



中 國 醫 藥 大 學

基礎醫學研究所

碩士學位論文

n-Butylidenephthalide (BP)透過活化 Jak2-Stat3 訊息
傳遞途徑維持幹細胞的多能性

n-Butylidenephthalide (BP) maintained the pluripotency
of stem cells by activating Jak2-Stat3 signaling
pathway

指導教授：劉詩平 教授

研究生：簡澄琿

中 華 民 國 一〇〇年七月

中文摘要

誘導型多能幹細胞(Induced pluripotent stem cells, 簡稱 iPS cells)是藉由病毒系統轉染 4 個轉錄因子(Oct4, Sox2, c-Myc 和 Klf4)進入體細胞所產生。雖然目前有許多產生 iPS cells 的方法,但效率低仍然是一個很大的障礙需要克服。此外,iPS 與胚胎幹細胞(embryonic stem cells, 簡稱 ES cells)一樣需要白血球增生抑制因子(Leukemia inhibitory factor, 簡稱 LIF)來維持幹細胞的多能性,但 LIF 價格昂貴。本篇論文期望可以找到一個從中草藥萃取出純化合物用來維持 ES 和 iPS cells 的多能性以取代 LIF,同時也可以增加 iPS cells 生成的效率。我們發現當小鼠纖維母細胞經過從當歸(Angelica sinensis)萃取的 n-Butylidenephthalide (BP) 10 μ g/ml 處理後,可以增加 Oct4 和 Sox2 的基因表現量;也發現當 BP 濃度提高(20 μ g/ml 和 40 μ g/ml)時,反而作用降低。我們利用 3-[4,5-dimethylthiazolium-2-yl]-2,4-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay)來測試這些濃度是否會造成細胞凋亡,而數據顯示超過 80 μ g/ml BP 才會造成細胞凋亡。我們也使用不同濃度的 BP (於培養液中取代 LIF),測試 BP 是否可以有效的維持 ES 及 iPS cells 的多能性。經過幹細胞標記(stem cell markers)的測定之後,鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase)、SSEA1 和 Nanog 的表現量在 BP 給予的實驗組高於不加 LIF 的控制組;利用 embryoid body 的形成和分化來確認 BP 可以使 ES cells 維持其多能性。證實 BP 可以有效的維持 ES 及 iPS cells 的多能性。此外,我們使用 microarray

analysis 來找尋 BP 主要調控的訊息途徑。結果顯示，受 BP 調控的前三名訊息途徑分別為：PPAR, ECM 和 Jak-Stat pathway。我們偵測到經 BP 處理過後，phospholation-Jak2 和 phospholation-Stat3 蛋白質的表現量都有增加，與 Jak2-Stat3 pathway 相關的細胞激素(Cytokines)基因表現量也有增加的現象。最後，我們使用 pou5f1-GFP MEF cells 來測試經由 BP 處理後 iPS cells 生成的效率。數據顯示，BP 處理後顯著增加產生 GFP positive clones 的效率。總結來說，我們的數據顯示，BP 藉由誘導細胞激素表現，活化 Jak2-Stat3 pathway 維持 iPS cells 的多能性。此外，BP 還可以提高 iPS cells 生成的效率。



Abstract

The first induced pluripotent stem (iPS) cells were generated in 2006 from somatic cells by introducing Oct4, Sox2, c-Myc and Klf4. The original process was inefficient, and maintaining the pluripotency of embryonic stem (ES) and iPS cell cultures required leukemia induced factor (LIF) as an expensive reagent. Our goal is to find a pure compound that not only maintains ES and iPS cell pluripotency, but also increases iPS cell generation efficiency. From 15 candidate compounds we determined that 10 $\mu\text{g/ml}$ n-Butylidenephthalide (BP), an *Angelica sinensis* extract, triggers up-regulation of Oct4 and Sox2 gene expression levels in MEF cells. We used ES and iPS cells treated with different concentrations of BP to test its usefulness for maintaining stem cell pluripotency. Results indicate higher expression levels of several stem cell markers in BP-treated ES and iPS cells compared to controls that did not contain LIF including alkaline phosphatase, SSEA1, and Nanog. Embryoid body formation and differentiation results confirm that BP containing medium culture is capable of maintaining ES cell pluripotency. Microarray analysis data identified PPAR, ECM and Jak-Stat signaling as the top three deregulated pathways. We subsequently determined that phospholation-Jak2 and phospholation-Stat3 protein levels increased following BP treatment, and that cytokines associated with the Jak2-Stat3 pathway were up-regulated. Last, we used pou5f1-GFP MEF

cells to test iPS generation efficiency following BP treatment. Our data demonstrate the ability of BP to maintain stem cell pluripotency via the Jak2-Stat3 pathway by inducing cytokine expression levels, at the same time improving iPS generation efficiency.



致謝

鳳凰花開的季節，暗示著碩士班兩年的生活已接近尾聲，也代表我的學生生涯即將畫上句點，兩年來的實驗室生活有如三溫暖般，經歷過低潮、挫折、興奮期待還有漫長的等待，終究順利到達終點。在這一路上，非常感謝許多的人幫助與提點，使我在學術知識和個人發展上獲得豐富的充實與成長。最讓我感謝的人，當然是我的指導教授劉詩平老師，兩年來的指導、督促和包容，我才可以順利通過這重重的考驗。感謝曾經幫助及教導過我的老師們，您的提點是我在自我培育過程中的一盞明燈。感謝實驗室的所有助理學姐們，在實驗上適時的提點與幫助。感謝實驗室的夥伴們，大家不僅在實驗課業上互相討論、互相切磋，在日常生活中也累積了我一年多來許多的歡笑與感動。感謝我最親愛的室友，這些年來的陪伴，陪我分享歡樂，聽我發牢騷。相當感謝舅舅與舅媽這兩年來的照顧。最後，當然是要感謝我最親愛的家人，謝謝爸媽全力的支持與苦心的栽培，還有哥哥們的包容，希望我的努力能讓您們感到驕傲與欣慰。

目錄

中文摘要	II
Abstract	IV
第一章 前言	1
1.1 研究背景	1
1.1.1 iPS cells 的重要性	1
1.1.2 Leukemia Inhibitory Factor (LIF) 和 Jak2-Stat3 signaling pathway	2
1.1.3 n-Butylidenephthalide (BP) 相關生物活性之研究	4
1.2 研究目的	4
第二章 材料與方法	6
2.1 細胞培養	6
2.1.1 老鼠胚胎纖維母細胞 (Mouse Embryonic Fibroblasts)	6
2.1.2 iPS 和 mES cells	6
2.2 細胞存活測試 (MTT Assay)	7
2.3 RNA 的萃取及 cDNA 的製備	8
2.4 即時聚合酶連鎖反應 (Real-time Polymerase Chain Reaction)	8
2.5 鹼性磷酸酶染色 (Alkaline Phosphatase Staining)	9
2.6 免疫螢光染色 (Immunofluorescence stain)	10
2.7 胚胎球的形成和分化 (Embryoid body (EB) formation and differentiation)	10
2.8 細胞溶解物的製備	11
2.9 硫酸十二酯鈉—聚丙烯醯胺凝膠體電泳 (SDS-PAGE)	12
2.10 西方墨點法 (Western Blotting Analysis)	13

2.11 DNA 微陣列分析(DNA Microarray Analysis)	14
2.12 iPS cells 生成效率的測定	15
2.13 統計分析.....	15
第三章 研究結果	16
3.1 中草藥的篩選	16
3.2 BP 對 MEF cells 生長的影响	16
3.3 BP 對 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 基因表現量的影响	16
3.4 BP 對 ES 和 iPS cells 維持自我更新能力的影响	17
3.5 BP 對 MEF cells 分子訊息傳遞途徑的影响	19
3.6 BP 對 Jak2 和 Stat3 基因表現之影响	20
3.7 BP 對 Jak2 和 Stat3 蛋白質表現之影响	20
3.8 BP 對 cytokine 的基因表現之影响	20
3.9 BP 對 iPS cells 生成之影响	21
第四章 討論.....	22
參考文獻	27
圖表.....	32

第一章 前言

1.1 研究背景

1.1.1 iPS cells 的重要性

胚胎幹細胞(Embryonic stem cells, 簡稱 ES cells), 來自於哺乳動物囊胚內的內胚層細胞, 具有無限生長能力並且可以分化為任何三胚層中的細胞(1-3)。由於胚胎幹細胞同時具有自我更新和分化成多種細胞類型的能力, 對於臨床的細胞療法, 擁有巨大的潛力(4)。因此, 人們期待胚胎幹細胞可以用於了解未知的病理機轉, 新藥開發中篩選有效性和安全性的指標, 以及治療和控制各種疾病(3, 5), 例如: 骨髓移植[hematopoietic stem cells (HSCs)]應用於白血病、血友病和貧血; 間質幹細胞[Mesenchymal stem cells (MSCs)]應用於缺血或損傷和進行有效的血管再生, 修復受損區域(6)。在以前的研究中, 胚胎幹細胞可以分化成多巴胺神經元進行細胞治療(7)。但是, 胚胎幹細胞用於細胞治療有兩個大問題: 一方面必需面臨倫理道德爭議的問題, 另一方面則是患者移植後產生免疫排斥的問題, 導致胚胎幹細胞的應用受到阻礙。

誘導型多能幹細胞(Induced pluripotent stem cells, 簡稱 iPS cells) 是研究幹細胞治療相當重要的新穎領域。iPS cells 是將 Oct4, Sox2, c-Myc 和 Klf4 這四個基因轉染進入老鼠或人類的纖維母細胞所生成(3, 8)。iPS 與 ES cells 的特性非常相似, 不僅是增殖能力、細胞型態、基因表現、細胞表面抗原、

端粒酶活性，還有基因上調控甲基化的 AP genetic site 都相當一致。iPS cells 具有的多能性對於組織修復和更換是一項令人興奮的潛力(9)。更重要的是，iPS cells 不僅可以避開道德的問題，也可以避開免疫排斥。但是，現階段 iPS cells 的應用面臨最大難題是 iPS cells 的產生效率非常低，增加應用在病人身上的困難(10)。目前，iPS cells 的研究宗旨是要找到一個簡單而且安全的方法可以高效率的產生 iPS cells，使 iPS cells 的應用更加廣泛。

1.1.2 Leukemia Inhibitory Factor (LIF) 和 Jak2-Stat3 signaling pathway

雖然來自不同動物的胚胎幹細胞特性和維持會有所不同，老鼠的胚胎幹細胞培養時，需要透過白血球增生抑制因子(Leukemia inhibitory factor，簡稱 LIF)來維持胚胎幹細胞的自我更新能力(11-13)。LIF 是屬於 IL-6 家族的一員，它可以誘導老鼠胚胎幹細胞生長，並且抑制老鼠胚胎幹細胞分化(14-16)。LIF 則是透過與 LIF receptor 和 gp130 [IL-6 家族的共同受體(IL-6, IL-11, CNTF, OSM 和 LIF)] (17-21)複合物結合，活化 Janus kinase (Jak)和 signal transducer and activator of transcription (Stat)，而使胚胎幹細胞可以維持自我更新能力和多能性（圖一）(22-24)。

Jak (Janus Kinases)的家族成員包含 Jak1、Jak2、Jak3、TYK2 (Tyrosine Kinase 2)，它們位於細胞膜內側並附著於受器上，皆屬於非受器蛋白激酶 (nonreceptor protein kinases)，分子量介於 120~135 KDa 之間；Jaks 含七個激酶區域(JH domains 1~7)，但只有 C 端的 JH1 domain 具備催化活性，而 N

端之 JH6 domain 和 JH7 domain 與受器之間皆有交互作用(25)。

在 Jak 的家族成員中，Jak2 於本篇論文裡扮演一個重要的角色；Jak2 是參與於 cytokine receptor signaling 中酪胺酸激酶家族的一員，藉由 IL-6 家族的 cytokines 透過 gp130 或其他高表現的 LIFR β 來共同活化 Jak2 (26-29)，進而使 Stat3 活化，維持幹細胞的自我更新能力和多能性。

Stats (signal transducer and activator of transcription) 透過 Jak2 居中介導使其酪胺酸殘基被磷酸化，形成二聚體活化，並轉運到細胞核內以誘導特異性的基因組(30, 31)。在哺乳類動物中，Stats 至目前為止已有七個家族成員被確認出來，分別是 Stat1、Stat2、Stat3、Stat4、Stat5a、Stat5b、Stat6，其分子量介於 75~95 KDa 之間；而 Stats 具有四個共同保留區域，包含了 SH2 domain、Linker domain、DNA binding domain、Coiled-coil domain，這四個區域維持了 Stats 的基本結構和功能，至於其 C 端的 TAD (transcriptional activation domain) 則具有啟動基因轉錄之功能(32, 33)。

在 Stats 的七個家族成員中，Stat3 是 gp130 訊息傳遞的最主要調節者(31, 34-37)，參與了誘導肝細胞急性期反應(38)、胚胎幹細胞的轉錄活化和自我更新(39, 40)、透過 LIF 和 IL-6 依賴反應使 M1 cells 分化(41-43)、以及體內各式各樣的反應(44-46)。

先前的研究顯示，Jak/Stat 訊息傳遞途徑幾乎參與了所有細胞內的生物效應，因此更加突顯出 Jak/Stat 訊息傳遞途徑的重要性。

1.1.3 n-Butylidenephthalide (BP) 相關生物活性之研究

Angelica sinensis 為繖形科植物屬於多年生草本植物，是我們一般俗稱的當歸，當歸根部可入藥，是最常用的中藥之一。當歸在傳統中草藥裡可當作一般補品，在臨床中可用於補血活血、調經止痛，潤腸通便 (47)；在美國也應用於臨床上幾個婦科症狀 (48)。目前，已從當歸根部分離得到六種化合物：(E)-ligustilide, (Z)-ligustilide, (Z)-n-butylidenephthalide, palmitic acid, beta-sitosterol 和 ferulic acid (47)，其中 n-Butylidenephthalide (圖二)為最主要組成成分(超過 30%)。

在以前的研究中，發現 BP 有顯著的抗腫瘤作用，不論在體內或體外皆已證實 BP 可以導致惡性腫瘤生長停滯，並且透過 p53-dependent 和 -independent 的訊息途徑進行毒殺機制使腫瘤細胞凋亡(49, 50)。

BP 有幾種藥用的特性，例如：透過抑制 cyclo-oxygenase 達到抗血小板的作用(51)；減緩心絞痛的症狀(52, 53)。此外，將 BP 的結構加上 hydroxyl molecules，發現它可用於動脈粥狀硬化治療上(54)。這些發現指出，在臨床應用中 BP 是一個充滿希望並且具有潛力的新抗癌化合物。然而，BP 的作用對於活化幹細胞仍是未知。

