

出國報告(出國類別：進修)

美國博士學位進修心得報告
主題：皮膚組織工程與發育

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：歐冠伶、整型外科主治醫師

派赴國家/地區：美國洛杉磯

出國期間：104年8月24日至109年2月24日

報告日期：109年4月9日

摘要

鍾正明院士實驗室長期致力於研究皮膚、毛髮及羽毛的形成，範圍涵蓋最初毛囊如何定位、後續組織如何嵌入以及在傷口狀況下毛髮如何能再生。不論是毛髮再生、組織嵌入或傷口模式皆與整型外科領域息息相關。鍾院士實驗室廣納人才且使用各種生物模組：除了一般常見的實驗鼠外，還有雞與鵝鶉，甚至小鱷魚與非洲刺鼠，都是實驗室研究的材料。進實驗室之初，我在 Dr. Erin L. Weber 指導下使用人類皮膚細胞進行組織工程培養，研究人類皮膚細胞如何自行重組成類毛囊原型。第二年鍾院士交予我另一項任務，研究在上皮阻斷乙型第二型異構酶之轉基因鼠之掉毛現象，在此階段中我學習了使用流式細胞儀、螢光活化細胞以及次世代定序…等技術。第三年要提出計畫，進行博士候選人筆試及口試。院士考量我出身整型外科，對於重建需要的皮瓣血管系統以及現今與細胞治療領域相關的脂肪幹細胞有一定的熟悉度，便鼓勵我研究鳥類皮膚的血管系統與脂肪組織如何與毛囊組織形成皮膚系統。此年度我的計劃正式定為：「皮膚發育之適應模式：血管系統與脂肪組織的建立」。順利通過博士候選人考試後，我使用之前習得的實驗技術潛心研究鳥類皮膚的血管系統與脂肪組織，加上同學與實驗室同事鼎力相助，在最後一年通過答辯，於規定國外博班全時進修期限內畢業。

目次

摘要.....	2
目的.....	4
過程.....	5
心得與建議.....	8
致謝.....	8

本文

目的

毛囊含有多種幹細胞且具有於非胚胎時期可再生之能力，現今學界多研究鼠類毛髮細胞再生，已有相當規模，然而人類細胞除來源取得困難本身亦有難解之謎，故所知所成相當有限。若可達成人類毛髮再生則代表皮膚亦可再生，不僅在燒傷、困難傷口重建領域可有重大突破，在皮膚發育學與禿髮治療皆有發展之可能性。皮膚組織工程在燒傷、困難傷口重建領域有其臨床價值，若有再生皮膚可使用，則病人無需挖東牆補西牆。現今 3D 列印蔚為風潮，雖可有相同之皮膚結構，但後續若無血管系統形成，3D 列印之植體存活有限。我使用鳥類皮膚為模型，在羽毛芽孢剛形成之初，研究血管系統如何組織及與羽毛芽孢之間的關係。希望藉由瞭解皮膚發育中血管系統形成之原理，在皮膚組織工程、再生醫學及臨床療法上有所突破。另外，脂肪幹細胞於學界、醫界仍為熱門研究題材，原因無非取得容易且人體含大量脂肪組織，應用於臨床機會高。然現今多研究鼠與人之脂肪組織，對鳥禽類脂肪胚胎發育所知甚少。鍾正明院士實驗室專長為研究鳥類羽毛，對鳥禽類解剖構造熟悉，期憑藉實驗室優點於脂肪胚胎發育學拓展未知領域，了解脂肪發育起源。綜上所述，為皮膚胚胎生長發育研究領域。期合併皮膚血管及脂肪之研究，豐富個人研究涵養與實力並使皮膚再生生物科學知識範疇更向上提升。

過程

第一年

1. 在美攻讀博士班與英國最大不同即是有必修及選修課程之要求。雖然上課花時間且有考試及報告壓力，但對於從臨床馬上投入基礎研究的我有其必需。有上課的好處是可以認識很多來自不同國家的同學，考前互助學習之外，也培養了革命情感與熟悉第二語言的使用。不僅學業與生活上互相幫忙，有實驗上的問題也可與本科就是讀生物的同學請教，甚至日後一起做實驗，同學惠我良多。
2. 實驗室方面，鍾院士安排一位醫學博士同時也是美國整型外科住院醫師的 Dr. Erin L. Weber 擔任我的指導老師。我在第一年學習了組織切片，細胞培養，RNA 萃取，分子克隆及 PCR 等相關技術，很快能協助 Dr. Weber 進行實驗並預備於第二年 Dr. Weber 回臨床工作後接手人類皮膚組織工程的計劃。
3. 學長葉肇元醫師教導我使用螢光共軛顯微鏡，鼓勵我爭取接手 Dr. Weber 手上的計劃，並在學習實驗技術上給我諸多建議。葉醫師雖後續未完成博班學業，但於博士班期間發現興趣為電腦工程，結合其醫療背景與生物實驗知識另闢蹊徑，日前在台灣成立「雲象」公司並著力於醫療 AI 人工智慧發展，與台大、長庚醫院皆有合作並發表文章，且爭取國內外新創基金皆獲得賞識。葉醫師實為醫界不典型之模範。

