

出國報告（出國類別：進修）

**實驗室中合成俱內皮細胞之人工真皮
技術**

服務機關：台北榮民總醫院

姓名職稱：主治醫師 彭成康

派赴國家：美國

出國期間：97/1/21 至 98/4/5

報告日期：978/4/30

摘要

本次出國進修前往美國加州大學聖地牙哥分校進行醫學工程方面的研究，主要是延續個人在台灣陽明大學醫學工程研究所博士班在職進修的研究方向，目的是將血管內皮細胞置入人工合成之真皮模型中探討其在體外發展出微血管網之可能性，並進一步將此體外培養之含內皮細胞之人工真皮以動物實驗模型探討其在活體內促進微血管網新生之成效。本系列實驗的第一部份是將血管內皮細胞置入人工合成之真皮模型中探討其在體外發展出微血管網之可能性。第二部份是將體外培養之含內皮細胞之人工真皮以動物實驗模型探討其在活體內促進微血管網新生之成效。第三部份是建置合併細胞微環境陣列及機械拉伸實驗模型，並用以進行幹細胞分化的研究。

關鍵字: 人工真皮, 血管內皮細胞, 細胞微環境陣列, 機械拉伸, 幹細胞

目次

1. 本文	
i. 目的	4
ii. 過程及心得	5
iii. 建議事項	25
2. 附錄	
i. 參考文獻	26

目的

本次出國進修前往美國加州大學聖地牙哥分校進行醫學工程方面的研究，主要是延續個人在台灣陽明大學醫學工程研究所博士班在職進修的研究方向，目的是將血管內皮細胞置入人工合成之真皮模型中探討其在體外發展出微血管網之可能性，並進一步將此體外培養之含內皮細胞之人工真皮以動物實驗模型探討其在活體內促進微血管網新生之成效。

對於因為先天或後天因素造成的器官或組織缺損，器官或組織的移植手術是目前常用的治療方法。異體的器官移植有器官捐贈短缺的問題。少量自體移植所需的組織雖然容易取得但是病患需承擔組織捐贈區可能的併發症及不適。若病患需要移植大量自體組織，例如大面積燒傷，以目前的醫療技術則仍有相當的困難及限制。因此一些合成的材料被拿來取代及重建缺損的組織，例如矽膠，但是以人造材料來對器官進行功能上的重建則進展有限。到了 1960 年代，結合了材料科學及細胞學的組織工程被發展出來成為一個新的研究領域。組織工程在醫學方面的應用則是發展出許多生物醫學材料用來修補缺損的組織或改進功能。經由實驗室中培養大量的某種細胞，再以一些支持有作用的基質材料將細胞帶入體內而存活下來，在一些方面，例如人造皮膚及軟骨，有相當的進展，甚至有一些產品已經在臨床上使用。不過目前成功的例子大多是單一細胞及結構簡單的組織，對於複雜的器官及三度空間組織的合成仍然難以突破。一個主要的難題是如何在實驗室的情況下維持大體積細胞的存活並將之移植回體內。單純的擴散作用無法達到營養複雜組織的效果，因此如何在建構的組織中建立血管系統來提供細胞養分似乎是一個可能的解決方法。

在合成的生醫材料組織中建構血管系統可概分為三個研究方向，第一種是使用能促進血管新生的激素，例如：VEGF 或 bFGF，藉由注射或直接包埋在生醫材料組織中來促進血管的新生。缺點是這些激素在體內皆不穩定且可能有全身性的副作用。第二種方法是將有支持作用的聚合材料先植入體內進行預先的血管化，後再將

細胞置入。但是此法需要額外的時間讓血管生長且實際上能血管化的體積有限。第三種方法是在合成生醫材料組織時一併將血管的內皮細胞置入其中。以血管內皮細胞及各種基質來建立的血管新生模型有很多種。Black AF.等人在 1998 年發表了以膠原蛋白聚合物、表皮細胞、纖維母細胞、及臍靜脈內皮細胞合成的皮膚，在這組織工程製造出來的皮膚中會自然形成類似微血管的構造。Frerich B.等人於 2001 年發展出以人類脂肪細胞、臍靜脈內皮細胞、及纖維蛋白架構製成的軟組織型，其中也能長出類似微血管的構造。這些以血管內皮細胞來促進血管新生的方法，雖然提供了一個很好的研究方向，但是這些細胞植入體內很快就會死亡，仍有待進一步研究，找出解決的方法。

過程及心得

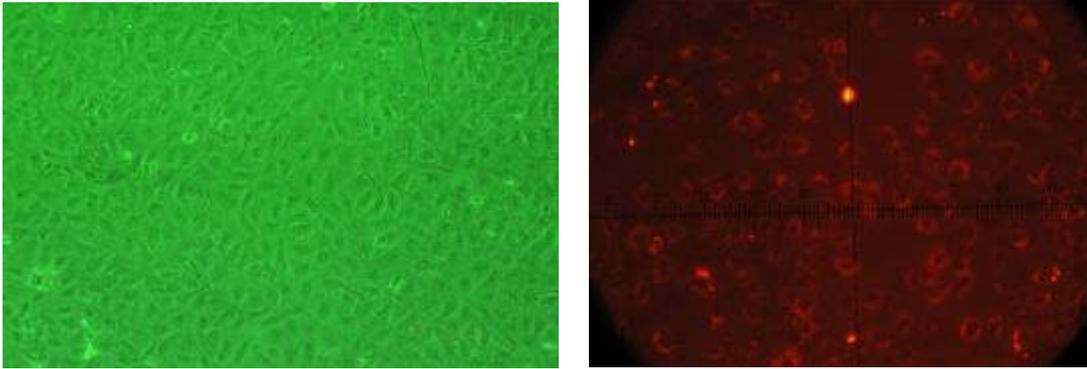
本系列實驗的第一部份是將血管內皮細胞置入人工合成之真皮模型中探討其在體外發展出微血管網之可能性。實驗使用的人工真皮模型是以 Integra (Integra Life Science Corp., Plainsboro, New Jersey)為基質，其組成為純化之牛隻肌腱膠原蛋白及鯊魚之 GAG (glycosaminoglycans)交錯而成俱有孔洞且類似人類真皮的三度空間結構。人類真皮纖維母細胞則從健康志願者之皮膚切片取得，以培養液 (DMEM+10%FCS+antibiotics)在 5%CO₂，37°C 溫箱中生長。將這些纖維母細胞置於 Integra 上繼續於培養液中成長則細胞會移入其孔洞中成為類似人類真皮的結構。

血管內皮細胞則是從人類臍帶靜脈取得，以 EC basal medium-2 (EBM-2, CLonetics) 培養液在覆蓋有人類 fibronectin 之培養皿(Sigma)中培養。

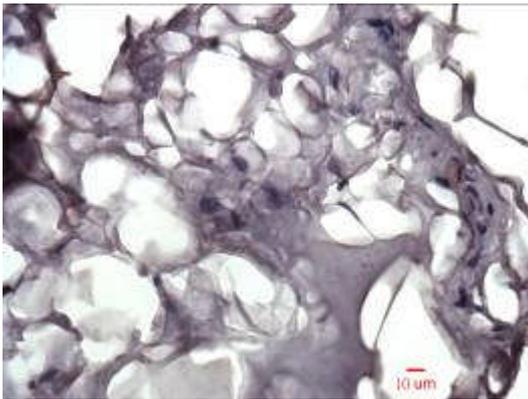
本實驗共分成三組，第一組是在 Integra 基質上加入人類纖維母細胞及血管內皮細胞，第二組是只加入人類纖維母細胞，而第三組是只加入人類血管內皮細胞。加入細胞後再持續培養 7,14,21,及 28 天後收獲以進行組織及免疫分析，了解實驗成果。

下圖左為人類臍帶靜脈血管內皮細胞在偏光顯微鏡下之型態；下圖右為內皮細胞

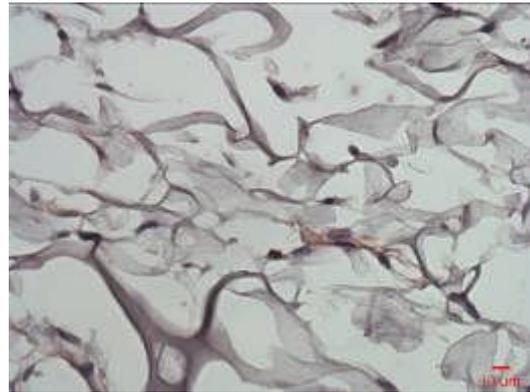
吞食 Dil-Ac-LDL 之螢光表現, Dil-Ac-LDL 為血管內皮細胞特異性標記物。



