

2012 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

編號：090015

作品名稱

以交聯化羊膜為模式探討 Wnt 路徑保存表皮幹細胞
之分子機轉

得獎獎項

大會獎：三等獎

就讀學校：臺北市私立薇閣高級中學

指導教師：陳宏吉、陳明男

作者姓名：馬聖凱

關鍵字：交聯化羊膜、表皮幹細胞、Wnt

作者簡介



如果未曾親眼見證，我想，也許我的視野依舊侷限在課本及題目的字句間。

我是馬聖凱，目前就讀於台北市私立薇閣高中三年級數學資優班。從小樂於探索新事物，並且有著廣泛涉獵的求知慾。興趣為寫作、素描、攝影；而其中最令我嚮往的便是在現象間找到契合的那種邏輯感。曾參加高中生小論文競賽獲得優勝。

感謝實驗室的老師及學長姊，使我得以在顯微鏡下捕捉不同尺度的美，並開啟了我人生新一段探索之旅。

中文摘要

研究目的：以交聯技術改良羊膜，增進其培養並維持表皮幹細胞的效能；並以其

為模式，探討 Wnt 訊息於基底膜上維持表皮幹細胞之機轉。

研究過程：用 EDC 交聯羊膜(HLE/CLDAM)、天然羊膜(HLE/DAM)或純化之基底膜蛋白培養角膜表皮幹細胞，以細胞群落形成作用分析幹細胞之保存；以免疫螢光染色法、real-time PCR 及西方墨點法觀察幹細胞及分化標記之表現、 β -catenin、Tcf4、Lef1、integrin β 1 及 integrin-linked kinase (ILK) 之變化。以 ILK SiRNA 及 cDNA 分別下調或上調 ILK 於 HLE 之表現，並觀察其對 Wnt 相關蛋白質及 p63 表現之影響。

研究結果：HLE/CLDAM 組比 HLE/DAM 組表現更高量的幹細胞群落與標記，並可見 β -catenin 轉移至細胞核、Tcf4 及 ILK 之表現。加入 GSK3- β 抑制劑促進表皮細胞之群落形成及 p63 之表現。調控 ILK 基因可造成相對應之 Wnt 訊息及 p63 蛋白之表現。純化之基底膜蛋白活化 Wnt 訊息及表現 p63 蛋白，但產量很少。

結論：交聯化羊膜比天然羊膜更能保存角膜表皮幹細胞，其機轉為 ILK 活化 Wnt 路徑，後者再作用於 p63 基因，從而活化幹細胞相關因子。

運用：交聯化羊膜可取代天然羊膜培養角膜表皮幹細胞；培養基質表面的複雜性可用來調控幹細胞之分化，從而提高體外培養幹細胞之效能。

關鍵詞：交聯化羊膜、表皮幹細胞、Wnt

Abstract

Purpose:

To cross-link de-epithelialized amniotic membrane (CLDAM) to improve the efficiency of cultivating epithelial stem cells, and to use CLDAM as a model to study the mechanism how Wnt signaling preserves corneal epithelial stem cell on basement membrane.

Process:

Human limbo-corneal epithelial (HLE) cells were cultured on CLDAM, on DAM, and on dish. Colony formation efficiency (CFE) was compared among cells isolated from different substrates. Immunofluorescence microscopy, real-time PCR and Western blot were used to study HLE stem cell markers and differentiation markers, and also β -catenin, Tcf4, Lef1, integrin β 1 and integrin-linked kinase (ILK). ILK SiRNA or cDNA was added to HLE/dish cultures to see the effect on Wnt signal and p63 expression.

Results:

Compared with HLE cells cultured on DAM and dish, cells on CLDAM were more compact in morphology, expressed higher level of p63, ABCG2, keratin 19 and integrin β 1, and lower level of connexin 43 and E-cadherin. CFE was highest in HLE/CLDAM, so were the nuclear expression of β -catenin, Tcf4, integrin β 1 and ILK. SEM showed digestion of natural DAM after cell cultivation, while CLDAM remained intact with prominent extracellular matrix (ECM) deposition. Addition of GSK3- β inhibitors to HLE/dish cultures not only increased CFE but also the expression of stem cell marker p63. Modulation of ILK gene caused a corresponding changes in Wnt signal and p63 expression

Conclusion:

CLDAM showed tendency to better preserve HLE stem cells in vitro, which may be caused by interconnection of ILK and Wnt activation, with the latter subsequently activates p63.

Application:

CLDAM may replace natural AM to better cultivate HLE stem cells in vitro; modulating surface complexity of culture substrate may be a way to improve efficiency of stem cell culture.

Key words: Cross-linking amniotic membrane, limbal stem cell, Wnt

一、前言

(一)、研究動機

幹細胞研究是二十一世紀一項重要發展中的醫療科技，可運用在細胞療法、組織工程、以及再生醫學等研究與應用，冀望對受傷或是病變的細胞、組織甚至器官予以修復或是更換，以治療重大疾患。其中符合倫理的成體幹細胞是當今發展的主流。成體幹細胞的優勢為，若用在自體移植，不會引發免疫排斥的困擾；但和胚胎幹細胞相較，從成體上分離出的幹細胞數量少，且較難培養。

以近年來發展快速、常被用來研究的眼角膜表皮幹細胞為例，臨床已證實以羊膜為基質，體外培養眼角膜表皮幹細胞再用於移植，可有效治療角膜灼傷等表皮幹細胞缺乏症(Shortt et al., 2010)。羊膜是一種天然的基底膜結構，且相對較易取得用於研究，可被視為一種基底膜研究的模式。然而，在培養過程中，羊膜會被細胞所分泌的蛋白酶逐漸溶解，致使利基(niche)結構分解，無法長期維持幹細胞的特性(Li et al., 2006)。因此，我們試圖發展出改良羊膜的技術，找到增強其基底膜結構的方法，希望能加強其培養幹細胞的效能。EDC交聯反應，有強化物質的功能，被廣泛使用於備製生醫材料，因此我們嘗試用交聯反應技術來改良羊膜，加強羊膜利基對蛋白酶分解的抗性，增進其培養並維持角膜表皮幹細胞的特性。

表皮幹細胞之增殖與分化受其所處的微環境(microenvironment) 影響。此微環境，主要包括細胞賴以附著之胞外間質(特別是基底膜蛋白質)，與充滿其間、調控細胞生長的各種生長因子。以往認為羊膜保存幹細胞的機轉是因其內含多種生長因子，如bFGF及KGF(Grueterich et al., 2003)；但我們搜尋網路，沒有找到針對基底膜保存上皮幹細胞分子機轉的文獻。因此，我們希望進一步以交聯化羊膜為模式，探討表皮幹細胞體外培養及保存的分子機轉，藉著對分子機轉的瞭解，或可提升在組織工程領域培養表皮幹細胞的效能。

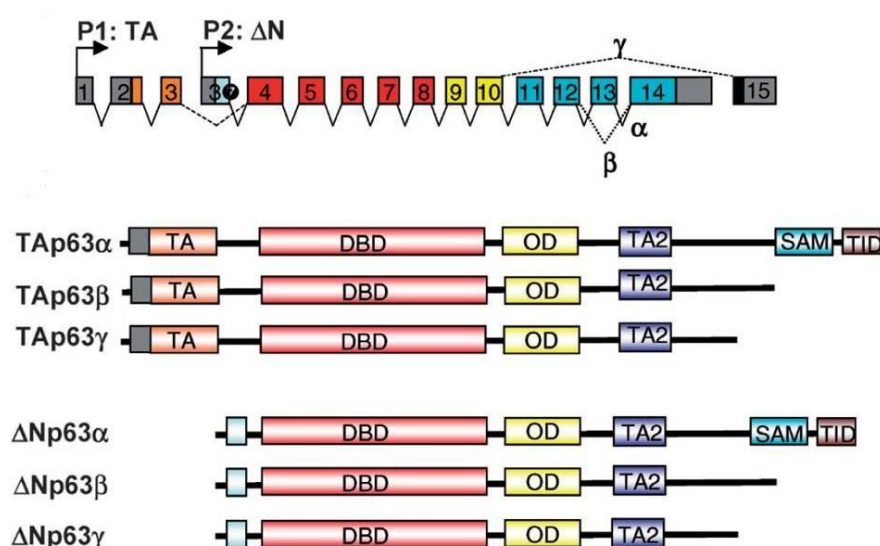
1、角膜表皮幹細胞標記 p63

角膜表皮幹細胞係位於角膜週邊、黑白眼球交接處，稱為眼輪部(limbus) 區域的底層幹細胞，又稱輪部幹細胞。最近十年有關角膜表皮幹細胞增殖之研究，學界的重點主要放在轉錄因子 p63 如何調控角膜表皮細胞之生長。p63 基因結構

類似腫瘤抑制基因 p53，在胚胎發育期表皮與間質之交互作用上扮演主要之角色，是肢體及顱顏部增生，以及胚胎期皮膚或角膜表皮發育與分化所必需(Truong and Khavari, 2007; Candi et al., 2008)。p63 是輪部幹細胞維持增殖能力的最重要轉錄因子，與表皮之複層化有關。該基因產物由 transactivation domain (TAD)、DNA binding domain (DBD)、以及 sterile α motif domain (SAM) 所構成。p63 的 TA(transactivation) isoform 具有 TAD，而 deltaN isoform 沒有。TA 與 deltaN 各有 α 、 β 、 γ 三種 isoform。TAp63 主要與控制細胞凋亡有關；其 γ isoform 的作用相似 p53，可造成細胞周期停止甚至細胞凋亡。

Delta(Δ)Np63 α 是在最具增殖活力的底層表皮細胞主要表現的 isoform，但其表現在表層的已分化表皮細胞就大幅減少。DeltaNp63 α 會和 p21^{WAF1/Cip1} and 14-3-3 σ 之啟動子結合，從而阻止表皮細胞的終末分化(Truong et al., 2006; Vigano et al., 2006)。當 deltaN p63 α 高度表現時，可維持細胞之增生能力而不分化(Wang et al., 2005)。由於 deltaN p63 α 高度表現於輪部幹細胞，而非暫時性增殖細胞，因此被公認為輪部幹細胞之另一可信的標記(Di Iorio et al., 2005)。