1.2 研究目的

本篇論文的研究目的希望可以找出從中草藥中萃取出來的一種純化合物，用來維持 ES cells 和 iPS cells 的多能性和自我更新能力，進一步取代

LIF，並且提高產生 iPS cells 的效率。因此，本篇論文進行一系列的實驗，證實從 *Angelica sinensis* 根部萃取出來的純化合物 BP，可以透過活化 Jak2/Stat3 訊息傳遞途徑，來維持 ES cells 和 iPS cells 的多能性和自我更新能力，並且證實給予 BP 可以增加產生 iPS cells 的效率。



第二章 材料與方法

2.1 細胞培養

2.1.1 老鼠胚胎纖維母細胞 (Mouse Embryonic Fibroblasts)

Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF)是取自於 C57BL/6 品系 13.5 天的胎鼠。將 MEF 培養於含有 10% FBS, 1% penicillin-Streptomycin (Invitrogen), 1% NEAA (Invitrogen), 以及 1% L-glutamine 的 DMEM (Invitrogen) 培養液中, 並放置在 37°C、5% CO₂ 之培養箱內生長, 每兩天換一次培養液。當細胞培養至 7~8 分滿時, 利用 PBS (每公升含 NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 1.44g, KH₂PO₄ 0.24g, 以 5N NaOH 調整 pH 值至 7.4) 沖洗培養皿底部一次後, 加入 trypsin-EDTA 放置 37°C 培養箱中作用 5 分鐘, 以等量培養液中和 trypsin 的作用, 再將含有細胞的培養基移至無菌離心管。離心 (1000rpm, 5 分鐘) 後, 移除上清液, 加入新鮮的培養液, 將細胞均勻打散, 再以 1:3~1:4 的比例將細胞培養至新的培養皿中。

2.1.2 iPS 和 mES cells

於 6 well 的培養皿中, 每個 well 分別加入 1mL 0.2% Gelactin (Sigma), 並放置於 37°C、5% CO₂ 之培養箱內培養 30 分鐘後, 移除 0.2% Gelactin, 每個 well 分別加入 2mL 回溫的 DMEM 培養液, 再將 Feeder cells (1×10^6) 解凍於此培養皿中, 移至 37°C、5% CO₂ 之培養箱內培養 over night。移除 DMEM 培養液, 加入回溫的 stem cell 培養液 [42.5mL 1% L-glutamine 的

DMEM (Invitrogen) + 7.5mL Hyclon FBS (Thermo) + 0.5mL NEAA (Invitrogen) + 91 μ l β -mercaptoethanol (Invitrogen) + 5 μ l leukemia inhibitory factor (Millipore)]，放至 37°C、5% CO₂ 之培養箱內培養 1 小時，再將 stem cells 培養於含有 feeder cells 之培養皿內，並放置在 37°C、5 % CO₂ 之培養箱內生長，於兩天後換第一次培養液之後需每天更換培養液，以確保細胞生長所需之養分充足。

2.2 細胞存活測試 (MTT Assay)

3- (4,5-dimethyl-thiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Sigma) 簡稱 MTT，為黃色水溶性的 tetrazolium salt，tetrazolium bromide 經由活細胞粒線體中之琥珀酸去氫酶 (mitochondrial succinate dehydrogenases) 代謝還原產生不溶於水的紫色沉澱物 formazan，加入 Isopropanol 將之溶解。只有活細胞內之粒線體才存在具有活性的琥珀酸去氫酶，因此可作為細胞經藥物處理後存活率的指標。實驗步驟：繼代培養後的細胞，經過細胞計數，依每個 well 5×10^3 的起始細胞數目培養於 96-well 的 culture plate 中，24 小時後移除原培養液，加入含有已知不同濃度 N-Butylidenephthalide (BP) 的新鮮培養液，經過不同時間點培養後，於每個 well 中分別加入 10 μ l 的 MTT 溶液(0.5mg/mL)，放置在 37 °C、5% CO₂ 之培養箱內作用 2~4 小時後，移除全部培養液，再每個 well 分別加入 100 μ l 的 Isopropanol，以 570nm 測定其吸光值。將加有藥物溶劑 (DMSO) 的組別作為對照組，並以實驗組之吸光值個別除以對照組之吸光值，作圖計算出細胞相對存活率。

2.3 RNA 的萃取及 cDNA 的製備

細胞培養至 7~8 分滿時，移除培養液，加入 1mL TRIzol (Invitrogen)，室溫培養 5 分鐘，利用刮杓將細胞全部刮下，再將含有細胞的 TRIzol 移至 1.5mL tube 中，充分將細胞打破後，於 tube 中加入 0.2mL Chloroform，上下搖晃 15 秒，室溫培養 2~3 分鐘，離心 (12000g, 15 分鐘, 4°C) 後，將上清液移至另一新的 1.5mL tube 中，再加入 0.5mL Isopropyl-alcohol，充分混合後，室溫培養 10 分鐘，離心 (12000g, 10 分鐘, 4°C) 後，移除上清液，再加入 1mL 75% ethanol-DEPC · H₂O 沖洗 RNA。離心 (7500g, 5 分鐘, 4°C) 後，移除上清液，再利用真空機將 RNA 完全乾燥後，加入 0.01mL ~ 0.02mL DEPC · H₂O 將 RNA 充分回溶，儲存於-80°C 冰箱。將抽出的 RNA 於 260nm 下測 OD 值 (假設 OD 值=1 時, RNA = 40 ng/μl)，再每管各取 2 μg 的 RNA 並加入 RNA free water 使體積達 10μl，再各加入 2μl (100ng/μl) oligo (dT) 和 1μl (10mM) dNTP 並且置於 65°C 反應 5 分鐘後快速置於冰上並 spin down，再各加入 6.5μl 的反應溶液 [4μl 5X Buffer、1μl 0.1 M DTT、1μl RNase out、0.5μl SSIII (Invitrogen)] 且置於 50°C 反應 30~60 分鐘後，再置於 75°C 反應 15 分鐘後，spin down 並儲存於-80°C 冰箱。

2.4 即時聚合酶連鎖反應 (Real-time Polymerase Chain Reaction)

我們利用 real-time PCR 來偵測 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4, Jak2, Stat3, LIF, EGF, IL5, IL11, EPO 和 OSM 這些基因的表現量。實驗步驟：取 4μl 稀釋過

的 cDNA 分別加入至 96-well 反應盤中，接著分別加入 6 μ l 反應溶液 [0.5 μ l 6 μ M Forward Primer (表一) + 0.5 μ l 6 μ M Reverse Primer (表一) + 5 μ l SYBR Green PCR Master mix (Roche)]，經均勻混合及 spin down 後放入 StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) 的儀器中經 95 $^{\circ}$ C 10 分鐘，再進行 40 個循環期：95 $^{\circ}$ C 15 秒，60 $^{\circ}$ C 60 秒。結束後，預測的 cycle threshold (CT)值直接利用 EXCEL 工作表來進行分析。

2.5 鹼性磷酸酶染色 (Alkaline Phosphatase Staining)

將 iPS cells 或 ES cells 培養於 6-well 的 culture plate 中，經 48 小時後移除原培養液，加入含有已知不同濃度 N-Butylidenephthalide (BP) 的新鮮培養液，經過不同時間點培養後，將培養液移除，再加入 PBS 浸潤清洗細胞後移除，重複清洗 2 次。當移除培養盤內 PBS 後，分別將 1mL 80% ethanol 加入培養盤內，並放置於 4 $^{\circ}$ C 固定 2~24 小時。接著將培養盤內 80% ethanol 移除，並以 Distilled Water 浸潤清洗細胞後移除，再加入 Distilled Water，於室溫浸泡 2~3 分鐘後移除，再以 100mM Tris-HCl buffer (pH 8.2~8.5) 於室溫中浸泡 5 分鐘後移除後，使用 Leukocyte Alkaline Phosphatase kit (Vector) 染色約 20~30 分鐘，移除 Alkaline Phosphatase Substrate working solution，以 100mM Tris-HCl buffer (pH 8.2~8.5) 浸潤清洗後，觀察拍照。當未分化的胚胎幹細胞具有高量 alkaline phosphatase 之活性會呈現紅色反應，已分化的胚胎幹細胞則 alkaline phosphatase 活性低，紅色反應弱甚至無色。

2.6 免疫螢光染色 (Immunofluorescence stain)

將 iPS cells 或 ES cells 培養於 24-well 的 culture plate 中，經 48 小時後移除原培養液，加入含有已知不同濃度 BP 的新鮮培養液，經過不同時間點培養後，將培養液移除，再加入 PBS 浸潤清洗細胞後移除，接著加入 4% paraformaldehyde 於室溫下固定 10 分鐘後，移除 4% paraformaldehyde，利用 0.1% Tween-20 / 1X PBS 浸潤清洗 3 次，每次 10 分鐘，再加入 0.3% Triton-X 100 / 1X PBS 於室溫下作用 30 分鐘將細胞膜打洞以利染劑進入。再利用 0.1% Tween-20 / 1X PBS 浸潤清洗 3 次後，加入 5% FBS / 1X PBS 於室溫下進行 blocking 2 小時，進而與 1:100 稀釋後的一次抗體[Nanog (Novus)、SSEA1 (Millipore)]在室溫下作用 over night。利用 0.1% Tween-20 / 1X PBS 浸潤清洗 5 分鐘後，加入 1:500 稀釋的二次抗體在室溫下避光反應 1 小時後，再以 0.1% Tween-20 / 1X PBS 清洗 10 分鐘，經含有 DAPI 染劑的 UltraCruz™ Mounting Medium 封片後，即可利用倒立螢光顯微鏡觀察。

2.7 胚胎球的形成和分化 (Embryoid body (EB) formation and differentiation)

將 ES cells 利用含有 BP 的培養液培養三代之後，用 EB formation medium [DMEM (GIBCO BRL) 添加 20% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO BRL), 1mM β -mercaptoethan (GIBCO BRL), 1% L-glutamin (GIBCO BRL), 1% insulin-transferin-selenium-Gsupplement (ITSG)(GIBCO BRL), 1% non-essential amino acids (NEAA) (GIBCO BRL)] 培養至 Ultra Low Cluster

Plate (Costar)，培養約2~3天後，ES cells便可以形成EB。再將 EB用 differentiation medium [DMEM添加20% fetal bovine serum (FBS)(GIBCO BRL), 1% L-glutamine (GIBCO BRL), 1% non-essential amino acids (NEAA)(GIBCO BRL), 1% penicillin and streptomycin (p/s)(GIBCO BRL), 1mM β -mercaptoethanol (GIBCO BRL)]培養至事先已coating Gelactin的 24-well中，每個well約培養5~6顆的EB，培養約3天，使EB可以分化成三個胚層的細胞。

2.8 細胞溶解物的製備

細胞經藥物處理後先移除舊的培養液，以 1X PBS 清洗培養盤 2 次，將盤內殘餘液體吸除乾淨。加入 1ml 的 PBS，並利用刮杓將細胞刮落，再將細胞懸浮液從培養盤中移至 1.5ml 微量離心管。離心 (1000rpm，10 分鐘)，確實移除上清液後，加入 500 μ l 細胞溶解緩衝液 (cell lysis buffer) [50mM Tris-HCl (pH 7.5)，1mM EDTA，0.5M NaCl，1mM beta-Mercaptoethanol，1% NP40，1% Glycerol，1% Protein Kinase inhibitor] 作用 30 分鐘，每 5 分鐘 Vortex 一次，使細胞溶解液充分混合，再以 4 $^{\circ}$ C 離心(13,000rpm，20 分鐘)。離心後，取上清液至新的 1.5ml 微量離心管。蛋白質濃度的測定則是使用“Bio-Rad Protein Assay”。以 BSA 當標準品，配製不同濃度標準品 (梯度濃度：0、0.25、0.5、0.75、1、1.25 μ g/ μ l)，將稀釋的樣品蛋白質溶液與標準品各取出 10 μ l 置於新的 1.5ml 微量離心管中，並分別加入 490 μ l 的 1 倍 Bio-Rad protein assay 染劑，混合均勻。將上述溶液三重複分別加至 96-well

plate 中，並以波長 595nm 測定其吸光值，並根據吸光值作出標準曲線，以 $R^2 > 0.99$ 的標準曲線才予以計算而測量出蛋白質濃度。根據樣品蛋白質溶液的濃度不同，加入細胞溶解緩衝液及 Laemmli sample buffer [2% SDS, 50mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.2mg/mL Bromphenol Blue, 0.1M DTT, 10% Glycerol, 7.5mL H₂O]，最終配製成每 30 μ l 溶液中含有 40 μ g 蛋白質的 loading sample，再以乾式加熱器，進行加熱，100 $^{\circ}$ C，10 分鐘，將樣品儲存於-80 $^{\circ}$ C 冰箱中備用。

2.9 硫酸十二酯鈉—聚丙烯醯胺凝膠體電泳 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) 進行前先將溶於 sample buffer 的樣品於 100 $^{\circ}$ C 中加熱 3 分鐘。本實驗室所使用的電泳設備為 Bio-Rad System。首先把 glass plate sandwiches 裝置好，其次配製 running gel (8%) 及 5% stacking gel。再將適量的 8% running gel [4mL 1.5M Tris-HCl (pH 8.8), 0.2mL 10% SDS, 4mL 40% acrylamide, 0.2mL 10% ammonium persulfate (APS), 0.012mL TEME, 10.6mL H₂O] 注入凹槽，。注入達適量高度的 running gel 後，在上面輕輕覆上一層二次蒸餾水。待 running gel 凝固後，移除上層水，將 comb 插在 running gel 上方，然後注入適量 5% stacking gel [1.5mL 0.5M Tris-HCl (pH 6.8), 0.06mL 10% SDS, 0.75mL 40% acrylamide, 0.06mL 10% APS, 0.006mL TEMED, 3.6mL H₂O]。當 stacking gel 凝結後，將電泳設備裝好，並移去 comb。加入 running buffer (0.025M Tris, 0.192 M

glycine, 3.5 mM SDS)後即可將 30 μ l 樣品注入孔洞內。在 4 $^{\circ}$ C 進行電泳，而電壓分別為：stacking gel 時固定在 50 伏特；等到樣品跑至 running gel 後固定在 110 伏特，直到樣品達玻璃末端適當位置。

2.10 西方墨點法 (Western Blotting Analysis)

