

行政院及所屬各機關出國報告

(出國類別：研究)

組織工程
脂肪衍生之母幹細胞

服務機關：成大醫院 整形外科

出國人職稱：主治醫師

姓名：林聖哲

出國地區：美國

出國期間：89年8月14日至90年8月13日

報告日期：90年11月13日

行政院及所屬各機關出國報告提要

系統識別號：C09004899

出國報告名稱：

頁數： 含附件：

組織工程 脂肪衍生之母幹細胞

出國計畫主辦機關/聯絡人/電話

國立成功大學醫學院附設醫院/陳秀梅/06-2353535 ext 2049

出國人員姓名/服務機關/單位/職稱/電話

林聖哲/國立成功大學醫學院附設醫院/整形外科/主治醫師

/06-2353535 ext 5228

出國類別： 1 考察 2 進修 研究 4 實習 5 其他

出國期間：89年8月14日至90年8月13日

出國地區：美國

報告日期：90年11月13日

分類號/目：J2/西醫

關鍵詞：Tissue Engineering, Adipo-Derived Stem Cell

內容摘要：(詳次頁)

摘要

組織工程是一門新興的領域，極具發展性及前瞻性，它結合了醫學、細胞學、生理學、生化學、免疫學及醫學工程等相關領域，綜合而獨立發展為組織工程。以前認為只有胚胎細胞才有能力發展成為體細胞，但是研究人員最近在成年人體內發現其他已經發育的組織內含有母幹細胞，能夠培養並分化為有限的幾種組織，如骨骼、軟骨、神經及脂肪細胞，而人類抽脂手術後的抽取液即有此母幹細胞存在，整形外科醫師可以廢物利用，利用自體組織來培養出特殊的細胞，既可做學術研究，亦可能於未來使用於臨床工作上，來克服一些組織缺乏或血液循環太差的重建整形外科手術上的難題。

林聖哲醫師於 2000 年赴美 UCLA 進修組織工程領域，已學成抽脂液母幹細胞的分離、純化、培養的技術，想再進一步從事特殊免疫生化染色及定量研究，期於數年內運用此技術使用於人體，此一組織工程計劃特點為不使用骨髓組織，以避免細胞取得不易及捐贈區疼痛的問題，而改用美容門診常見抽脂手術的抽脂液做為母幹細胞的來源，利用特殊的肌肉刺激劑來分化出骨骼肌細胞，利用光學顯微鏡來觀察其形態的變化，利用免疫組織生化法來檢查 MyoD1 Myosin Heavy Chain 的存在，並用 Axioskop2 儀器加以照相存檔及定量化，最後利用 cDNA 及 RT-PCR 的方法來進一步證實肌肉細胞分化的比率及正確性。

在實驗的 negative control 對照組方面，一組為把處理過的抽脂液培養在一般的培養液中做為對照，另一組把人體纖維母細胞放在實驗細胞分化促進液中，看能不能長出骨骼肌細胞。在實驗的 Positive Control 方面，我們把以前研究學者研發的骨髓母細胞和商品化的人類肌肉細胞放在肌肉分化促進液中培養，並用同一套分析方法去比較

及證實與本實驗脂肪抽取液分離的母幹細胞所分化的肌肉細胞的相同性與相異處。

目的

林聖哲博士於 2000 年赴 UCAL 組織工程實驗室研究一年，已熟悉此源自抽脂液的母幹細胞培育方式，將把它使用於培養成骨髓肌細胞，以期有一天正式使用於先天或後天的肌肉系統疾病或損傷患者身上，利用培養的骨髓肌細胞替代損傷或功能不佳的肌肉來達到以細胞基礎的治療方式，提供除了外科科外另一修復及重建肌肉功能的方法。

過程

人體脂肪抽取液是在整形外科門診抽脂手術中取得，在局部麻醉下，以 Tumesence 方法執行，局部麻醉劑內有 1% Xylocaine，epinephrine (1:10⁵) 和生理食鹽水，抽脂機為傳統負壓機械式吸脂機，以 Tumesence 方法可以減少流血量，避免太多血液細胞雜混抽取液，細胞較不易破壞，並減低萃取母幹細胞的困難度。

處理過的脂肪抽取液 (Processed Lipo-Aspirate, PLA)

