

嘉南藥理科技大學
藥物科技研究所

碩士論文

人類臍帶血 CD34⁺細胞對創傷性腦損傷大鼠血管生成
與神經再生之研究

Human umbilical cord blood-derived CD34⁺ cells
attenuate inflammation but stimulate both angiogenesis
and neurogenesis after traumatic brain injury in rats

指導教授：李冠漢 博士

共同指導教授：陳勝咸 博士

研究生：陳宛詩

中華民國一百零一年六月十九日

嘉南藥理科技大學藥物科技研究所
Graduate Institute of Pharmaceutical Science
Chia-Nan University of Pharmacy and Science

碩士論文

Thesis for the Degree of Master

人類臍帶血 CD34⁺細胞對創傷性腦損傷大鼠血管生成與神經
再生之研究

Human umbilical cord blood-derived CD34⁺ cells attenuate
inflammation but stimulate both angiogenesis and neurogenesis
after traumatic brain injury in rats

指 導 教 授：李冠漢 博士 (Dr. Kuan-Han Lee)

共同指導教授：陳勝咸 博士 (Dr. Sheng-Hsien Chen)

研 究 生：陳宛詩 (Wan-Shih Chen)

中華民國一百零一年六月十九日

19, June 2012

嘉南藥理科技大學

碩士學位考試委員會審定書

本校 藥物科技研究所 碩士班 陳宛詩 君

所提論文 人類臍帶血 CD34⁺細胞對創傷性腦損傷大鼠血管

生成與神經再生之研究

Human umbilical cord blood-derived CD34⁺ cells

attenuate inflammation but stimulate both angiogenesis

and neurogenesis after traumatic brain injury in rats

合於碩士資格水準，業經本委員會評審認可。

考試委員：張峰銘 博士

張峰銘

陳勝咸 博士

陳勝咸

呂尚謙 博士

呂尚謙

李冠漢 博士

李冠漢

指導教授：李冠漢 博士

李冠漢

系主任（所長）：



中華民國 101 年 6 月 19 日

中文摘要

過去研究顯示，臍帶血含有低於 0.2% 的造血幹細胞 (CD34⁺)，在液體撞擊腦創傷 (FPI) 的動物實驗模式，具有減少神經受損的功效。本研究主要是純化臍帶血的 CD34⁺ 細胞 (大於 95%)，研究幹細胞改善 FPI 大鼠的機轉。實驗大鼠共分三組：(1) 對照組；(2) FPI 並移植 CD34⁺ 細胞 (5x10⁵ 臍帶血淋巴球與單核球，含有 0.2% CD34⁺ 細胞)；(3) FPI 並移植 CD34⁺ 細胞 (5x10⁵ 臍帶血淋巴球與單核球，含有 95% CD34⁺ 細胞)。FPI 四天後評估實驗大鼠的行為障礙與腦梗塞、發炎、細胞凋亡、血管生成和神經再生。與對照組相比，CD34⁺ 細胞治療 FPI 大鼠，仍有運動與認知障礙、腦梗塞、細胞凋亡和發炎現象。藉由 CD34⁺ 細胞治療，可以明顯減緩 FPI 導致的神經損傷與腦梗塞、細胞凋亡和發炎現象。此外，CD34⁺ 細胞可以移至受損腦部，有效地促使受損區域的血管新生與神經再生。

本研究結果顯示，純化臍帶血 CD34⁺ 造血幹細胞，對於減緩創傷性腦損傷的大鼠，可能具有療效。

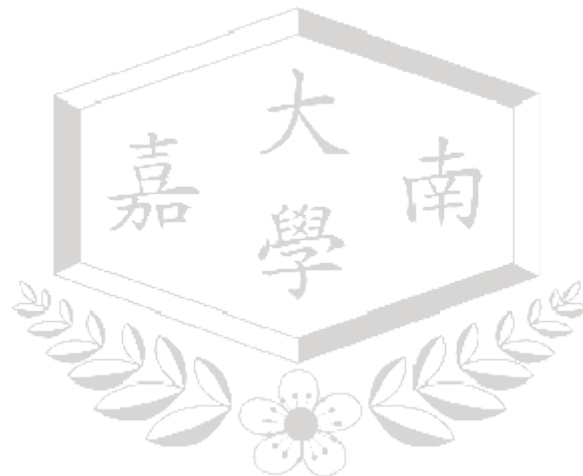
關鍵字：創傷性腦損傷、CD34⁺ 造血幹細胞、細胞凋亡、發炎、血管生成、神經再生

Abstract

Umbilical cord blood contained $<0.2\%$ $CD34^+$ cells have been shown to be beneficial in reducing neurological deficits in animals after fluid percussion injury (FPI). This study aimed to generate cord blood-derived $CD34^+$ cells ($>95\%$) and to investigate the mechanisms underlying their beneficial effects in treating FPI in rats. Rats were divided into three groups: (1) sham operation; (2) FPI+ $CD34^-$ cells (5×10^5 cord blood lymphocytes and monocytes that containing $<0.2\%$ $CD34^+$ cells); and (3) FPI+ $CD34^+$ cells (5×10^5 cord blood lymphocytes and monocytes that contained 95% $CD34^+$ cells). Behavioral dysfunction and brain infarction, inflammation, apoptosis, angiogenesis, and neurogenesis were evaluated 4 days post FPI. As compared to sham operation controls, $CD34^-$ -treated FPI rats had motor and cognitive dysfunctions and cerebral infarction, apoptosis, and inflammation. FPI-induced neurological dysfunction and cerebral infarction, apoptosis, and inflammation could be significantly attenuated by $CD34^+$ cell therapy. In addition, $CD34^+$ cells migrated to the injured brain regions and significantly promoted both angiogenesis and neurogenesis in the injured brain.

The results indicate that therapy using umbilical cord blood-derived CD34⁺ cells may be beneficial in attenuating traumatic brain injury in rats.

Key words: Traumatic brain injury; CD34⁺ cells; apoptosis; inflammation; angiogenesis; neurogenesis.



誌謝

此篇論文順利的完成，首先要感謝兩位恩師陳勝成教授及李冠漢教授在這兩年來不辭辛勞且竭盡心力的對我指導。另外口試期間亦也特別感謝張峰銘教授及呂尚謙教授對碩士論文疏漏之處的中肯建議，使得本篇論文更具完整。

能夠踏入藥物科技研究系所，讓我最感恩的還是最敬愛的父親、母親、哥哥及蕭阿宏，因為念了五年護理科畢業的我在原本還擔心不能勝認這非熟悉領域下，有了家人的支持及鼓勵，讓我擁有信心而取得碩士學位。在這兩年的學習期間，真的很慶幸讓我遇到了好的班導師劉國勝老師及好同學銀彬、肇堯、景祥及惠珍，雖然每週週末上課都要從北部坐車到南部，但有了吳進福大哥、經宜學長、冠伶，號稱往北一族的我們讓趕路之餘不感到孤單，更因為經宜學長在課業的照應及督促下，讓我有更想與大家一起畢業的決心。

很感謝生寶臍帶血公司給我機會出來進修，也很謝謝在工作上幫助過我的所有生寶同事們及課業上協助我的好夥伴慕梅。能夠在半工半讀下讓我學會天下沒有做不到的事，只要有心外加多點努力及堅持，人人都可以做得這不可能的事。

最後也很感謝在實驗過程中鼎力相助的家俐、維真、宗翰及乃楨。

目 錄

中文摘要.....	I
英文摘要	II
誌謝	IV
目錄	V
圖目錄.....	VIII
表目錄.....	XI
常用縮寫及專有名詞.....	XII
第一章 緒論	1
第一節 創傷性腦損傷.....	4
第二節 幹細胞介紹.....	6
第三節 大腦海馬介紹.....	12
第四節 研究目的.....	14
第二章 材料與方法.....	15
第一節 實驗材料.....	15
第一項 實驗藥品.....	15
第二項 實驗儀器.....	16
第三項 實驗動物.....	19

第二節	實驗方法	20
第一項	手術	20
第二項	生理參數監測	22
第三項	微透析測量大腦海馬回之麩氨酸、甘油、乳酸鹽/ 焦葡萄糖鹽和一氧化氮代謝物	23
第四項	人類造血幹細胞之準備	24
第五項	實驗分組	25
第六項	實驗過程	26
第七項	運動功能的評估	28
第八項	認知功能的評估	29
第九項	內皮前驅細胞	30
第十項	腦梗塞評估	31
第十一項	凋亡細胞之凋亡檢測	32
第十二項	溴脫氧尿嘧啶核苷標記	32
第十三項	免疫組織化學染色	33
第十四項	細胞激素的測定	35
第十五項	統計分析	36
第三章	實驗結果	37
第一節	CD34 ⁺ 細胞改善 FPI 大鼠所引發的顱內壓升高和腦部血	

灌注降低.....	37
第二節 CD34 ⁺ 細胞改善 FPI 大鼠所引發的腦缺血和神經元損傷.....	39
第三節 CD34 ⁺ 細胞改善 FPI 引發的運動和認知功能障礙...	41
第四節 CD34 ⁺ 細胞改善 FPI 引發的腦梗塞.....	45
第五節 CD34 ⁺ 細胞改善 FPI 引發的腦神經細胞凋亡.....	47
第六節 CD34 ⁺ 細胞治療 FPI 刺激血管生成.....	52
第七節 CD34 ⁺ 細胞治療 FPI 刺激神經再生.....	56
第八節 CD34 ⁺ 細胞改善 FPI 引發的炎症反應.....	61
第九節 CD34 ⁺ 細胞治療 FPI 提高循環內皮先祖細胞.....	63
第十節 經由免疫組織化學染色測定 CD34 ⁺ 細胞到達 FPI 損傷區域.....	65
第四章 討論.....	67
第五章 結論.....	72
第六章 參考文獻.....	73
英文部分.....	73
中文部分.....	86

圖目錄

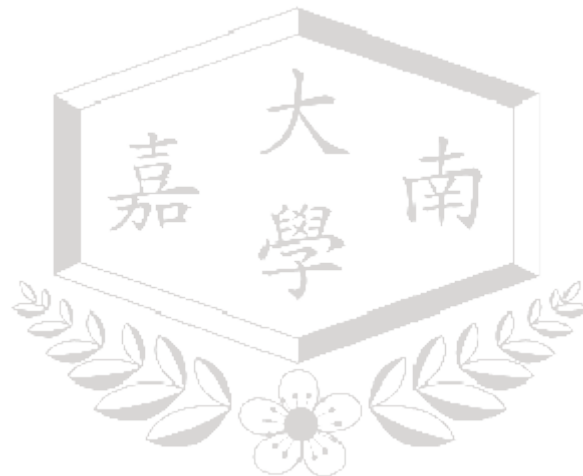
- 圖 1-3: 大腦海馬之區域..... 12
- 圖 3-1: 顯示 (●) 為假手術組, (○) 為 CD34⁻細胞處裡的 FPI 鼠組, (▼) 為 CD34⁺細胞處裡的 FPI 鼠組, 其 MAP, HR, ICP, CPP 之數據呈現.....38
- 圖 3-2: 於 FPI 期間之體內核心溫度, 麩氨酸, 甘油, 乳酸鹽, 焦葡萄糖酸鹽的比例。(●) 為假手術組, (○) 為 FPI 八隻鼠以靜脈注射 CD34⁻細胞之數值, (▼) 為 FPI 八隻鼠以靜脈注射 CD34⁺細胞之數值..... 40
- 圖 3-3-1: 顯示於最大角度動物能夠緊貼傾斜平面。(□) 為 FPI 後在 Morris 水迷宮設備平台的潛伏期 1-7 天假手術組, (▨) 為 CD34⁻細胞處裡的 FPI 大鼠組, (▩) 為 CD34⁺細胞處裡的 FPI 大鼠組..... 43
- 圖 3-3-2: 顯示 (□) 為 FPI 後在 Morris 水迷宮設備平台的潛伏期 1-7 天假手術組, (▨) 為 CD34⁻細胞處裡的 FPI 大鼠組, (▩) 為 CD34⁺細胞處裡的 FPI 大鼠組..... 44
- 圖 3-4-1: 組織學檢查腦組織梗塞體積, 由假手術對照比較, FPI 後第 4 天 CD34⁻細胞處裡的大鼠和 FPI 後第 4 天 CD34⁺細胞處

理的大鼠.....	46
圖 3-5-1：TUNEL 染色在腦組織經由假手術對照組，FPI 後的第 4 天用 CD34 ⁻ 細胞治療組和 FPI 後的第 4 天用 CD34 ⁺ 細胞治療組.....	48
圖 3-5-2：免疫組織化學檢測的 caspase-3 陽性細胞在腦組織中經由假手術對照組，FPI 後的第 4 天用 CD34 ⁻ 細胞治療組，和 FPI 後的第 4 天用 CD34 ⁺ 細胞治療組.....	50
圖 3-6-1：免疫組織化學檢測的 BrdU/內皮雙陽性細胞在腦組織中的假手術對照組，FPI 後第 4 天用 CD34 ⁻ 細胞治療大鼠組和 FPI 後第 4 天用 CD34 ⁺ 細胞治療大鼠組.....	53
圖 3-6-2：免疫組織化學組檢測腦組織的血管內皮生長因子陽性細胞的假手術對照組，FPI 後第 4 天用 CD34 ⁻ 細胞治療大鼠組和 FPI 後第 4 天用 CD34 ⁺ 細胞治療大鼠組.....	54
圖 3-7-1：腦組織中免疫組織化學檢測的假手術對照組，FPI 後第 4 天用 CD34 ⁻ 細胞治療大鼠組和 FPI 後第 4 天用 CD34 ⁺ 細胞治療大鼠組.....	57
圖 3-7-2：腦組織中免疫組織化學檢測 GDNF 的陽性細胞假手術對照組，FPI 後第 4 天用 CD34 ⁻ 細胞治療大鼠組和 FPI 後第 4 天用 CD34 ⁺ 細胞治療大鼠組.....	59

圖 3-8：顯示與假手術對照比較，FPI 後第 4 天 CD34⁻細胞處置的大鼠組和 FPI 後第 4 天 CD34⁺細胞處置的大鼠組…………… 62

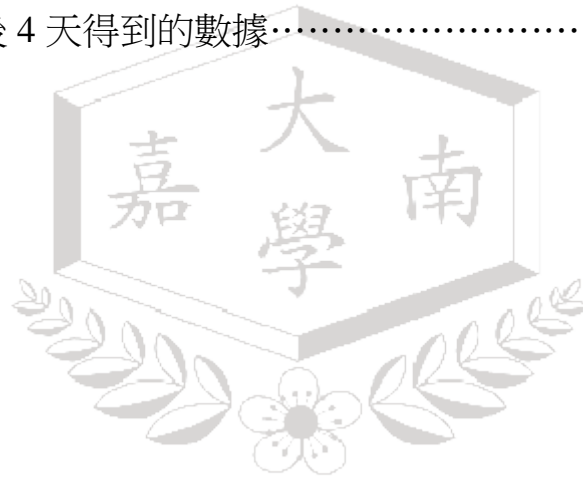
圖 3-9：顯示與假手術對照比較，FPI 後第 4 天 CD34⁻細胞處置的大鼠組和 FPI 後第 4 天 CD34⁺細胞處置的大鼠組…………… 64

圖 3-10：腦組織中免疫組織化學染色測定的假手術對照比較，FPI 後第 4 天用 CD34⁻細胞處置的大鼠組和 FPI 後第 4 天用 CD34⁺細胞處置的大鼠組…………… 66



表目錄

表 1-2: 幹細胞比較.....	11
表 2-1-1: 實驗藥品.....	15
表 2-1-2: 實驗儀器.....	16
表 3-3-1: 假的行為和組織化學特性操作大鼠組, FPI 與 CD34 ⁻ 細胞控制組(FPI+CD34 ⁻)和 FPI 與 CD34 ⁺ 細胞治療組(FPI+CD34 ⁺), 注射後 4 天得到的數據.....	42



常用縮寫及專有名詞

HUCBCs : (Human umbilical cord blood cells) 人類臍帶血球細胞

CD34⁺ : (Hematopoietic stem cells surface marker) 造血幹細胞標記

PBMCs : (peripheral blood mononucleocytes) 人類周邊血單核球

Tco : (core temperature) 核心溫度

Tbr or TB : (brain temperature) 大腦溫度

Ta : (ambient temperature) 環境溫度

HR : (Heart Rate) 心跳速率

MAP : (mean arterial pressure) 平均動脈壓

ICP : (Intracranial pressure) 顱內壓

CPP : (Cerebral perfusion pressure) 顱內灌流壓

ES cells : (Embryonic stem cells) 胚胎幹細胞

TBI : (Traumatic brain injury) 創傷性腦損傷

FPI : (Fluid percussion brain injury) 液體撞擊設備建立腦創傷

ICM : (Inner cell mass) 內部細胞團

HES cells : (human embryonic stem cells) 人類胚胎幹細胞

SD : (Sprague-Dawley) 大鼠

iv : (intravenous) 經靜脈給予

ip : (intraperitoneal) 經腹腔給予

IL : (interleukin) 細胞介質素 (如 IL-1 β , IL-6, IL-10)

TNF : (如 Tumor Necrosis Factor- α) 腫瘤壞死因子

TUNEL : (TUNEL assay for apoptotic cells) 凋亡細胞之凋亡檢測

ELISA : (Enzyme-linked immunosorbent assay) 酵素結合免疫吸收
分析法

GDNF : (Glial cell-derived neurotrophic factor) 神經膠質細胞衍生之
神經滋養因子

VEGF : (Vascular endothelial growth factor) 血管內皮生長因子

GVHD : (Graft-versus-Host Disease) 移植體對宿主反應

HLA : (human leukocyte antigen) 人類白血球組織抗原

MWM : (Morris water maze learning) 莫氏水迷宮

第一章 緒論

美國每年有 80,000 人至 90,000 人患有創傷性腦損傷 (Traumatic brain injury ; TBI) 的疾病 (Thurman et al., 1999)。創傷性腦損傷是先進國家在有限的治療方式，面對腦部殘疾和死亡的首要原因 (Nortje and Menon, 2004)。創傷性的半暗區是有階段性的修復過程，可能是幾小時或幾天後才能修復 (Keeling et al., 2000; Lenzlinger et al., 2001; Ray et al., 2002; Stanimirovic and Satoh 2000)。用液體撞擊設備建立腦創傷 (Fluid percussion brain injury ; FPI) 的動物實驗導致創傷性腦損傷，在二次的細胞及分子處理過程，包括發炎，興奮性毒性，氧化壓力都有可能導致延緩神經元的喪失 (Morganti-Kossmann et al., 2001, 2007)，這是一種典型大腦皮質區或海馬回的觀察 (Gennarelli and Graham 1998; Kuo et al., 2010)。在成人的腦部 FPI 造成神經元的損失，可能會導致神經元持續再生 (Kuo et al., 2010; Chen et al., 2009; Quinones-Hinojosa et al., 2006; Sanai et al., 2004) 及血管新生的功能喪失 (Kuo et al., 2010; Chen et al., 2009; Jin et al., 2002; Taguchi et al., 2004)。

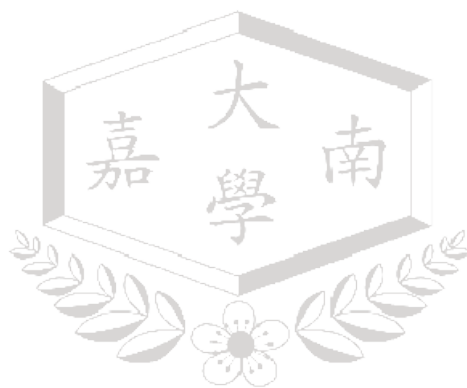
臍帶血是 CD34⁺細胞和其他幹細胞/前驅細胞的豐富來源。由臍帶血誘導出的幹細胞，在脊髓損傷 (Walczak et al., 2004)，中風 (Willing

et al., 2003), 和肢體缺血的細胞治療具有潛在用途(Lian et al., 2010)。特別是，臍帶血具有豐富的未成熟的幹細胞，與成人骨髓細胞移植相比它具有相對較低的免疫抗原性 (Walczak et al., 2004)。根據 Lu 等人 (2002) 的研究結果，在大鼠 FPI 後給予靜脈注射臍帶血有核細胞 (含有 $<0.2\%$ CD34⁺細胞) 可降低神經缺損並且用於治療創傷性腦損傷。在老鼠動物模式下的臍帶血幹細胞發現到可以進入腦部，並且會誘導循環到受損區域作用，進而降低腦部神經的損傷。同樣，臍帶血幹細胞移植也可以減輕在大鼠模型中的新生兒腦性麻痺的症狀，改善神經系統的顯著效果 (Meier et al., 2006)。