本實驗方法主要是依據“ECL Western Blotting Protocols”。將細胞溶解物所取得的上清液做蛋白質定量分析。接著取樣品進行上述的 SDS-PAGE。取一張與欲轉漬蛋白質膠大小適合的 PVDF membrane (polyvinylidene difluoride membrane)，將其浸泡於 100% methanol 潤濕，以活化 PVDF membrane，再將 PVDF membrane 浸泡於轉漬緩衝液 [25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% (v/v) methanol, pH 8.3] 中，再取 2 張 filter paper 和 2 張 Blotting Pad 浸泡於轉漬緩衝液中。在負極板上放 1 張 Blotting Pad 和 filter paper，再把 gel 放上，之後再放上 PVDF membrane，接著再蓋上 1 張 filter paper 和 Blotting Pad，再蓋上正極板，放入轉漬槽內。在轉漬緩衝液中以固定安培 (400mA) 於 4 $^{\circ}$ C 轉漬 90 分鐘。接著使用 1X PBS/Tween-20 (PBS-T) 緩衝液沖洗 PVDF membrane 約 1 分鐘，再用含 10% 脫脂奶粉(安佳脫脂奶粉)之 PBS-T 緩衝液進行覆蓋反應，將 PVDF membrane 上的非特異性結合位置覆蓋住，此 blocking 步驟於室溫反應 2 個小時或 4 $^{\circ}$ C 隔夜反應。

移除 blocking 緩衝液，以 PBS-T 緩衝液清洗 PVDF membrane 3 次，每次 10 分鐘。之後加入以 PBS-T 1:1000 稀釋之初級抗體(primary antibody)

[phospho-Jak2 (cell signaling)、Jak2 (cell signaling)、phospho-Stat3 (cell signaling)、Stat3 (BD)]，於室溫下使其均勻作用 2 小時(亦可 4°C 隔夜反應)。初級抗體結合後，再以 PBS-T 緩衝液清洗 PVDF membrane 30 分鐘。接著加入 Horseradish Peroxidase 所結合的二級抗體(mouse 1:10000; rabbit 1:5000)，於室溫下作用 1 小時。隨後立即以 PBS-T 緩衝液沖洗 PVDF membrane 1 小時。洗淨的 PVDF membrane 最後加入 ECL 冷光感應劑 (Amershan International, England) 作用 3 分鐘後，以透明投影片蓋在 PVDF membrane 上，並趕走氣泡，將透明投影片覆蓋好的 PVDF membrane 平放於 X 光片卡匣中，並於暗房內壓入高感度底片 (hyperfilm-MP) (Amershan International, Sweden)，以顯影劑和定影劑顯像。底片沖洗後，再以密度分析軟體分析顯影在底片上的 bands 強度，進而了解待測蛋白質的免疫活性表現。

2.11 DNA 微陣列分析(DNA Microarray Analysis)

MEF cells 經由 10 μ g/ml 和 40 μ g/ml 的 BP 處理 24 小時後，萃取出 total RNA，再將其分別標定放射線同位素 (Cy3)。依據製造廠商的 protocol 將樣品與 Agilent Mouse G3 Whole Genome Oligo 8 \times 60K Microarray (Agilent) 進行雜交。Arrays 的掃描是利用 Microarray Scanner System (Agilent)。數據的分析是利用 GeneSpring GX 軟體 (Agilent)。

2.12 iPS cells 生成效率的測定

我們利用取自 Pou5f1-GFP 老鼠(The Jackson Lab)的 MEF cells 來偵測 iPS cells 生成的效率。簡單來說，利用剖腹產將胚胎取出，並且將胚胎的頭、內臟、四肢和尾巴去除乾淨；組織，利用剪刀剪碎，在轉移到含 Trypsin 的試管中消化分解。MEF cells 培養至足夠量時，我們利用共同轉染 pcDNA-Oct4, pcDNA-Sox2, pcDNA-c-Myc 和 pcDNA-Klf4 到 Pou5f1-GFP MEF cells 中，每兩天轉染一次(總共四次)，實驗組在轉染之後給予 20 μ g/ml BP。在第九天將此細胞培養於 feeder cells 上，並持續觀察 GFP 陽性的 clones 和每天更換培養液。在此實驗中 BP 處理分為兩組：一組是持續處理 20 μ g/ml 的 BP (BP(T+P))；另一組則是只有 iPS cells 培養液(BP(T))。

2.13 統計分析

相關數據之間差異則使用 one-way ANOVA 分析檢定。再利用 Tukey HSD 事後檢定法分析，若 $p < 0.05$ 則表示統計上有顯著差異。

第三章 研究結果

3.1 中草藥的篩選

為了找尋可以用來生成 iPS cells 並且維持幹細胞之多能性的中草藥，我們利用 MEF cells 分別經由 18 種不同濃度的中草藥處理 24 小時後，再利用 real-time PCR 偵測 Oct4 和 Sox2 基因表現量。圖三顯示經由牛樟芝、紅茄子、生地黃、蟲草、蜂王漿、BP、雞胚胎幹細胞、牛胎盤素、韭菜籽、紅藻和豬胎盤素等中草藥作用後，可以讓 Oct4 和 Sox2 基因表現量顯著增加，在這些可以讓 Oct4 和 Sox2 基因表現增加的中草藥裡，BP 是唯一的純化物，所以我們優先選擇 BP 做進一步探討。

3.2 BP 對 MEF cells 生長的影响

MEF cells 經由不同濃度的 BP 處理 (5 μ g/ml、10 μ g/ml、20 μ g/ml、40 μ g/ml、80 μ g/ml、160 μ g/ml、320 μ g/ml、640 μ g/ml)，分別在 24 小時、72 小時利用 MTT assay 的方式檢測 BP 對 MEF cells 生長能力的影響。圖四顯示經 BP 處理後，24 小時和 72 小時皆顯示 80 μ g/ml、160 μ g/ml、320 μ g/ml、640 μ g/ml 的處理濃度會影響 MEF cells 存活率下降，因此我們選擇在影響濃度之下的 5 μ g/ml、10 μ g/ml、20 μ g/ml、40 μ g/ml 進行接下來的實驗。

3.3 BP 對 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 基因表現量的影響

為了測試 BP 可以用來生成 iPS cells 並且維持幹細胞的多能性這個假說，我們將 MEF cells 經由 5 μ g/ml、10 μ g/ml、20 μ g/ml、40 μ g/ml 的 BP 處理

作用 24 小時後，偵測 Oct4, Sox2, c-Myc 和 Klf4 基因表現量。圖五顯示 MEF cells 經由 10 μ g/ml 的 BP 處理後，Oct4 和 Sox2 的基因表現量有顯著的增加。我們也發現一個有趣的現象，當 BP 的濃度提高(20 μ g/ml 和 40 μ g/ml) 時，Oct4 和 Sox2 的基因表現量卻沒有隨著濃度增加而上升，反之往下降。儘管此效應在 10 μ g/ml 處理時較高，但 20 μ g/ml 和 40 μ g/ml 處理後 Oct4 和 Sox2 的基因表現量也比溶劑對照組高。此外，c-Myc 和 Klf4 基因表現量與溶劑對照組相比卻沒有顯著的影響。進一步，利用 ES cells 分別處理不同濃度的 BP 作用 72 小時後，偵測 Oct4, Sox2, c-Myc 和 Klf4 基因表現量。圖六顯示 ES cells 經由 BP 作用後，可以讓 Oct4, Sox2, c-Myc 和 Klf4 基因表現明顯增加。

3.4 BP 對 ES 和 iPS cells 維持自我更新能力的影響

當我們觀察到 BP 處理後，會增加 Oct4 和 Sox2 的基因表現量，我們也試著去測試經由 BP 處理 ES 和 iPS cells 後，是否可以維持兩者的自我更新能力和多能性。在一般的 ES 和 iPS cells 培養中，添加 LIF 是用來維持 ES 和 iPS cells 的自我更新能力和多能性。出於這個原因，我們設計了用 BP 替代 LIF 來培養 ES 和 iPS cells，來證實這個假說。AP 染色是使用於偵測 ES 和 iPS cells 多能性的一種幹細胞標記。圖七 A、B 顯示 ES cells 分別經 10 μ g/ml、20 μ g/ml、40 μ g/ml 的 BP 處理後，AP 陽性的區域確實比陰性對照組 LIF OUT 增加許多。然而，ES cells 經 5 μ g/ml 的 BP 處理後，AP 陽性的

區域卻沒有比對照組 LIF OUT 多。圖七 C 顯示於顯微鏡觀察下，發現結果與上述結果相同。由這些數據顯示，在 ES cells 培養中，BP 有能力維持 ES cells 的自我更新能力和多能性。相同的結果，圖八 A、B 顯示 iPS cells 分別經 10 μ g/ml、20 μ g/ml、40 μ g/ml 的 BP 處理後，AP 陽性的區域確實比陰性對照組 LIF OUT 增加許多。然而，iPS cells 經 5 μ g/ml 的 BP 處理後，AP 陽性的區域卻沒有比對照組 LIF OUT 多。圖八 C 顯示於顯微鏡觀察下，發現結果與上述結果相同。由這些數據顯示，在 iPS cells 培養中，BP 也有能力維持 iPS cells 的自我更新能力和多能性。

此外，我們也利用其他的幹細胞標記來證明這一個假說。我們在 ES cells 培養時，分別用 5 μ g/ml、10 μ g/ml、20 μ g/ml、40 μ g/ml 的 BP 取代 LIF。我們利用免疫螢光染色，觀察 Nanog 和 SSEA-1 的螢光表現量，證實 BP 是否也可以使 ES cells 維持自我更新能力和多能性。圖九 A 顯示 ES cells 分別經 10 μ g/ml、20 μ g/ml、40 μ g/ml 的 BP 處理後，Nanog 的表現量確實比陰性對照組 LIF OUT 增加許多，而 ES cells 經 5 μ g/ml 的 BP 處理後，Nanog 的表現量卻沒有比對照組 LIF OUT 多。我們利用另一個幹細胞標記 SSEA-1 來觀察是否有相同的結果，由圖九 B 顯示的結果與 Nanog 表現量的結果一致。

我們使用的老鼠 iPS cells 是來自 Nanog-GFP 基因轉殖鼠(8)，所以我們也藉由觀察 Nanog-GFP 的表現量來證實。圖十 A 顯示的結果與 ES cells 的 Nanog 表現量相符，經由 BP 10 μ g/ml、20 μ g/ml、40 μ g/ml 確實比陰性對照

組 LIF OUT 增加許多。圖十 B 顯示與 ES cells 的 SSEA-1 表現量也相當一致。

為了進一步證實，BP 確實可以維持幹細胞的多能性，我們利用 10 μ g/ml 的 BP 取代 LIF 培養 ES cells 三代之後使之形成胚胎球，進而分化形成三胚層細胞，包含神經細胞、肌肉細胞、內胚層細胞等等。利用免疫螢光染色分析證實這些不同類型的細胞在使用以下的標記染色後有表現。Tuj1（外胚層標記）， α -SMA（中胚層標記），Gata4（內胚層標記）（圖十一）。

3.5 BP 對 MEF cells 分子訊息傳遞途徑的影響

由前面的實驗結果得知，BP 可以增加 Oct4 和 Sox2 基因表現量，也可以使 ES 和 iPS cells 維持自我更新能力和多能性，因此我們試圖進一步找出 BP 是透過哪些分子訊息傳遞途徑，影響 ES 和 iPS cells 自我更新能力和多能性。

我們將 MEF cells 分別處理 10 μ g/ml 和 40 μ g/ml 的 BP 作用 24 小時，進行 DNA Microarray 分析，為了釐清 BP 的作用機制，我們利用 KEGG pathways 資料庫分析基因表現的模式。表二顯示 MEF cells 經 BP 處理後，可以調節幾個訊息傳遞途徑的活化，最顯著的前三名分別是：PPAR signaling pathways、ECM-receptor interaction 和 Jak-Stat signaling pathways。參考許多期刊得知 Jak-Stat signaling pathways 與 stem cells 最為相關，因此我們選擇 Jak-Stat signaling pathways 做進一步探討。

3.6 BP 對 Jak2 和 Stat3 基因表現之影響

在幹細胞相關 Jak-Stat signaling pathways 中，Jak2 和 Stat3 是維持幹細胞多能性的最主要調節之基因。我們將 ES cells 經由 5 μ g/ml、10 μ g/ml、20 μ g/ml、40 μ g/ml 的 BP 處理作用 72 小時後，利用 real time PCR 偵測 Jak2 和 Stat3 基因的表現情形。圖十二顯示 ES cells 經由 BP 處理後，發現 BP 10 μ g/ml 的濃度使 Jak2 和 Stat3 之基因增加效果最為顯著。

3.7 BP 對 Jak2 和 Stat3 蛋白質表現之影響

我們偵測了 Jak2 和 Stat3 基因的表現情形，發現 BP 也會影響 Jak2 和 Stat3 基因表現量增加。進一步，我們利用西方墨點法分析，ES cells 經由 5 μ g/ml、10 μ g/ml、20 μ g/ml、40 μ g/ml 的 BP 處理作用 72 小時後，Jak2 和 Stat3 蛋白質表現情形。(圖十三 A) ES cells 經由 BP 處理作用 72 小時，Jak2 和 phosphorylation-Jak2 的蛋白質表現量與陰性對照組 LIF OUT 比較有明顯增加。圖十三 B 顯示相同的結果，ES cells 經由 BP 處理作用 72 小時，Stat3 和 phosphorylation-Stat3 蛋白質表現量與陰性對照組 LIF OUT 比較也有明顯增加。

3.8 BP 對 cytokine 的基因表現之影響

由上述的數據顯示，幹細胞經由 BP 處理後，可以活化 Jak2-Stat3 signaling pathways。為了尋找 BP 是透過哪一個 cytokine，進而活化 Jak2-Stat3 signaling pathways，我們利用 real time PCR 來分析調控 Jak2-Stat3 signaling

pathways 的上游 cytokine 之基因表現量。圖十四顯示將 ES cells 經由 5 μ g/ml、10 μ g/ml、20 μ g/ml、40 μ g/ml 的 BP 處理作用 72 小時後，偵測 LIF, EGF, IL5, IL11, EPO 和 OSM 基因的表現量。發現 ES cells 經由 10 μ g/ml 的 BP 處理作用 72 小時後，LIF, EGF, IL5, IL11, EPO 和 OSM 基因的表現量與陰性對照組 LIF OUT 相比確實有顯著的增加。

