

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

探討飛梭雷射誘導毛囊再生之機轉

The Key Mechanism of Early Anagen Entry Induced

by Farxel Laser

黃銘新

Ming-Sin Huang

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



# 口試委員審定書



## 國立臺灣大學碩士學位論文 口試委員會審定書

### 探討飛梭雷射誘導毛囊再生之機轉 The Key Mechanism of Early Anagen Entry Induced by Farxel Laser

本論文係黃銘新君（學號 R04548002）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 頌 然

（指導教授）

陳志強

林銘新

所長：

陳 中 明

## 誌謝



兩年的碩士班生活轉瞬即逝，回想當初我懷著疑惑與忐忑的心情就讀醫工系，然後推甄考取醫工所，就連會來到丁組也是因為自己的疏忽大意，太晚去找最初報考的甲組老師的緣故。

即使已有初步的醫學工程相關訓練與知識，但不論是組織再生或毛囊相關的研究，對大學時期專題研究高分子材料的我來說，都是全新、陌生的領域。

所幸，實驗室的大家都非常親切，不吝於教導相關的知識、不厭於回答與討論我所提出的基礎問題，讓我能從零開始，一點一滴、步步累積知識和實驗能力。

回首整個過程，要感謝的人實在太多，單是謝天都尚不足以言謝。感謝台大醫工所的同儕們以及大學時期的好友們，這段時間一起舉辦、參與的種種活動，讓我認識了許多有趣的人、也讓我過了一個與大學前截然不同、精彩豐富的學校生活，不會只有實驗、實驗、與實驗；感謝我的指導老師 林頌然老師，一路上指導我實驗的方上並給予諸多建議，使我能夠由淺入深，在未知領域探索的同時也能逐漸收割成果。更重要的是打造了這良好的實驗環境，幫助我能順利地完成許多艱難的挑戰。同時也要感謝王修含醫生在實驗器材提供的莫大協助，若是沒有您總是撥空在下班後陪著我做實驗，實驗的時間和費用恐怕會變得相當驚人。真的非常謝謝您們兩位！

特別特別要感謝實驗室的夥伴們，在實驗閒暇之餘，會一起約電影團、運動團、吃飯聊天喝酒團，等等族繁不及備載，增添了许多研究生生活的樂趣。當然，對於我實驗方向與成果的幫助更是讓我感激。感謝博士班的學長姐，岳峰學長在我初踏入實驗室時帶我認識實驗室的環境，並且帶我熟悉我的實驗架構；感謝群凱學長帶我做了許許多多細部的實驗操作，也在類似的主題上有許多值得我深思的討論；感謝維宏、邁儀、志龍學長那經過時日累積、充滿智慧與經驗的建言，讓我在實驗方向與目標訴求還有許多問題時，循循善誘，省去無謂的實驗，找尋並解決問題的癥結，讓我能慢慢地真正解、完善自己的實驗。

最後我要感謝我們家人們，雖然因為實驗的關係越來越少回去，但依然會不時打電話來關心我的近況、每每回去時也會準備豐盛的大餐。這一路上的支持讓我能夠在實驗之間的空檔充分放鬆。

隨著碩士班生活逐漸落幕，往後在社會上會遇到的挑戰與挫折恐怕只會更多。雖然未來會投身的領域以及現在的所知所學是否會對下一階段產生幫助，仍充滿未知數，但我相信在這間實驗室、這兩年來學到的「實事求是」的科學求知態度、解決問題的精神以及與他人的聯繫，不論我將來如何選擇，都一定能成為我的助力，幫助我在之後的路程上勇於面對挑戰、不餒於挫折！也祝福大家未來在工作與生活上都能事事順心、鵬程萬里！

黃銘新 2017.08

## 中文摘要

毛囊具有替人體屏障外界傷害與保溫保濕等複雜且多樣化的功能，是為人體中最重要的器官之一。它是一個擁有高度自我調控能力的微小器官，具有毛囊幹細胞與自己的生長週期，其形態也會隨著生長周期而有所變化。因此毛囊本身的生理調控與受刺激後產生的後續反應和修復機制、和環境間的溝通，都已成為再生醫學研究探討重要領域。毛囊在休止期時會受到許多不同的引發因子激發，從而進入生長期，例如傷口、化學物質、光照，等等。熟悉這些因子也被視為能夠掌握促進毛髮生長的關鍵鑰匙。本研究的目標希冀能探索毛囊感受到外界的微小刺激後活化、從休止期提前進入生長狀態的生長期之背後機轉。

我們先前的研究已指出第二代飛梭雷射 Fraxel SR1500 造成的刺激能引誘毛囊提前進入生長期。本研究遂以此作皮膚刺激物，調整能量後，以不會在皮膚留下疤痕的能量，引發接觸性刺激性皮膚炎，刺激毛囊進入生長期。本研究發現，經過刺激之後將引發 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等發炎因子與 VEGF 家族、PDGF 等生長因子表現，並引起嗜中性白血球與巨噬細胞等免疫細胞大量進浸潤囊周圍的區域，同時促使巨噬細胞活化為 M1 與 M2 型。

在經由 TNF- $\alpha$  基因剔除鼠、注射 Avastin 與 Zaltrap 抑制 VEGFs、施打 Ly6G 抗體耗竭嗜中性球以及皮下注射 Clodrosme 使巨噬細胞凋亡後，發現 VEGFA、巨噬細胞和其高度分泌的 PIGF 在本雷射刺激誘發毛囊提前進入生長期的實驗中具有促進生長期的效果，也在毛囊上看到這些因子的受器有高表現。

簡言之，本研究確立了一個小鼠皮膚在接受飛梭雷射以一定能量刺激後，能不導致疤痕且促進 VEGFA 提高、巨噬細胞分泌 PIGF，進而使 VEGFA 與 PIGF 協同作用使休止期毛囊進入生長期的實驗模型。

**關鍵字：**毛囊幹細胞、飛梭雷射、刺激性接觸性皮膚炎、巨噬細胞、VEGF、PIGF、VEGFR、Avastin、Zaltrap、Clodrosome

## ABSTRACT



Hair follicle, one of the most important organ in human, is able to keep us warm, moisture and from external injury, which is a miniorgan with high self-regulation ability, an unique lifecycle and fueled by its resident stem cells. Their structure also vary with hair cycle. Thus, the issue about how hair follicle does self-regulation, reacts and repairs itself after injury for physiological growth, communicates with niche microenvironment are worth exploring in regenerative medicine feilds. Follicle will activated by several different initiators in telogen and then enter anagen phase, including chemicals, light, and wound, and these factors are thought to be the key to promote hair growth. This study is aimed at exploring how microenvironment transformed after miniwound, how follicle stem cells reacted to this change and activated, and finally regenerated from telogen to anagen. We used Fraxel SR1500 as irritant to induce irritant contact dermatitis without scarring during telogen phase afetr ajusting energy settings. We found that inflammatory or growth factors like TNF- $\alpha$ , IL-1, VEGF family, and PDGF incresed after injury, as well as numerous immune cells infiltrated to the injured area, including neutrophils and macropages activated to M1 or M2 type. We then found that VEGFA, macrophages and PIGF secreted mainly from macropahges may promote early anagen entry by laser according to experiment results depleting TNF- $\alpha$  by transgenic mice, VEGF family by Avastin and Zaltrap, neutrophils by Ly6G antibody, and macrophages by Clodrosome. Our findings indicated that VEGFA increased after Fraxel laser injury and macrophages recuited to wound area followed by secreting PIGF to co-work with VEGFA to incude early anagen entry via VEGFR2 on follicle.

**Keywords : Hair follicle stem cells, Fraxel laser, Irritant contact dermatitis, Macrophages, VEGF, PIGF, VEGFR, Avastin, Zaltrap, Clodrosome**

# 目錄



口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iv
ABSTRACT.....	v
圖目錄.....	ix
表目錄.....	xii
<b>第一章、緒論.....</b>	<b>1</b>
1.1    皮膚結構概述.....	1
1.2    毛囊結構與毛囊生長週期概述.....	4
1.3    雷射在皮膚科相關應用.....	7
1.3.1    雷射治療原理與治療落髮.....	7
1.3.2    皮膚治療常用之雷射療法.....	9
1.3.3    飛梭雷射.....	11
1.3.4    1550 奈米點陣鈮玻璃雷射.....	13
1.4    傷口癒合與毛囊新生.....	14
1.4.1    傷口.....	14
1.4.2    傷口癒合過程.....	15
1.4.3    免疫細胞.....	16
1.4.4    血管內皮生長因子.....	17
1.5    飛梭雷射誘導毛囊提前由休止期進入生長期.....	18
1.6    研究動機與目標.....	20

<b>第二章、實驗材料與方法</b>	<b>21</b>
2.1 建立雷射微傷口刺激皮膚炎之實驗動物模型	21
2.1.1 實驗動物	21
2.1.2 飛梭雷射	21
2.1.3 實驗設計概念	23
2.2 採樣方式	23
2.3 蘇木精 & 伊紅染色	24
2.4 免疫螢光染色	25
2.5 RNA 萃取 與 cDNA 合成	28
2.6 聚合酶連鎖反應	30
2.7 即時定量聚合酶連鎖反應	31
2.8 免疫細胞耗竭與細胞激素抑制劑	32
2.8.1 嗜中性白血球耗竭	32
2.8.2 TNF- $\alpha$ 表現抑制	32
2.8.3 巨噬細胞耗竭	33
2.8.4 血管內皮生長因子 (VEGF) 抑制	34
2.8.5 受體酪氨酸激酶 (RTKs) 路徑抑制	34
2.9 細胞分選	35
<b>第三章、實驗結果</b>	<b>36</b>
3.1 確立雷射傷口促進毛囊再生之 C57BL/6 小鼠實驗模型	36
3.2 探討雷射微傷口對皮膚組織結構之影響	37
3.2.1 皮膚變化	38
3.2.2 毛囊變化	38
3.3 探討雷射微傷口對毛囊幹細胞之影響	41
3.3.1 雷射刺激誘導毛囊幹細胞增生	41



3.3.2	雷射刺激誘導次級毛胚增生.....	43
3.3.3	雷射刺激誘導毛囊由休止期進入生長期 .....	44
3.3.4	雷射刺激對皮膚細胞之細胞週期影響差異 .....	45
3.4	外因性與內因性控制因素 .....	48
3.5	探討雷射刺激誘發發炎與免疫浸潤之情形.....	50
3.5.1	發炎與免疫浸潤現象 .....	50
3.5.2	腫瘤壞死因子- $\alpha$ 表現狀況 .....	51
3.5.3	白血球介素 1 族表現狀況.....	52
3.5.4	血管內皮生長因子家族表現狀況 .....	54
3.5.5	血小板衍生生長因子表現狀況.....	56
3.5.6	嗜中性球表現狀況 .....	57
3.5.7	巨噬細胞表現狀況 .....	59
3.6	探討發炎相關因子與細胞抑制對雷射刺激促使毛囊生長之影響.....	61
3.6.1	腫瘤壞死因子- $\alpha$ 抑制對雷射促毛髮生長反應之影響.....	61
3.6.2	VEGF 抑制對雷射促毛髮生長反應之影響 .....	64
3.6.3	嗜中性白血球耗竭對雷射促毛髮生長反應之影響.....	67
3.6.4	巨噬細胞耗竭對雷射促毛髮生長反應之影響.....	70
3.6.5	巨噬細胞抑制對毛囊幹細胞動態之影響 .....	73
3.7	探討巨噬細胞在微傷口促進毛囊再生現象中扮演之角色 .....	75
3.7.1	巨噬細胞活化類型 .....	75
3.7.2	巨噬細胞與發炎、生長相關因子之聯繫 .....	77
3.8	探討發炎與生長相關因子對毛囊之影響 .....	82
<b>第四章、討論 .....</b>		<b>85</b>
<b>第五章、結論 .....</b>		<b>96</b>
<b>第六章、參考文獻.....</b>		<b>98</b>

## 圖目錄



圖 1.1 皮膚結構 .....	1
圖 1.2 毛囊結構 .....	5
圖 1.3 毛囊生長週期 .....	6
圖 1.4 實驗 C57BL/6 母鼠毛囊生長週期 .....	6
圖 1.5 不同雷射於皮膚治療之效果 .....	13
圖 1.6 血管內皮生長因子家族與接受器 .....	18
圖 1.7 雷射能量強度和密與提前進入生長期區域之關係 .....	19
圖 2.1 第二代飛梭雷射控制面板 .....	22
圖 2.2 第二代飛梭雷射儀器、探頭與操作方法 .....	22
圖 2.3 取樣時間 .....	23
圖 3.1 雷射光束 15mJ X 1048MTZ 對毛髮週期之影響 第 .....	36
圖 3.2 受雷射刺激組與控制之部分天數 H&E 比較圖 .....	37
圖 3.3 未受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 H&E 圖 .....	39
圖 3.4 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 H&E 圖 .....	39
圖 3.5 受雷射刺激與對照組之 C57BL/6 小鼠兩側表皮厚度定量 .....	40
圖 3.6 受雷射刺激與對照組之 C57BL/6 小鼠兩側毛囊長度定量 .....	40
圖 3.7 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚毛囊 K15 與 BrdU 染色圖 .....	42
圖 3.8 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠 兩側皮膚 P-cadherin 與 BrdU 染色圖 .....	43
圖 3.9 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 Lef1 與染色圖 .....	44
圖 3.10 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 Ki67 與 BrdU 染色圖 .....	46
圖 3.11 受雷射刺激之小鼠表皮、Isthmus、真皮之 Ki67 表現與時間關係 .....	47
圖 3.12 受雷射刺激之小鼠表皮、Isthmus、真皮之 BrdU 表現與時間關係 .....	47
圖 3.13 受傷區域與毛囊占整體之百分比 .....	49

圖 3.14 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠 Day1 時兩側皮膚之 H&E 染色圖.....	50
圖 3.15 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚 TNF- $\alpha$ 之 mRNA 表現量.....	51
圖 3.16 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚之 TNF- $\alpha$ 螢光染色圖.....	52
圖 3.17 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚 IL-1 $\beta$ 之 mRNA 表現量.....	53
圖 3.18 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚 IL-1R 之 mRNA 表現量.....	53
圖 3.19 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚 VEGFs 之 mRNA 表現量.....	55
圖 3.20 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚之 VEGFA 螢光染色圖.....	55
圖 3.21 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚 PIGF 之 mRNA 表現量.....	56
圖 3.22 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚 PDGF 之 mRNA 表現量.....	57
圖 3.23 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 Ly6G 表現圖.....	58
圖 3.24 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚之 Ly6G mRNA 表現量圖.....	58
圖 3.25 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 F4/80 表現圖.....	60
圖 3.26 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 F4/80 mRNA 表現圖.....	60
圖 3.27 受雷射刺激之 TNF- $\alpha$ -/- 小鼠與 C57BL/6 小鼠外觀比較.....	62
圖 3.28 受雷射刺激之 TNF- $\alpha$ -/- 小鼠與兩側皮膚 H&E 染色.....	62
圖 3.29 受雷射刺激之 TNF- $\alpha$ -/- 與 C57BL/6 小鼠免疫浸潤現象比較.....	63
圖 3.30 受雷射刺激之 VEGF 抑制小鼠與 C57BL/6 小鼠外觀比較.....	65
圖 3.31 受雷射刺激並抑制 VEGF 後 Day1 時小鼠皮膚 VEGFA 比較圖.....	66
圖 3.32 受雷射刺激並抑制 VEGF 後 Day1 時小鼠皮膚 VEGFA 定量圖.....	66
圖 3.33 受雷射刺激並抑制 VEGF 後毛囊生長狀況與時間之關係.....	67
圖 3.34 嗜中性球抑制對雷射誘導進入生長期之影響.....	68
圖 3.35 嗜中性球抑制後受雷射刺激之小鼠兩側皮膚 H&E 染色圖.....	69
圖 3.36 受雷射刺激並抑制 Neutrophil 後 Day1 時小鼠皮膚 Ly6G 比較圖.....	69
圖 3.37 巨噬細胞抑制對雷射誘導進入生長期之影響.....	70
圖 3.38 巨噬細胞抑制後受雷射刺激之小鼠兩側皮膚 H&E.....	71

圖 3.39 施打 Clodrosome 後受雷射刺激之小鼠皮膚 Day21 H&E 染色圖 .....	72
圖 3.40 巨噬細胞抑制後受雷射刺激之小鼠兩側皮膚 F480 螢光染色圖 .....	72
圖 3.41 施打 Clodrosome 後受雷射刺激之小鼠皮膚 Ki67 與 BrdU 雙染圖 .....	74
圖 3.42 施打 Clodrosome 後未受影響之部分皮膚 Ki67 與 BrdU 雙染圖 .....	74
圖 3.43 施打 Clodrosome 後受雷射刺激之小鼠皮膚 D21 之 Ki67 與 BrdU.....	75
圖 3.44 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 iNOS mRNA 表現.....	76
圖 3.45 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 Arg1 mRNA 表現量 .....	77
圖 3.46 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚巨噬細胞 iNOS 與 Arg1 mRNA 表現量 .....	78
圖 3.47 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚巨噬細胞 TNF- $\alpha$ 之 mRNA 表現量 .....	79
圖 3.48 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚巨噬細胞 PDGF 之 mRNA 表現量 .....	79
圖 3.49 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚巨噬細胞 VEGFs 之 mRNA 表現量 .....	80
圖 3.50 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚巨噬細胞 PlGF 之 mRNA 表現量 .....	81
圖 3.51 受雷射刺激之小鼠兩側毛囊細胞 VEGFR1 之 mRNA 表現量 .....	83
圖 3.52 受雷射刺激之小鼠兩側毛囊細胞 VEGFR2 之 mRNA 表現量 .....	83
圖 3.53 受雷射刺激之小鼠兩側毛囊細胞 Nrpl 之 mRNA 表現量 .....	84
圖 3.54 受雷射刺激之小鼠兩側毛囊細胞 Nrpl 之 mRNA 表現量 .....	84
圖 4.1 經 Sutent 處理後受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠毛囊生長情況 .....	91
圖 4.2 經 Sutent 處理後受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠皮膚 H&E 染色圖 .....	91
圖 4.3 經 Sutent 處理後受雷射刺激之 C57BL/6 鼠皮膚 Ly6G 之 Day1 染色 ..	92
圖 4.4 不同處理後受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠觀察至 Day28 毛囊生長情況 ...	92
圖 4.5 經 Sutent 處理後受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠皮膚 BrdU 染色 .....	93
圖 4.6 經 Sutent 處理後受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠皮膚 BrdU & Ki67 染色 ..	93
圖 4.7 不同處理後受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠之 Lef1 染色 .....	94
圖 4.8 受 15mJ X 1048 MTZ 飛梭雷射刺激之小鼠促毛囊生長之可能機轉 .....	95

## 表目錄



表 1.1 皮膚結構 .....	3
表 1.2 常見用於皮膚治療之雷射概述 .....	10
表 1.3 飛梭雷射之類型概述 .....	12
表 2.1 抗體表 .....	27
表 2.2 即時定量聚合酶連鎖反應 (qPCR) 所需材料 .....	31
表 2.3 即時定量聚合酶連鎖反應 (qPCR) 所使用之引子 .....	32

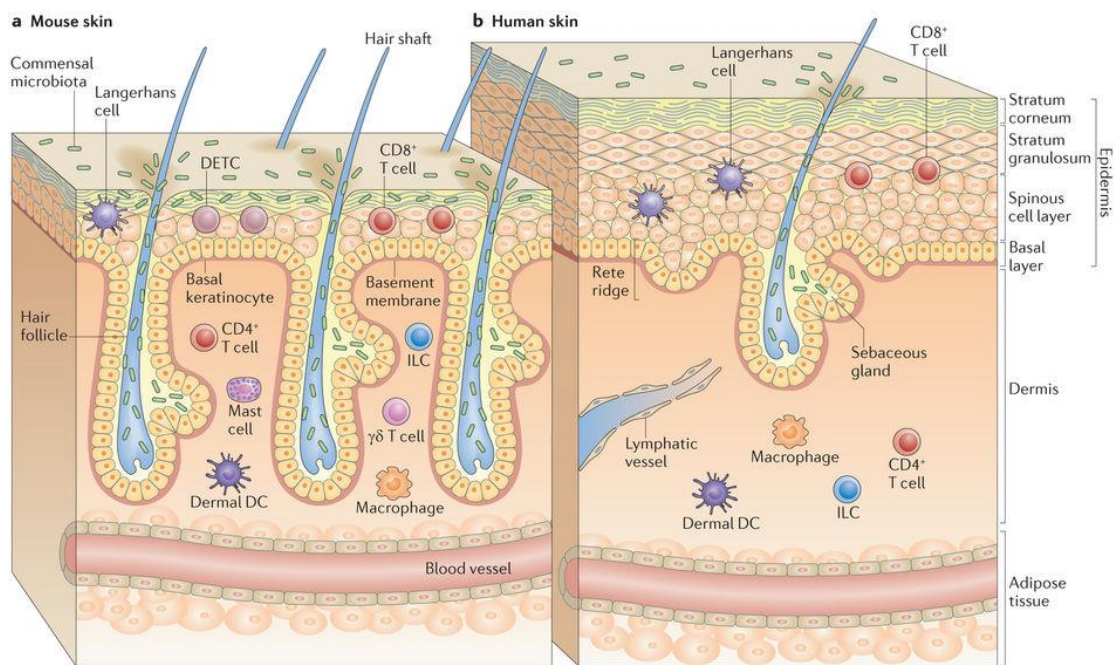
# 第一章、緒論



## 1.1 皮膚結構概述

皮膚是人體中最重要的器官之一，具有許多與維持、保護人體生命現象與安全相關的重要功能。主要分為保護作用、體溫調節、知覺反應、免疫反應、吸收作用、合成作用與分泌作用。皮膚主要分為表皮層(Epidermis)、真皮層(Dermis)和皮下脂肪組織層(Hypodermis, Subcutaneous Tissue)三層以及附屬器官如皮脂腺、汗腺、豎毛肌、毛囊等(圖 1.1)(1, 2, 3)。

另外，皮膚中也存在許多兼具防禦外來物、維持皮膚功能恆定性之能力，以及在傷口修復與傷口癒合中扮演重要角色的細胞，例如 Langerhans Cells、Dendritic Epidermal T Cells、 $\gamma\delta$  T Cells、Skin-Resident Macrophages 等(4, 5, 6, 7)。茲概述如下(表 1.1)：



Nature Reviews | Immunology

圖 1.1 皮膚結構 (2)

表皮層	
表皮層的細胞多由基底層細胞分裂分化而來。主要是屏障作用、阻絕外來的傷害，如紫外線、有害微生物、化學物質等侵入並防止體液的流失。	
角質層	由 10~20 層扁平死細胞所組成，此時的細胞其細胞膜變厚，細胞核及胞器消失。
透明層	約由 2~3 層透明而扁平的死細胞組成，無核和胞器，主要含有油粒蛋白(eleidin)，此層只出現在手掌及腳掌，未存在所有皮膚中。
顆粒層	細胞內含許多大小不一，形狀不規則的顆粒而得名。約由 2~4 層的角質細胞組成，細胞形狀變成扁平狀，且細胞核及胞器開始退化萎縮，形成大量透明角質(keratohyaline)顆粒，細胞開始死亡。
棘狀層	為表皮當中最厚的一層，約由 4~8 層細胞組成。因角質細胞由圓柱形（下層）變成多角形（上層），故稱為棘狀層。
基底層	主要是由一層圓柱形角質細胞所構成。屬於未分化細胞，大部分會持續不斷地分裂，產生出新的細胞，細胞一半會留在基底層，一半會逐漸向皮膚表層移動，並進行角質化作用。
其他細胞	<p>黑色素細胞(Melanocytes)：</p> <p>位於表皮的基底層間，提供細胞黑色素抵擋紫外線曝曬傷害。</p> <p>蘭格罕細胞(Langerhans Cells)：</p> <p>抗原呈現細胞(antigen presenting cell, APC)，分佈在表皮各層，棘狀層中最常見；在真皮層血管周圍也可見。屬於免疫系統的一部份，具偵測外來異物(病源)功能。</p> <p>墨克細胞(Merkel's cell)：觸覺受器</p>
真皮層	
真皮層在表皮層的下層，是皮膚組織中最厚的部分，含有汗腺、皮脂腺、毛細血管、淋巴管和神經。皮膚厚度以眼瞼部位最薄，而背部、手掌、腳掌最厚。	

其結構可分為乳頭層及網狀層。	
其中的結締組織可分為三類：膠原蛋白纖維(collagen fibers)，網狀纖維(reticular fiber)，及彈性纖維(elastic fiber)	
乳頭層	疏鬆結締組織。由薄而疏鬆的膠原纖維等結締組織所構成，含有對觸覺敏感的神經末梢－梅斯納氏小體(Meissner's corpuscles)。
網狀層	決定皮膚厚度的主要膚層，主要由粗壯平行的膠原纖維支持其架構。而交織於膠原纖維之間的彈力纖維，則使組織成網狀結構並具彈性。含有許多皮膚的附屬器官。
<b>皮下組織</b>	
皮下組織包括大量的脂肪細胞及較深部的血管、淋巴管與神經脂肪組織提供物理性的保溫作用與對外力的緩衝作用	
<b>附屬器官：</b> 皮脂腺、汗腺、毛囊、豎毛肌、指甲，等	

表 1.1 皮膚結構 (4, 5, 6, 7)



## 1.2 毛囊結構與毛囊生長週期概述

毛囊是毛髮的基本單位，毛髮便是由毛囊內的細胞分化生長而成。毛囊幹細胞位於毛囊中，具有自我更新 (Self-renewal) 和細胞分化 (Differentiation) 的工作，以利於維持生理的恆定性。因此，毛囊成為一個微小但具備自我恆定功能的單位，且毛囊的結構會隨著毛囊生長周期的變化而有所不同 (8, 9)。

毛囊為多層同心圓結構，由不同分化程度的角質細胞和間質細胞所組成。由外到內分別為結締組織 (Connective Tissue Sheath, CTS)、外根鞘 (Outer Root Sheath, ORS)、內根鞘 (Inner Root Sheath, IRS)、髮幹 (Hair Shaft) (圖 1.2) (9)。

在生長期的毛囊會有被稱為毛囊球 (Hair Bulb) 的膨大結構，其中包覆一群被稱為真皮乳突細胞 (Dermal Papilla, DP) 的纖維母細胞，以及基質細胞 (Matrix)。毛囊的上方有由表皮細胞特化而成的皮脂腺，另外在外根鞘有一名為 Bulge 的鼓起結構，內含毛囊幹細胞，為長期存在毛囊內的重要結構。真皮乳突細胞在毛囊發育時能刺激表皮細胞增生、誘導表皮分化並形成毛囊。在毛囊形成後真皮乳突細胞會隨著毛囊週期分泌不同細胞包激素與生長因子來調控基質細胞增生，促進毛囊生長與發育 (9)。

進入衰退期後，毛囊球的結構裡的細胞會開始細胞凋亡 (Apoptosis)，毛囊球構造開始萎縮，整根毛囊也跟著向上縮短，漸漸進入休止期狀態 (9)。

休止期時，真皮乳突細胞位於真皮的位置，而毛囊幹細胞則進入休止睡眠的狀態，細胞此時將暫時不會增生，而毛髮也不會增長，直到毛囊幹細胞活化，再次進入生長期為止 (9)。

毛囊的結構會隨著毛囊週期的變化而進行周而復始的循環，當然，毛髮的長度不會無限制生長，其長度與生長有自己的生長週期，具備調控能力 (9)。

此機制以人體為例，即是當毛髮結束一生長週期並往下個循環邁進時，毛囊會長出第二根新的毛髮，而原有的毛髮會自然脫落，遂維持毛囊生長的恆定 (9)。

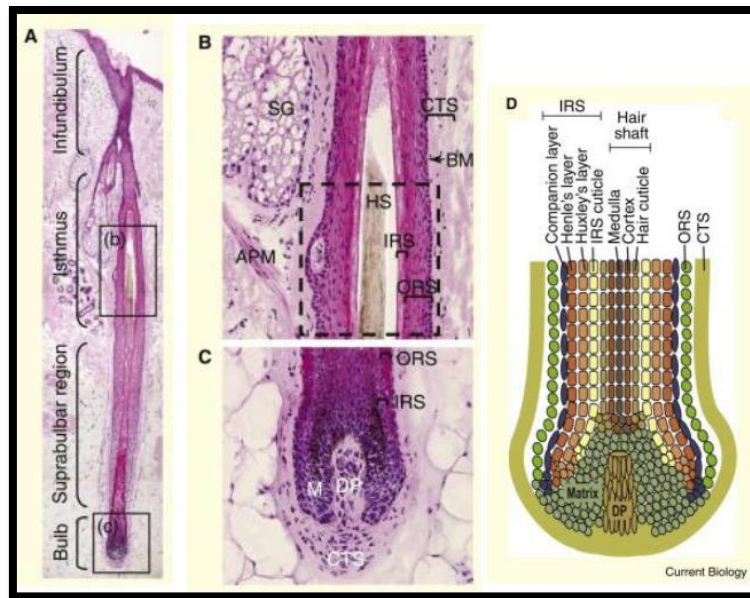


圖 1.2 毛囊結構 (9)

毛囊的生長週期可分為三個階段，分別是毛囊生長期 (Anagen)、毛囊退化期 (Catagen)、毛囊休止期 (Telogen) (圖 1.3)。當毛囊從休止期開始進入生長期時，毛囊幹細胞 (Bulge Stem Cells) 和次級毛胚 (Secondary Hair Germ) 細胞開始活化並大量增生，往皮下組織的方向逐漸生長。通常以毛囊幹細胞與次級毛胚細胞開始增生做為進入生長期第一期的指標。生長期主要為毛囊球的構成與毛髮增生為主。此時期主要分為六期，分別為 Anagen I 到 Anagen VI，其中 Anagen III 又分為 IIIa、IIIb 和 IIIc。在 Anagen VI 時，毛囊球生成、毛髮逐漸生長，髮幹往上突破表皮。生長期後期時，毛囊幹細胞已不再繼續維持細胞增生的狀態，而細胞增生的位置主要位於毛囊球中的基質 (Matrix) 部分。當由生長期轉變進入衰退期時，毛囊球中的基質細胞開始進行細胞凋亡，逐漸衰退死亡。一般研究中若 TUNEL 在毛囊球中有超過兩顆細胞表現，則是為進入衰退期第一期；若超過四顆表現則進入第三期衰退期。衰退期主要有八期，在此階段毛囊球結構會開始凋亡，並逐漸萎縮退化而進入休止期，重新開始新的循環，以維持毛髮生長之恆定性 (10, 11, 12)。

## Hair Cycle

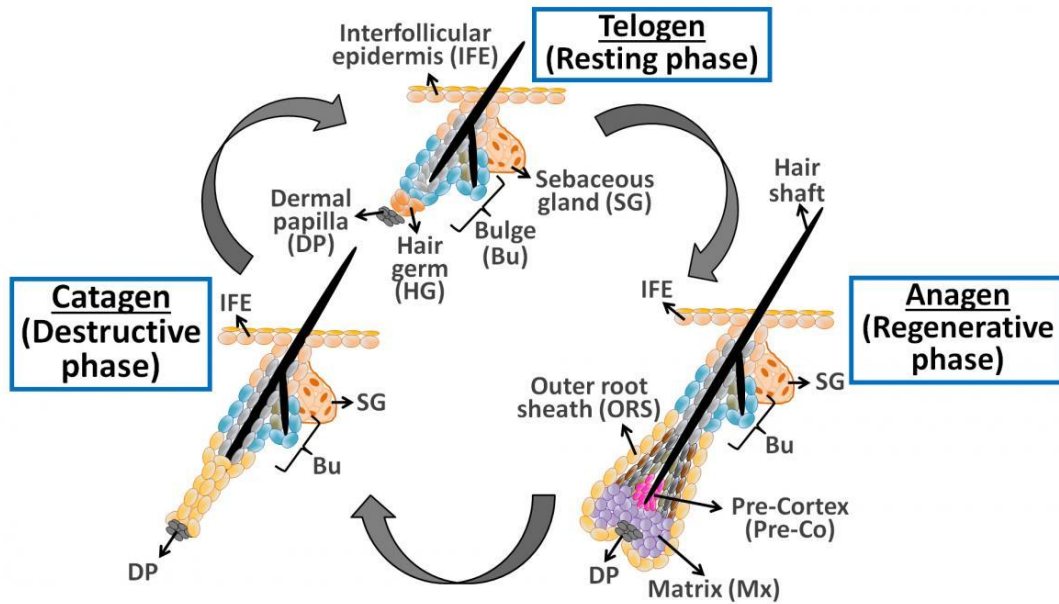


圖 1.3 毛囊生長週期 (12)

實驗常用的 C57BL/6 母鼠在出生後兩周會進入第一次衰退期，為期約一週後進入衰退期，並在一週後（出生後第四週）進入第一次生長期，持續兩週後結束第一次毛囊生長週期，再次進入衰退期。一般而言，第一次休止期通常為數天至一週；第二休止期則通常超過三周。每增加一個週期的休止期將持續擴大，毛囊循環中衰老的動物會顯著降低（圖 1.4）（10）。

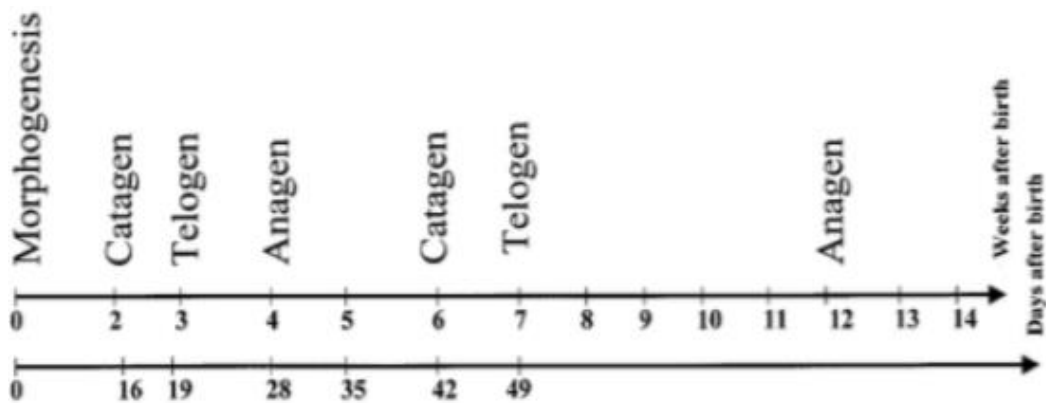


圖 1.4 實驗 C57BL/6 母鼠毛囊生長週期 (10)

## 1.3 雷射與在皮膚科相關應用

### 1.3.1 雷射治療原理與治療落髮

皮膚有三種稱為「載色體」(chromophore) 的雷射作用的目標：黑色素、氧合血紅素，與水分子。每種標的物各有合適的吸收波長，故可選擇相對應雷射來將它們破壞。皮膚的各種構造具有不同的「熱緩解時間」(thermal relaxation time)，亦即組織吸收能量昇溫後，在未傳導熱量至鄰近組織的情況下，90%的組織立即降溫至最高溫度一半所需之時間，此時間約與組織直徑平方成正比。標的物暴露於雷射光束的時間稱為「脈衝寬度」(Pulse Duration)。每單位面積接受的雷射能量稱為「能量密度」(Fluence)。若以特定波長，能量密度充足的雷射光束，以小於或等於標的物「熱緩解時間」的「脈衝寬度」照射皮膚，則可選擇性地以熱能分解標的物，但不使這些熱能釋放至周圍組織，減少非必要的傷害，此即「選擇性光熱分解」(Selective Photothermolysis)的治療原理 (13)。

傳統的藥物治療往往會伴隨著副作用而植髮手術是侵入性手術，具有一定的風險，且價錢上也是備受考量的原因。近年來雷射與光源療法開始流行，一些使用低能量光束的產品已在市場上銷售，以促進頭髮生長。目前已知有一獲得食品藥物管理局 FDA 批准使用的相關裝置，名為 HairMax 雷射健髮梳，他是利用低強度積光療法「Low-Level Laser Therapy (LLLT)」的作用機制，已達促進頭髮生長 (14)。

低強度激光療法 LLLT 是由波長為 500 到 1100 奈米的紅外線、近紅外線促進組織修復和刺激細胞再生的活性。期可應用在傷口癒合、神經再生、緩解關節疼痛、中風恢復和粘膜癌的預防與治療。

低強度激光療法 LLLT 刺激毛髮生長作用的確切機制目前尚不清楚，但仍有幾種可能的機制。LLLT 可能作用在粒線體 (Mitochondria)，並且可以通過從細胞色素 C 氧化酶 (Cytochrome C Oxidase, CCO) 抑制一氧化氮 (NO) 的光解 (Photodissociation) 改變細胞的代謝 (15)。透過活性氧化物 (Reactive Oxygen

Species, ROS) 產生誘發 ATP 以及轉錄因子例如核因子 NF- $\kappa$ B、缺氧誘導因子 (Hypoxia-inducible Factor- $\alpha$ , HIF-1) 增加 (16)。這些轉錄因子會轉譯出新蛋白質合成，進而增加細胞的增殖和遷移，改變細胞激素 (Cytokines)、生長因子 (Growth Factors) 和發炎介質 (Inflammatory Mediators) 的含量以及增加組織內的含氧量 (16)。

在過去，雷射常常是被用來應用在除毛上，其原理是利用分布在髮幹 (Hair Shaft)、基質細胞 (Matrix)、外根鞘 (Outer Root Sheath)、隆突 (Bulge) 的黑色素吸收光能，並且向外散發熱量，使周圍組織受到損傷。此過程稱為「光熱解過程 (Photothermolysis) (17)」，因為這些細胞受到損害影響毛囊生長而達到除毛的目的 (18)。

然而，也有人從雷射除毛後觀察到一個罕見的反應 (19, 20)。Moreno-Arias 等人發現，在雷射除毛後有時會有與除毛矛盾的毛髮生長結果 (Paradoxical Hair Growth, PHG)，這種情形多發生在經過雷射除細微毛髮 (Vellus Hairs) 的區域，例如女性的臉部、頸部 (19, 20)。有研究提出之所以會發生這種現象的原因可能是因為雷射除毛時通過毛囊的光能量太低 (20, 21)，以至於無法完全損害毛囊生長時的必須幹細胞，反而刺激更多細微毛髮的生長或刺激在休止期的毛髮進入生長期。這種較低能量的雷射通過毛囊，之所以能刺激毛囊進入生長期，可能是透過釋放血管生成因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) 增加血流流向真皮乳突細胞 (20, 22)，若毛囊同時被這些較低能量的光所刺激，則外觀上毛髮密度會增加 (20)。因為角質幹細胞 (Keratinocyte Stem Cell) 的活化對於毛髮循環週期生長的毛髮和表皮傷口的癒合皆扮演重要的角色，所以雷射療法能同時刺激毛髮再生與促進傷口癒合 (23)。