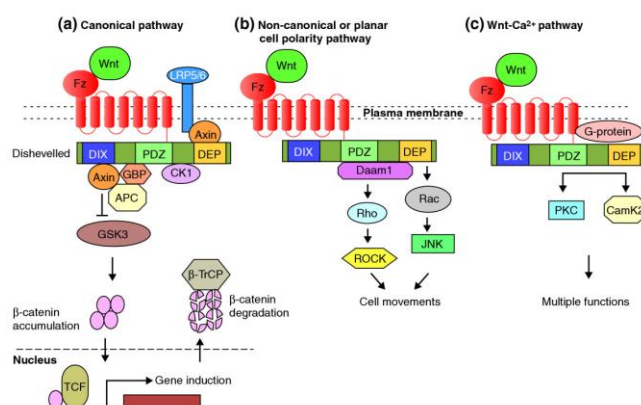
不論 deltaN 或 TA isoform 均可誘發與細胞附著、細胞骨架與細胞週期相關基因之轉錄。DeltaNp63 的 α isoform 目前被公認是輪部幹細胞的最佳標記，且僅在輪部的底層表皮細胞表現。因此，在本研究中我們將以 deltaNp63 α 做為最重要之標記，以檢驗 Wnt 訊息對輪部幹細胞分化之影響。



圖一、轉錄因子p63之基因結構(摘自Candi et al, Cell. Mol. Life Sci. 65:3126–33, 2008)

2、 Wnt/ β -catenin訊息傳遞路徑對輪部幹細胞分化之影響

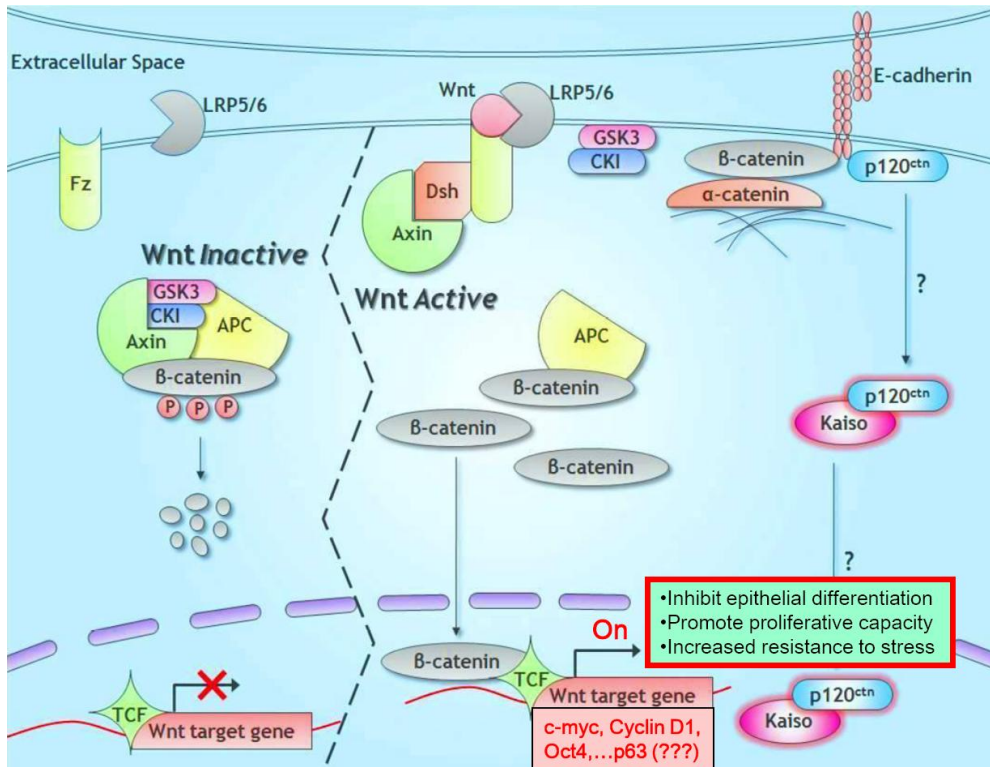
Wnt 訊息傳遞路徑目前被認為會參與胚胎發育過程，會誘導腫瘤生成以及癌症轉移。Wnt 訊息傳遞路徑可分 canonical(標準的)、 non-canonical 及 Wnt- Ca^{2+} 三種調控路徑。第一條路徑主要跟細胞的型態之形成有關；第二條路徑主要跟細胞的移動有關；第三條路徑影響多種功能，包括細胞體軸的形成以及細胞排列的方向性。本研究探討維持幹細胞增殖能力者，主要與 canonical 路徑有關。



圖二、 Wnt 訊息三條傳遞路徑示意圖(摘自 Habas R and Dawid I, Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? Journal of Biology 2005, 4:2-1)

一般狀態下 Wnt 路徑並不活化，此時 glycogen synthase kinase 3 β (GSK3- β)、axin、adenomatous polyposis coli (APC)、casein kinase I (CKI)、與 β -catenin 形成複合體，會磷酸化 β -catenin 而使 β -transducin repeat containing protein (β -TrCP)將 β -catenin 降解。

一般Wnt/ β -catenin路徑活化時，Wnt蛋白會結合到其受體Frizzled (Fz)，且有 cofactor LRP參與，使受體Frizzled (Fz)/ LRP活化，造成LRP被GSK3- β 和CKI 磷酸化，而受體複合體中的Dishevelled會與axin結合，使Axin遠離 β -catenin。因此， β -catenin便不被降解，而在細胞質間穩定地累積，並與HMG DNA結合蛋白如T cell factor (Tcf)-4、lymphoid enhancer factor (Lef)-1等共同進入細胞核而啟動其目標基因如c-myc、cyclin D1、Oct-4等等之轉錄，引發細胞增殖等現象(Akiyama, 2000; Clevers, 2006)。



圖三、 Wnt訊息路徑活化機轉(摘自Nanan K and Daniel J, zinc finger and BTB domain containing 33, Transcription Factor Encyclopedia; <http://www.cisreg.ca/tfe/>)

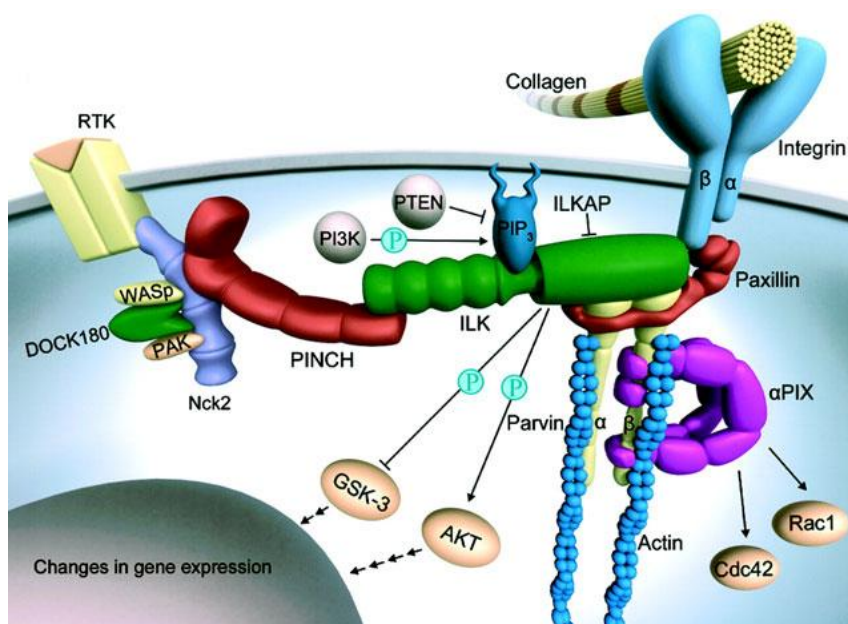
由上可知， β -catenin原本是細胞外骨架E-cadherin與細胞內骨架 α -catenin、actin間的黏附分子。 β -catenin的穩定性及入核現象被視為Wnt/ β -catenin路徑是否活化的主要關鍵。因此觀察 β -catenin於細胞內之分佈對了解Wnt/ β -catenin路徑之活化便十分重要。

最近，Nakatsu等人報告了Wnt蛋白質於輪部表皮層之表現，且觀察到有少量輪部底層表皮細胞 β -catenin位於細胞核之現象。尤其是加入lithium chloride (LiCl; GSK3- β 之抑制劑)於培養之角膜表皮細胞，可促進該培養細胞中幹細胞族群之擴增及幹細胞標記之表現(Nakatsu et al., 2011)。

在國內，Chu 等人發現以 LiCl 抑制 GSK3- β 可刺激 HEK293T 細胞 deltaNp63 啟動子之活性及蛋白質之表現。在他們的研究，由於發現 β -catenin 和 Lef1 共同作用而增進 deltaNp63 啟動子之活性，故 p63 很有可能是 Wnt 訊息傳遞路徑的一個下游標的基因(Chu et al., 2008)。

3、細胞附著於基底膜從而影響 Wnt 訊息傳遞之可能途徑: Integrin- linked kinase 之角色

表皮細胞附著於基底膜蛋白質如第 IV 型膠原蛋白或 laminin-1，需要以 $\alpha1\beta1$ 及 $\alpha3\beta1$ integrin 為其受器。Integrin-linked kinase (ILK) 是一種 serine /threonine 蛋白激酶，與 $\beta1$ 及 $\beta3$ integrin 之 cytoplasmic domain 相連接。ILK 的結構以及其在 focal adhesion 的位置，不但容許 ILK 與不同的結構蛋白(如 Pinch 及 α -Parvin)連結，所形成的 Pinch-ILK-Parvin 複合體，亦可藉由磷酸化分別影響 Akt 及 Wnt 訊息傳遞路徑。ILK 因此被認為與依賴附著的細胞生長、細胞週期變化、移行、細胞骨架之組合及表皮-間質轉換(epithelial-mesenchymal transition)。當受到胞外間質或生長因子的刺激時，不但造成細胞膜上的 E-cadherin 表現下調，且可藉由對 GSK3- β 之磷酸化抑制其活性，使後者不能再將細胞質中的 β -catenin 磷酸化，使得 β -catenin 得以在細胞核內堆積、形成 β -catenin/Tcf 之轉錄複合體，啟動 Wnt 路徑的下游基因(Wu, 2004; Oloumi et al., 2004)。



圖四、 The PINCH-ILK-parvin complexes: assembly, functions and regulation. (摘自 Wu, C. Biochim.Biophys.Acta 1692(2-3), 55-62, 2004.)