另一項研究顯示，臍帶血幹細胞移植到脊髓損傷動物會分化成各種神經細胞，改善神經軸突的再生及運動功能的恢復(Kuh et al., 2005)。而在德州休斯頓的德克薩斯大學有 FDA 註冊合法利用自體臍帶血幹細胞輸注的臨床試驗，在治療兒童的創傷性腦損傷的基礎上(Cox and Baumgartner, 2008, UT Health Sciences Center, Houston, Texas, personal communication)，與自體相似的骨髓幹細胞以大量的動物實驗研究顯示，幹細胞治療創傷性腦損傷的模型有成功的結果 (Harting et al., 2008)。但是，臍血來源的 CD34⁺細胞神經保護作用的基本機制仍不清楚。

此外，人類臍帶血幹細胞對創傷性腦損傷具有降低腦部神經損傷的

再生與修復作用是應該被探討，因此，利用大鼠 FPI 後的實驗來進行研究，將探討人類臍帶血衍生出 CD34⁺細胞，和 CD34⁻細胞 (<0.2%，CD34⁺細胞) 使用上的比較，以及給與人類臍帶血幹細胞去治療大鼠因 FPI 後所產生腦梗塞、細胞凋亡、發炎、血管生成、神經再生、運動神經和認知功能障礙後的療效評估。



第一節 創傷性腦損傷

創傷性腦損傷，也稱為腦損傷或頭部損傷，是由外傷所引起的腦組織損傷。腦損傷分為兩種類型（Gregory et al., 1997）：

- 一、 閉合性腦損傷：是由於運動中的頭部遭到急停，例如：被鈍物撞擊或撞到擋風玻璃，導致使顱骨內的腦髓撞擊堅硬的骨質層。頭部未受到直接外傷，但在頭部快速前後運動情況下也會發生閉合性腦損傷，例如：頸部過度的屈伸或嬰兒受到搖動時導致。
- 二、 貫穿性腦損傷：是由於快速移動的物體，例如：子彈穿透顱骨所導致。

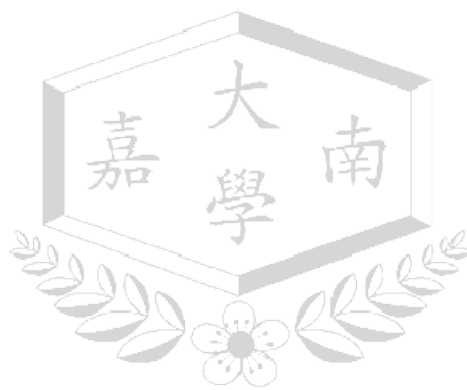
閉合性腦損傷及貫穿性腦損傷都有可能造成大腦局部性及彌漫性的損害（Gregory et al., 1997）。創傷性腦損傷受損程度從輕度（例如：精神狀態或意識短暫受到改變）到重度（例如：損傷後長期無知覺或失憶）。而腦損傷都有可能導致短期或長期的運動功能障礙。

造成創傷性腦損傷的主要成因，例如：跌倒、受到撞擊、受到攻擊、被硬物刺到、汽車意外事故、受到暴力、受到轟擊或爆炸（Langlois JA et al., 2006）。

具有創傷性腦損傷高風險因素的族群包括：某個類別的軍人，例如：傘兵（Ivins et al., 2003）、幼童（尤其是嬰兒~4 歲幼兒）或青少年（15~19

歲之間的青少年)，男性罹患創傷性腦損傷的人數是女性的 1.5 倍，而非裔美國人具有較高的腦損傷死亡率（Langlois et al., 2006）。

創傷性腦損傷會出現的症狀包括：認知上的障礙（思考能力，尤其是記憶力）、痙攣、長時間處於植物人的狀態、嚴重的行為問題（例如：敵意、精神病、憂鬱、躁動、好鬥）以及肌肉運動失調。



第二節 幹細胞介紹

幹細胞最早是由歐文在 1945 年於母牛的身上發現(Owen, 1945)。幹細胞是一種可以自我不斷繁衍，且具有潛力可發展成許多種身體組織的細胞（張力明，2004）。幹細胞也是指一群可塑性的細胞，具有自我更新（self-renew）和多向分化（differentiation）兩大特性。「自我更新」意指可不斷長出相同的細胞，「多向分化」則為可長出較為成熟的不同種細胞（巫康熙，2007）。在胚胎發展的階段，幹細胞能分化為任何特化細胞，但仍會維持新生組織（像是皮膚、血液或腸組織）的正常轉移。



幹細胞依功能可以分為以下四類：

- 一、 全能性幹細胞（Totipotent stem cell）：是由卵子和精子的融合產生受精卵。而受精卵由一變為二，二變為四，四變為八的形成胚胎過程中，這八個最初的細胞中任一細胞皆是全能幹細胞，這些細胞具有發展成獨立個體的能力，可分化的路徑多達兩百多種，例如：胚胎幹細胞（ES cell），受精卵為最高層次的胚胎幹細胞。
- 二、 多能性幹細胞（Pluripotent stem cell）：是由胚胎內部所取得的

內細胞群，為全能幹細胞的後裔，由受精卵一直到變為三十二個細胞的時候，其中十六個細胞在外圍，十六個細胞在內部，在外圍的細胞會發展成胎盤等，在內部的十六個細胞無法發育及分化成一個完整的個體，也就是失去全能性，但是他們還是具有可以發育及分化成多種器官或組織能力的起源細胞，例如：造血幹細胞、神經細胞。

三、專能性幹細胞（**Multipotent stem cell**）：存在於成體的各部位組織中，只能分化成特定器官或組織等特定族群的細胞，例如：造血幹細胞，能分化成白血球細胞、紅血球細胞和血小板，以進行組織的更新及修復。

四、專一性幹細胞（**Unipotent stem cell**）：只能產生一種細胞類型，但具有自我更新的屬性，將其與非幹細胞區分開來。

由於幹細胞的能力有強弱之分，以應用性來講全能性幹細胞及多能性幹細胞的能力最強，科學家操控其分化效果也最佳，應用前景也為最被看好的幹細胞。

幹細胞依發育的過程先後出現及分布以下兩類：

一、 胚胎幹細胞（**Embryonic stem cells ; ES cells**）：早期科學家從胚胎取出其內部細胞團（**Inner cell mass ; ICM**）並成功的培養出

可以不斷繁衍，且具有多種分化能力的細胞株，因此稱為胚胎幹細胞 (Evans and Kaufman , 1981; Martin 1981; Thomson et al., 1998)。ES cells 是所有細胞最初期的形態，也是一種高度未分化的細胞，它具有發育的全能性，能分化為任何一種組織或細胞的能力。胚胎幹細胞顧名思義是從胚胎身上取下來的幹細胞，人類胚胎幹細胞 (human embryonic stem cells, hES cells) 即從人類的胚胎中取得。因此它具有極大的醫療潛力，自從科學家們可以成功地在體外培育胚胎幹細胞後，隨即引發科學界對於幹細胞研究的淘金熱 (李文婷，2003)。但又因胚胎幹細胞是由受精卵胚胎或墮胎胎兒組織中取得，於臨床應用上目前卻面臨道德、政治、生物和監管方面之限制 (Harris, 2009)。

二、 成體幹細胞 (adult stem cell)：來自成人的組織或器官中，亦稱為成人幹細胞，醫學上常用的大致包括骨髓幹細胞、周邊血幹細胞及臍帶血幹細胞。目前發現於成體幹細胞的組織中，包含骨髓、周邊血液、眼角膜、視網膜、大腦、脊椎、牙髓腔、血管、骨骼肌、肝臟、脾臟、皮膚上皮、消化器官的表皮及大腿骨等，成體幹細胞被歸類為多能性幹細胞，其所能分化的細胞及組織種類較胚胎幹細胞少 (李文婷，2003)。它們主要功能為存在成體特定的組織中，維持特定細胞族群在人體內的平衡狀態，具有由

幹原細胞形成先驅細胞的能力，在成體組織中，幹細胞與先驅細胞擔任身體的修復系統，可補充成體組織及分化成具有特定功能細胞的能力，以便補充受傷或死亡的細胞，從而使器官和組織保持生長和衰退的動態平衡。例如：骨髓幹細胞、神經幹細胞、造血幹細胞。成年動物的許多組織和器官，例如：造血系統和表皮，具有再生及修復的能力。然而成體幹細胞在其中具有關鍵的作用。

並非所有幹細胞都是相同的，以胚胎幹細胞其優點具有高增生能力，但卻面臨人道及生物性的限制；成體骨髓幹細胞具有分化能力且在臨床上有較多使用經驗，但卻有較高的移植體對宿主反應（Graft-versus-Host Disease；GVHD）發生率；成體周邊血幹細胞比骨髓幹細胞具有較低的侵入性；臍帶血幹細胞其優點具有極佳分化與增生的能力、較低的人類白血球組織抗原（human leukocyte antigen；HLA）配對要求，與成體骨髓幹細胞相比較為年輕及具有較低 GVHD 與感染性（表 1-2）。

「臍帶血」造血幹細胞

在一九六〇年代，科學家恩尼斯特·莫科洛克（Ernest A. McCulloch）和詹姆士·堤爾（James E. Till）分析老鼠骨髓中的成分，他們發現其中有一種細胞可以不斷的增生，並且可以分化成血球細胞，

而他們把這種細胞稱做為「造血幹細胞」。造血幹細胞是所有血液細胞的原始細胞。而所有的血液細胞都是由造血幹細胞來定向增殖、分化而成。人類的造血幹細胞是在胚齡第 2~3 周時開始產生，這時主要產生造血幹細胞的位置在於卵黃囊；在胚齡第 2~3 個月時，這時主要產生造血幹細胞的位置在於肝臟和脾臟；在胚齡第 5 個月起，一直到出生之後，而此時主要產生造血幹細胞的位置在於骨髓。

在一九八〇年代末期及一九九〇年代早期，醫生們開始了解到新生嬰兒的臍帶中的血液及胎盤內的血液含有大量的造血幹細胞。而血液幹細胞，最常見的來源是臍帶血。嬰兒出生的時候，胎盤或臍帶的血液裡面有很多的血液幹細胞，臍帶血的療效就是因此而來。在過去，臍帶血被當做醫療廢棄物隨著胎盤丟棄；現在，臍帶血則被視為黃金般的珍貴（李文婷，2003）。

臍帶血療法最早是一九八八年在法國成功的應用在一位罹患 **Fanconi** 氏貧血的兒童身上；美國在一九九〇年及一九九三年也成功地利用臍帶血醫治了一些兒童，從此臍帶血療法就有了比較蓬勃的發展。它主要應用於跟血液有關的疾病，比方說各種貧血症，如：**Blackfan-Diamond** 氏貧血症、**Fanconi** 氏貧血症、鎌刀形細胞貧血症與血癌等（**Eliane Gluckman et al.**, 1989）。

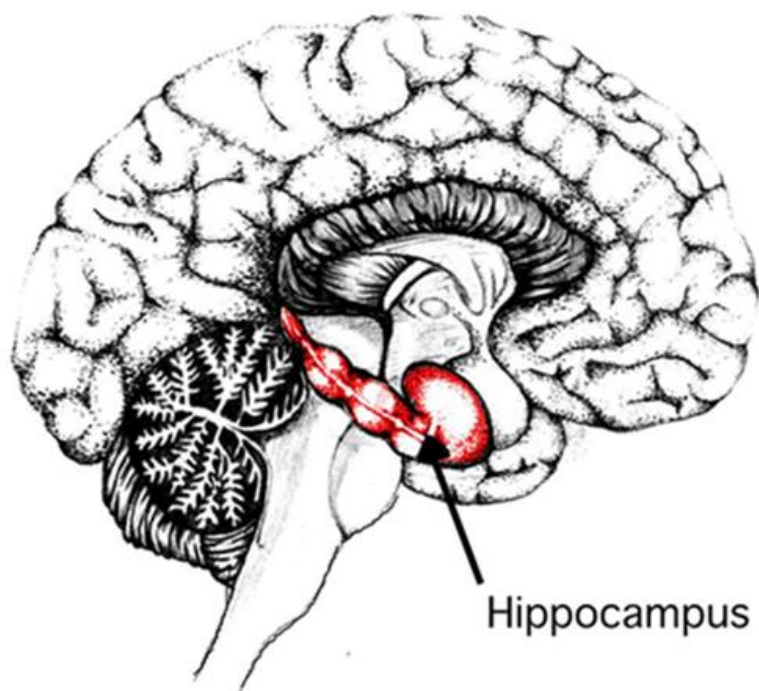
表 1-2 幹細胞比較，經由胚胎幹細胞 (Embryonic stem cells)、臍帶血幹細胞 (Newborn stem cells cord blood)、成體骨髓幹細胞 (Adult stem cells bone marrow)、成體周邊血幹細胞 (Peripheral blood) 來比較其優缺差異性 (Harris, 2009)。

	優點	缺點
胚胎幹細胞	高度發展潛力 高增生能力 低病毒汙染危險	人道考量限制 目前無臨床研究資料 生物性限制
臍帶血幹細胞	年輕且有極佳分化與增生能力 立即可用 較低 HLA 配對要求 低 GVHD 與感染性 自體移植可能性	延遲移植成功率 單次原料供應
成體骨髓幹細胞	具分化能力 富含濃縮幹細胞 較多使用經驗、移植速率快	複雜預後結果 較高 GVHD 發生率
成體周邊血幹細胞	較多使用經驗 比骨髓幹細胞較低侵入性 自體移植相關器材較為簡便	

第三節 大腦海馬介紹

海馬又名海馬迴、海馬區和大腦海馬（圖 1-3），位於內側顳葉（medial temporal lobe），它是組成大腦邊緣系統的一部分，擔當著關於記憶以及空間定位的作用（Stuart Ira Fox 2002）。創傷性腦損傷可能會導致神經元的喪失（Morganti-Kossmann et al., 2001, 2007），此研究經由 FPI 的動物實驗引發創傷性腦損傷後給予臍帶血幹細胞移植，於海馬區來研究大鼠能否因臍帶血幹細胞的處理來改善其認知及運動功能的損傷及神經元的再生。

圖 1-3 大腦海馬之區域（Squire and Kandel, 2000）



海馬的功能可將短期記憶轉換成長期記憶，此區域包括海馬、杏仁核及大腦皮質之相鄰區域。海馬的構造是由海馬（hippocampus）、海馬旁迴（parahippocampal gyrus）與齒狀迴（dentate gyrus）的大部分所構成。在大腦冠狀切面中，海馬為左右成對的 C 形構造所組成，附著於側腦室的內後方，從顳葉內側（medial temporal lobe）往頂葉（parietal lobe）的中心延伸，是大腦皮質向內折轉而形成。根據許多臨床經驗顯示，海馬確實是一個重要的記憶系統所在處（Stuart Ira Fox 2002）。



第四節 研究目的

本實驗藉由液體撞擊設備建立腦創傷，經誘導下導致大鼠創傷性腦損傷模式，來探討當大鼠發生創傷性腦損傷後，立即給予人類臍帶血球細胞 (Human umbilical cord blood cells ; HUCBCs) 後，看 HUCBCs 在創傷性大腦缺血、細胞死亡及損傷標誌物的影響。

預計，HUCBCs 的治療對大鼠創傷性腦損傷的實驗，可減少大鼠創傷性腦損傷的傷害，減輕細胞外的損傷標誌物和減少細胞死亡及內皮細胞的破壞，且增加血管生成及神經的再生。



第二章 材料與方法

第一節 實驗材料

第一項 實驗藥品

藥物名稱	廠商
1. 戊巴比妥納 (sodium pentobarbital)	Sigma Chemical Co., St., Louis, Mo, USA
2. 氯胺酮 (Ketamine)	Nankuang, Pharmaceutical, Taipei ; Taiwan
3. 阿托品 (atropine)	Sintong Chemical Ind. Co., Taiwan
4. 二甲苯噻嗪 (xylazine)	Bayer, Germany

第二項 實驗儀器

儀器名稱	型號；廠商
1.立體定位儀	Kopf 1406；Grass Instrument, Quincy, MA, USA
2.溫度探測器	Model HYP-033-1-T-G-60-SMP-M; Omega Engineering, Inc
3.數位電子體溫計	Model DP80；Omega Engineering, Inc., Stanford, CT
4.模擬電子溫度計	Model 43 TE；YSI, Inc., Yellow Springs, OH
5.溫度測試棒	Series 400; YSI, Inc
6.透析探針	Carnegie Medicine, Stockholm, Sweden
7.微型透析分析儀	Carnegie Medicine
8. Eicom ENO-20 NO2-分析系統	Eicom, Kyoto
9.內皮先驅細胞分離 試劑盒	MiltenyiBiotec, BergisehGladbach, Germany
10. Multisort 試劑盒	MiltenyiBiotec
11.莫氏水迷宮器具	Muromachi Kikai Co, Ltd, Tokyo, Japan
12.監視器影像記錄	Muromachi Kikai Co, Ltd, Tokyo, Japan

儀器名稱	型號；廠商
13. 繪圖軟體	Systat Software, Inc. San Jose, California, USA
14.原位細胞凋亡檢測 試劑	ImmunotechCorpo- ration, USA
15.5-溴脫氧尿嘧啶核 苷標記	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
16.鼠單株 BrdU 抗體	1:10; Oxford Biotechnology, Oxfordshire, UK
17.檢測切片 DAPI 染 色	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
18.抗體	Cell Signaling Tec- nology, Inc., Beverly, MA, USA
19.凝集素	1: 200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
20.螢光顯微鏡系統	Zeiss Axiovision; Zeiss Gmbh, Göttingen, Germany
21.雙抗體包夾酵素連 結免疫吸附分析法	R&D systems, Minneapolis, MN, USA

儀器名稱

型號；廠商

22.統計應用繪圖軟體 Sigma Plot for windows version 11.0



第三項 實驗動物

實驗中所使用動物為成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (重 266 ± 12 克)，取自中華民國國家科學委員會動物資源中心 (中華民國台灣台北)。動物飼養於奇美醫學中心動物室，以四隻一組飼養於環境溫度 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，12 小時日/夜循環控制之環境。雄性大鼠採自由攝食的方式提供食物及水。本臨床實驗經由台灣台南奇美醫學中心動物試驗委員核准，並且遵守國家衛生研究院“實驗動物飼養管理及使用指南”及“動物福利法”方針飼養，盡量減低動物在接受手術中及恢復時期的不適。

實驗過程中，大約 8 個小時，以腹膜內注射戊巴比妥納 (依體重 1.4 克/公斤) 給予適當麻醉，以免除因捏夾尾巴造成角膜反射及痛苦反色。於實驗結束時，會以過量戊巴比妥納將控制鼠組與 TBI 存活鼠犧牲。

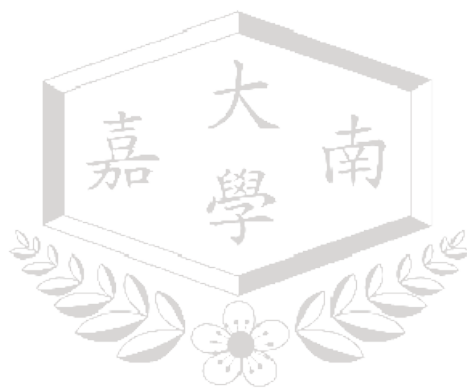
第二節 實驗方法

第一項 手術

動物經腹腔中給予戊巴比妥納 (25 mg/kg)，肌肉給予混合氯胺酮 (44 mg/kg)，肌肉給予阿托品 (0.02633 mg/kg)，及肌肉給予二甲苯噻嗪 (6.77 mg/kg) 來進行麻醉。

於大鼠的右股動脈和靜脈插入聚乙烯管 (PE 50) 用來監測血壓、和注射藥物使用。插管後，進行傷口的縫合及消毒避免感染，動物會轉向俯臥位。將這些大鼠頭部固定於立體定位儀上，以矢狀切開頭皮，動物受到側向液體撞擊設備建立腦創傷 (McIntosh et al., 1987; Chio et al., 2007)。開顱手術的準備首先頭皮切開後，一個 4.8 毫米 (mm) 的圓形開顱手術，使頭蓋骨定位 Lambda 和前凶門 (Bregma) 3.0 mm 之間的進行中央溝定位。放上改良的旋緊式 (Luer Lock) 接頭 (為創傷插管)，內徑為 2.6 mm，用氰基丙烯酸甲酯 (cyanoacrylate) 接著劑固定，在用鑽孔器進行頭顱兩處的鑽孔，於兩邊鑽孔處各旋入一個螺絲後用牙科使用的牙粉為丙烯酸甲酯 (acrylic) 固定。動物受到側向液壓撞擊損傷 (McIntosh et al., 1987; Chio et al., 2007)。一個溫和的 FPI 2.2 atm 產生的迅速注入液壓衝擊裝置封閉顱腔小體積的生理鹽水。