3.9 BP 對 iPS cells 生成之影響

由以上的數據顯示，BP 可以增加 Oct4 和 Sox2 基因表現量，而且可以維持幹細胞的自我更新能力和多能性。因此，我們利用 MEF cells 轉染 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 四個基因，同時加入 BP 試圖增加產生 iPS cells 的效率。我們使用的老鼠 MEF cells 是來自 Oct4-GFP 基因轉殖鼠，所以我們也藉由觀察 Oct4-GFP 的表現量來證實。圖十五顯示 MEF cells 經 20 μ g/ml BP 處理後，Oct4-GFP 的表現量確實比陰性對照組增加許多，而 BP(T+P) (seeding 後持續加 BP) 只有在第六天 Oct4-GFP 的表現量比 BP(T) (seeding 後不持續加 BP) 顯著，這也意味著，在轉染的過程中加入 BP 處理會增加 iPS cells 生成的效率。

第四章 討論

幹細胞可以進行自我更新和分化成多種細胞類型，並且應用於多種臨床治療(55)。我們能進行體外培養的所有幹細胞中，ES cells 具有多能性和分化成三個主要胚層細胞的特性，這些重要的特性可以產生健康的細胞用於臨床治療。在 2006 年，日本的 Takahashi 團隊藉由轉染 Oct4, Sox2, c-Myc 和 Klf4 這四個基因進入體細胞產生 iPS cells (8)，此 iPS cells 可以克服 ES cells 所面臨的兩個重要之問題：免疫排斥反應和醫療道德，在未來它會成為一項非常重要的細胞治療之技術。但是，ES 和 iPS cells 的培養必須藉由 LIF 來活化 Jak-Stat pathway，而維持其多能性(39)。此外，iPS cells 生成效率非常低是目前 iPS cells 技術的最大限制。在本研究中，我們發現一個純化合物不僅可以取代 LIF 來培養 ES 和 iPS cells，而且還可以增加 iPS cells 生成的效率。

BP 是從當歸萃取的一種純化合物，它有顯著的抗癌作用，在體內和體外都可以導致惡性腦腫瘤生長停滯和凋亡(49, 50)。然而，BP 抗腫瘤作用的有效濃度超過 50 $\mu\text{g/ml}$ 甚至達到 100 $\mu\text{g/ml}$ (56, 57)，但低濃度之 BP 在治療上機制與功能仍是不明。為了測試低濃度之 BP 治療上有不同的機制，並且發現低濃度之 BP 有新的功能，我們使用低於 40 $\mu\text{g/ml}$ 的 BP 進行一系列的實驗。MTT 分析發現經由低於 40 $\mu\text{g/ml}$ 的 BP 處理後，並沒有導致細胞死亡(圖四)。根據這些數據，我們以下實驗使用低於 40 $\mu\text{g/ml}$ 的 BP 處理，這

也是 BP 使用於幹細胞的首次研究。

接下來我們試圖找出一個從中草藥萃取的純化合物，並且可以增加產生 iPS cells 的效率。根據這個原因，我們利用 18 種中草藥來處理 MEF cells，並且偵測處理後 MEF cells 的 Oct4 和 Sox2 (8) 之基因表現，在這 18 種中草藥中，BP 是唯一的純化物，並且可使 Oct4 和 Sox2 基因表現增加。圖五顯示，我們使用 MEF cells 經 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 BP 處理後，Oct4 和 Sox2 基因表現皆有增加，有趣的是這種作用在低濃度(10 $\mu\text{g/ml}$)比高濃度(20 $\mu\text{g/ml}$ 和 40 $\mu\text{g/ml}$)的效果明顯。以前的研究中，BP 的抗腫瘤效應，導致惡性腦瘤生長停滯和凋亡的有效濃度超過 50 $\mu\text{g/ml}$ (49, 50)。雖然，我們研究中使用的濃度低於 40 $\mu\text{g/ml}$ ，而且我們也測試過 BP 這些濃度並不會造成細胞死亡，但我們認為 20 $\mu\text{g/ml}$ 和 40 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度處理下會導致細胞不健康。因此，10 $\mu\text{g/ml}$ 的 BP 是讓 Oct4 和 Sox2 基因表現增加的最有效濃度(圖五)。BP 可以增加 Oct4 和 Sox2 基因表現，因此我們還測試利用 BP 來增加 iPS cells 的效率。如圖十五顯示，我們確定 BP 處理後可以增加 iPS cells 生成的效率，而且對照組與控制組相比約提高了五倍的效率。在未來的研究中，我們將找出更多具安全性和提高 iPS cells 生成效率的方法。

在以往的研究，Oct4 和 Sox2 可以維持 ES cells 的多能性(58)。因此，我們研究的具體目標為：1.測試 BP 可以維持 ES 和 iPS cells 的自我更新能力和多能性；2.確定 BP 維持幹細胞多能性的機制。我們利用 BP 取代 LIF

來培養 ES cells，發現 BP 也可以讓 Oct4, Sox2, c-Myc 和 Klf4 基因表現明顯增加(圖六)。並且使用 BP 來培養 ES 和 iPS cells，我們用了幾個幹細胞標記，包含 AP 染色、Nanog 和 SSEA1，來確定 BP 可以取代 LIF 來培養 ES 和 iPS cells，尤其是 10 和 20 $\mu\text{g/ml}$ (圖七、八、九、十)，這個數據與 Oct4 和 Sox2 基因表現的數據一致。此外，我們利用 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 BP 取代 LIF 來培養 ES 和 iPS cells，經過三代培養後，利用 embryoid body (EB) 形成這個技術(3, 8)，來測試幹細胞的多能性，這個數據指出，BP 可以取代 LIF 來培養 ES 和 iPS cells。

為了研究 BP 處理後其作用的機制，我們利用 microarray 分析找出 BP 主要調節的途徑。前三名的途徑：PPAR signaling pathway、ECM-receptor interaction 和 Jak-Stat signaling pathway (表二)。在 2010 年，Mo et al. 研究顯示 PPAR γ 調節 LIF 透過 Tyk2-Stat3 途徑，誘導老鼠的胚胎幹細胞生長與自我更新(59)。我們偵測了 ES cells 經 BP 處理後 PPAR γ 的基因表現，發現 PPAR γ 基因表現與控制組相比並沒有差異，根據這個原因，我們將著重於 Jak-Stat signaling pathway。我們確認幹細胞經 BP 處理後，phosphorylation-Jak2 和 phosphorylation-Stat3 的蛋白質表現增加(圖十三)。LIF 的訊息透過 Jak 活化了相關的訊息傳遞，並且活化 Stat3 (39)，對於 ES cells 的自我更新能力 LIF 是扮演一個不可或缺的角色(31)。我們的數據指出，經 BP 處理可以活化 Jak2 和 Stat3 使 ES cells 維持自我更新能力。此外，

Jak-Stat signaling pathway 可以透過 LIF, EGF, EPO, IL5, IL11 和 OSM (17-21) 這些細胞激素活化。我們發現在經過 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 BP 處理後，這些細胞激素的基因表現都有增加的現象，這個數據與蛋白質表現的數據一致，經 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 BP 處理後表現量是最高的。我們確定 BP 透過活化 Jak-Stat signaling pathway 相關的細胞激素，進而活化 Jak2 和 Stat3 的蛋白質，來達到維持幹細胞多能性之功能。

最後，我們利用質體轉染四個基因，並且經由 BP 處理來增加 iPS cells 生成的效率，效率低是產生 iPS cells 技術中最大的障礙(60)。在先前的研究中，有一個小分子[valproic acid (VPA)]可以用來提高 iPS cells 的生成效率(10)。VPA 並不會增加 Oct4 和 Sox2 的基因表現，但是它會增加病毒嵌入基因的效率(10)。在 2010 年，Esteban et al.的研究顯示維生素 C 可以增加老鼠和人類的 iPS cells 生成效率(61)。這些研究顯示一個小的化合物可以用來增加生成 iPS cells 的效率。為了測試這個假說，我們使用 pou5f1-GFP 基因轉殖鼠的 MEF cells，並且將 Oct4, Sox2, c-Myc 和 Klf4 基因傳入 MEF cells，再加上 BP 處理，並與控制組不加 BP 處理的比較 iPS cells 生成效率。我們發現經 BP 處理可以增加 iPS cells 生成。這些數據是 BP 可以增加 iPS cells 生成效率的有利證據。

我們確定了 BP 透過調節參與於 Jak2-Stat3 signaling pathways 中的細胞激素，增加 Jak2 和 Stat3 的蛋白質表現，讓幹細胞維持多能性和自我更新

能力；此外，BP 的處理後可以增加 iPS cells 生成的效率。將來 BP 可以發展成為健康食品，用來活化幹細胞，而且在未來 BP 可以用於改善 iPS cell 生成之效率。



參考文獻

1. Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156
2. Martin, G. R. (1981) 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* **78**, 7634-7638
3. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872
4. Marson, A., Levine, S. S., Cole, M. F., Frampton, G. M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M. G., Johnston, W. K., Wernig, M., Newman, J., Calabrese, J. M., Dennis, L. M., Volkert, T. L., Gupta, S., Love, J., Hannett, N., Sharp, P. A., Bartel, D. P., Jaenisch, R., and Young, R. A. (2008) Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* **134**, 521-533
5. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147
6. Liu, S. P., Fu, R. H., Yu, H. H., Li, K. W., Tsai, C. H., Shyu, W. C., and Lin, S. Z. (2009) MicroRNAs regulation modulated self-renewal and lineage differentiation of stem cells. *Cell Transplant* **18**, 1039-1045
7. Kim, D. S., Kim, J. Y., Kang, M., Cho, M. S., and Kim, D. W. (2007) Derivation of functional dopamine neurons from embryonic stem cells. *Cell Transplant* **16**, 117-123
8. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676
9. Ezashi, T., Das, P., and Roberts, R. M. (2005) Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4783-4788
10. Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D. A. (2008) Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* **26**, 1269-1275
11. Kawase, E., Suemori, H., Takahashi, N., Okazaki, K., Hashimoto, K., and Nakatsuji, N. (1994) Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines. *Int J Dev Biol* **38**, 385-390
12. Ichikawa, Y. (1970) Further studies on the differentiation of a cell line of myeloid leukemia. *J Cell Physiol* **76**, 175-184
13. Smith, A. G. (1992) Mouse embryo stem cells: their identification, propagation and manipulation. *Semin Cell Biol* **3**, 385-399
14. Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P.,

- Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Gough, N. M. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**, 684-687
15. Moreau, J. F., Donaldson, D. D., Bennett, F., Witek-Giannotti, J., Clark, S. C., and Wong, G. G. (1988) Leukaemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukin for DA cells. *Nature* **336**, 690-692
 16. Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688-690
 17. Metcalf, D. (1991) The leukemia inhibitory factor (LIF). *Int J Cell Cloning* **9**, 95-108
 18. Ip, N. Y., Nye, S. H., Boulton, T. G., Davis, S., Taga, T., Li, Y., Birren, S. J., Yasukawa, K., Kishimoto, T., Anderson, D. J., and et al. (1992) CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130. *Cell* **69**, 1121-1132
 19. Wijdenes, J., Heinrich, P. C., Muller-Newen, G., Roche, C., Gu, Z. J., Clement, C., and Klein, B. (1995) Interleukin-6 signal transducer gp130 has specific binding sites for different cytokines as determined by antagonistic and agonistic anti-gp130 monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* **25**, 3474-3481
 20. Gearing, D. P., Thut, C. J., VandeBos, T., Gimpel, S. D., Delaney, P. B., King, J., Price, V., Cosman, D., and Beckmann, M. P. (1991) Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J* **10**, 2839-2848
 21. Guschin, D., Rogers, N., Briscoe, J., Witthuhn, B., Watling, D., Horn, F., Pellegrini, S., Yasukawa, K., Heinrich, P., Stark, G. R., and et al. (1995) A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *EMBO J* **14**, 1421-1429
 22. Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., and Yokota, T. (1999) STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* **18**, 4261-4269
 23. Sumi, T., Fujimoto, Y., Nakatsuji, N., and Suemori, H. (2004) STAT3 is dispensable for maintenance of self-renewal in nonhuman primate embryonic stem cells. *Stem Cells* **22**, 861-872
 24. Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J., and Smith, A. (1999) Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* **210**, 30-43
 25. Gual, P., Baron, V., Lequoy, V., and Van Obberghen, E. (1998) Interaction of Janus kinases JAK-1 and JAK-2 with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-1 receptor. *Endocrinology* **139**, 884-893
 26. Andus, T., Geiger, T., Hirano, T., Kishimoto, T., and Heinrich, P. C. (1988) Action of

- recombinant human interleukin 6, interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha on the mRNA induction of acute-phase proteins. *Eur J Immunol* **18**, 739-746
27. Narazaki, M., Witthuhn, B. A., Yoshida, K., Silvennoinen, O., Yasukawa, K., Ihle, J. N., Kishimoto, T., and Taga, T. (1994) Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2285-2289
 28. Stahl, N., Boulton, T. G., Farruggella, T., Ip, N. Y., Davis, S., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S., and et al. (1994) Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* **263**, 92-95
 29. Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D. J., Marine, J. C., Teglund, S., Vanin, E. F., Bodner, S., Colamonici, O. R., van Deursen, J. M., Grosveld, G., and Ihle, J. N. (1998) Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* **93**, 385-395
 30. Darnell, J. E., Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science* **277**, 1630-1635
 31. Raz, R., Lee, C. K., Cannizzaro, L. A., d'Eustachio, P., and Levy, D. E. (1999) Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2846-2851
 32. Schindler, C. (1999) Cytokines and JAK-STAT signaling. *Exp Cell Res* **253**, 7-14
 33. Bromberg, J., and Darnell, J. E., Jr. (2000) The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* **19**, 2468-2473
 34. Raz, R., Durbin, J. E., and Levy, D. E. (1994) Acute phase response factor and additional members of the interferon-stimulated gene factor 3 family integrate diverse signals from cytokines, interferons, and growth factors. *J Biol Chem* **269**, 24391-24395
 35. Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell, J. E., Jr. (1994) Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* **264**, 95-98
 36. Akira, S., Nishio, Y., Inoue, M., Wang, X. J., Wei, S., Matsusaka, T., Yoshida, K., Sudo, T., Naruto, M., and Kishimoto, T. (1994) Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* **77**, 63-71
 37. Luttkicken, C., Wegenka, U. M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A. G., Wilks, A. F., Yasukawa, K., Taga, T., and et al. (1994) Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* **263**, 89-92
 38. Wegenka, U. M., Buschmann, J., Luttkicken, C., Heinrich, P. C., and Horn, F. (1993) Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol Cell Biol* **13**, 276-288

39. Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. (1998) Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* **12**, 2048-2060
40. Boeuf, H., Hauss, C., Graeve, F. D., Baran, N., and Kedinger, C. (1997) Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *J Cell Biol* **138**, 1207-1217
41. Minami, M., Inoue, M., Wei, S., Takeda, K., Matsumoto, M., Kishimoto, T., and Akira, S. (1996) STAT3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3963-3966
42. Nakajima, K., Yamanaka, Y., Nakae, K., Kojima, H., Ichiba, M., Kiuchi, N., Kitaoka, T., Fukada, T., Hibi, M., and Hirano, T. (1996) A central role for Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells. *EMBO J* **15**, 3651-3658
43. Yamanaka, Y., Nakajima, K., Fukada, T., Hibi, M., and Hirano, T. (1996) Differentiation and growth arrest signals are generated through the cytoplasmic region of gp130 that is essential for Stat3 activation. *EMBO J* **15**, 1557-1565
44. Cressman, D. E., Greenbaum, L. E., DeAngelis, R. A., Ciliberto, G., Furth, E. E., Poli, V., and Taub, R. (1996) Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* **274**, 1379-1383
45. Sierra-Honigmann, M. R., Nath, A. K., Murakami, C., Garcia-Cardena, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W. C., Madge, L. A., Schechner, J. S., Schwabb, M. B., Polverini, P. J., and Flores-Riveros, J. R. (1998) Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* **281**, 1683-1686
46. Vaisse, C., Halaas, J. L., Horvath, C. M., Darnell, J. E., Jr., Stoffel, M., and Friedman, J. M. (1996) Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* **14**, 95-97
47. Wang, H., Chen, R., and Xu, H. (1998) [Chemical constituents of radix Angelicae Sinensis]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **23**, 167-168, inside backcover
48. Abebe, W. (2002) Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs. *J Clin Pharm Ther* **27**, 391-401
49. Tsai, N. M., Lin, S. Z., Lee, C. C., Chen, S. P., Su, H. C., Chang, W. L., and Harn, H. J. (2005) The antitumor effects of Angelica sinensis on malignant brain tumors in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* **11**, 3475-3484
50. Tsai, N. M., Chen, Y. L., Lee, C. C., Lin, P. C., Cheng, Y. L., Chang, W. L., Lin, S. Z., and Harn, H. J. (2006) The natural compound n-butylidenephthalide derived from Angelica sinensis inhibits malignant brain tumor growth in vitro and in vivo. *J Neurochem* **99**, 1251-1262
51. Teng, C. M., Chen, W. Y., Ko, W. C., and Ouyang, C. H. (1987) Antiplatelet effect of butylidenephthalide. *Biochim Biophys Acta* **924**, 375-382
52. Ko, W. C., Sheu, J. R., Tzeng, S. H., and Chen, C. M. (1998) The selective antianginal

- effect without changing blood pressure of butylidenephthalide in conscious rats. *Planta Med* **64**, 229-232
53. Ko, W. C., Liao, C. C., Shih, C. H., Lei, C. B., and Chen, C. M. (2002) Relaxant effects of butylidenephthalide in isolated dog blood vessels. *Planta Med* **68**, 1004-1009
 54. Mimura, Y., Kobayashi, S., Naitoh, T., Kimura, I., and Kimura, M. (1995) The structure-activity relationship between synthetic butylidenephthalide derivatives regarding the competence and progression of inhibition in primary cultures proliferation of mouse aorta smooth muscle cells. *Biol Pharm Bull* **18**, 1203-1206
 55. Liu, S. P., Fu, R. H., Huang, Y. C., Chen, S. Y., Chien, Y. J., Hsu, C. Y., Tsai, C. H., Shyu, W. C., and Lin, S. Z. (2011) Induced pluripotent stem (iPS) cell research overview. *Cell Transplant* **20**, 15-19
 56. Lin, P. C., Chen, Y. L., Chiu, S. C., Yu, Y. L., Chen, S. P., Chien, M. H., Chen, K. Y., Chang, W. L., Lin, S. Z., Chiou, T. W., and Harn, H. J. (2008) Orphan nuclear receptor, Nur-77 was a possible target gene of butylidenephthalide chemotherapy on glioblastoma multiform brain tumor. *J Neurochem* **106**, 1017-1026
 57. Chen, Y. L., Jian, M. H., Lin, C. C., Kang, J. C., Chen, S. P., Lin, P. C., Hung, P. J., Chen, J. R., Chang, W. L., Lin, S. Z., and Harn, H. J. (2008) The induction of orphan nuclear receptor Nur77 expression by n-butylidenephthalide as pharmaceuticals on hepatocellular carcinoma cell therapy. *Mol Pharmacol* **74**, 1046-1058
 58. Heng, J. C., Feng, B., Han, J., Jiang, J., Kraus, P., Ng, J. H., Orlov, Y. L., Huss, M., Yang, L., Lufkin, T., Lim, B., and Ng, H. H. (2010) The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell* **6**, 167-174
 59. Mo, C., Chearwae, W., and Bright, J. J. (2010) PPARgamma regulates LIF-induced growth and self-renewal of mouse ES cells through Tyk2-Stat3 pathway. *Cell Signal* **22**, 495-500
 60. Yamanaka, S. (2009) A fresh look at iPS cells. *Cell* **137**, 13-17
 61. Esteban, M. A., Wang, T., Qin, B., Yang, J., Qin, D., Cai, J., Li, W., Weng, Z., Chen, J., Ni, S., Chen, K., Li, Y., Liu, X., Xu, J., Zhang, S., Li, F., He, W., Labuda, K., Song, Y., Peterbauer, A., Wolbank, S., Redl, H., Zhong, M., Cai, D., Zeng, L., and Pei, D. (2010) Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **6**, 71-79
 62. Burdon, T., Chambers, I., Stracey, C., Niwa, H., and Smith, A. (1999) Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs* **165**, 131-143

圖表

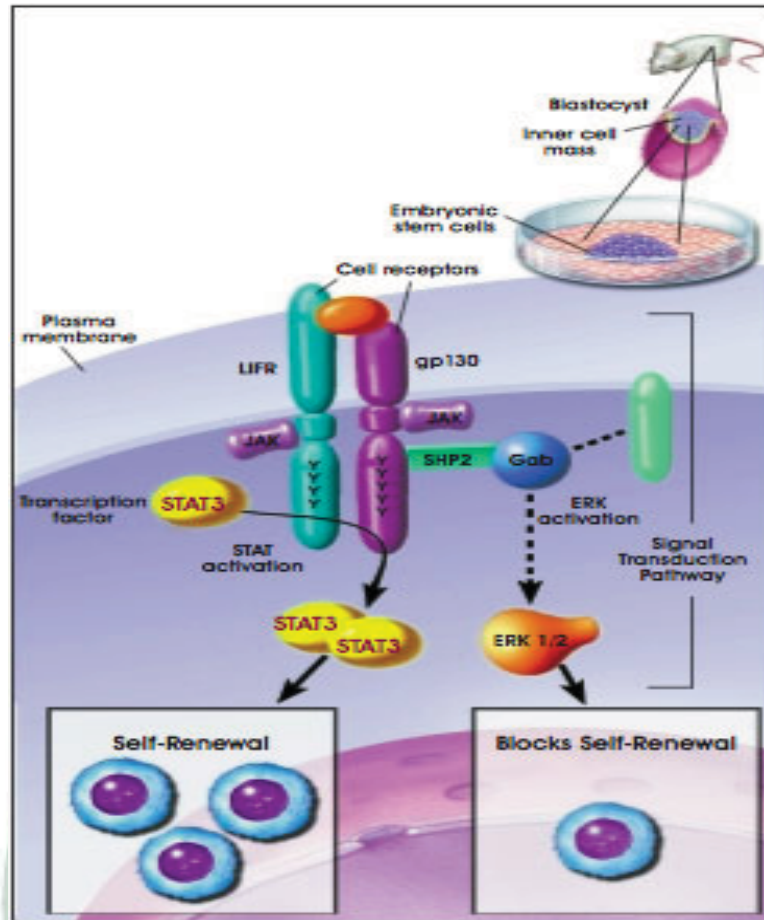
表一、即時定量聚合酶連鎖反應序列一覽表

Primer	Forward Sequence : (5'-3')	Reverse Sequence : (5'-3')	Taqman Probe
Sox2	AGGGCTGGACTGCGAACTG	TTTGCACCCCTCCCAATTC	
c-Myc	CATCAAGCAGACGAGCA	CGAGTIAGGTCAGTTTATGCAC	
Klf4	CCTTTCAGTGCCAGAAGT	ACTACGTGGGATTTAAAAGTGC	
Jak2	CAATGATAAACAAGGGCAAATGAT	CTTGGCAATCTTCCGTTGCT	
Stat3	CCCCGTACCTGAAGACCAAGT	CCGTIATTCCAAACTGCATCA	
EGF	GAGTCTGCCTGCGGATGGT	GCTGCAGGGAGGGAGACA	
EPO	CCCCCAGCCTCATCTG	TGCCTCCTTGGCCTCTAAGA	
IL5	TCCCTGCTACTCTCCCAAA	CAACCTTCTCTCTCCCAAGAA	
IL11	CATGCCACACCCAAACAA	CCCCTCACCCAGGTCTACTG	
LIF	CCTACCTGCGTCTTACTCCATCA	TGTTTTCCCAAGGCTCAA	
OSM	CGGTCCACTACAACACCAGATG	GCGATGGTATCCCCAGAGAA	
<i>β</i> -Actin	GTGCGTGACATCAAAGAGAAGC	TGGATGCCACAGGATTCCATAC	
Taqman-Oct4	GAGGCTACAGGGACACCTTTC	GTGCCAAAGTGGGGACCT	Roche Universal Probes 6
Taqman- <i>β</i> -Actin	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	ACCAGAGGCATACAGGGACA	Roche Universal Probes 64

表二、利用 KEGG 和 Babelomics 資料庫分析顯著表現的基因數據與生物功能分類。

Function/Pathway	BP10				BP40			
	I	D	n	%	I	D	n	%
Methylation (n=0)								
Signal transduction								
PPAR signaling pathway	14	14	28/74	37.8	12	14	27/74	36.5
ECM-receptor interaction	3	18	21/74	28.4	3	16	19/74	25.7
JAK-STAT signaling pathway	9	30	39/140	27.9	8	27	35/140	25
Calcium signaling pathway	4	28	32/146	21.9	2	30	32/146	21.9
TGF-beta signaling pathway	3	2	5/45	11.1	5	1	6/45	13.3
MAPK signaling	7	17	24/227	10.6	5	19	24/227	10.6
Wnt signaling pathway	2	5	7/66	10.6	0	6	6/66	9.1
Insulin signaling pathway	3	7	10/102	9.8	2	3	5/102	4.9
VEGF signaling pathway	2	0	2/31	6.5	0	0	0/31	0
Cell proliferation								
Cell communication	3	17	20/92	21.7	2	18	20/92	21.7
Cell cycle	0	4	4/163	2.5	0	6	6/163	3.7
Metabolism								
Lipid metabolism	3	15	18/109	16.5	2	12	14/109	12.8
Amino acid metabolism	0	1	1/23	4.3	0	2	2/23	8.7
Cell adhesion								
Cell adhesion molecules	13	20	33/150	22	13	21	34/150	22.7
Tight junction	2	7	9/66	13.6	2	9	11/66	16.7
Focal adhesion	3	16	19/173	11	2	20	22/173	12.7
Apoptosis								
	3	8	11/94	11.7	1	6	7/94	7.4

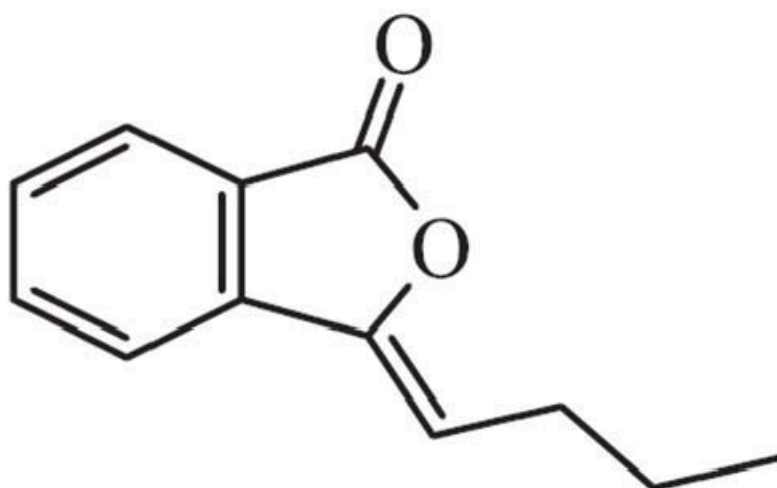
I: number of upregulated genes; D: number of downregulated genes.



