

無心插柳的研究之路

台北榮總皮膚部
主治醫師陳志強

在台北榮總接受皮膚科住院醫師訓練的四年期間從未想過我將來會走進醫學研究的領域。因為我是教育部的公費生必須要下鄉服務，因此在訓練結束後我便被分配到桃園榮民醫院去服務。在下鄉期間由於工作性質較單純因此總有相當多空閒的時間，這時候心裡就在想既然桃園距離台北不是太遠我何不藉由這段期間順便拿個碩士學位，這樣不是一舉兩得嗎？因此便報考陽明大學的臨床醫學研究所的碩士班，然而在開始上”做研究”的基礎課程後才發現，原來”做研究”並不是如我所想的哪麼容易及枯燥乏味，因此在念了一年的碩士班之後便決定要念博士班。進入博士班之後，開始對於”研究方向”產生了疑問，一開始只覺得既然我是皮膚科醫師那我可能可以做跟老化相關的議題看有沒有什麼方式可以減緩皮膚老化的可能，但如此”制式”的想法卻讓我在學習過程中依然抱持著疑問。正在此時美國南加州大學鍾正明院士受陽明大學李光申教授的邀請來陽明大學演講，在聽完鍾院士的演講完後深受感動，那時候只覺得很奇怪基礎研究到底有什麼樣的魔力可以讓鍾院士這樣的熱愛使他即使在極度忙碌的工作下仍然充滿了笑容的教育下一代，訴說他的研究領域及研究初衷。當下便覺得若是我能到鍾院士的實驗室去學習的話應該就能找到我研究的方向了，因此在李光申教授的引薦下認識了鍾院士，在了解了我的背景之後，鍾院士並不嫌棄我沒有實驗室的經驗而非常樂意的讓我到他的實驗室去進修。這一個轉機讓我非常的雀躍，但是心中卻也浮現了一絲隱憂，我擔心沒有研究及實驗經驗的我會不會無法適應實驗室的步調、會不會因為自己的不足而跟不上進度也做不出什麼成果。

接下來便是一連串的出國準備，一方面為家人安頓而準備另一方面認為相較於美國的先進且能出這麼多高品質paper的實驗室一定是充滿了各種新奇的高科技設備，再加上自己本身英文並不太好，所以已經做好心理準備要學習很多新的技術與設備的操作，及適應與同事相處的方式，因此可能會面臨一段學習的黑暗期。到了美國之後才發現事情與我想像的有很大的出入，鍾院士的實驗室裡設備都還蠻有歷史的，雖稱不上老舊但也絕不是新穎。這時我心中雖然充滿了問號但也激起了我的強烈好奇心，到底是什麼原因可以讓這個樸實無華的實驗室產生這麼多精彩且令人讚嘆的豐碩成果呢？接下來的時間裡並沒有時間讓我多想，因為一開始醫院只讓我出來一年，所以我必須要盡快地進入狀況並開始進行我的研究(後來才知道要做出一個相當程度的研究，一年是不夠的。為了讓我的研究成果更加完整，因此在一年期限快到前，我又跟醫院提出了延長一年的申請。)。第一次與鍾院士討論實驗方向的時候他跟我說雖然你想做有關幹細胞老化的主題，但是你最好另外想三到四個主題來同時進行，免得孤注一擲到最後有可能什麼都得不到。那時候我心裡想，我只有一年的時間又要同時做三到四個研究課題，這根本是不可能的任務(不過後來證實這樣的策略才是最正確的，薑還是老的辣，鍾院士給我的第一個概念是“想法是活的，不應該只侷限於一個圈圈”)！不過雖然他要我同時進行不同的課題，卻不會給我限制一定要做那方面的研究而是給我最大的寬容度讓我天馬行空的去想我想做的題目，而他只是從旁指導並給我最適切的建議，這對我來說無疑是最大的鼓勵也是一大挑戰。因為這樣的訓練讓我有獨立思考的能力而不是永遠在by order做事，這是鍾老師教我的第一件也是最重要的一件事。

進實驗室之後，正在為著該進行那些課題及該從何處著手而忙得焦頭爛額之際，實驗室裡的成員就紛紛告訴我說，這邊的不成文規定就是隨時隨地都必須要檢查E-mail(當時還沒有Line或WeChat)，當時我覺得很納悶，有什麼事那麼急一定要隨時check E-mail？後來才發現原來鍾老師似乎不需要睡覺(好像偉人所需的睡眠時間都比較少!)，他可以在任何時間發E-mail給大家，甚至是半夜或清晨。內容包括更改lab meeting的時間、更改要報告的人、討論實驗方向及進度還有評論實驗結果等等。