液體撞擊設備建立腦創傷事件後，因外力的刺激動物會顯示短暫呼吸停止和四肢抽搐，大約持續 40 至 70 秒的時間。動物從立體定位儀器中分離，丙烯酸甲酯去除，切口進行縫合。每隻受傷的 FPI 大鼠組和假受傷的大鼠組立即密切進行評估 FPI 行為後的恢復。



第二項 生理參數監測

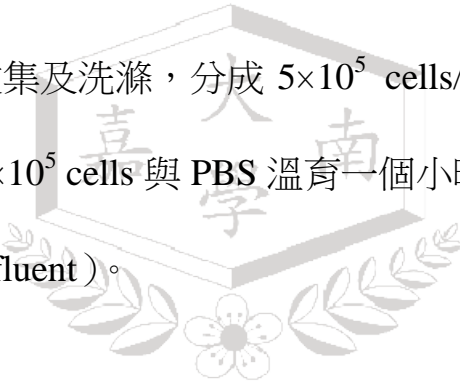
在戊巴比妥納麻醉下，大鼠的右股動脈和靜脈插入聚乙烯管（PE 50）用來監測血壓和注射藥物使用。接著將大白鼠頭、耳部位牢固安置於立體定位儀上，調整門齒桿（incisor bar），頭皮切開後，剝離頭蓋骨上附著的肌肉與骨膜。探針根據 Paxino & Watson（1982）之大鼠腦部立體定位圖譜定位左側腦室：A，雙耳 7.7 mm；L，從中線 2.0 mm 及 H，從上方頭骨 3.5 mm。經由 20 號不銹鋼探針（直徑 0.90 mm，長度 38 mm）插入為 Statham P23 AC 壓力感測器，測量顱內壓（ICP）。所有記錄在一個 four-channel 肌電訊號擷取系統。核心溫度（TCO）是由熱電偶連續監測，而同時平均動脈壓（MAP）和心率（HR）的連續監測是經由壓力傳感器。用直徑 0.15 mm 的溫度探測器插入 4.0 mm 腹側的頭骨表面，用數位電子體溫計監測額葉皮質區腦部的溫度。在 FPI 前移除探針，核心溫度損傷後立即更換的模擬電子溫度計和溫度測試棒。

第三項 微透析測量大腦海馬回之麩氨酸、甘油、乳酸鹽、焦葡萄糖酸鹽和一氧化氮代謝物 (NO_x)

每隻動物使用戊巴比妥納注射於動物腹膜內使其麻醉。並使用定位於水平線以下 3.3 毫米處之壓尺，將動物的頭安放在立體定位器上，接著從大鼠頭部的中間切開後則會看見大鼠顱骨和頭骨，其中有一鑽孔可供一個透析探針 (4 mm in length, CMA/2) 插入在內。此微型透析探針可根據 Paxinos and Watson (1982): 凶門後 P, 8 mm ; 中線 R, 3 mm ; H, 5 mm 之地圖和座標立體植入右側海馬。根據前面介紹的方法 (Chio et al., 2007)，用微型注射器灌注 2.0 μL/min 及透析液進行取樣。將收集之透析樣液 (每隔二十分鐘) 注入 CMA/140 的微型透析分析儀中。等分的透析液 (5 μL) 注入到 CMA 600 微透析儀中 (Carnegie Medicine)，測量乳酸鹽，甘油，焦葡萄糖酸鹽和麩氨酸。透析液中 NO_x⁻ 濃度的測定用 Eicom ENO-20 NO₂⁻ 分析系統 (Togashi et al., 1998)。只有在海馬回定位微型透析探針的證實病理實驗結果。在這一系列的實驗中，由於不正確的微透析探針位置沒有動物被排除在外。

第四項 人類造血幹細胞 (CD34⁺Cells) 之準備

人 CD34⁺細胞從臍血中分離，使用 CD34 的內皮先驅細胞分離試劑盒和 CD34 Multisort 試劑盒且完全根據其上之過程方式收集。在 FPI 生成之後，立即給予人類臍帶血 CD34⁺細胞 (95%之純度，定義為 5×10^5 人類臍帶血淋巴球和單核球，含有 >95% 的 CD34⁺細胞) 或給予人類臍帶血 CD34⁻細胞 (定義為 5×10^5 人類臍帶血淋巴球和單核球，含有 <0.2% 的 CD34⁺細胞) 當作控制組，其給予途徑為經由尾靜脈靜脈注射。CD34⁺細胞透過磷酸鹽緩衝液 (phosphate-buffered saline ; PBS) 的收集及洗滌，分成 5×10^5 cells/0.3ml 濃度。另外收集取出之 CD34⁺ 5×10^5 cells 與 PBS 溫育一個小時後，取其上澄液做為另一輪注液 (effluent)。



第五項 實驗分組

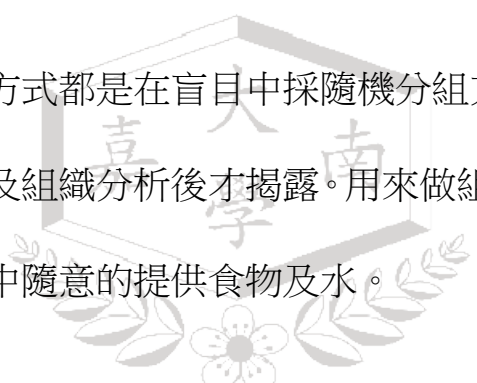
動物經由隨意分配成到以下三個組別之一：

第一組：老鼠進行 FPI 後，經靜脈給予 CD34⁻ cells (5×10^5 / 0.3 ml PBS)，此為控制組。

第二組：老鼠進行 FPI 後，經靜脈給予，從 HUCBCs 中分離 CD34⁺ cells (5×10^5 / 0.3 ml PBS)，此為治療組。

第三組：假手術 (sham group) 對照組。

全部的實驗進行方式都是在盲目中採隨機分組方式進行，大鼠的分組組別只有在行為及組織分析後才揭露。用來做組織學及行為學研究的大鼠在整個實驗中隨意的提供食物及水。



第六項 實驗過程

實驗一：以隨機進行治療經液壓撞擊損傷模組的大鼠 (N=8) 術後經由靜脈注射 CD34⁺細胞 (5×10⁵/0.3 毫升 PBS) 或 CD34⁻細胞 (5×10⁵/0.3 毫升 PBS)，於 FPI 後的 120 分鐘進行，在核心溫度 (T_{co})、平均動脈壓 (MAP)、心跳速率 (HR)、顱內壓 (ICP)、顱內灌流壓 (CPP) = MAP - ICP 及大腦溫度 (T_{bror} TB) 和測量腦部海馬回之麩氨酸、甘油、乳酸鹽/焦葡萄糖酸鹽和一氧化氮代謝物 (NO_x) 比例之測量。

實驗二：以隨機進行治療經液壓撞擊損傷模組的大鼠 (N=8) 術後經由靜脈注射 CD34⁺細胞 (5×10⁵/0.3 毫升 PBS) 或 CD34⁻細胞 (5×10⁵/0.3 毫升 PBS)，於 FPI 後的 1-7 天進行以最大角度動物可以抓住傾斜板的平面和認知功能的評估。

實驗三：以隨機進行治療經液壓撞擊損傷模組的大鼠 (N=8) 術後經由靜脈注射 CD34⁺細胞 (5×10⁵/0.3 毫升 PBS) 或 CD34⁻細胞 (5×10⁵/0.3 毫升 PBS)，於 FPI 後的 1-7 天進行腦梗塞區、血清中內皮前驅細胞 (EPCs)、腫瘤壞死因子- α (TNF- α)、細胞介質素-10 (IL-10) 和 ICAM-1 之間的評估。

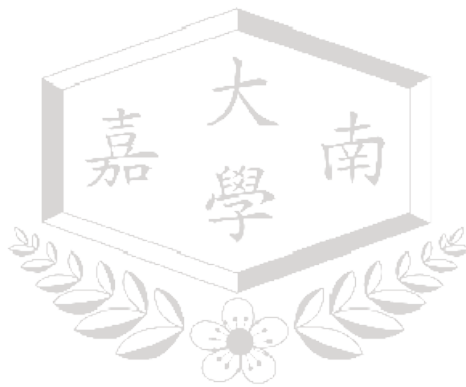
實驗四：以隨機進行治療經液壓撞擊損傷模組的大鼠 (N=8) 術後經由靜脈注射 CD34⁺細胞 (5×10⁵/0.3 毫升 PBS) 或 CD34⁻細胞

(5×10^5 /0.3 毫升 PBS)，於 FPI 後的第 4 天使用終端轉移酶 (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated α UTP nick end labeling ; TUNEL) 凋亡陽性細胞和 caspase-3 的凋亡陽性細胞在受傷的海馬回進行兩者細胞數量進行評估。

實驗五：以隨機進行治療經液壓撞擊損傷模組的大鼠 (N=8) 術後經由靜脈注射 CD34⁺細胞 (5×10^5 /0.3 毫升 PBS) 或 CD34⁻細胞 (5×10^5 /0.3 毫升 PBS)，於 FPI 後的第 4 天，對血管內皮生長因子 (vascular endothelial growth factor ; VEGF) 陽性細胞，神經膠質細胞衍生之神經滋養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor ; GDNF) 陽性細胞，5-溴脫氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 陽性的血管內皮細胞的 BrdU/ NeuN 染色雙陽性細胞和人類細胞核抗體 (HNA) 陽性細胞在受傷的海馬回進行評估。

第七項 運動功能的評估

傾斜板 (Inclined Plane) 主要是用來測量大鼠下肢的抓力支撐的力量。將大鼠放置於傾斜板上，面積為 20*20cm，啟動傾斜面將與左邊及右邊的傾斜，垂直一開始角度為 30 度最高角度到 55 度 (Hallam et al., 2004)。傾斜板角度的增加或降低在 50 增量到最大角度來判定每隻大鼠能支撐的角度。每一天的數據為左邊和右邊的最大角度的平均值。



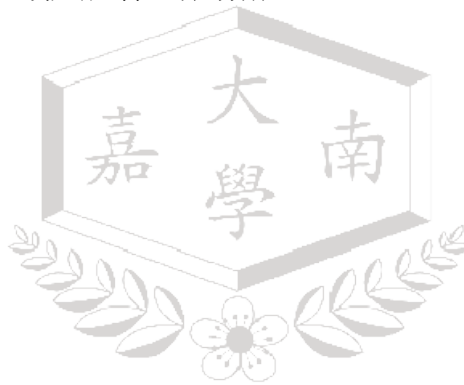
第八項 認知功能的評估

在大鼠的空間學習及認知能力測試，採用隱藏在水中平台的一種實驗，稱為莫氏水迷宮學習(Morris, 1984)。莫氏水迷宮(Morris water maze learning ; MWM) 是在 1982 年由英國愛丁堡大學的神經科學家 Dr. Richard G.M. Morris (Morris, 1984) 所發展出來的。本實驗亦採用莫氏水迷宮來測試豐富的環境是否具有影響腦創傷對海馬迴空間學習及記憶的能力。

莫氏水迷宮器具組成一個大型灰色的圓形水池（直徑 174 cm、高 45 cm）及一個直徑 10 cm 的透明樹脂玻璃平台水面 1 cm 以下。大鼠進行訓練，當水池充滿水時必須讓動物無法看清水面下平台之位置。在實驗過程中，該平台維持在一個象限中的固定位置。將動物面向池壁放入其中一水牆，在四種隨機選擇 90 度分隔的位置。最多 180 秒的時間內找到隱藏平台，由監視器傳至電腦並記錄其影像。在損傷後 1-7 天，游泳路徑被記錄，延遲找到隱藏平台主要取決於測量本次測試，以觀察老鼠的游泳能力是否影響尋找平台的時間。

第九項 內皮前驅細胞（**Endothelial progenitor cells ; EPCs**）

收集分離的大鼠股骨骨髓，從附著的軟組織進行了小心清理。骨髓腔內插入一個注射針頭（23 號）和磷酸鹽緩衝液（PBS）沖洗出骨髓。經由分離取得骨髓細胞。單核細胞在 PBS 洗滌三次。細胞進行了分析 CD 133 標記（ab 19898, abcam）用類似 FITC 標記的二級抗體（ab6717, abcam）和血管內皮生長因子-2（VEGF-2）（ab10972, abcam）標記用類似 PE 標記的第二抗體（ab7004, abcam）。在每一個實驗，同型匹配的抗體作為對照組。



第十項 腦梗塞評估

所有動物都在 FPI 發生後在第 4 天被犧牲。在給予高劑量的戊巴比妥鈉麻醉下 (100 mg/kg i.p.) 動物心臟裡都被快速灌流 100 ml 的生理食鹽水用 heparin(肝素)unit/ml 隨後 300 ml 10%福爾馬林(Sigma, St. Louis, MO)。取出腦組織，福爾馬林固定後，加工和石蠟包埋。冠狀切面 (6 microns thick) 被切片和染色，染色過程採用氯化三苯基四唑 (triphenyltetrazolium chloride, 或簡稱 TTC、TZ 法) 如其他文獻所描述 (Wang et al., 1997)。為期 4 天的存活選擇對應的行為 (運動和認知功能) 評估。梗塞範圍由沒有染到 TTC，代表該組織缺乏脫氫酶 (dehydrogenase-deficient tissue)，最後用電腦 planimetry (PC 圖像工具軟體) 計算範圍的總和。梗塞體積範圍 (volume) 為 2 毫米 (切片厚度) × (所有腦片 (mm²) 梗塞區的面積) 計算基準 (Wang et al., 1997)。對於這個皮質病變的體積評估，腦切片的數字化圖像，從每毫米 2.0 mm 至 7.0 mm 後到前凶門被抓獲。研究以蒙蔽損傷後的治療狀況進行所有影像和梗死體積分析。

第十一項 凋亡細胞之凋亡檢測 (TUNEL assay for apoptotic cells)

原位細胞凋亡檢測試劑，被用於評估通過使用末端脫氧核糖核酸轉移酶 (terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT) -mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL)。其中定量分析有凋亡陽性反應(TUNEL positive) 在顯微鏡下計算染色細胞數量。結果的百分比即凋亡率代表隨機選擇的 10 格標誌細胞的百分比表示。染色的結果是採用影像數據處理器 (American Image-Pro Plus software) 進行分析和評估。



第十二項 溴脫氧尿嘧啶核苷 (bromodeoxyuridine ; BrdU) 標記

所有動物都在 TBI 發生後在第 4 天被犧牲。5- bromodeoxyuridine (BrdU) (50 mg/kg) 溶解在 PBS 給予每日一次，連續 3 天腹膜內注射，來評估細胞的增生標記。

第十三項 免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry, IHC)

相鄰的 50 μm 切片對應冠狀坐標 2.0 毫米到 7.0 毫米, 後方到前
門的順序分別為:

1. 放置於 2 mol /L HCl 培養 30 分鐘,
2. 以 0.1 mol/L 硼酸 (boric acid, pH 8.5) 在室溫下沖洗 3 分鐘,
3. 將原發性抗體培養和含有 PBS 0.5% 的 normal bovine serum 放置於 4°C 一個晚上。
4. 當以 PBS 沖洗後再跟輔助抗體培養存放於室溫 1 小時。

這項研究中採用以下抗體:

1. 鼠單株 BrdU 抗體 (1:10)
2. 鼠抗血管內皮生長因子 (VEGF)
3. 星行膠質細胞 (GFAP)
4. 抗神經元特殊核蛋白 (NeuN, antibody in 1:200 dilution) 或抗人細胞核抗原 (HUA) (MAB 1281, Chemicom)
5. 螢光素異硫氰酸鹽 (fluorescein isothiocyanate ; FITC) 標記 goat anti-mouse secondary antibody (Alexa-Fluor[®], 568) 為檢測切片 DAPI 染色進行可看的見的核細胞。

caspase-3 活性皮質切片的順序:

1. 培養 cleaved caspase-3 (ASP/75) 抗體只認活化的 caspase-3 大片

段(17-20 kDa), 3% BSA/PBS/0.1%的 TX-100 在 4°C 一個晚上。

2. 沖洗 PBS/0.6%TX-100 和 FITC 標記的 anti-rabbit IgG 培養於 1% BSA/PBS/0.1%TX-100 為 60 分鐘。
3. 安裝使用螢光保護劑的 Mounting Medium 是專門用來減緩免疫螢光染色 (immunofluorescent staining) 衰退的速率。

血管內皮細胞，biotinylated lycopersicon esculentum (Tomato) 凝集素 (1: 200) 使用相同的方式，而不是其他初級抗體和可看的見為採用螢光標記的鏈黴抗生物素蛋白。

免疫細胞螢光免疫組織化學染色圖像使用螢光顯微鏡系統在 100x放大倍率，圖像的形式凶門呈水平-2.0，-2.5，-3.0，-3.5 毫米，對每隻動物進行評估。在每個圖像的免疫陽性細胞顯示染色以細胞形態和上述背景採用水平手動方式和詳盡的計算，均使用影像分析軟體來進行軟體的分析 (Zeiss GmbH)。每隻動物的治療現狀研究者 (M.T.L.) 採用蒙蔽方式進行所有細胞的計數。全部圖像進行評估，在 100x放大倍率利害 (ROIs) 區域進行大腦皮層兩側周圍損傷評估 (顯示於白色正方形圖 3-6-1 及圖 3-6-2)。在腦部損傷的大鼠組和假損傷的大鼠組進行梗塞區域的評估比較。

第十四項 細胞激素的測定 (Assay of Cytokines)

在血清中測定細胞粘附分子-1 (ICAM-1) 和介白素-10 (Interleukin-10; IL-10) 與腫瘤壞死因子- α (TNF- α) 的濃度採用雙抗體包夾酵素連結免疫吸附分析法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA) 或稱酵素免疫分析法試驗。對於 TNF- α 及 IL-10 的光密度設定在 45 奈米 (nm) 由平板讀取器來讀取。計算血液樣本中的 TNF- α 及 IL-10 的濃度計算方式採用標準曲線乘以稀釋係數，以皮克/毫升 (pg/ml) 來表示。



第十五項 統計分析 (Statistical Analysis)

實驗的圖、表及結果數據分析均以平均值±標準誤 (mean± S.E.M) 顯示。重複測量利用雙因子變異分析 (Two way analysis of variance (ANOVA)) 來比較各組治療時間是否有顯著差異和因治療隨著時間的推移對每個分數進行檢定。免疫反應的細胞計數和梗塞體積的數據以常態分佈 (Normal distribution) 又名高斯分佈 (Gaussian distribution) 來進行評估，如果 $P < 0.05$ 有統計上差異則持續進行紐曼-庫爾 (Neumann-Keuls; N-K) 檢定稱為事後比較檢定 (Post hoc tests)。

傾斜面和 MWM 的潛伏期沒有按照高斯分佈，和數據分析用無母數的克-瓦二氏變異數分析 (Kruskal-Wallis ANOVA) 當顯著之後採用 Mann-Whitney's U test 檢測 (非常態分布之數據) 配對比較 (pairwise comparison)。對於 MWM 的潛伏期經由單因子變異數分析 (One-Way ANOVA)。P 值 < 0.05 時則認為是有統計學上的顯著差異。所有數據分析用統計應用繪圖軟體。

第三章 實驗結果

第一節 $CD34^+$ 細胞改善 FPI 大鼠所引發的顱內壓升高和 腦部血流灌注降低

圖 3-1 指出分別以 $CD34^+$ cells ($5 \times 10^5/0.3$ ml PBS) 及 $CD34^-$ cells ($5 \times 10^5/0.3$ ml PBS) 處置和假手術對照組所呈現的多種不同生化和生理參數之比較。在 $CD34^-$ 細胞處置的 FPI 鼠組別與假手術對照組比較發現，在 FPI 後 20~120 分鐘顱內壓 (ICP) 明顯上升及顱內灌注壓 (CPP) 明顯下降。而以 $CD34^+$ 細胞處置的 FPI 鼠組別與 $CD34^-$ 細胞處置的 FPI 鼠組別比較發現，所引發的顱內壓及顱內灌注壓均呈現明顯改善。

