

國立臺灣師範大學理學院營養科學碩士學位學程

碩士論文

Graduate Program of Nutrition Science

College of Science

National Taiwan Normal University

Master's Thesis

麩醯胺補充對於 imiquimod 誘導小鼠乾癬樣皮膚發炎
之影響

Effects of glutamine supplementation on imiquimod-induced
psoriasis-like dermatitis in mice

林挺瑜

(Ding-Yu Lin)

指導教授:蔡帛蓉 博士 (Po-Jung Tsai, Ph. D.)

共同指導教授:侯又禎 博士 (Yu-Chen Hou, Ph. D.)

中華民國 111 年 7 月

July 2022

中文摘要

乾癬(psoriasis)是一種自體免疫功能失調引起的慢性皮膚發炎疾病，其特徵是過度增生的角質細胞以及浸潤的 T 細胞、樹突細胞、巨噬細胞及嗜中性白血球，並對患者的生活品質有不良影響。乾癬的發病機制雖然尚未完全釐清，但已知 T 細胞在疾病的起始與發展階段扮演主要的致病因子之一。麩醯胺 (Glutamine; GLN) 具有抗氧化、抗發炎、免疫調節的作用，且乾癬患者血漿及血清中麩醯胺顯著較低。因此，本研究使用 imiquimod (IMQ)誘發小鼠乾癬樣皮膚炎的動物模式，探討飲食中補充麩醯胺對於乾癬的保護效果。本實驗將雄性 C57BL/6J 小鼠隨機分為三組 (n=8/組)：控制 (NC)組、IMQ 誘發乾癬 (P)組、IMQ 誘導並補充 GLN (PG)組。NC 組和 P 組所有小鼠給予 AIN-93G 飼料，PG 組則於飼料中添加麩醯胺 (GLN 取代 30%總胺基酸氮含量)，經 15 天餵養後，連續 6 天以 Aldara 乳膏 (5% IMQ) 塗抹於 P 組及 PG 組小鼠背部皮膚誘發乾癬樣皮膚炎，誘發期間持續給予飼料介入麩醯胺。實驗結果發現，與 NC 組相比，P 組小鼠背部皮膚出現紅斑、脫屑、增厚等典型乾癬樣皮膚炎反應，且呈現更高的乾癬面積暨嚴重程度指數(psoriasis area severity index, PASI)，以及血液中嗜中性白血球、促發炎單核球、抗發炎單核球、T 細胞、輔助型 T 細胞 17 (helper T cell 17, Th17) 及調節型 T 細胞比例顯著提升。將 P 組和 PG 組做比較，發現飼料中補充麩醯胺可顯著降低 IMQ 誘導的乾癬嚴重程度的 PASI 指數、血中嗜中性白血球及 Th17 細胞比例。補充麩醯胺可顯著降低 IMQ 誘發的背部皮膚之嗜中性白血球比例與促發炎因子如 interleukin (IL)-17A、IL-23、C-X-C motif chemokine ligand 1 的 mRNA 表現量。在組織學方面觀察到補充麩醯胺降低了 IMQ 誘導引起的表皮增厚，降低角質層的厚度、減少角化不全及角化過度；免疫化學染色方面觀察到，補充麩醯胺降低了皮膚中 T 細胞及嗜中性白血球的浸潤。綜合上述結果推論，飲食補充 GLN 能可藉由調節 Th17 細胞比例、降低發炎激素及趨化因子的表現量，而改善 IMQ 誘導小鼠乾癬樣皮膚發炎反應。

關鍵字：麩醯胺、乾癬、嗜中性白血球、T細胞、發炎



Abstract

Psoriasis is an immune-mediated chronic inflammatory skin disease characterized by hyperproliferative keratinocytes and infiltration of T cells, dendritic cells, macrophages and neutrophils, which has great negative impact on patients' quality of life. Although the pathogenesis of psoriasis is not fully understood, there is evidence suggesting that T cells play a dominant pathogenic role in the initiation and development of psoriasis. Glutamine (GLN) possesses antioxidant, anti-inflammatory, and immunoregulatory properties. Glutamine has been found at lower levels in the serum and plasma of psoriasis patients. Therefore, we conducted imiquimod (IMQ)-induced psoriasis-like mouse model to explore the protective role of GLN in psoriasis. Thirty male C57BL/6J mice were randomly divided into three groups (n=10 in each group): the normal control (NC), IMQ-induced psoriasis (P), and IMQ-induced psoriasis with glutamine supplementation (PG) group. All animals in the NC and P groups were fed an AIN-93 semi-purified diet, while PG group received a semi-purified diet that casein was replaced by Gln, which provided 30% of total amino acid nitrogen. Three groups were fed the respective diets for 15 days, and then P and PG group were topical treated for 6 days with Aldara cream (5% IMQ) to induce psoriasis-like dermatitis. Results showed that the P group emerged typical psoriasis-like inflammatory responses on back, such as erythema, scaling and thickening, and exerted higher psoriasis area severity index (PASI) scores, increased percentage of neutrophils, inflammatory monocyte, anti-inflammatory monocyte, T cells, T helper (Th)17 cells, and regulatory T (Treg) cells in blood, as compared to NC group. GLN supplementation significantly reduced IMQ-induced PASI scores, and the percentage of neutrophils and Th17 cells in blood. GLN supplementation also significantly reduced the percentage of neutrophils and the mRNA levels of proinflammatory mediators (interleukin (IL)-17A, IL-23, C-X-C motif chemokine ligand 1) in the back skin by IMQ induction. Besides, the

results of histological observation indicated GLN decreased IMQ-induced epidermal hyperplasia, thinning of the stratum corneum, parakeratosis, and hyperkeratosis. In conclusion, these results suggested that dietary GLN supplementation alleviates IMQ-induced psoriatic inflammation by modulating the percentage of Th17 in the blood, reducing the expression of inflammatory mediator and chemokines.

Keywords: glutamine, psoriasis, neutrophil, T cells, inflammation



致謝

兩年的時光轉瞬即逝，回想我一路走來充滿淚水和歡笑，所幸受到許多人的幫助，使我在求學過程遇見的困難能換為喜悅與許許多多的寶貴回憶。

首先要感謝我的指導教授蔡帛蓉老師，願意接受缺乏實驗室經驗懵懂的我，協助我找到研究的方向、學習邏輯思辯的能力並用心地指出我的錯誤與不足，帶領我逐漸成長，很榮幸能成為老師的學生。尤其感謝臺北醫學大學共同指導教授侯又禎老師，以謹慎嚴謹的態度教導我，有條有理的帶領我學習數據的判讀及實驗的技術，更願意視如己出，不僅提供實驗室資源更帶我們參加實驗室活動，能在碩班階段遇到如此親切又體貼的老師，是我最大的幸運，感謝您一直以來的幫助與關愛。同樣感謝國立臺灣大學龔秀妮教授在組織切片的分析及規劃上提供重要的協助，感謝有您提供寶貴的建議與暖心的鼓勵，讓我能繼續向前。在給予實驗設計建議之外，更大方讓我去學習組織染色，十分感謝您的幫忙。此外，更要感謝臺北醫學大學陳玉華教授的指導，在論文寫作與口述表達上給予相當寶貴的建議，使我在論文的論述與表達方面能認識自己的不足，感謝有您的建議與鼓勵，使我更加成長。

我在研究所的生活能順利結束除了家人朋友的支持外還要感謝學長姐、同學及學弟妹的照顧與幫助。北醫實驗室的育瑩、少玫學姐、振宇及馨之，謝謝你們協助我完成實驗，給予我許多的幫助與關心，希望學姐們工作順利，學弟妹實驗平安順利。感謝北醫好朋友劉臻、荷晴、士靖、妤安、翊寧、詠甯及詩方的鼓勵關心與代買午餐、晚餐，感謝你們的一路相伴，有你們真好。感謝師大的學長安生、學弟妹勝歲與加綺，感謝你們的幫助讓我順利完成口試，雖然大家分散各地工作學習，但希望各位一切都好，身體健康，總有相聚的時刻。此外，感謝碩一生活陪伴我最多的師大同學們采蘋、家妤、千翔、品婷、靖靖、邵淵與冠言以及總是相互支持的語葳，十分幸運在地下室的一年中能有大家的陪伴與鼓勵，祝福各位在往後的人生中能一帆風順、鵬程萬里。

最後感謝在研究過程中犧牲的實驗動物們，謝謝你們偉大的犧牲奉獻，希望動物們在天之靈能平安幸福。

目錄

中文摘要	I
Abstract.....	III
致謝	V
目錄	VI
圖目錄	IX
表目錄	XI
縮寫表	XII
第一章、文獻回顧	1
第一節、皮膚與免疫系統.....	1
一、皮膚構造.....	1
二、皮膚免疫系統.....	4
第二節、乾癬.....	9
一、背景介紹.....	9
二、免疫細胞與乾癬.....	10
三、乾癬動物模式.....	14
四、乾癬的治療與藥物使用	17
五、乾癬的照護與飲食介入和膳食補充劑 (Dietary Intervention and Supplements in the Management of Psoriasis)	19
第三節、麩醯胺 (glutamine)	21
一、GLN 之生理與代謝.....	21
二、GLN 與免疫調節.....	22
二、GLN 與發炎反應.....	24

四、GLN 與發炎性皮膚疾病.....	24
第二章、研究動機與目的.....	26
第三章、材料與方法.....	27
第一節、所使用之藥品與儀器.....	27
第二節、實驗動物.....	31
第三節、實驗設計.....	31
第四節、採集組織檢體.....	35
一、血液.....	35
二、器官組織.....	35
第五節、分析項目與方法.....	36
一、血液.....	36
二、背部皮膚.....	40
三、脾臟.....	46
第六節、統計分析.....	52
第四章、實驗結果.....	53
第一節、GLN 攝取對小鼠皮膚局部發炎反應影響.....	53
一、小鼠皮膚外觀變化與 PASI 評分.....	53
二、背部皮膚損傷情形與表皮層增厚.....	55
三、背部皮膚中 T 細胞比例.....	59
四、皮膚中白血球比例.....	61
五、背部皮膚促發炎細胞激素、趨化因子及 TLR7 之 mRNA 表現量.....	63
第二節、GLN 攝取對小鼠全身性發炎反應影響.....	65
一、脾臟/體重比值.....	65
二、血液中白血球比例.....	66

三、血液中淋巴球比例.....	67
四、血液中 CD4 ⁺ T 細胞比例	68
五、脾臟中 T 細胞相關 mRNA 表現量	69
第三節、小鼠體重變化與 GLN 攝取量.....	70
一、體重.....	70
二、飼料攝取量變化.....	71
三、GLN 攝取量變化.....	72
第四節、實驗結果整理.....	73
第五章、討論	74
第一節、IMQ 誘導小鼠乾癬樣皮膚炎之特徵	74
第二節、GLN 補充減緩小鼠皮膚發炎反應及損傷.....	75
第三節、GLN 補充對於小鼠先天性免疫細胞之影響.....	77
第四節、GLN 補充對於小鼠適應性免疫細胞之影響.....	79
第六章、結論	82
第七章、參考文獻	83

圖目錄

圖 1-1、皮膚構造解剖圖	3
圖 1-2、皮膚解剖圖及細胞組成	3
圖 1-3、初始 CD4 ⁺ T 細胞分化成輔助型 T 細胞模型	8
圖 1-4、乾癬疾病機轉	13
圖 1-5、IMQ 誘發免疫反應機制	16
圖 1-6、Aldara 獨立於 TLR7 路徑誘導皮膚反應之圖示	17
圖 1-7、乾癬的治療方法	18
圖 3-1、實驗流程圖	32
圖 3-2、血液中圈選先天性免疫細胞流程圖 (流式細胞儀)	37
圖 3-3、血液中圈選適應性免疫細胞流程圖 (流式細胞儀)	37
圖 3-4、血液中圈選 Treg 細胞流程圖 (流式細胞儀)	38
圖 3-5、血液中圈選 Th17 細胞流程圖 (流式細胞儀)	39
圖 3-6、背部皮膚發紅與脫屑之得分	40
圖 3-6、背部皮膚中圈選先天性免疫細胞流程圖 (流式細胞儀)	41
圖 3-7、背部皮膚中圈選 T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞及 $\alpha\beta$ T 細胞流程圖 (流式細胞儀)	42
圖 3-8、表皮層占皮膚層面積計算流程	44
圖 4-1、背部皮膚外觀及耳朵厚度與 PASI 評分	54
圖 4-2、背部皮膚正常與組織損傷特徵	56
圖 4-3、背部皮膚組織損傷情形	58
圖 4-4、背部皮膚中 T 細胞比例	59
圖 4-5、背部皮膚組織 CD3 ⁺ 免疫染色	60
圖 4-6、皮膚中白血球之比例	61
圖 4-7、背部皮膚組織 Ly6G 免疫染色	62

圖 4-8、背部皮膚細胞激素與 TLR7 之 mRNA 表現量	64
圖 4-9、脾臟/體重比值	65
圖 4-10、血液中白血球之分布	66
圖 4-11、血液中淋巴球之分布	67
圖 4-12、血液中 CD4 ⁺ T 細胞比例	68
圖 4-13、脾臟中 Th17 細胞相關 mRNA 表現量	69
圖 4-14、小鼠體重變化百分比	70
圖 4-15、飼料攝取量	71
圖 4-16、GLN 攝取量	72
圖 5-1、人類及老鼠皮膚組成	76



表目錄

表 1-1、GLN 的細胞及免疫調節功能.....	23
表 3-1、實驗飼料組成成分	33
表 3-2、檢體分析項目與方法	34
表 3-3、流式細胞儀使用之抗體	48
表 3-4、貝式評分系統	50
表 3-5、即時定量聚合酶連鎖反應之引子序列	51



縮寫表

AMP: antimicrobial peptides

APC: antigen-presenting cell

CCL: C-C motif ligand

CCR2: C-C Motif Chemokine Receptor 2

cDNA: complementary DNA

CD: contact dermatitis

cPLA2: cytosolic phospholipase A2

CQ: Chloroquine

Ct: cycle threshold

CXCL: C-X-C motif chemokine ligand

CX3CR1: CX3C chemokine receptor 1

DC: dendritic cell

DEPC: diethyl pyrocarbonate

DETCs: dendritic epidermal T cells

DNFB: dinitrochlorobenzene

ECM: extracellular matrix

Foxp3: forkhead box p3

GPCRs: G protein-coupled receptors

GRK2: G protein-coupled receptors Kinase 2

GSH: glutathione

IFN: interferon

IL: interleukin

IMQ: imiquimod

KC: keratinocytes

LC: langerhans cell

LTs: leukotrienes

MAPK: mitogen-activated protein kinase

mDC: myeloid DC

MHC: major histocompatibility complex

Mo: monocyte

mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1

MΦ: macrophage

MyD88: myeloid differentiation factor 88

NF-κB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell

NO: nitric oxide

PAMP: pathogen-associated molecular pattern

PASI: psoriasis area and severity index

pDC: plasmacytoid DC

PGs: prostaglandins

PRR: pattern recognition receptor

qPCR: quantitative polymerase chain reaction

ROS: reactive oxygen species

SALT: skin-associated lymphoid tissue

Th: helper T cell

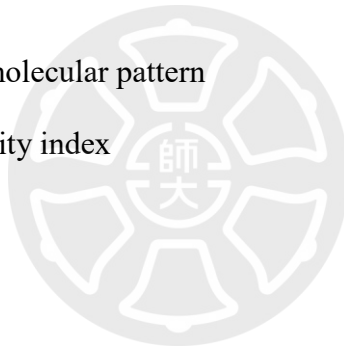
Thp: naïve CD4⁺ T helper cell

TLR: toll-like receptor

TNF: tumor necrosis factor

Treg: regulatory T cell

WBC: white blood cell



第一章、文獻回顧

第一節、皮膚與免疫系統

一、皮膚構造

皮膚為人體最大的器官，具有保護身體免受生存環境威脅的功能，其作為抵禦外來傷害的第一道防線，對於正常生理功能的維持十分重要，包含恆定體溫、防止體液散失、傳達感覺、合成維生素 D、排泄體內廢物等功能。且皮膚構成物理性屏障，可阻隔外在刺激侵擾，防止外來有害物質的入侵，例如 UV 傷害、微生物、過敏原、有毒化學物質及病原體 (Calleja-Agius et al., 2007)。

皮膚的構造由外到內可大致分為：表皮層 (epidermis)、真皮層 (dermis)、皮下層 (subcutaneous layer)，皮膚結構解剖圖如圖 1-1 所示。皮膚最外層的表皮層又可由外而內再細分為角質層 (stratum corneum)、透明層 (stratum lucidum)、顆粒層 (stratum granulosum)、棘狀層 (stratum spinosum) 和基底層 (stratum basale) (Tortora, 2005)。

表皮層中有 95% 由角質細胞 (keratinocyte, KC) 所構成，而表皮層中除角質細胞外，還具有蘭格漢氏細胞 (Langerhans cell, LC) 和 CD8⁺ T 細胞等免疫細胞。LC 是一種樹突狀的抗原呈現細胞 (antigen-presenting cell, APC)，具有抗原呈現的功能。在健康的皮膚中，角質細胞的增生和皮膚的脫落之間存在平衡，基底層的幹細胞 (stem cells) 會不斷分裂產生新的角質細胞，但一般情況下僅有 15% 的基底細胞會參與產生新的角質細胞，其餘處於靜止的狀態，直到需要修復傷口或皮膚需要增長時再參與 (Baroni et al., 2012)。角質細胞於基底層形成後會逐漸往皮膚表層移動，抵達顆粒層時角質細胞的細胞核會退化，逐漸分化為成熟的角質細胞 (corneocyte) 使皮膚的最外層形成充滿角質素 (keratin)、扁平無核且堅固的角質層，並隨著新細胞生成，老舊細胞被取代而脫落形成皮膚 (Klicznik et al., 2018) (賴明德等, 2014)。角質層是身體重要的屏障，可阻擋分子量大於 1000 的物質進入體內 (Egawa & Kabashima, 2020)、避免表皮過多的水分散失以及防止環境中的有害物質滲透至表皮和真皮層中 (Van Smeden & Bouwstra, 2016)。此外，健康的皮膚上存在一定數量的共生菌群，如葡萄球菌和丙酸桿菌，這些微生物會和試圖在皮膚上定殖 (colonization) 的致病菌競爭營養和生存空間，限制群體的規模、抑制其生長，參與適應性免疫防禦的工作。而角質細胞的定期脫落會使定殖或感染表皮細胞的微生物脫除，以避免皮膚深層의 感染

(Baroni et al., 2012)。角質細胞自形成到變成皮膚脫落，這一連串過程稱為角化 (keratosis) (Baroni et al., 2012)。當角質細胞受到損傷時，如慢性發炎或物理、化學性的損傷，會使得角質細胞過度增生，表皮層及角質層不正常的增生肥厚，讓皮膚產生皮膚、皮痂，即稱為過度角化(hyperkeratosis) (Farci & Mahabal, 2021)。另一方面，若角質細胞沒有正常角化，導致最後到達角質層時仍具有細胞核，則稱為角化不全(parakeratosis)，角化不全的原因為角質細胞增生速度過快，細胞來不及完成角化過程，這可能發生在皮膚發炎疾病或腫瘤生長的過程。如此一來，角質層與顆粒層的界線會變得模糊不清，甚至消失，而此現象可於乾癬 (psoriasis)、慢性濕疹或鱗狀細胞癌患者的皮膚上觀察到 (Murphrey et al., 2018)。

表皮層之下則是真皮層，由緻密不規則的結締組織 (dense irregular connective tissue) 組成，具有膠原蛋白纖維 (collagenous fiber)、彈性纖維 (elastic fiber)、毛囊、皮脂腺、免疫細胞與細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) (Baroni et al., 2012)。ECM 由膠原蛋白以及彈性纖維構成，可提供皮膚柔韌性和穩定性 (Klicznik et al., 2018)。ECM 當中分布著血液、淋巴管及神經元網絡，免疫細胞可在此進行抗原訊號傳遞及進行免疫反應 (Nguyen & Soulika, 2019; Quaresma, 2019)。而真皮中主要的免疫細胞包括:嗜中性白血球 (neutrophils)、單核球 (monocytes, Mo)、巨噬細胞 (macrophage, MΦ)、樹突狀細胞 (dendritic cells, DC) (包含 dermal DC, dDC 和 plasmacytoid DC, pDCs)、肥大細胞 (mast cell)、自然殺手細胞 (natural killer cell) 以及 $\gamma\delta$ T 細胞等 T 細胞，除這些免疫細胞之外，也具有纖維母細胞 (fibroblast)及發炎介質。

在真皮層的下方則是由疏鬆結締組織 (loose connective tissue) 組成的皮下層 (subcutaneous layer)，此處儲存的脂肪組織具有彈性，能夠緩衝外來衝擊、儲備能量、調節溫度以保護體內組織免受冷或熱傷害 (Kobayashi et al., 2019)。

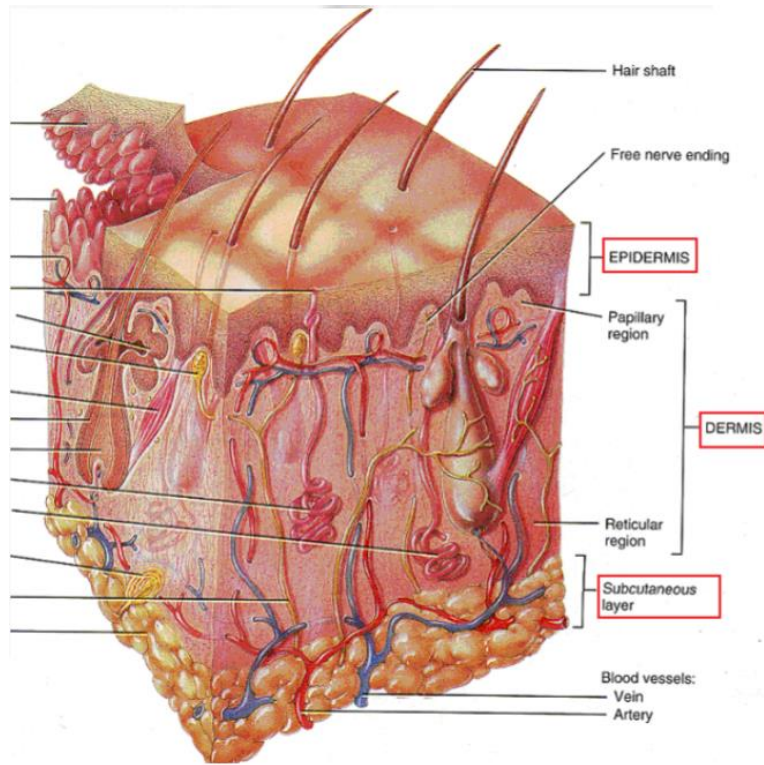


圖 1-1、皮膚構造解剖圖

Figure 1-1. The structure of the skin. (Tortora, 2005)。

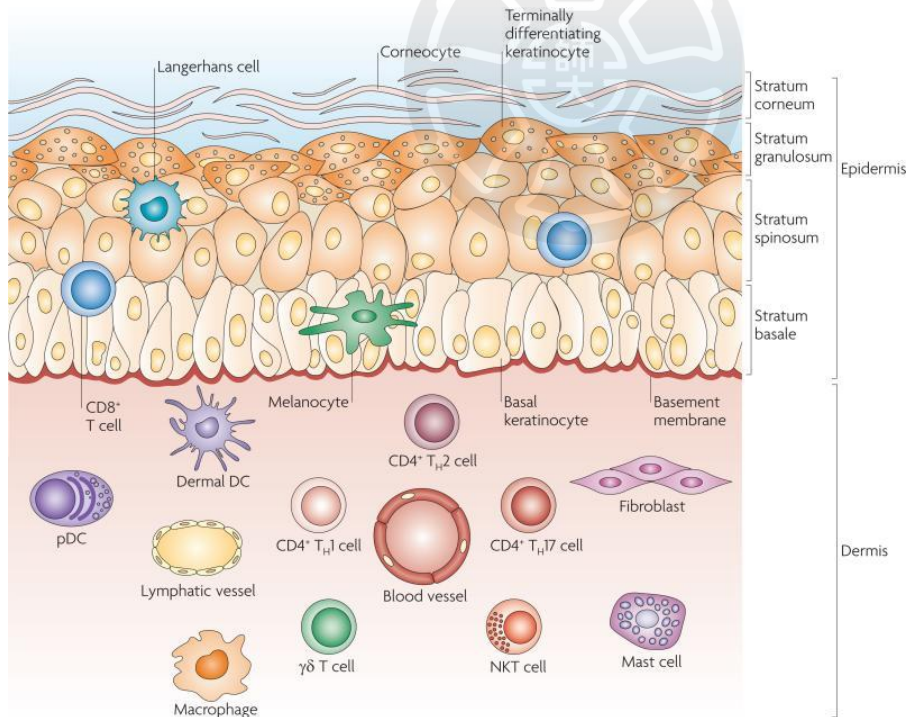


圖 1-2、皮膚解剖圖及細胞組成

Figure 1-2. Skin anatomy and cellular constituents. dDC, dermal dendritic cell; NK, natural killer cell; pDC, plasmacytoid dendritic cell. (Nestle et al., 2009)

二、皮膚免疫系統

皮膚身為人體面積最大的器官，對於人類生存十分重要，若免疫反應不足而導致保護屏障的缺失，可能會引起感染或是導致癌病變，若是免疫過度則會造成急性過敏如蕁麻疹或演變成慢性發炎如異位性皮膚炎，甚至是自體免疫疾病 (Autoimmune disease)，如乾癬和紅斑性狼瘡 (Hile & Kahlenberg, 2021; Orsmond et al., 2021; Yang et al., 2020)。因此，調整免疫反應在合適的程度上與維持皮膚完整性有密不可分的重要關聯。角質層構成的物理性屏障及皮膚表層微生物群，能夠避免病原體的侵入，為人體提供第一階段的保護 (Abdallah et al., 2017)。除此之外，皮膚還具有複雜的免疫系統可提供第二階段的保護，包括先天性免疫 (innate immunity) 與適應性免疫 (adaptive immunity)。

(一) 先天性免疫 (Innate Immunity)

先天性免疫是一種快速、非特異性且多樣化的免疫反應，可以及時對各種入侵體內的微生物進行處置。皮膚中用以對抗微生物傷害的先天性免疫要素包括物理屏障 (Bernatchez & Bichel, 2022)、皮膚表面的 pH 值 (Surber et al., 2018)、脂質分布 (Gruber et al., 2021)、共生菌叢 (Kobayashi et al., 2019; Mahmud et al., 2022)、抗菌肽 (antimicrobial peptides and proteins, AMPs) (Afshar & Gallo, 2013; Rademacher et al., 2021)、補體系統 (complement System)、細胞激素 (cytokine)、趨化因子 (chemokine) 的分泌以及免疫細胞之募集 (recruitment) 與活化 (Baroni et al., 2012; Nguyen & Soulika, 2019; Richmond & Harris, 2014)。先天性免疫的特點在於遭受病原體入侵時，能迅速產生免疫反應。免疫細胞能辨識外來病原體並毒殺消滅或吞噬清除，並進行抗原呈現 (antigen presentation)，進一步促進細胞激素及趨化因子的分泌，啟動適應性免疫反應 (Abdallah et al., 2017; Mathers & Larregina, 2006)。

這些免疫細胞具有不同種類的模式辨識受體 (pattern recognition receptor, PRR) 可用以辨識病原體、受損或凋亡的細胞表面特定的結構分子 (Li & Wu, 2021)，包含外來病原體的病原體相關分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 或自體產生的損傷相關分子樣式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs) (Takeuchi & Akira, 2010) 及 AMPs，以幫助身體產生適當的免疫反應，清除病原體。PRR 家族包含跨細胞膜蛋白，例如：類鐸受體 (Toll-like receptors, TLRs)、C 型凝集素受體 (C-type lectin receptors, CLRs) 以及細胞質蛋白例如 Retinoic acid-

inducible gene I (RIG-I) -like receptors (RLRs)、NOD-like receptors (NLRs) (Li & Wu, 2021)。當中 TLR 家族是研究最廣泛的 PRR，在許多免疫細胞上都有表達，包含 DC、MΦ、T 細胞和 B 細胞 (Sweeney et al., 2011)。TLR 家族可活化細胞內促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 路徑和核轉錄因子 (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell, NF-κB) (Kaisho & Akira, 2006; Kjellerup et al., 2008)，促使下游促發炎基因表現，進而啟動免疫反應，釋放促發炎細胞激素及趨化因子 (Li & Wu, 2021)。

角質細胞參與先天性免疫反應，角質層可構成角質層以抵禦外來物質入侵，更可作為免疫哨兵，巡視皮膚中是否有入侵的病原體 (Nestle et al., 2009)。因角質細胞上有辨識 PAMP 的 PRR 如 TLR 家族，具有抗原呈現的功能，可感知皮膚是否遭受外來病原入侵。TLR 家族包含在細胞表面的 TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 及在細胞內部的 TLR3、TLR7、TLR9，這些受體可應對外來傷害，並適時啟動免疫反應來保護皮膚。TLR 活化後會產生多種細胞激素如介白素 interleukin (IL)-1、IL-10、IL-6、腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、轉化生長因子 (transforming growth factor-beta, TGF- β)、趨化因子 C-X-C motif chemokine ligand (CXCL)、顆粒球巨噬細胞株刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 和 AMPs。TLR 活化所產生的這些細胞因子具有直接中和、消滅病原體或活化適應性免疫反應的功能 (Abdallah et al., 2017)。例如皮膚所產生的 AMPs 如抗菌蛋白 LL37、 β -防禦素 (β -defensin) 及 S100 等，具有殺死微生物或抑制其生長、促進血管生成、趨化發炎反應的效果。此外，AMPs 還可增強 Th1 及 Th17 下游細胞激素的產生，如增加 IL-1 β 、TNF- α 及 IL-6 的釋放，進一步活化周遭的免疫細胞及促進趨化因子 CXCL-1 分泌，以吸引嗜中性白血球遷移到皮膚 (Morizane & Gallo, 2012; Takahashi & Yamasaki, 2020; Williams & Kupper, 1996)。

免疫細胞當中，DC 由骨髓的造血幹細胞 (hematopoietic stem cell) 生成，可在周邊分化為 myeloid DC (mDC) 以及在骨髓發育完全成為 Plasmacytoid pre-DC (pDC) (Abdallah et al., 2017)。DC 作為抗原呈現細胞，能夠表現不同的 PRR，會在接觸外來抗原後逐漸分化成熟，產生大量促發炎細胞激素，促使淋巴細胞如初始 T 細胞 (naïve T cells) 分化 (Macri et al., 2018)，過程受轉錄因子 NF-κB 刺激及 MAPK 路徑誘導 (Lin et al., 2005; Nakahara et al., 2006; Worbs et al., 2017)，而活化的淋巴細胞會隨著循環血遷移至皮膚發炎處 (Sabat et al., 2019)。

嗜中性白血球則是在感染發生時，受到 DC 或巨噬細胞釋放的 CXCL-1 的募集，在第一時間進到發炎組織抵禦外來入侵的重要吞噬細胞 (Iwasaki & Medzhitov, 2015)。進入組織的嗜中性白血球能藉由吞噬作用 (phagocytosis)、去顆粒作用 (degranulation)、產生活性氧化物 reactive oxygen species (ROS) 及形成嗜中性白血球胞外網狀結構 (neutrophil extracellular trap, NET) 等多種機制來清除微生物，消除外來病原體 (Kraus & Gruber, 2021)。

除了嗜中性白血球外，Mo 也參與了皮膚組織的免疫反應，由骨髓生成後儲存於脾臟，會在組織受損時被募集到受傷或感染的部位進行免疫反應 (Auffray et al., 2007)。可依據細胞表面表達的標誌物將其分為促發炎 Mo (inflammation monocyte) 及抗發炎 Mo (anti-inflammation monocyte) (Ingersoll et al., 2011)。促發炎 Mo 主要表達 CCR2 (C-C Motif Chemokine Receptor 2) 及 Ly6C⁺，可分化為 DC 及 MΦ 進入發炎的組織中進行免疫反應，如吞噬病原體或分泌 ROS、TNF- α 、一氧化氮 (nitric oxide)、IL-1 β 及 type 1 interferon (IFN) 以清除外來病原、避免感染 (Geissmann et al., 2010)。至於抗發炎 Mo，則表達 CX3C chemokine receptor 1, CX3CR1 及 Ly6C⁻，在穩定的狀態下，抗發炎 Mo 分泌抗發炎的細胞激素，具有清除細胞碎片、修復受損內皮組織的功能 (Wolf et al., 2019; Yang et al., 2014)。

此外，皮膚中存在大量的 T 細胞，約是血液中的兩倍 (Clark et al., 2006)，可受 APC 的刺激而產生適應性免疫反應，APC 包括 DC、LC 等免疫細胞。T 細胞可依據其表達的 T 細胞受體 (T-cell receptor, TCR) 是 $\alpha\beta$ TCR 或 $\gamma\delta$ TCR 來區分為 $\alpha\beta$ T 細胞及 $\gamma\delta$ T 細胞。在人體循環內的 T 細胞多是 $\alpha\beta$ T 細胞， $\gamma\delta$ T 細胞比例很低，佔不到一成， $\gamma\delta$ T 細胞在腸道及上皮組織等部位中較為豐富 (Shiromizu & Jancic, 2018)。即使如此，在人類皮膚中的 T 細胞組成仍以 $\alpha\beta$ T 細胞為主，與此相反，小鼠則是 $\gamma\delta$ T 細胞佔多數 (Hayday & Tigelaar, 2003) 且其外型的樹突狀明顯，又稱作樹突狀表皮 T 細胞 (dendritic epidermal T cells, DETCs) (Havran & Jameson, 2010)。皮膚當中的 $\gamma\delta$ T 細胞，其功能介於先天及適應性免疫反應之間。和其他 T 細胞不同的是， $\gamma\delta$ T 細胞可以在沒有 TCR 配體對其進行活化的條件下，直接感應 PAMP 和細胞激素，執行先天性免疫反應 (Shiromizu & Jancic, 2018)，如直接毒殺受到感染的細胞、促使嗜中性白血球聚積、促進 MØ 作用，以及活化吞噬細胞的作用，亦會受到環境中細胞激素的調控分化成不同次群，而執行適應性免疫反應 (Hu et al., 2022; Ribot et al., 2021)，並且具有促進受損皮膚組織修復的能力 (Havran, 2002;

Kobayashi et al., 2019)。

先天性免疫平衡維持人體皮膚的健康，當其失調時可能會引發乾癬等皮膚相關疾病 (MacLeod & Havran, 2011; Nakahigashi et al., 2011)。

(二) 適應性免疫 (adaptive immunity)

適應性免疫反應又稱為後天性免疫反應，是受到特定免疫刺激誘導後發生的反應，適應性免疫細胞包含 T 細胞和 B 細胞 (Cronkite & Strutt, 2018)。相較先天性免疫，適應性免疫具有特異性以及記憶性，其所需反應時間較長，接續在先天性免疫反應之後。適應性免疫反應以淋巴球為主導，其表面具有辨認特定抗原的接受器，可調節免疫反應的進行以維持免疫反應的恆定 (Lee, 2018)。當 APC 將病原體吞噬後會遷移至淋巴結，而皮膚中也有皮膚相關淋巴組織 (skin-associated lymphoid tissue, SALT) (Streilein, 1983)，可在此與 T 細胞進行反應。APC 透過主要組織相容複合物 (major histocompatibility complex, MHC) 將抗原片段呈現在細胞表面，而 T 細胞則會藉由其細胞表面的 T 細胞受體 (T cell receptor, TCR) 與 APC 上的 MHCII 結合進行 (Luckheeram et al., 2012)。依照細胞的表面標誌 (surface marker) 可將 T 細胞分成 $CD4^+$ T 以及 $CD8^+$ T 細胞。 $CD8^+$ T 細胞又稱毒殺型 T 細胞 (cytotoxic T cell, Tc) 或毒殺型 T 淋巴細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 可以分泌穿孔素 (perforin) 破壞入侵的病原菌。而其中被 APC 活化的初始 $CD4^+$ T 細胞 (naïve $CD4^+$ T helper cell, Thp) 會受到環境中細胞激素的誘導，進一步分化成不同的 T 細胞次群—輔助型 T 細胞 (helper T cell, Th) 以及調節型 T 細胞 (regulatory T cell, Treg) (圖 1-3)。

輔助型 T 細胞當中 Th1 細胞有助於 $CD8^+$ T 細胞的毒殺作用；Th2 細胞有助於 B 細胞產生抗體；Th17 細胞分泌細胞激素包含 IL-17A、IL-22 以及 IL-23 等，以及標誌性轉錄因子 ROR γ t，其中 IL-17A 會使組織生成促發炎細胞激素、促進嗜中性白血球聚積並強化感染處的發炎反應、促使角質細胞異常增生及分化、增加 AMPs 的產生，並加強 IL-23 表達，故 IL-17A 過多會導致組織的過度發炎 (Lee, 2018; Li et al., 2020)。至於表達標誌性轉錄因子 Foxp3 的 Treg 細胞則是能夠抑制 T 細胞的過度增值及細胞激素的產生，Treg 會藉由產生 IL-10 及 TGF- β 以抑制其他免疫細胞的活化及增生，減少發炎反應與組織破壞，可預防 Th 細胞過度活化所引起的慢性發炎 (Vignali et al., 2008)，協助維持體內發炎反應的平衡與自我耐受性，並在預防自體免疫疾病方面具有重要功能 (Kondelkova et al., 2010) (圖 2-3)。

免疫反應可分為三階段，首先外來入侵物與皮膚生態系統的先天性免疫作用、接著適應性免疫反應的發生、最後免疫記憶 (immunological memory) 產生 (Abdallah et al., 2017)，任一階段發生錯誤都可能造成疾病的發生，因此皮膚免疫系統的健全是人體對抗疾病的重要關鍵。