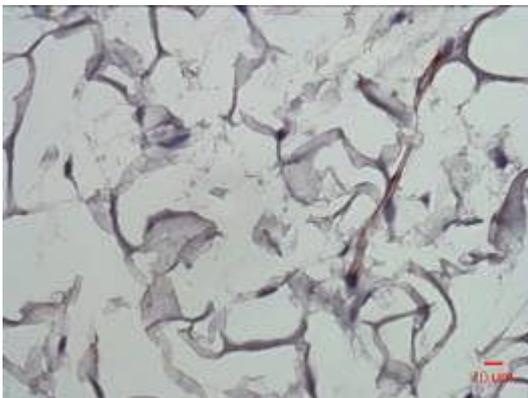
下圖為第一組, 在 Integra 基質上加入人類纖維母細胞及血管內皮細胞(呈棕色), 第 1, 2, 3, 及 4 星期之組織切片, 並以 CD34 免疫化學染色來標記血管內皮細胞, 由組織切片可以發現此組中可以形成類似微血管的管狀結構, 其數目隨時間增加。



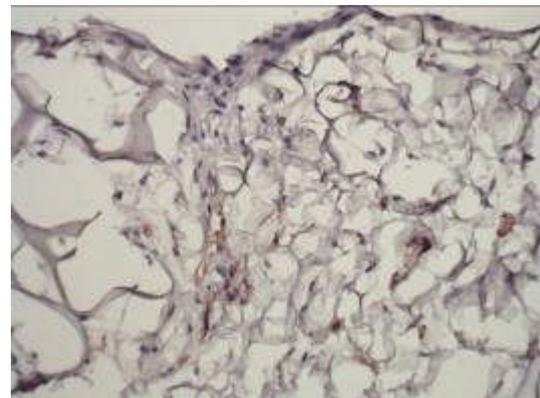
CD34 IHC stain, week 1, 400X



CD34 IHC stain, week 2, 400X

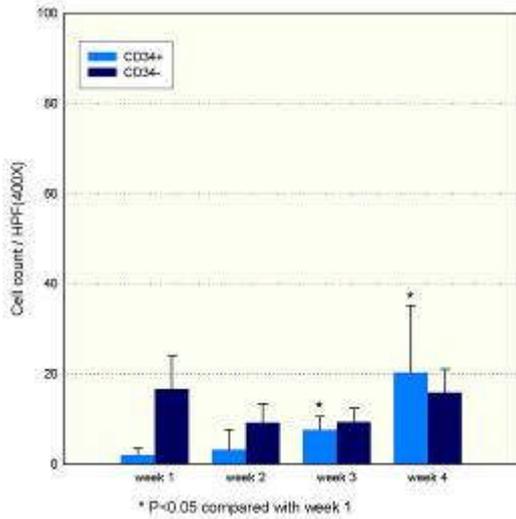


CD34 IHC stain, week 3, 400X

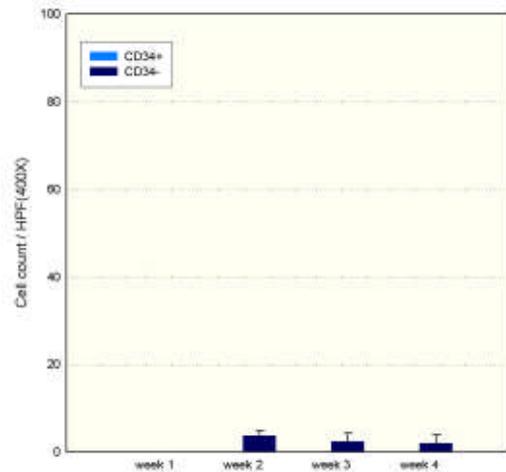
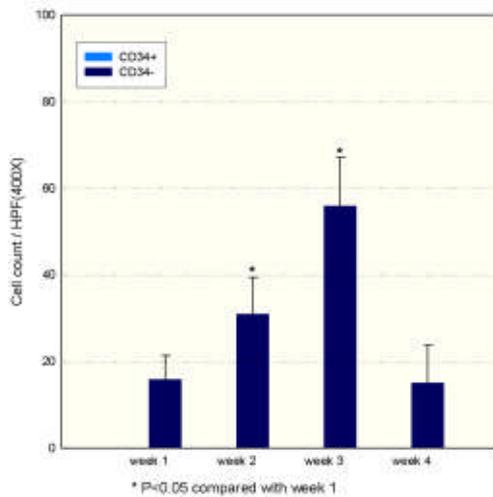


CD34 IHC stain, week 4, 400X

下圖為第一組，在 Integra 基質上加入人類纖維母細胞及血管內皮細胞(呈棕色)，第 1, 2, 3, 及 4 星期之組織切片，並以 CD34 免疫化學染色來標記血管內皮細胞，於顯微鏡高倍視野下計數細胞之平均數目，其中血管內皮細胞(CD34+)隨培養時間增加而增加。



第二組只加人類纖維母細胞(下圖左),從一至四星期間皆無血管內皮細胞(CD34+),而纖維母細胞(CD34-)則隨時間增加。第三組是只加人類血管內皮細胞(下圖右),其細胞數較第一及二組為少,且均為 CD34-,應是血管內皮細胞凋亡及失去其細胞特性。



由以上實驗可得以下初步結論: 1. 在 Integra 中培養纖維母細胞之真皮模型中加入血管內皮細胞可分化成類似微血管的結構, 且在四個星期間, 隨時間增加而增加。

2. 只將血管內皮細胞培養在 Integra 中則會產生細胞凋亡及失去細胞特異性。後續研究我們將把此俱血管內皮細胞之人工真皮以動物實驗型來驗證其效果, 是否較不俱血管內皮細胞者有較佳的刺激血管新生及傷口癒合能力。

本系列實驗的第二部份是將體外培養之含內皮細胞之人工真皮以動物實驗模型探討其在活體內促進微血管網新生之成效。如前節所述，本實驗室成功的使用人工真皮，Integra(Integra Life Science Corp., Plainsboro, New Jersey)，為基質，共同培養纖維母細胞及血管內皮細胞後可促成其分化成類似微血管的結構，且在四個星期間，此微血管結構隨時間增加而增加，另一方面若只將血管內皮細胞培養在人工真皮中則會產生內皮細胞凋亡及失去特異性。

實驗所使用的人工真皮模型是以 Integra(Integra Life Science Corp., Plainsboro, New Jersey)為基質，其組成為純化之牛隻肌腱膠原蛋白及鯊魚之 GAG (glycosaminoglycans)交錯而成具有孔洞且類似人類真皮的三度空間結構。人類真皮纖維母細胞則從健康志願者之皮膚切片取得，以培養液(DMEM+10%FCS+antibiotics)在 5%CO₂，37°C 溫箱中生長。將這些纖維母細胞置於 Integra®上繼續於培養液中成長則細胞會移入其孔洞中成為類似人類真皮的結構。

人類臍帶靜脈內皮細胞的培養是將新鮮人類臍帶之靜脈先以 PBS 沖洗，將殘留的血液排出，以 collagenase 溶液灌注靜脈腔，在攝氏 37 度下並保持此溶液留駐約 10 分鐘，後將溶液與所溶解下來的內皮細胞收集及離心，以 EC basal medium-2(EBM-2, CLonetics)培養液在覆蓋有人類 fibronectin 之培養皿(Sigma)中培養。

本實驗共分成四組，第一組是在 Integra 基質(剪裁成直徑一公分之圓形)上加入人類纖維母細胞(105 cells/cm²)及血管內皮細胞(105 cells/cm²)，第二組是只加入人類纖維母細胞，第三組是只加入人類血管內皮細胞，第四組是不加細胞。四組之 Integra 皆以培養液((DMEM+10%FCS+antibiotics): EBM-2 = 1:1)持續培養 14 天後收獲以進行動物實驗。

