

On Growth, Pattern Formation and Forms

謝豐舟教授

生長與生物形式(Growth and Forms)

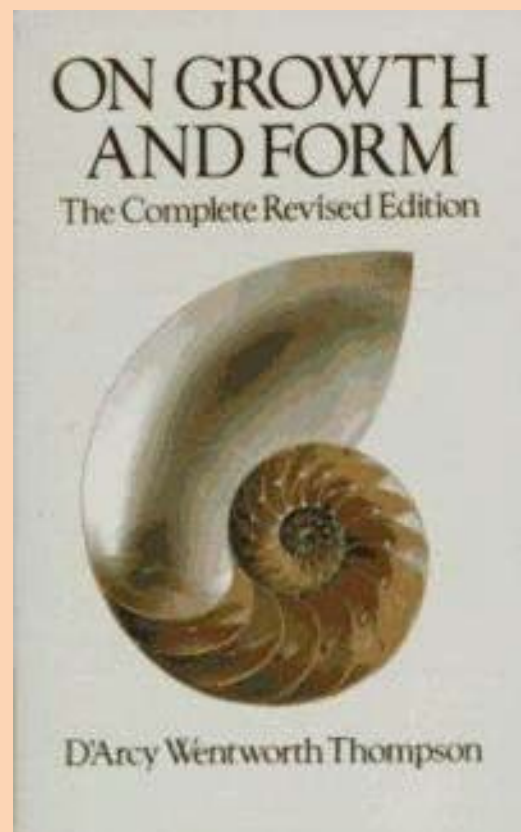
近年來全世界掀起一股幹細胞的熱潮。一般人的想法是只要把幹細胞送入人體，它們就會自己去到該去的地方發揮作用，例如修補受損組織，或產生某些人體需要的物質。

事實上，除了血液細胞之外，細胞要發揮作用一定要先形成組織或器官，也就是它們要形成某種結構。這些結構具有形狀（**shape**）或是形式（**form**），這個過程就是形態生成（**morphogenesis**），例如在小腸壁中上皮細胞要形成絨毛，在肺臟中要形成肺泡，並藉由分支（**branching**）形成肺小葉。這個**morphogenesis**的過程是最複雜深奧的，它就是冷門的發育生物學探討的領域。傳統上，我們認為**morphogenesis**是由基因在主導，然而我們却忽略了生物物理力量（**biophysical force**）所扮演的角色。若要讓幹細胞發揮其作用，我們必須要了解**morphogenesis**的過程，也就是了解細胞如何形成構造（**structure**）否則幹細胞研究將如三、四十年前非常熱門的基因治療一樣曇花一現。從前的基因治療只是盲目地把基因送入細胞，去向何處不能控制；進入細胞之後，其表現也不能調控，因此三、四十年後的今天基因治療尚未能在臨床使用上佔一席之地。

幾年前，有人用**matrix**做成耳朵的形狀種植在老鼠背上，長成一個有細胞包覆的耳朵而造成轟動。不過，沒有報導的是，一陣子之後**matrix**被吸收，耳朵也不見了，因此歸根究底還是要透過**morphogenesis**讓細胞自己形成構造才是正途。

2010年7月10日台灣大學正式成立校級的發育生物學與再生醫學研究中心，這中心的主軸就是“morphogenesis”希望結合生物化學及生物物理的學者來探討morphogenesis的奧妙，再進而用於幹細胞研究的發展。

在20世紀初英國生物學家D'Arcy Thompson就指出器官形式必須透過“生長”來研究，他其實講的就是morphogenesis實在是真知灼見，他說：數字準確度是科學的靈魂所在，達到數字準確度是檢驗學說真實性與實驗正確性的最佳，也許是惟一的指標(*Numerical precision is the very soul of science, and its attainment affords the best, perhaps the only criterion of the truth and theories and the correctness of experiments*)