圖 3-1

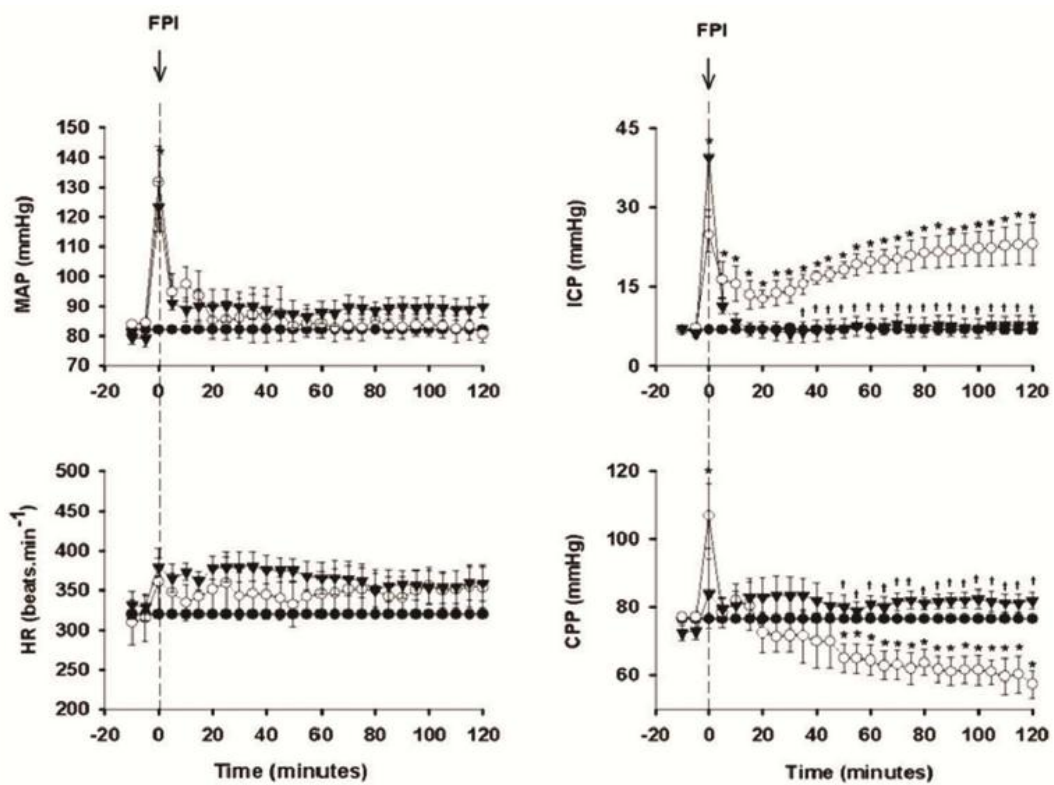


圖 3-1 顯示 (●) 為假手術組, (○) 為 CD34 細胞處置的 FPI 鼠組, (▼) 為 CD34⁺細胞處置的 FPI 鼠組, 其平均動脈壓 (MAP), 心率 (HR), 顱內壓 (ICP), 腦部血流灌注壓 (CPP) 之數據呈現。平均值±標準誤 (每組 N =8)。* P < 0.05 與 (●) 組比較; + P < 0.05 與 (○) 組比較。FPI 起始或注射細胞以虛線表示。

第二節 CD34⁺細胞改善 FPI 大鼠所引發的腦缺血和神經元損傷

圖 3-2 指出分別以 CD34⁺ cells (5×10⁵/0.3 ml PBS) 及 CD34⁻ cells (5×10⁵/0.3 ml PBS) 處置和假手術對照組所呈現的多種不同生化和生理參數之比較。細胞層次的細胞缺血標誌物，例如：麩氨酸 (glutamate)；乳酸鹽 (lactate) / 焦葡萄糖酸鹽 (pyruvate) 的比率和細胞外損傷標誌物，例如：甘油 (glycerol) 和腦組織中的氮氧化物 (NO_x)。大鼠在 FPI 後立即給予 CD34⁻細胞的組別與假手術對照組比較發現，麩氨酸、乳酸鹽/焦葡萄糖酸鹽、甘油、氮氧化物均在 FPI 後 20~120 分鐘均呈現明顯上升。而以大鼠在 FPI 後立即給予 CD34⁺細胞組別與 CD34⁻細胞處置的 FPI 鼠組別比較發現，所引發的缺血和損傷標誌物均呈現明顯降低。

圖 3-2

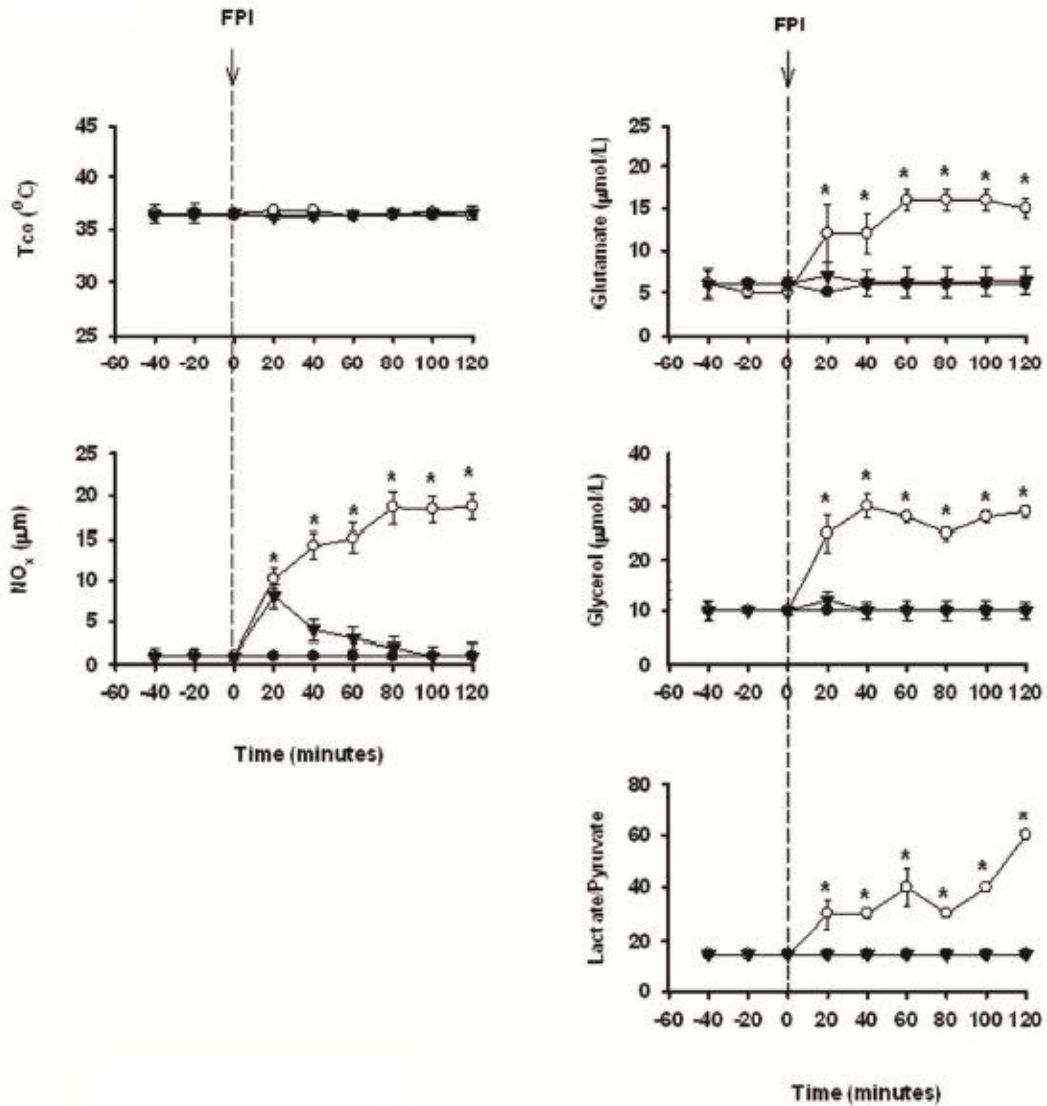


圖 3-2 於 FPI 期間之體內核心溫度 (TCO) 和一氧化氮代謝物的麩氨酸，甘油，乳酸鹽/焦葡萄糖酸鹽的比例。(●) 為假手術組，(○) 為 FPI 八隻鼠以靜脈注射 CD34⁻細胞之數值，(▼) 為 FPI 八隻鼠以靜脈注射 CD34⁺細胞之數值。平均值±標準誤。* P < 0.05 與 (●) 組比較；+P < 0.05 與 (○) 組比較。FPI 起始或注射 CD34⁺及 CD34⁻細胞以虛線表示。

第三節 CD34⁺細胞改善 FPI 引發的運動和認知功能障礙

圖 3-3-1、圖 3-3-2 和表 3-3-1 指出分別以 CD34⁺ cells (5×10⁵/0.3 ml PBS) 及 CD34⁻ cells (5×10⁵/0.3 ml PBS) 處置和假手術對照組所呈現的最大角度之比較。行為測試顯示，在 CD34⁻細胞處置組與假手術對照組比較發現 TBI 大鼠的運動效能 (圖 3-3-1, 表 3-3-1) 和評估 FPI 損傷後 1、4 及 7 天大鼠的認知功能 (圖 3-3-2, 表 3-3-1), 於 35~62 角度以 CD34⁻細胞處置的組別明顯下降。而以大鼠在 FPI 後立即給予 CD34⁺細胞組別與 CD34⁻細胞處置的 FPI 鼠組別比較發現, FPI 引發的運動和認知功能障礙, 以注射 CD34⁺細胞後均呈現明顯改善 (圖 3-3-1、圖 3-3-2 和表 3-3-1)。

表 3-3-1 假手術對照組；FPI 與 CD34⁻細胞控制組 (FPI+CD34⁻) 和 FPI 與 CD34⁺細胞治療組 (FPI+CD34⁺) 注射後 4 天得到的數據。括號中的數字為動物數。資料採用 Mann-Whitney U 檢驗法分析。

*P<0.05 與假手術對照比較；+P<0.05 與 FPI+CD34⁻組比較。

Parameters	Animal groups		
	Sham	FPI+CD34 ⁻	FPI+CD34 ⁺
1. Infarction volume (mm ³): TTC	0±0(8)	170±25(8)*	20±2(8) ⁺
2. HNA-positive cells/mm ²	0±0(8)	0±0(8)	15±5(8) ⁺
3. Maximal angle (degree)	62±0(8)	35±3(8)*	53±4(8) ⁺
4. Latency to platform (second)	13±2(8)	32±(8)*	18±4(8) ⁺
5. Number of GDNF-positive cells	0±0(8)	0±0(8)	114±22(8) ⁺
6. Number of BrdU/endothelial cells	1±0(8)	1±0(8)	7±0.7(8) ⁺
7. Number of VEGF positive cells	0±0(8)	0±0(8)	128±25(8) ⁺
8. Number of BrdU/NeuN double Positive cells	0±0 (8)	0±0 (8)	45±2(8) ⁺
9. Number of TUNEL double Positive cells (per section)	0±0(8)	368±41(8)*	48±18(8) ⁺
10. Number of caspase-3 positive cells (per section)	41±1(8)	168±21(8)*	65±5(8) ⁺
11. TNF-α (pg/ml)	10±2(8)	268±31(8)*	67±7(8) ⁺
12. IL-10 (pg/ml)	11±1(8)	10±2(8)	330±9(8) ⁺
13. EPCs expression	0±0(8)	8±2(8)*	45±3(8) ⁺
14. ICAM-1 (pg/ml)	9±1(8)	361±36(8)*	25±4(8) ⁺

圖 3-3-1

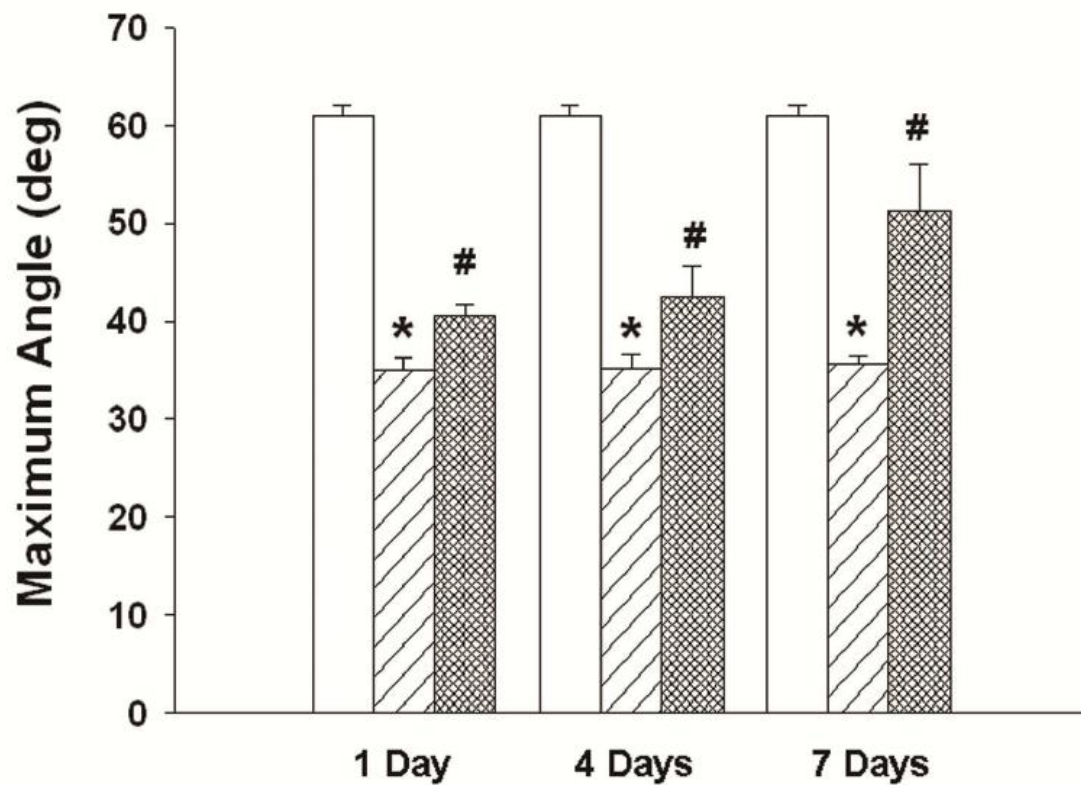


圖 3-3-1 顯示於最大角度動物能夠緊貼傾斜平面。(□) 為 FPI 後在 Morris 水迷宮設備平台的潛伏期 1-7 天假手術組，(▨) 為 CD34⁻細胞處理的 FPI 大鼠組，(▩) 為 CD34⁺細胞處理的 FPI 大鼠組。平均值±標準誤 (每組 N =8)。* P <0.05 與 (□) 組比較；# P <0.05 與 (▨) 組比較。

圖 3-3-2

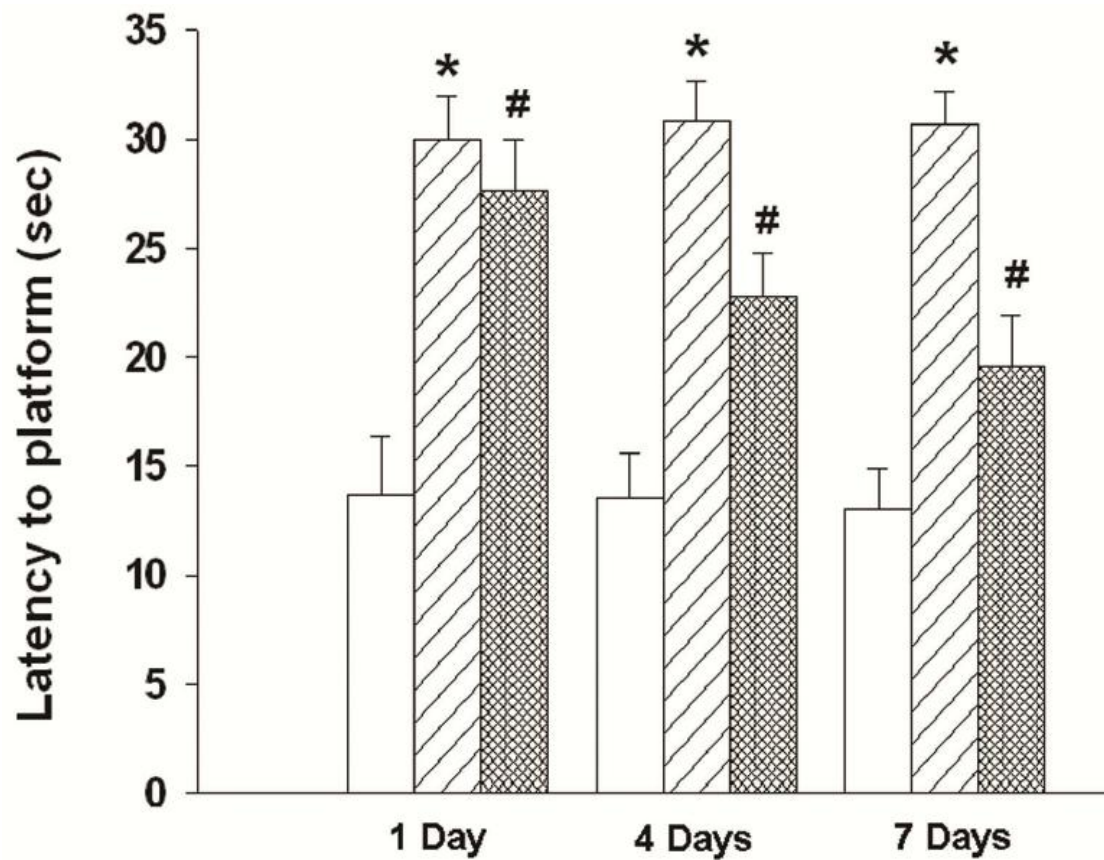


圖 3-3-2 顯示 (□) 為 FPI 後在 Morris 水迷宮設備平台的潛伏期 1-7 天假手術組, (▨) 為 CD34⁻細胞處理的 FPI 大鼠組, (▩) 為 CD34⁺細胞處理的 FPI 大鼠組。平均值±標準誤 (N=8)。* P < 0.05 與 (□) 組比較; # P < 0.05 與 (▨) 組比較。

第四節 CD34⁺細胞改善 FPI 引發的腦梗塞

圖 3-4-1，表 3-1-1 指出分別以 CD34⁺ cells (5×10⁵/0.3 ml PBS) 及 CD34⁻ cells (5×10⁵/0.3 ml PBS) 處置和假手術對照組所呈現大鼠的腦部梗塞體積程度之比較。TTC 染色的數據顯示，FPI 之後第 4 天，在假手術對照組與 CD34⁻細胞處置組比較發現，FPI 大鼠給予 CD34⁻細胞處置腦梗塞體積 (Infarction volume (mm³): TTC)，明顯高於假手術對照組。而以大鼠在 FPI 後立即給予 CD34⁺細胞組別與 CD34⁻細胞處置的 FPI 鼠組別比較發現，FPI 引發的腦梗塞，以注射 CD34⁺細胞後均呈現明顯降低。