### 1.3.2 皮膚治療常用之雷射療法

皮膚雷射種類繁多，一般而言，可分為磨皮雷射、色素雷射、血管雷射等。

茲敘述如下表（表 1.2）（24）



磨皮雷射	二氧化碳雷射 (Carbon dioxide laser)	波長高達 10600 奈米，為最早用於磨皮的雷射。  較常改為點陣式輸出的模式，即所謂的「二氧化碳飛梭雷射」。
	鉺雅克雷射 (Er:YAG laser)	波長為 2940 nm，與傳統二氧化碳雷射相比，較不會造成周邊組織的熱傷害。
	分段式換膚雷射 (Fractional resurfacing laser)	俗稱飛梭雷射。  以雷射探頭產生微陣式光學圓錐，同時放出數條微光束（光點大小僅約 100-200 $\mu$ m）微創皮膚，因此每次探頭照射下，僅有部份皮膚受到破壞，避免大面積同時治療所可能的副作用。  又可分為非汽化剝離式雷射與非汽化剝離式雷射。
色素雷射	紅寶石雷射 (Ruby laser)	波長 694 nm（紅光），是目前色素雷射中效果最好的雷射。

色素雷射	紫翠玉雷射 (Alexandrite laser)	亞歷山大雷射。波長 755 nm (紅光)，與紅寶石雷射皆為紅光雷射，但因波長較長，所以穿透深度稍深。
	鈹雅克雷射 (Nd:YAG laser)	具備對淺色層色斑的 532 nm (綠光) 與對深層病灶的 1064 nm (紅外線) 雙重波長的模式。
血管雷射	氬雷射 (Argon laser)	波長為 418 nm (藍光) 與 514 nm (綠光)，為最早應用於血管性病灶。
	染料雷射 (Dye laser)	波長介於 577 至 600 nm (黃光)，一般皆以 585 或 595 nm 來治療。 目前血管性雷射的最佳選擇之一。

表 1.2 常見用於皮膚治療之雷射概述 (24)





### 1.3.3 飛梭雷射

「飛梭雷射」(又稱為「點陣激光」, fractional laser)是一種點陣式能量輸出的雷射治療方式,也就是將雷射光束分成細微小點的點狀輸出,結合多次治療,降低皮膚在每次治療時受到的破壞,與大面積破壞的傳統雷射相較,是相當受病患歡迎的處理方法。飛梭雷射這種分段式治療概念,由於每個微光束的直徑都很小,通常大約介於 100-200 微米(micrometer)之間,因此可以打到深層真皮層,在一般情況下不會造成無法修復的凹洞,適於處理深部的病灶結構,可是每次只能破壞部份的組織,通常只有一次的治療外觀變化並不大,需要多次處理。

「非汽化(剝離)式」意指該雷射的波長不會造成皮膚表面的破損,因此不會滲出組織液;反之則稱為「汽化式」(24, 25, 26)。

飛梭雷射(點陣激光)可分為汽化式與非汽化式兩大類,如下表(表 1.3):

非汽化剝離式雷射 (non-ablative laser)	<p>可刺激膠原蛋白新生,例如鉕玻璃雷射(Er: Glass laser, 波長 1550 nm),即二代飛梭(Fraxel, 亦有人稱為第四代飛梭)所利用的雷射波長, Sellas 3D 變頻飛梭,亦可使用波長 1540 nm 的雷射,如晶鑽飛梭(Lux1540)、XD 飛梭雷射。亦有廠商研發波長為 1440 nm 或 1927 nm 點陣式輸出的雷射,即俗稱的「素顏光飛梭雷射」。</p> <p>最早被用來探討飛梭雷射在皮膚治療方面之研究的即為此類型,通常使用的機型為二代飛梭雷射 Fraxel SR1500。由於利用滾輪探頭在皮膚表面滾動而輸出能量(Intelligent Optical Tracking System, IOTS),又名為「飛輪光雷射」、「飛輪光飛梭雷射」。</p>
----------------------------------	---



<p>汽化剝離式雷射 (ablative laser)</p>	<p>這類型的飛梭雷射，是利用傳統磨皮雷射的波長，以點陣式輸出光束，可移除疤痕，破壞疤痕下方的纖維化組織，並刺激膠原蛋白新生。</p> <p>二氧化碳飛梭雷射、飛梭式鉕雅克雷射、飛梭式珍珠雷射屬之，其中以二氧化碳飛梭雷射穿透深度最佳，對纖維母細胞亦可達較好的熱刺激效應，故目前較為使用。</p>
-------------------------------------	---

表 1.3 飛梭雷射之類型概述 (24, 25, 26)

綜合以上可以得知，在面對不同的皮膚相關病徵時，須根據不同種類雷射療法原理判斷出最適合的雷射治療。

下圖便以卡通圖的方式，展示傳統磨皮雷射與不同飛梭雷射施加在皮膚上之後的外觀之異同 (圖 1.5) (24)：

- a、傳統磨皮雷射，如 Er:YAG, CO<sub>2</sub> lasers
- b、低能量二氧化碳飛梭雷射：只作用在表皮層。
- c、汽化式雷射。鉕雅克(Er: YAG)飛梭雷射：因為水分對 2940 nm 波長的吸收效應太好，對組織的熱效應反而不佳，容易滲血，不容易作用到皮膚深部。
- d、非汽化式雷射。鉕玻璃雷射(Er: glass laser)：對水分子有良好的加熱作用，利用此溫度效應，對組織具有凝固作用，熱效應佳，較無汽化剝離作用。
- e、高能量二氧化碳飛梭雷射：對組織的熱效應佳，具止血效果，與較強的切割作用，可作用到皮膚深部。

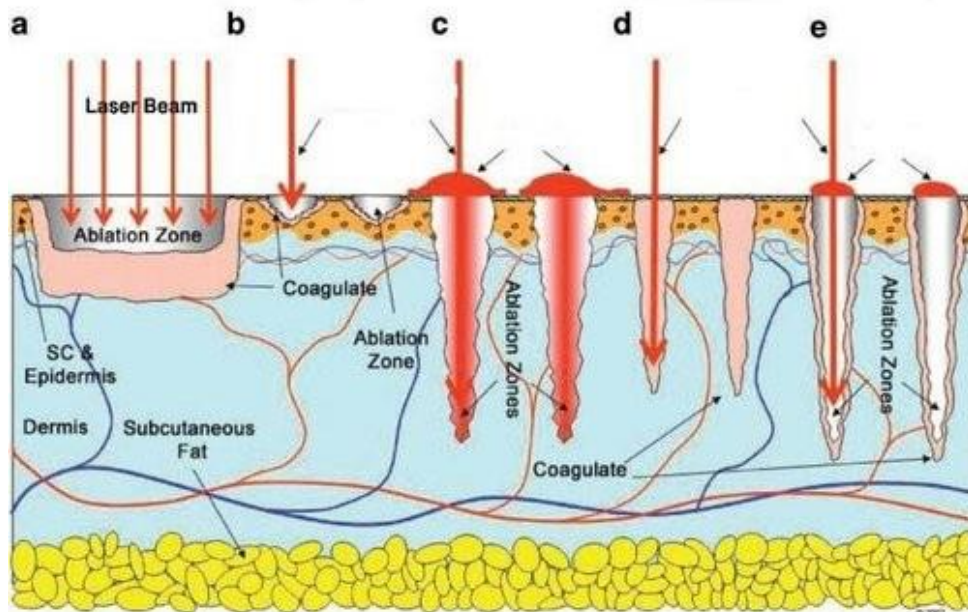


圖 1.5 不同雷射於皮膚治療之效果 (24)

#### 1.3.4 1550 奈米點陣鉕玻璃雷射

1550 奈米點陣鉕玻璃雷射 (1550 nm fractional erbium-glass laser) 是非汽化剝離式飛梭雷射中的一個重要類別。相較於傳統大面積破壞的雷射療法，此療法使用的是一種分段治療換皮的概念。它將雷射光束分成細小的點狀輸出，每個雷射光束的直徑通常介於 100 至 200 微米之間，直徑則隨輸出能量改變。利用探頭接觸到皮膚才會擊發雷射、輸出能量。

非汽化剝離式的 1550 奈米飛梭雷射不會造成皮膚表面破損也不會使組織液滲出皮膚，且雷射深度可達真皮層，利用光電療法刺激皮膚內部。當真皮層受到雷射產生的熱能後，可能導致傷口癒合 (Wound Healing) 現象，從而促使纖維母細胞 (Fibroblasts) 活化，使得膠原蛋白 (Collagen) 生成 (27, 28, 29)。

1550 奈米點陣鉕玻璃飛梭可廣泛應用在磨皮和真皮重塑(膠原蛋白再生)，可能可使小鼠的毛髮提前從休止期進入生長期、改善雄性禿患者的毛髮密度與提高毛髮生長速率 (30)。



## 1.4 傷口癒合與毛囊新生

### 1.4.1. 傷口

數十年來，已有研究發現若是在有毛囊的區域造成傷害，傷口將會比在沒有毛囊的區域造成的傷害還要更快復原，並發現此加速傷口癒合的機制是透過快速啟動表皮細胞的在上皮化而非使傷口閉合而成 (31, 32, 33, 34, 35)。

另外也有不少研究指出，小鼠、兔子以及人類在傷口癒合的過程中會伴隨著毛囊新生 (36,37,38)。2007 年時，Ito 等人給予小鼠面積大小約 1 到 2.25 平方公分的開放性傷口後，在傷口癒合的過程中發現，傷口縮合後的中心處有毛囊新生 (Hair Follicle Neogenesis) 現象的產生。隨著利用基因轉殖鼠等方式持續向下探討，該團隊發現了這些新生毛囊細胞的來源是 Inter-Follicle Epidermal Cells。在傷口癒合的上皮細胞再生過程中，毛囊新生亦參與此過程。此外，Ito 等人也發現了在傷口促毛髮再生的過程中，Wnt10、Shh、Lef1、KRT17 等皆有高表現。在此之後也利用 Wnt 相關抑制劑與過表現 (Overexpression) 等方法證實在傷口致毛髮新生的過程中，Wnt 訊號確有其重要性 (33, 39, 40)。

其他方面，Osaka 等人發現 Apoptosis signal-regulating kinase1 (ASK-1) 在皮膚傷口促毛髮生長過程中也扮演了重要的角色 (41)。在 ASK-1 缺乏的小鼠傷口實驗中，發現該鼠的傷口毛髮再生情況與一般相比有明顯延遲，也發現到傷口區域的巨噬細胞 (Macrophages) 浸潤與活化程度受到嚴重影響。藉由此觀察，Nao Osaka 等人認為這些位於傷口附近的巨噬細胞因受到周遭環境的影響而被活化，進而釋放某些促進生長的因子來影響傷口處的毛囊生長 (41)。

2010 年，也有研究團隊發現在小鼠皮膚給予非圓形傷口以及小於 1 平方公分的小型傷口也會在傷口癒合過程中使毛囊再生，同時也發現 Wnt 訊號傳遞相關蛋白有較高表現。此外，他們也發現了這些傷口有較高的 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的 mRNA 表現。透過建立實驗模型，他們也證實了 Wnt 訊號傳遞在傷口癒合過程中確實在毛囊再生現象扮演重要角色 (42)。



## 1.4.2. 傷口癒合過程

傷口修復的過程主要分為三個階段，分別是發炎（Inflammatory）、增生（Proliferative）和重塑（Remodeling）三個階段（43,44）：

### （一）發炎

傷口癒合的第一步驟為免疫系統面對外來傷害的最快速反應，發炎。經過連串包括血管收縮、血小板聚集、纖維蛋白凝塊行程等步驟，凝血並終止血管損傷（45,46）。此纖維蛋白凝塊（Fibrin Clot）產生為發炎細胞（Inflammatory Cells）朝傷口遷移的表徵（45,46）。隨後發炎細胞如中性球、單核球等被血小板和細胞外基質（ECM）釋放的細胞激素吸引到損傷部位。此時也會使轉化生長因子- $\beta$ （TGF- $\beta$ ）和血小板衍生成長因子（PDGF）提升（43,46）。當嗜中性球（Neutrophils）除去從傷口進入的異物和細菌後，會隨著由單核球分化的巨噬細胞移動（47）。巨噬細胞具有吞噬入侵微生物還凋亡的中性球的功能，亦會分系 TGF- $\beta$  和其他細胞因子，進而刺激成纖維母細胞（Fibroblasts）和上皮細胞移動到傷口（48）。

### （二）增生

當發炎反應消退時，會進入表皮細胞開始再生與修復真皮層的增生期。內皮細胞此時會增生新的血管，真皮的修復透過增生的纖維母細胞，其合成並分泌細胞外基質蛋白，也會釋放 TGF- $\beta$  等生長因子（49）。

在傷口癒合的增生期，纖維母細胞會製造如 TypeI、TypeIII 膠原蛋白等未成熟的細胞外基質（49），並可透過分泌基質金屬蛋白酶（Matrix Metalloproteinase, MMPs）促使纖維母細胞進入傷口（43）。在修復傷口的過程中，表皮角質細胞會表現多種整合素（Integrin）接受器，能讓表皮細胞作為再生時所需的臨時基質（50,51）。透過角質細胞遷移、增生和分化的合作，將上皮細胞的間質封閉，恢復上皮的屏障功能（52）。不同位置的毛囊

幹細胞也有助於再生表皮細胞 (39,53,54,55)。毛囊間的幹細胞也可能參與此過程 (55)。



### (三) 重塑

在最後的重塑階段，纖維母細胞會分化成肌纖維母細胞 (Myofibroblasts) 幫助傷口收縮癒合 (56,57)。傷口組織主要透過更換未成熟的細胞外基質來重組，如一型與三型膠原蛋白。第一型膠原蛋白組織成束，並在傷口部位誘發多種類型細胞凋亡 (45,49,58,59)。透過這些連續變化，最終使傷口收縮並形成疤痕。

## 1.4.3. 免疫細胞

從傷口產傷到癒合的過程，免疫細胞在其中扮演相當重要的角色。不僅是促進傷口修復，也與毛囊消長有所關聯。在早期的研究中，免疫細胞多和皮膚發炎與掉髮有關，但最近有許多研究指出免疫細胞在毛囊幹細胞活化時參與其中，也扮演重要角色。近年有研究團隊指出，他們觀察到巨噬細胞在休止期中期時數量會大量增加，而到休止期晚期進入生長期初期時，巨噬細胞數量會因為大量凋亡而遽減，並在此時釋放大量 Wnts 訊號分子如 Wnt7b 與 Wnt10a，進而使毛囊活化，啟動 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑，促使毛囊進入生長期 (60)。藉由 Clodronate-liposomes 凋亡巨噬細胞的實驗，發現凋亡的巨噬細胞會釋放大量 Wnt7b 和 Wnt10a，使得休止期狀態毛囊幹細胞活化，進入生長期。可見得巨噬細胞與毛囊幹細胞間的某種關聯能影響毛囊幹細胞的活化，且巨噬細胞在毛囊生長過程中扮演重要角色 (60)。

另外也有研究發現因拔毛 (Plucking) 導致的凋亡釋放出的化學激素 CCL2 會吸引 M1 型態巨噬細胞聚集在毛囊附近，並釋放大量腫瘤壞死因子 TNF- $\alpha$ ，促使毛囊活化再生。此訊號接著傳遞到相鄰的毛囊，跟著使其他毛囊也活化。由

此可知巨噬細胞在毛囊幹細胞活化與再生間的訊息傳遞也相當重要 (61)。

進一步探討 TNF- $\alpha$  與巨噬細胞間的關聯，在 2017 年 3 月，Xusheng Wang 的研究也指出，透過 TNF 路徑活化毛囊再生的巨噬細胞，是透過誘導毛囊中 Lgr5<sup>+</sup> 毛囊幹細胞的 AKT/ $\beta$ -catenin 訊號，進而促進受傷後的毛囊生長週期與毛囊新生 (62)。

#### 1.4.4. 血管內皮生長因子 (VEGF Family)

血管內皮生長因子 (VEGF) 與血管新生 (Angiogenesis)、血管通透性 (Vasculogenesis)、內皮細胞遷移與增生有極大的關聯。其相關家族 (VEGF Family) 包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PlGF1/2 (小鼠僅有 PlGF2) 與其同型體 (Isoform) 等。VEGF 家族在發炎中佔有重要的地位，在刺激性的接觸性皮膚發炎中可以看到角質細胞與內皮細胞大量表現 VEGFs (63,64,65,66,67)。

一般而言，在 VEGF 家族中，VEGFA 因為占了絕大部分的比例，因此常被稱為 VEGF，因為 A 是血管發生和祖內皮細胞分化的關鍵調節劑，在人類多種腫瘤中，A 都是過表達的，這與腫瘤的增殖、侵襲和轉移呈正相關(68,69)。VEGF 家族成員均與細胞膜酪氨酸受體相互作用，導致受體二聚化和自身磷酸化，啟動信號級聯反應，激活大量下游蛋白，比如磷脂酰基醇 3-激酶 (PI3K)、Ras、有絲分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等，介導相應的生物學效應(70)。

VEGFs 的受器主要有 VEGFR 和 Nrp 兩大類型，VEGFR 可區分為 VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3 三種亞型；Nrp 則可分成 Nrp1 和 Nrp2。這些受體存在人動物體內的位置皆有所不同，並且，相同的受體在不同物種中的組成亦有差異，例如在人體中的 VEGFR2 主要由 KDR 組成，但在鼠中則是由 Flk-1 組成 (70,71)。這些受器與 VEGFs 之間有各自不同的專一性，並根據不同分子與受體結合，其下游所引導的訊號傳遞與生理現象也有極大差異 (圖 1.6)(72)。

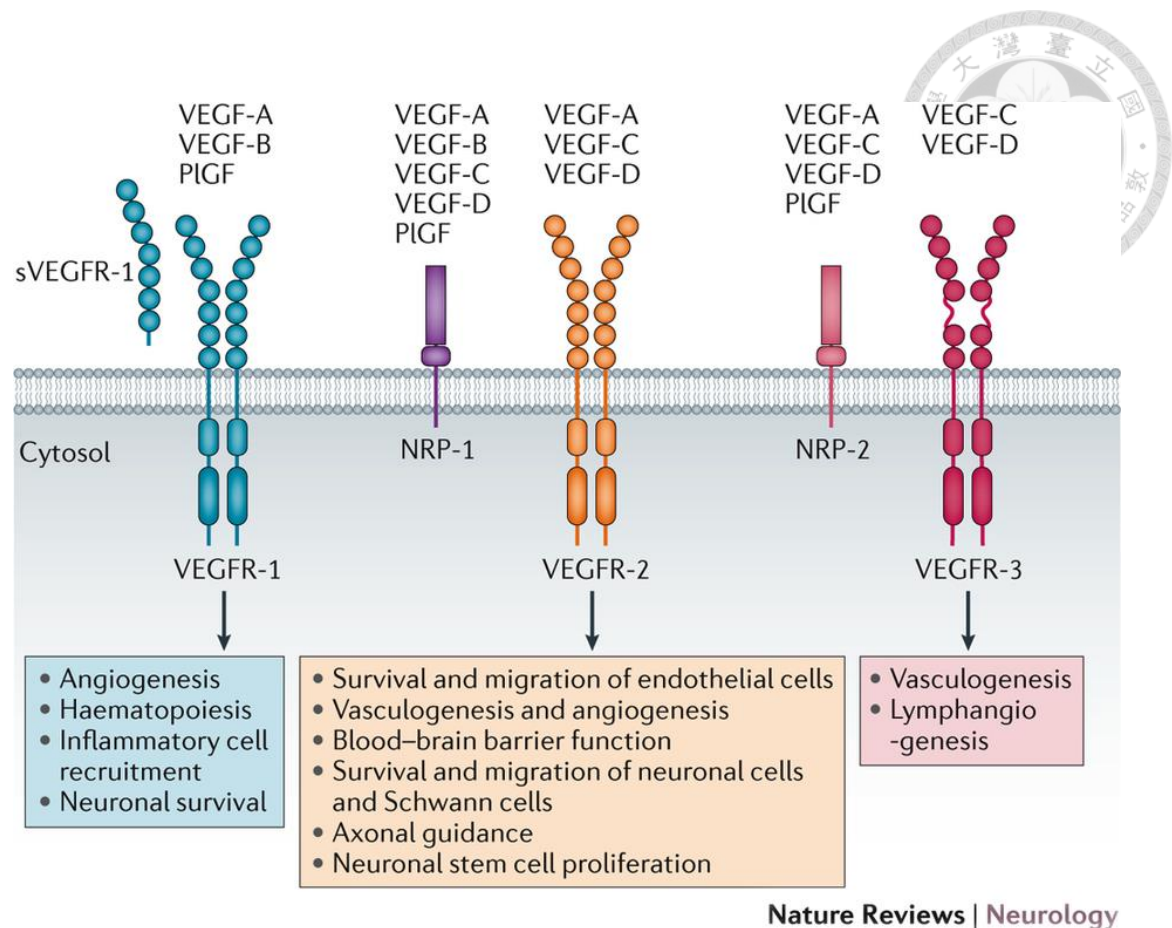


圖 1.6 血管內皮生長因子家族與接受器 (72)

## 1.5 飛梭雷射誘導毛囊提前由休止期進入生長期

目前已有不少文獻指出，皮膚的傷口會造成傷口周圍毛髮進入生長期 (36, 37, 38)，於是本研究便希望尋求能在透過可控制的小傷口、不要造成疤痕的情況下誘發毛囊再生的方法。

本研究使用的是現在最多被應用在學術研究的第二代飛梭雷射 Fraxel SR1500 來進行實驗。藉由調整不同的能量強度 (mJ) 與輸出光束密度 (MTZ)，輸出在 8 週週齡的 C57BL/6 母鼠以除毛刀粗剔後的兩側，本研究成功得到能總能量 (mJ x MTZ) 與促進毛髮由休止期進入生長期 (Telogen to Anagen, T to A) 的關係。發現當能量強度低於一定值時，不論如何提高輸出光束密度，仍無法有效促使毛髮進入生長期；但當單位能量強度有一定值以上後，若輸出密度太高，



雖然仍會有促進毛髮提前生長的效果，但也會使雷射施打區域產生潰爛或疤痕。  
藉由比較以不產生疤痕為前提下、提前進入 Anagen 的區域面積與施打雷射後天數的關係折線圖，本研究也能發現以 15mJ 配合 1048 MTZ 的效果最好 (73)。

**A**

		Laser beam density(MTZ/cm <sup>2</sup> )					
		500	1000	1500	2000	2500	3500
Laser beam energy(mJ)	5	□○	□○	□○	□○	□○	□○
	10	□○	□○	◻●	■◎	■◎	NT
	12	□○	□○	◻●	■◎	NT	NT
	15	□○	◻●	■◎	■◎	NT	NT
	20	□○	■◎	NT	■◎	NT	NT
	25	◻●	■◎	NT	■◎	NT	NT
	35	■◎	■◎	NT	■◎	NT	NT

□: No ulcer ■: Ulcer formation NT: Not tested  
○: No hair regeneration ●: Hair regeneration ◎: Hair regeneration after wound contraction

**B**

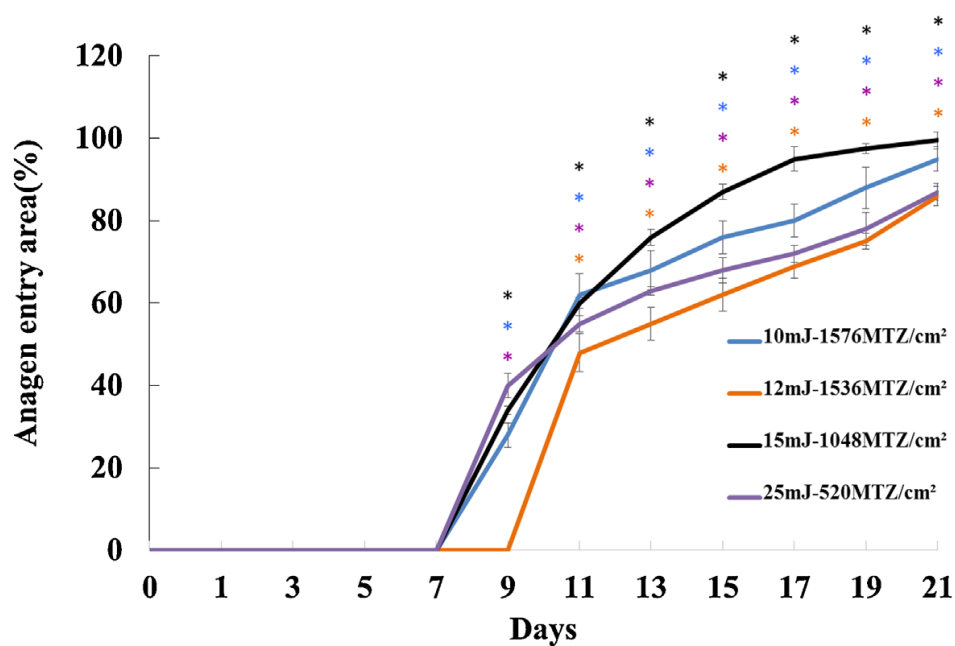


圖 1.7 雷射能量強度和密度與提前進入生長期區域之關係 (73)



## 1.6 研究動機與目標

在了解到以第二代飛梭雷射刺激位於休止期的 C57BL/6 母鼠後能提早使毛囊進入生長期、且也了解到如何選擇不會留下疤痕又最有促進效果的能量之後，本研究便想進一步探討，究竟雷射施打在皮膚後產生了如何的反應、是透過何種機制才會使得施打雷射的區域提早將近兩周進入生長期，這是本研究目前還不太了解的部分。

在本研究之前的研究中發現，飛梭雷射的能量束打穿表皮、透達真皮層之後，會使得真皮層的膠原纖維受到灼燒破壞，發生改變的微環境也會誘使組織產生明顯的免疫浸潤情形，包括嗜中性球、巨噬細胞等發炎相關細胞都會提高表現。這些發炎細胞在受到雷射傷害刺激後是否在形態上有所變化、釋放出的細胞激素或發炎因子是否為直接針對毛囊幹細胞產生影響而導致毛囊加速生長，都還有待釐清。

本研究長期致力於毛囊再生與生長的相關研究，而毛囊作為第一道防線表皮中的一員，接觸外界環境刺激的頻率相當高。若是能了解微傷口促進毛髮生長的機轉，一來本研究或許能使得缺少毛髮屏蔽的部分更早恢復功能，二來也可能在日後無須透過飛梭雷射等器具，直接針對此機制作影響，進而達成同樣提早進入生長期的效果。

本研究希望能建立一個皮膚在受到微傷口刺激後誘發休止期毛囊提早進入生長期狀態的實驗模型，希望能釐清後續的機轉、找出參與其中的關鍵細胞以及因子。

## 第二章、實驗材料與方法



### 2.1 建立雷射微傷口刺激皮膚炎之實驗動物模型

#### 2.1.1 實驗動物

本實驗使用的小鼠為購買自國家實驗動物中心 (NLAC) 的 8 週齡 C57BL/6JNarl 母鼠。為確保接受實驗的動物其毛髮週期準確，在實驗的前處理方面，會使用 30 $\mu$ l 的麻醉藥劑先將小鼠麻醉。使用的麻醉藥劑為 5ml 的 Zoletil (Vibrac, France) 配上 1.25ml 的 Rompun (Bayer, Germany)，並配上等體積 6.25ml 的生理食鹽水 (信東生技，台灣)。麻醉後使用電剃刀將小鼠頭頸部以下的毛髮剃除，觀察週期狀態。一般而言，休止期時的膚色呈現粉紅色，生長期則為灰黑色。判斷週期正確後方能進行實驗。

#### 2.1.2 飛梭雷射

本實驗所使用的第二代飛梭雷射 Fraxel SR1500 (Solta medical, Inc U.S.A.)，具有 15mm 的探頭，並以波長 1550nm 的紅外線波雷射為主要工具。藉由控制面板，儀器可調整雷射光束的單位能量以及每平方公分雷射光密度的大小，藉由此二者組合出不同的雷射熱能。

透過先前的實驗 (73)，本實驗以具有最佳誘導毛囊自休止期提前進入生長期效果的 15mj 乘以密度 1048 點為主。如前所述，實驗以八週的 C57BL/6 母鼠為實驗對象，利用剃毛刀將頭頸部以下的毛去除後，在鼠的腹部兩側胸骨到大腿骨之間作約 1.5 公分到 2 公分的長方形標記，此為雷射施打的位置。在施打雷射時，為求皮膚能平均接受雷射，會以手將標記位置壓平以便探頭滾動。施打後觀察毛髮週期變化。



圖 2.1 第二代飛梭雷射之控制面板



圖 2.2 第二代飛梭雷射儀器、探頭與操作方法

### 2.1.3 實驗設計概念

在確定本研究選的能量強度與密度的組合確實能重現無疤痕且促使進入生長期的效果後，本研究需要嘗試進一步分析背後的機制。

首先本研究選定施打雷射後的第 0、1、3、5、7、9、11、14、17、21 天來做取樣時間點（圖 1.9）。而分析方法主要有利用組織染色 H&E Staining 來觀察毛囊與皮膚型態隨著時間的變化。再利用免疫螢光染色以各式角質細胞（如 K15）與分化相關標誌（如 Ki67、BrdU）標定毛囊特定細胞，並以不同發炎細胞（如 Neutrophils、Macrophages）、細胞激素（TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ）與毛囊幹細胞活化相關蛋白（VEGF、VEGFR、Wnt）的標定物，檢視他們的消長，同時以 qPCR 做 mRNA 表現量差異來驗證螢光染色的結果。針對可能是雷射刺激後導致休止期毛囊提前進入生長期的因子，本研究也使用特定藥物或基因轉殖鼠使該因子表現量大幅下降，再施予相同的雷射處理，並觀察是否有所影響。

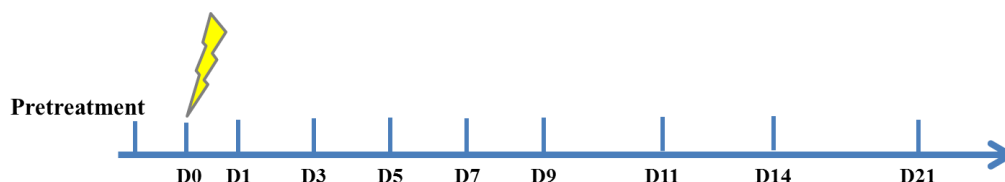


圖 2.3 取樣時間

## 2.2 採樣方式

在經過不同前處理並施打雷射後，依所需時間犧牲以便取下兩側施術過後的皮膚做分析。通常本研究以斷頸法犧牲小鼠，以剪刀取下皮膚後貼於 A4 紙上，並浸泡於 4% 多聚甲醛（PFA）於 4 度冰箱隔夜，再將固定的組織置於解剖顯微鏡下修剪後，可進行冷切包埋或蠟切脫水包埋，方可接續染色等分析。

在取樣前，通常會在犧牲前一個小時以腹腔注射給予小鼠 100 $\mu$ l 的 10mg/ml BrdU，並在一小時後犧牲取皮。稀釋後的 BrdU 為利用 BrdU（Sigma-aldrich, USA）溶解在 Dimethyl Sulfoxide（DMSO）（Sigma-aldrich, USA）後配製成濃度 100mg/ml，再利用生理食鹽水稀釋成所需的 10mg/ml BrdU。

## 2.3 蘇木精 & 伊紅染色 (Hematoxylin & Eosin Staining)

- I. 將組織固定、石蠟包埋、切片、置於烘箱以 45 度烘乾隔夜。
- II. 在染色前將烘乾的切片以烘箱 60 度烘約半小時，使蠟溶解以利脫蠟
- III. 置於二甲苯 (Xylene) (Leica Biosystems, Germany) 中脫蠟，一缸約 5 到 10 分鐘，時間到後換到新的 Xylene 中，至少過兩缸。
- IV. 依照 100%、100%、95%、90%、70%、50% 酒精 (Pharmco-aaper, USA) 的順序浸泡進行覆水，每缸約 3 分鐘，最後泡於蒸餾水中 5 分鐘完成覆水動作
- V. 完成覆水後將樣品泡於裝有蘇木精 (Hematoxylin) (武藤化學, Japan) 的染缸中 1 分鐘進行細胞和染色。取出後置於水盆中並開啟自來水以流動水進行退染約 10 分鐘。
- VI. 放入裝有伊紅染劑 (Eosin) (Leica Biosystem, Germany) 的染缸中進行細胞質染色約 10 到 15 秒。
- VII. 依序浸入 70%、95%、100%、100% 的梯度酒精去除多餘的 Eosin 染劑與脫水，完成後再依序泡於兩缸 Xylene 中，每缸約 10 分鐘。
- VIII. 取出樣品後待其風乾，以 H&E 專用封片膠 (Assistent, Germany) 封片，置於抽氣櫃抽乾後即可使用 NIE 正立式螢光顯微鏡進行光察分析。

## 2.4 免疫螢光染色 (Immunofluorescence Staining)



- I. 配製抗原修復所需溶液 pH 6.0 的檸檬酸緩衝液 (Citrate Buffer, 10mM Citric Acid, 0.05% Tween20, pH 6.0)。

將 1.92 克無水檸檬酸 (Bio Basic Inc, Canada) 溶於 1L 二次水中，並利用 1.0N 的氫氧化鈉 (J.T. Basker, USA) 將 pH 值調整為 6.0 之後加入 0.5ml 的 Tween20 (Bio Basic Inc, Canada)。混和均勻之後取出所需的量置於水浴槽中預熱至 95 度備用。

- II. 配製阻斷非特異性抗原結合位(雜訊)與稀釋抗體所需的 5% BSA 溶液。

將 10X PBS(amresco, USA)使用二次水稀釋後成 1X PBS，再將 0.5g Bovine Serum Albumin (BSA)(Bionovas, Canada)溶於 10ml 的 1 倍 PBS 中，配成 5% BSA 溶液。可立刻使用或冷藏、冰凍保存。

- III. 將組織固定、石蠟包埋、切片、置於烘箱以 45 度烘乾隔夜。

- IV. 在染色前將烘乾的切片以烘箱 60 度烘約半小時，使蠟溶解以利脫蠟

- V. 置於二甲苯 (Xylene) (Leica Biosystems, Germany) 中脫蠟，一缸約 5 到 10 分鐘，時間到後換到新的 Xylene 中，至少過兩缸。

- VI. 依照 100%、100%、95%、90%、70%、50% 酒精(Pharmco-aaper, USA) 的順序浸泡進行覆水，每缸約 3 分鐘，最後泡於蒸餾水中 5 分鐘完成覆水動作 (III 到 VI 步驟大致同 H&E 染色)。

- VII. 放入已預熱至 95 度的 Citrate Buffer 中加熱約 25 分鐘進行抗原修復 (Retrieval) 後，取出並放於水盆中待冷卻至室溫，接著用 1X PBS 浸泡約 5 分鐘，洗淨殘留的緩衝液。

- VIII. 利用疏水筆 (PAP Pen) 圈出樣本所在位置，並滴上配製好的 5% BSA 溶液，置於保有濕度的盒子中保持樣品在過程中不會乾燥，並放在搖晃盤 (Shaker) 約 1 小時作 Blocking，減少抗體非特異性結合。

- IX. 利用輕敲的方式將 BSA 甩掉，並利用 5% BSA 按所需稀釋比例稀釋一級抗體後，取約 25 $\mu$ l 滴在樣本上，置於保濕盒後於 4 度冰箱隔夜。
- X. 隔天取出後用 1X PBS 洗淨，至少 3 次，每次 5 分鐘。此時若有要染第二個一級抗體，則重複上步驟，然後再利用 1X PBS 洗淨三次。若無的話則準備加入二級抗體。
- XI. 將所有與使用之一級抗體對應的二級抗體依照建議稀釋比例（通常是 1：500）加入 1X BSA 後滴於樣本上，並置於保濕盒中於室溫搖晃盤上至少待其避光反應 1 個小時。結束後使用 1X PBS 洗淨 5 分鐘，重複三次。
- XII. 用 5% BSA 以 1：500 的比例稀釋 DAPI 後，滴在樣本上並靜置待避光反應至少 10 分鐘以標定細胞核位置。結束後利用 1X PBS 洗淨 5 分鐘，共計三次後過一次水洗淨多餘鹽類並避光風乾。
- XIII. 利用螢光封片膠 Fluorescence Mounting Solution (Dako Inc, Denmark) 與蓋玻片封片後，去除空氣後以指甲油密封連接處，待乾後可利用 NIE 螢光顯微鏡觀察分析。

一級抗體 Primary Antibody			
抗體名稱 Name	寄主 Host	稀釋比率	廠牌與編號
Cytokeratin15	Mouse	1：350	ThermoFisher (MA1-90929)
P-cadherin	Goat	1：200	R&D Systems (AF761)
BrdU	Rat	1：200	Abcam (ab6326)
F4/80	Rat	1：200	eBioscience (14-4801-82)
Ly6G	Rat	1：150	Biolegend (127632)

VEGFA	Rabbit	1 : 100	Abcam ( ab51745 )
IL-1 $\beta$	Rabbit	1 : 200	Abcam ( ab9722 )
TNF- $\alpha$	Mouse	1 : 150	LSBio ( LS-B2123 )
Lef1	Rabbit	1 : 200	Cell Signaling Technology ( 2230S )
iNOS	Rabbit	1 : 150	Santa Cruz ( sc-651 )
ArginaseI	Rabbit	1 : 150	Santa Cruz ( sc-20150 )
p-VEGFR2	Rabbit	1 : 100	ThermoFisher ( MA1-90929 )
<b>二級抗體 Secondary Antibody</b>			
<b>抗體名稱 Name</b>		<b>稀釋比率</b>	<b>廠牌與編號</b>
Alexa Fluor 488 AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG ( H+L )		1 : 500	Jackson ImmunoResearch ( 712-545-153 )
Alexa Fluor 488 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG ( H+L )		1 : 500	Jackson ImmunoResearch ( 711-545-152 )
Alexa Fluor 488 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG ( H+L )		1 : 500	Jackson ImmunoResearch ( 715-545-151 )
Alexa Fluor 488 AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG ( H+L )		1 : 500	Jackson ImmunoResearch ( )
Cy3 AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG ( H+L )		1 : 500	Jackson ImmunoResearch ( )
Cy3 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG ( H+L )		1 : 500	Jackson ImmunoResearch ( 711-165-152 )
Cy3 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG ( H+L )		1 : 500	Jackson ImmunoResearch ( 715-165-151 )
Cy3 AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG ( H+L )		1 : 500	Jackson ImmunoResearch ( 705-165-147 )

表 2.1 抗體表



## 2.5 RNA 萃取 與 cDNA 合成

在收取所需的組織後，除了用來做組織染色與螢光染色之外，也需要作 mRNA 與 qPCR 分析，因此必須先從組織中抽取 RNA 方可進行後續處理。



### I. 磨碎組織 (Day1)

步驟	材料
前日以 121°C 滅菌二次水和鉢後，以液態氮預冷研鉢	研鉢 鋁箔紙
I. 在預冷的研鉢中磨碎組織 II. 刮入預冷過的 eppendorf 並置於冰上	冰桶 樣品 eppendorf

