SY, Choi YM, Suh CS, Kim SH, Kim JG, Moon SY, Lee JY, Kim YS. Effect of superovulation on the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 in the murine endometrium. Gynecol Obstet Invest 2003; 55:1-6.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1981; 78:7634-8.

McLean DJ, Friel PJ, Johnston DS, Griswold MD. Characterization of spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice. Biol Reprod 2003; 69:2085-91.

Ohta H, Wakayama T, Nishimune Y. Commitment of fetal male germ cells to spermatogonial stem cells during mouse embryonic development. Biol Reprod 2004; 70:1286-91.

Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Scholer H. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. Mech Dev 1998; 71:89-98.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282:1145-7.

Surbek DV, Holzgreve W, Nicolaides KH. Haematopoietic stem cell transplantation and gene therapy in the fetus: ready for clinical use? Hum Reprod Update 2001; 7:85-91.

Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100:11457-62.

Van Blerkom J and Davis P. Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II mouse oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. Hum Reprod 2001; 16:757-64.

Watt FM, Hogan BLM. Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. Science 2000; 287:1427-30.

Wu MY, Chow SN. Derivation of germ cells from mouse embryonic stem cells. J Formos Med Assoc 2004 (in press)

Yoshizaki T, Inaji M, Kouike H, Shimazaki T, Sawamoto K, Ando K, Date I, Kobayashi K, Suhara T, Uchiyama Y, Okano H. Isolation and transplantation of dopaminergic neurons generated from mouse embryonic stem cells. Neurosci Lett 2004; 363:33-7.