

國立臺灣大學醫學院暨工學院醫學工程學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biomedical Engineering

College of Medicine and College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis



游離輻射在毛囊生長期造成的萎縮反應與早發性再生

The effect of ionizing radiation on anagen hair follicle:

Dystrophic response and premature regeneration

程詠杰

Weng-Kit Cheng

指導教授：林頌然 博士

Advisor: Sung-Jan Lin, M.D. & Ph.D.

中華民國 106 年 7 月

July, 2017

口試委員會審定書



國立臺灣大學碩士學位論文 口試委員會審定書

The effect of ionizing radiation on anagen hair follicle:

Dystrophic response and premature regeneration

游離輻射在毛囊生長期造成的萎縮反應與早發性再生

本論文係程詠杰君（學號 R04548059）在國立臺灣大學醫學工程
學研究所完成之碩士學位論文，於民國 106 年 7 月 25 日承下列考試
委員審查通過及口試及格，特此證明。

口試委員：

林 頤 珍

陳 宏 謙 (指導教授)

陳 志 流

所長：

陳 中 明

誌謝



首先感謝指導教授林頌然醫師讓我有加入林家實驗室這個大家庭，並在這兩年的實驗室生涯給予的支持和指導。感謝群凱擔當了我這兩年的萬能顧問，在我加入實驗室還是個菜鳥的時候幫助我解決了很多實驗或是物品訂購的問題，也感謝文彥在實驗及論文上的幫忙，另外舒瑜也在百忙之中抽空幫我拍玻片，真的是萬分感謝。

另外有一群必需謝謝的是在加入實驗室的第二年搬來永齡生醫工程館，625 休息室的各位，每次在實驗上遇到瓶頸或是迷失時，都會用各種方法讓我醒來，也花費時間聽我在各種事情中遇到的困難，有各位大哥大姐們的幫忙才讓我走到畢業這一步。在永齡的雖然只待了不到一年的時間，但在我的碩士生涯卻留下最多的回憶，各位實驗室的吃喝玩樂電影團的各位，真的陪我走過許多實驗以外的時間，一起喝用葡萄或是麥釀出來的果汁的日子真的是非常快樂。晚上做實驗的伙伴銘新，海恩和維宏都陪伴我不少做實驗的時光，有你們的陪伴做事情才會變得有趣，而志龍大哥平常也一直忍受聽我們講無聊話，卻在我實驗上給予很多的意見，在這兩年以來真的是辛苦各位了。

中文摘要



放射線治療是現代癌症醫學的常用的治療手法之一，利用具穿透性的游離輻射對體內的腫瘤進行非入侵性的治療。可是這種治療手法會同時對附近的正常組織造成傷害，從中帶來許多副作用，其中落髮為廣為人知的副作用之一，落髮為病人帶來外觀上的影響，使他們心理上造成壓力。毛髮週期包括生長期，衰退期及休止期，過去對小鼠注射化療藥物後對毛髮影響的研究中，根據注射的劑量會得到萎縮性生長期及萎縮性衰退期兩個路徑，前者出現短暫修復，後者則無，可是萎縮性衰退期會經過一短暫休止期後會提早進入下一個生長期。本研究主要分為兩部分，一. 探討高劑量游離輻射在毛囊生長期造成的傷害；二. 在輻射傷害下毛囊在生長週期的影響。實驗使用出生後 32 天的 C57BL/6 母鼠，在毛囊處於生長期時，以 8.5Gy 鈾-137 伽瑪射線照射小鼠背部，觀察毛髮掉落情形及收集背部皮膚，以出生後 40 天，處於自然衰退期的小鼠作為對照組，以組織切片及免疫螢光染色進行分析。實驗結果顯示，照射游離輻射後，小鼠在第 7 天毛髮完全掉落，在組織切片下可以觀察到毛囊在第 10 天時型態接近休止期。利用 γ H2AX 免疫螢光染色可以發現在照射游離輻射後 6 小時，毛囊表現嚴重的 DNA 斷裂，在 TUNEL 及 Cleaved caspase-3 的染色中可以發現在 24 小時內，毛囊出現大量細胞凋亡，同時表現 BrdU 的細胞數目相對正常生長期有顯著減少。另一方面，毛囊在受輻射後的 48 小時內出現同源重組(HR)及非同源性末端接合(NHEJ)來修復斷裂的 DNA，表現的位置主要為毛囊球，在 48 小時後因傷害過大無法修復的情況下開始萎縮，隨後進入短暫的休止期。在第二部分中，實驗採用細胞分選儀收集對照組及輻射組休止期的不同細胞群，以即時聚合酶鏈式反應的方式觀察在休止期中不同細胞群分析其基因表現，結果顯示在照射游離輻射後，在毛囊 inner bulge 的部分，抑制進入生長期的信號降低，在 bulge 及次級毛胚可以發現輻射組的休止期比正常的休止期更具有進入生長期的條件，可是在輻射傷害導致的休止期，細胞的信號傳遞功能可能受到干擾，所以毛囊需要一個短暫的時間進行調整，才可以進入下一個生長週期。

關鍵字：放射性治射、游離輻射、落髮、毛囊、毛囊生長週期

ABSTRACT

Radiotherapy is one of the commonly used in cancer treatment. By use of ionizing radiation(IR) for non-invasive treatment of tumors in the body. However, this treatment will also cause damage to the nearby normal tissue, resulting in many side effects. IR induced alopecia is one of well-known side effects, it will affect the patient's life quality.

Hair cycle includes growth (anagen), regression (catagen) and quiescence (telogen). Mice were injected with chemotherapy drugs on the impact of hair research, it will induce dystrophic anagen or dystrophic catagen pathway; this has not a primary recovery, and that will. Otherwise, dystrophic catagen has a short telogen and early entry into next hair cycle. In this study divides into two parts: 1.The effect of IR on anagen hair follicle. 2.The effect of hair cycle after IR.

In our experiment, C57BL/6 female mice were irradiated with gamma rays (8.5Gy) from radioactive isotope Cs-137 on the back skin when a hair follicle in the anagen stage, 40 days old B6 mice were used in the control group, the analysis was performed by H&E and immunofluorescence staining. The results showed that after irradiation of IR, the mice appeared alopecia at day 7 post irradiation. Histologically, the hair follicle structure was changed to telogen like phase after 10 days' post irradiation. Immunofluorescence staining by γ H2AX indicated serious DNA damage on the hair bulb at 6 hours post irradiation. In TUNEL and Cleaved caspase-3 staining can be found hair follicles appear a large number of apoptosis cells within 24 hours, the number of BrdU positive cells also decreased after IR treatment. On the other hand, homologous recombination (HR) and non-homologous terminal binding (NHEJ) repair marker Rad51 and DNAPkcs had occurred in the hair follicles after IR within 48 hours. Unfortunately, the repair would not success and hair follicles entered into dystrophic catagen.

In part two, we will discuss why dystrophic telogen has a short resting time. We

sorted Inner bulge, bulge and hair germ cells from normal telogen (P49, P59) and the radiation group(IRd10, d17) by FACSCalibur. qPCR data suggest that radiation group inner bulge inhibition signal was reduced. In bulge and secondary hair germ, we found radiation group cells were more active than normal telogen cells, moreover, we found IRd10 telogen cells signaling function may be disturbed, so the hair follicles need a short time to revise before they enter the next hair cycle.

Key words: Radiotherapy, Ionizing radiation, Hair loss, Hair follicle, Hair cycle

目錄



口試委員會審定書	i
誌謝	ii
中文摘要	iii
ABSTRACT	iv
目錄	vi
圖目錄	viii
表目錄	xi
第一章 緒論	- 1 -
1.1 輻射介紹 - 1 -	
1.2 毛囊之結構與週期	- 2 -
1.3 毛囊的生長週期	- 4 -
1.4 游離輻射之臨床治療及副作用	- 6 -
1.5 游離輻射對生物體的影響	- 8 -
1.6 游離輻射對組織造成的傷害	- 10 -
1.7 毛囊休止期到生長期之轉換	- 12 -
1.8 研究目的 - 14 -	
第二章 實驗材料與方法	- 15 -
2.1 實驗動物 - 15 -	
2.2 小鼠游離輻射照射	- 15 -
2.3 小鼠背皮組織收集及處理	- 16 -
2.4 蘇木精—伊紅(hematoxylin & eosin, H&E)染色	- 16 -
2.5 免疫螢光(immunofluorescence, IF)染色	- 17 -
2.6 雙重免疫螢光	- 18 -
2.7 TUNEL 檢測	- 20 -
2.8 增生細胞的定量	- 21 -
2.9 自我凋亡細胞的定量	- 21 -
2.10 細胞分選(cell sorting).....	- 22 -
2.11 即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time quantitative polymerase chain	



reaction,qPCR).....	- 23 -
第三章 結果	- 25 -
3.1 游離輻射造成小鼠背部毛髮掉髮	- 25 -
3.2 游離輻射造成小鼠毛生長期囊結構受損及影響生長週期	- 27 -
3.3 游離輻射造成小鼠毛囊細胞分化狀態的影響	- 30 -
3.4 游離輻射造成毛囊自我凋亡的影響	- 33 -
3.5 游離輻射造成毛囊活化 Caspase-3.....	- 36 -
3.6 游離輻射影響毛囊生长期增生	- 38 -
3.7 游離輻射造成毛囊細胞 DNA 受損	- 40 -
3.8 毛囊細胞對於 8.5Gy 游離輻射引發的 DNA 修復	- 43 -
3.9 游離輻射對於毛囊生長週期的影響	- 46 -
3.10 收集游離輻射造成的休止期與正常休止期之細胞群	- 49 -
3.11 游離輻射造成毛囊 Inner bulge 抑制信號下降.....	- 53 -
3.12 毛囊幹細胞在游離輻射後之基因表現	- 54 -
3.13 毛囊次級毛胚細胞在游離輻射後之基因表現	- 56 -
第四章 討論	- 61 -
4.1 輻射傷害對毛囊生長週期的影響	- 61 -
4.2 游離輻射對毛囊細胞造成 DNA 傷害及凋亡	- 61 -
4.3 游離輻射抑制毛囊細胞增生及改變次級毛胚組成	- 62 -
4.4 萎縮性衰退期路徑影響毛髮週期	- 64 -
第五章結論	- 67 -
參考文獻	- 68 -



圖目錄

圖 1.1 在單位時間內吸收輻射造成的副作用	1
圖 1.2 毛囊的組織結構與各分層對應的蛋白標記	3
圖 1.3 毛囊休止期，生長期及衰退期之結構	5
圖 1.4 毛囊生長週期示意圖	5
圖 1.5 放射治療後於不同身體部位早期及晚期副作用	7
圖 1.6 游離輻射引發細胞 DNA 修復機制之路徑及參與的 DNA 傷害反應蛋白	9
圖 1.7 接受化學治療後的毛囊的主要傷害反應路徑	11
圖 1.8 Wnt/β-catenin 與 BMP 在毛囊不同時期抗拮示意圖	13
圖 1.9 毛囊在休止期與生長期信號轉換示意圖	13
圖 2.1 C57BL/6JNral 母鼠毛囊生長週期	15
圖 2.2 動物實驗使用的小鼠之背部皮膚與毛髮狀態示意圖	15
圖 2.3 實驗設計示意圖	16
圖 3.1 受 8.5Gy 輻射劑量對小鼠毛髮生長的影響	26
圖 3.2 正常生理衰退期與游離輻射引起的萎縮性衰退期之毛囊 HE 染色及生長時間軸	29
圖 3.3 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組及對照組小鼠毛囊的 AE13(red)/P-cadherin(green) 雙重螢光染色圖	31
圖 3.4 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組及對照組小鼠毛囊的 AE15(red)/P-cadherin(green) 雙重螢光染色圖	32
圖 3.5 生理衰退期和 8.5Gy 輻射劑量之實驗組小鼠毛囊的 TUNEL(+)基質細胞數量及基質細胞數目之定量圖	34
圖 3.6 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組與對照組小鼠毛囊的 TUNEL/K5 染色圖	35
圖 3.7 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組與對照組小鼠毛囊的 Cleaved Caspase-3	37
圖 3.8 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組與毛囊的 BrdU(+)細胞數量定量圖	38
圖 3.9 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組及對照組小鼠毛囊的 BrdU/K5 雙重螢光染色圖	39
圖 3.10 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組與對照組小鼠毛囊的 γH2AX 染色圖	42



圖 3.11 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組與 0Gy 生長期對照組小鼠毛囊的 Rad51 染色圖.....	44
圖 3.12 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組與 0Gy 生長期對照組小鼠毛囊的 DNAPkcs 染色圖.....	45
圖 3.13 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組與對照組小鼠毛囊的 Ki67/P-cad 染色.....	47
圖 3.14 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組與對照組小鼠毛囊的 BrdUP-cad 染色.....	48
圖 3.15 利用細胞分選儀分選 P49 小鼠 inner bulge(P9), bulge(P7) 及 hair germ(P8)	49
圖 3.16 利用細胞分選儀分選 P56 小鼠 inner bulge(P10), bulge(P8) 及 hair germ(P9)	50
圖 3.17 利用細胞分選儀分選受 8.5Gy 輻射劑量後第 10 天小鼠 inner bulge(P9), bulge(P7) 及 hair germ(P8).....	51
圖 3.18 利用細胞分選儀分選受 8.5Gy 輻射劑量後第 17 天小鼠 inner bulge(P9), bulge(P7) 及 hair germ(P8).....	52
圖 3.19 休止期早期(左,P49, IRd10)和休止期中期的(右,P56,IRd17)毛囊 inner bulge 細胞抑制信號及其下游基因之 mRNA 表現.....	53
圖 3.20 休止期早期(左,P49, IRd10)和休止期中期的(右,P56,IRd17)毛囊 bulge 細胞 Wnt 信號路徑下游基因之 mRNA 表現.....	54
圖 3.21 休止期早期(左,P49, IRd10)和休止期中期的(右,P56,IRd17)毛囊 bulge 細胞 BMP 下游基因之 mRNA 表現.....	55
圖 3.22 休止期早期(左,P49, IRd10)和休止期中期的(右,P56,IRd17)毛囊 bulge 細胞 Wnt 路徑相關基因之 mRNA 表現	56
圖 3.23 休止期早期(左,P49, IRd10)和休止期中期的(右,P56,IRd17)毛囊 bulge 細胞 BMP 下游基因之 mRNA 表現.....	57
圖 3.24 休止期早期(左,P49, IRd10)和休止期中期的(右,P56,IRd17)毛囊 bulge 細胞 Notch 下游基因之 mRNA 表現.....	58
圖 3.25 休止期早期(左,P49, IRd10)和休止期中期的(右,P56,IRd17)毛囊 bulge 細胞 TGF β 路徑基因之 mRNA 表現.....	59
圖 3.26 休止期早期(左,P49, IRd10)和休止期中期的(右,P56,IRd17)毛囊 bulge 細胞 shh 路徑基因之 mRNA 表現.....	60



- 圖 4.1 細胞分選中 Sca1⁻CD49f^{high} 中 CD34 及 CD200 細胞分佈圖 63
圖 4.2 輻射造成之休止期與正常生理休止期之比較 66
圖 4.3 小鼠生長期毛囊受到游離輻射傷害後造成落髮及加快生長週期示意圖 66

表目錄

表 2.1 一級抗體使用清單.....	19
表 2.2 二次抗體使用清單.....	19
表格 2.3 qPCR primer sequence.....	24





第一章 緒論

1.1 輻射介紹

輻射是一種以波或粒子移動的能量，若此能量強度足夠把原子游離為電子及正離子時，稱為游離輻射(ionizing radiation)，相反，能量強度不足使原子無法游離，則稱為非游離輻射(non-ionizing radiation)。游離輻射大致上分為 alpha 射線，beta 射線，gamma 射線，X 射線及中子(1)。人類暴露於輻射環境的可分為兩種，首先是從事醫療，研究或管理放射廢棄物等行業，他們所接觸到的是人造輻射，另一種就是來自宇宙射線，氡氣等的天然輻射(2)。從九十年代到二十世紀以來游離輻射於醫療，農業，工業及軍事等中廣泛利用，如檢測用 X 光，放射性治療，電腦斷層攝影，滅菌，發電及考古等(3)。雖然游離輻射對人類社會發展，尤其在醫學上起重大作用，但暴露於游離輻射也會對人體做成許多不良影響，而根據吸收劑量和接觸時間可以分為急性(acute)及慢性(chronic)輻射中毒(4)。二次大戰原子彈爆炸或核電廠事故中，受害者因為一次或多次全身性暴露導致急性中毒，根據單位時間內吸收劑量的多寡會出現不同的症狀(圖 1.1)；長時間暴露於低劑量，如居住在核事故附近的居民，X 光或輻射操作人員等可能會出現慢性中毒，雖然接觸輻射的時間長，但由於劑量低，身體的修復機制有能力修補，所以在外觀或生理上沒有太大影響，可是在分生層面上，他們的染色體較容易發生變異，使晚年得到癌症或帶有遺傳病的機會增加(5)。

Observed acute skin reaction	Radiation dose (Gy)	Onset of findings
Transient erythema	2	Hours
Faint erythema and epilation	6–10	7–10 days
Defined erythema and hyperpigmentation	12–20	2–3 weeks
Dry desquamation	20–25	3–4 weeks
Moist desquamation	30–40	4 weeks or more
Ulceration	>40	6 weeks or more

圖 1.1 在單位時間內吸收輻射造成的副作用(4)



1.2 毛囊之結構與週期

毛髮為哺乳類動物之主要特徵，是皮膚的附屬器官之一，其中具有多種功能，包括體溫調節，緩衝外力，感官受器及社會互動等作用。毛髮是由毛囊細胞分化後所形成之結構，為毛髮之基本單位。毛囊位於皮膚當中，跨越表皮層(epithelium)及真皮層(dermis)，從表皮開口由上而下可以分為漏斗部(infundibulum)、狹窄部(isthmus)及毛囊球(bulb)(圖 1.2A)。毛囊球中的基質(matrix)細胞具有快速分裂的特性，它們的細胞數會決定毛囊的大小與直徑(6)。

從毛囊的橫切面來看(圖 1.2B)，由內到外可以分為髮幹(hair shaft)，內根鞘(inner root sheath,IRS)以及外根鞘(outer root sheath,ORS)，最外層由一結締組織包覆，稱為結締組織髮鞘(connective tissue sheath,CTS)，髮幹又可以由內而外細分為毛髓(medulla)、毛皮質(cortex)、毛外皮(cuticle)；內根鞘由內而外可細分為 IRS cuticle、Huxley's layer、Henle's layer 及 companion layer。毛囊各層結構可以利用每一層特有的角質蛋白標定其位置。在生長期的毛囊球結構中，基質細胞會包覆著一群稱為真皮乳突細胞(dermal papilla,DP)的纖維母細胞，在毛囊生長週期中負責早期訊息的傳導及接收，在細胞間訊息交流上起重大作用，另外，在毛囊上半部，靠近表皮位於外根鞘上有一鼓起的構造，這個構造為 bulge，是幹細胞所在的地方，毛囊自身具備毛囊幹細胞，有自我更新(self-renewal)及細胞分化(differentiation)的功能，在 bulge 周圍分別可以找到皮脂腺(sebaceous gland)及豎毛肌(arrector pili muscle) (7)。

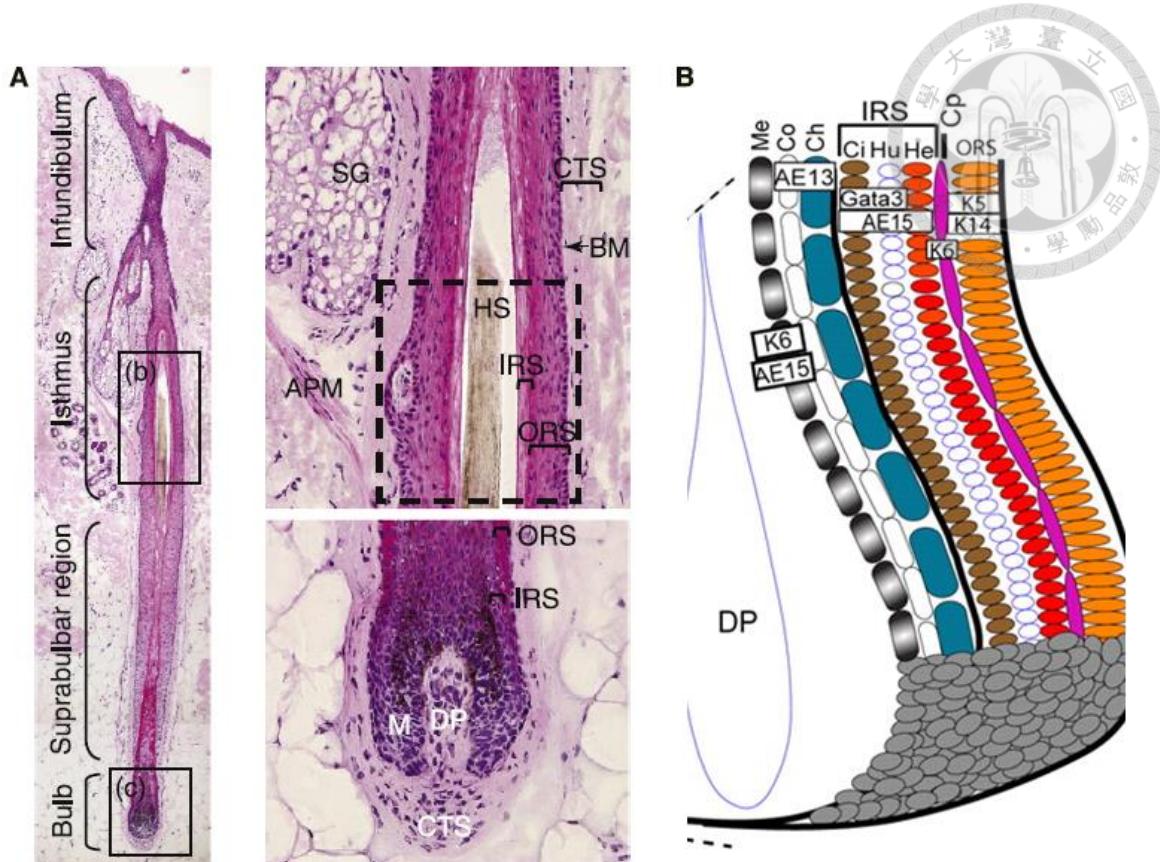


圖 1.2 毛囊的組織結構與各分層對應的蛋白標記(6,7)

(A) 毛囊於皮膚下的組織結構。SG:皮脂腺(sebaceous gland); APM:豎毛肌(arrector pili muscle); BM:基底膜(basement membrane); CTS:結締組織髮鞘(connective-tissue sheath); ORS:外根鞘(outer root sheath); IRS:內根鞘(inner root sheath); HS:髮幹(hair shaft); M:基質細胞(matrix cell); DP:真皮乳突細胞(dermal papilla cell)。

(B) 髮幹縱切面的各分層結構與對應的蛋白標記。Me:毛髓(medulla); Co:毛皮質(cortex); Ch:毛外皮(cuticle); Ci:內根鞘毛外皮(IRS cuticle); Hu: Huxley's layer; He: Henle's layer; Cp: companion layer。白色方框內為蛋白標記名稱。



1.3 毛囊的生長週期

毛囊的結構會隨著自身生長週期(hair cycle)而有所改變，生長週期可分為生長期(anagen)，衰退期(catagen)，休止期(telogen)(圖 1.3)。當毛囊從休止期進入生長期時，次級毛胚(secondary hair germ)首先活化並開始增生，增生之細胞會包覆在休止期外露之真皮乳突細胞，隨後毛囊幹細胞(bulge stem cells)開始活化增生(8)。在生長期過程中主要分為毛囊球形成及毛髮增生，根據生長程度可分為六期(anagen I – anagen VI)，上述過程為毛囊進入生長期第一及二期的指標，在第三期中又分為 IIIa, IIIb 及 IIIc，主要為毛囊球形成，髮幹生長及往表皮方向突破，進入第六期後，毛囊幹細胞再入進入休眠狀態，此時細胞增生的位置主要為毛囊球之基質細胞。當毛囊從生長期轉至衰退期時，毛囊球中之基質細胞開始進入細胞凋亡，研究中常用 TUNEL 檢測來判斷細胞是否處於細胞凋亡狀態，當基質細胞在 TUNEL 檢測中，表現陽性之細胞大於 2 顆時，此時可判斷毛囊進入衰退期第一期，衰退期又根據不同的衰退程度為八期(catagene I – catagene VIII)，當 TUNEL 表現陽性之細胞超過 4 顆時為第三期，進入第五期後會出現 epithelial strand 之結構連接次級毛胚及真皮乳突細胞，隨衰退程度至第七期此結構會相對變長，於衰退期第七期在真皮乳突細胞下方會出一尾巴(trailing CTS tail)結構，進入第八期後此尾巴結構會比較長，以及失去 epithelial strand 之結構，待毛囊完全萎縮退化後便進入休止期狀態(9)。哺乳類動物的毛囊一生中不斷重覆進行這個生長週期，週而復始的循環，以維持身體毛髮的恆定性(圖 1.4)。

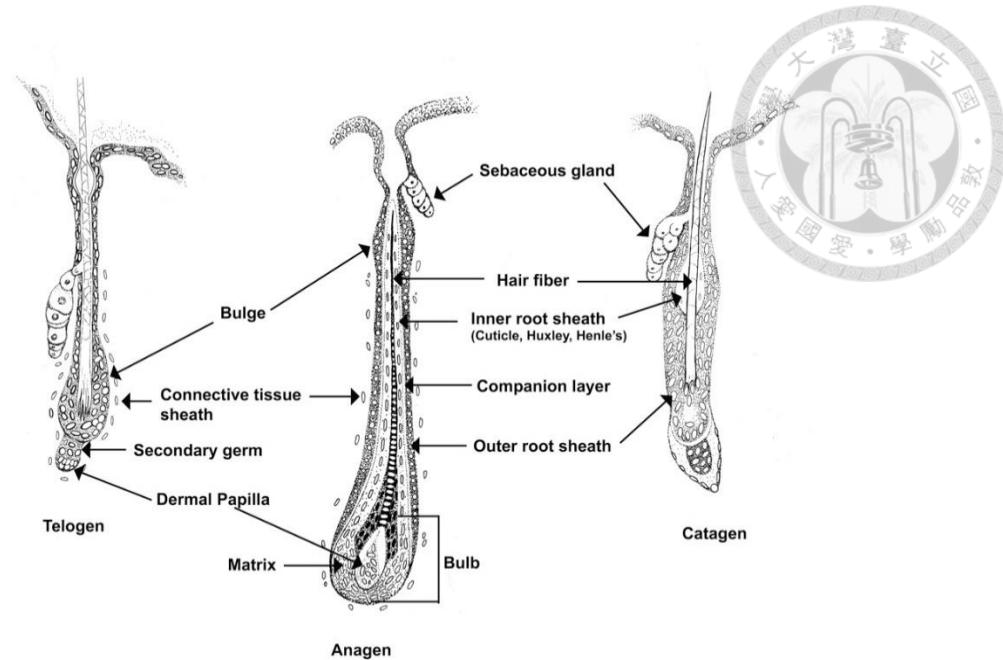


圖 1.3 毛囊休止期，生长期及衰退期之結構(10)

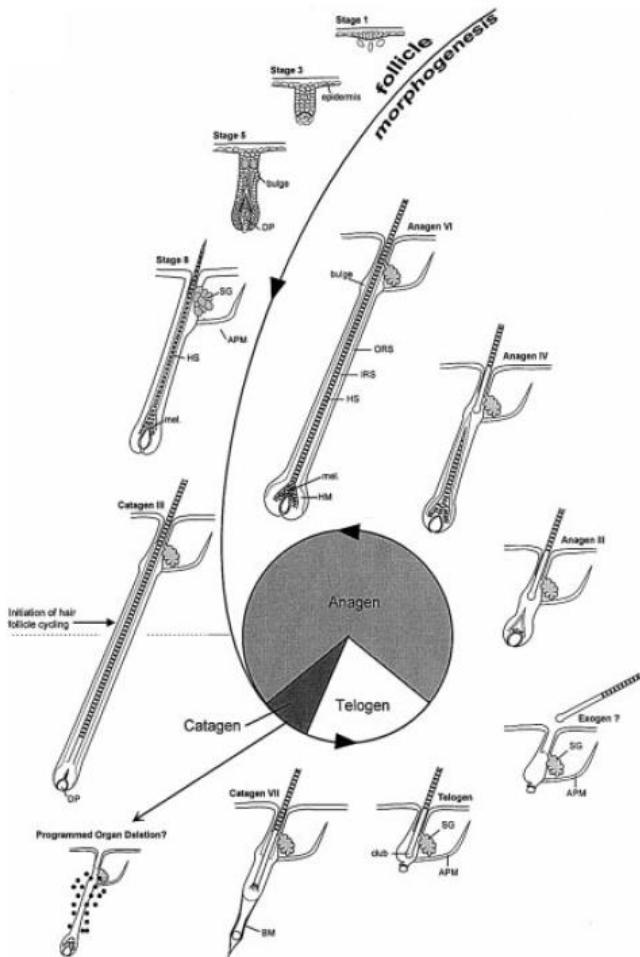


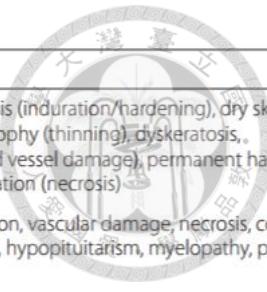
圖 1.4 毛囊生長週期示意圖(9)



