

# 表現綠色螢光之雞 誘導多能性幹細胞株

◎生理組／劉振發、陳立人

## 前言

綠色螢光蛋白質 (green fluorescent protein, GFP) 已廣泛應用於幹細胞研究，例如 (1) 當作基因表現的報導基因；(2) 追蹤動物胚胎發育時的細胞遷徙；(3) 活體動物之細胞移植定位等多項研究，增加幹細胞科技研發之應用與實用性。

由於人類的胚胎幹細胞之取得來源仍有道德倫理上的爭議，因此幹細胞研究專家希望能找到其它的取代方式。2006年日本京都大學的Yamanaka與研究團隊發表透過送入特定的基因 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) 進入成體的纖維母細胞，可誘導細胞進行重整 (Reprogramming)，變成具有類似胚胎幹細胞的特性及功能，一般簡稱為誘導多能性幹細胞或 iPS (Induced pluripotent stem cells)，iPS 的成功誕生對再生醫學或生物技術產業將造成深遠的影響。

家禽是一種很好的動物模式，也常被使用在發育生物學與疾病之研究。然而，家禽不像老鼠已經建立具有分化多能性之幹細胞株，提供研究人員進行哺乳動物的生物學和醫學等相關研究使用。因家禽幹細胞的相關研究並不多，所以能提供做為研究使用的家禽細胞株非常欠缺。Lu等人於2012年的報告指出，利用哺乳動物的特定的基因 (Oct3/4,

Sox2, Klf4, c-Myc) 轉殖到鵪鶉的胚胎纖維母細胞 (Quail embryonic fibroblasts, QEFs)，成功誘導胚胎纖維母細胞進行重新編程改造變成具有類似胚胎幹細胞的特性及功能，並且誘導後的細胞移植到雞的胚胎，也證實誘導後的細胞能順利移行，形成嵌合體，這是第一例禽類利用哺乳動物基因進行產製誘導多能性幹細胞的研究。

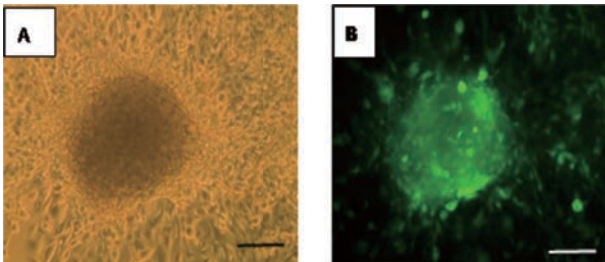
## 家禽誘導多能性幹細胞株的建立

本所利用上述之哺乳動物基因 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) 轉殖到烏骨雞的胚胎纖維母細胞，已成功建立國內第一株「雞誘導多能性幹細胞株 (chicken-induced pluripotent stem cells, ciPSC)」。後續為了增加在研究上的應用性，將GFP轉染到此細胞株 (ciPSC)；並對轉染後細胞的螢光表現、分化多能性、胚體形成效率與分化潛力等特性進行確認。試驗結果顯示，將GFP轉染雞誘導多能性幹細胞後，約 24~36 小時可觀察到綠色螢光表現。轉染後表現GFP的雞誘導多能性幹細胞 (ciPSC/GFP+) 體外培養已超過 25代 (200天)，且持續穩定表現綠色螢光 (圖1)。經分化多能性特異性抗體 Oct-4、AP染色後均呈現陽性反應 (圖2)。使用懸浮小滴培養技術培養誘發時，具有高效率的類胚體

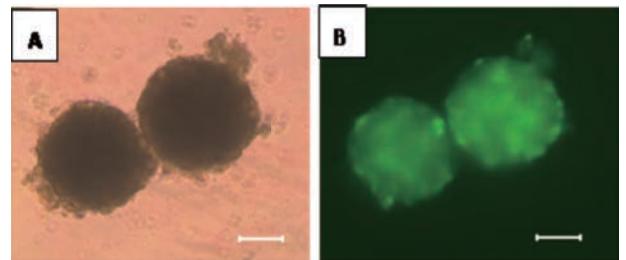
(embryoid body) 形成率 (圖3)。此外，將 ciPSC/GFP+ 細胞移植於非肥胖糖尿病型重症聯合免疫缺陷型 (nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency, NOD-SCID) 小鼠，可誘發形成畸胎瘤 (teratoma)，並表現綠色螢光 (圖4)。

### 結語

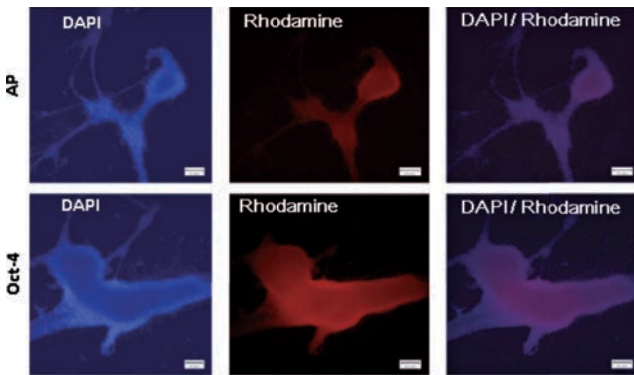
依據上述螢光表現、分化多能性、胚體形成效率與分化潛力等特性測試結果，顯示經綠色螢光蛋白質轉染後的雞誘導多能性幹細胞仍具有分化多能性與分化潛能且能夠持續穩定表現綠色螢光，已成功建立的 ciPSC/GFP+ 細胞，可應用於生物醫學領域研究。



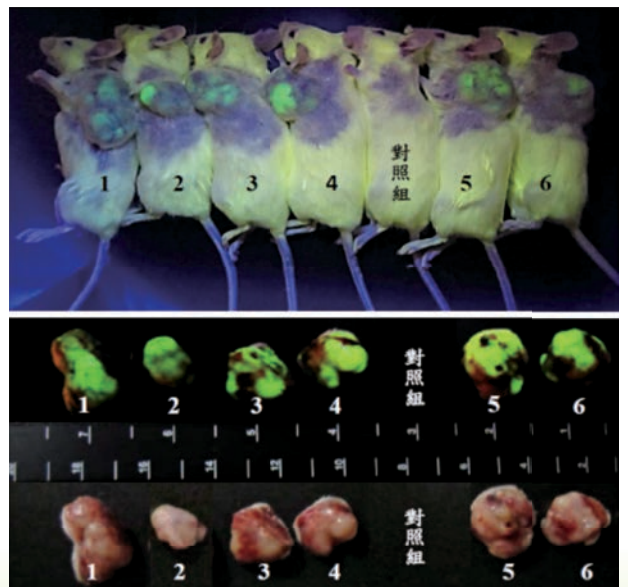
▲圖1. 經選殖後目前已繼代25代以上，細胞均可持續穩定表現綠色螢光  
A:可見光。B:螢光。Scale bar = 100  $\mu$ m



▲圖3. 利用懸浮培養可誘發 ciPSC/GFP+ 形成類胚體。  
A:可見光。B:螢光。Scale bar = 100  $\mu$ m



▲圖2. 利用 AP 及 Oct-4 抗體對 ciPSC/GFP+ 進行免疫組織化學染色  
Scale bar = 50  $\mu$ m



▲圖4. ciPSC/GFP+ 細胞移植注射於 NOD-SCID 小鼠可誘發畸胎瘤形成並表現綠色螢光