第二年

1. 此年度課業方面已不構成壓力，主要學習科學論文寫作以及可選修課程。南加大以電影學院著稱，戲劇學院有提供「正音」及「演說」課程。因日後上台演示及報告機會還是很多，我向部門主任爭取至戲劇學院上課。非常有趣的是，老師以肢體的方式演繹，並要求同學做相關練習。除此之外老師還教導各種放鬆技巧，讓同學在做公共演講時能盡量不緊張，或隱藏緊張並投入自己的演說。我也從此課程裡學到上台報告還是需要投入時間精力反覆練習，才能傳達甚至感染群眾。
2. 實驗室方面，接手的人類皮膚組織工程計劃有初步研究成果：我們發現人類皮膚細胞在 3D 環境培養下會自行重組成類毛囊原型，移植到裸鼠皮下二個月後會有毛囊、毛髮生

成。除了與發育中毛囊型態相似，我們使用幾種具有表皮基板及真皮乳頭代表性的抗體對此類毛囊原型進行染色，發現與發育中毛囊表達亦相似。此類毛囊原型於培養皿中之發育階段也與人體胚胎中毛囊發育階段相似：一開始表皮細胞會在底部形成一層結構，真皮細胞會在上形成小聚落並逐漸變大成真皮細胞團，最後表皮細胞會像樹幹一樣支撐起真皮細胞團形成類毛囊原型。除此之外，宏觀上整個 3D 培養環境裡此類毛囊原型於時間空間上呈現特殊分佈：先是線條然後呈點狀最後是迷宮形態，符合 Turing 法則。與實驗室合作之數學家並可以數學模型重現此分佈，我們認為此模組之創立將可應用於研究毛髮再生與測試毛髮生長藥物…等。

3. 除了人類皮膚組織工程的計劃，鍾院士並給予我另一項任務：研究在上皮阻斷乙型第二型異構酶之轉基因鼠之掉毛現象。在梁雅珍博士的協助下，我研究了如何使用流式細胞儀、螢光活化細胞並找到適用於抽取微量 R N A 以及次世代定序的品項。

第三年

1. 接續人類皮膚組織工程計劃，我們為胚胎與成人真皮乳頭做次世代定序，希望可以找出毛髮再生的關鍵基因。雖次世代定序有初步成果，但在後續實驗印證上遭遇困難。因博士候選人資格考，暫緩人類皮膚組織工程計畫。
2. 研究在上皮阻斷乙型第二型異構酶之轉基因鼠之掉毛現象亦遭逢困難。我雖花時間研究實驗方法與背景知識，無奈轉基因鼠遲遲未表達掉毛現象。推測為此轉基因鼠於實驗室已逾十年，雖基因型尚存，但已失去掉毛現象之表型。
3. 此年度重點為博士候選人資格考，要提出計畫，前兩項計畫都未能有預期結果。鍾正明院士實驗室專長為研究鳥類羽毛，對鳥禽類解剖構造熟悉，鍾院士考量我出身整型外科，對於重建需要的皮瓣血管系統以及現今與細胞治療領域相關的脂肪幹細胞有一定的熟悉度，便鼓勵我研究鳥類皮膚的血管系統與脂肪組織如何與毛囊組織形成皮膚系統。我閱讀文獻發現現今多研究鼠與人之脂肪組織，對鳥禽類脂肪胚胎發育所知甚少，是一個我感興趣且可以做的題目。在鍾院士推薦介紹下組織了 guidance committee，成員有：南加大牙醫學院博士班主任副教授 Dr. Michael L. Paine, 南加大生化所教授 Dr. Robert Maxson, 洛杉磯兒童醫院放射科特聘研究員副教授 Dr. Rusty Lansford 鍾院士。