1.4 游離輻射之臨床治療及副作用

在 1895 年德國物理學家倫琴(Rontgen)發現 X 射線，隨後居禮夫婦(Pierre and Marie Curie)及貝克勒(Becquerel)發現放射物，為早期放射性物質研究立下基礎(11)。利用放射技術治療早在 1900 年使用在皮膚相關疾病(12)。放射線在現代醫學中常用於治療癌症，放射治療可分為體外及體內治療，體外治療是利用放射物蛻變所產生的能量透過儀器，在適當距離下治療腫瘤，這種治療模式為局部治療，也就是說治療肺癌則照射胸部，其它部位無需照射，可是照射範圍中的正常組織也會受到輻射傷害(13)。在體內治療中，以手術放置醫療裝置於腫瘤附近，再把放射物送達治療的部位，這種方法可以提高對腫瘤的精確度，也可以減少腫瘤附近正常組織的傷害(14)。時至今日，放射治療的技術隨機械，光學等進步，治療儀器由過往的鈷六十遠隔治療機逐漸改成直線加速器的治療儀器，同時配合精準的三維空間，可以減少照射的劑量，減少對正常組織的傷害(15)。

隨著放射治療的強度，時間及部位，身體會出現各種不同的副作用。游離輻射會對癌細胞及附近的正常細胞造成傷害，在放射治療時會盡量限制劑量，並提高對腫瘤精確度(15)，盡管如此，若正常細胞接收超過生理上能忍受的程度時，就會產生對輻射的副作用，副作用的種類主要取決於照射的組織器官相關，程度則取決於輻射的累積的劑量，例如下腹部照射較容易腹瀉，頭頸部及口腔照射會出現口乾，味覺改變及吞嚥困難等，頭部照射則會出現落髮症狀(圖 1.5)，這個症狀也是部分化學性治療的副作用(5,16)。據統計研究指出，落髮是病人接受化學治療後，影響力在全部副作用中排名第二(17)，當中女性比男性更在意落髮的問題，落髮雖然沒有影響癌症病人的健康，但在病人心理或治療期間的人際關係造成影響，病人可能會中止治療或對整個治療行程造成延誤。癌症治療中，心理的上的變化可能是支撐病人能否接受治療的關鍵，如果改善落髮可以增強病人的自信，相信會有助於整個治療過程。



Site/tissue	Acute	Late
Skin	Erythema, dry skin, desquamation, transient hair loss, dermatitis, pain	Subcutaneous fibrosis (induration/hardening), dry skin (loss of sweat glands), atrophy (thinning), dyskeratosis, telangiectasia (blood vessel damage), permanent hair loss, pigmentation, ulceration (necrosis)
Central nervous system	Tiredness, nausea, edema, transient radiation myelitis with numbness, paresthesia and 'electric-shock'-like sensation often precipitated by neck flexion (Lhermitte's syndrome)	Fibrosis, demyelination, vascular damage, necrosis, cognitive decline, hearing loss, hypopituitarism, myelopathy, paralysis
Head and neck	Erythema, edema, oral mucositis, pain	Fibrosis, telangiectasia, dry mouth (xerostomia), dental caries, osteo-radionecrosis, cartilage necrosis
Eye	Local irritation , watery eyes (increased lacrimation)	Cataract formation, dry eyes (xerophthalmia), weeping eye (epiphora) due to impaired lacrimal drainage, impairment of corneal sensation leading to damage, corneal ulceration and corneal keratinization, retinal hemorrhage, exudate and degeneration, optic atrophy
Esophagus/stomach	Mucositis, dysphagia, gastritis, pain, vomiting	Fibrosis, stenosis, strictures, obstruction, ulceration
Lung	Pneumonitis (dyspnea, non-productive cough and chest tightness)	Fibrosis (scarring), dyspnea
Breast	Edema	Lymphoedema, fibrosis (hardening), atrophy (shrinking)
Intestine	Mucositis, malabsorption, vomiting, diarrhea, pain, tenesmus, passage of mucus, bleeding	Malabsorption, adhesions, stenosis, obstruction, proctitis, fistulae, incontinence, telangiectasia (leading to rectal bleeding), ulceration
Kidney, ureter, bladder	Radiation nephritis, cystitis, increased micturition, dysuria, hyperemia, mucosal edema	Chronic radiation nephritis (proteinuria, nocturia), progressive nephropathy with hypertension, and proteinuria, fibrosis, ulceration, obstruction, incontinence
Reproductive tract	Vaginal mucositis, cessation of menstruation	Sterility, induction of menopause, vaginal stenosis, vaginal obstruction, vaginal dryness, erectile dysfunction
Bone and cartilage		Growth retardation of growing bone, osteoradionecrosis, cartilage necrosis
Hemopoietic	Decreased total white cells (leukopenia), decreased platelets (thrombocytopenia)	

圖 1.5 放射治療後於不同身體部位早期及晚期副作用(5)



1.5 游離輻射對生物體的影響

游離輻射對生物體帶來許多副作用，其中包括掉髮問題等，要探討當中原因，我們必需知道游離輻射是如何對生物造成傷害。當游離輻射的高能量粒子穿透身體時，體內中不同分子的化學鍵會被破壞，形成大量活性氧化物(reactive oxygen species, ROS)，它們會間接性對生物體遺傳因子去氧核醣核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)做成傷害(18)。人體裡含有大量的水，當體內的水分子受到游離輻射時會被電離或激發，然後產生大量 ROS，如 OH[·] (hydroxyl radical), O₂⁻ (superoxide anion radical) 等，這些氧化物與 DNA 進行反應(19)，另一種傷害模式是 DNA 自身接受游離輻射後產生 DNA 單股或雙股斷裂(20)，當中最常出現的是造成 DNA 雙股螺旋斷裂(double strand break, DSB)。不論是間接或直接傷害，DNA 在過程中必定受到傷害。當細胞偵測到 DNA 受到傷害時，便會引發一系列的機制，首先 MRE11-RAD50-NBS1 這三種蛋白質組成的 MRN 複合體(MRN complex)先行偵測，緊接著將 ATM 蛋白質召集到 DNA 破損處，同時將訊息初步整合至 ATM、ATR 等蛋白質，藉由訊息傳遞路徑之中多種蛋白質的調控，如 53BP1、MDC1、γH2AX 等(21,22,23,24)。細胞在 DNA 受到傷害時會將細胞週期停止(cell cycle arrest)，暫停分裂等生理程序，然後開始對 DNA 進行修復。DNA 的修復會根據傷害的類型及細胞處於不同的細胞週期而有所不同(26,27,28)，在游離輻射中出現的 DSB 會以同源性重組(homologous recombination, HR)及非同源性末端接合(non-homologous end joining, NHEJ)(29,30)兩種修復模式為主，若細胞處於 S 或 G2 期時，細胞會傾向於以 HR 的方式進行修復，HR 是以未受損的同源染色體作為模板來修復已受損的片段，HR 比較依賴細胞週期，原因是 G1 期染色體套數為 2n，同源染色體是唯一的修復模板，在 S 和 G2 期的細胞染色體套數為 4n，有較多的模板可以提供，修復效率也比較高。所以身處 G1 期的細胞會藉由 NHEJ 的方式來修復，NHEJ 靠著 Ku 和 DNA-Pkcs 等修復蛋白把 DNA 的斷裂點拉近，再由 DNA 黏合酶連接斷裂處來達到修復效果(31)。當 DNA 受損過重至無法修復時，細胞會啟動自我凋亡(apoptosis)機制，避免錯誤堆積使細胞突變而走向癌化。

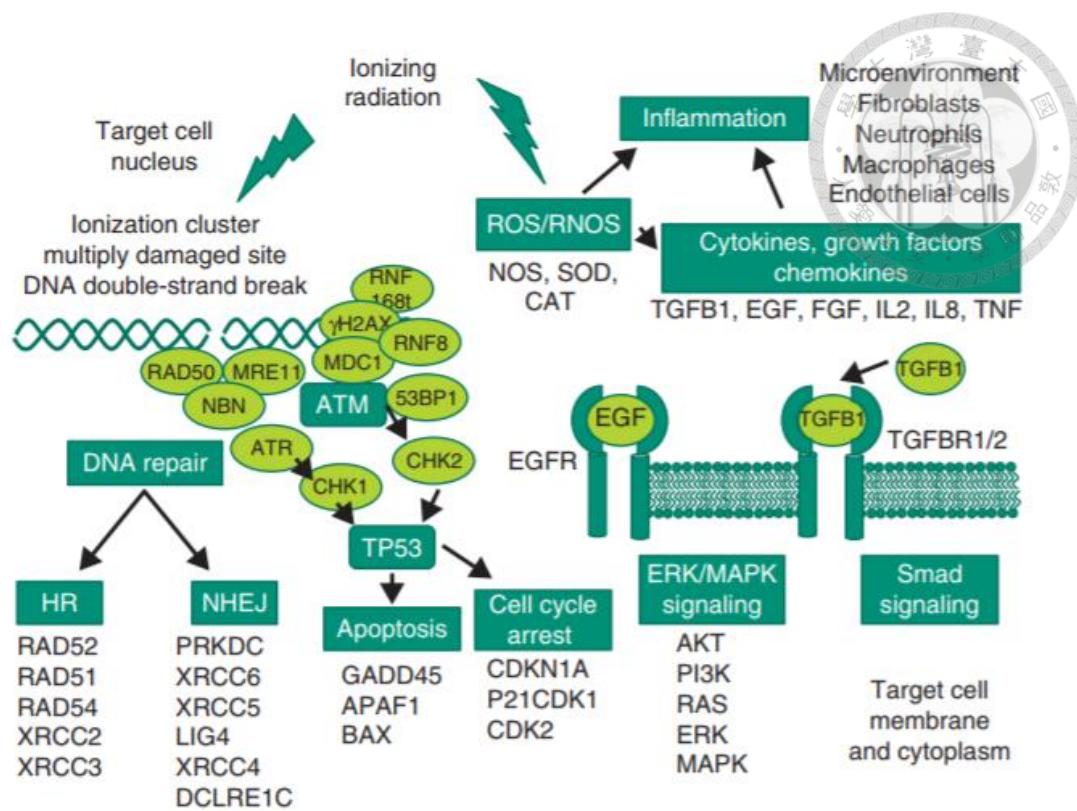


圖 1.6 游離輻射引發細胞 DNA 修復機制之路徑及參與的 DNA 傷害反應蛋白(5)



1.6 游離輻射對組織造成的傷害

病人對放射治療產生副作用時，代表該組織內的細胞因為輻射傷害而無法進行正常的生理活動，這些異常的細胞增加時可能會導致組織結構產生變化或喪失原有功能(32)。細胞分裂頻率高的細胞較容易受到輻射的傷害，如腹部放射治療中，腸壁的上皮細胞為高頻率分裂細胞，治療時對游離輻射較為敏感(33)，容易受到傷害，當這些細胞出現大量死亡時，會影響腸道的消化及吸收等功能，最後出現腹瀉等副作用。人類的毛囊處於生長期的時間較長，此時毛囊球內的基質細胞分裂頻率相當高，所以這群細胞也較容易受到輻射傷害，隨後毛囊球內細胞出現大量死亡，毛囊失去原有型態並開始萎縮，最後導致掉髮。根據過去 Ralf Paus 等人(34,35,36)對化療藥物環磷酰胺(cyclophosphamide)所造成落髮副作用的研究中，毛囊會根據受到傷害的嚴重程度，會出現以下兩種修復路徑(圖 1.7):

1. 婆縮性生長期(dystrophic anagen pathway)

在注射低劑量的模型中，毛囊受到較低的傷害，基質細胞損失數目較少，結構上會有輕微變化，但掉髮現象不常見，此時毛囊會在出現一個早期的修復現象(primary recovery)，嘗試在生長期時修復受損部分，以維持正常的生理功能，隨後毛囊會比正常的生長週期更早進入衰退期，然後進入正常休止期。

2. 婆縮性衰退期(dystrophic catagen pathway)

在注射高劑量模型中，毛囊球內的基質細胞在短時間內出現大量死亡，毛囊結構出現嚴重受損，婆縮期間會出現扭曲變形，會出現大量落髮及黑色素堆積。在這種狀態下，毛囊無法在生長期中修復至可進行生理功能的狀態，導致持續婆縮，此時毛囊會比婆縮性生長期更早進入衰退期及休止期。在這個模型當中，由傷害造成的休止期會比較短，毛囊進入下一個生長期會比正常生理週期來得早。

在這個實驗中雖以化療藥物作為傷害來源，但傷害模式以 double strand break(DSB)為主，因此對游離輻射模型具一定的參考價值。

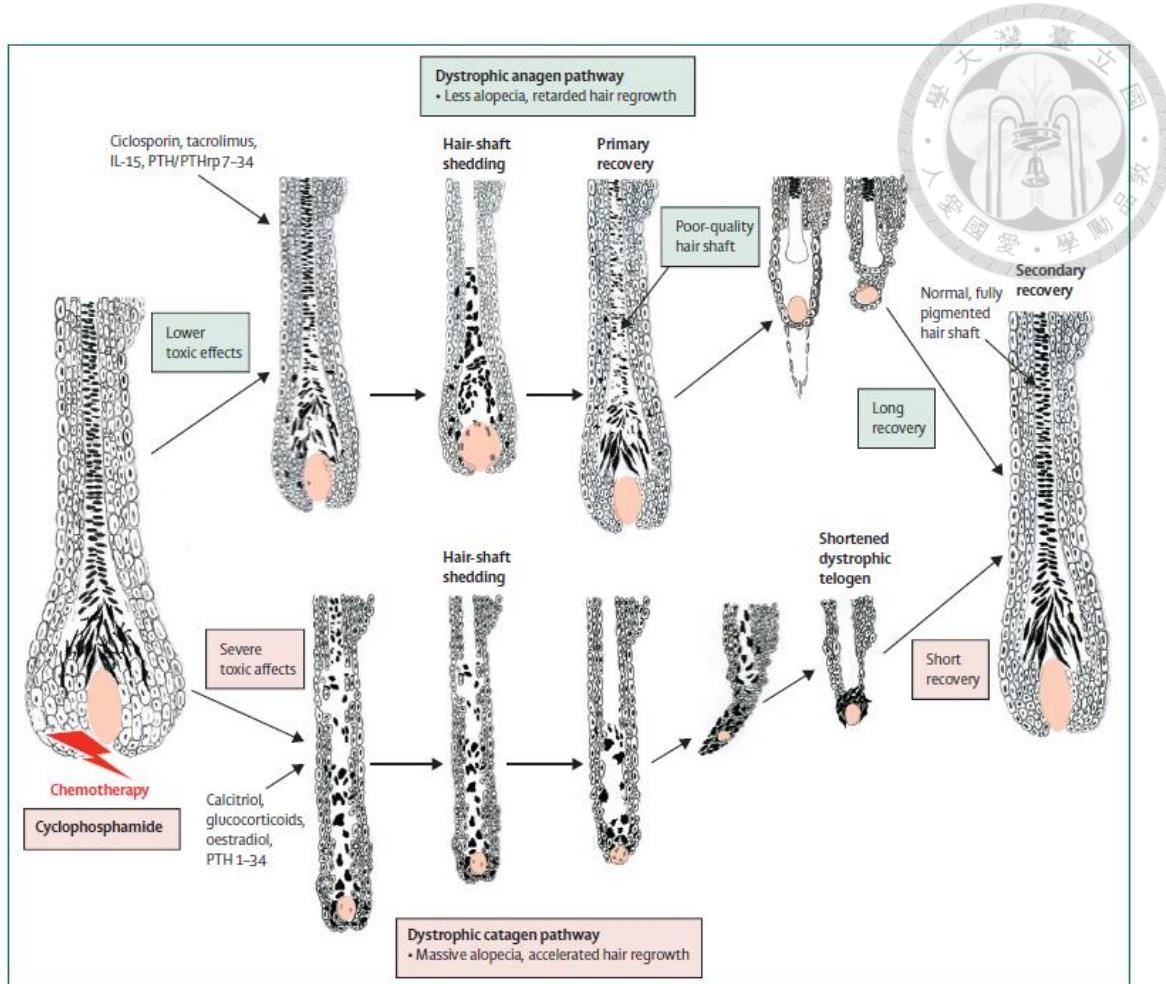


圖 1-7 接受化學治療後的毛囊的主要傷害反應路徑(36)



1.7 毛囊休止期到生长期之轉換

毛囊的生長週期中，分化與生長主要經由 Wnt/ β -catenin 及 bone morphogenetic proteins(BMP)的信息傳導及調控所控制(6,37)(圖 1.8)。BMP 屬於 transforming growth factor beta (TGF- β)家族，在型態和骨骼發展上扮演重要角色(38)。休止期中，真皮層，脂肪層及毛囊自身都會影響到生長週期的(39,40,41)，過去研究發現 BMP 及 Wnt/ β -catenin 會形成一個循環並交錯表現的狀態，隨著這兩個交錯的信號可以把休止期分為早期不反應休止期(refractory telogen)及晚期可反應休止期(competent telogen)(42)，這兩種休止期最大分別在於真皮層中 BMP 信號的高低，早期的休止期 BMP 信號較高，這些信號來源主要為脂肪層分泌的 BMP-2，真皮層纖維細胞分泌 BMP-4 及毛囊內 K6⁺inner bulge layer 表現之 BMP-6，同時毛囊內層也會表現 FGF-18(fibroblast growth factors-18)來抑制幹細胞活化，使毛囊維持在休止期狀態(40,43,44)。許多生長因子，如 fibroblast growth factors(FGF)，platelet derived growth factors(PDGFs)，hepatocyte growth factors(HGFs)，vascular endothelial growth factors，以及上述提到的 TGF，BMP 及 Wnt 等，這些信息在毛囊細胞間的傳遞對調控生長及毛囊的週期轉換起重大作用(45,46,47,48,49)。

當毛囊處於晚期可反應休止期時(圖 1.9)，真皮乳突細胞會分泌 TGF- β 2, FGF7, FGF-10，以及 noggin(BMP inhibitor)等信號來活化毛囊中的次級毛胚細胞釋放 Wnt/ β -catenin 信號分子，誘導毛囊幹細胞再度活化，使毛囊再次進入生長期(50)。實際上毛囊並不是單單靠自身的信號來完全幹細胞再活化的動作，在晚期的休止期 BMP 信號較低，再活化的信號如同海浪般傳遞到周圍的毛囊，受到影響的毛囊又會被活化，這如同大海浪潮一波又一波的傳遞，這種現象稱為傳遞浪潮(propagating wave)，若毛囊處於 BMP 信號高的早期休止期時，傳遞浪潮無法傳遞，周圍的毛囊會持續處於休止期(51)。

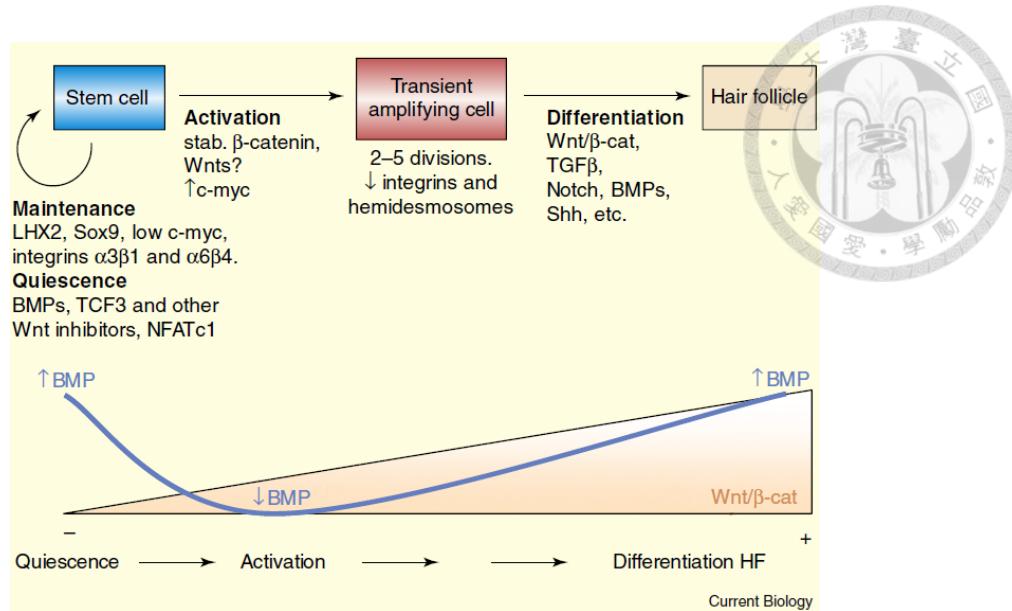


圖 1.8 Wnt/β-catenin 與 BMP 在毛囊不同時期抗拮示意圖(6)

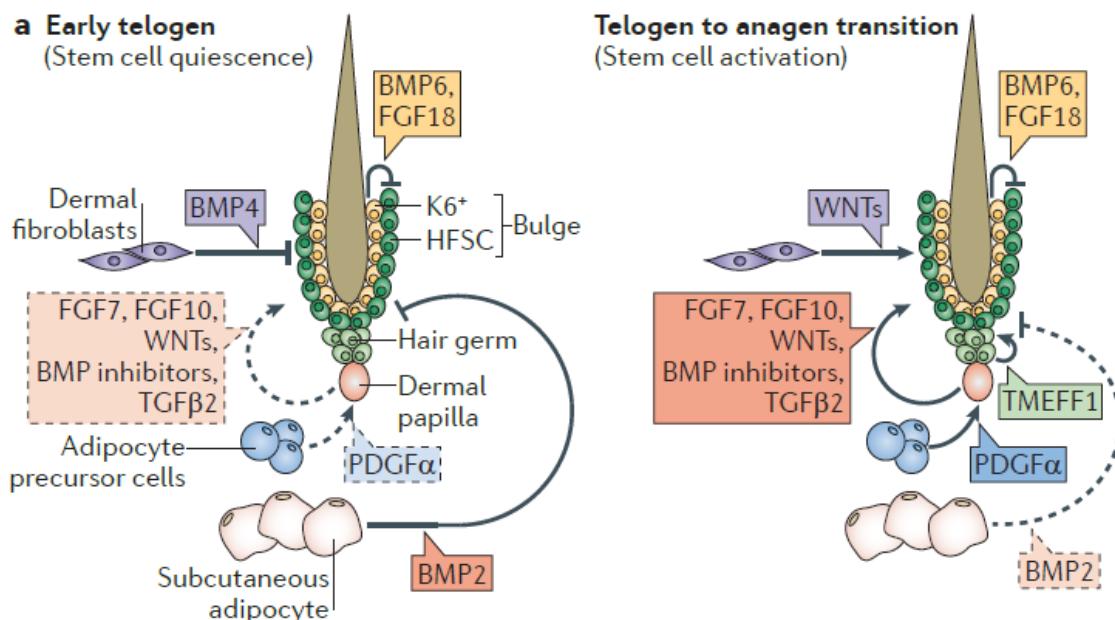


圖 1.9 毛囊在休止期與生长期轉換時信息傳遞示意圖(44)



1.8 研究目的

現代癌症醫學上的治療手法主要為化學性藥物治療及放射線治療，普羅大眾對癌症治療的副作用認識大多為失去食慾，嘔吐，腹瀉，頭暈及落髮等。其中落髮問題表面上只是外觀差別，不影響病人生理，但事實上落髮對病人心理上帶來的負擔是我們無法想像的。化療造成的落髮一直都是醫學研究中的重大議題，已知模型隨著藥物劑量高低會對小鼠造成不同的影響，以高劑量引起的萎縮性衰退期會對毛囊造成重大傷害，可是過去的研究的動物模型指出，造成重大傷害後毛囊並不會永久停止生長，而是比正常的生長週期更早進入下一輪的生長期。在本篇研究中，藉由高劑量(8.5Gy)的鉻 137 伽瑪射線對小鼠毛囊造成重大傷害後，是否能重現化學治療中提早生長期的情況，並探討其中傷害造成的毛囊萎縮的過程，以及受傷後毛囊休止期與正常休止期中結構，細胞與基因表現等的差異，試提出當中接受游離輻射傷害後毛囊加速生長週期的原因。



第二章 實驗材料與方法

2.1 實驗動物

本實驗所用使用之小鼠來自國家動物中心之 4 週 C57BL/6JNral 母鼠。以肌肉注射 20 μ l 麻醉劑進行麻醉，麻醉藥之配製為 5ml Zoletil®(Virbac, France)加入 3.75ml 生理食鹽水(信東生技,台灣)以及 1.25ml Rompun®(Bayer, Germany)。麻醉後，使用電剃刀將小鼠背部毛髮剃除，確定小鼠進入生長期，一般為小鼠出生後 32 天(圖 2.1-2.2)，即可進行游離輻射照射實驗。

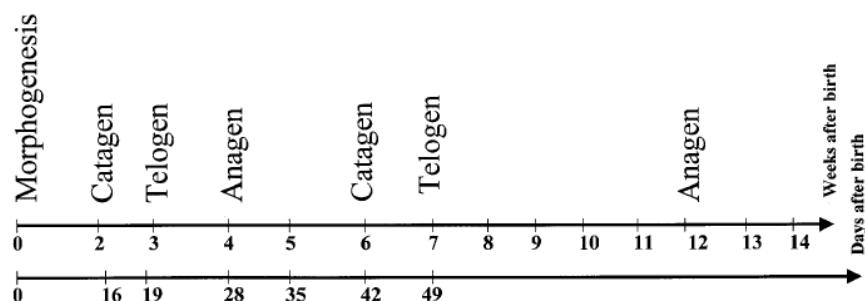


圖 2.1C57BL/6JNral 母鼠毛囊生長週期(9)



圖 2.2 動物實驗使用的小鼠之背部皮膚與毛髮狀態示意圖

2.2 小鼠游離輻射照射

首先對動物進行麻醉，將小鼠送入鉻-137 伽瑪射線輻射儀中，以背部朝下的方式進行照射，照射時間依輻射劑量而定，每二十秒為 1Gy，本實驗輻射照射均照射 8.5Gy。實驗對照組之小鼠無需進行輻射實驗。



2.3 小鼠背皮組織收集及處理

依照實驗所需之時間點(6,12,24,48,72,96 小時及照射後第 5,7,10,14,17,21,24,26 天)對小鼠進行犧牲及取出背部皮膚。以斷頸法犧牲小鼠，以剪刀，攝子取下所需之皮膚，取下之皮膚貼於秤量紙並浸於 4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)(Bio Basic Inc., Canada)水溶液中隔夜進行組織固定，固定後之組織再經由脫水，石蠟包埋保存。以石蠟切片之方式，以 5 μ m 厚度連續切片並貼於玻片上以進行後續染色部分。若需進行細胞分裂之觀察，在小鼠犧牲前 1 小時，以腹腔注射 100 μ l 的 6mg/ μ l BrdU(5-bromo-2'-deoxyuridine)，1 小時後取出皮膚。