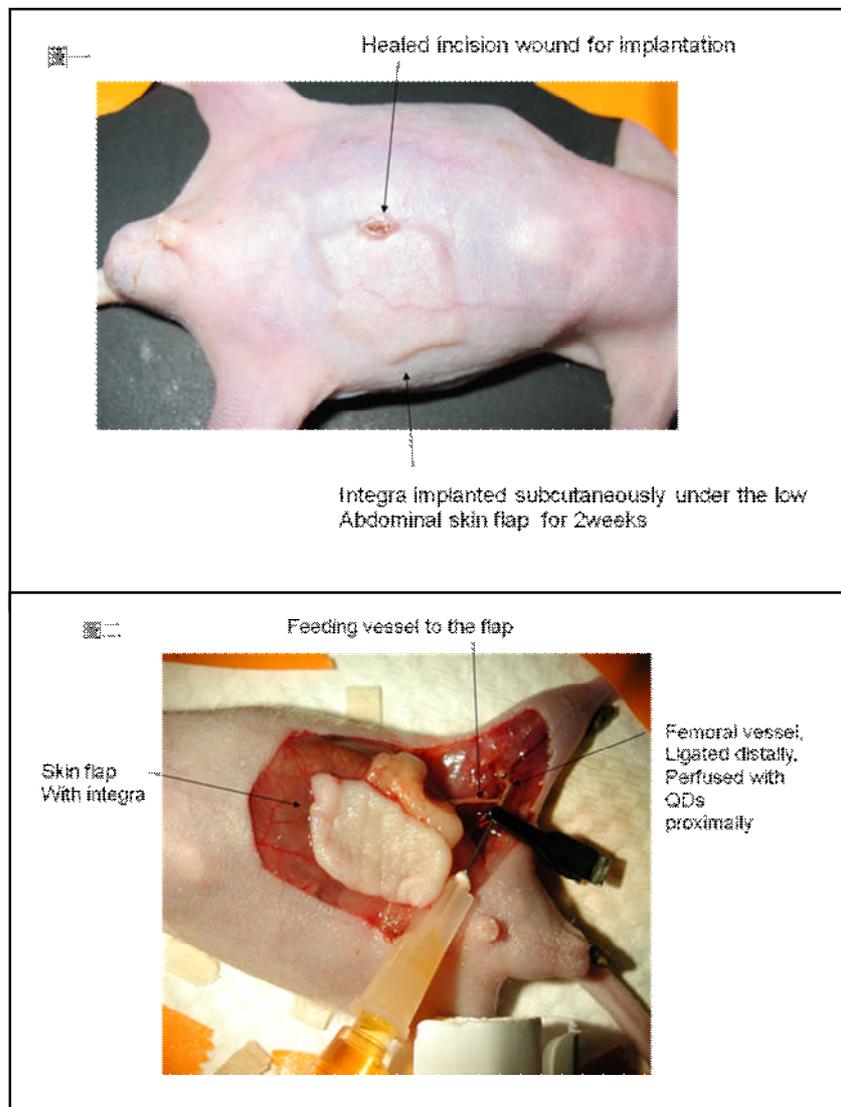
刺激血管新生能力之動物實驗，於 SCID 小鼠下腹部 deep inferior epigastric artery 皮瓣下分別植入前述一至四組之 Integra 基質 (n=12)。並於第 7，14，21，28 天每組各犧牲 3 隻小鼠以進行以下血管新生能力之分析：

以量子點(200 pmole/ml in PBS, emission maximum 650 nm, from “Molecular

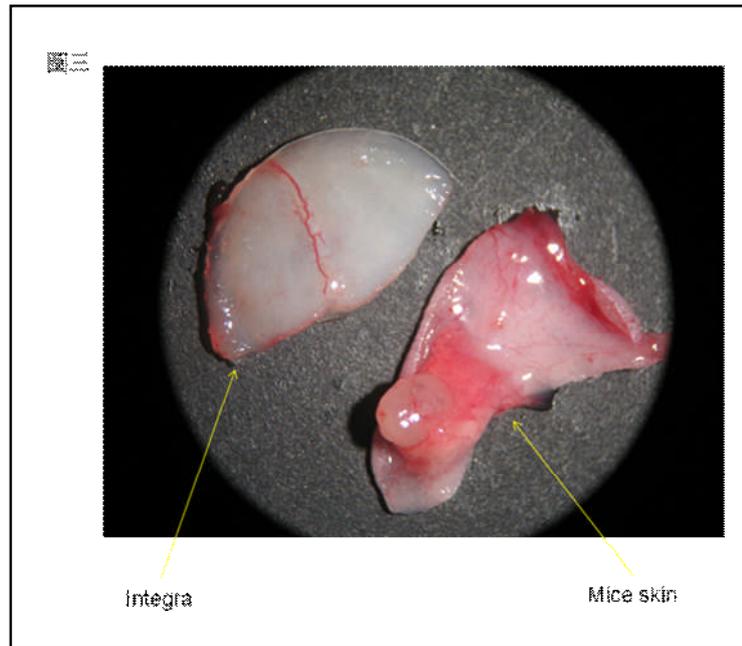
Probes”)經小鼠之股動脈充分灌注 deep inferior epigastric artery 皮瓣及植入之 Integra 基質, 再將 Integra 基質從皮瓣上取下, 以螢光照相系統記錄其螢光強度以作為分析 Integra 基質中新生血管數目之指標; Integra 基質另以共軛焦螢光顯微鏡觀察新生血管之三度空間立體結構。

以量子點充分灌注之 Integra 基質經固定, 石蠟包埋, 切片, 進行 H&E 染色及免疫化學染色(human CD34 and mouse CD34 monoclonal antibody)後於顯微鏡下觀察並計數血管密度以為新生血管數目之指標, 並可分辨植入之人類血管內皮細胞是否長期存活並融入小鼠之新生血管網中; 因量子點之光漂白現象很低, 可長時間發出螢光, 故此切片亦可以螢光顯微鏡觀察新生血管, 並與免疫化學染色之結果互相驗證。

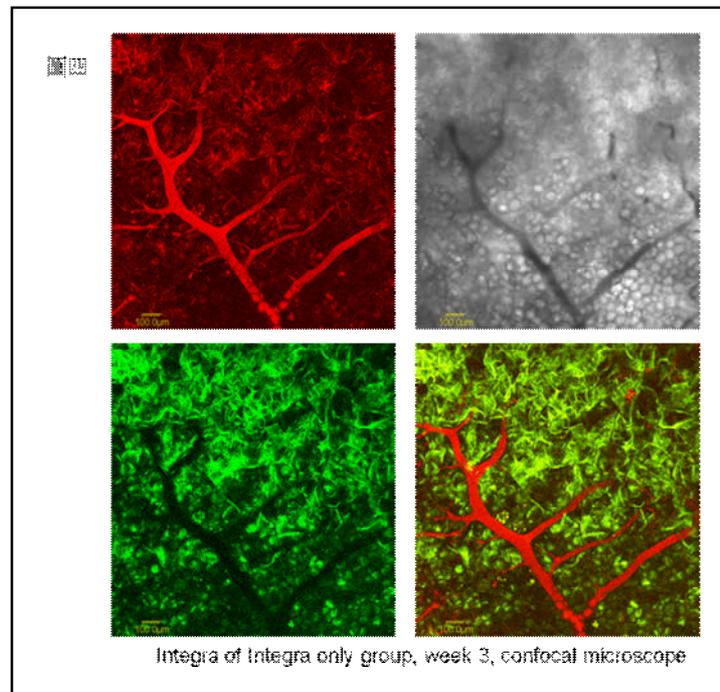
本研究發現如圖一所示, Integra 與細胞在體外培養 14 天後, 植入裸鼠下腹部皮下。在植入後 7 至 28 天, 以圖二的方式注入 QDs, 使其經由皮膚新生至 Integra 的血管帶入植入物中, 新生血管越多則 QDs 的信號越強。以此方式來測定植入物血管新生的程度。



