

中華民國第 64 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學學科

佳作

052010

探討 Dexlansoprazole 的副作用-可作為 ITE、
芳香烴受體和糖皮質激素受體的內分泌干擾劑

學校名稱： 國立嘉義高級中學

作者： 高二 黃脩睿 高二 黃祈叡 高二 張恒瑞	指導老師： 黃冠夫
---	------------------

關鍵詞： Dexlansoprazole, aryl hydrocarbon
receptor, glucocorticoid receptor.

摘要

"我們將探討 dexlansoprazole 的副作用，是否會調節 AhR 和 GR 的活性。AhR 和 GR 是細胞質內受體，在被其配體活化後，移轉入細胞核中，AhR 和 GR 作為轉錄因子 (transcription factor)，與芳香烴反應元件(arylhydrocarbon response element, AHRE) 和糖皮質激素受體反應元件 (glucocorticoid receptor response element, GRE) 結合。CYP1A1 和 FKBP5 分別是受 AhR 和 GR 調控表現的基因。我們的研究顯示 dexlansoprazole 促進 AhR 和 GR 活性，從而分別促進 CYP1A1 和 FKBP5 的 mRNA 和蛋白質表現。此外，dexlansoprazole 誘導 AhR 和 GR 移轉入細胞核。據此，我們的研究顯示 dexlansoprazole 是一種 AhR 和 GR 的促進劑。由於其活化 AhR 的效力低於內源性配體 ITE，我們數據顯示 dexlansoprazole 抑制了 ITE 和人工合成的 AhR 配體 (β -NF) 誘導人類細胞中 CYP1A1 的表現，這顯示 dexlansoprazole 可能降低 ITE 作用於 AhR 的生理功能。

壹、研究動機

Dexlansoprazole 是一種氫離子幫浦阻斷劑 (PPI) — 一類永久結合和阻斷氫離子幫浦的藥物，進而抑制胃酸的形成。此類藥物用於治療糜爛性食道炎和胃食道逆流 (GERD) (Fass & Frazier, 2017)。GERD 是一種常見疾病，在西方盛行率為 10-20%。在美國，20% 的成年人每週都會出現症狀，而 7% 的成年人每天都會出現症狀 (Fass & Frazier, 2017)。隨著社會經濟的進步和生活方式的改變，GERD 的發生率正在增加 (Goh et al., 2016)。此外，與其他藥物相比，氫離子幫浦阻斷劑在治療 GERD 方面具有更佳療效 (Fass & Frazier, 2017)。

芳香烴受體 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) 是一種細胞質內受體，最初在肝臟中發現，已知可被 2,3,7,8-四氯雙苯環戴奧辛 (TCDD) 和苯芘 (Benzo[a]pyrene, BaP) 等異生素 (xenobiotics) 活化，如圖一。在與細胞質中的配體相互作用後，AhR 移轉入細胞核中，與 ARNT 異二聚化，並作為轉錄因子 (transcription factor)，與其調控表現的目標基因上的 aryl hydrocarbon response element (AHRE) 相互作用 (Murray, Patterson, & Perdew, 2014; Nakata et al., 2006)。異生素活化 AhR，是由 AhR 調控表現具有代謝能力的蛋白質酵素，代謝異生素，以達到解毒的目的 (Nakata et al., 2006)。Dexlansoprazole 已被證明可以增加人類肝細胞中 AHRE 和 CYP1A1 表現的轉錄活性 (Novotna et al., 2014)。AhR 也在女性生殖器官中廣泛表現，會影響卵巢生長和功能 (Hernández-Ochoa、Karman & Flaws, 2009)。