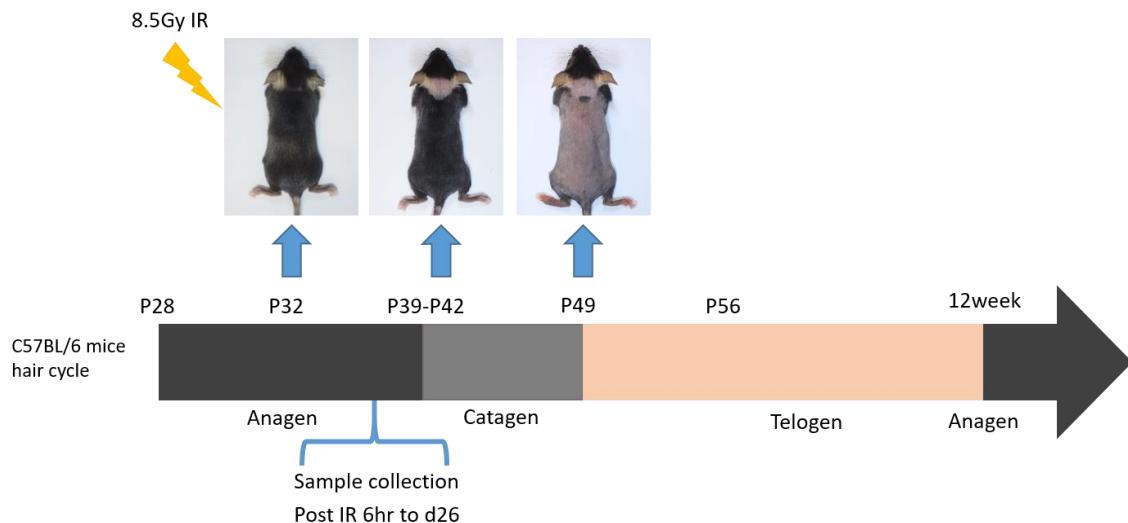
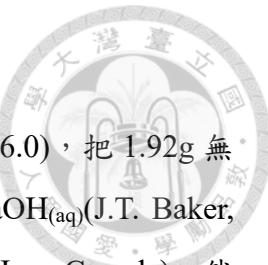


圖 2.3 實驗設計示意圖

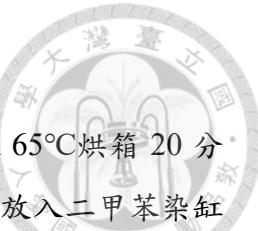
2.4 蘇木精—伊紅(hematoxylin & eosin, H&E)染色

把製備好的組織切片置入 65°C 烘箱 20 分鐘，然後放入二甲苯(Leica Biosystems, Germany)染缸中 5 分鐘進行石蠟溶解，再放入新的二甲苯染缸中 5 分鐘使殘蠟溶解，依次放入 100%，100%，95%，90%，70%，50% 酒精(PHARMCO-AAPER, U.S.A.)染缸各 3 分鐘進行組織復水，最後浸於蒸餾水中 5 分鐘完成復水步驟。接著浸入蘇木精(武藤工業, Japan)染缸中 2 分鐘進行細胞核染色，然後移到沖洗容器中置於水槽，用自來水沖洗 5 分鐘去除多餘的蘇木精，再放入伊紅(Leica Biosystems, Germany)染缸中 30 秒進行細胞質染色，依次放入 70%，95%，100% 酒精染缸中以去除多餘的伊紅及脫水，接著放入二甲苯染缸中 5 分鐘後取出風乾。待組織風乾後，把封片膠(Assistent, Germany)滴到玻片上並蓋上蓋玻片，完成的 H&E 染色切片使用 Nikon Eclipse Ni-E 正立螢光顯微鏡進行觀察、拍照與分析。



2.5 免疫螢光(immunofluorescence, IF)染色

首先製備 Citrate buffer(10mM Citric Acid,0.05% Tween 20,pH6.0)，把 1.92g 無水檸檬酸(Bio Basic Inc., Canada)溶於 1L 二次水中，使用 2N NaOH_(aq)(J.T. Baker, USA) 溶液調整 pH 值至 6.0，然後加入 0.5ml Tween 20(Bio Basic Inc., Canada)。然後配製 5% bovine serum albumin(BSA)，把 0.5g BSA(Bionovas, Canada)，溶於 1x phosphate buffered saline (PBS) (amresco,USA) 中。把製備好的組織切片置入 65°C 烘箱 20 分鐘，把 Citrate buffer 置於水浴槽並預熱至 95°C，隨後把組織切片放入二甲苯染缸中 5 分鐘進行石蠟溶解，再放入新的二甲苯染缸中 5 分鐘使殘蠟溶解，依次放入 100%，100%，95%，90%，70%，50% 酒精及蒸餾水中進行復水，然後放到已預熱之 Citrate buffer 中並在 95°C 水浴槽中反應 25 分鐘進行抗原修復，反應結束後至於室溫 15 分鐘然後再移到常溫水水浴 10 分鐘，接著以 1x PBS 淨洗 5 分鐘，重複 3 次，以防水蠟圈筆(PAP pen)圈出組織所在的位置再滴上 5% BSA，把玻片置於封閉潮濕之容器中於室溫下搖晃 1 小時進行阻擋步驟，依各種一級抗體稀釋比例(表一)以 5% BSA 溶液稀釋抗體，把稀釋之一抗液滴上至組織上，放置於封閉潮濕之容器中於 4°C 冰箱至隔天。隔天以 1x PBS 淨洗 5 分鐘，重複 3 次，以 5% BSA 溶液稀釋相對應之二級抗體(表二)，於圈選之組織滴入二抗稀釋液，於室溫潮濕之避光環境反應 1 小時，以 1x PBS 淨洗 5 分鐘，重複 3 次，用 1x PBS 以 1:1000 稀釋 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)(sigma-aldrich,USA) 細胞核螢光染劑之稀釋液，於組織上滴上 DAPI 染劑稀釋液，避光作用 10 分鐘，以 1x PBS 淨洗 3 分鐘，重複 2 次。將染色後之組織切片放置在陰暗乾燥的地方風乾，風乾後，於組織上滴上 Fluorescence Mounting Solution(Dako Inc., Denmark)，蓋上蓋玻片，用指甲油密封連接處，完成組織切片的螢光染色。完成的染色切片使用 Nikon Eclipse Ni-E 正立螢光顯微鏡進行觀察、拍照與分析。



2.6 雙重免疫螢光

首先製備 Citrate buffer，5% BSA，把製備好的組織切片置入 65°C 烘箱 20 分鐘，把 Citrate buffer 置於水浴槽並預熱至 95°C，隨後把組織切片放入二甲苯染缸中 5 分鐘進行石蠟溶解，再放入新的二甲苯染缸中 5 分鐘使殘蠟溶解，依次放入 100%，100%，95%，90%，70%，50% 酒精及蒸餾水中進行復水，然後放到已預熱之 Citrate buffer 中並在 95°C 水浴槽中反應 25 分鐘進行抗原修復，反應結束後至於室溫 15 分鐘然後再移到常溫水水浴 10 分鐘，接著以 1x PBS 淨洗 5 分鐘，重複 3 次，以防水蠟圈筆(PAP pen)圈出組織所在的位置再滴上 5% BSA，把玻片置於封閉潮濕之容器中於室溫下搖晃 1 小時進行阻擋步驟，依各種一級抗體稀釋比例(表一)以 5% BSA 溶液稀釋抗體，把第一支稀釋一抗液滴上至組織上，放置於封閉潮濕之容器中於 4°C 冰箱至隔天。隔天以 1x PBS 淨洗 5 分鐘，重複 3 次，以 5% BSA 溶液稀釋第一支一級抗體相對應之二級抗體(表二)，於圈選之組織滴入二抗稀釋液，於室溫潮濕之避光環境反應 1 小時，以 1x PBS 淨洗 5 分鐘，重複 3 次，然後以 5% BSA 溶液稀釋第二支一級抗體，把第二支稀釋一抗液滴上至組織上，放置於封閉潮濕之容器中於 4°C 冰箱至隔天。隔天以 1x PBS 淨洗 5 分鐘，重複 3 次，以 5% BSA 溶液稀釋第二支一級抗體相對應之二級抗體(表二)，於圈選之組織滴入二抗稀釋液，於室溫潮濕之避光環境反應 1 小時，以 1x PBS 淨洗 5 分鐘，重複 3 次，用 1x PBS 以 1:1000 稀釋 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)細胞核螢光染劑之稀釋液，於組織上滴上 DAPI 染劑稀釋液，避光作用 10 分鐘，以 1x PBS 淨洗 3 分鐘，重複 2 次。將染色後之組織切片放置在陰暗乾燥的地方風乾，風乾後，於組織上滴上 Fluorescence Mounting Solution(Dako Inc., Denmark)，蓋上蓋玻片，用指甲油密封連接處，完成組織切片的螢光染色。完成的染色切片使用 Nikon Eclipse Ni-E 正立螢光顯微鏡進行觀察、拍照與分析。

表 2.1 一級抗體使用清單

Primary antibody	Host	Dilution ratio	Brand (catalog number)
Cytokeratin 5	rabbit	1:200	abcam (ab52635)
Cytokeratin 15	mouse	1:100	TemroFisher(MAI-90929)
BrdU	rat	1:200	abcam (6326)
P-cadherin(P-cad)	goat	1:200	R&D System (AF761)
DNAPkcs	rabbit	1:200	abcam (18192)
Rad51	rabbit	1:200	abcam (133534)
AE13	mouse	1:100	abcam (16113)
AE15	mouse	1:100	abcam (58755)
P-histione h2ax ser139	rabbit	1:100	cell signaling (9718s)
Ki67	rabbit	1:200	abcam (16667)
Cleaced caspase-3	rabbit	1:100	cell signaling (9664s)

表 2.2 二次抗體使用清單

Secondary antibody	Manufacturer	Catalog	Host	Dilution ratio
Alexa Flour 488	Jackson Immuno Research	715-545-151	Mouse	1:500
		712-545-153	Rabbit	1:500
		711-545-452	Rat	1:500
		705-545-003	Goat	1:500
Cyanine Cy3	Jackson Immuno Research	715-165-151	Mouse	1:500
		712-165-153	Rabbit	1:500
		711-165-152	Rat	1:500
		705-165-147	Goat	1:500



2.7 TUNEL 檢測

TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)檢測是用於觀察組織內細胞或細胞群落自我凋亡狀態的檢測工具之一。本實驗之 TUNEL 檢測使用 DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System 檢測組(Promega, U.S.A.)，首先將製備好的組織切片置入 65°C 烘箱 20 分鐘，隨後把組織切片放入二甲苯染缸中 5 分鐘進行石蠟溶解，再放入新的二甲苯染缸中 5 分鐘使殘蠟溶解，依次放入 100%，100%，95%，90%，70%，50% 酒精，然後放入 0.85% NaCl 溶液中 5 分鐘，再浸入 1x PBS 中 5 分鐘進行淨洗，淨洗後的組織切片以防水蠟圈筆圈出組織所在範圍，於組織上滴上 4% PFA 溶液固定 15 分鐘，以 1x PBS 淨洗 2 次，每次 5 分鐘，於組織上滴上以檢測組合所附的 proteinase K 溶液(20μg/ml)於室溫下作用 10 分鐘，以 1x PBS 淨洗 5 分鐘，於組織上滴上 4% PFA 溶液 5 分鐘進行再固定，完成後以 1x PBS 淨洗 5 分鐘，於組織上滴上檢測組合所附之 equilibrium buffer 於室溫下作用 10 分鐘，完成後，於避光環境下(之後步驟皆須避光)將配製好的 rTdT buffer(將檢測組合所附之 rTdT enzyme solution、dUTP solution、equilibrium buffer 以 1:5:50 之比例配製)滴於組織上，並以組合所附之透明塑膠蓋片蓋上使溶液均勻分布，然後將玻片置於密閉且潮濕的容器中，再將容器放入 37°C 烘箱中反應 1 小時。反應完成後，移除玻片上的塑膠蓋片，以稀釋後的 2x SSC 緩衝液浸洗 15 分鐘以中止反應，接著以 1x PBS 淨洗 3 次，每次 5 分鐘，於組織上滴上 DAPI 染劑稀釋液，避光作用 10 分鐘，以 1x PBS 淨洗 3 分鐘，重複 2 次，於組織上滴上 Fluorescence Mounting Solution(Dako Inc., Denmark)，蓋上蓋玻片，用指甲油密封連接處，完成組織切片的 TUNEL 螢光染色。完成的染色切片使用 Nikon Eclipse (Ni-E) 正立螢光顯微鏡進行觀察、拍照與分析。



2.8 增生細胞的定量

將免疫螢光染色的毛囊組織切片，從序列切片中以約 $15\mu\text{m}$ 的間隔挑選切片，挑選的毛囊以具有完整的球狀部與 dermal papilla 結構為主。以 Ni-E 正立螢光顯微鏡拍照存檔後，以 ImageJ 分析軟體進行增生細胞的定量。增生細胞的定義為，具有 P-cadherin 陽性表現與 BrdU 陽性表現的細胞。控制組與實驗組的每個時間點的每隻動物均挑選 10-15 根的毛囊。

2.9 自我凋亡細胞的定量

將免疫螢光染色的毛囊組織切片，從序列切片中以約 $15\mu\text{m}$ 的間隔挑選切片，挑選的毛囊以具有完整的球狀部與 dermal papilla 結構為主。以 Ni-E 正立螢光顯微鏡拍照存檔後，以 ImageJ 分析軟體進行自我凋亡細胞的定量。自我凋亡細胞的定義為，具有 TUNEL 陽性表現的細胞。控制組與實驗組的每個時間點的每隻動物均挑選 10-15 根的毛囊。



2.10 細胞分選(cell sorting)

首先將老鼠斷頸犧牲取下背皮浸泡於 1x PBS 備用，把背皮張開表皮朝下，利用針頭把皮固定在保麗龍上，用手術刀把脂肪層刮除。在 10 公分培養皿中加入 15ml 0.25% Trypsin(Gibco,USA) 中，然後把除去脂肪層之背皮以表皮朝上的方式轉移至培養皿上，放入 37°C 培養箱中作用 35 分鐘。取出培養皿後以手術刀從表皮層面開始刮皮，把背皮刮至半透明狀態後，加入一倍體積之 sorting buffer(5% Fetal bovine serum(FBS)(Gibco,USA)in 1x PBS)然後以 pipette air 把混合液充分混均，以中止 Trypsin 作用，把溶液加入 70 μ m cell strainer(SPL,Korea) 中，strainer 下以 50mL 離心管收集濾液，再把濾液加入 40 μ m cell strainer(SPL,Korea) 中，以 50mL 離心管收集細胞溶液，以 4°C 低溫離心，離心後移除上清液，加入 10mL sorting buffer 進行清洗，然後再進行低溫離心，離心後移除上清液，根據細胞 pellet，加入定量體積 sorting buffer 回溶細胞。按照各抗體所取需要之體積，把細胞液移至不同的管子並進行標記，然後加入抗體 :CD49f-PE(1:300,eBioscience,USA),CD34-APC(1:100,eBioscience,USA),CD200(1:50,bio-rad,USA),Sca1-PECy7(1:100,eBioscience, USA)，置於冰上緩慢搖晃 25 分鐘，期間可準備 filter 管子，以 sorting buffer 洗滌並預冷備用。25 分鐘後，在各管子上加入 1mL sorting buffer 然後進行低溫離心，離心後移除上清液，以 1mg/mL propidium iodide(PI)以 1:200 之比例稀釋至 sorting buffer，再以此 buffer 回溶細胞並轉移至 filter 管子，把管子置於冰上等待上機。以流式細胞分選儀(FACSAria III)(BD Biosciences,USA)收集所需之細胞群，收集細胞後進行低溫離心，並以 1xPBS 洗淨，最後置於-80°C 冰箱保存，細胞將進行 RNA 萃取，RNA 放大及 qPCR 分析等。



2.11 即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time quantitative polymerase chain reaction,qPCR)

即時定量聚合酶連鎖反應(qPCR)的基本原理主要是利用特殊螢光物質(如 SYBR Green)嵌入雙股 DNA 的特性，在進行 PCR 時，隨著循環數增加，目標產物也會增多，因而嵌入雙股 DNA 的螢光物質也會隨之增加，此時透過螢光偵測系統來偵測每個循環所釋放出的螢光物質量，進而推算出每個循環所產生的產物量，達到即時與定量的目的。

首先把 cDNA 放置於冰上回溫，配制反應試劑：

ddH ₂ O	5.9 μl
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix(2x)(KAPA Bio, USA)	7.5 μl
forward primer	0.3 μl
reverse primer	0.3 μl
Total	14 μl

把混合液加入 96 孔 qPCR 盤中，再加入樣本經由 REPLI-g® WTA Single Cell Kit(QIAGEN, Germany)放大並以 1:100 稀釋之 cDNA(每個基因以三重復小孔測定)，然後封膜及離心，放入 LighCycler® 96 Real Time PCR system 儀器(Roche, Switzerland)中進行反應。反應結束後以 LighCycler®96 Software 及 Microsoft Excel 進行分析。

表格 2.3 qPCR primer sequence

Gene	forward	reverse
GAPDH	GGGAAGCCCATCACCATCT	CGGCCTCACCCCATTTG
AXIN2	ACTGGGTCGCTCTTGAA	CTCCCCACCTGAATGAAGA
WNT3A	CACCACCGTCAGCAACAGCC	AGGAGCGTGTCACTGCGAAAG
Lef1	AGCGCAGCTATCAACCAGAT	CTGACCAGCCTGGATAGAGC
BMP6	CTGCGCACCAACCAAAGTA A	TTGGGGGAGGCGAACATTAGGT A
FGF18	AGACGCGGGCTCGAGATGAT GTGAGTCGGA	GCCCTTGATCCGGACTTGACTCC CGAAGGT
ID1	CCTAGCTGTTCGCTGAAGGC	GTAGAGCAGGACGTTCACCT
ID2	ATGAAAGCCTTCAGTCCGGTG	AGCAGACTCATCGGGTCGT
ID3	CGACCGAGGAGCCTCTTAG	GCAGGATTCCACCTGGCTA
ID4	CAGTGCATATGAACGACTG C	GACTTTCTTGTGGCGGGAT
Tgfb2	TCCCGAATAAAAGCGAAGAG	AAGCTTCGGGATTATGGTG
Tgfbr2	AGTGATGTCATGCCAGCGA C	CGCAGACTTCATGCGGCTTCTC
Hes1	CTACCCCAGCCAGTGTCAAC	AAGCGGGTCACCTCGTTCAT
Hey1	AGCGCCGACGAGACCGAAC AATA	TGGGGCAGCAGCAGAGGGTGTG
Gli1	ATCACCTGTTGGGATGCTGG A	GGCGTGAATAGGACTTCCGACA G
Gli2	GTTCCAAGGCCTACTCTGCC TG	CTTGAGCAGTGGAGCACGGACA T



第三章 結果

3.1 游離輻射造成小鼠背部毛髮掉髮

用電剃毛刀剃除週齡 4 週的 C57BL/6 小鼠背部毛髮以確定小鼠毛髮生長週期，當背皮呈現亮黑色時(約出生後 32 天)，以 8.5Gy 游離輻射照射小鼠背部，拍照記錄及觀察照射後小鼠背部毛髮之變化，本實驗以未照射游離輻射之小鼠毛囊衰退期作為對照組。實驗結果顯示(圖 3.1)，C57BL/6 小鼠在出生後約 40 天，毛囊從生長期進入衰退期，此時背皮毛髮停止生長，背部皮膚由部位逐漸轉變為灰色，而當毛髮週期由衰退期進入休止期時，皮膚顏色會逐漸轉為粉紅色，此時大約為出生後的 49 天，這個休止期會持續到約出生後第 10 至 11 週，大約到第 12 週時，可以明顯觀察到皮膚顏色由粉色逐漸變黑，代表小鼠將再進入下一個生長期。

實驗組小鼠在照射游離輻射後至 24 小時之間，在外觀上並沒有觀察到產生變化，在照射 3 天後，背部毛髮開始變為較稀疏和散亂，用手接觸小鼠背部時會發現有少量毛髮掉落。照射 5 天後，可以發現小鼠出現大量落髮，落髮位置的皮膚顏色轉變為淺灰色。照射 7 天後，所有背部毛髮完全掉落，且暫時不會重新長出新的毛髮，在完全掉髮後皮膚仍保持淺灰色，並隨時間漸漸轉變成淺灰色至粉紅色，保持淺灰色的原因為毛髮雖然掉落，但黑色素堆積在皮膚中，以上結果表示，毛髮週期因受到游離輻射的傷害，會從生長期快速進入衰退期和休止期。另一方面，小鼠在照射游離輻射後第 21 天，淺灰色的部分會慢慢並轉變為粉紅色，同時皮膚會變得光滑，到第 26 天時，小鼠背部靠近尾巴部位的皮膚顏色轉為黑色，表示毛髮週期已經進入下一個生長期，相比對照組仍處於休止期狀態，顯示照射 8.5Gy 游離輻射可以導致小鼠生長期毛囊在短時間內進入休止期並造成落髮，並相對對照組提早進入下一個生長期。



圖 3.1 8.5Gy 輻射劑量對小鼠毛髮生長的影響

對照組(0Gy)與實驗組(8.5Gy)小鼠的毛髮生長情形，照射輻射後第 5 天出現掉髮，至第 7 天後完全掉落。對照組在出生後 84 天開始進入下一個生長期，而實驗組則在第 26 天提早開始進入生長期。



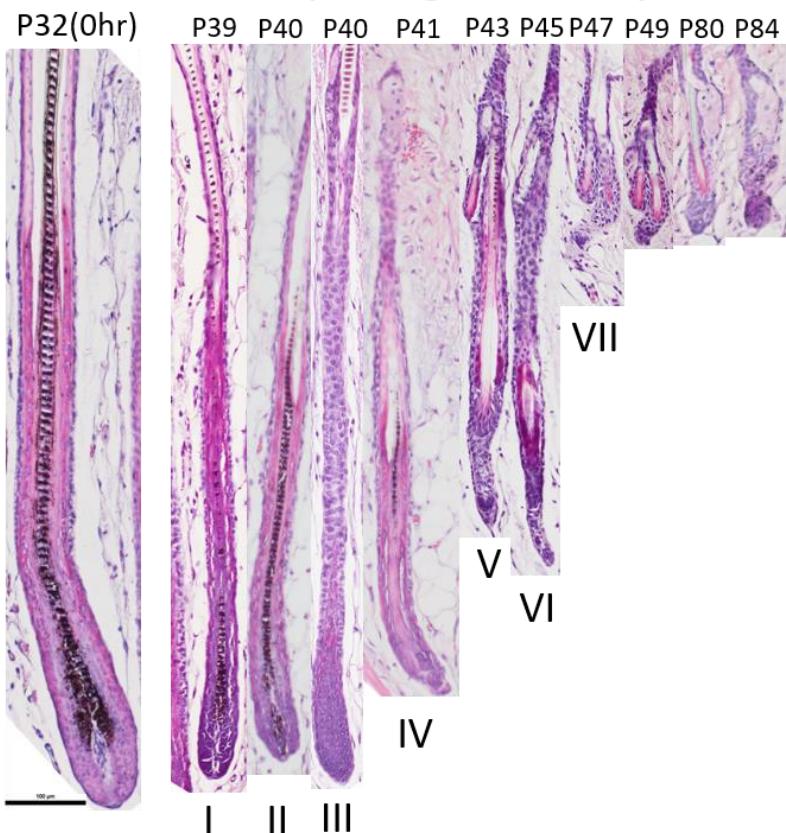
3.2 游離輻射造成小鼠毛生長期囊結構受損及影響生長週期

從外觀上可以觀察到 8.5Gy 游離輻射可造成背部落髮，本實驗接下來以組織切片及 H&E 染色法，觀察毛囊在接受 8.5Gy 輻射劑量後的結構變化。以正常毛囊衰退期作為對照，比較輻射傷害後造成的衰退與自然衰退的差異(圖 3.2A)。在進入正常生理衰退期後(約 P40)，毛囊球開始變萎縮，隨後 dermal papilla 結構變圓並慢慢脫離基質細胞，不再被其包覆，到衰退期第五期時出會出現 epithelial strand 的結構，毛囊持續衰退時就會出現 trailing CTS 的結構，此時約為第六或七期，最後進入休止期，這個休止期將持續至出生後的 12 週，從圖 3.2A 中可以發現毛囊球重新形成。

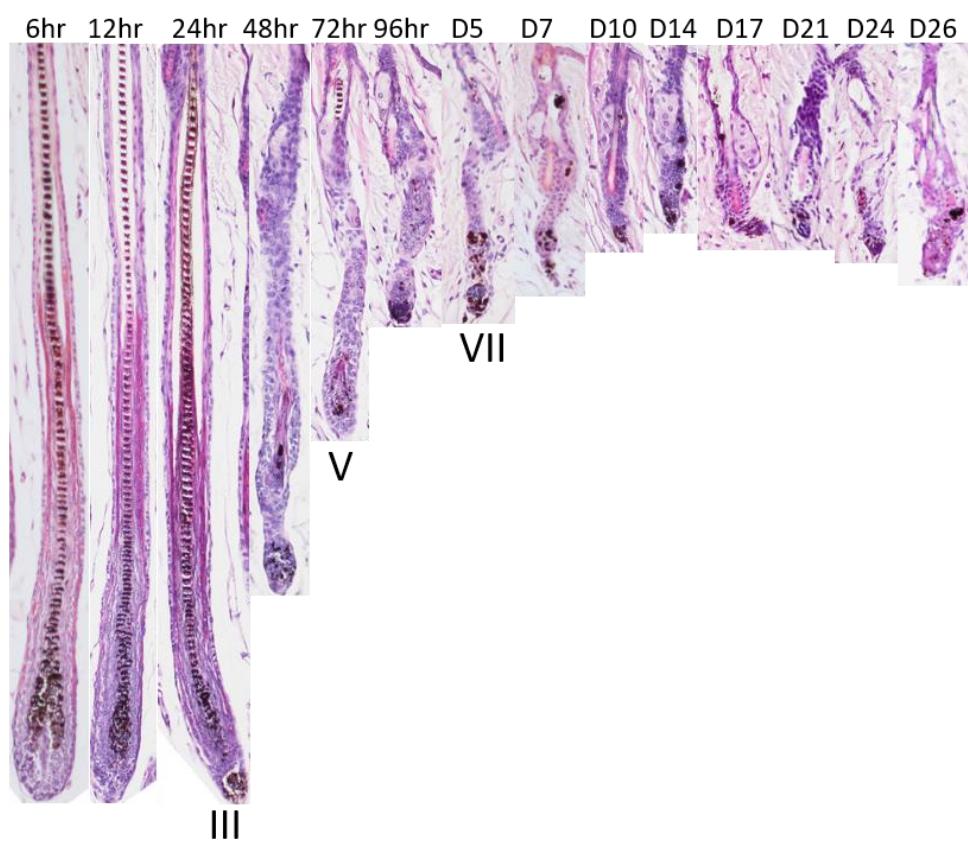
在照射後 6 小時，毛囊結構並無顯著變化，12 小時後，毛囊球開始萎縮，到 24 小時毛囊萎縮情況變得較為嚴重，開始觀察到黑色素的排列受到破壞。從 48 到 72 小時後可以明顯觀察到毛囊往表皮方向退縮，開始出現類似 epithelial strand 結構，破碎的黑色素散佈在毛囊底部，結構上與衰退期的五期相似。到 96 小時到第 7 天，毛囊出現類似 trailing CTS 的結構，與衰退期晚期較為接近，毛囊在後續退縮的情況減慢，萎縮的情況會持續到第 10 天，此時毛囊的外觀和正常的休止期相似，但黑色素碎片會持續存在於毛囊底部。實驗結果顯示，比較正常的衰退期和受到游離輻射影響的毛囊，輻射傷害使毛囊在十天的過程中從生長期快速進入休止期，並在第 10 天後保持休止期狀態至第 24 天(P56)，開始進入下一個生長週期的，與化療藥物造成的萎縮性衰退期的生長模型相似(36)，歸納正常生長週期的時間與此輻射傷害模型的時序進行比較(圖 3.2B)，可以得知受到游離輻射影響毛囊的休止期持續的時間較正常休止期短，且會提早進入下一個生長期。

