2014 年臺灣國際科學展覽會
優勝作品專輯

作品編號　**090022**

參展科別　醫學與健康科學

作品名稱　**Synergistic effects of external factors on reprogramming of insulin-producing cells**

得獎獎項　大會獎：三等獎

美國 **I-SWEEEP** 正選代表：**2014** 年美國國際永續發展 **3E** 科技競賽

就讀學校　臺北市立第一女子高級中學

指導教師　林玟娟、沈家寧

作者姓名　丁靈文

關鍵字　肝胰轉分化、胰島素分泌細胞

作者簡介

我是丁靈文，目前就讀於北一女中數理資優班三年級，對於各式新奇的東西充滿興趣。一接觸生物後便愛上這一領域(尤其是解剖)。高二時有幸進入沈家寧教授的實驗室，學習到許多的知識以及研究方法，以及最重要對科學研究的熱誠和堅持，雖然做實驗的過程一定會有挫折，但在得到結果那一瞬間，其興奮之情無法言喻，一切的努力都是值得的。也非常感謝教授及學姊的耐心的指導和協助，沒有他們的協助，我的專研也無法順利進行，謝謝你們！

中文摘要

第一型糖尿病是因自身免疫破壞使貝他細胞（ß-cell）數量減少，目前治療糖尿病最好的方式是利用胰島移植補充貝他細胞，而胰島來源缺乏導致全世界超過三千萬糖尿病患者無法用胰島移植治療糖尿病。在低等節肢動物的消化腔，肝胰組織存在同一個器官中，稱為肝胰臟(Hepatopancreas)。因此從生物演化角度看，肝胰兩種器官細胞親緣相近，且為擴大貝他細胞供應來源，我們試著測試肝臟細胞是否能藉由同時表現胰臟轉錄因子 Pdx1 或 Ngn3 重新編程成胰島素分泌細胞，並進一步開發能增進這些胰島素分泌細胞活性的培養因子。因此，我們測試正常個體中會調控貝他細胞生長、分化、胰島素製造及分泌的外在環境培養因子：葡萄糖濃度、菸鹼酸（Nicotinamide）、腸泌素 (Glucagon-like peptides 1) 、類腸泌素（Exendin-4）、血小板生長因子(platelet-derived growth factor)，對肝細胞重新編程為胰島素分泌細胞的影響。結果發現這些因子會抑制肝細胞專一轉錄蛋白表現、細胞生長或造成細胞死亡。且在肝細胞中表達胰島分化必須轉錄因子 Pdx1 及 Ngn3，並配合不同培養因子組合處理後，得知當葡萄糖、腸泌素、類腸泌素、血小板生長因子共同處理，對肝細胞轉變成胰島素生成細胞效率有加乘並顯著促進胰島素分泌的效果。因此我們藉由表現 Pdx1 及 Ngn3 配合特定培養因子提高肝細胞轉化效率，並提高胰島素分泌細胞活性，希望將來提供胰島移植應用。

Abstract

The etiology of type 1 diabetes is a progressive autoimmune disease that results in destruction of ß-cells in islets and further causes diminished production of insulin. The islets transplant is now considered the best way to increase insulin secreting cells. However, over 30 million type 1 diabetics cannot be cured by islets transplant because of the shortage of islets. To expand the supply of ß-cells, our research is aimed to develop ß-cell resource by cells reprogramming. Human and other vertebrates have an elaborate digestive system. Among all, the liver and the pancreas play crucial roles in metabolism, and regenerating and secreting digestive juice. In fact, liver and pancreas tissues in low developed animals, such as arthropods, are stored in the organ called Hepatopancreas and are responsible for secreting digestive enzymes, metabolism and regenerating function. From the perspective of animal evolution, the liver and the pancreas are homorganic. Hence, our purpose is to study whether liver cells could be reprogrammed into ß-cells in islets. By expressing transcription factors, pancreatic and duodenal homeobox 1(Pdx1) and Neurogenin 3 (Ngn3), in liver cells, we are able to reprogram liver cells into insulin-producing cells. Our main work is to search for cultivating factors that could increase transforming efficiency and survival rate of these cells. In a normal individual, cell development, differentiation and the production and the secretion of insulin in ß-cells are generated strictly by environmental factors. Therefore, we use the five following factors, High glucose, Nicotinamide, Glucagon-like peptides 1 (GLP1), Exendin-4 and Platelet-derived growth factor (PDGF), to cultivate reprogrammed cells.

We found that these generating factors could inhibit the expression of specific transcription factor in liver cells and result in the inhibition of liver cells growth or the

induction of cell death. Furthermore, we express the two essential transcription factors, Pdx1 and Ngn3. After generating cells with various concentration of cultivating factor, immunofluorescene staining and RT-PCR could demonstrate that there is a synergistic effect of transforming liver cells into insulin producing cells. Hence, we could increase the liver cells transforming efficiency by expressing pancreas transcription factors, Pdx1 and Ngn3, and complement with specific cultivating factors, increasing the activity of reprogrammed pancreas cells.

一、 前言

(一) 背景介紹：

1. 胰臟生理及發育

胰臟是扁平長形的腺體，位於左上腹部的後腹膜腔，是人體的第二大消化腺體(Wu et al.,1994)。有趣的是，胰臟的功能很特殊，同時具有外分泌(exocrine)及內分泌(endocrine)系統兩大功能。其中外分泌系統中主要分為腺泡(acinar)細胞及導管(ductal)細胞。腺泡細胞分泌胰液至導管，而導管細胞則負責運輸胰液至十二指腸，以進一步在小腸中消化食物中的各種營養成分。內分泌系統則是由一特殊細胞群所構成，名為蘭氏小島(islets of Langerhans)，其中由 α 細胞、β 細胞、δ 細胞、ε 細胞及 PP 細胞所組，α 細胞分泌昇糖素(glucagon)，可以使血糖濃度上升；β 細胞分泌胰島素(insulin)，可使血糖濃度下降；δ 細胞分泌體抑制素(somatostatin)，可抑制昇糖素、胰島素之分泌及小腸運動；ε 細胞分泌飢餓素(ghrelin)，作用為刺激食慾；PP 細胞則分泌胰多肽(pancreatic polypeptide)，能抑制腸胃蠕動和胰液分泌(Slack, 1995)。

在發育過程中，胰臟是自腸管內胚層表皮細胞開始發育，在胚胎第 9.5 天，腸管內胚層表皮細胞的背部(dorsal)及腹部(ventral)開始隆起，至胚胎第 12.5 天時，背部及腹部的胰臟前驅組織以開始形成分支狀，此為第一階段轉變。接著，在第二階段轉變，胚胎第 14 天，外分泌及內分泌細胞皆開始分化。最後，在胚胎 15-19 天，背側胰組織會進行旋轉至腹側並與腹側胰組織融合成一個完整的胰臟，且此時內分泌細胞成熟，並組織形成團狀，最終構成胰島(Habener et al.,

2005)(圖一)。

2. 糖尿病成因及治療方法

糖尿病為一極為普遍的慢性流行疾病，全球各地將近有三億人為此病所苦。當人體無法適當且有效地利用或代謝葡萄糖，導致血液中血糖濃度便會無法恢復正常狀態，此症狀便稱為糖尿病(diabetes mellitus)，糖尿病分為兩型，第一型糖尿病(胰島素依賴型糖尿病)是屬於自體免疫疾病，發病以孩童及青少年最常見，主要是因為免疫系統主動攻擊病破壞β細胞，造成胰島素分泌不足。第二型糖尿病(非胰島素依賴型糖尿病)則是因β細胞所分泌之胰島素不足以降低血糖，久而久之造成肝臟細胞和肌肉細胞上的受器對胰島素不敏感，又稱為胰島素阻抗性(insulin resistance)，使胰島素無法有效地被運用，進而造成糖尿病。嚴重時甚至會造成失明、腎臟衰竭甚至截肢。

為能夠有效地緩解糖尿病患因高血糖所引起的各種慢性病變，目前治療的方式有下列幾種：

(1) 施打胰島素：為較常見之治療方式，施打方便，但有時會因為血糖在胰島素作用下急遽下降，造成低血糖，嚴重者甚至休克昏迷。

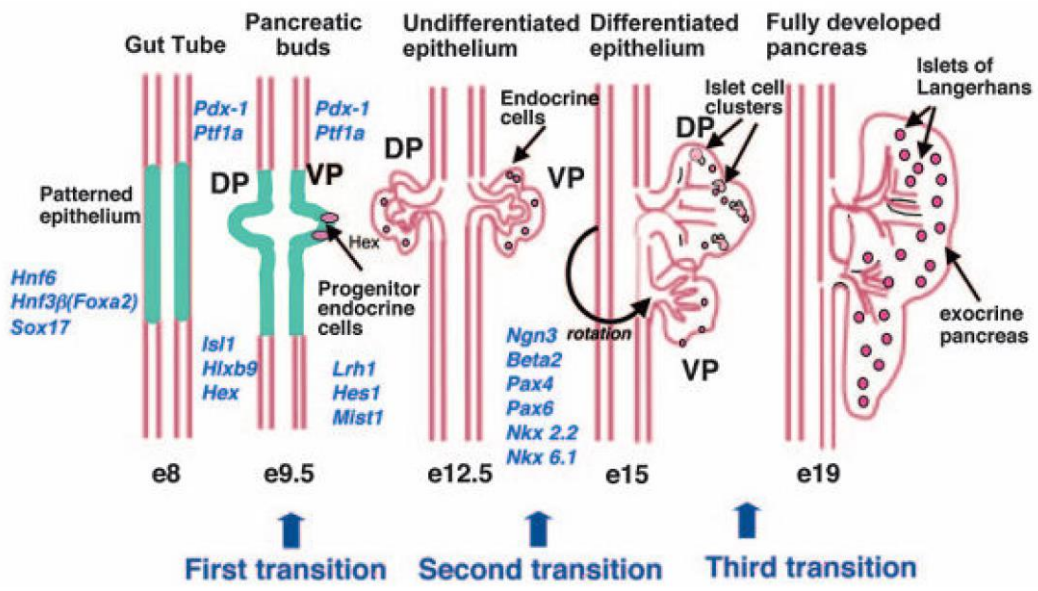
(2)口服藥物：作用和施打胰島素類似，皆易造成低血糖之副作用，長期服用也會影響肝功能，且皆治標不治本。

(3) 移植胰島細胞(islet transplantation)：根據全球胰島移植案例，經胰島移植的病患可彈性飲食且長期維持正常血糖濃度，不需另外注射胰島素，因此可提昇病患的生活品質，但胰臟取得不易，且胰島分離純化過程中胰島細胞易流失，移植後亦需長期服用抗免疫藥物。因此為能增加胰島細胞的來源與數量及解決手術後免疫排斥的問題，是否

能尋找方法從其他自體細胞轉變成胰島素分泌細胞，使能得到足量的胰島細胞，並提供植入的胰島細胞良好的生長環境等，皆是對於提昇胰島移植手術很重要的課題。

3. 胰臟β細胞分化調控轉錄因子(Pdx1 及 Ngn3)

Pdx1(pancreatic and duodenal homeobox 1)及 Ngn3(Neurogenin3)是其中兩個已被證實對調控胰島β細胞發育分化過程中很重要的轉錄蛋白，在人類胚胎發育約四週時，腹側內胚層在啟動因子(含 Pdx1)作用下分化出胰臟先驅(pancreatic progenitors)(圖一)，且在晚期胰島發育，Pdx1 最終只會表現在β細胞中。值得注意的是，Pdx1 基因破壞的老鼠會有胰臟發育不全的現象，且出生後幾天便會死亡(Offield et al., 1996)，因此代表 Pdx1 對於胰臟發育有相當重要的作用。此外，胰臟發育過程中，在 Ngn3 的表現下，胰臟幹細胞會分化出內分泌先驅(endocrine progenitors)，且在 Ngn3 基因剔除老鼠模式中，此老鼠胰臟中沒有生成任何的內分泌細胞(Gradwohl et al., 2000)，由此可知 Ngn3 對於胰臟內分泌細胞發育是必須的。且在研讀過去的研究報導過程中，我們發現 Pdx1 和 Ngn3 雖能使胚胎幹細胞分化成或重新編程轉化外分泌細胞為類胰島貝他細胞(ß-like cell)，但截至目前為止，這些研究尚無法有效率的得到足夠量的胰島素分泌細胞以供胰島移植手術利用



圖一、胰臟發育於各胚胎時期所參與調控的轉錄蛋白及發育過程

4. 胰島素生成、分泌相關調控因子

由上述可知，胰島素在人體血糖調控扮演很重要的角色，然而胰島素的生成和分泌是受環境中因子嚴密調控的，當環境中葡萄糖濃度增加，葡萄糖進入β細胞，透過檸檬酸代謝循環後會使細胞中 ATP 比例增高，並進一步促使對 ATP 敏感的鉀離子通道關閉，細胞膜去極化後，依賴電壓的鈣離子通道打開，鈣離子流入細胞，刺激細胞中的胰島素囊泡經胞吐作用使胰島素釋放到細胞外。但除葡萄糖濃度外，在臨床上治療糖尿病患的藥物及體內由其他組織分泌的賀爾蒙也會影響胰島素生成及分泌，包括：

(1)菸鹼酸（Nicotinamide）：菸鹼酸是維生素 B3 的一種形式，除誘發胰島素從分泌泡中分泌至胞外，亦能抑制破壞胰島細胞酵素的活性，保護 ß-cell 功能(Freeman et al., 2006)。

(2)GLP1 腸泌素 (Glucagon-like peptides 1, GLP1)：GLP1 是一種由腸胃 L 細胞所分泌的腸泌素類荷爾蒙，作用是刺激胰島 ß-cell 分泌胰島素並抑制升糖素的分泌(Combettes, 2006)。

(3)Exendin-4 類腸泌素：Exendin-4 是由蜥蜴毒液中萃取的 GLP1 類似物，能促進胰島素分泌、增加其敏感性(Li et al., 2010; Xu et al., 1999)。

(4)血小板生長因子(platelet-derived growth factor, PDGF)：PDGF 證實在胰臟發育過程中能刺激年少時期具有 PDGF 接受器的 ß-cell 增殖及生長(Chen et al., 2011)。