經常的情況是，鍾老師mail我說明天的lab meeting 由我來報告進度，但是明明是還有3個星期才會輪到我。這時候我只好發揮超人的速度，3個星期併作1天用，用一個晚上的時間準備好隔天要報告的power point。這是我到美國之後鍾老師教會我的第二件事，”always well-prepared” 以及 “always the last minute”，任何事情都可能隨時有變化，要隨時有應戰的準備。這樣的訓練讓我可以很有效率地在任何急迫的時間內完成重要的事，最常碰到的情形就是研究計畫的申請，總是在deadline前的最後一刻才把所有data備齊然後送出去。後來我才漸漸發現鍾老師並不是不喜歡睡覺而是他對研究充滿了熱誠，使得他滿腦子整天都在想著研究的事，而沒有時間睡覺或睡到一半突然靈光一閃而有了新的idea，那時候我心裡面一直有疑惑，鍾老師到底從何而來的這麼多idea？之後慢慢跟鍾老師相處之後才知道，鍾老師是一個十足的好奇寶寶，他的好奇使他成為一個多才多藝且興趣廣泛的人，他喜歡歷史、藝術以及大自然。他常常告訴我要跟大自然學習，而他的idea也大多都是從大自然的現象中觀察而來。例如斑馬的黑白線條的pattern是如何形成的、為什麼鱷魚或鯊魚的牙齒可以一直再生，甚至有一次我們實驗室到LA zoo去outing的時候，鍾老師還跟我說你應該去研究一下獅子頭上的鬃毛為什麼長成這樣的形態，背上卻沒有，當時我想可能在我研究出來之前就先被獅子吃掉了。

另外，我也曾經跟鍾老師一起到美國中部的Kansas state 去挖掘魚龍的化石，由於我本身也是喜歡奇奇怪怪的新奇事物的人，因此幾天的挖掘工作下來雖然疲累卻相當的開心也學到了很多的知識，了解到了為什麼從大自然中學習可以如此愉快，也明白了為什麼鍾老師的實驗室不需要有太fancy的設備及技術就可以有很好的研究成果，原因就在於novel的idea才是最重要的。此外，在與鍾老師相處的這段時間中我也發現鍾老師在做任何事都非常的專注、嚴謹、實事求是且力求完美，每次在報告數據的時候他總會再三詢問是否正確，是不是多次重複的結果以確保數據的可信度，甚至一個圖表在投稿前可能都會經歷過數十次的修改才有可能定案。因此，我從鍾老師身上所學到的第三件事就是，嚴謹而細膩的實驗態度及精神。



鍾正明院士與美國實驗室學生聚餐合照
左邊前排黃色上衣為陳志強醫師

正如同之前所說的，我原本想做的題目是幹細胞的老化，由於不知道該如何進行，因此一開始只好做copycat，學習鍾老師學生Max Plikus之前在Nature paper中所做的，先觀察老年小鼠hair wave的變化。在觀察了一段時間之後，發現老年小鼠的hair wave有異於正常的年輕小鼠時，便開始思考下一步應該要怎麼做。由於當時我本身的實驗經驗還不是很充足，因此便再次的參考了那篇Nature的paper，在重複的研讀之下除了慢慢找到該如何進行老年小鼠的研究之外，我還發現了我之前一直覺得理所當然，但是再讀一次之後卻讓我覺得很難理解的一個圖表。那就是Max為了要釐清refractory telogen和competent telogen的差別並證明refractory telogen的環境中有較多的抑制因子BMP-2，因此便在小鼠的背上拔50及200根的毛髮然後觀察在不同時期下(refractory telogen和competent telogen)毛髮再生回來速度的差異。他發現不管是拔50根毛還是200根毛，從refractory telogen時期拔的再生時間總是遠比從competent telogen時期要來的長了許多。這個結果間接證明了在refractory telogen的時期其環境中充斥著抑制因子BMP-2，這個數據看起來非常合理也很容易理解所以剛開始念這篇文章的時候並不會覺得有什麼異樣。但是就在我慢慢進入狀況並沉浸於思考直著我的老化題目並假設著環境中的抑制因子過多或許是年老小鼠毛髮再生異常的原因而重新反覆的咀嚼這篇文章的時候才發現，這個數據中似乎另有蹊蹺。因為當時我只注意到了refractory telogen跟competent telogen其毛髮再生回來的時間大不相同卻沒有注意到即使在同一個時期(refractory telogen或competent telogen)，拔50根毛髮與拔200根毛髮其再生回來的時間也不一樣，拔200根毛髮之後再生的時間遠比拔50根要來的短。這時我便詢問了Max的意見，他說他也不清楚為何會有這樣的現象，另外我又問他說為什麼選擇50根與200根而不是10根與30根，因為我覺得這樣可以減輕實驗的loading。結果他告訴我說若是拔除低於30根的毛髮，那麼毛髮的再生將無法被誘發，這時我的心中更加充滿了疑惑。因為過去曾有論文指出，拔除休止期毛髮之後毛髮還會再生的原因是，拔毛的這個動作會造成毛囊幹細胞的凋亡，之後再由hair germ中存活的細胞逆分化成毛囊幹細胞之後再增生活化，而且這樣的再生過程是透過毛囊內兩階段的訊號傳遞與細胞活化。如果過去的這個研究結果是對的，那麼我不論拔幾根毛它應該都會再生而且再生回來的時間應該都會是相同而不會因為拔的數量多寡而有差別。