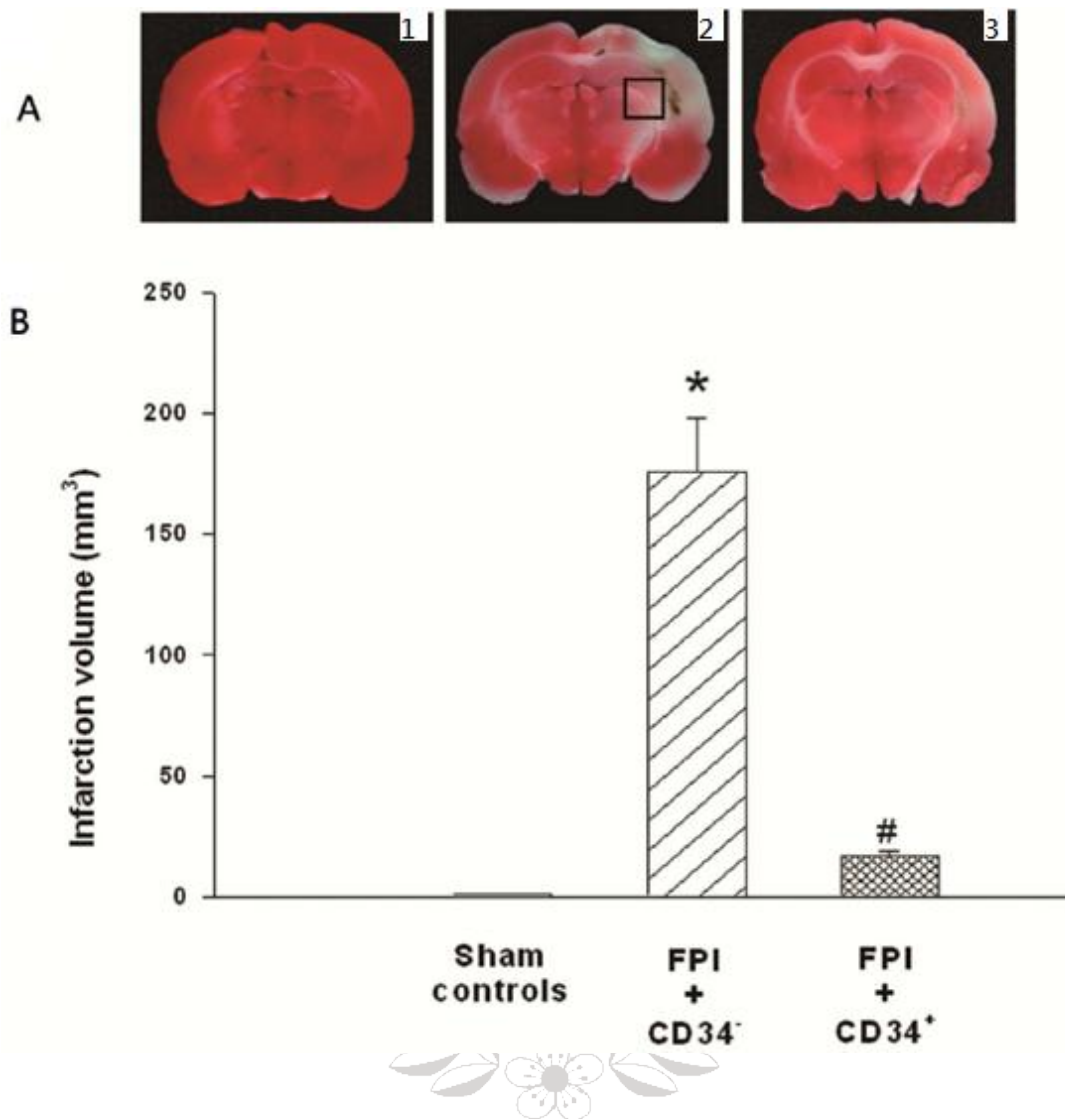


圖 3-4-1 組織學檢查腦組織梗塞體積，由假手術對照比較，FPI 後第 4 天 CD34⁻細胞處置的大鼠和 FPI 後第 4 天 CD34⁺細胞處置的大鼠。(A) 假手術對照鼠組代表腦部顯微照片 (圖 1)，CD34⁻細胞所處置 FPI 大鼠組 (圖 2) 和 CD34⁺細胞所處置 FPI 大鼠組 (圖 3)。(B) (□) 為假手術對照梗塞體積組，(▨) 為 CD34⁻細胞所處置 FPI 大鼠組，(▩) 為 CD34⁺細胞所處置 FPI 大鼠組。結果表明平均值±標準誤 (N= 8)。
*P < 0.05 與假手術對照組比較；# P < 0.05 與 FPI+CD34⁻細胞組比較。

第五節 CD34⁺細胞改善 FPI 引發的腦神經細胞凋亡

以 CD34⁺ cells(5×10^5 / 0.3 ml PBS) 及 CD34⁻ cells(5×10^5 / 0.3 ml PBS) 處置和假手術對照組所呈現腦神經細胞凋亡的比較。大鼠 FPI 後的第四天 TUNEL 染色顯示，在 FPI 引發的腦神經細胞凋亡，以 CD34⁻ 細胞治療所呈現 TUNEL 陽性細胞（圖 3-5-1）和 caspase-3 的陽性細胞（圖 3-5-2）的數目均明顯高於假手術的對照組（表 3-3-1；圖 3-5-1 和圖 3-5-2）。但以 CD34⁺ 細胞治療因 FPI 引發的腦細胞凋亡，TUNEL 陽性細胞（圖 3-5-1）和 caspase-3 的陽性細胞（圖 3-5-2）的產生均呈現明顯改善。



3-5-1

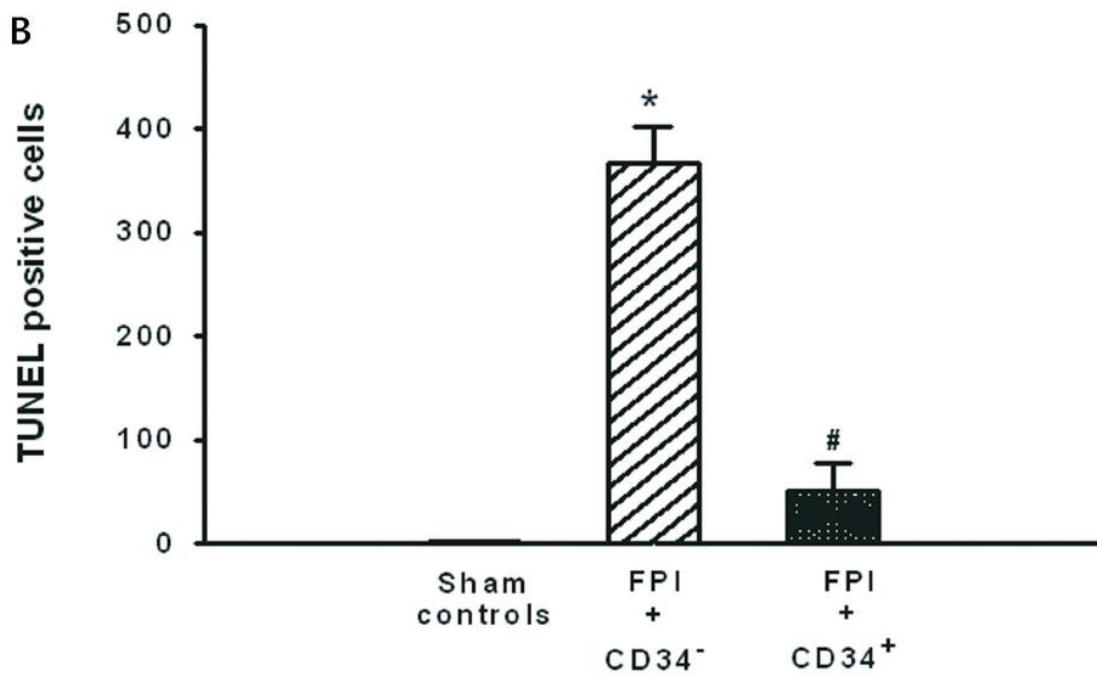
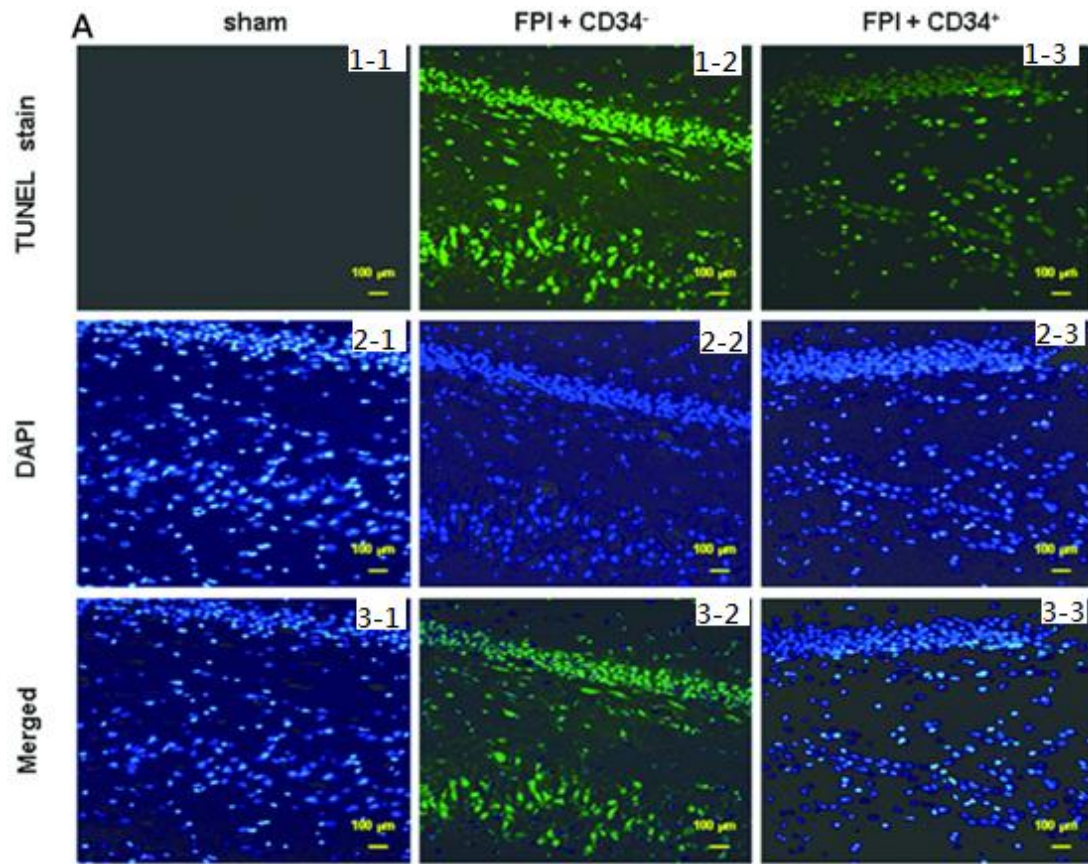


圖 3-5-1 TUNEL 染色在腦組織中經由假手術對照，FPI 後的第 4 天用 CD34⁻細胞治療，和 FPI 後的第 4 天用 CD34⁺細胞治療。(A) 代表大腦 TUNEL 法染色的圖片是假手術的大鼠組 (圖 1-1)，使用 CD34⁻細胞治療 FPI 大鼠組 (圖 1-2)，和使用 CD34⁺細胞治療 FPI 大鼠組 (圖 1-3)。(B) TUNEL 的陽性細胞 (Sham controls) 為假手術對照組，(▣) 為 FPI 大鼠與 CD34⁻細胞控制組，和 (▤) 為 FPI 大鼠與 CD34⁺細胞治療組。結果表明平均值±標準誤 (N= 8)。*P <0.05 與假手術對照組比較；#P <0.05 與 FPI+CD34⁻細胞組比較。



3-5-2

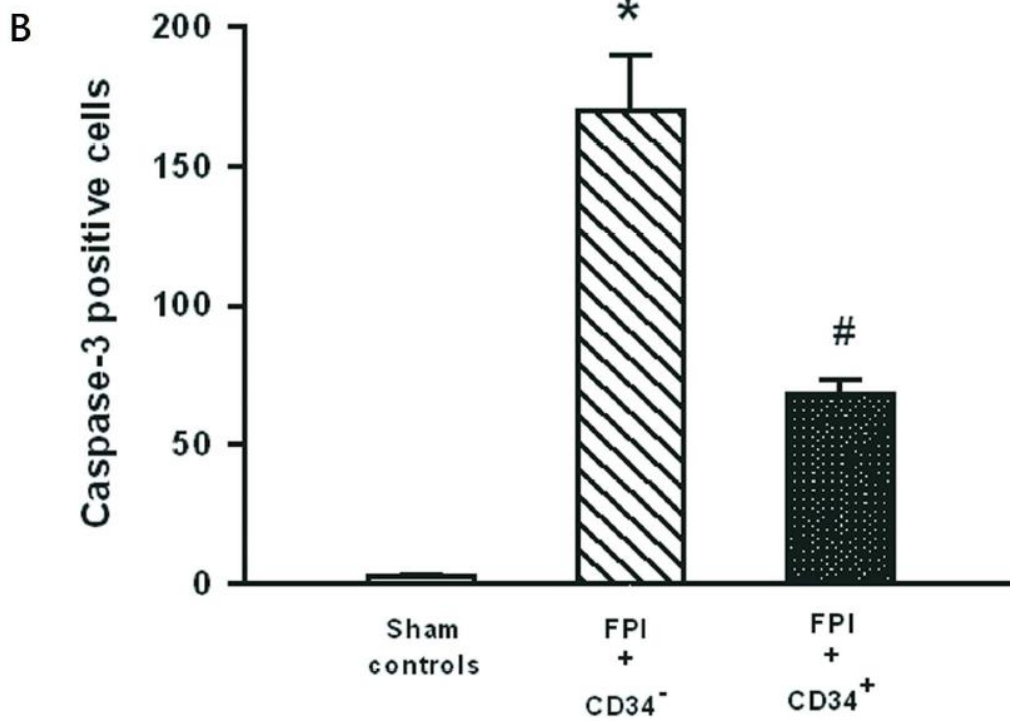
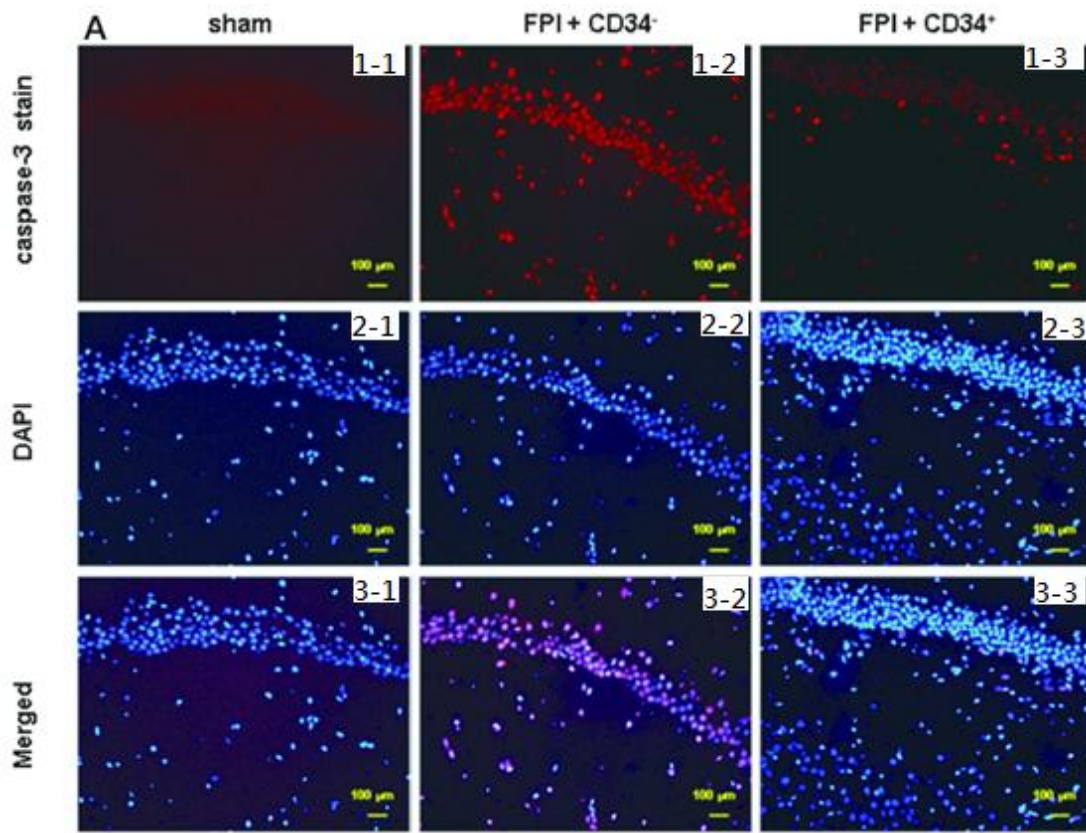
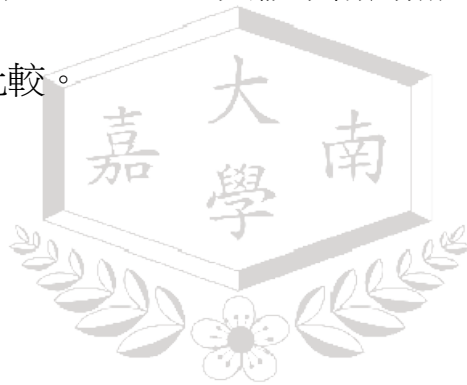


圖 3-5-2 免疫組織化學檢測的 caspase-3 陽性細胞在腦組織中經由假手術對照組，FPI 後的第 4 天用 CD34⁻細胞治療組，和 FPI 後的第 4 天用 CD34⁺細胞治療組。(A) 代表大腦 caspase-3 的染色圖片是假手術的大鼠組 (圖 1-1)，使用 CD34⁻細胞治療 FPI 大鼠組 (圖 1-2)，和使用 CD34⁺細胞治療 FPI 大鼠組 (圖 1-3)。(B) caspase-3 的陽性細胞 (Sham controls bar) 為假手術對照組，(▨) 為 FPI 大鼠與 CD34⁻細胞控制組，和 (▩) 為 FPI 大鼠與 CD34⁺細胞治療組。結果表明平均值±標準誤 (N=8)。*P <0.05 與假手術對照組比較；#P <0.05 與 FPI+CD34⁻細胞組比較。



第六節 CD34⁺細胞治療 FPI 刺激血管生成

圖 3-6-1、圖 3-6-2 與表 3-1-1 指出分別以 CD34⁺ cells (5×10⁵/0.3 ml PBS) 及 CD34⁻ cells (5×10⁵/0.3 ml PBS) 處置和假手術對照組所呈現大鼠的腦部 BrdU/內皮雙陽性細胞及血管內皮生長因子染色數目之比較。在大腦海馬回免疫組織化學檢測 FPI 後的第四天，假手術對照組與 CD34⁻細胞處置組比較發現，FPI 大鼠給予 CD34⁻細胞處置所呈現 BrdU 內皮雙陽性細胞 (表 3-3-1；圖 3-6-1) 和血管內皮生長因子陽性細胞 (表 3-3-1；圖 3-6-2) 數目與假手術對照組無明顯差異。但以大鼠在 FPI 後立即給予 CD34⁺細胞組別與 CD34⁻細胞處置的 FPI 鼠組別比較發現，大腦 BrdU 內皮雙陽性細胞和血管內皮生長因子陽性細胞的數目在 FPI 後給予 CD34⁺細胞治療均明顯增加。

圖 3-6-1

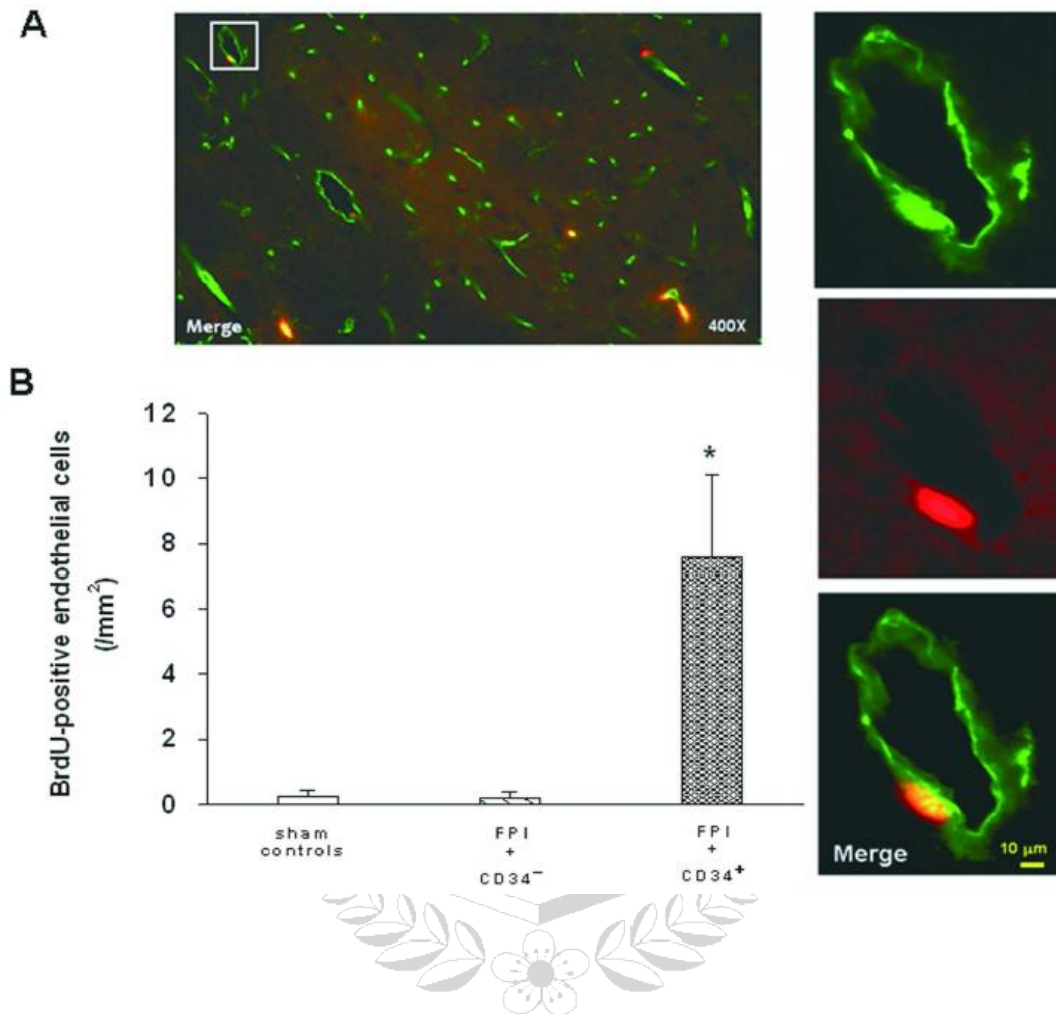


圖 3-6-1 免疫組織化學檢測的 BrdU/內皮雙陽性細胞在腦組織中的假手術對照組 (sham controls)，FPI 後第 4 天用 CD34⁻細胞治療大鼠組 (FPI+CD34⁻)和 FPI 後第 4 天用 CD34⁺細胞治療大鼠組(FPI+CD34⁺)。