(二) 研究動機：

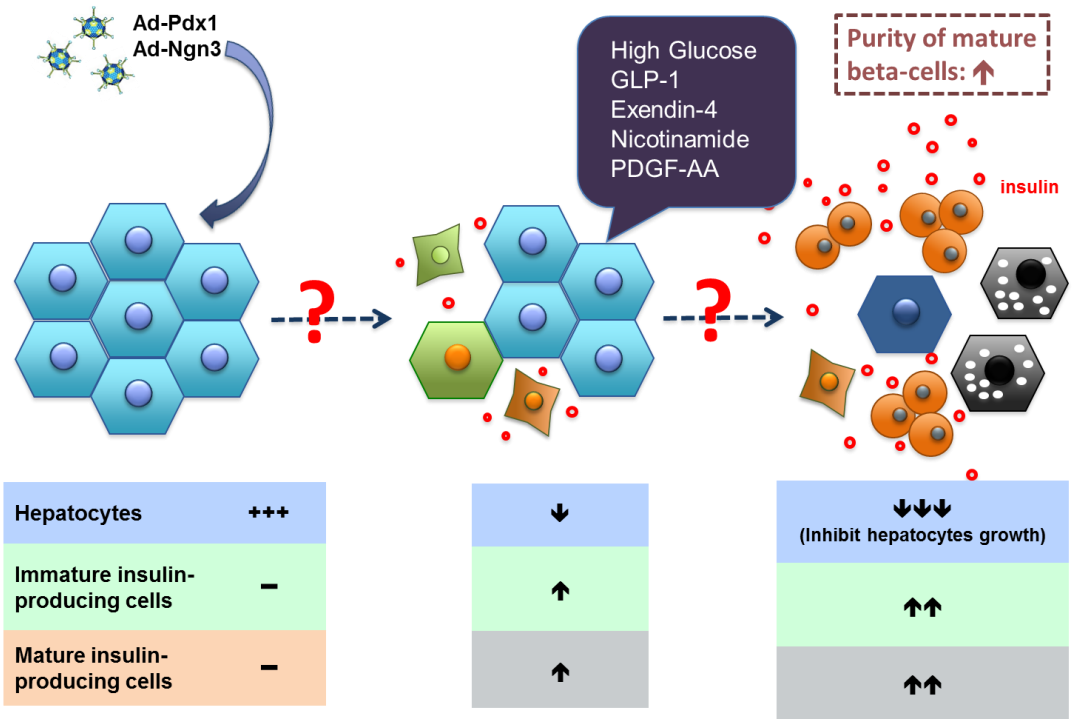
根據世界衛生組織統計，目前全球已有約 3 億人口罹患糖尿病，且平均每十秒鐘就會有一人因糖尿病造成死亡，因此能如何有效地治療糖尿病、提昇糖尿病患的生活品質是我們認為很重要且需要解決的問題。從 1921 年開始可使用胰島素來治療，但是並沒有辦法將病人完全治癒，目前認為治療糖尿病最好的方式是胰島移植來補充胰島素分泌的細胞，然而胰島來源缺乏導致目前為止，全世界超過三億糖尿病患者仍無法用胰島移植來治療糖尿病患。

為了擴大胰島貝他細胞（ß-cell）供應來源，我們想利用細胞重新編程的方式開發胰島貝他細胞（ß-cell）來源。在演化較低等動物如節肢動物的消化腔中，肝胰組織其實是存在同一個器官中，稱為肝胰臟(Hepatopancreas)，負責分泌消化酶兼具代謝儲存及調節功能。因此從生物演化的角度來看，肝胰兩種器官細胞其實是親緣相近的家人，因此我們想試著測試肝臟細胞是否能透過表現胰臟轉錄因子 Pdx1 及 Ngn3 重新編程轉化成胰島貝他細胞，並進一步找尋開發能增進這些從肝細胞重新編程而來的胰島細胞活性的培養因子。

(三) 研究目的：

在我們的實驗中，我們試著利用腺病毒攜帶兩個胰臟發育必須轉錄因子 Pdx1 及 Ngn3，以不同濃度培養因子處理處理細胞後，觀察這些培養

因子對肝臟細胞及重新編程胰島細胞生長及細胞內轉錄蛋白表現的影響與變化；並偵測轉分化過程中，處理外在培養因子與否對肝胰臟基因表現是否有消長變化。我們預期能藉由表現胰臟轉錄因子 Pdx1 及 Ngn3 配合特定培養因子提高肝臟細胞轉化效率，並進一步提高重新編程胰島細胞活性。



圖二、利用 Pdx1 及 Ngn3 並在培養因子作用下，能得到純度高效率佳的胰島素分泌細胞

二、 研究方法及過程：

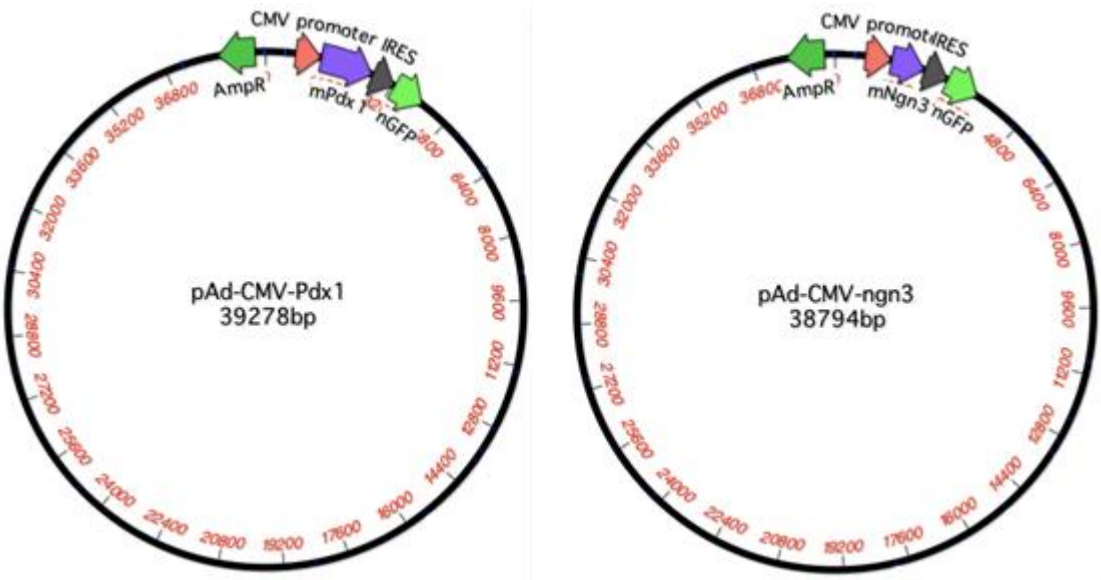
(一) 研究材料及設備：

1. AML12 小鼠肝臟細胞株：

我們的實驗利用 AML12 (alpha mouse liver 12)小鼠肝臟細胞株做肝胰轉分化體外培養模式，在早期研究中，已證實 AML12 細胞無法在軟洋菜膠細胞群落形成分析法(soft-agar assay)中生長出細胞群落，且 AML12 細胞能表現成熟肝臟細胞的轉錄因子，包括白蛋白(albumin)及運鐵蛋白(transferrin)等(Wu et al., 1994)，因此 AML12 細胞可被當做小鼠正常肝臟細胞模式。

2. 攜帶胰島貝他細胞轉錄因子 Pdx1 及 Ngn3 基因的腺病毒載體：

為誘發小鼠肝臟細胞能藉由重新編程的過程轉變成能產生胰島素的貝他細胞，因此為了能在不容易用傳統方法將基因轉殖進入的肝臟細胞表達外來基因，我們利用兩種腺病毒載體分別攜帶在貝他細胞發育過程中很重要的轉錄因子 Pdx1 和 Ngn3，藉由腺病毒感染強迫肝臟細胞表現這兩種轉錄因子。而此腺病毒載體是利用人類巨細胞病毒早期基因啟動子(cytomegalovirus major immediate early promoter)開啟並大量活化 Pdx1 和 Ngn3 的表現，並利用綠色螢光蛋白(GFP)來追蹤被病毒感染的細胞。



圖三、攜帶胰臟β細胞特殊轉錄因子 Pdx1(左)及 Ngn3(右)的腺病毒載體

3. 調節胰島素產生或分泌的外在環境培養因子：

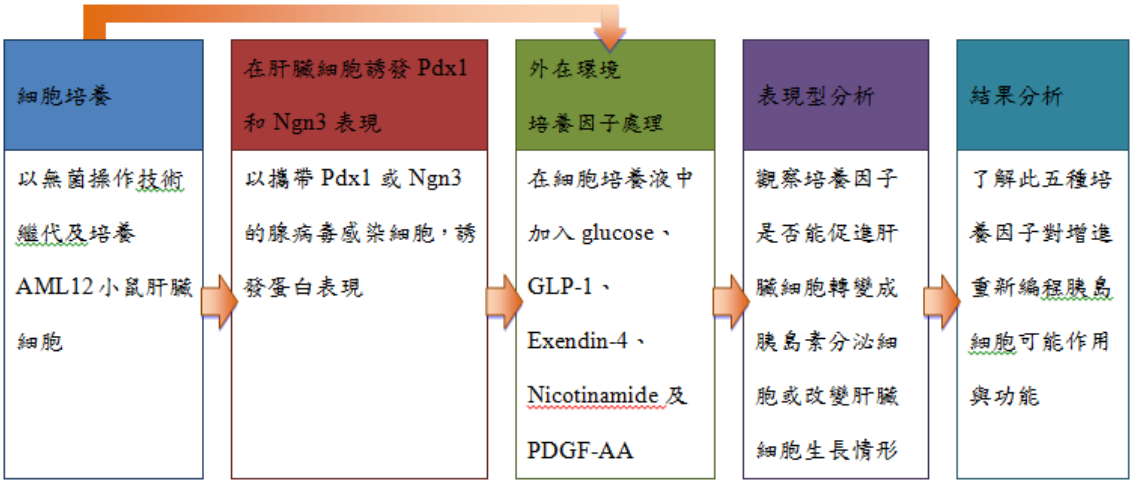
葡萄糖、菸鹼酸（Nicotinamide）、腸泌素(Glucagon-like peptides 1, GLP1)、類腸泌素(Exendin-4)及血小板生長因子(platelet-derived growth factor, PDGF) 。

4. 器材設備：

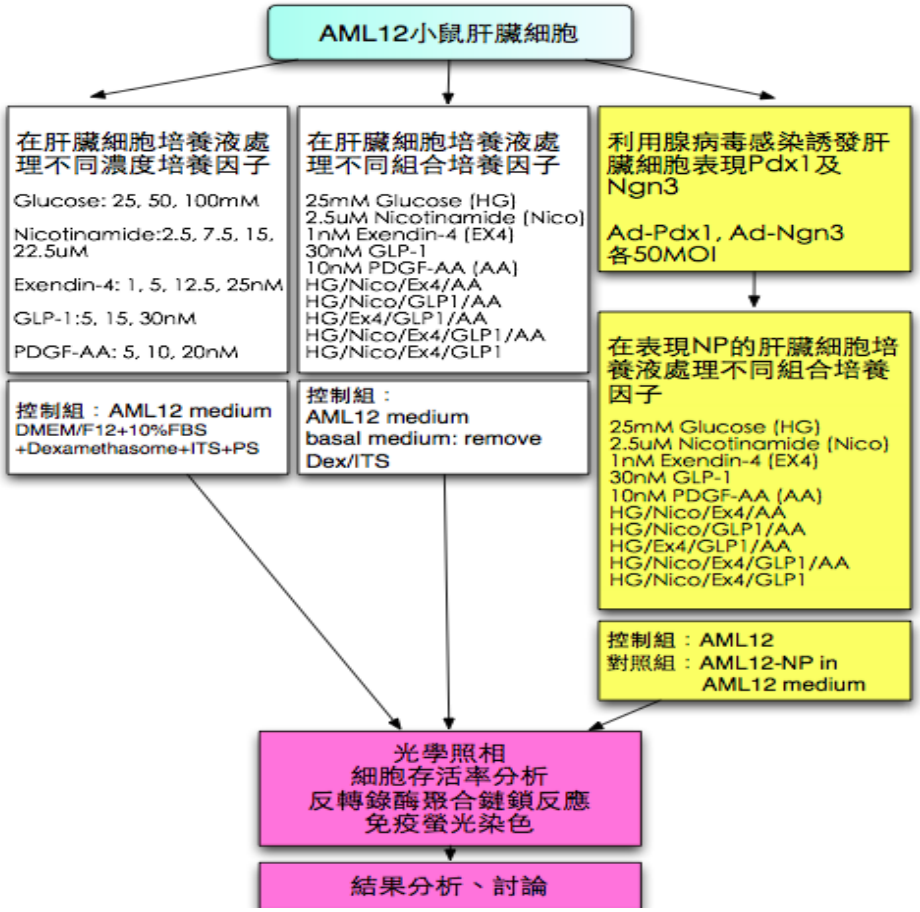
微量吸管、細胞培養箱、無菌操作檯、聚合酶鏈鎖反應器、乾式加熱器、桌上型冷凍離心機、微量盤式分光光度分析儀、真空乾燥機、水平凝膠電泳儀器、電泳影像處理系統、正立及倒立螢光顯微鏡、電磁加熱攪拌機、攪拌子、電子天平。

(二) 實驗流程與設計：

1. 流程：


細胞培養
以無菌操作技術繼代及培養AML12小鼠肝臟細胞
在肝臟細胞誘發 Pdx1 和 Ngn3 表現
以攜帶 Pdx1 或 Ngn3 的腺病毒感染細胞，誘發蛋白表現
外在環境培養因子處理
在細胞培養液中加入 glucose、GLP-1、Exendin-4、Nicotinamide 及 PDGF-AA
表現型分析
觀察培養因子是否能促進肝臟細胞轉變成胰島素分泌細胞或改變肝臟細胞生長情形
結果分析
了解此五種培養因子對增進重新編程胰島細胞可能作用與功能

2. 實驗設計：


AML12小鼠肝臟細胞
在肝臟細胞培養液處理不同濃度培養因子
Glucose: 25, 50, 100mM
Nicotinamide:2.5, 7.5, 15, 22.5uM
Exendin-4: 1, 5, 12.5, 25nM
GLP-1:5, 15, 30nM
PDGF-AA: 5, 10, 20nM
控制組：AML12 medium
DMEM/F12+10%FBS
+Dexamethasome+ITS+PS
在肝臟細胞培養液處理不同組合培養因子
25mM Glucose (HG)
2.5uM Nicotinamide (Nico)
1nM Exendin-4 (EX4)
30nM GLP-1
10nM PDGF-AA (AA)
HG/Nico/Ex4/AA
HG/Nico/GLP1/AA
HG/Ex4/GLP1/AA
HG/Nico/Ex4/GLP1/AA
HG/Nico/Ex4/GLP1
控制組：
AML12 medium
basal medium: remove Dex/ITS
利用腺病毒感染誘發肝臟細胞表現Pdx1及Ngn3
Ad-Pdx1, Ad-Ngn3
各50MOI
在表現NP的肝臟細胞培養液處理不同組合培養因子
25mM Glucose (HG)
2.5uM Nicotinamide (Nico)
1nM Exendin-4 (EX4)
30nM GLP-1
10nM PDGF-AA (AA)
HG/Nico/Ex4/AA
HG/Nico/GLP1/AA
HG/Ex4/GLP1/AA
HG/Nico/Ex4/GLP1/AA
HG/Nico/Ex4/GLP1
控制組：AML12
對照組：AML12-NP in AML12 medium
光學照相
細胞存活率分析
反轉錄酶聚合鏈鎖反應
免疫螢光染色
結果分析、討論

(三) 實驗方法：

1. 細胞培養：

將 AML12 細胞培養在含有 10%胎牛血清、40 ng/mL 氟美松(Dexamethasone)、0.005mg/m 胰島素(insulin)、0.005 mg/mL 運鐵蛋白(transferrin)、5 ng/mL 硒(selenium)、以及 1% 盤尼西林(penicillin)及鏈黴素(streptomycin)混合液的 DMEM/F12 培養液中，並置放在 37℃含有 5% CO_2 的細胞培養箱中，每天觀察細胞生長狀態，待細胞生長至培養盤底部空間約 80%滿度時，便利用胰蛋白酵素(trypsin)繼代細胞。

2. 細胞存活率分析(MTT assay)：

細胞存活率分析法是利用 MTT 在經由活細胞粒線體中的琥珀酸去氫酵素(succinate dehydrogenase)作用，進一步還原成藍色的 formazan，因此我們利用 MTT 這個化合物來檢測 AML12 細胞在經由促進胰島素分泌的培養因子處理後的存活率變化。在 96 孔細胞培養盤中，每小格加入 5000 顆 AML12 細胞，以 AML12 培養液在 37℃的細胞培養箱中培養，隔天移除肝臟細胞所需要的氟美松(Dexamethasone)、胰島素、運鐵蛋白及硒後，加入不同組合的培養因子，每隔 24 小時每組細胞加入 20 μL 0.5 mg/mL MTT，在 37℃的細胞培養箱中培養 2 小時後，移除培養液，以 100 μL DMSO 在 37℃處理 30 分鐘，使藍色沈澱的 formazan 完全溶解，最後以微量盤式分光光度分析儀以 540 nm 波長偵測吸光值。