常常聽人家說，”魔鬼總是藏在細節裡”，以前總是不太相信，而這一件事才讓我體會到這句話的真諦，從仔細研讀一篇好的paper中也可能得到新的研究靈感。由於發現了這個問題便開始設想到到底是什麼原因才會導致拔毛的數量會影響毛髮再生的時間。當時的想法是既然拔毛產生再生不是一對一的線性關係(拔一根就會再生一根回來)，那麼這個過程應該就不只牽涉到毛囊內細胞而應該包括毛囊外環境。

為了釐清這個疑慮我便提出了一個假說，我認為每拔一根毛就會釋放出一個活化因子到被拔毛髮的周遭環境，而一但拔的毛髮夠多而累積足夠的活化因子時，則毛髮再生才會發生。為了要證明這個理論是正確的，因此我便設計了一個實驗。首先我學習Max的方式在小鼠的背上拔200根毛，但是與Max不同的是我是在不同的面積範圍內拔相同數目(200根)的毛髮，從最密百分之百的拔掉範圍內的毛髮到最稀疏的百分之五。結果意外的發現，太稀疏的拔除毛髮，即使拔除的總量是一致的也無法誘發毛髮的再生。這樣的結果暗示著拔除的密度才是關鍵而不是總量，當拔除的密度夠密也就是在環境中必須要累積到足夠的活化因子才能使毛髮再生。而更有趣的是，一旦達到可以活化的密度則在拔毛範圍內的所有毛髮(包括有被拔除及沒被拔除的毛髮)都會在同一個時間一起再生，而在拔除適當密度的毛髮下最多甚至可以誘發超過五倍的毛髮再生。這樣的結果令我們相當興奮，因為我們似乎使再生變得更有效率了。由於這種全有全無的毛髮再生反應是獨一無二的全新發現所以當時天真的以為應該可以很順利的被許多不錯的雜誌所接受，這樣我就能順利畢業了。結果後來才發現，事情並不如我想的這麼簡單，而是十分的坎坷。一開始我們就發現這樣的現象與發炎反應和腫瘤壞死因子TNF- α 的訊號相關，因此便將這個機轉與我們的發現包裝後投稿至**Gene and Development**，review回來的結果是他們希望我們能增加分子機轉並釐清究竟是甚麼細胞分泌TNF- α 。有鑑於此，我們便與當時任職於南加州加大的免疫學專家**Dr. Songtao Shi**合作，以期能更深入的探討拔毛導致全有全無再生的根本原因。經過了將近一年的時間，在他們實驗室fellow **Dr. Lei Wang**的努力下發現了凋亡的keratinocytes會分泌CCL-2並吸引巨噬細胞macrophages到拔毛附近且分泌TNF- α ，進而促使毛髮的再生。

得到了這樣的結果，我們認為應該可以挑戰比較高**ranking**的雜誌，因此便將它投到**Cell Stem Cell**，結果竟然是一個彈性碰撞，才剛寄出去幾天就收到回信說他們不**review**。那時候雖然有畢業的壓力，但是也還沒有迫在眉睫，覺得說應該可以再等等，所以就想改投**Nature Cell Biology**好了。這次結果比較好，他們願意**review**了，不過等幾個月後的結果是**reject**，因為他們要求我們要解釋非常多且很深入的分子機轉而忽略了我們的全有全無的再生概念。