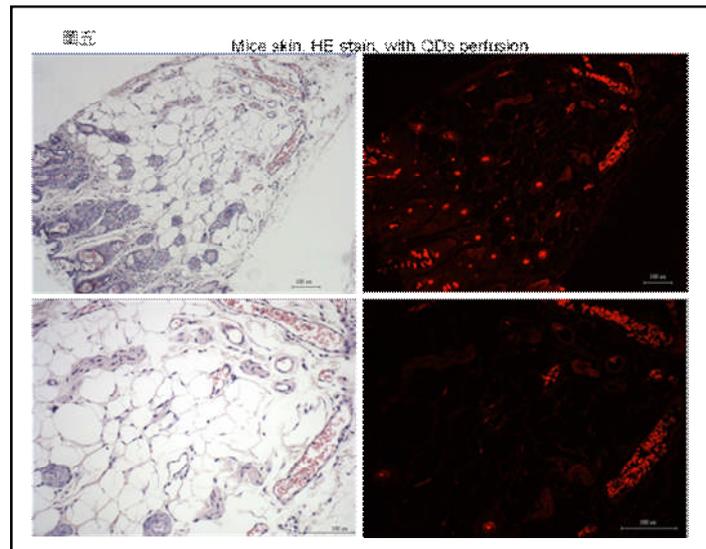
圖三為從實驗動物取下標本，並已將 Integra 及 skin 分開，在 Integra 的內側面可以清楚觀察到新生的血管，在螢光顯微鏡下也可偵測到灌注 QDs 之螢光信號。



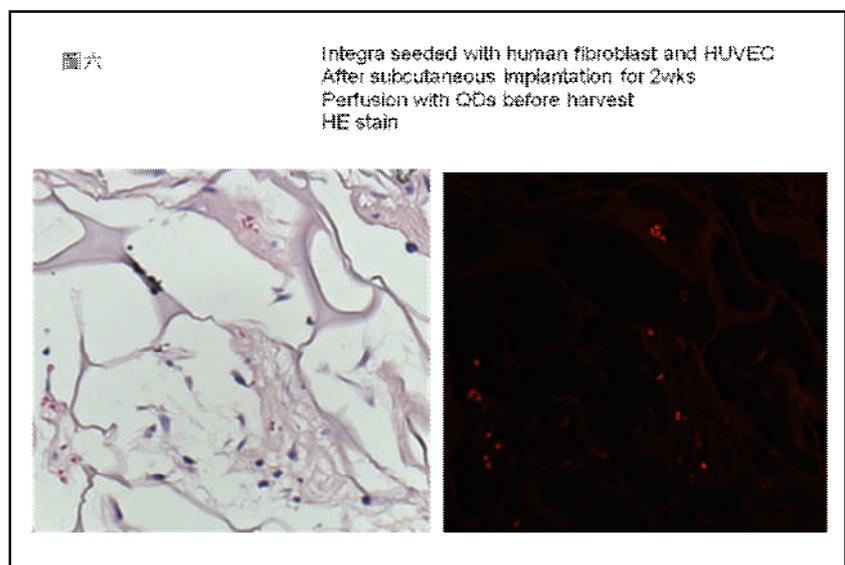
圖四為以共軛焦顯微鏡觀察自動物皮下取出的 Integra。Integra 本身會發綠色螢光，新生血管的部分因 QDs 灌注則發紅色螢光，將此二相片合併則可清楚辨識出新生在 Integra 中的血管。



圖五為經過 QDs 灌注之裸鼠皮膚，在進行石蠟包埋，切片，及可見光與螢光顯微鏡觀察。QDs 紅色螢光的信號可以很明顯的出現在血管中。

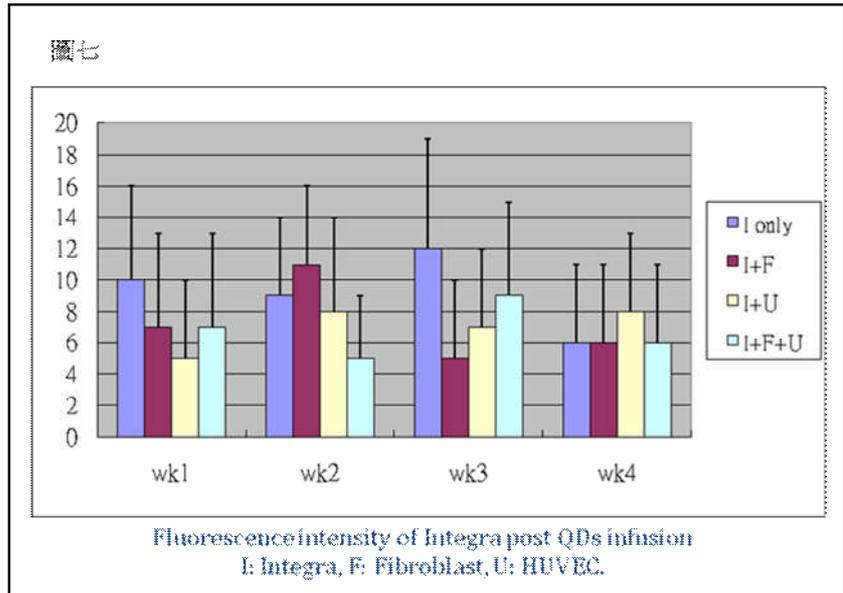


同樣的紅色 QDs 螢光信號也可以在 Integra 中的新生血管裡看到。圖六是帶有纖維母細胞及臍靜脈內皮細胞的 Integra 在植入裸鼠皮下 2 星期後的標本，在犧牲動



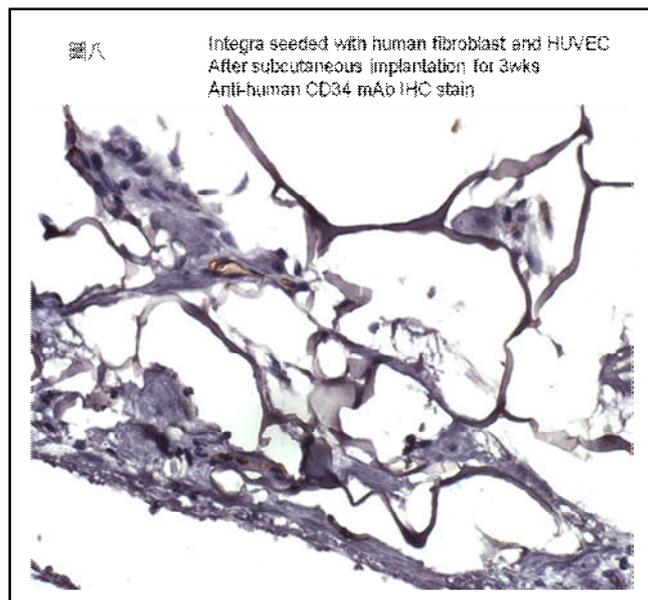
物以前，以 QDs 灌注下腹皮瓣及旗下的 Integra。圖中可明顯辨識 Integra 新生血管中的紅色螢光。

以上述的方法我們分析了四組 Integra 在一至四星期的血管新生程度，第一組是在 Integra 基質上加入人類纖維母細胞 (105cells/cm²)及血管內皮細胞(105



cells/cm²)，第二組是只加入人類纖維母細胞，第三組是只加入人類血管內皮細胞，第四組是不加細胞。結果如圖六所示，各組之間並沒有統計學上的差異。

圖八為以 Anti-human CD34 mAb 對 Integra 進行免疫組織化學染色。可發現部分 Integra 中的新生血管可呈現棕色的陽性信號，這表示我們培養在 Integra 中的臍靜脈內皮細胞在植入裸鼠體內後是可以存活下來並加入新生血管系統中。



在此計畫中我們發展了一個新的研究植入物血管新生的動物實驗模型。將植入物置於小鼠下腹皮瓣下，一定時間後由皮瓣的血管莖注入 QDs，則此 QDs 會經由新生血管帶入植入物中，藉由測定螢光強度可推測新生血管的數量，並可藉由共軛焦顯微鏡觀察三度空間的新生血管影像。