第四年

1. 在鳥類皮膚的血管系統方面，我使用了 Tiel:H2B-eYFP 的轉基因鵪鶉來研究血管內皮細胞的發育。Tiel 轉基因鵪鶉的內皮細胞核會發出黃綠色螢光，為研究胚胎時期血管發育很好使用的模組。當皮膚在形成羽毛芽孢時，可以發現帶有黃綠色螢光細胞核的細胞立刻聚集其下。另外，FGF2 與 VEGF 等血管促進因子在羽毛芽孢處之表皮較真皮有較高的表達。除觀察到鳥類皮膚的血管內皮細胞與羽毛芽孢初期形成位置相關，並發現跟羽毛芽孢之表皮部分而非真皮，相關性較大。另一方面，sprouty2 與 noggin 為已知會抑制血管生成之因子。當過表達 sprouty2 與 noggin 時，在羽毛發育晚期發現不正常之表形。最後，我們想知道鳥類皮膚的血管內皮細胞是來自於血管新生(angiogenesis)或是自發性的血管形成(vasculogenesis)。我們使用流式細胞儀分別收取發育中的皮膚與心臟的血管內皮細胞與其他真皮細胞，抽取微量 R N A 以及次世代定序，發現皮膚的血管內皮細胞基因表達與皮膚其他的真皮細胞較相近（相較於心臟的血管內皮細胞）。除了血管新生相關基因外，發育中的皮膚血管內皮細胞亦表達了肌肉發育與脂肪生成相關基因。推測皮膚的血管內皮細胞應是來源於自發性的血管形成(vasculogenesis)，令我們驚訝的是：一樣是 Tiel 內皮細胞，皮膚中的 Tiel 內皮細胞較心臟的 Tiel 內皮細胞表達了肌肉發育與脂肪生成相關基因，推測間質細胞在早期胚胎發育時期仍處於一種彈性可轉換功能階段。
2. 在鳥類皮膚的脂肪系統方面，我研究了胚胎時期脂肪在皮膚的分佈、可用來標記鳥類皮膚脂肪的抗體以及脂肪細胞在鳥類皮膚的分化。我們發現鳥類皮膚脂肪的分佈與羽毛的分佈呈現正相關，不僅如此，皮下脂肪更與血管分佈相關而真皮層脂肪與羽毛肌肉相關。我們找出 C/EBP α 可標記鳥類皮膚前驅脂肪細胞，且作為轉錄因子在細胞核表達。另外我們以 lentivirus 系統追蹤 SMA 細胞，發現皮膚的部分 SMA 細胞會發育成表達 C/EBP α 的前驅脂肪細胞。最後我們比較組織培養與鳥類的尿囊絨毛膜模組發現血管/血液對於脂肪的發育是必要性的存在。整體來說，鳥類與哺乳類有相似的皮膚脂肪分佈：都有皮下脂肪與真皮脂肪的分層。但是在真皮脂肪層，因鳥類有複雜的羽毛肌肉系統，脂肪發育分佈與其相關，這是與哺乳類不同的部分。追蹤 SMA 細胞串連了脂肪、肌肉與血管之間的關係，在肌肉與血管的部分 SMA 細胞會發育成表達 C/EBP α 的前驅脂肪細胞。我們發現鳥類的尿囊絨毛膜模組可以支持脂肪細胞在體外的發育後，亦著手測試所謂「適應模

式」的概念。

心得與建議

1. 於美國研讀博士班除了課業與研究進度的壓力外，對於時間的分配與掌控格外重要。臨床工作有時間表可遵循，但實驗室工作的時間表要靠自己安排。我個人比較後悔在第一年時為了貪圖早點把必修課程修完，而沒有足夠的時間向 Dr. Weber 學習實驗方法，導致後面研究過程常常遇到瓶頸而無法自行找出失敗原因。所幸實驗室有經驗的同仁都很願意幫忙，老師也考量國防部全時進修期限，適時建議我轉換方向。最後在申請延長六個月的期限下，終於能如期通過口試並繳交論文。
2. 另一項遺憾是因為身處華人眾多的洛杉磯，實驗室也多是華人，認識的朋友也多是華人，除了實驗室例行報告外，使用英文的機會很少，感覺英文並沒有進步，都到了美國求學卻沒有跨出舒適圈。沒有能深入了解美國人的文化、多認識一些不同國家的朋友，有點可惜。
3. 鍾院士始終鼓勵實驗室成員參加大型會議，了解世界上其他人在做什麼對於自己做的計畫也非常重要。不論是參加分子生物學或幹細胞會議，我每次都有大開眼界的感覺。看看其他人在相同的問題上用什麼方法解決，也會對自己手上的工作有所反思。有時閱讀的沒有那麼全面，在會議上會得到重要的新資訊或找到問題的解決辦法。
4. 在這四年博士學位的學習過程中，最大的收穫是了解鍾院士實驗室回答發育生物學問題的方法、一篇好的文章需要哪些要素以及發表文章如何編排的邏輯性。另外，鍾院士與國內多所大學有合作，認識了很多國內不同領域的專家，相信回到國內在研究這條路上會受惠良多。希望將來可以運用所學對國內醫療研究領域，特別是與整型外科、傷口、燒傷、戰傷、重建與再生相關，能做出成果發表期刊或回饋於臨床病人上。
5. 預定於 109 年 4 月 9 日 0730 時於外科部會議分享進修心得。