就這樣2年的進修結束了，我回到了台灣，雖然實驗仍繼續的做但壓力卻越來越大了，因為若是再沒有投稿成功我的博士班修業年限就要過了，因此在臨床與實驗室的雙重壓力下，我有了有退縮的想法，乾脆放棄研究專心做臨床工作去賺錢就好了，太太也因為經濟的壓力下經常在耳邊碎碎念的說「：就隨便找個雜誌投趕快畢業就好了，家裡有三個小孩要養，經濟狀況又不充裕，為什麼一直要執著於這些**top journal**呢？」可能是因為真的急了，此時我便積極的搜尋適合投的雜誌，從**PNAS**、**EMBO J**、**Nature Communication**到**Cell Report**，竟然沒有一份雜誌願意**review**我們的**paper**。我越來越灰心了，也越來越沒有自信，總覺得自己可能不是做研究的料。但是鍾老師始終沒有放棄我，一直在我的身旁鼓勵我，也經常告訴我以前他們投**top journal**的各種辛酸血淚史。由於我一直無法忘懷自己做實驗時所得到的快樂，因此便告訴我自己一定要堅持下去。此時，太太也看到了我的努力與堅持因此便轉而鼓勵與支持我。還好此時我之前做的老化題目已有了不錯的成果並順利的被**Journal of Investigative Dermatology**所接受，再加上我之前自己做的光老化研究也被另一個皮膚科的雜誌所接受，所以我在缺乏這篇拔毛的論文下靠前兩篇**paper**畢業，此時的我便更能心無旁騖地進行拔毛的研究。由於我們的研究結果顯示的是群體的活化，且牽涉到多種不同的細胞與組織，因此鍾老師便與任教於**UC Irvine**的**System Biology**專家**Dr. Arthur D. Lander**討論我們的發現。他一看到我們的實驗結果便說這種拔毛的再生現象應該是一種群聚感應現象 (**quorum sensing**)。

這時候我便傻住了，因為我根本沒聽過什麼是群聚感應。此時便開始念相關的paper，才慢慢地了解原來群聚感應是一種社會行為讓族群做一個共同的決定，就生物體來說，群聚感應是讓不同組織的細胞間相互合作並達成一個共同的目標，以前只在細菌、蜜蜂或螞蟻這些生物體上被發現，而我們的這個發現則是第一次在組織上被觀察到，因此我們便將之稱為器官層級的群聚感應現象。為了證明他的推論是正確的**Dr. Arthur D. Lander**便利用三種不同的數學模式來來演算我們之前所得到的研究數據。雖然我們的數據非常的符合他的推算，不過他卻需要更多不同的拔毛方式，包括拔毛形狀的改變、拔毛數目的改變以及拔毛密度的改變等等來驗證我們的實驗及他的數學模式，因此我便設計更多不同的拔毛型態以取得更多的數據。我曾經算過，從我開始進行這個拔毛實驗以來，我總共拔超過10萬根的毛髮，換回來的成果是我的眼科學妹告訴我，你已經得了老花眼了，而且還不輕，開始需要戴多焦點的眼鏡了。不過，皇天總算不負苦心人，我後來所做的研究成果都符合**Dr. Arthur D. Lander**所推演的數學模式，而根據這些模式與我們的數據我們也提出了一個全新的概念，那就是這種取決於閾值高低的”全有全無的再生反應”是藉由兩階段的免疫反應所達成的：首先，拔毛所導致的毛囊表皮細胞的凋亡會釋放出細胞激素CCL2，而這個細胞激素(CCL2)則會吸引分泌腫瘤壞死因子的巨噬細胞到毛髮拔除的區域，一旦累積夠多的巨噬細胞及腫瘤壞死因子而且超過活化的”閾值”時，則在這個拔毛範圍內的所有毛髮包括被拔過跟沒被拔過的毛髮都會一起再生。藉由結合免疫與再生反應，這樣的群聚感應機制可以讓皮膚決定在面對外界傷害時該如何反應，若是傷害很輕微則任何反應都不發生；但相對的若是傷害達到一定的程度時則毛囊幹細胞將會全部活化而造成全面的再生。

由於我之前曾經遭遇無數的挫敗，當我將這個成果投稿到Cell時並沒有抱太大的期望，還以為會直接彈性碰撞的被退稿回來。出乎意料的，這次reviewers相當認同我們的研究，其中甚至還有一個reviewer認為我們這篇paper是他這一年來在Cell雜誌上所看過最好的paper。雖然後來經過了兩次的修改(還好有Max的鼎力相助，利用他的三重基因轉殖鼠幫我們回答其中一個reviewer的問題)，不過也總算被Cell所接受。這一路走來雖然過程並不順遂甚至還有點心酸，但是卻不後悔所付出的一切以及當初決定繼續走基礎研究的初衷。我非常感謝鍾老師的教誨及勉勵還有太太與家人的支持，說真的我一直把鍾老師當成學習的偶像，因為我很少看到一個人這麼醉心於研究，即使忙得不可開交還是努力的提攜後進且經常滿臉笑容的跟別人講解他最近所做的研究及新的發現。我想我當初無意的踏進了研究的這條路，而由鍾老師幫我播了一個非常扎實的種子，且培育它使它開始發芽並慢慢茁壯，這應該是我當初所始料未及的。



陳志強醫師與陽明實驗室助理合照