3. 免疫螢光染色(immunofluorescence staining)：

腺病毒感染 AML12 細胞後第五天，以 4% 三聚甲醛

(paraformaldehyde)固定細胞，於室溫作用 30 分鐘後，以磷酸鹽緩衝液(phosphate buffered saline, PBS)清洗細胞，再加入 0.1%之介面活性劑 Triton X-100 in PBS 於室溫靜置 20 分鐘以將細胞膜打洞，再次以 PBS 清洗後。接下來為去除非特異性結合(non-specific binding)，加入 5%BSA(bovine serum albumin,牛血清白蛋白)覆蓋細胞，置於室溫 1 小時，以 PBS 清洗，再加入以 5%BSA 稀釋的一級抗體，於 4℃作用隔夜，以 PBST 清洗五次，每次 10 分鐘，一級抗體清洗乾淨後，加入同樣以 5%BSA 稀釋的二級抗體，於室溫避光作用 1 小時，以 PBST 清洗五次，每次 10 分鐘。最後利用一雙股 DNA 標記結合的藍色螢光染料 DAPI，以 500 倍稀釋於室溫作用 10 分鐘來標定細胞核，以便觀察細胞核型態變化，並以封片膠封片後，以蔡司正立螢光顯微鏡觀察並照相記錄於肝胰轉分化過程中，細胞蛋白表現變化情形。

一級抗體			二級抗體		
抗體名稱	稀釋倍率	廠牌	抗體名稱	稀釋倍率	廠牌
Rabbit anti-albumin	1:100	sigma (USA)	Donkey anti-rabbit Alexa594	1:200	invitrogen (USA)
Rabbit anti-transferrin	1:100	Dako (Denmark)			
Guinea pig (GP) anti-insulin	1:50	abcam (England)	Rabbit anti-GP TRITC	1:200	sigma (USA)
Chicken anti-GFP	1:1300	abcam (England)	Donkey anti-chicken FITC	1:300	chemicon (Germany)

4. 核醣核酸(RNA)之粹取：

AML12 細胞培養在加有不同組合的胰島素分泌培養因子之培養液五天後，先將培養液去除並以 PBS 清洗細胞，加入 400 μl 的 Tri-reagent，以微量吸管(pipetmen)反覆抽吸使細胞完全破裂並收集此細胞溶解液至新的 1.5 mL 微量離心管，為初步分離 RNA、DNA 與蛋白質，每管加入 80 μl 的氯仿(chloroform)(Tri reagent 1/5 的量)並以手用力搖晃 15 秒使液體呈粉色乳糜狀，至於室溫五分鐘直到分層，

於 4℃高速離心每分鐘 13200 轉(rpm)共 15 分鐘後，小心抽取上層透明上清液至新的 1.5 mL 微量離心管（此時最上層透明液體為 RNA，中層白色固體為 DNA，最下層粉色液體為蛋白質），加入 170μL 異丙醇(isopropanol, 上層溶液的 0.7 倍)，上下翻轉離心管混合液體後置於室溫 10min，再次於 4℃離心 13200 轉(rpm)共二十分鐘，移除上清液(supernatant)，加入 1 ml 的 75％酒精清洗並以高速離心五分鐘後，再次去除上清液並將沉澱物真空蒸乾至呈白色粉末(不要太乾)，以 127.5 μL 的二次水再懸浮沉澱物。為確保 RNA 樣本中沒有摻雜基因組 DNA 污染，在 RNA 樣本中加入 DNase-1 以切除殘留的基因組 DNA (每管 RNA 樣本加入：10X RQ1 DNase buffer 5 μL, RNasin(40 U/μL) 1.5 μL, RQ1 DNase-1 (1Unit-μL) 4.5 μL)，於 37℃處理 15 分鐘後，加入 100 mM EDTA 3.75 μL 及 10% SDS 1.5 μL 抑制 DNase-1 酵素活性，再加入 150 μL Phenol/Chloroform/IAA，混和均勻並在 4℃用最大速率 13200 轉離心 5min，取出上層 RNA 溶液至乾淨的 1.5mL 離心管，加入 3 M NaOAc 15 μL 及 100%冰酒精 375 μL 後，於-20℃靜置過夜使 RNA 析出，隔天先在 4℃以 13200 轉離心 30 分鐘後，用 1mL 的 100％冰酒精清洗沉澱物，再次以最高速離心 30 分鐘，並重複酒精清洗步驟三次，最後以真空蒸乾沉澱物至呈透明澄清(大約五分鐘)並冷凍儲藏於-80℃。

5. 反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)：

此實驗是要將萃取出的 RNA 利用反轉錄酵素進行反轉錄作用以合成 cDNA，先將每組 RNA 稀釋成 60 ng/μL，取 900ng RNA 作為模版加入微量離心管中，並加入 1 μL Oligo(dT)引子，以適量的 DEPC-二次水將體積補至 15 μL，將反應溶液置於 65℃反應 10 分鐘後，迅速轉置冰上冷卻，以確保 RNA 能伸展開。五分鐘後，每組反應液加入

4.5 μL 5X fermentas reaction buffer、0.5 μL RNase 抑制劑、1.5 μL dNTP 混合液及 1μL ReverAid 反轉錄酵素，然後於 25℃作用 10 分鐘、45℃作用 60 分鐘、最終以 70℃反應 10 分鐘以破壞反轉錄酵素活性，cDNA 產物保存於-20℃冰箱。接下來我們利用聚合酶鏈鎖反應分析外在環境培養因子是否能促進肝臟細胞轉變成胰島細胞，先在微量離心管上蓋標記名稱，每管加入 1 μL cDNA、2.5 μL 10X 反應緩衝液、0.5 μL dNTP 混合液、特定基因 5 端及 3 端引子各 0.5 μL、0.5 μL DNA 聚合酶及 19μL 去離子水，混和均勻(pipet)後，放入離心機，使管壁上不附著溶液。在聚合酶鏈鎖反應儀器中，先加熱至 95℃使 DNA 變性(denature) 2 分鐘，接著 95℃反應 20 秒、55℃使引子與 DNA 黏合(annealing)作用 30 秒、及 72℃使聚合酶延伸(extension)合成新股 DNA，此三個反應反覆循環 25~35 回，以放大 DNA，最後以 72℃反應 6 分鐘終止聚合酶活性，並保存於 4℃。最後以 DNA 電泳觀察培養因子處理後在轉錄層面對肝臟及胰島細胞專一表現基因的影響，每管先加入 5 μL DNA 上樣染劑(6X orange DNA loading dye)、以震盪混合器(vortex)混合均勻後，每組取 7 μL 加至 2%洋菜瓊脂膠(agarose gel)，並於洋菜膠的第一格加入 1.8 μL 100bp DNA 分子量標準液(marker)，以 100 伏特電壓進行電泳分析 15 分鐘後，以 Ethidium Bromide (EtBr) 染色 10 分鐘，最後在紫外光下觀察結果，並照攝存檔。

6. 蛋白質萃取：

AML12 細胞培養在加有不同組合的培養因子之培養液五天後，在冰上先將培養液以移除並以 PBS 清洗兩次，移除 PBS 後，加入 100 μL 的裂解液(lysis buffer)：(50 mM Tris HCL pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium Deoxycholate, 0.1% SDS)，然後於冰上刮取細胞，再進行 3 次超音波震盪，儲存於-80℃。接下來進行蛋白質定量，先準

備六組定量標準管，以 0.1 μg/μL 的 BSA 配置，分別加入 0/20/40/60/80/100 μL 的 BSA 並以 ddH_2O 補至 800 μl，而要測定的樣本是每管加入 1 μL 的蛋白質樣本和 799 μL 的 ddH_2O，最後每管連同標準管加入 200 μL 的 Bio-Red 蛋白質染劑，混合均勻後各取 200 μL 加於 96 孔盤，最後以酵素免疫分析測讀儀以 595 nm 波長偵測吸光值。

7. 西方墨點法（Western blot）：

用 6 倍 SDS 蛋白質染劑將蛋白質樣本稀釋六倍，並加熱至 95℃處理 5 分鐘後，置於冰上冷卻，取 30 μg 的樣本加入 10% SDS-PAGE 膠，上膠以 50 伏特進行電泳一小時，下膠以 100 伏特進行電泳直至蛋白質染劑至膠體底部，然後將膠浸泡於轉印緩衝液(transfer buffer) 10 分鐘，同時將轉印紙浸泡於 100%甲醇中以活化，再將活化的轉印和 3M 圖畫紙浸泡於轉印緩衝液 5 分鐘。接下來以負極到正極的順序將三張 3M 圖畫紙、膠、轉印膜、三張 3M 圖畫紙放置於半乾式轉漬槽(Semi-dry transfer)，並加入移轉液(3 g Tris base, 14.4 g glycine, 1g SDS 以 ddH_2O 補至 800 μl 然後再加入 200 μL 甲醇)，轉印 75mA ，共 30 分鐘，將轉印膜裁切後以 5%脫脂牛奶在室溫浸泡 1 小時，加入以 5% BSA 稀釋的一級抗體，於 4℃作用隔夜，隔天以 TBS-Tween20 清洗五次，每次 15 分鐘，一級抗體清洗乾淨後，加入同樣以 5% BSA 稀釋的二級抗體，在室溫下放置 1 小時，再以 TBS-Tween20 清洗五次，每次 15 分鐘。將轉印紙加入 ECL，然後以 Las4000 mini 化學發光偵檢器照攝存檔。

一級抗體			二級抗體		
抗體名稱	稀釋倍率	廠牌	抗體名稱	稀釋倍率	廠牌
Rabbit anti-cyp7A1	1:100	Santa Cruz	Goat anti-rabbit IgG (H&L) HRP	1:5000	Cell Signalling
Rabbit anti-transferrin	1:1000	Dako (Denmark)			
Mouse anti-GAPDH	1:500	Millipore			
Mouse anti-cyp3A1	1:100	Santa Cruz	Goat anti-mouse IgG (H+L) HRP	1:10000	Millipore

8. 酵素連結免疫吸附分析法(ELISA, enzyme-linked immunoadsorbent assay)：

我們實驗中利用酵素連結免疫分析法偵測胰島素分泌細胞是否有將胰島素分泌至培養液中的能力，首先將胰島素標準液以及蛋白質樣本 10 μL 加入 96 孔盤內，每孔再加入 100 μL 的酵素結合液(enzyme conjugate 1X solution)，於室溫以 800 rpm 搖晃 2 小時，每孔用 700 μL 清洗液(1X wash buffer)清洗，並用力拍打於紙上，總共清洗 6 次後，每孔加入 200 μL 的 TMB 呈色劑(Substrate TMB)，室溫放置 15 min 後，在每孔加入 50 μL 的停止液(stop solution)並搖晃均勻，最後以酵素免疫分析測讀儀以 450nm 波長偵測吸光值。