Lu 等人亦報導，將角膜表皮細胞培養在低鈣離子濃液之無血清培養液中，表皮細胞形態類似輪部幹細胞，且有較佳之增殖活力，同時發現 β -catenin、Tcf4 及 survivin 之表現均有增加，而加入 Tcf4 之 SiRNA 可抑制培養細胞的增殖活力。這是 β -catenin/ Tcf4/survivin 訊息途徑促進輪部幹細胞表徵的良好證據(Lu et al., 2011)。

利用一系列表皮幹細胞與分化細胞之標記，我們的初步結果顯示，培養於交聯化去上皮羊膜(cross-linked de-epithelialized amniotic membrane; CLDAM)之人類輪部-角膜表皮細胞(human limbo-corneal epithelial cells; HLE cells)，在表徵上與正常輪部表皮細胞相近。在 EDC 交聯前後的生醫材料對所培養幹細胞分化程度之研究，目前還很少。由於 EDC 交聯後的羊膜內已不含有活性之生長因子，因此單靠細胞與基底膜上的胞外間質接觸，後者幾何空間結構，是否就能影響幹細胞之增殖與分化能力，是一個吸引人的假說，而所產生之生存訊息如何從細胞外傳到細胞核，目前亦不甚清楚。

(二) 研究目的

1、培養於交聯化羊膜之人類輪部-角膜表皮細胞幹細胞標記之表現及細胞群落形成能力分析

我們首先要檢視培養在交聯化羊膜之人類輪部-角膜表皮細胞的型態、幹細胞標記之表現，及是否有更高的比例能形成細胞群落(clone)? 單一細胞能形成一個細胞群落，是幹細胞最佳之檢驗方法。

2、以 real-time PCR 檢視相關基因表現

我們將以 ABI 公司的 ABI PRISM 7900 Real-time PCR system 研究 HLE/CLDAM 幹細胞標記、ILK 及 Wnt 訊息傳遞路徑相關基因之消長。

3、觀察 ILK、Wnt 相關蛋白質、p63 蛋白於 HLE/CLDAM 之表現

我們將以螢光免疫染色、西方點墨技術與 real-time PCR，檢視 ILK、 β -catenin、Tcf4 及 p63 在培養於交聯化羊膜之角膜表皮細胞(HLE/CLDAM)之表現，且與 HLE/DAM 及 HLE/dish 兩組相比較。

4、觀察 GSK3- β 抑制劑對角膜表皮細胞細胞群落形成之促進作用

由於 ILK 是藉由將 GSK3- β 磷酸化，從而阻止其對 β -catenin 之抑制作用，因此我們將用小分子 GSK3- β 抑制劑 SB216763 模擬 ILK 導致 Wnt 路徑活化後，對 HLE/dish 細胞群落形成能力之促進，以及讓細胞群落表現 p63 之能力。

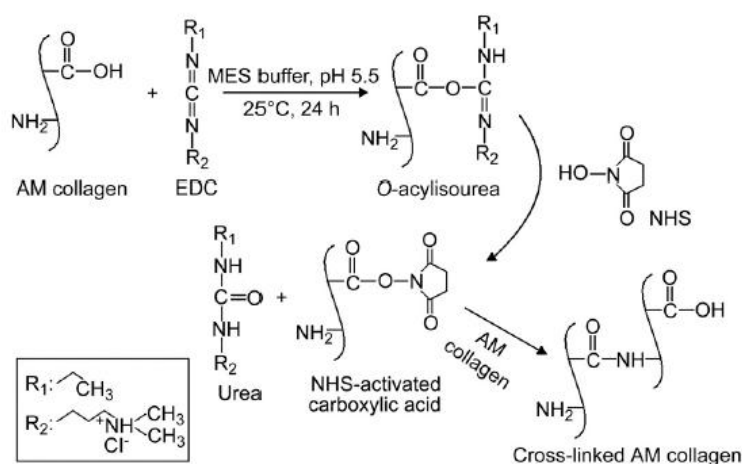
5、調控 ILK 基因以研究 ILK 活化對 Wnt 路徑及 p63 表現之影響

我們將在 HLE/CLDAM 培養中加入 ILK SiRNA，或在 HLE/dish 培養中加入 ILK cDNA，以觀察在 ILK 下調或上調之情況下，Wnt 訊息之抑制/活化狀態，以及下游 p63 表現之消長。

二、研究方法

(一)、羊膜交聯化之製程

1. 本研究所使用的羊膜，由自願捐贈胎盤的足月剖腹產婦取得，該產婦必須無重大感染性疾病病史(如愛滋病及肝炎等)。在捐贈者經解釋說明簽立胎盤捐贈同意書後，測定該捐贈者之血清梅毒、B 及 C 型肝炎及 HIV-1、-2 病毒檢驗須為陰性反應。
2. 依據先前實驗結論得知以 0.05mmol EDC/mg AM 交聯化羊膜可達最佳反應效果，因此本研究均使用該交聯化濃度。首先將羊膜解凍，再以 phosphate buffer saline (PBS) 沖洗乾淨，然後以 0.1% 無菌 EDTA 溶液室溫下作用 30 分鐘，然後以細胞刮除器將羊膜表皮細胞刮除，並小心不要將羊膜刮破。刮除表皮細胞後再於相位差顯微鏡底下觀察，是否所有表皮細胞均已刮除。
3. EDC/NHS 交聯化羊膜之製程，係將羊膜解凍、刮除表皮後以 PBS 沖洗三次，然後在 MES 緩衝溶液中作用 1 小時，再將羊膜置於含 5:1 EDC to NHS molar ratio 之 MES 緩衝溶液中室溫攪拌 24 小時。
4. 以無菌水清洗數次，然後保存於 30% 之酒精中。如此作用後的羊膜，清洗後可被用來做細胞培養實驗。



圖五、羊膜交聯反應示意圖

(二)、細胞培養

1. 本計劃使用角膜移植後的剩餘周圍輪部組織，取其上皮細胞培養做試驗，已獲得醫學倫理暨人體試驗委員會審查通過。本研究使用美國眼庫進口眼角膜進行實驗。由於進口角膜由於已「去聯結化」，衛生署准予不需要取得捐贈同意書。

2. 將天然或交聯化去上皮羊膜鋪在 35 mm 培養皿或 2 well chamber slide 上，並以外植體培養法(explant culture method)培養角膜表皮細胞。將角膜移植後的剩餘周圍輪部組織切成小塊，每塊約 2 X 5 mm，置於培養皿上，以含有 5%胎牛血清之 supplemental hormonal epithelial medium (SHEM)培養細胞，該培養液含有相同比例 HEPES-buffered DMEM 及 Ham's F12 培養液，另含 10 ng/ml recombinant human epidermal growth factor、10 µg/ml insulin 及 40 µg/ml gentamicin。
3. 培養液每三天更換一次。每種實驗條件重複至少三次。
4. 每隔 3-5 天，測量長出皮層之平均直徑，直至長滿整個培養皿。同時定期以相位差顯微鏡照相，紀錄細胞型態。

(三)、細胞群落形成能力分析(colony formation analysis)

1. 首先將 NIH3T3 細胞於 T25 flask 中繼代培養至足量，將近長滿時以 4µg/ml 之 mitomycin C 於 37°C 下作用 2 小時，再將細胞以 trypsin 打下來計數。每個 35mm dish 下 2.5×10^5 個細胞，以含 5%FBS 之 SHEM 培養。
2. 第二天，將培養於 dish、DAM 及 CLDAM 上的角膜表皮細胞以 1.2U dispase II 於 37°C 作用 15 分鐘，再換 0.25% trypsin-EDTA 作用 3-5 分鐘，所收集懸浮細胞置於含 5%FBS 之 SHEM 培養液中並計數。每 cm^2 下 5×10^2 個細胞。
3. 此外，為了解活化 Wnt 路徑對源自 HLE/dish 的表皮細胞形成群落的能力，我們在上述的培養條件中，再加上 GSK3-β 抑制劑 SB216763 (Sigma; 10 µM/mL)。
4. 每 3 天更換培養液直到滿 12 天，以含 4%paraformaldehyde 之 PBS 固定細胞，然後在顯微鏡下數群落之數目或做 2% rhodamine B (Panreac)染色 30 分鐘。每個群落須包含至少 8 個細胞。

(四)、角膜表皮幹細胞標記 p63、ABCG2 以及 ILK 之免疫螢光染色及共軛顯微鏡檢查

1. 於 35 mm dish 上面加鋪天然或交聯化去上皮羊膜，或以 2 well chamber slide 不加鋪羊膜做對照組，再用來培養角膜表皮細胞。
2. 培養物長滿後，分割成約 1 X 1 cm 大小，以 100% 冰甲醇固定細胞 10 分鐘，先加 5% 牛血清白蛋白作用 30 分鐘以阻斷非特異性結合，再加入初次抗體 anti-p63 單株抗體 (1 : 100; Chemicon)、anti-ABCG2 單株抗體 (1 : 50; Calbiochem)、或 anti- Integrinβ1 單株抗體 (1:50; Chemicon)。