首先請助理將脂肪抽取液由手術室儘快送到實驗室，先用等體積的 Phosphate Buffered Saline (PBS) 多次沖洗及激烈搖盪混合，濾掉血液成份，再加上等體積 0.075% collagenase (37 °C, 30 分鐘) 來分解殘留血液細胞，再利用 Dulbecro's Modified Eagles Medium (DMEM) 來中和 Collagenase，分裝成 50cc 的試管，並於 1200xg 下離時 10 分鐘，以取得高濃度的 stromal vascular fracture (SVF) 萃取物，接著再度用 DMEM 溶解 SVF，此時需用 100 μm 的尼龍濾網過濾細胞殘存物，再放到 Control Medium (DMEM, 10% FBS, 1% Antibiotic/Antimycotic solution) 中，於 37 °C / 5% CO₂ 的 incubator 中放過隔夜天再把欲培養的細胞懸浮液用 PBS 沖洗以除去 non-adherent RBC，此時的萃取液稱為 Processed Lipo-Aspirate (PLA)。

加入肌肉細胞分化促進液 (Myogenic Medium, MM)

把 1x10⁴ 個細胞培養在 35mm 的培養皿上，加入 Myogenic Medium (DMEM, 10% FBS, 5% Horse Serum, 50 μm hydrocortisone 和 1% Antibiotic/Ant-mycotic solution)，每週換分化促進液兩次，共六週，每天以光學顯微鏡觀察細胞形態的變化。

免疫組織生化法

每 5×10^3 個細胞培養在一小格(共八小格的培養皿), 每一週做免疫組織生化法一次, 方法為把一小格培養皿用 PBS 濕潤兩次, 用 4% Paraformaldehyde 於 4 °C 下固定 2 分鐘, 再加上 3% H_2O_2 5 分鐘來阻斷 endogenous peroxides 的活性, 並加上 Blocking Buffer (BBPSB, 1% Horse Serum 0.1% Triton/x-100) 30 分鐘來阻斷 non-specific epitope, 接著加入 monoclonal antibody to human MyoD1 或 human fast twitch skeletal muscle myosin heavy chain 於 4 °C 中過夜, 隔天用 BB 再度清洗, 並加上 Horse Anti-mouse IgG Biotinylated Secondary Antibody (1:250 dilution) 兩小時, Secondary antibodies 用 Vectastain ABC Kit, 最後用 hematoxyline 3 分鐘來加強對比染色。

定量分析

利用 Axioskop 2 顯微鏡照相系統在 200 倍下計算染有 MyoD1 或 Myosin heavy chain 的細胞比率, 以 one-way analysis of variance (ANOVA) 做統計分析。

CDNA 和 RT-PCR 的方法

用 superscript Enzyme 把培養肌肉細胞的 RNA 反轉合成為 oligo d(T)-Primed cDNA, 等量的 cDNA 用以做為 templates for PCR amplification (50 μ l Reaction volume)。Primer Pairs 如下:

MyoD1: 5' -AAGCGCCATCTCTTGAGGTA-3'

和 5' -GCGCCTTTATTTTGATCACC-3'

Myosin Heavy Chain:

5' -TGTGAATGCCAAATGTGCTT-3'

和 5' -GTGGAGCTGGGTATCCTTGA-3'

經 35 個 amplification 週期後取出樣品在 agarose gel 中分析, 預期分子大小: MyoD1 為 500bp, 而 Myosin Heavy Chain 為 750bp。