圖一、LIF 透過活化 Jak/Stat3 signaling pathways，調控幹細胞的生物活性，

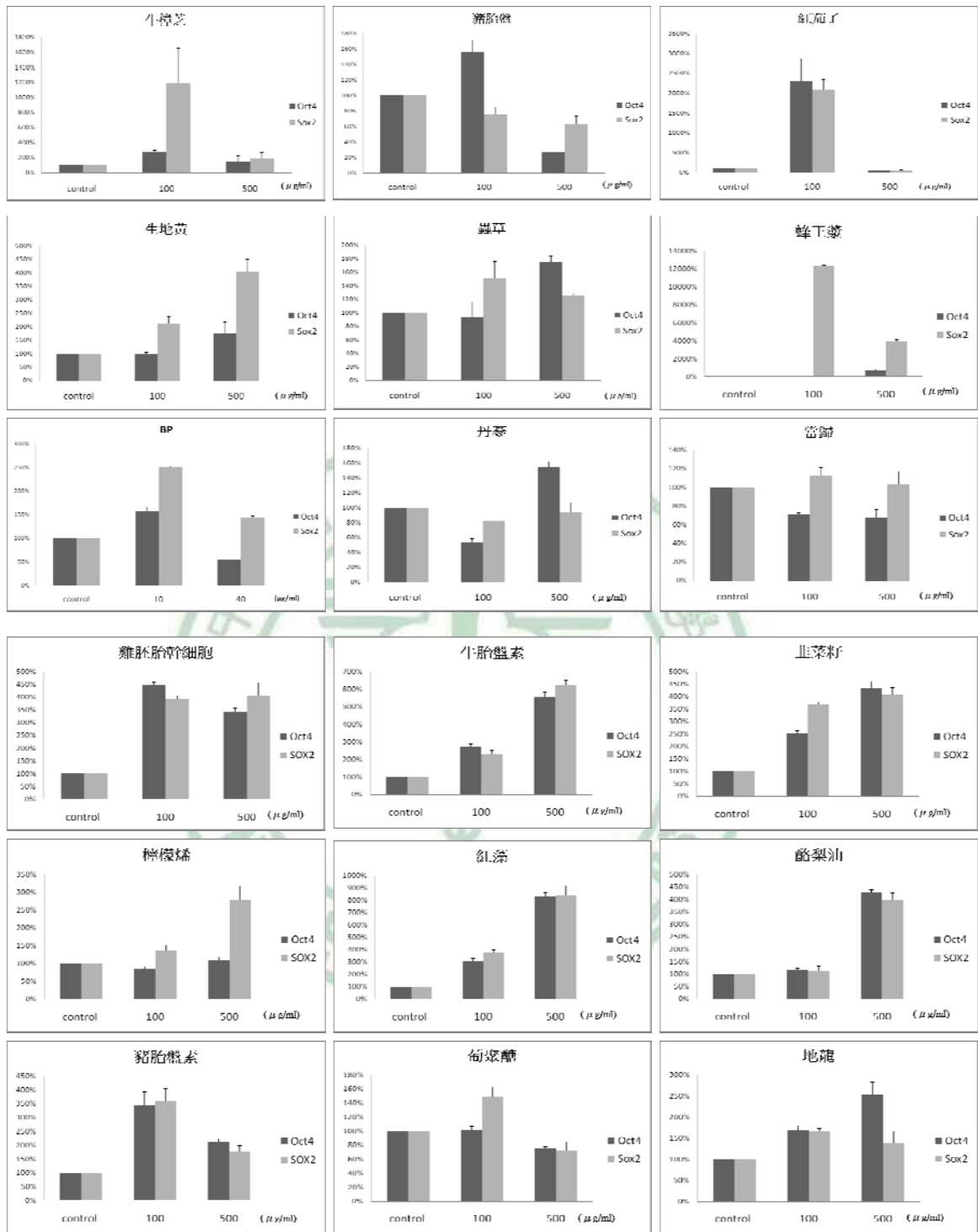
圖擷取自文章(62)。

n-Butylidenephthalide
(BP; BdPh, a natural compound,
MW: 188.23)

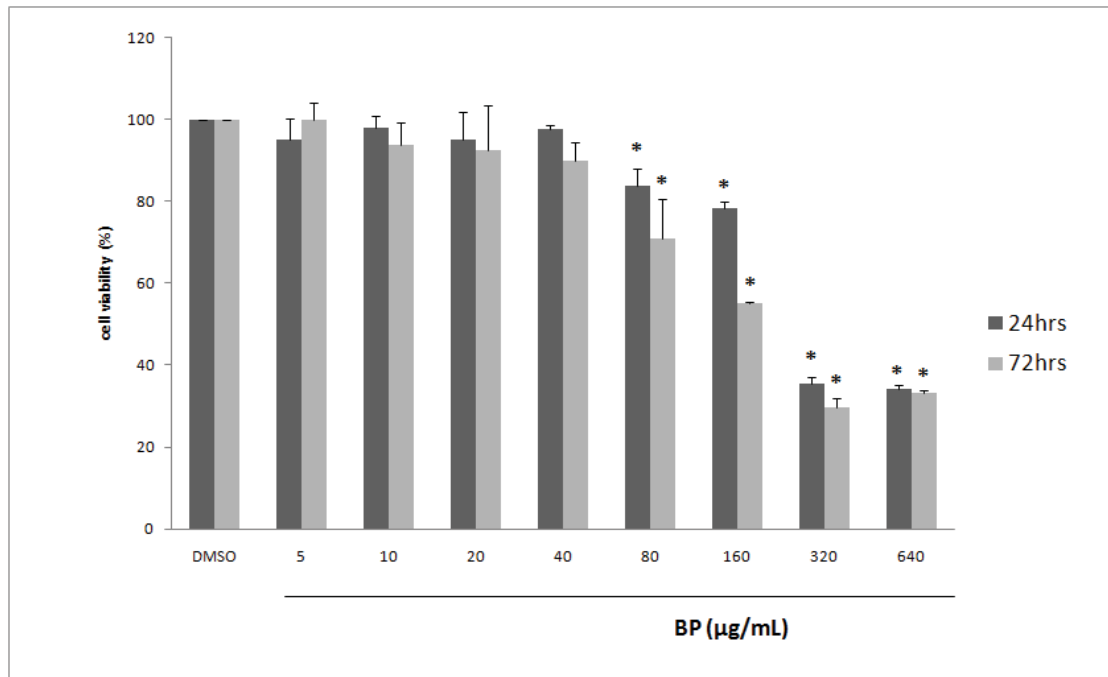


圖二、n-Butylidenephthalide 的化學結構

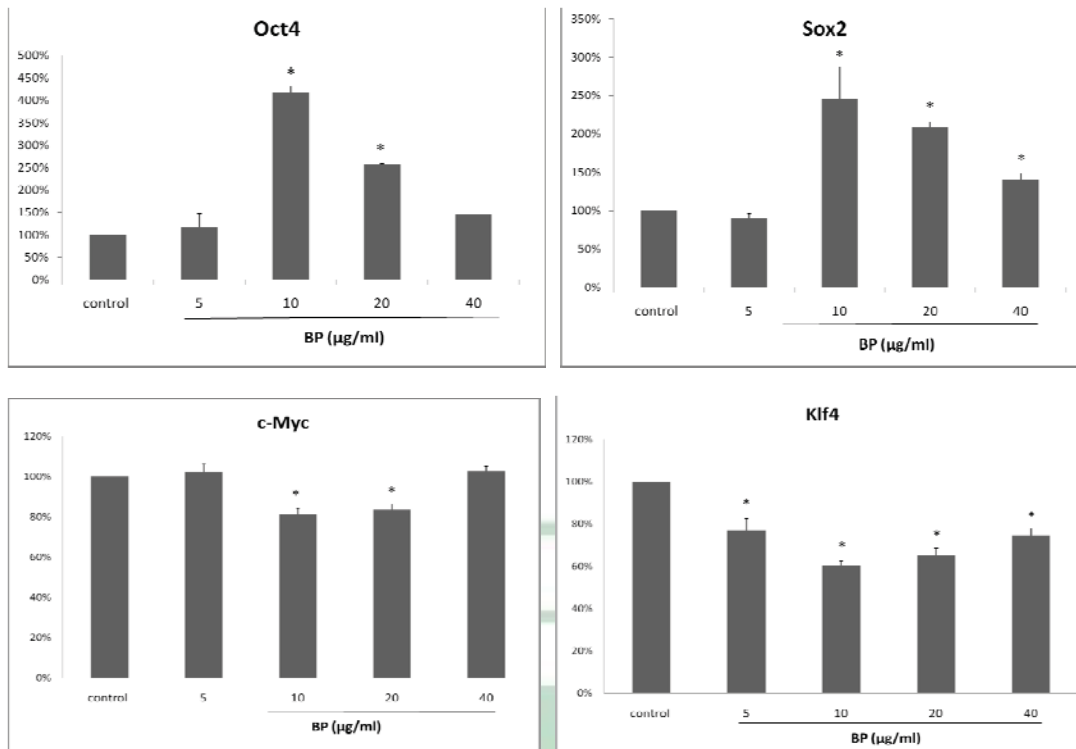




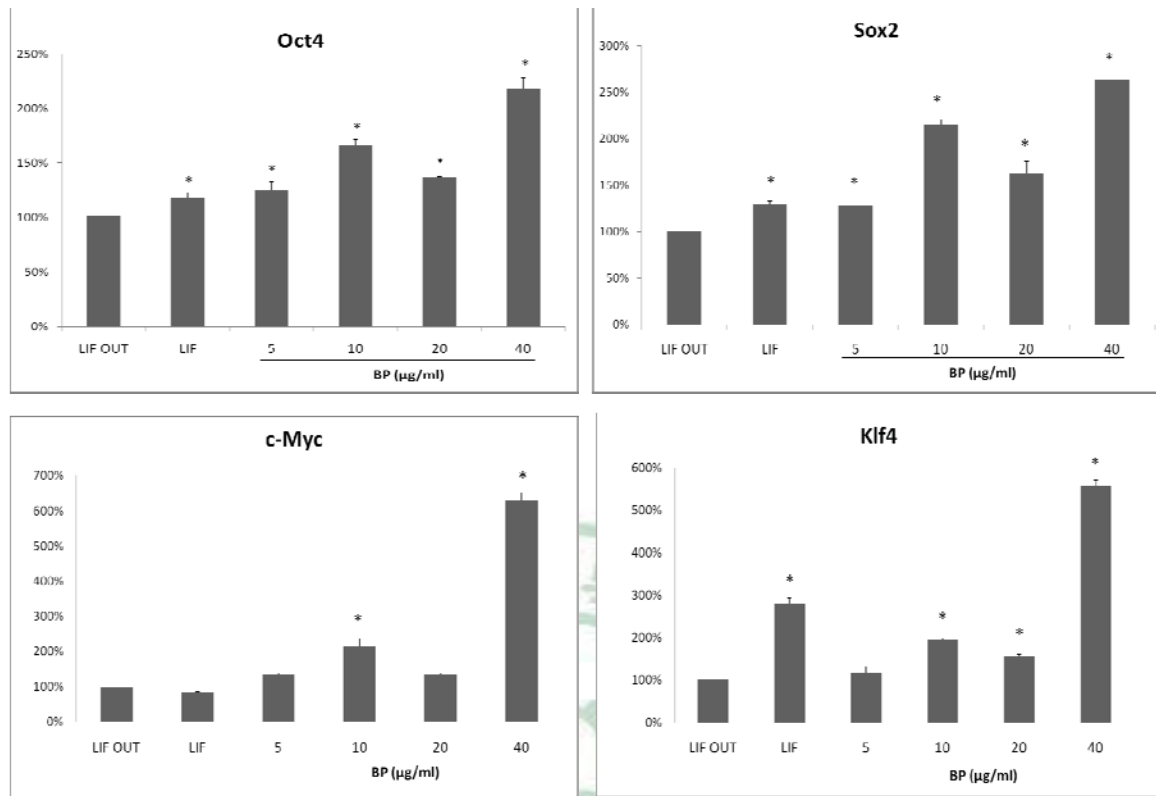
圖三、利用 real-time PCR 偵測 MEF cells 分別處理 18 種不同濃度的中草藥作用 24 小時後，Oct4 和 Sox2 基因表現量。



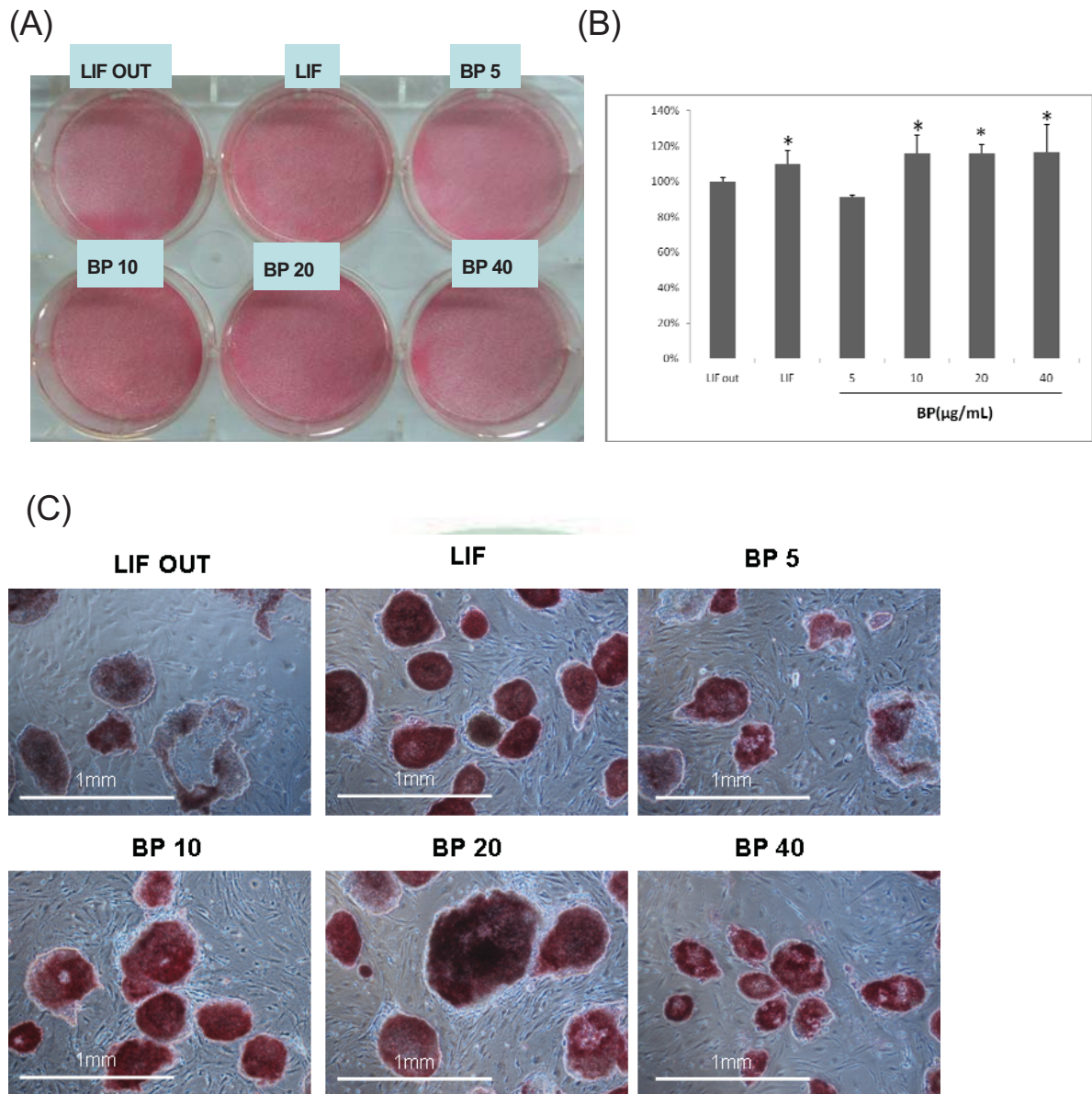
圖四、利用 MTT assay 分析 BP 對 MEF cells 生長能力的影響。MEF cells 處理不同濃度的 BP 分別作用 24 和 72 小時。各組相對吸光值的平均值與標準差。 $*P < 0.05$ versus control (DMSO)。