### II. RNA 萃取 (Day1 ~ Day2)

步驟	材料
I. 加入 1ml Trizol 與 200 µl Chloroform II. Vortex 15 秒後靜置於室溫數分鐘 III. 低溫離心機以 12000rpm 離心 15 分鐘，離心機須先預冷至 4 度	Trizol  Chloroform (含鹵廢液)
I. 吸取上清液 (約 8 成，500 µl，勿取到有機層) 至新的 eppendorf II. 加入等體積 (約 500 µl) Isopropanol 混合均勻並靜置於室溫 10 分鐘 III. 保存於 -20°C 冰箱隔夜以利沉澱	Isopropanol
<b>Day 2</b>	
I. 低溫離心機以 12000rpm 離心 10 分鐘 II. 去除上清液，應可見透明或半透明 Pellet III. 加入 300µl 75% 酒精以 pipetman 沖洗 pellet IV. 低溫離心機以 12000rpm 離心 5 分鐘	75% 酒精
打開 eppendorf 置於架上並蓋上擦手紙待酒精揮發	
I. 依 Pellet 大小加入 DEPC 水溶解 Pellet II. 取 1µl 利用 Nanodrop 測量濃度 III. 所得之 RNA 可保存於 -80°C 冰箱	DEPC 水

### III. 純化 ( Day2 ~ Day3 , 以加入 20μl DEPC 水為例 )

步驟	材料
加入： <b>20 μl</b> RNA (前步驟產物) <b>1 μl</b> DNase (最後加) <b>3 μl</b> 10X DNase Buffer (回溫至 37 度) <b>0.5 μl</b> RNase Inhibitor <b>5.5 μl</b> ddH2O 共 30 μl	DNase 10X Buffer Inhibitor ddH2O
I. 在加熱盤上以 37 度靜置 30 分鐘 II. 加入 120 μl ddH2O 與 150 μl Phenol 混和 ( ddH2O + mix Liquid : Phenol = 1 : 1 ) III. 低溫離心機以 12000rpm 離心 10 分鐘	Phenol
I. 吸取上清液 (約 150 μl ~ 120 μl) II. 以 1 : 0.1 : 2 比例加入 NaOAC 與 99% 酒精 (上清液 : NaOAC : 酒精 = 1 : 0.1 : 2) III. 置於 -20°C 冰箱隔夜以利析出	NaOAC
<b>Day 3</b>	
I. 低溫離心機以 12000rpm 離心 30 分鐘 II. 去除上清液，應可見 pellet III. 以 400 ~ 600 μl 的 75 % 酒精沖洗 Pellet IV. 低溫離心機以 12000rpm 離心 5 分鐘	
I. 待酒精揮發後加入 20 ~ 25 μl 之 ddH2O，並 取 1 μl 混合液利用 Nanodrop 測量濃度 II. 純化後的 RNA 可置於 -80°C 冰箱保存	

### VI. RT ( 反轉錄聚合酶連鎖反應 , Day3 )

步驟	材料
I. 加入 ddH2O 稀釋 RNA 濃度至約 1000 ng/μl (低於 1000 者不用) II. 重測濃度	
I. 依重測後的濃度取 3 ~ 4 μl 的 RNA，使 RNA 總量約在 3000ng 左右 II. 將 Oligo(dT) 回溫至 37°C 後取 1 μl 加入，並 補充 ddH2O 使總體積為 12 μl	Oligo(dT)
在 PCR Machine 上選擇以 70°C 運行 5 分鐘後置 於冰上 1 分鐘	

加入		
<b>4 <math>\mu</math>l</b>	5X Reaction Buffer (回溫至 37°C)	Buffer
<b>2 <math>\mu</math>l</b>	10mM dNTP (於冰上緩慢融解)	dNTP
<b>1 <math>\mu</math>l</b>	RiboLock Rnase Inhibitor	Inhibitor
<b>1 <math>\mu</math>l</b>	Reverse Transcriptase (RTase, 最後加)	RTase
<b>12 <math>\mu</math>l</b>	RNA + OligodT Mixed Liquid 共 20 $\mu$ l	
混和均勻後於室溫靜置 5 分鐘		
在 PCR Machine 上選擇依序以 <b>42°C 運行 60 分鐘、70°C 5 分鐘</b> 運行並冷卻至 4°C		
反轉錄所得之 cDNA 可穩定保存於 -20°C		



一般而言，此步驟得到的 cDNA 需利用 PCR 步驟測試 GAPDH 是否能顯現後才能確定反轉錄得到的 cDNA 可以運作，詳見下小節。

## 2.6 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

聚合酶連鎖反應(PCR)是常見的分子生物學技術之一。配合特定酶與 Primer，擴增特定 DNA 片段，測試該基因片段是否有表現。

步驟	材料
取所需之 cDNA，加入滅菌二次水，將濃度稀釋至 <b>20 ng/<math>\mu</math>l</b>	
於微量離心小管內加入 <b>1 <math>\mu</math>l</b> 20ng/ $\mu$ l 之 cDNA <b>1 <math>\mu</math>l</b> 10 $\mu$ M Primer F <b>1 <math>\mu</math>l</b> 10 $\mu$ M Primer R <b>10 <math>\mu</math>l</b> MyTaq Red Mix 2X <b>7 <math>\mu</math>l</b> 滅菌二次水 共 20 $\mu$ l	Primer F Primer R MyTaq Red Mix
置於 PCR 儀器上，選擇 <b>設定 Primer 所需之溫度條件</b> 並運行，同時可配置 <b>1 ~ 2%</b> 洋菜膠。	
I. 於 Agrose Gel 專用瓶中加入 <b>100 ml</b> 的 1X TAE Buffer，以及 <b>1.5g</b> 的 Agrose II. 以微波爐加熱 1 ~ 2 分鐘，至完全溶解無	TAE Buffer Agrose

顆粒殘留，加入 5 $\mu$ l SafeView™ Dye (5 $\mu$ l Dye / 100 ml 膠)	SafeView Dye
III. 倒入製膠台，於室溫待其冷卻成膠後，放入 電泳槽並接上電極	製膠台 電泳槽
IV. 倒入 1X TAE Buffer 至蓋過洋菜膠表面	
I. 於洋菜膠樣本孔中加入 100 bp DNA Ladder 以及 PCR 後的產物	DNA Ladder
II. 開啟電源，當電泳達終點線後關閉電源	
III. 利用 UVP 確認結果	UVP

## 2.7 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如 SYBR Green 等特殊螢光物質能遷入雙股 DNA 的特性，隨著 PCR 循環次數增加，目標基因增加，同時螢光物質也隨著增加，藉此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，並推算出每個循環所產生的產物量，達到即時定量的目的。

備妥需要的 cDNA 與 qPCR 所需的試劑 (表 2.2) 後方可開始。

cDNA (20ng/ $\mu$ L)	2 $\mu$ l
Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.3 $\mu$ l
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.3 $\mu$ l
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) (Kapa Biosystem, U.S.A.)	7.5 $\mu$ l
滅菌 ddH <sub>2</sub> O	4.9 $\mu$ l
總體積	15 $\mu$ l

表 2.2 qPCR 所需材料

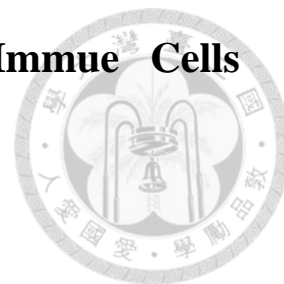
通常每個樣本對應的每個基因都會進行 3 次重複，用以平均並減少人為誤差。下表將列出過程中使用的小鼠 Primer 序列（表 2.3）。



Gene	Forward (5' to 3' )	Reverse (5' to 3' )
<i>GAPDH</i>	GGGAAGCCCATCACCATCT	CGGCCTCACCCCATTTG
<i>Ly6G</i>	TGCCCCCTTCTCTGATGGATT	TGCTCTTGACTTTGCTTCTGTGA
<i>F480</i>	GGCTTTGTCTTGAATGGC	CCACATCTTCACAGGATTCG
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	CCTGTAGCCACGTCGTAGC	AGCAATGACTCCAAAGTAGACC
<i>VEGFA</i>	ATCTTCAAGCCGTCCTGTGT	GCATTCACATCTGCTGTGCT
<i>VEGFB</i>	GCCAGACAGGGTTGCCATAC	GGAGTGGGATGGATGATGTCAG
<i>VEGFC</i>	GAGGTCAAGGCTTTTGAAGGC	CTGTCCTGGTATTGAGGGTGG
<i>VEGFD</i>	TCACGCTCAGCATCCCATC	ACTTCTACGCATGTCTCTCTAGG
<i>PDGFA</i>	ATCTTCAAGCCGTCCTGTGT	ATCTTCAAGCCGTCCTGTGT
<i>P1GF2</i>	TCTGCTGGGAACAACCAACA	GTGAGACACCTCATCAGGGTAT
<i>iNOS</i>	TTTGCTTCCATGCTAATGCGAAAG	GCTCTGTTGAGGTCTAAAGGCTCCG
<i>Arg1</i>	CAGAAGAATGGAAGAGTCAG	CAGATATGCAGGGAGTCACC
<i>VEGFR1</i>	GAGGAGGATGAGGGTGTCTATAGGT	GTGATCAGCTCCAGGTTTGACTT
<i>VEGFR2</i>	TGGACGGATGATCAAGAGAA	CTTCACAGGGATTCCGACTT
<i>PDGFRA</i>	ATCTTCAAGCCGTCCTGTGT	ATCTTCAAGCCGTCCTGTGT
<i>IL-1R1</i>	GGGAAGCAATATCCGGTCACA	TGACGTTGCAGATCAGTTGTATC
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	TGTAATGAAAGACGGCACACC	TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG
<i>Nrp1</i>	GAAGGCAACAACAACATATGA	ATGCTCCCAGTGGCAGAATG
<i>Nrp2</i>	AAGTGGGGGAAGGAGACTGT	GTCCACCTCCCATCAGAGAA

表 2.3 qPCR 使用之引子序列

## 2.8 免疫細胞耗竭與細胞激素抑制劑 (Immue Cells Depletion and Factors Inhibition)



### 2.8.1 嗜中性白血球耗竭

本研究用採用注入抗體的 Specific Antibody Depletion 方式，以腹腔注射 (Intraperitoneal Injection, IP injection) 注入實驗小鼠 Ly6G-specific Monoclonal Antibody 行 Ly6G positive cells depletion，即 Neutrophils depletion (74, 75)。

實驗設計上，本研究會在施打雷射前一天給予 60 $\mu$ l 的 1mg/ml anti-mouse Ly6G antibody (BioLegend, USA)，然後再於前三小時再給一次等劑量的藥劑，作為前處理。施打雷射後，則每日固定在施打雷射前三小時給藥，直到進入生長期或持續到採樣結束的第 21 天。

### 2.8.2 TNF $\alpha$ 表現抑制

為抑制 TNF- $\alpha$  表現，本研究使用的是 TNF- $\alpha$  Knock Out 的基因轉殖鼠，不以打藥的方式而是直接從基因上降低表現。

### 2.8.3 巨噬細胞耗竭

在使巨噬細胞耗竭方面，本研究使用的是 Clodrosome-Liposome，使 Macrophages 吞噬 Clodrosome 後細胞凋亡 (Apoptosis)，達成讓 Macrophages 大量消耗的效果 (60, 76)。

給藥方式採用皮下注射 (Subcutaneous Injection, SC injection) 方式。為避免在雷射前施打導致雷射過後撐起的皮膚容易產生破皮潰爛，本研究改在施打雷射後立刻給予一側皮膚 100 $\mu$ l 的 5mg/ml Clodrosome-Liposome (Encapsula NanoScience LLC, USA)，並再兩天後再給予第二劑。作為對照組，本研究在另一側的皮膚於相同的時間點給予皮下注射 Control-Liposomes。

#### 2.8.4 血管內皮生長因子 (VEGF) 抑制

血管內皮生長因子家族 (VEGF Family) 包括 VEGFA、VEGFB、VEGFC、VEGFD、PlGF 和一些因 mRNA 不同剪切方式而產生的同型體 (Isoform)。

本研究選用 Avastin® (bevacizumab)(Roche, Switzerland)與 Zaltrap® (Sanofi, French) 來做相關因子耗竭 (77, 78, 79)。

Avastin® 是一種重組的人化單株抗體，它能透過特異性結合併阻斷 VEGFA 以抑制腫瘤血管生成 (77, 78)，為世界上第一個抗腫瘤血管生成藥物。本研究採用腹腔注射方式，於施打雷射前一天給予 80 $\mu$ l 的 25mg/ml Avastin®，然後再於前三小時再給一次等劑量的藥劑，作為前處理。施打雷射後，則每日固定在施打雷射前三小時給藥，直到進入生長期或持續到採樣結束的第 21 天。

Zaltrap® 是一種擁有類似 VEGFR1 與 VEGFR2 結構的重組融合蛋白，注入體內後如同可溶性游離受體，可用類似 Avastin® 作用的原理結合 VEGFA、VEGFB 和 PlGF (79)。採用皮下注射方式，於施打雷射前一天給予 40 $\mu$ l 的 25mg/ml Zaltrap®，再於前三小時給一次等量藥劑作前處理。施打雷射後，則每日固定在施打雷射前三小時給藥，直到進入生長期或持續到採樣結束。

#### 2.8.5 受體酪氨酸激酶 (RTKs) 路徑抑制

Sunitinib (Suntent®) (Pfizer, USA) 是通過靶向多個受體酪氨酸激酶來抑制細胞信號的抑制劑，根據目前的發現，他至少能抑制 VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、PDGFRA、PDGFRB、c-Kit、Flt-3、CSF-1R、RET 等 (80, 81)。

藉由此藥物，可抑制受體上的 RTK 訊號傳遞路徑來減少血管新生相關因子表現量。由於 Suntent® 為一口服藥物且須控制攝入量，因此採用管餵的方式給藥。本研究於施打雷射前一天給予 80mg/Kg Suntent®，然後再於前三小時再給一次等劑量的藥劑，作為前處理。施打雷射後，則每日固定在施打雷射前三小時給藥，直到進入生長期或持續到採樣結束的第 21 天。

## 2.9 細胞分選 (Cell Sorting)



- I. 準備冰桶，並將 10 公分 Dish 至於冰上，倒入 1X PBS 備用。將小鼠犧牲後取下施打雷射後的皮膚泡於 PBS 中洗滌。
- II. 使用磨鈍的手術刀，將脂層刮除後置回 PBS 中，待所有樣品處理完。
- III. 將完全解凍的 10X Trypsin 與 1X PBS 以 1:1 比率稀釋，並在新的 10 公分 Dish 上倒入約 10ml 後，將皮放入並移入 37 度培養箱的搖晃盤上 35 分鐘，待酵素反應。
- IV. 加入等體積 10ml 的 5% FBS (與 1X PBS 稀釋) (Gibco, USA) 中和 Trypsin 反應，並刮皮數次，將細胞刮下。
- V. 準備孔徑大小 70 $\mu$ m 的 Strainer (SPL, Korea)，架於 50ml 離心管上。將刮下後的混和液以 Pipet-Aid 混和均勻並吸取滴於 Strainer 上。完成後再取 40 $\mu$ m 的 Strainer，繼續過濾。完成後加入 5% FBS 讓各管等高。
- VI. 把各管以 4 度離心機 300G 離心 10 分鐘。去除上清液。
- VII. 依 Pellet 大小加入 5% FBS 回溶並將各相同處理者混為一管後，依照所需染色的組別數均分至各管。
- VIII. 以 5% FBS 照所需抗體建議之稀釋比例稀釋取出對應量後加入，並置於冰浴中避光搖晃 30 分鐘染色。
- IX. 準備 Filter 管，並使用 5% FBS 清洗後倒出清洗液並預冷。染色結束後補充 5% FBS 至各管等高，並以 4 度離心機 300G 離心 10 分鐘。
- X. 去除上清液，將 Propidium Iodide (PI) 以 1:200 的比率與 5% FBS 稀釋，並取 150 $\mu$ l 回溶各管。
- XI. 將回溶後的液體流過 Filter，進入 Sorting 用之管子，即可至於冰上等待上機。使用分析的儀器為流式細胞儀 (FACS Aria III) (BD, USA)，根據抗體表現蒐集特定細胞，並萃取 RNA、反轉錄為 cDNA。參考方法為 MessageBOOSTER™ cDNA Synthesis from Cell Lysates Kit Protocol。



## 第三章、實驗結果

### 3.1 確立雷射傷口促進毛囊再生之 C57BL/6 小鼠實驗模型

經由先前的實驗，本研究已經確定以第二代飛梭雷射給予 C57BL/6 小鼠微傷口刺激，在一定總能量以上後可促進毛髮提前進入生長期，且以 15 mJ X 1048 MTZ 刺激的效果最為優良。本研究再度使用這個單位與能量的組合，確定施打購買自國家實驗動物中心的 8 週 C57BL/6 母鼠後，與自然週期的毛髮生長狀況比較（圖 3.1）。

從實驗結果中可以看到，沒有經過任何處理的小鼠除了有些微因週期不準確而提前進入生長期的小區域之外，毛囊幾乎都處於休止期的狀態；而經過 15 mJ X 1048 MTZ 的雷射施打後的 C57BL/6 小鼠大約從施術後的第 9 天開始就可在外觀上看到有小區域進入生長期的現象。當第 14 天時已經幾乎整個施打雷射的區域都已進入生長期。由此可知，此能量組合的飛梭雷射確實能有效地促進休止期的毛囊提前進入生長期。

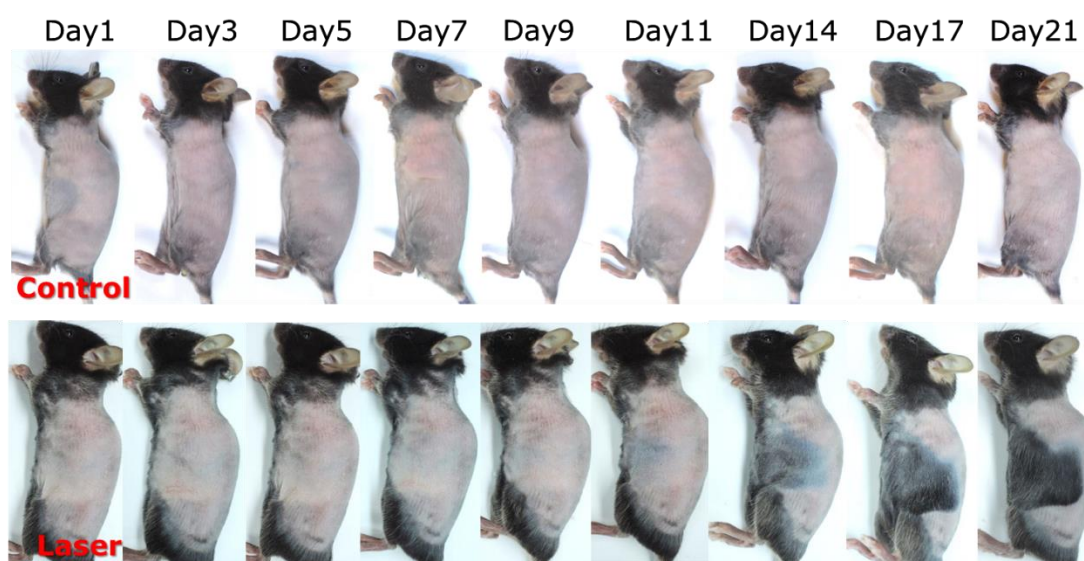


圖 3.1 雷射光束 15mJ X 1048 MTZ 對毛髮週期之影響

（施打雷射過後的小鼠約在第九天可於皮膚上觀察到變黑的現象，對照組則無）

### 3.2 探討雷射微傷口對皮膚組織結構之影響

在前一小節，本研究從巨觀上確定了飛梭雷射在本研究選定的能量下確實有誘導毛髮進入生長期的效果後，便進一步以 H&E 組織染色的方式，針對幾天數確認在染色下是否也能看到提前生長的情況（圖 3.2）。本研究可以看到在第五天的時候就明顯可以看出未處理組與處理組的毛囊型態差異，確定了毛囊確實會提前生長且仍保有正常型態。

接著本研究便挑選連續的天數，觀察毛囊與表皮組織經由雷射刺激後的連續變化（圖 3.3、圖 3.4）。由於本研究所著重的在於進入生長期前所產生的變化，因此取樣時間將止於進入完整生長期之前，通常不會收取在此之後的時間點樣本。

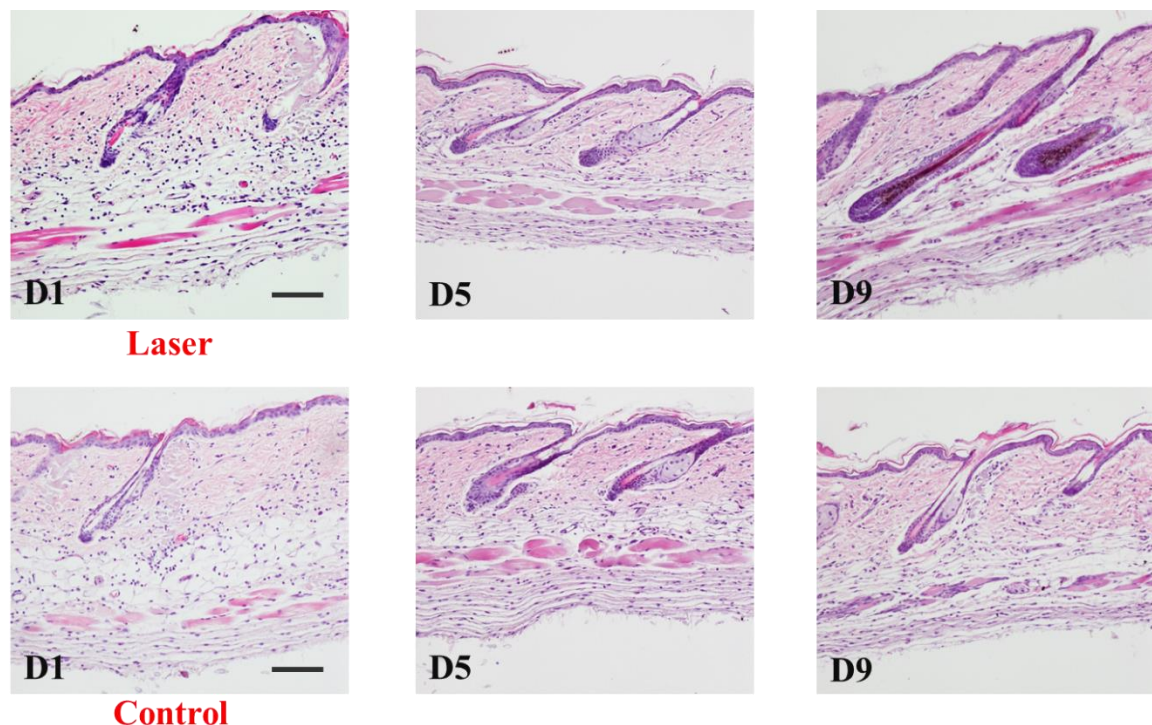


圖 3.2 受雷射刺激組與控制組之部分天數 H&E 比較圖

(Scale Bar = 100 $\mu$ m)

### 3.2.1 皮膚變化

本研究以施打雷射的日子算起，收取未施打雷射（對照組）與施打雷射兩個組別的第一、第三、第五、第七、第九與第十一天來做連續觀察組織學上的變化。

在未受雷射刺激的對照組中（圖 3.3），可以看到表皮層基本上都維持在相同的厚度，沒有特別增厚的情況。同樣地，本研究在真皮層與皮下組織層也能看到類似的情況，整體皮膚的厚度亦維持在相近的範圍。

在受雷射刺激的組別中（圖 3.4），可觀察到表皮層在 Day5 與 Day7 有較明顯的增厚情形，此現象在 Day9 後逐漸趨緩，Day11 時已幾乎恢復原來的厚度。而在真皮層方面，經由雷射照射後的真皮組織厚度皆厚於對照組，且可在 Day1 時明顯看到經過飛梭雷射燒灼後被破壞的真皮組織與毛囊。此雷射損傷在第五天後將變得較難觀察到。

另外，本研究在雷射組別的 Day1 樣本中也可看到真皮層有明顯的免疫浸潤現象，即有許多細胞核被標定在真皮層與皮下脂肪層，代表著可能有諸如嗜中性球、巨噬細胞等免疫細胞在此表現。此現象消退的速度十分快，在 Day3 時已幾乎看不到免疫浸潤的現象。

### 3.2.2 毛囊變化

比較實驗組與對照組，可發現兩者透過組織染色所見的外觀上，在 Day3 之前無明顯差異，但在 Day5 就能發現次級毛胚已有顯著生長的現象，逐漸包覆真皮乳突細胞。而在 Day7 時已可見到明顯的毛囊球（Bulb）的結構，毛囊持續往下生長。在 Day9 時，毛囊的結構已趨於完整，至 Day11 時仍繼續生長增長；相對地，對照組的毛囊則幾乎一直處於穩定的休止期狀態（圖 3.6）。



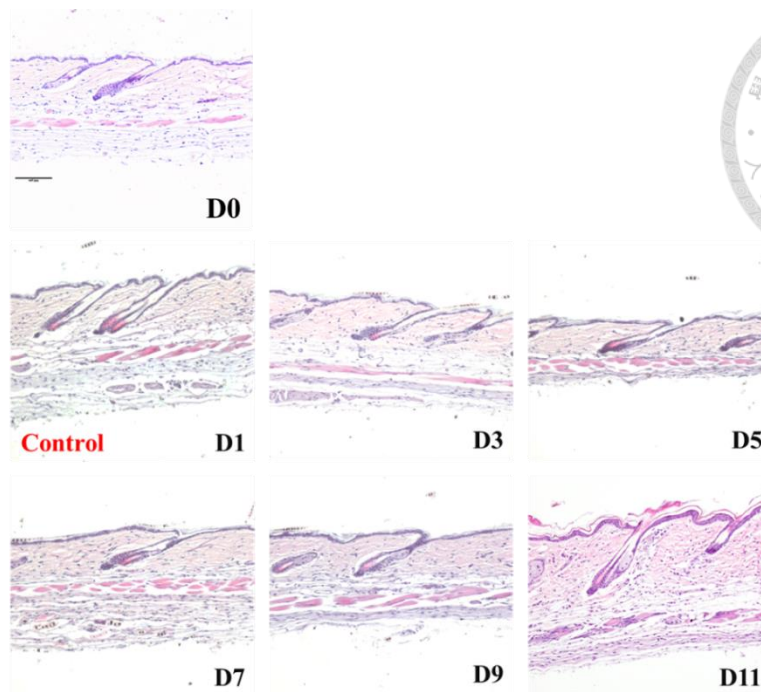


圖 3.3 未受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 H&E 圖

(無施打雷射的組別毛囊至 11 天都維持休止，Scale Bar = 100 $\mu$ m)

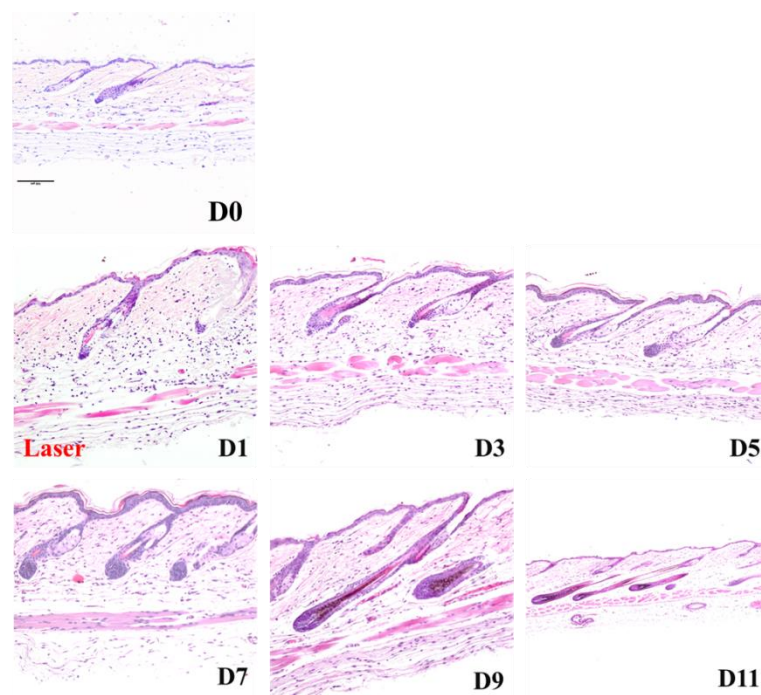


圖 3.4 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 H&E 圖

(施打雷射組在第 5 天時已能明顯看到毛囊進入生長期，Scale Bar = 100 $\mu$ m)

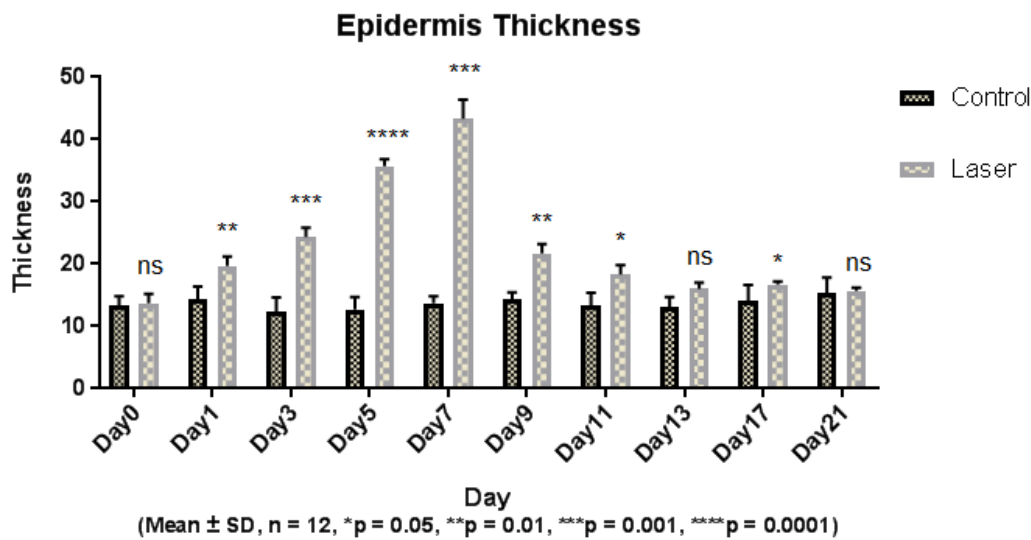


圖 3.5 受雷射刺激與對照組之 C57BL/6 小鼠兩側表皮厚度定量

(經由雷射刺激後小鼠的表皮增厚現在第七天最明顯，而後退減至一般情況)

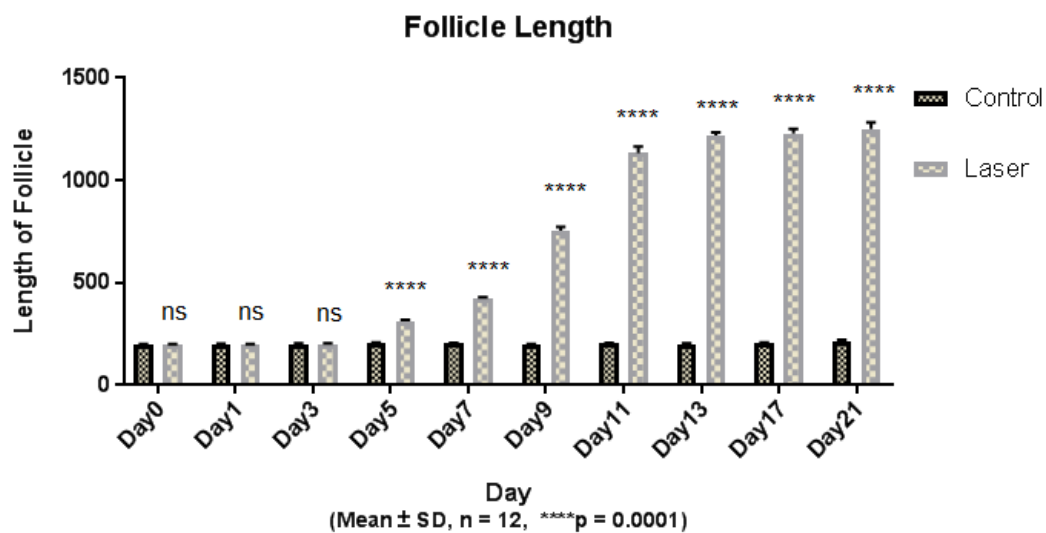


圖 3.6 受雷射刺激與對照組之 C57BL/6 小鼠兩側毛囊長度定量

(經由雷射刺激後小鼠的毛囊長度在第五天起顯著增長，第十一天約達最長)

### 3.3 探討雷射微傷口對毛囊幹細胞之影響

在前兩小節，本研究從外觀與組織切片染色確定了休止期毛囊經一定刺激後確實會提前進入生長期，接著便想了解，在毛囊生長起始過程中扮演重要角色的毛囊幹細胞與次級毛胚，究竟在反應中被活化的先後順序為何。未達此目標，本研究使用免疫螢光染色搭配標定特定蛋白的抗體來觀察各個表現的連續變化。

#### 3.3.1 雷射刺激誘導毛囊幹細胞增生

BrdU 能標定進入分裂期的細胞，而 Cytokeratin 15 (K15) 則能標定 Bulge Stem Cell 的細胞，在生長期時，幹細胞會有活化增生情形。本研究將兩者雙染後觀察螢光情況是否有重疊，可了解毛囊幹細胞從什麼時候開始增生 (圖 3.7)。

根據之前的 H&E 染色，本研究知道在 Day9 時毛囊已明顯進入生長期的中後段，而本研究關心的是在初進入生長期的現象，因此本研究收取 Day1、Day3、Day5 和 Day7 的時間點作觀察。

從 3.7a 圖可以發現，在 Day1 時幾乎沒有任何 BrdU 表現，而從 Day3 開始，毛囊出現 BrdU 表現，但尚未與 K15 重疊。此時也可發現在表皮與真皮層有 BrdU 表現，這顯示了可能是為了修補因雷射的傷害而開始產生修補性質的細胞分裂。在 Day5 時，毛囊明顯開始生長，且也能看到 K15 與 BrdU 有重疊的現象，表示在受到此能量的飛梭雷射刺激情況下，原位於休止期的毛囊，在施術後第五天毛囊幹細胞已開始增生，位於生長期初期。另外從 3.7b 圖中的 Day3 也可看到受損毛囊表現大量 BrdU，代表著生長情況快於未直接受影響之毛囊。顯示直接受到刺激與否對於毛囊生長情況會產生不同程度的影響。

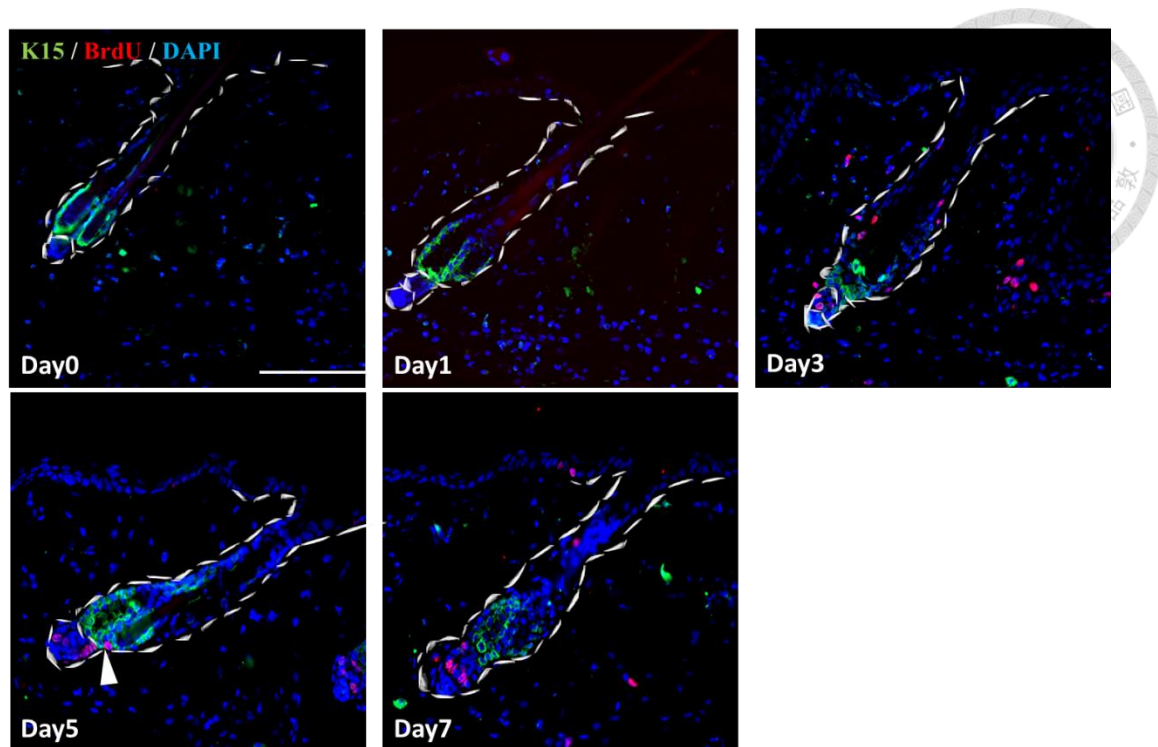


圖 3.7 (a) 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚毛囊 K15 與 BrdU 染色圖  
(白箭頭表示 K15 與 BrdU 雙染之細胞，表示幹細胞增生，Scale Bar = 100 $\mu$ m)

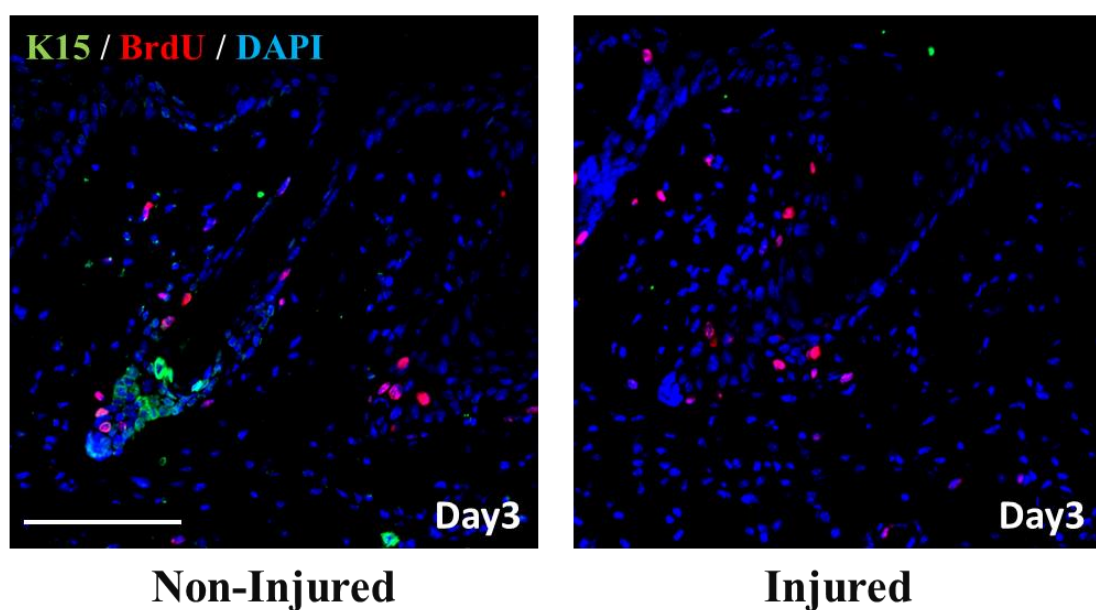


圖 3.7 (b) 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠受損毛囊 K15 與 BrdU 染色圖  
(受雷射刺激之毛囊增生情況明顯多於未受傷害之毛囊，Scale Bar = 100 $\mu$ m)