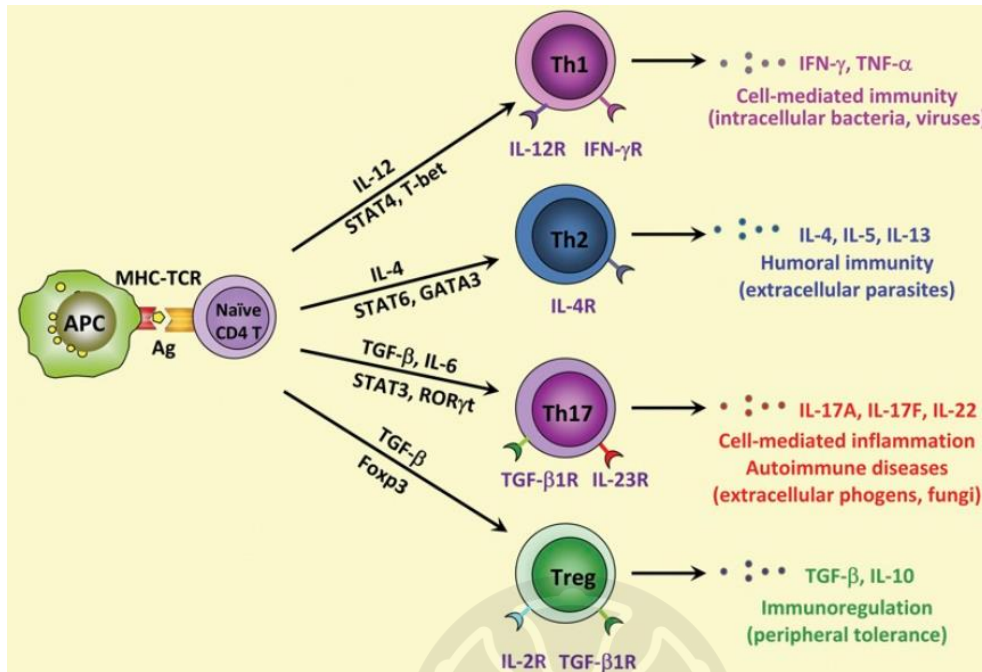


圖 1-3、初始 $CD4^+$ T 細胞分化成輔助型 T 細胞模型

Figure 1-3. The differentiation and function of $CD4^+$ T cells. Foxp3, forkhead box p3; IL, interleukin; ROR γ t, RAR-related orphan nuclear receptor; STAT, signal transducer and activator of transcription; TGF, transforming growth factor; Thp, naïve $CD4^+$ T helper cell; Treg, regulatory T cell. Model for Th cell differentiation from naïve $CD4^+$ T cells. (Leung et al., 2010)

第二節、乾癬

一、背景介紹

乾癬 (psoriasis) 又名「銀屑病」、「牛皮癬」，為一種自體免疫失調所引起的慢性皮膚發炎疾病 (Iskandar et al., 2021)，與基因遺傳和環境影響相關。不同國家及種族間的患病率不盡相同，如在美國地區白人患病率較高為 3.6%，黑人族群則較低為 1.5% (Armstrong et al., 2021)，全球患病率依地區不同約 2-5 %，影響為數不少的人口 (Liang et al., 2017; Parisi et al., 2020)。環境差異如氣候、陽光照射程度也會對乾癬患者產生影響，如研究發現大多數的乾癬性關節炎患者，在夏季時皮膚患部能獲得改善，相反的冬季時皮膚之乾癬症狀則惡化，此改變與患者接受的日曬量有關 (Balato et al., 2013)。另有研究發現陽光照射可調節乾癬患者皮膚中失調的免疫細胞，如減少皮膚中的 $CD4^+$ T 細胞和 $CD8^+$ T 細胞並增加真皮中的 $Foxp3^+$ T 細胞 (Søyland et al., 2011)，推測日曬是乾癬患者皮膚症狀改善的原因之一。

乾癬的特徵是具有過度增生且異常分化的角質細胞、過度活化的免疫細胞浸潤皮膚、角質細胞與免疫細胞所產生的大量發炎性細胞激素累積而導致表皮改變 (Ni & Lai, 2020; Tonel & Conrad, 2009)。乾癬可依病灶外觀分為許多種類，其中斑塊狀的乾癬又名尋常型乾癬 (psoriasis vulgaris) 最為常見，佔所有乾癬種類的 85-90%，主要臨床表現為皮膚產生邊界清楚的銀白色乾燥鱗屑，並引起紅腫、搔癢難耐 (Armstrong & Read, 2020)。患者的紅斑、脫屑及搔癢等病癢，主要發生於四肢及身體軀幹，但臉部、頭皮、指甲及關節也有發生的可能 (Boehncke & Schön, 2015)。除了外觀上引起反感，脫落的銀屑和病灶的搔癢、灼熱及疼痛往往帶給患者在日常工作、人際互動上的困擾，反覆發作也造成心理上的壓力，影響生活品質 (Sahi et al., 2020)。

除此之外，失調的免疫系統讓乾癬患者發生其他共病症 (comorbidities) 的機會大為增加，如乾癬性關節炎 (psoriatic arthritis)、發炎性腸道疾病 (inflammatory bowel disease, IBD)、心血管疾病、代謝症候群、癌症、自體免疫疾病和精神疾病 (Boehncke, 2018; Mehta et al., 2011; Rendon & Schäkel, 2019)，且目前無法根治解決。為此，針對乾癬的致病機轉與治療策略的相關研究，日益受到科學家重視，以期早日降低醫療風險、提升人民福祉。

目前對於乾癬疾病的實際病因及機轉尚未有明確的定論，但許多研究指出應是

由於基因遺傳與生存環境影響所引起的免疫系統異常，加上觸發因素的作用而引起乾癬疾病的發展，最後造成皮膚損傷，(Kamiya et al., 2019; Krueger & Ellis, 2005; Tsoi et al., 2017)。一篇雙胞胎研究指出同卵雙胞胎皆罹患乾癬的比例為 67%，而異卵雙胞胎則是 18% (Krueger & Ellis, 2005)，顯示乾癬與基因遺傳有關，但不全由基因遺傳所決定，而是基因與生活環境相互作用，共同產生的結果。許多因素都可能會誘發乾癬的發作並加劇疾病進展，包含外在的危險因素：皮膚損傷、空氣汙染、藥物使用、感染、重大壓力、吸菸、酒精攝取等；內在危險因素包括：代謝症候群、肥胖、糖尿病、高血壓、高血脂、長期心理壓力等 (Balato et al., 2015; Gelfand et al., 2006; Kamiya et al., 2019)。

臨床上對於患者疾病嚴重度的判定可由乾癬面積和嚴重度指數 (psoriasis area and severity index, PASI) 與醫師整體評估 (psoriasis global assessment, PGA) (Langley & Ellis, 2004) 及病理切片來確認 (Armstrong & Read, 2020)。PASI 是指個別評估頭部、上肢、軀幹和下肢此四個部位之乾癬患部面積範圍 (area)、紅斑 (erythematic)、鱗屑 (scaling) 及厚度 (thickness) 的狀態，加總計算出代表乾癬嚴重程度之分數，分數越高代表乾癬症狀越嚴重。PGA 則是醫師透過患部影像，進行主觀評估判定嚴重程度。

二、免疫細胞與乾癬

免疫系統本應替人體抵抗外來病原侵害、保護自身，但萬一免疫機制失去控制，發炎反應過度發生，轉而造成本身的細胞及組織受損，如乾癬之現象，即稱為自體免疫疾病或自體發炎疾病 (autoinflammatory disease) (Bejarano & Valdecantos, 2013; Liang et al., 2017)。

乾癬是經由複雜的免疫反應所產生的全身性發炎疾病，根據過往的研究文獻指出，乾癬的發展與皮膚中的 T 細胞過度活化與失衡有關 (Lowes et al., 2014; Prinz, 2003)，尤其是 $CD4^+$ T 細胞次群的失衡 (Cai et al., 2012)。而皮膚中的角質細胞、DC、先天性免疫細胞、適應性免疫細胞與細胞激素如 T 細胞相關的 IL-23 和 IL-17A，彼此之間的交互作用亦是乾癬疾病發展的重要因素 (Deng et al., 2016; Yang et al., 2016)。

如 (圖 1-4) 在乾癬疾病的起始階段，皮膚的角質細胞為應對所受到的外界刺激如 (皮膚受損、微生物入侵、藥物誘導) 而分泌出 AMPs、釋放 DNA 及 RNA、釋放 CXCL1、C-C motif ligand 20 (CCL20) 等趨化因子、增加血管內皮生長因子

(vascular endothelial growth factor, VEGF) 的分泌、釋放細胞激素如 TNF- α 、IL-6 以促進發炎反應及角質細胞增生 (圖 1-4) (Ni & Lai, 2020)。趨化因子 CXCL1 會吸引嗜中性白血球聚集；CCL20 則吸引 Th17 細胞聚集 (K. Furue et al., 2020)。AMPs 除角質細胞外，還可由嗜中性白血球或巨噬細胞分泌，而 AMPs 當中 LL37 可和自體 DNA、RNA 結合，做為自體抗原 (self-antigen) 進一步刺激 mDC 及 pDC 上的 TLR7 的活化並分泌 IL-17、TNF- α ，引起初始 T 細胞分化，或作為自體抗原不經由 DC 直接活化 T 細胞，使 Th17 細胞數量增加 (Kim & Krueger, 2015; Morizane & Gallo, 2012; Takahashi & Yamasaki, 2020)。活化後的 DC 會釋放 TNF- α 、IFN- α 、IL-6 和 IL-23 等細胞激素刺激 T 細胞分化 (Herster et al., 2020; Takahashi & Yamasaki, 2020; Tian & Lai, 2022)。TNF- α 、IFN- α 和 IL-6 可繼續活化 mDC (Tian & Lai, 2022)；而 IL-23 會活化 Th17 細胞，使其釋出 IL-17A 和 TNF- α 等細胞激素 (K. Furue et al., 2020; Lowes et al., 2014)。

皮膚損傷產生的發炎反應導致大量嗜中性白血球聚集於患者皮膚，同時血液中的嗜中性白血球數量及百分比皆增加，研究顯示嗜中性白血球的增加與乾癬嚴重度指標 PASI 分數成正比 (Liu et al., 2022)。患部聚集的嗜中性白血球，其功能除了吞噬病原體外更形成 NET，並透過促進 AMP 分泌及產生 ROS 來攻擊並清除外來病原體 (Takahashi & Yamasaki, 2020)。但在免疫失調的情況下，嗜中性白血球大量聚集造成患者的皮膚出現嚴重的發炎反應而無法受到緩解，而過量產生的 ROS 形成組織的受損，同時嗜中性白血球會分泌 IL-17，進一步促進角質細胞異常增生 (Keijsers et al., 2014; Lin et al., 2011)。因此在乾癬的皮膚病理切片上可以觀察到充滿嗜中性白血球及細胞核的孟洛微膿瘍 (Munro's microabscesses)、表皮層增厚、角質層角化過度與角化不全等乾癬組織病理學特徵 (Murphy et al., 2007)。此外，LL37 和 RNA 結合的複合體除了活化 TLR7 下游的發炎路徑，還加劇了嗜中性白血球的 NET 釋放，促使發炎反應惡化 (Herster et al., 2020)。

至於 Mo 則是 DC 和 M Φ 的前驅細胞，在發炎時期大量產生，並被募集到患部參與免疫反應 (Kratofil et al., 2017)。對於乾癬病情發展也具有意義 (Behfar et al., 2018)，可在臨床上觀察到患者血液循環中 Mo 數量上升並和 PASI 增加成正比 (Golden et al., 2015)。

當皮膚中 DC 接觸抗原後移動到淋巴組織中，進行抗原呈現給 T 細胞，使 T 細胞分化、增生，移動到皮膚患部或是全身循環系統，會導致全身性的發炎反應 (Clark,

2010)。許多研究已經發現，此時體內 T 細胞數量會增加 (Matos et al., 2017; Menssen et al., 1995; Takahashi & Yamasaki, 2020)。T 細胞可分為 $\alpha\beta$ T 細胞或 $\gamma\delta$ T 細胞，除 $\gamma\delta$ T 細胞外， $\alpha\beta$ T 細胞中與乾癬發炎反應相關的 T 細胞包括: Tc 細胞和 Th 細胞 (Th17 和 Treg) (Clark, 2010)。一般來說人類皮膚中存在的 $\gamma\delta$ T 細胞數量並不多，但在近年被研究發現 $\gamma\delta$ T 細胞，是皮膚受 IL-23 刺激後 IL-17A 產生的重要來源之一，具有影響乾癬發展的意義 (Cai et al., 2011)。而數量較多的 $\alpha\beta$ T 細胞中，Th17 細胞是主要產生 IL-17A 的細胞，對乾癬疾病的進展與維持十分重要。大量的研究發現可針對 Th17 細胞進行抑制，進而改善乾癬病癥 (Di Cesare et al., 2009; Sharma et al., 2022; Yang et al., 2022)。而 Tc 細胞也具有產生致病性 IL-17A 的功能，在乾癬患者血液內有所增加 (Kok et al., 2020; Leijten et al., 2021)。Th17 細胞所分泌的 IL-17 導致角質細胞大量增生，而大量增生的角質細胞分泌 IL-23 繼續促使 Th17 細胞分化增生，在發炎患部形成反覆發作的循環，使發炎反應持續 (Li et al., 2020)。在此階段，乾癬患者的皮膚病灶處、周邊血液中的 Th17 細胞及 Treg 細胞會大量增加 (Nussbaum et al., 2021; Schön, 2019; Zhang et al., 2010)。Treg 對於維持自我耐受性和調節免疫功能至關重要，但乾癬患者體內的 Treg 細胞功能，會受大量產生的促發炎細胞激素如 IL-6 影響而降低功能，無法抑制 T 細胞活化 (Goodman et al., 2007; Goodman et al., 2009; Sugiyama et al., 2005)，因此血中 Th17/Treg 比值會升高，並與疾病嚴重度成正相關 (Zhang et al., 2016)，顯示 Th17 與 Treg 之間的平衡也與乾癬疾病的關聯性極高。

在皮膚處大量產生的促發炎細胞激素當中，IL-17 家族的 IL-17A 與乾癬發展最為相關，在體外試驗 (M. Furue et al., 2020)、轉錄組研究 (transcriptome) (Lowe et al., 2014) 中也證實 IL-17A 具有影響乾癬發展的重要地位，針對其而研發的生物製劑療法展現了優異的治療效果 (M. Furue et al., 2020; Ghoreschi et al., 2021)。IL-17A 可由許多免疫細胞產生，包括先天性免疫細胞:嗜中性白血球、肥大細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞和適應性免疫細胞: Th17、 $\alpha\beta$ T 細胞、Tc 細胞 (Blauvelt & Chiricozzi, 2018; Keijsers et al., 2014)。IL-17A 可誘導角質細胞增生和異常分化、增加 AMP 合成 (Lowe et al., 2014)、分泌促發炎細胞激素、提高 CCL20 表現量、活化 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) 路徑使角質細胞增生並產生發炎反應 (M. Furue et al., 2020)。活化的角質細胞也會刺激 T 細胞產生 IL-17A，形成正回饋迴路 (positive feedback)，使發炎反應加劇 (Blauvelt & Chiricozzi, 2018; M. Furue et al., 2020)。

而 IL-23 由 DC、MΦ 及角質細胞所分泌，可刺激 Th17 細胞分化、增生和存活，是 Th17 細胞所必需的細胞激素。除 Th17 外，IL-23 也可促進 $\gamma\delta$ T 細胞產生 IL-17A (Baliwag et al., 2015) 影響乾癬疾病發展，因此 IL-23/IL-17A 軸被視為研究乾癬機轉的重要路徑 (Cai et al., 2011; Hawkes et al., 2018)。

這樣一連串失控的免疫細胞與細胞激素間的交互作用形成自我放大迴路 (self-amplifying loop) 使患部形成充滿免疫細胞、促發炎的細胞激素大量分泌、角質細胞異常增生、角質層增厚的狀態。

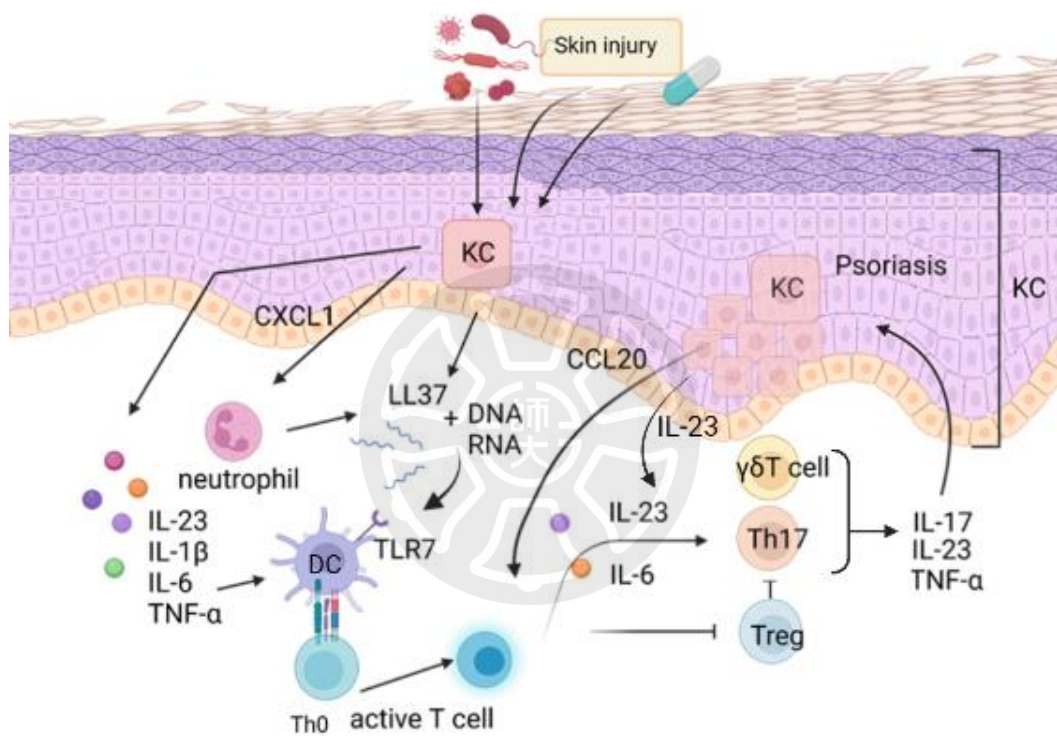


圖 1-4、乾癬疾病機轉

Figure 1-4. Psoriasis immunopathogenesis. KC, keratinocytes; DC, dendritic cell; IL, interleukin; TLR, toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor; CXCL, C-X-C motif ligand.

三、乾癬動物模式

目前研究乾癬的動物模式有自發突變 (Presland et al., 2000)、基因轉殖 (Carroll et al., 1997)、組織移植 (Wrone-Smith & Nickoloff, 1996) 及局部誘導等方式。局部誘導又以施予含 5% imiquimod (IMQ) 乳膏 (Van Der Fits et al., 2009) 或是皮下注射 IL-23 (Chan et al., 2006) 為主。使用 IMQ 局部誘導因具有快速和可重複的皮膚反應、動物不需特定的無病原體條件或特殊飲食，而且成本相對基因轉殖動物低廉等優勢，故自 2009 年首次發表以來，透過 IMQ 誘導使小鼠產生乾癬樣皮膚炎，逐漸成為乾癬動物實驗的主流 (Horváth et al., 2019; Schön et al., 2021; Van Der Fits et al., 2009)。

用於乾癬模式的實驗動物包括 C57BL/6J、BALB/cJ、CD1、DBA/1J、FVB/NJ、129X1/SvJ 和 MOLF/EiJ 小鼠，根據一項比較不同品系小鼠使用 IMQ 誘導的研究，其中 C57BL/6J 小鼠具有更高的 IL-17 家族相關基因表達、反映人類乾癬特徵的效果較佳 (Badanthadka et al., 2021; Swindell et al., 2017) 故 C57BL/6J 為 IMQ 誘導乾癬實驗較常採用之動物品系 (Hawkes et al., 2017)。以 IMQ 誘導小鼠乾癬樣皮膚炎的動物實驗方法為在小鼠背部取 4-5 平方公分 (cm²) 的皮膚範圍，塗抹 62.5 mg 的 aldera 乳液(含有 5% IMQ)連續 5-7 天進行乾癬誘導，局部濃度為 12.5-15.625 mg/cm² (Swindell et al., 2017; Zhang et al., 2021)。

Aldara 乳膏中文商品名為樂得美，一般用於治療因人類乳突病毒感染所引起的尖形濕疣 (condyloma acuminatum)。IMQ 為一小分子量的胺類化合物，延展性佳、塗抹方便且皮膚吸收快速、適合局部施用，在過去的臨床使用上發現局部塗抹後會誘發乾癬症狀 (Wu et al., 2004)，而後被用以模擬人類乾癬疾病的研究 (Vinter et al., 2015)。Aldara 誘發乾癬的機制與 TLR7 有關，藥膏中含有的 IMQ 作為 TLR7 的配體，可活化 KC、MΦ 以及 DC 上的 TLR7 (Flutter & Nestle, 2013)，並刺激 MyD88 adaptor 進而活化下游 NF-κB 路徑 (圖 1-5)，最終誘發與乾癬相關的發炎反應 (Li et al., 2019)，產生大量的促發炎激素及趨化因子。此階段大量的細胞激素分泌，以 IL-23/IL-17A 的 Th17 軸為主，促發炎症細胞激素 IL-17A、IL-23、TNF-α 和趨化因子 CXCL1 增加，導致局部皮膚出現 T 細胞、嗜中性白血球聚集，皮膚過度發炎的現象，可模仿人類乾癬的發病機制，形成全身性發炎疾病，因此可作為銀屑病樣皮膚炎小鼠的誘導藥劑。Aldara 也可直接促進角質細胞的凋亡、產生促發炎細胞激素及趨化因子，引起皮膚發炎反應 (Walter et al., 2013) (圖 1-6)。

以 IMQ 誘發小鼠乾癬樣皮膚炎和臨床乾癬患者相似，在皮膚外觀可觀察到紅斑、

脫屑及角質增厚的情形。透過皮膚組織切片更可以看到乾癬的組織學特徵，如真皮層血管擴張及增生導致皮膚泛紅；角質細胞過度增生且分化不全 (parakeratosis) 導致顆粒層缺失並造成角質層異常增厚、產生脫屑，且具有未完全退化的細胞核與孟洛微膿瘍；表皮及真皮層中免疫細胞浸潤（包含 T 細胞、DC 以及嗜中性白血球）(Murphy et al., 2007; Wagner et al., 2010; Yang et al., 2019)。而 IMQ 誘導造成皮膚中 T 細胞相關細胞激素 IL-17A、及 IL-23 的表現量增加並促進 AMP 的生成 (Abdallah et al., 2017)。且小鼠真皮層中的 $\gamma\delta$ T 細胞受到 IL-23 的刺激後，會分泌細胞激素 IL-17A，此現象在人類乾癬中的真皮層 $\gamma\delta$ T 細胞亦具相同功能 (Cai et al., 2011)。在全身性的影響方面，給予 IMQ 會導致小鼠脾臟腫大並增加脾臟及血液中的 Th17 細胞 (Flutter & Nestle, 2013; Van der Fits et al., 2009)。另外，在動物整體變化方面，有研究發現小鼠在給予 IMQ 誘導後，隨著疾病嚴重程度增加，會出現程度不等的行為改變，包含：厭食（進食量下降、體重減輕）(Badanthadka et al., 2021)、搔癢動作增加及活動能力下降（打鬥頻率、抬頭、築巢程度）等改變 (Alvarez & Jensen, 2016)。活動能力方面，由 Karamani 等人 (2021) 的研究發現給予 IMQ 的小鼠在活動測試 (Locomotor activity test) 中活動距離 (distance covered) 明顯低於對照小鼠，顯示小鼠在疾病的情況下，活動能力較差。



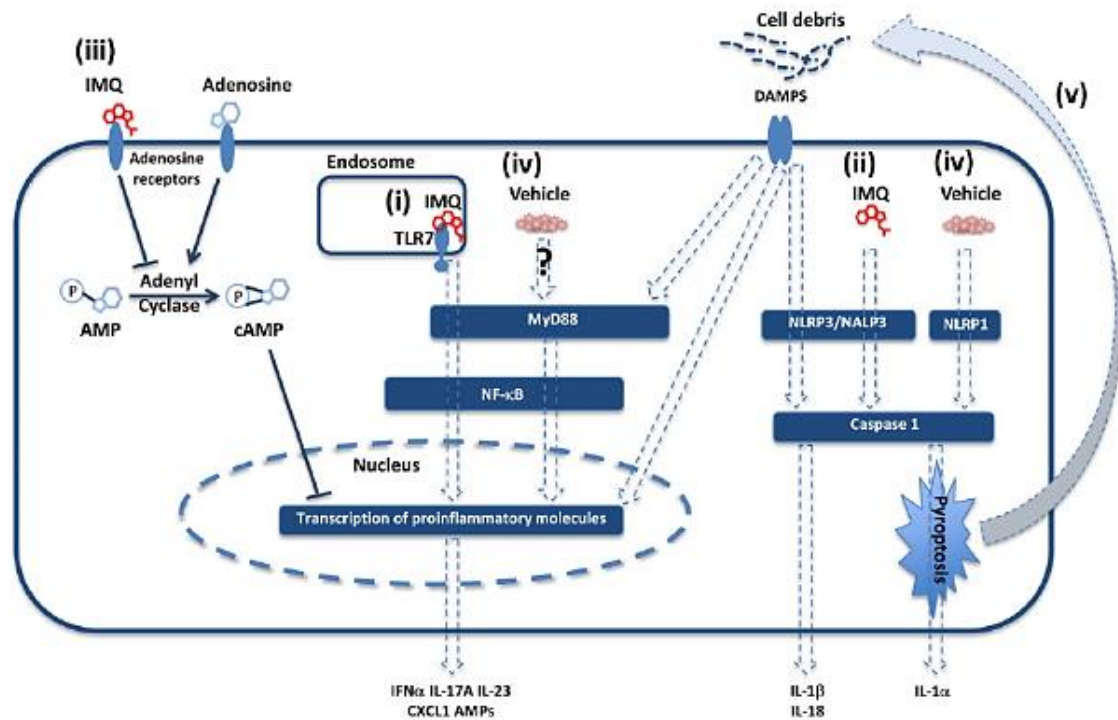


圖 1-5、IMQ 誘發免疫反應機制

Figure 1-5. Mechanisms of action of IMQ. AMP, antimicrobial peptides; AMP, adenosine monophosphate; cAMP, cyclic AMP; CXCL, C-X-C motif ligand; IMQ, imiquimod; IFN, interferon; IL, interleukin; MyD88, myeloid differentiation factor 88; NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NALP, NACHT, LRR- and pyrin domains-containing protein; TLR, toll-like receptor. (Flutter & Nestle, 2013)

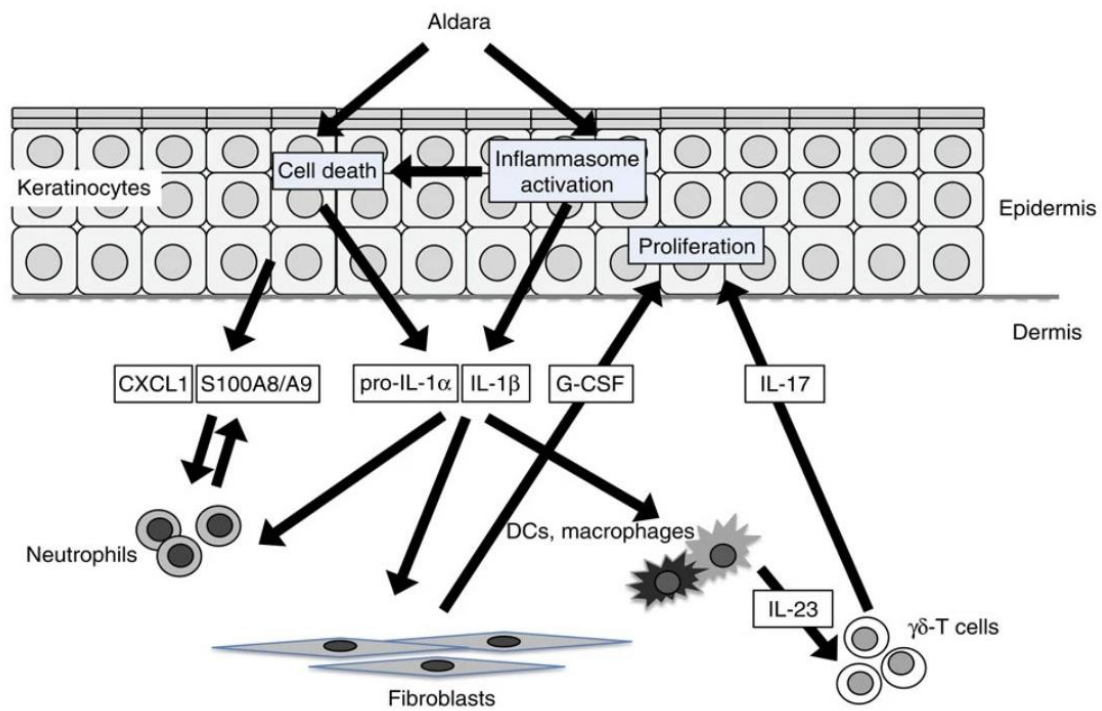


圖 1-6、Aldara 獨立於 TLR7 路徑誘導皮膚反應之圖示

Figure 1-6. Schematic representation of TLR7-independent Aldara-induced events in the skin. IL, interleukin; CXCL, C-X-C motif ligand; DC, dendritic cell; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor. (Walter et al., 2013)

四、乾癬的治療與藥物使用

目前尚未出現能夠完全根除乾癬的強效藥物，但是可以採取避免觸發或使用藥物控制來減輕症狀。而臨床上治療主要有幾種方向，其一為局部控制皮膚病徵的傳統療法如：外用類固醇藥膏、維生素 D₃ 類似物，其二為系統性的全身治療，如服用胺甲喋呤 (methotrexate, MTX) 藥物、光療 (如紫外光和雷射光) 和使用生物製劑類 (biologicals) 藥物，針對引起乾癬的特定免疫細胞進行調控，以降低發炎反應 (圖 1-7)。

類固醇可抑制促發炎細胞激素產生，具有抑制角質細胞增生、抗發炎和局部血管收縮的效果，但是長期局部使用會導致皮膚萎縮、微血管擴張、治療能力下降等副作用 (Deng et al., 2016)。維生素 D 類似物可抑制角質細胞異常增生，但會引起刺痛、灼熱感等皮膚不適且效果發揮較慢 (Zhu et al., 2021)。MTX 藥物能抑制 DNA 合成，在長期使用下比類固醇藥物具有更高的治療效果，但具有引起血液、肺部、胃

腸道及肝臟病變等副作用之可能，尤其引起肝臟病變如肝纖維化或肝硬化 (Gaies et al., 2012)。光療方面，由於日曬可改善乾癬患者的皮膚狀況並具有免疫抑制的效果，包含降低皮膚中的 $CD4^+$ T 細胞、 $CD8^+$ T 細胞 (Søyland et al., 2011) 和 pDC 細胞 (Balato et al., 2013) 數量並增加真皮中的 $Foxp3^+$ T 細胞 (Søyland et al., 2011)，雖然光療法有其療效 (Zhang & Wu, 2018)，但會受到場地與設備的限制。生物製劑方面，針對引起乾癬的細胞激素如 TNF、IL-12/23、IL-17、IL-23 (Chiu et al., 2018; Zhu et al., 2021) 進行抑制，已顯示可展現優異的治療效果，但費用高昂且具有噁心、頭痛等副作用 (Deng et al., 2016)。

關於乾癬的治療，可透過評估患者的乾癬嚴重程度以及影響範圍，來選擇局部或系統性的治療方法。但不論是傳統療法或是生物製劑都有長期使用的不良副作用或是價格昂貴等問題，尤其乾癬的慢性復發特徵讓此一隱憂更顯重要，因此乾癬的治療藥物及相關輔助療法的研究受到許多關注。

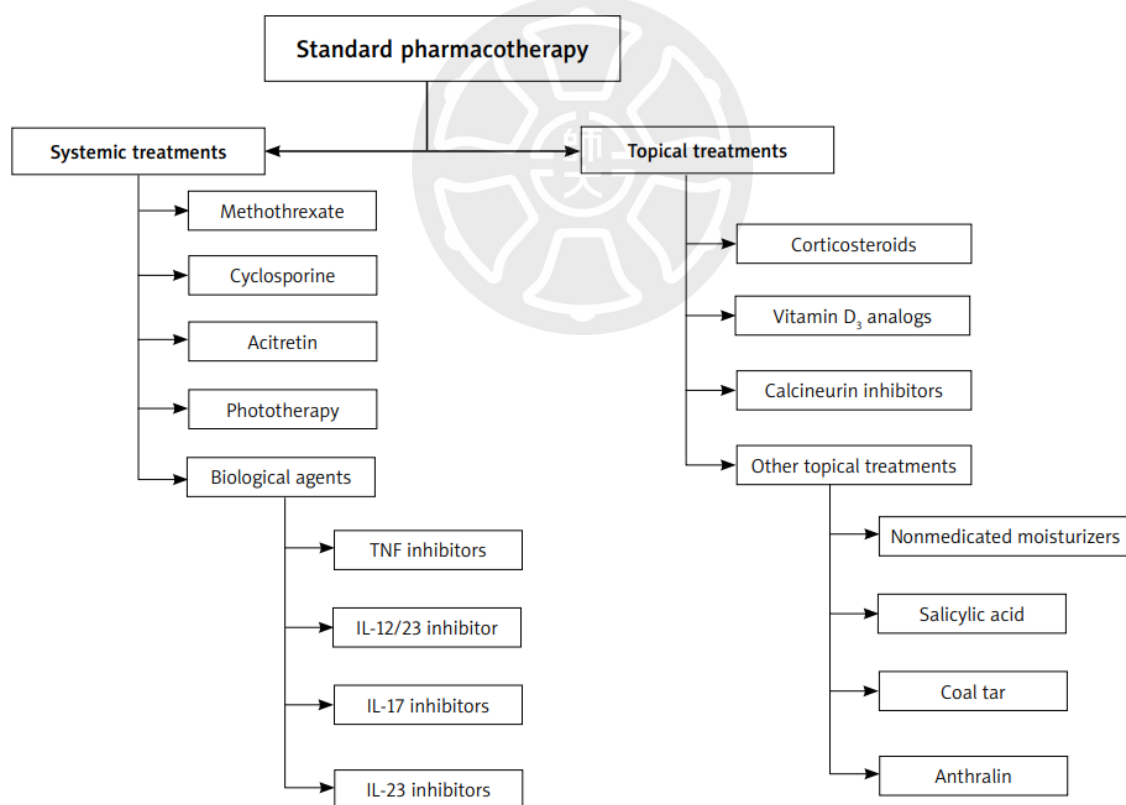


圖 1-7、乾癬的治療方法

Figure 1-7. Pharmacotherapy used in psoriasis. (Zhu et al., 2021)

五、乾癬的照護與飲食介入和膳食補充劑 (Dietary Intervention and Supplements in the Management of Psoriasis)

為提升民眾的生活品質，除了目前的臨床用藥以外，乾癬病友需要更全方位性的醫藥照護，例如營養建議、運動指南、衛教資訊等。飲食介入或膳食補充劑已被認為可輔助改善乾癬。如地中海飲食 (mediterranean diet) 可能有益於乾癬病情控制 (Barrea et al., 2015)。至於膳食補充劑對於乾癬的療效仍需進一步的研究，以確定其療效。以下就飲食介入與膳食補充劑分述於下：

(一) 飲食介入：

目前飲食調整的相關研究包含採取地中海飲食 (Lucius, 2022)、無麩質飲食 (gluten-free diet) (Michaëlsson et al., 2000)、低熱量飲食 (low calorie diet, LCD) (Pona et al., 2019) 等。

長期採取地中海飲食等健康飲食模式，可以降低罹患全身性發炎疾病的風險 (Akbaraly et al., 2015)，已被許多研究證實具有抗發炎的效果，可以減緩慢性腸炎的症狀 (Olendzki et al., 2014)，並降低代謝症候群 (Metabolic Syndrome) (Salas-Salvadó et al., 2015) 和心血管疾病 (Estruch et al., 2013) 之風險。由於地中海飲食中富含單元不飽和脂肪酸 (mono-unsaturated fatty acids, MUFA) 和多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA)，對腸道和免疫系統具有益處 (Mazzocchi et al., 2019; Mena et al., 2009)。研究指出採取地中海飲食模式及食用特級初榨橄欖油 (extra virgin olive oil) 可降低血漿中 IL-6、IL-17A、TNF- α 、IL-1 β 及環氧化酶 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 等促發炎因子，具有抗發炎效果 (Luisi et al., 2019)。此飲食模式中含有較高比例的蔬菜及水果，可增加多酚類攝取量。在許多研究中顯示多酚類具有抗發炎及抗氧化的效果，如白藜蘆醇可抑制 TLR4 路徑活化，降低促發炎基因表現，進而減少 Th17 細胞數量、降低細胞激素 IL-17 表現 (Malaguarnera, 2019)。更有研究發現乾癬患者當中，疾病嚴重程度較高的族群對地中海飲食模式的依從性較低 (Phan et al., 2018)，同樣支持了地中海飲食可能減緩乾癬疾病進展的假設。

由於乾癬患者具有乳糜瀉 (celiac disease) 的比例較高 (Wu et al., 2012)，因此有研究對於乾癬患者採取無麩質飲食的效益進行了探討，發現乾癬患者若同時具有抗醇溶蛋白抗體 (elevated antigliadin antibodies) 升高，對於採取無麩質飲食具有改善乾癬病癥並降低 PASI 分數的效果 (Bhatia et al., 2014)。因此建議同時具有乳

糜瀉或抗醇溶蛋白抗體較高的乾癬患者應避免食用含麩質食物。LCD 結合局部或全身性治療可降低患者的 PASI 分數以及皮膚病生活質量指數 (Dermatology Life Quality Index, DLQI)，但是當患者停止同時使用環孢素 (cyclosporine) 或 MTX 治療時，單獨的維持 LCD 並不能使疾病持續緩解。

(二) 膳食補充劑

透過飲食補充來減緩或改善乾癬病徵，是許多民眾及科學家皆感興趣的議題。魚油中含有 EPA 和 DHA，多項研究已經發現使用魚油補充品對於乾癬皮膚損傷具有改善效果，例如可改善患者的皮膚搔癢、紅斑及脫屑 (Millsop et al., 2014)。魚油補充劑更可與治療藥物 Etretinate 搭配使用，對於乾癬患者的臨床症狀來說，合併魚油補充比單獨藥物使用具有更強烈的改善效果 (Danno & Sugie, 1998)。因此，魚油補充對於乾癬患者來說具有正向的效益 (Kanda et al., 2020)。

除魚油之外，其他膳食補充劑也受到關注，例如補充維生素 D (GAál et al., 2009)、茄紅素 (lycopene) (Shih et al., 2020)、薑黃素 (curcumin) (Sun et al., 2013)、與益生菌如 *Bifidobacteria infantis* 35624、*Bifidobacterium longum* CECT 7347、*Bifidobacterium lactis* CECT 8145 和 *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361.) (Lucius, 2022)。且已具備相關效果，如口服給予維生素 D，實驗期間持續 6 個月至 36 個月不等，在每天 0.5 µg 的維生素 D3 補充下，88% 的乾癬患者有一定程度的臨床症狀改善 (Perez et al., 1996)。維生素 D3 被證明對角質細胞具有抑制增生的作用 (Matsumoto et al., 1990)，可改善乾癬患者的皮膚變化。至於口服給予小鼠 0.06 mg/kg BW/day 的茄紅素可抑制細胞間黏著分子 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 表達，並降低 IMQ 誘導乾癬小鼠的小鼠的 PASI 分數；而口服共 400 mg 薑黃素專利片，可降低乾癬患者血液中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 細胞的活性、顯著降低了 IL-22 的血清水平並降低 PASI 分數，改善皮膚發炎反應 (Perez et al., 1996; Sun et al., 2013)。