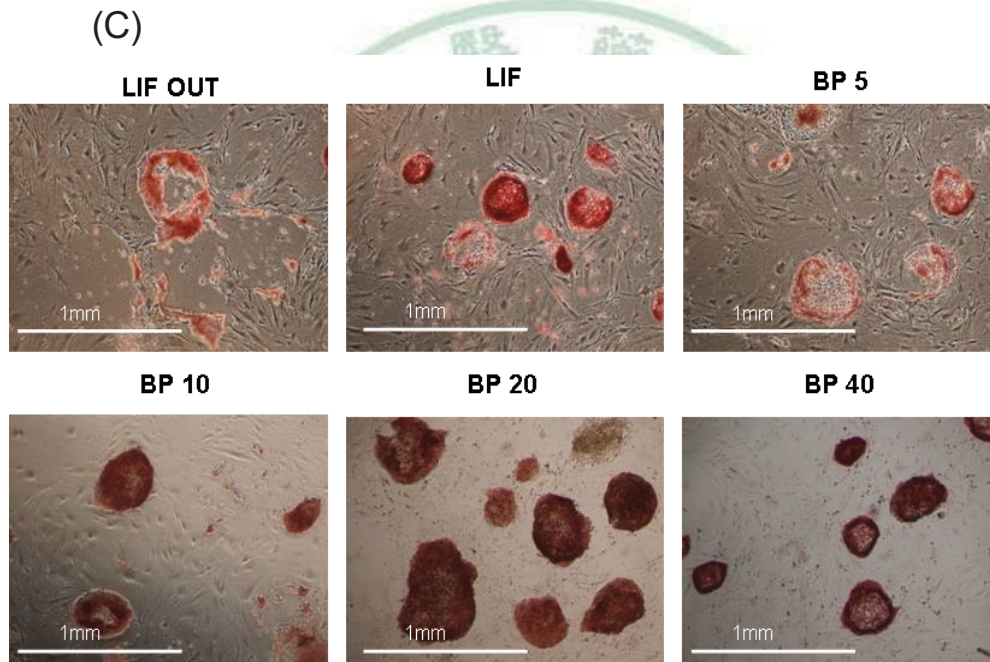
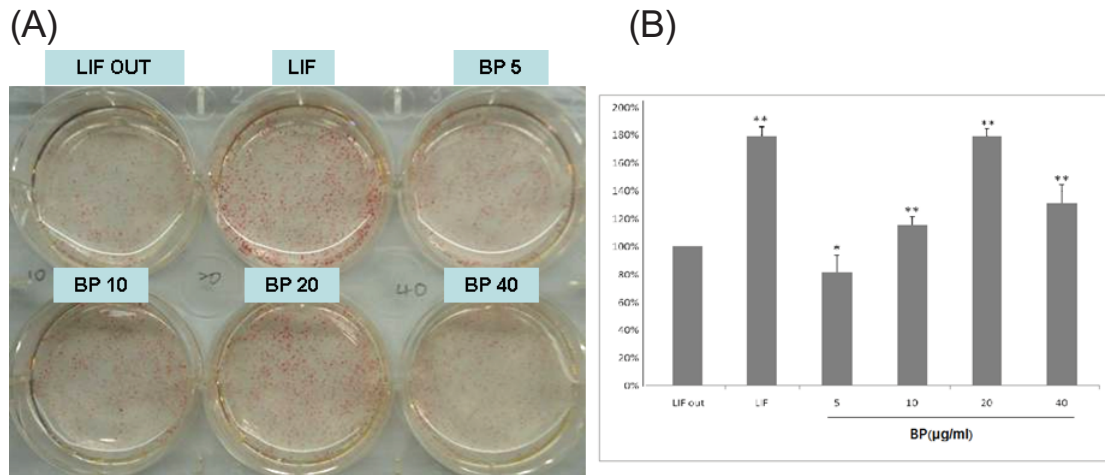
圖五、利用 real-time PCR 偵測 MEF cells 處理不同濃度 BP 作用 24 小時後，Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 基因表現量。*P < 0.05 versus control (DMSO)。



圖六、利用 real-time PCR 偵測 ES cells 處理不同濃度 BP 作用 72 小時後，Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 基因表現量。*P < 0.05 versus control (LIF OUT).

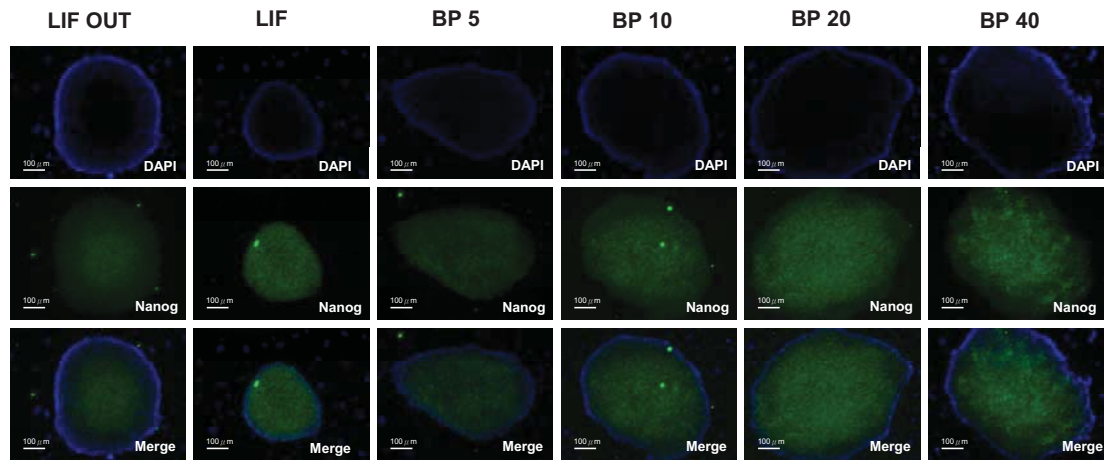


圖七、(A) ES cells 處理不同濃度 BP 作用 72 小時後，利用 alkaline phosphatase staining 分析俯瞰圖。(B) 三次獨立實驗的平均值±SD。*P < 0.05 versus LIF OUT. (C) ES cells 處理不同濃度的BP作用72小時後，alkaline phosphatase staining 於 40 倍顯微鏡圖。

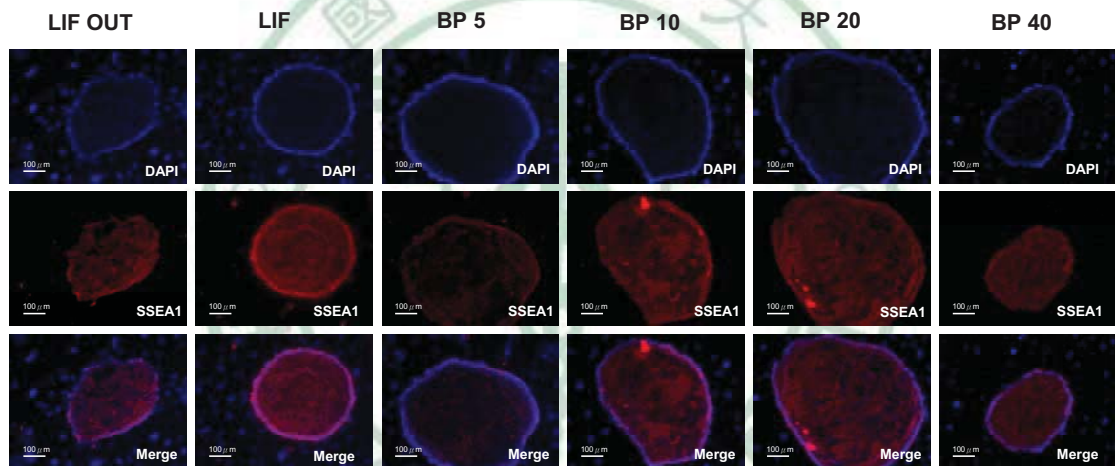


圖八、(A) iPS cells 處理不同濃度 BP 作用 72 小時後，利用 alkaline phosphatase staining 分析俯瞰圖。(B) 三次獨立實驗的平均值±SD。* $P < 0.05$ versus LIF OUT. (C) iPS cells 處理不同濃度的 BP 作用 72 小時後，alkaline phosphatase staining 於 40 倍顯微鏡圖。

(A)

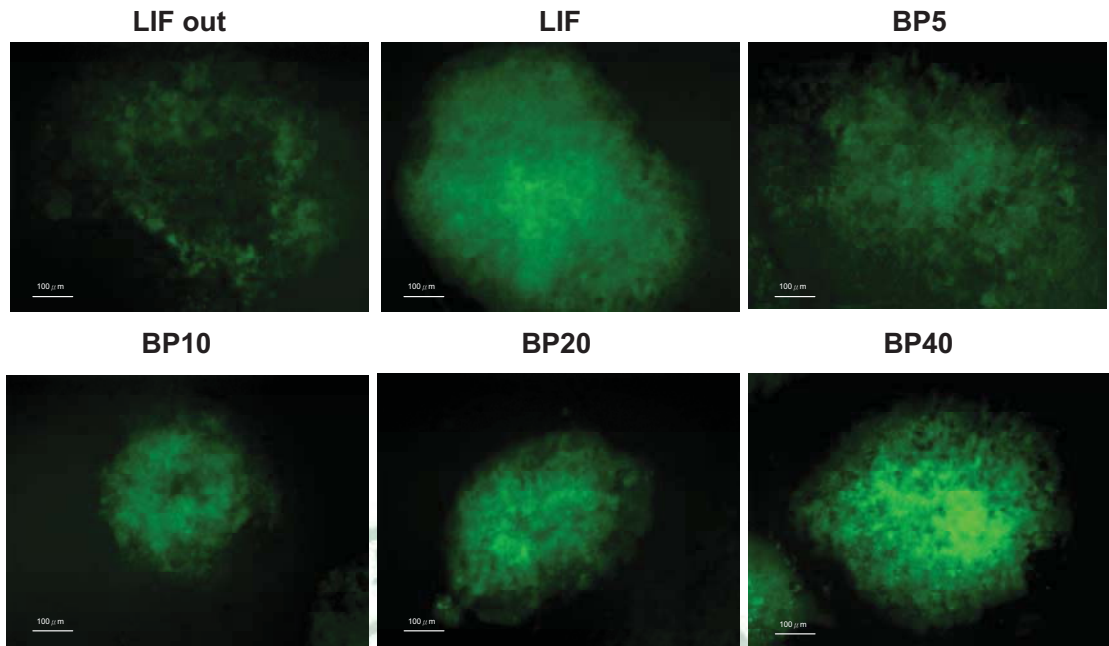


(B)

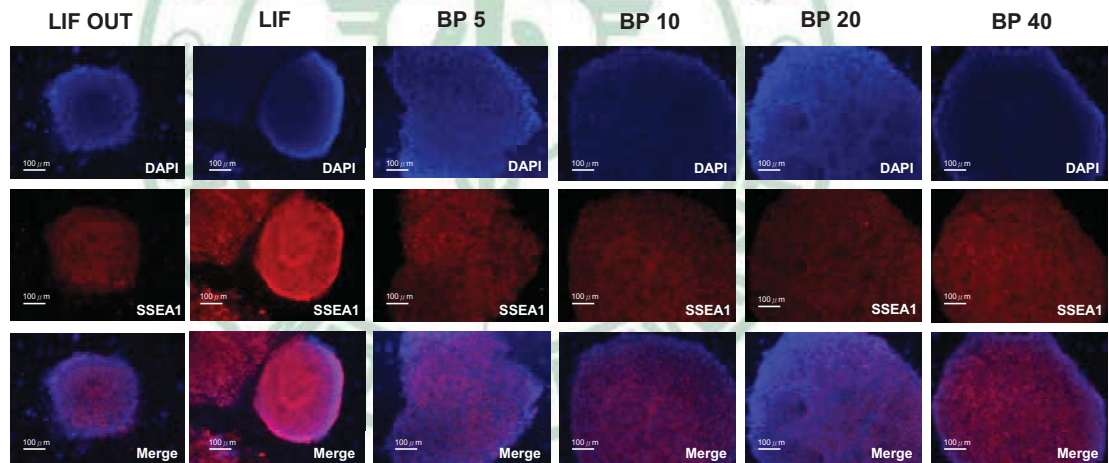


圖九、(A) ES cells 處理不同濃度 BP 作用 72 小時後，在螢光顯微鏡下觀察 Nanog-GFP 的表現量。(B) ES cells 處理不同濃度 BP 作用 72 小時後，在螢光顯微鏡下觀察 SSEA1 的表現量。

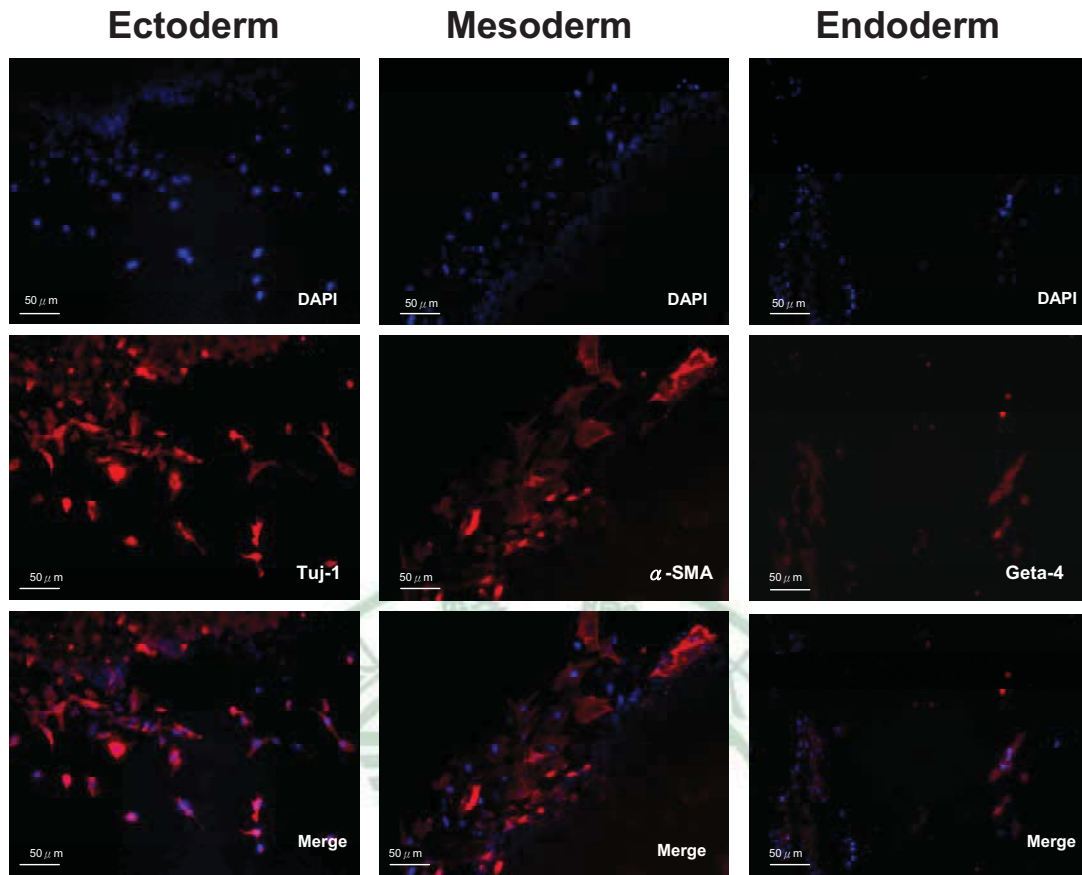
(A)