3. 在4℃作用一夜。玻片以PBS沖洗後再加入cyanine-3 (Cy3)-conjugated donkey anti-mouse IgG (1: 100; for p63及ABCG2)或FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG (1: 100; for Integrinβ1)室溫作用30分鐘。
4. 玻片沖洗後以Vectashield-PI(for FITC)或Vectashield-DAPI(for Cy3或FITC)作核染色，然後以指甲油封片。未加初次抗體之染色標本，做為陰性對照組。
5. 使用雷射共軛顯微鏡(TCS SP2-MP system; Leica, Heidelberg, Germany)在400倍下對標本5-7μm厚度之區域掃描14張影像並平均之。使用濾鏡為for FITC (excitation 488 nm, emission 500–535 nm), DAPI (excitation 359 nm, emission 450–460 nm), 以及PI (excitation 514 nm, emission 595–633 nm)。

(五)、即時定量聚合酶連鎖反應(Real-time quantitative PCR)

1. 近八成長滿之角膜表皮細胞，先以PBS沖洗，再加500 μL 之 1.2 IU dispase II in PBS 1小時，將表皮細胞與羊膜分離。所得細胞以QIAGEN RNeasy mini kit抽取mRNA，以分光光度計定量後，再以Invitrogen之SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix反轉錄成cDNA。
2. 角膜表皮幹細胞標記deltaNp63及ABCG2的引子(primer)，係基於人類基因庫之序列，利用Primer Express V.2.0 software (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA)軟體所設計出。人類GAPDH基因則被用作內生性對照組。Real-time PCR係使用SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc.)，在ABI PRISM 7900 Real-time PCR system的MicroAmp Optical 96-well plate上操作，每個well加2 μl cDNA。
3. 各基因之相對表現量以 $\Delta\Delta C_t$ 法表示，各基因在培養皿組的表現視為對照組，並以GAPDH之量做校正。

| Primer Name | | Primer Sequence |
|------------------|---|--------------------------|
| Human deltaNp63α | F | CCACCTCCGTATCCCACAG |
| | R | CAACCTCGCTAAGAACTGACAA |
| Human ABCG2 | F | CTTAGACTCAAGCACAGCAAATGC |
| | R | GGTGAGGCTATCAAACAACTTGAA |
| Human GAPDH | F | AATGGAAATCCCATCACCATCT |
| | R | CAGCATCGCCCCACTTG |

| Stage | Cycle | Temperature | Time |
|---------|-------|-------------|--------|
| stage 1 | 1 | 50°C | 2 min |
| stage 2 | 1 | 95°C | 10 min |
| stage 3 | 40 | 95°C | 15 sec |
| | | 60°C | 1 min |
| Stage 4 | 1 | 95°C | 15 sec |
| | | 60°C | 15 sec |
| | | 95°C | 15 ec |

(六)、西方墨點技術 (Western blotting)

在以免疫螢光染色法觀察 β -catenin 在細胞內的位置，由細胞質移到細胞核後，為進一步驗證並分析 Wnt 訊息傳導路徑為交聯化之羊膜為何更能保存角膜上皮幹細胞的重要分子機轉，我們決定採用西方墨點法 (Western blotting)。經過膠體電泳分離的蛋白質轉漬於 PVDF 膜上後，利用特定的蛋白質抗體抓取固定在 PVDF 膜上的特定蛋白質。此偵測法具有可對蛋白質定性與定量之功用。

步驟：

1. 次細胞分群 (subcellular fractionation) 第一步先以有機溶劑破壞細胞架構，此步驟稱為均質化 (homogenization)，須加入蛋白質酶抑制劑。
2. 第二步接著將均質後的混合物分離成不同的部分，離心是最有效且常用的分法。加入胞質萃取有機溶劑後，可先用低速離心的方式，取得上述離心後上清液 (含細胞質)。
3. 再以胞核萃取有機溶劑後，並用高速離心的方式，取得上述離心後上清液 (含細胞核)。
4. 蛋白質樣品以 SDS-聚丙烯胺電泳展開，並轉印到 PVDF 纖維膜上。
5. 將轉漬膜裁成適當大小。PVDF 需以甲醇潤濕後以二次水清洗。
6. 裁好的濾紙、轉漬膜與電泳膠的分離膠部分一起浸泡於轉漬液 5-15 分鐘。
7. 在槽式轉漬器的白金極版上，依序緊密平鋪 2 張濾紙、轉漬膜、膠體、再 2 張濾紙，最後蓋上負極板。
8. 以 5 volt/mm 電極厚度為設定電流基準，固定電壓、通電 60-90 分鐘後，取出轉漬膜，加入適量 blocking buffer，室溫下搖晃 60 分鐘。

9. 以 TBST 清洗轉漬膜 5 分鐘，3 次。
10. 加入以 blocking buffer 適當稀釋的一級抗體溶液於 4°C 下搖晃過夜後，再以 TBST 清洗轉漬膜 5 分鐘，3 次。
11. 加入以適當稀釋的二級抗體於室溫下搖晃 60 分鐘後，以 PBST 清洗轉漬膜 5 分鐘，3 次。
12. 以二級抗體連結酵素呈色劑避光浸泡轉漬膜 3-10 分鐘後，以二次水稍加清洗即可，然後就可以進行壓片。

(七)、ILK SiRNA 對培養於交聯化去上皮羊膜之人類輪部-角膜表皮細胞 (HLE/CLDAM) Wnt 訊息及 p63 表現之影響：

1. HLE 細胞以外植體法培養於交聯化去上皮羊膜上(HLE/CLDAM)，等到長滿 50-70% 可用於實驗。
2. 培養皿以 2 mL 之 transfection medium wash 後，加入含有 60 pmole ILK SiRNA (Santa Cruz) 之 1 mL transfection medium，6 小時後再加入等量之含 10% FBS SLEM。
3. 24 小時後將培養液換成正常之含 5% FBS 之 SLEM。培養 3 天後再重複上述步驟。滿六天後，將培養物用於免疫螢光染色或西方墨點技術，檢視 β -Catenin 有否核轉移，以及 deltaNp63 α 量之消長。
4. 相同操作但未加入 ILK SiRNA 或加入 control SiRNA 之培養皿則當作對照組。

(八)、轉染 ILK cDNA 質體對人類輪部-角膜表皮細胞(HLE/dish) Wnt 訊息及 p63 表現之影響：

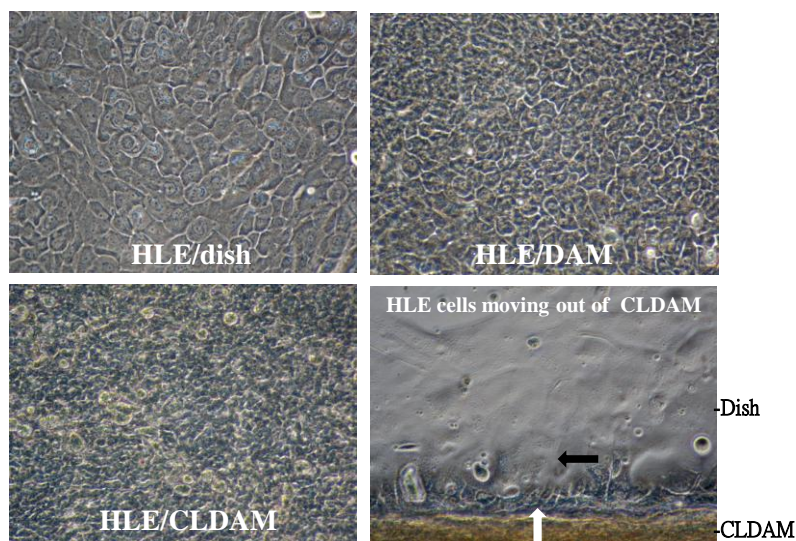
1. HLE 細胞以外植體法培養於培養皿上(HLE/dish)，等到長滿 50-70% 可用於實驗。
2. 含有人類 ILK1 cDNA clone 之質體係自 OriGene 取得。每一個 35 mm 培養皿，以 200 μ L 無血清與抗生素的 transfection medium 稀釋 2.0 μ g ILK plasmid DNA 於 microfuge tube 中，另以 200 μ L transfection medium 稀釋 10 μ g (10 μ L) 的 Arrest-In™ 於另一個 microfuge tube 中，分別混勻再加在一起，在室溫中靜置培養至少 20 分鐘。之後以 transfection medium 稀釋成 1 mL。

- 3.培養皿以 2 mL 之 transfection medium wash 後,加入含有 ILK plasmid DNA 之 1 mL transfection medium, 8 小時後再加入等量之含 10%胎牛血清 SDEM 培養液。
- 4.培養 3 天後再重複上述步驟。滿第 3 及第 6 天收取細胞,做西方墨點實驗觀察 ILK、細胞核 β -catenin、Lef1 及 p63 之表現。
- 5.相同操作但未加入 ILK plasmid DNA 或加入 control plasmid DNA (pCMV-empty vector,Invitrogen)之培養皿則當作對照組。

三、研究結果與討論

結果

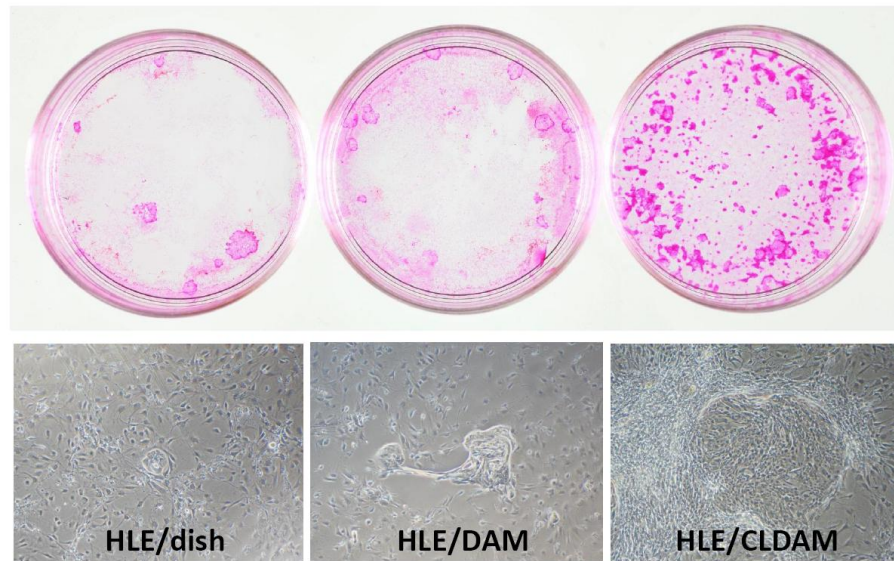
(一)、角膜表皮細胞培養於交聯化羊膜上細胞型態之變化



圖六、培養於培養皿(dish)、天然羊膜(DAM)與交聯化羊膜(CLDAM)之角膜表皮細胞(HLE)之細胞型態及大小之變化(X400)