因此，僅是單獨的飲食改變可能無法對乾癬患者產生顯著的改善，但可能成為治療上的重要輔助手段，協助改善發炎狀態 (Michaëlsson et al., 2000)。因此尋找用於預防或減輕乾癬病癥的膳食補充劑或飲食模式，仍可作為輔助乾癬治療的策略之一。

第三節、麩醯胺 (glutamine)

一、GLN 之生理與代謝

麩醯胺 (glutamine, GLN)，是人體內含量最豐富的游離胺基酸 (Li et al., 2007)。大多由骨骼肌合成並釋放到各種組織，在血液中濃度約為 500-800 $\mu\text{mol/L}$ (Cruzat et al., 2018)。人體可自行合成 GLN，在骨骼肌、肺臟、脂肪組織和肝臟中具有麩胺合成酶 (glutamine synthetase)，可在其作用之下利用氨 (NH_3) 和麩胺酸 (glutamate) 合成 GLN，以供生理代謝使用。而大多數細胞中具有麩醯胺酸酶 (glutaminase, GLS) 可將 GLN 水解成麩胺酸和 NH_3 以供尿素生成、葡萄糖代謝及調控體內 pH 值使用 (de Oliveira et al., 2016)。

GLN 參與體內許多重要的生理作用，是生理代謝和細胞分裂所需中間代謝物的來源，其可作為核苷酸、蛋白質合成的材料，或作為體內氮原子與胺基的傳遞媒介，更可在腸道和腎臟等器官作為氨 (NH_3) 的材料來源，維持正常生理功能 (Tapiero et al., 2002)。GLN 亦可作為抗氧化成分穀胱甘肽 (glutathione, GSH) 的前驅物。GSH 是體內重要的抗氧化物質，由麩胺酸、半胱氨酸 (cysteine) 及甘胺酸 (glycine) 三個胺基酸所組成，GSH 能夠和體內的自由基或 ROS 結合，幫助身體組織對抗氧化傷害 (Chang et al., 1999)。因此維持體內 GLN 的穩定有利於器官間的氮交換、酸鹼平衡和平衡體內細胞的氧化還原狀態 (Kim, 2011)。除此之外，GLN 還具有抗發炎、免疫調節 (Roth, 2007, 2008)、調節基因表達 (Brasse-Lagnel et al., 2009)、參與能量代謝、活化 mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) 蛋白及活化熱休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 等功能 (Cruzat & Tirapegui, 2009; Heck et al., 2011; Mayers & Vander Heiden, 2015)。GLN 可活化 mTORC1 以維持細胞對胺基酸的感知能力，調節生長、新陳代謝和自噬作用的正常運作 (Meng et al., 2020)。由於人體組織可以自行合成 GLN，其通常被認為是一種非必需胺基酸 (non-essential amino acid)，但在高速代謝或壓力時期如創傷、重大手術、感染、敗血症、骨髓移植、燒傷、化學治療和放射線治療時，GLN 會供不應求，故被視作條件性必需胺基酸 (conditionally essential amino acid) (Kim & Kim, 2017; Rodas et al., 2012; Wang et al., 2010)。當細胞需要大量增生，作為細胞生成的材料之一，體內 GLN 消耗增加，細胞內外的 GLN 濃度會顯著降低 (Tapiero et al., 2002; Watford, 2015)。

二、GLN 與免疫調節

雖然人體內主要以葡萄糖作為細胞的能量來源，但在高強度的分解代謝條件下，患者體內的細胞會快速增生，免疫細胞（如 MØ、淋巴細胞、嗜中性白血球）會利用 GLN 作為能量來源之一，因此 GLN 被認為是免疫系統的燃料，有免疫營養素 (immuno-nutrients) 之稱 (Cruzat et al., 2014; Newsholme, 2001)。GLN 不但可作為細胞的材料以及能量來源，在細胞增生、組織修復過程和病原體識別方面同樣具有貢獻。當身體處於強烈的免疫反應之下，如發生感染或創傷時，免疫細胞會大量產生，同時 GLN 代謝旺盛進行。GLN 代謝相關的酶如 GLS、麩胺酸去氫酶 (glutamate dehydrogenase, GDH)、麩胺酸草乙酸轉胺酶 (glutamic-oxaloacetic transaminase, GOT) 即 (aspartate aminotransferase, AST)、麩胺酸丙酮酸轉胺酶 (glutamic-pyruvic transaminase, GPT) 即 (alanine transaminase, ALT) 也會隨之增加 (Carr et al., 2010)。這些情況下，體內的葡萄糖及 GLN 的消耗量皆大幅增加 (Cruzat et al., 2018)，顯見 GLN 對免疫細胞代謝具有重要角色。除此之外，補充 GLN 也具有調節免疫細胞的效果，GLN 的含量高低會影響 MØ 合成及分泌促發炎細胞激素，如 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 (Cruzat et al., 2018)。在敗血症動物實驗上發現補充 GLN 可以維持血液及脾臟中整體 T 細胞的比例，並提高輔助性 T 淋巴細胞所佔比例，具有調節 T 細胞功能之效果 (Yeh et al., 2004)。另外在細胞實驗中發現 GLN 的缺乏會促進 Th17 細胞增加，而補充 GLN 能夠逆轉此一現象，使 Treg 細胞增加並抑制 Th17 分化 (Araujo et al., 2017)。同樣在 DSS 誘導腸炎動物模式中也發現到補充 GLN 具有調節 Th17 細胞及嗜中性白血球之效果，可減少 Th1、Th2、Th17 相關細胞激素的表達並降低組織中嗜中性白血球的浸潤 (Chu et al., 2012)。在體外試驗也發現在燒傷患者的細胞中補充 GLN 可改善嗜中性白血球的殺菌功能，能夠更好地消滅金黃色葡萄球菌 (Ogle et al., 1994)。

GLN 除了作為免疫細胞的能量來源、參與許多免疫細胞分化、代謝的重要過程外，其也對淋巴細胞及單核球等免疫細胞具有調節功能，詳表 1-1 (Roth, 2008)。

表 1-1、GLN 的細胞及免疫調節功能

Table 1-1. Cell and immune regulation by glutamine (Roth, 2008)

Regulation of cell functions

- Precursor of purine and pyrimidine
- Precursor of glutathione
- Interferes with L-arginine and nitric oxide metabolism
- Regulates cell size by osmosignaling
- Stimulates Hsp formation
- Stimulates AMP-activated protein kinase pathway
- Activates extracellular signal-regulated kinases

Regulation of lymphocyte function

- Stimulates Con-A- and PHA-induced proliferation
- Activates the expression of CD25, CD71, and CD45RO
- Stimulates interferon γ secretion
- Stimulates lymphokine-activated killer-cells
- Inhibits apoptosis
- Stimulates intestinal immunity (GALT)
- Increases proportion of natural killer cells in spleen

Regulation of monocyte function

- Stimulates RNA synthesis
 - Increases IL-1 secretion
 - Stimulates phagocytosis of opsonized E. coli and oxidized erythrocytes
 - Stimulates antigen presentation
 - Increases expression of surface antigens
 - Influences differentiation
 - Improves antioxidant defenses
-

二、GLN 與發炎反應

補充 GLN 的效益在敗血症模式 (Su et al., 2021)、發炎性腸道疾病 (Chu et al., 2012; Hsiung et al., 2014)、缺血再灌流 (Shih et al., 2016) 等發炎性疾病上已獲得證實，發現 GLN 具有調節 T 細胞、減緩發炎反應等效果。在脂多醣 (lipopolysaccharide; LPS) 處理的人類大腸癌細胞株 Caco-2 細胞實驗中，補充 GLN 可抑制 STAT4 路徑活化 (Liboni et al., 2004)，降低 IL-6 和 IL-8 的蛋白質表現量來減緩發炎反應 (Kretzmann et al., 2008)。在 DSS 誘導腸炎的動物實驗給予小鼠口服 0.75 g/kg/day 的 GLN，可改善小鼠的出血及腹瀉並增強 HSP70 表現量 (Xue et al., 2011)，或減少 Cytoplasmic phospholipase A2 (cPLA2) 磷酸化及腸道中 TNF- α 的蛋白質表現量 (Jeong et al., 2018)。在三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS) 誘導大鼠腸炎實驗中給予 25 mg/kg 的 GLN 可抑制 STAT1 和 STAT5 路徑的活化 (Kretzmann et al., 2008)。在高脂飲食 (55% 的卡路里來自脂肪) 誘導肥胖大鼠實驗模式下，給予 GLN (2.4 g/kg) 經四周，可降低 NF- κ B 活性來減少肝臟、肌肉及脂肪組織中的發炎反應 (Abboud et al., 2019)。GLN 被報導具有誘導 MAPK phosphatase (MKP)-1 活性的能力，可使脂肪酸代謝酵素 cPLA2 失去活性，進一步抑制前列腺素 (prostaglandins, PGs) 和白三烯素 (leukotrienes, LTs) 的生成，而具有抗發炎作用 (de Oliveira et al., 2016; Lee et al., 2015; Murakami et al., 2017)。當 NF- κ B 路徑被活化後，許多促發炎的細胞激素便會隨之產生，如 IL-1、IL-6 和 TNF- α ，而補充 GLN 能減緩發炎性細胞激素過度合成和釋放，故推論 GLN 的補充對於改善發炎性疾病具有一定效果。

四、GLN 與發炎性皮膚疾病

在過去的研究中發現 GLN 具有免疫調節、減緩發炎反應的效果，在 0.15% 二硝基氯苯 (dinitrochlorobenzene, DNFB) 誘導的接觸性皮膚炎 (contact dermatitis, CD) 小鼠實驗，透過局部給予生理食鹽水配成的 4% GLN 溶液，可達到抑制 cPLA2 磷酸化的效果，進而改善皮膚之腫脹與搔癢 (Jin et al., 2012)；塗抹蒸餾水配成之 4% GLN 溶液可改善 DNFB 及氯化奎寧 (Chloroquine, CQ) 所誘導的 CD 搔癢，證實 GLN 可誘導 G 蛋白偶聯受體激酶 (G protein-coupled receptors Kinase 2, GRK2) 的表達而抑制 G 蛋白偶聯受體 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 的活性，避免 GPCR 路徑傳遞的搔癢訊號，來改善小鼠的搔癢情形 (Im et al., 2018)；給予裸鼠由 GLN 構成的元

素飲食 Elental (由胺基酸、碳水化合物、維生素、脂肪及 GLN 組成) 可改善由抗癌藥物 5-fluorouracil 及外傷共同誘導的背部皮膚炎，且 Elental 在 HaCaT 角質細胞實驗具促進皮膚的傷口癒合和遷移能力 (Harada et al., 2018)。

目前尚未有 GLN 補充對於乾癬影響的直接研究，但許多研究有提到 GLN 對於乾癬發炎反應相關因子之作用，如 cPLA2、Th17/Treg、鐵依賴型細胞死亡 (ferroptosis)，推測 GLN 補充對於乾癬可能具有潛在的效益。cPLA2 作為重要的發炎因子，被認為參與了乾癬的皮膚發炎過程，其在乾癬患者的皮膚中表達提高，且在體內試驗與體外試驗皆促進角質細胞增生，並促進促發炎細胞激素分泌 (Shao et al., 2021)。因此也有針對抑制 cPLA2 途徑來作為乾癬治療方式的研究 (Ashcroft et al., 2020)。

由於免疫系統失衡造成乾癬患者皮膚中角質細胞大量異常增生，死亡的細胞會釋出促發炎細胞激素，尤其是以鐵依賴型細胞死亡的形式，會釋放 DAMPs 加劇患部發炎反應的發生。在 Shou 等人 (2021) 的研究中透過體內及體外模型發現抑制角質細胞鐵依賴型細胞死亡，可進而減輕發炎反應並改善乾癬的臨床表徵。同時，在體外試驗研究指出若 GSH 或其他細胞保護系統受到抑制，角質細胞會隨之發生鐵依賴型細胞死亡 (Vats et al., 2021)。因此推論藉由補充 GLN 來提升體內 GSH 含量，可避免角質細胞發生鐵依賴型細胞死亡及產生 DAMPs，對於乾癬治療患者而言，可能具有潛在的益處。但在過去的研究中指出細胞發生鐵依賴型細胞死亡需要 GLN 及 GLN 代謝反應的參與，故補充 GLN 對於乾癬疾病的效益仍需進一步實驗去釐清 (Gao et al., 2015)。此外，除了燒傷、敗血症等情況會造成體內的 GLN 下降外，也有代謝體學研究發現乾癬患者的血漿中 GLN 含量較對照組低了 1.5 倍，且血漿中 GLN 濃度與 PASI 評分呈現負相關 (Armstrong et al., 2014; Chen et al., 2021)。更有研究指出病患血液中 GLN 濃度降低會造成免疫功能受損、導致患者預後狀況不佳甚至死亡風險增加 (Rodas et al., 2012)，故補充 GLN 對於乾癬病患可能具有益處。在先前的皮膚炎實驗中發現 GLN 可改善皮膚損傷及搔癢，因此對於乾癬這樣由過度活化的 T 細胞引起之慢性皮膚發炎疾病，補充 GLN 可能具有正面效益，而使用 IMQ 誘導小鼠產生乾癬樣的慢性皮膚發炎疾病模式是否具有改善效果，仍有待釐清。

第二章、研究動機與目的

乾癬為一種慢性皮膚發炎的自體免疫疾病，會導致患者皮膚紅腫脫屑及搔癢，嚴重影響患者生活品質和身心健康，並加劇社會醫療負擔。由於目前針對乾癬的治療方式具有副作用、環境限制及價格高昂等問題，許多研究者期望從飲食方面下手，透過補充特定營養素來減緩乾癬發炎反應且降低副作用。

同時，在乾癬患者的代謝體學研究中發現血清中 GLN 的含量較一般民眾來得低 (Armstrong et al., 2014)。GLN 是體內含量最豐富的胺基酸，除了維持體內重要的生理運作之外，在許多發炎性疾病實驗中證實具有抗發炎及免疫調節的作用。儘管 GLN 補充已顯示出這些結果，但由於其經過人體或動物的腸道代謝後的功效，尤其是以口服或及腸道攝取後對乾癬這類慢性發炎的改善效果仍然未知。因此補充 GLN 是否會影響皮膚免疫而改善乾癬發炎狀況，成為有待釐清的研究方向。本研究使用 IMQ 誘發乾癬樣皮膚炎的動物模式，探討給予 GLN 飼料是否會造成皮膚發炎實驗動物的症狀改善，並評估 GLN 介入對於動物體內的免疫細胞以及發炎反應是否改變。



第三章、材料與方法

第一節、所使用之藥品與儀器

一、實驗試劑與材料

1. 2-propanol: I9516, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
2. α -Cellulose: 900453, MP Biomedicals, Irvine, CA, U.S.A
3. Aldara™ 樂得美™乳膏, 3M Health Care Limited, Loughborough, England.
4. AIN-93G-MX mineral mix: 960400, MP Biomedicals, Irvine, CA, U.S.A
5. AIN-93G-VX vitamin mix: 960402, MP Biomedicals, Irvine, CA, U.S.A
6. Bovine serum albumin: A4503, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
7. Cell Strainer 70 μ m Nylon: 352340, FALCON, Mexico.
8. Casein purified high nitrogen: SR02211, MP Biomedicals, Irvine, CA, U.S.A
9. Chloroform: C2432, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
10. Choline bitartrate: C1629, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
11. Corn starch: S1914, MP Biomedicals, Irvine, CA, U.S.A
12. Deoxyribonuclease I: D5025, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
13. Diethyl ether: 32203, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
14. Diethyl pyrocarbonate (DEPC) : D5758, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
15. Disposable Syringe (without needle): MDSS03S, Terumo, China.
16. Ethanol: 32221, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
17. Ethylenediaminetetraacetic acid solution: 03690, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
18. Fetal bovine serum: 35-010-CV , CORNING, NY, U.S.A
19. Foxp3 staining buffer set: 00-5523-00, eBioscience, San Diego, CA, U.S.A
20. Glutamine: G8540, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
21. Hanks' Balanced Salt solution: H6648, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
22. IC fixation buffer: 00-8222-49, eBioscience, San Diego, CA, U.S.A
23. Intracellular staining permeabilization wash buffer: 421002, Biolegend, San Diego, CA, U.S.A
24. L-Cystine: C8755, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
25. Liberase: 5401127001, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
26. Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X): K0222, Thermo Scientific,

Waltham, MA, U.S.A

27. Paraformaldehyde: 16005, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
28. RBC lysis buffer: 420301, Biolegend, San Diego, CA, U.S.A
29. Permeabilization Buffer (10X): 00-8333-56, eBioscience, San Diego, U.S.A.
30. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium: 10-040-CV, CORNING, NY, U.S.A
31. Sodium azide: S8032, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
32. Soybean oil: Uni-President Enterprises, Taiwan
33. Sucrose: Taiwan Sugar Corporation, Taiwan
34. tert-Butylhydroquinone: 112941, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
35. Trizol reagent: 15596-018, Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A
36. VANICREAM™, Pharmaceutical Specialties, Minnesota, U.S.A

二、實驗抗體

1. AlexaFluor®700-conjugated anti-mouse CXC3R1: SA011F11 (clone number), 149021 (catalog number), Biolegend, CA, USA.
2. APC-conjugated anti-mouse CCR2 antibody: FAB5538A, R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A
3. APC-conjugated anti-mouse $\gamma\delta$ TCR antibody: 17-5711-81, eBioscience, San Diego, CA, U.S.A
4. APC-conjugated anti-mouse CD25 antibody: 102012, BioLegend, San Diego, CA, U.S.A
5. APC-conjugated anti-mouse CD4 antibody: 100412, BioLegend, San Diego, CA, U.S.A
6. Biotin-SP (long spacer) AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L): 111-065-003, Jackson ImmunoResearch, PA, USA
7. FITC-conjugated anti-mouse Ly6G antibody: 127606, BioLegend, San Diego, CA, U.S.A
8. FITC-conjugated anti-mouse CD3 antibody: 100305, BioLegend, San Diego, CA, U.S.A
9. Pacific blue-conjugated anti-mouse CD4 antibody: 100534, BioLegend, San Diego, CA, U.S.A
10. Pacific blue-conjugated anti-mouse CD11b antibody: 101224, BioLegend, San Diego, CA, U.S.A
11. Pacific blue-conjugated anti-mouse CD19 antibody: 115523, BioLegend, San Diego,

CA, U.S.A

12. Pacific blue-conjugated anti-mouse CD3 antibody: 100334, BioLegend, San Diego, CA, U.S.A
13. PE-conjugated anti-mouse Foxp3 antibody: 126404, BioLegend, San Diego, CA, U.S.A
14. PE-conjugated anti-mouse IL-17A antibody: 506904, BioLegend, San Diego, CA, U.S.A
15. PE-conjugated anti-mouse CD8 antibody: 100708, BioLegend, San Diego, CA, U.S.A
16. PE-conjugated anti-mouse β TCR antibody: 109207, BioLegend, San Diego, CA, U.S.A
17. PE-conjugated anti-mouse Ly6C antibody: 12-5932-82, eBioscience, San Diego, CA, U.S.A
18. PerCP-conjugated anti-mouse CD45 antibody: 103130, BioLegend, San Diego, CA, U.S.A
19. Rabbit anti-mouse CD3: ab16669, Abcam, Cambridge, UK.
20. Rabbit anti-mouse Ly6G: ab238132, Abcam, Cambridge, UK.
21. TruStain anti-mouse CD16/32 antibody: 101320, BioLegend, San Diego, CA, U.S.A

三、分析試劑組

1. RevertAid™ first-strand cDNA synthesis kit: K1622, Thermo Scientific, Waltham, MA, U.S.A
2. VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit, Peroxidase (Standard): PK-6100, vector laboratories, California, U.S.A

四、儀器設備

1. PH meter: Five Easy, METTLER TOLEDO, Columbus, U.S.A
2. 四位數微量天平: PA224C, OHAUS, Parsippany, NJ, U.S.A
3. 高壓滅菌釜: TOMIN Inc., New Taipei City, Taiwan (ROC)
4. 分光光度計: SpectroStar nano, BMG LABTECH, Offenburg, Germany
5. 聚合酶連鎖反應器、即時核酸定量系統: Rotor-Gene Q, QIAGEN, Hilden, Germany
6. 桌上型冷凍高速離心機: Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Scientific, Waltham, MA, U.S.A
7. 流式細胞儀: Attune™ NxT, ThermoFisher scientific, Waltham, MA, U.S.A
8. 超純水機: Direct-Q, Merck Millipore, Kenilworth, NJ, U.S.A
9. 精密 4 度冷藏櫃: CR-520, Chih Chin H&W Enterprise Co., Ltd., Taiwan.

10. -30 度低溫冷凍櫃: MDF-U5312, Panasonic, Osaka, Japan.
11. -80 度超低溫冷凍櫃: NV-94839C, NuAire, Plymouth, MN, USA.
12. 掃片機: Basler acA1920-40uc, BASLER, Ahrensburg, Germany.

五、統計分析軟體

1. GraphPad Prism 6 for Windows (GraphPad Software, USA)
2. ViewPoint Light (PreciPoint, Germany)



第二節、實驗動物

本實驗使用 5 週齡的 C57BL/6J 雄性小鼠作為實驗動物，購自國家實驗動物中心，飼養於國立台灣師範大學動物房之獨立通氣飼育籠 (individually ventilated cage)，可自由攝食飲水，並控制飼養環境於 12 小時光暗循環、溫度 19-22°C，以及濕度 40-60°C。取得國立臺灣師範大學實驗動物照護及使用委員會 (Institutional animal care and use committee, IACUC) 核准 (同意書編號：師大動實字第 110021 號)。

第三節、實驗設計

小鼠購入後進行 1 週適應期，期間給予一般正常飲食，而後隨機分成 3 組，為正常對照組 (NC 組, n=8)、乾癬對照組 (P 組, n=8) 以及乾癬介入組 (PG 組, n=8)。各組小鼠皆於 6 週齡時開始進行飼料介入 (實驗第 1 天)，分別給予 AIN-93G 飼料 (NC 組和 P 組) 以及含有 GLN 的 AIN-93G 飼料 (飼料中所含的 Casein 中 25% 由 GLN 取代)，模擬飲食補充 GLN 的影響。所有小鼠於實驗第 14 天剃除背部毛髮，乾癬組小鼠 (P 組、PG 組) 於實驗第 16 天起，連續 6 天在背部及右耳塗抹 Aldara 乳膏 (含 5% IMQ) 誘發乾癬樣皮膚炎，而 NC 組小鼠則塗抹 Vanicream 乳霜作為對照。Aldara 乳膏 (樂得美) 的主要成分包含 5% IMQ、異硬脂酸、鯨臘醇、硬酯酸醇、凡士林以及多山梨醇 60 等; Vanicream 之主要成分則包含白色凡士林、山梨糖醇以及鯨臘醇等。

由於舔食攝入 IMQ 會導致小鼠腸道免疫系統中的干擾素 (interferon, IFN) 增加，進而造成全身性的發炎反應加劇，影響實驗準確性。故在局部塗抹 IMQ 來誘導小鼠乾癬樣皮膚炎的動物模式上，有研究使用 Elizabethan collars 來避免小鼠舔咬背部 (Grine et al., 2016)。而本實驗選擇在每次進行藥膏塗抹前及剃除背部毛髮前進行小鼠的麻醉，以降低藥物在經由皮膚吸收前，遭小鼠舔咬而攝入消化系統的風險。

實驗期間每兩天記錄小鼠體重，並將後續所記錄的體重減去初始體重，再除以初始體重，得到小鼠體重變化百分比。飼料每隔 1-2 天更換並記錄飼料剩餘量，用以計算攝食量，並換算 PG 組小鼠的每日 GLN 攝入量。於實驗第 16、19、22 天進行背部、耳朵厚度測量並拍照紀錄作為 PASI 評分依據。所有小鼠於實驗第 22 天時以心臟採血方式犧牲，收集血液、脾臟、背部和耳朵的皮膚待後續分析，實驗分組情形及流程如圖 3-1 所示。

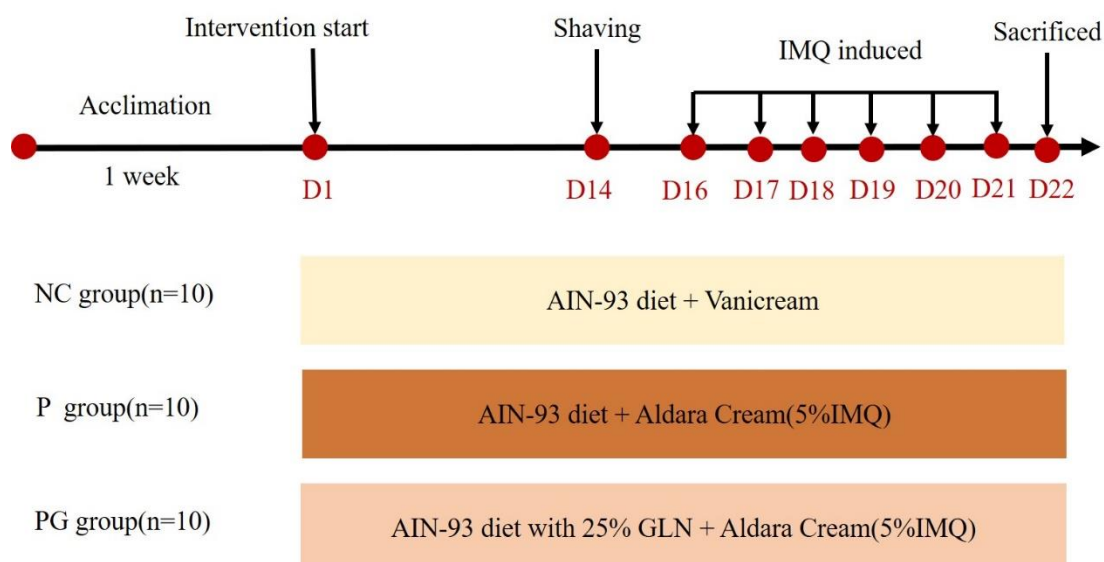


圖 3-1、實驗流程圖

Figure 3-1. Study flow chart

適應期結束後，於小鼠 6 週齡時進行飼料介入，飼料參考 American Institute of Nutrition-93G (AIN-93G) (Reeves et al., 1993) 而配製，飼料組成如表 3-1 所示。GLN 補充方法為將飼料的 Casein 總胺基酸氮含量 30% 以 GLN 取代，此含量 GLN 參考先前的研究並進行配方調整，在過去的研究發現 GLN 在多種發炎性疾病下具有免疫調節特性 (Hsiung et al., 2014; Su et al., 2017; Tsai, Liu, et al., 2012)，而本研究針對乾癬疾病進行 GLN 補充之初步探討，使用較高 GLN 比例之飼料作為介入方式。

於飼料介入後第 14 天，將小鼠麻醉之後，先使用電動剃毛刀除去小鼠背部毛髮，再使用除毛膏及刀片刮除背部剩餘細毛，最後使用清水擦洗背部，以去除殘留的除毛膏。待其皮膚修復一天後，自第 16 天起，連續 6 天誘發乾癬模式 (Hawkes et al., 2017)，使用標記筆於背部標記出 2*2.5 的面積範圍，分別對 P 組、PG 組小鼠的背部皮膚（標記範圍內）以及右耳（內外側）塗抹 Aldara 乳膏，塗抹劑量分別為背部皮膚 62.5 mg 和右耳 12.5 mg (Sakai et al., 2016)，而 NC 組則在背部及右耳塗抹等量的 Vanicream 乳霜作為對照 (Singh et al., 2019)。

表 3-1、實驗飼料組成成分

Table 3-1. Composition of the experimental diets (g/kg)

Ingredient (g/kg diet)	NC	P	PG
Corn starch	529.5	529.5	529.5
Sucrose	100	100	100
Casein	200	200	150
Glutamine	0	0	50
Soybean oil	70	70	70
Fiber	50	50	50
Mineral mixture (AIN-93G-MX)	35	35	35
Vitamin mixture (AIN-93-VX)	10	10	10
L-cystine	3	3	3
Choline	2.5	2.5	2.5
Tert-butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014

NC, normal control group; P, psoriasis control group; PG, psoriasis group with glutamine.

表 3-2、檢體分析項目與方法

Table 3-2. Sample analysis

檢體	分析項目		分析方法
全血	先天性免疫細胞	1. 嗜中性白血球 (CD45 ⁺ CD11b ⁺ Ly6G ⁺) 2. 促發炎 Mo (CD45 ⁺ CD11b ⁺ Ly6c ⁺ CCR2 ⁺) 3. 抗發炎 Mo (CD45 ⁺ CD11b ⁺ Ly6c ⁻ CX3CR1 ⁻)	流式細胞儀
	淋巴球	1. B 細胞 (CD45 ⁺ CD19 ⁺) 2. Th 細胞 (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺) 3. Tc 細胞 (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺)	
	Treg	Treg (CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺)	
	Th17	Th17 (CD4 ⁺ IL-17A ⁺)	
背部皮膚	先天性免疫細胞	1. 嗜中性白血球 (CD45 ⁺ Ly6G ⁺) 2. $\gamma\delta$ T 細胞 (CD45 ⁺ CD3 ⁺ $\gamma\delta$ TCR ⁺ β TCR ⁻) 3. $\alpha\beta$ T 細胞 (CD45 ⁺ CD3 ⁺ $\gamma\delta$ TCR ⁻ β TCR ⁺)	流式細胞儀
	促發炎相關基因 mRNA 表達	IL-17A、IL-23、TLR7、CXCL1、TNF- α	qPCR
	皮膚角質層	組織病理切片	H&E 染色
	組織損傷	Baker's score	
脾臟	T 細胞相關基因 mRNA 表達	IL-17A、ROR- γ t	qPCR

第四節、採集組織檢體

一、血液

犧牲當天使用乙醚 (diethyl ether) 將老鼠迷昏後，使用潤過 heparin 的 1 mL 無菌針筒進行心臟採血，使用 4ml 含有 heparin 的綠頭真空採血管收集血液，輕搖採血管使血液與管壁接觸，待血液與管壁均勻接觸後暫存於冰上。而後取出適量全血進行流式細胞儀分析使用，將剩餘的全血進行離心 (3000xg, 10min, 4°C) 後，取上清液的血漿分裝在 Eppendorf，存放於- 80°C待後續分析。

二、器官組織

(一) 背部皮膚

沿著背部標記剪下經過 Aldara 或 Vanicream 處理過的皮膚 (2*2.5cm)，平分為兩塊，將右側的皮膚組織放入 eppendorf 中存放於-80°C留待後續分析使用。左側中段的皮膚組織 (1*1 cm) 放入含有 4% formaldehyde 溶液配方 (1X phosphate-buffered saline, PBS 加入 4% paraformaldehyde (w/v)，並調整溶液 pH 值至 7.2-7.4 間) 的組織切片盒中存放於 4°C，待後續進行包埋切片使用。

左側上及下的皮膚組織則用於流式細胞儀分析使用，將左側上下兩塊之皮膚組織浸泡於 Hanks' Balanced Salt solution (HBSS) 緩衝液中防止乾燥，接著用剪刀將皮膚剪碎置於 50 mL 離心管，加入 3 mL digestion solution (RPMI 1640 medium 加入 0.025 mg/mL Deoxyribonuclease I 和 0.25 mg/mL Liberase) 於 37°C 水浴槽消化約 70 分鐘，消化期間每 10 分鐘將離心管拿起搖晃，使組織均勻消化，待組織呈現邊緣不規則且稍微浮起，再加入 1 mL stop solution (RPMI 1640 medium 加入 5% fetal bovine serum 以及 5 mM EDTA)，輕輕 pipetting 10-15 下後將皮膚溶液暫置冰上。接著將皮膚溶液透過 70 μ m 的細胞篩網進行過濾，利用 5 mL RPMI 1640 細胞培養液 (含 5 % fetal bovine serum) 和無菌 3 mL 針筒塞子將組織輕輕研磨至新的離心管中，以分離出皮膚細胞。接著將離心管進行離心 (500 xg 10 分鐘) 後去除上清液，以 0.25 mL staining buffer (1X PBS 加入 0.5% bovine serum albumin 以及 0.09% NaN₃) 重新懸浮細胞，待後續流式細胞儀之分析。

(二) 耳朵皮膚

取下誘發乾癬的右耳，修剪去多餘毛髮，存放於-80°C留待後續分析使用。

(三) 脾臟

取出後修剪附著的脂肪組織，將脾臟置於方格墊板上，拍照記錄外觀大小，並秤重紀錄，放入 eppendorf 後存放於-80°C 留待後續分析使用。

第五節、分析項目與方法

本次實驗分析之檢體、項目與方法分別整理於表 3-2，各項詳細操作流程如下所述。

一、血液

(一) 白血球及淋巴球組成

每隻實驗動物各取出 100 μ L 全血於流式細胞儀專用試管 (5 mL Polystyrene Round-Bottom Tube) 中，加入外染抗體 (詳見表 3-3) 避光置於 4°C 反應 30 分鐘，以標定細胞膜表面蛋白。接著加入 3 mL RBC lysis buffer 震盪 8 秒，避光置於室溫下 12 分鐘使紅血球破裂，再於 1500 rpm 4°C 下離心 5 分鐘，去除上清液。以 2 mL staining buffer 重新懸浮細胞後，於 1500 rpm 4°C 下離心 5 分鐘並去除上清液，此清洗步驟重複 2 次。最後再以 0.4 mL staining buffer 重新懸浮細胞，即可使用流式細胞儀分析血液中的免疫細胞比例。

使用流式細胞儀中前向角散射光 (Forward scatter, FSC) 來分析血液細胞的顆粒大小，及使用側向角散射光 (Side scatter, SSC) 分析細胞的顆粒複雜度，藉此圈選出血液中白血球次群。再從 CD45 標記的白血球次群中依據不同的細胞標記表現高低，圈選出各種先天性免疫細胞，如圈選出具有嗜中性白血球標記 ($CD45^+ Ly6C^+ Ly6G^+$) 的細胞群、促發炎 Mo ($CD45^+ CD11b^+ Ly6c^+ CCR2^+$) 的細胞群及抗發炎 Mo ($CD45^+ CD11b^+ Ly6c^- CXC3R1^+$) 的細胞群，如圖 3-2 之方法進行圈選 (gating)，以得知在白血球當中嗜中性白血球、促發炎 Mo 及抗發炎 Mo 的細胞比例。

使用同樣的方式，另外測定血液中淋巴細胞的分佈比例，如白血球中 T 細胞 ($CD45^+ CD3^+$) 及 B 細胞 ($CD45^+ CD19^+$) 之表現比例，再從 T 細胞中圈選 Th 細胞 ($CD45^+ CD3^+ CD4^+$) 及 Tc 細胞 ($CD45^+ CD3^+ CD8^+$)，以得知 T 細胞中 Th 細胞及 Tc 細胞之細胞比例，如圖 3-3 之方法進行圈選。

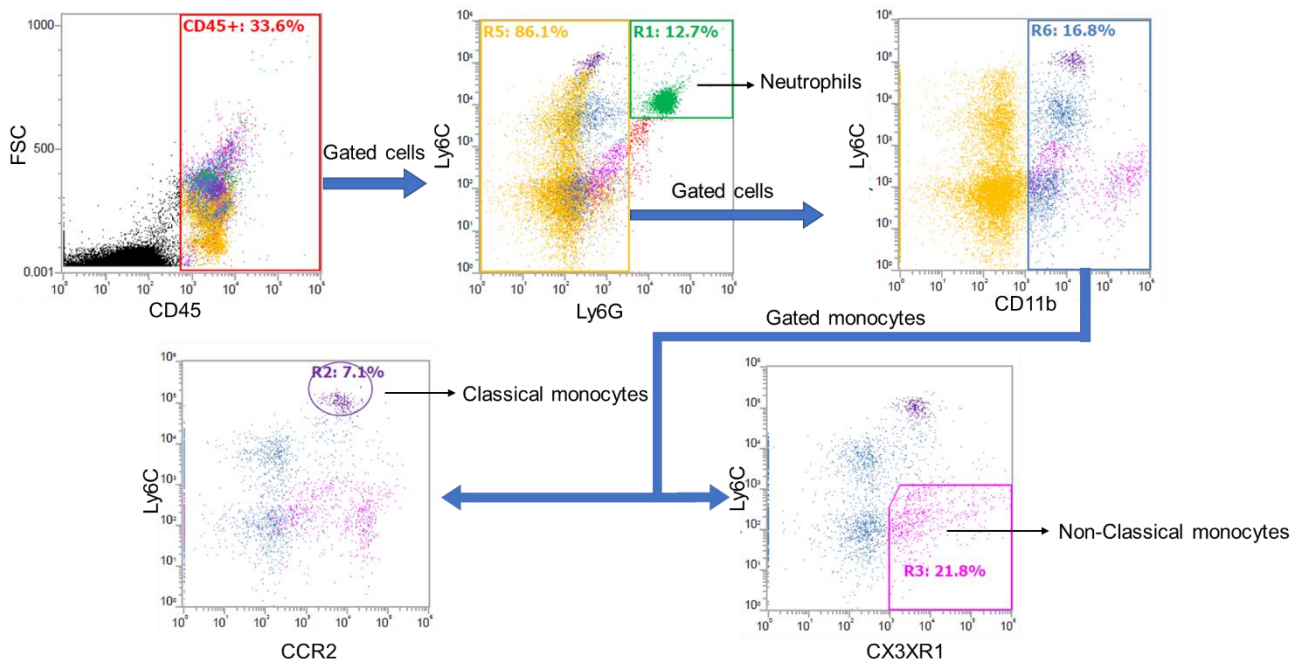


圖 3-2、血液中圈選先天性免疫細胞流程圖 (流式細胞儀)

Figure 3-2. Gating strategy used in flow cytometry analysis to detect innate immune cells in the blood.