致謝

特別感謝國防醫學院、三軍總醫院、軍醫局及國防部各位師長及長官的支持與鼓勵，讓我無

後顧之憂地在洛杉磯攻讀博士學位。感謝我的指導老師鍾正明院士給我機會與肯定，願意接受並指導一個無實驗基礎的臨床醫師作為博士生。讓我除了是整型外科醫師，更成為一個科學家。另外，非常感謝實驗室成員以及我的同學不論在實驗上或生活上的幫助，都讓我在求學過程中順遂許多。感謝整型外科的老師、學長、學弟妹們一直以來的支持，還有我的家人在我最後兩年沒有回台灣時，更是飛到美國來一起團聚並參加我的畢業典禮。感謝老天眷顧，讓我在每個可能受到挫折的時機都安排了貴人相助。甚至，連回台灣時間都安排的好好的，在加州新冠肺炎爆發前三週就抵達台灣了。希望未來秉持對研究的熱忱，能運用所學為我國、國軍、臨床病人及國防醫學院、三軍總醫院醫療研究做出貢獻。



Fig.1 實驗室成員：上圖左與口試委員之一蔣老師合影;下圖中與 Dr. Erin L. Weber 合影。

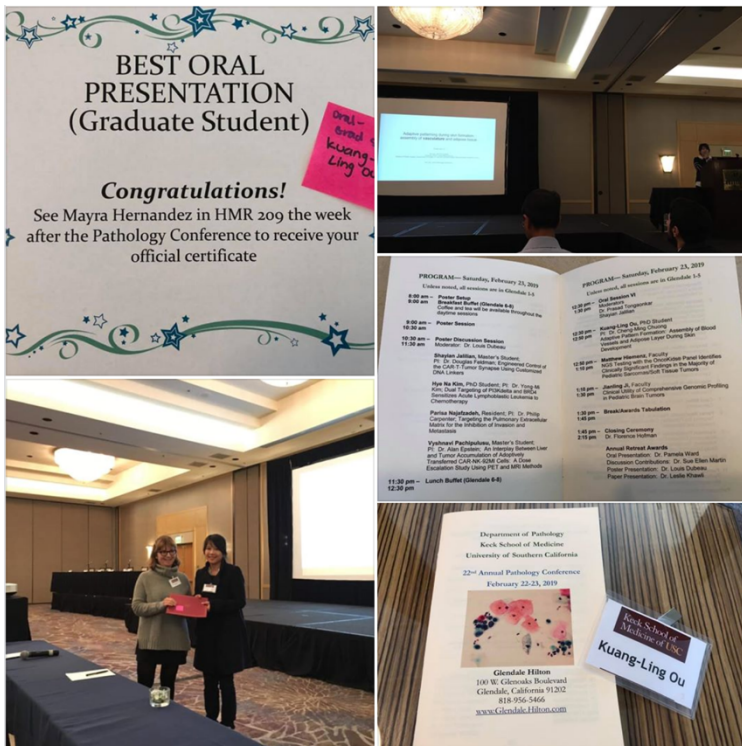


Fig.2 參與南加大醫學院病理部學術研討會，獲選博士生組最佳口頭報告。



Fig.3 參與加州大學爾灣分校細胞分化會議貼海報：上圖右與指導老師鍾正明院士合影；下圖左與台大整形外科進修醫師官振翔學長合影。



Fig.4 與指導老師鍾正明院士（左二）、Dr. Randall Widelitz（右二）以及台大牙醫師蔡迪珊準博士（右一）合影。