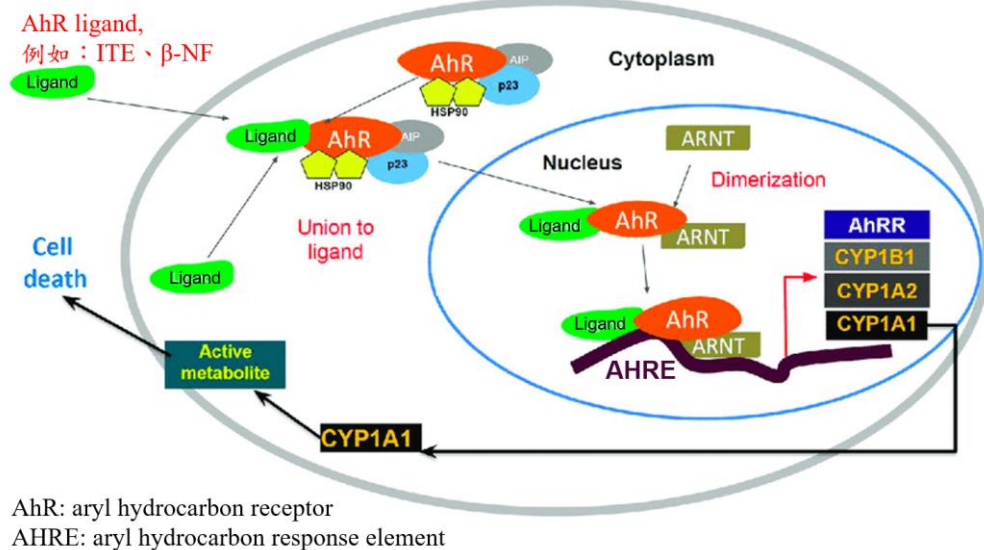
除異生素外，內源性配體 ITE 最初是從肺組織中分離出來的 (Song et al., 2002)。 β -NF 是一種人工合成的 AhR 促進劑，可調節涉及神經內分泌功能 (壓力和生殖) 的 49 個基因的 mRNA (Juricek & Coumoul, 2018)。

Glucocorticoid receptor (GR) 是一種類固醇激素受體，在 glucocorticoid 荷爾蒙的生理學中發揮著至關重要的作用 (Frank, Ortlund, & Liu, 2021; Kadmiel & Cidlowski, 2013)，如圖二。Glucocorticoids，例如人類的 cortisol，是腎上腺響應壓力或其他生理訊號而釋放的類固醇激素。這些荷爾蒙對體內的各個組織和器官有廣泛的影響。Glucocorticoid receptor 活化的生理效應是多樣的，影響各種生物過程，包括新陳代謝、免疫功能、發炎和壓力反應。

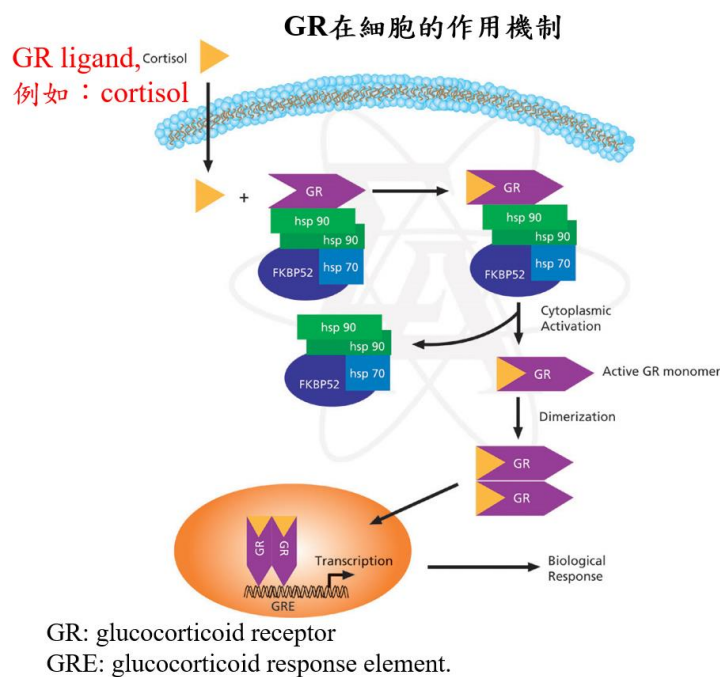
Dexlansoprazole 的結構含有 hydrocarbon rings，與內源性 AhR ligand —

ITE 和內源性 GR ligand — cortisol，的結構部份相似，如圖三。因此，我們想分析 dexlansoprazole 是否調節 AhR 和 GR 的活性。這項研究將幫助我們更了解 dexlansoprazole 的潛在副作用。