### 3.3.2 雷射刺激誘導次級毛胚增生

BrdU 能標定進入分裂期的細胞，而 P-cadherin 則能標定次級毛胚 (Secondary Hair Germ)，在生長期時，次級毛胚會有活化增生情形。本研究將兩者雙染後觀察螢光情況是否有重疊，可了解次級毛胚從什麼時候開始增生 (圖 3.8)。

透過實驗結果，可以發現從 Day3 開始次級毛胚開始表現 BrdU，表示從此時開始次級毛胚開始增生，並且隨著天數累積，毛囊往下身長、次級毛胚增生的現象越發增加。此現象指出休止期毛囊在接受雷射刺激後，Day3 起便已準備進入生長期。另外，在 Day3 的結果中也可看到受傷損毛囊的次級毛胚表現大量的 BrdU，如同前小節，指出受損的毛囊生長得更加快速。

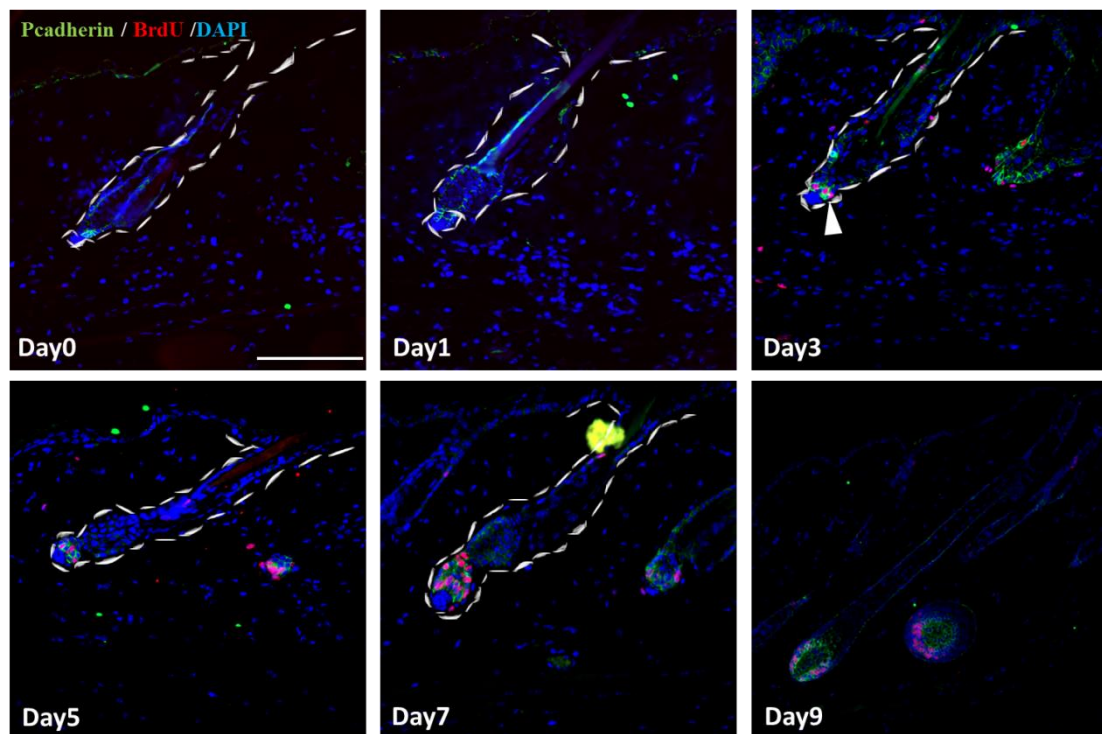


圖 3.8 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 P-cadherin 與 BrdU 染色圖

(白色箭頭表示 P-cadherin 與 BrdU 雙染之細胞，Scale Bar = 100µm)



### 3.3.3 雷射刺激誘導毛囊由休止期進入生長期

淋巴增強序列因 (Lymphoid enhancer-binding factor 1, Lef1) 是 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊號傳遞路徑中相當重要的調控蛋白質之一，且 Wnt 訊號調控了細胞的生長、分化與發育等重要機能，也是活化真皮乳突細胞的關鍵。在毛囊生長期時，毛囊會大量表現 Lef1，而在休止期與衰退期則相對低表現量 (82)。

藉由雙染代表分裂期的 BrdU 與生長期有高表現的 Lef1，本研究可以進一步以 Lef1 提高表現量的時間來佐證前兩節毛囊幹細胞與次級毛胚提前生長的現象，證實幹細胞與生長訊號都有符合在生長期時的表現 (圖 3.9)。

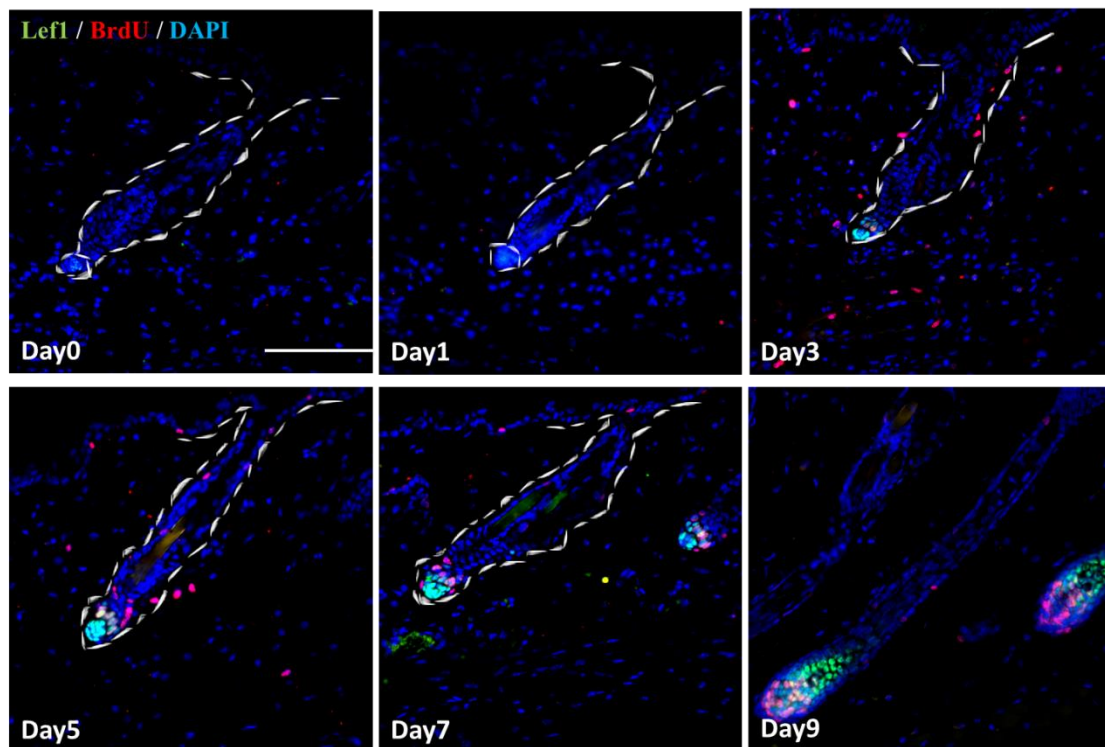


圖 3.9 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 Lef1 與 BrdU 染色圖

(Lef1 自 Day3 有顯著提高表現，Scale Bar = 100 $\mu$ m)

### 3.3.4 雷射刺激對皮膚細胞之細胞週期影響差異

BrdU 能標定進入分裂期的細胞，而 Ki67 則能標定細胞分裂周其中除了 G0 停止期之外的階段 (83)，標定的範圍比 BrdU 更廣泛。Ki67 表現代表處於有絲分裂週期中，因此當其開始表現時可視為一種啟動細胞週期的特徵，但未必會進一步細胞分裂增生，然 BrdU 表現則表示該細胞正在增生 (Proliferation) 中。透過雙染此兩種標誌，本研究可以判斷皮膚各層與毛囊在受到雷射導致的微傷口刺激後進入細胞週期與分裂的先後與分布狀況如何 (圖 3.10)。

從實驗結果圖中，可觀察到雷射後 Day1 的皮膚在真皮層有大量 Ki67 表現，而表皮只有零星數點。在 Day3 時可繼續觀察到表皮與真皮有 Ki67 表現，且此時可見到與 BrdU 雙重表現的細胞出現。此現象在 Day5 逐漸衰退，至 Day7 時已幾乎看不見真皮有 Ki67 與 BrdU 表現，唯表皮仍有許多 Ki67 與極少量 BrdU 表現。配合先前的組織染色圖推測，Day5 前之所以會在皮膚組織出現大量 Ki67 表現，或許是因為雷射所致的傷口之故。當雷射傷害產生，隨之而來的修復需求促使皮膚細胞進入細胞週期，伴隨的便是 Ki67 與 BrdU 先後表現，這也解釋了為何雷射組別的真皮層厚度會大於對照組，以及表皮在此時期有些許增厚的現象。當 Day5 之後，傷口已逐漸修復完成，Ki67 與 BrdU 也逐漸不在表皮與真皮層表現。

毛囊變化方面，Day3 之前是以 Isthmus 與 Suprabasal 作為分界。Isthmus 部分有明顯 Ki67 表現，而 Suprabasal 以下幾乎沒有。在 Day7 前 Isthmus 均表現出明顯 Ki67 標誌，而 BrdU 則於 Day5 逐漸衰退，反應似於表皮。這很可能是毛囊越接近表皮的細胞，其細胞功能就越似於於表皮，因此對於刺激的反應類似的緣故 (圖 3.11、圖 3.12)。Suprabasal 以下，可見 Ki67 於 Day3 時在次級毛胚與 BrdU 有共同表現；於 Day5 大量協 BrdU 表現在 Germ、少量出現於 Germ，並在 Day9 時逐漸充滿整個毛囊球，且可見 Suprabasal 也開始表現 Ki67。此原因或許也是因為 Suprabasal 之細胞相似於 Bulb 之故。

從 3.3 小節的結果可以判斷， Day1 時表皮與真皮組織感受到雷射刺激並準備修復，接著在 Day3 時次級毛胚始進入細胞分裂週期、Day5 時毛囊幹細胞進入分裂週期，毛囊宣告由休止期轉向生長期。

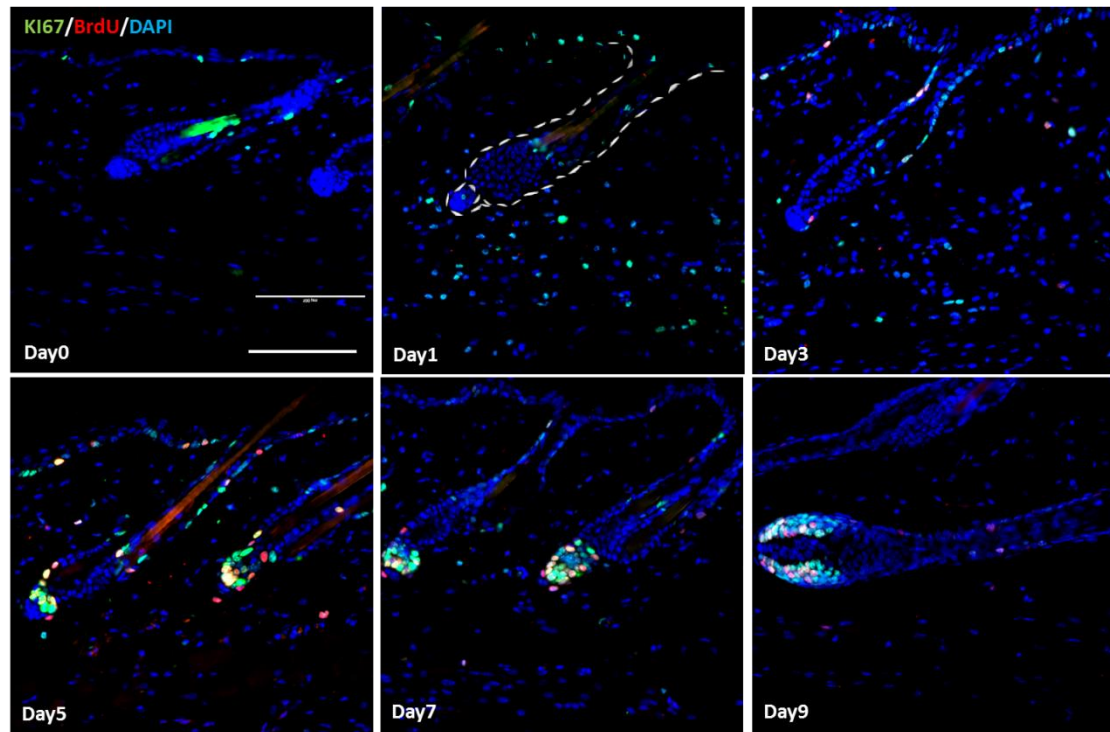


圖 3.10 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 Ki67 與 BrdU 染色圖

(Ki67 從 Day1 起開始在毛囊與皮膚增高表現，Scale Bar = 100 $\mu$ m)

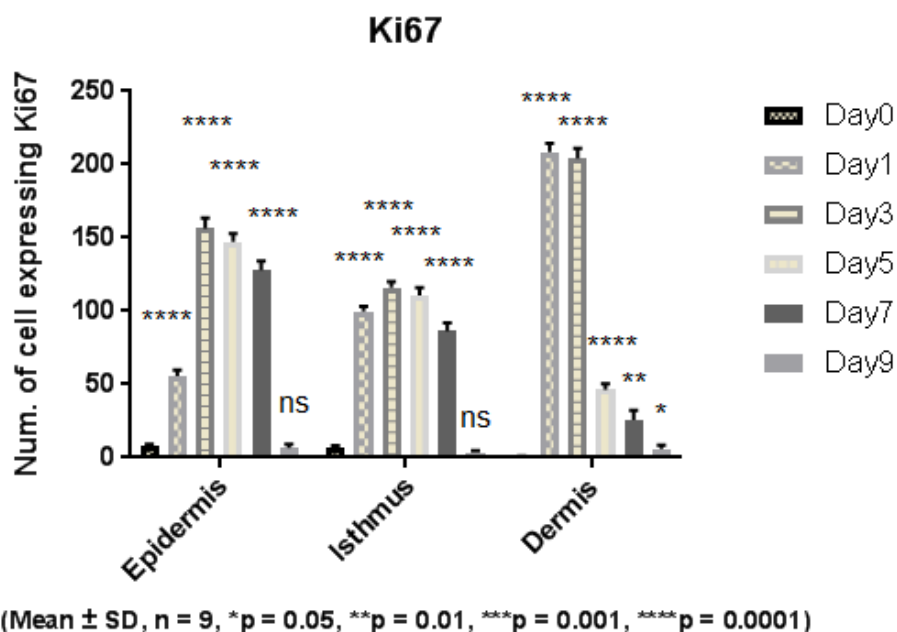


圖 3.11 受雷射刺激之小鼠表皮、Isthmus、真皮之 Ki67 表現與時間關係  
(Epidermis 與 Isthmus 都在 Day1 到 Day7 高表現 Ki67，真皮則在 Day3 前)

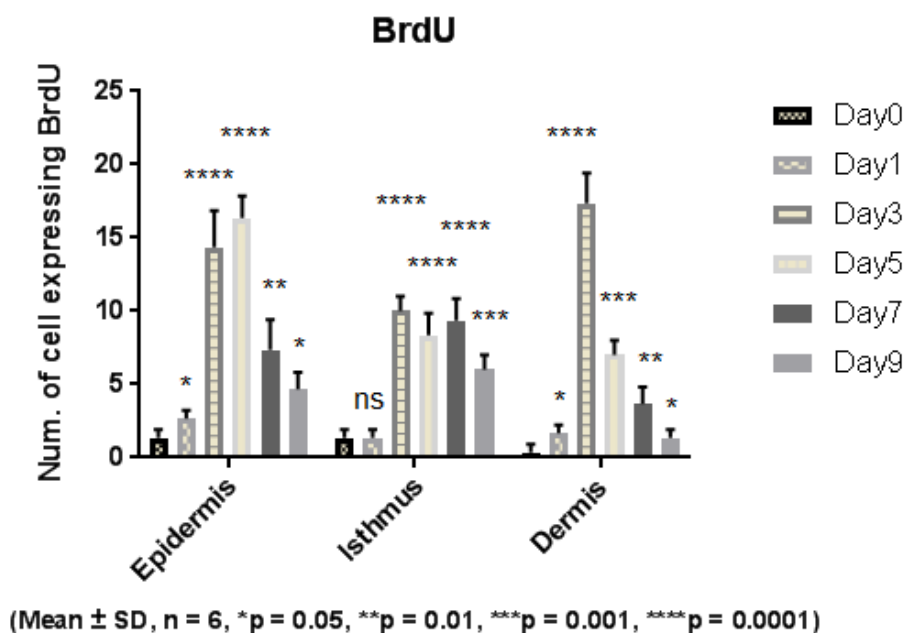


圖 3.12 受雷射刺激之小鼠表皮、Isthmus、真皮之 BrdU 表現與時間關係  
(Epidermis 與 Isthmus 都在 Day3 到 Day7 高表現 BrdU，真皮只在 Day3)

### 3.4 外因性與內因性控制因素

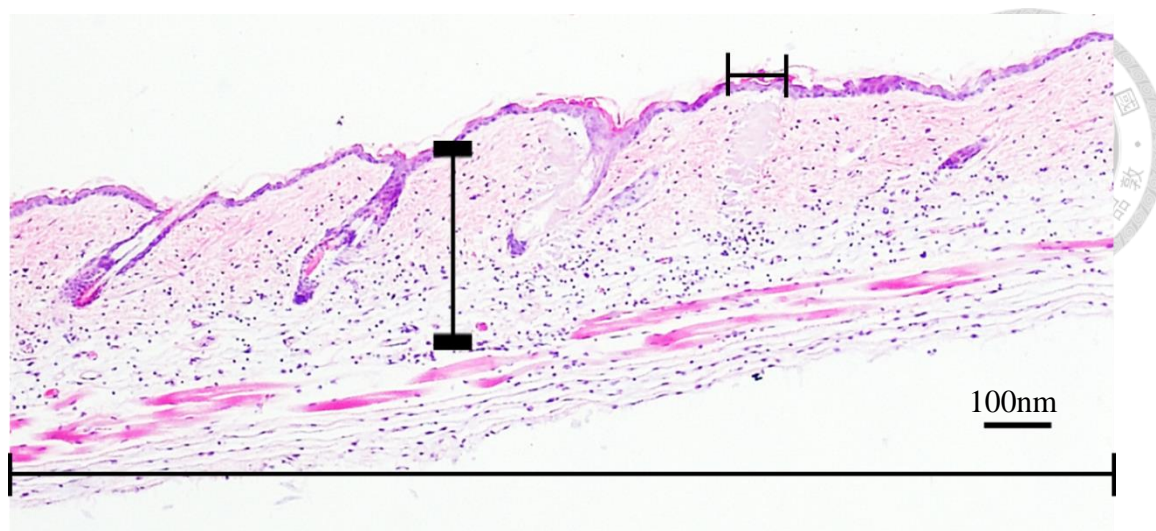
經由前面的討論，本研究發現未直接受到雷射傷害的休止期毛囊從 Day3 起便已準備提前進入生長期，而直接受到雷射損傷的毛囊細胞也有著更劇烈的增生現象。本研究將受損增生歸類為為了修補而產生的反應，即一內因性控制因素，表示為毛囊內部反應直接促使生長；而未受損卻因周遭微環境因子改變影響而提前進入生長期者，則歸類為外因性控制因素，表示毛囊提前生長乃因外界環境導致。類似的分類方式也已有相關文獻整理，如 R Paus 在 1999 年著作就將毛囊生長因子如此分類，外因性如免疫反應或是任何毛囊外的細胞或分泌物；內因性如毛囊本產生的賀爾蒙、細胞激素等等 (84, 85, 86)。

為釐清這點，本研究統計受損毛囊與皮膚佔取樣區域總毛囊與皮膚的百分比數，以確定從外觀上觀察到的整個雷射施打區域最終都進入生長期，是否為該區域絕大多數毛囊都受到雷射損傷所導致。

本研究以 5 $\mu$ m 切片的組織染色為統計對象，將雷射灼燒傷口視作圓錐狀，以靠近表皮處之傷口長度為直徑，計算傷口體積，並以切片皮膚之長度為總長度、表皮至脂肪層為寬度、5 $\mu$ m 為厚度，計算皮膚總體積。兩者相除後可得到受傷區域佔全皮之百分比。在計算每個切片共有多少毛囊，並計算被雷射擊傷之毛囊數目，計算出受傷毛囊占總毛囊數目之比例 (圖 3.13)。

經由計算的結果，本研究可以發現，不論是受傷害的區域或受傷害的毛囊都只佔了整體的少部分，但最後卻是整個雷射區域的毛囊都會提前進入生長期，因此推測促成此現象的原因可能是來自於毛囊外的微環境發生了改變、釋放某些因子，進而使得該區域的所有毛囊無論受損與否皆提前進入生長期。根據先前的實驗結果，本研究發現經過刺激後的皮膚不論從外觀或組織染色都能看到發炎反應，因此決定朝此方面著手探討。





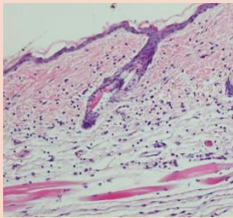
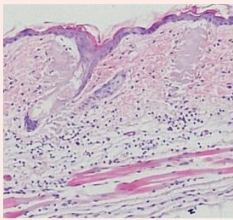
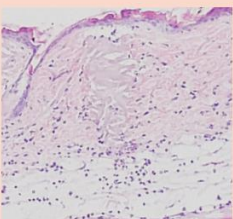
Dose	H & E	Injury Percentage
0		Area : 0 Follicle : 0
13 mJ x 1016 MTZ		Area : $13 \pm 2.08\%$ Follicle : $11 \pm 1.15\%$
15 mJ x 1048 MTZ		Area : $17 \pm 2.51\%$ Follicle : $13 \pm 1.52\%$

圖 3.13 受傷區域與毛囊占整體之百分比 (計算毛囊數  $n = 350$ )

(由統計結果可見，受到雷射直接刺激的表皮與毛囊僅占少部分)

### 3.5 探討雷射刺激誘發發炎與免疫浸潤之情形

#### 3.5.1 發炎與免疫浸潤現象

從 Day1 的 H&E 染色圖，可以得知，C57BL/6 小鼠皮膚在經由雷射刺激後會有皮膚炎反應產生的情形。此時可觀察到角質細胞增厚（Hyperkeratosis）、表皮層增厚等情況，且在真皮層與皮下脂肪層有大量的細胞核表現，表示有為數眾多的免疫細胞浸潤其中。本研究也能注意到此現象並非只集中於受損部分，而是散布在整個真皮層（圖 3.14）。既然此現象為整體性的分布，那麼或許它與促進毛囊提前進入生長期的外因性控制因子有所關聯，因此接下來本研究便想針對幾種發炎相關細胞作探討。

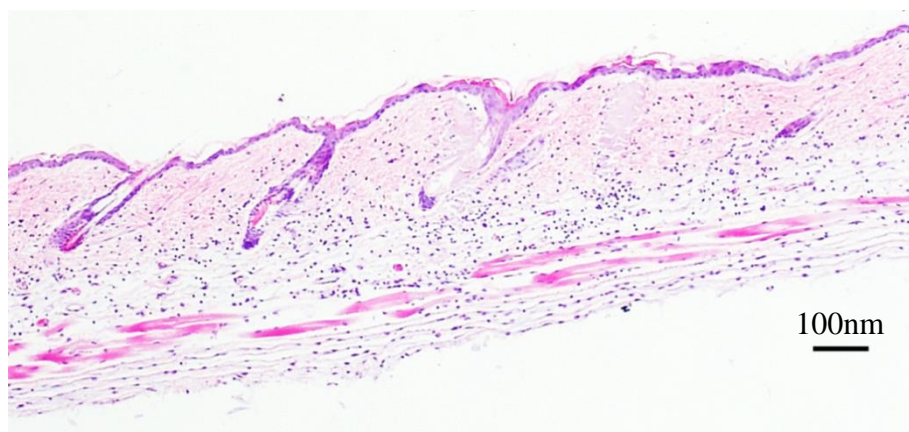


圖 3.14 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠 Day1 時兩側皮膚之 H&E 染色圖

皮膚作為人體防禦的第一道防線，抵禦外來入侵物或感染源的重要手段之一便是透過非專一性的免疫反應，即發炎現象。當外界給予皮膚刺激，角質細胞、內皮細胞等會分泌  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}$  等因子吸引與發炎最為相關的兩種發炎細胞嗜中性球（Neutrophils）與巨噬細胞（Macrophages），內皮細胞還會分泌 VEGF、PDGF 和 PlGF 等與血管新生相關的因子，促使血管擴張，進而使得更多免疫細胞進入（87, 88, 89, 90, 91）。透過螢光染色與一些標誌抗體，本研究能嘗試釐清這些因子在毛囊進入生長期前的表現狀況為何。

### 3.5.2 腫瘤壞死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 表現狀況

當皮膚受到外界刺激時，角質細胞和 Resident 的巨噬細胞會受刺激分泌腫瘤壞死因子- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和白細胞介素 1 族 (Interleukin-1 family, IL-1) 等發炎相關因子，引起血管新生，並吸引單核球、嗜中性白血球等免疫細胞前來的免疫浸潤現象，而活化的巨噬細胞和嗜中性白血球又會繼續分泌 TNF- $\alpha$  來調控免疫反應。也有相關文獻指出由巨噬細胞分泌的 TNF- $\alpha$  會活化毛囊，促進毛囊生長，由此可見 TNF- $\alpha$  與毛囊生長有所關聯 (61, 92, 93)。

經由先前描述的 qPCR 處理與分析步驟，後本研究可以看到，藉由全皮抽取的 RNA 只在 Day1 的時候有快速升高 TNF- $\alpha$  的表現 (圖 3.15)，這點也能從螢光染色圖中再次驗證 (圖 3.16)。表示 TNF- $\alpha$  在經由雷射刺激後的 Day1 會有高度表現，與發炎、免疫浸潤的時間吻合。

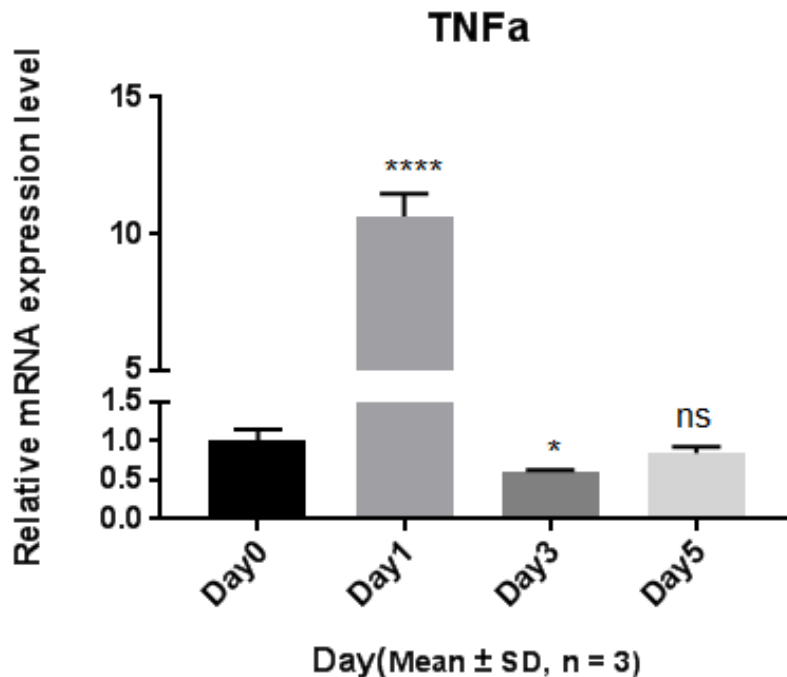


圖 3.15 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚 TNF- $\alpha$  之 mRNA 表現量  
(TNF- $\alpha$  在 Day1 有明顯增高表現，並在 Day3 後衰退至一般水平，\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ )



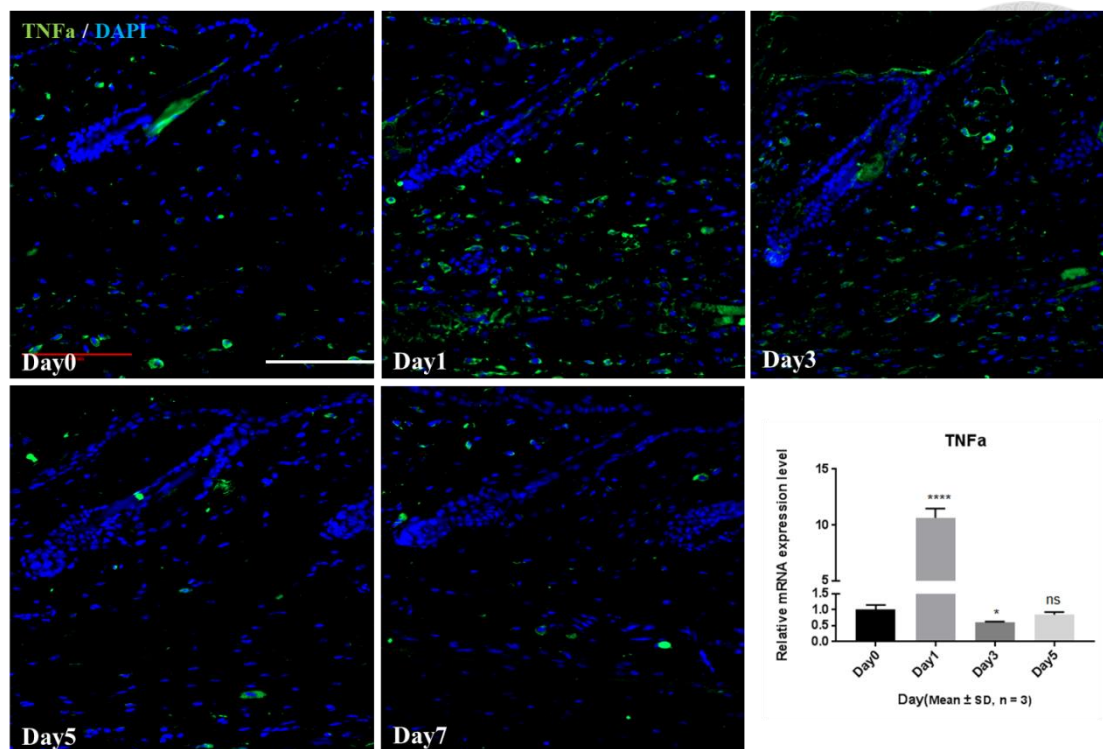


圖 3.16 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚之  $\text{TNF-}\alpha$  螢光染色圖  
( $\text{TNF-}\alpha$  在 Day1 與 Day3 增加最明顯，Scale Bar = 100 $\mu\text{m}$ )

### 3.5.3 白血球介素 1 族 (IL-1) 表現狀況

當刺激皮膚表面時會破壞表皮層的角質細胞，促使角質細胞釋放 IL-1 家族、 $\text{TNF-}\alpha$  等發炎相關因子。已有研究指出在經歷刺激性皮膚炎的組織會大量表現 IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ，並且 IL-1 的受器在發炎期間會於表皮、毛囊等處大量表現，並在發炎過後大量降低 (92, 93)。

從整片接受雷射刺激的皮膚抽取出的 RNA 進行的 qPCR 結果中可以發現，IL-1 $\beta$  在 Day1 時，有明顯的大量表現，並且從 Day3 起急速降低 (圖 3.17)。相同的趨勢也可在 IL-1R 的 mRNA 表現情況中發現 (圖 3.18)。配合 3.5.1 小節，可以得知兩種與發炎相關的細胞激素都在 Day1 時有高度的表現，並在 Day3 快速降低至一般水平。

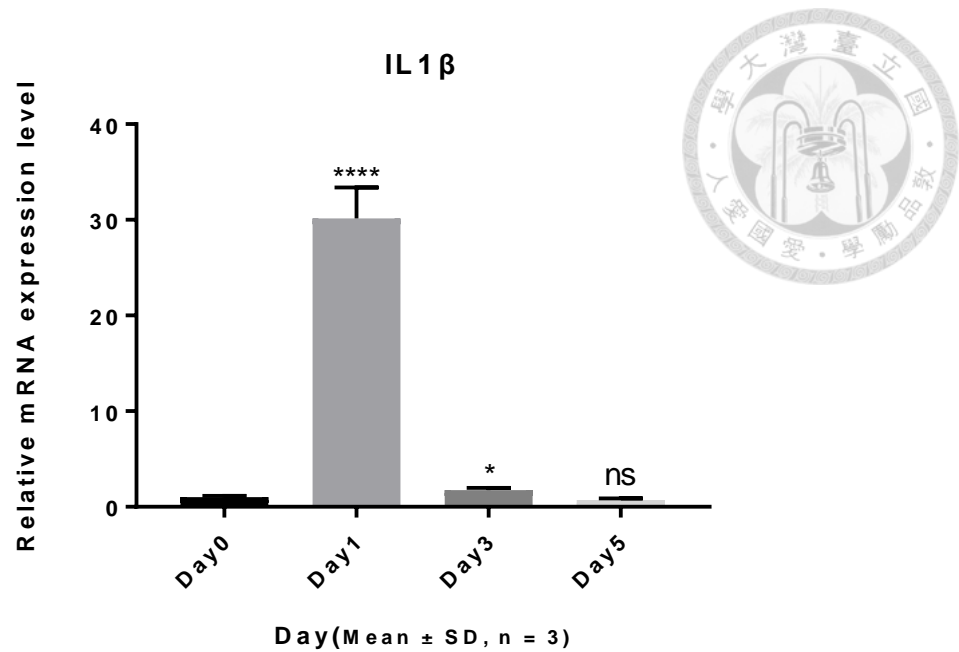


圖 3.17 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚 IL-1 $\beta$  之 mRNA 表現量

(\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ )

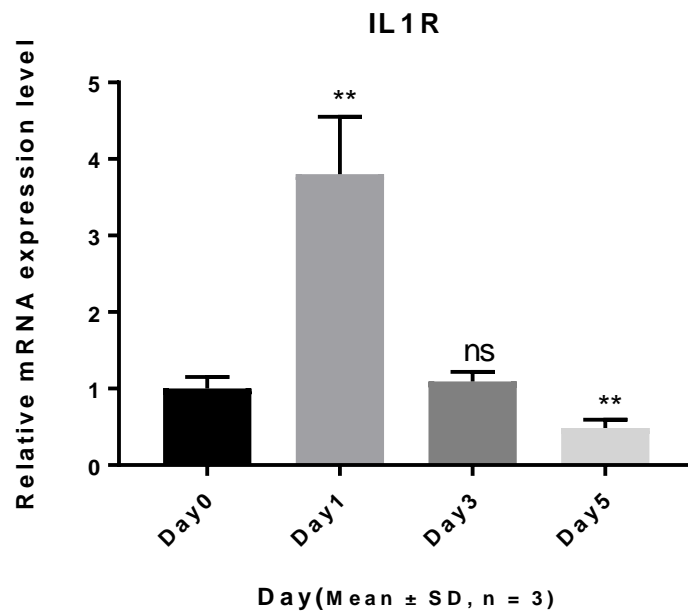


圖 3.18 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚 IL-1R 之 mRNA 表現量

(\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ )

### 3.5.4 血管內皮生長因子家族表現狀況

血管內皮生長因子 (VEGF) 與血管新生 (Angiogenesis)、血管通透性 (Vasculogenesis)、內皮細胞遷移與增生有極大的關聯。其相關家族 (VEGF Family) 包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PlGF1/2 (小鼠僅有 PlGF2) 與其同型體等。VEGF 家族在發炎中佔有重要的地位，在刺激性的接觸性皮膚發炎中可以看到角質細胞與內皮細胞大量表現 VEGF (63, 64, 65, 66, 67)。

從實驗結果 (圖 3.19) 以看到利用全皮抽取的 RNA 除了 VEGFA 在 Day1 有較明顯的提高之外，其他幾乎都沒有太大量的提升，並且四者都從 Day3 起劇烈降低。

針對表現量較高的 VEGFA，本研究也採螢光染色的方式觀察表現結果 (圖 3.20)，可以發現各時間點皆有表現，且在 Day7 之前的時間點並沒有相當明顯的差異。而在 Day9 後表現量之所以會提升，有可能和毛囊在生長期時需要更多的生長因子與營養，因此激發 VEGFs 以促進血管擴張之故 (94)。

總體而言，小鼠在經過雷射刺激之後，在 Day1 時會因發炎現象而使得 VEGF 有較高的表現，其中又以 VEGFA 最為顯著。此現象在 Day5 後逐漸下降，並在 Day9 時再度上升。

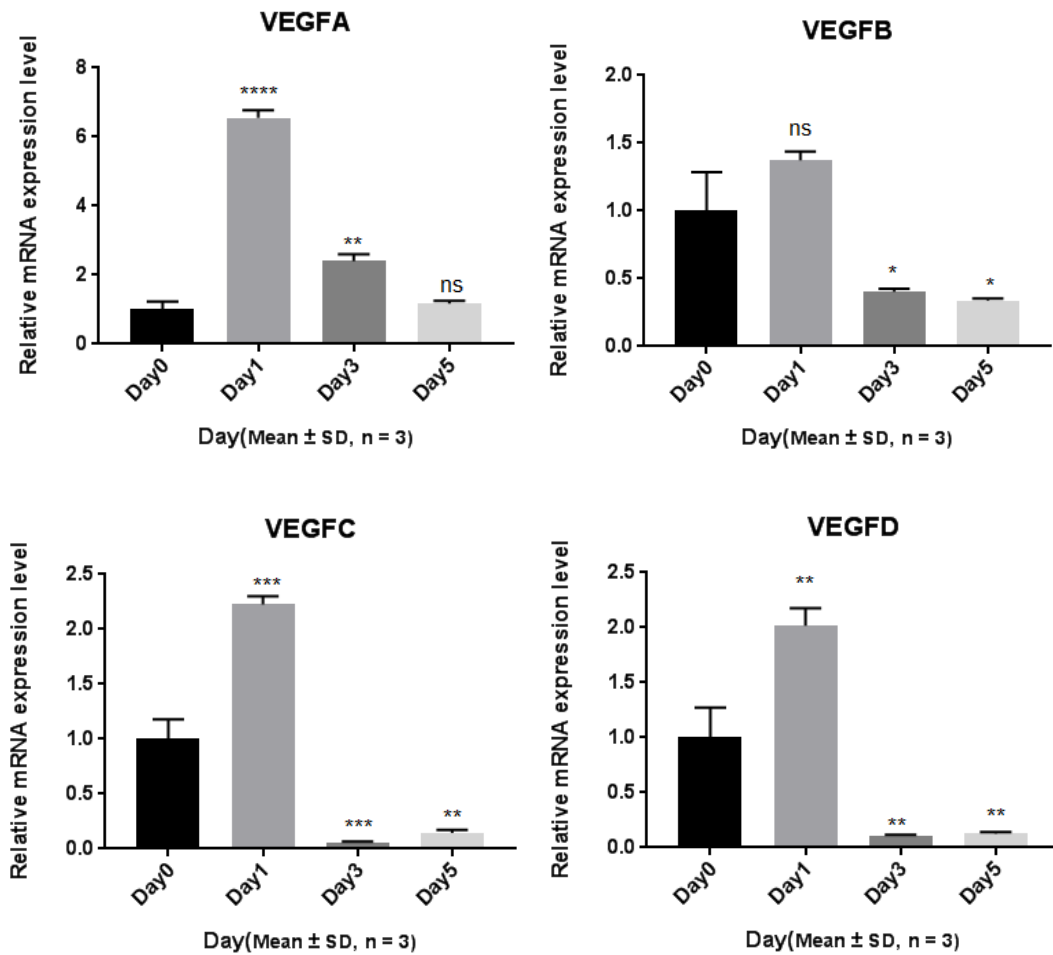


圖 3.19 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚 VEGFs 之 mRNA 表現量  
 (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ )

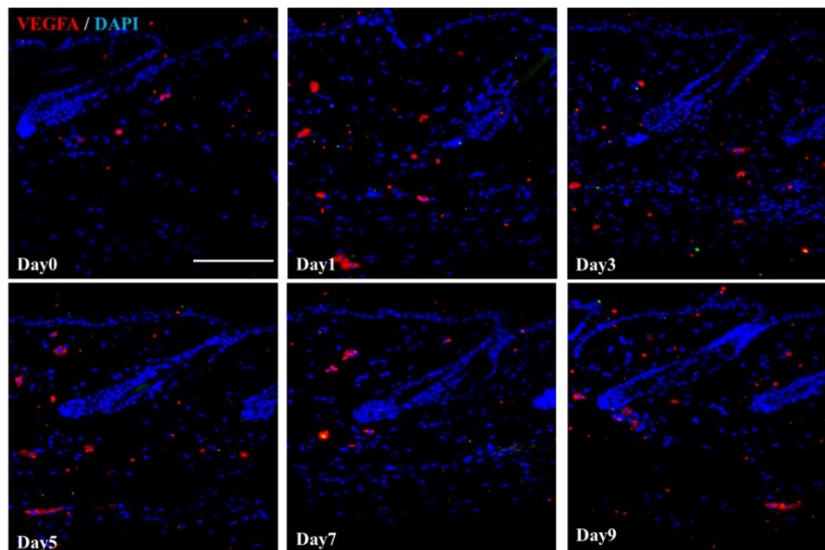


圖 3.20 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚之 VEGFA 螢光染色圖  
 (Scale Bar = 100 $\mu$ m)

而在本研究對 VEGF 家族中的另一個成員 PlGF 作 mRNA 表現的結果 (圖 3.21) 中，可以看到全皮抽取的 RNA 在 Day1 時表現了較高的 PlGF，並且在 Day3 之後減低。

PlGF 在發炎反應中主要是由內皮細胞分泌，並具有調控與誘導 VEGF 與其訊號傳遞的功能 (95,96,97,111, 112) 以及活化與吸引單核球、巨噬細胞的能力 (95, 112)。在先前的討論可看到 Day1 時的 VEGF 有所提高，或許與 PlGF 之提高有所關連。

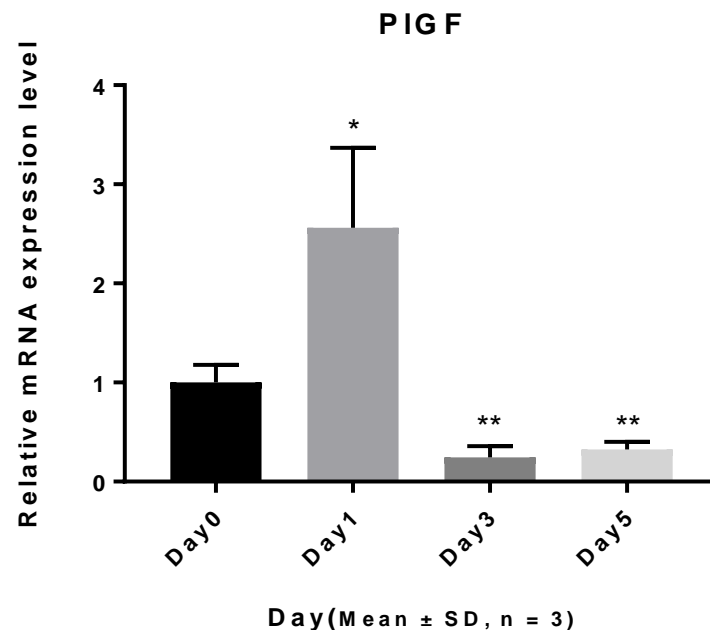


圖 3.21 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚 PlGF 之 mRNA 表現量

(\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ )

### 3.5.5 血小板衍生生長因子 (PDGF) 表現狀況

還有另外一個已知與血管新生和調控細胞生長分化以及傷口癒合的生長因子是 PDGF，它是貯存於血小板 $\alpha$ 顆粒中的一種鹼性蛋白質，主要由血小板製造，但在組織受損時的內皮細胞和巨噬細胞也會分泌。同時，它也具有吸引巨噬細胞

的功能 (98, 99, 100)。

從結果 (圖 3.22) 可以看到，在整體的情況下，PDGF 於 Day1 的時候有提高表現，並在 Day3 後退減至一般水平。

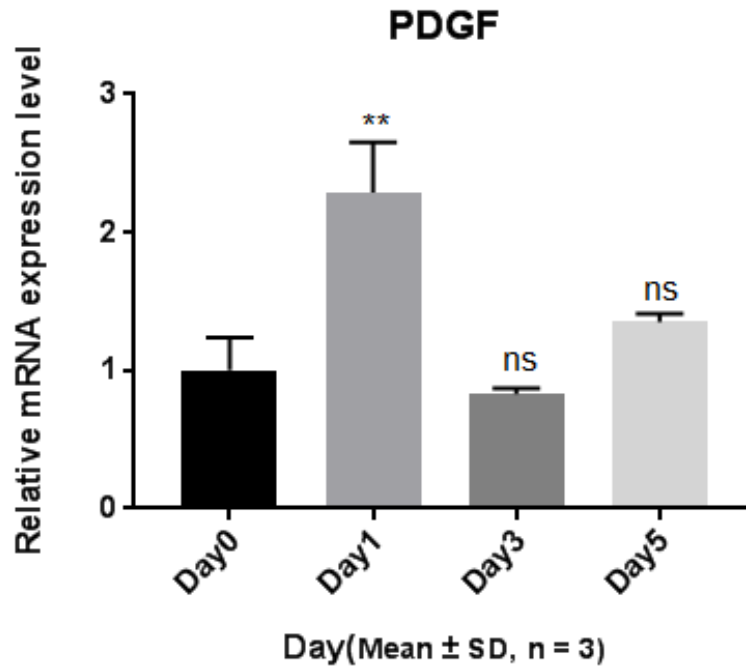


圖 3.22 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚 PDGF 之 mRNA 表現量

(\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ )

### 3.5.6 嗜中性球 (Neutrophils) 表現狀況

本研究使用能中和中性粒細胞表面抗原 Ly6G 的抗體來標定 Ly6G，並收取進入生長期前的天數觀察。從染色結果 (圖 3.23) 可以發現 Ly6G 大量於 Day1 真皮層與皮下組織層，表示在 Day1 發生免疫浸潤時進入的細胞絕大多數都是嗜中性球。且此現象消退的速度十分急遽，在 Day3 時已幾乎無 Ly6G 表現。此結果與全皮抽取的 mRNA 跑出的 qPCR 結果類似，在 D0 時幾乎偵測不到表現、而後在 Day1 快速增高，並在 Day3 後衰退 (圖 3.24)。

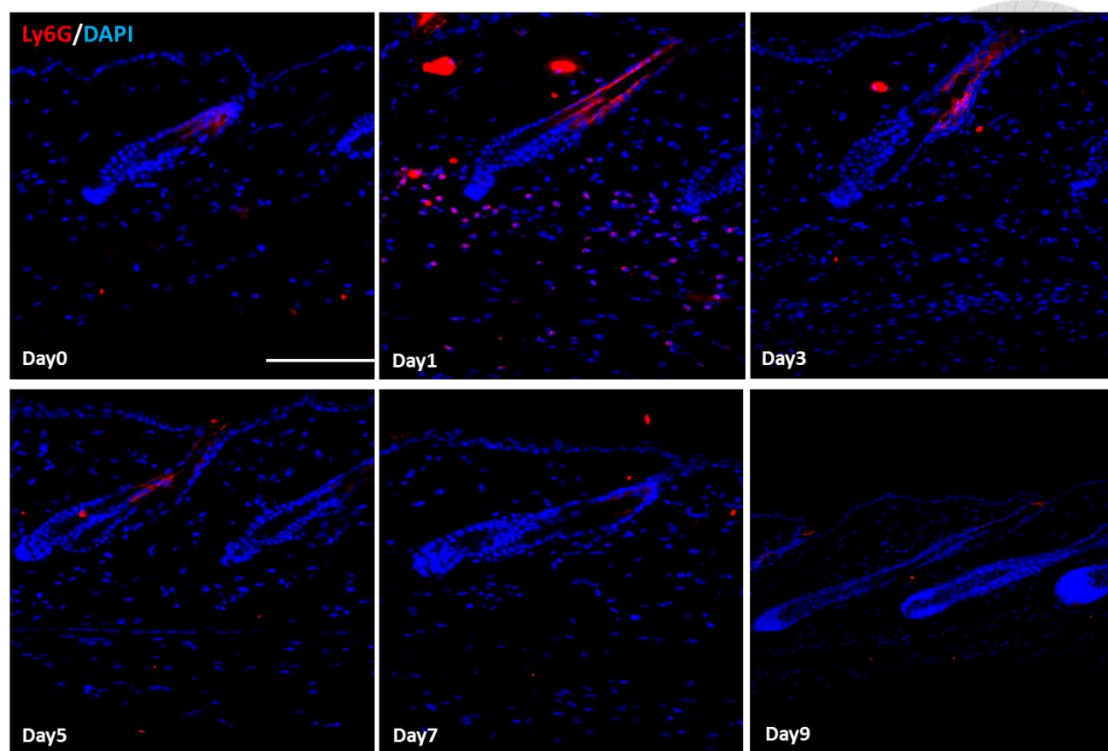


圖 3.23 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 Ly6G 表現圖  
(嗜中性球僅在 Day1 於真皮層大量表現，Scale Bar = 100 $\mu$ m)

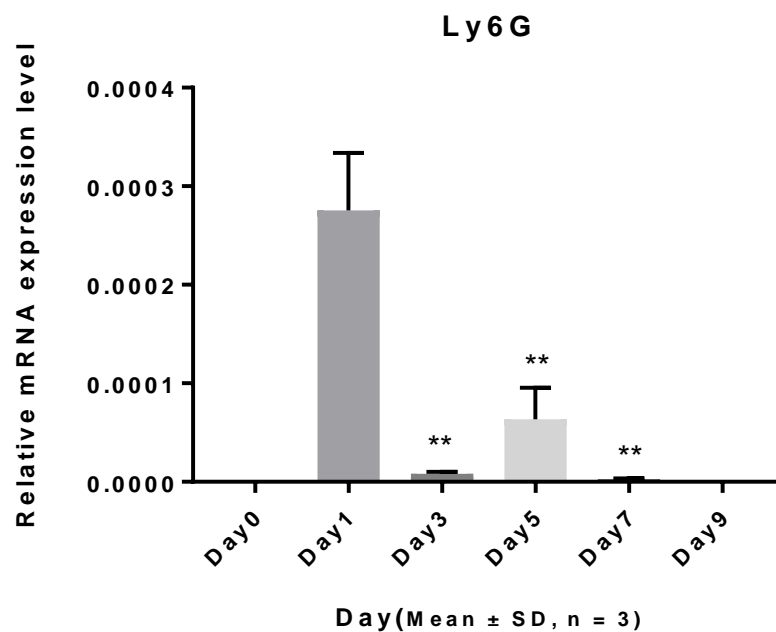


圖 3.24 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚之 Ly6G mRNA 表現量圖  
(相對於 Day1, \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ )



### 3.5.7 巨噬細胞 (Macrophages) 表現狀況

相較於嗜中性球，巨噬細胞是以 F4/80 是成熟小鼠巨噬細胞的表面標誌，本研究可利用抗體標誌此蛋白並藉由冷凍切片的免疫螢光染色觀察巨噬細胞的表現情形。

從冷切染色的結果 (圖 3.25) 可以發現，F4/80 標誌在未受雷射刺激前便已有在皮膚表現，包含表皮和真皮層，其中表皮可能是 Langerhans Cell 存在所致。在經由雷射刺激後，可觀察到 Day3 與 Day5 表皮的 F4/80 表現消失，且真皮組織的 F4/80 表現數量相較之前更為增多，並可看到脂肪層中也有大量表現。然而在全皮抽取的 mRNA 中卻無法看到明顯的表現量增高 (圖 3.26)，這或許是因為巨噬細胞本來占整體皮膚的比例遍不高，且在後期天數時皮膚細胞增生，導致即使巨噬細胞數量增多，在總體細胞數量大量增加的情況下，便無法從 qPCR 的結果中看出增加趨勢、甚至反而會看見降低的情形。

在前一小節裡，嗜中性球經過雷射刺激後快速於 Day1 出現並消退，可能就是為了應對雷射灼燒傷害而產生的急速發炎反應。而中性球數量衰減後，巨噬細胞的數量逐漸在 Day3 起增多，這很可能是因為發炎反應促使組織內的細胞釋出發炎相關因子，使得巨噬細胞被招募 (Recruit) 至組織中 (101)。

總地來說，本研究確實觀察到嗜中性球與巨噬細胞在刺激後會有提高表現的情況，但仍無法確定在此反應中他們是否對毛囊提前進入生長期具有重要性。



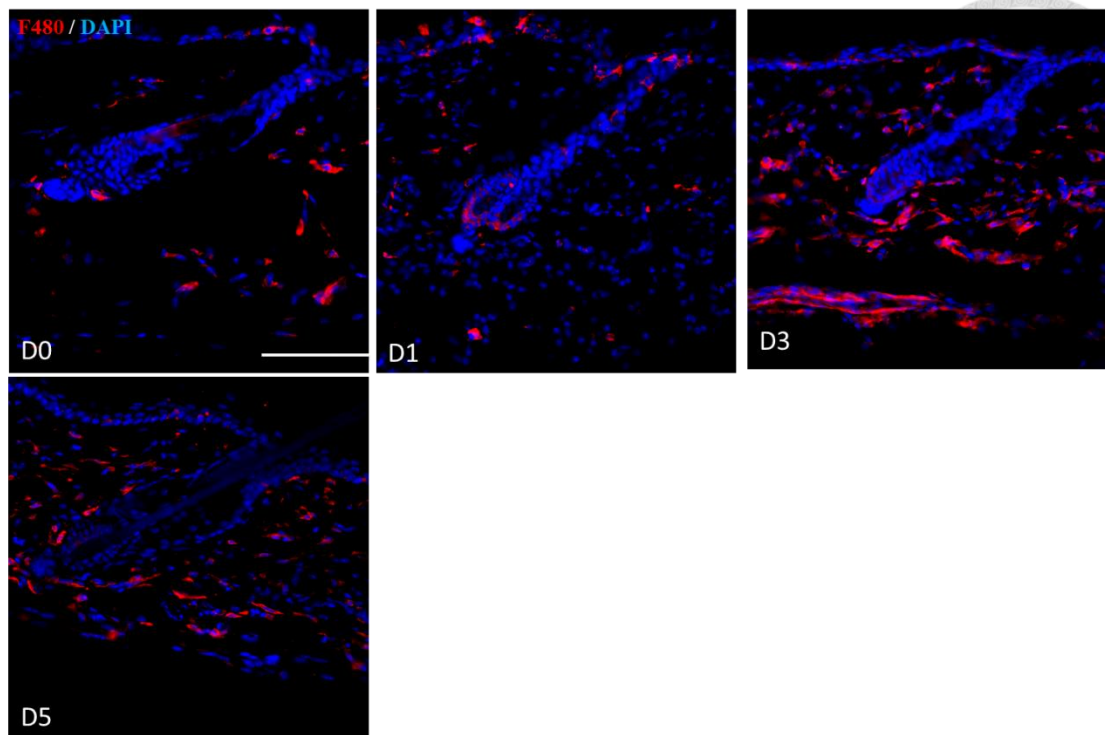


圖 3.25 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 F4/80 表現圖

(F4/80 自 Day3 後提高表現量，Scale Bar = 100 $\mu$ m)

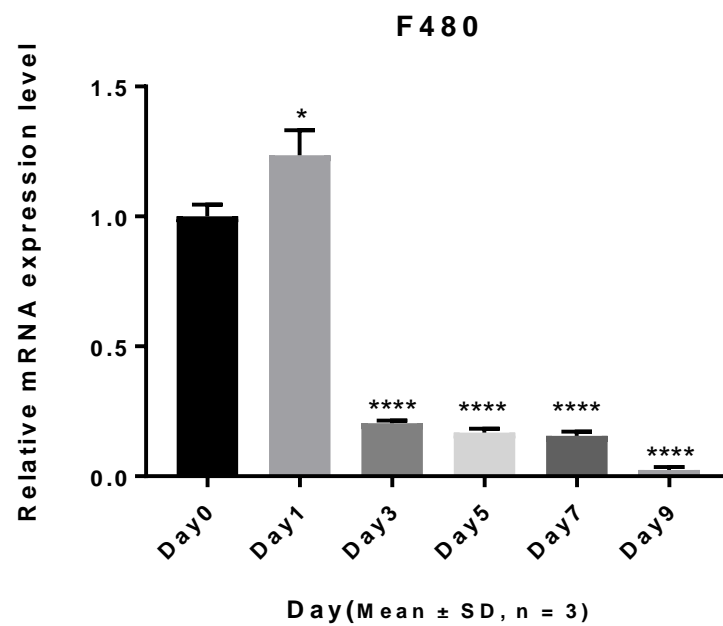


圖 3.26 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 F4/80 mRNA 表現圖

(\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ )

### 3.6 探討發炎相關因子與細胞抑制對雷射刺激促使毛囊生長之影響

為了釐清這些具有高表現的發炎或生長相關因子、嗜中性球與巨噬細胞在促進毛囊提前進入生長期的反應中所扮演的角色，本研究選擇使用具有專一性的抑制劑來降低這些因子的表現，並觀察在小鼠少了某些因子又受到相同能量雷射刺激的情況下，毛囊生長的情況是否有所差異。

#### 3.6.1 腫瘤壞死因子- $\alpha$ 抑制對雷射促毛髮生長反應之影響

在抑制 TNF- $\alpha$  的表現方面，本研究使用的是 TNF- $\alpha$  Knock Out (TNF $\alpha$ -/-) 基因轉殖小鼠，在經由基因型鑑定確認的確為 TNF- $\alpha$ -/- 後，一樣在 8 週時進行雷射實驗，並收取皮膚作染色觀察。

在外觀上 (圖 3.27) 可以見到使用 TNF- $\alpha$  剔除的基因轉殖鼠並施打相同劑量的雷射後，在 Day11 已能看到進入生長期的變黑現象，相較於 C57BL/6 小鼠有大約 2 天的延遲。但觀察到 21 天後仍可看到施打雷射的區域皆已進入生長期的現象。

在 H&E 的染色圖 (圖 3.28) 中可以觀察到毛囊的生長狀況也略有延遲，且在 Day7 時已明顯看到進入生長期的跡象。並且透過定量分析圖 (圖 3.29) 可以觀察到，當將 TNF- $\alpha$  剔除後，免疫浸潤的情形有所減少，且細胞核變得較為集中於雷射傷害附近。

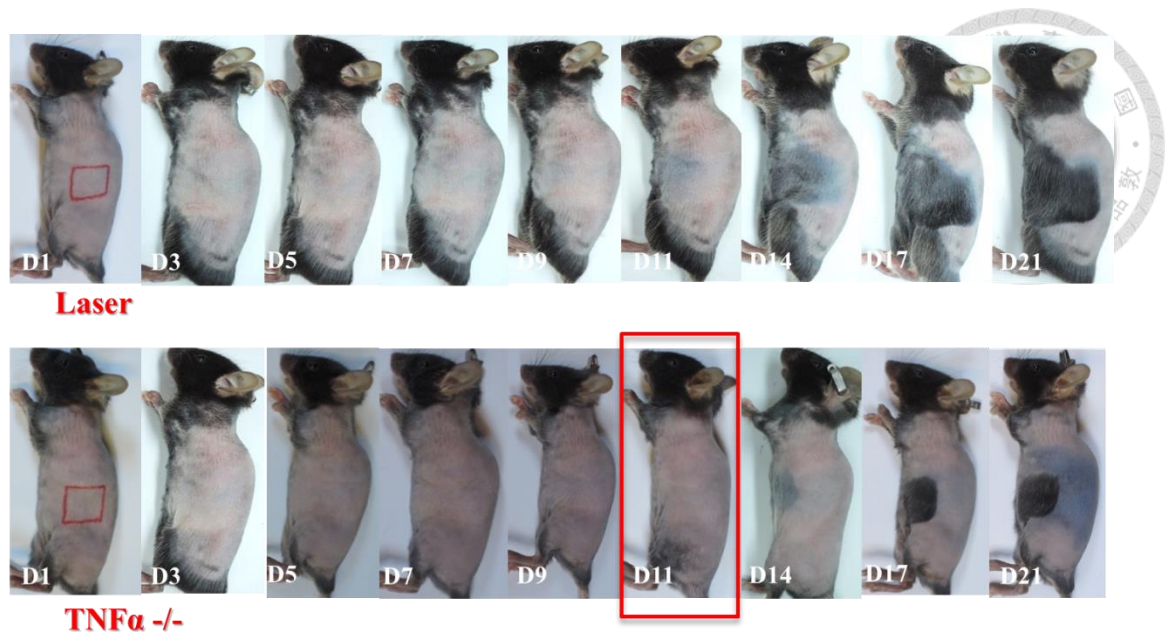


圖 3.27 受雷射刺激之  $\text{TNF-}\alpha$   $-/-$  小鼠與 C57BL/6 小鼠外觀比較  
(膚上紅標記為施打雷射之區域；紅框表示從外觀上可見皮膚變黑之現象)

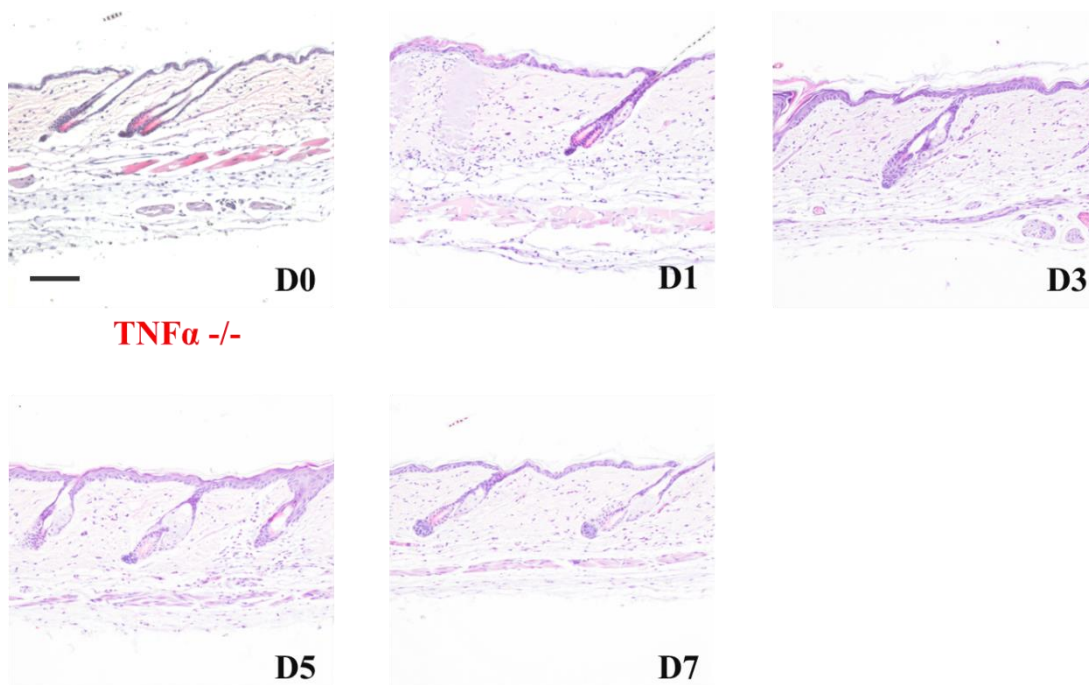


圖 3.28 受雷射刺激之  $\text{TNF-}\alpha$   $-/-$  小鼠與兩側皮膚 H&E 染色  
(Scale Bar = 100 $\mu\text{m}$ )

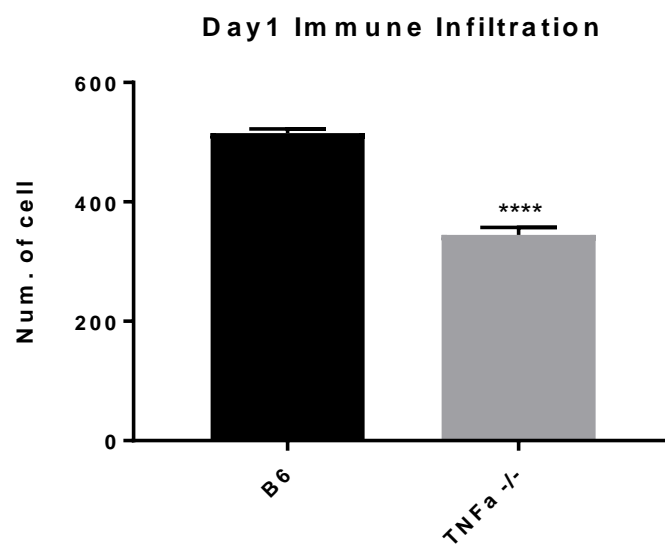
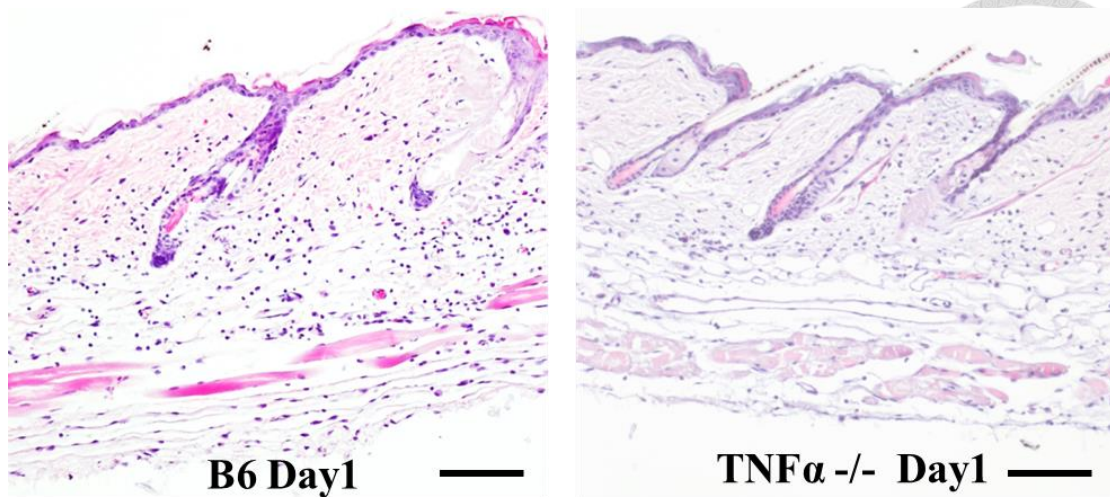


圖 3.29 受雷射刺激之  $\text{TNF-}\alpha$   $-/-$  與 C57BL/6 小鼠免疫浸潤現象比較

( Scale Bar = 100 $\mu\text{m}$ , \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$  )

### 3.6.2 VEGF 抑制對雷射促毛髮生長反應之影響

經由先前的討論得知 VEGF 大致都會在 Day1 上升，其中又以 VEGFA 有最明顯的改變，並在 Day3 時仍有較高的表現。已有多數研究指出，VEGF 對於毛囊生長有所影響，且在早期發炎反應時 VEGF 主要會透過內皮細胞分泌，其他還有 T 細胞與表皮角質細胞亦會分泌，而 VEGFA 在其中佔了絕大部分的比例 (68,69)。因此本實驗接著嘗試以施打藥物的方式抑制 VEGFA，並觀察對於刺激後提前進入生長期時否有所影響。

Avastin 能專一性抑制 VEGFA，而 Zaltrap 可抑制 VEGFA、VEGFB 與 PlGF，阻絕其下游的 RTK 訊號傳遞路徑，並且有效抑制血管新生 (79)。使用在 2.8.4 節描述的給藥方式之後，從觀察毛囊生長的結果 (圖 3.30) 可發現有兩者有明顯的生長時間延遲，Avastin 組直到 Day11 才能在表現上看見進入生長期的情況，並且進入生長期的面積也有很明顯的縮小，然而仍無法完全抑制毛囊提前生長；Zaltrap 組大致也是在 Day11 左右才能從外觀上看到變黑的情況，但對於皮下注射的區域而言，此處理在停止給藥之前都不會在注射藥物處看到進入生長期的狀況，顯示綜合抑制 VEGFA、VEGFB 與 PlGF 能有效抑制提前進入生長期的情況。

本實驗也針對在 mRNA 表現量中有明顯高點的 Day1 作螢光染色，從結果中 (圖 3.31、圖 3.32) 可以看到施打 Avastin 與 Zaltrap 之後能降低 VEGFA 的表現量。另外也收取施打 Avastin 後特定幾個時間點組織染色觀察毛囊型態，可以看到毛囊在 Day14 時已充分進入生長期 (圖 3.33)。



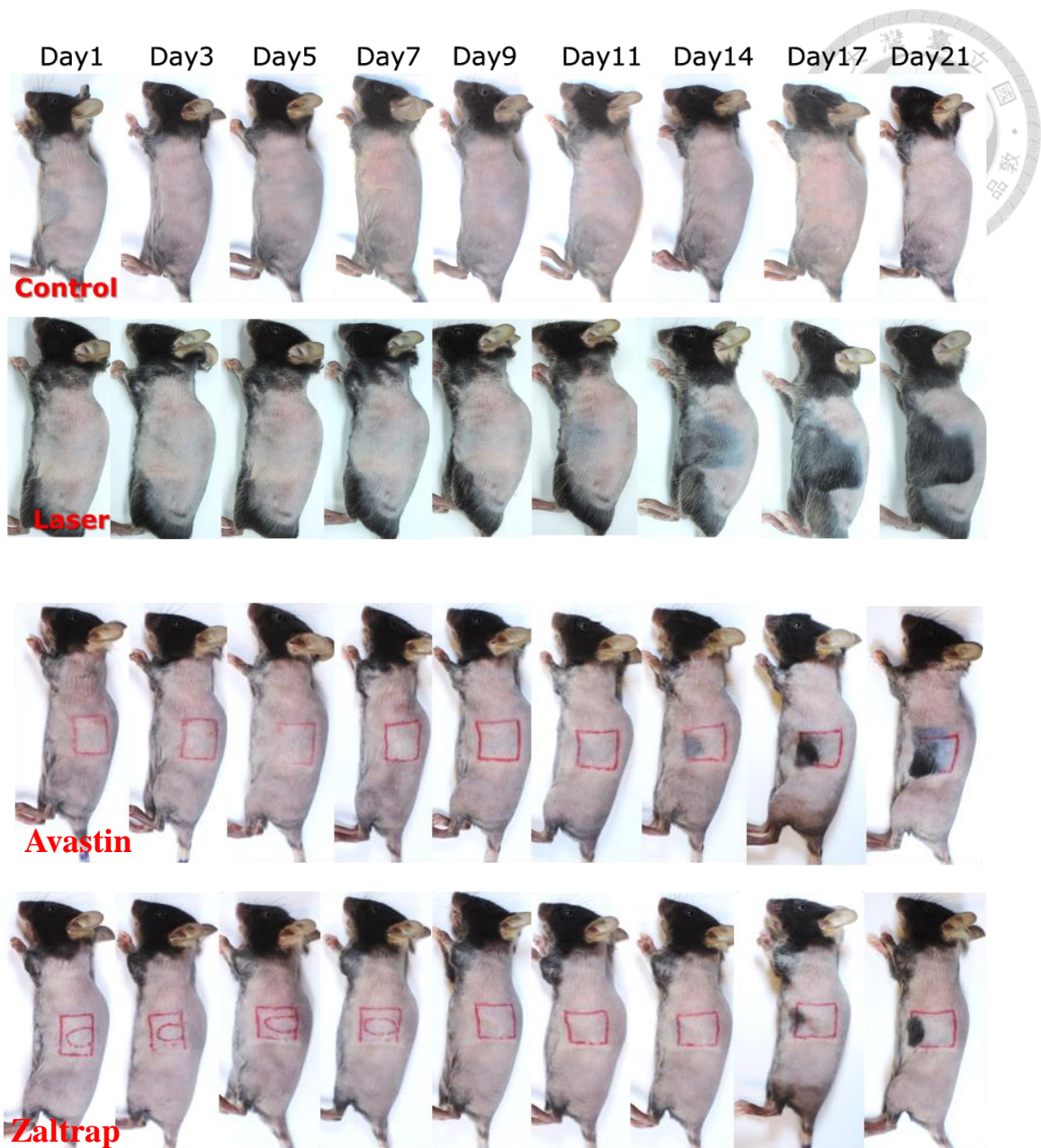


圖 3.30 受雷射刺激之 VEGF 抑制小鼠與 C57BL/6 小鼠外觀比較  
 (皮膚上紅框為施打雷射之區域，橢圓紅色標記為皮下注射藥劑之區域)

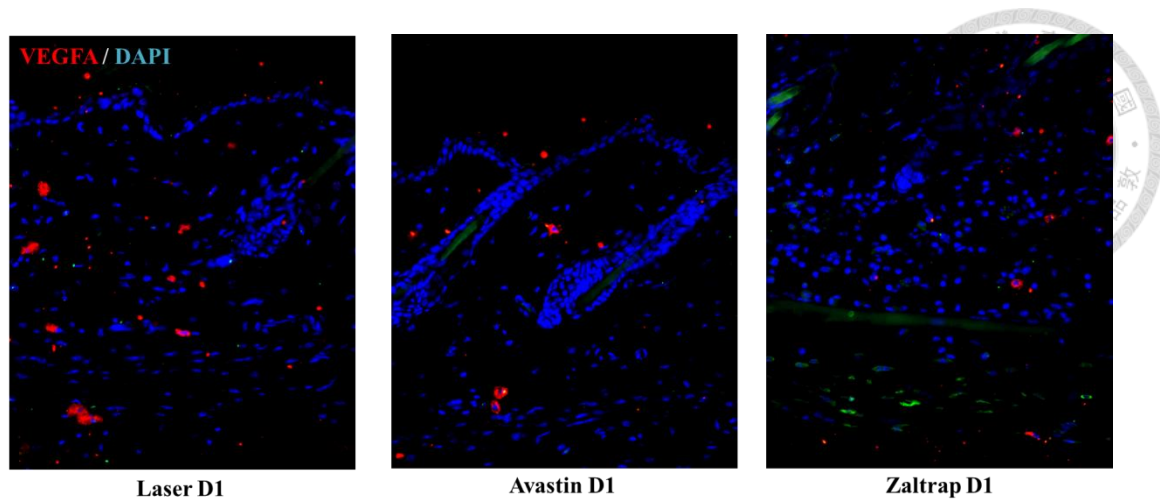


圖 3.31 受雷射刺激並抑制 VEGF 後 Day1 時小鼠皮膚 VEGFA 比較圖

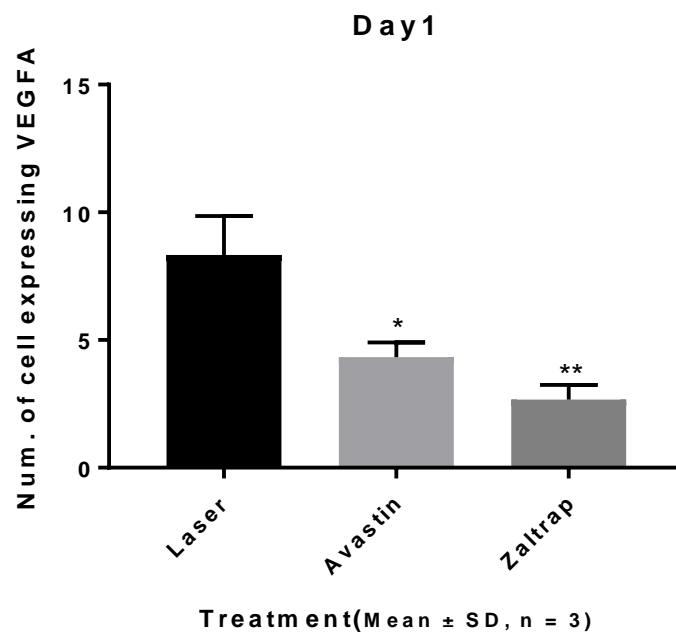


圖 3.32 受雷射刺激並抑制 VEGF 後 Day1 時小鼠皮膚 VEGFA 定量圖

(\*p  $\leq$  0.05, \*\*p  $\leq$  0.01, \*\*\*p  $\leq$  0.001, \*\*\*\*p  $\leq$  0.0001)

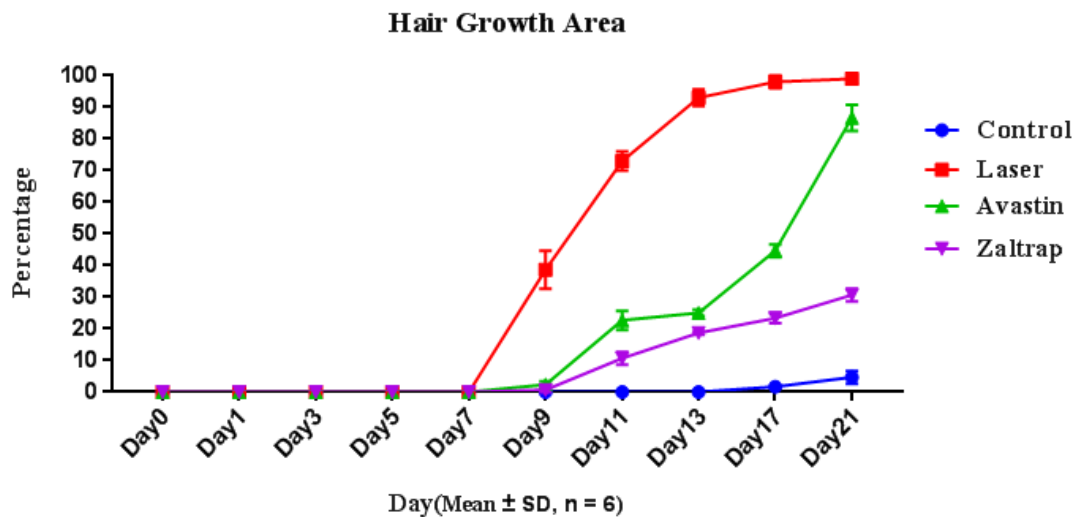


圖 3.33 受雷射刺激並抑制 VEGF 後毛囊生長狀況與時間之關係

### 3.6.3 噬中性白血球耗竭對雷射促毛髮生長反應之影響

經由先前的討論，本研究得知噬中性白血球在早期發炎有劇烈增減的情形，為探討其重要性，本研究選擇以腹腔注射的方式，打入對噬中性白血球專一性抑制的抗體 Anti-Ly6G，使噬中性白血球的耗竭，降低數量，並觀察是否在缺少了噬中性白血球的情況下，休止期毛囊依然會進入生長期。