(A) 代表大腦的 BrdU/內皮細胞雙重染色圖片是由 CD34⁺細胞治療 FPI 大鼠組。(B) BrdU/內皮雙陽性細胞數目 (sham controls bar) 由左至右分別為假手術對照組，FPI 與 CD34⁻細胞控制組，和 FPI 與 CD34⁺細胞治療組。結果表明平均值±標準誤 (N=8)。*P <0.05 與假手術對照組比較。

3-6-2

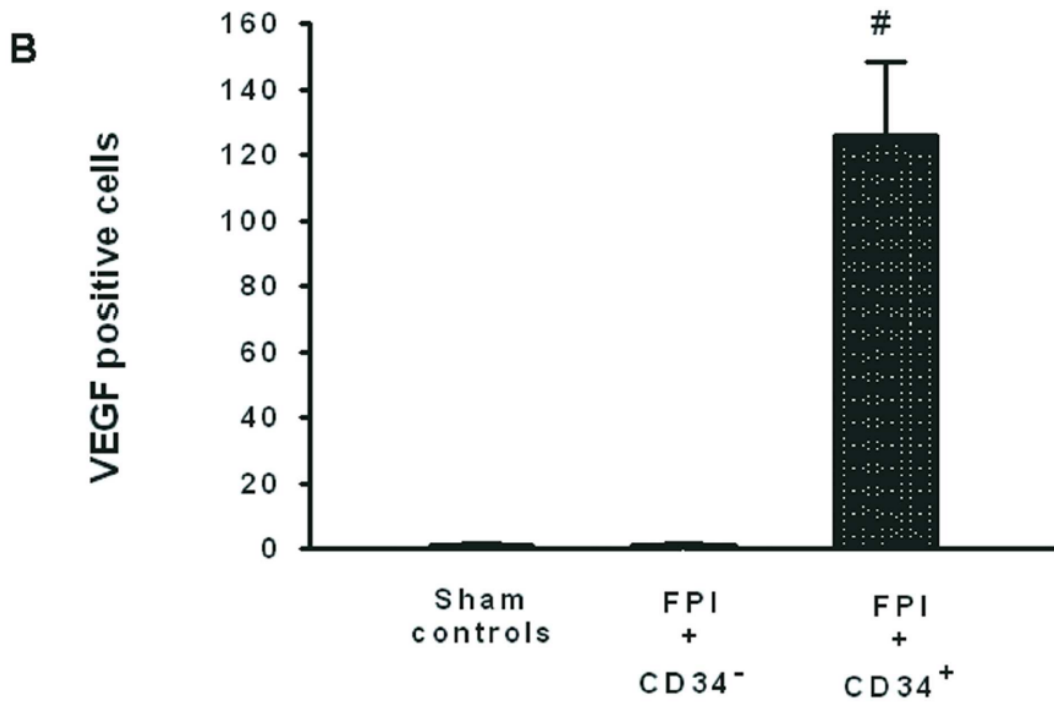
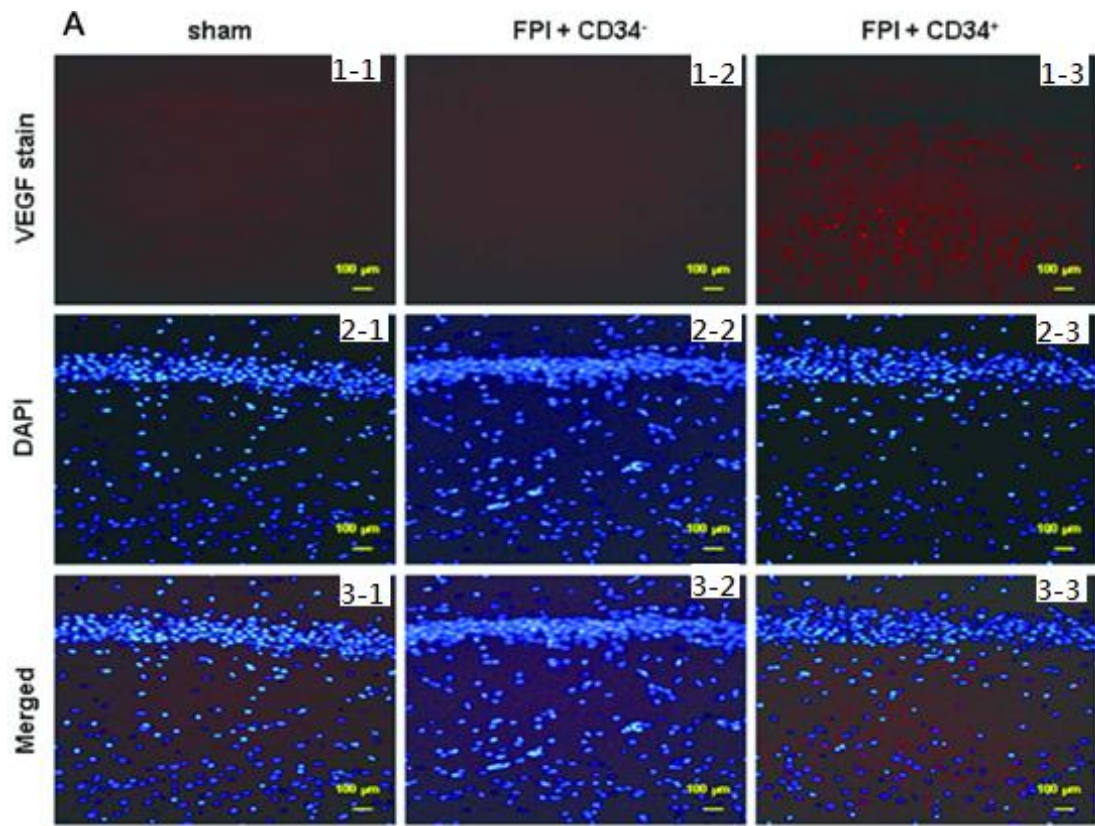


圖 3-6-2 免疫組織化學組檢測腦組織的血管內皮生長因子陽性細胞的假手術對照組 (sham controls), FPI 後第 4 天用 CD34⁻細胞治療大鼠組 (FPI+CD34⁻) 和 FPI 後第 4 天用 CD34⁺細胞治療大鼠組 (FPI+CD34⁺)。(A) 代表大腦的血管內皮生長因子染色圖片, 假手術組的大鼠組 (圖 1-1), 使用 CD34⁻細胞治療 FPI 大鼠組 (圖 1-2), 和使用 CD34⁺細胞治療 FPI 大鼠組 (圖 1-3)。(B) 血管內皮生長因子 (sham controls bar) 由左至右分別為假手術對照組, FPI 與 CD34⁻細胞控制組, 和 FPI 與 CD34⁺細胞治療組。結果表明平均值±標準誤 (N=8)。#P <0.05 與 CD34⁻細胞組比較。



第七節 CD34⁺細胞治療 FPI 刺激神經再生

表 3-3-1、圖 3-7-1 和圖 3-7-2 指出分別以 CD34⁺ cells (5×10⁵/0.3 ml PBS) 及 CD34⁻ cells (5×10⁵/0.3 ml PBS) 處置和假手術對照組所呈現在腦組織中 BrdU-NeuN 染色雙重標記細胞 (表 3-3-1; 圖 3-7-1) 和 GDNF 的陽性細胞 (表 3-3-1; 圖 3-7-2) 數目的比較, 在 FPI 後的第 4 天, 給予 CD34⁻細胞治療 FPI 大鼠與假手術組並無明顯差異。但以 FPI 後給予 CD34⁺細胞治療發現在大腦中檢測 BrdU-NeuN 染色雙重標記細胞和 GDNF 的陽性細胞與 CD34⁻細胞治療 FPI 大鼠組別相比均呈現明顯上升。



3-7-1

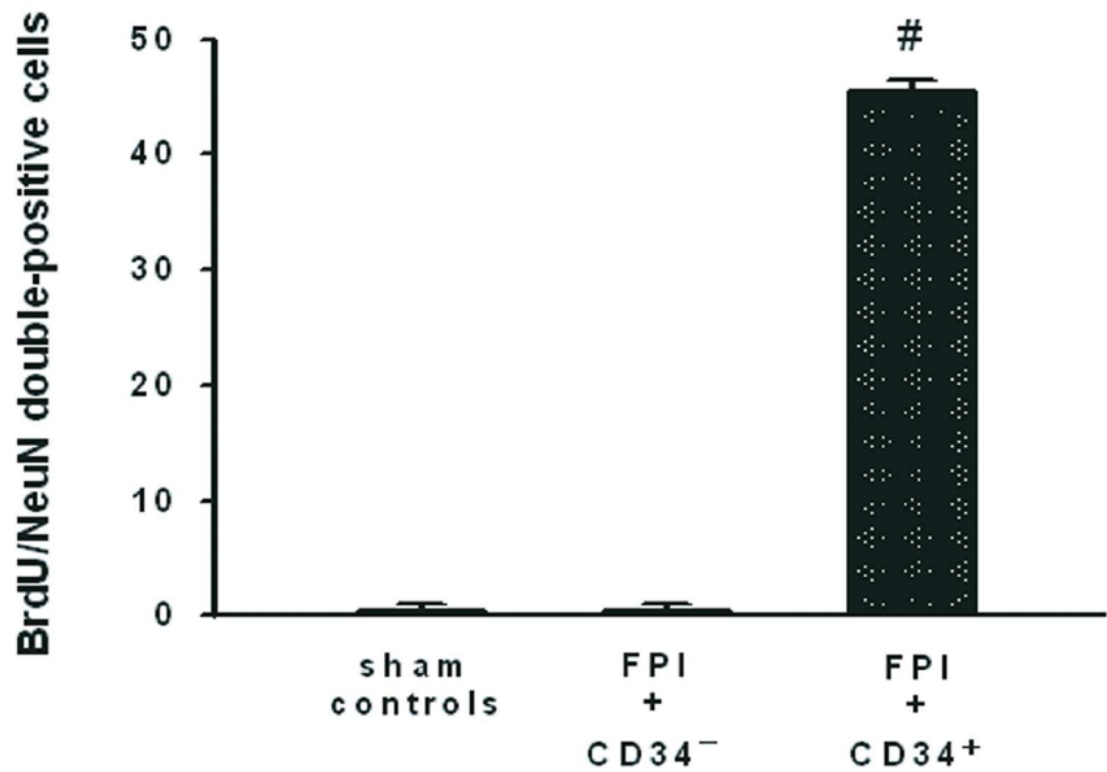
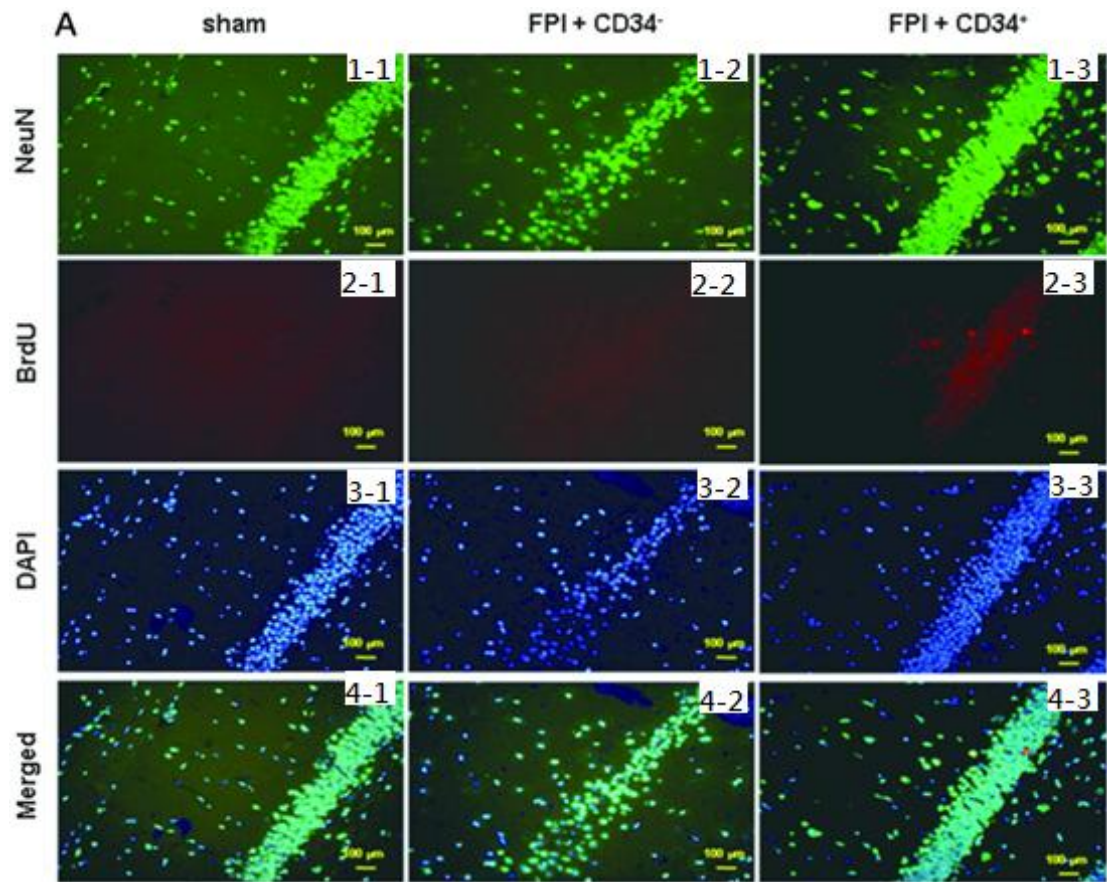


圖 3-7-1 腦組織中免疫組織化學檢測的假手術對照組 (sham controls) , FPI 後第 4 天用 CD34⁻細胞治療大鼠組 (FPI+CD34⁻) 和 FPI 後第 4 天用 CD34⁺細胞治療大鼠組 (FPI+CD34⁺)。(A) 代表大腦的 BrdU/NeuN 雙重染色圖片, 假手術組的大鼠組 (圖 1-1), 使用 CD34⁻細胞治療 FPI 大鼠組 (圖 1-2), 和使用 CD34⁺細胞治療 FPI 大鼠組 (圖 1-3)。(B) BrdU-NeuN 染色雙陽性細胞數目, (sham controls bar) 由左至右分別為假手術對照組, FPI 與 CD34⁻細胞控制組, 和 FPI 與 CD34⁺細胞治療組。結果表明平均值±標準誤 (N=8)。#P <0.05 與 CD34⁻細胞組比較。



圖 3-7-2

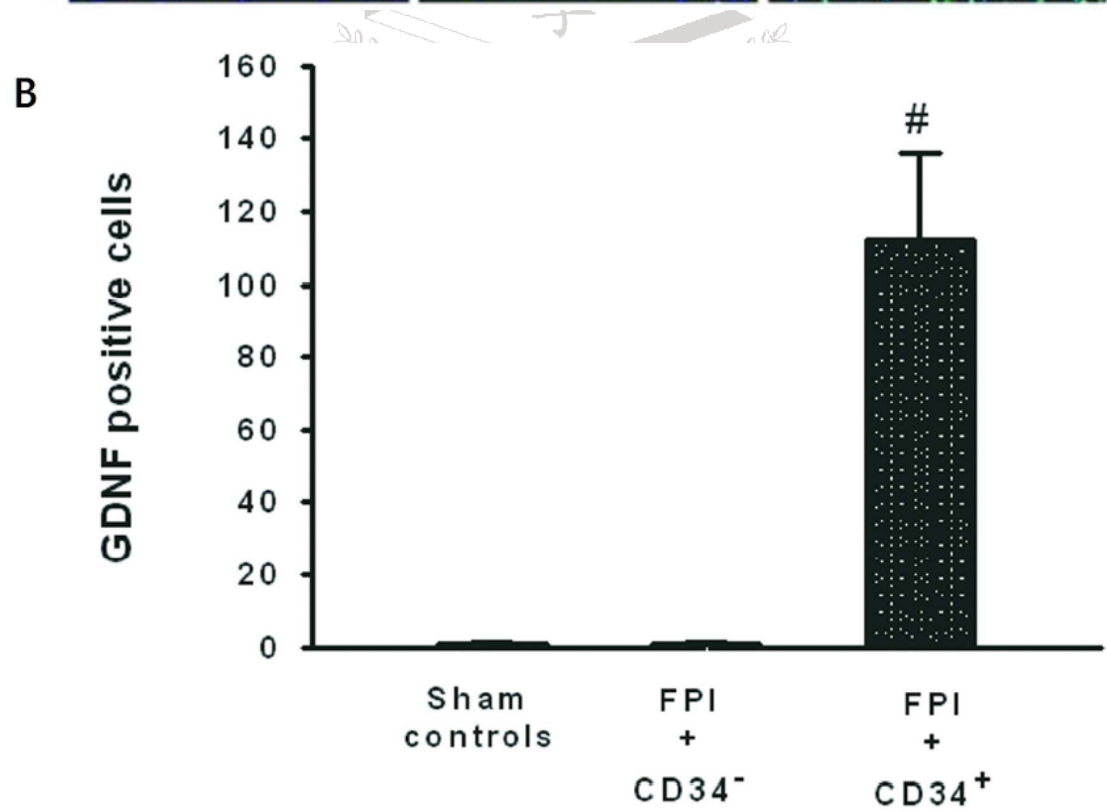
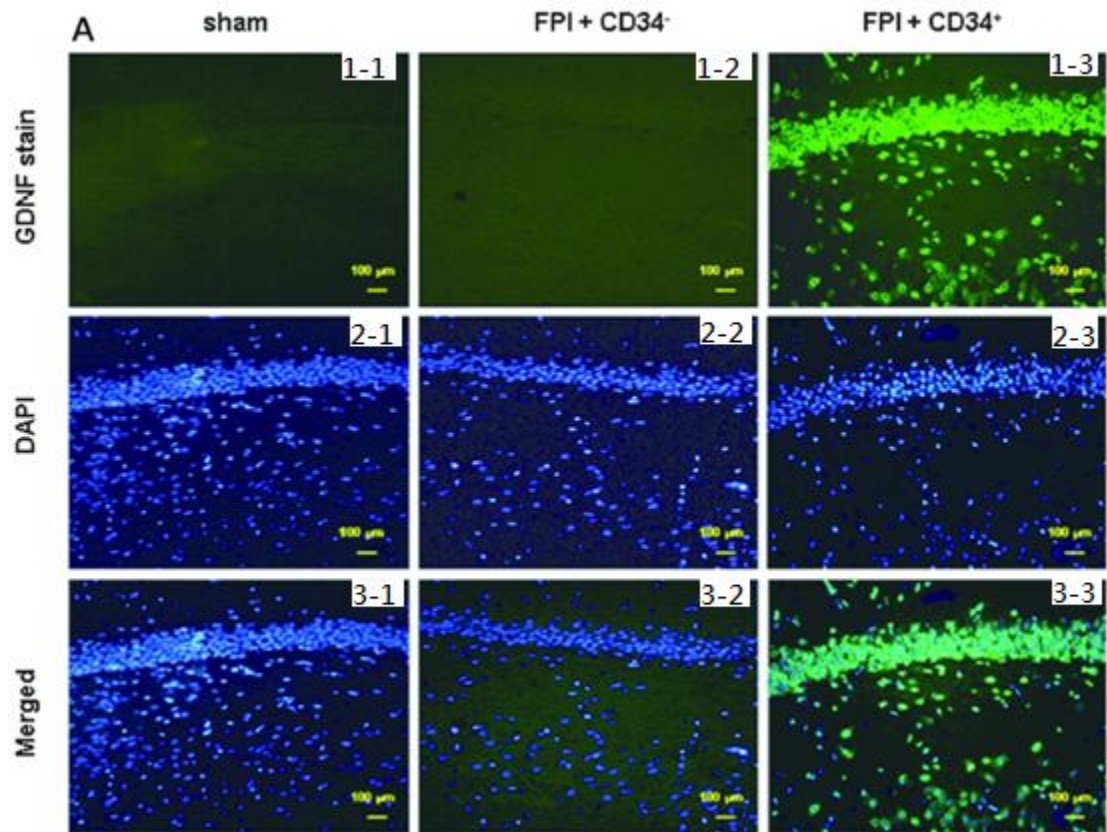
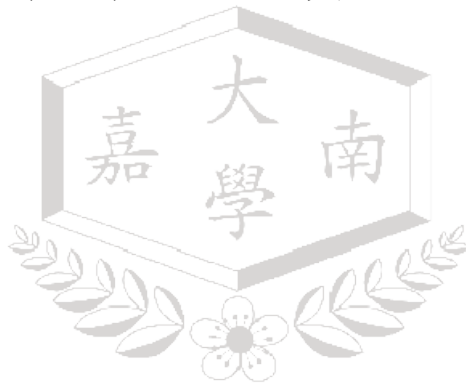