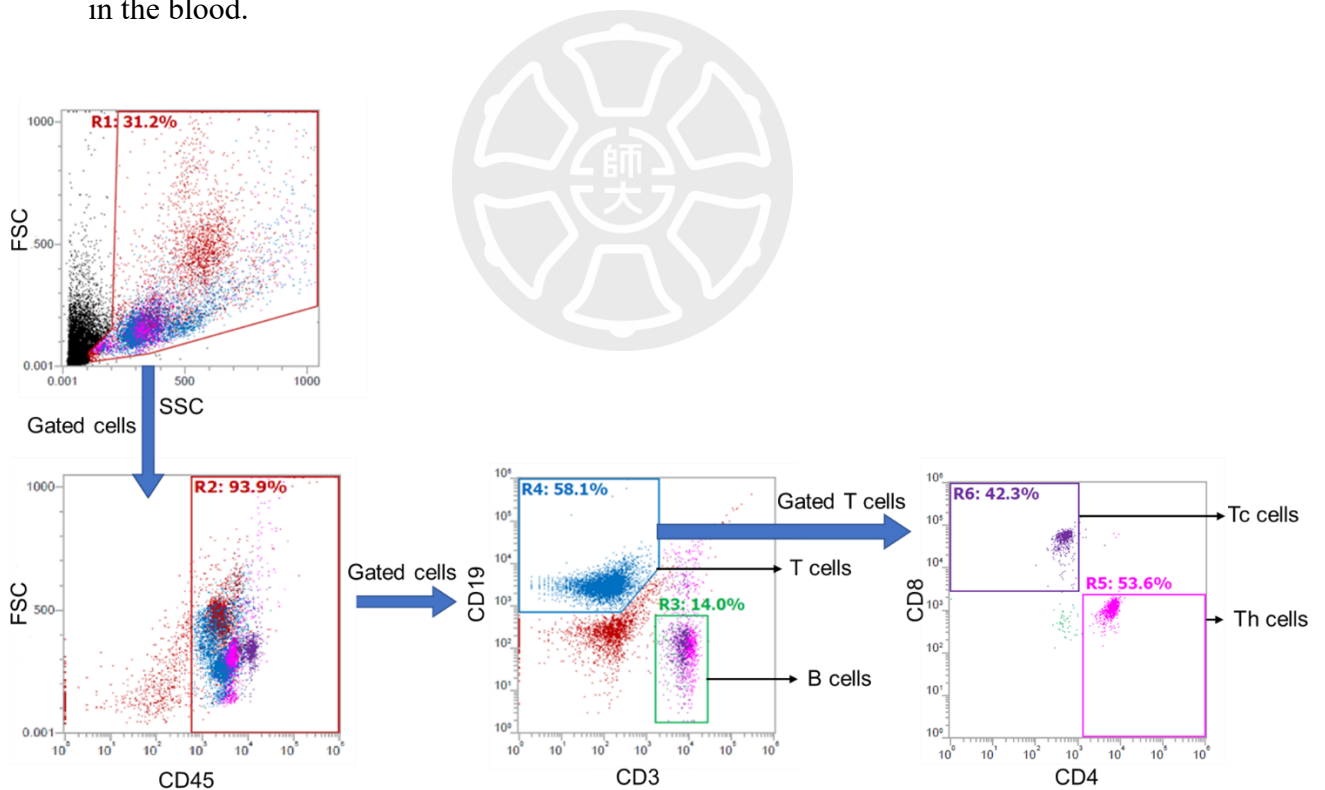


圖 3-3、血液中圈選適應性免疫細胞流程圖 (流式細胞儀)

Figure 3-3. Gating strategy used in flow cytometry analysis to detect adaptive immune cells in the blood. WBC, white blood cells; Tc, cytotoxic T cell; Th, helper T cell.

(二) Treg 細胞之表現比例

每隻實驗動物各取出 100 μ L 全血於流式細胞儀專用試管中，加入外染抗體（詳見表 3-3）避光置於 4°C 反應 30 分鐘，以標定細胞膜表面蛋白。接著加入 3 mL RBC lysis buffer 震盪 8 秒，避光置於室溫下 12 分鐘使紅血球破裂，於 1500 rpm 4°C 下離心 5 分鐘，去除上清液。以 2 mL staining buffer 重新懸浮細胞後於 1500 rpm 4°C 下離心 5 分鐘並去除上清液，此清洗步驟重複 2 次。接著加入 1 mL 1X Foxp3 Fix/Perm buffer (V:V = 1:3)，避光置於室溫 50 分鐘，以固定細胞膜結構。加入 3 mL permeabilization buffer，離心 1500 rpm 4°C 5 分鐘並去除上清液，此步驟重複 2 次使細胞膜穿孔。取 5 μ L PE-conjugated anti-mouse Foxp3 抗體加入試管中，避光置於室溫 40 分鐘，以標定 Treg 細胞核內代表性之轉錄因子。加入 3 mL staining buffer 於 1500 rpm 下離心 5 分鐘並去除上清液，最後再以 0.5 mL staining buffer 重新懸浮細胞，即可以流式細胞儀分析血液中 Treg 細胞比例。

使用流式細胞儀中前向角散射光來分析血液細胞的顆粒大小，及使用側向角散射光分析細胞的顆粒複雜度。再從 CD4⁺ 的細胞中選出具有 CD25⁺Foxp3⁺ 的細胞群，即為 Treg 細胞。如圖 3-4 之方法進行圈選，以得知血液中 Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) 細胞之表現比例。

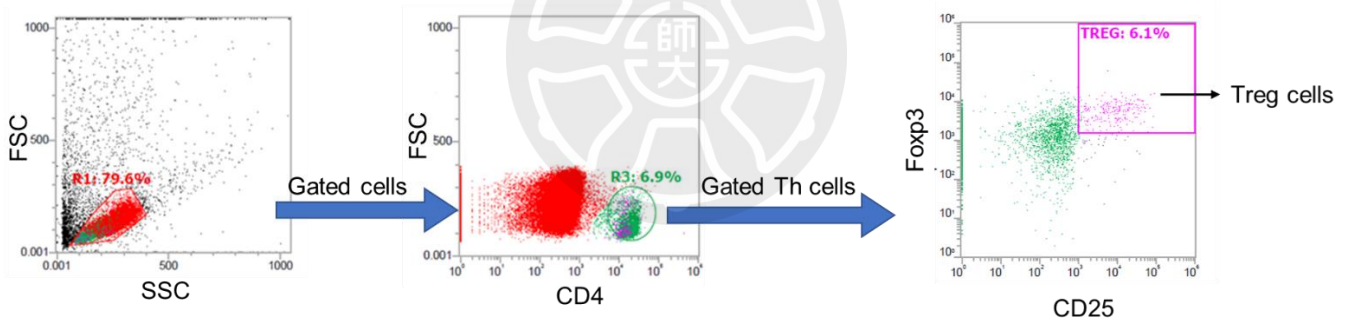


圖 3-4、血液中圈選 Treg 細胞流程圖（流式細胞儀）

Figure 3-4. Gating strategy used in flow cytometry analysis to detect Treg cells in the blood. Treg, regulatory T cell.

(三) Th17 細胞之表現比例

每隻實驗動物各取出 100 μ L 全血於流式細胞儀專用試管中，將外染抗體 (詳見表 3-3) 加入試管中，於 4°C 避光反應 30 分鐘，以標定細胞膜表面蛋白。接著加入 3 mL RBC lysis buffer 震盪，避光置於室溫下 12 分鐘使紅血球破裂，於 1500 rpm 4°C 下離心 5 分鐘，去除上清液。以 2 mL staining buffer 重新懸浮細胞後於 1500 rpm 4°C 下離心 5 分鐘並去除上清液，此清洗步驟重複 2 次。接著加入 100 μ L IC fixation buffer，避光置於室溫 20 分鐘，以固定細胞膜結構。加入 3 mL permeabilization buffer，以 1500 rpm 4°C 下離心 5 分鐘並去除上清液，此步驟重複 2 次使細胞膜穿孔。取 1 μ L PE-conjugated anti-mouse IL-17A 抗體加入試管中，避光置於室溫 20 分鐘，以標定 Th17 細胞內代表性之細胞激素。加入 3 mL staining buffer 於 1500 rpm 4°C 下離心 5 分鐘並去除上清液，最後再以 0.5 mL staining buffer 重新懸浮細胞即可以流式細胞儀分析血液中 Th17 細胞之表現率。

使用流式細胞儀中前向角散射光分析血液細胞的顆粒大小，及使用側向角散射光析細胞的顆粒複雜度。再從 CD4⁺ 的細胞中選出具有 IL-17A⁺ 的細胞群，即為 Th17 細胞。如圖 3-5 之方法進行圈選，以得知血液中 Th17 (CD4⁺IL-17A⁺) 細胞之表現比例。

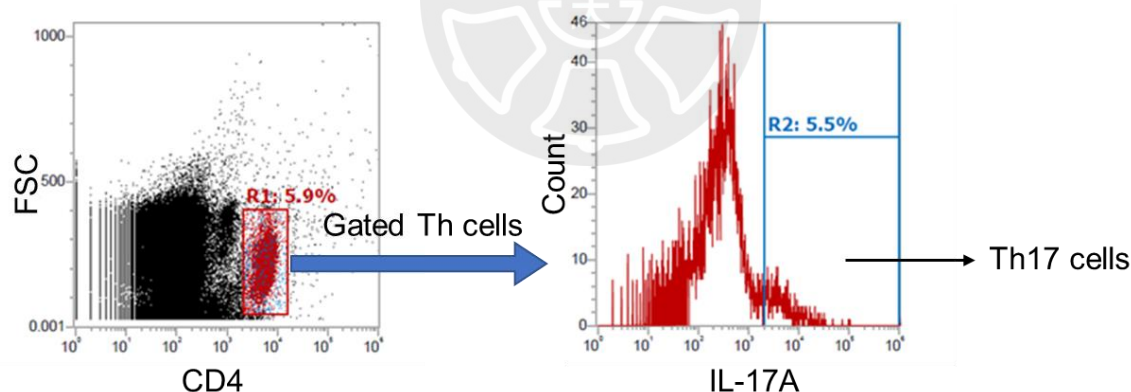


圖 3-5、血液中圈選 Th17 細胞流程圖 (流式細胞儀)

Figure 3-5. Gating strategy used in flow cytometry analysis to detect Th17 cells in the blood. Th17, T helper 17 cell.

二、背部皮膚

(一) 背部皮膚 PASI 評分

本研究利用 PASI 評分作為小鼠的乾癬嚴重度指標，PASI 包含三個項目，分別為皮膚發紅、脫屑及厚度增加。此三項指標因子依據所觀察到的嚴重程度，分數由低至高為 0 (none)、1 (slight)、2 (moderate)、3 (marked)、4 (very marked)，如圖 3-6 所示，三項評分加總後為最終 PASI 分數，最高分為 12 分 (Van Der Fits et al., 2009)。在實驗第 16、19 和 22 天時，小鼠麻醉狀態下以電子游標卡尺進行背部以及耳朵皮膚的厚度量測，並拍照觀察皮膚發紅及脫屑狀況，以利進行 PASI 評分，其中背部皮膚的厚度量測方式為輕捏起背部皮膚的左右兩側，以利測量中心點。以上實驗的操作以及後續的評分皆由同一人執行，且皮膚厚度僅以背部皮膚的厚度變化為評分依據。

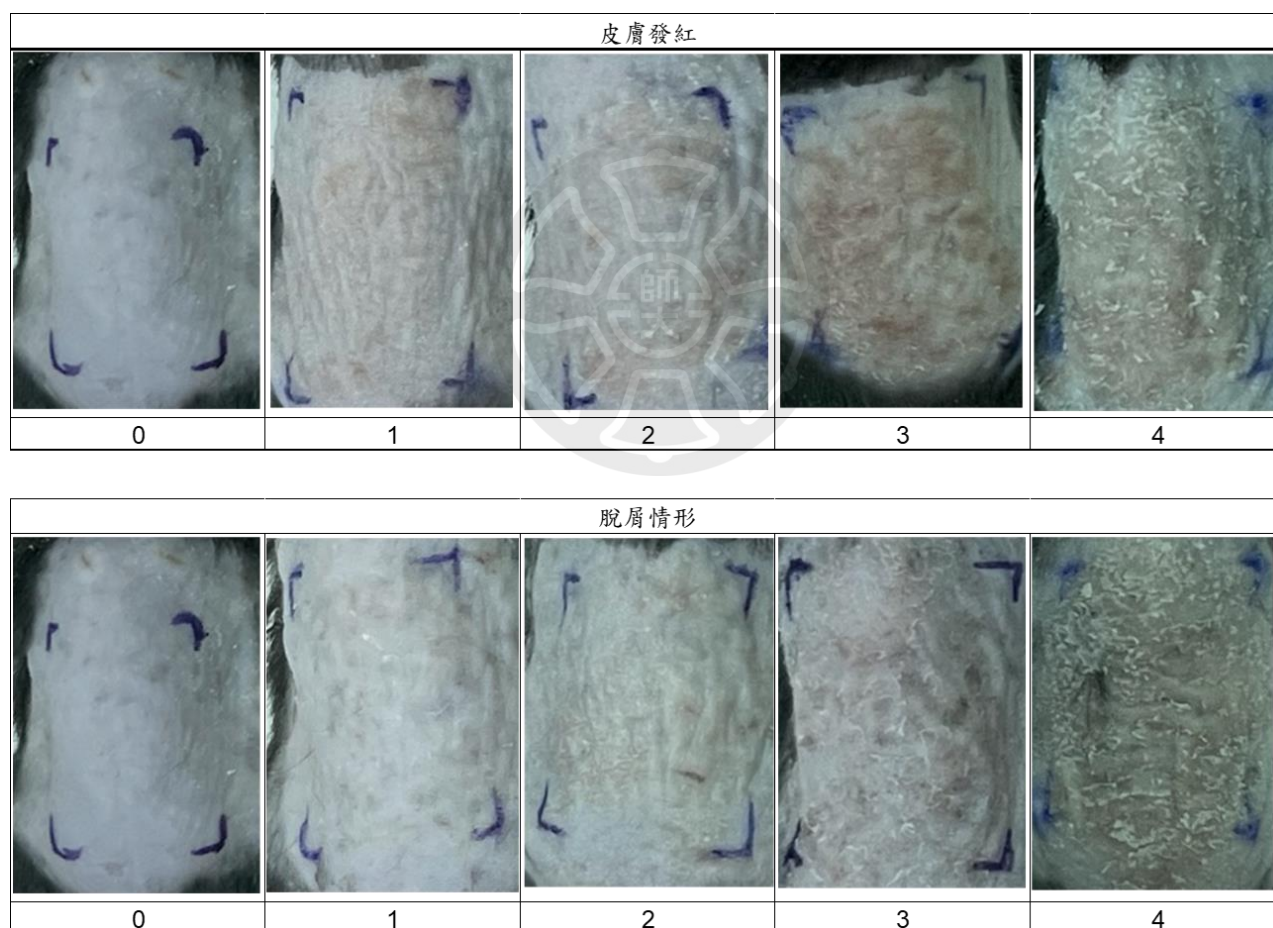


圖 3-6、背部皮膚發紅與脫屑之得分

Figure 3-6. The score of erythema and scales in the back skin.

(二) 先天性免疫細胞與相關 T 細胞分布比例

將製備好的皮膚細胞懸浮液加入流式細胞儀專用試管中，加入 2 μL anti-mouse CD16/32 抗體於冰上靜置 5-10 分鐘，之後將其餘抗體（詳見表 3-3）加入試管，即可以流式細胞儀分析背部皮膚中之先天性免疫細胞與相關 T 細胞表現比例的高低。如嗜中性白血球、Mo、T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、 $\alpha\beta$ T 細胞之表現比率。

使用流式細胞儀中前向角散射光來分析皮膚細胞的顆粒大小，及使用側向角散射光分析細胞的顆粒複雜度，藉此圈選出皮膚中白血球次群。再從 CD45 標記的白血球次群中依據不同的細胞標記表現高低，圈選出各種先天性免疫細胞。如圈出 CD11b⁺ 的細胞，再從中選出 Ly6G⁺ 的細胞，即具有嗜中性白血球標記 (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺) 的細胞群，及從 CD45 標記的白血球次群中圈出 Ly6c⁺ 的 Mo (CD45⁺ Ly6c⁺) 細胞群，如圖 3-6 之方法進行圈選，以得知在皮膚的白血球當中嗜中性白血球及 Mo 的細胞比例。

使用同樣的方式，另外測定背部皮膚中淋巴細胞的分佈比例，如白血球中 T 細胞 (CD45⁺CD3⁺) 之表現比例，再從 T 細胞中圈選 $\gamma\delta$ T 細胞 (CD45⁺CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺TCR⁻) 及 $\alpha\beta$ T 細胞 (CD45⁺CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁻TCR⁺)，以得知 T 細胞中 $\gamma\delta$ T 細胞及 $\alpha\beta$ T 細胞之細胞比例，如圖 3-7 之方法進行圈選。

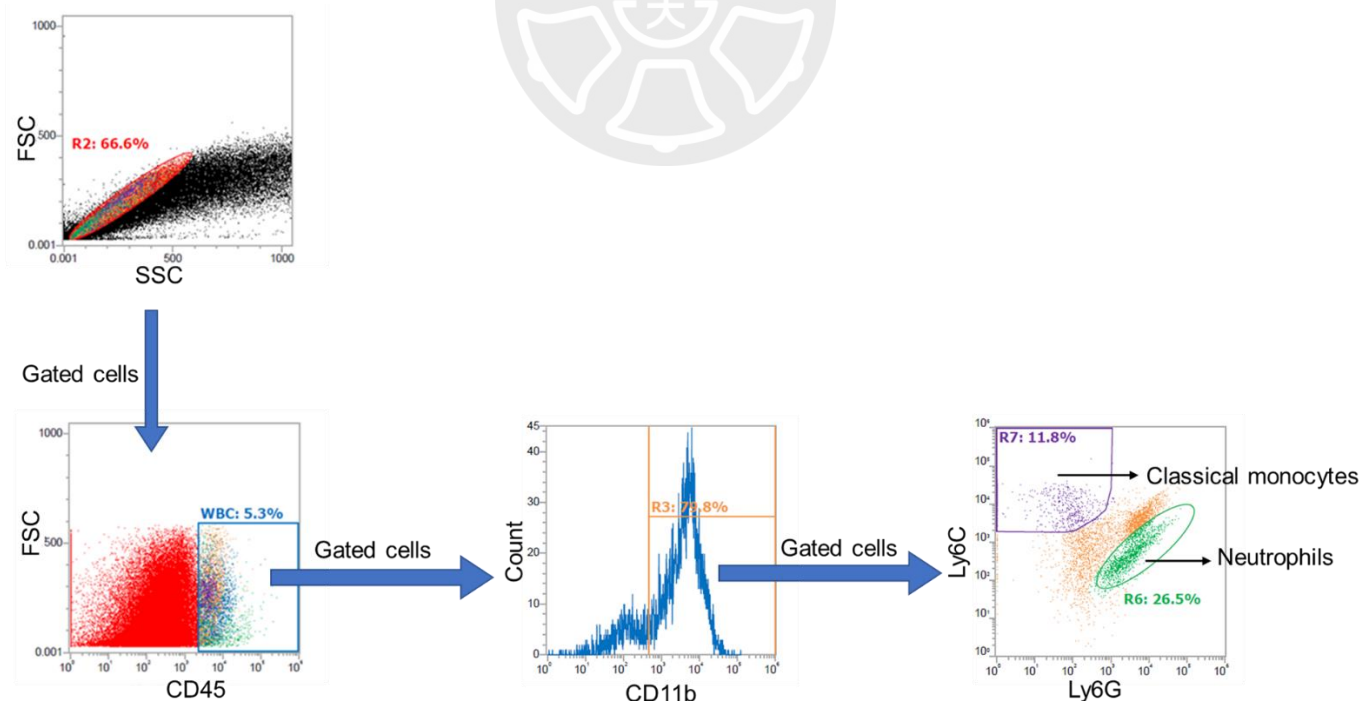


圖 3-6、背部皮膚中圈選先天性免疫細胞流程圖（流式細胞儀）

Figure 3-6. Gating strategy used in flow cytometry analysis to detect innate immune cells in the back skin.

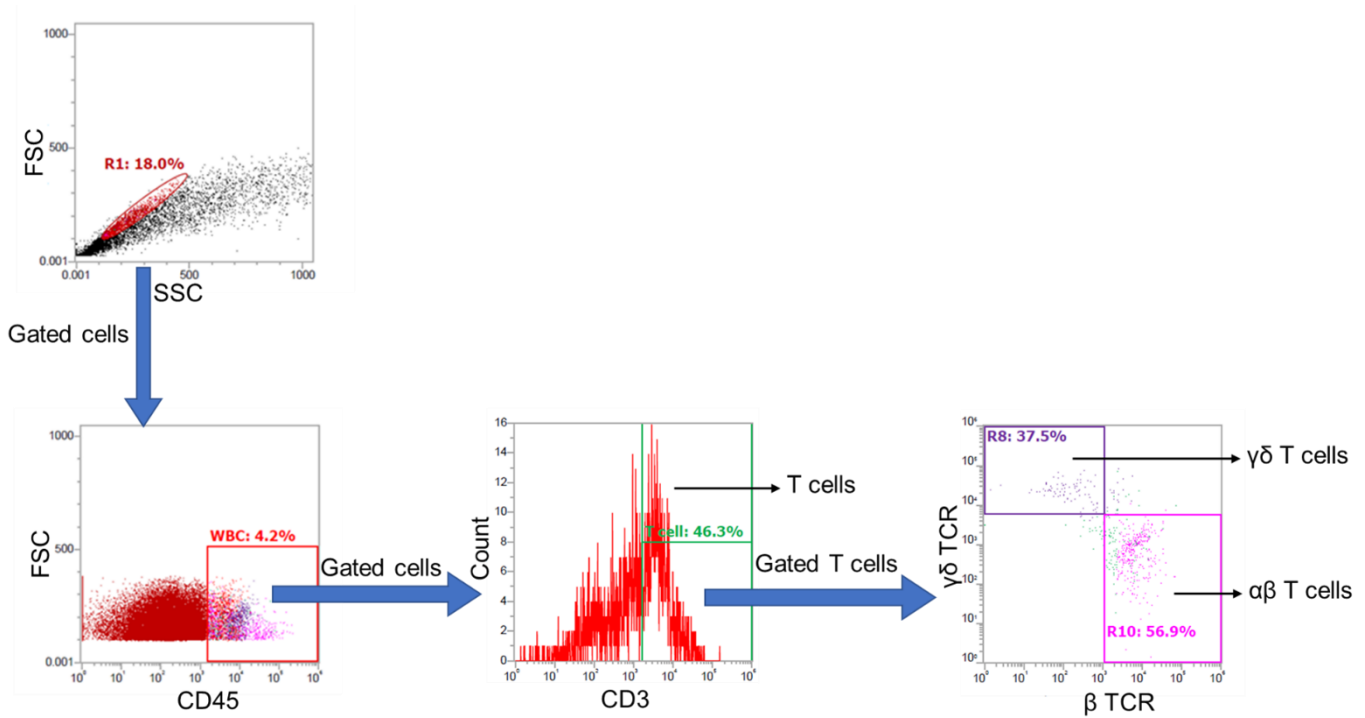


圖 3-7、背部皮膚中圈選 T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞及 $\alpha\beta$ T 細胞流程圖 (流式細胞儀)

Figure 3-7. Gating strategy used in flow cytometry analysis to detect T cells, $\gamma\delta$ T cells, and $\alpha\beta$ T cells in the back skin.

(三) 背部皮膚組織切片分析

組織切片的 H&E 染色委託國立台灣大學實驗動物中心進行，將泡在 4% formaldehyde 的背部皮膚取出以石蠟包埋後，用切片機切成厚度 3-5 μ m 的組織薄片，平貼在載玻片上。接著將玻片浸入二甲苯 (xylene) 30 分鐘，拿起後重複一次，泡入 100% ethanol 10 分鐘，並重複一次，接著泡入 90% ethanol 5 分鐘、70% ethanol 1 分鐘、50% ethanol 1 分鐘、30% ethanol 1 分鐘與 PBS 5 分鐘後，將 200 μ L hematoxylin 滴在組織上 3 分鐘，以流水洗去多餘染劑。將玻片浸泡在 PBS 中 5 分鐘，取出玻片並滴上 400 μ L eosin 等 30 秒，再以流水洗去多餘染料，並浸泡 PBS 5 分鐘。隨後浸入 100% ethanol 2 分鐘重複兩次與 xylene 10 分鐘，同樣重複兩次，使組織脫水，接著蓋上玻片即可透過顯微鏡觀察組織情況，最後使用掃片機對組織切片進行掃描與儲存數位影像。

(四) 背部皮膚組織損傷評分

皮膚組織切片方面，為降低主觀判斷所產生的誤差，在完成影像儲存後，將組

組織的影像進行亂數排列並重新編號。損傷評分的部分由三個人將重新編號的組織影像依據貝式評分系統 (Backer's scores) (Baker et al., 1992) (如表 3-4) 進行乾癬損傷評分。評分項目分別有：角質層的孟洛微膿瘍 (2 分)、角化過度 (Hyperkeratosis) (0.5 分) 和角化不全 (Parakeratosis) (1 分) 現象；表皮層中表皮層增厚 (Thinning above papillae) (0.5 分)、網狀嵴的增長 (Lengthening of rete ridges) 和聚集 (Clubbing of rete ridges)(共 1.5 分)、黑棘皮症 (Acanthosis)(0.5 分) 和顆粒層缺乏情形 (Lack of granular layer)(1 分)；真皮層中的淋巴球浸潤程度 (低 0.5/中 1/高 2 分) 和乳突腫大 (Papillary congestion) (0.5 分)，將各項目評分加總即為皮膚損傷分數，最高為 9.5 分，分數越高代表組織損傷越嚴重。而後將三人所評的分數取平均值，得到最終的皮膚損傷評分。

表皮層厚度的部分，使用 View Point Light 軟體替重新編號的組織影像進行表皮層厚度評估。在 200x 放大倍率下，將重新編號的皮膚組織分為 7 段 (圖 3-8A)，每段取 3 個部位，利用 line annotatione 工具進行表皮層厚度測量，將總共 21 個表皮層厚度結果取平均，得到最終的表皮層厚度結果。

表皮層佔皮膚面積比例上，則使用 View Point Light 軟體中的 polygon annotaion 工具將分段的皮膚進行表皮層及皮膚整體 (自角質層至肌肉層) 各自範圍的圈選，將表皮層面積除上皮膚的面積得到表皮層面積比例，將組織分段各自計算後，取平均得到最終的面積比例 (圖 3-8)。

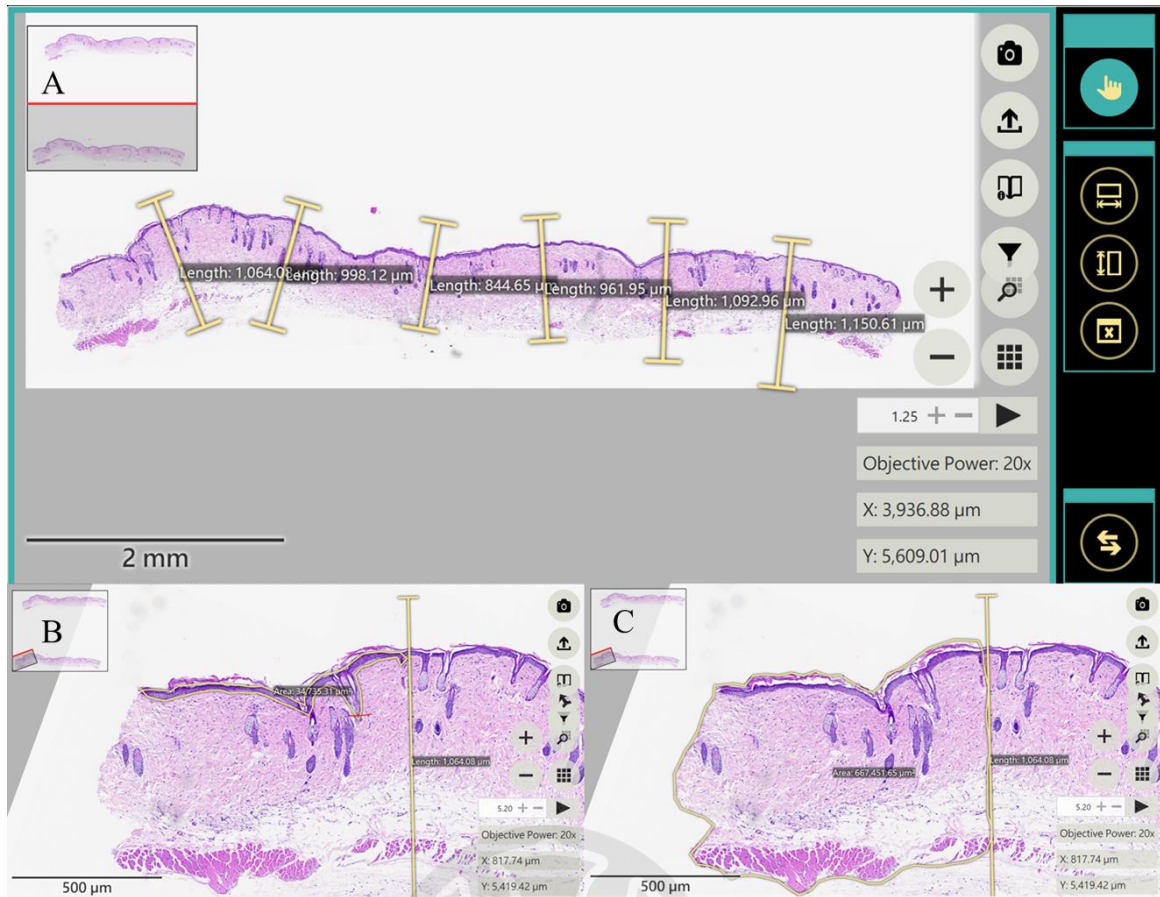


圖 3-8、表皮層占皮膚層面積計算流程

Figure 3-8. process of counting epidermis in skin ratio. (A) The skin tissue is divide into seven pieces. (B) Analysis of the epidermal area using a polygon annotation tool. (C) Analysis of the skin area using a polygon annotation tool.

(四) 背部皮膚組織之發炎相關因子 mRNA 表現量

取背部皮膚 40 mg 放入 1.5 mL eppendorf 中，先用剪刀剪碎皮膚組織再加入 1 mL TRIzol 以手持均質機均質化，於室溫靜置 3 分鐘。加入 0.2 mL 氯仿上下搖晃 15 秒，靜置 3 分鐘後離心 15 分鐘 (4°C 12000 xg)，取出 500 μ L 上清液至新 eppendorf 中。加入 0.5 mL 2-propanol 上下搖晃 10 秒後靜置 12 分鐘，以利於 RNA 析出，接著離心 10 分鐘 (4°C 12000 xg) 並去除上清液，加入 1 mL 75% ethanol 後於 4°C 下以 7500 xg 離心 5 分鐘，吸除上清液得到 total RNA。將 eppendorf 上蓋打開放進抽真空機以加速 RNA 中酒精揮發速度，抽乾至沉澱物呈現透明狀即可加入約 30 μ L 經 DEPC 處理過的二次水，於室溫下使 total RNA 完全溶解。將 RNA 原液稀釋 50-100 倍後以分光光度計分析萃取出 RNA 品質 (檢液吸光值比例 260/280 nm 大於 1.7) 及 RNA 濃度後，即可由每隻實驗動物之原液取出 4 μ g RNA 於新的 eppendorf 中，加入 1 μ L Oligo (dT) 後補水至 11 μ L，再加入 4 μ L reaction buffer、1 μ L RiboLock RNase Inhibitor、2 μ L dNTP 以及 1 μ L RevertAid M-MuLV RT，使最終總體積為 20 μ L，最後放入聚合酶連鎖反應器，將 RNA 反轉錄為 cDNA (complementary DNA)，並放置於 -20°C 冷凍保存。

以螢光染劑 SYBR Green I 和 qPCR 系統測定待測基因之 mRNA 表現，以 β -actin 作 housekeeping gene。由 NCBI GeneBank database 找出特定基因序列並設計引子，向明欣生物科技有限公司訂購，各基因之引子序列如表 3-5 所示。測定時取 5 μ L 之 cDNA (檢測 IL-17A、IL-23、CXCL1、 β -actin 時 cDNA 濃度為 20 ng/ μ L 而 TNF- α 、TLR7 及搭配的 β -actin 時 cDNA 濃度為 80 ng/ μ L) 以及 12.5 μ L 的 2X SYBR Master Mix 加至 strip tubes 中，再分別加入目標基因的前置和反置引子 5 μ M 各 0.5 μ L 後，補水至總體積為 25 μ L，並蓋上 Strip caps，即可以至 Rotor-Gene Q qPCR 系統進行皮膚中 IL-17A、IL-23、CXCL1、TNF- α 、TLR7 及 β -actin 之基因表現量分析。qPCR 反應條件如下：50°C 10 分鐘 (1 個循環)、95°C 10 分鐘 (1 個循環)、95°C 15 秒與 60°C 1 分鐘 (40 個循環)。最後使用 melting peak 進行引子專一性確認，使用 β -actin 做為 internal control，以 ΔC_t 計算各基因之表現量，並以 NC 組進行校正，數值以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。

(五) 背部皮膚免疫組織化學染色法

取皮膚組織切片浸入 xylene 10 分鐘 2 次、100% ethanol 10 分鐘 2 次、95% ethanol 3 分鐘、85% ethanol 3 分鐘、75% ethanol 3 分鐘、去離子水 5 分鐘，以進行脫蠟及組織復水程序。將組織切片放置於潮濕培養箱中，浸泡於 trypsin 中放置 37°C 一個小時，以進行抗原修復。而後加入以 methanol 配置之 3% H₂O₂ 靜置 30 分鐘，去除組織中的過氧化酶，再以 PBS 浸泡 5 分鐘清洗三次。使用防水筆圈選組織位置，將切片放置於潮濕培養箱中，在圈選處滴入 Blocking buffer (10% FBS) 反應一小時，倒除 Blocking buffer 再以 PBS 浸泡 5 分鐘清洗三次。加入 PBS 稀釋 (1:150) 的一級抗體 (rabbit anti-mouse CD3) 或 rabbit anti-mouse Ly6G (1:100) 遮光放置 4°C 過夜。隔天將多餘的抗體回收，以 PBS 浸泡 5 分鐘清洗五次，加入經 PBS 稀釋 (1:400) 的二級抗體 (Goat Anti-Rabbit IgG) 遮光放置室溫反應一小時，再次以 PBS 浸泡 5 分鐘清洗五次。重新使用防水筆圈選組織所在的位置，並滴上均勻混合靜置 30 分鐘的 ABC solution (avidin : biotin : PBS = 1 : 1 : 98) 於室溫靜置作用 30 分鐘，以 PBS 浸泡 5 分鐘清洗五次。帶組織表面乾燥後，最終加入 DAB 試劑進行呈色反應 20 秒鐘，泡入去離子水中終止反應。將組織浸入 hematoxylin 染劑中 2 秒進行複染，以流水沖洗 5 分鐘去除多餘染劑，接著泡入 75% ethanol 三下、85% ethanol 三下、95% ethanol 三下、100% ethanol 三下、重複 100% ethanol 三下，並在 100% ethanol 中浸泡 10 分鐘，最後將切片泡入 xylene 10 分鐘 2 次，以脫除水分。將玻片放置濾紙上方，塗抹封片膠，蓋上蓋玻片，以棉花棒壓出氣泡，室溫下放置過夜即可用顯微鏡以 40、100 及 200 的倍率觀察皮膚組織，並使用掃片機對組織切片進行掃描與儲存數位影像。

三、脾臟

(一) 脾臟組織之 T 細胞相關 mRNA 表現量

每隻實驗動物各取出 1/3 的脾臟放入 1.5 mL eppendorf 中，先用剪刀剪碎組織，再加入 1 mL TRIzol 以手持均質機均質化，於室溫靜置 3 分鐘。加入 0.2 mL 氯仿上下搖晃 15 秒，靜置 3 分鐘後離心 15 分鐘 (4°C 12000 xg)，取出 500 µL 上清液至新 eppendorf 中。加入 0.5 mL 2-propanol 後上下搖晃 10 秒，靜置冰上 12 分鐘，以利於 RNA 析出。接著離心 10 分鐘 (4°C 12000 xg) 並去除上清液，加入 1 mL

75% ethanol 後於 4°C 下以 7500 xg 離心 5 分鐘，除去上清液後加入 1 mL 75% ethanol 重複離心一次 (4°C 下 7500 xg 5 分鐘)，吸除上清液即得到 total RNA。將 eppendorf 上蓋打開放進抽真空機 10 分鐘，以加速 RNA 中酒精揮發速度，抽乾至沉澱物呈現透明狀即可加入約 30 μ L 經 DEPC 處理過的二次水，於室溫下使 total RNA 完全溶解。將 RNA 原液稀釋 40-100 倍後以分光光度計分析萃取出 RNA 品質 (檢液吸光值比例 260/280 nm 大於 1.7) 及 RNA 濃度後，即可由每隻實驗動物之 RNA 原液取出 4 μ g RNA 於新的 eppendorf 中，加入 1 μ L Oligo (dT) 後加水至總體積為 11 μ L，再加入 4 μ L reaction buffer、1 μ L RiboLock RNase Inhibitor、2 μ L dNTP 以及 1 μ L RevertAid M-MuLV RT，使最終總體積為 20 μ L，最後放入聚合酶連鎖反應器，將 RNA 反轉錄為 Cdna (complementary DNA)，並放置於 -20°C 冷凍保存。

以螢光染劑 SYBR Green I 和 qPCR 系統測定待測基因，以 β -actin 作 housekeeping gene。由 NCBI GeneBank database 找出特定基因序列並設計引子，向明欣生物科技有限公司訂購，各基因之引子序列如表 3-5 所示。測定時取 5 μ L 之 Cdna (20 ng/ μ L) 以及 12.5 μ L 的 2X SYBR Master Mix 加至 strip tubes 中，再分別加入目標基因的前置和反置引子 5 μ M 各 0.5 μ L 後，補水至總體積為 25 μ L，並蓋上 Strip caps，即可以至 Rotor-Gene Q qPCR 系統進脾臟中 IL-17A、ROR- γ t 及 β -actin 之基因表現量分析。qPCR 反應條件如下：50°C 10 分鐘 (1 個循環)、95°C 10 分鐘 (1 個循環)、95°C 15 秒與 60°C 1 分鐘 (40 個循環)。使用 melting peak 確認引子專一性， β -actin 做為 internal control，以 ΔC_t 計算各基因之表現量，並以 NC 組進行校正，數值以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。

表 3-3、流式細胞儀使用之抗體

Table 3-3. Antibodies used for flow cytometry.