本研究以 2.8.1 小節描述的方式進行處理，並將腹腔注射 60 $\mu$ l Anti-Ly6G 的 C57BL/6 小鼠為處理組，注射 Anti-IgG 者為對照組，拍照與收取組織以比較兩者經同樣雷射刺激後的毛囊生長情況。

透過實驗結果（圖 3.34）可以發現，注射 Anti-Ly6G 抗體的組別與對照組在毛囊生長方面並無太大的差異，僅處理組有些許的延遲。兩者最終毛髮生長的區域大小亦無明顯差別。



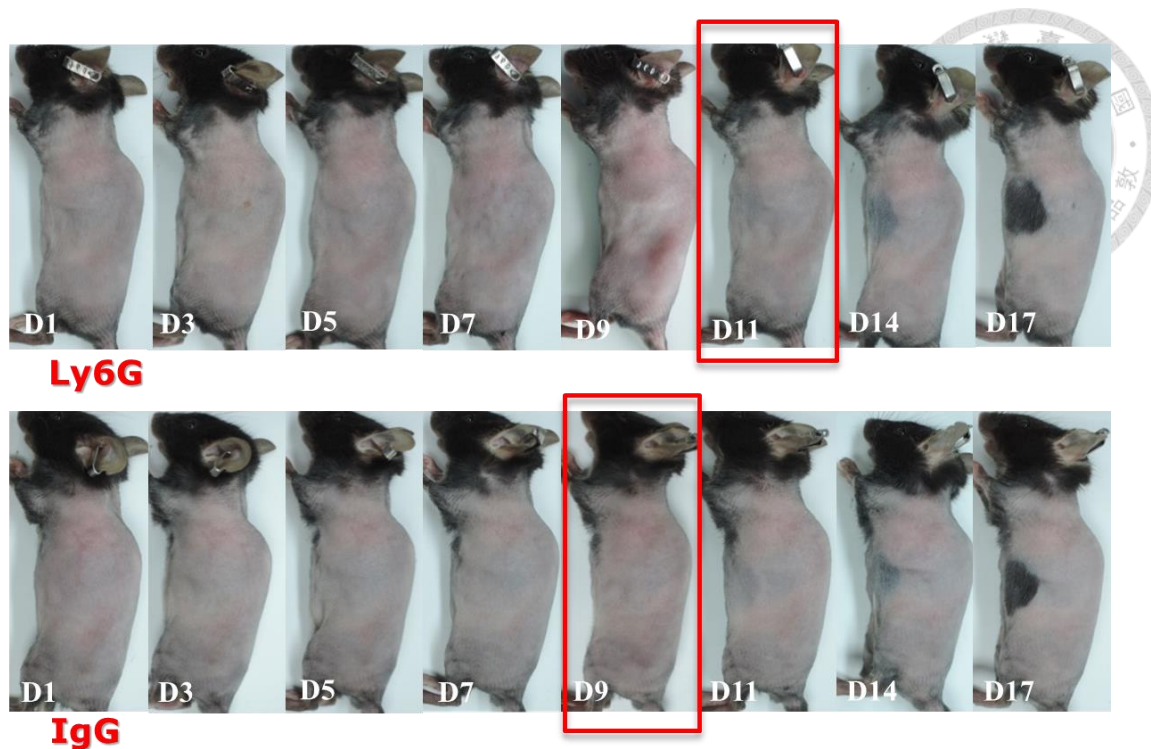


圖 3.34 嗜中性球抑制對雷射誘導進入生長期之影響

(紅框圍從外觀上可見皮膚轉黑之現象)

同時，本研究也透過 H&E 染色與螢光染色確認嗜中性球是否確實有被 Anti-Ly6G 抗體耗竭 (圖 3.35、圖 3.36)。從 H&E 染色圖中可以看到 Day1 在控制組中仍有大量免疫浸潤現象，而施打抗體後的處理組則明顯減少許多。在螢光染色圖中也可看到原先有大量 Ly6G 表現的 Day1 控制組，經施打抗體後期表現量有大幅下降的情形發生。

由此本研究可以得知，嗜中性球即便耗竭，對於經由雷射刺激後促使毛囊進入生長期的現象並沒有明顯抑制作用，可見嗜中性球並非重要的影響因子。

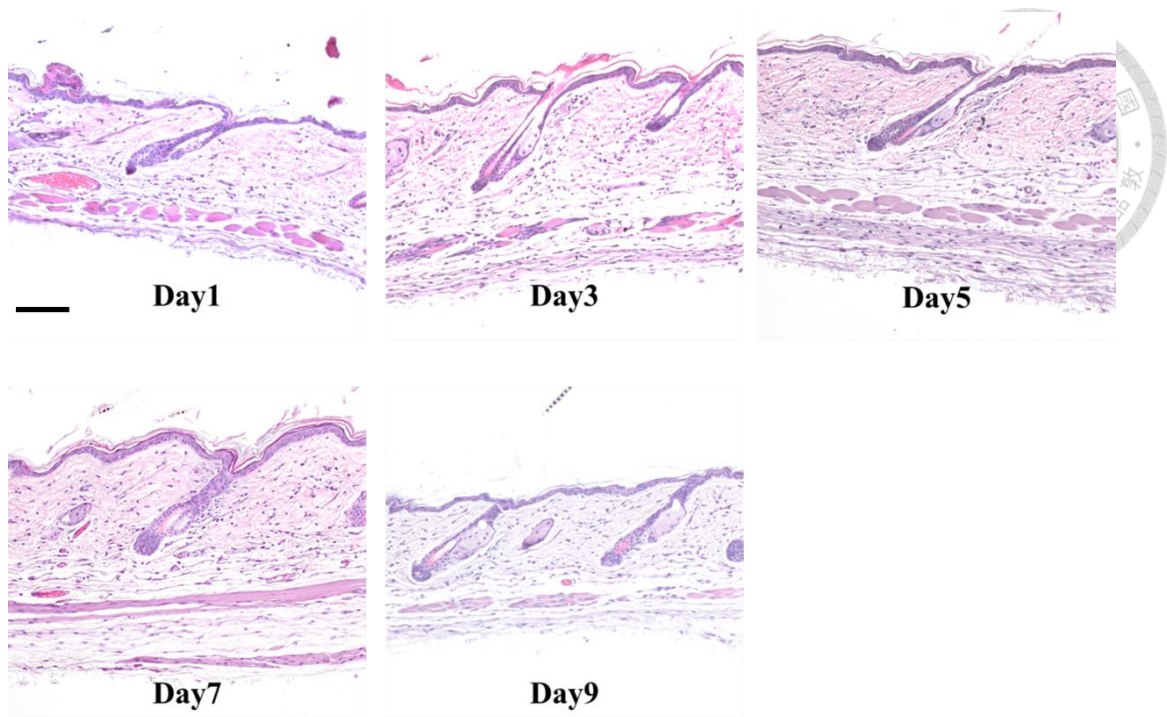


圖 3.35 嗜中性球抑制後受雷射刺激之小鼠兩側皮膚 H&E 染色圖

(Scale Bar = 100 $\mu$ m)

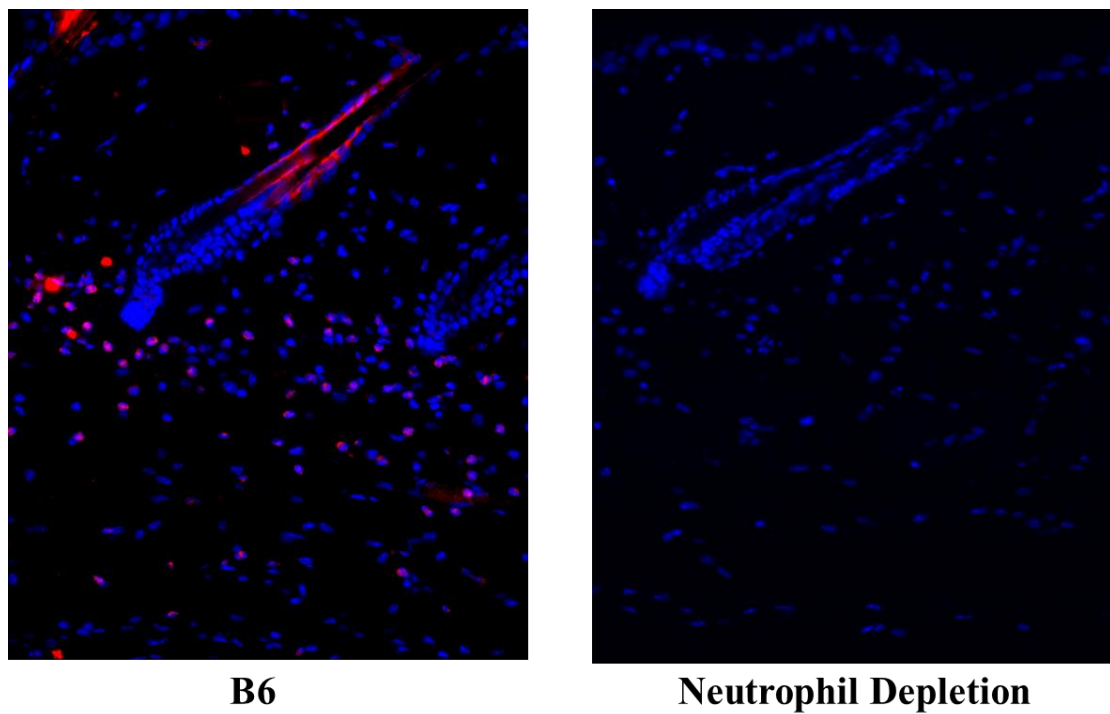


圖 3.36 受雷射刺激並抑制 Neutrophil 後 Day1 時小鼠皮膚 Ly6G 比較圖

### 3.6.4 巨噬細胞耗竭對雷射促毛髮生長反應之影響

在第一章的討論中已有許多文獻指出巨噬細胞與促進毛囊生長有所關連，但在雷射刺激的實驗模組中，巨噬細胞的作用仍有待釐清。

本研究使用的是能讓巨噬細胞吞噬後凋亡以減少其數量的藥物 Clodrosome 與無使巨噬細胞凋亡效用的 Liposome。如同 2.8.2 小節描述方式，本研究將在皮下注射 Clodrosome 的組別作為處理組；施打 Liposome 的組別作為控制組，並拍照觀察與收取組織染色，以比較兩者經同樣雷射刺激後的毛囊生長情況。

透過實驗結果(圖 3.37)可以發現，注射 Clodrosome 的處理組雖然在 Day9 時便已有部分區域進入生長期，但在 Day11 天時可觀察到進入生長期的區域時圍繞著注射 Clodrosome 的區域而成，且施打藥物的部位直到 Day21 都沒有進入生長期；相對地，施打 Liposome 的對照組如同雷射處理組，在 Day9 時已可從外觀上見到進入生長期之跡象，且進入生長期的區域並無縮小現象。

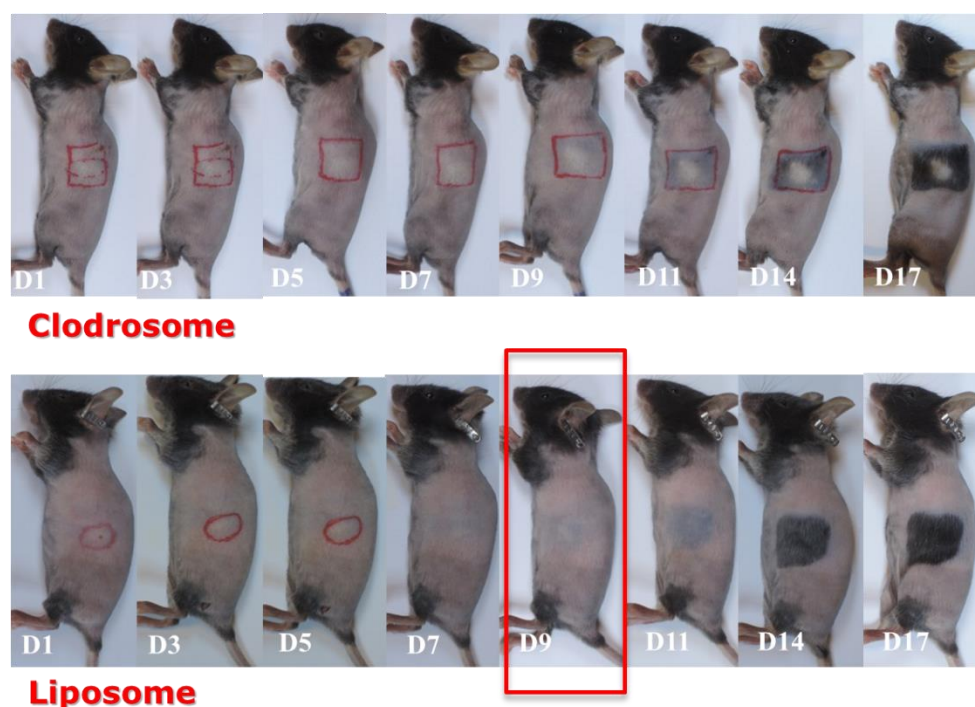


圖 3.37 巨噬細胞抑制對雷射誘導進入生長期之影響

(皮上方形標記為施打雷射區域、紅色橢圓為打藥區域、紅色方框為可見變黑時)



另外，本研究也收取施打藥劑後的前期時間點作 H&E 染色（圖 3.38）。透過染色結果本研究可以發現，直到 Day9 毛囊都還停留在休止期狀態，而未做處理的雷射組在此時已幾乎位於生長期後期。其他還可發現在施打 Clodrosome 之後的部分，其皮下組織層會有明顯增厚的現象，且在 Day5 後可看到皮下組織處有大量細胞核出現。這可能是因為藥物累積在該處引發的發炎反應，並吸引嗜中性球前往。本研究也在 Day7 與 Day9 的組織染色圖裡可發現到兩側（未注射藥劑）的部分已有明顯進入生長期的現象，藉此，讓本研究確定皮下注射 Clodrosome 的效果的確為局部性的。

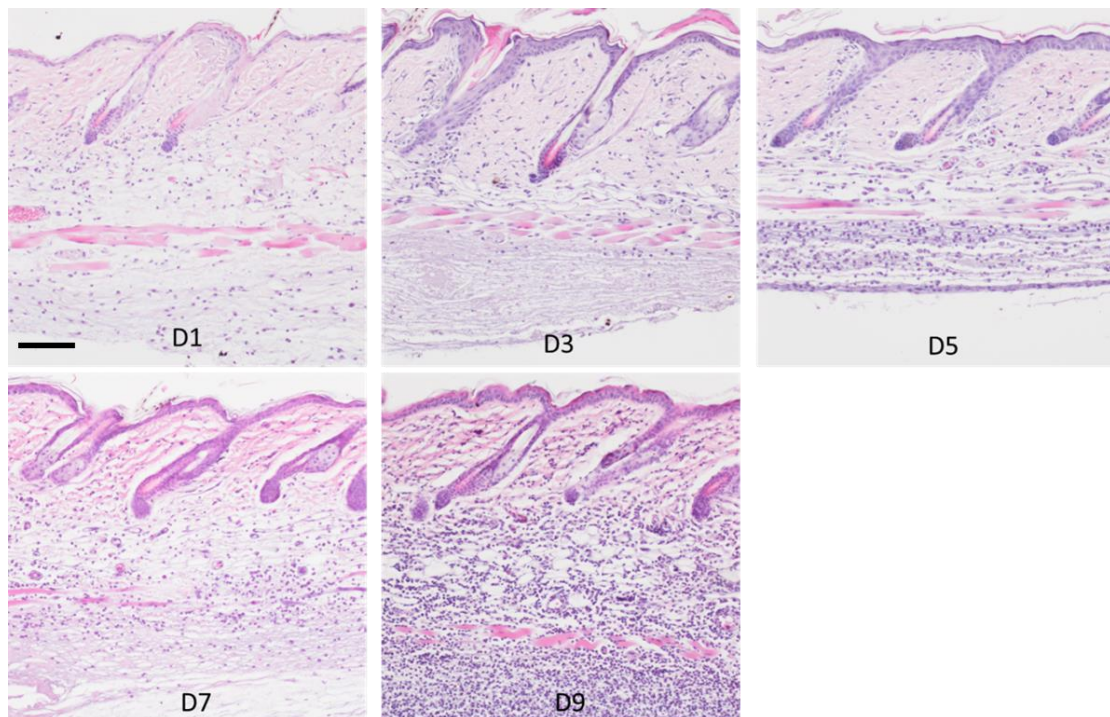


圖 3.38 巨噬細胞抑制後受雷射刺激之小鼠兩側皮膚 H&E

(Scale Bar =100 $\mu$ m)

在觀察時間結束後，本研究也取下 Day21 天的皮膚作 H&E 染色（圖 3.39），從中本研究可以明顯看到施打藥劑與否的區域其毛囊處於完全不同的狀態。打藥處位於休止期，而未打藥處已處於完全的生長期。

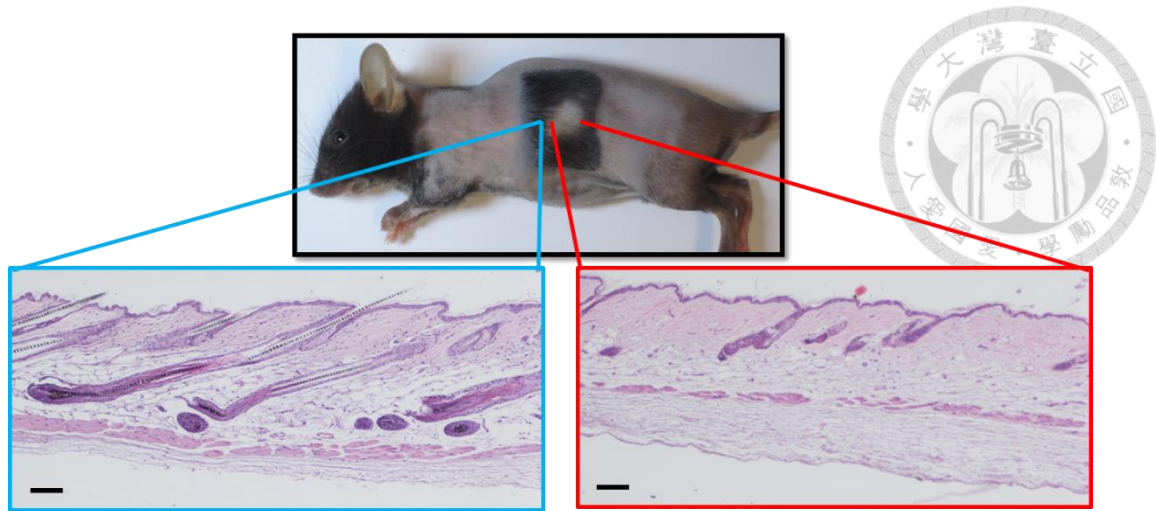


圖 3.39 施打 Clodrosome 後受雷射刺激之小鼠皮膚 Day21 H&E 染色圖

(Scale Bar = 100μm)

為確認 Clodrosome 是否真的能減少巨噬細胞的量，以判斷毛囊無法提前進入生長期與巨噬細胞數量衰減是否有所關聯，本研究收取實驗前期的時間點，以 qPCR 的方式觀察 F4/80 標誌的表現量(圖 3.40)，顯示巨噬細胞數有顯著減少。

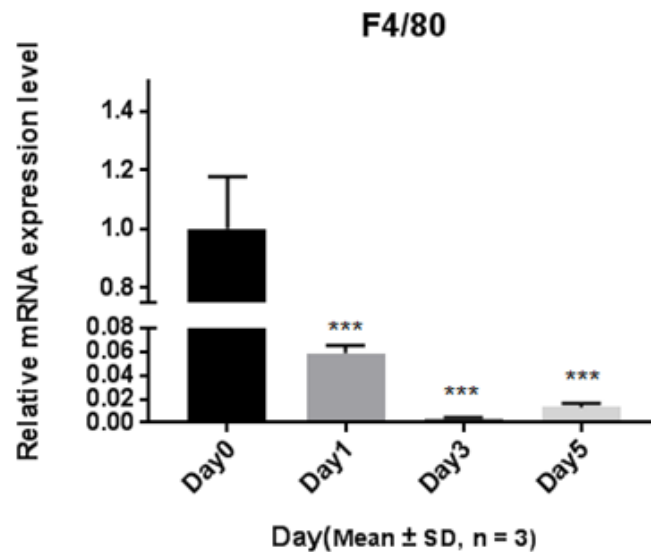


圖 3.40 巨噬細胞抑制後受雷射刺激之小鼠兩側皮膚 F480 mRNA 表現

(\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ )

### 3.6.5 巨噬細胞抑制對毛囊幹細胞動態之影響

透過前面的實驗，本研究從巨觀層面與組織染色、免疫螢光染色確定將巨噬細胞耗竭後，確實能抑制該區域毛囊提前進入生長期的情況。但這時期的毛囊幹細胞狀態仍為了解。本研究接著使用 Ki67 與 BrdU 作螢光染色，觀察此階段的毛囊狀態。

在 BrdU 與 Ki67 的雙染結果圖（圖 3.41）中，可以看到代表進入細胞週期的 Ki67 表現情形在 Day3 之前大致同未經特別處理的雷射組別，在表皮、真皮與 Isthmus 有高表現，但在 Day5 後真皮層仍有 Ki67 表現，不同於雷射組別，且直到 Day9 表皮、真皮與 Isthmus 都依然有相當明顯的表現，這或許和施打藥物後引起的嗜中性白血球浸潤的情形有所關聯。BrdU 方面則可觀察到在毛囊幹細胞外的表現情況類似雷射組別，僅在 Day3 時於表皮、真皮與 Isthmus 有稍高的表現，可能是因為巨噬細胞被抑制後導致修復作用減緩所致。而在毛囊部分則直到 Day7 才能在次級毛胚的部份看到寥寥數點、Day9 時零星出現於毛囊幹細胞處。

這些結果顯示施打 Clodosome 抑制巨噬細胞後雖無法減緩細胞進入細胞週期，但會使得毛囊幹細胞與次級毛胚的增生情況受到大幅抑制。本研究在 Day5 後未受施打藥劑的部分（圖 3.42），也可明顯觀察到毛囊生長的情況以及大量的 BrdU 與 Ki67 表現。並且在 Day21 的雙染結果（圖 3.43）中也可看到相當的差異，確定了 Clodosome 對細胞週期的影響主要為局部作用。



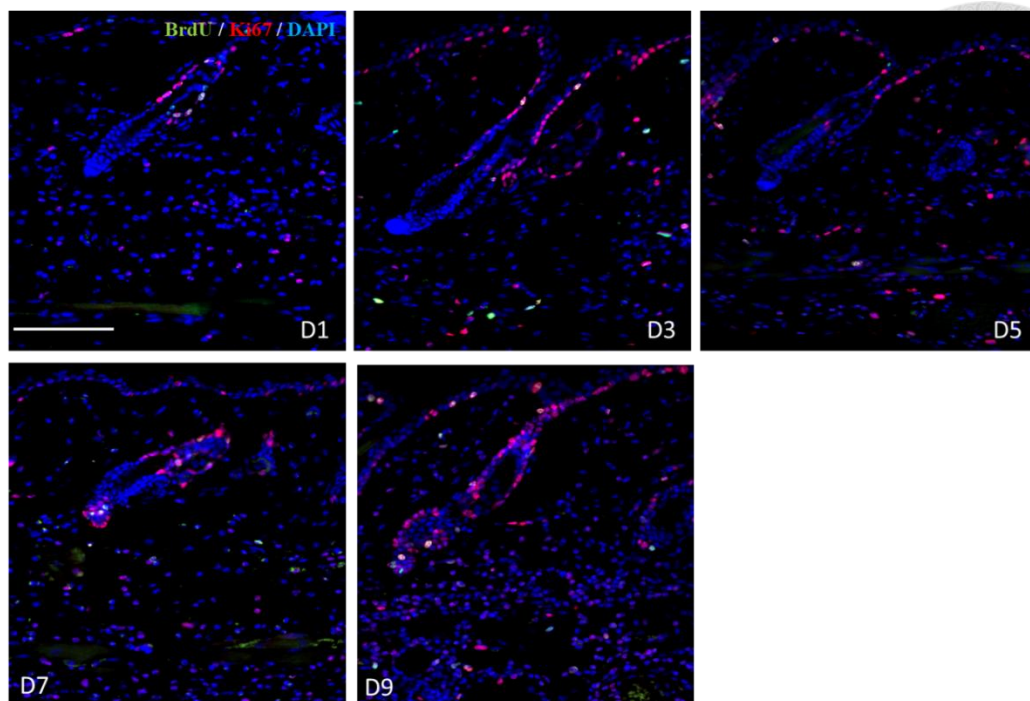


圖 3.41 施打 Clodrosome 後受雷射刺激之小鼠皮膚 Ki67 與 BrdU 雙染圖  
(Scale Bar = 100 $\mu$ m)

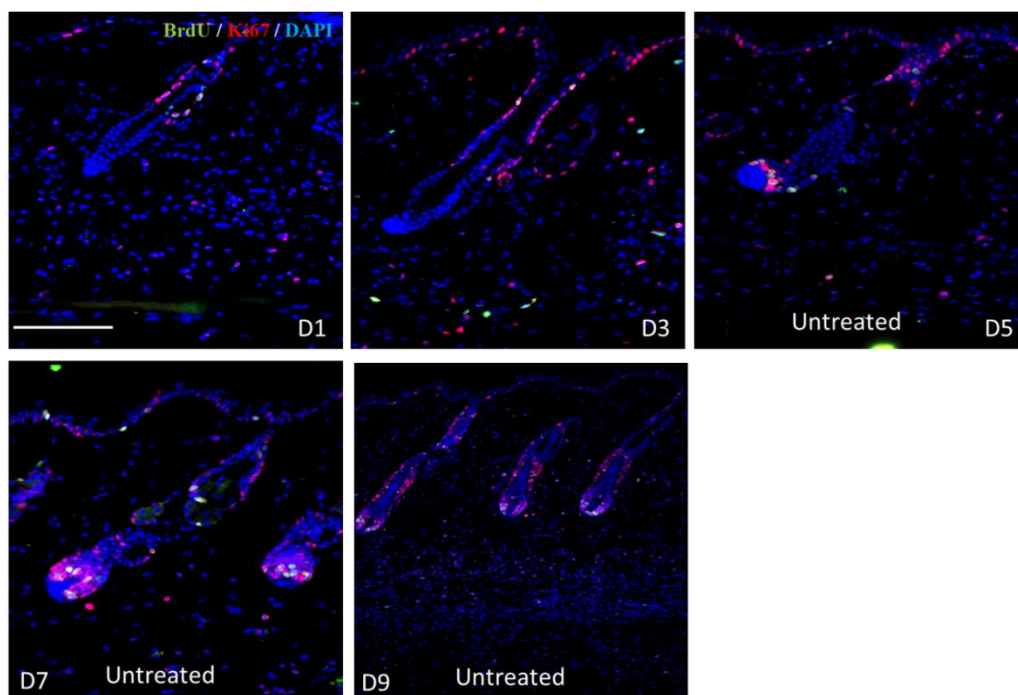


圖 3.42 施打 Clodrosome 後未受影響之部分皮膚 Ki67 與 BrdU 雙染圖  
(Untreated 表示未受到局部皮下 Clodrosome 影響之區域，Scale Bar = 100 $\mu$ m)



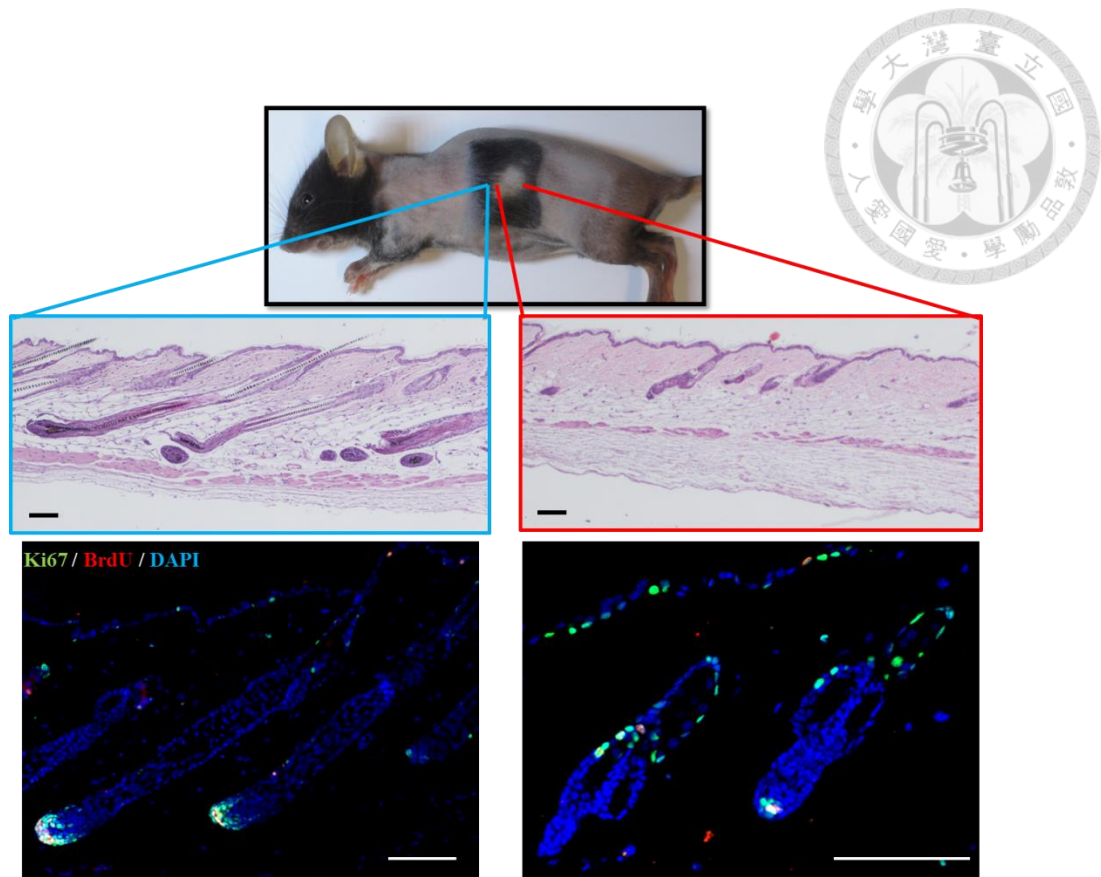


圖 3.43 施打 Clodrosome 後受雷射刺激之小鼠皮膚 D21 之 Ki67 與 BrdU

(Scale Bar = 100 $\mu$ m)

### 3.7 探討巨噬細胞在微傷口促進毛囊再生現象中扮演之角色

經由前面的研究，發現當降低巨噬細胞的數量後，能使得經由一定能量以上的雷射刺激所導致的提前進入生長期之現象受到抑制，也確定了在雷射刺激的發炎環境下巨噬細胞會有被活化的現象，本研究接著便想探討，巨噬細胞可能釋放出哪些因子，從而使得休止期毛囊提前進入生長期。

#### 3.7.1 巨噬細胞活化類型

當皮膚受到外來物刺激之後，血管中許多單核球會因此被吸引至該區域，浸潤其中，並受到許多發炎相關因子控制與刺激，極化（Polarization）為不同類型

的巨噬細胞。一般而言，接受發炎因子調控並活化的巨噬細胞大致可分為 M1 巨噬細胞(Classically activated macrophage)和 M2 巨噬細胞(Alternatively activated macrophage)。前者與發炎反應有較大的關聯性，它會分泌許多與發炎相關的因子以抵抗外來物與活化其他相關發炎反應；後者主要與傷口修復、組織癒合較有關連。M1 與 M2 巨噬細胞在分泌的發炎因子也有所不同，M1 多分泌 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  和 Inducible Nitric Oxide Synthesis (iNOS)；M2 則多分泌 IL-4、IL-10、IL-13 和 Arginase1 (Arg1)。若要藉由螢光染色區分 M1 與 M2 巨噬細胞，通常以 iNOS 與 Arg1 作為區分的標誌 (102, 103)。我們利用全皮抽取 mRNA 並以 qPCR 的方式鑑定此兩種基因，顯示兩者在 Day1 與 Day3 時皆有提升表現，其中又以 iNOS 最為明顯 (圖 3.44、圖 3.45)。

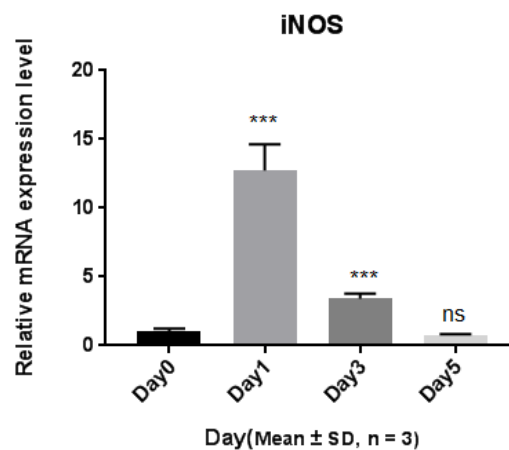


圖 3.44 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 iNOS mRNA 表現

(\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ )

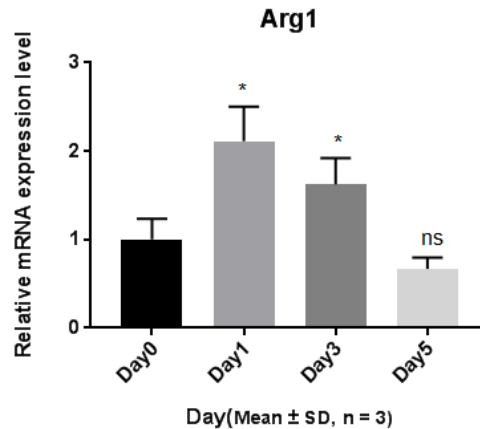


圖 3.45 受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠兩側皮膚 Arg1 mRNA 表現量

(\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ )

### 3.7.2 巨噬細胞與發炎、生長相關因子之聯繫

經先前系列的討論瞭解了經雷射刺激後的皮膚確實會表現活化狀態的巨噬細胞，接著便想討論這些巨噬細胞分泌了哪些與發炎或生長相關的因子，並希望能循著與這些因子相關的路徑往下探討。

本研究使用在 2.9 節描述的細胞分選方法，分選出未施打雷射的 Day0 與施打雷射後 Day3 的巨噬細胞，並轉錄成 RNA，再經由 qPCR 鑑定目標基因的表現量。之所以選擇 Day3 是因為 Day3 為毛囊的次級毛胚開始活化的時候，此時期的巨噬細胞所分泌出的相關因子將可能是促使毛囊提前進入生長期的關鍵，且從螢光染色圖中也可看到巨噬細胞從 Day3 起有較高的表現。

首先本研究先針對 iNOS 與 Arg1 兩種蛋白作分析，確定在 Day3 時的巨噬細胞究竟以何種型態為主，因為全皮抽取的 mRNA 可能會因為其他細胞餐入而使得表現量被稀釋，且此兩種因子並非只有巨噬細胞會表現。從結果(圖 3.46)本研究得知在 Day3 時巨噬細胞多以 M2 型態表現。

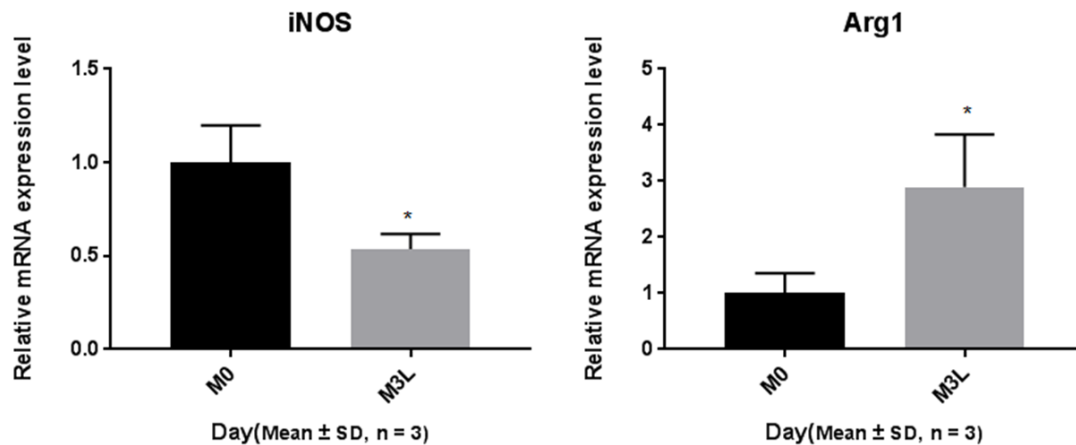


圖 3.46 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚巨噬細胞 iNOS 與 Arg1 mRNA 表現量

(\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ )

再來本研究針對幾種可能的發炎與生長相關因子做討論，分別有主要由巨噬細胞分泌且與系統性發炎相關的腫瘤壞死因子- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、與血管新生有密切關係的血管內皮生長因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) 家族以及胎盤生長因子 (Placental Growth Factor, PlGF)、血小板衍生生長因子 (Platelet-derived Growth Factor, PDGF)，共計七種。

這些因子已在前面的章節利用染色或 qPCR 的方式討論過在整體的表現，且幾乎都能看到在 Day1 時有高度表現。針對巨噬細胞做專一探討，希望能更準確釐清在即將進入生長期時，巨噬細胞分泌上述因子的狀況。

經由實驗結果可以看到 Day3 的巨噬細胞並沒有特別表現 TNF- $\alpha$ ，甚至表現量還變得趨緩 (圖 3.47)。本實驗在先前透過基因轉殖鼠抑制 TNF- $\alpha$  表現後並無法有效抑制毛囊提前進入生長期，與此結果都共同指向 TNF- $\alpha$  並非關鍵。