1. 培養於交聯化羊膜(CLDAM)與天然羊膜(DAM)之人類輪部-角膜表皮細胞(HLE)之型態，比培養於培養皿(dish)者型態更小、細胞密度更高(圖六)。先前之報告顯示，位於輪部表皮底層之角膜表皮幹細胞的體積，遠小於已分化、位於輪部表層之表皮細胞表皮之體積(Romano et al., 2003)。因此，就細胞型態而言，培養於交聯化去上皮羊膜之人類角膜表皮細胞，顯然分化程度較低，更像幹細胞。
2. 有趣的是，圖六右下顯示當角膜表皮細胞自交聯化羊膜爬出(白色箭頭)，接觸到培養皿未被羊膜覆蓋之區域時，細胞面積便擴大(黑色箭頭)。這暗示與羊膜基底膜的直接接觸，是輪部-角膜表皮細胞維持未分化之必要條件，因為一旦這些細胞不與羊膜接觸時，細胞便開始分化而變大。

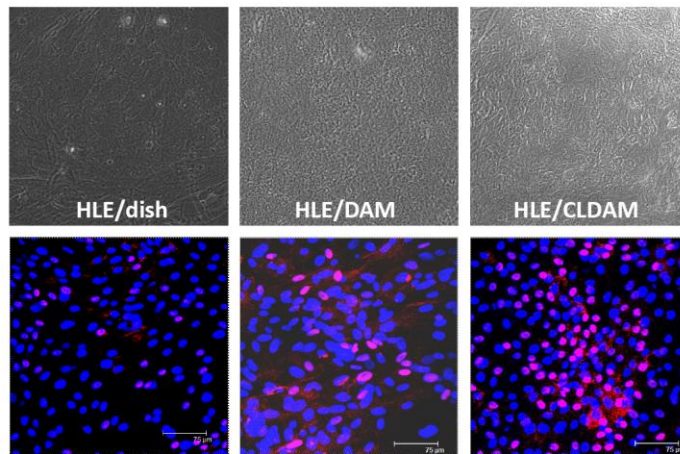
(二)、培養於交聯化羊膜之角膜表皮細胞的細胞群落形成能力比較



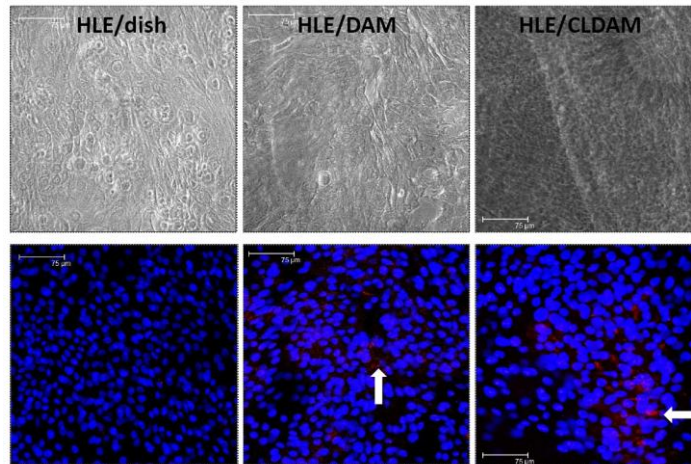
圖七、培養於培養皿(dish)、天然(DAM)或交聯化去上皮羊膜(CLDAM)之角膜表皮細胞(HLE)之群落形成作用。

將培養於培養皿(dish)、天然去上皮羊膜(DAM)或交聯化去上皮羊膜(CLDAM)之角膜表皮細胞(HLE)分離，再低密度接種於 3T3 滋養細胞上，12 天後以所形成之細胞群落數目計算細胞群落形成能力，發現從 HLE/CLDAM 長出之群落，數目最多且面積最大，優於自 HLE/DAM 長出者。反之，從培養皿組接種之細胞，僅長出少數之群落，顯示在後者條件下鮮有幹細胞被保存。觀察單一細胞形成細胞群落是檢視幹細胞功能之最佳證據，因此本實驗是交聯化羊膜保存角膜表皮幹細胞之最佳功能性證據(圖七)。

(三)、角膜表皮幹細胞標記染色



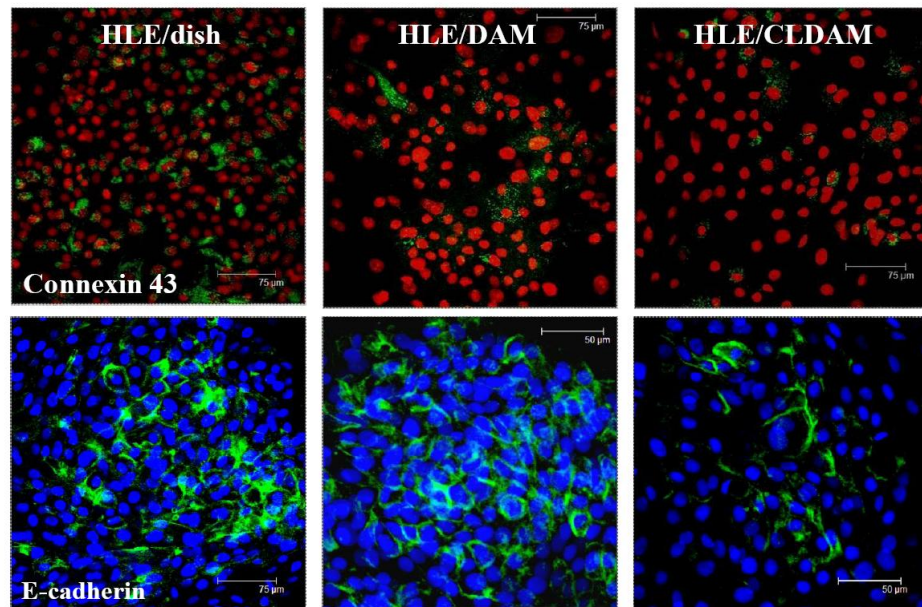
圖八、培養於培養皿(HLE/dish)、天然(HLE/DAM)或交聯化去上皮羊膜之HLE細胞(HLE/CLDAM)細胞核中轉錄因子p63蛋白質之表現



圖九、培養於天然去上皮羊膜(DAM)與交聯化去上皮羊膜(CLDAM)人類輪部-角膜表皮細胞(HLE)之相位差照片與幹細胞標記ABCG2染色(X400)

1. 轉錄因子 p63 之 Cy3 紅色訊號，在 HLE/dish 組僅由小部分細胞表現；培養於 DAM 或 CLDAM 上之角膜表皮細胞，更多細胞表現明顯紅色細胞核染色，顯示在這兩種培養條件下 p63 之表現較強，尤其是在後者(圖八)。
2. 在 HLE/dish 組，幾乎看不到任何 Cy3 之紅色訊號，顯示 ABCG2 在培養皿上的角膜表皮細胞表現很少；培養於 DAM 或 CLDAM 上之角膜表皮細胞，部分細胞表現明顯紅色細胞膜染色(白色箭頭)，顯示在這兩種培養條件下 ABCG2 之表現較強，意味有較多角膜表皮幹細胞存在(圖九)。

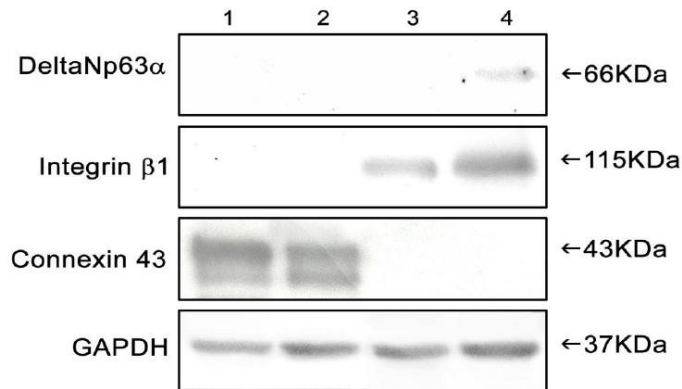
(四)、角膜表皮細胞分化標記染色



圖十、培養於培養皿(HLE/dish)、天然(HLE/DAM)或交聯化去上皮羊膜之角膜表皮細胞(HLE/CLDAM)分化標記connexin-43及E-Cadherin之表現。

1. 培養於培養皿之角膜表皮細胞，有明顯綠色細胞膜染色可見，顯示 gap junction protein connexin 43 在培養皿上的角膜表皮細胞表現強烈，亦即這些細胞大多為已分化之細胞(Grueterich et al., 2002)。培養於天然羊膜或交聯化羊膜上之角膜表皮細胞，僅部分細胞表現綠色細胞質染色，在後者尤其較少。顯示在這兩種培養條件下 connexin 43 之表現較弱，意味多數角膜表皮細胞尚未分化(圖十)。
2. Cadherin 是一種 Ca^{++} -dependent 之 transmembrane receptor，負責細胞與細胞之間的黏合。培養於培養皿之角膜表皮細胞，表現出明顯之綠色細胞膜 E-cadherin 染色，而培養於天然羊膜或交聯化羊膜上之角膜表皮細胞，僅部分細胞表現綠色細胞質染色，顯示在這兩種培養條件下 E-cadherin 之表現亦較弱，意味多數角膜表皮細胞尚未分化(圖十)。