Sample	Cell type	Antibody	廠牌	μL/test
Blood	Monocyte Neutrophil	PerCP-conjugated anti-mouse CD45	103130, BioLegend	1
		Pacific blue-conjugated anti-mouse CD11b	101224, BioLegend	1
		FITC-conjugated anti-mouse Ly6G	127606, BioLegend	0.5
		PE-conjugated anti-mouse Ly6C	12-5932-82,	1
		APC-conjugated anti-mouse CCR2	Bioscience	10
			FAB5538A, R&D	0.5
	Th17	AlexaFluor®700-conjugated anti-mouse CXC3R1	Systems 149021, Biolegend	
		Pacific blue-conjugated anti-mouse CD4	100534, BioLegend	1
		PE-conjugated anti-mouse IL-17A	506904, BioLegend	1
	lymphocyte	PerCP-conjugated anti-mouse CD45	103130, BioLegend	1
		FITC-conjugated anti-mouse CD3	100305, BioLegend	2
		Pacific blue-conjugated anti-mouse CD19	115523, BioLegend	0.5
		APC-conjugated anti-mouse CD4	100411, BioLegend	1
		PE-conjugated anti-mouse CD8	100708, BioLegend	1
	Treg cells	Pacific blue-conjugated anti-mouse CD4	100534, BioLegend	1
		APC-conjugated anti-mouse CD25	102012, BioLegend	1
		PE-conjugated anti-mouse Foxp3	126404, BioLegend	5
Skin	Monocyte Neutrophil	TruStain anti-mouse CD16/32 antibody	101320, BioLegend	2
		PerCP-conjugated anti-mouse CD45	103130, BioLegend	1
		Pacific blue-conjugated anti-mouse CD11b	101224, BioLegend	2
		PE-conjugated anti-mouse Ly6C	12-5932-82,	1
		APC-conjugated anti-mouse CCR2	Bioscience	2
			FAB5538A, R&D	0.5
		AlexaFluor®700-conjugated anti-mouse CXC3R1	Systems 149021, Biolegend	

	TruStain anti-mouse CD16/32 antibody	101320, BioLegend	2
	PerCP-conjugated anti-mouse CD45	103130, BioLegend	1
	Pacific blue-conjugated anti-mouse CD3	100334, BioLegend	2
lymphocyte	APC-conjugated anti-mouse $\gamma\delta$ TCR	17-5711-81,	1
		eBioscience	2
	PE-conjugated anti-mouse β TCR	109207, BioLegend	0.5
	FITC-conjugated anti-mouse Ly6G	127606, BioLegend	



表 3-4、貝式評分系統

Table 3-4. The Baker's scoring system of psoriatic skin. (Baker et al., 1992)

Item	Description	Score	
Keratin	Munro abscess	2.0	
	Hyperkeratosis	0.5	
	Parakeratosis	1.0	
Epidermis	Thinning above papillae	0.5	
	Clubbing of rete ridges	0.5	
	Lengthening of rete ridges	1.0	
	Acanthosis	0.5	
	Lack of granular layer	1.0	
Dermis		Mild	0.5
	Lymphocytic infiltrate	Moderate	1.0
		Marked	2.0
	Papillary congestion		0.5

表 3-5、即時定量聚合酶連鎖反應之引子序列

Table 3-5. Primer sequences for qPCR

Gene		Primer sequences (5' to 3')	Accession number
IL-17A	Forward	AGC AAG AGA TCC TGG TCC TGA A	NM_010552.3
	Reverse	CAT CTT CTC GAC CCT GAA AGT GA	
IL-23	Forward	AAT AAT GTG CCC CGT ATC CA	NM_031252.2
	Reverse	AGG CTC CCC TTT GAA GAT GT	
CXCL-1	Forward	TGG GAG GCT GTG TTT GTA TG	NM_008176.3
	Reverse	GAG ACG AGA CCA GGA GAA AC	
TNF- α	Forward	CACGTCCGTAGCAAACCACCAA	NM_013693.3
	Reverse	GTTGGTTGTCTTTGAGATCCAT	
ROR- γ t	Forward	CCA CTG CCA GCT GTG TGC TGT	NM_001293734.1
	Reverse	CTT GGC TCC CTG TCC TCC TCA GT	
TLR7	Forward	TGG CTC CCT TCT CAG GAT	NM_133211.4
	Reverse	CCG TGT CCA CAT CGA AAA CA	
β -actin	Forward	ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC	NM_007393.5
	Reverse	TCG GTG AGG ATC TTC ATG AGG TA	



第六節、統計分析

所有結果數值以 $\text{mean} \pm \text{standard error of the mean (SEM)}$ 呈現，使用 GraphPad Prism 6.0 軟體進行統計分析及製圖。體重變化及 PASI 評分以 two-way analysis of variance (ANOVA) 進行分析，並搭配 Bonferroni test 進行事後檢定。其餘實驗結果，兩組間差異以 Student's t-test 分析。當 $p < 0.05$ 代表具有統計上的意義。



第四章、實驗結果

第一節、GLN 攝取對小鼠皮膚局部發炎反應影響

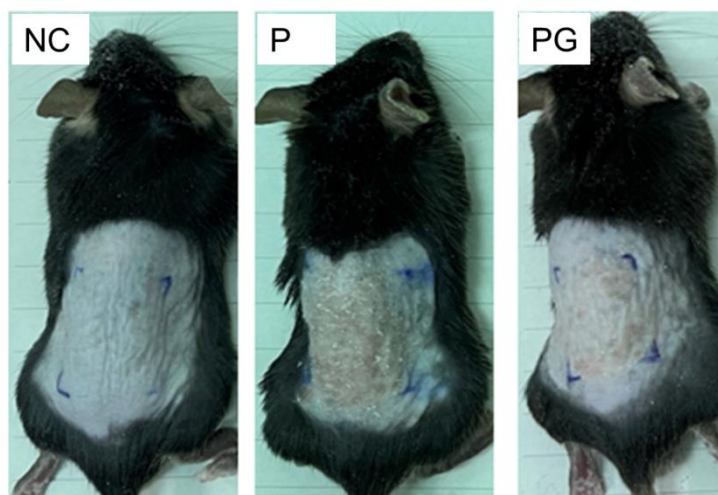
一、小鼠皮膚外觀變化與 PASI 評分

在背部皮膚外觀上，NC 組整體而言在塗抹對照乳液的 1、4、7 天（實驗第 16、19、22 天）時並無明顯的發紅、皮膚增厚及脫屑的情形。P 組及 PG 組小鼠則是在塗抹 aldara 乳液的前三天，沒有產生明顯的發炎型態變化，如皮膚發紅、增厚及脫屑，但自第 4 天（實驗第 19 天）起出現徵狀，此時 PG 組皮膚發紅及脫屑的程度稍較 P 組輕微，而兩組的皮膚發炎程度隨著塗抹日期增加而逐漸提升；第 7 天（實驗第 22 天）時 P 組在三項指標上皆明顯的較 NC 組嚴重，皮膚產生顯著的紅腫、增厚、乾燥脫屑及出現搔抓的傷口，PG 組則是在發紅及增厚的程度略低於 P 組，脫屑的部分顯著低於 P 組。實驗第 22 天，各組皮膚外觀如（圖 4-1A）。

PASI 評分的部分，與 NC 組相比，P 組之紅斑、脫屑及 PASI 總得分於第 4、7 天（實驗第 19、22 天）時顯著增加，皮膚厚度則是在第 7 天（實驗第 22 天）時有顯著差異。而與 P 組相比，PG 組除脫屑分數及總分於第 7 天（實驗第 22 天）有顯著差異外，其餘皆無顯著差異但低於 P 組（圖 4-1B）。

至於小鼠耳朵，左耳的部分三組間在第 1、4、7 天（實驗第 16、19、22 天）沒有明顯變化（圖 4-1C），右耳的部分則是在第 1、4 天（實驗第 16 天、19 天）沒有顯著差異、第 7 天（實驗第 22 天）時則是 P 組厚度顯著高於 NC 組，PG 組則顯著低於 P 組（圖 4-1D）。

A



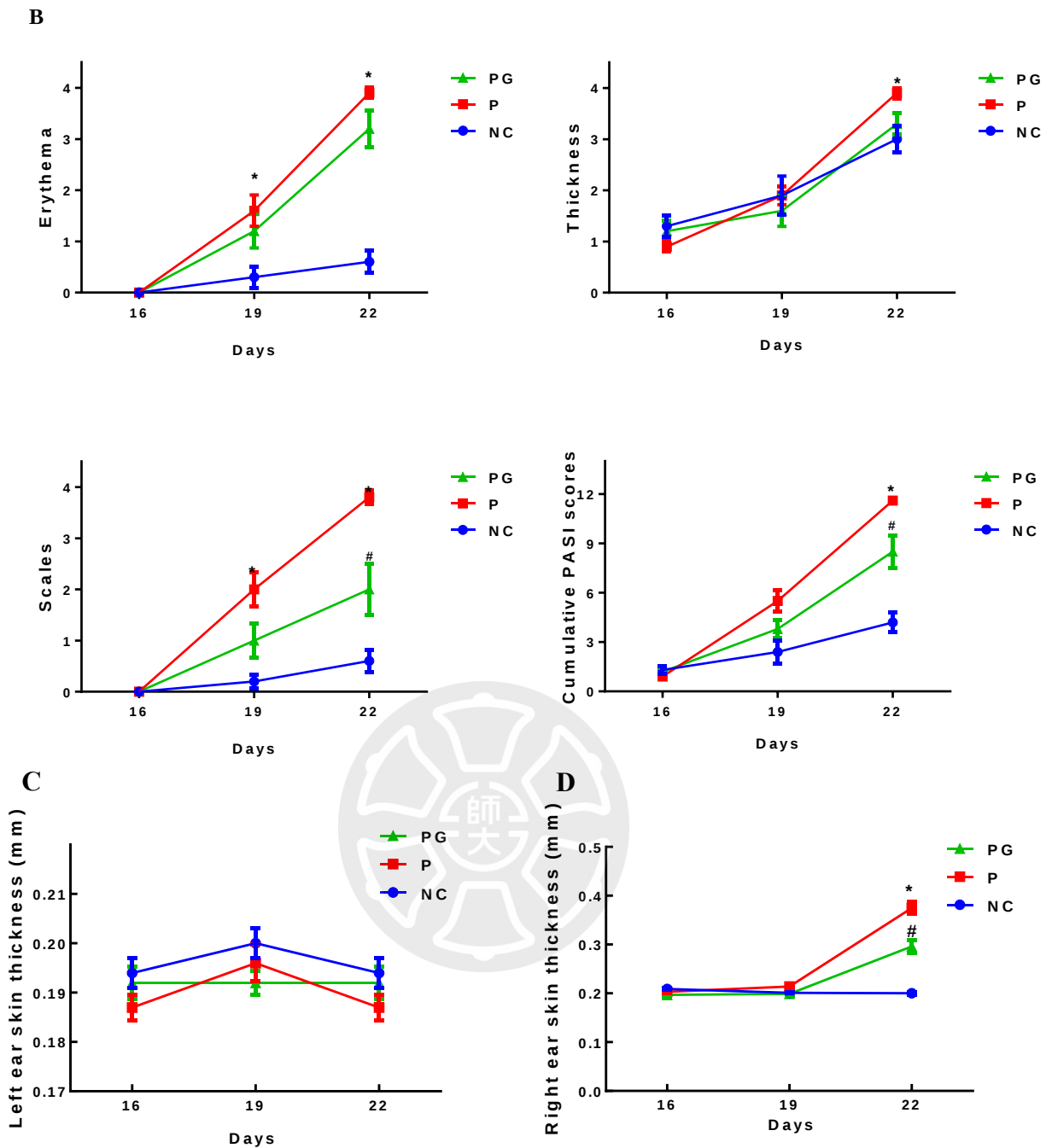


圖 4-1、背部皮膚外觀及耳朵厚度與 PASI 評分

Figure 4-1. Back skin appearance, Ear skin thickness, and PASI score. (A) The severity of back skin on day 22. (B) PASI scores. (C) Left ear skin thickness (D) Right ear thickness. PASI, psoriasis area severity index. Data are presented as the mean $\pm$ SEM. Difference among groups were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni test. *Significantly different compared to the NC groups ($p < 0.05$). # Significantly different compared to the P groups ($p < 0.05$).

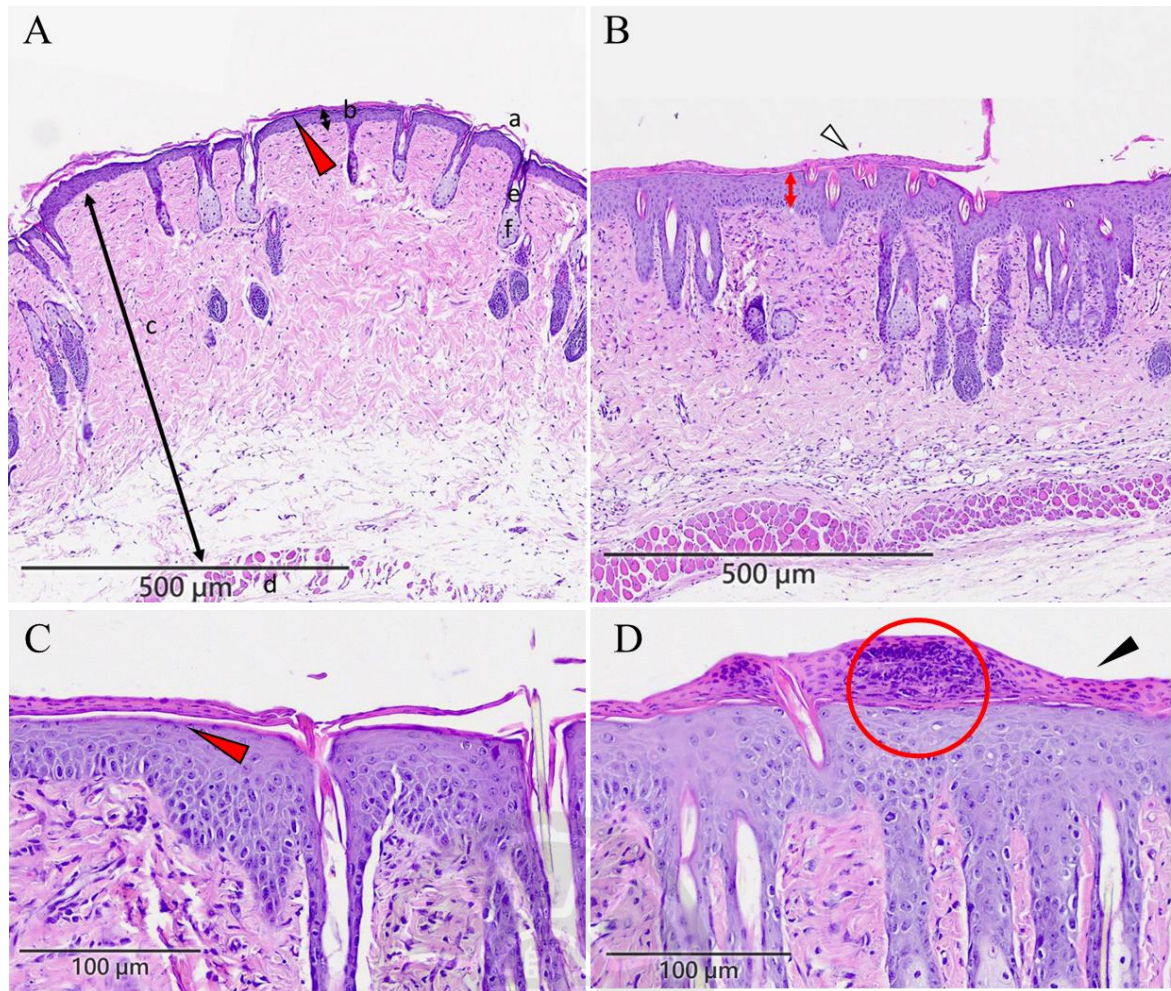
二、背部皮膚損傷情形與表皮層增厚

NC 組小鼠可由組織切片的 H&E 染色觀察到皮膚角質層較薄，且分化較為完全，沒有在角質細胞中觀察到未退化的細胞核；角質層與表皮層間的深紫色顆粒層明顯可見（如圖 4-2 A 紅色箭頭處）；表皮層較薄且厚度相對一致，棘層的分布較鬆散、長度較短（圖 4-2A）。經 IMQ 處理的 P 組小鼠皮膚則是在最外層可見到角質細胞快速堆積、增厚產生的角化過度（如圖 4-2 B 白色箭頭處）、角化不全（細胞核退化不完全）（如圖 4-2 D 黑色箭頭處）、嗜中性白血球聚集（孟洛微膿瘍）（如圖 4-2 D 紅色圓圈處）的角質層（如圖 4-2 的 B、C 及 D）；角質層及表皮層之間的顆粒層不明顯（如圖 4-2 C 紅色箭頭處）；表皮層的厚度增加，呈現棘皮病（Acanthosis）的特徵（如圖 4-2 B 紅色雙箭頭處）並可觀察到嗜中性白血球聚集（圖 4-2）的孟洛微膿瘍。

在不同倍率（40 倍、100 倍、200 倍）底下觀察小鼠皮膚組織損傷情形，可在 100 倍的影像上發現 P 組較 NC 組具有明顯的角質層增厚、表皮層厚度增加的情形（圖 4-3 A）；在 200 倍底下更可以清楚看到 P 組角質層的角化過度（如圖中白色箭頭處）、角化不全（如圖中黑色箭頭處）狀況及嗜中性白血球聚集（如圖中紅色圓圈處），且表皮層增厚（如圖中紅色雙箭頭處）。另外，PG 組相較 P 組，在 200 倍底下進行比較，可看出角質層異常增生（角化過度及角化不全）及表皮層增厚（如圖中紅色雙箭頭處）方面有明顯的改善，和 NC 組的皮膚特徵較接近。

使用 View Point 計算表皮層厚度（圖 4-3 B），P 組小鼠的表皮層厚度顯著高於 NC 組，而 PG 組則是厚度顯著低於 P 組。考量到皮膚組織切片時的角度差異，可能造成表皮層厚度出現落差，影響比較的準確性，因此本實驗進一步分析了小鼠背部皮膚中表皮層佔皮膚整層的面積（圖 4-3 C）。結果顯示，在表皮層所占面積比上面，P 組顯著高於 NC 組，而 PG 組相較 P 組而言，則是顯著降低，並接近 NC 組的比例。最後在貝氏評分上，P 組得分顯著高於 NC 組，PG 組得分則是較 P 組而言稍低，但沒有達到顯著差異（圖 4-3 D）。

綜合以上皮膚損傷分析項目，可得知 NC 組的皮膚損傷最輕微，P 組的皮膚損傷最為嚴重，而 PG 組的皮膚損傷則較 P 組來的輕微。

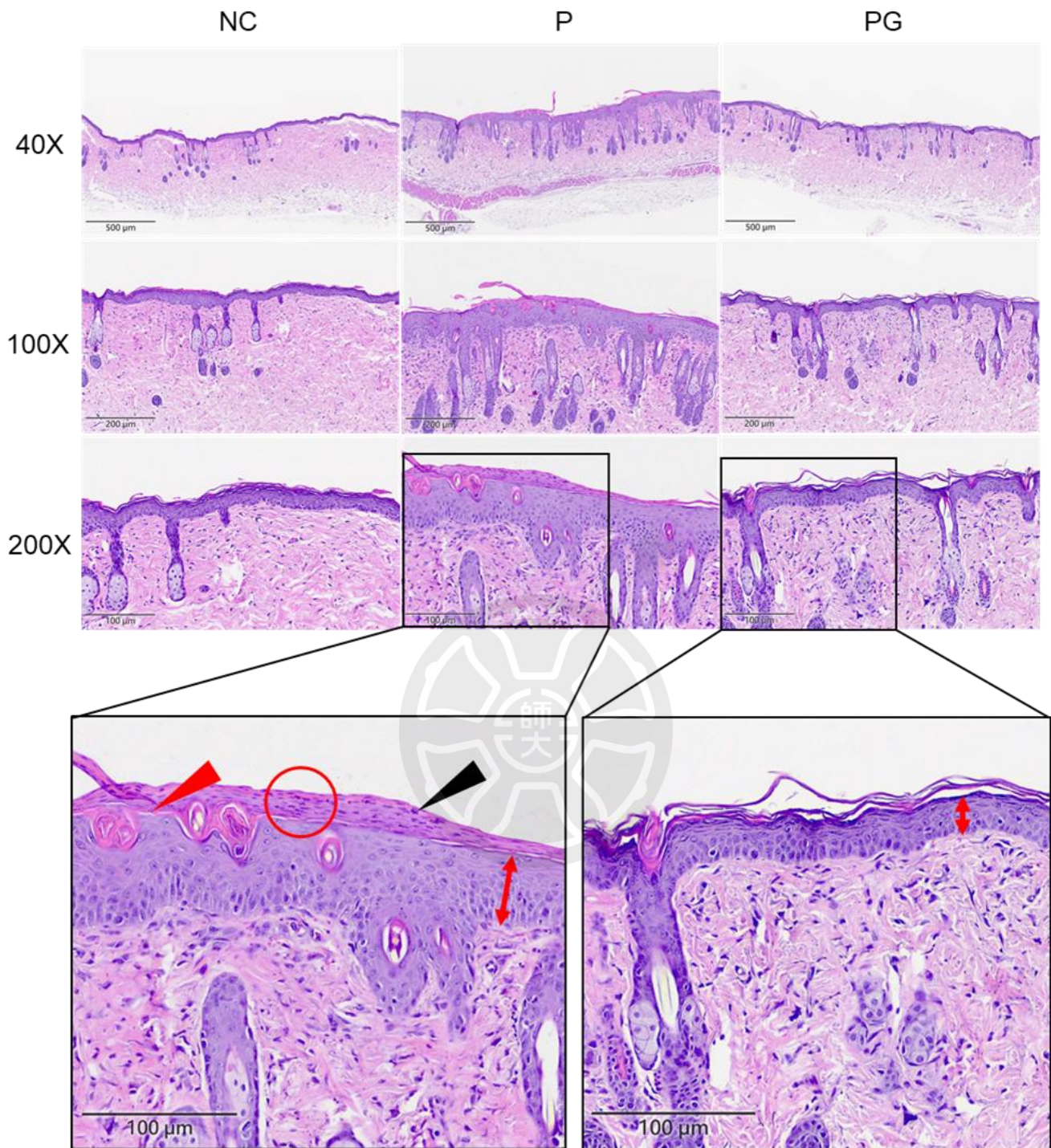


a: 角質層 b: 表皮層 c: 真皮層 d: 肌肉層 e: 毛囊細胞 f: 皮脂腺
 ↓ 表皮層厚度 ← 角化不全(可見細胞核) ← 角化過度(角質層增厚) ↑ 棘皮症(棘層延長)
 ▲ 顆粒層(深紫色線) ○ 嗜中性白血球聚集

圖 4-2、背部皮膚正常與組織損傷特徵

Figure 4-2. Histological features of mice's healthy and psoriasis-like skin. (A) Healthy mice skin features (60x). (B) Psoriasis-like skin features of mice (60x). (C) and (D) Psoriasis-like skin features of mice (200x). Scale bar represents 500 μm and 100 μm . Black double-headed arrows are used to show the dermal thickness. Red double-headed arrows are used to show the epidermal thickness. The red arrow indicates the place of the granular layer. The white arrow indicates the place of hyperkeratosis. The black arrow indicates the place of parakeratosis. Red circle indicates the place of Munro microabscess.

A



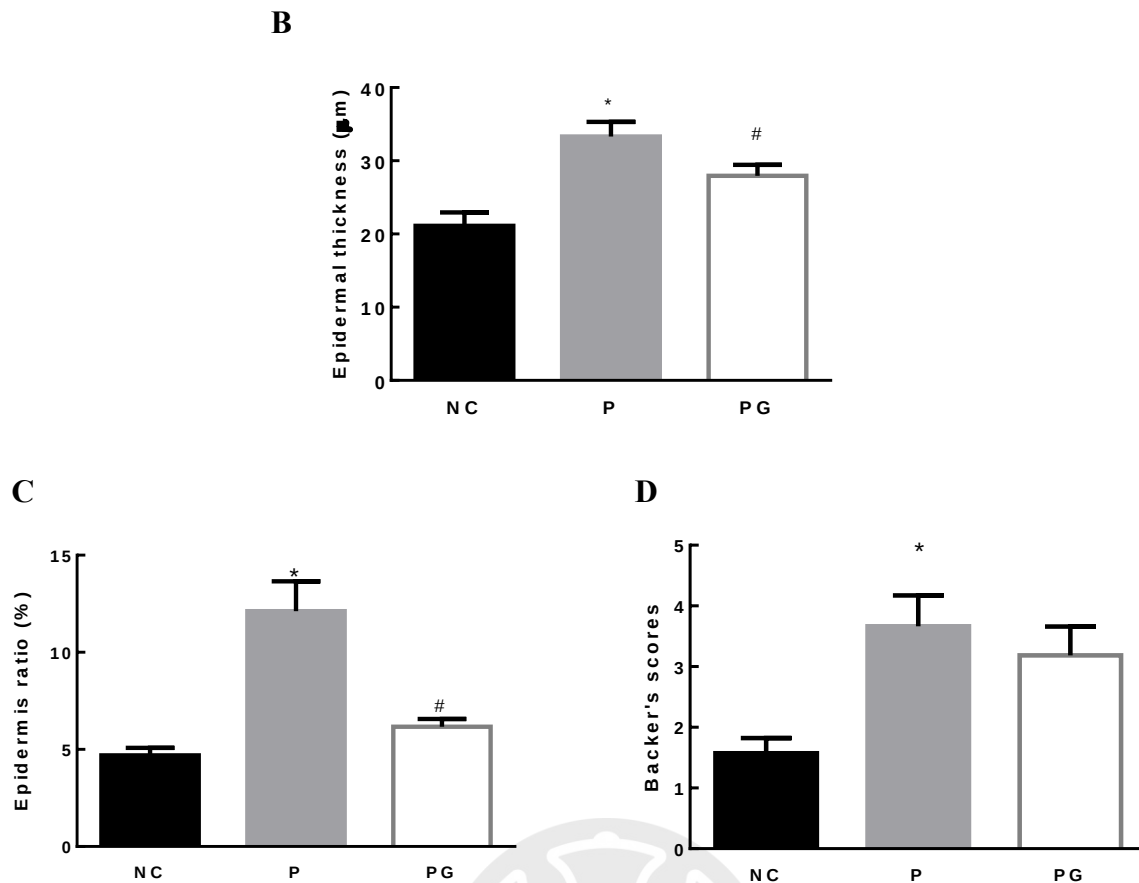


圖 4-3、背部皮膚組織損傷情形

Figure 4-3. Back skin histology, epidermal thickness and injury scores. (A) Histopathology of back skin with H&E stain (40x, 100x, 200x). Scale bar represents 500 μm , 200 μm , and 100 μm . Red double-headed arrows are used to show the epidermal thickness. The red arrow indicates the place of the granular layer. The black arrow indicates the place of hyperkeratosis and parakeratosis. Red circle indicates the place of Munro microabscess. (B) epidermal thickness (C) epidermis skin ratio (D) Baker's score. Data are presented as the mean $\pm$ SEM. Difference among groups were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni test. *Significantly different compared to the NC groups ($p < 0.05$). # Significantly different compared to the P groups ($p < 0.05$).

三、背部皮膚中 T 細胞比例

小鼠背部皮膚白血球中 T 細胞比例上來看，三組之間皆沒有顯著差異，但可觀察到 P 組具有較 NC 組為高的趨勢，而 PG 組則較 P 組略低(圖 4-4A)；同樣在 IHC 染色切片上觀察到 T 細胞 (CD3⁺) 在 P 組出現顯著的陽性反應 (Positive)，如圖中紅色箭頭所指處，而 NC 組與 PG 組的陽性反應則明顯較少 (圖 4-5)。而將各組的皮膚中 T 細胞進行比較，在 $\alpha\beta$ T 細胞佔 T 細胞比例上，P 組顯著高於 NC 組，PG 組與 P 組沒有顯著差異 (圖 4-4B)；在 T 細胞內 $\gamma\delta$ T 細胞所佔比例上，P 組顯著低於 NC 組，PG 組與 P 組沒有顯著差異 (圖 4-4C)。

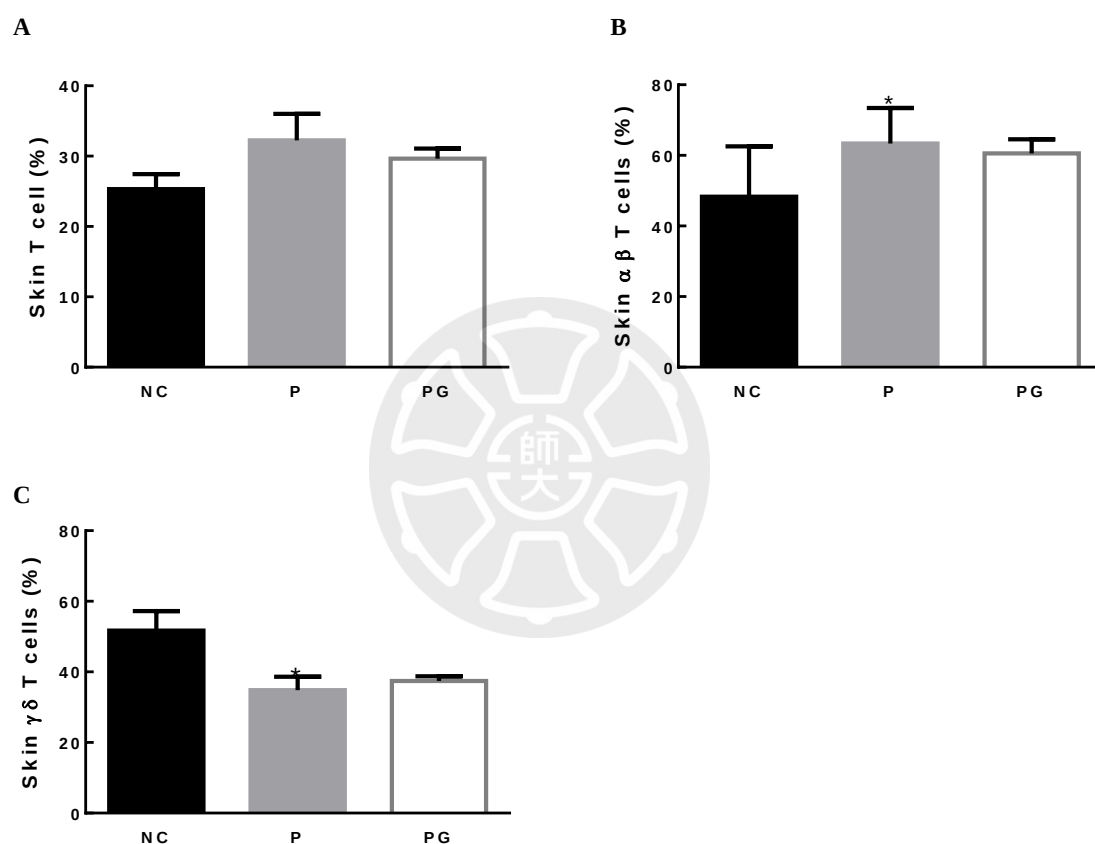


圖 4-4、背部皮膚中 T 細胞比例

Figure 4-4. Percentages of T cells in the back skin. (A) The percentage of T cell in WBC. (B) The percentage of $\alpha\beta$ T cell in T cells. (C) The percentage of $\gamma\delta$ T cell in T cells. NC, normal control group; P, psoriasis control group; PG, psoriasis group with glutamine supplementation. Data are presented as the mean $\pm$ SEM. Student's t-test was used to analyze differences between the NC and P & P and PG.

* Significantly different compared to the NC groups ($p < 0.05$).

Significantly different compared to the P groups ($p < 0.05$).

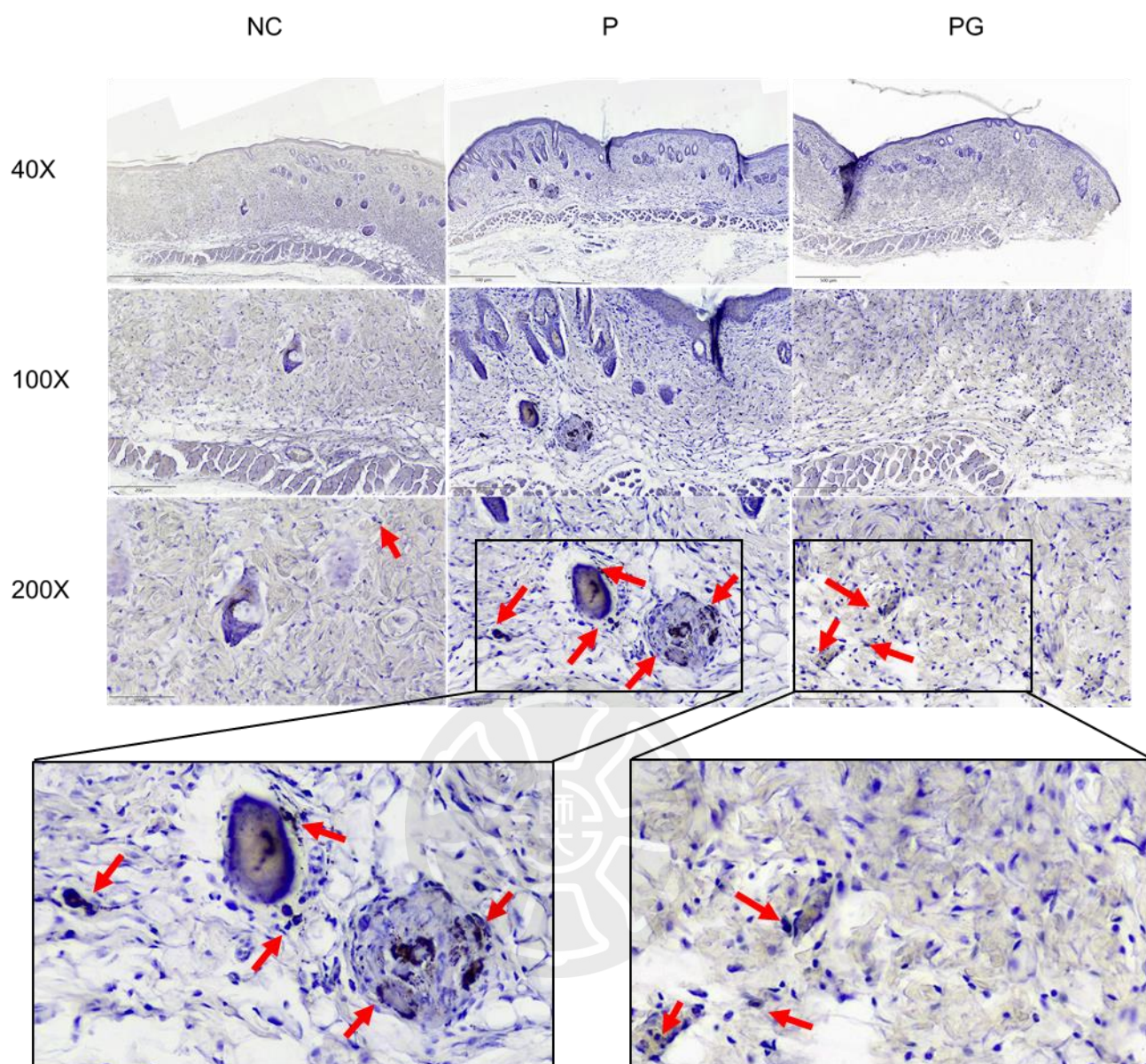


圖 4-5、背部皮膚組織 CD3⁺免疫染色

Figure 4-5. CD3 IHC staining of back skin. Scale bar represents 500 μm , 200 μm , and 100 μm (40x, 100x, 200x). The red arrow represents the distribution of the CD3⁺ cells in back skin.

四、皮膚中白血球比例

與 NC 組相比，P 組皮膚中的嗜中性白血球及促發炎 Mo 比例顯著上升。與 P 組相比，PG 組在皮膚中的嗜中性白血球比例顯著較低，而促發炎 Mo 方面則沒有顯著差異（圖 4-6A 及 B）。在 IHC 免疫染色方面，使用 Ly6G 抗體觀察嗜中性白血球在皮膚的分布情形，其中 P 組出現明顯的陽性反應，如圖中紅色箭頭所指處，而 NC 組及 PG 組則是未觀察到此現象（圖 4-7）。

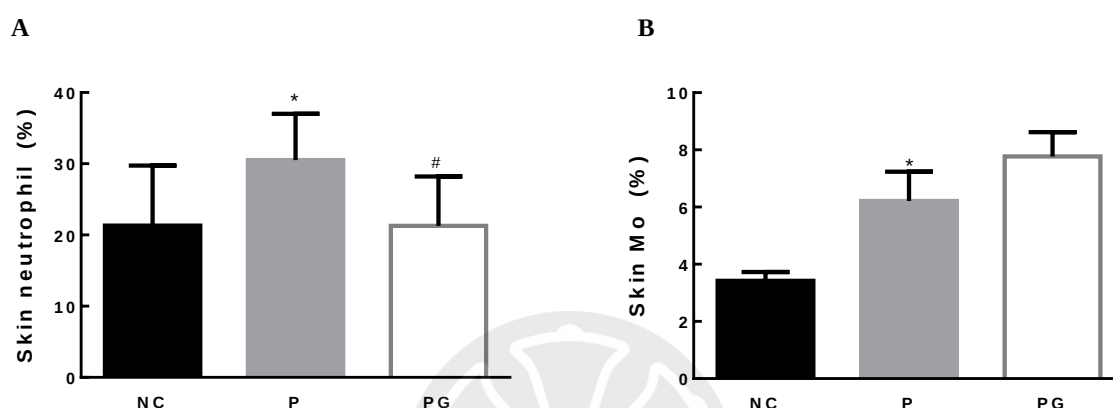


圖 4-6、皮膚中白血球之比例

Figure 4-6. Distributions of white blood cells in the back skin. (A) The percentage of neutrophils. (B) The percentage of inflammatory Mo. Mo, monocyte. NC, normal control group; P, psoriasis control group; PG, psoriasis group with glutamine supplementation. Data are presented as the mean $\pm$ SEM. Student's t-test was used to analyze differences between the NC and P & P and PG. * Significantly different compared to the NC groups ($p < 0.05$). # Significantly different compared to the P groups ($p < 0.05$).

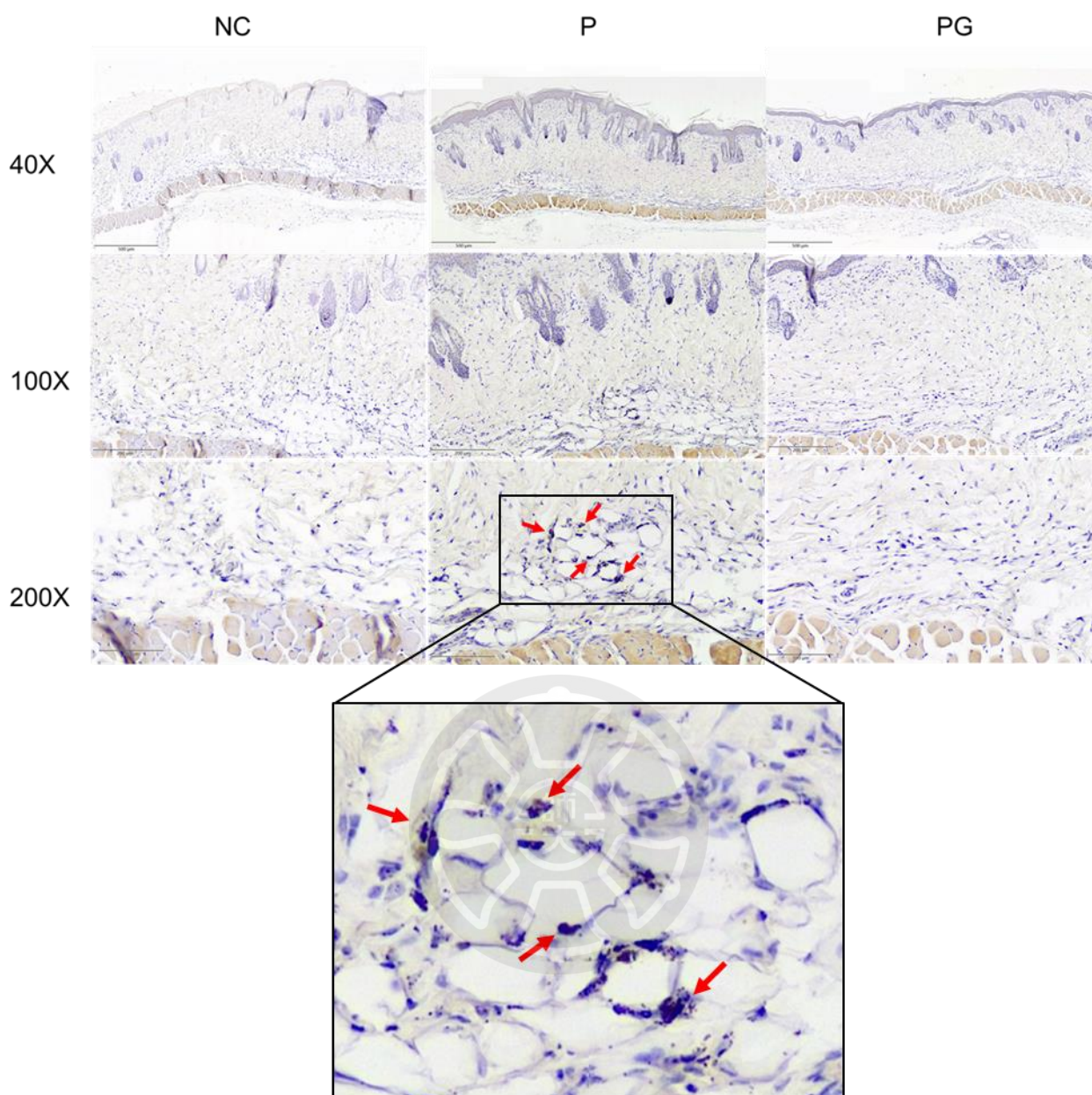


圖 4-7、背部皮膚組織 Ly6G 免疫染色

Figure 4-7. Ly6G IHC staining of back skin. Scale bar represents 500 μm , 200 μm , and 100 μm (40x, 100x, 200x). The red arrow represents the distribution of the neutrophil in back skin. (A) Histopathology of back skin with H&E stain (40x, 100x, 200x). Scale bar represents 500 μm , 200 μm , and 100 μm .