圖 3-7-2 腦組織中免疫組織化學檢測 GDNF 的陽性細胞假手術對照組，FPI 後第 4 天用 CD34⁻細胞治療大鼠組 (FPI+CD34⁻) 和 FPI 後第 4 天用 CD34⁺細胞治療大鼠組 (FPI+CD34⁺)。(A) 代表大腦的 GDNF 染色圖片，假手術組的大鼠組 (圖 1-1)，使用 CD34⁻細胞治療 FPI 大鼠組 (圖 1-2)，和使用 CD34⁺細胞治療 FPI 大鼠組 (圖 1-3)。(B) GDNF 陽性細胞數目，(sham controls bar) 由左至右分別為假手術對照組，FPI 與 CD34⁻細胞控制組，和 FPI 與 CD34⁺細胞治療組。結果表明平均值±標準誤 (N=8)。#P <0.05 與 CD34⁻細胞組比較。



第八節 CD34⁺細胞改善 FPI 引發的炎症反應

表 3-3-1 和圖 3-8 指出分別以 CD34⁺ cells (5×10⁵/0.3 ml PBS) 及 CD34⁻ cells (5×10⁵/0.3 ml PBS) 處置和假手術對照組所呈現的 TNF-α 和 ICAM-1 血清中濃度的比較。在假手術對照組與 CD34⁻細胞處置組比較發現，FPI 大鼠給予 CD34⁻細胞處置均顯著高於假手術對照組。

然而，FPI 引發血清 TNF-α 和 ICAM-1 的增加，若給予 CD34⁺細胞的治療則發現血清中的濃度均顯著下降。表 3-3-1 和圖 3-8 也描述在 CD34⁺細胞治療 FPI 大鼠，血清 IL-10 的濃度也明顯高於假手術組及 CD34⁻細胞治療 FPI 大鼠組。



圖 3-8

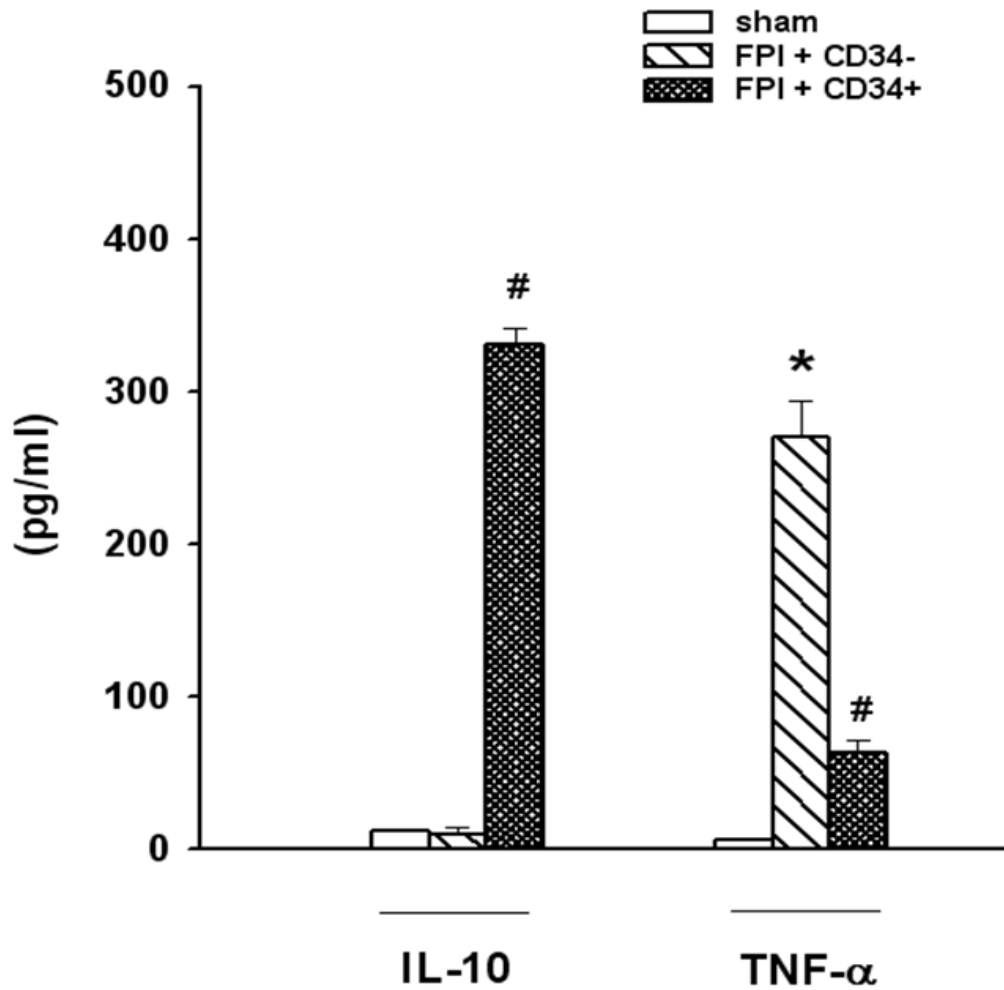


圖 3-8 顯示與假手術對照比較，FPI 後第 4 天 CD34⁻細胞處置的大鼠組和 FPI 後第 4 天 CD34⁺細胞處置的大鼠組。(□) 為假手術組，(▨) 為 CD34⁻細胞處置的 FPI 大鼠組，(▩) 為 CD34⁺細胞處置的 FPI 大鼠組。平均值±標準誤 (每組 N = 8)。* P < 0.05 與 (□) 組比較；# P < 0.05 與 (▨) 組比較。

第九節 CD34⁺細胞治療 FPI 提高循環內皮先祖細胞

表 3-3-1 和圖 3-9 指出分別以 CD34⁺ cells (5×10⁵/0.3 ml PBS) 及 CD34⁻ cells (5×10⁵/0.3 ml PBS) 處置和假手術對照組所呈現的血管內皮先祖細胞 (EPCs) 的比較。以假手術對照組與 CD34⁻細胞處置組比較發現，FPI 大鼠給予 CD34⁻細胞處置，在大鼠血清中內皮先祖細胞均顯著高於假手術對照組。然而以 CD34⁺細胞治療 FPI 大鼠組血清中內皮先祖細胞，更加明顯著高於 CD34⁻細胞治療 FPI 大鼠組。



圖 3-9

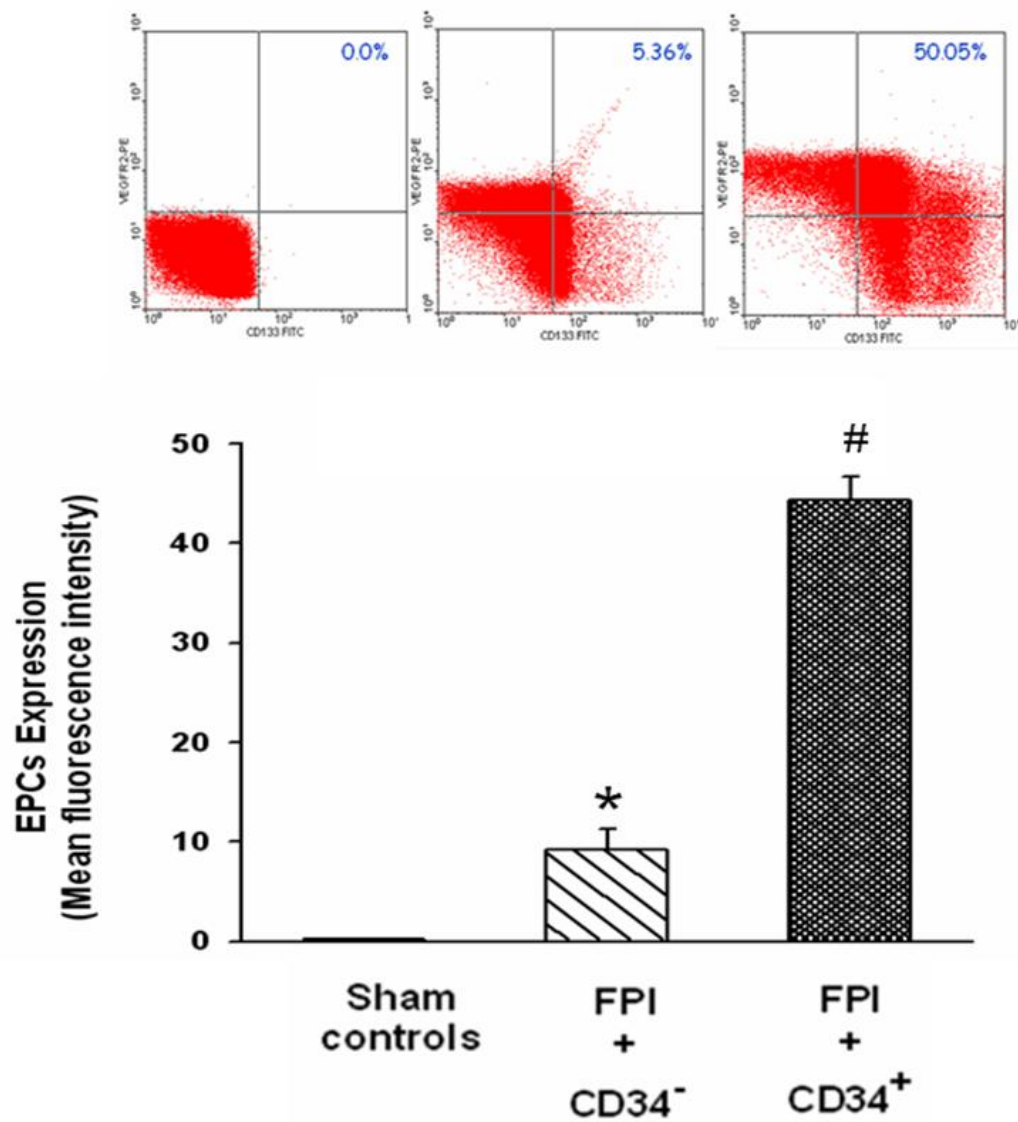


圖 3-9 顯示與假手術對照比較，FPI 後第 4 天 CD34⁻細胞處置的大鼠組和 FPI 後第 4 天 CD34⁺細胞處置的大鼠組。(sham controls bar) 為假手術組，(▨) 為 CD34⁻細胞處置的 FPI 大鼠組，(▩) 為 CD34⁺細胞處置的 FPI 大鼠組。平均值±標準誤 (每組 N = 8)。* P < 0.05 與 (□) 組比較；# P < 0.05 與 (▨) 組比較。

第十節 經由免疫組織化學染色測定 CD34⁺細胞到達 FPI 損傷區域

表 3-3-1 和圖 3-10 指出分別以 CD34⁺ cells (5×10⁵/0.3 ml PBS) 及 CD34⁻ cells (5×10⁵/0.3 ml PBS) 處置和假手術對照組所呈現的染色腦損傷區域數目的比較。在 FPI 後的第 4 天，HNA 陽性細胞檢測在 FPI 腦損傷區域，HNA-DAPI 雙染色以假手術對照組與 CD34⁻細胞處置組比較發現，給予 CD34⁻細胞治療 FPI 大鼠與假手術組並無明顯差異。然而以 CD34⁺細胞治療 FPI 大鼠組，明顯高於 CD34⁻細胞治療 FPI 大鼠組。這表明，CD34⁺細胞移植於 FPI 後第 4 天，CD34⁺細胞可以達到受傷的大腦區域。



圖 3-10

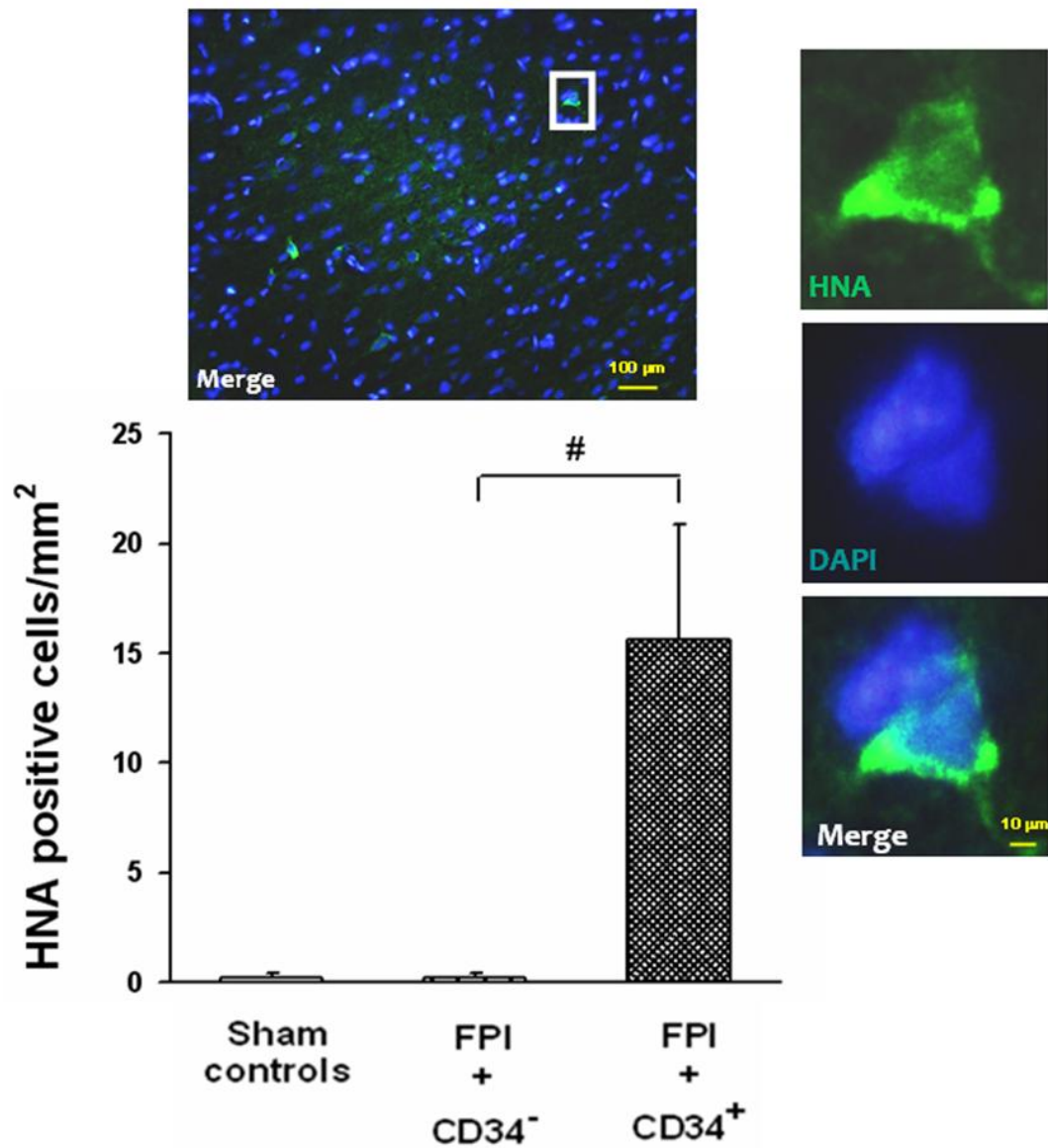


圖 3-10 腦組織中免疫組織化學染色測定的假手術對照比較，FPI 後第 4 天用 CD34⁻細胞處置的大鼠組和 FPI 後第 4 天用 CD34⁺細胞處置的大鼠組。(sham controls bar) 為假手術組，(▨) 為 CD34⁻細胞處置的 FPI 大鼠組，(▩) 為 CD34⁺細胞處置的 FPI 大鼠組。平均值±標準誤(每組 N = 8)。* P < 0.05 與 (□) 組比較；# P < 0.05 與 (▨) 組比較。

第四章 討論

本實驗目的藉由液體撞擊設備建立大鼠腦創傷後，分別給予 CD34⁺、CD34⁻與假手術對照組來比較 CD34⁺對損傷處的影響，看是否可減輕大鼠創傷性腦損傷的傷害，減輕細胞外的損傷標誌物和減少細胞死亡及內皮細胞的破壞，且增加血管生成及神經的再生和改善運動及認知功能的障礙。

本研究結果顯示：

- (1) 靜脈注射 CD34⁺細胞可降低運動和認知功能障礙。
- (2) 在腦組織中細胞核標記的 DAPI (細胞核的染色) 表示 CD34⁺細胞遷移進入損害器官周圍實質的細胞。
- (3) 靜脈注射 CD34⁺細胞可降低細胞凋亡 (在大腦中證實兩個組別所呈現的 TUNEL 陽性細胞和 caspase-3 陽性細胞的數目) 和腦梗塞。
- (4) 靜脈注射 CD34⁺細胞可提升血管生成 (實驗證實在兩個組別所呈現的血管內皮生長因子的陽性細胞和尿嘧啶/內皮細胞的雙陽性細胞數目的增加)。
- (5) 靜脈注射 CD34⁺細胞刺激神經再生 (實驗證實在兩個組別所呈現的 GDNF 陽性細胞和的 BrdU/ NeuN 染色雙陽性細胞數目的

增加)。

(6) 靜脈注射 CD34⁺細胞，提升血液中的內源性內皮先祖細胞的表達。

(7) 靜脈注射 CD34⁺細胞抑制活化炎症反應（實驗證實在兩個組別所呈現的 TNF- α 和 ICAM-1 水平下降，但增加血清 IL-10）。

數據結果表明，FPI 處置的大鼠經由全身給予 CD34⁺細胞，例如：臍帶血細胞可用於治療創傷性腦損傷（Lu et al., 2002）。

據發現，FPI 引起腦組織梗塞、細胞缺血標誌物（例如：谷氨酸，乳酸/丙酮酸比值）（Bullock et al., 1995; Hillered and Persson 1999）、損傷標誌物（例如：甘油）（Hillered et al., 1998）和有毒的氧化物，例如：一氧化氮代謝物（NO_x）（Wu et al., 2008）水平的提高。雖然細胞缺血損傷標誌物在創傷後上升，在 120 分鐘的研究提出，腦內微透析研究進行對人的頭部損傷病人證明，麩氨酸濃度提升臨床顱腦損傷後的很長一段時間（天數）（Zauner and Bullock 1995）。此外，我們發現，FPI 引起的顱內高壓、腦血流灌注、腦梗塞、運動及認知功能障礙，全部被 FPI 後立即給予 CD34⁺細胞的治療抑制。實驗數據證明，在大鼠 FPI 後給予人類臍帶血 CD34⁺細胞治療的結果具有神經保護的作用。

在這項研究中，在周圍損害的大腦區域兩個組別所呈現的 BrdU 內皮雙陽性細胞及血管內皮生長因子陽性細胞的數量，在臍血 CD34⁺細胞治療後均顯著增加，這表明 CD34⁺細胞治療可能會促進新的血管以增加供應血液進行損害的大腦區域神經的再生（Jin et al., 2002; Taguchi et al., 2004）。豐富的血管環境中與血管內皮生長因子的生成可能會加強附隨的血管和神經。此外，兩個組別所呈現的 BrdU 的標記細胞，表示 NeuN 染色(一次後有絲分裂的神經元的表現核蛋白質)及 GDNF 的陽性細胞在 FPI 後給予 CD34⁺細胞治療第四天顯著增加，表示臍血 CD34⁺細胞治療在周圍損害的大腦區域可能刺激神經細胞的再生。然而，不知道是否因 FPI 後給予 CD34⁺細胞經由海馬回、腦室下區（Quinones-Hinojosa et al., 2006; Eriksson et al., 1998）的移轉及分化在周圍損害的大腦區域，亦或在損傷部位活化潛在的內源性神經前驅細胞的發生，來引起增殖細胞的生成，防止神經元的損失。這些觀察結果我們認為，大鼠經 FPI 後給予 CD34⁺細胞處理在周圍損傷的大腦區域可刺激內源性的血管生成和神經的再生改善其成果。論點的支持於幾次的調查之下。例如，人類臍帶血（HUBC）細胞可以融入腦實質和作為營養因子的來源（Erices et al., 2001; Li et al., 2000; Yunoki et al., 1998）。FPI 後，HUBC 細胞進入血管結構，可能會提高血管生成和促進神經功能的改善（Lu et al., 2002）。出生後的血管生