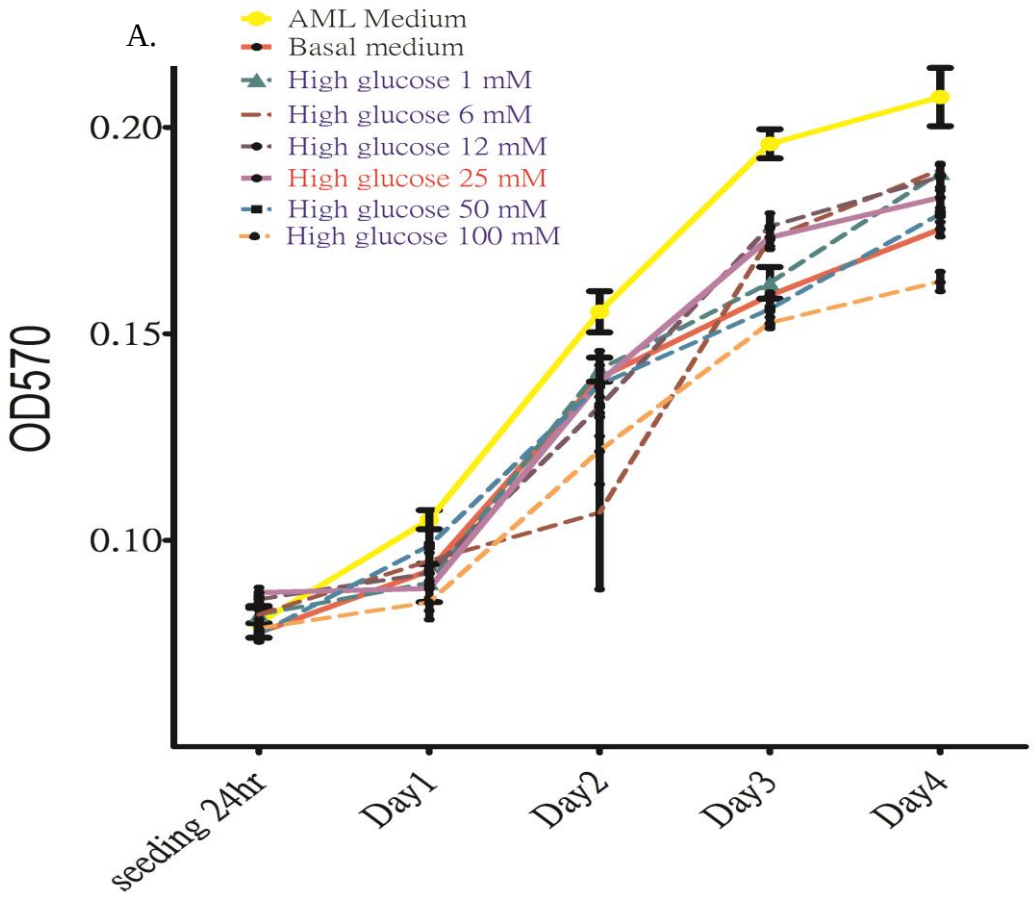
三、 研究結果及討論：

(一) 這五種培養因子在單一處理及不同組合處理下，對肝臟細胞的生長是否會有影響與變化：

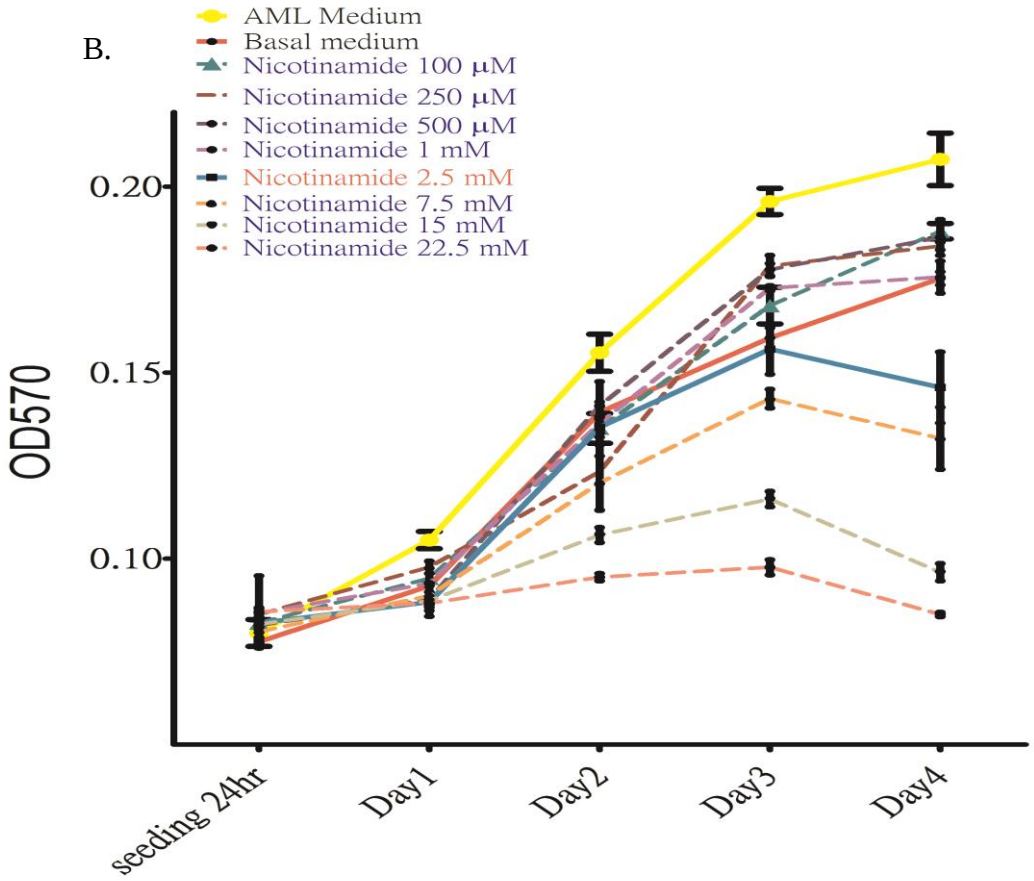
1. 利用不同濃度的培養因子測試對肝臟細胞的生長抑制作用

首先，為觀察不同濃度培養因子對肝臟細胞生長是否有影響，我們利用每 24 小時執行細胞存活率分析來進行實驗偵測，跟據圖四吸光值的結果，在加入不同組合培養因子(24 小時)時，我們同時移除了肝臟細胞生長所需要的氟美松(Dexamethasone，Dex)及胰島素(insulin)、運鐵蛋白(transferrin)、硒(selenium)。在處理培養因子的第二天後，細胞開始繼續生長，而從處理完五天的結果，與將 AML12 細胞培養在傳統 AML12 細胞培養液中的組別細胞比較，在高濃度葡萄糖(High Glucose)中培養的肝臟細胞，細胞存活率有隨著濃度提高時下降的趨勢，而我們要選擇的是能抑制肝臟細胞生長，同時又不會造成細胞過少而不足以重新編成為胰島素分泌細胞，因此選擇中間的濃度(25 mM 葡萄糖)進行接下來觀察培養因子對肝細胞轉分化為胰島素分泌細胞影響的實驗。在 Nicotinamide 的組別中，可以很明顯地看到存活率隨濃度的提高而下降，基於以上理由，我們選擇中間的濃度(2.5 mM Nicotinamide)進行接下來的實驗。至於在 Exendin4 、GLP1 以及 PDGFAA 中，我們無法明顯觀察到肝臟細胞存活率以及培養因子濃度間的關係，因此我們直接選用過去文獻中可以有效提高人類或老鼠胰島細胞生成或分泌胰島素能力的濃度（圖一）。

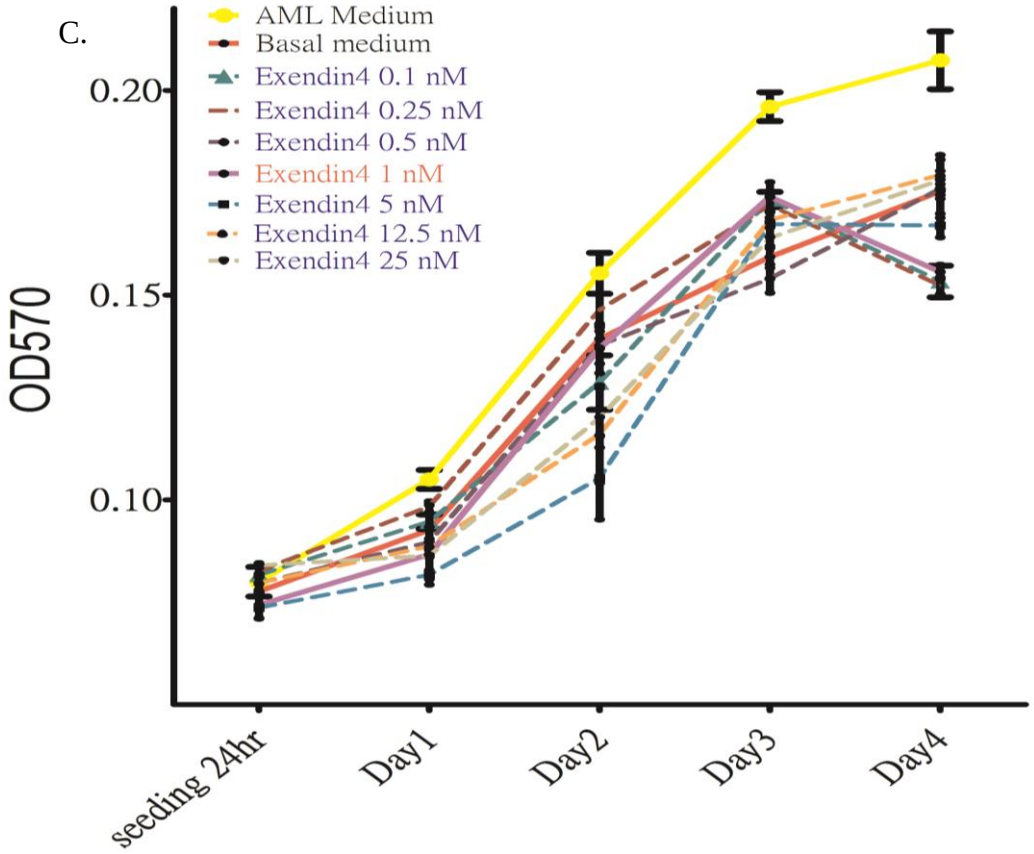
A.


AML Medium
Basal medium
High glucose 1 mM
High glucose 6 mM
High glucose 12 mM
High glucose 25 mM
High glucose 50 mM
High glucose 100 mM
OD570
0.20
0.15
0.10
seeding 24hr
Day1
Day2
Day3
Day4

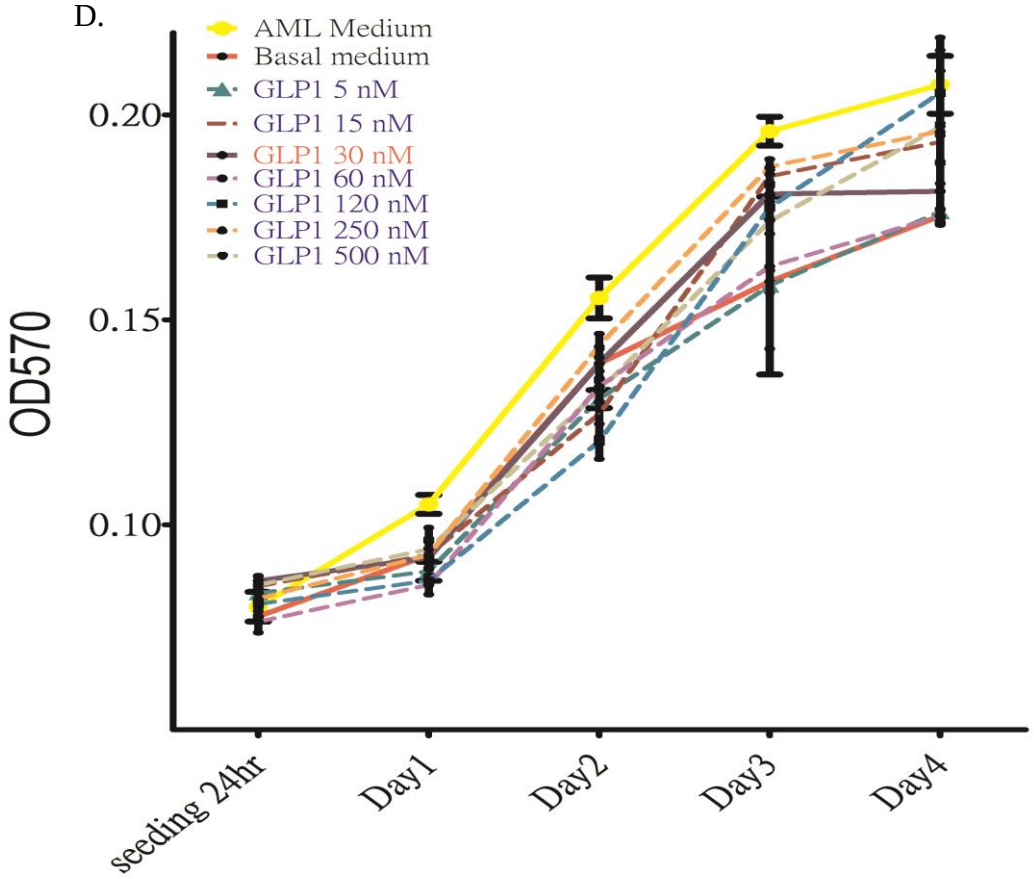
B.

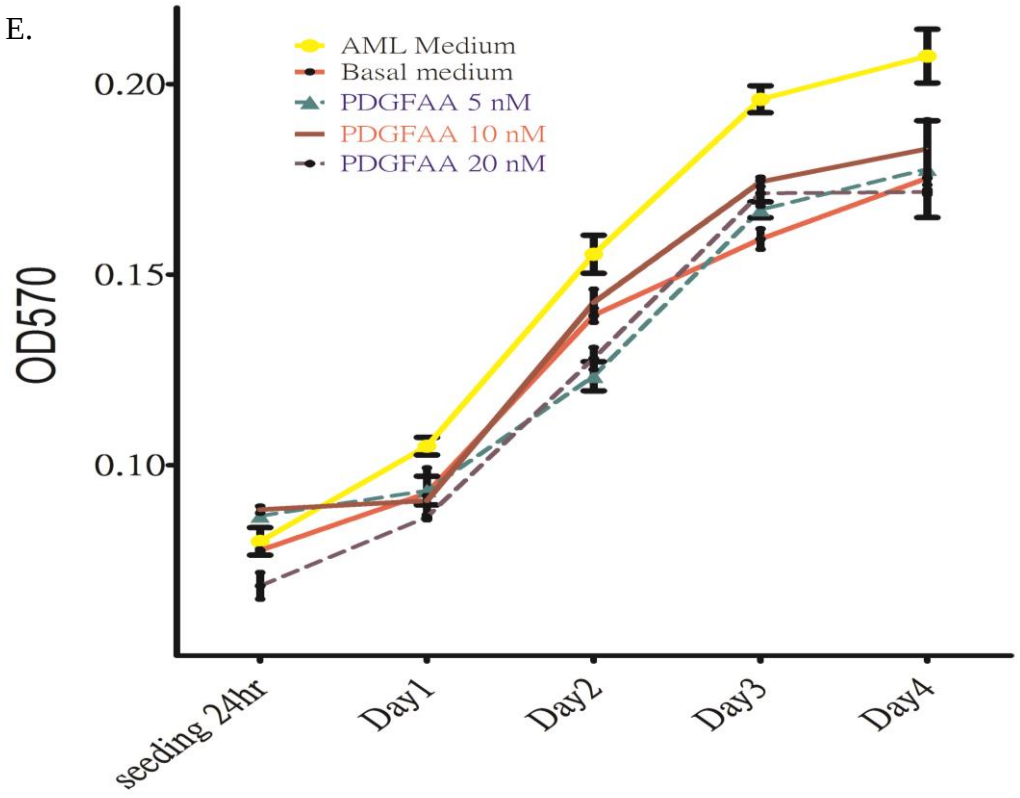

AML Medium
Basal medium
Nicotinamide 100 μM
Nicotinamide 250 μM
Nicotinamide 500 μM
Nicotinamide 1 mM
Nicotinamide 2.5 mM
Nicotinamide 7.5 mM
Nicotinamide 15 mM
Nicotinamide 22.5 mM
OD570
0.20
0.15
0.10
seeding 24hr
Day1
Day2
Day3
Day4

C.


AML Medium
Basal medium
Exendin4 0.1 nM
Exendin4 0.25 nM
Exendin4 0.5 nM
Exendin4 1 nM
Exendin4 5 nM
Exendin4 12.5 nM
Exendin4 25 nM
OD570
0.20
0.15
0.10
seeding 24hr
Day1
Day2
Day3
Day4

D.


AML Medium
Basal medium
GLP1 5 nM
GLP1 15 nM
GLP1 30 nM
GLP1 60 nM
GLP1 120 nM
GLP1 250 nM
GLP1 500 nM
OD570
0.20
0.15
0.10
seeding 24hr
Day1
Day2
Day3
Day4



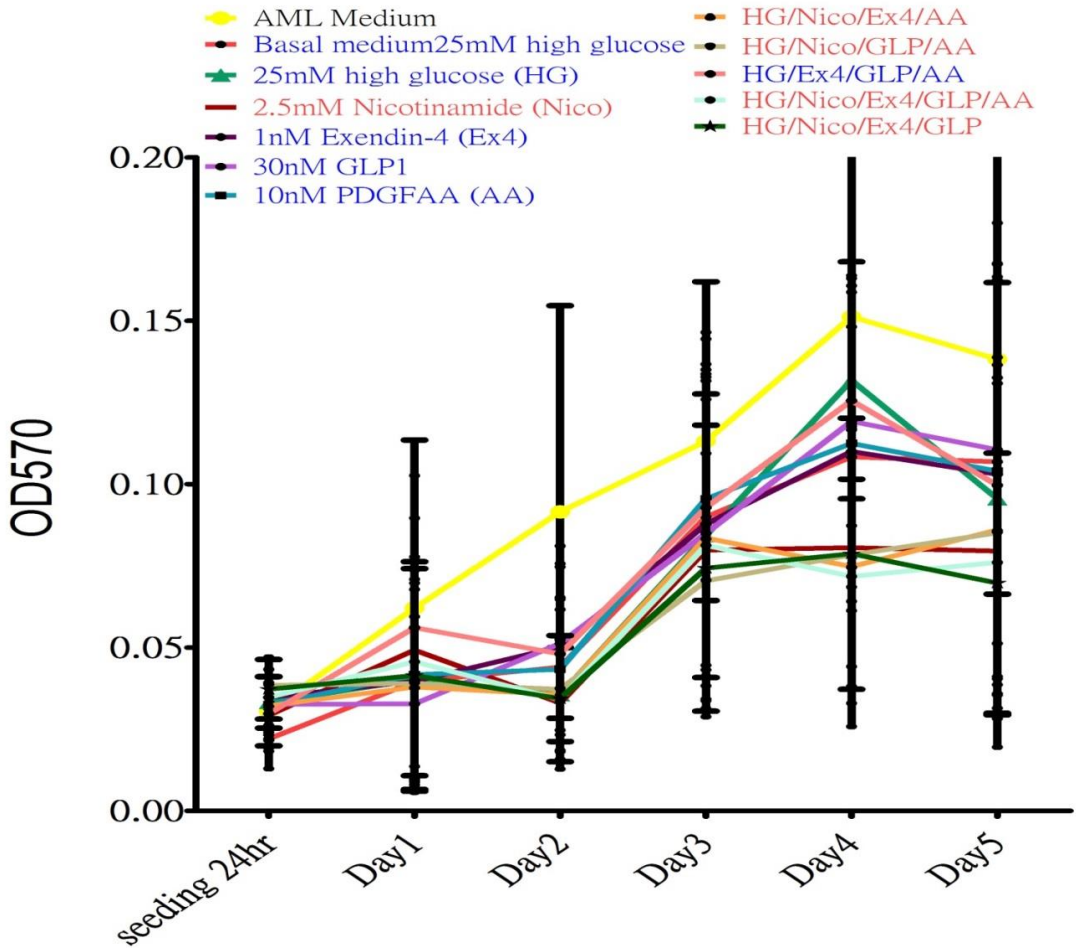
圖四、以 MTT 細胞存活率分析不同濃度培養因子對肝臟細胞生長的影響

AML12 繼代培養在 96 孔細胞培養盤中，每格加入 5×10^3 個細胞，隔天加入不同組合外在環境培養因子(A. High glucose 1/6/12/25/50/100 mM, B.Nicotinamide 0.1/0.25/0.5/1/2.5/7.5/15/22.5 mM, C.Exendin4 0.1/0.25/0.5/1/5/12.5/25 nM, D. GLP1 5/15/30/60/120/250/500 nM, E.PDGFAA 5/10/20 nM)，每天換一次培養液，共培養四天。Y 軸為波長 570 的吸光值，當吸光值越高，代表細胞中累積沉澱的 MTT 越多，也代表細胞越多，X 軸則代表偵測吸光值的時間點，圖中曲線斜率則可代表細胞生長的速率。