今年恰是D'Arcy Thompson誕生150年，他深為生物的外觀與構造而迷惑，在他影響深遠的鉅著“*On Growth and Form*”一書中，他描述及解釋形態生成（**morphogenesis**）的原則，他認為形態生成就是生物生長以及達成其形式（**form**）的方式。利用許多例子，從蜂窩到蝸牛殼的螺旋，他強調形式必須以生長的角度來研究而要解釋形狀必須先了解其機轉（*Form should be studied in the context of growth and to explain shape it was essential to understand the underlying mechanisms*）。由此衍生出此書的中心論述：生物形式是機械性與物理性過程的結果，而這些過程的描述必須具有數學的準確性（*Biological forms are the result of mechanical and physical processes that should be described with mathematical precision*）。

雖然發育過程中的形式生成（**pattern formation**）與細胞分化（**cellular differentiation**）之分子基礎已廣受注目，但我們對生長與器官形狀的調控却所知有限。一方面這是因為對器官形狀與細胞行為準確的高解析度3D測量與這些資料的定量分析在技術上難度甚高，因此3D的器官經常是使用比較簡單的2D表現方式來研究，不過近年來在技術與運算能力的大幅進步已經漸漸可以克服這些限制。

總體而言，發育中的組織是藉由非均等生長（**anisotropic growth**）來達到形態生成（**morphogenesis**）也就是組織在不同方向的擴張並非一致，才能達成器官的最終形狀。要達到 **anisotropic growth** 的方式有二種，第一種方式是藉由外來的機械力形塑器官的最終形狀（**External mechanical forces mould the final organ form**）。細胞被外力重塑形狀或重新組合，例如，生長基質（**growth substrate**）對培養細胞施予表面張力而血流對內皮細胞施予剪力（**shear force**）；第二種方式是形狀的形成是器官與生俱來的能力，它是構成器官的個別細胞之集體行為（*Shape formation can be inherent to the collective behavior of the individual cells comprising the organ*）（圖1）。

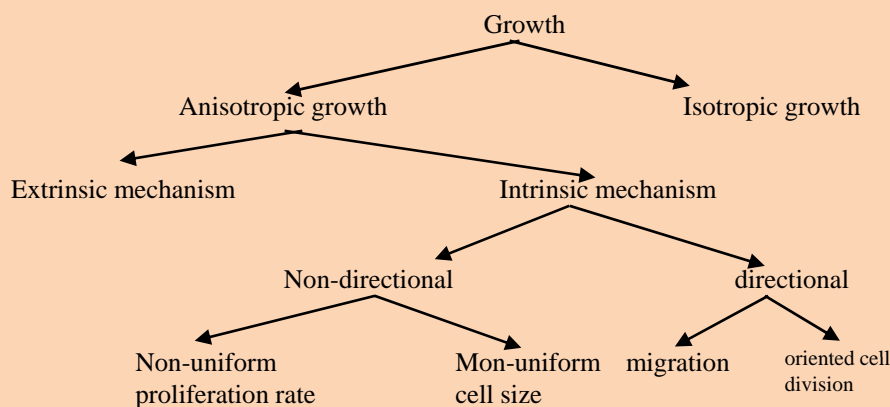


圖1：細胞生長可分均等（**isotropic**）（在各方向的生長均相等）及非均等（**anisotropic**）（在某些特定方向的生長較多）。**anisotropic growth**又分外來機制（**extrinsic mechanism**）及內在機制（**internal mechanism**）；前者是因外力而改變形狀，後者則源自非方向性（**non-directional**）及方向性**directional**兩種機制。非方向性機制是因組織內不同部分的**proliferation rate**不同或因組織內各種細胞大小的不同所致；方向性機制則因為細胞有方向性的遷移（**migration**）或分裂（**division**）所致。