Negative Control

1. Human Fibroblast + Myogenic Media
2. Process Lipo-Aspirate + Control Medium

Positive Control

1. Human Skeletal Muscle Cell
2. Bone Marrow-derived Stem Cell + Myogenic Medium

心得

在重建整形外科領域中，組織缺損的重建或塑型常因適當組織捐贈的困難取得，捐贈區的後遺症及血液循環不良的因素影響而受到限制，組織工程技術的研發提供我們臨床工作者一個新的思維模式。如果能萃取具有再度分化能力的母幹細胞，加以引導培養出我們所需的特殊細胞，亦可達到治療的功效。理論上只有胚胎母幹細胞可以利用於多源性細胞的分化，一為胚胎母幹細胞，但基於道德的考慮及細胞的合法控制，只能用於動物實驗；另一為自體母幹細胞，它就沒有這些限制，尤其是來自骨髓的自體母幹細胞，已經在世界很多研究機構成功地培養，並得到卓越的突破性發展。人體骨髓源自於胚胎時期的中胚層，富含造血母細胞和間質，我們以前對造血細胞了解較多，但較少研究間質的重要性及用處，其實這些間質含有源自中胚層的母幹細胞，已被研究學家成功地培養分化出脂肪、軟骨、骨骼及肌肉細胞，但由骨髓間質所衍生的母幹細胞數目較少(<0.0005%)，且需要在體外長時間培養及繁殖，才能使用於臨床，這些步驟不僅耗時、花錢且有細胞汙染的可能性，且捐贈者會長期疼痛，因此其他組織來源的自體母幹細胞一直被尋找著，其中脂肪組織和骨髓一樣源自胚胎期的中胚層，一樣富含多樣性的間質細胞群，其細胞取得容易，可以利用需要治療的患者本身的細胞，不必借用他人細胞以避免外來組織的排斥問題，且手術時只需局部麻醉，可抽取的母幹細胞較多，捐贈區較不疼痛，這些經過處理過的脂肪抽取液可以在體外穩定的繁殖和低程度的老化，利用免疫螢光法及流量細胞測量法發現，大部份經處理過的脂肪抽雙液源自中胚層，另參雜有一些內皮細胞、平滑肌細胞及 Pericytes，經特殊溶解分離及純化後加上專屬的培養液亦與骨髓母幹細胞一樣可以分化為骨骼、軟骨、脂肪及骨骼肌細胞，此技術在近年

來於美國 UCLA 及匹茲堡大學正積極的研究，並在技術上有重大突破，將陸續發表在世界著名雜誌，林聖哲博士於 2000 年赴 UCAL 組織工程實驗室研究一年，已熟悉此源自抽脂液的母幹細胞培育方式，將把它使用於培養成骨髓肌細胞，以期有一天正式使用於先天或後天的肌肉系統疾病或損傷患者身上，利用培養的骨髓肌細胞替代損傷或功能不佳的肌肉來達到以細胞基礎的治療方式，提供除了外科科外另一修復及重建肌肉功能的方法。

參考文獻

1. P. K. Law, T. G. Goodwin and M. G. Wang. normal myoblast injections provide genetic treatment for murine dystrophy [see comments]. *Muscle Nerve* 11,525-33,1988.
2. T. A. Rando, G. k. Pavlath and H. M. Blau. The fate of myoblasts following transplantation into mature muscle. *Exp Cell Res* 220,383-9,1995.
3. T. A. Partridge, M. Grounds and J. C. sloper . evidence of fusion between host and donor myoblasts in skeletal muscle grafts. *Nature* 273,306-8,1978.
4. T. A. Rando and H. M. blauprimary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated genc therapy. *J Cell Biol* 125,1275-87,1994.
5. S. D. Hauschka. Clonal analysis of vertebrate myogenesis. 3. Developmental changes in the muscle-colony-forming cells of the human fetal limb. *Dev Biol* 37,345-68,1974.
- P. A. Lucas, A. F. Calcutt, D. J. Mulvaney, H. E. Young and S. S. Southerland. Isolation of putative mesenchymal stem cells from rat embryonic and adult skeletal muscle. *In Vitro Cell Dev Biol* 28,154A,1992.
6. V. Guerriero, Jr. and J. R. Florini. Dexamethasone effects on myoblast proliferation and differentiation. *Endocrinology* 106,1198-202,1980.
7. A. E. Grigoriadis, J. N. Heersche and J. E. Aubin. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progcnitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell*

- Biol 106,2139-51,1988.
8. M. Periasamy, P. Gregory, B. J. Martin and W. S. Stirewalt. Regulation of myosin heavy-chain gene expression during skeletal-muscle hypertrophy. *Biochem J* 257,691-8,1989.
 9. H. H. Vandeburgh. Cell shape and growth regulation in skeletal muscle: exogenous versus endogenous factors. *J Cell Physiol* 116,363-71,1983.
 10. H. H. Vandeburgh, P. Karlisch and L. Farr. Maintenance of highly contractile tissue-cultured avian skeletal myotubes in collagen gel. In *In Vitro Cell Dev Biol* 24,166-74,1988.
 11. H. H. Vandeburgh and P. Karlisch. Longitudinal growth of skeletal myotubes in vitro in a new horizontal mechanical cell stimulator. In *In Vitro Cell Dev Biol* 25,607-16,1989.
 12. P. A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. I. Huang, M. Ngo, A. J. Katz, W. Futrell, H. P. Lorenz, P. Benhaim and M. H. Hedrick. Multi-lineage cells from human adipose tissue: a potential source for cell-based therapies. *Tissue Engineering* submitted, in revision, 2000.
 13. S. Wakitani, T. Saito and A. I. Caplan. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18,1417-26,1995.
 14. D. J. Prockop. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276,71-4,1997.
 15. D. R. Champion. The muscle satellite cell: a review. *Int Rev Cytol* 89,225-51,1984.
 16. H. S. Alameddine, M. Dehaupas and M. Fardeau. Regeneration of