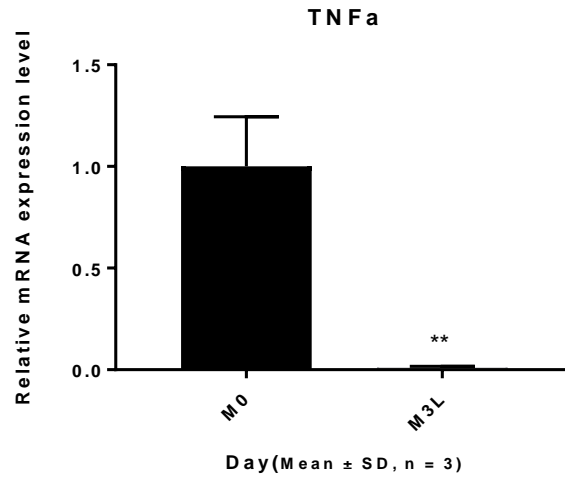


圖 3.47 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚巨噬細胞 TNF- $\alpha$  之 mRNA 表現量

(M0：Day0 之巨噬細胞；M3L：雷射後 Day3 之巨噬細胞, \*\* $p \leq 0.01$ )

PDGF 在傷口修復時主要會由內皮細胞與巨噬細胞分泌，並且具有吸引巨噬細胞前來的功能 (98, 99, 100)。在我們實驗結果中 (圖 3.48)，並沒有在 Day3 時的巨噬細胞看到有明顯的 PDGF 增加表現。

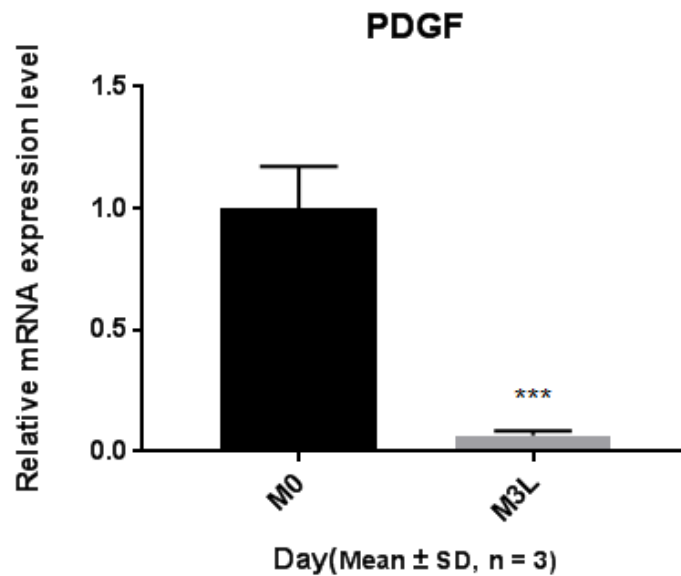


圖 3.48 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚巨噬細胞 PDGF 之 mRNA 表現量

(\*\*\* $p \leq 0.001$ )

針對不同的 VEGF 分子做探討，從實驗結果（圖 3.49）可以看到 Day3 的巨噬細胞與 Day0 相比幾乎都沒有增高表現這些因子的情形，甚至出現降低者。而在先前的章節，本研究也利用全皮抽取的 RNA 鑑別這些基因的表現，可以發現除了 VEGFA 在 Day1、Day3 有較明顯的提高之外，其他幾乎都沒有太大量的提升，並且四者都在 Day3 之後劇烈降低。

由此可知，在本實驗的反應中，VEGFA 在促進毛囊生長的反應中扮演重要角色，且 VEGFB、VEGFC、VEGFD 的影響較不顯著。巨噬細胞雖然也有表現一定量的 VEGFA，但在 Day3 時並不會特別提高其表現，顯示比起 VEGFA，巨噬細胞更可能是透過其他機制調控毛囊生長。

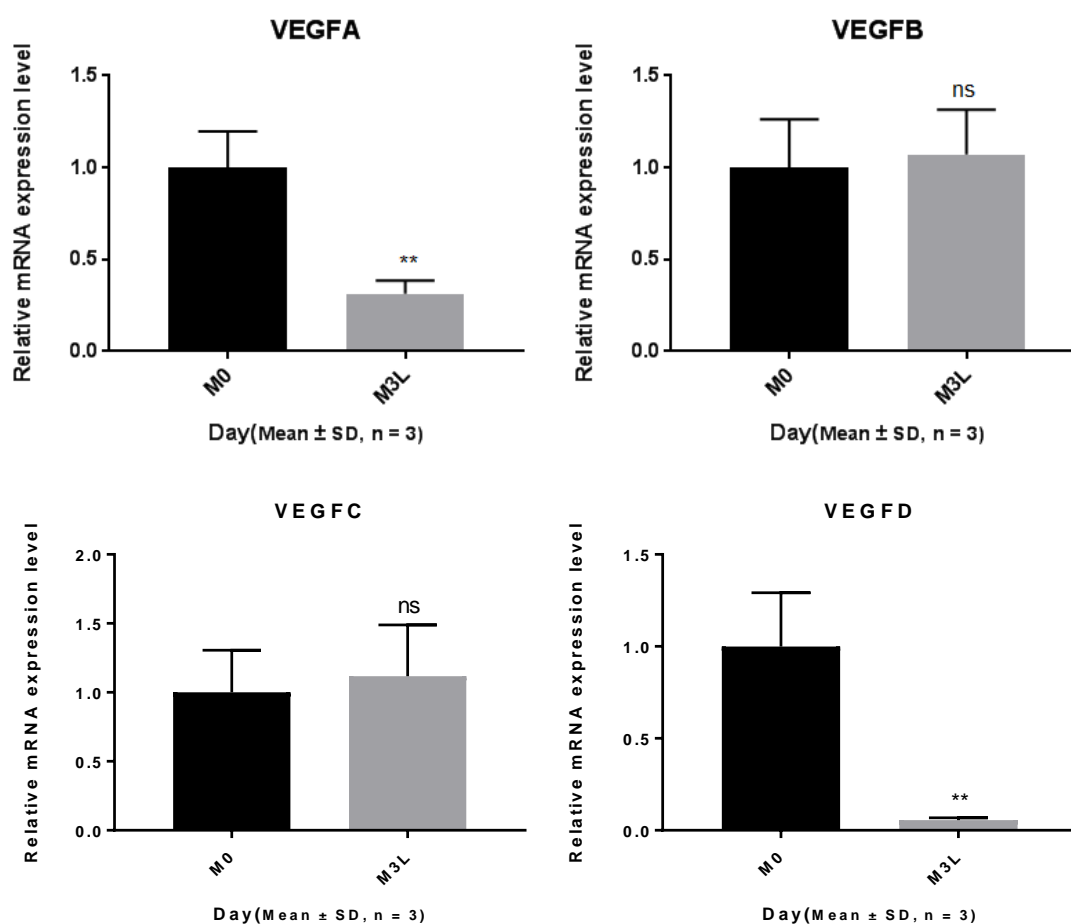


圖 3.49 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚巨噬細胞 VEGFs 之 mRNA 表現量 (\*\* $p \leq 0.01$ )

而在本研究對 VEGF 家族中的另一個成員 PIGF 作 mRNA 表現的結果 (圖 3.50) 中，可以看到受雷射刺激後 Day3 的巨噬細胞明顯比起未受雷射影響的巨噬細胞還要高度表現 PIGF。雖然此現象在全皮抽取的 RNA 表現中並未觀察到，但這很可能是因為巨噬細胞並未占整個皮膚的細胞總量太高的百分比，因此巨噬細胞增加表現 PIGF 的效果在整體看來便被淡化了。

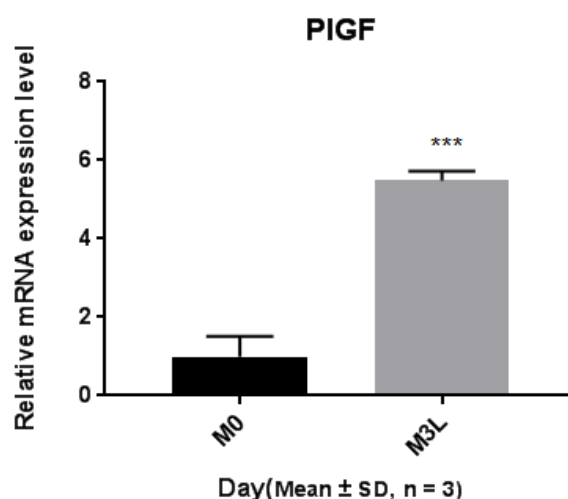


圖 3.50 受雷射刺激之小鼠兩側皮膚巨噬細胞 PIGF 之 mRNA 表現量  
(\*\*\* $p \leq 0.001$ )

總結來說，觀察整個受到雷射刺激的皮膚，可以發現到 TNF- $\alpha$ 、VEGFA、VEGFC、VEGFD、PIGF 與 PDGF 都在 Day1 的時候有提高表現量，這些因子都和誘導發炎反應、血管新生以及吸引免疫細胞前往發炎部位有所關聯，如 VEGFA 對於招募 (Recruit) 巨噬細胞前往發炎或腫瘤部位有相當的必要性 (104, 105, 106)；PIGF 能左右巨噬細胞的趨化與極化 (95, 107, 108, 109, 112)。他們的高表現，顯示 Day1 時的皮膚正處於發炎狀況。再觀察 Day3 的巨噬細胞後，僅能確認到 PIGF 在 Day3 有高表現，而此時正是毛囊準備進入生長期的起始，當本研究使用 Clodrosome 將巨噬細胞專一性去除後，毛囊提前進入生長期的情形受到抑制，兩者結果指出由巨噬細胞釋出的 PIGF 可能在其中扮演了關鍵的角色。



### 3.8 探討發炎與生長相關因子對毛囊之影響

經先前的討論得知 VEGF Family、PDGF、PlGF、TNF- $\alpha$  等在整個微環境的發炎早期皆有所提升，其中抑制巨噬細胞或同時抑制 VEGFA、VEGFB 與 PlGF 對於提前進入生長期的狀況有顯著的影響，且巨噬細胞在 Day3 時有高 PlGF 的表現，本研究便想探討這些因子對於毛囊的作用是否為直接影響。為此，本研究分選出 Day0 與 Day3 的毛囊幹細胞與次級毛胚細胞，希望以 qPCR 來確認究竟是否有這些因子的接受器（Receptor）存在。

VEGF Family 主要透過 VEGFR 產生作用，VEGFR 分為 VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3，其中又以前兩者佔大宗，且每種受器所對應的因子也有所不同。除了 VEGFR 之外，還有 Neuropilin1 與 Neuropilin2（96, 110）。他們亦能和部分 VEGFs 結合或結合某些 VEGFR，遂影響 VEGF 與受器結合的訊號傳遞（124, 125, 126）。

經由實驗結果（圖 3.51、圖 3.52）可以看到在 Day0 與 Day3 時的毛囊幹細胞與次級毛胚幾乎都沒有表現 VEGFR1，然而 VEGFR2 則在兩者於 Day3 時有提高表現的情況。此點與 2009 年的研究指出人類的毛囊自進入生長期起會在毛囊表現 VEGFR2 的結果相同(113)，表示在毛囊上表現的主要為 VEGFR2，且在本實驗中，VEGFR2 會在即將進入生長期時略微提高表現。

另外我們也看到 Nrp1 在 Day3 時的表現，不論是在次級毛胚或毛幹細胞處，都大幅下降；而 Nrp2 幾乎不在毛囊幹細胞處表現（40 多 Cycle 數），但此時卻會在次級毛胚有顯著提高表現的情形（圖 3.53、圖 3.54），這結果或許代表在受雷射刺激後第三天時，次級毛胚的 Nrp2 受 PlGF 活化，並且增加表現，從而直接或協調 VEGFA 與 VEGFR2 結合並促使次級毛胚進入生長期。

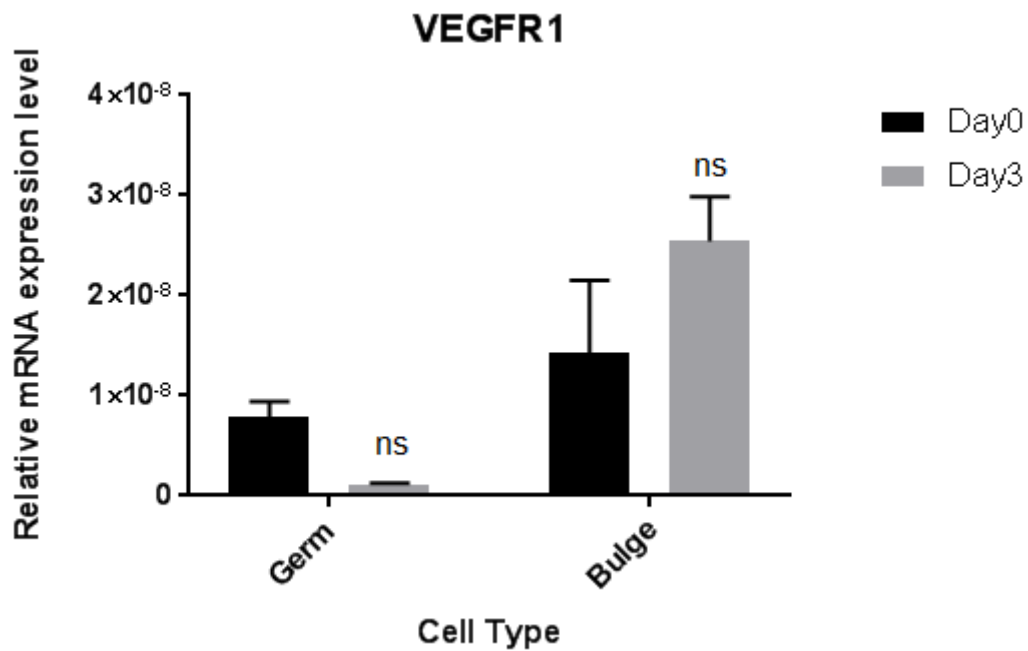


圖 3.51 受雷射刺激之小鼠兩側毛囊細胞 VEGFR1 之 mRNA 表現量  
(ns 表示沒有顯著差異)

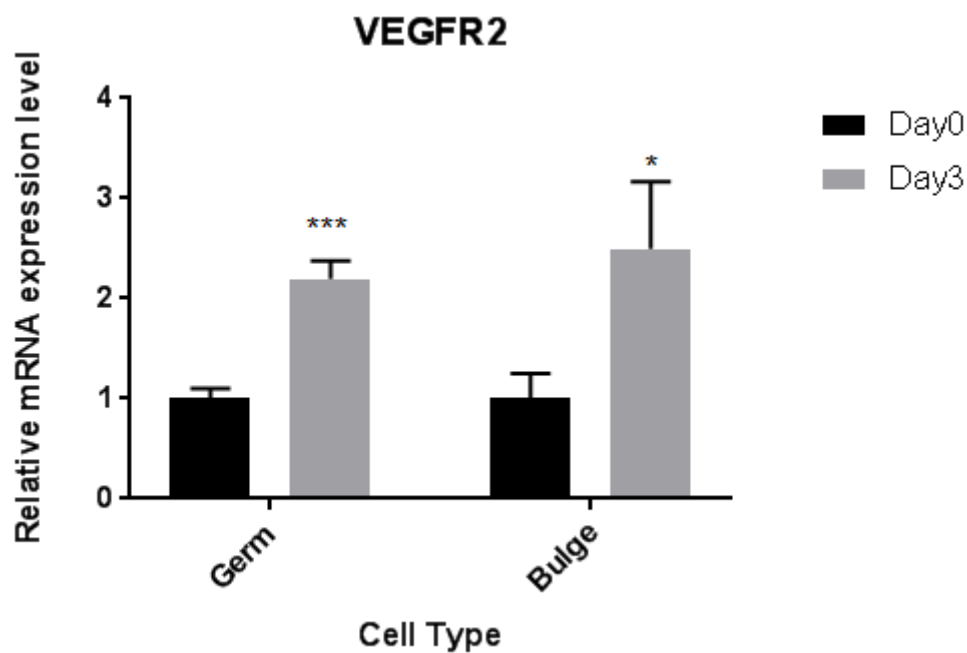


圖 3.52 受雷射刺激之小鼠兩側毛囊細胞 VEGFR2 之 mRNA 表現量  
(\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ )

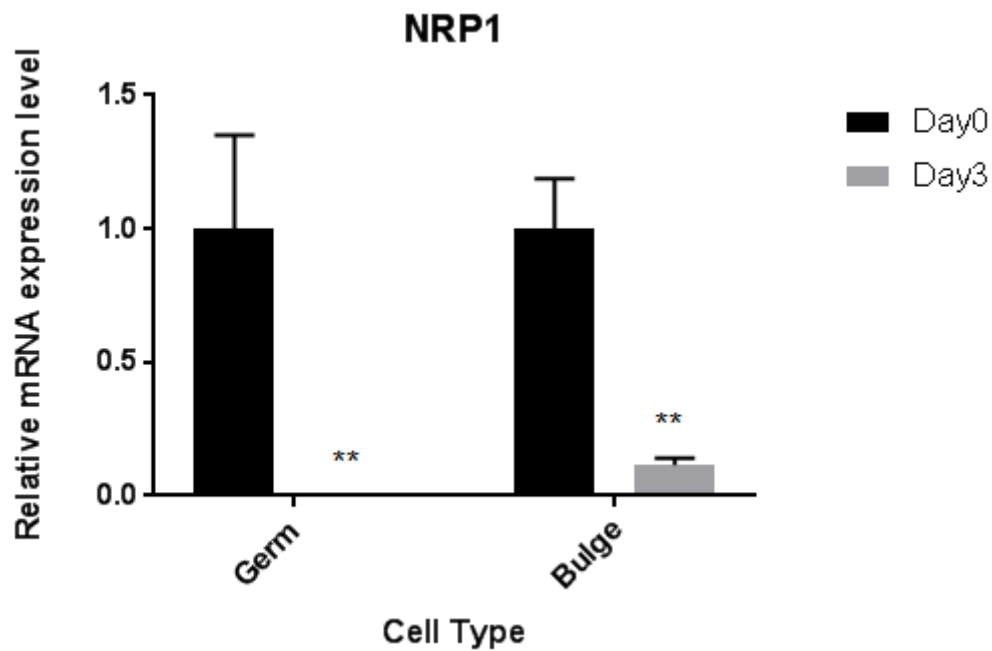


圖 3.53 受雷射刺激之小鼠兩側毛囊細胞 Nrp1 之 mRNA 表現量

( $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.001$ ,  $****p \leq 0.0001$ )

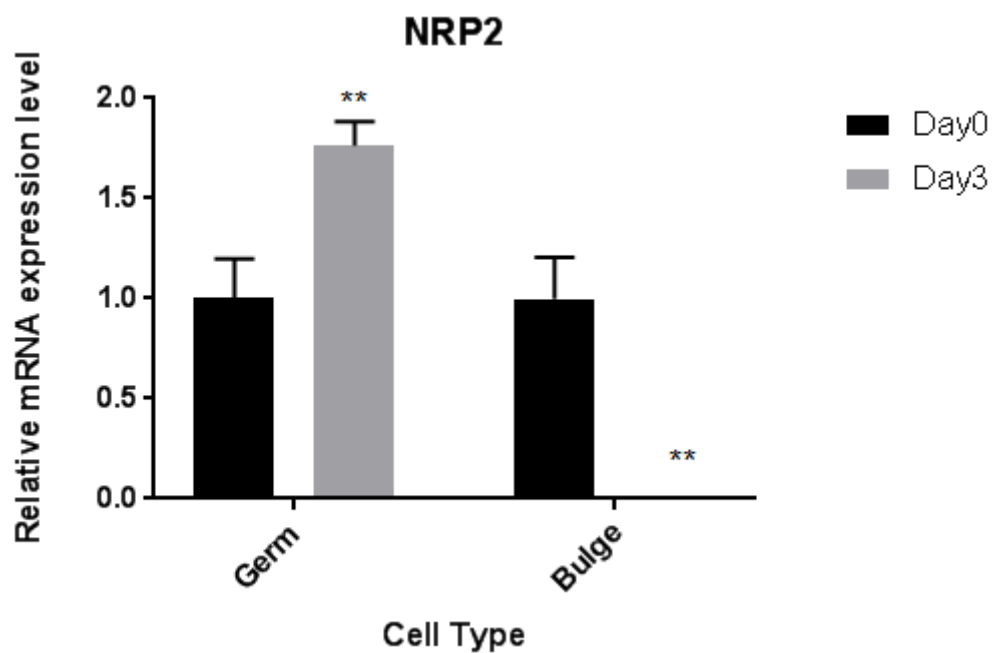


圖 3.54 受雷射刺激之小鼠兩側毛囊細胞 Nrp2 之 mRNA 表現量

( $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.001$ ,  $****p \leq 0.0001$ )

## 第四章、討論

### 4.1 雷射誘導發炎致使 PIGF 與 VEGFA 促進毛囊生長

在臨床上已有許多案例指出局部性的摩擦可能和多毛症有所關聯，其產生原因有可能便是摩擦產生的局部發炎現象 (114,115)。而在經過低能量的飛梭雷射刺激後，不僅不會產生明顯雷射除毛的現象，反而導致該區域整體提前進入生長期，讓我們好奇，飛梭雷射所導致的促進毛髮生長現象是否也和發炎有所關連。倘若能找到一個能在不產生疤痕又能促進毛囊生長的能量大小，以後或許能有更進一步的運用。

我們使用當今被運用在實驗用途最為廣泛的第二代飛梭雷射，配合先前測試出的能量組合，並使用毛囊能繼續維持約 3 到 4 周休止期的 C57BL/6 小鼠來進行實驗。

經由實驗，我們可以看到位於休止期的毛囊在經過雷射的刺激後，確實會提前進入生長期，且此現象會隨著雷射能量降低而趨緩。使用 15mJ X 1048 MTZ 的能量組合刺激後可在第 9 天時於外觀看到進入生長期的變黑情況，而使用 13 mJ X 1016 MTZ 則大約在 13 天才會看到此情形。兩者雖然進入生長期的時間有所區別，但最終仍會整個區域都進入生長期，顯示當強度足夠時，刺激的強弱會影響僅有活化毛囊的快慢。讓我們好奇，刺激強弱引發的差異發炎反應是否造成為此影響的因素。

我們接著選用效果最好的 15mJ X 1048 MTZ 能量組合接續探討，觀察到毛囊幹細胞與次級毛胚分別在 Day5 與 Day3 開始有增生的現象，隨後包覆真皮乳突細胞、往下生長，邁入生長期。我們也利用 Ki67 染色，發現其實早在 Day1 時毛囊的 Isthmus 部分就已有進入細胞週期的現象，指出雷射刺激透過某種方式讓毛囊在 Day1 時期就準備進入細胞週期。

我們也能從 H&E 染色圖中觀察到實驗早期有角質層與表皮增厚的現象、在 Day5 前明顯的真皮層燒灼痕跡，以及僅在 Day1 產生的明顯免疫浸潤等接

觸性皮膚炎的代表性跡象 (116)。

經由觀察，我們發現受到雷射刺激後僅有少部分毛囊受到傷害，然而卻是整個區域的毛囊在最後都會提前進入生長期，讓我們因此朝向發炎這種能帶來全區域性效果的反應來探討。我們利用免疫螢光染色與 qPCR 觀察刺激後的發炎相關細胞、生長因子等表現情況，發現 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等發炎前驅因子

(Pro-Inflammatory Factors) 都在 Day1 時有明顯的高表現。而與血管新生、擴張以及吸引免疫細胞前往的其他因子，如 VEGFs、PlGF、PDGF 等，也都在 Day1 有顯著提升。並且我們也可以看到嗜中性球在 Day1 有高度表現，幾乎充滿整個真皮層與皮下組織層，表示 Day1 確實有產生一個急速且劇烈的發炎反應，提高這些因子表現並吸引大量嗜中性球前往。其他如巨噬細胞也可在 Day3 後看到增加的情形，可能是因為被發炎相關因子吸引。

由於毛囊在 Day1 時便有 Ki67 表現，且次級毛胚在 Day3 時便處於分裂期的狀態，我們便好奇在這之前所發生的發炎因子、嗜中性球與巨噬細胞是否為導致進入生長期的起始因子 (Initiator)。

為此，我們使用免疫抑制劑、抗體和基因轉殖鼠，將某些因子專一性抑制，倘若該因子是促使提前進入生長期的關鍵因子的話，那麼在將其抑制後或許就能使得進入生長期的現象變得趨緩甚至完全被抑制。經由一系列的實驗，我們發現當把嗜中性球抑制或以基因轉殖鼠剔除 TNF- $\alpha$  和 IL-1R 後，對於毛囊提前進入生長期的現象並沒有明顯的抑制效果，僅有延遲的功能。在利用藥物把 VEGFA 抑制後可以看到毛囊生長的情況有明顯的延遲，且生長區域顯著縮小。更進一步地，我們將 VEGFA 連同 VEGFB 與 PlGF 一併抑制後，注射藥劑的區域便不會提前進入生長期，這些結果顯示此現象和 VEGF 家族的相關訊號有重要的關連，並且排除掉了毛囊提前進入生長期是因為血管新生的緣故。最後，當我們把巨噬細胞抑制後，發現在施打藥物的區域並不會提前進入生長期，告訴我們巨噬細胞在此反應中有極為重要的地位，很可能是因為巨噬細胞狀態的改變

含分泌出的某些細胞激素從而使得毛能提前進入生長期。

我們利用細胞分選的方式，選擇出休止期時 (Day0) 的巨噬細胞毛囊準備進入生長期 (Day3) 的巨噬細胞，希望分析出此時的巨噬細胞相比於一般狀態，在何種細胞激素的分泌情況有所改變，或許這就是讓毛囊進入生長期的因子。經過 qPCR 的結果，我們發現巨噬細胞此時大多屬於 M2 類型，且具有分泌 VEGF 家族以及高分泌 PlGF 的狀況。藉此，我們認為 VEGF 家族在雷射刺激後進入生長期的現象中扮演重要的角色，其中巨噬細胞分泌的 PlGF 更是扮演了調控的關鍵。

為了解 VEGF 家族對於進入生長期的影響是直接或間接影響，我們分選出 Day3 的毛囊幹細胞與次級毛胚細胞，探討是否具有 VEGFA 與 PlGF 的相關受器。結果發現，毛囊細胞具能與 VEGFA、VEGFC、VEGFD 結合的 VEGFR2 以及能和 VEGFA、PlGF2 結合的 Nrp2，或許巨噬細胞分泌的 VEGFA 與 PlGF 能透過 VEGFR2 和 Nrp2 直接影響到毛囊細胞。對此，有研究指出 VEGF 促使的血管新生對於毛囊的生長有重要影響，缺少 VEGF 可能導致毛囊生長延遲或縮短(94)；也有研究表示 VEGF 能在細胞培養的環境下促進角質細胞生長(117)與透過在毛囊上的 VEGFR2 直接影響到毛囊生長(118, 119)。而在本實驗中，我們透過 Avastin 與 Zaltrap 等血管新生抑制劑將 VEGF 家族中最為主要且在反應中最大量表現的 VEGFA 與 PlGF 抑制後，雖對提前進入生長期有顯著影響，但仍無法完全抑制，顯示了此生漲的主因並非是透過血管新生，指出更可能是直接透過 VEGFR2 與 Nrp2 的路徑。由此，我們可以提出可能的實驗模型。當雷射刺激產生，燒灼膠原蛋白形成傷害，使得角質細胞、內皮細胞分泌諸多發炎前驅物質，例如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等等，此時毛囊毛囊也開始表現 Ki67。接著嗜中性球因發炎前驅物質而聚集、內皮細胞釋放 VEGFs 與 PlGF，促使巨噬細胞前來並且被極化，釋放出更多的 TNF- $\alpha$ 、VEGFA 與 PlGF 等細胞因子，其中 VEGFA 透過 VEGFR2 影響毛囊 (118, 119)，並需要 PlGF 直接作用在毛囊上

(95, 112) 或透過 Nrp2 結合 VEGFR 強化 VEGF 訊號傳遞效果 (125, 126)，促使毛囊提前進入生長期 (圖 4.8)。



## 4.2 Sutent 與 雷射刺激誘導毛囊進入生長期之關係

另外，為更進一步抑制 VEGF 訊號，我們也使用 Sutent 來抑制所有 VEGFR、PDGFR 與 c-Kit，發現施打 Sutent 後的小鼠經過雷射刺激後在觀察時間內都不會進入生長期 (圖 4.1、圖 4.2)。這個結果似乎指出由 VEGF 介導的 RTK 訊號在雷射促使進入生長期的情況中扮演重要角色。然而，Sutent 除了抑制 RTK 及其下游之外，它所抑制的 CSF-1R 與單核球 (Monocyte)、巨噬細胞的活化、增生、存活有密不可分的關係 (120)，並且已有相當多的研究與臨床報告指出施打 Sutent 以及抑制 VEGF/VEGFR 訊號後會使得單核球和巨噬細胞的數量減少 (121)。透過染色，我們可以發現經過 Sutent 處理後的小鼠，在 Day1 時的免疫浸潤情形大幅度地減少 (圖 4.2、圖 4.3)。因此我們便無法確定指出究竟 Sutent 的作用使影響到毛囊的 RTK 或者使免疫細胞如巨噬細胞、嗜中性球等數量降低，再影響到毛囊。

另外，在使用 Avastin 的組別，我們發現即使持續給藥，在約第 16 起原先有施打雷射但尚未長毛的部分也能從外觀上看到進入生長期的現象，並且最後整個雷射區域都進入生長期。此現象雖然在 Zaltrap、Sutent 與 Clodrosome 處理中不會看到，但在 Day21 停止給予藥物後，也會在第 28 天看見原打雷射但尚未進入生長期的區域開始變黑 (圖 4.4)。這個現象指出，受到這些藥物抑制而未進入生長期的區域，並非完全處於休止期，而是可能處在一種有別於休止期的狀態。當停止給藥，抑制消失後，毛囊遂進入生長期。



### 4.3 抑制 VEGFA、PLGF 與 Macrophage 無法阻止毛囊細胞


#### 進入細胞週期

我們透過螢光染色結果，比較 Clodrosome 處理與 Sutent 此兩種在給藥期間不會讓毛囊進入生長期的處理，發現在前期的時間點 Lef1 與純雷射組別並無差異，顯示即使尚未進入生長期，但 Wnt 訊號依然有表現。並且，經過三種處理後在 Ki67 的表現也是幾乎沒有差異，表示施打這些藥物並沒有辦法阻止未直接接受雷射損傷的毛囊進入細胞週期。然而，在 BrdU 表現上，可以看出使用 Sutent 或 Clodrosome 的組別幾乎都無法在 Day9 前看到明顯的 BrdU 表現在毛囊幹細胞或次級毛胚，指出此兩種處理可能對毛囊細胞進入分裂期有所關聯（圖 4.5、圖 4.6、圖 4.7）。

許多文獻指出，巨噬細胞上存在著 VEGFR1 (109, 122, 123)，且 VEGFA 會吸引巨噬細胞前往聚集 (104, 105, 106)，以及 PLGF 與 VEGFR1 的訊號傳遞也與巨噬細胞的極化有重大關聯 (109, 110, 111)。換言之，當施打 Avastin 時，或許也降低了發炎部位的巨噬細胞數量；在施打 Zaltrap 的時候，除了 VEGFA 之外 PLGF 減少也抑制了巨噬細胞的聚集與極化。

綜合以上的結果，或許我們先前假設的模型依然有更多的影響因素，如 VEGFA 影響巨噬細胞出現在被施打雷射的區域，進而影響到後續的 PLGF 與 VEGFA 的共同協調作用，使得施打 Avastin 的組別需要更久的時間達到所需要的刺激激素；而 Sutent 則是影響到巨噬細胞的活化。然而，這些假設仍有待進一步證明。

免疫現象是個一個錯綜複雜、彼此牽扯的反應，我們很難簡單地指出某個因素就是最重要因子，因為通常這個因子或細胞與他們分泌的激素之間又有正回饋或副回饋的現象，一但少了其中一個，下游的反應也都會接連受到影響，從而使得本身的效果也跟著受到改變。我們透過實驗，了解到經過刺激後產生的發炎反應能引起全區域性的促進毛囊生長現象，其中巨噬細胞、VEGFA、PLGF 在這個



反應中擁有舉足輕重的地位。VEGFA 可能直接作用在毛囊上並促成生長，並且需要 PIGF 調控增強這條路徑；另外，VEGFA，PIGF 也被認為是吸引巨噬細胞與影響極化的重要因子。為了更進一步釐清各自扮演的角色，在未來我們可能利用 PIGF Knock Out、Nrp2 Knockout 的基因轉殖鼠，確認在僅缺少 PIGF 訊號傳遞的情況下對於毛囊和免疫細胞的影響；或者專一性地抑制 VEGFR2，觀察在不對免疫細胞聚集造成太大影響的情況下，毛囊是否還能經由 VEGFA、PIGF 與 VEGFR2 結合並導致提前生長。又或許我們也能透過分別與同時注入 VEGFA 與 PIGF 的方式，觀察他們是否能刺激未受刺激之區域的毛囊提前生長。除此之外，經由 Avastin、Zaltrap、Sutent 與 Clodrosome 處理後的小鼠仍無法有效抑制毛囊細胞表現 Ki67，也就是進入細胞週期，顯示了在這些因子作用之前，有我們尚未了解的因子啟動了毛囊進入細胞週期，或許這又和我們觀察到和表皮對刺激的反應類似有所關聯性是否能進入分裂期，VEGFA 與 PIGF 可能就是調控的重要關卡。我們研究發現了微傷口促進全域性毛囊提前進入生長期的可能的關鍵，並希望在未來能夠以此為參考往下探討，釐清促使毛囊進入細胞週期的啟動因子，以及 VEGF 與 PIGF 究竟是透過何種作用引發如此現象，並了解微環境的變化如何影響、調控毛囊生長周期的轉變。

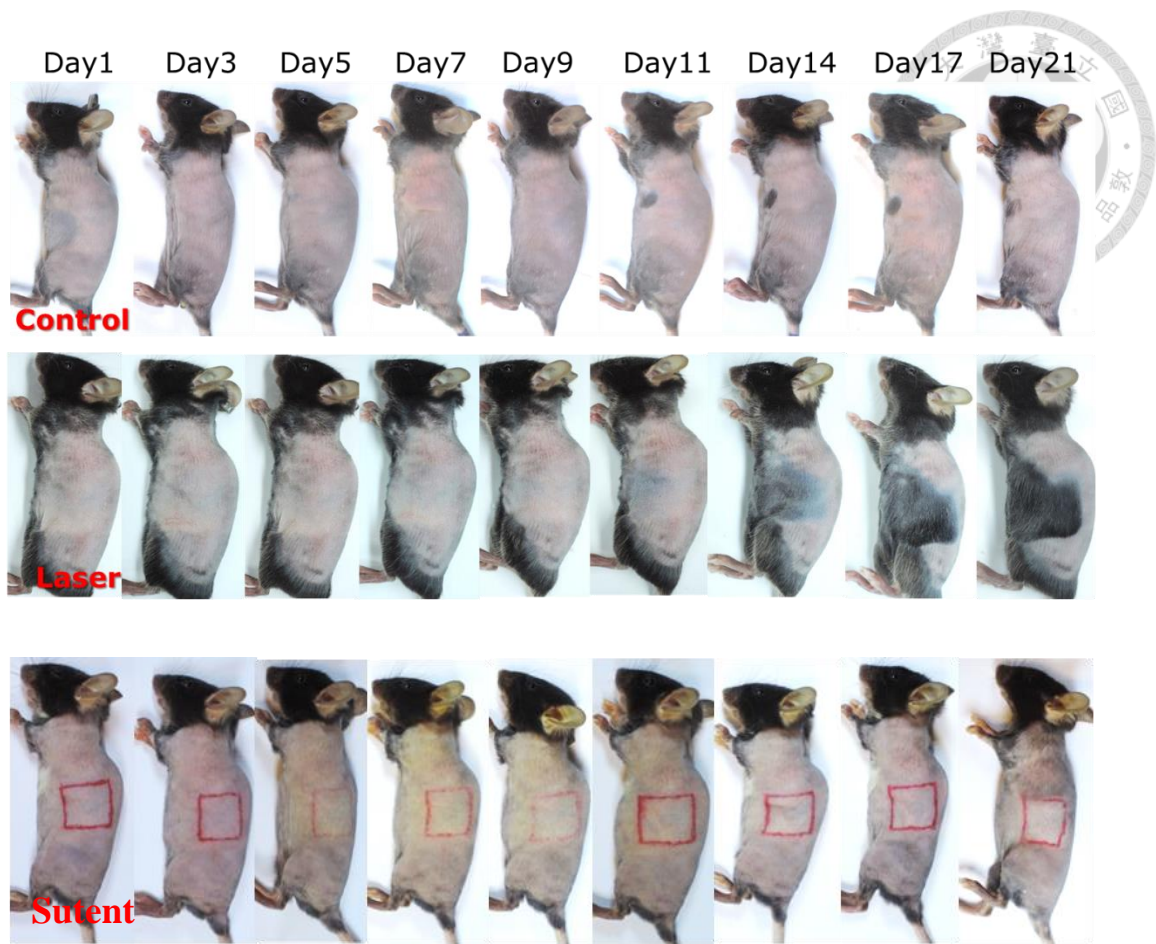


圖 4.1 經 Sutent 處理後受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠毛囊生長情況

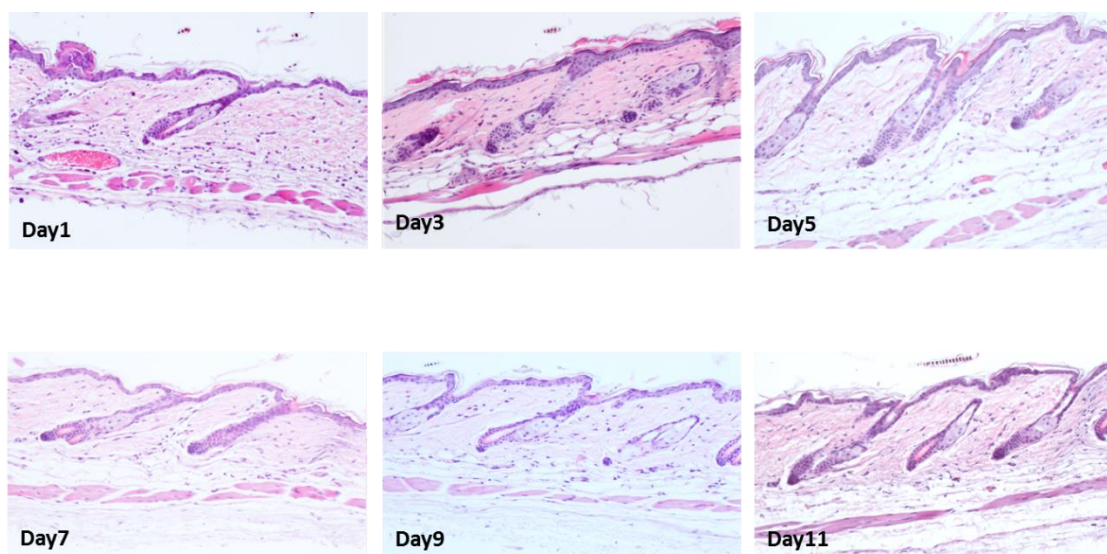


圖 4.2 經 Sutent 處理後受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠皮膚 H&E 染色圖