五、背部皮膚促發炎細胞激素、趨化因子及 TLR7 之 mRNA 表現量

背部皮膚的促發炎細胞激素 IL-17A 及 IL-23 之 mRNA 表現量，P 組與 NC 組相比顯著提升，PG 組與 P 組相比則是顯著下降、接近 NC 組（如圖 4-8A 和 B）；趨化因子 CXCL1 的 mRNA 表現量，P 組顯著高於 NC 組，且 PG 組顯著低於 P 組（圖 4-8C）；細胞激素 TNF- α 的 mRNA 表現量方面，P 組與 NC 組相比有提升的趨勢，PG 組與 P 組相比較為下降，但因組內差異性較大故皆未達到統計上的差異（圖 4-8D）；類鐸受體 TLR7 的 mRNA 表現量則是在三組之間沒有顯著差異（圖 4-8E）。



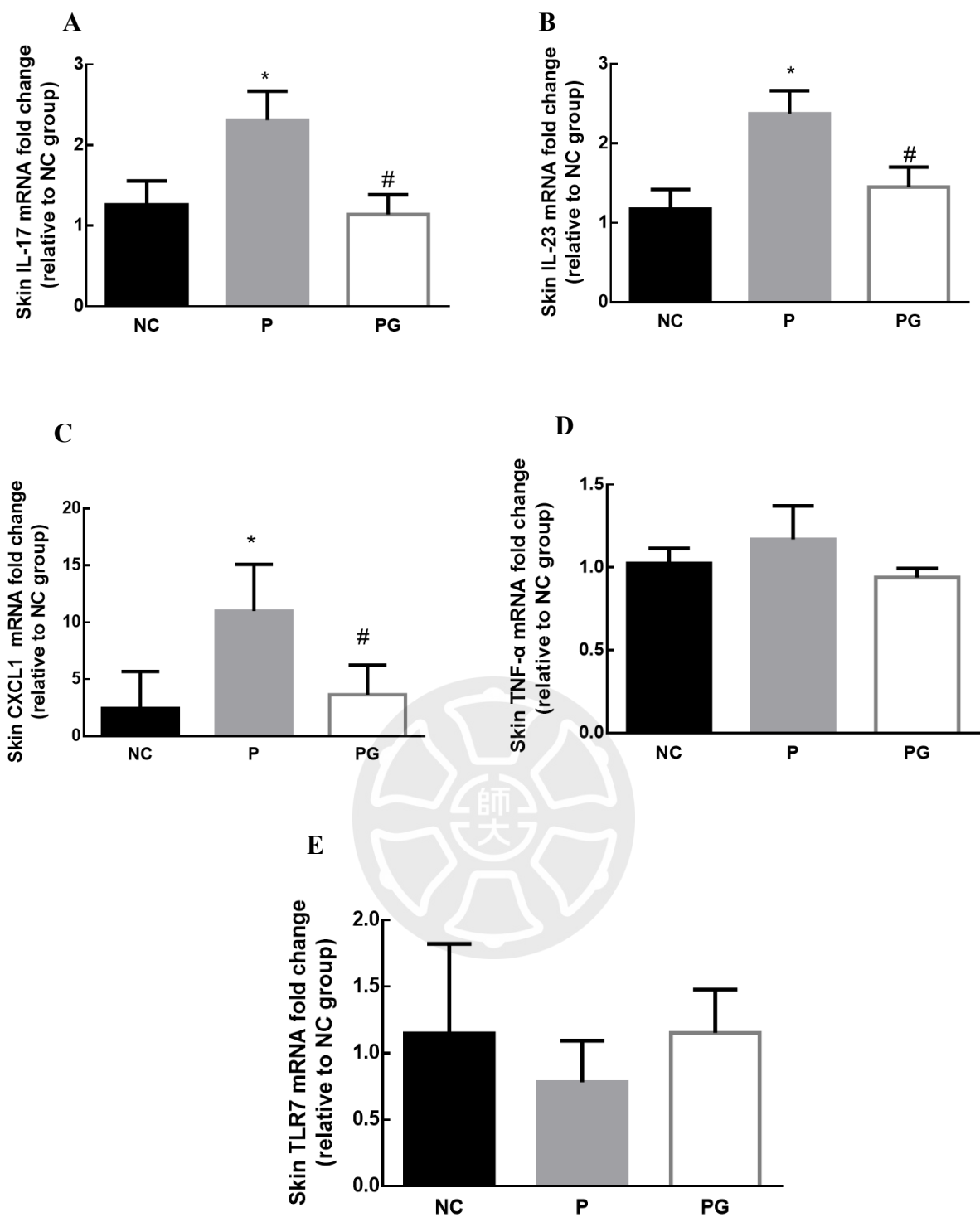


圖 4-8、背部皮膚細胞激素與 TLR7 之 mRNA 表現量

Figure 4-8. mRNA expressions of cytokines, chemokine, and TLR7 in the back skin. (A) IL-17A (B) IL-23 (C) CXCL1 (D) TNF- α . (E) TLR7. Data are presented as the mean $\pm$ SEM. Student's t-test was used to analyze differences between the NC and P & P and PG.

* Significantly different compared to the NC groups ($p < 0.05$).

Significantly different compared to the P groups ($p < 0.05$).

第二節、GLN 攝取對小鼠全身性發炎反應影響

一、脾臟/體重比值

為了解口服給予 GLN 飼料是否會影響全身性的免疫反應，本研究檢查了犧牲當天的小鼠脾臟重量與當天的體重比值，與 NC 組相比，P 組小鼠脾臟重量比值顯著提升，至於 PG 組則與 P 組沒有顯著差異（圖 4-9）。

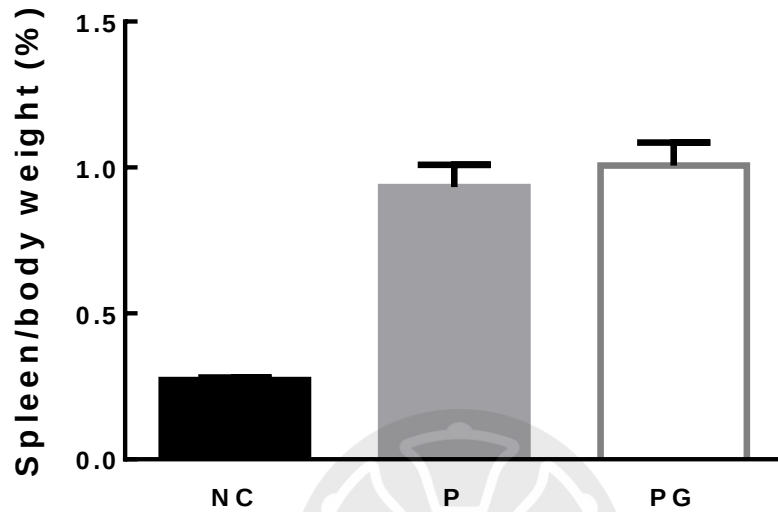


圖 4-9、脾臟/體重比值

Figure 4-9. Spleen to body weight ratios. NC, normal control group; P, psoriasis control group; PG, psoriasis group with glutamine supplementation. Data are presented as the mean $\pm$ SEM. Difference between groups were analyzed by independent student's t test.. *The NC group significantly different compared to psoriasis group ($p < 0.05$).

二、血液中白血球比例

與 NC 組相比，P 組血液中的嗜中性白血球、促發炎 Mo (inflammatory Mo) 以及抗發炎 Mo (anti-inflammatory Mo) 比例皆顯著提升。而與 P 組相比，PG 組於血液中的嗜中性白血球較低，而在促發炎 Mo 比例以及抗發炎 Mo 比例上皆無顯著差異（圖 4-10）。

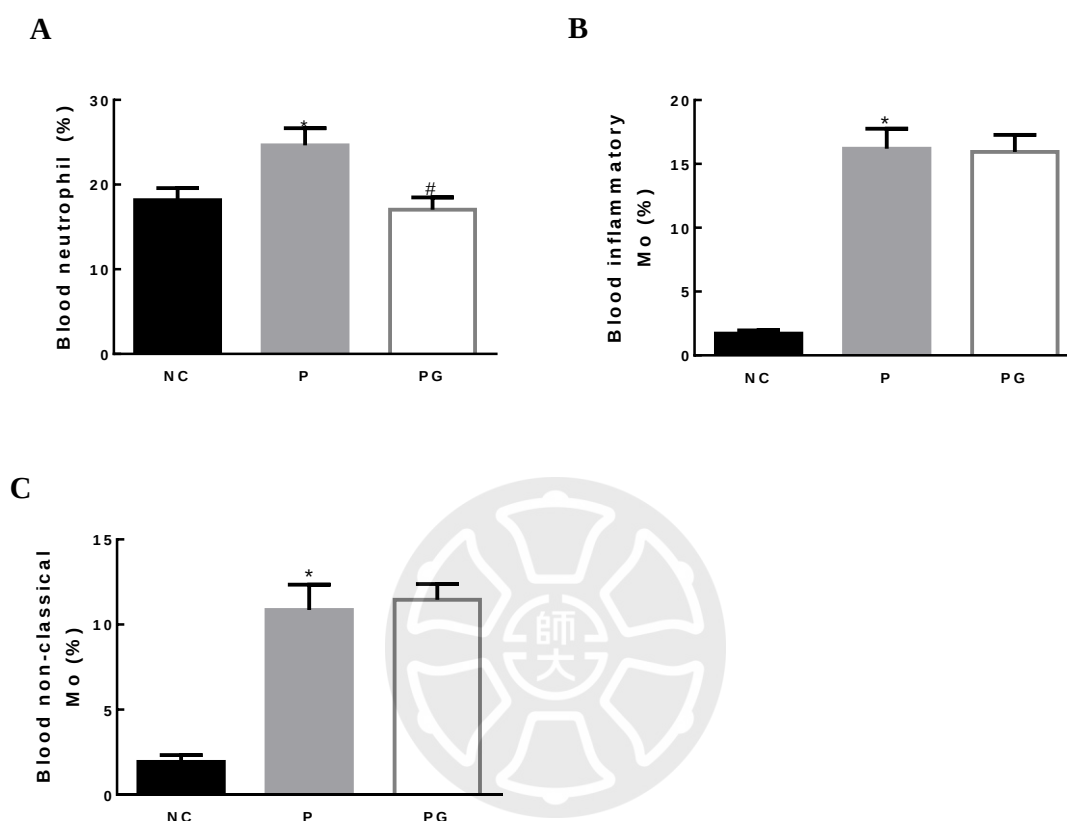


圖 4-10、血液中白血球之分布

Figure 4-10. Distributions of white blood cells in the blood. (A) The percentage of neutrophils in WBC. (B) The percentage of classical Mo in WBC. (C) The percentage of non-classical Mo in WBC. Mo, monocyte. NC, normal control group; P, psoriasis control group; PG, psoriasis group with glutamine supplementation. Data are presented as the mean $\pm$ SEM. Student's t-test was used to analyze differences between the NC and P & P and PG. * Significantly different compared to the NC groups ($p < 0.05$). # Significantly different compared to the P groups ($p < 0.05$).

三、血液中淋巴球比例

與 NC 組相比，P 組小鼠血液白血球中的 T 細胞及 B 細胞比例顯著下降，T 細胞中的 Th 細胞顯著下降、Tc 細胞顯著上升。而與 P 組相比，PG 組僅在血液白血球中的 B 細胞比例顯著較高，其他細胞方面則沒有差異（圖 4-11）。

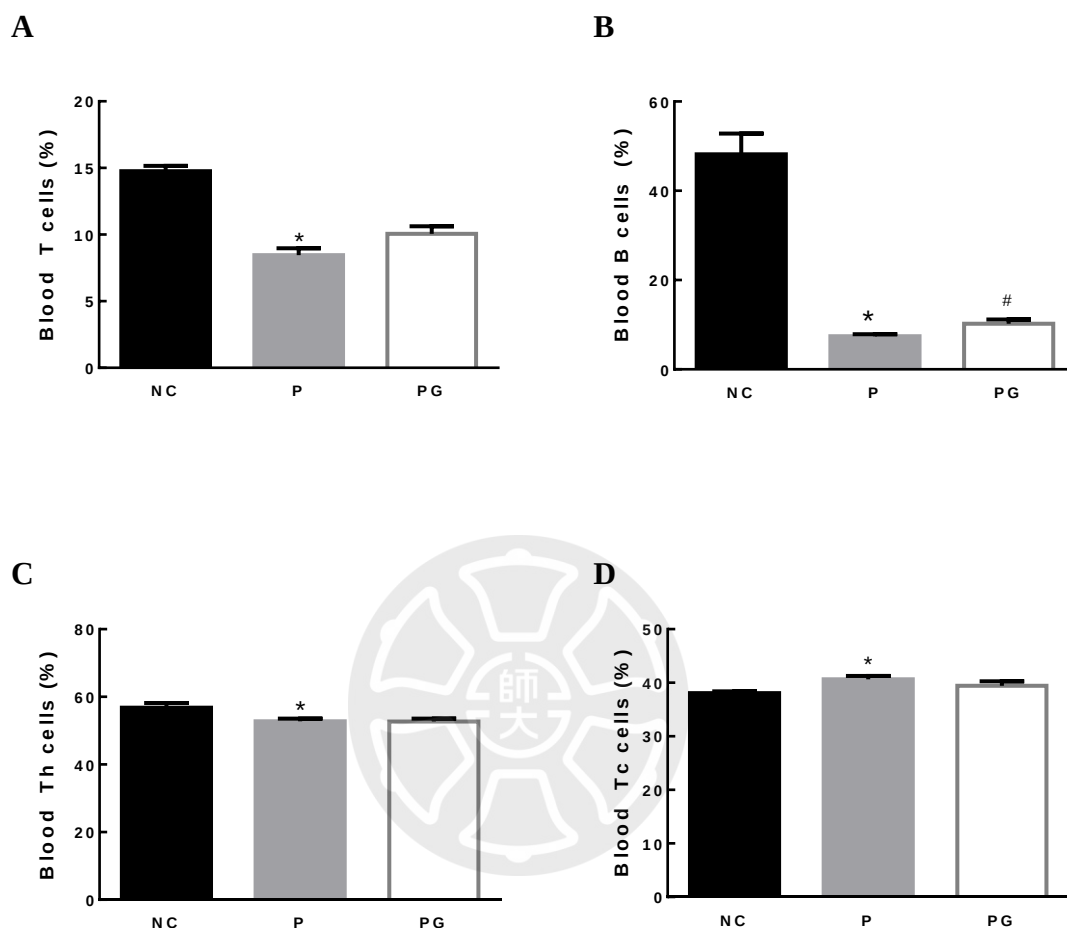


圖 4-11、血液中淋巴球之分布

Figure 4-11. Percentages of lymphocytes in the blood. (A) The percentage of T cells in WBC. (B) The percentage of B cells in WBC. (C) The percentage of Th cell in T cells. (D) The percentage of Tc cell in T cells. NC, normal control group; P, psoriasis control group; PG, psoriasis group with glutamine supplementation. Tc, cytotoxic T cell; Th, helper T cell. Data are presented as the mean $\pm$ SEM. Student's t-test was used to analyze differences between the NC and P & P and PG.

* Significantly different compared to the NC groups ($p < 0.05$).

Significantly different compared to the P groups ($p < 0.05$).

四、血液中 CD4⁺ T 細胞比例

與 NC 組相比，P 組血液中的 Th17、Treg 細胞比例顯著提升。而與 P 組相比，PG 組中 Th17 顯著下降，而 Treg 細胞比例方面則無顯著差異（圖 4-12）。

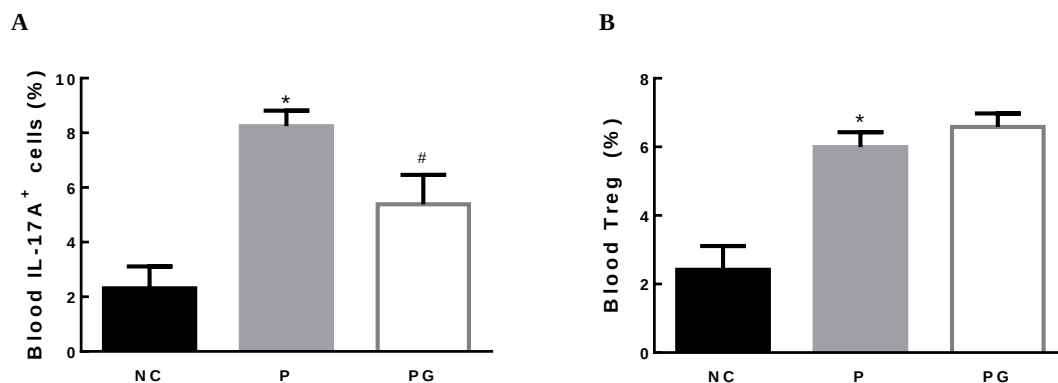


圖 4-12、血液中 CD4⁺ T 細胞比例

Figure 4-12. Percentages of CD4⁺ T cell in the blood. (A) The percentage of Th17 in CD4⁺ cells. (B) The percentage of Treg in CD4⁺ cells. Th, helper T cell; Treg, regulatory T cell. NC, normal control group; P, psoriasis control group; PG, psoriasis group with glutamine supplementation. Dots represent individual values. Data are presented as the mean $\pm$ SEM. Student's t-test was used to analyze differences between the NC and P & P and PG.

* Significantly different compared to the NC groups ($p < 0.05$).

Significantly different compared to the P groups ($p < 0.05$).

五、脾臟中 T 細胞相關 mRNA 表現量

脾臟中細胞激素 IL-17A 的 mRNA 表現量，在三組間並沒有達到顯著差異(圖 4-13A)；而轉錄因子 ROR γ t 的表現量則是 P 組顯著低於 NC 組，PG 組顯著高於 P 組，與 NC 組較接近 (圖 4-13B)。

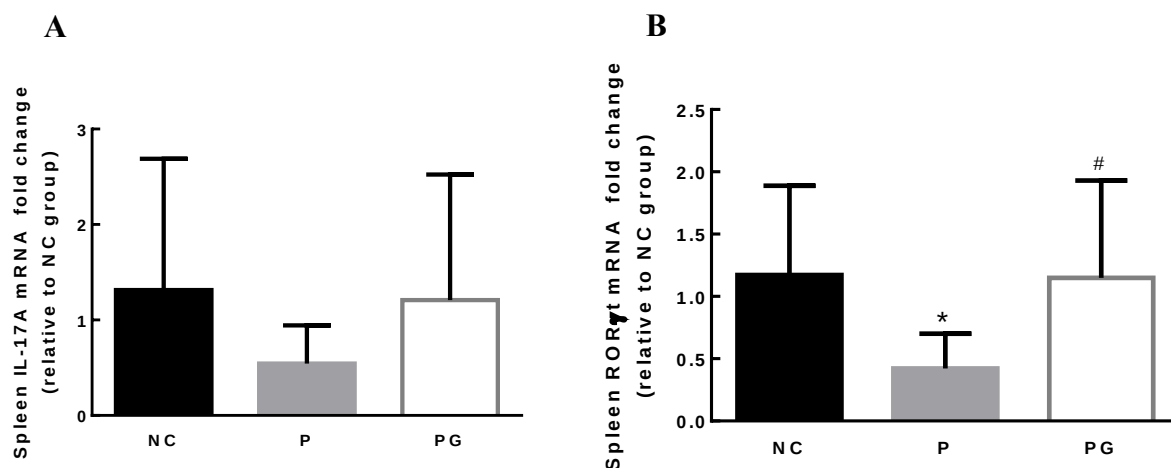


圖 4-13、脾臟中 Th17 細胞相關 mRNA 表現量

Figure 4-13. Splenic gene expressions of Th17-related markers. (A) IL-17A. (B) ROR γ t. NC, normal control group; P, psoriasis control group; PG, psoriasis group with glutamine supplementation. Data are presented as the mean $\pm$ SEM. Student's t-test was used to analyze differences between the NC and P & PG and PG.

* Significantly different compared to the NC groups ($p < 0.05$).

Significantly different compared to the P groups ($p < 0.05$).

第三節、小鼠體重變化與 GLN 攝取量

一、體重

三組在實驗前 14 天沒有明顯的差異，且體重隨著時間增加逐漸上升；實驗第 14 天時達到最高體重，；第 16 天（IMQ 誘導第一天）時三組體重皆略為下降；在第 18 天（IMQ 誘導第三天），P 組及 PG 組體重快速下降，但 NC 組變化不大，P 組及 PG 組達到最低體重，顯著低於 NC 組；第 20 天（IMQ 誘導第五天），PG 組仍低於 NC 組；第 22 天（犧牲當天），三組間沒有顯著差異（圖 4-14）。

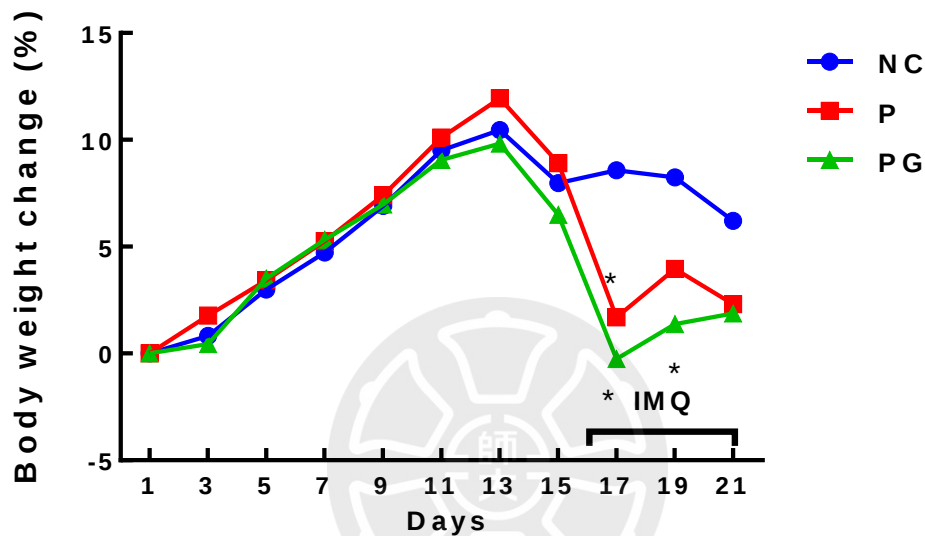


圖 4-14、小鼠體重變化百分比

Figure 4-14. Percentage of body weight change in mice. NC, normal control group; P, psoriasis control group; PG, psoriasis group with glutamine supplementation. Data are presented as the mean $\pm$ SEM. Difference among groups were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni test. *The NC group significantly different compared to psoriasis groups ($p < 0.05$).

二、飼料攝取量變化

實驗前兩周之飼料攝取狀況在各組間無明顯差異，第 14 天起，全部小鼠的飼料攝取量皆開始下降，將 P 組與 NC 組相比，P 組在第 16、17、18、20、21 天顯著較低，並在第 17 天觀察到最低攝食量；PG 組則是在第 16、17、18 天顯著較 NC 組低，也在第 17 天記錄到最低攝食量，而到了第 19 天以後，攝食量即回升至與 NC 組無顯著差異的程度（圖 4-15）。

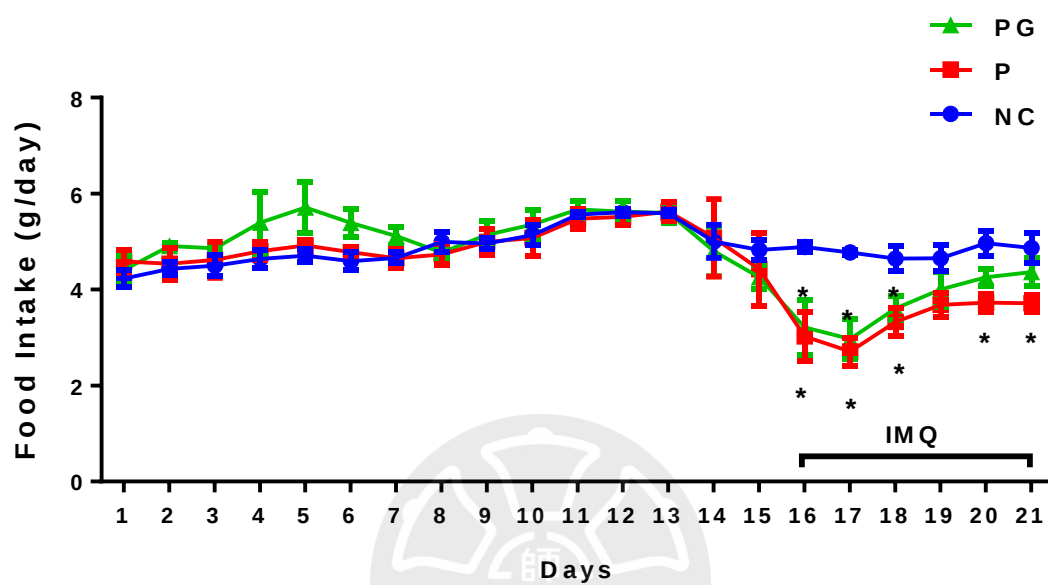


圖 4-15、飼料攝取量

Figure 4-15. Food intake of mice on AIN-93G diet or AIN-93G diet with glutamine. NC, normal control group; P, psoriasis control group; PG, psoriasis group with glutamine supplementation. Data are presented as the mean $\pm$ SEM. Difference between groups were analyzed by independent student's t test. * Significantly different compared to the NC groups ($p < 0.05$).

三、GLN 攝取量變化

PG 組小鼠 GLN 攝取量，平均每日攝取 0.24g (圖 4-16)。

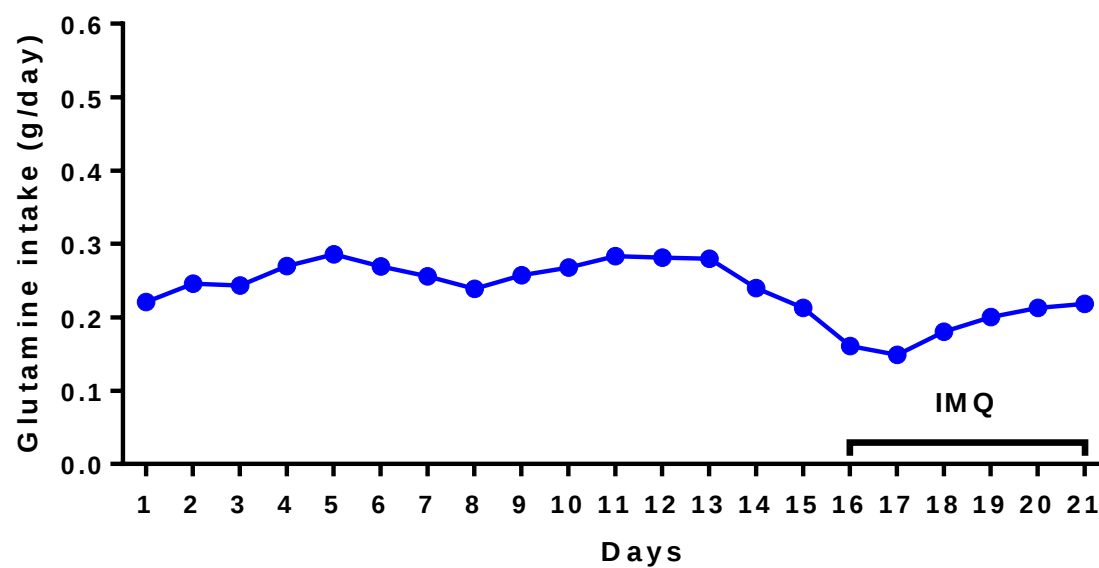


圖 4-16、GLN 攝取量

Figure 4-16. The intake of GLN.



第四節、實驗結果整理

Table 4-1. Summary of experimental results

項目	類別	分析項目	P 組 vs. NC 組	PG 組 vs. P 組
血液	先天性 免疫細胞	嗜中性白血球	↑	↓
		促發炎 Mo、	↑	-
		抗發炎 Mo	↑	-
	淋巴球	Th 細胞	↓	-
		B 細胞	↓	↑
		Tc 細胞	↑	-
		Th17	↑	↓
脾臟	T 細胞相關 mRNA 表現量	Treg	↑	-
		IL-17A	-	-
背部 皮膚	乾癬 嚴重程度	PASI 總分	↑	↓(第 22 天)
	先天性 免疫細胞	嗜中性白血球	↑	↓
		Mo	↑	-
	T 細胞 次群	$\alpha\beta$ T 細胞	↑	-
		$\gamma\delta$ T 細胞	↑	-
	促發炎相關 mRNA 表現量	IL-17A	↑	↓
		IL-23	↑	↓
		TLR7	-	-
		CXCL1	↑	↓
		TNF- α	-	-
	皮膚損傷	表皮層厚度	↑	↓
		表皮層面積比例	↑	↓
		Backer's scores	↑	-
全身	體重	急性期體重	↓	-
	脾臟	脾臟重量差異	↑	-

↑:上升、↓:下降、-:沒有顯著差異

第五章、討論

第一節、IMQ 誘導小鼠乾癬樣皮膚炎之特徵

IMQ 藥物誘導的乾癬小鼠有許多發炎表現，包含皮膚外觀變化、脾臟腫大、皮膚中免疫細胞及相關的促發炎細胞激素增加等改變 (Chen et al., 2022; Gao et al., 2020; Mercurio et al., 2021; Uchida et al., 2021; Yang et al., 2019)。在皮膚外觀方面，本研究發現小鼠於 IMQ 誘導乾癬第 4 天起出現發炎病癥，因此 PASI 得分在誘導第 4 天（實驗第 19 天）及誘導第 7 天（實驗第 22 天）顯著高於正常小鼠（圖 4-1B），和過往結果相符 (Yang et al., 2019)；皮膚組織切片方面，在 IMQ 誘導第 3 天觀察到表皮層變厚，第 5 天除表皮層增厚外還可觀察到角化過度，並於第 7 天可觀察到顯著的乾癬皮膚病變特徵（角化過度、角化不全、孟洛微膿瘍及表皮層增厚等情形）。此外，本實驗在 IMQ 誘導第七天觀察到皮膚顆粒層缺失（圖 4-3A）、表皮增生（圖 4-3A、B 及 C）、角化過度及角化不全等乾癬特徵（圖 4-3A），顯示角質細胞的異常增生與代謝失常，與先前研究一致 (Peng et al., 2020; Yang et al., 2019)。

和皮膚發炎相關的先天性免疫細胞方面，本研究觀察到乾癬小鼠血液及皮膚中先天性免疫細胞（嗜中性白血球及 Mo）比例提升（圖 4-11A、B 及圖 4-9A、B），皮膚中 CXCL1 的 mRNA 表現量也有所增加（圖 4-9C），且在免疫化學染色看到嗜中性白血球浸潤皮膚組織之情形（圖 4-7），與過往研究結果一致 (Ha et al., 2014; Kim et al., 2020; Knopp et al., 2021; Mercurio et al., 2021)，顯示 IMQ 會促進先天性免疫相關之發炎反應而造成乾癬樣皮膚炎。有研究發現乾癬小鼠在 IMQ 誘導後，皮膚中受體蛋白 TLR7 之 mRNA (Jeon et al., 2017) 及蛋白質表現量會增加 (Yang et al., 2019)，發炎性細胞激素 TNF- α 之 mRNA 表現量同樣增加 (Wang et al., 2019)，然而本實驗並未觀察到相同結果（圖 4-8E 及 D），推測是因為小鼠個體差異較大，導致 TLR7 和 TNF- α 的 mRNA 表現量未能達到顯著差異。

本研究發現乾癬小鼠的血液 T 細胞及 T 細胞當中的 Th 細胞比例皆降低（圖 4-11A 及 C），而皮膚中 T 細胞比例則有上升的趨勢且 $\alpha\beta$ T 細胞比例增加（圖 4-4B），更從免疫化學染色觀察到 CD3⁺T 細胞聚集皮膚（圖 4-5），顯示 T 細胞聚集到皮膚處的現象，故推論 IMQ 誘導的乾癬樣皮膚炎會促使血液中的 T 細胞遷移至皮膚處，與先前文獻相仿 (Chen et al., 2022; Surcel et al., 2019)。本研究觀察到皮膚增加的 T 細胞以 $\alpha\beta$ T 細胞為主（圖 4-5B）， $\gamma\delta$ T 細胞較少（圖 4-5C），顯示增加的 T 細胞仍

以來自血液循環的 $\alpha\beta$ T 細胞為主，而非皮膚及黏膜特有的 $\gamma\delta$ T 細胞 (Shiromizu & Jancic, 2018)。乾癬重要的致病細胞 Th17 在乾癬小鼠血液中顯著上升 (圖 4-12A)，而 Th17 細胞相關的細胞激素如 IL-17A、IL-23 之 mRNA 表現量也在皮膚中顯著增加 (圖 4-8AB)，符合先前研究結果 (Cho et al., 2017; Gao et al., 2020)。故由以上結果顯示，本實驗使用含有 IMQ 的 Aldara 藥膏，連續塗抹皮膚 6 天後，可成功誘發 C57BL/6J 小鼠乾癬樣皮膚炎。

第二節、GLN 補充減緩小鼠皮膚發炎反應及損傷

IMQ 誘導乾癬小鼠會發生皮膚外觀的病變，並可用 PASI 分數進行程度評估。本實驗發現乾癬小鼠補充 GLN 可降低背部皮膚之 PASI 分數，並減緩 IMQ 誘導第 7 天 (實驗第 22 天) 時皮膚脫屑的程度，但在皮膚的發紅及厚度增加方面並沒有顯著的改變 (圖 4-1B)，可能因組內個體差異較大及小鼠毛髮生長干擾判讀而降低了 GLN 補充對乾癬小鼠皮膚改善的效果。由於小鼠的皮膚組成與人體不同，在進行小鼠皮膚的變化觀察會受到毛髮的影響而有所限制，如：小鼠的表皮層較薄、具有 DETC 及密布的毛囊細胞 (圖 5-1)。本實驗也發現使用電動剃毛刀及脫毛膏進行脫毛處理的乾癬小鼠，皮膚會出現黑斑，且黑斑處毛髮生長較快，影響藥物經皮膚吸收及量測觀察，不利於皮膚厚度及發紅、脫屑的觀察，或許因而影響乾癬小鼠皮膚發紅及增厚的判斷，降低所得之 PASI 分數。有研究指出這是由於小鼠會經歷換毛期而產生的差異，小鼠的毛髮生長週期包含生長期 (anagen)、退化期 (catagen) 及靜止期 (telogen)，在生長期時皮膚中真黑色素 (eumelanin) 增加，外觀呈現灰色或黑色，而靜止期時皮膚則呈粉紅色 (Sundberg & Silva, 2012)。C57BL/6 小鼠約在出生後 49 天進入毛髮生長靜止期，但脫毛處理使得小鼠重新開始毛髮生長週期，約在剃毛後的 5-10 天，小鼠的皮膚顏色會由粉紅色變為灰色或黑色 (Müller-Röver et al., 2001) 故此階段的小鼠會有實驗觀察上的限制。

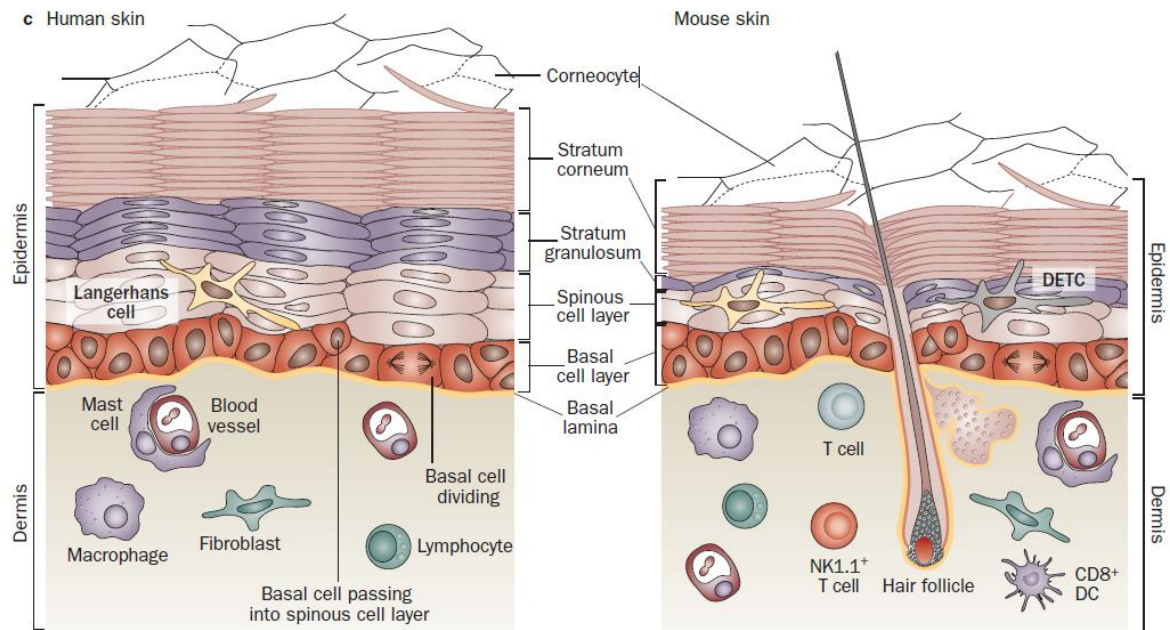


圖 5-1、人類及老鼠皮膚組成

Figure 5-1. Human and mouse skin features. DC, dendritic cell; DETC, dendritic epidermal T cell NK, natural killer. (Wagner et al., 2010)