- skeletal muscle fibers from autologous satellite cells multiplied in vitro. An experimental model for testing cultured cell myogenicity. *Muscle Nerve* 12,544-55,1989.
17. H. E. Young, M. L. Mancini, R. P. Wright, J. C. Smith, A. C. Black, Jr., C. R. Reagan and P.A. Lucas. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev Dyn* 202,137-44,1995.
 18. A. I. Caplan. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9,641-50,1991.
 19. J. H. Bennett, C. J. Joyner, J. T. Triflitt and M. E. Owen. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci* 99,131-9,1991.
 20. A. P. Calcutt, P. Ossi, H.E. Young, S. S. Southerland and P. A. Lucas. Mesenchymal stem cells from wound tissue. *Clin Res* 41,536A,1993.
 21. P. A. Lucas, A. F. Calcutt, P. Ossi, H. E. Young and S. S. Southerland. Mesenchymal stem cells from granulation tissue. *J Cell Biochem* 17E,122,1993.
 22. M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284,143-7,1999.
 23. G. Ferrari, G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu and F. Mavilio. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors [see comments][published erratum appears in *Science* 1998 Aug 14;281(5379):923]. *Science* 279,1528-30,1998.

24. J. T. Williams, S. S. Southerland, J. Souza, A. F. Calcutt and R. G. Cartledge. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg* 65, 22-6, 1999.

建議

在醫學方面

- 1.結合組織工程，創造另外一種以細胞為基礎的肌肉修補方式。
- 2.利用美容手術抽脂手術的丟棄物(抽脂液)加入廢物利用，達到研究新科技的目的。

在組織工程方面

- 1.把基礎醫學的技術有效的應用到臨床上。
- 2.比較脂肪來源的母幹細胞和骨髓來源的母幹細胞培養分化的肌肉細胞有何異同？

未來展望

本年度的目標為建立一套實驗的基本操作手冊，並提高肌肉細胞的分化成功率，如有時間會把此技術培養幹細胞於可分解的生醫材料上(Biodegradable Material)，如 Poly-glycolic Acid, Poly Lactic Acid 或 Collagen 上。

未來會再做動物實驗，並等無菌技術及安全性更提高以後，將使用於先天性肌肉病變和後天性肌肉損壞的病人身上，以提供除了手術方法外，另一以細胞為基礎的組織工程療法。

人生有夢，逐夢踏實，從小生活在殷實的城市 嘉義，總是羨慕同學得以因打少棒而出國，但也目睹了嘉義七虎少棒鍛羽波廉波特時社會的人情冷暖，及長總以為若能學有所成，回故鄉開業，得以幫助故鄉人，即是此生最大志願了。然而在台大當完整形外科總住院醫師後，因成大醫院剛成立，再加上邱浩遠主任的精神感召，故得以”轉進”成大，繼續服務於大學醫院，沒有成為開業醫。初入成大，一切從頭來，沒有基本病人群，又沒知名度，因此先一頭鑽入醫工所唸書，師事周有禮教授，民國 89 年初，當還沈醉在所做的”顏面表情動態分析”論文為 SCI 雜誌所接受的喜悅時，又喜上加喜，接獲 UCLA 來函同意我赴美進修一年。當時會選擇 UCLA 的原因很多，但最主要的因素有二：一為我從小就是 LA Lakers 的球迷；二為 UCLA 同意我從事二十一世紀最 Hito 的研究—組織工程，一年後的今天回想起來，這個抉擇是絕對正確的，因為 Lakers 在美國職業籃球二連霸，我們全家得以躬逢盛會，而且 UCLA 在我進修半年後發表了全世界第一篇利用脂肪抽取術分離出的 Stem Cells 來分化為骨骼、軟骨、肌肉及脂肪細胞，雖然未能掛名其中，但有幸在論文修改其間，幫忙補充一些資料，也是與有榮焉。

我把這一年(89.8.14~90.8.13)在 UCLA 進修的情形分為四個階段：

一、蠻荒期(前二個月)

出國前因博士班畢業及出國申請作業兩頭忙，所以無法做太多行前準備作業，記得一家五口出國前的行李只有兩大箱，還被友人譏笑比出國短期旅行還精簡，後來勉強湊了一人一箱就直奔天使之城—洛杉磯，前兩個月為了 UCLA 的行政作業，房事相關的水電、瓦斯、電話、垃圾，社會安全卡的申請，小孩就學及買車，忙到體重直降，大