要了解釐清**morphogenesis**機制的困難何在，最好的例子就是肢體的發育。從兩棲類到哺乳類等四足動物的肢體都是由小小的隆起也就是（**limb bud**）生成。起初這些**limb bud**是由鬆散的間質細胞組成，外包一層外胚層細胞。在**limb bud**的遠端，外胚層增厚成**AER**（**apical ectoderm ridge**），它會分泌細胞外訊號，特別是**FGF**（**Fibroblast Growth Factor**）家族的成員，來造成肢體的生長與定型（**Patterning**）。在肢體生長開始之後，骨骼形成之前肢體組織主要是往遠端生長，遠離軀幹；也就是肢體長度在遠—近方向的增加大於在前—後或是腹—背方向的增加，因此肢體就成為研究非均等生長（**anisotropic growth**）一個最好的例子。

由於**AER**是增殖訊號的來源，因此產生了“**growth-based morphogenesis**”的假說，也就是沿著肢體的遠—近軸有一個增殖速率的梯度（**a gradient of proliferation rate**）。這是一種無方向性的機制（**non-directional**）。實際上肢體遠端細胞的增殖速率確實較快40年來已有各種不同的運算模式用來測試增殖速率的不同是否可以解釋肢體的生長，不過這些模式通常只限於一維或二維。他們的結論是**growth-based morphogenesis**可以解釋肢體的生長，但其他機制也不能排除。某些運算模式甚至也加入了方向性的機制或是外力的影響來使之更符合於實際觀察所見。

最近在PLOS Biology的一篇論文中Boehm等人以最新的影像與運算技來檢驗**growth-based morphogenesis**。他們秉承著D’Arcy Thompson的精神，使用下列三種做法提供了前所未有的精密觀測。

- 1.使用最新的OPT（**Optical Projection Tomography**）技術來產生生長中白鼠肢體的高解析度3D影像，由此產生一個**in silico**的**limb bud**，可以用來測試任何肢體**morphogenesis**的模式。
- 2.進行系統性的收集增殖速率及細胞密度不像以前必須依賴在細胞周期長度的某些假設。綜合起來，可以得到**limb bud 3D**的增殖速率。
- 3.建立一個3D的**computer model**未模擬在測得的增殖速率下，由OPT得來的肢體複製體如何生長。

在Boehm所建構的模式裡，它將肢體分成約**27,000**個相連的四方體小塊，稱之為“**finite element**”。藉由增加每個**finite element**的體積來模擬生長的效率是符合於該位置的細胞增殖速率。他們也將整個肢體視為一個不能壓縮的黏稠液體（**incompressible viscid fluid**）如此可以利用流體力學的原則，依所測得的細胞增殖速率來預測每個元素的膨脹及軌跡（**trajectory**），然後藉由與真實肢體的比較來測試此一模式的正確性。

Boehm等人得到以下的結論：

1. 試驗結果排除“**growth-based morphogenesis**”是**morphogenesis**的主要驅動力，雖然他們發現肢體遠端的細胞增殖率確是近端的兩倍，但此差異不足以解解肢體的最終形狀。
2. 經由系統性地探索不同的細胞增殖速率，Boehm發現：理論上，非方向性機制（**non-directional mechanism**）可以產生肢體的形狀，不過有些區域的細胞周期必須小於2小時—至少為觀測值的五倍，而在其他區域約有**10%**的細胞必須縮小或死亡，同時要有相當數量（約**20%**）的細胞，由鄰近的間質組織進入**limb bud**，也就是新進入的細胞將原來的細胞推向遠端。

不過，Boehm等人並不接受這個非方向性的機制，相反地他們在**limb bud**的間質組織中發現**filopodia extension**以及細胞分裂都有具方向性的偏差。這顯示某種主動性的方向性非均等細胞行為（**directional-anisotropic-cell behavior**）是造成肢體形狀的最可能解釋。

此一研究使學者的注意力重新聚焦在**morphogenesis**的主動方向性機制（**active directional mechanism**）。在2D組織如**epithelial sheet**也有類似的結論。更值得注意的是：細胞分裂的方向性在果蠅的**wing disc**及開花植物花瓣形狀的形成也有其角色。這些發現顯示此一機轉在發育中是被經常利用的，將來的研究必須說明方向性的細胞行為如何解辦肢體的生長，Boehm等人的資料顯示：這可能涉及一種**convergence-extension-like**過程而非直接了當的向遠端移動。要釐清這個問題必須能追蹤個別細胞的移動路徑，當然這也需要進一步開發觀察及分析技術。

