

知識天地

顯微鏡下的一抹彩虹

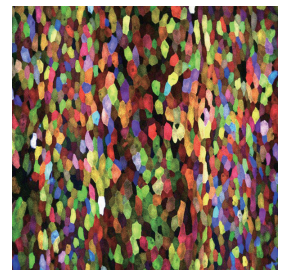
陳振輝助研究員（細胞暨個體生物學研究所）

為什麼有的脊椎動物像是蠓螈或魚類可以再生複雜組織，但是人類卻不行？這是一個讓生物學家著迷了好幾個世紀的問題。在這些動物身上，再生過程是如何發生？為什麼牠們可以擁有再生能力？回答這兩個問題，可以幫助再生醫學的發展，突破目前治療上的瓶頸。在細胞的層級上，要恢復一個複雜的組織，比如說長回來一個被切斷的手臂，這個過程其實需要在很多層面上調控細胞的行為。比如說，殘肢上的細胞要移動、增生、分化產生新組織，同時也要跟舊組織溝通、整合，來讓新生的手臂具有正確的大小、形狀和功能。而細胞的動態行為，在再生的過程中，需要在時間和空間上被精確的協調。利用目前影像學的工具和平台，要在成年脊椎動物上，即時動態捕捉、研究再生過程中個別細胞的一舉一動，技術上仍然是相當挑戰。第一個明顯的挑戰是：如何以高解析度拍攝活體生物身上的細胞？第二個挑戰是：如何在再生過程中，長時間、大規模追蹤個別細胞的行為？

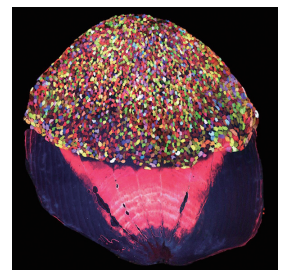
在2012年，當時跟筆者一起在Dr. Ken Poss實驗室工作的同事Vikas Gupta成功的利用了「Brainbow」的細胞標誌技術，探討了個別心肌細胞在斑馬魚心臟發育和再生過程中的貢獻 (Gupta and Poss, 2012)。「Brainbow」是一個很有創意的多顏色細胞標誌技術，其基本的原理是利用基因重組的方式，將三種不同顏色的螢光蛋白，隨機在個別細胞裡表現不同的數量。理論上三種原色的隨機組合，可以產生上百上千種不同的顏色，來分別標誌群體裡的每一個個別的細胞。在細胞生物學上應用這個的技術，可以突破目前螢光蛋白在顏色、數目上面選擇的限制。Joan Livet在2007建立這個技術的時候 (Livet et al., 2007)，成功的將老鼠大腦裡的個別神經細胞標誌上不同的顏色，讓複雜的神經網路連結可以被進一步解構。因為這個技術首先應用在大腦神經細胞(Brain)的研究，及經由這個技術所觀察到的細胞影像，就像彩虹(Rainbow)一般有著多彩炫目的顏色組合，這個基因學的技術被作者們暱稱為「Brain-bow」。

Vikas的研究示範了這個細胞標誌技術，有很大的潛力可以應用在神經細胞之外的細胞種類。還記得Vikas在Ken的實驗室，第一次跟大家分享利用「Brainbow」技術產生的心肌細胞影像的時候，當下自己的印象是多麼深刻。在進一步跟Vikas的討論後，我開始聯想到其它應用的可能性。有沒有可能，我也可以利用「Brainbow」的技術，來標記斑馬魚尾鰭上所有的細胞，再進一步追蹤、分析個別細胞在再生過程中的動態行為。我的想法是：斑馬魚尾鰭是一個已經建立完備的再生模型；因此，尾鰭做為一個身體的外部構造，表面平坦且透光良好，有機會作為一個實驗影像平台來進行高解析度、活體細胞的即時連續觀察，在細胞層級上回答一個我很有興趣的問題：「再生過程是如何發生？」。為了要標記尾鰭上大部分的各式細胞，我一開始天真的利用beta-actin2的啟動序列來控制「Brainbow」在尾鰭的表現範圍，再加上一個自己設計的雙重藥物基因控制模組，來調控基因重組酵素的表現量和活性。在這個計畫的初期，我利用基因轉殖的斑馬魚胚胎做了一些測試，證實這個實驗設計是可行的。

幾個月過後，當我開始尋找表現穩定的基因轉殖魚系時，一開始的結果卻是讓人失望。幾乎所有的基因轉殖魚在成魚階段，我都可以觀察到不受控制的基因重組，而且被「Brainbow」模組標誌的細胞種類在不同的轉殖魚系裡，也存在很大的變異性。在持續幾個禮拜不斷的尋找、測試不同轉殖魚系的過程中，我意外發現其中一隻很特別的魚系，「Brainbow」的模組在牠尾鰭的皮膚表皮細胞有很穩定的表現，顯微鏡視野下的每一個表皮細胞都被標誌上不同的顏色 (圖一和圖二)。進一步分析這些被標誌的表皮細胞，讓我驚訝的是，這些像是被各種顏料染上的細胞，它們的顏色表現都相當穩定，一個視野下很容易可以偵測到70-80種隨機分布不同的顏色，足夠讓我們長時間追蹤、大規模分析個別相鄰表皮細胞的行為變化。這隻「Skin-bow」魚系提供一個很特別的機