(五)、角膜表皮幹細胞及細胞分化標記西方墨點技術結果

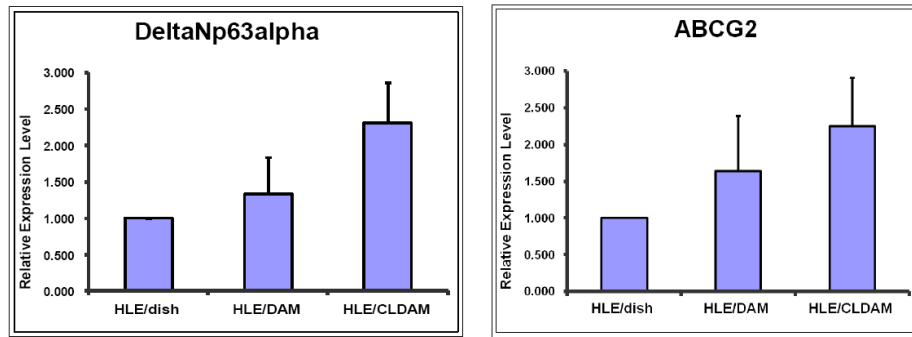


1, 2: HLE / dish; 3: HLE / DAM; 4: HLE / CLDAM

圖十一、培養於培養皿(1、2)、天然(3)或交聯化去上皮羊膜(4)之角膜表皮細胞deltaNp63α、integrin β1及connexin 43蛋白質之表現。以GAPDH做為定量對照。

1. 由於 deltaNp63α 是目前公認角膜表皮幹細胞之最佳標記，但現有免疫染色使用之抗體無法辨識其 α、β、及 γ isoform，且無法藉以定量，因此我們利用西方墨點技術，藉分子量之差別辨識 α isoform 之表現。我們發現 deltaNp63α 主要表現於 HLE/CLDAM 組，而這也是輪部表皮層底部，亦即角膜表皮幹細胞主要表現之 p63 isoform (Robertson et al., 2008)。
2. 某些 integrin，如 integrinβ1 或 α6 可被視為表皮幹細胞之標記，但在眼角膜的表現並非太專一，因為在輪部或角膜皆有，只是在後者量較少 (Chen et al., 2004)。由於 integrinβ1 之表現與 ILK 之活化息息相關，稍後將再提到。
3. Gap junction 蛋白質 connexin 43 及 connexin 50 構成細胞間流通之管道，在全層眼角膜表皮及輪部皮層表面皆有表現。輪部表皮幹細胞因新陳代謝低、與臨近細胞少交流，故不表現 connexin 43 (Wolosin et al., 2000)。HLE/dish 分化程度高，故表現 connexin 43；反之 HLE/DAM 及 HLE/CLDAM 組未見表現 connexin 43 (圖十一)。

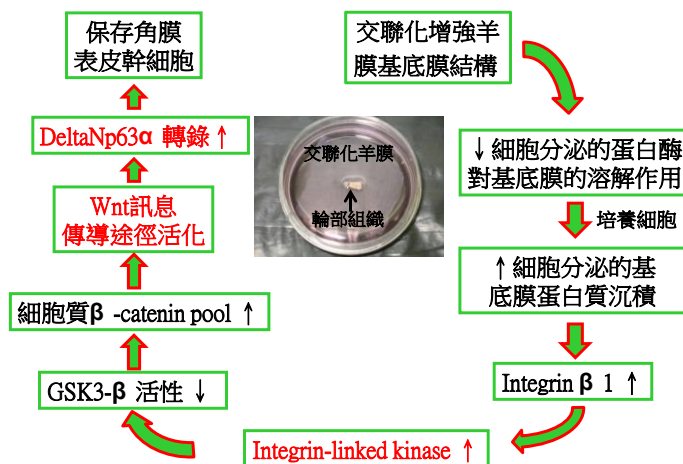
(六)、即時定量聚合酶連鎖反應(Real-time quantitative PCR)



表一、培養於培養皿(HLE/dish)、天然羊膜(HLE/DAM)與交聯化去上皮羊膜(HLE/CLDAM)角膜表皮細胞deltaNp63 α 與ABCG2real-time PCR之結果。

1. 培養於交聯化羊膜與天然羊膜之角膜表皮細胞，其角膜表皮細胞幹細胞標記 deltaNp63 α 與 ABCG2 之 mRNA 表現均比培養於培養皿者顯著增加，尤其是前者；相反地，兩者形成角膜表皮細胞分化標記 connexin 43 mRNA 之量，均比培養於培養皿者低(表一)。
2. 由於免疫螢光染色法只能提供定性之觀察，無法用於定量，使用 real-time PCR 則可將其 mRNA 之表現做定量。由於具有最高的 deltaNp63 α 與 ABCG2 mRNA，交聯化去上皮羊膜比天然去上皮羊膜培養之表皮細胞，有更高比例維持著表皮幹細胞之特性。

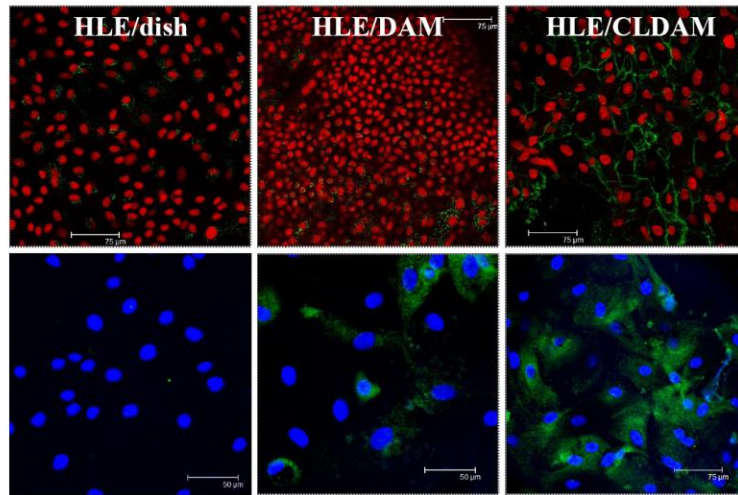
總結前面多項實驗，我們可確認交聯化去上皮羊膜(CLDAM)比天然去上皮羊膜(DAM)或培養皿更能培養及保存角膜表皮幹細胞。但我們無可避免地必須找出肇因之分子機轉。從稍後提到之 integrin β 1 之表現增加，我們可以合理推斷 integrin-linked kinase (ILK)路徑會被活化，且藉由對 GSK3 β 之磷酸化抑制，從而活化 Wnt 訊息路徑。由於 p63 可能是 Wnt 傳遞路徑之下游基因，因此整個的分子機轉可能如下：



圖十二、交聯化羊膜保存角膜表皮幹細胞之可能分子機轉

接下來的研究係針對交聯化去上皮羊膜培養角膜表皮細胞時，ILK 及 Wnt 路徑被活化之情形，以及調控此二路徑對下游 p63 基因表現之影響。

(七)、 Integrin-linked kinase (ILK)表現於培養於去上皮羊膜之角膜表皮細胞



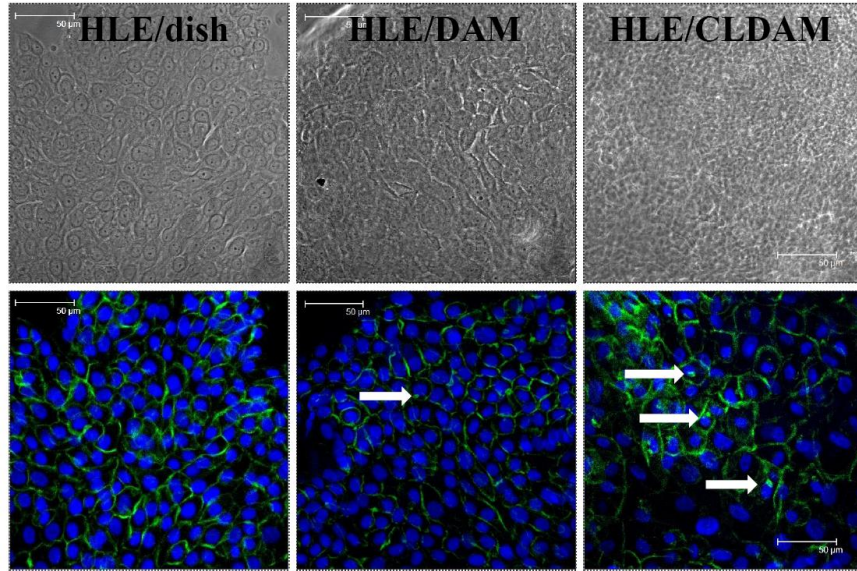
圖十三、培養於培養皿(HLE/dish)、天然羊膜(HLE/DAM)及交聯化羊膜之角膜表皮細胞(HLE/CLDAM)之 integrin $\beta 1$ 與 ILK 之免疫螢光染色

利用免疫染色，我們發現培養於培養皿的角膜表皮細胞幾乎看不到任何 ILK 之訊號；培養於天然羊膜之細胞開始有訊號，而在交聯化之羊膜上 ILK 之訊號非常明顯(圖十三)。