假若morphogenesis是藉由某種方向性機制，那麼到底引發方向性機制訊息（cue）從何而來？在limb bud 有好幾個分泌性的訊息（secreted signals）會形成梯度（gradient）來調控生長與形狀。這些訊息分子曾被認為會給予細胞某些極性（polarity）。不過這些morphogen在anisotropic cell behavior的作用，例如方向性的細胞分裂或遷移，直到最近才受到注意。在肢體內，研究顯示：異位的FGF4來源會吸引間質細胞的之移動，因此從AER產生的FGF4可能會賦予細胞方向性的行為，這與在原腸胚形成（gastrulation）時FGF會導引細胞遷移的觀察是相符，缺乏FGF的Talpid 3 mutant雞胚胎，其外觀看起來就像Boehm對缺少方向性細胞活動的預測模式。Talpid 3 mutant也缺乏與肢體前後軸生長有關的Sonic Hedgehog (Shh)訊息，因此Shh訊息可能也與細胞的方向性行為有關。

另外，細胞可能也需要planar cell polarity (PCP) pathway的訊息來獲得方向感。PCP訊息與reorganizing epithelial packing geometry（例如果蠅翅膀的發育）與convergent extension movement皆有相關。研究顯示PCP會透過控制細胞行為的方向性差異諸如cell prolongation, junction remodelling或細胞分裂之軸向。這些anisotropic過程會使細胞對其鄰居施加的機械力發生改變，此訊息可能是經由junctional或cytoskeleton component傳遞。PCP在哺乳類肢體生長的角色未明，但缺少PCP調控者如Wnt5a的變種確實有縮短的肢體，因此細胞的方向感到底是經由局部的機械力或組織起初的不均等特性或仰賴全面的外來訊息則尚待釐清。

總而言之，方向性的細胞活動例如有方向性的分裂或遷移看來應在器官的morphogenesis扮演關鍵的角色。不過它如何賦予細胞方向訊息及力量以達到anisotropic cell behavior則尚不得而知。

由反應擴散模式了解生物學空間形式
(Understanding biological spatial patterns through
Reaction-Diffusion Model)



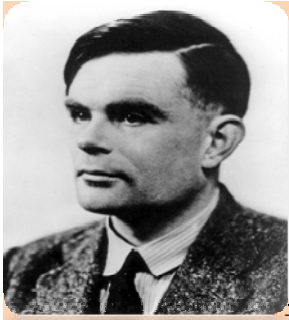
由左至右：

後排：李心予老師、曹伯年老師、王弘毅老師

前排：謝豐舟老師、**Prof. Shigeru Kondo**、楊偉勛老師

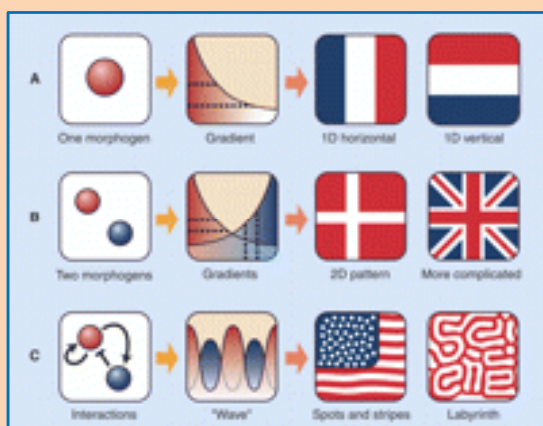
二十一世紀初當**gene expression microarray**問世的時候，生物醫學研究者莫不以為從此我們可以從**deduction**跨入**system**，了解生物醫學的種種**network**，因為生物醫學的各種現象，不論是正常或病態，都是由細胞或分子交互作用形成的**complex network**。然而儘管**gene expression microarray**技術的成熟，產生了許多大規模的**database**也找到了許出生物印記(**bio-signature**)，但我們還是很難從其中看出**network**與**system**的真面目。**gene expression micro array**之後又有更多的**high throughput**工具，如**proteomics, microRNA, metabolome**陸續出現，也都跟**microarray**相去不遠，只是找到一些**candidate gene**或**biosignature**這些**signature**往往在自己的**cohort**有其預測效果，但換了**cohort**就另當別論了。有次升等演講，有位PI報告了他發現的肺癌預後**micro RNA signature**，我請教他這個**signature**裡，各種**micro RNA**表現度的上上下下到底從何而來，代表什麼樣的生理意義，他抓抓頭皮說“不知道”。2011年3月我們邀請大阪大學的**Prof. Shigeru Kondo**就此課題做了“由反應擴散模式了解生物學空間形式的演講”，以下是演講內容：