圖一：「Skinbow」斑馬魚尾鰭的皮膚表皮細胞。個別的表皮細胞具有不同的顏色，因此，相同的細胞可以在組織再生的過程中被長時間追蹤觀察。



圖二：「Skinbow」斑馬魚身上摘下的單一魚鱗。魚鱗上緣的皮膚表皮細胞在顯微鏡下呈現多彩的顏色。

會，讓我可以探討整個群體的皮膚表皮細胞，在組織恆定和再生過程中被調控的機制。為了要達到同時追蹤所有顯微鏡視野下約1000顆左右細胞的目標，我很幸運找到兩位專長在細胞影像分析的科學家一起合作。在Dr. Stefano Di Talia (Duke University) 和Dr. Alberto Puliafito (Istituto di Candiolo) 的協助下，我們進行一系列的定量分析，探討整個群體的皮膚表皮細胞，在面對不同的傷害情況下，如何集體反應、合作、再生，以恢復原來的組織構造 (Chen et al., 2016)。

利用「Skinbow」的系統，我們發現了皮膚表皮細胞的壽命在不同個體間是相當接近。在未受傷的情況下，每18.5天整個皮膚表面就會完整更新一次。在組織受傷，皮膚再生的過程中，已經分化的表皮細胞會經由快速移動、改變大小、加速分化的機制來完成再生的反應。而這一系列影像學的實驗，也讓我更了解到過去組織切片研究的限制。如果不是經由在活體身上，連續長時間觀察相同的一群細胞，許多細胞行為的動態調控是無法被觀察研究的。利用「Skinbow」的系統，我進一步在3維空間裡，探討皮膚基底幹細胞是如何跟皮膚表皮細胞溝通來完成再生。在截斷尾鰭的再生反應中，基底幹細胞的增生是完成皮膚組織再生的主要機制。有趣的是，當面對大面積皮膚刮傷的時候，再生的過程主要是經由加速細胞分化的機制完成，而基底幹細胞並不會增生。表皮組織受傷後產生的氧化反應，可以直接調控細胞分化的速度。面對不同的受傷程度，皮膚細胞如何集體做出不同的反應，以最有效率的方式完成再生，是另一個我現在實驗室裡想要回答的問題。

經由發展「Skinbow」系統的經驗，我的感想是類似的實驗方法（結合多顏色細胞標誌技術、細胞動態即時捕捉和細胞行為定量分析）在再生研究領域有很大發展的空間。在尾鰭再生過程中參與的各式細胞，比如骨細胞、神經細胞、血管細胞、間質細胞等，經由建立適合的基因轉殖魚，它們的行為可以被有系統的定量分析，進而建立起一個在3維空間裡，可以解釋各式細胞如何互動、建構複雜組織的工程藍圖。相關的研究成果，有幾個立即的應用：其一是對生物醫學工程的啟發，提供誘導各式細胞再生分化的可能策略。其二是相關新發現的細胞行為和反應機制，可以作為一個探索的平台，來尋找其調控的分子機制；或是應用在分析當個體面對老化、感染或是癌化的情況下細胞生理特質的改變等。

題外之話，實驗的結果不如預期其實是常態。重要的是保持開放的心態，留心意料之外的發現。我自己的經驗是，很多時候這些意料之外的發現，後來的發展都比原先計畫的方向更「多彩」有趣。

陳振輝實驗室的網站：

<http://icob.sinica.edu.tw/lab.php?id=40>

<https://chenhui-chen.squarespace.com>

更多「Skinbow」的介紹：

相關影片：<https://www.youtube.com/watch?v=xCNz1OHQ30E>

相關影像：<https://www.flickr.com/photos/nihgov/26064937482/in/album-72157659401055954/>

NIH director's blog: <https://directorsblog.nih.gov/2016/03/31/snapshots-of-life-fish-awash-in-color/>

Duke Today: <https://today.duke.edu/2016/03/zebrafish>

The Economist: <http://www.economist.com/news/science-and-technology/21695380-epidermis-now-comes-technicolor-rainbows-beginning>

索引：

Chen, C.H., Puliafito, A., Cox, B.D., Primo, L., Fang, Y., Di Talia, S., and Poss, K.D. (2016). Multicolor Cell Barcoding Technology for Long-Term Surveillance of Epithelial Regeneration in Zebrafish. *Dev Cell* 36, 668-680.

Gupta, V., and Poss, K.D. (2012). Clonally dominant cardiomyocytes direct heart morphogenesis. *Nature* 484, 479-484.

Livet, J., Weissman, T.A., Kang, H., Draft, R.W., Lu, J., Bennis, R.A., Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (2007). Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* 450, 56-62.