2. 測試單一處理及不同組合下肝臟細胞的存活率

選定各個培養因子對小鼠肝臟細胞生長有些微抑制效果的適當濃度後，接下來，我們利用每 24 小時執行細胞存活率分析來觀察不同組合培養因子處理對於小鼠肝臟細胞生長抑制情形是否有加成影響，跟據圖五吸光值整理的結果，與將 AML12 細胞培養在傳統 AML12 細胞培養液中的組別細胞比較，我們可觀察到只要在含有

Nicotinamide 的組別中細胞數目顯著比其他組別的細胞數少 (p-value < 0.05)，因此從細胞活率分析的結果，我們推測 Nicotinamide 可以抑制小鼠肝臟細胞生長，另外，HG/Nico/Ex4/GLP 細胞數目最少，因此我們推論除了 Nicotinamide 的抑制效果外，可能還有缺乏 PDGF-AA 的因素也會影響其肝臟細胞的生長。



圖五、以 MTT 細胞存活率分析觀察不同組合培養因子對肝臟細胞生長的影響

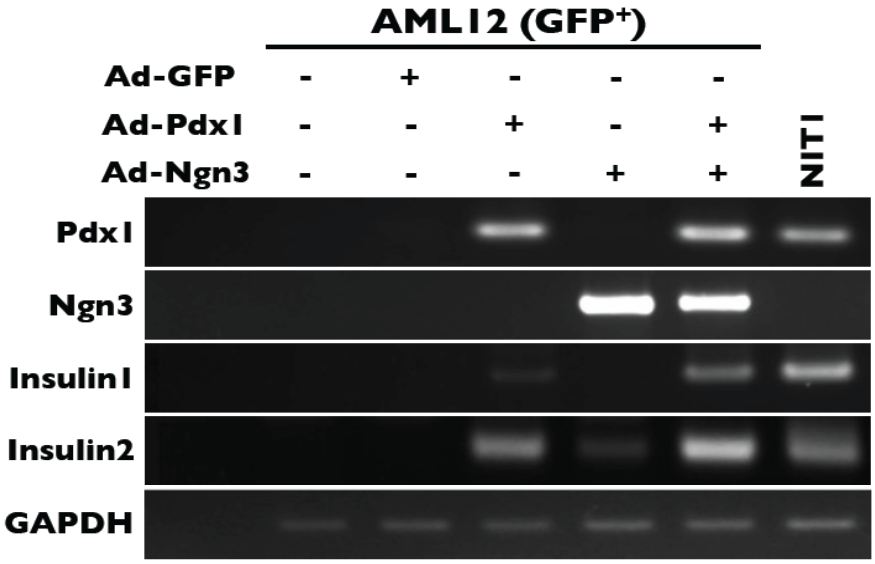
AML12 繼代培養在 96 孔細胞培養盤中，每格加入 5×10^3 個細胞，隔天加入不同組合外在環境培養因子，包括單一因子 25mM 葡萄糖，2.5 mM Nicotinamide，1nM Exendin-4，30nM GLP-1，10nM PDGF-AA，及多重因子組合，包括 HG-Nico-Ex4-AA、HG-Nico-GLP1-AA、HG-Ex4-GLP1-AA、HG-Nico-Ex4-GLP1-AA 及 HG-Nico-Ex4-GLP1。每天換一次培養液，並每隔 24 小時做 MTT 細胞存活率分析，共五天。圖中 Y 軸為波長 570 的吸光值，當吸光值越高，代表細胞中累積沉澱的 MTT 越多，也代表細胞越多，X 軸則代表偵測吸光值的時間點，圖中曲線斜率則可代表細胞生長的速率。

(二) 胰臟轉錄因子 Pdx1 及 Ngn3 表現下，觀察培養因子是否會促進肝臟細胞重新編程為胰島細胞的效率及對胰臟轉錄蛋白表現的影響：

1. 測試肝臟細胞是否能經由同時表現轉錄因子 Pdx1 及 Ngn3 而重新編程為胰島素分泌細胞

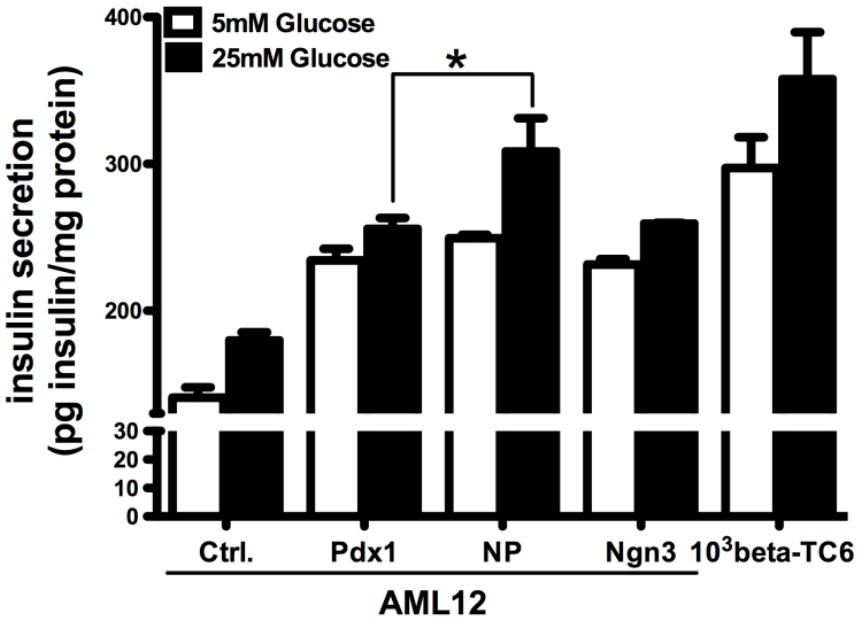
在測試培養因子是否能有效促進 Pdx1 及 Ngn3 表現的肝臟細胞重新編成為胰島素分泌細胞的效率，我們先測試 AML12 小鼠肝臟細胞是否確實能經 Pdx1 或 Ngn3 成功重新編程為胰島素分泌細胞，並測試個別轉錄蛋白(Pdx1 或 Ngn3)或共同表現下，何者轉分化出胰島素分泌細胞的效率最好。首先，在反轉錄聚合酶鏈鎖反應的結果中，我們利用一個在細胞中變動極小的常務性基因(house-keeping gene) GAPDH(甘油醛磷酸脱氫酶)作為評估我們加入的 cDNA 模版表現量是否在各組細胞間都等量的控制組基因，由結果可得知，經轉錄因子表現後，都有第二型胰島素蛋白的表現，然而在老鼠模式中，老鼠能生成兩種胰島素異構物，包括胰島素異構物第一型(insulin1)及胰島素異構物第二型(insulin2)，但胰島素異構物第一型才能專一表現在胰島素分泌細胞，而只有 Pdx1 以及共同表現的組合才有第一型胰島素蛋白的表現，且和單獨表現 Pdx1 的組別相比，Pdx1 和 Ngn3 共同處理下，肝臟細胞產生胰島素異構物第一型的效率顯著提昇 3.09 倍，因此我們推測相較於過去文獻在肝臟細胞單獨表現 Pdx1 或 Ngn3，共同表現 Pdx1 和 Ngn3 較能有效促進肝臟細胞轉分化為較專一的胰島素分泌細胞。除胰島素生成外，我們亦利用酵素連結免疫吸附分析法偵測在肝臟細胞共同表現 Pdx1 和 Ngn3 是否能有效誘發具功能性的胰島素分泌細胞生成，由結果得知，和單獨表現 Pdx1 的組別相比，在共同表現 Pdx1 及 Ngn3 組合的胰島素分泌細胞在 25mM 葡萄糖處理下能顯著提昇胰島素分泌效率 1.26 倍，代表共同表現 Pdx1 及 Ngn3

所誘發的胰島素生成細胞較能夠感應培養液中葡萄糖濃度的變化，因此綜合上述兩個實驗，我們接下來將同時在肝臟細胞中表現 Pdx1 及 Ngn3，觀察不同組合培養因子是否能有效促進這群 Pdx1 及 Ngn3 表現的肝臟細胞轉分化為胰島素分泌細胞的效率。



圖六、以反轉錄聚合酶鏈鎖反應觀察肝臟細胞在誘發 Pdx1 或 Ngn3 因子表現後，胰島素蛋白表現量的影響

AML12 繼代培養在 10 公分細胞培養皿中共加入 1.7×10^6 個細胞，隔天感染攜帶有 Pdx1、Ngn3 或 Pdx1&Ngn3 的腺病毒各 50 個病毒感染劑量 (Multiplicity of Infection，MOI)，每天換一次培養液，培養 5 天後，進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應，GAPDH 被用作 cDNA 模版的標準控制基因，Pdx1 及 Ngn3 引子用來判斷腺病毒感染後是否誘發其表現，並以第一型及第二型胰島素(insulin1, insulin2)引子觀察培養因子對肝臟細胞轉變為胰島素分泌細胞效率影響的標定蛋白。



圖七、以酵素連結免疫吸附分析法觀察肝臟細胞在誘發 Pdx1 或 Ngn3 因子表現後，分泌胰島素效率的影響

AML12 繼代培養在 10 公分細胞培養皿中共加入 1.7×10^6 個細胞，隔天感染攜帶有 Pdx1、Ngn3 或 Pdx1&Ngn3 的腺病毒各 50 個病毒感染劑量(Multiplicity of Infection，MOI)，每天換一次培養液，培養 5 天後，進行酵素連結免疫吸附分析法，測試在肝臟細胞共同表現 Pdx1 及 Ngn3 是否能有效增進胰島素生成細胞轉分化及分泌胰島素效率。

2. 測試單一及不同組合培養因子處理下，是否能促進 Pdx1 及 Ngn3 表現的小鼠肝臟細胞重新編程為胰島素分泌細胞的效率

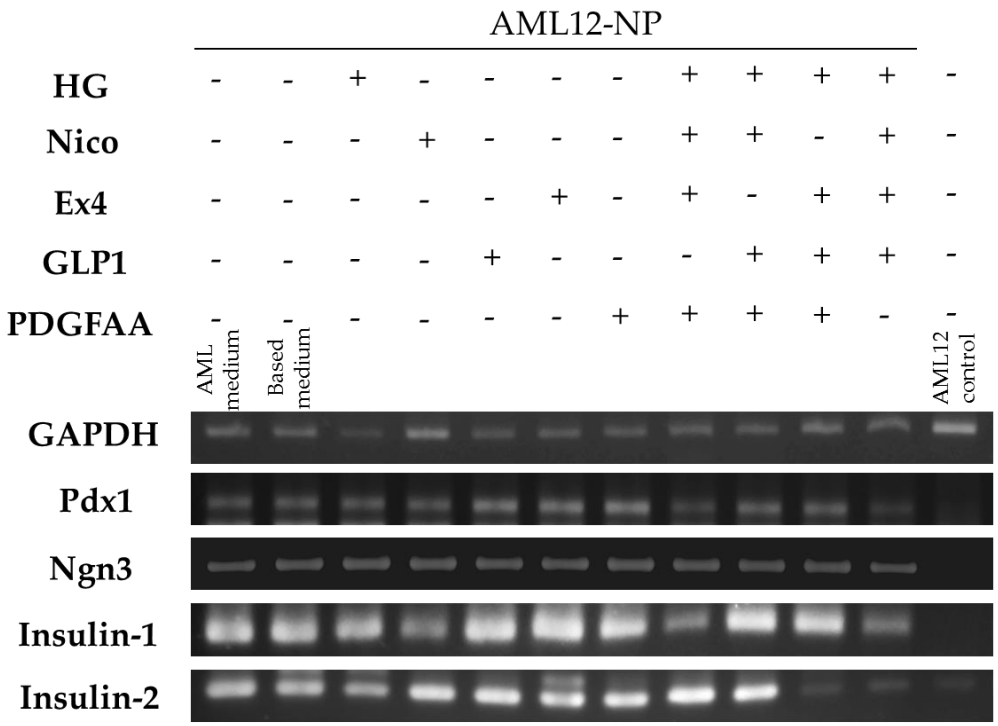
從以上的結果，我們找到這些能誘發胰島素生成或分泌的外在培養因子能抑制肝臟細胞生長的濃度，因此接下來，我們想了解當我們藉由腺病毒感染誘發肝臟細胞表現 Pdx1 及 Ngn3 這兩種貝他細胞分化中很重要的轉錄因子，再同時處理這些外在環境培養因子，這些因培養因子導致肝臟細胞生長被抑制的細胞是否能更有效促使重新編程為胰島素分泌細胞。首先，從反轉錄聚合酶鏈鎖反應的結果中，GAPDH 常務基因在各組細胞中表現量沒有差異，代表我們所加入

cDNA 模版量在各組間沒有差異，且相對於控制組沒有感染腺病毒的 AML12 細胞偵測不到 Pdx1 及 Ngn3 的表現(最後一組)，當我們感染腺病毒後，確實能在 AML12 細胞中誘發 Pdx1 及 Ngn3 的表現（圖八）。

然而雖然在 AML12 細胞中誘發 Pdx1 及 Ngn3 表現後，仍培養在 AML12 培養液中的細胞就能夠表現胰島素異構物第二型(insulin2)，但經 Exendin-4、GLP1、PDGFAA 培養的細胞確實能促使胰島素異構物第二型表現增加，分別為 basal medium 培養細胞產生胰島素異構物第二型的 1.9 倍、1.8 倍、1.4 倍。另外，可專一表現胰島貝他細胞的胰島素異構物第一型結果顯示，與培養在 AML12 培養液中細胞相比，經 Exendin-4、GLP1、PDGFAA 及 HG/Nico/ GLP1/PDGFAA 處理過的細胞能促進肝臟細胞分別表現 1.81、1.96、1.32 及 1.47 倍的胰島素異構物第一型（圖八）。