A

Physiological hair cycle



Dystrophic catagen and regeneration



B

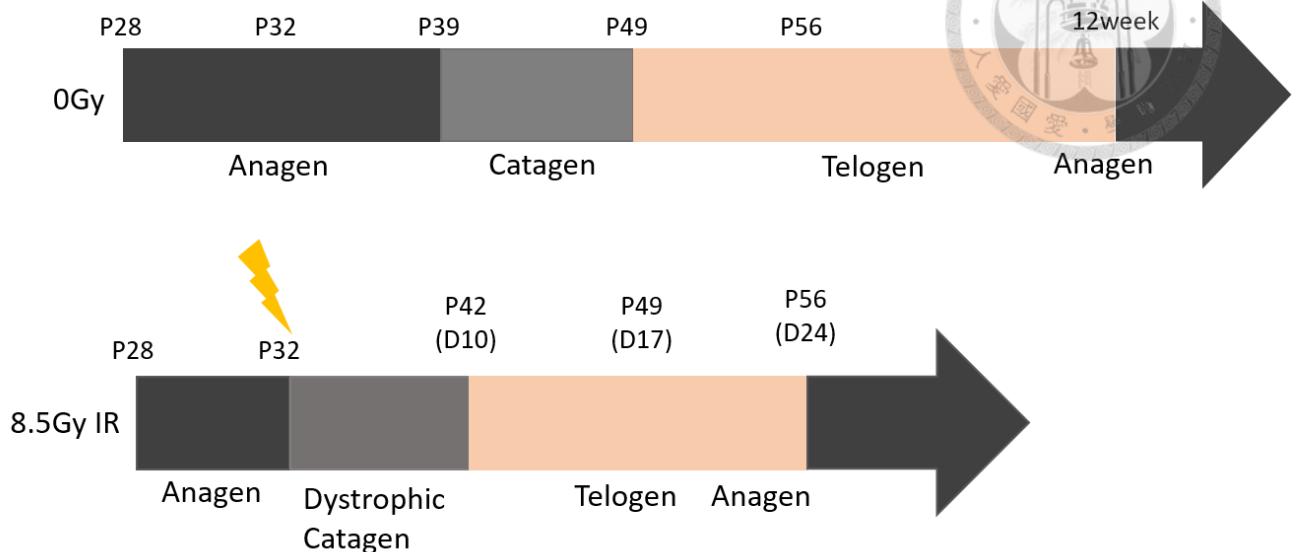


圖 3.2 正常生理衰退期與游離輻射引起的萎縮性衰退期之毛囊 H&E 染色及生長時間軸

A H&E 染色觀察正常衰退期與游離輻射引起的萎縮性衰退期之毛囊衰退情況，下方羅馬數字為衰退期的時期狀態；bar:100μm

B 歸納兩者間生長週期的時間軸。



3.3 游離輻射造成小鼠毛囊細胞分化狀態的影響

從 H&E 的組織染色中，我們發現受到游離輻射的小鼠毛囊會出現嚴重受損，導致毛囊從生長期的狀態快速萎縮至休止期。為一步了解毛囊組織中細微結構在輻射傷害後的變化，本實驗以毛囊微結構對應的專一性標記蛋白，利用免疫螢光染色法，以 hair cortex cytokeratin(AE13)、trichohyalin(AE15)及 P-cadherin 標記，來觀察這些微結構在游離輻射影響與正常衰退期的過程中的變化。AE13 表現於毛囊中分化成毛皮質、毛外皮兩層結構中的角質細胞，用以辨別毛囊結構中接近髮幹中心的這兩層結構；AE15 則表現於毛囊中分化成毛髓(medulla)及 IRS 中三小層(Henle's layer、Huxley's layer、IRS cuticle)的角質細胞，用以辨別毛囊結構中毛髓與 IRS 的位置；P-cadherin 則辨認毛囊球結構中的基質細胞。實驗結果可以發現(圖 3.3-3.4)，毛囊的微結構在受到輻射傷害後 6 小時到 12 小之間並無太大變化，到 24 小時後可以觀察到基質細胞數目明顯減少，但仍可以觀察到 AE13 及 AE15 的結構。在 48 到 96 小時中，基質細胞持續減少，epithelial strand 同樣由表現 P-cadherin 之細胞組成與對照組相似並往表皮方向退縮，在 48 小時可以觀察到毛囊在萎縮過程中出現結構扭曲的狀態，在圖 3.1 的觀察中我們得知在照射 8.5Gy 輻射劑量後的 72 小時，小鼠的毛髮容易在接觸的過程中掉落，由於在毛囊球內 dermal papilla 上方可以發現 AE13 及 AE15 表現量明顯降低，故 AE13 及 AE15 表現減少可能是導致毛髮容易掉落的原因，在第 5 天到第 7 天毛囊會持續退縮，此時結構會類似正常衰退期的第七和第八期。到第 10 天，此時毛囊 P-cadherin 表現的位置大致上與正常休止期相同。

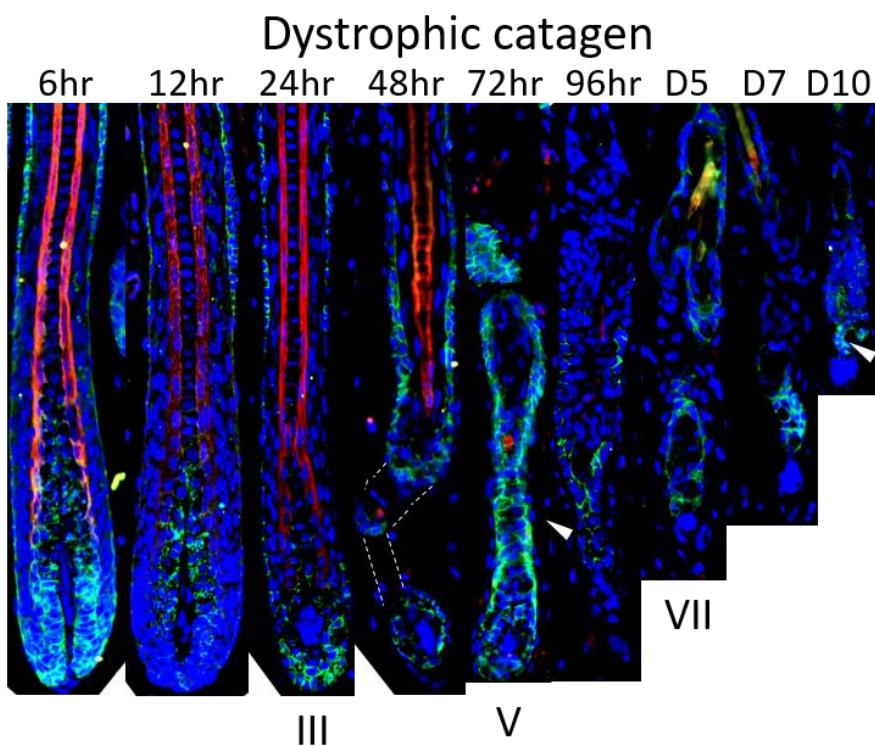
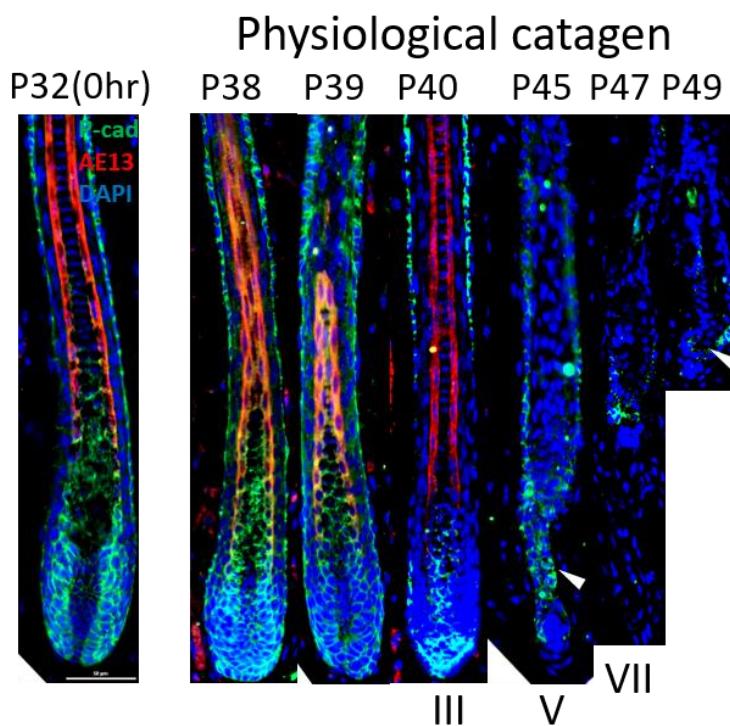


圖 3.3 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組及對照組小鼠毛囊的 AE13(red)/P-cadherin(green) 雙重螢光染色圖。實驗組在輻射傷害 96hr 後，AE13 不再表現。P-cadherin 在衰退期間及完全萎縮後表現的位置與對照組相似。P38~P40: 小鼠出生後的天數，6hr~D10: 接受游離輻射後的時(天)數。Pcad: P-cadherin；bar:50μm

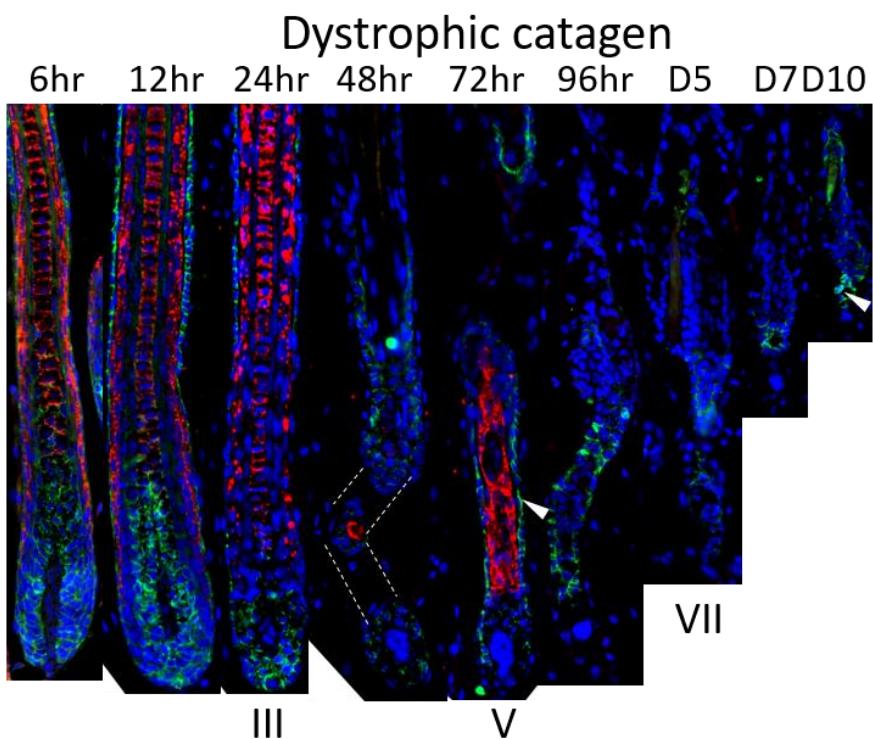
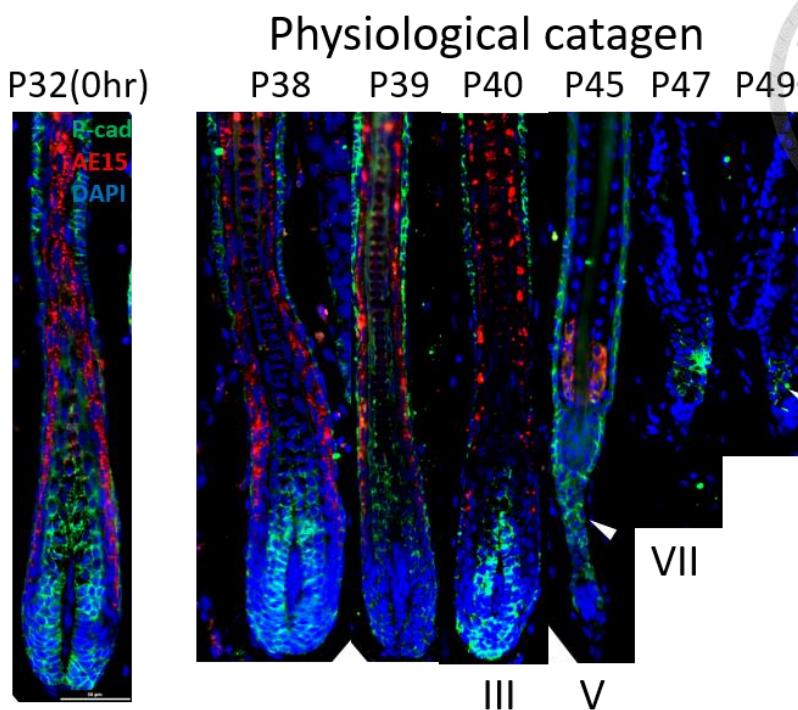
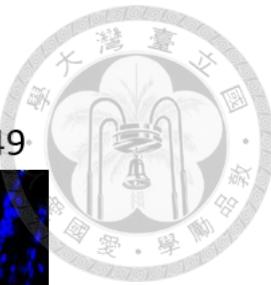


圖 3.4 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組及對照組小鼠毛囊的 AE15(red)/P-cadherin(green)雙重螢光染色圖。實驗組在輻射傷害 96hr 後，AE15 不再表現。P-cadherin 在衰退期間及完全萎縮後表現的位置與對照組相似。P38~P40: 小鼠出生後的天數，6hr~D10: 接受游離輻射後的時(天)數。Pcad: P-cadherin；bar:50μm



3.4 游離輻射造成毛囊自我凋亡的影響

細胞啟動凋亡機制原因大多為在正常組織需要與新生細胞間達到平衡，或是細胞狀態不良，如胞器或 DNA 受到嚴重損害時，為了保持組織整體健康和功能性，這些細胞就會啟動凋亡機制(52)。毛囊從生長期進入衰退期主要為毛囊細胞自然凋亡，過去 Ralf Paus 等人利用毛囊內自我凋亡所表現的 TUNEL 陽性細胞數目作為判斷不同階段衰退期的依據之一(9,35)。為了解游離輻射如何造成毛囊萎縮，本實驗以 TUNEL 檢測法比較正常小鼠毛囊衰退期與受到輻射傷害後衰退時之細胞凋亡情形。實驗結果如下圖所示(圖 3.5-3.6)，當毛囊進入正常衰退期時，毛囊球內的基質細胞開始零星表現 TUNEL 陽性細胞，隨著進入衰退期後 TUNEL 表現慢慢增加，到衰退期第三期時，可以觀察到 dermal papilla 外形變圓並處於毛囊末端，到達第四期時漸漸脫離基質細胞的包覆，表現 TUNEL 之細胞主要位於 dermal papilla 附近。進入第五期後，此時出現的 epithelial strand 為 TUNEL 主要表現的地方。在衰退期晚期 TUNEL 不再表現，在整個衰退過程中 ORS, IRS 等部位也會出現表現 TUNEL 的細胞。

另一方面，受到游離輻射影響，毛囊在照射 6 小時後毛囊球內出現大量 TUNEL 陽性細胞，這種情況會持續至 12 小時。到 24 小後，毛囊球內 TUNEL 陽性細胞數目減少，同時毛囊球細胞也比前 12 小時少，毛囊各個部分表現 TUNEL 的細胞數目增加，dermal papilla 形狀開始變得較圓。在 48 小時後，毛囊球內餘下少數表現 TUNEL 的細胞，dermal papilla 開始貼近毛囊末端，72 小時後 dermal papilla 漸漸脫離，此時會出現類似 epithelial strand 結構，該處的細胞會表現 TUNEL，到後 96 小時之間，dermal papilla 不再被基質細胞包覆，此時毛囊類似 epithelial strand 結構仍有少量 TUNEL 表現。

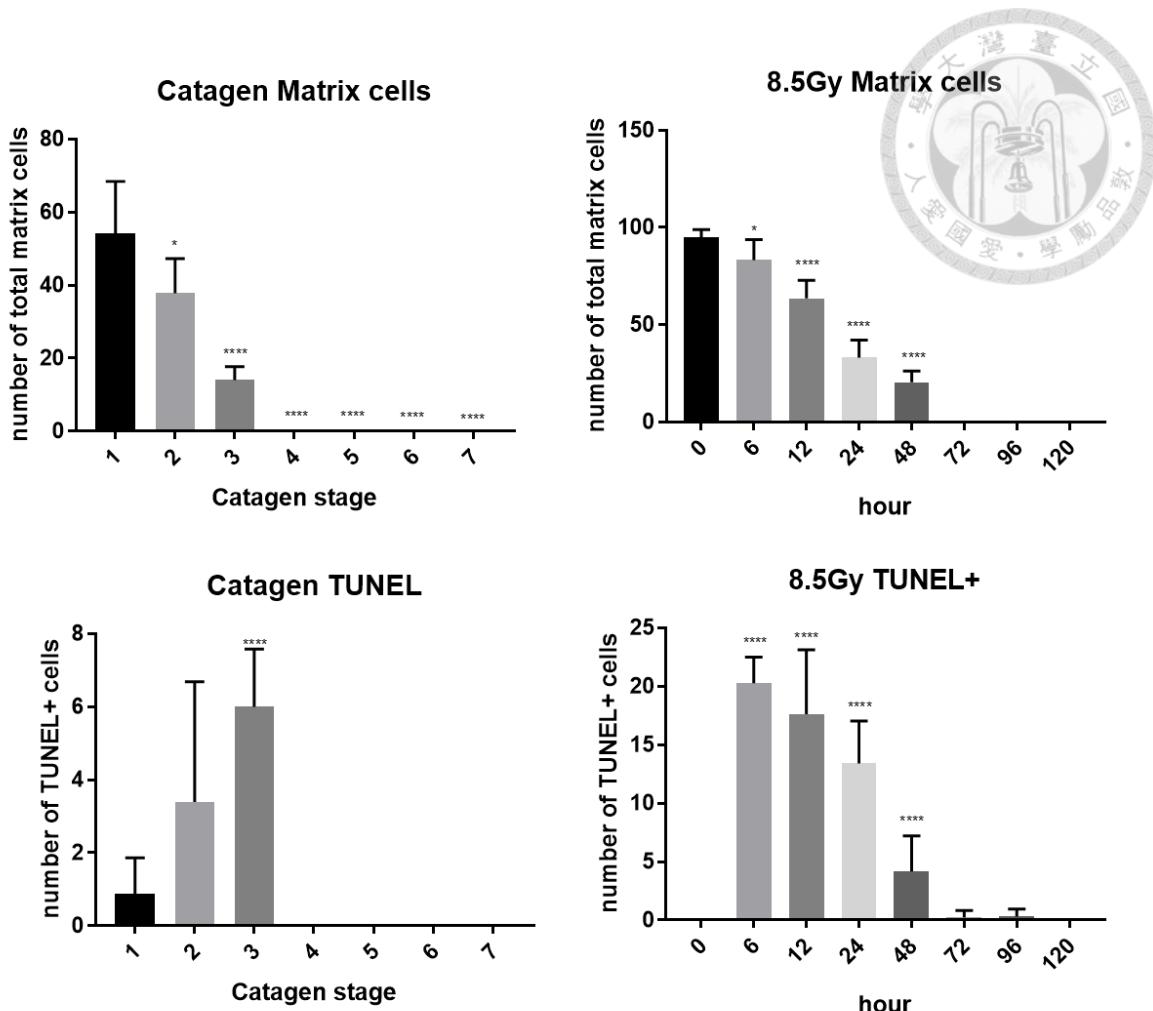


圖 3.5 生理哀退期和 8.5Gy 輻射劑量之實驗組小鼠毛囊的 TUNEL(+)基質細胞數量及基質細胞數目之定量圖。n = 10-15, Time(hr): 接受游離輻射後的時數, * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$, **** $P < 0.0001$ (實驗組與 0hr, 控制組與 catagen I 比較)

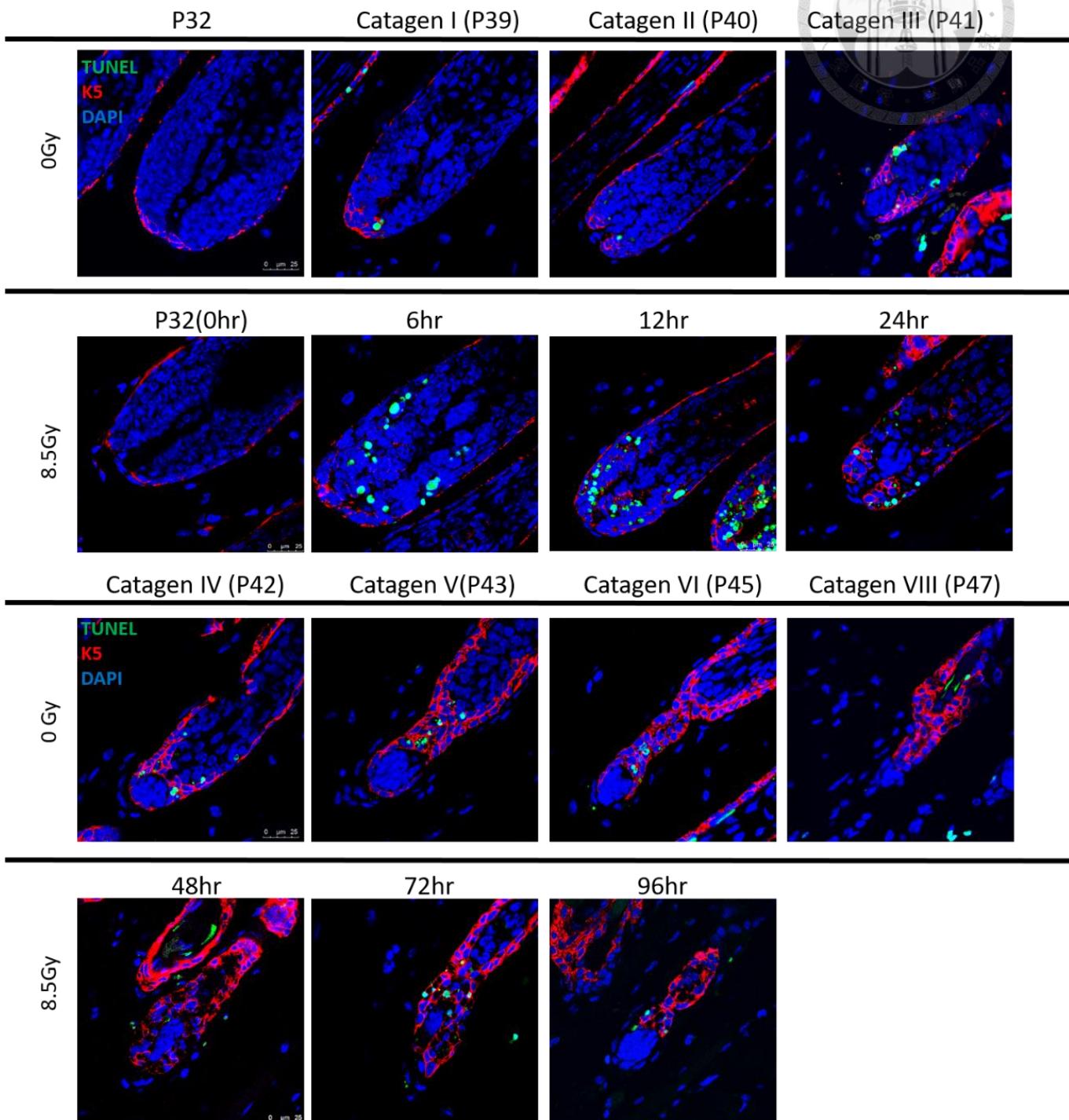


圖 3.6 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組與對照組小鼠毛囊的 TUNEL/K5 染色圖

P32~P47:小鼠出生後的天數，6hr~96hr:接受游離輻射後的時(天)數。bar:25μm



3.5 游離輻射造成毛囊活化 Caspase-3

為進一步了解毛囊受到傷害後凋亡的過程，以 Cleaved Caspase-3 免疫螢光染色分析毛囊中，受傷部份所引起的凋亡信號。在 TUNEL 檢測中，是利用末端脫氫核苷酸轉移酶(Terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)把 dUTP 標記在 DNA 斷裂片段末斷來偵測細胞死亡信號，所以表現 TUNEL 陽性之細胞有可能包含處於受傷 DNA 嚴重斷裂的信號。Caspase 在細胞凋亡過中是非常重要的媒介，它們在一般情況下以未活化(inactive)的形式存在於細胞質，當細胞受到內源性(Intrinsic)或外源性(Extrinsic)路徑傳遞凋亡訊息時，Caspase-3 會被活化成 Cleaved Caspase-3，引發凋亡，所以 Cleaved Caspase-3 為細胞凋亡的過程中的重要指標之一(52,53,54)。本實驗以正常小鼠毛囊衰退期與受到輻射傷害所引起的萎縮性衰退期，比較兩者在萎縮過程中 Caspase-3 被活化的時間點與位置。實驗結果圖所示(圖 3.7)，當毛囊進入生理衰退期早期時偵測不到 Cleaved Caspase-3 表現，在衰退期第四期時，dermal papilla 開始脫離基質細胞，毛囊球內的細胞會開始表現 Cleaved Caspase-3，隨後的衰退期出現的 epithelial strand 結構會大量表現 Cleaved Caspase-3。

在輻射傷害的 6 小時後，毛囊球內的細胞開始表現 Cleaved Caspase-3，至 12 小時依然持續表現。Cleaved Caspase-3 在傷害 24 小時後數目開始減少，此時表現的位置與 TUNEL 大致相同。在 48 到 72 小時後，毛囊進入衰退，毛囊末端周圍的細胞表現少量 Cleaved Caspase-3，與正常生理衰退期的 epithelial strand 的結構相比，輻射傷害 epithelial strand 表現 Cleaved Caspase-3 較少，到 96 小時後只偵測到微量的信號。

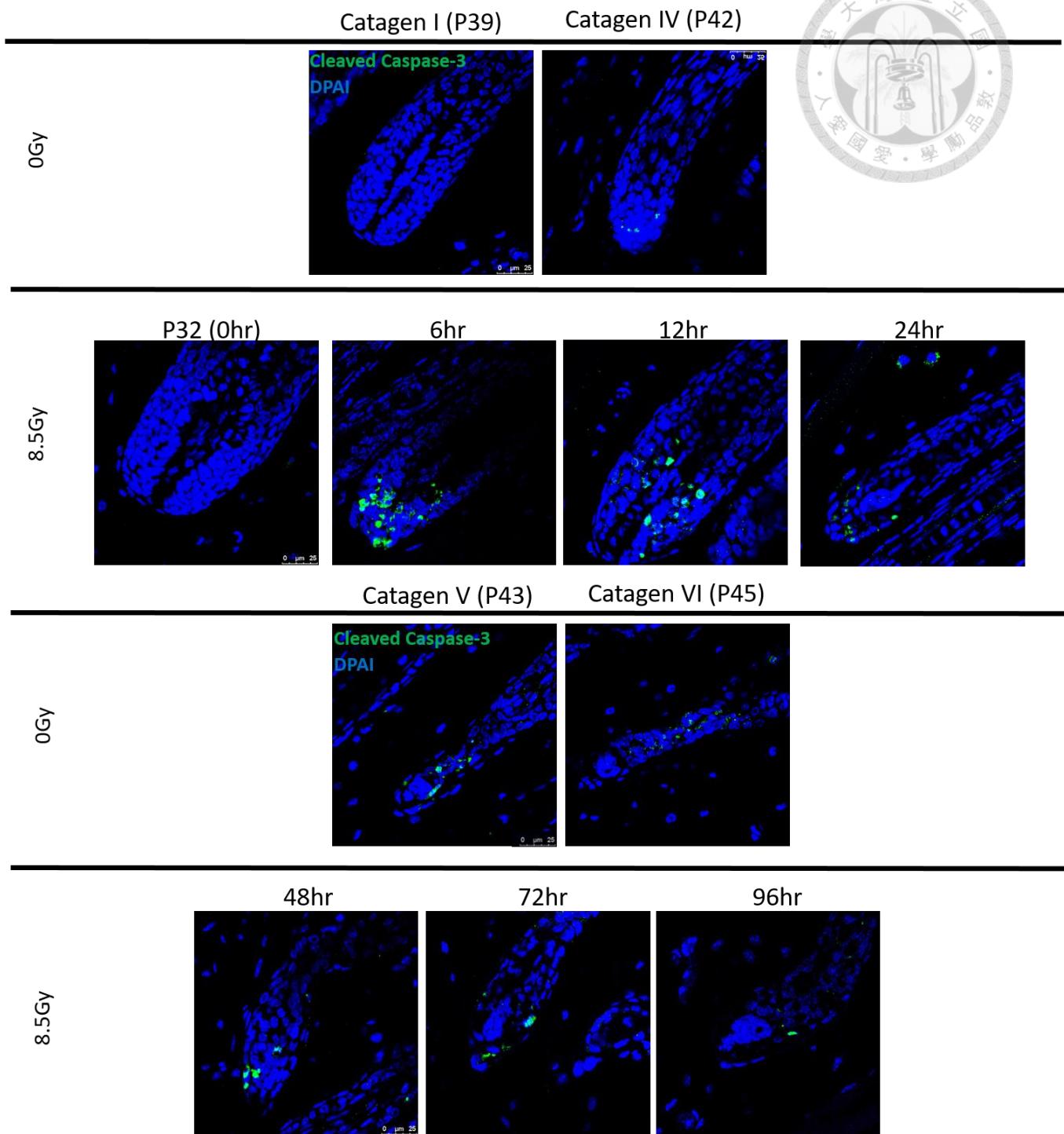
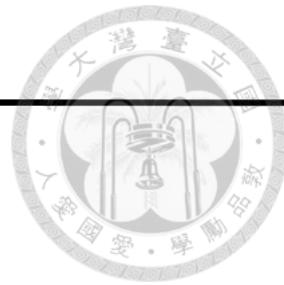