有不如歸去之感。因為我們不是美國居民又沒有 Credit 就算你有合法簽證(J-1 and J-2)，在美國生活也是大不易，再加上以前在成大醫工所並沒有組織工程的課程可修，剛入行，不論在知識上或技術上都大不如人，挫折感很重，真不好意思說自己是 M.D 加上 Ph.D., 幸好在同事 Min 的幫忙及鼓歷勵下，才得以漸入佳境，日起有功。

二、成長期：(前二個月到前四個月)

經二個月的奮戰後，總算把一些細胞學、生化學、基因學的程度提昇到聽得懂，並可以加入討論的地步，但在每週一的 4 小時研究報告及討論會，仍受限於英文表達能力及敏捷度的限制，只能偶而插話，但 UCLA 的醫師及醫工所教授也漸漸了解，來自台灣的我在臨床經驗及手術技巧也稱得上優良，因此會不時停下來詢問我的意見，那種受重視的感覺直到現在都還感激莫名。這時在實驗操作上，也漸漸由只能到比佛利山美容外科診所拿脂肪抽取物的車伕，升格為幫忙分離 Stem Cell 的”二廚”，並擁有獨立的 incubator 空間可以自己培養自己想要的細胞，甚至偶而可以充當”大廚”，獨立分離出 Adipo-Derived Stem Cell 供同事分化成其他細胞。

三、成熟期：(中間六個月)

由於細胞培養的能力已被認證通過，所以得以有多餘的時間去開一些國議醫學會及參加專為 UCLA 整形外科住院安排的 Instruction Courses，如利用黃金比例的原則用陶土塑造臉形課程及繪畫課，由其中了解到 UCLA 對住院醫師訓練課程的多樣性及精緻度。此時也被委以重任，尋求利用除了 Collagenase 外的物理方法來分離 Stem Cell，並成功地利用超音波在固定的頻率和能量下，分離出 Stem Cell，現仍在 UCLA 的 REBAR 實驗室繼續研發中。

四、整理期：(後兩個月)

如同服役中由”破百之日”倒數饅頭般的心情，收拾行囊準備歸國的時間漸漸接近，UCLA 的秘書 Jessica 也帶來了一個令人高興又難

以回答的問題，UCLA 想讓我多留一年，但只有少許生活津貼，為了尋求這個問題的解答，我們全家開了數次家庭會議，雖然小孩已漸漸習慣美式教育，但他們還是很懷念台灣，而且終究他們還是要回台灣唸書，而我呢？或許多一年會讓我的研究之路更充實，但積蓄即將用盡，未來的一年成大勢必將我停薪(留不留職仍未定)，而我們又不像日本友人 Yoshi，第一年日本政府給全薪，第二年給 70%，且基於公平原則及未事先報備下，我們決定如期返國，在 LA 長榮機場櫃檯還被 Check-In 的地勤人員笑說，那天是我們一年期機票有效期間的最後一天。當決定回國時，心情輕鬆很多，不過也感覺時間不多，必須把以前作的實驗方法及流程更詳細記錄下來，並從根本做起，親自調配各種 Induction Media(此工作原為研究助理的工作)，以免回國後無法調配出與 UCLA 一樣的藥劑，而使細胞培養的工作功虧一潰。

回國不到一個月，發生 911 紐約雙子星大廈撞機的恐怖事件，連忙聯絡在 LA 的友人，直到全部聯絡上才安心，因為那些飛機大部份飛往 LA。在我們安全返台三個月的此時，我們由衷感激在這段期間不論在生活上或工作上給我們全家有形或無形的支持的美國親友，原諒我不能一一寫出您們的名字，就算寫出，您們大部份也看不懂中文，但別忘了我幫您們取的中文姓名以及我給您們的中文印章，那些內含著我們全家無比的感激與思念。

後記：

感謝 UCLA 整形外科同仁對我及成大醫院的愛戴及支持，其中 Dr. William Shaw 已於十月底飛來成大擔任外科客座教授；Dr. Marc Hedrick 將於十二月中中華民國整形外科年會時來成大做專題演；Dr. Kawamoto 亦預於明年三月中受邀來訪，這些行程及內容容後再撰文敘述。

目次

內容	頁數
書名頁	1
目次	
摘要	3-4
正文	5-16
來去 UCLA 夢想之旅	17-19
附錄	後 20 頁