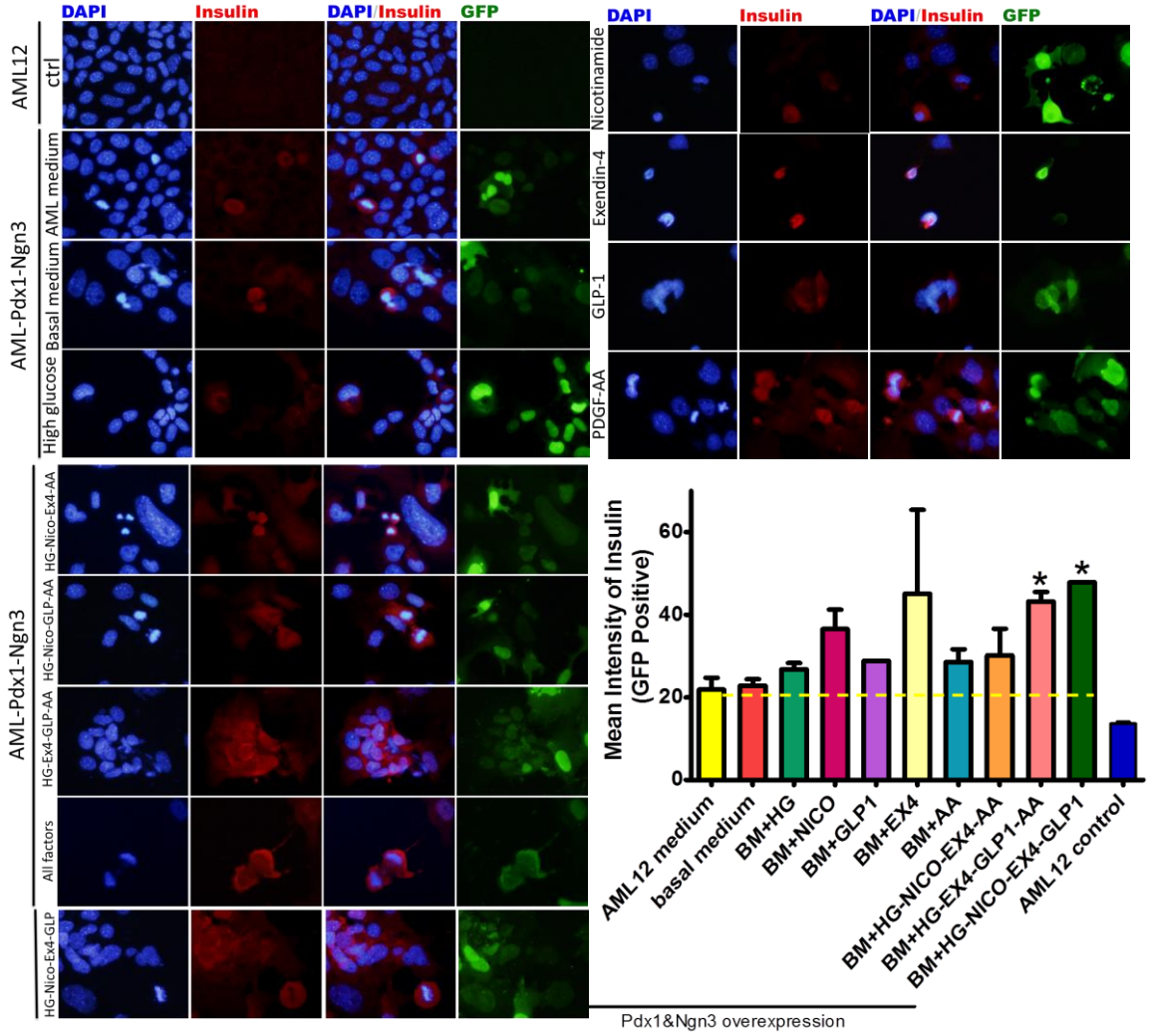
相對的在免疫螢光染色的結果中顯示，在肝臟細胞誘發表現 Pdx1 及 Ngn3 並經培養因子處理五天後，胰島素蛋白表現都高於 AML12 控制組，其中經 Nicotinamide 及 Exendin-4 處理過後，與 AML12 控制組相比，平均肝臟細胞所染到的胰島素蛋白紅色螢光強度分別增加 1.60 及 1.97 倍，代表 Nicotinamide 及 Exendin-4 能促使 Pdx1 及 Ngn3 誘發的胰島素生成細胞表現更多胰島素蛋白量，而 PDGF-AA 處理過的細胞則是有增加胰島素生成細胞數量增加的現象。而在不同培養因子組合處理的結果可明顯觀察到，與 AML12 控制組相比，Pdx1 及 Ngn3 表現的細胞經 HG/Ex4/GLP1/PDGFAA 以及 HG/Nico/Ex4/GLP1 處理五天後，其胰島素蛋白紅色螢光強度可顯著增加 1.89 及 2.09 倍，且可明顯誘發胰島素生成細胞群塊的產生（圖九）。最後，我們以酵素連結免疫吸附分析法測試經單一或不同組合

培養因子處理五天後，對 Pdx1 及 Ngn3 誘發的胰島素生成細胞分泌胰島素效率的影響，從結果中可以觀察到，首先，和只攜帶 GFP 的腺病毒感染的 AML12 組別相比，在 AML12 細胞中表現 Pdx1 和 Ngn3 五天後確實能顯著誘發胰島素生成細胞分泌胰島素至培養液中，代表 Pdx1 和 Ngn3 能成功使肝臟細胞轉分化為具功能性的胰島素分泌細胞。而在培養因子處理五天後，除了 Nicotinamide 處理的細胞外，glucose、GLP1、Exendin-4 及 PDGFAA 分泌胰島素的表現分別高於 basal medium 控制組 1.96、2.01、1.64 及 1.46 倍，其中以單一處理 glucose 以及 GLP1 兩組分泌的胰島素量與 AML12 控制組相比可達統計上的顯著差異(p-value<0.01)，而混合不同培養因子處理的組別中，在 HG/Ex4/GLP1/PDGFAA 以及 HG/Nico/Ex4/GLP1/PDGFAA 處理五天後，可更進一步顯著促使胰島素分泌量高於 basal medium 控制組 2.33 及 2.38 倍(圖十)。因此，我們推測 Nicotinamide 雖能夠幫助 Pdx1 和 Ngn3 誘發的胰島素生成細胞製造更多胰島素，但卻無法幫助胰島素分泌，相較 Nicotinamide，glucose、GLP1 及 exendin-4 不僅能促使這群胰島素生成細胞製造胰島素，更能進一步促使他們將胰島素分泌到培養液中，代表 glucose、GLP1 及 exendin-4 能促使 Pdx1 和 Ngn3 表現的細胞轉分化為具功能性的貝他細胞，且混合不同培養因子處理會有加乘效果。



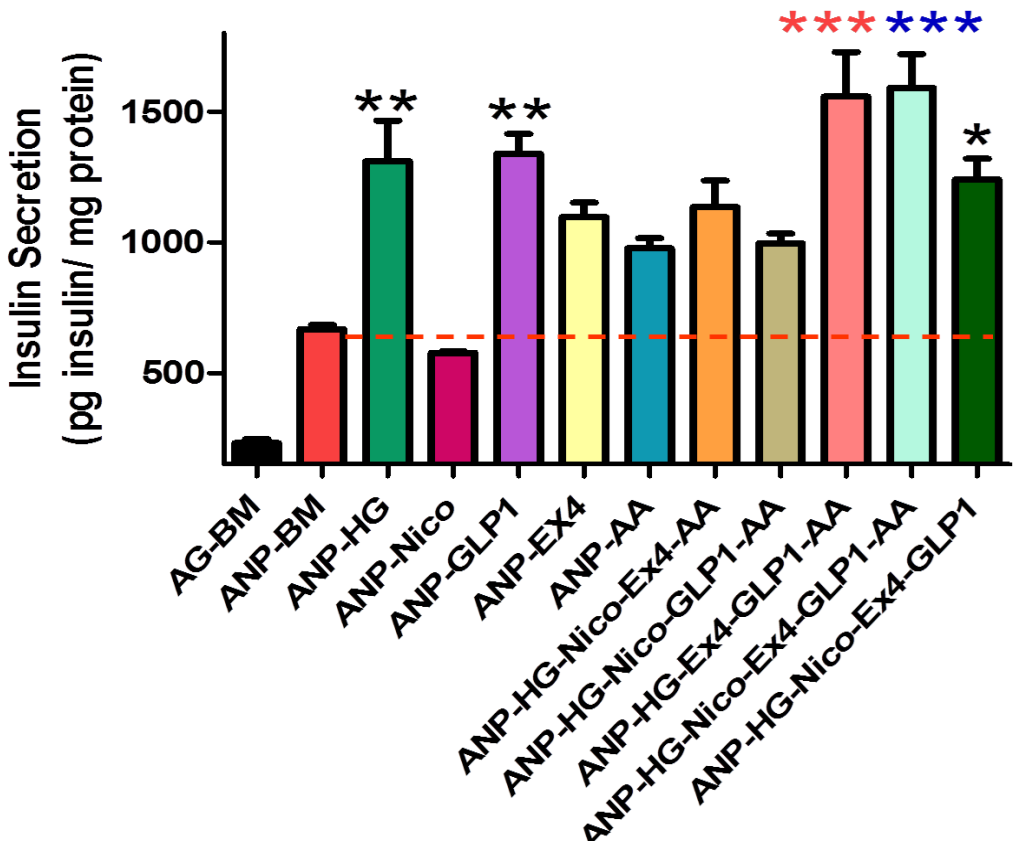
圖八、以反轉錄聚合酶鏈鎖反應觀察肝臟細胞在誘發 Pdx1 及 Ngn3 因子表現後，不同組合培養因子對重新編程成胰島細胞效率的影響

AML12 繼代培養在 10 公分細胞培養皿中共加入 1.7×10^{6} 個細胞，隔天感染攜帶有 Pdx1 及帶有 Ngn3 的腺病毒各 50 個病毒感染劑量 (Multiplicity of Infection，MOI)，再隔 24 小時候，移除含有腺病毒的培養液，並加入不同組合的外在環境培養因子，每天換一次培養液，在處理培養因子 5 天後，進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應，GAPDH 被用作 cDNA 模版的標準控制基因，Pdx1 及 Ngn3 引子用來判斷腺病毒感染後是否誘發其表現，並以第一型及第二型胰島素(insulin1, insulin2)引子觀察培養因子對肝臟細胞轉變為胰島素分泌細胞效率影響的標定蛋白。



圖九、以免疫螢光染色觀察肝臟細胞在誘發 Pdx1 及 Ngn3 因子表現後，不同組合培養因子對重新編程成胰島細胞效率的影響

AML12 繼代培養在 24 孔細胞培養盤中，每格加入 5×10^4 個細胞，隔天感染攜帶有 Pdx1 及帶有 Ngn3 的腺病毒各 50 個病毒感染劑量(Multiplicity of Infection，MOI)，再隔 24 小時候，移除含有腺病毒的培養液，並加入不同組合的外在環境培養因子，每天換一次培養液，在處理培養因子 5 天後，進行免疫螢光染色，用抗胰島素抗體(紅色螢光)來觀察不同組合培養因子處理是否會促進胰島細胞之產生，綠色螢光蛋白用來標記被腺病毒感染的肝臟細胞，而 DAPI 則是細胞核染料，用來標定細胞核位置。



圖十、以酵素連結免疫吸附分析法觀察肝臟細胞在誘發 Pdx1 或 Ngn3 因子表現後，分泌胰島素效率的影響

AML12 繼代培養在 10 公分細胞培養皿中共加入 1.7×10^{6} 個細胞，隔天感染攜帶有 Pdx1 及帶有 Ngn3 的腺病毒各 50 個病毒感染劑量(Multiplicity of Infection，MOI)，再隔 24 小時候，移除含有腺病毒的培養液，並加入不同組合的外在環境培養因子，每天換一次培養液，在處理培養因子 5 天後，進行酵素連結免疫吸附分析法，測試不同組合培養因子處理對轉分化的胰島素生成細胞分泌胰島素效率的影響。

(三) 單一處理五種培養因子及不同組合處理對肝臟細胞細內轉錄蛋白表現是否會有影響與變化：

1. 測試單一處理及不同組合下肝臟細胞專一蛋白的表現

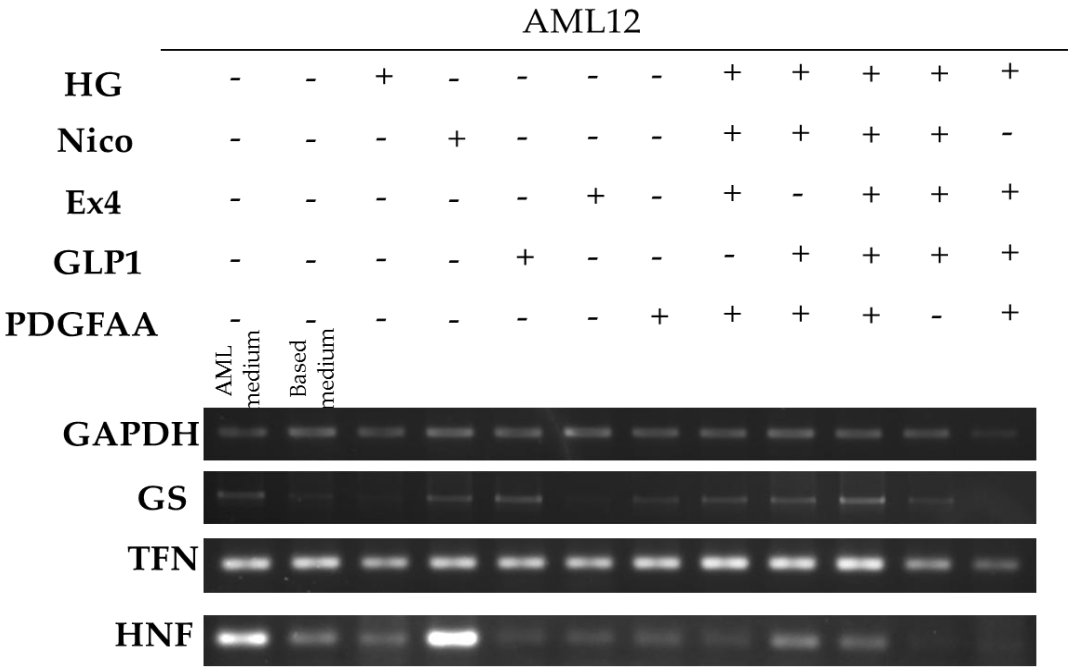
接下來我們想要利用反轉錄聚合酶鏈鎖反應、免疫螢光染色以及西方墨點法進一步觀察這些培養因子是否是藉由影響肝臟特殊轉錄

因子的表現而造成對肝臟細胞生長的影響。在反轉錄聚合酶鏈鎖反應的結果中，首先，我們利用一個在細胞中變動極小的常務性基因(house-keeping gene) GAPDH(甘油醛磷酸脫氫酶)作為評估我們加入的 cDNA 模版表現量是否在各組細胞間都等量的控制組基因，由結果可得知，除 HG-Ex4-GLP1-AA 處理的組別外，其餘組別加入的 cDNA 模版表現量類似。而我們進一步觀察培養因子對三個肝臟細胞中特殊的轉錄因子表現的影響，包括穀氨酸合成酶(glutamine synthetase, GS，負責合成穀氨酸)、運鐵蛋白(transferrin, TFN, 在肝臟中合成後釋放到血液中與游離鐵離子結合，維持體內鐵質恆定)、及肝細胞核因子 4α(Hepatocyte nuclear factor 4α, HNF4α，能透過調控基因表現調節肝臟細胞生長)，因此從圖可得知，與培養在 AML12 培養液的細胞相比，當我們移除培養液中肝臟細胞所需的氣美松及 ITS 後(basal medium)，就能明顯抑制細胞中 glutamine synthetase 和 HNF4α 的表現，但 Nicotinamide 處理反而能反向抵消氣美松及 ITS 移除後抑制 HNF4α 的表現，其 HNF4α 的表現增為 basal medium 的 3.45 倍，而從合併不同組合培養因子的組別來看，當培養因子組合中沒有加入 PDGFAA 時可以抑制 glutamine synthetase 和 HNF4α 的表現，（分別為 0.95 及 0.25 倍）（圖十一）。