(八)、Wnt 訊息路徑於培養於交聯化羊膜之角膜表皮細胞活化之證據

1、 β -catenin 免疫螢光染色

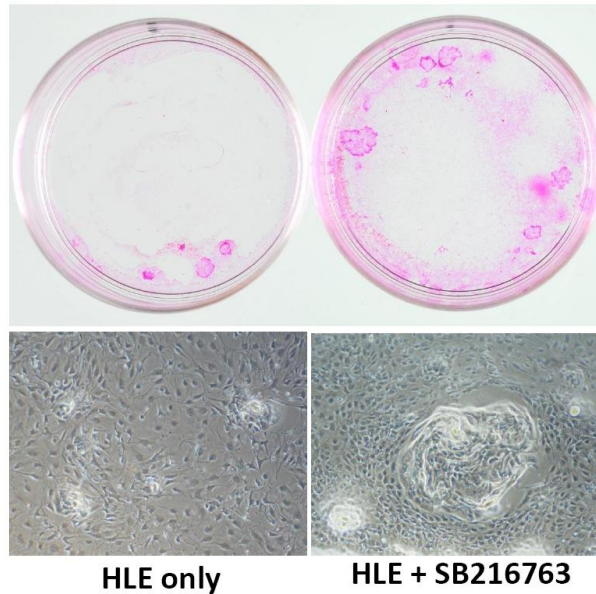
1. Wnt 訊息傳遞路徑之活化，在維持角膜表皮幹細胞活性上扮演重要的角色(Figueira et al., 2007)。觀察該路徑之重要分子 β -catenin 在細胞的位置，有助於了解 Wnt 訊息傳導路徑之活化狀態。
2. 培養於培養皿之角膜表皮細胞(HLE)，其 β -catenin 只在細胞膜表現，顯示 Wnt 路徑未活化；而培養於天然羊膜之細胞，其 β -catenin 則在細胞核開始有表現(白色箭頭)；培養於交聯化羊膜則在多個細胞核 β -catenin 之表現更明顯，顯示 Wnt 訊息傳導路徑已被活化(圖十四)。



圖十四、培養於培養皿(dish)、天然去上皮羊膜(DAM)與交聯化去上皮羊膜(CLDAM)人類輪部-角膜表皮細胞(HLE)之 β -catenin之表現(X600)

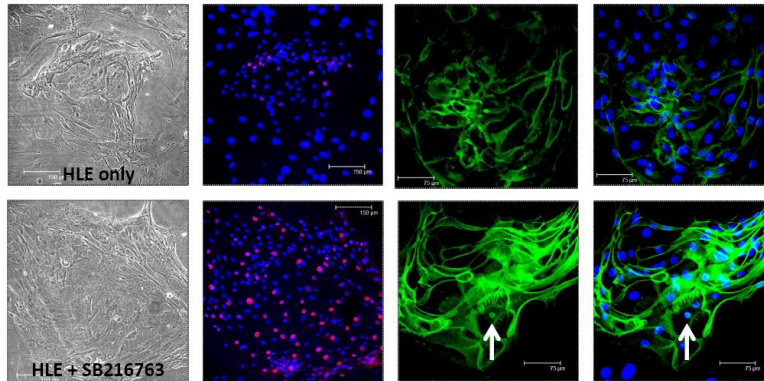
(九)、活化 Wnt 訊息傳遞路徑對培養之角膜表皮細胞的影響

為了驗證培養於交聯化羊膜所造成的角膜表皮幹細胞族群之擴增，是因為 Wnt 訊息活化所促成，我們因此構思在 HLE/dish 培養組中，加入 GSK 3- β 抑制劑 SB216763 以活化 Wnt 路徑，並檢視其細胞群落生成作用、幹細胞標記及 Wnt 訊息分子之表現。



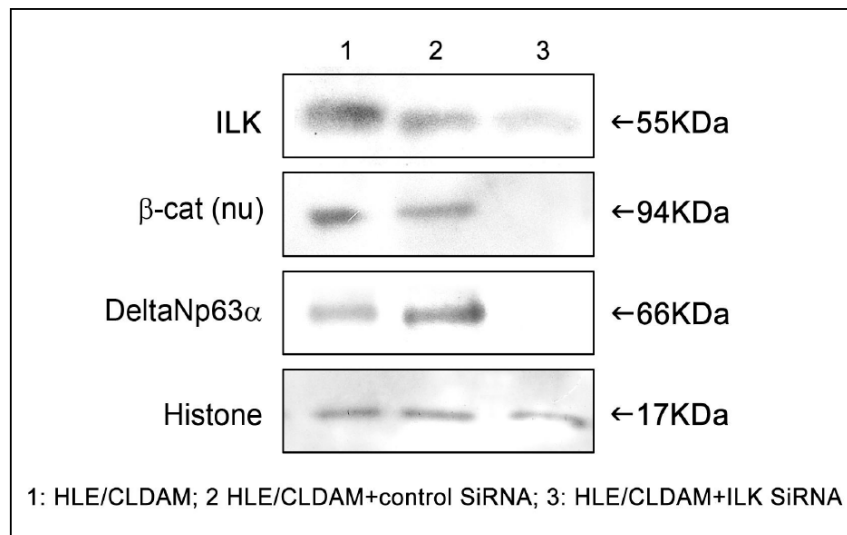
圖十五、GSK3- β 抑制劑對角膜表皮細胞群落形成之促進作用。

我們發現，加入 GSK3- β 抑制劑的 HLE/dish 培養組，其產生細胞群落之能力，均明顯高於對照組(圖十五)。各組 β -catenin 染色形態雖相似，但在少數加入 SB216763 之培養中可見核染色(圖十六白色箭頭)。在 HLE/dish 組長出之細胞群落，僅有少數表現 p63 之免疫染色，但在加入 GSK3- β 抑制劑培養組所長出的群落明顯地表現 p63。



圖十六、取自培養皿之角膜表皮細胞所形成之細胞群落加入 GSK3 β 抑制劑後 p63 與 β -catenin 之表現，箭頭所指為核轉移之 β -catenin。

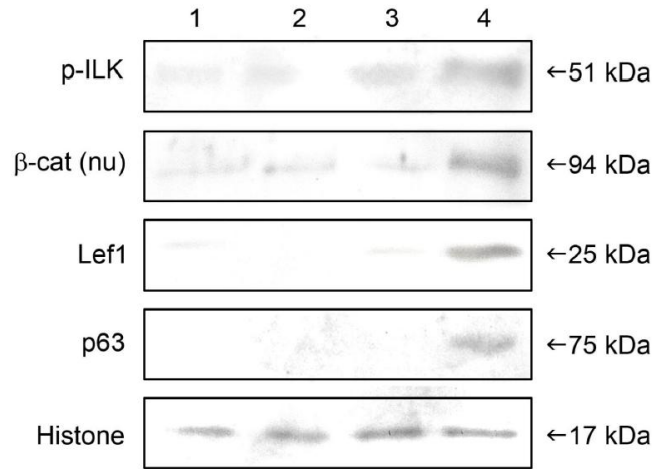
(十)、Integrin-linked kinase(ILK)活化 Wnt 訊息傳遞路徑之探討(I)： 下調 Integrin-linked kinase(ILK)對 Wnt 訊息及 p63 表現之影響



圖十七、ILK SiRNA 對培養於交聯化去上皮羊膜之角膜表皮細胞 (HLE/CLDAM) 細胞核 β -catenin 及 deltaNp63 α 表現之影響。1: 未加試劑之對照組。2: 加入 control SiRNA。3: 加入 ILK SiRNA 六天。

1. 選用 HLE/CLDAM 組做下調 ILK 基因功能之研究，係因該組原本就表現最高量的 ILK，故 silencing 其 mRNA 將可看到最大的下調效果。一般用 SiRNA 兩、三天即可看到標的蛋白質下降的效果，但由於我們還希望看到對其他蛋白質如 Wnt 相關蛋白質或 p63 等的影響，故將 SiRNA 作用期間延至 6 天。我們發現經過 6 天之作用角膜表皮細胞之型態良好，並無明顯脫落死亡現象，顯示短期間無血清狀態或轉染試劑並未對細胞造成傷害。
2. 加入對照 SiRNA 並未造成 ILK 或其他標的蛋白質的下降，顯示所用 SiRNA 之專一性。我們可以看到核內 β -catenin 在加入 ILK SiRNA 後的明顯下降，顯示 Wnt 訊息路徑被抑制。由於 Wnt 路徑原本由 Wnt 配體 (ligand) 與受體 Frizzled 結合後而活化(已於圖三說明)，抑制 ILK 基因間接明顯地抑制了 Wnt 訊息，顯示培養於羊膜之角膜表皮細胞所表現的 Wnt 路徑，主要是由 ILK-Wnt 交互作用而來，而非源自 Wnt ligand 之高度表現。至於 Δ Np63 α 表現的下降，則說明 p63 可能是 ILK-Wnt 途徑之下游標的，有關這點在 ILK 之上調實驗將有更明顯之闡述。

(十一)、Integrin-linked kinase(ILK)活化 Wnt 訊息傳遞路徑之探討(II):
上調 ILK 基因表現對 Wnt 相關蛋白及 p63 蛋白之影響



1: HLE only; 2: HLE+control cDNA; 3: HLE+ILK cDNA 3 days; 4: HLE+ILK cDNA 6 days

圖十八、上調ILK 基因表現對培養於培養皿之角膜表皮細胞(HLE)細胞核β-catenin、Lef1及deltaNp63 α表現之影響。1:未加試劑之對照組。2:加入control cDNA。3:加入ILK cDNA三天。4:加入ILK cDNA六天。

1. 由於培養在培養皿上的角膜表皮細胞(HLE/dish)原本表現 ILK 的量在各組中最低，故適合用於做上調性實驗。如同在下調實驗一般，為觀察上調 ILK 基因後對 Wnt 路徑及 p63 的影響，我們觀察了轉染後第 3 及第 6 天的變化。在轉染第 3 天後 ILK 的量雖已有增加，但核內 β-catenin、Lef1 及 deltaNp63α 尚無明顯變化。到第 6 天 ILK 的量才明顯增加。由於我們用的是偵測磷酸化 ILK 的抗體，故西方墨點實驗所見係有表現活性之 ILK。也只有到了第 6 天這些下游蛋白的產量才明顯增加。在實驗組而非對照組核內 β-catenin 及 Lef-1 的明顯增加，顯示 Wnt 訊息確實已被 ILK 活化。
2. 再者，我們認為本研究整個分生實驗最重要的觀察就是上調 ILK 可造成 deltaN p63α 之高度表現。本實驗模擬了表皮幹細胞與基底膜接觸後，藉由 integrin β1、ILK 及 Wnt 之系列活化，終於啟動了維持表皮幹細胞的主基因 (master gene) deltaN p63α，如此再去支配細胞增生、附著及抗凋亡等相關基因之表現(Carroll et al., 2007)。
3. 曾有報導，p63 可上調細胞黏附相關蛋白如 laminin、integrin，及 β-catenin 及 Wnt 配體 Wnt4、5A 及 10b 之表現(Vigano and Mantovani, 2007)，所