圖 3.7 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組與對照組小鼠毛囊的 Cleaved Caspase-3
P39~P45: 小鼠出生後的天數，6hr~96hr: 接受游離輻射後的時數。bar: 25 μm



3.6 游離輻射影響毛囊生長期增生

本實驗採用施打 BrdU 的方式檢測小鼠毛囊細胞在游離輻射影響下從生長期進入衰退期之間細胞增生的變化情形，並以正常生理的衰退期作為對照組。BrdU 檢測法是利用結構與胸腺嘧啶(thymidine)相似的 BrdU 分子，在細胞進行複製時，BrdU 會取代胸腺嘧啶並嵌入新合成 DNA 結構中，再以 BrdU 抗體以免疫螢光染色的方式觀察及定量分析，這樣我們就可以判斷細胞在受到處理後是否有新的細胞進行分裂。實驗結果如下圖所示(圖 3.8-3.9)，毛囊在受到 8.5Gy 游離輻射劑量後，可以發現毛囊在 6 小時偵測不到表現 BrdU 的細胞，顯示此時細胞完全停止增生。12 小時後在毛囊底部細胞開始表現 BrdU，並持續到 24 小時，但同時毛囊球大部分已經失去大部分的細胞，在 48 小時後，BrdU 數目開始減少，並在 72 小時後毛囊球內完全偵測不到 BrdU 的訊號。對照組方面，當毛囊處於生長期晚期時，BrdU 陽性細胞的數目與生長期相比時大幅下降，到達衰退期時，從毛囊球開始變得萎縮，至 dermal papilla 完全不被基質細胞包覆的過程中出現皆無法偵測到 BrdU 陽性細胞，顯示在正常的衰退期過程中，細胞是停止增生的。毛囊處於生長期時，毛囊球會出現大量表現 BrdU 的細胞，可是游離輻射傷害後，表現數目大減，只有在 12 到 48 小時間出現，隨著步入萎縮性衰退期路徑，毛囊開始萎縮，萎縮期間毛囊球也不會表現 BrdU。

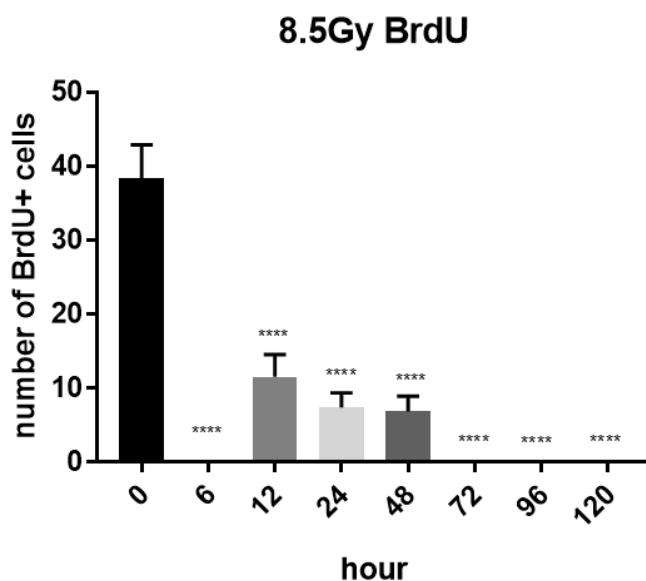


圖 3.8 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組與毛囊的 BrdU(+)細胞數量定量圖

$n = 10-15$; Time(hr): 接受游離輻射後的時數, **** $P < 0.0001$ (實驗組與 0 小時比較)

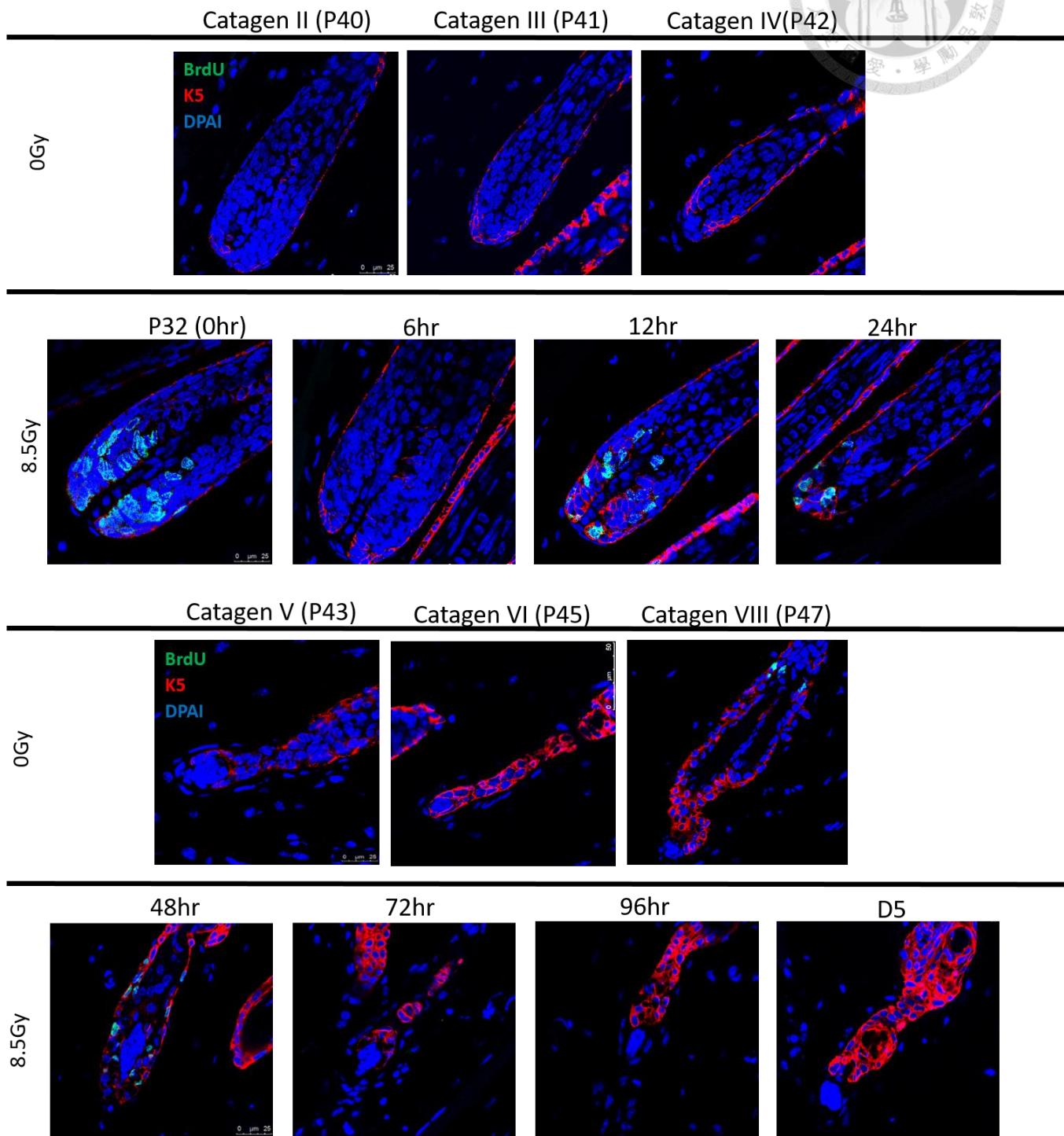


圖 3.9 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組及對照組小鼠毛囊的 BrdU/K5 雙重螢光染色圖

P39~P45: 小鼠出生後的天數，6hr~D5: 接受游離輻射後的時(天)數；bar:25μm



3.7 游離輻射造成毛囊細胞 DNA 受損

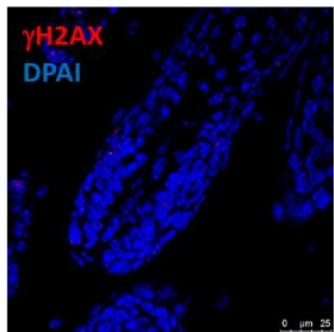
為了探討游離輻射是否造成毛囊細胞的 DNA 傷害，我們利用 γ H2AX 免疫螢光染色來判斷傷害的嚴重程度。當 DNA 發生雙股斷裂(double strand breaks, DSBs)等傷害時，DNA 結構中的 H2AX 上的 Ser139 會被磷酸化(55)，得到的產物為 γ H2AX，隨後 γ H2AX 會在斷裂位置參與 DNA 的修復工作。因此， γ H2AX 常用於 DNA 受傷的程度指標，如 γ H2AX 持續表現，即生物體之 DNA 持續受到傷害(56)。從染色結果中(圖 3.10A)可以發現， γ H2AX 在輻射傷害6小時後，開始大量表現在毛囊球的位置，代表毛囊此時出現大量 DSBs，DNA 受到嚴重傷害， γ H2AX 信號在12小時後開始大量減少，在24和48小時只偵測到少量信息，在72小時後已經偵測不到信號。對照組中，毛囊衰退期過程中也會表現少量 γ H2AX 信號，在衰退期出現的 epithelial strand 表現最多，但相對輻射傷害組來說，毛囊球幾乎沒有 DNA 的傷害。在 hair bulge 方面，受到游離輻射後的 6 到 12 小時會偵測到少量 γ H2AX 信號，並在24小時消失，TUNEL 的訊號並沒有在毛囊幹細胞被偵測到(圖 3.10B)，表示該區細胞受到傷害後很快就會被修復。細胞分裂速度愈快，對輻射的敏感度(radiosensitivity)愈高，毛囊球的基質細胞在生長時期處於快速分裂的狀態，所以基質細胞受到輻射影響程度較大。毛囊受到這些 DNA 傷害的影響，當修復能力不足以應付時，細胞會傾向進行凋亡來保持生物個體健康，毛囊受到重大傷害後可能會自我凋亡提早進入休止期，藉由獨特的生長週期，待下一週期毛囊幹細胞刺激下重新生長。



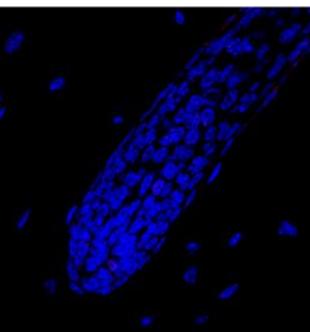
A

Catagen I (P39) Catagen II (P40) Catagen VI (P45)

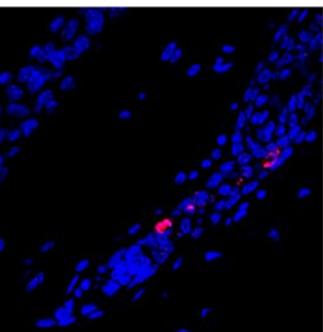
0Gy



0hr



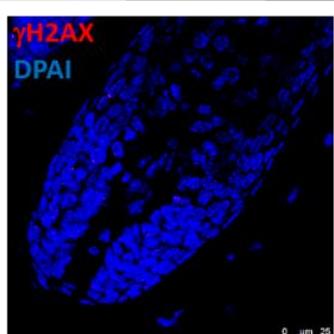
6hr



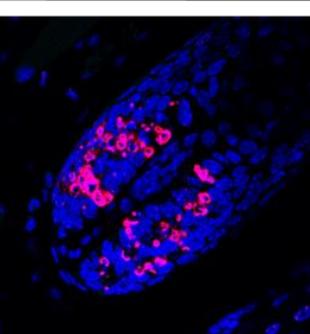
12hr

24hr

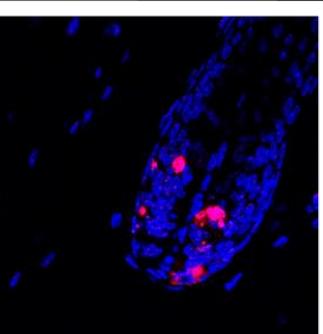
8.5Gy



48hr

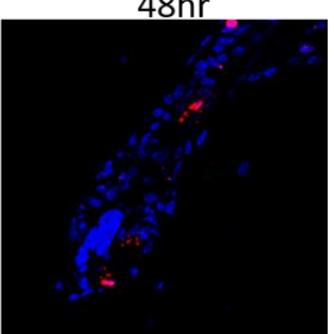


72hr

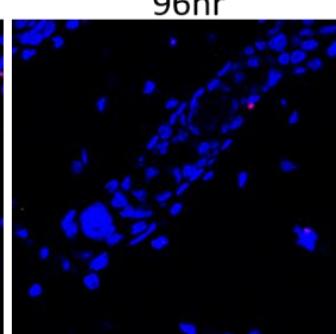
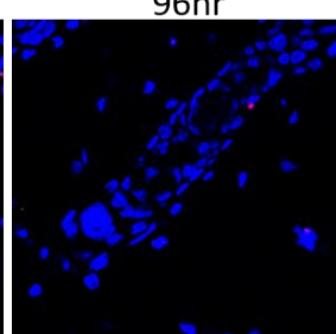
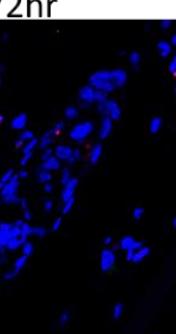


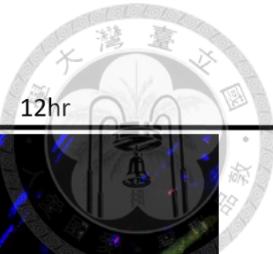
96hr

D5



8.5Gy





B

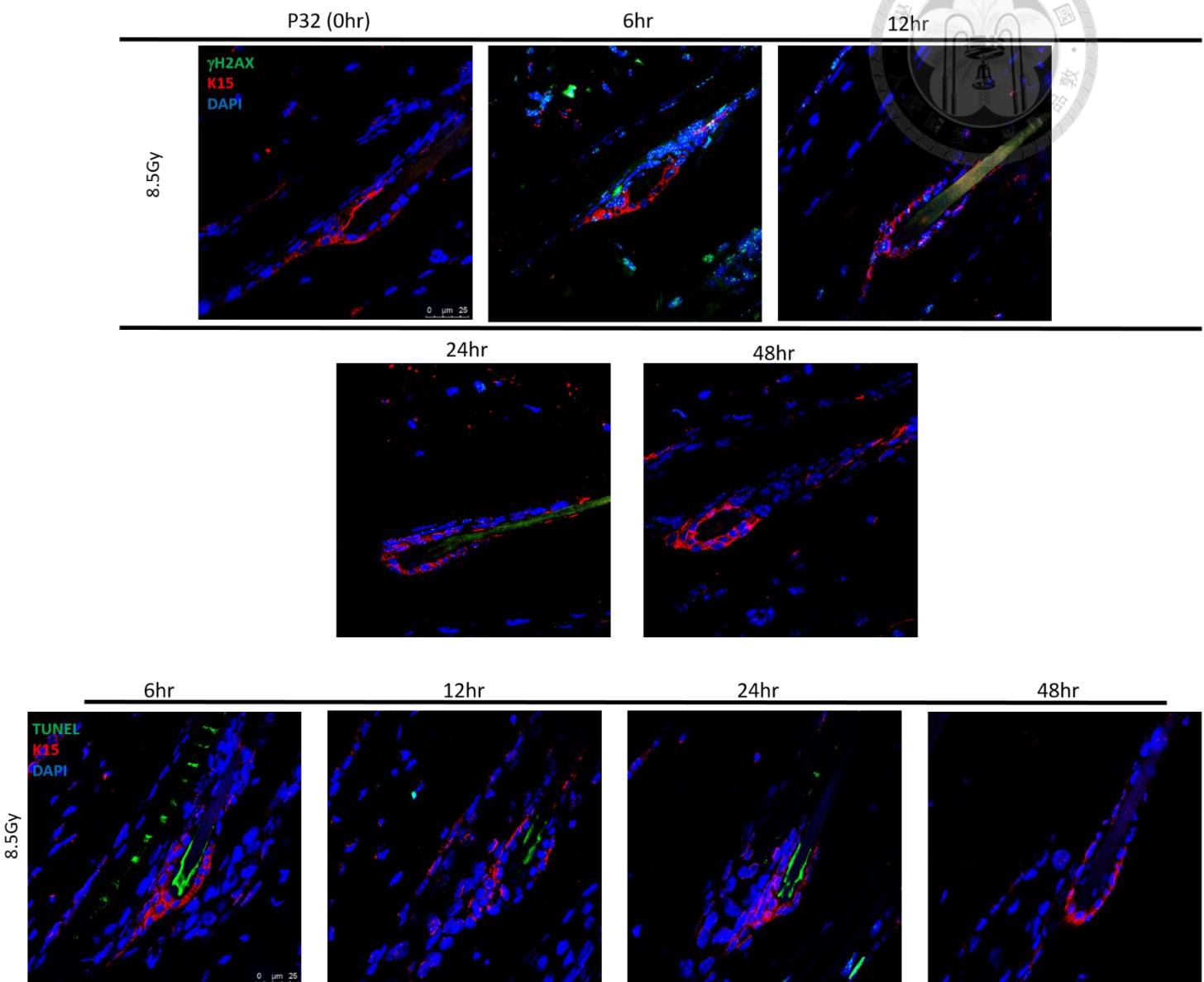


圖3.10 A.受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組與對照組小鼠毛囊的 γ H2AX 染色圖。

B.受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組與對照組小鼠毛囊的 TUNE/K15, γ H2AX/K15 染色圖。P39~P45: 小鼠出生後的天數 6hr~D5: 接受游離輻射後的時(天)數
bar:25μm



3.8 毛囊細胞對於 8.5Gy 游離輻射引發的 DNA 修復

在游離輻射傷害的過程中，DNA DSB 為細胞主要傷害原因。面對 DNA DSB 的傷害，為了避免細胞死亡或突變，細胞會以同源性重組(Homologous recombination, HR)及非同源性末端接合(Non-homologous end joining, NHEJ)兩種修復模式來修補斷裂的 DNA(30,31,57)，本實驗以免疫螢光染色分別標定這兩種修復路徑之相關蛋白，以 RAD51 標定 HR；以 DNAPKcs 標定 NHEJ。實驗結果如下圖所示(圖 3.11-3.12)，在 8.5Gy 這個輻射劑量下，兩種修復路徑都會表現，其中表現最多的部分集中在毛囊球的位置。在輻射傷害後的 6 小時，Rad51 及 DNAPKcs 會表現在 dermal papilla 附近的細胞，其中 DNAPKcs 的表現量較 RAD51 多，在 12 小時後，Rad51 的表現量與 6 小時接近，DNAPKcs 的表現量則較 6 小時少。到 24 小時後，DNAPKcs 的顆粒數目已經非常少，相反 Rad51 在餘下的毛囊球細胞幾乎都有表現。到 48 小時後隨著毛囊萎縮，只能偵測非常微弱的信號。在這個實驗中可以發現在高劑量的游離輻射可以同時引發 HR 及 NHEJ 的修復路徑，其中 HR 的修復較為持續，NHEJ 則是在早期大量出現，隨細胞數目減少表現數目也大幅下降。HR 比 NHEJ 持續的原因可能與餘下毛囊球細胞所在的週期有關，從 BrdU 的實驗中可以得知，在 12 及 24 小時這個時間點，細胞表現 BrdU 的數目較 6 小時多，而 HR 在 S 及 G2 期時的依賴性高，細胞可能為了促進 HR 的修復而在萎縮的早期重新進入細胞分裂。

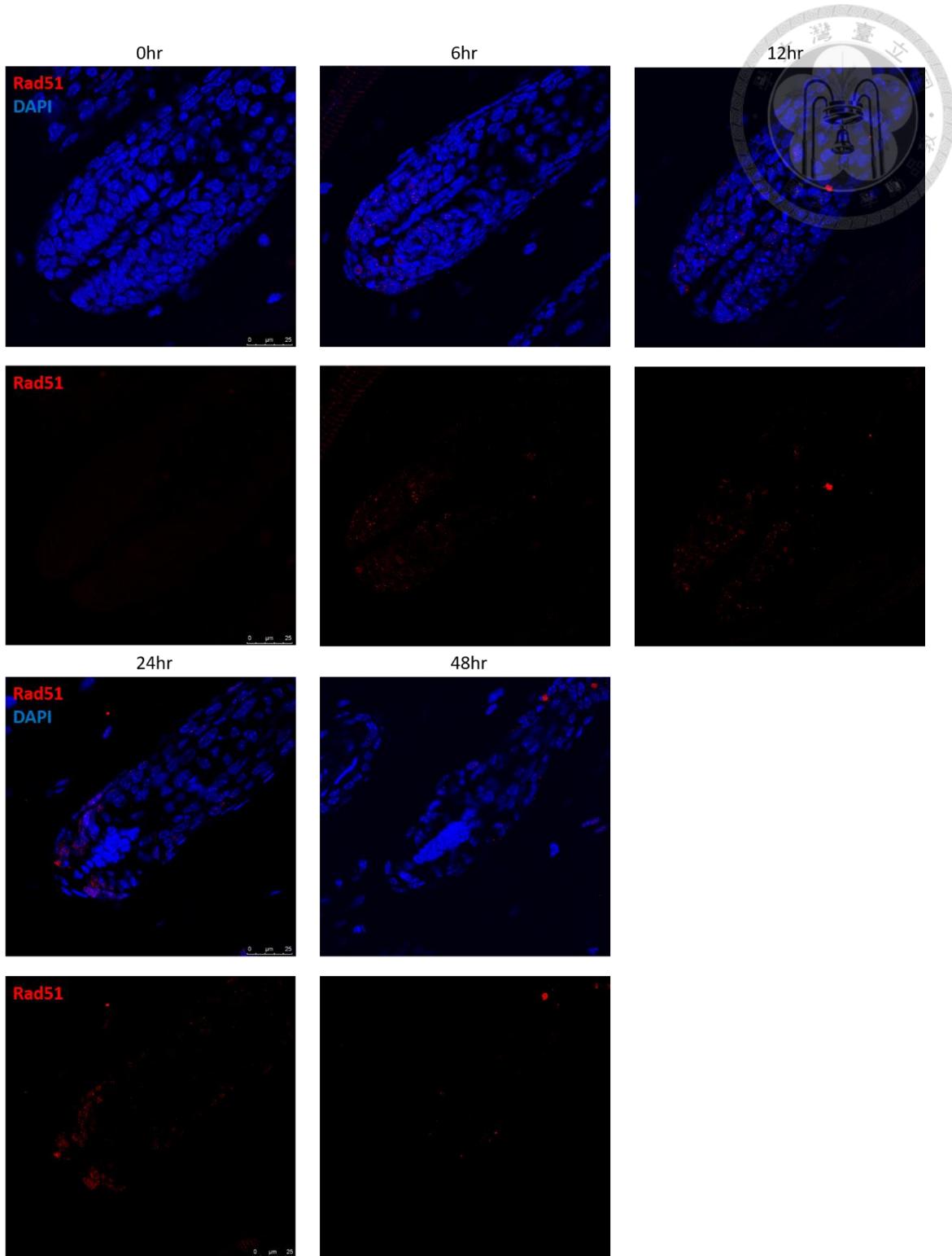


圖3.11 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組與 0Gy 生長期對照組小鼠毛囊的 Rad51 染色圖。

0hr~48hr: 接受游離輻射後的時數；bar:25μm

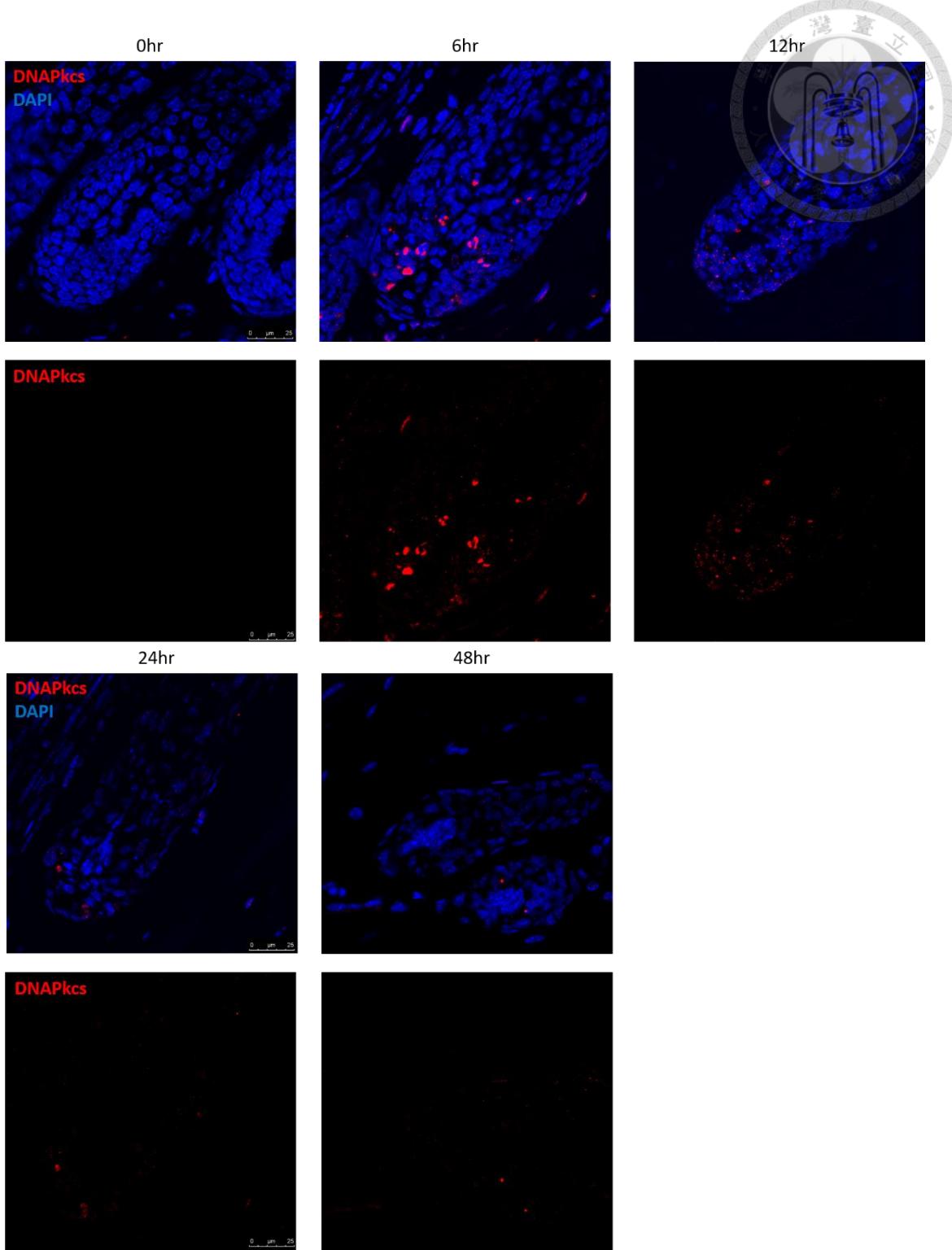


圖3.12 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組與 0Gy 生長期對照組小鼠毛囊的 DNAPkcs 染色圖。0hr~48hr: 接受游離輻射後的時數；bar:25μm