為了要進一步確定培養因子處理能有效抑制肝臟細胞專一表現的功能性蛋白的製造，我們接下來以西方墨點法直接觀察培養因子處理五天後，肝臟細胞中運鐵蛋白 (transferrin, TFN)、細胞色素 P450 3A1(cytochrome P450 3A1, Cyp 3A1，cytochrome P450 在肝臟中佔全身表現的 70%，主要負責體內內生性或外生性物質的氧化代謝)及細胞色素 P450 7A1(cytochrome P450 7A1, Cyp 7A1)，結果可以看到除培養在 AML12 培養液的細胞可明顯偵測到運鐵蛋白表現外，無論添

加何種培養因子都可以有效抑制肝臟細胞中運鐵蛋白的表現，而在細胞色素 P450 3A1(cytochrome P450 3A1, Cyp 3A1)的結果，與培養在 basal medium 的細胞產生的 Cyp3A1 表現量相比，HG/Nicotinamide/GLP1/PDGFAA 的表現量降為 0.35 倍，而 HG/Nicotinamide/GLP1/Ex4 的表現量則降為 0.13 倍（圖十二）。因此我們證明處理 HG/Nicotinamide/GLP1/PDGFAA 及 HG/Nicotinamide/GLP1/Ex4 最能夠有效抑制肝臟細胞功能性蛋白的生成。

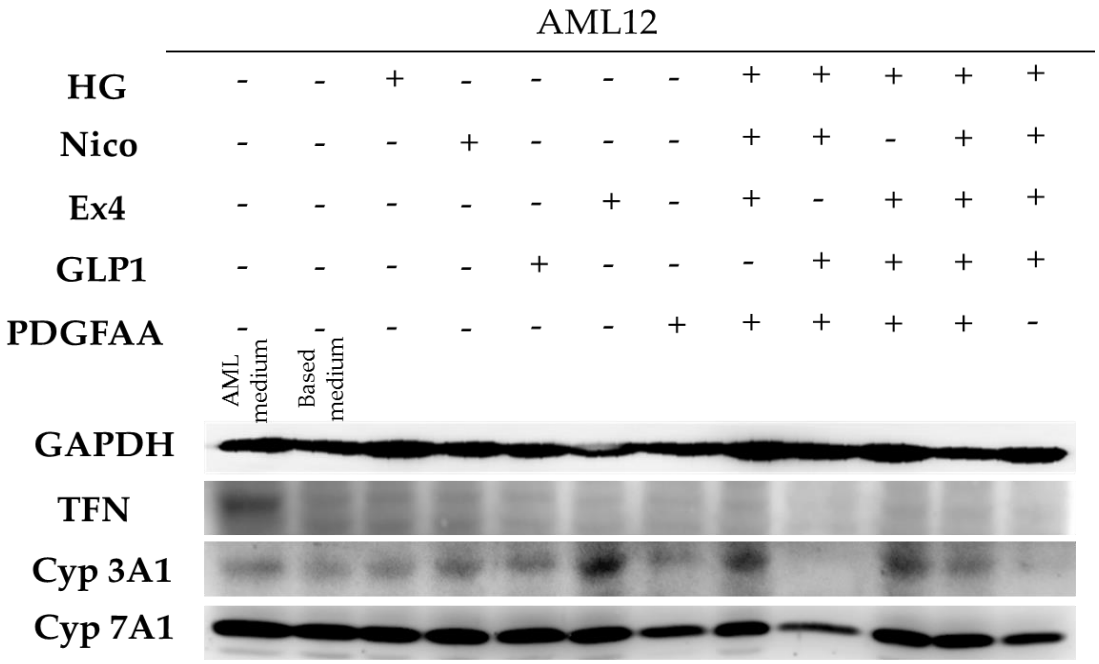
最後，白蛋白是肝臟合成最重要的血清蛋白之一，且人體內只有肝臟細胞能合成白蛋白，因此我們也利用免疫螢光染色觀察不同組合培養因子對白蛋白(albumin)表現的影響，而我們可以明顯觀察到當細胞受 GLP1 和 PDGF-AA 處理時，細胞中白蛋白表現量有明顯被抑制的現象，分別降為 AML 控制組蛋白表現量的 0.43 及 0.36 倍，而當所有培養因子一起處理時，很明顯會有加乘效果（圖十三）。



圖十一、AML12 小鼠肝臟細胞在不同組合培養因子處理下，對肝臟

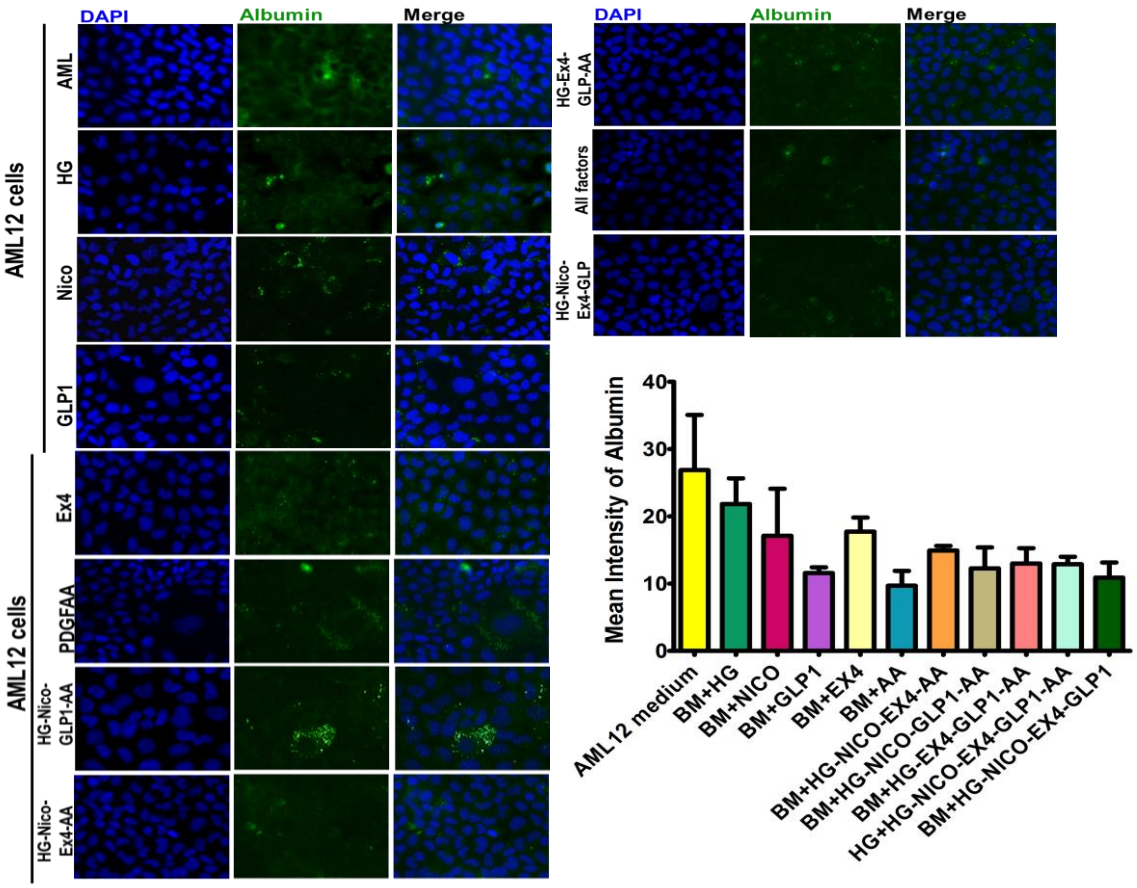
蛋白表現量的影響

AML12 繼代培養在 10 公分細胞培養皿中共加入 1.7×10^6 個細胞，隔天加入不同組合外在環境培養因子，每天換一次培養液，共培養五天後，進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應，GAPDH 為一常務基因，被用作 cDNA 模版的標準控制基因，穀氨酸合成酶(Glutamine Synthetase, GS)及運鐵蛋白(Transferrin, TFN)及肝細胞核因子 4α (Hepatocyte nuclear factor 4α, HNF)為觀察培養因子對肝臟細胞特殊轉錄因子影響之標定蛋白。



圖十二、AML12 小鼠肝臟細胞在不同組合培養因子處理下，對肝臟蛋白表現量的影響

AML12 繼代培養在 10 公分細胞培養皿中共加入 1.7×10^6 個細胞，隔天加入不同組合外在環境培養因子，每天換一次培養液，共培養五天後，進行 Western blot，GAPDH 為一常務基因，被用作蛋白質的標準控制基因，運鐵蛋白(Transferrin, TFN)及細胞色素 P450 3A1 及 7A1(cytochrome p450 3A1&7A1)為觀察培養因子對肝臟細胞特殊蛋白之影響。



圖十三、以免疫螢光染色觀察肝臟細胞在培養因子表現後對肝臟細胞合成專一表現蛋白的影響

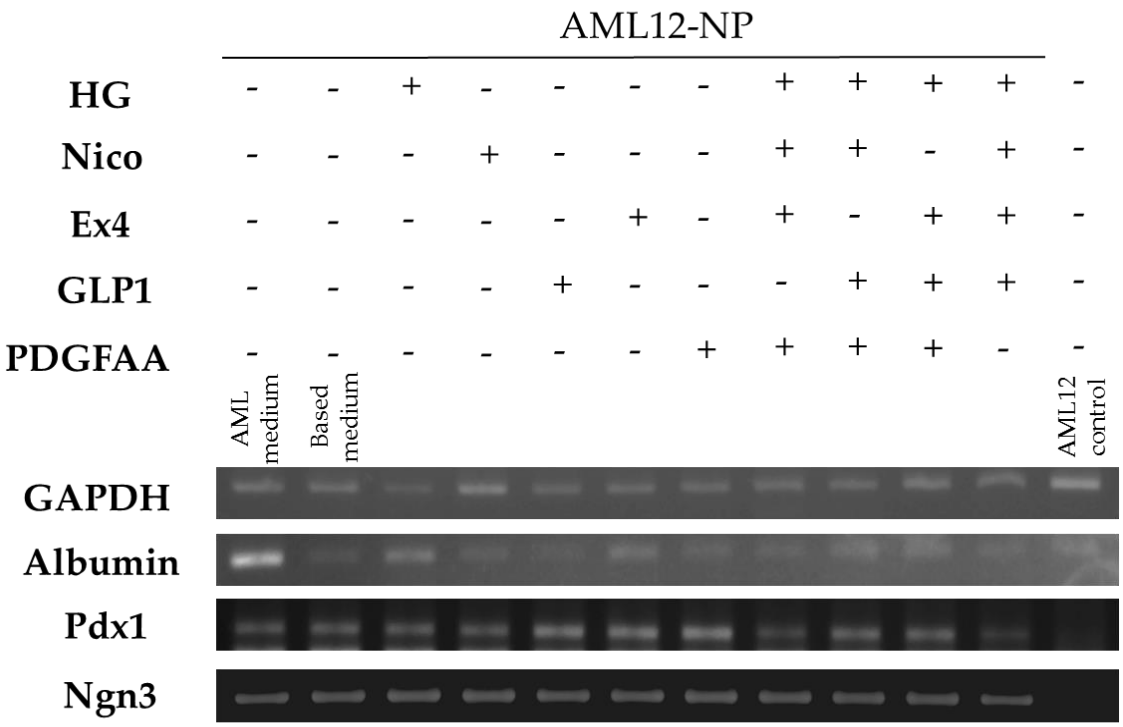
在 24 孔細胞培養盤中繼代培養 AML12 小鼠肝臟細胞，於每格加入 5×10^4 個細胞，24 小時候處理不同外在環境培養因子，每天換一次培養液，處理培養因子 5 天後，以免疫螢光染色觀察不同組合培養因子對肝臟細胞生成白蛋白(Albumin)之影響。利用 Metamorph 分析測定其螢光強度。

2. 測試單一處理及不同組合培養因子，經 Pdx1 及 Ngn3 轉錄後，是否抑制重新編程細胞原本肝細胞蛋白的表現

最後，這些因 Pdx1 和 Ngn3 成功轉分化為胰島素分泌細胞的細胞是否會因處理不同組合培養因子而抑制原本肝臟細胞專一蛋白的表現，而有機會進一步分化為更成熟的貝他細胞，因此我們試著利用反轉錄聚合酶鏈鎖反應觀察在處理不同組合培養因子五天後，轉分化細胞中的白蛋白表現量是否會有變化。結果經 image J 軟體定量並校

正常務性基因 GAPDH 表現量後，可得知除了培養在 25mM 高濃度葡萄糖的細胞外，其餘不論是處理單一或不同組合培養因子，白蛋白表現量皆有明顯被抑制的情形，其中以 Nicotinamide 以及 HG/Nicotinamide /Exendin-4/GLP1 抑制最明顯，與培養在 AML12 培養液控制組細胞相比，白蛋白的表現量分別降為 0.12 以及 0.11 倍(圖十四)。

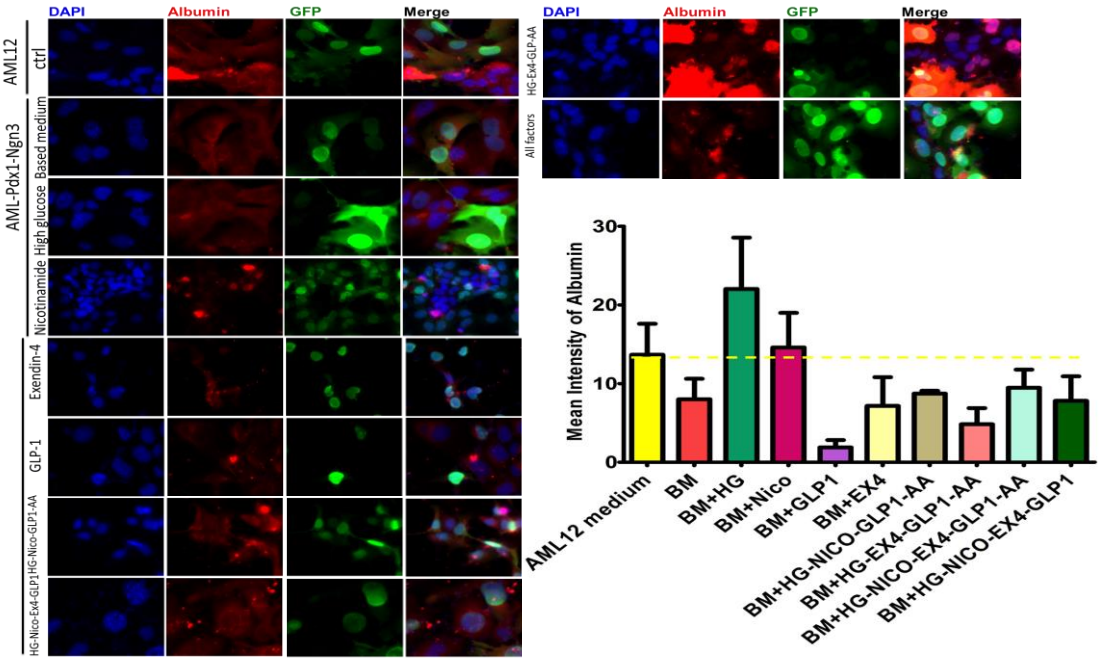
最後，從免疫螢光染色的結果，我們也明顯觀察到有經腺病毒感染而表現 Pdx1 及 Ngn3 的細胞（因腺病毒載體上攜帶核表現的綠色螢光蛋白基因，故綠色螢光表現的細胞為腺病毒感染細胞)，肝臟細胞生成的白蛋白的表現有明顯減少的現象，而經 Metamorph 軟體定量並經統計結果，我們可以觀察到雖與培養在 AML12 培養液中的細胞相比，將轉分化的胰島素生成細胞培養在 basal medium 就能抑制細胞白蛋白的表現，除 25mM 葡萄糖以及 Nicotinamide 以外，經其餘培養因子處理五天後，白蛋白的表現量皆比 AML 控制組低，其中以處理 GLP1 的細胞抑制白蛋白表現情況最明顯，顯著降為 AML 控制組的 0.14 倍 (圖十五)。因此我們也推論肝臟細胞的確有機會能透過處理培養因子而進一步分化為更成熟的胰島素分泌細胞。