以 ILK-Wnt- p63 這一系統似乎是一種正向回饋（positive feedback）循環。其關鍵在於基底膜須維持完整，否則此一循環會被打斷。然而，為了能更印證此說法，在未來我們尚須檢視經 ILK 上調的角膜表皮細胞，是否能在 3T3 共同培養模式中，產生更多的群落，如此才是表現幹細胞功能之最佳證據。

討論

- (一)、以交聯化羊膜作為角膜表皮細胞之培養基質，藉由觀察培養後的細胞形態、角膜表皮幹細胞標記 p63、ABCG2、integrin β 1 及細胞分化標記 connexin 43 及 E-cadherin 之免疫螢光染色、p63 與 ABCG2 real-time PCR 的結果，以及最重要的細胞群落形成能力分析，我們顯示了交聯化去上皮羊膜在體外培養時能保存表皮幹細胞，而且比天然去上皮羊膜更勝一籌。因為不需要再與 3T3 細胞共同培養，因此可減少人畜共通疾病傳染之機會。
- (二)、羊膜做為保存角膜表皮幹細胞利基(niche)之機轉，以往被認為大部分與羊膜中含有豐富生長因子及特定之胞外間質有關；然而，在羊膜交聯化的過程中會經過酸性與酒精之處理，這些因子應早已失效。我們推論，在本研究，幹細胞之保存與羊膜內富含之生長因子不見得有關。最近 Gentile 等人報告，培養介面的粗糙度本身就可以影響細胞增生(Gentile et al., 2010)。就羊膜做為培養表皮幹細胞之利基而言，或許這種介面的超微結構(nanogeometry)可藉由活化 integrin β 1/ILK 路徑，間接活化 Wnt 訊息，進而傳遞生長訊息。
- (三)、藉由觀察 β -catenin 在細胞位置的改變、細胞核 β -catenin、Tcf4 與 Lef1 西方墨點實驗之結果，我們認為培養於交聯化去上皮羊膜與天然去上皮羊膜的人類角膜表皮細胞，其幹細胞族群之保存應與胚胎幹細胞一般，與 Wnt 訊息傳遞路徑之活化有關。
- (四)、Chu 等人曾發現 β -catenin 和 Lef-1 可共同作用而增進 deltaNp63 啟動子之活性。在本研究，加入 GSK3- β 抑制劑於培養中可活化 Wnt 訊息、增進角膜表皮細胞群落形成能力，同時看到 p63 表現增加，以故 p63 可被視為 Wnt 訊息傳遞路徑的一個下游標的基因(Chu et al., 2008)。
- (五)、在以往，角膜表皮幹細胞之 Wnt 訊息如何被活化並不清楚。為進一步釐清基底膜蛋白質 integrin β 1-ILK-Wnt 訊息之關聯性，我們檢視並發現培養於交聯化羊膜之角膜表皮細胞高度表現 integrin-linked kinase (ILK)。藉由磷酸化 GSK3- β 從而穩定細胞內之 β -catenin，ILK 之活化間接地活化了 Wnt 訊息傳遞路徑。
- (六)、藉由上調 ILK 基因表現觀察到 Wnt 相關蛋白質及 deltaNp63 α 之增加，以及下調 ILK 時，兩者之表現亦隨之減少，我們從而建立了 ILK-Wnt-p63 之訊息路徑，這也就是基底膜之所以能提供表皮幹細胞存活之分子機轉。

四、結論與運用

- (一)、總結本研究以交聯化羊膜做為模式，我們發現藉由 ILK 與 Wnt 訊息傳遞路徑之活化，培養介面的幾何結構(或複雜性)，深遠地影響了表皮幹細胞之分化趨勢；穩定而複雜之基底膜胞外間質結構，較有利於表皮幹細胞之保存。
- (二)、我們的實驗室目前已運用交聯化羊膜培養角膜表皮細胞，成功地治療實驗性大白兔眼角膜灼傷，並無不良反應，證實了本生醫材料之臨床運用價值。
- (三)、表皮幹細胞偏好複雜之培養基質介面，此項特性未來或許可用來調控其他種類幹細胞之分化，例如以奈米科技模擬幹細胞利基(niche)之幾何結構去建構細胞培養基質，從而提高體外培養幹細胞之效能。

五、參考文獻

Reference List

- Akiyama,T. (2000). Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* *11*, 273-282.
- Candi,E., Cipollone,R., Rivetti,d., V, Gonfloni,S., Melino,G., and Knight,R. (2008). p63 in epithelial development. *Cell Mol. Life Sci.* *65*, 3126-3133.
- Carroll,D.K., Brugge,J.S., and Attardi,L.D. (2007). p63, cell adhesion and survival. *Cell Cycle* *6*, 255-261.
- Chen,Z., de Paiva,C.S., Luo,L., Kretzer,F.L., Pflugfelder,S.C., and Li,D.Q. (2004). Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells* *22*, 355-366.
- Chu,W.K., Dai,P.M., Li,H.L., and Chen,J.K. (2008). Glycogen synthase kinase-3beta regulates DeltaNp63 gene transcription through the beta-catenin signaling pathway. *J. Cell Biochem.* *105*, 447-453.
- Clevers,H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* *127*, 469-480.
- Di Iorio,E., Barbaro,V., Ruzza,A., Ponzin,D., Pellegrini,G., and De Luca,M. (2005). Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 9523-9528.
- Figueira,E.C., Di,G.N., Coroneo,M.T., and Wakefield,D. (2007). The phenotype of limbal epithelial stem cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* *48*, 144-156.
- Gentile,F., Tirinato,L., Battista,E., Causa,F., Liberale,C., di Fabrizio,E.M., and Decuzzi,P. (2010). Cells preferentially grow on rough substrates. *Biomaterials* *31*, 7205-7212.
- Grueterich,M., Espana,E., and Tseng,S.C. (2002). Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact and denuded amniotic membrane. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* *43*, 63-71.
- Grueterich,M., Espana,E.M., and Tseng,S.C. (2003). Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv. Ophthalmol.* *48*, 631-646.
- Li,W., He,H., Kuo,C.L., Gao,Y., Kawakita,T., and Tseng,S.C. (2006). Basement membrane dissolution and reassembly by limbal corneal epithelial cells expanded on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* *47*, 2381-2389.
- Lu,R., Bian,F., Zhang,X., Qi,H., Chuang,E.Y., Pflugfelder,S.C., and Li,D.Q. (2011). The

beta-catenin/Tcf4/survivin signaling maintains a less differentiated phenotype and high proliferative capacity of human corneal epithelial progenitor cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 751-759.

Nakatsu,M.N., Ding,Z., Ng,M.Y., Truong,T.T., Yu,F., and Deng,S.X. (2011). Wnt/beta-catenin signaling regulates proliferation of human cornea epithelial stem/progenitor cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 4734-4741.

Oloumi,A., McPhee,T., and Dedhar,S. (2004). Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1691**, 1-15.

Robertson,D.M., Ho,S.I., and Cavanagh,H.D. (2008). Characterization of DeltaNp63 isoforms in normal cornea and telomerase-immortalized human corneal epithelial cells. *Exp. Eye Res.* **86**, 576-585.

Romano,A.C., Espana,E.M., Yoo,S.H., Budak,M.T., Wolosin,J.M., and Tseng,S.C. (2003). Different cell sizes in human limbal and central corneal basal epithelia measured by confocal microscopy and flow cytometry. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 5125-5129.

Shortt,A.J., Tuft,S.J., and Daniels,J.T. (2010). Ex vivo cultured limbal epithelial transplantation. A clinical perspective. *Ocul. Surf.* **8**, 80-90.

Truong,A.B. and Khavari,P.A. (2007). Control of keratinocyte proliferation and differentiation by p63. *Cell Cycle* **6**, 295-299.

Truong,A.B., Kretz,M., Ridky,T.W., Kimmel,R., and Khavari,P.A. (2006). p63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes. *Genes Dev.* **20**, 3185-3197.

Vigano,M.A., Lamartine,J., Testoni,B., Merico,D., Alotto,D., Castagnoli,C., Robert,A., Candi,E., Melino,G., Gidrol,X., and Mantovani,R. (2006). New p63 targets in keratinocytes identified by a genome-wide approach. *EMBO J.* **25**, 5105-5116.

Vigano,M.A. and Mantovani,R. (2007). Hitting the numbers: the emerging network of p63 targets. *Cell Cycle* **6**, 233-239.

Wang,D.Y., Cheng,C.C., Kao,M.H., Hsueh,Y.J., Ma,D.H., and Chen,J.K. (2005). Regulation of limbal keratinocyte proliferation and differentiation by TAp63 and DeltaNp63 transcription factors. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 3102-3108.

Wolosin,J.M., Xiong,X., Schutte,M., Stegman,Z., and Tieng,A. (2000). Stem cells and differentiation stages in the limbo-corneal epithelium. *Prog. Retin. Eye Res.* **19**, 223-255.

Wu,C. (2004). The PINCH-ILK-parvin complexes: assembly, functions and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1692**, 55-62.

評語

1. 本研究探討交聯技術改良羊膜，增進其培養及維持表皮幹細胞之效能，結果顯示交聯化去上皮羊膜能更有效地保存角膜表皮幹細胞，並與ILK及Wnt路徑之活化有關。
2. 本研究具應用價值。