在我們實驗室先前的研究中，我們發現在 Integra 中同時培養纖維母細胞血管內皮細胞可使內皮細胞分化成類似微血管的結構，且在四個星期間，隨時間增加而增

加。若只將血管內皮細胞培養在 Integra 中則會產生細胞凋亡及失去細胞特異性。這個研究計畫是延續以上成果，進一步研究將此纖維母細胞及血管內皮細胞之人工真皮以動物實驗型來驗證其效果，是否較不俱血管內皮細胞者有較佳的刺激血管新生能力。初步的結果，在本實驗四個分組，Integra 中新生血管的程度在一至四星期間並沒有明顯的差異。由圖六可以看出 Integra 中的螢光強度在一至四星期間並沒有明顯的增加，且信號的絕對強度是低下的，故可能 Integra 需要比四星期更長的時間來進行血管新生的過程。所以進一步延長動物體植入的時間是可能的實驗方向。但也有可能在 Integra 中加入纖維母細胞及血管內皮細胞對其血管新生並沒有實質的幫助。

雖然初步的實驗結果顯示在 Integra 中加入纖維母細胞及血管內皮細胞對其血管新生並沒有實質的幫助，但我們也發現加入的人類血管內皮細胞可以在植入物中長期存活，且參與新生血管網路的形成，這個現象告訴我們在實驗室培養具有內皮細胞的植入物應有其一定的功能，但如何使其在促進血管新生上扮演進一步的角色則需進一步的研究來發展。

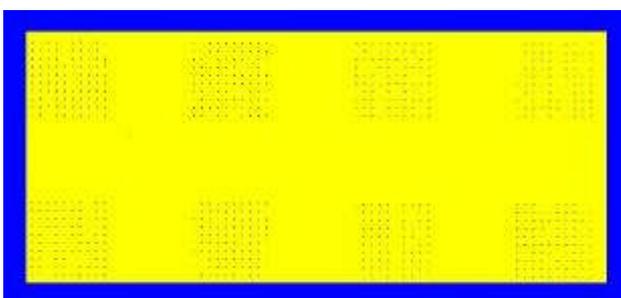
本系列實驗的第三部份是建置合併細胞微環境陣列及機械拉伸實驗模型，並用以進行幹細胞分化的研究。

人類成體及胚胎幹細胞方面的研究及進展提供了組織工程及再生醫學進一步發展的重要方向，幹細胞具有可大量增生及分化成各種胚層的能力，是目前細胞治療的重要支柱。因此，了解幹細胞生長與分化的機轉是進一步應用的基礎。雖然目前關於幹細胞分化的研究很多，但是缺乏整合性的研究方法。

細胞微環境陣列技術(Arrayed cellular microenvironment) (圖一)，是將丙烯醯胺(Acrylamide)聚合在載玻片形成薄膜，再以微陣列列印機將不同組合之細胞外蛋白基質列印 150um 直徑之蛋白質點，每一次陣列共有 100 點。將細胞培養於此玻片上，則細胞將之貼附於印有蛋白基質的陣列點上，形成細胞微環境陣列。此方法可以大量不同細胞外蛋白基質組合配合給予不同生長因子來研究細胞在不同為環境下生長分化的反應，尤其適合研究幹細胞的分化情形。

影響細胞生長分化的因素除了化學性的因子，如各種蛋白生長因子，物理性的刺激也扮演了相當重要的角色。在心臟血管系統中，血管內皮細胞及平滑肌細胞會受到血液流動

圖一



微環境陣列示意圖，藍色為載玻片，黃色為聚丙烯醯胺(Acrylamide)層，黑點為列印之細胞外蛋白基質組合。

圖二 PDMS stretch chamber



的剪應力及血壓脈衝的張應力的影響.在幹細胞的研究方面, Hamilton et al (2004) 發現以 1 Hz 10% 單方向拉伸連續刺激大鼠骨髓母細胞七天, 會促使其表現平滑肌細胞標記(SM α -actin)並使細胞垂直於張力方向排列. Park et al (2004) 在人類骨髓間質幹細胞上也有類似的發現. 不同的是平滑肌細胞標記的表現是短暫的, 前 24 小時增加, 48 小時後消失. 這些實驗開啟了幹細胞分化研究的另一個方向, 是否可以物理刺激的方式來引導分化. 但是以細胞受拉伸張力進行的實驗需要在 PDMS 拉伸膜上覆蓋細胞外蛋白基質以供細胞貼附在進行拉伸. 不同基質可能有不同的效果. 為進一步了解其可能的影響, 本計劃將細胞微環境陣列技術進一步建置在 PDMS 拉伸膜上, 並以此進行人類骨髓間質幹細胞於機械拉伸下分化的研究. 圖二為初步將丙烯醯胺 (Acrylamide)聚合在 PDMS 上形成薄膜的成果.

本實驗的研究方法條列如下,

1. 聚丙烯醯胺-PDMS合成

- A. Put PDMS membrane (0.005 inch in thickness) in UV-Ozone Chamber for 20 min. This step will add Hydroxyl group to the membrane surface for further silanization.
- B. Silanization: incubate PDMS membranes in 2% 3-(TMS)PM/95% EtOH for 2mins;
- C. Rinsing PDMS in 100% EtOH briefly and air dry;
- D. Making working solution for polyacrylamide (pAAm) gel pads: Mix 900 μ L acrylamide solution (10%, with 1:19 of bis) and 100 μ L Irgacure 2959 (200mg/ml in methanol) into a microcentrifuge tube, wrap the microcentrifuge tube with foil.
- E. Pipette two drops of 40 μ L working solution on PDMS membrane.
- F. Place 22x22 mm cover slips on top of each drop carefully to insure that no bubbles are caught between.
- G. Expose to UV for 30min.

- H. Hydrate membranes for 5min in Millipore water.
- I. Remove cover slips with a razorblade.
- J. Return membranes to Millipore water and soak for 48hrs; change water daily.

2. 細胞外蛋白基質列印

- A. Make protein printing buffer (PPB), mix 105.5mg of sodium acetate, 37.2mg of EDTA, 6.0mL DI milli-Q ultrapure water, 50 μ L triton X-100, 41.1 μ L glacial acetic acid, and 3.8mL glycerol. Vortex until homogenized and then add glacial acetic acid until pH = 4.7.
- B. Make protein stock solution 1000 μ g/mL in DI water, collagen I (I), collagen IV (IV), Fibronectin (Fn), and Laminin (Lam).
- C. Make protein printing solution as shown in the following table with protein stock solution, PPB, and DI water.

Composition(ul) Combination	I	IV	Fn	Lam	PPB	DI water	For wells of 384-well plate
I	12				12		A1, A3, C1, C3
IV		12			12		A4, A6, C4, C6
Fn			12		12		A13, A15, C13, C15
Lam				12	12		A16, A18, C16, C18
I-1/2	6				12	6	D1, D3, F1,

							F3
IV-1/2		6			12	6	D4, D6, F4, F6
Fn-1/2			6		12	6	D13, D15, F13, F15
Lam-1/2				6	12	6	D16, D18, F16, F18
I, Fn	6		6		12		G1, G3, I1, I3
I, Lam	6			6	12		G4, G6, I4, I6
IV, Fn		6	6		12		G13, G15, I13, I15
IV, Lam		6		6	12		G16, G18, I16, I18
I, IV	6	6			12		J1, J3, L1, L3
Fn, Lam			6	6	12		J4, J6, L4, L6
I, Fn, Lam	4		4	4	12		J13, J15, L13, L15
IV, Fn, Lam		4	4	4	12		J16, J18, L16, L18
I, IV, Fn	4	4	4		12		M1, M3, O1, O3

I, IV, Lam	4	4	X	4	12	X	M4, M6, O4, O6
All	3	3	3	3	12	X	M13, M15, O13, O15
ALL-1/2	1.5	1.5	1.5	1.5	12	6	M16, M18, O16, O18
Total volume (ul)	52.5	52.5	52.5	52.5	200	30	

- D. Add 6ul of protein printing solution each to wells shown in the table of a 384-well plate and store at 4°C until printing, centrifuge the plate a little bit before printing;
- E. Dehydrate the pAAm on PDMS before printing by air dry overnight
- F. Print the ECM protein array on pAAm-PDMS with spotarray machine, with 150um spot diameter, 450um distance between spots, 10x10 spots for each subarray ,and 8 subarrays for each PDMS membrane.

3. 人類骨髓間質幹細胞 (HMSC) 培養

- A. HMSC is obtained from Lonza, cat. No. PT-2501
- B. The HMSC is cultured with MSCGM BulletKit (PT-3001) medium kit from Lonza as suggested. Cells from p3 to p7 are used for experiments.