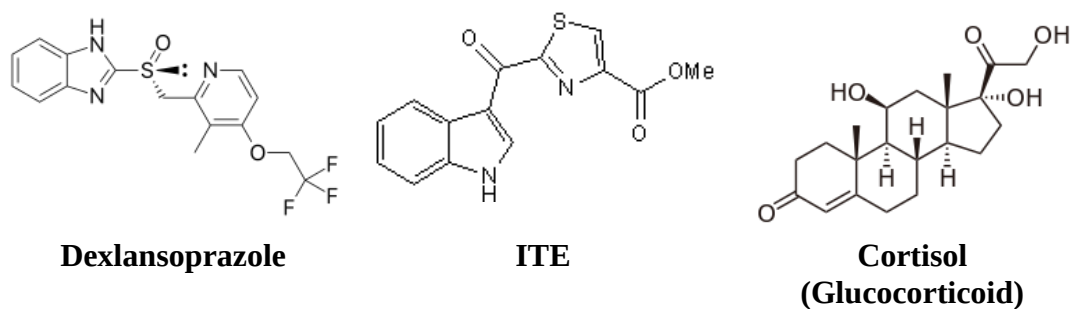
AhR在細胞的作用機制



圖一、Aryl hydrocarbon receptor (AhR) 在細胞的作用機制。AhR ligand (配體) 穿過細胞膜，進入細胞質，與 AhR 結合，活化 AhR。被活化的 AhR 進入細胞核內，與 ARNT 結合之後，結合 AhR 調控的目標基因上的 DNA 片段，aryl hydrocarbon response element (AHRE)。活化 AHRE 的轉錄活性，增加目標基因的 mRNA 表現量。因此，也增加了目標基因的蛋白質表現量。達到活化 AhR 的目的。圖採自 ResearchGate GmbH 的網頁。



圖二、Glucocorticoid receptor (GR)在細胞的作用機制。 GR ligand (配體) 穿過細胞膜，進入細胞質，與 GR 結合，活化 GR。被活化的 GR 進入細胞核內，結合 GR 調控的目標基因上的 DNA 片段，glucocorticoid response element (GRE)。活化 GRE 的轉錄活性，增加目標基因的 mRNA 表現量。因此，也增加了目標基因的蛋白質表現量。達到活化 GR 的目的。圖採自 Sigma-Aldrich。



圖三、Dexlansoprazole、ITE、Cortisol 的化學結構。

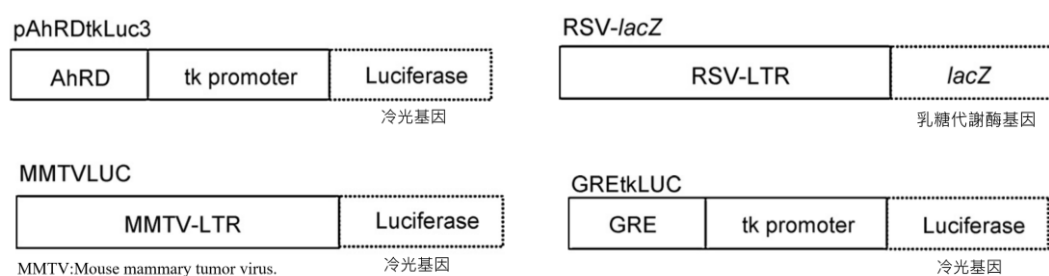
Abbreviations:

AhR, aryl hydrocarbon receptor; AHRE, aryl hydrocarbon response element; CYP, cytochrome P450; GR, Glucocorticoid receptor; GRE, glucocorticoid receptor response element; Dex, dexamethasone; FKBP5, FK506 binding protein 5; ITE, 2-(1H-Indol-3-ylcarbonyl)-4-thiazolecarboxylic acid methyl ester; MMTV, Mouse mammary tumor virus.

貳、研究目的

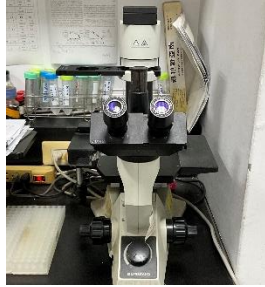
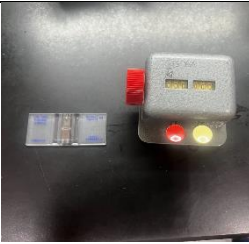
為了證明 dexlansoprazole 有 (a) 活化 AhR、GR 的功能及 (b) 阻止 ITE 活化 AhR 的作用，我們依序檢驗 dexlansoprazole 調節基因的轉錄活性、調節 mRNA 及蛋白質的表現，及誘導 AhR、GR 由細胞質移轉入細胞核內。CYP1A1 和 FKBP5 分別是受 AhR 和 GR 調控表現的基因。因此，可以透過偵測 CYP1A1 和 FKBP5 的 mRNA、蛋白質表現量，來判斷是否有活化 AhR、GR 的活性。

- 一、分析 dexlansoprazole 是否刺激細胞內芳香烴反應元件 (AHRE) 和糖皮質激素受體反應元件 (GRE) 的轉錄活性，如圖四。
- 二、分析 dexlansoprazole 與 AhR 和 GR 配體，是否刺激 AhR 目標基因 CYP1A1 和 GR 目標基因 FKBP5 的 mRNA 和蛋白質表現。
- 三、分析 dexlansoprazole 是否有與 AhR、GR 配體類似的功能，誘導 AhR、GR 移轉入核。