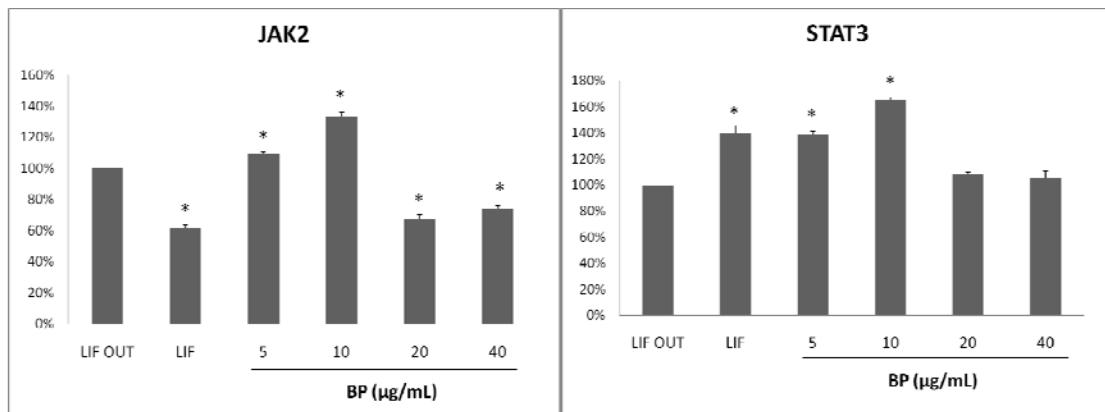
(B)



圖十、(A) iPS cells 處理不同濃度 BP 作用 72 小時後，在螢光顯微鏡下觀察 Nanog-GFP 的表現量。(B) iPS cells 處理不同濃度 BP 作用 72 小時後，在螢光顯微鏡下觀察 SSEA1 的表現量。

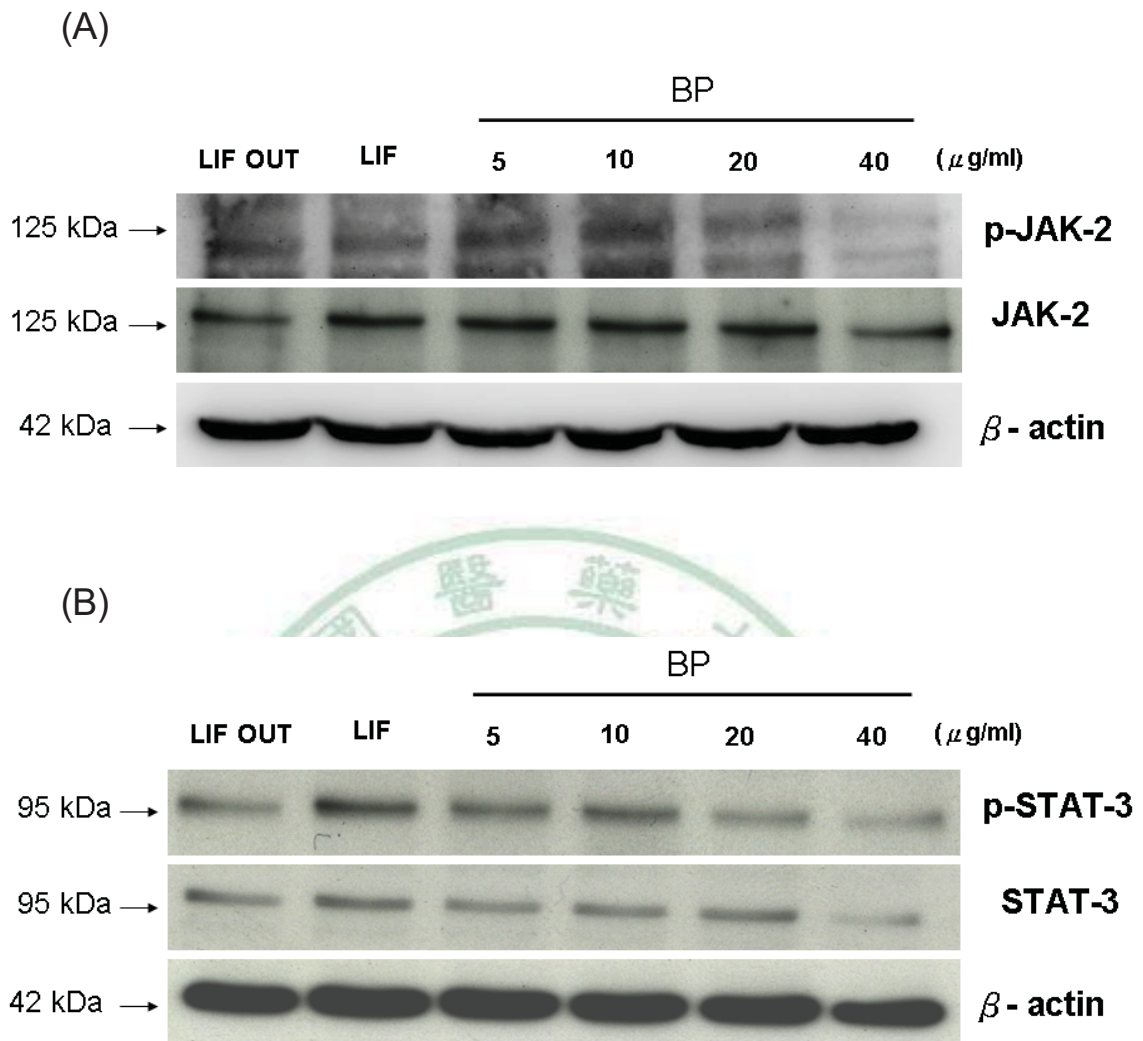


圖十一、利用 BP 取代 LIF 培養 ES cells 三代之後使之形成 EB 分化生成三胚層細胞。

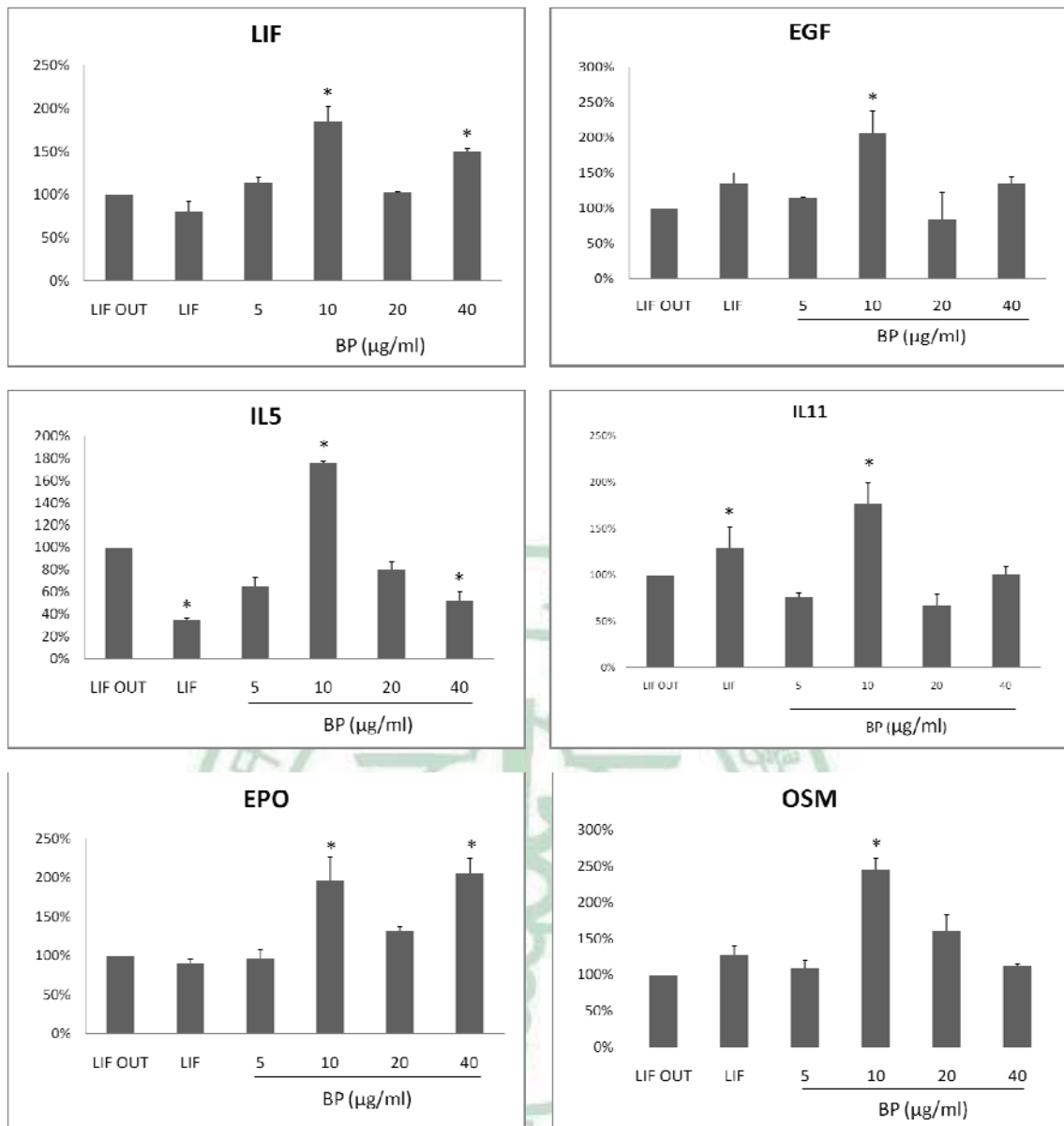


圖十二、利用 real-time PCR 偵測 ES cells 處理不同濃度 BP 作用 72 小時後，
Jak2 和 Stat3 基因表現量。*P < 0.05 versus LIF OUT.

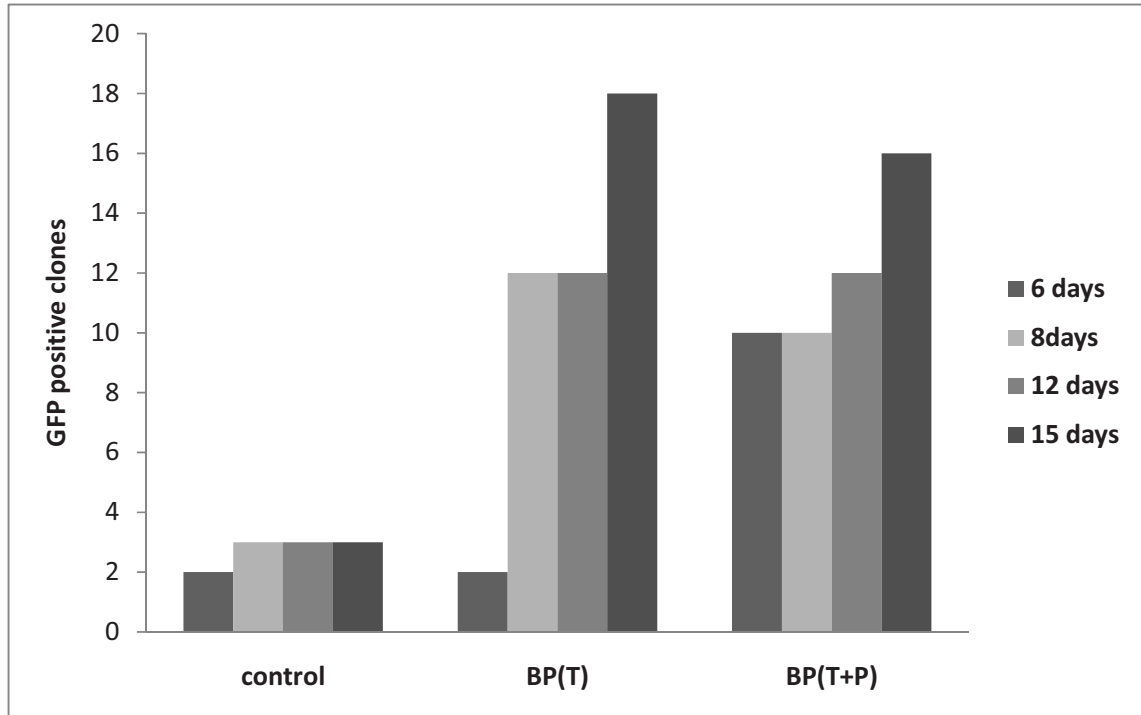




圖十三、(A) ES cells 處理不同濃度 BP 作用 72 小時後，利用 western blot 分析 Jak2 和 phosphorylation-Jak2 蛋白質表現量。(B) ES cells 處理不同濃度 BP 作用 72 小時後，利用 western blot 分析 Stat3 和 phosphorylation-Stat3 蛋白質表現量。



圖十四、利用 real-time PCR 偵測 ES cells 處理不同濃度 BP 作用 72 小時後，LIF, EGF, IL5, IL11, EPO, OSM 基因表現量。*P < 0.05 versus LIF OUT.



圖十五、MEF cells 轉殖 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 同時加入 BP，分別在第六天、第八天、第十二天、第十五天利用螢光顯微鏡觀察並計數 Oct4-GFP positive clones 統計作圖。Control：轉殖 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4；BP (T)：轉殖 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 在轉殖過程中加 BP，之後培養則不加；BP (T+P)：轉殖 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 在轉殖過程和之後培養皆持續加 BP。