本實驗在皮膚組織切片方面，為降低可能的誤差，使用影像分析軟體 View Point 對亂數排列、重新編號的皮膚組織影像進行表皮層厚度及面積的計算，以利更客觀的去了解 GLN 補充對於皮膚損傷的保護效果。由於皮膚組織切片時角度無法完全一致，考量到切片角度會影響表皮層厚度的結果，本實驗更進一步計算表皮層佔整體皮膚層的面積比值（圖 4-3C），藉此排除切片角度帶來的影響。綜合小鼠表皮層厚度（圖 4-3B）、表皮層面積比（圖 4-3C）及貝式評分系統（圖 4-3D）之結果，顯示 GLN 補充具有改善乾癬小鼠表皮層增厚的效果，對於改善皮膚損傷有正面效益。

皮膚中的角質細胞及免疫細胞都會表現 PRR，以偵測、啟動免疫反應，如與乾癬疾病相關的有 TLR 家族中的 TLR7 (Huang et al., 2016)。當皮膚受到病原體或是 IMQ 的刺激，角質細胞及 DC 上的 TLR7 會活化導致促發炎細胞激素的分泌增加，使得先天性免疫細胞的數量上升 (Flutter & Nestle, 2013; Kawasaki & Kawai, 2014; Li et al., 2013)。先前研究中藉由 TLR7 剔除 (TLR7-deficient) 小鼠證實 IMQ 誘導乾癬樣皮膚炎的模式可透過 TLR7 而引起 (Ueyama et al., 2014)，其所使用的 IMQ 來源為 Beselna cream (5% IMQ)。然而，在另一篇和本實驗同樣使用 Aldara cream (5% IMQ) 的文獻指出，Aldara 會引起 TLR7 剔除小鼠的表皮層厚度增加、角化不

全、增加角質細胞凋亡及增加促發炎細胞激素釋放，顯示其可獨立於 TLR7 而引起皮膚異常與損傷產生 (Walter et al., 2013)。本實驗連續六天給予小鼠 Aaldara cream 後，皮膚組織中 TLR7 的 mRNA 表現量並沒有在乾癬小鼠、正常小鼠或 GLN 補充乾癬小鼠間出現顯著差異 (圖 4-8E)，和過往研究結果有落差 (Jeon et al., 2017)，推論可能原因與三組小鼠各自的組內差異較大有關。根據先前研究的結果顯示 TLR7/8–MyD88–NF- κ B 之訊號傳遞路徑是發炎反應重要的參與者 (Son et al., 2016)，導致皮膚中促發炎激素如 TNF- α 、IL-1 及 IL-6 之蛋白質表現量增加 (Lai et al., 2017; Li et al., 2013)，引起發炎反應，造成皮膚損傷。TNF- α 是發炎反應中重要的細胞激素，可由許多先天性免疫細胞產生，在各種損傷及刺激下會迅速釋放，且在 Wang 等人 (2020) 的研究中給予小鼠 42.5 mg 之 aldera 藥膏以誘導發炎反應，發現 TNF- α 的 mRNA 表現量在給予 IMQ 的第 4 天時，顯著高於控制組，相反的在第 7 天時，沒有達到顯著差異，推論產生 TNF- α 的細胞是在發炎的早期階段被活化。而本次實驗分析了實驗第 22 天 (給予 IMQ 誘導後的第 7 天) 之小鼠皮膚組織，所測得 TNF- α 之 mRNA 表現量在三組間無顯著差異 (圖 4-8D)，推論原因和乾癬小鼠組內個體差異較大及處於誘導發炎較晚期有關。

先前研究顯示，GLN 具有抑制 NF- κ B 活性、降低發炎反應的效用 (Brasse-Lagnel et al., 2010; Lesueur et al., 2012)。GLN 抗發炎之機制包含抑制 p65 核蛋白的表現、抑制 p38 MAPK 的活化以抑制 NF- κ B 路徑的傳遞，及抑制 STAT 訊息路徑及減少 COX-2 的表達等以抑制發炎反應 (Brasse-Lagnel et al., 2010)。此外，GLN 可降低 LPS 處理大鼠腸道中 TLR4、MyD88 的蛋白質表達來減輕發炎反應，促進腸道恢復 (Kretzmann et al., 2008)。IMQ 誘導同樣促使 MyD88 路徑活化，因此 GLN 的補充對於乾癬小鼠皮膚發炎及損傷具有之保護效果，可能是透過抑制 NF- κ B 路徑或 STAT 路徑來產生。然而本研究未分析 GLN 補充是否經由抑制皮膚 NF- κ B 表現量或相關訊息傳遞路徑而具抗發炎作用，仍有待未來研究探討之。

第三節、GLN 補充對於小鼠先天性免疫細胞之影響

當皮膚受損、外在病原體入侵時，體內會迅速產生先天性免疫反應以避免感染的發生 (Sweeney et al., 2011)。這時皮膚的先天性免疫細胞如：嗜中性白血球、Mo、M Φ 和 DC 之數量會增加，以利在皮膚處執行免疫反應，維護組織的完整性 (Gong & Wang, 2021)。在先天性免疫細胞之中，嗜中性白血球會在乾癬皮膚受損的第一

時間聚集，進行外來微生物的清除，但過度增生的嗜中性白血球會造成組織受損，並放大患部的發炎反應 (Herster et al., 2020)。根據 Katayama 等人 (2018) 的研究，人類乾癬疾病的持續發展是源自於嗜中性白血球的不斷浸潤；而使用 ticlopidine 所引起的顆粒性白血球缺乏症 (agranulocytosis) 能改善尋常型乾癬，在患者血液嗜中性白血球數量降低的期間，皮膚損傷也相對的獲得改善，而當嗜中性白血球數量回升之後，皮膚受損又再次出現 (Toichi et al., 2000)。此外，在 IMQ 誘導乾癬的動物模式中，使用 CI-amidine 來抑制 NET 並降低皮膚中嗜中性白血球的數量，可觀察到小鼠的皮膚損傷降低 (Shao et al., 2019)。綜合先前研究，嗜中性白血球的數量與乾癬的皮膚損傷具有重要的關聯性。

使用 IMQ 誘導會產生皮膚發炎反應，增加皮膚嗜中性白血球趨化因子 CXCL1 的基因表現量 (Cho et al., 2012)，引起嗜中性白血球浸潤於皮膚 (Walter et al., 2013)。但本實驗中 GLN 補充降低了皮膚中 CXCL1 的 mRNA 表現量 (圖 4-8C)，且降低了乾癬小鼠血液及皮膚中的嗜中性白血球數量 (圖 4-10A 及 4-6A)，在皮膚的免疫化學染色中也觀察到乾癬小鼠出現嗜中性白血球 Ly6G 的陽性反應，而 GLN 補充則相對較少 (圖 4-7)，顯示 GLN 補充改善小鼠的皮膚免疫細胞浸潤。在過去的研究中同樣發現 GLN 補充對於嗜中性白血球的過度聚集具有保護效果，於創傷手術前給予大鼠 GLN 補充可降低嗜中性白血球浸潤肺組織，避免局部組織過度損傷 (Murphy et al., 2012)；補充 GLN 可減少 LPS 誘導的感染小鼠肺部嗜中性白血球數量及降低肺部與血液中的 ICAM-1 及 CXCL2 (Santos et al., 2019)。相反的，若體內 GLN 不足則增加嗜中性白血球聚集，如引起哮喘小鼠的氣管發炎與嗜中性白血球浸潤 (Kim et al., 2022)。GLN 補充降低嗜中性白血球聚集的可能機制包含降低 CXCL1 (Lee et al., 2012) 及 CXCL2 (Santos et al., 2019) 的表現，降低 ICAM-1 (Guigui, 2011)、降低嗜中性白血球表面 CD11b 的表現 (Santos et al., 2019)、更有研究顯示 GLN 可活化 (Mitogen- Activated Protein Kinase Phosphatase-1, MKP-1) 使 p38MAPK 失活 (Ayush et al., 2016)，降低 cPLA2 的產生，以減少氣管中嗜中性白血球聚集 (Lee et al., 2012)，減緩發炎反應。嗜中性白血球中存在 GLN 代謝所需的 GLS，故嗜中性白血球的功能受到 GLN 調節 (Lai et al., 2014) 且補充 GLN 可抑制 LPS 刺激的嗜中性白血球中 TNF- α 的產生 (Pithon-Curi et al., 2002)，顯示 GLN 具有抑制嗜中性白血球活性及浸潤的能力。

除了嗜中性白血球外，促發炎 Mo 會在體內發炎反應發生時，從血液遷移至組

織並分化成 MØ 以利病原菌的清除，至於抗發炎 Mo 則分泌抗發炎細胞激素，進行組織修復和免疫調節 (Wolf et al., 2019)。許多研究指出補充 GLN 具有調節 Mo 比例的能力，如對敗血症小鼠進行腹腔注射補充 GLN (0.5 g/kg BW) 在術後第四天時血中抗發炎 Mo 比例提升，肌肉中 Mo 比例下降 (Hou et al., 2021)；或對 LPS 引起內發毒血症 (endotoxemia) 的小鼠進行靜脈注射補充 GLN (0.75 mg/kg)，可降低小鼠的氣管及腹腔 Mo 浸潤 (Santos et al., 2019)，上述結果顯示 GLN 具有抑制 Mo 浸潤至組織之效果。而 GLN 抑制 Mo 遷移到組織的可能途徑是透過減少 CD11b 的表達及降低 ICAM-1、血管細胞黏著蛋白 (Vascular cell adhesion protein 1, VCAM-1) 和血小板內皮細胞黏著分子 (Platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1) 的基因表達而改善組織的免疫細胞浸潤 (Santos et al., 2019)。在本實驗中，乾癬小鼠血液及皮膚中促發炎的 Mo 和血液中抗發炎的 Mo 皆顯著提升 (圖 4-10B、4-6B 及 4-10C)，和先前的研究結果相符 (Terhorst et al., 2015)。而補充 GLN 對於小鼠血液及皮膚中的 Mo 則未顯示出調節作用，推測是給予 GLN 之途徑不同所導致。

第四節、GLN 補充對於小鼠適應性免疫細胞之影響

適應性免疫反應由淋巴球 T 細胞及 B 細胞參與，過往乾癬被認為是 T 細胞相關的發炎性疾病，然而近期 B 細胞也被認為參與了疾病的發展過程 (Mizumaki et al., 2021)。脾臟則是人體最大的次級淋巴器官，可清除血液中受損的細胞以及協助體內對抗感染，並存有豐富的 T 細胞及 B 細胞，在適應性免疫反應上具有重要的貢獻 (Lewis et al., 2019)，並可作為評估全身性免疫反應的指標之一 (Barrea et al., 2018)。本實驗中乾癬小鼠發生脾臟腫大 (圖 4-9)，與文獻結果相符 (Badanthadka et al., 2021)，而 GLN 的補充並沒有改善此一現象。

而 B 細胞的功能方面，除了可作為 APC 進行抗原呈現外，還具有免疫記憶、產生抗體及幫助 T 細胞分化為 T 細胞次群的作用 (Finkelman et al., 1992; Harris et al., 2000)。根據 Fetter 等人 (2020) 的研究，B 細胞可和 T 細胞等免疫細胞在皮膚處聚集，形成淋巴結構，稱為三級淋巴結構 (tertiary lymphoid structures, TLS)。先前研究在 IMQ 誘導後第 6 天的乾癬小鼠血液中觀察到 B 細胞比例的下降 (Surcel et al., 2019)，本實驗同樣觀察到乾癬小鼠血液中的 B 細胞比例下降 (圖 4-11B)，推測可能和皮膚患部的發炎反應旺盛，使 B 細胞和 T 細胞聚集於皮膚處形成三級淋巴結構有關，而 GLN 補充使乾癬小鼠的皮膚發炎反應減輕，因此停留於血液的

B 細胞比例較高，但本實驗並未對皮膚處的 B 細胞進行分析，仍需未來研究證實。

T 細胞的異常增生，尤其是 T 細胞次群中的 Th17 細胞，是乾癬重要的致病因素。Th17 細胞在細胞激素 IL-23 的協助之下產生 IL-17A，促進乾癬發炎反應進展，而 ROR γ t 是 Th17 細胞產生 IL-17A 的重要轉錄因子 (Di Cesare et al., 2009; Li et al., 2020)。在先前的研究中發現 IMQ 誘導會使小鼠皮膚中的 CD3⁺ T 細胞顯著上升 (Van der Fits et al., 2009; Yang et al., 2019)。目前研究已知，體內 Th17 細胞及 Treg 細胞兩者比例失去平衡時會造成免疫反應傾向發炎狀態，並與乾癬、紅斑性狼瘡、風濕性關節炎、發炎性腸道疾病、多發性硬化症 (Multiple sclerosis) 及代謝症候群等疾病相關 (Knochelmann et al., 2018; Lee, 2018; Zhang et al., 2021)。在本實驗中，乾癬小鼠血液 T 細胞比例下降而皮膚中 $\alpha\beta$ T 細胞比例增加；GLN 補充不影響乾癬小鼠血液中 T 細胞比例 (圖 4-11A)，然而皮膚中 $\alpha\beta$ T 細胞比例呈下降趨勢 (圖 4-4B)，且皮膚組織的免疫化學染色中 CD3⁺T 細胞的陽性反應較少 (圖 4-5)，推測 GLN 補充具有抑制乾癬小鼠皮膚處 T 細胞聚集之潛在效益。GLN 可能藉由降低 ICAM-1 (Guiqi, 2011) 或 T 細胞趨化因子 CCL20、CCL27 之表現，減緩 T 細胞遷移至皮膚，但本實驗並未對 CCL20 及 CCL27 進行分析，仍需更多實驗去證實此一假說。

本實驗中乾癬小鼠脾臟內 ROR γ t 之 mRNA 表現量顯著下降，GLN 的補充使 ROR γ t 表現量回升 (圖 4-13B)，脾臟 IL-17A 的表現量方面，由於個體差異較大，各組間未達到顯著差異，然而補充 GLN 組有增加的趨勢 (圖 4-13A)；同時，乾癬小鼠血液中 Th17 細胞比例上升，而 GLN 的補充降低了此現象，推測 GLN 可減少脾臟中的 Th17 細胞進入循環血中。而 GLN 補充組皮膚中的 IL-17A 表現量也下降，顯示聚集於皮膚處的 Th17 細胞比例較低 (圖 4-8B)。

綜合以上結果推論，GLN 可藉由降低血液 Th17 細胞比例，並減少 Th17 細胞遷移至皮膚，進而減緩 IMQ 誘導的乾癬樣皮膚發炎。根據過往的研究，GLN 補充具有降低 Th17 細胞比例的效果 (Jiang et al., 2018)，而本實驗之結果再次印證 GLN 對於乾癬小鼠體內 Th17 細胞及所產生之 IL-17A 具有抑制作用。乾癬會造成小鼠血液 Treg 細胞比例上升，然而 GLN 補充不影響血液中 Treg 細胞比例 (圖 4-12)。本研究觀察到 GLN 補充對乾癬小鼠 Treg 細胞比例不具調節效果，顯示 GLN 主要是藉由降低 Th17 細胞比例來改善 Th17/Treg 平衡，以抑制乾癬之發炎反應，改善皮膚病變。

人體皮膚的 DC、MΦ 及角質細胞皆會表現 IL-23，而 IL-23 會協助 T 細胞分化為 Th17 細胞並分泌 IL-17，促進皮膚的發炎反應產生 (Hawkes et al., 2018)，同時 IL-23 也被指出與小鼠皮膚的表皮層厚度增加有關 (Chan et al., 2006; Rizzo et al., 2011)。本研究乾癬小鼠皮膚中 IL-23 及 IL-17A 之 mRNA 表現量皆上升，顯示乾癬的成功誘導，而 GLN 的補充顯著降低這兩個 Th17 細胞相關的細胞激素 (圖 4-8AB)，與預期假說相符。本研究中補充 GLN 的乾癬小鼠皮膚 IL-23 之 mRNA 表現量較低 (圖 4-8B)，且背部皮膚表皮層厚度較薄 (圖 4-3B)，因此 GLN 可能透過降低皮膚 IL-23 表現量來避免小鼠皮膚的表皮層增厚。在先前的研究中指出 GLN 補充可降低 streptozotocin 誘導糖尿病大鼠血中單核細胞 (mononuclear cell) 的 IL-23 表達 (Tsai, Yeh, et al., 2012)，且 GLN 的補充可以降低 ICAM-1、VCAM-1 和 PECAM-1 的表達，推測 GLN 補充應可減少皮膚中 Mo 及所分化的 MΦ 比例，進而減少 IL-23 的表現量。但在本實驗中並未觀察到皮膚 Mo 比例下降，故推論 GLN 是透過降低角質細胞或 DC 的增生而減少 IL-23 的表現量。

本研究以 GLN 取代 AIN-93G 飼料中 30%總含氮量的情況下，初探此 GLN 補充方式是否具有改善 IMQ 誘導小鼠乾癬樣皮膚炎的效果，目前的證據顯示此劑量的有效性，但較其他研究所採用之 GLN 濃度為高。如 Hsiung 等人 (2014) 採用佔 25%的總胺基酸氮的 GLN 改善 DSS 誘導小鼠 Th 相關細胞激素的表現量；Kew 等人 (1999) 採用 24.6%的總胺基酸氮的 GLN 證實其會增加小鼠細胞激素 IL-2 及 IL-10 的分泌，未來研究宜再進一步降低劑量，探討更具效益的 GLN 補充量。

乾癬之治療不易，乾癬治療藥物或光療法的使用具有副作用與場地要求，本研究透過膳食給予 GLN 改善小鼠的乾癬樣皮膚炎，是目前唯一針對乾癬疾病進行 GLN 補充的研究，且膳食給予 GLN 的方式方便性與安全性較高，替乾癬之膳食補充劑研究提供相關證據，具有其優勢。但本研究仍具有幾項限制 (一) 由於實驗執行人力有限，在實驗設計的動物飼養隻數及組別的規劃上較為侷限。條件允許下可增加正控制組 (positive control) 以排除潛在的實驗缺陷，減少可能的實驗變數。(二) 小鼠剃毛之後會重新開始毛髮的生長週期，新生的毛髮與黑色的皮膚外觀會影響 PASI 評分，但仍可就皮膚的免疫細胞比例、細胞激素、皮膚厚度、組織病變程度等結果進行乾癬嚴重度的判斷。以上研究限制與規畫建議提供後續研究人員參考，以期此主題之研究能在未來更趨完美。

第六章、結論

由本實驗結果顯示，將 GLN 透過飲食補充給 IMQ 誘發乾癬樣皮膚炎的小鼠，會使得小鼠血液中 Th17 細胞比例及嗜中性白血球比例下降、B 淋巴球上升並降低脾臟中促發炎因子之表現量；在小鼠背部皮膚組織方面可以降低 PASI 得分、減緩表皮層厚度增加、改善皮膚組織損傷情形，並且降低皮膚中嗜中性白血球比例、減少促發炎細胞激素及趨化因子的表現量。GLN 皮膚組織損傷的保護作用可能與降低 Th17 細胞比例、嗜中性白血球比例及促發炎相關因子有關，本實驗結果證實 GLN 的飲食補充可減緩 IMQ 誘導乾癬樣皮膚炎小鼠的皮膚損傷。



第七章、參考文獻

- 賴明德等合著(2014)。新編人體解剖學 Current human anatomy。臺中市:華格那企業
- Abboud, K. Y., Reis, S. K., Martelli, M. E., Zordão, O. P., Tannihão, F., de Souza, A. Z. Z., Assalin, H. B., Guadagnini, D., Rocha, G. Z., & Saad, M. J. A. (2019). Oral glutamine supplementation reduces obesity, pro-inflammatory markers, and improves insulin sensitivity in DIO wistar rats and reduces waist circumference in overweight and obese humans. *Nutrients*, 11(3), 536.
- Abdallah, F., Mijouin, L., & Pichon, C. (2017). Skin immune landscape: inside and outside the organism. *Mediators of inflammation*, 2017.
- Afshar, M., & Gallo, R. L. (2013). Innate immune defense system of the skin. *Veterinary dermatology*, 24(1), 32-e39.
- Akbaraly, T. N., Shipley, M. J., Ferrie, J. E., Virtanen, M., Lowe, G., Hamer, M., & Kivimaki, M. (2015). Long-term adherence to healthy dietary guidelines and chronic inflammation in the prospective Whitehall II study. *The American journal of medicine*, 128(2), 152-160. e154.
- Alvarez, P., & Jensen, L. E. (2016). Imiquimod treatment causes systemic disease in mice resembling generalized pustular psoriasis in an IL-1 and IL-36 dependent manner. *Mediators of inflammation*, 2016.
- Araujo, L., Khim, P., Mkhikian, H., Mortales, C.-L., & Demetriou, M. (2017). Glycolysis and glutaminolysis cooperatively control T cell function by limiting metabolite supply to N-glycosylation. *Elife*, 6, e21330.
- Armstrong, A. W., Mehta, M. D., Schupp, C. W., Gondo, G. C., Bell, S. J., & Griffiths, C. E. (2021). Psoriasis prevalence in adults in the United States. *JAMA dermatology*, 157(8), 940-946.
- Armstrong, A. W., & Read, C. (2020). Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of psoriasis: a review. *Jama*, 323(19), 1945-1960.
- Armstrong, A. W., Wu, J., Johnson, M. A., Grapov, D., Azizi, B., Dhillon, J., & Fiehn, O. (2014). Metabolomics in psoriatic disease: pilot study reveals metabolite differences in psoriasis and psoriatic arthritis. *F1000Research*, 3.
- Ashcroft, F. J., Mahammad, N., Midtun Fletekvål, H., J. Feuerherm, A., & Johansen, B. (2020). cPLA2 α enzyme inhibition attenuates inflammation and keratinocyte proliferation. *Biomolecules*, 10(10), 1402.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elaine, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., & Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*, 317(5838), 666-670.
- Ayush, O., Jin, Z. W., Kim, H.-K., Shin, Y.-R., Im, S.-Y., & Lee, H.-K. (2016). Glutamine up-regulates MAPK phosphatase-1 induction via activation of Ca²⁺→ERK cascade pathway. *Biochemistry and biophysics reports*, 7, 10-19.
- Badanthadka, M., D'Souza, L., & Salwa, F. (2021). Strain specific response of mice to IMQ-induced psoriasis. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 32(5), 959-968.
- Balato, N., Di Costanzo, L., Patruno, C., Patri, A., & Ayala, F. (2013). Effect of weather and environmental factors on the clinical course of psoriasis. *Occupational and environmental medicine*, 70(8), 600-600.
- Balato, N., Napolitano, M., Ayala, F., Patruno, C., Megna, M., & Tarantino, G. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease, spleen and psoriasis: New aspects of low-grade chronic inflammation. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21(22), 6892.
- Baliwag, J., Barnes, D. H., & Johnston, A. (2015). Cytokines in psoriasis. *Cytokine*, 73(2), 342-350.

- Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., & Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in dermatology*, 30(3), 257-262.
- Barrea, L., Balato, N., Di Somma, C., Macchia, P. E., Napolitano, M., Savanelli, M. C., Esposito, K., Colao, A., & Savastano, S. (2015). Nutrition and psoriasis: is there any association between the severity of the disease and adherence to the Mediterranean diet? *Journal of translational medicine*, 13(1), 1-10.
- Barrea, L., Di Somma, C., Muscogiuri, G., Tarantino, G., Tenore, G. C., Orio, F., Colao, A., & Savastano, S. (2018). Nutrition, inflammation and liver-spleen axis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(18), 3141-3158.
- Behfar, S., Hassanshahi, G., Nazari, A., & Khorramdelazad, H. (2018). A brief look at the role of monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in the pathophysiology of psoriasis. *Cytokine*, 110, 226-231.
- Bejarano, J. J. R., & Valdecantos, W. C. (2013). Psoriasis as autoinflammatory disease. *Dermatologic clinics*, 31(3), 445-460.
- Bernatchez, S. F., & Bichel, J. (2022). The science of skin: measuring damage and assessing risk. *Advances in Wound Care*(ja).
- Bhatia, B. K., Millsop, J. W., Debbaneh, M., Koo, J., Linos, E., & Liao, W. (2014). Diet and psoriasis, part II: celiac disease and role of a gluten-free diet. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71(2), 350-358.
- Blauvelt, A., & Chiricozzi, A. (2018). The immunologic role of IL-17 in psoriasis and psoriatic arthritis pathogenesis. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 55(3), 379-390.
- Boehncke, W.-H. (2018). Systemic inflammation and cardiovascular comorbidity in psoriasis patients: causes and consequences. *Frontiers in immunology*, 9, 579.
- Boehncke, W. H., & Schön, M. P. (2015). Psoriasis. *Lancet*, 386(9997), 983-994.
- Brasse-Lagnel, C. G., Lavoinne, A. M., & Husson, A. S. (2010). Amino acid regulation of mammalian gene expression in the intestine. *Biochimie*, 92(7), 729-735.
- Brasse-Lagnel, C., Lavoinne, A., & Husson, A. (2009). Control of mammalian gene expression by amino acids, especially glutamine. *The FEBS journal*, 276(7), 1826-1844.
- Cai, Y., Fleming, C., & Yan, J. (2012). New insights of T cells in the pathogenesis of psoriasis. *Cellular & molecular immunology*, 9(4), 302-309.
- Cai, Y., Shen, X., Ding, C., Qi, C., Li, K., Li, X., Jala, V. R., Zhang, H.-g., Wang, T., & Zheng, J. (2011). Pivotal role of dermal IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in skin inflammation. *Immunity*, 35(4), 596-610.
- Calleja-Agius, J., Muscat-Baron, Y., & Brincat, M. P. (2007). Skin ageing. *Menopause international*, 13(2), 60-64.
- Carr, E. L., Kelman, A., Wu, G. S., Gopaul, R., Senkevitch, E., Aghvanyan, A., Turay, A. M., & Frauwirth, K. A. (2010). Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. *The Journal of Immunology*, 185(2), 1037-1044.
- Carroll, J. M., Cronnpton, T., Seery, J. P., & Watt, F. M. (1997). Transgenic mice expressing IFN- γ in the epidermis have eczema, hair hypopigmentation, and hair loss. *Journal of investigative dermatology*, 108(4), 412-422.
- Chan, J. R., Blumenschein, W., Murphy, E., Diveu, C., Wiekowski, M., Abbondanzo, S., Lucian, L., Geissler, R., Brodie, S., & Kimball, A. B. (2006). IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *The Journal of experimental medicine*, 203(12), 2577-2587.
- Chang, W., Yang, K., & Shaio, M. (1999). Lymphocyte proliferation modulated by

- glutamine: involved in the endogenous redox reaction. *Clinical & Experimental Immunology*, 117(3), 482-488.
- Chen, C., Hou, G., Zeng, C., Ren, Y., Chen, X., & Peng, C. (2021). Metabolomic profiling reveals amino acid and carnitine alterations as metabolic signatures in psoriasis. *Theranostics*, 11(2), 754.
- Chen, Y., Hu, Y., Zhou, X., Zhao, Z., Yu, Q., Chen, Z., Wang, Y., Xu, P., Yu, Z., & Guo, C. (2022). Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells ameliorate psoriasis-like dermatitis by suppressing IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells. *Cell and Tissue Research*, 388(3), 549-563.
- Chiu, H.-Y., Wang, T.-S., Chen, P.-H., Hsu, S.-H., Tsai, Y.-C., & Tsai, T.-F. (2018). Psoriasis in Taiwan: From epidemiology to new treatments. *Dermatologica Sinica*, 36(3), 115-123.
- Cho, K.-A., Park, M., Kim, Y.-H., Ryu, K.-H., & Woo, S.-Y. (2017). Mesenchymal stem cells inhibit RANK-RANKL interactions between osteoclasts and Th17 cells via osteoprotegerin activity. *Oncotarget*, 8(48), 83419.
- Cho, K.-A., Suh, J. W., Lee, K. H., Kang, J. L., & Woo, S.-Y. (2012). IL-17 and IL-22 enhance skin inflammation by stimulating the secretion of IL-1 β by keratinocytes via the ROS-NLRP3-caspase-1 pathway. *International immunology*, 24(3), 147-158.
- Chu, C.-C., Hou, Y.-C., Pai, M.-H., Chao, C.-J., & Yeh, S.-L. (2012). Pretreatment with alanyl-glutamine suppresses T-helper-cell-associated cytokine expression and reduces inflammatory responses in mice with acute DSS-induced colitis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(9), 1092-1099.
- Clark, R. A. (2010). Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *Journal of investigative dermatology*, 130(2), 362-370.
- Clark, R. A., Chong, B., Mirchandani, N., Brinster, N. K., Yamanaka, K.-i., Dowgiert, R. K., & Kupper, T. S. (2006). The vast majority of CLA⁺ T cells are resident in normal skin. *The Journal of Immunology*, 176(7), 4431-4439.
- Cronkite, D. A., & Strutt, T. M. (2018). The regulation of inflammation by innate and adaptive lymphocytes. *Journal of Immunology Research*, 2018.
- Cruzat, V., Macedo Rogero, M., Noel Keane, K., Curi, R., & Newsholme, P. (2018). Glutamine: metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. *Nutrients*, 10(11), 1564.
- Cruzat, V. F., Krause, M., & Newsholme, P. (2014). Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise. *Journal of the international Society of Sports Nutrition*, 11(1), 61.
- Cruzat, V. F., & Tirapegui, J. (2009). Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. *Nutrition*, 25(4), 428-435.
- Danno, K., & Sugie, N. (1998). Combination therapy with low-dose etretinate and eicosapentaenoic acid for psoriasis vulgaris. *The Journal of dermatology*, 25(11), 703-705.
- de Oliveira, D. C., da Silva Lima, F., Sartori, T., Santos, A. C. A., Rogero, M. M., & Fock, R. A. (2016). Glutamine metabolism and its effects on immune response: molecular mechanism and gene expression. *Nutrire*, 41(1), 1-10.
- Deng, Y., Chang, C., & Lu, Q. (2016). The inflammatory response in psoriasis: a comprehensive review. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 50(3), 377-389.
- Di Cesare, A., Di Meglio, P., & Nestle, F. O. (2009). The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *Journal of investigative dermatology*, 129(6), 1339-1350.
- Egawa, G., & Kabashima, K. (2020). Role of lymphoid structure in skin immunity.

- Estruch, R., Ros, E., & Martínez-González, M. A. (2013). Mediterranean diet for primary prevention of cardiovascular disease. *The New England journal of medicine*, 369(7), 676-677.
- Farci, F., & Mahabal, G. D. (2021). Hyperkeratosis. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Fetter, T., Niebel, D., Braegelmann, C., & Wenzel, J. (2020). Skin-associated B cells in the pathogenesis of cutaneous autoimmune diseases—implications for therapeutic approaches. *Cells*, 9(12), 2627.
- Finkelman, F., Lees, A., & Morris, S. (1992). Antigen presentation by B lymphocytes to CD4+ T lymphocytes in vivo: importance for B lymphocyte and T lymphocyte activation. *Seminars in immunology*.
- Flutter, B., & Nestle, F. O. (2013). TLRs to cytokines: mechanistic insights from the imiquimod mouse model of psoriasis. *European journal of immunology*, 43(12), 3138-3146.
- Furue, K., Ito, T., Tsuji, G., Nakahara, T., & Furue, M. (2020). The CCL20 and CCR6 axis in psoriasis. *Scandinavian journal of immunology*, 91(3), e12846.
- Furue, M., Furue, K., Tsuji, G., & Nakahara, T. (2020). Interleukin-17A and keratinocytes in psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1275.
- Gaies, E., Jebabli, N., Trabelsi, S., Salouage, I., Charfi, R., Lakhal, M., & Klouz, A. (2012). Methotrexate side effects: review article. *J Drug Metab Toxicol*, 3(4), 1-5.
- GAÁL, J., Lakos, G., Szodoray, P., Kiss, J., HORVÁTH, I., Horkay, E., NAGY, G., & SZEGEDI, A. (2009). Immunological and clinical effects of alphacalcidol in patients with psoriatic arthropathy: results of an open, follow-up pilot study. *Acta dermato-venereologica*, 89(2), 140-144.
- Gao, J., Chen, F., Fang, H., Mi, J., Qi, Q., & Yang, M. (2020). Daphnetin inhibits proliferation and inflammatory response in human HaCaT keratinocytes and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesion in mice. *Biological research*, 53.
- Gao, M., Monian, P., Quadri, N., Ramasamy, R., & Jiang, X. (2015). Glutaminolysis and transferrin regulate ferroptosis. *Molecular cell*, 59(2), 298-308.
- Gelfand, J. M., Neimann, A. L., Shin, D. B., Wang, X., Margolis, D. J., & Troxel, A. B. (2006). Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis. *Jama*, 296(14), 1735-1741.
- Ghoreschi, K., Balato, A., Enerbäck, C., & Sabat, R. (2021). Therapeutics targeting the IL-23 and IL-17 pathway in psoriasis. *The Lancet*, 397(10275), 754-766.
- Golden, J. B., Groft, S. G., Squeri, M. V., Debanne, S. M., Ward, N. L., McCormick, T. S., & Cooper, K. D. (2015). Chronic psoriatic skin inflammation leads to increased monocyte adhesion and aggregation. *The Journal of Immunology*, 195(5), 2006-2018.
- Gong, X., & Wang, W. (2021). Profiles of innate immune cell infiltration and related Core genes in psoriasis. *BioMed Research International*, 2021.
- Goodman, W., Massari, J., McCormick, T., & Cooper, K. (2007). Does IL-6 in psoriatic lesions reverse the ability of regulatory T cells to suppress effector T cell proliferation? *Journal of investigative dermatology*.
- Goodman, W. A., Levine, A. D., Massari, J. V., Sugiyama, H., McCormick, T. S., & Cooper, K. D. (2009). IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 183(5), 3170-3176.
- Grine, L., Steeland, S., Van Ryckeghem, S., Ballegeer, M., Lienenklaus, S., Weiss, S., Sanders, N. N., Vandenbroucke, R. E., & Libert, C. (2016). Topical imiquimod yields systemic effects due to unintended oral uptake. *Scientific reports*, 6(1), 1-6.

- Gruber, F., Marchetti-Deschmann, M., Kremslehner, C., & Schosserer, M. (2021). The skin epilipidome in stress, aging, and inflammation. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 607076.
- Guiqi, G. (2011). Pre-treatment with glutamine attenuates lung injury in rats subjected to intestinal ischaemia–reperfusion. *Injury*, *42*(1), 72-77.
- Ha, H.-L., Wang, H., Pisitkun, P., Kim, J.-C., Tassi, I., Tang, W., Morasso, M. I., Udey, M. C., & Siebenlist, U. (2014). IL-17 drives psoriatic inflammation via distinct, target cell-specific mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(33), E3422-E3431.
- Harada, K., Ferdous, T., Kobayashi, H., & Ueyama, Y. (2018). Elemental diet accelerates the recovery from oral mucositis and dermatitis induced by 5-fluorouracil through the induction of fibroblast growth factor 2. *Integrative Cancer Therapies*, *17*(2), 423-430.
- Harris, D. P., Haynes, L., Sayles, P. C., Duso, D. K., Eaton, S. M., Lepak, N. M., Johnson, L. L., Swain, S. L., & Lund, F. E. (2000). Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nature immunology*, *1*(6), 475-482.
- Havran, W. (2002). A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science*.
- Havran, W. L., & Jameson, J. M. (2010). Epidermal T cells and wound healing. *The Journal of Immunology*, *184*(10), 5423-5428.
- Hawkes, J. E., Gudjonsson, J. E., & Ward, N. L. (2017). The snowballing literature on imiquimod-induced skin inflammation in mice: a critical appraisal. *Journal of investigative dermatology*, *137*(3), 546-549.
- Hawkes, J. E., Yan, B. Y., Chan, T. C., & Krueger, J. G. (2018). Discovery of the IL-23/IL-17 signaling pathway and the treatment of psoriasis. *The Journal of Immunology*, *201*(6), 1605-1613.
- Hayday, A., & Tigelaar, R. (2003). Immunoregulation in the tissues by $\gamma\delta$ T cells. *Nature Reviews Immunology*, *3*(3), 233-242.
- Heck, T. G., Schöler, C. M., & de Bittencourt, P. I. H. (2011). HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? *Cell biochemistry and function*, *29*(3), 215-226.
- Herster, F., Bittner, Z., Archer, N. K., Dickhöfer, S., Eisel, D., Eigenbrod, T., Knorpp, T., Schneiderhan-Marra, N., Löffler, M. W., & Kalbacher, H. (2020). Neutrophil extracellular trap-associated RNA and LL37 enable self-amplifying inflammation in psoriasis. *Nature communications*, *11*(1), 1-13.
- Hile, G. A., & Kahlenberg, J. M. (2021). Immunopathogenesis of skin injury in systemic lupus erythematosus. *Current Opinion in Rheumatology*, *33*(2), 173-180.
- Horváth, S., Komlódi, R., Perkecz, A., Pintér, E., Gyulai, R., & Kemény, Á. (2019). Methodological refinement of Aldara-induced psoriasiform dermatitis model in mice. *Scientific reports*, *9*(1), 1-8.
- Hou, Y.-C., Pai, M.-H., Wu, J.-M., Yang, P.-J., Lee, P.-C., Chen, K.-Y., Yeh, S.-L., & Lin, M.-T. (2021). Protective effects of glutamine and leucine supplementation on sepsis-induced skeletal muscle injuries. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(23), 13003.
- Hsiung, Y.-C., Liu, J.-J., Hou, Y.-C., Yeh, C.-L., & Yeh, S.-L. (2014). Effects of dietary glutamine on the homeostasis of CD4⁺ T cells in mice with dextran sulfate sodium-induced acute colitis. *PLoS One*, *9*(1), e84410.
- Hu, W., Shang, R., Yang, J., Chen, C., Liu, Z., Liang, G., He, W., & Luo, G. (2022). Skin $\gamma\delta$ T Cells and Their Function in Wound Healing. *Frontiers in immunology*, *13*, 875076-875076.
- Huang, S.-W., Chen, Y.-J., Wang, S.-T., Ho, L.-W., Kao, J.-K., Narita, M., Takahashi, M., Wu, C.-Y., Cheng, H.-Y., & Shieh, J.-J. (2016). Azithromycin impairs TLR7

- signaling in dendritic cells and improves the severity of imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice. *Journal of Dermatological Science*, 84(1), 59-70.
- Im, Y.-N., Lee, Y.-D., Park, J.-S., Kim, H.-K., Im, S.-Y., Song, H.-R., Lee, H.-K., & Han, M.-K. (2018). GPCR Kinase (GRK)-2 is a key negative regulator of itch: l-glutamine attenuates itch via a rapid induction of GRK2 in an ERK-dependent way. *Journal of investigative dermatology*, 138(8), 1834-1842.
- Ingersoll, M. A., Platt, A. M., Potteaux, S., & Randolph, G. J. (2011). Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends in immunology*, 32(10), 470-477.
- Iskandar, I., Parisi, R., Griffiths, C., Ashcroft, D., & Atlas, G. P. (2021). Systematic review examining changes over time and variation in the incidence and prevalence of psoriasis by age and gender. *British Journal of Dermatology*, 184(2), 243-258.
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology*, 16(4), 343-353.
- Jeon, Y.-J., Sah, S. K., Yang, H. S., Lee, J. H., Shin, J., & Kim, T.-Y. (2017). Rhododendrin inhibits toll-like receptor-7-mediated psoriasis-like skin inflammation in mice. *Experimental & Molecular Medicine*, 49(6), e349-e349.
- Jeong, S.-Y., Im, Y. N., Youm, J. Y., Lee, H.-K., & Im, S.-Y. (2018). L-glutamine attenuates DSS-induced colitis via induction of MAPK phosphatase-1. *Nutrients*, 10(3), 288.
- Jiang, S., Yan, W., Wang, S. E., & Baltimore, D. (2018). Let-7 suppresses B cell activation through restricting the availability of necessary nutrients. *Cell metabolism*, 27(2), 393-403. e394.
- Jin, Z. W., Kim, H.-K., Lee, C.-H., Jung, S.-W., Shin, S.-J., Im, S.-Y., Cho, B.-H., & Lee, H.-K. (2012). Glutamine suppresses dinitrophenol fluorobenzene-induced allergic contact dermatitis and itching: inhibition of contact dermatitis by glutamine. *Journal of Dermatological Science*, 67(2), 88-94.
- Kaisho, T., & Akira, S. (2006). Toll-like receptor function and signaling. *Journal of allergy and clinical immunology*, 117(5), 979-987.
- Kamiya, K., Kishimoto, M., Sugai, J., Komine, M., & Ohtsuki, M. (2019). Risk factors for the development of psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4347.
- Kanda, N., Hoashi, T., & Saeki, H. (2020). Nutrition and psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5405.
- Karamani, C., Antoniadou, I. T., Dimou, A., Andreou, E., Kostakis, G., Sideri, A., Vitsos, A., Gkavanozi, A., Sfiniadakis, I., & Skaltsa, H. (2021). Optimization of psoriasis mouse models. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 108, 107054.
- Katayama, H. (2018). Development of psoriasis by continuous neutrophil infiltration into the epidermis. *Experimental dermatology*, 27(10), 1084-1091.
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*, 461.
- Keijsers, R. R., Joosten, I., van Erp, P. E. J., Koenen, H. J., & van de Kerkhof, P. C. (2014). Cellular sources of IL-17 in psoriasis: a paradigm shift? *Experimental dermatology*, 23(11), 799-803.
- Kew, S., Wells, S. M., Yaqoob, P., Wallace, F. A., Miles, E. A., & Calder, P. C. (1999). Dietary glutamine enhances murine T-lymphocyte responsiveness. *The Journal of nutrition*, 129(8), 1524-1531.
- Kim, H. (2011). Glutamine as an immunonutrient. *Yonsei medical journal*, 52(6), 892-897.
- Kim, J., & Krueger, J. G. (2015). The immunopathogenesis of psoriasis. *Dermatologic clinics*, 33(1), 13-23.
- Kim, J. M., Im, Y. N., Chung, Y. J., Youm, J. h., Im, S. Y., Han, M. K., & Lee, H. K.