4. 大鼠主動脈 (RASMC) 平滑肌細胞培養

- A. RASMC is cultured in DMEM with 10% FCS and Penicillin/Streptomycin (P/S), 37°C, 5% CO₂, and 95% humidity. Cells from p6 to p12 are used for experiments.

5. 細胞微環境陣列拉伸實驗

- A. The ECM protein array printed pAAM-PDMS membrane is immersed briefly in 70% EtOH for sterilization and then mounted to a stretch chamber. Then chamber is further sterilized by exposure to UV light for 30 min.

- B. The pAAm is rehydrated with PBS 5 min then DMEM 5 min.
- C. HMSC or RASMC 5×10^4 cells in 1ml DMEM+10% FCS+ P/S are seeded to pAAm $22 \times 44 \text{ mm}^2$ area with 8 subarrays.
- D. The cells are incubated for 48hrs before putting on the stretch machine.
- E. 1Hz Cyclic uniaxial stretch with 10 % strain and is applied for 24, and 72 hrs

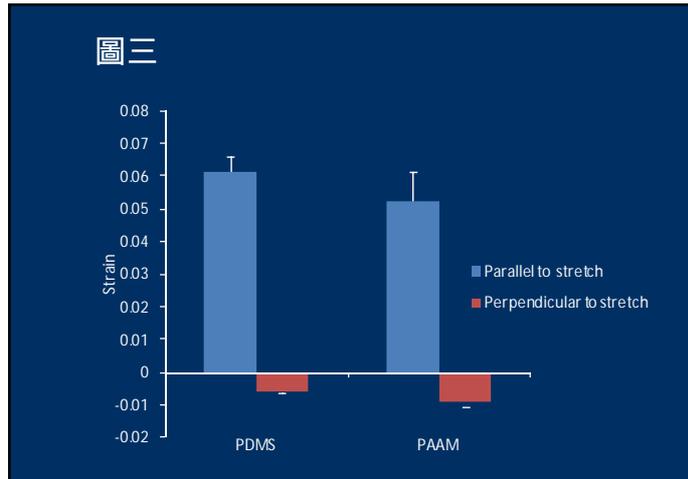
6. 細胞微環境陣列免疫螢光染色

- A. The Stretch chamber is washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at RT, and permeablized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 10 min.
- B. The pAAm-PDMS is cut and mounted to $75 \times 25 \text{ mm}$ glass slides
- C. The slides is blocked with 5% BSA in PBS for 1 hr at room temperature
- D. Indirect immunofluoresence is conducted by incubating with primary antibodies of mouse monoclonal to alpha smooth muscle actin (adcam, ab18460) with 1:100 dilutions for 1.5hr at room temperature
- E. After wash 3 times with PBS, further incubation with Cy5-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, 315-175-003) for 1hr at room temperature.
- F. After wash 3 times with PBS, Nucleic acid staining are performed by incubating with 1:500 Propidium Iodide nucleic acid stain (Molecular probes, P-3506) for 30min at room temperature

7. 細胞微環境陣列螢光掃描及資料分析

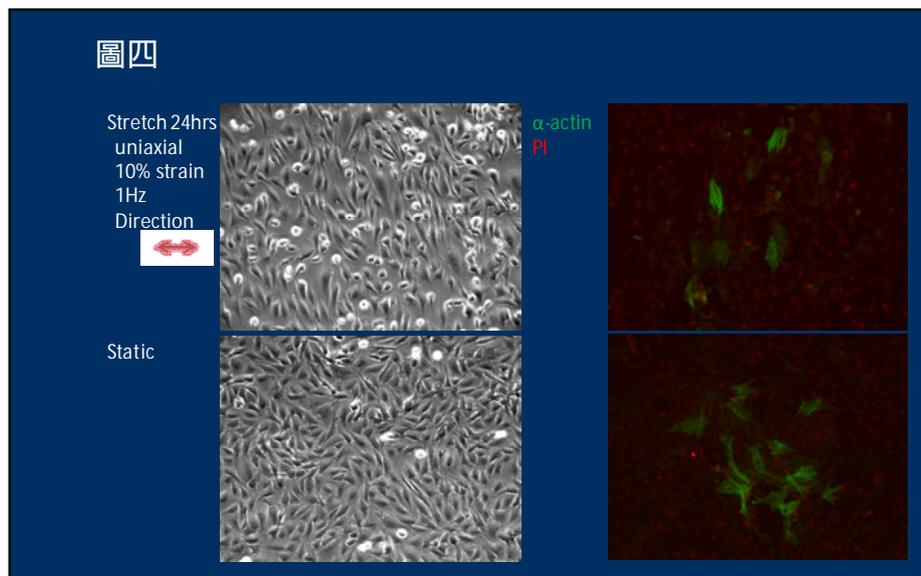
- A. For most quantification purposes, the ECM and cellular arrays are imaged with a ScanArray 4000 confocal laser scanner (GSI Lumonics) at $10 \mu\text{m}$ resolution.
- B. The scanner images are analyzed using ScanArray Express 2.0 software
- C. For normalization of cell numbers of each array spot, the signal ratio of the alpha smooth muscle actin to the PI nucleic acid staining is calculated.

本實驗初步結果，首先我們驗證了以共價鍵結合在 PDMS 膜上的 pAAm，在接受相同的機械性拉伸時，其產生的伸長量在兩者之間是沒有差異的，如圖三在沿拉伸的方向上，PDMS 的伸長量是 $6.16 \pm 0.81\%$ ，pAAm 的圖 $5.25 \pm$



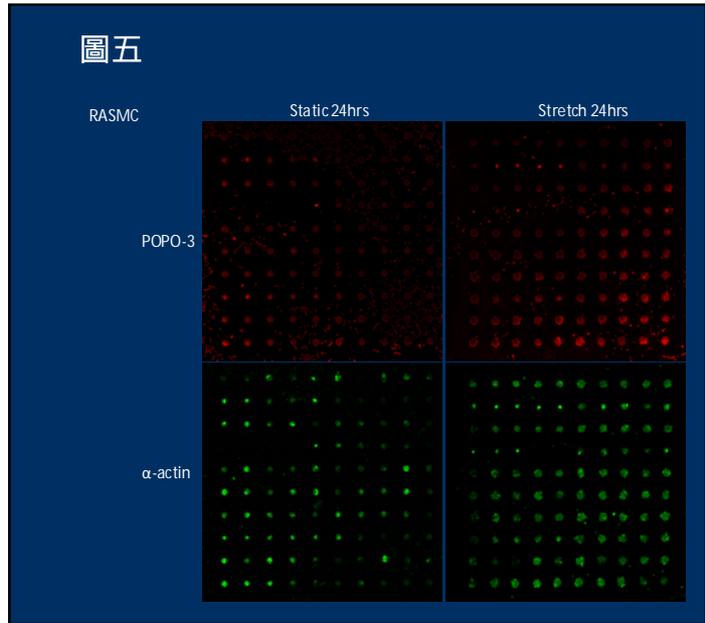
1.55%，兩者在統計學上是沒有差別的 ($p=0.54$)。在拉伸的過程中 pAAm 也沒有破損的情形發生。由此可推斷附著在 pAAm 上的細胞在施以機械性拉伸時能獲得與其下 PDMS 膜相同的拉伸量。圖四為以大鼠主動脈平滑肌細胞(RASMC)來驗證我們的機械性拉伸裝置及

平滑肌細胞分化標記 α -actin 免疫染色的有效性，在有接受機械性拉伸組的細胞會與拉伸方向垂直排列，靜態組



則沒有特定的排列方向。以 α -actin 免疫染色則可看見部份細胞會表現此種平滑肌細胞分化標記，在細胞內呈纖維狀排列。

大鼠主動脈平滑肌細胞 (RASMC) 也用在細胞外蛋白基質微陣列合併機械性拉伸的實驗，作為正向控制組，由文獻上我們可以知道，平滑肌細胞再受到機械性拉伸時會引發其表現 α -actin。在我們的實驗模型中，圖五為平滑肌細胞接受 24 小時機械性拉伸後，螢光染色的照片。紅色 popo-3 是染 DNA，代表的是細胞數目。綠色的是 α -actin，是平滑肌細胞特有的分化標記。