3.9 游離輻射對於毛囊生長週期的影響

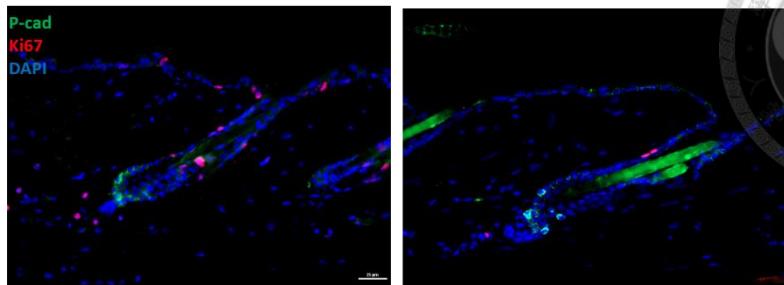
在游離輻射影響下，B6 小鼠毛囊會走向萎縮性衰退期路徑並接著進入休止期。的狀態，同時這個休止期維持的時間會比正常生理的休止期短，從時間軸(圖 3.2B)可以得知正常小鼠在出生後約 40 天毛囊進入衰退期，約 49 天進入休止期，這個休止期會持續至在出生後的第 84 天後毛囊才會重新進入下一個生長期。另一方面，小鼠在出生後第 32 天照射 8.5Gy 游離輻射後，毛囊萎縮至休止期，此時約為出生後的 42 天，在照片觀察上我們就可以發現在 58 天(照射後 26 天)毛囊已經進入生長期，表示兩者在休止期階段相差二十多天的時間。Ki67 為表現在細胞週期 G0 以外的細胞，所以 Ki67 也常用於觀察細胞增生的實驗中。為探討毛囊提早進入生長週期的時間，本實驗 P-cadherin 標定毛囊的次級毛胚，以 BrdU 及 Ki67 探討當中細胞分裂的時間，確定受到輻射影響後的第 10(P42)，17(P49)，21(P53)，24(P56)及 26(P58)天時，次級毛胚是否處於分裂階段，與對照組出生後的 49，56，80 及 84 天再為比較。實驗結果顯示(圖 3.13,3.14)，在正常週期下，出生後 49 及 56 天正處於休止期狀態，毛囊的次級毛胚沒有表現 BrdU 及 Ki67，在處於出生後 80 天的毛囊次級毛胚開始有表現 BrdU 及 Ki67，表示毛囊正準備從休止期轉換到生長期，在 84 天的次級毛胚開始增生並往下包覆 dermal papilla 的狀態，約為生長期第二期的時間點，符合正常生理週期。

在實驗組方面，在照射游離輻射後的第 10，17 及 21 天次級毛胚都沒有表現 BrdU 及 Ki67，表示毛囊還處於游離輻射所引起的休止期，到輻射處理後的第 24 天時，次級毛胚的地方開始表現 BrdU 及 Ki67，表示此時毛囊已經開始進入生長期階段，在第 26 天時，毛囊球接近形成，毛囊已經進入生長期第三期。



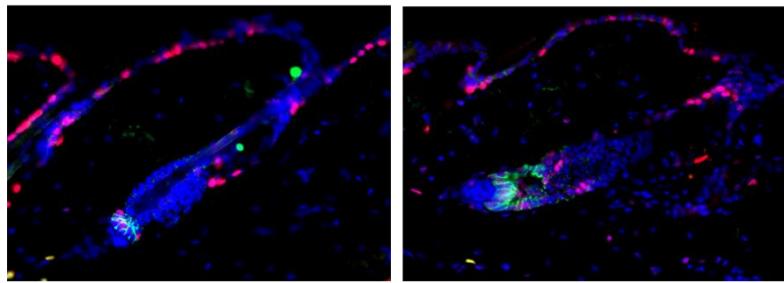
P49

P56



P80

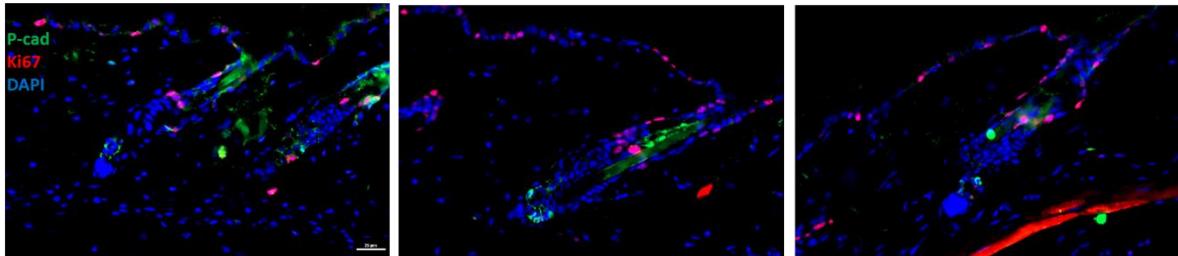
P84



P42(D10)

P49(D17)

P53(21)



P56(D24)

P58(D26)

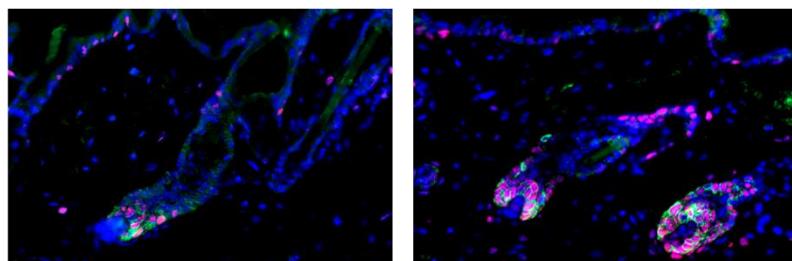


圖 3.13 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組與對照組小鼠毛囊的 Ki67/P-cad 染色圖。

D10~D26: 接受游離輻射後的天數, P49~P84: 小鼠出生後的天數

P-cad 為 P-cadherin ; bar:25μm

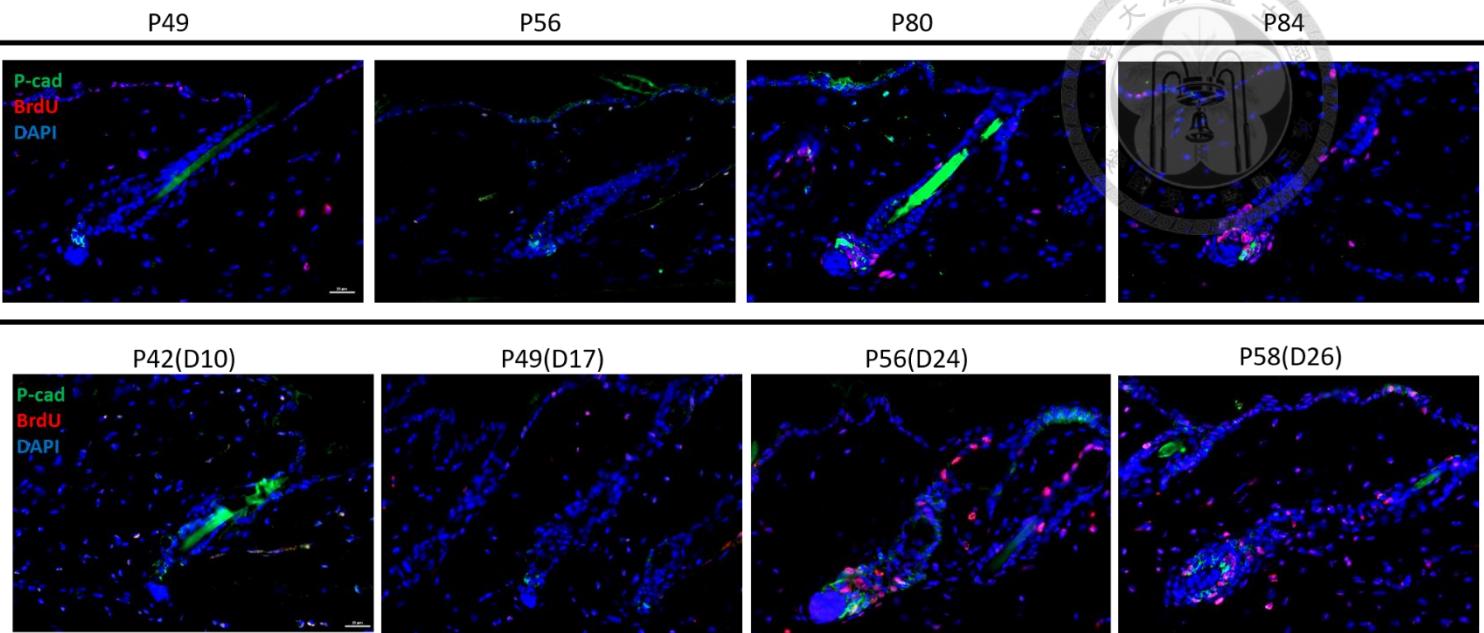
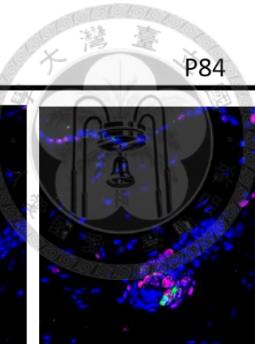


圖3.14 受 8.5Gy 輻射劑量之實驗組與對照組小鼠毛囊的 BrdUP-cad 染色圖。

D10~D26: 接受游離輻射後的天數, P49~P84: 小鼠出生後的天數

P-cad 為 P-cadherin ; bar:25μm

3.10 收集游離輻射造成的休止期與正常休止期之細胞群

為進一步了解兩者休止期的狀態的差異，實驗以出生後第 49 天(P49)與第 56 (P56)天的休止期毛囊，分別與照射游離輻射後第 10 天(P42)及第 17 天(P49)的休止期毛囊互相比較。我們利用流式細胞儀(FACS)並利用表現在細胞膜的專一性蛋白標誌進行分選並收集 Inner bulge , Bulge 及 Hair germ 三群細胞(圖 3.15-3.18)，以 Sca1⁻CD49f^{low}CD34⁺分選出 inner bulge，以 Sca1⁻CD49f⁺ CD34⁺ CD200⁺分選出 bulge 以及 Sca1⁻CD49f⁺ CD34⁺CD200⁺分選出 hair germ(58,59)。再以 qPCR 的方式分析這三選細胞群在有或無接受游離輻射的基因表現情況。透過 Brdu 及 Ki67 出現的時間，可以得知在游離輻射傷害後的第 24 天，次級毛胚開始活化，雖然在第 21 天並沒有出現此現象，但由於時間上較為接近，所以 21 天這個時間點不適合用在比較休止期的細胞狀態。

7w P49

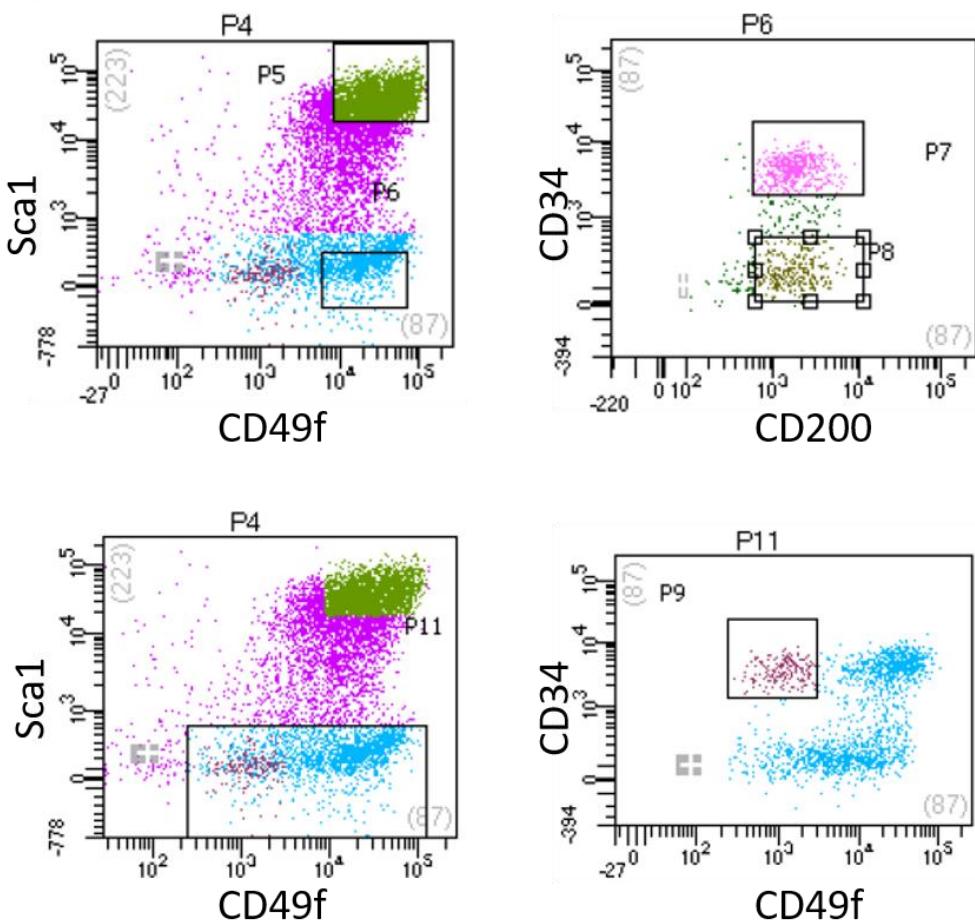


圖 3.15 利用細胞分選儀分選 P49 小鼠 inner bulge(P9), bulge(P7)及 hair germ(P8)

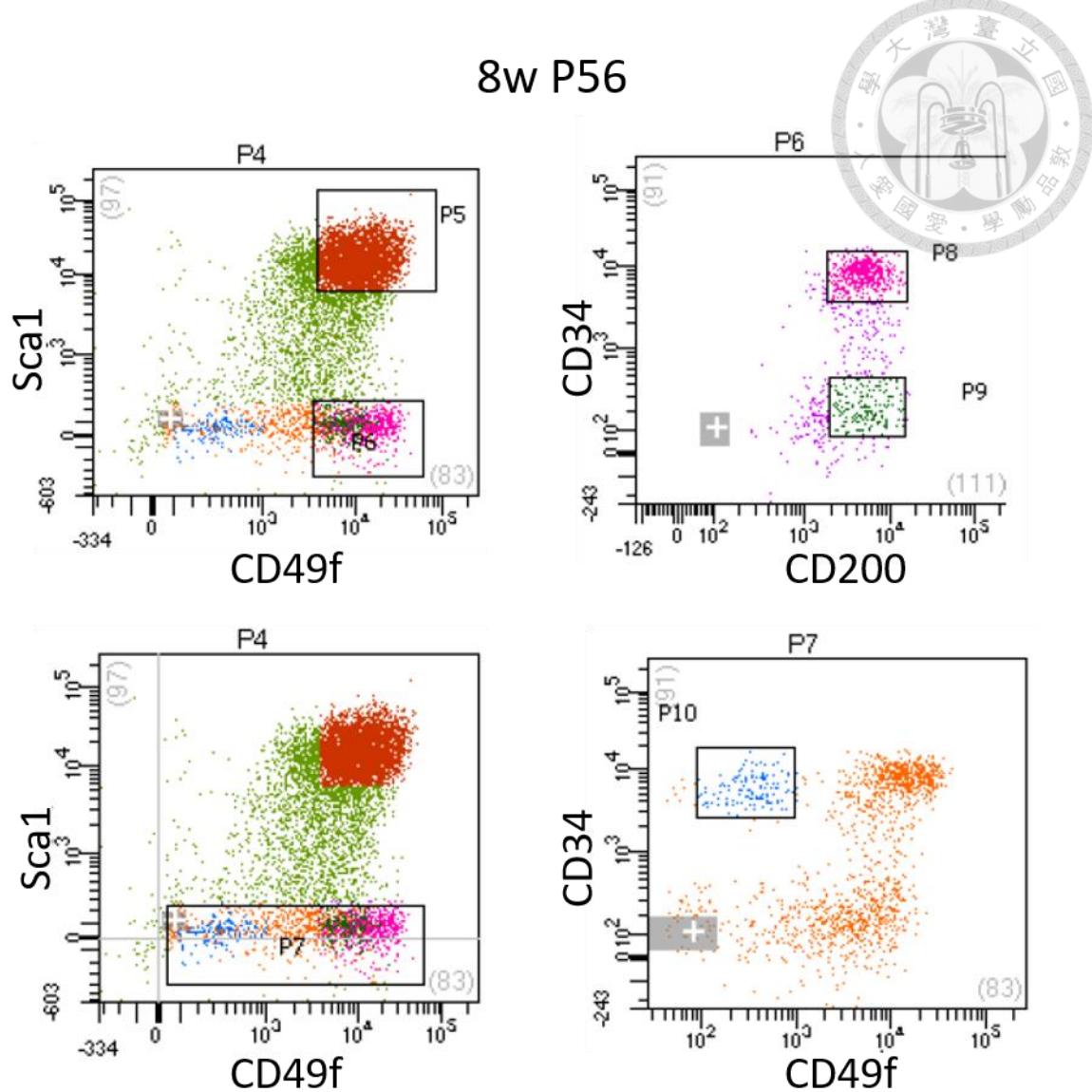


圖 3.16 利用細胞分選儀分選 P56 小鼠 inner bulge(P10), bulge(P8) 及 hair germ(P9)

IR day 10

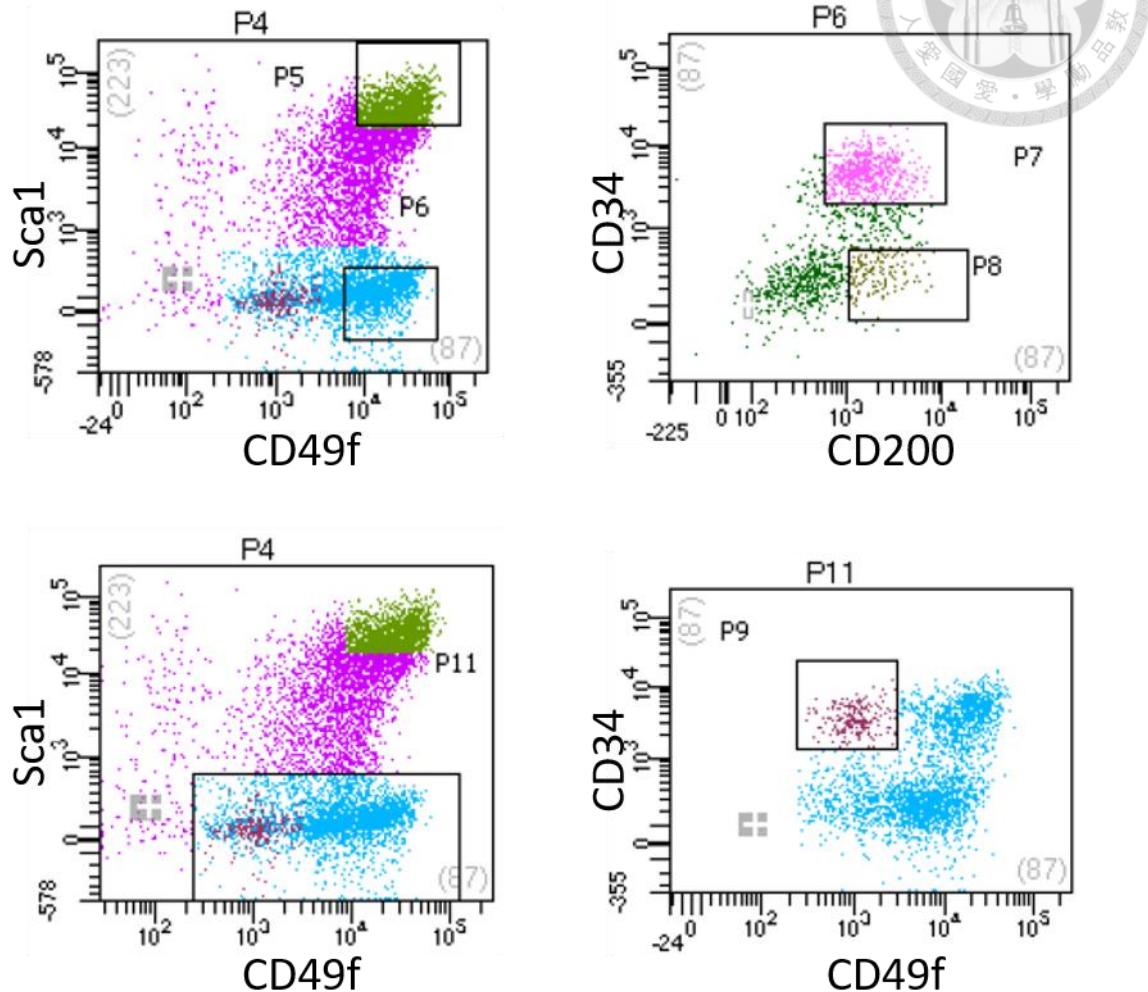


圖 3.17 利用細胞分選儀分選受 8.5Gy 輻射劑量後第 10 天小鼠 inner bulge(P9), bulge(P7) 及 hair germ(P8)



IR day 17

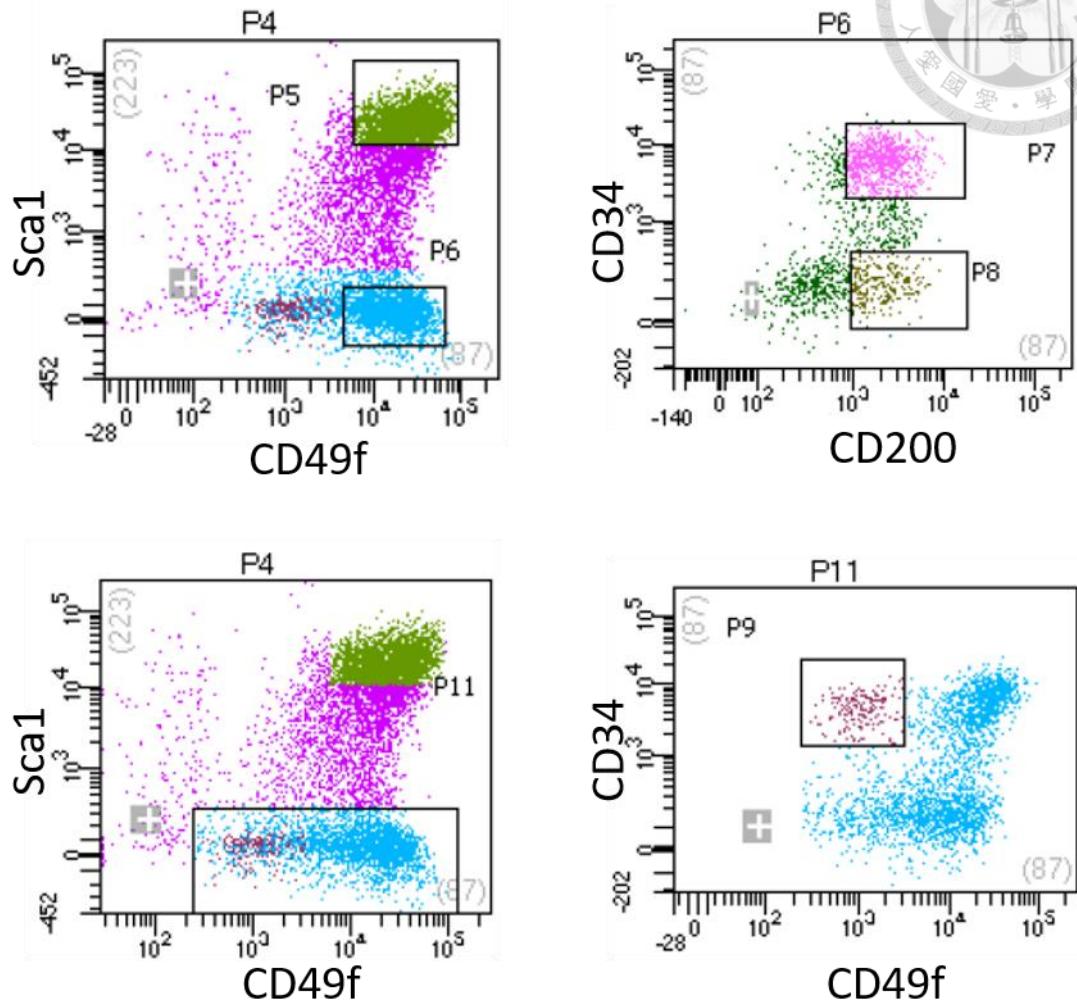


圖 3.18 利用細胞分選儀分選受 8.5Gy 輻射劑量後第 17 天小鼠 Inner bulge(P9), bulge(P7) 及 hair germ(P8)



3.11 游離輻射造成毛囊 Inner bulge 抑制信號下降

過去研究指出毛囊在進入休止期後，K6⁺的 Inner bulge 細胞會表現 BMP-6 及 FGF18 的訊號來抑制毛囊幹細胞活化，使毛囊幹細胞維持不活化並使毛髮周期留在休止期的狀態(44)。在收集的三群細胞中，Inner bulge 是毛囊自身的 BMP 來源，為了探討毛囊自身抑制訊號的變化，

首先要知道 Inner bulge 細胞在經過游離輻射後其抑制訊號表現量是否會有改變。

在這個實驗中將分為兩組，組別一為進入休止期早期的 P49 和照射輻射後 10 天(IRd10)，組別二為處於休止期中期的 P56 和照射輻射後 17 天(IRd17)。在 qPCR 結果中(圖 3.19)，可以發現在輻射傷害造成的休止期前期及中期，BMP-6 的表現量並沒有出現顯著下降；但另一個抑制來源 FGF18 的表現中，可以發現兩個組別中，輻射造成的休止期之 FGF18 的表現量較正常休止期出現顯著下降。這個結果表示，在接受游離輻射後毛囊自身的抑制訊號表現的改變可能是毛囊提早進入下一個生長期的原因之一。

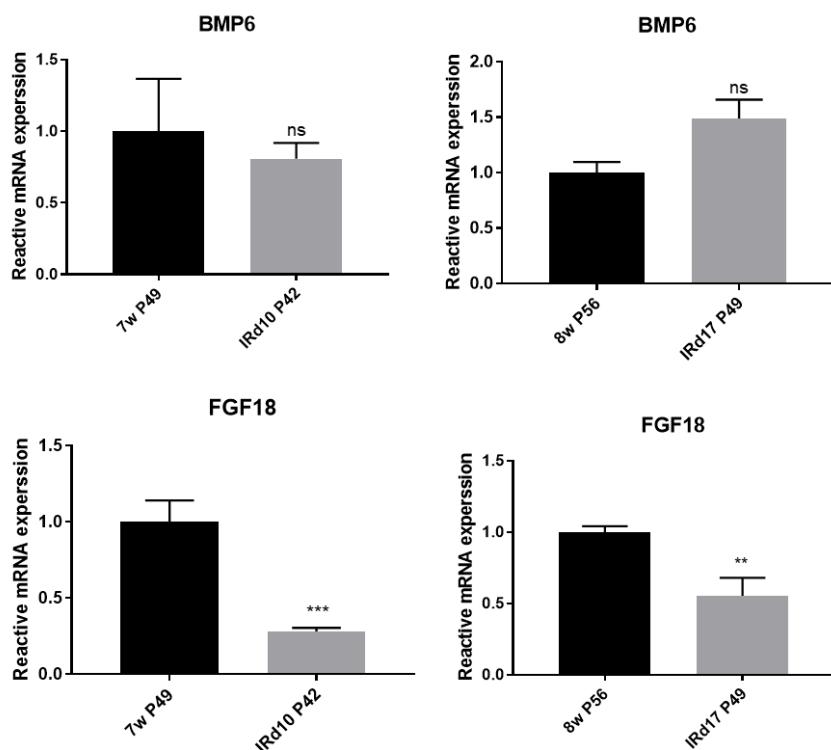


圖 3.19 休止期早期(左,P49, IRd10)和休止期中期的(右,P56,IRd17)毛囊 inner bulge 細胞抑制信號及其下游基因之 mRNA 表現；*<0.05，*** P<0.0001，**** P<0.0001



3.12 毛囊幹細胞在游離輻射後之基因表現

qPCR 結果顯示(圖 3.20)，輻射造成的休止期早期及中期的 Wnt 訊號傳遞路徑下游的 Axin2 及 Lef1 之表現量都較正常休止期有顯著上升。這個結果表示，在游離輻射傷害後的休止期的毛囊幹細胞比正常生理的休止期更活躍；另一方面，雖然在 inner bulge 中毛囊內的 BMP-6 表現量沒有顯著下降，但在皮膚中還有其它的 BMP 來源來抑制毛囊的生長週期(44)，所以我們測定 BMP 訊號的下游 Id 基因的表現來判定毛囊周圍的 BMP 訊號在游離輻射後是否會改變。結果顯示(圖 3.21)，在接受游離輻射造成的休止期前期及中期，所有的 Id 基因的表現量都有顯著下降，這個結果表示，在游離輻射傷害的過程中可能會影響皮膚內的信號傳遞來影響毛囊的生理週期。