成被視為在成人組織的血管新生，因為骨髓衍生的內皮先驅細胞從周邊血單核細胞中分離合併到生理和病理的血管新生並分化為成熟的內皮細胞 (Murasawa and Asahara, 2005)。事實上，我們目前的研究 FPI 引起的腦缺血用 CD34⁺細胞治療表明，CD34⁺細胞，可提高血液中的內源性內皮先驅細胞的表現。這些骨髓衍生內皮先驅細胞可能會合併到損傷性大腦中新生血管的地點。

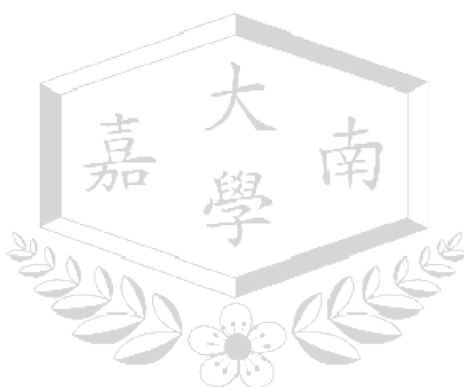
凋亡的影響及細胞凋亡引起炎症性細胞因子是 FPI 後繼發性損傷的重要途徑 (Palzur et al., 2004; Vlodaysky et al., 2006; Keane et al., 2001; Raghupathi 2004)。中性粒細胞釋放炎症性細胞因子和含氧的自由基可能會造成繼發性神經元死亡 (Mullane et al., 1985; Leker and Shohami 2002)。由於在目前的研究結果顯示，在 FPI 後的血清中產生全身炎症反應的分子提高，如 TNF- α 和 ICAM-1 和有毒氧化指標，如氮氧化物。血清中 TNF- α 和 ICAM-1 水平可視為全身炎症反應的標誌物因為它們間接地反映全身各個器官產生的 TNF- α 和 ICAM-1 (Wyble et al., 1996; Chen et al., 2003; Kuzu et al., 2002; Olanders et al., 2002)。氮氧化物被認為是一種有毒的氧化自由基 (Hillered et al., 1998)。FPI 引發血清中的腫瘤壞死因子- α 、ICAM-1 和氮氧化物的增加，可能會導致神經細胞凋亡。在 FPI 大鼠模型中，我們目前的研究顯示，CD34⁺細胞的治療可降低炎症性細胞因子的產生 (例如：TNF- α 和 ICAM-1)、

降低有毒的氧化自由基的生成（例如：NO_x），提升抗炎細胞因子產生（例如：IL-10），降低腦細胞凋亡及改善運動和認知功能的障礙。應該強調在 FPI 的初始階段炎症反應，可能有加重腦損傷的作用，而在後期，這些發炎介質可能有助於恢復或修復（Kadhim et al., 2008）。

此外，研究學者曾指出，普力馬林（Premarin）對創傷性腦損傷動物模式（Chen et al., 2009）具有其保護機制，顯示雌激素在急性發炎反應中扮演著重要的角色。因 FPI 引發的顱內高壓、腦血流灌注、腦梗塞、運動及認知功能障礙，全部被 FPI 後立即給予 Premarin 的治療而誘導其保護機制，可保護 FPI 大鼠刺激血管生成及神經再生，並改善 FPI 大鼠所引發的炎症反應。以 Premarin 雌激素來比較，淋巴球及單核球巨噬細胞均有雌激素的受體（Wickelgren, 1997；Frazier-Jessen and Kovacs, 1995），而 CD34⁺也是一種免疫單核球，其內應有雌激素的受體，所以 Premarin 與本研究結果相同具有創傷性腦損傷的保護機制。

第五章 結論

經由上述的結果顯示，經由靜脈注射人類臍帶血衍生的 CD34⁺細胞至 FPI 後的雄性大鼠，可降低 FPI 導致的功能障礙。注射 CD34⁺細胞進入 FPI 大鼠的大腦中，可誘導 CD34⁺細胞到受損的區域，降低腦梗塞和凋亡並刺激血管生成和神經再生，且抑制全身炎症反應分子的產生。人類臍帶血衍生的 CD34⁺細胞可能是 FPI 的一個有效的治療。



第六章 參考文獻

英文部分：

1. Brain Injury Association of America. Types of Brain Injury. Available at: http://www.biausa.org/Pages/types_of_brain_injury.html
2. Broxmeyer, H.E., Douglas, G.W., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Arny, M., Thomas, L., and Boyse, E.A. (1989). Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable haematopoietic stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 382-3832.
3. Bullock, R., Zauner, A., Woodward, J., and Young, H.F. (1995). Massive persistent release of excitatory amino acids following human occlusive stroke. *Stroke* 26, 2187-2189.
4. Chen, L.W., Egan, L., Li, Z.W., Greten, F.R., Kagnoff, M.F., and Karin, M. (2003). The two faces of IKK and NF-kappa B inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nat. Med.* 9, 575-581.
5. Chen, S.H., Chang, C.Y., Chang, H.K., Chen, W.C., Lin, M.T., Wang, J.J., Chen, J.C., and Chang, F.M. (2009). Premarin stimulates

- estrogen receptor-alpha to protect against traumatic brain injury in male rats. *Crit. Care Med.* 37, 3097-3106.
6. Chio, C.C., Kuo, J.R., Hsiao, S.H., Chang, C.P., and Lin, M.T. (2007). Effect of brain cooling on brain ischemia and damage markers after fluid percussion brain injury in rats. *Shock.* 28, 284-290.
 7. Chou Y.T., Lai S.T., Lee C.C., Lin M.T. (2003). Hypothermia attenuates circulatory shock and cerebral ischemia in experimental heatstroke. *Shock.* 19, 388-393.
 8. Ernest A. Mc Culloch, James E. Till. (1960).The Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells, Determined by Quantitative Marrow Transplantation. *radiation research.*13, 115-125.
 9. Erices, A., Conget, P., and Minguell, J.J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.* 109, 235-242.
 10. Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313-1317.
 11. Evans M.J., Kaufman M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-6.

12. Frazier-Jessen M.R., Kovacs E.J. (1995). Estrogen modulation of JE/monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in murin macrophages. *J Immunol.* 154:1838-45.
13. Gennarelli, T.A., and Graham, D.I. (1998). Neuropathology of the head injuries. *Semin. Clin. Neuropsychiatry* 3, 160-175.
14. Gregory J., Mary S., Sue Gazman., Family Caregiver., Resource Centers. (1997). *Traumatic Brain Injury. Family Caregiver Alliance.* 1-4. Brain Injury Association. <http://www.caregiver.org>
15. Hallam, T.M., Floyd, C.L., Folkerts, M.M., Lee, L.L., Gong, Q.Z., Lyeth, B.G., Muizelaar, J.P., and Berman, R.F. (2004). Comparison of behavioral deficits and acute neuronal degeneration in rat lateral fluid percussion and weight-drop brain injury models. *J. Neurotrauma* 21, 521-539.
16. Harris D.T. (2009). Non-haematological uses of cord blood stem cells. *British Journal of Haematology*, 147, 177-184. Review
17. Harting, M.T., Baumgartner, J.E., Worth, L.L., Ewing-Cobbs, L., Gee, A.P., Day, M.C. & Cox, C.S. (2008). Cell therapies for traumatic brain injury. *Neurosurgical Focus*, 24, E18.
18. Hillered, L., and Persson, L. (1999). Neurochemicla monitoring of

- the acutely injured human brain. *Scan. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 229, 9-18.
19. Hillered, L., Valtysson, J., Enblad, P., and Persson, L. (1998). Interstitial glycerol as a marker for membrane phospholipid degradation in the acutely injured human brain. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry* 64, 486-491.
20. Ivins, B.J., Schwab, K., Warden, D., Harvey, S., Hoilien, M., Powell, J., et al. (2003). Traumatic brain injury in U.S. army paratroopers: prevalence and character. *Journal of Trauma Injury, Infection and Critical Care*; 55(4):617-21.
21. Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., and Greenberg, D.A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 11946-11950.
22. Kadhim, H.J., Duchateau, J., and Sébire, G. (2008). Cytokines and brain injury: invited review. *J. Inten. Care Med.* 23, 236-249.
23. Keane, R.W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Alonso, O.F., Aldana, P., and Dietrich, W.D. (2001). Apoptotic and antiapoptotic mechanisms after traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 1189-1198.

24. Keeling, K.L., Hicks, R.R., Mahesh, J., Billings, B.B., and Kotwal, G.J. (2000). Local neutrophil influx following lateral fluid-percussion brain injury in rats is associated with accumulation of complement activation fragments of the third component (C3) of the complement system. *J. Neuroimmunol.* 105, 20-30.
25. Kuh, S.U., Cho, Y.E., Yoon, D.H., Kim, K.N. and Ha, Y. (2005). Functional recovery after human umbilical cord blood cells transplantation with brain derived-neurotropic factor into the spinal cord injured rats. *Acta Neurochirurgica (Wein)*, 14, 985–992.
26. Kuo, J.R., Lo, C.J., Chang, C.P., Lin, H.J., Lin, M.T., and Chio, C.C. (2010). Brain cooling-stimulated angiogenesis and neurogenesis attenuated traumatic brain injury in rats. *J. Trauma* 69, 1467-1472.
27. Kuzu, M.A., Köksoy, C., Kuzu, I., Gürhan, I., Ergün, H., and Demirpence, E. (2002). Role of integrins and intracellular adhesion molecule-1 in lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Am. J. Surg.* 183, 70-74.
28. Langlois, J.A., Rutland-Brown, W., Thomas, KE. (2006). Traumatic brain injury in the United States: emergency department visits, hospitalizations, and deaths. Atlanta (GA): Centers for Disease

Control and Prevention, National Center for Injury Prevention and Control.

29. Leker, R.R., and Shohami, E. (2002). Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 39, 55-73.
30. Lenzlinger, P.M., Morganti-Kossmann, M.C., Laurer, H.L., and McIntosh, T.K. (2001). The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Mol. Neurobiol.* 24, 169-181. Review
31. Li, Y., Douglas, S.D., and Ho, W. (2000). Human stem cells express substance P gene and its receptor. *J. Hemother Stem Cell Res.* 9, 445-452.
32. Lian, Q., Zhang, Y., Zhang, J., Zhang, H.K., Wu, X., Zhang, Y., Lam, F.F., Kang, S., Xia, J.C., Lai, W.H., Au, K.W., Chow, Y.Y., Siu, C.W., Lee, C.N., and Tse, H.F. (2010). Functional mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells attenuate limb ischemia in mice. *Circulation* 121, 1113-1123.
33. Lu, D., Sanberg, P.R., Mahmood, A., Li, Y., Wang, L., Sanchez-Ramos, J., and Chopp, M. (2002). Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological

- deficit in the rat after traumatic brain injury. *Cell Transplant* 11, 275-281.
34. McIntosh, T.K., Noble, L., Andrews, B., and Faden, A.I. (1987). Traumatic brain injury in the rat: characterization of a midline fluid-percussion model. *Cent. Nerv. Syst. Trauma* 4, 119-134.
35. Meier, C., Middelanis, J., Wasielewski, B., Neuhoff, S., Roth-Haerer, A., Gantert, M., Dinse, H.R., Dermietzel, R. & Jensen, A. (2006). Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatric Research*, 59, 244–249.
36. 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* 78:7634-8.
37. McIntosh, T.K., Vink, R., Noble, L., Yamakami, I., Fernyak, S., Soares, H., Faden, AL. (1989). Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience* 28:233-244.
38. Morganti-Kossmann, M.C., Rancan, M., Otto, V.I., Stahel, P.F., and Kossmann, T. (2001). Role of cerebral inflammation after traumatic

- brain injury: a revisited concept. *Shock* 16, 165-177. Review
39. Morganti-Kossmann, M.C., Satgunaseelan, L., Bye, N., and Kossmann, T. (2007). Modulation of immune response by head injury. *Injury* 38, 1392-1400.
40. Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11, 47-60.
41. Mullane, K.M., Kraemer, R., and Smith, B. (1985). Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J. Pharmacol. Methods* 14, 157-167.
42. Murasawa, S., and Asahara, T. (2005). Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology (Bethesda)* 20, 36-42.
43. Nortje, J., and Menon, D.K. (2004). Traumatic brain injury: physiology, mechanisms, and outcome. *Curr. Opin. Neurol.* 17, 711-718.
44. Olanders, K., Sun, Z., Börjesson, A., Dib, M., Andersson, E., Lasson, A., Ohlsson, T., and Andersson, R. (2002). The effect of intestinal ischemia and reperfusion injury on ICAM-1 expression, endothelial barrier function, neutrophil tissue influx, and protease inhibitor levels in rats. *Shock* 18, 86-92.

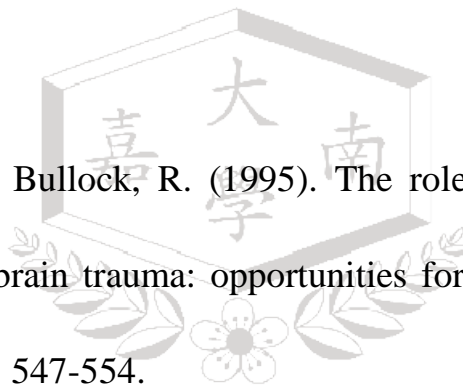
45. Owen, R.D. (1945). Immunogenetic consequences of vascular anastomosis between bovine twins. *Science*. 102:400-401.
46. Palzur, E., Vlodaysky, E., Mulla, H., Arieli, R., Feinsod, M., and Soustiel, J.F. (2004). Hyperbaric oxygen therapy for reduction of secondary brain damage in head injury: an animal model of brain contusion. *J. Neurotrauma* 21, 41-48.
47. Paxinos, G., and Watson, C. (1982). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press.
48. Quiñones-Hinojosa, A., Sanai, N., Soriano-Navarro, M., Gonzalez-Perez, O., Mirzadeh, Z., Gil-Perotin, S., Romero-Rodriguez, R., Berger, M.S., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2006). Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J. Comp. Neurol.* 494, 415-434.
49. Raghupathi, R. (2004). Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathol.* 14, 215-222.
50. Ray, S.K., Dixon, C.E., and Banik, N.L. (2002). Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Histol. Histopathol.* 17, 1137-1152.

51. Stuart Ira Fox 。(2002) 。人體生理學。台灣：美商麥格羅·希爾國際股份有限公司；202-203。
52. Squire, L. and Kandel, E. (2000). Memory: From Mind to Molecules. New York: Scientific American Library.
<http://www.memorylossonline.com/glossary/hippocampus.html>.
53. Sanai, N., Tramontin, A.D., Quiñones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Manuel-García Verdugo, J., Berger, M.S., and Alvarez-Buylla, A. (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427, 740-744.
54. Staimirovic, D., and Satoh, K. (2000). Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. *Brain Pathol.* 10, 113-126. Review
55. Soltesz, I., and Deschenes, M. (1993). Low- and high-frequency membrane potential oscillations during theta activity in CA1 and CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus under ketamine-xylazine anesthesia. *J. Neurophysiol.* 70(1), 97-116.
56. Taguchi, A., Soma, T., Tanaka, H., Kanda, T., Nishimura, H., Yoshikawa, H., Tsukamoto, Y., Iso, H., Fujimori, Y., Stern, D.M.,

- Naritomi, H., and Matsuyama, T. (2004). Administration of CD34⁺ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J. Clin. Invest.* 114, 330-338.
57. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., et al. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-7.
58. Thurman, D.J., Alverson, C., Dunn, K.A., Guerrero, J., Sniezek, J.E. (1999). Traumatic Brain Injury in the United States: A Public Health Perspective. *J Head Trauma Rehabil.* 14(6): 602-15.
59. Togashi, H., Mori, K., Ueno, K., Matsumoto, M., Suda, N., Saito, H., and Yoshioka, M. (1998). Consecutive evaluation of nitric oxide production after transient cerebral ischemia in the rat hippocampus using in vivo brain microdialysis. *Neurosci. Lett.* 240, 53-57.
60. U.S. Department of Defense. (2005). Defense and Veterans Brain Injury Center (DVBIC). Unpublished. Washington (DC).
61. Vlodaysky, E., Palzur, E., and Soustiel, J.F. (2006). Hyperbaric oxygen therapy reduces neuroinflammation and expression of matrix metalloproteinase-9 in the rat model of traumatic brain injury. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 32, 40-50.

62. Walczak, P., Chen, N., Hudson, J.E., Willing, A.E., Garbuzova-Davis, S.N., Song, S., Sanberg, P.R., Sanchez-Ramos, J., Bickford, P.C., and Zigova, I. (2004). Do hematopoietic cells exposed to a neurogenic environment mimic properties of endogenous neural precursors. *J. Neurosci. Res.* 76, 244-254.
63. Wang, Y., Lin, S.Z., Chiou, A.L., Williams, L.R., and Hoffer, B.J. (1997). Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against ischemia-induced injury in the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 17, 4341-4348.
64. Wickelgren I. (1997). Estrogen stakes claim to cognition. *Science.* 276:675-8.
65. Willing, A.E., Lixian, J., Milliken, M., Poulos, S., Zigova, T., Song, S., Hart, C., Sanchez-Ramos, J., and Sanberg, P.R. (2003). Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. *J. Neurosci. Res.* 73, 296-307.
66. Wu, J.Y., Tsou, M.Y., Chen, T.H., Chen, S.J., Tsao, C.M., and Wu, C.C. (2008). Therapeutic effects of melatonin on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *J. Pineal. Res.* 45, 106-116.

67. Wyble, C.W., Desai, T.R., Clark, E.T., Hynes, K.L., and Gewertz, B.L. (1996). Physiologic concentrations of TNF alpha and IL-1beta released from reperfused human intestine upregulate E-selectin and ICAM-1. *J. Surg. Res.* 63, 333-338.
68. Yunoki, M., Kawauchi, M., Ukita, N., Noguchi, Y., Nishio, S., Ono, Y., Asari, S., Ohmoto, T., Asanuma, M., and Ogawa, N. (1998). Effects of lecithinized SOD on sequential change in SOD activity after cerebral contusion in rats. *Acta Neurochir. Suppl. (Wien)* 71, 142-145.
69. Zauner, A., and Bullock, R. (1995). The role of excitatory amino acids in severe brain trauma: opportunities for therapy: a review. *J. Neurotrauma* 12, 547-554.



中文部分：

1. 陳勝咸。(2007)。人類臍帶血幹細胞與雌激素在實驗性熱中風所引發多器官衰竭的預防與修護。國立成功大學臨床醫學研究所博士論文。
2. 林彥昇。(2010)。普力馬林 (Premarin) 施打於脊椎神經損傷動物模式產生之保護機制。南台科技大學生物科技研究所碩士學位論文。
3. 康介乙。(2010)。探討催產激素施打於雙側卵巢切除的母鼠後其對熱中風所誘發的大腦損傷及血液循環失調的保護機制。南台科技大學生物科技研究所碩士學位論文。
4. 鍾啟榮。(2010)。探討顆粒性白血球群落刺激因子治療脊椎神經損傷之大鼠的角色。南台科技大學生物科技研究所碩士學位論文。
5. 張毓容。(2006)。大量表現幹細胞專有轉錄因子抑制肌肉細胞走向分化。國立中央大學生命科學研究所碩士論文。
6. 張立明。(2004)。人類胚胎幹細胞的倫理考量。醫學教育 8 卷 2 期：189-201，32。
7. 巫康熙。(2007)。從臨床看幹細胞的研究和應用。中國醫訊 46；13。

8. 楊俊佑。(2004)。能幹的幹細胞。科學發展；373期：15。
9. 李文婷。(2003)。神奇寶貝幹細胞。科學發展；361期：55-56。
10. 侯劭毅。(2004)。幹細胞與臍帶血。科學發展；373期：58-60。
11. 全球美敦力，(2011)，關於腦損傷，Medtronic，
<http://www.medtronic.com.hk/your-health/brain-injury/index.htm>
12. 幹細胞，維基百科，
<http://zh.wikipedia.org/zh-tw/%E5%B9%B9%E7%B4%B0%E8%83%9E>