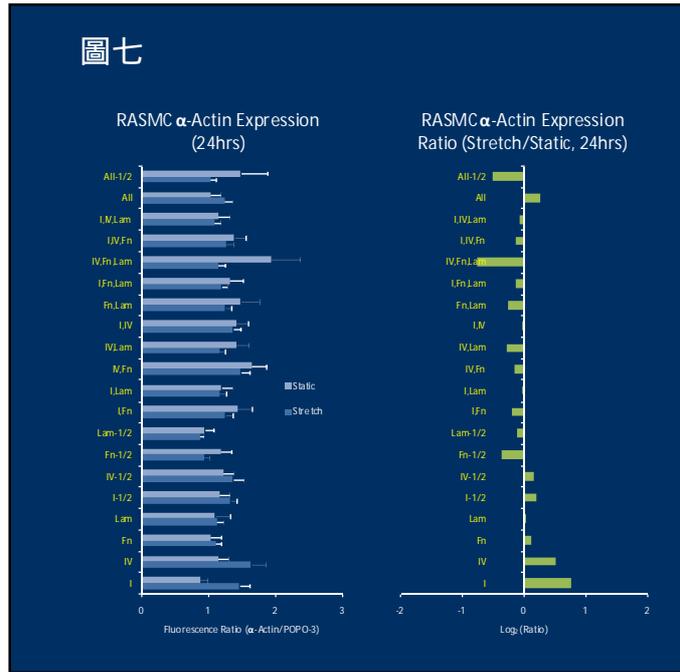


將圖五所有的螢光點亮化後可得圖六，在不同的細胞外蛋白基質組合及有否接受機械性拉伸的情況下，分別可測得其相對細胞數目 (popo-3)，及平滑肌細胞分化標記 (α -actin)。

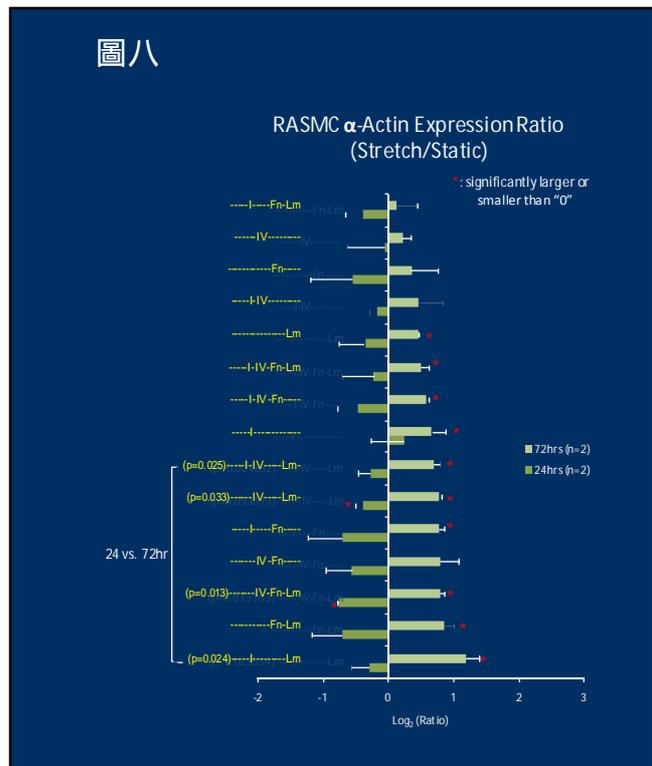


再由圖六進一步可得單位細胞表現 α -actin 的強度及有否受機械性拉伸的比值 (圖七)。

圖八為經 24 及 72 小時機械性拉伸後單位平滑肌細胞在不同細胞外蛋白基質組合下, 相對於靜態細胞表現 α -actin 的比例 (取底數為 2 的對數值)。紅色星號為數值在統計學上是大大於或小於 0, 在 24 小時拉伸後, 在大部份的細胞外蛋白



基質組合, 平滑肌細胞表現 α -actin 的程度與未拉伸組是沒有差別的。經 72 小時拉伸後, 大部份的組別可以看到明顯表現較多的 α -actin, 由此可知平滑肌細胞在機械性拉伸下須要大於 24 小時才能看到其表現較多的 α -actin, 這個情形與目前文獻報告的是吻合的。但是在接受 72 小時機械性拉伸的平滑肌細胞, 在不同細胞外蛋白基質組合之間 α -actin 的表現是沒有差異的, 由此可初步推論以此四種蛋白質組合之 20 種細胞外蛋白基質組合對平滑肌細胞因機械性拉伸而分化為收縮型平滑肌細胞的影響是沒有差別的。若以 24 與 72 小時來比較, 有四個細胞外

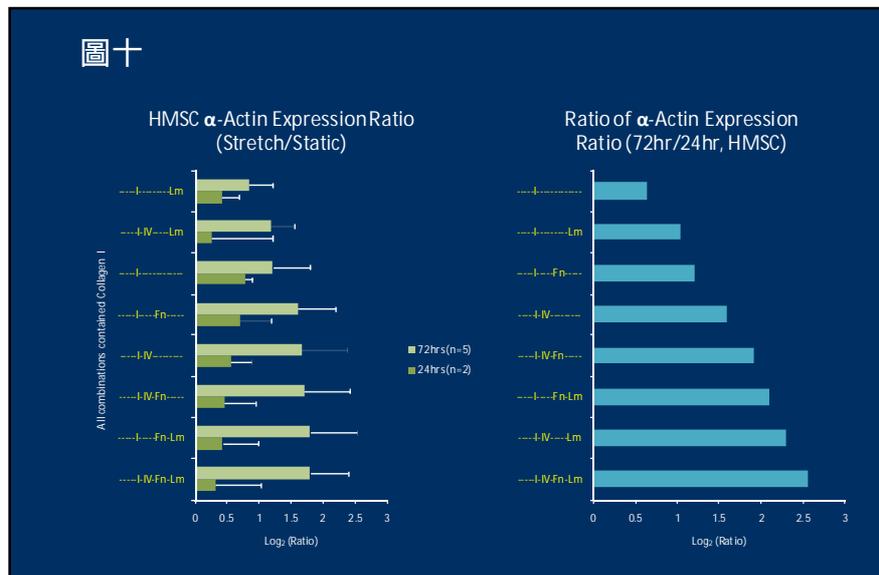
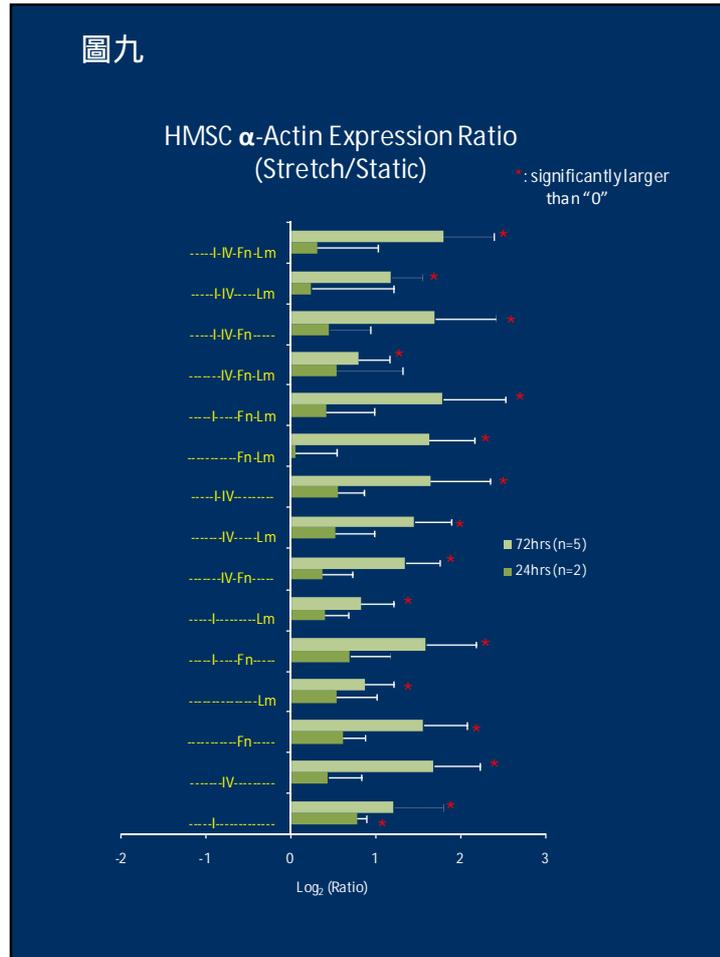