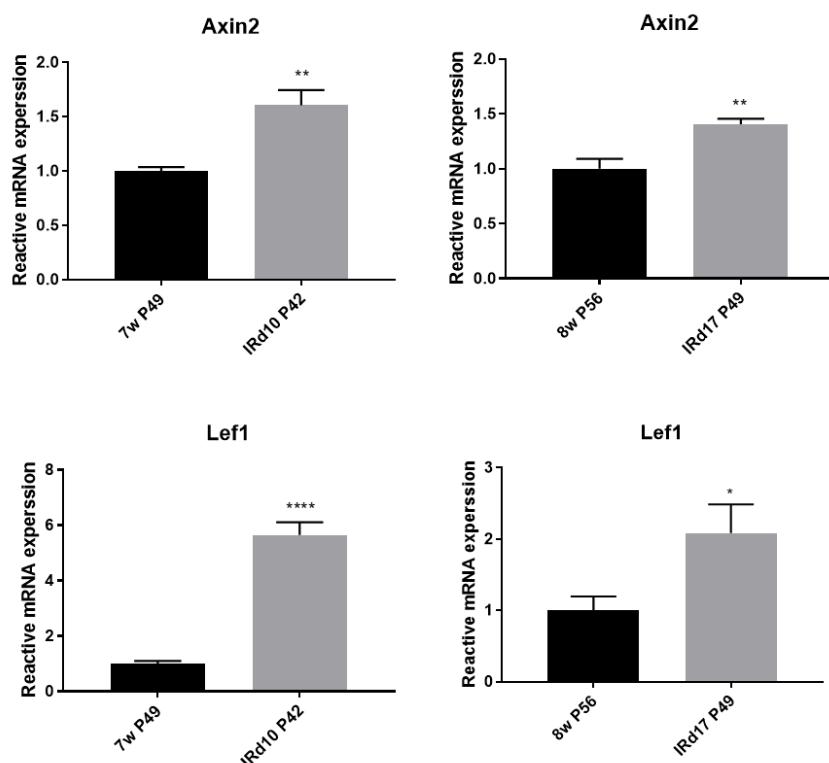


圖 3.20 休止期早期(左,P49,IRd10)和休止期中期的(右,P56,IRd17)毛囊 bulge 細胞 Wnt 信號路徑下游基因之 mRNA 表現；* <0.05 ，*** $P<0.0001$ ，**** $P<0.0001$

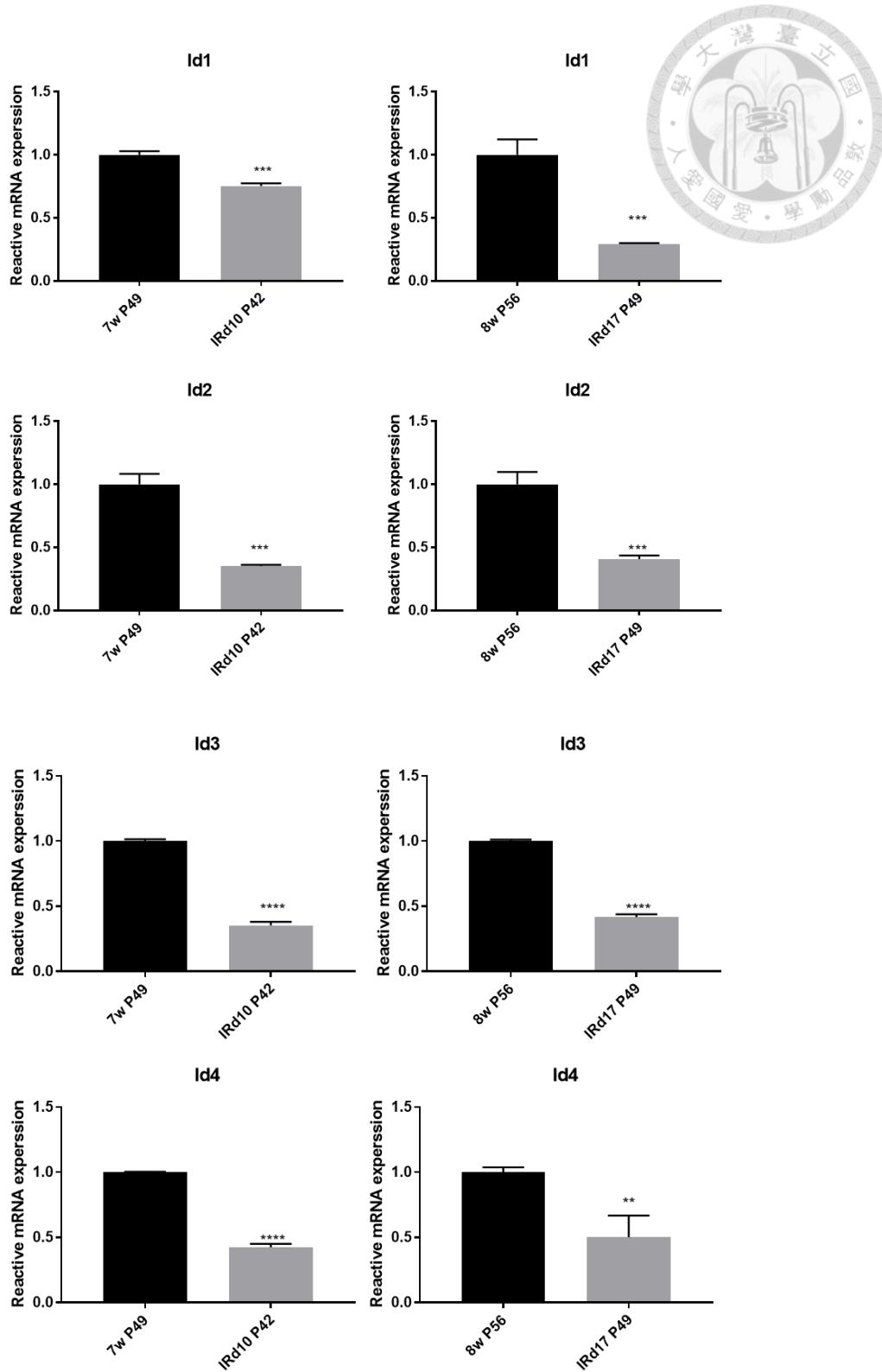


圖 3.21 休止期早期(左,P49, IRd10)和休止期中期的(右,P56,IRd17)毛囊 bulge 細胞
BMP 下游基因之 mRNA 表現；* <0.05 ，*** $P<0.0001$ ，**** $P<0.0001$



3.13 毛囊次級毛胚細胞在游離輻射後之基因表現

次級毛胚在休止期毛囊中位於 dermal papilla 與 bulge 之間的位置，為毛囊訊息傳遞的工作上起重大作用。當毛囊從休止期中脫離，進入生長期初期時，次級毛胚為生長訊號最先刺激的地方(50)，所以在探討毛囊提早生長週期時，我們需要了解次級毛胚在經過游離輻射後有什麼變化。

Wnt 的信息傳遞與毛囊的型態變化及調控生長相關，在毛囊生長週期中，當休止期結束轉換到生長期時，Wnt 的訊息傳遞會增強，使毛囊幹細胞活化，促使毛髮周期進入生長期(60)。實驗結果顯示(圖 3.22)，Wnt 訊號的下游 Axin2 的表現量在輻射造成的休止期的前期及中期較正常生理的休止期都有顯著上升，當中接受輻射處理後的休止期之 Wnt3a 的表現量有顯著上升。這個結果表示，在輻射處理後的休止期之次級毛胚較正常生理週期活躍。

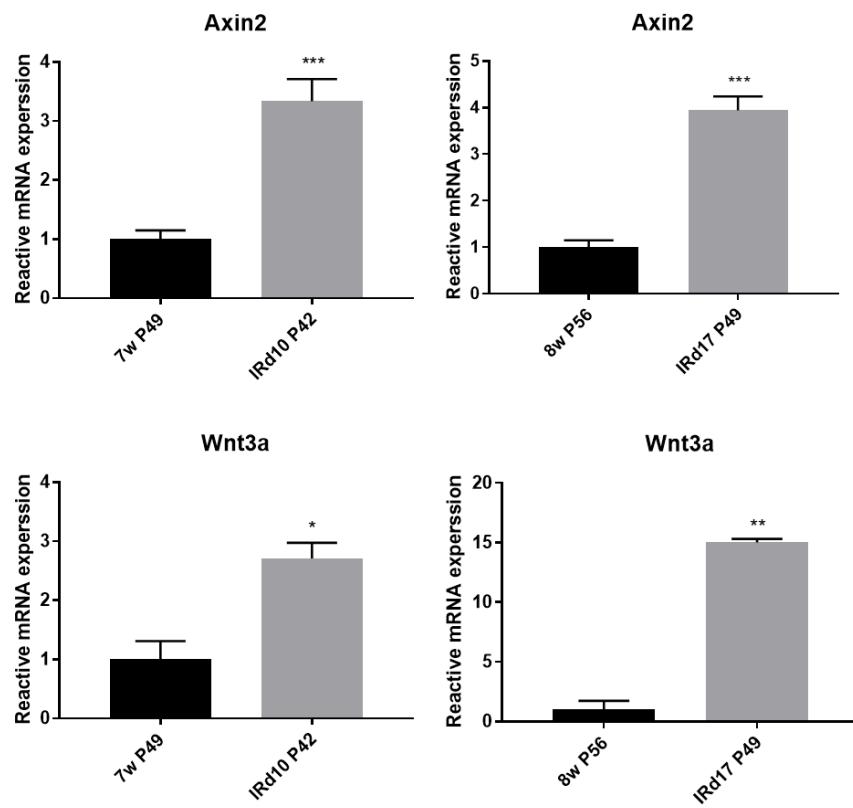


圖 3.22 休止期早期(左,P49, IRd10)和休止期中期的(右,P56,IRd17)毛囊 hair germ Wnt 路徑相關基因之 mRNA 表現；* <0.05 ，*** $P<0.0001$ ，**** $P<0.0001$

在毛囊休止期中 BMP 為抑制毛囊進入生長期的重要訊號之一(40,41)，但由於毛囊自身分泌 BMP 的來源只有 inner bulge，當中我們發現在 BMP6 沒有顯著下降，可是在 bulge 中可以發現 BMP 的下游基因 Id 之表現量有顯著下降，所以毛胚也有可能受到環境的 BMP 影響。在次級毛胚中，我們透過 Id 基因的表現量來測定毛囊在游離輻射後外來的 BMP 是否影響到次級毛胚。實驗結果顯示(圖 3.23)，不同的 Id 基因在次級毛胚中表現量會有所不同，在輻射傷害的休止期前期中，Id2 表現量並沒有顯著差異，在 Id3 中則是有顯著下降；可是在休止期中期時，Id2 的表現量出現顯著下降，Id3 則是顯著上升。

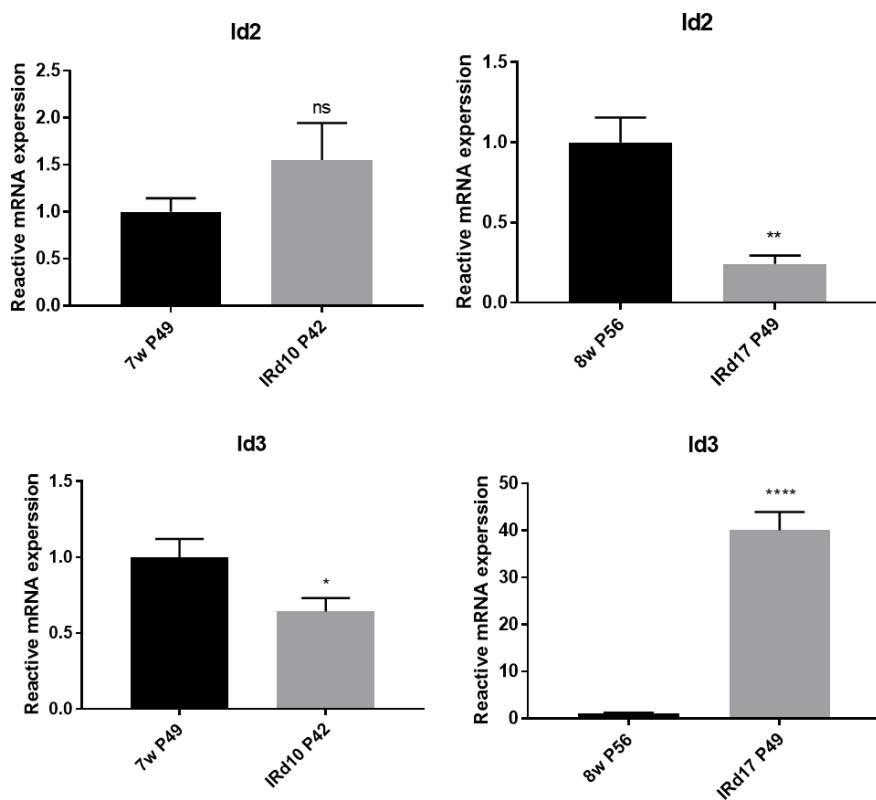


圖 3.23 休止期早期(左,P49,IRd10)和休止期中期的(右,P56,IRd17)毛囊 hair germ 細胞 BMP 下游基因之 mRNA 表現；* <0.05 ，*** $P<0.0001$ ，**** $P<0.0001$

Notch 的訊息傳遞與細胞的增生與分化有關(62,63)，這個訊息路徑也跟毛囊的生长期早期分化相關(64)。所以我們分析了 Notch 的下游基因表現，實驗結果顯示(圖 3.24)，Notch 的下游基因 Hey1 在輻射處理後休止期前期(IRd10)並沒有表現，在正常休止期中期(P56)也不表現 Hey1，可是在輻射傷害造成的休止期中期(IRd17)則表現 Hey1。另一方面，同樣是 Notch 下游基因的 Hes1，在休止期前期中，輻射處理後的休止期 Hes1 出現顯著下降，在休止期中期時，正常的毛囊不表現 Hes1，但在輻射處理後 Hes1 則有表現。

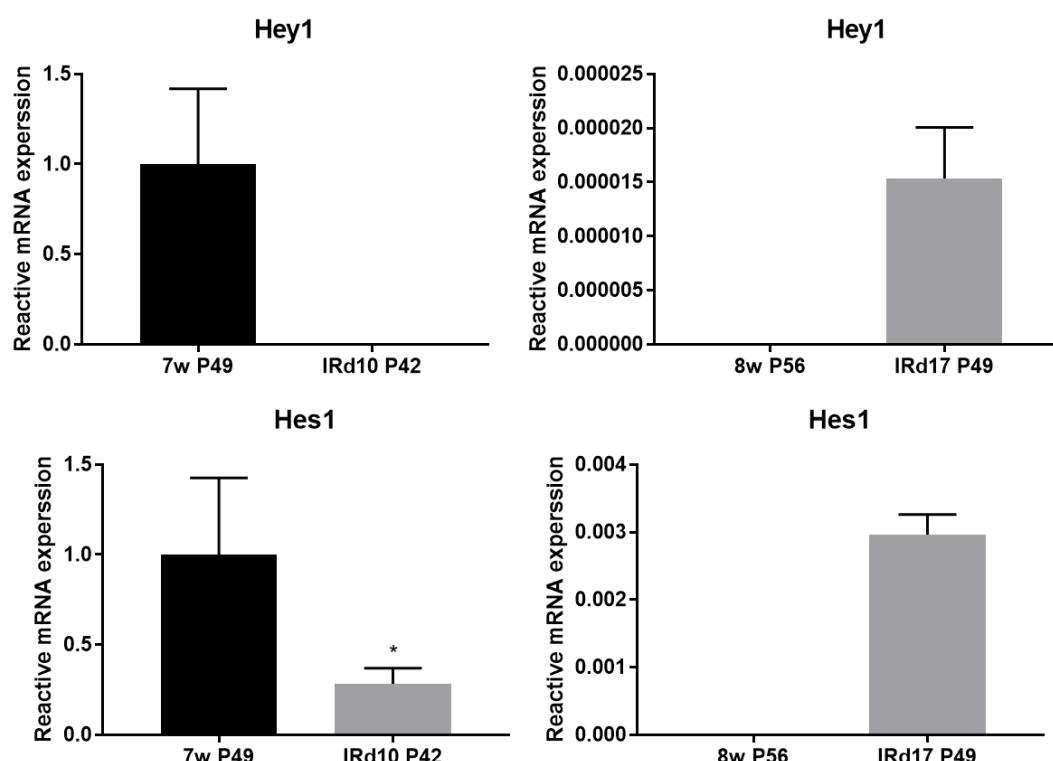


圖 3.24 休止期早期(左,P49, IRd10)和休止期中期的(右,P56,IRd17)毛囊 hair germ 細胞 Notch 下游基因之 mRNA 表現；* <0.05 ，*** $P<0.0001$ ，**** $P<0.0001$

在休止期進入生長期的過程中，TGF β 2的訊號是刺激次級毛胚活化的訊號之一(61)。為瞭解接受輻射後會加快毛囊週期，我們分析了 TGF β 2及其受器 TGF β r2 的表現量。實驗結果顯示(圖3.25)，在 TGF β 2在輻射處理的休止期前期及中期的表現較對照組有顯著上升。在 TGF β r2方面，可以發現在休止期的前期，受到輻射傷害後 TGF β r2表現量顯著下降，可是在休止期的中期時，輻射傷害的休止期 TGF β r2 相較對照組有顯著上升。

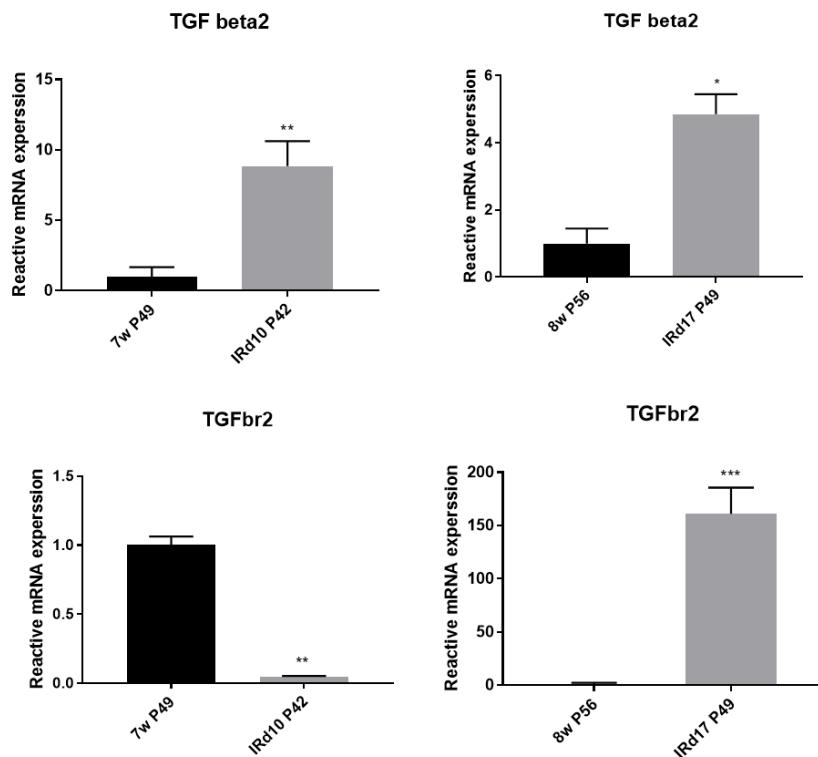


圖 3.25 休止期早期(左,P49, IRd10)和休止期中期的(右,P56,IRd17)毛囊 hair germ 細胞 TGF β 路徑基因之 mRNA 表現；* <0.05 ，*** $P<0.0001$ ，**** $P<0.0001$

Sonic hedgehog(shh)是參與毛囊的胚胎發育以及在成鼠中調控毛囊生長和週期的訊號之一(65)。為瞭解接受輻射後休止期前期和中期 shh 是否有參與其中，我們將分析其下游基因 Gli1 和 Gli2 的基因表現。實驗結果顯示(圖 3.26)，shh 下游基因 Gli1 在輻射處理後的休止期前期及中期表現量並沒有顯著差異；另一方面輻射處理的休止期前期及中期的 Gli2 表現都出現顯著下降。

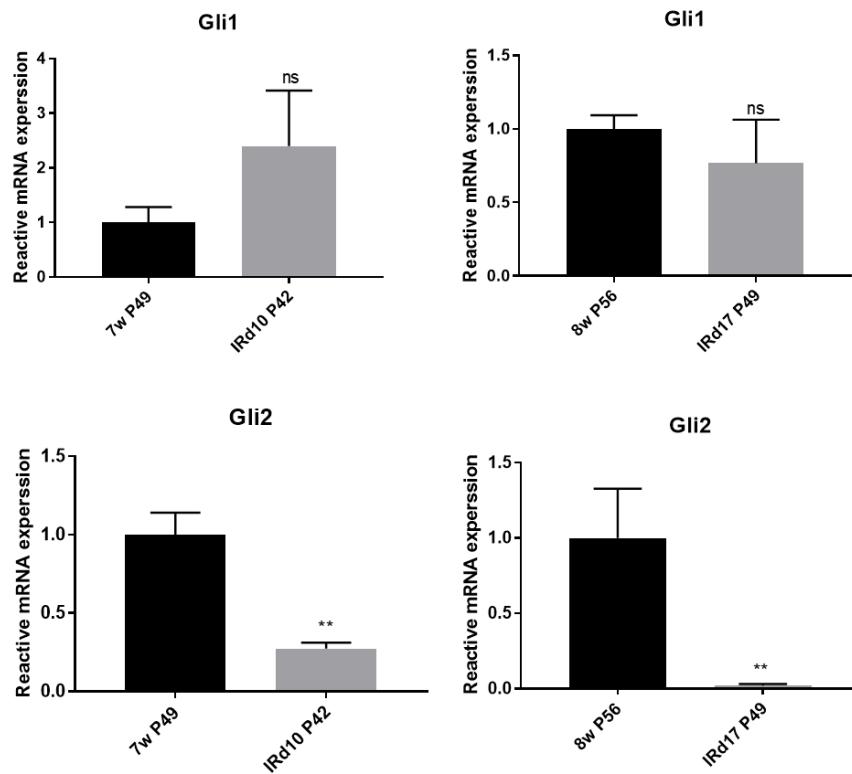


圖 3.26 休止期早期(左,P49, IRd10)和休止期中期的(右,P56,IRd17)毛囊 hair germ 細胞 shh 路徑基因之 mRNA 表現；*<0.05，*** P<0.0001，**** P<0.0001



第四章 討論

4.1 輻射傷害對毛囊生長週期的影響

在過去 Ralf Paus 等人的研究中發現毛囊根據化療藥物所造成的傷害程度會有萎縮性生長期和萎縮性衰退期兩個路徑。當傷害程度較小時，毛囊進入萎縮性生长期路徑，以一個快速修復的臨時結構來度過傷害帶來的負擔，隨後進入衰退期再進入休止期；傷害程度較大時，毛囊選擇萎縮性衰退期路徑，直接進入一個短暫的休止期(36)。根據這兩個路徑可以知道，當毛囊受到一定傷害後最終都需要透過休止期能再回復毛囊的生長週期。根據實驗結果，游離輻射對毛囊引起的毒性可以帶來與化療藥物相似的生物效應，高劑量游離輻射可以導致毛囊受損並進入萎縮性衰退期，毛囊在停留在休止期的時間比對照組更短，這個結果可能是毛囊提早進入衰退期所致，假設傷害後毛囊進入休止期是為了調整自身細胞情形，那就表示萎縮性生長期因為前期有一個臨時結構的協助，所以隨後再進入休止期調整；在萎縮性衰退期中，毛囊在前期因修復失效，需要處於休止期調整的時間比較久，但由於提前進入休止期，相對要調整狀態到可以進入下一個生長期的時間便會提早。

4.2 游離輻射對毛囊細胞造成 DNA 傷害及凋亡

細胞凋亡是毛囊生長週期中重要的一環，過去的研究已經有探討毛囊進入衰退期後細胞死亡的情形及位置，並以衰退的過程中毛囊表現 TUNEL 的數目建立不同時期的指標(66)。本篇以 TUNEL 及 Cleaved caspase 3 免疫螢光染色來標定凋亡的細胞，比較受到游離輻射傷害與正常衰退期凋亡的情形及位置。在正常生理衰退期中，毛囊自發性的凋亡主要集中在毛囊末端，隨凋亡數目增加毛囊開始退縮，到後期凋亡的細胞主要集中在 epithelial strand，待該處細胞凋亡後，毛囊已接近進入休止期。在游離輻射模型中，毛囊在受傷後萎縮的前期表現 TUNEL 及 Cleaved caspase 3 為毛囊球，IRS 及毛幹的位置，這些位置也是 γ H2AX 前期表現最多的地方，在照射 6 小時後，毛囊球內大部分的細胞都表現 γ H2AX，此時細胞處於嚴重受傷階段，部細胞也開始步入凋亡， γ H2AX 的表現量隨時間減少，但相對細胞表現 TUNEL 及 Cleaved caspase 3 表現量比 γ H2AX 減少的數目慢，表示毛囊已經步入死亡階段，在 48 小時後可以發現毛囊在萎縮的過程中並不是單純的往表皮退縮，

而是有出現結構扭曲的情形，在 72 小時後出現類似 epithelial strand 的結構，此時凋亡的細胞主要集中在此。雖然正常衰退期與萎縮性衰退期的起因不同，但是我們可以發現在衰退時的一些共同特徵，如凋亡的部位，退縮時出現的結構或退縮的形態等，所以毛囊本身的退縮機制可能會用於一些非自然狀況，運用原有的機制達到可以調整的階段，再重新進行一個新的週期。

4.3 游離輻射抑制毛囊細胞增生及改變次級毛胚組成

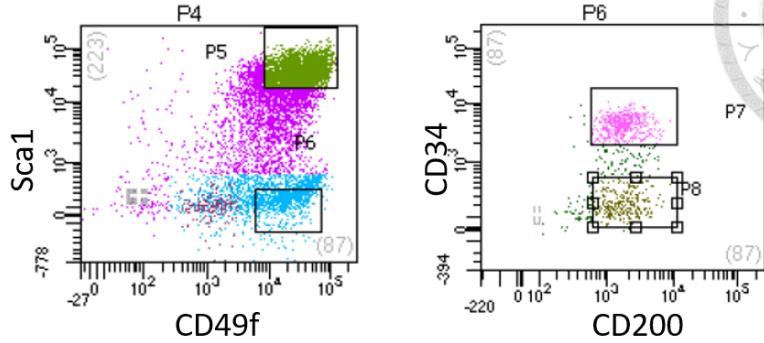
毛囊處於生长期時照射游離輻射後，在 6 小時可以發現毛囊球內之細胞沒有表現 BrdU，在 12 和 24 小時中毛囊細胞有表現 BrdU，期間毛囊球內的細胞總數是大量減少的，毛囊細胞可能需要進行 HR 的修復而不斷促進細胞分裂，但這個過程在高劑量游離輻射傷害下無法成功，凋亡的速度大於修復的速度下，在 48 小時後毛囊球細胞已所剩無幾，BrdU 的表現也漸漸消失，毛囊隨後開始進入萎縮性衰退期路徑，再進入休止期。另一方面，毛囊球在游離輻射傷害後表現 K5⁺(ORS)的細胞比沒有照射的毛囊多，ORS 為毛囊細胞中分化程度較低的細胞群，萎縮性衰退期前期時，毛囊球內的細胞會在短時間大量減少，K5⁺的細胞可能往毛囊球方向移動並分化，補充流失的細胞並協助細胞保持原有形態。

在細胞分選的實驗當中，可以發現游離輻射造成的休止期與正常生理休止期的 CD49f^{high} 中 CD34 及 CD200 細胞分佈有所不同，前者會出現 Scal⁻CD49f^{high}CD34⁻CD200^{low} 的細胞群(圖 4.1)，在分選的結果可以發現這群細胞在輻射處理後進入休止期的早期(IRd10)出現，在一週後的休止期中期(IRd17)中也可以發現這群細胞，在前期到中期這段時期此細胞群並沒有消失說明這並不是游離輻射傷後出現的短暫影響，另一方面在正常生理的休止期當中，並沒有出現此細胞群。

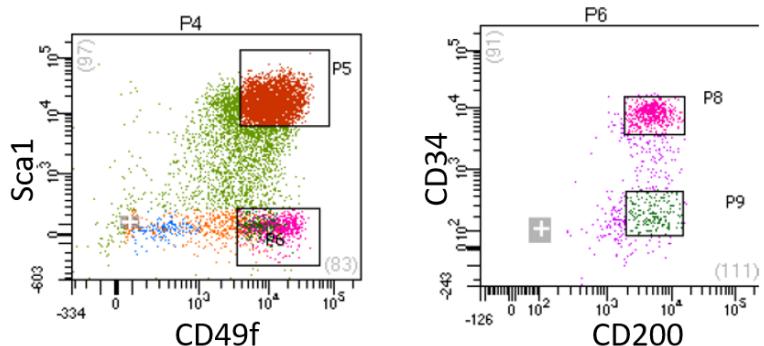
Scal⁻CD49f^{high}CD34⁻CD200^{low} 這群細胞可能是處於毛囊球附近的細胞修復成功後補充流失之基質細胞，或是在游離輻射過程中次級毛胚的基因表現受到影響導致 CD200 的表現量下降，而這群細胞所分佈的位置與原來次級毛胚相當接近，這群細胞可能是游離輻射傷害後組成次級毛胚的細胞群之一，這個特殊的次級毛胚結構可能是毛囊加速生長週期的因素之一。