科學家了解**network**及**system**方面早已嚐試用數學模式來探究。基本上有二種方式，第一種是運算（**computational approach**）：將各種相關元素加以定量，然後用運算（**computation**）尋找可以模擬觀察所見的運算模式，第二種則是以尋找簡單的模式（**simple modeling**）省略細節，以之來代表生理現象。



這二種數學模式，前者似乎較為周詳而後者似乎太過簡化，然而實務上前者只能用於簡單的場合，例如單一細胞中的代謝網路，反而是後者省略細節求其精粹，比較可以捕捉複雜體系的本質。在這方面1950年Alan Turing發表的Reaction-- diffusion model (RD)最受矚目，因為它可以用來模擬與解釋空間形式（spatial pattern）如何自動地生成。

在RD model中Turing以一個包含兩種滲透性物質，彼此互相作用的簡單體系來表示胚胎中的形式形成(pattern formation)機轉，並且發現此一體系可以自動地產生空間形式。RD model中最具革命性的是它引入了反應（reaction）的概念，反應可以產生ligand（亦即morphogen）。若無“反應”的參與則僅有擴散（diffusion）在作用，此時則有賴於局部的prepatterning來提供位置資訊（positional information）。不過有了“反應”的參與，則此一體系具有不需prepattern就能產生不同pattern的能力。Turing在發表RD model不久過世，不過後續的模擬實驗證實此一體系確實可以複製多數的生物學空間形式（biological spatial patterns）。隨後又有許多數學預測模式出現，但都離不開Turing的基本觀念也就是“*The mutual interactions of elements results in spontaneous pattern formation*”，目前RD model被公認為生物學模式形成數學模式的標準。



with permission from
Dr. Shigeru Kondo

不過，實驗生物學者界對Turing的RD model還是難以接受，原因在於學者們對簡單的數學模式能否模擬一真實世界中的複雜現象大大地存疑。不過形式形成的邏輯是可以用簡單模式來了解的，藉由套用此一邏輯到複雜的生物學現象，我們較易擷取其運作機制的基本原理。目前基因體資訊及新的分析技術已經將生物醫學研究目標從辨識相關的分子轉移到了了解複雜網路的行為，這一趨勢使RD model成為更形重要的理論分析工具。

本文希望藉由描述RD model及其實驗上的利用方法，回答生物學家常有的疑問，希望更多的生物學家能體會此一美妙的數學模式並在實驗工作中加以運用。

Turing model之原貌

Turing在他的原始論文一開始就提到他的目的是要顯示組合已知的物理性元素可以解釋生物學上的模式形成（**pattern formation**）。Turing使用一對理論上的分子，他們可以彼此互相作用，並且在一個連續的場域中擴散（*a theoretical pair of interacting molecules diffused in a continuous field*）。經過數學分析Turing發現此一體系視其反應條件（**reaction term**）與模式的波長（**wavelength of the pattern**）會產生六種可能的穩定狀態

第一狀態：體系達成一個穩定而均一的狀態

第二狀態：體系內morphogen濃度形成單一相位的振動（**uniform-phase oscillation**），此狀態可見於日夜節律（**circadian rhythm**）以及心臟肌肉細胞的收縮。