蛋白基質組合式有明顯的差異的, 且都包含了 Laminin, 由此可推論 Laminin 在平滑肌細胞因機械性拉伸而分化為收縮型平滑肌細胞的過程上扮演重要的角色, 這個情形與目前文獻報告的也是吻合的。

圖八為經 24 及 72 小時機械性拉伸後單位人類骨髓間質幹細胞在不同細胞外蛋白基質組合下，相對於靜態細胞表現 α -actin 的比例 (取底數為 2 的對數值)。紅色星號為數值在統計學上是大於 0。與平滑肌細胞類似的是在 24 小時拉伸後，在大部份的細胞外蛋白基質組合，人類骨髓間質幹細胞表現 α -actin 的程度與未拉伸組是沒有差別的。經 72 小時拉伸後，大部份的組別可以看到明顯表現較多的 α -actin，由此可知人類

骨髓間質幹細胞在機械性拉伸下須要大於 24 小時才能看到其往平滑肌細胞方向分化 (表現較多的 α -actin)。在接受 72 小時機械性拉伸的人類骨髓間質幹細胞，在不同細胞外蛋白基質組合之間 α -actin 的表現與平滑肌細胞的結果一樣是沒有差異的。但是

若將所有含 collagen I 的細胞外蛋白基質組合挑出來看 (圖十)，含有不同蛋白質種類越多的，其表現 α -actin 的比例有越高的趨勢，含有全部四種蛋白質的組



別高於三種, 三種大於二種, 而只有一種 collagen I 的組別則最小。由此推論細胞外蛋白基質組合越呈多樣性, 似乎能促成人類骨髓間質幹細胞在機械性拉伸下分化成平滑肌細胞。推次其可能的解釋是細胞對不同的細胞外蛋白基質組合有不同的受體, 透過這些受體, 細胞才能感受到外在的機械性拉伸, 多樣性的細胞外蛋白基質組合可能加強機械性拉伸對細胞的影響, 促進其分化。

建議事項

個人於台北榮總整形外科除從事病患診療及手術的臨床工作外, 也以在職進修的方式攻讀醫學工程方面的博士學位, 希望將來能獨立進行基礎科學方面的研究。此次出國進修主要是延續先前的研究, 同時學習不同實驗室新的研究方法, 截長補短並充實自己在基礎科學研究能力。個人覺得在國內要同時兼顧臨床工作及基礎研究, 因時間分散, 難免會有無法兼顧的情形, 原則上還是以臨床工作為主, 不可因為在職進修而影響病患照顧的品質。如此難免造成博士班研究的影響。出國進修期間因為能專心致力於實驗的進行及資料的分析, 對研究的進展有很大的幫助。就進修期間的長短方面, 基礎研究所需的時間一般較長, 尤其是在國外實驗室學習新的實驗方法, 往往費時較久, 一年的時間往往並不足夠。就個人的情況來說, 一年的時間全部用於熟悉實驗的方法及解決技術性的問題, 所以後來報准延長進修三個月, 而這最後三個月期間, 因所有技術性問題已經解決, 故非常有效率的收集了很多實驗的數據。個人建議, 出國進修從事基礎研究, 似乎已規畫一年半至二年較為理想, 如此才能獲得最高的成本效益。

附錄

參考文獻:

1. Principals of neovascularization for tissue engineering. Nomi M., Alala A., Coppi PD., and Soker S. *Molecular aspects of medicine* 23: 463-483, 2002.
2. In vitro models of vasculaogenesis and angiogenesis. Vailhe B., Vittet D., and Feige JJ. *Laboratory investigation* 81(4): 439-452, April 2001.
3. In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. Black AF., Berthod F>, L'heureux N., Germain L., and Auger FA. *The FASEB journal* 12: 1331-1340, October 1998.
4. In vitro model of a vascular stroma for the engineering of vascularized tissues. Frerich B., Lindemann N., Kurtz-Hoffmann J., and Oertel K. *International Journal of oral & maxillofacial surgery*. 30: 414-420, 2001.
5. Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging. Jyoti K. Jaiswal and Sanford M. Simon. *TRENDS in Cell Biology*. 14: 497-504, 2004.
6. Angiogenesis: now and then. Costa C., Soares R., and Schmitt F. *APMIS* 112: 402-12, 2004.
7. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. Jeffrey M. Isner and Takayuki Asahara. *The Journal of Clinical Investigation* 103: 1231-1236, 1999.
8. Angiogenesis Assays: A Critical Overview. Auerbach R., Lewis R., Shinnars B., Kubai L., and Akhtar N. *Clinical Chemistry* 49: 32-40, 2003.
9. In vivo formation of complex microvessels lined by human endothelial cells in an immunodeficient mouse. Jeffrey S. Schechner, Anjali K. Nath, Lian Zheng, Martin S. Kluger, Christopher C. W. Hughes, M. Rocio Sierra-Honigmann, Marc I. Lorber, George Tellides, Michael Kashgarian, Alfred L. M. Bothwell, and Jordan S. Pober.

- PNAS 97: 9191-9196, 2000.
10. Creation of long-lasting blood vessels. Naoto Koike, Dai Fukumura, Oliver Gralla, Patrick Au, Jeffrey S. Schechner, and Rakesh K. Jain. *Nature* 428: 138-139, 2004.
 11. Free Flap Transplantation in Mice. Brian C. Cooley, and Roger Daley. *MICROSURGERY* 18: 320–323, 1998.
 12. Rat models of skin wound healing: A review. Wanda A. Dorsett-Martin, DVM. *WOUND REP REG* 12: 591–599, 2004.
 13. Flam CJ, Teng D, Chien S, and Bhatia SN. Combinatorial Signaling Microenvironments for Studying Stem Cell Fate. *STEM CELLS AND DEVELOPMENT* 17: 29–39 (2008)
 14. Flam CJ, Chien S, and Bhatia SN. An Extracellular Matrix Microarray for Probing Cellular Differentiation. *Nature Method* 2:119 – 125 (2005)
 15. Kaunas R, Nguyen P, Usami S, and Chien S. Cooperative effects of Rho and mechanical stretch on stress fiber organization. *PNAS* 102: 15895–15900 (2005)
 16. Haga JH, Li YS, and Chien S. Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells. *Journal of Biomechanics* 40: 947–960 (2007)
 17. HAMILTON DW, MAUL TM, and VORP DA. Characterization of the Response of Bone Marrow-Derived Progenitor Cells to Cyclic Strain: Implications for Vascular Tissue-Engineering Applications. *TISSUE ENGINEERING* 10: 361 – 369 (2004)
 18. Park JS, Chu J, Cheng C, Chen F, Chen D, and Li S. Differential Effects of Equiaxial and Uniaxial Strain on Mesenchymal Stem Cells *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 88: 359 - 368 (2004)
 19. Efimenko K, Wallace WE, and Genzer J. Surface Modification of Sylgard-184 Poly(dimethyl siloxane) Networks by Ultraviolet and Ultraviolet/Ozone Treatment. *Journal of Colloid and Interface Science* 254, 306–315 (2002)
 20. Boudreau J, and Jones P. Extracellular matrix and integrin signalling: The shape of

- things to come. *Biochem J* 339: 481 - 488 (1999)
21. Minguell J, Erices A, and Conget P. Mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, 226: 507 - 520 (2001)
 22. Tuan R, Boland G, and Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research and Therapy*. 5: 32 – 45 (2002)
 23. McFarland C, Thomas C, DeFilippis C, Steele J, and Healy K. Protein adsorption and cell attachment to patterned surfaces. *J Biomed Mater Res*. 49: 200 – 210 (2000)
 24. Benjamin M, and Hillen B. Mechanical influences on cells, tissues and organs - 'Mechanical Morphogenesis'. *Eur J Morphol* 41: 3 – 7 (2003)