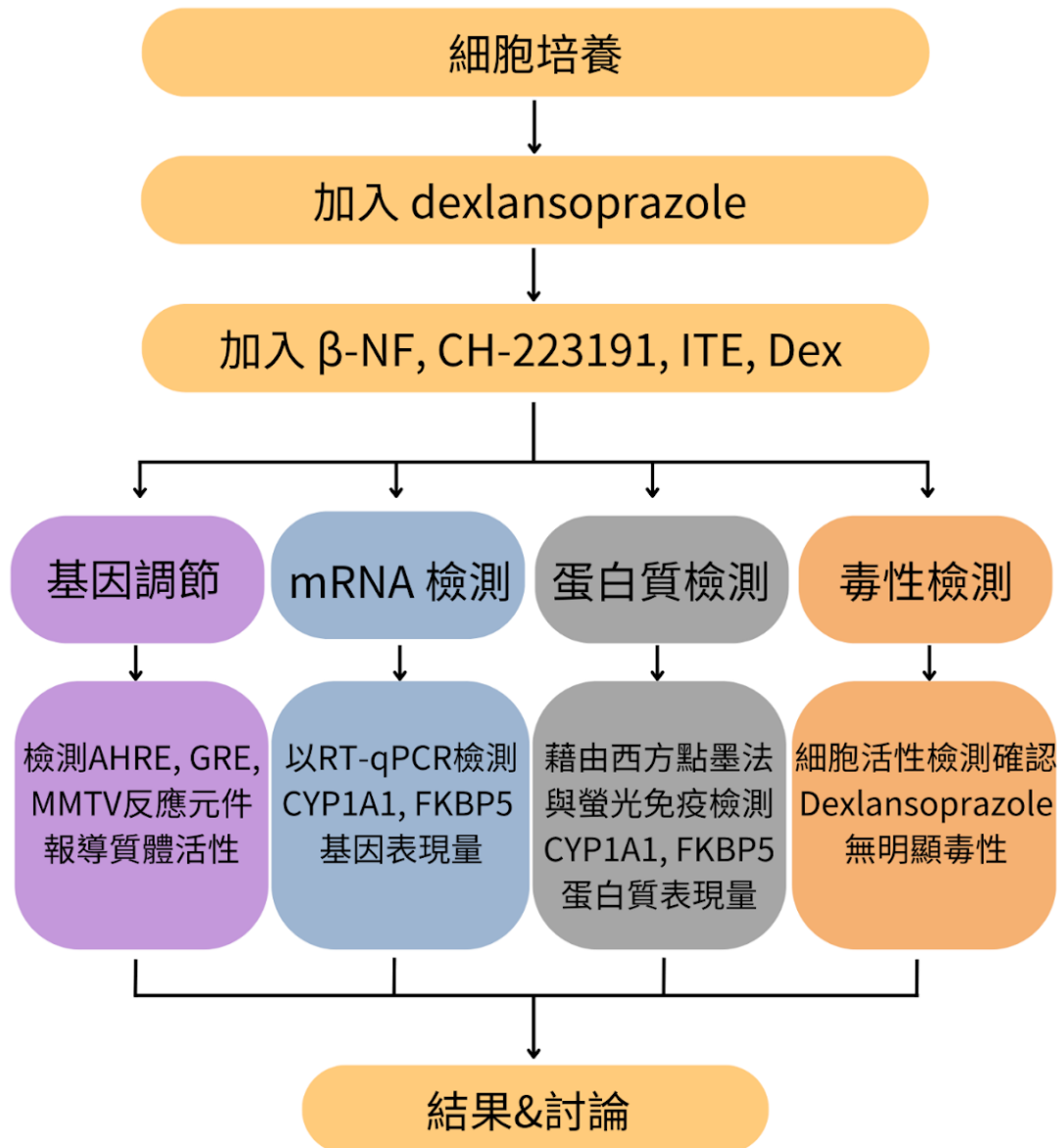
圖四、用於探討 aryl hydrocarbon receptor (AhR) 及 glucocorticoid receptor (GR) 分別調控基因的 aryl hydrocarbon response element (AHRE) 及 glucocorticoid response element (GRE) 的報告基因質體 (reporter plasmid) 的部份結構。pAhRDtkLuc3：含有 DNA 片段 AHRE，於 tk promoter 前，調節冷光報告基因 (luciferase) 的 mRNA 表現。MMTVLUC：含有來自病毒的 DNA (MMTV-LTR)，調節 luciferase 的 mRNA 表現。MMTV-LTR 上含有 glucocorticoid response element (GRE) 及具有 promoter 功能的 DNA 片段。GREtkLUC：含有 DNA 片段 GRE，置於 tk promoter 前，調節 luciferase 的 mRNA 表現。RSV-lacZ：含有來自病毒的 DNA Rouse sarcoma virus long-terminal repeat (RSV-LTR)，具有 promoter 的功能，調節代謝乳糖的酵素基因 (lacZ) 的 mRNA 表現，不受 AhR 及 GR 的調控。RSV-lacZ 用於正常化 (normalize) luciferase 的數據，不受 DNA 感染、細胞及蛋白質數量的不均勻的影響。