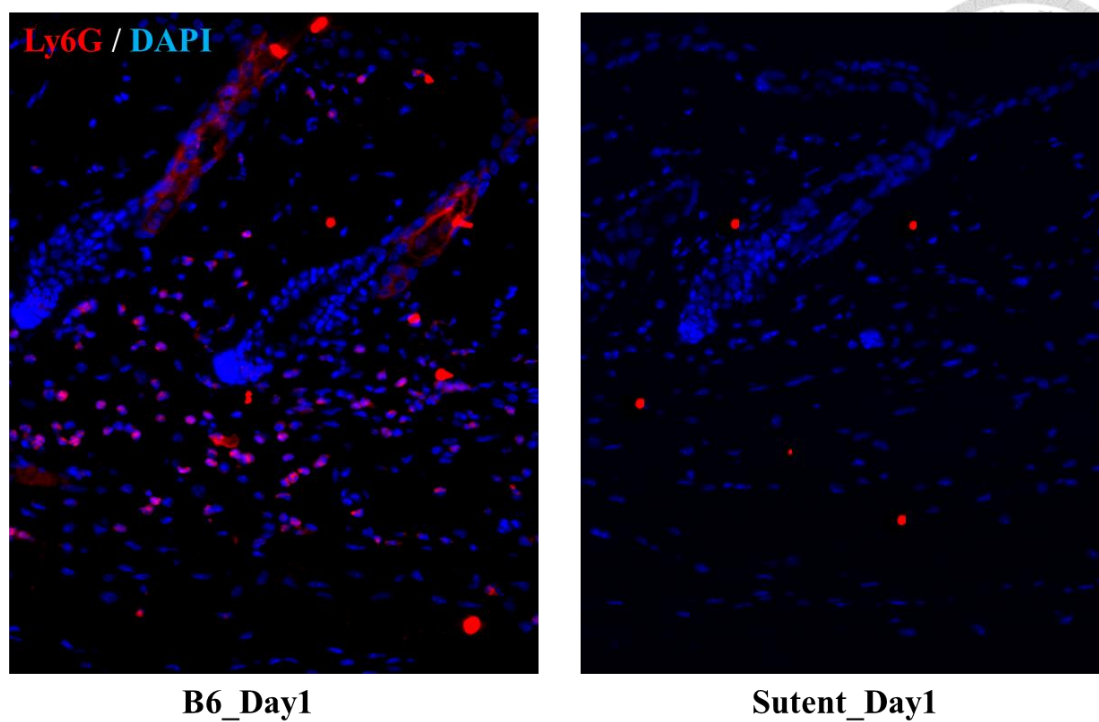


圖 4.3 經 Sutent 處理後受雷射刺激之 C57BL/6 鼠皮膚 Ly6G 之 Day1 染色

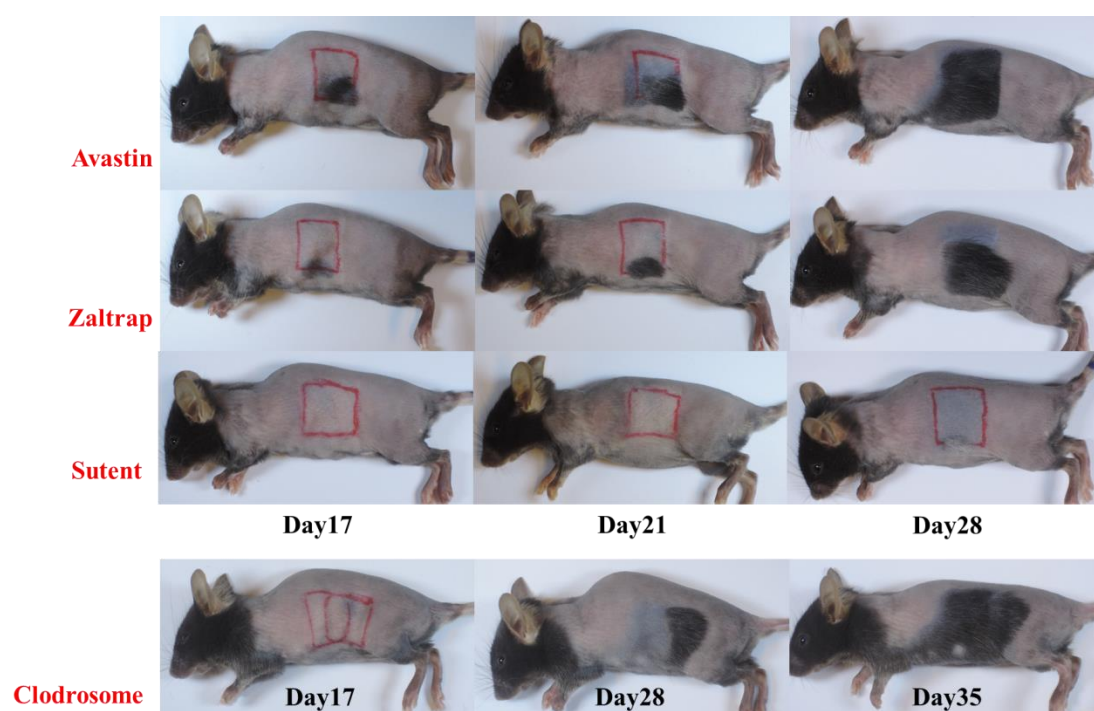


圖 4.4 不同處理後受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠觀察至 Day28 毛囊生長情況



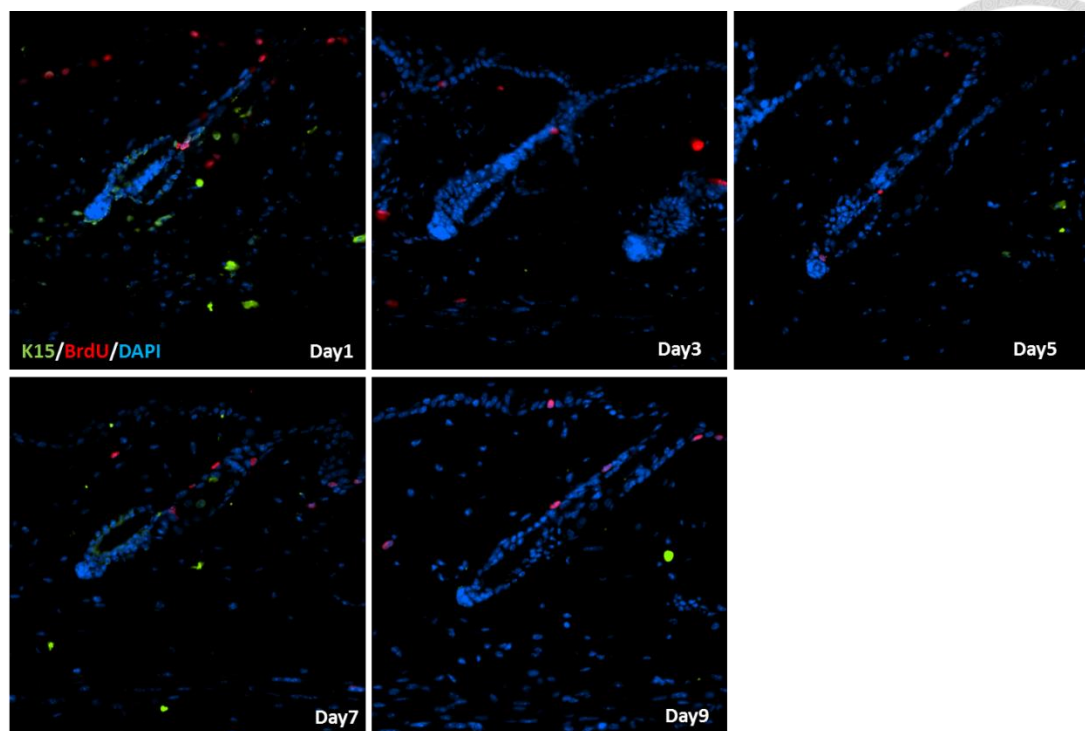


圖 4.5 經 Sutent 處理後受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠皮膚 BrdU 染色

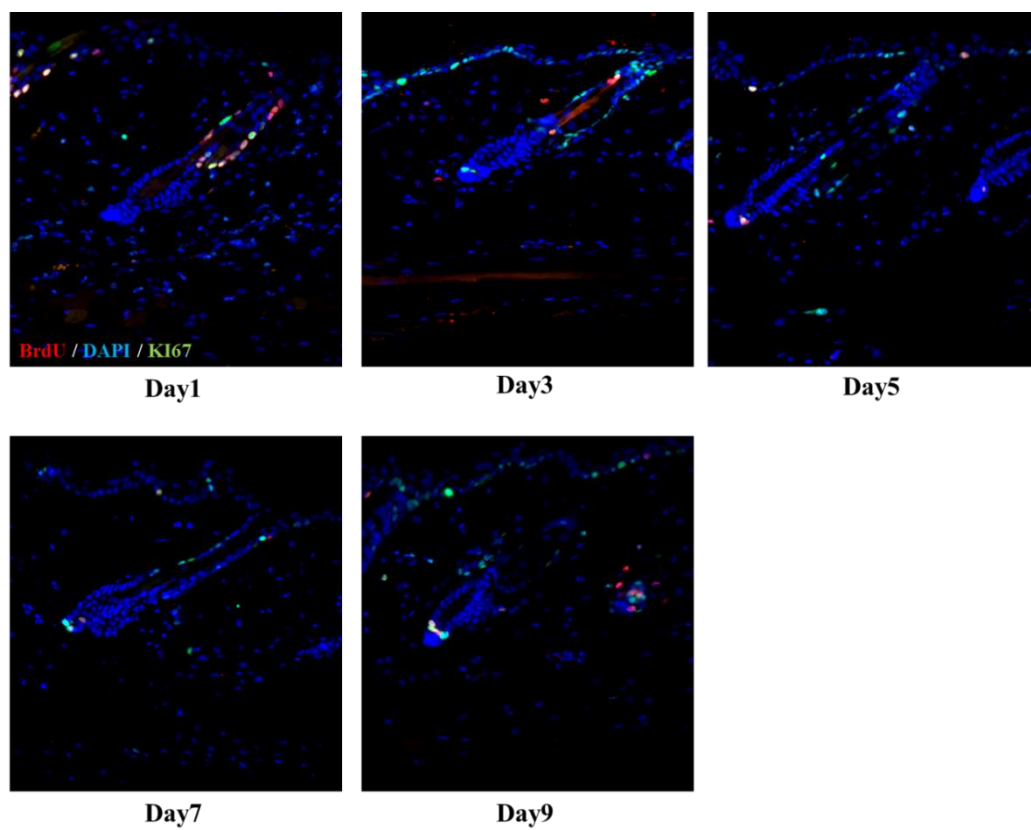


圖 4.6 經 Sutent 處理後受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠皮膚 BrdU & Ki67 染色

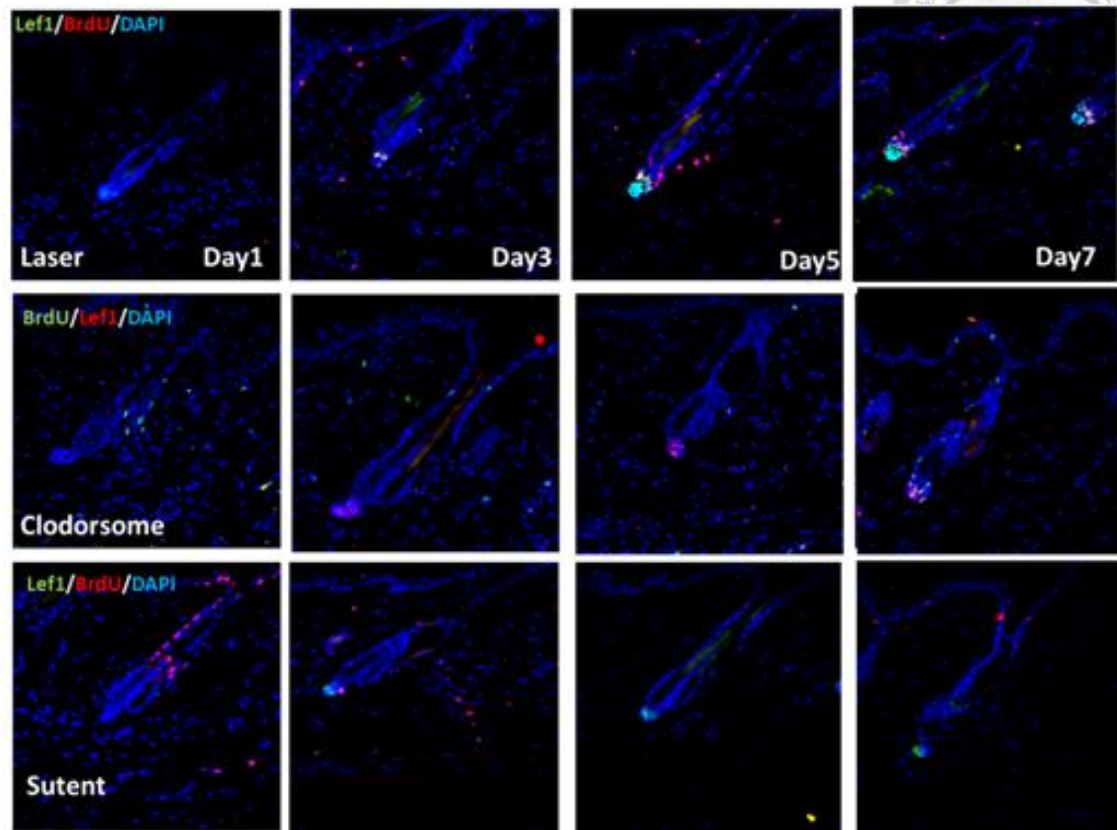


圖 4.7 不同處理後受雷射刺激之 C57BL/6 小鼠之 Lef1 染色



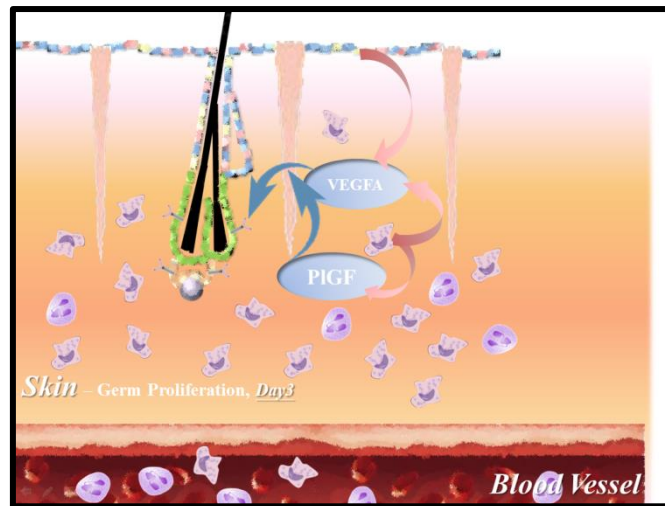
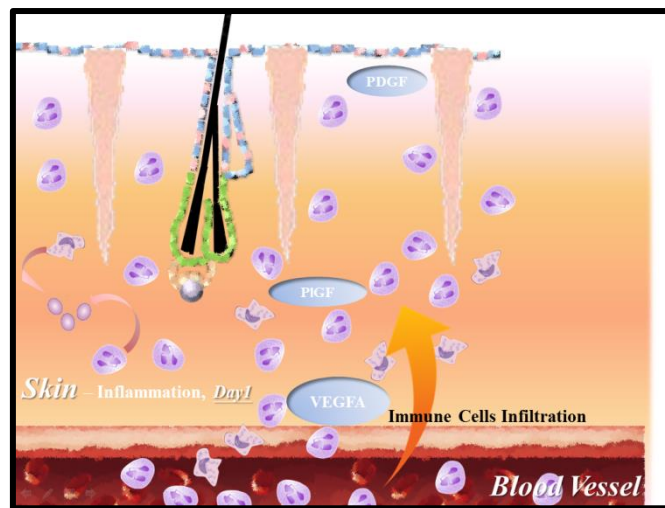
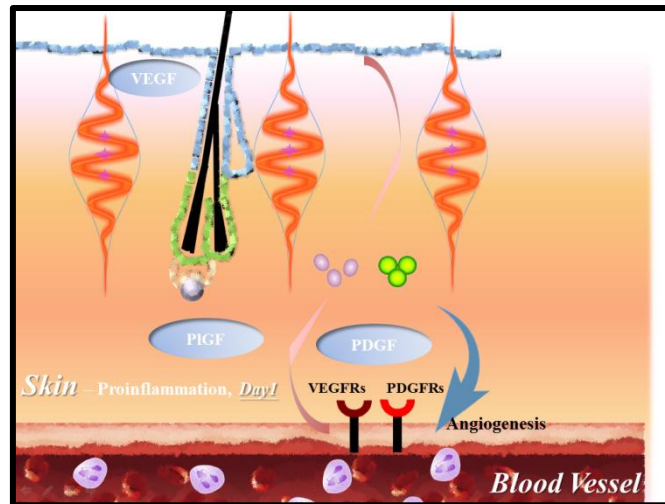


圖 4.8 受 15mj X 1048 MTZ 飛梭雷射刺激之小鼠促毛囊生長之可能機轉

## 第五章、結論

經由先前的實驗我們已經了解到，在低能量的飛梭雷射刺激下，除毛效果並不明顯，並且能夠在小鼠身上造成促進休止期毛囊進入生長期的效果。本實驗團隊長期以來致力於研究毛囊生長相關的機轉，並著重於幹細胞的變化與生長的關聯。

本研究希望利用一個不會留下疤痕又能確實促進毛囊生長的微小雷射刺激，建立一個模擬微傷口誘發休止期毛囊提前進入生長期的實驗模型，並探討其中的機轉為何。

透過觀察與文獻回顧，指出雷射刺激誘發的發炎現象與相關發炎因子與毛髮生長有存在著相當的關連性，且進入的時間與刺激的強弱、發炎強弱有所關聯。

在經過 15mJ X 1048MTZ 的雷射刺激後，TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1R、PDGF、PIGF、iNOS、Arg1、VEGFs 等發炎與生長相關因子都在第一天的時候有大量表現，且大多數在第三天後快速消退；而在發炎細胞方面，可以看到第一天時有大量嗜中性球浸潤至組織，並在第三天起有較高的巨噬細胞表現。由 qPCR 的結果可以得知巨噬細胞在第一天時較多表現與發炎相關的 M1 類型，而第三天則多以與腫瘤、修復相關的 M2 類型。這些結果都共同指出，雷射造成的燒灼刺激會在皮膚造成急性的且短暫的發炎現象，快速招募嗜中性球，並隨著聚集巨噬細胞。

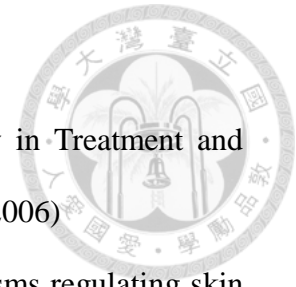
為了瞭解這些因子其中是否有調控毛囊提前進入生長期的重要因素，本研究使用基因轉殖鼠與免疫抑制劑來探討。發現 TNF- $\alpha$ 、IL-1、嗜中性球等毛囊生長因子與細胞在本模型中影響並不顯著；然而當把 VEGF 家族中的 VEGFA、PIGF 以及巨噬細胞抑制後，能夠有效延遲甚至在觀察期間完全抑制毛囊提前進入生長期。表示這些因子與免疫細胞與促進毛囊生長有一定的聯繫。

本實驗接著探討，在毛囊即將進入生長期的第三天的巨噬細胞與未處於發炎環境的巨噬細胞，是否有較高表現這些因子的跡象，結果發現巨噬細胞在第三天時有較高的 VEGFA 表現以及明顯增加的 PIGF 表現。經由先前專一抑制 VEGFA

與同時抑制 VEGFA 與 PlGF 的效果差異，認為 VEGFA 需要有 PlGF 協助刺激毛  
囊生長。並且，在整體的情況下 VEGFA 在第三天仍有高表現且巨噬細胞僅占少  
部分比例，表示第三天時巨噬細胞外的其他細胞或組織也會分泌 VEGFA，但 PlGF  
只在巨噬細胞有高表現，藉由抑制巨噬細胞的實驗結果，認為 PlGF 的調控是必  
須的。

最後，本實驗針對即將進入生長的第三天的毛囊幹細胞與次級毛胚作分析，  
發現第三天時次級毛胚在 VEGFR2 與 NRP2 都有提高表現的情形，配合相關文獻，  
指出 VEGFA 可能透過 VEGFR2 直接促使毛囊提前生長，並且需要 PlGF 與 Nrp2  
協調作用，但彼此之間的協作機制在本實驗中尚待進一步討論。除了著重探討  
VEGFA 與 PlGF 在誘導毛囊進入生長期的機制之外，未來也或許也能以此為出發  
點，多方探討促使毛囊準備進入細胞週期的因子為何，以及 VEGF 抑制對於免疫  
細胞招募的影響是否也會造成進入生長期快慢的差異、VEGF 與 PlGF 對血管新  
生是否會促進毛囊生長，以便從這彼此糾纏的機制中，逐步釐清各因子在毛囊生  
長中的調控機轉！


## 第六章、參考文獻




1. Janetta B. & Philippa B., Aromadermatology: Aromatherapy in Treatment and Care of Common Skin Conditions. Radcliffe Publishing 1-11(2006)
2. Manolis Pasparakis, Ingo Haase & Frank O. Nestle, Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. Nature Reviews Immunology 14, 289–301 (2014)
3. R. Randall Wickett & Maert O. Visscher, Structure and function of the epidermal barrier. American Journal of Infection Control 34, S98-S110(2006)
4. Maolis P., Ingo H. & Frank O.N., Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. Nature Immunology 14, 289-301(2014)
5. Luke C.D. et al., Tissue-resident macrophages. Nature Immunology 14, 986-995(2013)
6. Babak M.D. et al., Macrophages in skin injury and repair. Immunobiology 216, 753-762(2011)
7. Shao-wei Lu et al., Clodronate liposomes reduce excessive scar formation in a mouse model of burn injury by reducing collagen deposition and TGF- $\beta$ 1 expression. Mol Biol Rep. 41, 2143-2149(2014)
8. Chih-Chiang Chen et al., The Modulatable Stem Cell Niche: Tissue Interaction during and Feather Follicle Regeneration. J Mol Biol. 428, 1423-1440(2016)
9. Marlon R.S., Ruth S. & Ralf P., The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan. Current Biology 19, R132-R142(2009)
10. Sven M. et al., A comprehensive Guide for the Accurate Classification of Murine Hair Follicles in Distinct Hair Cycle Stages. J Invest Dermatol. 117, 3-15(2001)
11. K,S, Stenn & Ralf Paus, Controls of Hair Follicle Cycling. Physiol Rev. 81, 449-494(2001)
12. Wen-Hui Lien, Lisa Polak, et al., In vivo transcriptional governance of hair

follicle stem cells by canonical Wnt regulators. *Nature Cell Biology* 16, 179–190 (2014)

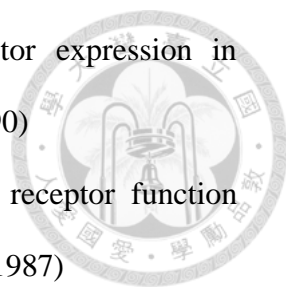
13. Uddhav A. Patil & Lakshyajit D. Dhami, Overview of lasers. *Indian J Plast Surg.* S101–S113(2008)
14. Wikramanayake, Rodriguez et al., Effects of the Lexington LaserComb on hair regrowth in the C3H/HeJ mouse model of alopecia areata. *Lasers Med Sci.* 27, 431–436(2012)
15. Eells J.T. et al., Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion* 4, 559-567(2004)
16. Chung H. et al., The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng.* 40, 516-533(2012)
17. Ibrahim, Avram et al., Laser hair removal. *Dermatol Ther.* 24, 94-107(2011)
18. Shellheyer K., Mechanisms of laser hair removal: could persistent photoepilation induce vitiligo or defects in wound repair?. *Dermatol Surg.* 33, 1055-1065(2007)
19. Moreno-Arias, Castelo-Branco et al., Paradoxical effect after IPL photoepilation. *Dermatol Surg.* 28, 1013-1016(2002)
20. Desai, Mahmoud et al., Paradoxical hypertrichosis after laser therapy: a review. *Dermatol Surg.* 36, 291-298(2010)
21. Kontoes, Vlachos et al., Hair induction after laser-assisted hair removal and its treatment. *J Am Acad Dermatol.* 54, 64-67(2006)
22. Avram Leonard et al., The current role of laser/light sources in the treatment of male and female pattern hair loss. *J Cosmet Laser Ther.* 9, 27-28(2007)
23. Peplow Chung et al., Laser photobiomodulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. *Photomed Laser Surg.* 28, 291-325(2010)
24. Brian Wong. *Laser in Surgery and Medicine*(2009)

- 
25. Michael H. Gold, MD et al., Update on Fractional Laser Technology. *J Clin Aesthet Dermatol.* 3, 42–50(2010)
  26. Manstein D, Herron GS, Sink RK, Tanner H, Anderson RR, Fractional photothermolysis: a new concept for cutaneous remodeling using microscopic patterns of thermal injury. *Lasers Surg Med.* 34, 426-38(2004)
  27. Bass L.S., Rejuvenation of the aging face using Fraxel laser treatment. *Aesthet Surg J.* 25, 307-309(2005)
  28. Walgrave, Zelickson et al., Pilot investigation of the correlation between histological and clinical effects of infrared fractional resurfacing lasers. *Dermatol Surg.* 34, 1443-1453(2008)
  29. Freedman, Greene et al., Histologic effects of resurfacing lasers. *Facial Plast Surg.* 30, 40-48(2014)
  30. Kim, Lee et al., Fractional photothermolysis laser treatment of male pattern hair loss. *Dermatol Surg.* 37, 41-51(2011)
  31. Brown and McDowell, Epithelial Healing and the Transplantation of Skin. *Ann Surg.* 112, 1166-1181(1942)
  32. V.Martinot, Mitchell et al., Comparative study of split thickness skin grafts taken from the scalp and thigh in children. *Burns* 20, 146-150(1994)
  33. Ito M. et al., Wnt dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* 447, 316-320(2007)
  34. Levy, Lindon et al., Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *FASEB J.* 21, 1358-1366(2007)
  35. Langton, Herrick et al., An extended epidermal response heals cutaneous wounds in the absence of a hair follicle stem cell contribution. *J Invest Dermatol.* 128, 1311-1318(2008)
  36. Kikgman A.M. & Strauss J.S., The formation of vellus hair follicles from human

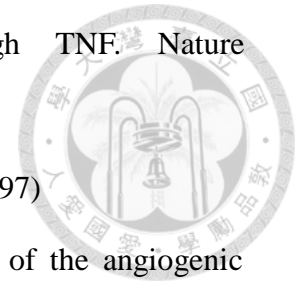
adult epidermis. J Invest Dermatol. 27, 19-23(1956)

- 
37. Billingham R.E. & Russel P.S., Incomplete wound contracture and the phenolon of hair neogenesis in rabbit's skin. Nature 177, 791-792(1956)
38. Breedies C., Regeneration of hair follicles and subaceous glands from the epithelium of scars in the rabbit. Cancer Research 12, 575-579(1954)
39. Ito M. te al., Stem cells in the hail follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. Nature Medicine 11, 1351-1354(2005)
40. Cheng-Ming Chuong, Regenerative biology: New hair from healing wounds. Nature 447, 265-266(2007)
41. Nao Osaka et al., ASK1-dependent recruitment and activation of macrophages induce hair growth in skin wounds. J Cell Biol. 176, 903-909(2007)
42. Shu Jiang et al. Small cutaneous wounds induce telogen to anagen transition of murine hair follicle stem cell. Journal of Dermatological Science 60, 143-150(2010)
43. Adam J. Singer et al., Cutaneous wound healing. N Engl J Med. 341, 738-746(1999)
44. Gurtner et al., Wound repair and regeneration. Nature 453, 314-321(2008)
45. Guo and Dipietro, Factors affecting wound healing. J Dent Res. 89, 219-229(2010)
46. Gregory S. Schultz et al., Dynamic reciprocity in the wound microenviroument. Wound Repair Ragen. 19, 134-148(2011)
47. Mahdavian Delavary B. et al., Macrophages in skin injury and repair. Immunobiology 216, 753-762(2011)
48. Maciej Lech & Hans-Joachim Anders, Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. Biochim Biophys Acta. 1832, 989-997(2013)



- 
49. Clark, Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin. *J Invest Dermatol.* 94, 128S-134S(1990)
  50. Grinnell, Toda et al., Activation of keratinocyte fibronectin receptor function during cutaneous wound healing. *J Cell Sci Suppl.* 8, 199-209(1987)
  51. Moulin, Auger et al., Role of wound healing myofibroblasts on re-epithelialization of human skin. *Burns* 26, 3-12(2000)
  52. O'Toole E.A., Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Clin Exp Dermatol.* 26, 525-530
  53. Taylor, Lehrer et al., Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102, 451-461(2000)
  54. Watt F.M. and Jensen K.B., Epidermal stem cell diversity and quiescence. *EMBO Mol Med.* 1, 260-267(2009)
  55. Snippert, Haegebarth et al., Lgr6 marks stem cells in the hair follicle that generate all cell lineages of the skin. *Science* 327, 1385-1389(2010)
  56. Darby I. et al., Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest.* 63, 21-29(1990)
  57. Hinz, Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 127, 526-537(2007)
  58. A. Desmoulière et al., Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.* 146, 55-56(1995)
  59. Gurtner et al., Wound repair and regeneration. *Nature* 452, 314-321(2008)
  60. Castellana D., Ralf P. & Mirna P., Macrophages Contribute to the Cyclic Activation of Adult Hair Follicle Stem Cells. *PLoS Biol.* 12, e1002002(2014)
  61. Chih-Chiang Chen et al., Organ-Level Quorum Sensing Directs Regeneration in Hair Stem Cell Population. *Cell* 161, 277-290(2015)
  62. Xusheng Wang et al., Macrophages induce AKT/ $\beta$ -catenin-dependent Lgr5<sup>+</sup> stem

cell activation and hair follicle regeneration through TNF. *Nature Communications* 8, 14091(2017)

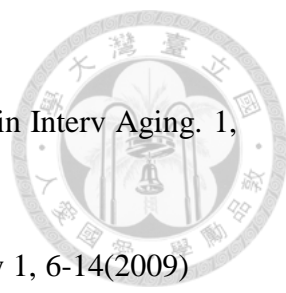


63. Risau W. Mechanism of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674(1997)
64. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364(1996)
65. Shibuya M. Role of VEGF-Flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 67, 281-316(1995)
66. Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309(1989)
67. Lee S, Chen TT, Barber CL, et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* 130, 691-703(2007)
68. Stacker SA, The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J.* 16, 922-934(2002)
69. Eklund L. et al., Mouse models for studying angiogenesis and lymphangiogenesis in cancer. *Mol Oncol.* 7, 259-282(2013)
70. Masabumi Shibuya, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis. *Genes Cancer* 2, 1097–1105(2011)
71. Masabumi Shibuya, Tyrosine Kinase Receptor Flt/VEGFR Family. *Genes Cancer* 1,. 1119–1123(2010)
72. Christian Lange, Erik Storkebaum et al., Vascular endothelial growth factor a neurovascular target in neurological diseases. *Nature Reviews Neurology* 12, 439–454 (2016)
73. Yueh-Feng Wu, Shiou-Han Wang, Pei-Shan Wu, Sabrina Mai-Yi Fan, Hsien-Yi Chiu, Tsung-Hua Tsai, Sung-Jan Lin.Enhancing Hair Follicle Regeneration by Nonablative Fractional Laser: Assessment of Irradiation Parameters and Tissue

Response. *Lasers in Surgery and Medicine* 47, 331–341 (2015)

74. Jean M. Daley et al. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *Journal of Leukocyte Biology* 83, 64-70(2008)
75. Felix C. Weber et al., Neutrophils are required for both the sensitization and elicitation phase of contact hypersensitivity. *J Exp Med.* 212, 15-22(2015)
76. van Rooijen N. et al., Liposomes for specific depletion of macrophages from organs and tissues. *Methods Mol Biol.* 605, 189-203(2010)
77. Nicholas Papadopoulos, Joel Martin, Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis* 15, 171–185(2012)
78. Laura A Sullivan & Rolf A Brekken, The VEGF family in cancer and antibody-based strategies for their inhibition. *MAbs* 2, 165–175(2010)
79. Kuifeng He, Guangliang Li, Haohao Wang et al., The effect of anti-VEGF drugs (bevacizumab and aflibercept) on the survival of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). *Onco Targets Ther.* 5, 59–65(2012)
80. Faivre S. et al., Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat Rev Drug Discov.* 6, 734-745(2007)
81. Robert Roskoski Jr. Sunitinib: A VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356, 323-328(2007)
82. Yi Zhang, Jin Yu, Lef1 Contributes to the Differentiation of Bulge Stem Cells by Nuclear Translocation and Cross-Talk with the Notch Signaling Pathway. *Int J Med Sci.* 10, 738-746(2013)
83. van Oijen MG et al., Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *Am J Clin Pathol.* 110, 24-31(1998)
84. Paus R. et al., Chronobiology of the Hair Follicle: Hunting the “Hair Cycle

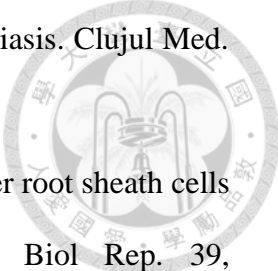
Clock". J Invest Dermatol Symp Proc. 4, 338-345(1999)

- 
85. Ralph M Trüeb., Pharmacologic interventions in aging hair. Clin Interv Aging. 1, 121–129(2006)
86. RM Trüeb., Oxidative Stress in Ageing of Hair. Int J Trichology 1, 6-14(2009)
87. Mantovani A et al., Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. Nature Reviews Immunology 11, 519-531(2011)
88. Sebastien Jaillon et al., Neutrophils in innate and adaptive immunity. Seminars in Immunopathology 35, 337-394(2013)
89. Sinnathamby T. et al., VEGF and angiopoietins promote inflammatory cell recruitment and mature blood vessel formation in murine sponge/Matrigel model. Journal of cellular biochemistry 116, 45-57(2015)
90. T F Deuel, R M Senior et al, Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. J Clin Invest. 69, 1046–1049(1982)
91. Bobic S. et al., Placental growth factor contributes to bronchial neutrophilic inflammation and edema in allergic asthma. Am J Respir Cell Mol Biol. 46, 781-789(2012)
92. Emanuela C. & Corrado L.G., Cytokines and irritant contact dermatitis. Toxicol Lett. 102-103, 277-282(1998)
93. Haur Yueh Lee et al., Cytokines and Chemokines in Irritant Contact Dermatitis. Mediators of Inflammation 2013, 1-7(2013)
94. Kiichiro Yano et al., Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. J Clin Invest. 107, 409–417(2001)
95. Mieke Dewerchin and Peter Carmeliet, PlGF: A Multitasking Cytokine with Disease-Restricted Activity. Cold Spring Harb Perspect Med. 2, a011056(2012)
96. Autiero M. et al., Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue

- revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost.* 1, 1356-1370(2003)
97. Cao Y. et al., Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.* 271, 3154-3162(1996)
98. Collins T. et al., Cultured human endothelial cells express platelet-derived growth factor A chain. *Am J Pathol.* 126, 7-12(1987)
99. Deuel TF et al., Growth Factors and Wound Healing: Platelet-Derived Growth Factor as a Model Cytokine. *Annu Rev Med.* 42, 567-584(1991)
100. Heldin CH & Westermark B., Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 79, 1283-1316(1999)
101. Thomas A. Wynn1 & Kevin M. Vannella1, Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 44, 450-462(2016)
102. F.O. Martinez & S. Gordon, The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.*, 6-13(2014)
103. Bruce A. Corliss, Jenny Munson et al., Macrophages: An Inflammatory Link between Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Microcirculation* 23, 95–121(2016)
104. Elias I. et al., New insights into adipose tissue VEGF-A actions in the control of obesity and insulin resistance. *Adipocyte* 2, 109-112(2013)
105. Sato Y., VEGFR1 for Lymphangiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28, 604-605(2008)
106. Claus Cursiefen, Lu Chen et al., VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest.* 113, 1040–1050(2004)
107. Ki-Jo Kim, Chul-Soo Cho, Role of placenta growth factor in cancer and

- inflammation. *Exp Mol Med.* 44, 10–19(2012)
- 108.Incio J. et al., PlGF/VEGFR-1 Signaling Promotes Macrophage Polarization and Accelerated Tumor Progression in Obesity. *Clin Cancer Res.* 22, 2993-3004(2106)
- 109.Xi Li et al., Placental growth Factor contributes to liver inflammation, angiogenesis, Fibrosis in Mice by Promoting hepatic Macrophage recruitment and activation. *Front Immunol.* 8, 2017
- 110.Mieke Dewerchin and Peter Carmeliet, PlGF induces the secretion of VEGF and proinflammatory cytokines from mononuclear cell. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2, a011056(2012)
- 111.J. Arnout, M. Hoylaerts et al., *Thrombosis: Fundamental and Clinical Aspects.* Leuven University Press, 253(2003)
- 112.Ki-Jo Kim, Chul-Soo Cho et al., Role of placenta growth factor in cancer and inflammation. *Exp Mol Med.* 44, 10–19(2012)
- 113.Man XY. et al., Expression and localization of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in human epidermal appendages: a comparison study by immunofluorescence. *Clin Exp Dermatol.* 34, 396-401(2009)
- 114.Hui-Jun Ma, et al., Acquired Localized Hypertrichosis Induced by Internal Fixation and Plaster Cast Application. *Ann Dermatol.* 25, 365-367(2013)
- 115.MW Yuen et al., Acquired Localised Hypertrichosis in a Chinese Child After Cast Immobilisation. *Hong Kong Med J.* 21, 369-371(2015)
- 116.Moon S.H. et al., Pathological findings in cumulative irritation induced by SLS and croton oil in hairless mice. *Contact Dermatitis.* 44, 240-245(2001)
- 117.Wilgus T.A. et al., Novel function for vascular endothelial growth factor receptor-1 on epidermal keratinocytes. *Am J Pathol.* 167, 1257-1266(2005)



- 
- 118.MIHAELA ELENA MARINA et al., VEGF involvement in psoriasis. *Clujul Med.* 88, 247–252(2015)
- 119.Li W. et al., VEGF upregulates VEGF receptor-2 on human outer root sheath cells and stimulates proliferation through ERK pathway. *Mol Biol Rep.* 39, 8687-8694(2012)
- 120.Derek C. Lacey et al., Defining GM-CSF– and Macrophage-CSF–Dependent Macrophage Responses by In Vitro Models. *J Immunol.* 188, 5752-5765(2012)
- 121.Ko J.S. et al., Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res.* 15, 2148-2157(2009)
- 122.Massena S. et al., Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans. *Blood.* 126, 2016-2026(2015)
- 123.Dineen SP. et al., Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Mediates Macrophage Infiltration into Orthotopic Pancreatic Tumors in Mice. *Cancer Res.* 68, 4340-4346 (2008)
- 124.Luttun A. et al., Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): novel therapeutic targets for angiogenic disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 979, 80-93(2002)
- 125.Hira Lal Goel and Mercurio A.M., VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer.* 13, 871–882(2013)
- 126.Favier B et al., Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood.* 108, 1243-1250(2006)