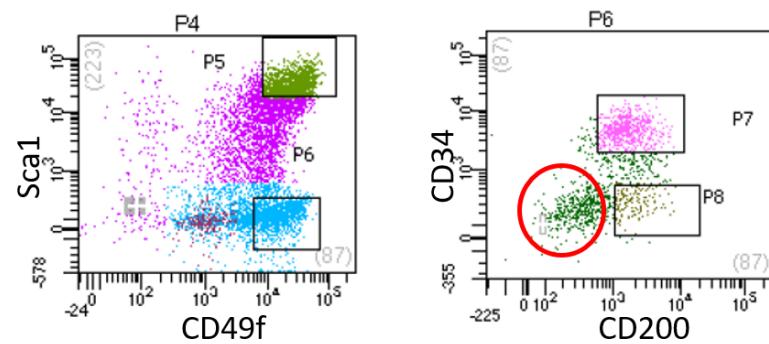
7w P49



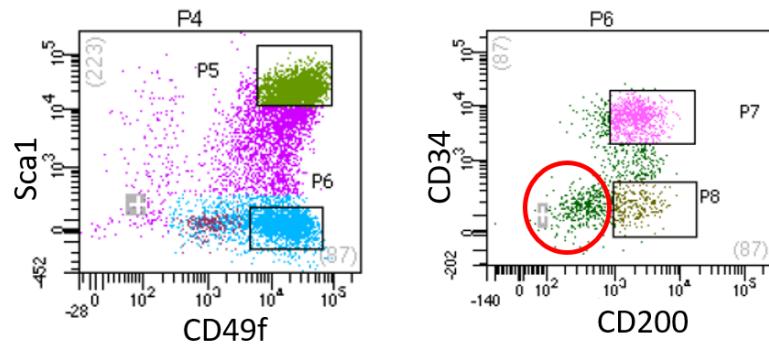
8w P56



IR day 10



IR day 17

圖 4.1 細胞分選中 $\text{Sca}1^-\text{CD49f}^{\text{high}}$ 中 CD34 及 CD200 細胞分佈圖



4.4 萎縮性衰退期路徑影響毛髮週期

在實驗中，我們分選出毛囊內的三群細胞，目的是為了解它們在萎縮性衰退期路中各自的訊號變化，從中探討那些因子在輻射傷害後會使毛囊提早進入下一個生長期。首先討論的是 inner bulge 的部分，在過去研究指出，這群細胞會分泌 BMP6 及 FGF18 到外層，在休止期的毛囊中扮演一個抑制毛囊幹細胞活化的角色。從結果可以發現 BMP6 的表現量在有或無游離輻射處理的休止期前期及中期皆沒有改變，FGF18 則是在游離輻射處理後有顯著下降，這表示在毛囊自身的訊號來說 FGF18 表現受到游離輻射的影響較大，使毛囊抑制生長期的訊號減少。

接著是 bulge 的部分，由於 inner bulge 的 FGF18 的表現量減少，所以 bulge 的細胞理應更加活躍，在游離輻射處理後的休止期前期及中期，Wnt 的下游基因 Axin2 及 Lef1 的表現量都比正常生理的休止期高，另一方面，BMP 的下游 Id1,2,3,4 都有顯著下降，Id 基因的表現對於 BMP 的信號傳遞是非常敏感的(67,68)，但毛囊自身的 BMP 訊號並沒有減弱，所以游離輻射可能是影響到毛囊以外的細胞導致 BMP 來源減少，Id 基因的表現量才會下降，所以在毛囊內的抑制因素減少外，環境的抑制因素也可能減少，而毛囊自身的幹細胞也處於比對照組更活躍的狀態。

再來是探討毛囊的是次級毛胚細胞群中各個信號的變化，在休止期和生長期的轉換中，次級毛胚是最先受到刺激的部份，而刺激的來源主要為 Wnt, BMP, TGF β , shh 等。在 Wnt 的訊息傳遞中可以發現休止期的次級毛胚在受到輻射傷害後的前期及中期 Axin2 的表現量比對照組都有顯著上升，其中可能是透過 Wnt3a 來傳達，但在實驗結果上，次級毛胚最早在受到輻射傷害後第 24 天才開始進行裂，所以在這模型當中，細胞的活躍程度只是休止期和生長期中的一個門檻，當下游 Axin2 表現量到達一定程度後(69)，再配合其餘的訊號活化，就可以脫離休止期而進入生長期。

在 TGF β 方面，從結果中可以得知，在輻射處理後的休止期前期(IRd10)TGF β r2 的表現量相對對照組是顯著下降的，可是在休止期中期(IRd17)的比較當中 TGF β r2 則是顯著上升，另一方面 TGF β r2 的表現量在輻射處理後都有顯著上升。過去的研究當中發現缺乏 TGF β r2的小鼠，毛囊會停留在休止期，當在缺乏 TGF β r2的小鼠植入 TGF β r2 beads 後，可以發現 psmad1/5/8 的信號會堆積在毛胚部份(61)，與處於休止期的毛囊相似。游輻射造成的休止期可能出現類似缺乏 TGF β r2小鼠的情



況，在輻射處理後休止期前期(IRd10)時 TGF β r2無法正常表現，使 TGF β 路徑的相關訊息無法執行，待休止期中期(IRd17)時毛囊 TGF β r2的表現量上升，訊號可以傳遞到細胞內。在游離輻射後第24天時可以觀察到次級毛胚開始增生，當中 TGF β r2 的回復可能是毛囊提早進入生長週期的重要因素之一。

Notch 的訊息是依靠細胞膜中 Delt, Jagged(ligand)和 Notch(receptor)的接觸來傳遞(70)，而它也在毛囊細胞分化中也扮演相當重要的角色(71)。我們在輻射處理後休止期前期(IRd10)發現 Notch 的下游基因 Hey1 和 Hes1 分別處於無表現及低表現的狀態，說明此時 Notch 的訊號無法正常執行，相反，到休止期中期(IRd17)可發現 Hey1 和 Hes1 都有表現，但正常的生理休止期中期(P56)中 Hey1 和 Hes1 都無表現，可見 Notch 的路徑在有或無游離輻射處理的休止期表現有所差異。Notch 的訊號無法正常執行原因可能是在 IRd10，毛囊細胞處於一個不良的狀態或細胞間的接觸受到干擾，導致信號無法傳遞，到了 IRd17 時細胞的狀態回復。

在 bulge 的部份中，Id 的表現都有顯著改變，可能是受到外界的 BMP 訊號影響，為了探討組織環境中的 BMP 對毛胚的影響，我們分析了毛胚中 Id2 及 Id3 的表現量，在結果中我們可以得知在輻射處理的休止期中期時 Id2 是顯著下降的，也就是說組織環境中存在的 BMP 也有可能影響到次級毛胚，但同時 Id3 則是顯著上升，Id3 的上升可能是 Notch 訊號回復後的一個負回饋，原因是 Id3 會與 TCF3 結合(72)，會直接抑制 Notch 下游 Hes1 的表現(73)，Id3 的上升有可能是防止 Hes1 過度表現。

根據以上的實驗結果，推測在游離輻射處理後的第 10 天已的狀態是有利於毛囊進入下一個生長期(圖 4.2)，包括毛囊自身的抑制訊號 FGF18 表現量下降、組織環境中的 BMP 可能減少及毛囊的幹細胞以及次級毛胚細胞相對處於較活化狀態等，可能是細胞間的訊息傳遞受到阻礙而無法順利傳遞，故需要一個調整期來讓細胞狀態回復，所以游離輻射後的 17 天更接近毛囊休止期轉換至生長期的時間點(圖 4.3)。

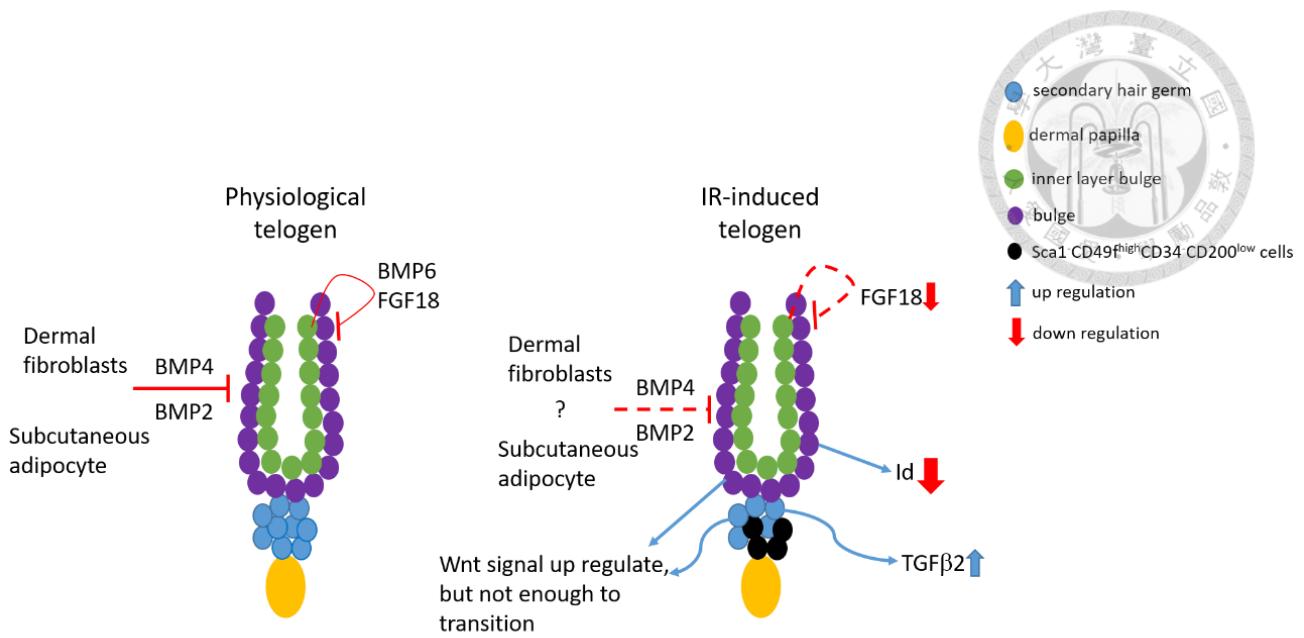


圖 4.2 輻射造成之休止期與正常生理休止期之比較

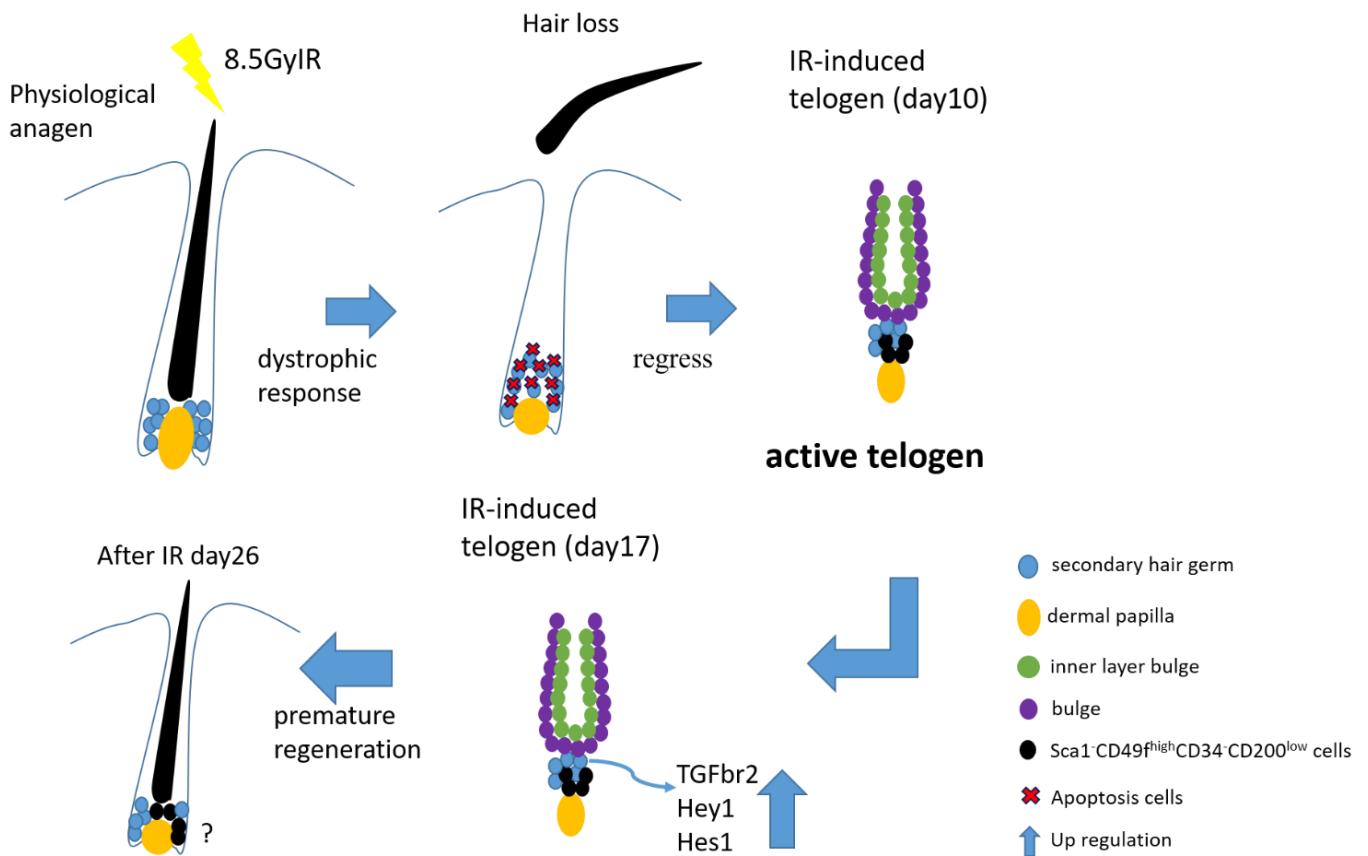


圖 4.3 小鼠生长期毛囊受到游離輻射傷害後造成落髮及加快生長週期示意圖



第五章結論

本篇利用 8.5Gy 鈀-137 伽瑪射線照射處於生長期的 C57BL/6 母鼠，建立以游離輻射導致毛囊引發萎縮性衰退期的路徑的動物模型，藉由此模型來探討萎縮性衰退期對毛囊帶來的傷害及提早進入下一個生長週期的因子。

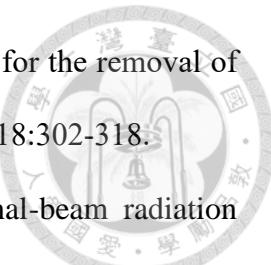
前半部份描述 8.5Gy 游離輻射對小鼠生長期之毛囊造成的傷害，在外觀上造成明顯落髮，在組織上發現毛囊快速萎縮，TUNEL 及 Cleaved caspase-3 之免疫螢光染色可以發現毛囊球細胞在接受輻射後的 24 小時內引起一個快速的凋亡，在 48 小時的免疫螢光照片可以發現毛囊球細胞已經大量流失，毛囊結構扭曲並開始往表皮方退縮，比較對照組正常生理的衰退期可以發現，在受傷急速的衰退狀態下，仍會出現一些共特徵，如 epithelial strand 或 tailing CTS 等結構，毛囊在快速萎縮的過程中原有的退縮機制可能有參與其中。接著探討毛囊在接受游離輻射後造成大量細胞凋亡的原因，在照射早期可以發現毛囊球細胞出現嚴重的 DNA 雙股斷裂，毛囊細胞在受傷後增生情形明顯受到抑制，毛囊在照射後 12 及 24 小時部分細胞有回復增生現象，可能是為了填補死亡細胞的位置促進增生。另一方面毛囊在受傷後 48 小時內出現 DNA 修復現象，毛囊細胞透過同源重組(HR)及非同源性末端接合(NHEJ)來修復斷裂的 DNA，但由於 8.5Gy 的輻射劑量對毛囊造成傷害大於修復的速度，導致毛囊最後退縮，短暫維持在休止期中。

在後半部分，我們發現毛囊在萎縮性衰退期所停留的時間比正常停留在休止期的時間短，實驗中採用細胞分選儀收集游離輻射處理及正常生理之休止期前期及中期的不同細胞群，當中我們發現在游離輻射處理後的休止期 CD49f^{high} 中 CD34 及 CD200 的細胞群分佈有所不同，次級毛胚的組成可能已經改變。在 qPCR 的結果中經游離輻射處理後的休止期 inner bulge 自身抑制進入生長期的信號降低。在 bulge 中發現其 Wnt 信號路徑下游基因表現量較正常生理的休止期高，而 BMP 的下游 Id 的表現量則也較低，毛囊外的環境可能受到游離輻射影響導致 BMP 的來源減少。在次級毛胚中可以發現經游離輻射處理後的休止期 Wnt 信號及其下游基因的表現量有顯著上升，另一方面 TGFβ2 的表現量也有顯著上升，說明細胞的狀態較為活躍，可是在游離輻射傷害導致的休止期，細胞的信號傳遞功能可能受到干擾，如 Notch 和 TGFβr2 等，所以毛囊需要一個短暫的時間進行調整，才可以進入下一個生長週期。

參考文獻



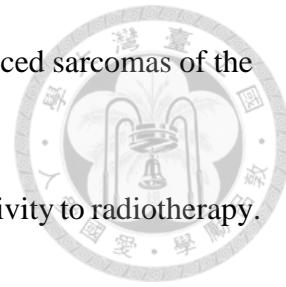
1. Balagamwala, E.H, et al., Introduction to Radiotherapy and Standard Teletherapy Techniques. *Dev Ophthalmol.* 2013;52:1-14.
2. Daryoush S.G, et al., A review on natural background radiation. *Adv Biomed Res.* 2013;30;2:65.
3. van Elmpt W, et al., Dual energy CT in radiotherapy: Current applications and future outlook. *Radiother Oncol.* 2016;119(1):137-44.
4. Fleta N. Bray, et al., Acute and Chronic Cutaneous Reactions to Ionizing Radiation Therapy. *Dermatol Ther (Heidelb).* 2016;6(2):185-206.
5. Catharine M West and Gillian C Barnett, Genetics and genomics of radiotherapy toxicity: towards prediction. *Genome Med.* 2011;23;3(8):52.
6. M. R. Schneider, et al., "The hair follicle as a dynamic miniorgan". *Curr Biol.* 2009;19(3):R132-42.
7. Osorio KM, et al., "Runx1 modulates developmental, but not injury-driven, hair follicle stem cell activation". *Development.* 2008;135(6):1059-68.
8. L. Alonso and E. Fuchs, The hair cycle. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 3):391-3.
9. Sven Müller-Röver, et al., A Comprehensive Guide for the Accurate Classification of Murine Hair Follicles in Distinct Hair Cycle Stages *J Invest Dermatol.* 2001;117(1):3-15.
10. Everts HB , Endogenous retinoids in the hair follicle and sebaceous gland. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821(1):222-9.
11. Dr Syed Yousuf Ali, et al., Cutaneous effects of radiotherapy- a review article. *Innovative Journal of Medical and Health Science.* 2014;341-349.

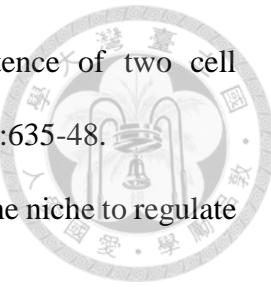


12. W. A. Pusey, Roentgen-rays in the treatment of skin diseases and for the removal of hair. *Journal of Cutaneous and Genitourinary Diseases*, vol. 1900;18:302-318.
13. X George Xu, et al., A review of dosimetry studies on external-beam radiation treatment with respect to second cancer induction. *Phys Med Biol.* 2008;53(13): R193-R241..
14. Mr RS Stubbs and SK Wickremesekera, Selective internal radiation therapy (SIRT): a new modality for treating patients with colorectal liver metastases. *HPB (Oxford)*. 2004;6(3):133-139.
15. Teh BS, et al., Intensity modulated radiation therapy (IMRT): a new promising technology in radiation oncology. *Teh BS1, Woo SY, Butler EB, Oncologist.* 1999;4(6):433-42.
16. Samant R. and Gooi AC., Radiotherapy basics for family physicians. Potent tool for symptom relief. *Can Fam Physician.* 2005;51:1496-501.
17. N. Carelle, et al., Changing patient perceptions of the side effects of cancer chemotherapy. *Cancer.* 2002;95(1):155-63.
18. Citrin D, et al., Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury. *Oncologist.* 2010;15(4):360-71.
19. Lipinski B. Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2011;809696:1-9
20. Hubenak JR, et al., Mechanisms of injury to normal tissue after radiotherapy: a review. *Plast Reconstr Surg.* 2014;133(1):49e-56e.
21. Huen MS, Chen J. The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Res.* 2008;18:8-16.

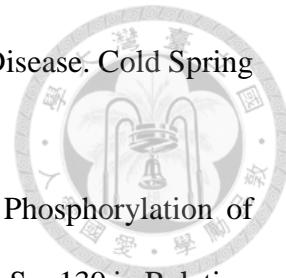
22. Kurose A, et al., Effects of Hydroxyurea and Aphidicolin on Phosphorylation of Ataxia Telangiectasia Mutated on Ser 1981 and Histone H2AX on Ser 139 in Relation to Cell Cycle Phase and Induction of Apoptosis. *Cytometry A*. 2006;69A:212-221.
23. Coates PJ, et al., Differential Contextual Responses of Normal Human Breast Epithelium to Ionizing Radiation in a Mouse Xenograft Model. *Cancer Res*. 2010;70:9808-9815.
24. G. Sulli, et al., Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(10):709-20.
25. M. F. Lavin, Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(10):759-69.
26. C. J. Lord and A. Ashworth, The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*. 2012;481(7381):287-94.
27. T. Helleday, E, et al., DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(3):193-204.
28. S. Postel-Vinay, et al., The potential of exploiting DNA-repair defects for optimizing lung cancer treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(3):144-55.
29. Zhiyong Mao, et al., DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells *Cell Cycle*. 2008; 7(18): 2902–2906.
30. Maria Jasin and Rodney Rothstein, Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(11):a012740.
31. Anthony J. Davis and David J. Chen, DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res*. 2013;2(3):130-143.

32. Anuradha Thiagarajan and N Gopalakrishna Iyer, Radiation-induced sarcomas of the head and neck. *World J Clin Oncol.* 2014;5(5):973-981.
33. Pawlik TM and Keyomarsi., Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;59(4):928-42.
34. Paus R, et al., Chemotherapy-induced alopecia in mice. Induction by cyclophosphamide, inhibition by cyclosporine A, and modulation by dexamethasone. *Am J Pathol.* 1994;144(4):719-34.
35. Sven Hendrix et al., A Guide to Assessing Damage Response Pathways of the Hair Follicle: Lessons From Cyclophosphamide-Induced Alopecia in Mice. *J Invest Dermatol.* 2005;125(1):42-51.
36. Paus R, et al., Pathobiology of chemotherapy-induced hair loss. *Lancet Oncol.* 2013;14(2):e50-9.
37. Genander M, et al., BMP signaling and its pSMAD1/5 target genes differentially regulate hair follicle stem cell lineages. *Cell Stem Cell.* 2014;15(5):619-33.
38. Chen G, et al., TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Int J Biol Sci.* 2012;8(2):272-88.
39. Festa E, et al., Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling. *Cell.* 2011;146(5):761-71.
40. Maksim V. Plikus, et al., Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration. *Nature.* 2008;451(7176):340–344.
41. Ya-Chieh Hsu, et al., Dynamics Between Stem Cells, Niche and Progeny in the Hair Follicle. *Cell.* 2011;144(1):92-105.
42. Geyfman M, et al., Resting no more: re-defining telogen, the maintenance stage of the hair growth cycle. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2015;90(4):1179-96

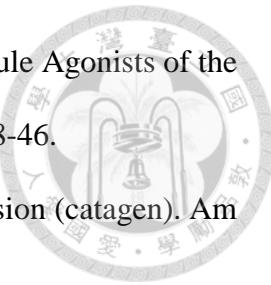




43. Blanpain C, et al., Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche, *Cell*. 2004;118(5):635-48.
44. Hsu YC. and Fuchs E., A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(2):103-14.
45. Stenn KS, et al., Hair follicle growth controls. *Dermatol Clin*. 1996;14(4):543-58.
46. Peus D. and Pittelkow MR., Growth factors in hair organ development and the hair growth cycle. *Dermatol Clin*. 1996;14(4):559-72.
47. Lindner G, et al. Involvement of hepatocyte growth factor/scatter factor and met receptor signaling in hair follicle morphogenesis and cycling. *FASEB J*. 2000 ;14(2):319-32.
48. Yoon SY, et al., A role of placental growth factor in hair growth. *J Dermatol Sci*. 2014;74(2):125-34.
49. Tao Tong, et al., Topical Application of Oleuropein Induces Anagen Hair Growth in Telogen Mouse Skin. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129578.
50. Greco V, et al., A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. *Cell Stem Cell*. 2009;4(2):155-69.
51. Plikus MV, et al., Analyses of regenerative wave patterns in adult hair follicle populations reveal macro-environmental regulation of stem cell activity. *Int J Dev Biol*. 2009;53(5-6):857-68.
52. Susan Elmore. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4): 495-516.
53. Porter AG and Jänicke RU, Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999;6(2):99-104.



54. David R. McIlwain, et al., Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a008656.
55. Kurose A, et al., Effects of Hydroxyurea and Aphidicolin on Phosphorylation of Ataxia Telangiectasia Mutated on Ser 1981 and Histone H2AX on Ser 139 in Relation to Cell Cycle Phase and Induction of Apoptosis. *Cytometry A.* 2006; 69A:212-221.
56. Rogakou EP, et al., DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 1998;273:5858-68.
57. Julien Vignard, et al., Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: A direct and indirect lighting up. *Radiother Oncol.* 2013;108(3):362-9.
58. Nowak JA. and Fuchs E., Isolation and Culture of Epithelial Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 2009;482:215-32.
59. Chiung-Ying Chang, et al., NFIB is a governor of epithelial–melanocyte stem cell behaviour in a shared niche. *Nature.* 2013; 495(7439): 98–102.
60. Yeon Sook Choi, et al., Distinct functions for Wnt/β-catenin in hair follicle stem cell proliferation and survival and interfollicular epidermal homeostasis. *Cell Stem Cell.* 2013;13(6):720-733.
61. Naoki Oshimori and Elaine Fuchs., Paracrine TGF-β Signaling Counterbalances BMP-Mediated Repression in Hair Follicle Stem Cell Activation., *Cell Stem Cell.* 2012;10:63-75
62. VanDussen KL, et al., Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development.* 2012;139(3):488-97.
63. Grottek B, et al., Notch signaling coordinates cellular proliferation with differentiation during zebrafish fin regeneration. *Development.* 2013;140(7):1412-23.
64. Sennett R. and Rendl M., Mesenchymal–epithelial interactions during hair follicle morphogenesis and cycling. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23(8):917-27.



65. Paladini RD, et al., Modulation of Hair Growth with Small Molecule Agonists of the Hedgehog Signaling Pathway. *J Invest Dermatol.* 2005;125(4):638-46.
66. G. Lindner, et al., Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol.* 1997;151(6):1601-1617.
67. Lasorella A, et al., The ID proteins: master regulators of cancer stem cells and tumour aggressiveness. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(2):77-91.
68. Niola F, et al., Id proteins synchronize stemness and anchorage to the niche of neural stem cells. *Nat Cell Biol.* 2012;14(5):477-87
69. Peters F, et al., Ceramide Synthase 4 Regulates Stem Cell Homeostasis and Hair Follicle Cycling. *J Invest Dermatol.* 2015;135(6):1501-9.
70. Lai EC, Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development.* 2004;131(5):965-73.
71. Powell BC, et al., The Notch signalling pathway in hair growth. *Mechanisms of Development.* 1998;78(1-2):189-92.
72. Langlands K, et al., Differential interactions of Id proteins with basic-helix-loop-helix transcription factors. *J Biol Chem.* 1997;272(32):19785-93.
73. Tomokatsu Ikawa, et al., E proteins and Notch signaling cooperate to promote T cell lineage specification and commitment. *J Exp Med.* 2006;203(5):1329-1342.