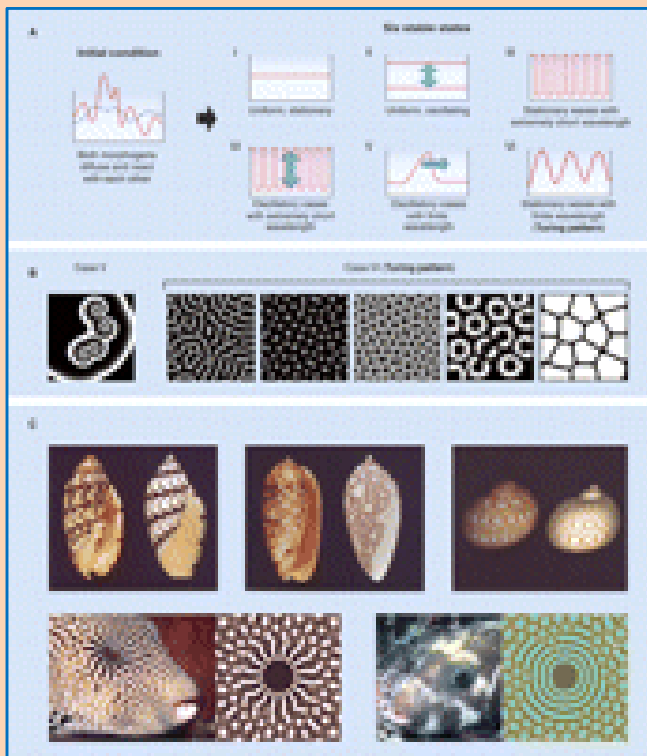
第三狀態：體系形成胡椒與鹽（**salt-and-pepper**）形式，例如已分化細胞抑制鄰近細胞的分化，在果蠅胚胎上皮的 β 分化神經前驅細胞也可見此一狀態。

第四狀態：第三狀態呈現振動狀態，此一狀態在自然界尚未發現實例。

第五狀態：體系生成一個前進的波（**a traveling wave**），實例為在黏菌聚合時形成的螺旋狀形式，以及Xenopus laevis的卵細胞在精子進入後鈣離子的波。

第六狀態：體系造成穩定的波狀形式。此種波形為Turing最主要的成就，故亦稱之為Turing Pattern。它是一種非線性的波形，由系統的動態平衡來維持（**nonlinear wave that is maintained by the dynamic equilibrium of the system**），波長由分子之間的互動與其擴散的速度來決定。此一波形係自動發生，與既存的位置資訊無關，此一性質使Turing model足以解釋在受精卵中位置資訊極少的狀況下，形式（**pattern**）是如何準確地發生。Turning pattern甚至在經過實驗引起的干擾後也可以自動再生。在解釋發育過程的自主性方面十分重要而有用。此外，因此經由調控參數及邊界情況（**boundary condition**），此一系統可以產生幾乎無限的各種空間形式。

不論是海螺的精緻螺紋，羽毛的精緻形式以及脊椎動物各種令人瞠目結舌的皮膚形式都可以用Turing Model為根本加以模擬。真實物體與模擬結果之間的高度相似性顯示Turing model可能就是生物學形式形成的機制。