- (2022). Glutamine deficiency shifts the asthmatic state toward neutrophilic airway inflammation. *Allergy*, 77(4), 1180-1191.
- Kim, M.-H., & Kim, H. (2017). The roles of glutamine in the intestine and its implication in intestinal diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 1051.
- Kim, N., Lee, S., Kang, J., Choi, Y.-A., Lee, B., Kwon, T. K., Jang, Y. H., & Kim, S.-H. (2020). Hispidulin alleviates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation by inhibiting splenic Th1/Th17 cell population and keratinocyte activation. *International Immunopharmacology*, 87, 106767.
- Kjellerup, R. B., Kragballe, K., Iversen, L., & Johansen, C. (2008). Pro-inflammatory cytokine release in keratinocytes is mediated through the MAPK signal-integrating kinases. *Experimental dermatology*, 17(6), 498-504.
- Klicznik, M., Szenes-Nagy, A., Campbell, D., & Gratz, I. (2018). Taking the lead—how keratinocytes orchestrate skin T cell immunity. *Immunology letters*, 200, 43-51.
- Knochelmann, H. M., Dwyer, C. J., Bailey, S. R., Amaya, S. M., Elston, D. M., Mazza-McCrann, J. M., & Paulos, C. M. (2018). When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. *Cellular & molecular immunology*, 15(5), 458-469.
- Knopp, T., Bieler, T., Jung, R., Ringen, J., Molitor, M., Jurda, A., Münzel, T., Waisman, A., Wenzel, P., & Karbach, S. H. (2021). Effects of Dietary Protein Intake on Cutaneous and Systemic Inflammation in Mice with Acute Experimental Psoriasis. *Nutrients*, 13(6), 1897.
- Kobayashi, T., Naik, S., & Nagao, K. (2019). Choreographing immunity in the skin epithelial barrier. *Immunity*, 50(3), 552-565.
- Kok, L., Dijkgraaf, F. E., Urbanus, J., Bresser, K., Vredevoogd, D. W., Cardoso, R. F., Perić, L., Beltman, J. B., & Schumacher, T. N. (2020). A committed tissue-resident memory T cell precursor within the circulating CD8⁺ effector T cell pool. *Journal of Experimental Medicine*, 217(10).
- Kondelkova, K., Vokurková, D., Krejsek, J., Borská, L., Fiala, Z., & Ctírad, A. (2010). Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 53(2), 73-77.
- Kratofil, R. M., Kubes, P., & Deniset, J. F. (2017). Monocyte conversion during inflammation and injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 37(1), 35-42.
- Kraus, R. F., & Gruber, M. A. (2021). Neutrophils—From bone marrow to first-line defense of the innate immune system. *Frontiers in immunology*, 5503.
- Kretzmann, N. A., Fillmann, H., Mauriz, J. L., Marroni, C. A., Marroni, N., González-Gallego, J., & Tuñón, M. J. (2008). Effects of glutamine on proinflammatory gene expression and activation of nuclear factor kappa B and signal transducers and activators of transcription in TNBS-induced colitis. *Inflammatory bowel diseases*, 14(11), 1504-1513.
- Krueger, G., & Ellis, C. N. (2005). Psoriasis—recent advances in understanding its pathogenesis and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53(1), S94-S100.
- Lai, C.-C., Liu, W.-L., & Chen, C.-M. (2014). Glutamine attenuates acute lung injury caused by acid aspiration. *Nutrients*, 6(8), 3101-3116.
- Lai, C.-Y., Su, Y.-W., Lin, K.-I., Hsu, L.-C., & Chuang, T.-H. (2017). Natural modulators of endosomal toll-like receptor-mediated psoriatic skin inflammation. *Journal of Immunology Research*, 2017.
- Langley, R. G., & Ellis, C. N. (2004). Evaluating psoriasis with psoriasis area and severity index, psoriasis global assessment, and lattice system physician's global assessment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 51(4), 563-569.
- Lee, C.-H., Kim, H.-K., Kim, J.-M., Ayush, O., Im, S.-Y., Oh, D.-K., & Lee, H.-K. (2012).

- Glutamine suppresses airway neutrophilia by blocking cytosolic phospholipase A2 via an induction of MAPK phosphatase-1. *The Journal of Immunology*, 189(11), 5139-5146.
- Lee, C., Kim, H., Jeong, J., Lee, Y., Jin, Z. W., Im, S., & Lee, H. (2015). Mechanism of glutamine inhibition of cytosolic phospholipase a2 (cPLA2): Evidence of physical interaction between glutamine-Induced mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and cPLA2. *Clinical & Experimental Immunology*, 180(3), 571-580.
- Lee, G. R. (2018). The balance of Th17 versus Treg cells in autoimmunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 730.
- Leijten, E. F., van Kempen, T. S., Olde Nordkamp, M. A., Pouw, J. N., Kleinrensink, N. J., Vincken, N. L., Mertens, J., Balak, D. M., Verhagen, F. H., & Hartgring, S. A. (2021). Tissue-Resident Memory CD8+ T Cells From Skin Differentiate Psoriatic Arthritis From Psoriasis. *Arthritis & Rheumatology*, 73(7), 1220-1232.
- Lesueur, C., Bôle-Feysot, C., Bekri, S., Husson, A., Lavoinnie, A., & Brasse-Lagnel, C. (2012). Glutamine induces nuclear degradation of the NF- κ B p65 subunit in Caco-2/TC7 cells. *Biochimie*, 94(3), 806-815.
- Lewis, S. M., Williams, A., & Eisenbarth, S. C. (2019). Structure and function of the immune system in the spleen. *Science immunology*, 4(33), eaau6085.
- Li, B., Huang, L., Lv, P., Li, X., Liu, G., Chen, Y., Wang, Z., Qian, X., Shen, Y., & Li, Y. (2020). The role of Th17 cells in psoriasis. *Immunologic research*, 68(5), 296-309.
- Li, D., & Wu, M. (2021). Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 1-24.
- Li, P., Yin, Y.-L., Li, D., Kim, S. W., & Wu, G. (2007). Amino acids and immune function. *British Journal of Nutrition*, 98(2), 237-252.
- Li, Y., Zhang, G., Chen, M., Tong, M., Zhao, M., Tang, F., Xiao, R., & Wen, H. (2019). Rutaecarpine inhibited imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis via inhibiting the NF- κ B and TLR7 pathways in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 1876-1883.
- Li, Z. J., Sohn, K.-C., Choi, D.-K., Shi, G., Hong, D., Lee, H.-E., Whang, K. U., Lee, Y. H., Im, M., & Lee, Y. (2013). Roles of TLR7 in activation of NF- κ B signaling of keratinocytes by imiquimod. *PLoS One*, 8(10), e77159.
- Liang, Y., Sarkar, M. K., Tsoi, L. C., & Gudjonsson, J. E. (2017). Psoriasis: a mixed autoimmune and autoinflammatory disease. *Current opinion in immunology*, 49, 1-8.
- Liboni, K., Li, N., & Neu, J. (2004). Mechanism of glutamine-mediated amelioration of lipopolysaccharide-induced IL-8 production in Caco-2 cells. *Cytokine*, 26(2), 57-65.
- Lin, A. M., Rubin, C. J., Khandpur, R., Wang, J. Y., Riblett, M., Yalavarthi, S., Villanueva, E. C., Shah, P., Kaplan, M. J., & Bruce, A. T. (2011). Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *The Journal of Immunology*, 187(1), 490-500.
- Lin, Y. L., Liang, Y. C., Lee, S. S., & Chiang, B. L. (2005). Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of leukocyte biology*, 78(2), 533-543.
- Liu, X.-t., Shi, Z.-r., Lu, S.-y., Hong, D., Qiu, X.-n., Tan, G.-z., Xiong, H., Guo, Q., & Wang, L. (2022). Enhanced Migratory Ability of Neutrophils Toward Epidermis Contributes to the Development of Psoriasis via Crosstalk With Keratinocytes by Releasing IL-17A. *Frontiers in immunology*, 13.
- Lowes, M. A., Suarez-Farinas, M., & Krueger, J. G. (2014). Immunology of psoriasis. *Annual review of immunology*, 32, 227.

- Lucius, K. (2022). Diet and Nutritional Supplements for Psoriasis. *Journal name: Integrative and Complementary Therapies*, 28(1), 43-50.
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4⁺ T cells: differentiation and functions. *Clinical and developmental immunology*, 2012.
- Luisi, M. L. E., Lucarini, L., Biffi, B., Rafanelli, E., Pietramellara, G., Durante, M., Vidali, S., Provensi, G., Madiati, S., & Gheri, C. F. (2019). Effect of Mediterranean diet enriched in high quality extra virgin olive oil on oxidative stress, inflammation and gut microbiota in obese and normal weight adult subjects. *Frontiers in pharmacology*, 10, 1366.
- Müller-Röver, S., Foitzik, K., Paus, R., Handjiski, B., van der Veen, C., Eichmüller, S., McKay, I. A., & Stenn, K. S. (2001). A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *Journal of investigative dermatology*, 117(1), 3-15.
- MacLeod, A. S., & Havran, W. L. (2011). Functions of skin-resident $\gamma\delta$ T cells. *Cellular and molecular life sciences*, 68(14), 2399-2408.
- Macri, C., Pang, E. S., Patton, T., & O'Keeffe, M. (2018). Dendritic cell subsets. *Seminars in cell & developmental biology*,
- Mahmud, M. R., Akter, S., Tamanna, S. K., Mazumder, L., Esti, I. Z., Banerjee, S., Akter, S., Hasan, M. R., Acharjee, M., & Hossain, M. S. (2022). Impact of gut microbiome on skin health: gut-skin axis observed through the lenses of therapeutics and skin diseases. *Gut Microbes*, 14(1), 2096995.
- Malaguarnera, L. (2019). Influence of resveratrol on the immune response. *Nutrients*, 11(5), 946.
- Mathers, A. R., & Larregina, A. T. (2006). Professional antigen-presenting cells of the skin. *Immunologic research*, 36(1), 127-136.
- Matos, T. R., O'Malley, J. T., Lowry, E. L., Hamm, D., Kirsch, I. R., Robins, H. S., Kupper, T. S., Krueger, J. G., & Clark, R. A. (2017). Clinically resolved psoriatic lesions contain psoriasis-specific IL-17-producing $\alpha\beta$ T cell clones. *The Journal of clinical investigation*, 127(11), 4031-4041.
- Matsumoto, K., Hashimoto, K., Nishida, Y., Hashiro, M., & Yoshikawa, K. (1990). Growth-inhibitory effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on normal human keratinocytes cultured in serum-free medium. *Biochemical and biophysical research communications*, 166(2), 916-923.
- Mayers, J. R., & Vander Heiden, M. G. (2015). Famine versus feast: understanding the metabolism of tumors in vivo. *Trends in biochemical sciences*, 40(3), 130-140.
- Mazzocchi, A., Leone, L., Agostoni, C., & Pali-Schöll, I. (2019). The secrets of the Mediterranean diet. Does [only] olive oil matter? *Nutrients*, 11(12), 2941.
- Mehta, N. N., Yu, Y., Pinnelas, R., Krishnamoorthy, P., Shin, D. B., Troxel, A. B., & Gelfand, J. M. (2011). Attributable risk estimate of severe psoriasis on major cardiovascular events. *The American journal of medicine*, 124(8), 775. e771-775. e776.
- Mena, M.-P., Sacanella, E., Vazquez-Agell, M., Morales, M., Fito, M., Escoda, R., Serrano-Martínez, M., Salas-Salvado, J., Benages, N., & Casas, R. (2009). Inhibition of circulating immune cell activation: a molecular antiinflammatory effect of the Mediterranean diet. *The American journal of clinical nutrition*, 89(1), 248-256.
- Meng, D., Yang, Q., Wang, H., Melick, C. H., Navlani, R., Frank, A. R., & Jewell, J. L. (2020). Glutamine and asparagine activate mTORC1 independently of Rag GTPases. *Journal of Biological Chemistry*, 295(10), 2890-2899.
- Menssen, A., Trommler, P., Vollmer, S., Schendel, D., Albert, E., Gürtler, L., Riethmüller, G., & Prinz, J. C. (1995). Evidence for an antigen-specific cellular immune

- response in skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. *The Journal of Immunology*, 155(8), 4078-4083.
- Mercurio, L., Morelli, M., Scarponi, C., Scaglione, G. L., Pallotta, S., Albanesi, C., & Madonna, S. (2021). PI3K δ sustains keratinocyte hyperproliferation and epithelial inflammation: implications for a topically druggable target in psoriasis. *Cells*, 10(10), 2636.
- Michaëlsson, G., Gerdén, B., Hagforsen, E., Nilsson, B., Pihl-Lundin, I., Kraaz, W., Hjelmquist, G., & Lööf, L. (2000). Psoriasis patients with antibodies to gliadin can be improved by a gluten-free diet. *British Journal of Dermatology*, 142(1), 44-51.
- Millsop, J. W., Bhatia, B. K., Debbaneh, M., Koo, J., & Liao, W. (2014). Diet and psoriasis, part III: role of nutritional supplements. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71(3), 561-569.
- Mizumaki, K., Horii, M., Kano, M., Komuro, A., & Matsushita, T. (2021). Suppression of IL-23-mediated psoriasis-like inflammation by regulatory B cells. *Scientific reports*, 11(1), 1-13.
- Morizane, S., & Gallo, R. L. (2012). Antimicrobial peptides in the pathogenesis of psoriasis. *The Journal of dermatology*, 39(3), 225-230.
- Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G.-i., Inoue, K., & Kudo, I. (2017). Regulatory functions of phospholipase A 2. *Critical Reviews™ in Immunology*, 37(2-6).
- Murphrey, M. B., Miao, J. H., & Zito, P. M. (2018). Histology, stratum corneum.
- Murphy, C. G., Stapelton, R., Chen, G., Winter, D., & Bouchier-Hayes, D. (2012). Glutamine preconditioning protects against local and systemic injury induced by orthopaedic surgery. *The journal of nutrition, health & aging*, 16(4), 365-369.
- Murphy, M., Kerr, P., & Grant-Kels, J. M. (2007). The histopathologic spectrum of psoriasis. *Clinics in dermatology*, 25(6), 524-528.
- Nakahara, T., Moroi, Y., Uchi, H., & Furue, M. (2006). Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *Journal of Dermatological Science*, 42(1), 1-11.
- Nakahigashi, K., Kabashima, K., Ikoma, A., Verkman, A. S., Miyachi, Y., & Hara-Chikuma, M. (2011). Upregulation of aquaporin-3 is involved in keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia. *Journal of investigative dermatology*, 131(4), 865-873.
- Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z., & Nickoloff, B. J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(10), 679-691.
- Newsholme, P. (2001). Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *The Journal of nutrition*, 131(9), 2515S-2522S.
- Nguyen, A. V., & Soulika, A. M. (2019). The dynamics of the skin's immune system. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1811.
- Ni, X., & Lai, Y. (2020). Keratinocyte: A trigger or an executor of psoriasis? *Journal of leukocyte biology*, 108(2), 485-491.
- Nussbaum, L., Chen, Y., & Ogg, G. (2021). Role of regulatory T cells in psoriasis pathogenesis and treatment. *British Journal of Dermatology*, 184(1), 14-24.
- Ogle, C. K., Ogle, J. D., Mao, J. X., Simon, J., Noel, J. G., Li, B. G., & Alexander, J. W. (1994). Effect of glutamine on phagocytosis and bacterial killing by normal and pediatric burn patient neutrophils. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 18(2), 128-133.
- Olendzki, B. C., Silverstein, T. D., Persuitte, G. M., Ma, Y., Baldwin, K. R., & Cave, D. (2014). An anti-inflammatory diet as treatment for inflammatory bowel disease: a case series report. *Nutrition journal*, 13(1), 1-7.
- Orsmond, A., Bereza-Malcolm, L., Lynch, T., March, L., & Xue, M. (2021). Skin barrier

- dysregulation in psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10841.
- Parisi, R., Iskandar, I. Y., Kontopantelis, E., Augustin, M., Griffiths, C. E., & Ashcroft, D. M. (2020). National, regional, and worldwide epidemiology of psoriasis: systematic analysis and modelling study. *Bmj*, 369.
- Peng, S., Cao, M., Sun, X., Zhou, Y., Chen, C. Y., Ma, T., Li, H., Li, B., Zhu, B., & Li, X. (2020). Recombinant programmed cell death 1 inhibits psoriatic inflammation in imiquimod-treated mice. *International Journal of Molecular Medicine*, 46(2), 869-879.
- Perez, A., Raab, R., Chen, T., Turner, A., & Hollek, M. (1996). Safety and efficacy of oral calcitriol (1, 25-dihydroxyvitamin D3) for the treatment of psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 134(6), 1070-1078.
- Phan, C., Touvier, M., Kesse-Guyot, E., Adjibade, M., Hercberg, S., Wolkenstein, P., Chosidow, O., Ezzedine, K., & Sbidian, E. (2018). Association between Mediterranean anti-inflammatory dietary profile and severity of psoriasis: results from the NutriNet-Santé cohort. *JAMA dermatology*, 154(9), 1017-1024.
- Pithon-Curi, T. C., Trezena, A. G., Tavares-Lima, W., & Curi, R. (2002). Evidence that glutamine is involved in neutrophil function. *Cell biochemistry and function*, 20(2), 81-86.
- Pona, A., Haidari, W., Kolli, S. S., & Feldman, S. R. (2019). Diet and psoriasis. *Dermatology online journal*, 25(2).
- Presland, R. B., Boggess, D., Lewis, S. P., Hull, C., Fleckman, P., & Sundberg, J. P. (2000). Loss of normal profilaggrin and filaggrin in flaky tail (ft/ft) mice: an animal model for the filaggrin-deficient skin disease ichthyosis vulgaris. *Journal of investigative dermatology*, 115(6), 1072-1081.
- Prinz, J. (2003). The role of T cells in psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 17(3), 257-270.
- Quaresma, J. A. S. (2019). Organization of the skin immune system and compartmentalized immune responses in infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 32(4), e00034-00018.
- Rademacher, F., Gläser, R., & Harder, J. (2021). Antimicrobial peptides and proteins: Interaction with the skin microbiota. *Experimental dermatology*, 30(10), 1496-1508.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey Jr, G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. In: Oxford University Press.
- Rendon, A., & Schäkel, K. (2019). Psoriasis pathogenesis and treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1475.
- Ribot, J. C., Lopes, N., & Silva-Santos, B. (2021). $\gamma\delta$ T cells in tissue physiology and surveillance. *Nature Reviews Immunology*, 21(4), 221-232.
- Richmond, J. M., & Harris, J. E. (2014). Immunology and skin in health and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(12), a015339.
- Rizzo, H. L., Kagami, S., Phillips, K. G., Kurtz, S. E., Jacques, S. L., & Blauvelt, A. (2011). IL-23-mediated psoriasis-like epidermal hyperplasia is dependent on IL-17A. *The Journal of Immunology*, 186(3), 1495-1502.
- Rodas, P. C., Rooyackers, O., Hebert, C., Norberg, Å., & Wernerman, J. (2012). Glutamine and glutathione at ICU admission in relation to outcome. *Clinical science*, 122(12), 591-597.
- Roth, E. (2007). Immune and cell modulation by amino acids. *Clinical nutrition*, 26(5), 535-544.

- Roth, E. (2008). Nonnutritive effects of glutamine. *The Journal of nutrition*, 138(10), 2025S-2031S.
- Søyland, E., Heier, I., Rodríguez-Gallego, C., Mollnes, T., Johansen, F. E., Holven, K., Halvorsen, B., Aukrust, P., Jahnsen, F., & De La Rosa Carrillo, D. (2011). Sun exposure induces rapid immunological changes in skin and peripheral blood in patients with psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 164(2), 344-355.
- Sabat, R., Wolk, K., Loyal, L., Döcke, W.-D., & Ghoreschi, K. (2019). T cell pathology in skin inflammation. *Seminars in Immunopathology*.
- Sahi, F. M., Masood, A., Danawar, N. A., Mekaiel, A., & Malik, B. H. (2020). Association between psoriasis and depression: a traditional review. *Cureus*, 12(8).
- Sakai, K., Sanders, K. M., Youssef, M. R., Yanushefski, K. M., Jensen, L., Yosipovitch, G., & Akiyama, T. (2016). Mouse model of imiquimod-induced psoriatic itch. *Pain*, 157(11), 2536.
- Salas-Salvadó, J., Guasch-Ferré, M., Lee, C.-H., Estruch, R., Clish, C. B., & Ros, E. (2015). Protective effects of the Mediterranean diet on type 2 diabetes and metabolic syndrome. *The Journal of nutrition*, 146(4), 920S-927S.
- Santos, A. C. A., Hebeba, C. B., Hastreiter, A. A., de Oliveira, D. C., Naoto Makiyama, E., Farsky, S. H. P., Borelli, P., & Fock, R. A. (2019). Exogenous glutamine impairs neutrophils migration into infections sites elicited by lipopolysaccharide by a multistep mechanism. *Amino acids*, 51(3), 451-462.
- Schön, M. P. (2019). Adaptive and innate immunity in psoriasis and other inflammatory disorders. *Frontiers in immunology*, 10, 1764.
- Schön, M. P., Manzke, V., & Erpenbeck, L. (2021). Animal models of psoriasis—highlights and drawbacks. *Journal of allergy and clinical immunology*, 147(2), 439-455.
- Shao, S., Chen, J., Swindell, W. R., Tsoi, L. C., Xing, X., Ma, F., Uppala, R., Sarkar, M. K., Plazyo, O., & Billi, A. C. (2021). Phospholipase A2 enzymes represent a shared pathogenic pathway in psoriasis and pityriasis rubra pilaris. *JCI insight*, 6(20).
- Shao, S., Fang, H., Dang, E., Xue, K., Zhang, J., Li, B., Qiao, H., Cao, T., Zhuang, Y., & Shen, S. (2019). Neutrophil extracellular traps promote inflammatory responses in psoriasis via activating epidermal TLR4/IL-36R crosstalk. *Frontiers in immunology*, 10, 746.
- Sharma, A., Upadhyay, D. K., Gupta, G. D., Narang, R. K., & Rai, V. K. (2022). IL-23/Th17 Axis: A Potential Therapeutic Target of Psoriasis. *Current Drug Research Reviews Formerly: Current Drug Abuse Reviews*, 14(1), 24-36.
- Shih, C.-M., Hsieh, C.-K., Huang, C.-Y., Huang, C.-Y., Wang, K.-H., Fong, T.-H., Trang, N. T. T., Liu, K.-T., & Lee, A.-W. (2020). Lycopene inhibit IMQ-induced psoriasis-like inflammation by inhibiting ICAM-1 production in mice. *Polymers*, 12(7), 1521.
- Shih, Y. M., Shih, J. M., Pai, M. H., Hou, Y. C., Yeh, C. L., & Yeh, S. L. (2016). Glutamine administration after sublethal lower limb ischemia reduces inflammatory reaction and offers organ protection in ischemia/reperfusion injury. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 40(8), 1122-1130.
- Shiromizu, C. M., & Jancic, C. C. (2018). $\gamma\delta$ T lymphocytes: an effector cell in autoimmunity and infection. *Frontiers in immunology*, 9, 2389.
- Shou, Y., Yang, L., Yang, Y., & Xu, J. (2021). Inhibition of keratinocyte ferroptosis suppresses psoriatic inflammation. *Cell death & disease*, 12(11), 1-10.
- Singh, T. P., Zhang, H. H., Hwang, S. T., & Farber, J. M. (2019). IL-23-and imiquimod-induced models of experimental psoriasis in mice. *Current Protocols in Immunology*, 125(1), e71.
- Son, E. D., Kim, H. J., Kim, K. H., Bin, B. H., Bae, I. H., Lim, K. M., Yu, S. J., Cho, E. G.,

- & Lee, T. R. (2016). S100A7 (psoriasin) inhibits human epidermal differentiation by enhanced IL-6 secretion through I κ B/NF- κ B signalling. *Experimental dermatology*, 25(8), 636-641.
- Streilein, J. W. (1983). Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *Journal of investigative dermatology*, 80.
- Su, L.-H., Lin, M.-T., Yeh, S.-L., & Yeh, C.-L. (2021). Glutamine administration attenuates kidney inflammation in obese mice complicated with polymicrobial sepsis. *Mediators of inflammation*, 2021.
- Su, S.-T., Yeh, C.-L., Hou, Y.-C., Pai, M.-H., & Yeh, S.-L. (2017). Dietary glutamine supplementation enhances endothelial progenitor cell mobilization in streptozotocin-induced diabetic mice subjected to limb ischemia. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 40, 86-94.
- Sugiyama, H., Gyulai, R., Toichi, E., Garaczi, E., Shimada, S., Stevens, S. R., McCormick, T. S., & Cooper, K. D. (2005). Dysfunctional blood and target tissue CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *The Journal of Immunology*, 174(1), 164-173.
- Sun, J., Zhao, Y., & Hu, J. (2013). Curcumin inhibits imiquimod-induced psoriasis-like inflammation by inhibiting IL-1 β and IL-6 production in mice. *PLoS One*, 8(6), e67078.
- Sundberg, J. P., & Silva, K. A. (2012). What color is the skin of a mouse? *Veterinary pathology*, 49(1), 142-145.
- Surber, C., Humbert, P., Abels, C., & Maibach, H. (2018). The acid mantle: a myth or an essential part of skin health? *pH of the Skin: Issues and Challenges*, 54, 1-10.
- Surcel, M., Huică, R.-I., Munteanu, A. N., Isvoranu, G., Pirvu, I. R., Ciotaru, D., Constantin, C., Bratu, O., Căruntu, C., & Neagu, M. (2019). Phenotypic changes of lymphocyte populations in psoriasiform dermatitis animal model. *Experimental and therapeutic medicine*, 17(2), 1030-1038.
- Sweeney, C. M., Tobin, A.-M., & Kirby, B. (2011). Innate immunity in the pathogenesis of psoriasis. *Archives of dermatological research*, 303(10), 691-705.
- Swindell, W. R., Michaels, K. A., Sutter, A. J., Diaconu, D., Fritz, Y., Xing, X., Sarkar, M. K., Liang, Y., Tsoi, A., & Gudjonsson, J. E. (2017). Imiquimod has strain-dependent effects in mice and does not uniquely model human psoriasis. *Genome medicine*, 9(1), 1-21.
- Takahashi, T., & Yamasaki, K. (2020). Psoriasis and antimicrobial peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6791.
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820.
- Tapiero, H., Mathe, G., Couvreur, P., & Tew, K. (2002). II. Glutamine and glutamate. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(9), 446-457.
- Terhorst, D., Chelbi, R., Wohn, C., Malosse, C., Tamoutounour, S., Jorquera, A., Bajenoff, M., Dalod, M., Malissen, B., & Henri, S. (2015). Dynamics and transcriptomics of skin dendritic cells and macrophages in an imiquimod-induced, biphasic mouse model of psoriasis. *The Journal of Immunology*, 195(10), 4953-4961.
- Tian, D., & Lai, Y. (2022). The Relapse of Psoriasis: Mechanisms and Mysteries. *JID Innovations*, 2(3).
- Toichi, E., Tachibana, T., & Furukawa, F. (2000). Rapid improvement of psoriasis vulgaris during drug-induced agranulocytosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 43(2), 391-395.
- Tonel, G., & Conrad, C. (2009). Interplay between keratinocytes and immune cells—recent insights into psoriasis pathogenesis. *The international journal of biochemistry &*

- cell biology*, 41(5), 963-968.
- Tortora, Gerard J(2005).Principles of Anatomy & Physiology - Learning Guide(11th, 06). Australia: John Wiley & Sons
- Tsai, P.-H., Liu, J.-J., Yeh, C.-L., Chiu, W.-C., & Yeh, S.-L. (2012). Effects of glutamine supplementation on oxidative stress-related gene expression and antioxidant properties in rats with streptozotocin-induced type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*, 107(8), 1112-1118.
- Tsai, P.-H., Yeh, C.-L., Liu, J.-J., Chiu, W.-C., & Yeh, S.-L. (2012). Effects of dietary glutamine on inflammatory mediator gene expressions in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Nutrition*, 28(3), 288-293.
- Tsoi, L. C., Stuart, P. E., Tian, C., Gudjonsson, J. E., Das, S., Zawistowski, M., Ellinghaus, E., Barker, J. N., Chandran, V., & Dand, N. (2017). Large scale meta-analysis characterizes genetic architecture for common psoriasis associated variants. *Nature communications*, 8(1), 1-8.
- Uchida, H., Kamata, M., Shimizu, T., Egawa, S., Ito, M., Takeshima, R., Mizukawa, I., Watanabe, A., & Tada, Y. (2021). Apremilast downregulates interleukin-17 production and induces splenic regulatory B cells and regulatory T cells in imiquimod-induced psoriasiform dermatitis. *Journal of Dermatological Science*, 104(1), 55-62.
- Ueyama, A., Yamamoto, M., Tsujii, K., Furue, Y., Imura, C., Shichijo, M., & Yasui, K. (2014). Mechanism of pathogenesis of imiquimod-induced skin inflammation in the mouse: a role for interferon-alpha in dendritic cell activation by imiquimod. *The Journal of dermatology*, 41(2), 135-143.
- Van Der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J. S., Kant, M., Boon, L., Laman, J. D., Cornelissen, F., Mus, A.-M., Florencia, E., & Prens, E. P. (2009). Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *The Journal of Immunology*, 182(9), 5836-5845.
- Van Smeden, J., & Bouwstra, J. A. (2016). Stratum corneum lipids: their role for the skin barrier function in healthy subjects and atopic dermatitis patients. *Skin barrier function*, 49, 8-26.
- Vats, K., Kruglov, O., Mizes, A., Samovich, S. N., Amoscato, A. A., Tyurin, V. A., Tyurina, Y. Y., Kagan, V. E., & Bunimovich, Y. L. (2021). Keratinocyte death by ferroptosis initiates skin inflammation after UVB exposure. *Redox biology*, 47, 102143.
- Vinter, H., Iversen, L., Steiniche, T., Kragballe, K., & Johansen, C. (2015). Aldara®-induced skin inflammation: studies of patients with psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 172(2), 345-353.
- Wagner, E. F., Schonthaler, H. B., Guinea-Viniegra, J., & Tschachler, E. (2010). Psoriasis: what we have learned from mouse models. *Nature Reviews Rheumatology*, 6(12), 704-714.
- Walter, A., Schäfer, M., Cecconi, V., Matter, C., Urosevic-Maiwald, M., Belloni, B., Schönewolf, N., Dummer, R., Bloch, W., & Werner, S. (2013). Aldara activates TLR7-independent immune defence. *Nature communications*, 4(1), 1-13.
- Wang, W., Qu, R., Wang, X., Zhang, M., Zhang, Y., Chen, C., Chen, X., Qiu, C., Li, J., & Pan, X. (2019). GDF11 antagonizes psoriasis-like skin inflammation via suppression of NF-κB signaling pathway. *Inflammation*, 42(1), 319-330.
- Wang, Y., Jiang, Z. M., Nolan, M. T., Jiang, H., Han, H. R., Yu, K., Li, H. L., Jie, B., & Liang, X. K. (2010). The Impact of Glutamine Dipeptide–Supplemented Parenteral Nutrition on Outcomes of Surgical Patients: A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 34(5), 521-529.
- Wang, Y., Li, P., Zhang, L., Fu, J., Di, T., Li, N., Meng, Y., Guo, J., & Zhao, J. (2020). Stress aggravates and prolongs imiquimod-induced psoriasis-like epidermal

- hyperplasia and IL-1 β /IL-23p40 production. *Journal of leukocyte biology*, 108(1), 267-281.
- Watford, M. (2015). Glutamine and glutamate: Nonessential or essential amino acids? *Animal Nutrition*, 1(3), 119-122.
- Williams, I. R., & Kupper, T. S. (1996). Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sciences*, 58(18), 1485-1507.
- Wolf, A., Alberto, Y., Barman, P., & Goodridge Helen, S. (2019). The ontogeny of monocyte subsets. *Front Immunol* 10: 1642. In.
- Worbs, T., Hammerschmidt, S. I., & Förster, R. (2017). Dendritic cell migration in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 17(1), 30-48.
- Wrone-Smith, T., & Nickoloff, B. J. (1996). Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *The Journal of clinical investigation*, 98(8), 1878-1887.
- Wu, J. J., Nguyen, T. U., Poon, K.-Y. T., & Herrinton, L. J. (2012). The association of psoriasis with autoimmune diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 67(5), 924-930.
- Wu, J. K., Siller, G., & Strutton, G. (2004). Psoriasis induced by topical imiquimod. *Australasian journal of dermatology*, 45(1), 47-50.
- Xue, H., Sufit, A. J., & Wischmeyer, P. E. (2011). Glutamine therapy improves outcome of in vitro and in vivo experimental colitis models. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 35(2), 188-197.
- Yang, B.-Y., Cheng, Y.-G., Liu, Y., Liu, Y., Tan, J.-Y., Guan, W., Guo, S., & Kuang, H.-X. (2019). Datura Metel L. Ameliorates Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Dermatitis and Inhibits Inflammatory Cytokines Production through TLR7/8–MyD88–NF- κ B–NLRP3 Inflammasome Pathway. *Molecules*, 24(11), 2157.
- Yang, D., Guo, Y., Wu, J., Qin, J., Wu, J., Lu, Y., Xiao, Y., Zhang, X., & Ye, J. (2022). Chinese herbal medicine Jia Wei Jing Xie Yin (JWJXY) ameliorates psoriasis via suppressing the Th17 cell response. *Annals of Translational Medicine*, 10(6).
- Yang, G., Seok, J. K., Kang, H. C., Cho, Y.-Y., Lee, H. S., & Lee, J. Y. (2020). Skin barrier abnormalities and immune dysfunction in atopic dermatitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2867.
- Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F., & Wang, H. (2014). Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker research*, 2(1), 1-9.
- Yang, L., Li, B., Dang, E., Jin, L., Fan, X., & Wang, G. (2016). Impaired function of regulatory T cells in patients with psoriasis is mediated by phosphorylation of STAT3. *Journal of Dermatological Science*, 81(2), 85-92.
- Yeh, S.-L., Lai, Y.-N., Shang, H.-F., Lin, M.-T., & Chen, W.-J. (2004). Effects of glutamine supplementation on innate immune response in rats with gut-derived sepsis. *British Journal of Nutrition*, 91(3), 423-429.
- Zhang, L., Li, Y., Yang, X., Wei, J., Zhou, S., Zhao, Z., Cheng, J., Duan, H., Jia, T., & Lei, Q. (2016). Characterization of Th17 and FoxP3⁺ Treg cells in paediatric psoriasis patients. *Scandinavian journal of immunology*, 83(3), 174-180.
- Zhang, L., Yang, X.-Q., Cheng, J., Hui, R.-S., & Gao, T.-W. (2010). Increased Th17 cells are accompanied by FoxP3⁺ Treg cell accumulation and correlated with psoriasis disease severity. *Clinical immunology*, 135(1), 108-117.
- Zhang, P., & Wu, M. X. (2018). A clinical review of phototherapy for psoriasis. *Lasers in medical science*, 33(1), 173-180.
- Zhang, S., Zhang, J., Yu, J., Chen, X., Zhang, F., Wei, W., Zhang, L., Chen, W., Lin, N., & Wu, Y. (2021). Hyperforin Ameliorates Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Murine Skin Inflammation by Modulating IL-17A–Producing $\gamma\delta$ T Cells. *Frontiers in immunology*, 12, 635076.

Zhu, B., Jing, M., Yu, Q., Ge, X., Yuan, F., & Shi, L. (2021). Treatments in psoriasis: from standard pharmacotherapy to nanotechnology therapy. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, 38(1).