圖十四、以反轉錄聚合酶鏈鎖反應觀察肝臟細胞在誘發 Pdx1 及 Ngn3 因子表現後，不

同組合培養因子對重新編程成胰島細胞效率的影響

AML12 繼代培養在 10 公分細胞培養皿中共加入 1.7×10^6 個細胞，隔天感染攜帶有 Pdx1 及帶有 Ngn3 的腺病毒各 50 個病毒感染劑量 (Multiplicity of Infection，MOI)，再隔 24 小時候，移除含有腺病毒的培養液，並加入不同組合的外在環境培養因子，每天換一次培養液，在處理培養因子 5 天後，進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應，GAPDH 被用作 cDNA 模版的標準控制基因，Pdx1 及 Ngn3 引子用來判斷腺病毒感染後是否誘發其表現，並以白蛋白(Albumin)測定肝臟專一蛋白的表現量。

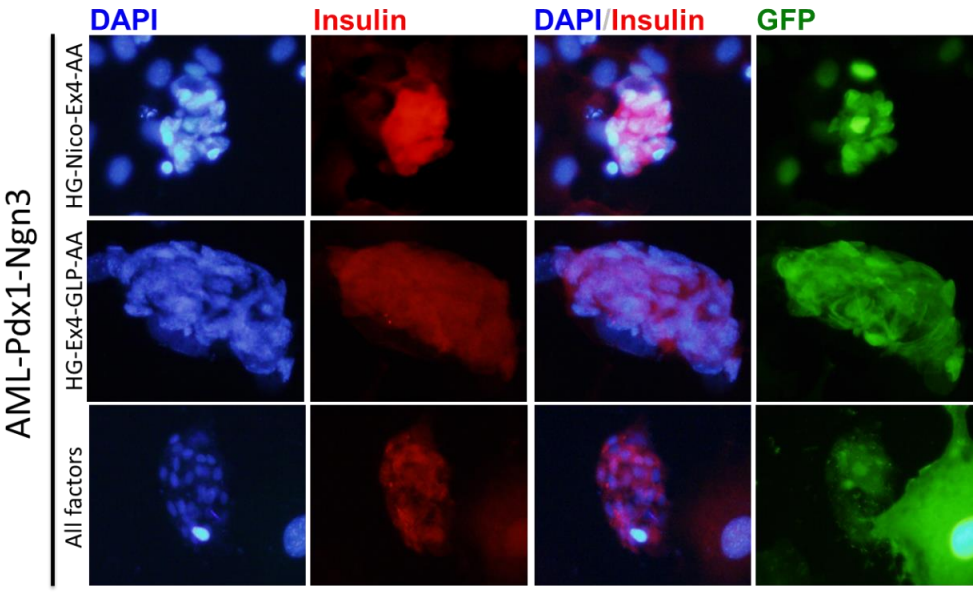


圖十五、以免疫螢光染色觀察肝臟細胞在誘發 Pdx1 及 Ngn3 因子表現後，不同組合培養因子對肝臟細胞生成白蛋白的影響

AML12 繼代培養在 24 孔細胞培養盤中，每格加入 5×10^4 個細胞，隔天感染攜帶有 Pdx1 及帶有 Ngn3 的腺病毒各 50 個病毒感染劑量(Multiplicity of Infection，MOI)，再隔 24 小時候，移除含有腺病毒的培養液，並加入不同組合的外在環境培養因子，每天換一次培養液，在處理培養因子 5 天後，進行免疫螢光染色，用抗白蛋白抗體(紅色螢光)來觀察被不同組合培養因子處理是否會影響被腺病毒感染的肝臟細胞中白蛋白產生的影響，綠色螢光蛋白用來標記被腺病毒感染的肝臟細胞，而 DAPI 則是細胞核染料，用來標定細胞核位置。

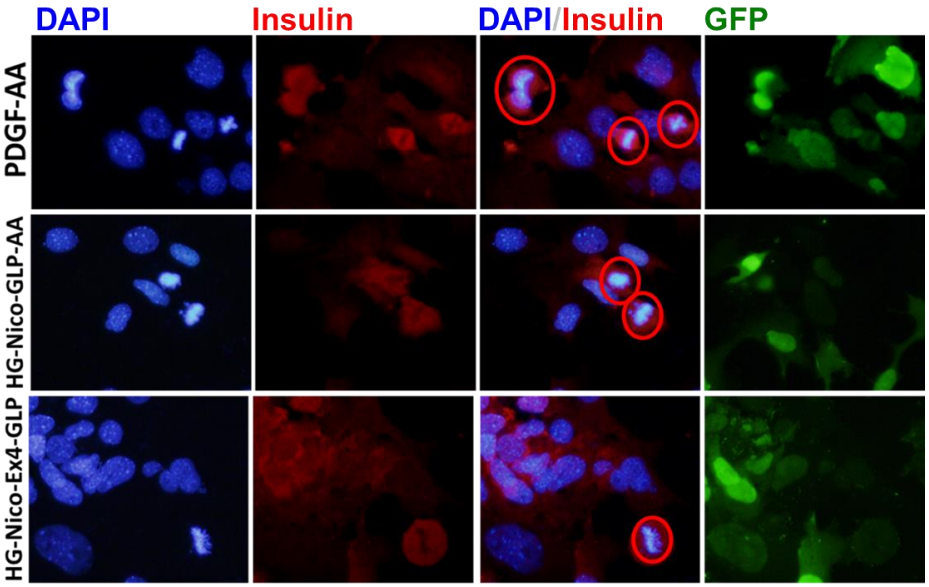
(四) 討論：

1. 在利用抗胰島素抗體的免疫螢光染色實驗中，我們發現在經由在肝臟細胞誘發表現 Pdx1 和 Ngn3 後，將細胞培養在 HG-Nico-Ex4-AA、HG-Ex4-GLP1-AA、All factors 組別的細胞中皆可觀察到會有少數的胰島素生成細胞能形成似胰島狀的細胞團塊，相較這些組別的共通點便是皆有在培養液中添加 PDGF-AA，因此我們推測 PDGF-AA 的處理有可能有助於胰島之形成的能力。



圖十六、胰島素分泌細胞形成團狀類胰島細胞團

2. 另外，同樣在利用抗胰島素抗體的免疫螢光染色的結果圖中，我們也發現在 PDGF-AA、HG-Nico-GLP1-AA、HG-Nico-Ex4-GLP1 處理組別的細胞中會有出現正在分裂的細胞，因此我們推測在這些組別中可能有能促進細胞分裂的因子，也可能因為有這些能促進細胞分裂的因子，使我們的結果可以看到這些調控因子組合對肝臟細胞轉變成胰島素分泌細胞有加乘的效果。



圖十七、胰島素蛋白免疫螢光染色圖，亮處為正在分裂之細胞

四、 結論與應用：

為能夠藉由重新編程過程(reprogramming)從能夠自體再生的肝臟細胞獲得足夠量的胰島素生成細胞，以期望能提供未來臨床一個可能的方式促使有效率得從自體取得大量的胰島細胞，以提供胰島移植手術所需，並進一步改善糖尿病患的生活品質，在我們的實驗中，我們試著去利用五種在過去研究中發現可能會誘發胰島素生成或分泌的外在環境培養因子，並配合在肝臟細胞中誘發胰島β細胞特殊轉錄蛋白後，包括 Pdx1 和 Ngn3，觀察這些胰島素調控因子是否能有效促進肝臟細胞轉變成重新編程β細胞的效率，然而從我們實驗結果中可以得知：

(一) 在高濃度葡萄糖及 GLP1 處理後，甚至當 Nicotinamide 濃度愈高時，會明顯影響肝臟細胞之生長，且其中以 Nicotinamide 的抑制效果最明顯。而從 MTT 細胞存活率分析中，我們也觀察到當小鼠肝臟細胞培養在含有 Nicotinamide 培養液中時，肝臟細胞生長數量會明顯較其他的少，其中又以不含 PDGF-AA 的數量最少。

(二) 且進一步我們也觀察到這些調控因子可能會藉由抑制肝臟細胞中專一轉錄蛋白的表現，包括白蛋白(albumin)、運鐵蛋白(transferrin)、穀氨酸合成酶(glutamine synthetase)、肝臟細胞核因子 4α (Hepatocyte nuclear factor 4α)以及細胞色素 P450 3A1 及 7A1(cytochrome p450 3A1&7A1)，進一步導致肝臟細胞生長受到抑制或造成肝臟細胞死亡。

(三) 最後，我們也確定能成功地利用 Pdx1 和 Ngn3 將肝臟細胞重新編程為胰島素分泌細胞，並發現在肝臟細胞中誘發 Pdx1 和 Ngn3 表現後，從免疫螢光染色分析中，經 Nicotinamide、GLP1、exendin-4 及 Exendin-4 處理過後，會促使單一顆肝臟細胞產生更多的胰島素蛋白，另外有趣的是，PDGF-AA 處理則是能增加胰島素生成細胞數量。然而，Nicotinamide 雖

能夠幫助 Pdx1 和 Ngn3 誘發的胰島素生成細胞製造更多胰島素，但卻無法幫助胰島素分泌，反之，glucose、GLP1 及 exendin-4 不僅能促使這群胰島素生成細胞製造胰島素，更能進一步促使他們將胰島素分泌到培養液中，代表 glucose、GLP1 及 exendin-4 能促使 Pdx1 和 Ngn3 表現的細胞轉分化為具功能性的胰島素分泌細胞，且多重培養因子組合處理後，似乎對於肝臟細胞生成胰島素有加乘的效果，最終更有胰島素生成的肝臟細胞能形成胰島狀團塊。

	AML12	BM	HG	Nico	GLP1	Ex4	AA	HNEA	HNGA	HEGA	HNEGA	HNEG
AML12												
Cell growth (MTT)	1.29	1.00	0.89	0.74	1.03	0.96	0.97	0.80	0.80	0.93	0.71	0.65
GS (RT-PCR)	2.75	1.00	1.05	1.73	2.71	0.17	0.90	1.62	2.22	1.44	3.96	0.95
Transferrin (RT-PCR)	30.38	1.00	1.23	0.89	1.31	0.77	1.42	1.68	1.14	1.50	1.73	0.96
HNF4α (RT-PCR)	5.15	1.00	1.63	3.45	0.47	0.42	0.82	0.53	1.17	1.84	1.15	0.25
Transferrin (Western blot)	0.61	1.00	0.14	0.32	0.16	0.49	0.58	0.18	0.35	0.14	0.61	0.13
Cyp 3A1 (Western blot)	0.47	1.00	0.19	0.52	0.37	2.21	0.67	0.62	0.26	0.43	1.19	0.16
Albumin (ICC)	1.00	1.00	0.81	0.64	0.43	0.66	0.36	0.56	0.46	0.48	0.48	0.41
AML12-Pdx1-Ngn3												
Insulin-1 (RT-PCR)	0.93	1.00	2.12	0.38	1.96	1.81	1.32	0.37	1.47	0.95	X	0.44
Insulin intensity (ICC)	0.96	1.00	1.17	1.60	1.26	1.97	1.25	1.32	X	1.89	X	2.09
Insulin secretion (Elisa)	X	1.00	1.96	0.86	2.01	1.64	1.46	1.70	1.49	2.33	2.38	1.86
Albumin (RT-PCR)	1.00	0.11	1.23	0.12	0.19	0.46	0.23	0.13	0.44	0.27	X	0.11
Albumin (ICC)	1.00	0.43	1.51	1.06	0.14	0.52	X	0.60	X	0.43	1.00	0.93

因此在我們實驗中，的確能藉由合併 Pdx1 和 Ngn3 誘發表現和胰島素調控因子的處理更有效率地從肝臟細胞產生更多的胰島素生成細胞，找出能促進將肝臟細胞重新編程為胰島素分泌細胞效率的最佳配對組合，希望將來能應用在臨床上提供胰島細胞移植利用，能供給更多具功能性的胰島素分泌細胞給糖尿病患治療用，以提高病患生活品質。

五、 參考文獻：

1. 沈家寧等著（2013）。

   你不可不知道的幹細胞科技。臺北市：五南

2. **Chen, H., Gu, X., Liu, Y., Wang, J., Wirt, S.E., Bottino, R., Schorle, H., Sage, J., and Kim, S.K., (2011)**

   PDGF signalling controls age-dependent proliferation in pancreatic beta-cells.

   Nature 478, 349-355.

3. **Combettes, M.M., (2006)**

   GLP-1 and type 2 diabetes: physiology and new clinical advances.

   Curr Opin Pharmacol 6, 598-605.

4. **Freeman, H., Shimomura, K., Horner, E., Cox, R.D., and Ashcroft, F.M., (2006)** Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a key role in insulin secretion.

   Cell Metab 3, 35-45.

5. **Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., and Guillemot, F., (2000)**

   Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas.

   Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 1607-1611.

6. **Habener, J.F., Kemp, D.M., and Thomas, M.K., (2005)**

   Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development.

   Endocrinology 146, 1025-1034.

7. **Li, H., Lam, A., Xu, A.M., Lam, K.S., and Chung, S.K., (2010)**

   High dosage of Exendin-4 increased early insulin secretion in differentiated

beta cells from mouse embryonic stem cells.

Acta Pharmacol Sin 31, 570-577.

8. **Offield, M.F., Jetton, T.L., Labosky, P.A., Ray, M., Stein, R.W., Magnuson, M.A., Hogan, B.L., and Wright, C.V., (1996)**

   PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum.

   Development 122, 983-995.

9. **Slack, J.M., (1995)**

   Developmental biology of the pancreas.

   Development 121, 1569-1580.

10. **Wu, J.C., Merlino, G., and Fausto, N., (1994)**

    Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 674-678.*

11. **Xu, G., Stoffers, D.A., Habener, J.F., and Bonner-Weir, S., (1999)**

    Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats.

    Diabetes 48, 2270-2276.

評語

利用小鼠之肝胰臟細胞株及 adenovirus，感染 pdx1 及 Ngn3 希望能誘導 insulin producing，類似的實驗已有人報導。本研究再利用 5 種因子來抑制肝細胞的 markers，也有初步之成果，但能持續 produce insulin 多久並不知，能否用在小鼠上也未知。