With permission from
Dr. Shigeru Kondo

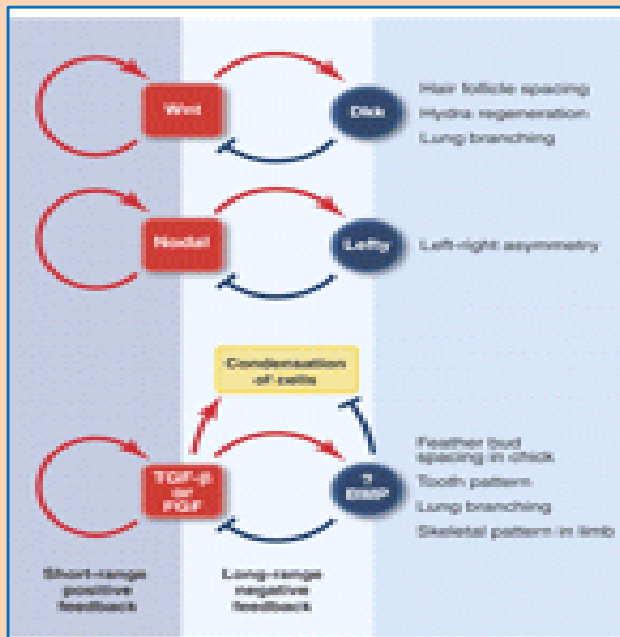
RD model與Gradient Model

生物學者對梯度（**gradient**）應不陌生。梯度模式就是在一特定位置有一個**morphogen**的源頭，由此向外擴散，濃度漸減形成一個梯度，從**morphogen**的濃度就可提供位置資訊。**RD model**與**gradient model**看似互不相容，不過**gradient model**可以視同把**RD model**中“**reaction**”的條件拿掉，也就是把它視為“**boundary condition**”。在許多模擬實驗中，此種**boundary condition**可以用來使形式（**pattern**）變得更接近實物。近來的實驗也顯示梯度的準確與穩定有賴於分子元素的互動。“反應”與“**boundary condition**”在了解複雜體系上都很重要，而**RD model**也確實可以用來模擬“梯度”的情況。

應用簡單RD model於複雜的現實

RD model假設分子可以控制自己與其伙伴的合成，他們可以迅速地擴散過細胞膜所分隔的空間，這種假設顯然很難適用於真實的複雜情境，不過近來的研究却顯示它的應用愈來愈廣。

Gierer與Meinhart指出：一個體系只要能具有近距正回饋與遠距負回饋（**short range positive feedback and long range negative feedback**）的網路就可以產生**Turing Pattern**。這個修正使反應因子的形式與數目不被限制，反應因子也不再限定於分子或具體的物質，細胞訊號迴路也可以視為反應因子，而傳遞途徑也不限於擴散，其他方式亦可適用包括**cell-to-cell signals**的接力傳遞、**chemotactic cell migration**、**mechanochemical activity**以及**neuronal interaction**。都可以形成類似**Turing pattern**的形式，只要能符合於**short range positive feedback long range negative feedback**的原則即可。



With permission from
Dr. Shigeru Kondo

從諸多實驗中顯示各式各樣以**Turing model**為基礎的數學模擬都可以產生類似的結果，這讓學者可以任意選擇實驗假說。在胚胎形成的過程，從全無周期性結構的環境中會產生許多周期性的結構，這顯示類似**Turing model**的機制在許多發育過程扮演著重要的角色。以目前的技術進展要發現相關的分子並不困難，但要釐清真正的網路仍待努力。

Turing出生於1912年，1952年出版其**RD model**，不久後辭世。他沒有親眼目睹他的假說在當代生物學上的影響，我們相信假以時日**RD model**終將證實它在**biological pattern formation**的重要性。

與細胞活動力及密度相隨之週 期性序列圖案之產生



香港大學黃建東副教授參訪
台大發育生物學與再生醫學研究中心紀實

臨床基因醫學研究所陳佑宗助理教授

週期性序列圖案在生物界隨處可見，舉凡老虎身上的斑紋，河豚身上的黑點，都是週期性序列圖案。生物學家對於週期性序列圖案的形成已提出許多假說，試圖透過幾個簡單的參數，以數學式對觀察到的生物圖案進行描述。

今年 8 月 8 日，在鍾正明院士的推薦下，趁香港大學生化系黃建東教授應高雄醫學院邀請訪台參與會議之餘，本中心及臨床基因醫學研究所聯合邀請黃教授來台大醫學院發表演講，於醫學院 202 講堂分享其以細菌模式進行與細胞活動力及密度相隨之週期性序列圖案產生之相關研究心得。

黃教授的演講題目為“**Generation of sequential and periodic pattern by coupling cell motility with density**”，以下是黃建東教授提供的演講摘要。