參、研究設備與器材

			
Inverted microscope	Fluoroskan Ascent FL Fluorescence Microplate Reader	MultiGel-21 Chemiluminescence Image System	Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell
			
centrifuge	Fluorescence microscope	NC-3000 Advanced Image Cytometer	CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System
			
Biosafety cabinet	Cell Culture Incubator.	MiniAmp Plus Thermal Cycler	Hemocytometer

肆、研究過程或方法

一、實驗架構



二、實驗方法

(一) 細胞培養

1. 本實驗使用的小鼠細胞株為肝細胞株 Hepa-1c1c7、Hepa-1c1c7 c4 (B13NBii1)、Hepa-1c1c7 c12 (B15ECiii2)，人類細胞株為肝細胞株 HepG2、卵巢顆粒細胞株 HO23。
2. 將培養液、磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS)、胰蛋白酶 (trypsin) 放於 37°C 水浴槽回溫。
3. 將細胞從 5% CO₂ 37°C 培養箱拿出，以顯微鏡觀察細胞狀態。
4. 吸除培養液，加入 10 ml PBS 清洗。
5. 吸除 PBS，加入 1 ml 胰蛋白酶，放回培養箱中反應 5 分鐘。
6. 取出細胞，加入 3 ml 培養液將細胞打散。
7. 取少許細胞液與 Trypan Blue 以 1:1 的比例混合，放入血球細胞計數盤中，計算活細胞數量。
8. 依實驗需求算取細胞量與新的培養液混和，放入新的培養盤，最後放入 5% CO₂ 37°C 培養箱。

(二) RNA 抽取

1. 將細胞培養於 6 cm dish，HepG2 8×10^5 cells/dish，Hepa-1c1c7 6×10^5 cells/dish。
2. 依實驗設計加入藥物。
3. 去除培養液，加入 1ml NucleoZOL，把細胞打下來移至微量離心管。
4. 加入 400 μ l RNase-free 水，劇烈搖晃 15 秒後，靜置 15 分鐘。
5. 以 14,000 rpm 離心 15 分鐘。
6. 取上清液至新的微量離心管，加入 600 μ l 異丙醇，放入 -20°C 冰箱沉澱 RNA。
7. 以 14,000 rpm 離心 10 分鐘。
8. 移除上清液，加入 600 μ l 乙醇，以 14,000 rpm 離心 2 分鐘。
9. 移除上清液，加入 30 μ l RNase-free 水溶解 RNA。

(三) 逆轉錄 cDNA

1. 依據下表配製

Total RNA sample (100 pg ~ 1 µg)	X µl
2x Magic RT Mastermix	10 µl
RNase-Free water	X µl
Magic RT enzyme	0.5 µl
Total Reaction Volume	20 µl

2. 完成上述反應混合液後，混合均勻。
3. 進行 cDNA 合成反應: 37°C 30 分鐘，42°C 5 分鐘。
4. 終止 cDNA 合成反應: 85°C 5 分鐘。
5. 插入冰上至少 1 分鐘，放入 -20°C 冰箱保存備用。

(四) RT-qPCR

1. 依據下表配製
2. 放入 96 孔盤中，以 CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System 進行反應。
3. 反應條件:

循環次數	反應條件	
1	95°C, 5 min	cDNA denaturation
40	95°C, 10 sec	cDNA denaturation
	55°C, 50 sec	cDNA synthesis
	Detect luminescence	

FKBP5	F: GCCAATGAGAAAGGCTTGTATAGG R: GGTTTACTTCCAGCACTTTCTCAAA
CYP1A1	F: AAACCAGTGGCAGATCAACCAT R: CACCTTGTCGATAGCACCATCA
GAPDH	F: GAGTCAACGGATTTGGTCGT R: AATGAAGGGGTCATTGATGG

(五) 免疫螢光 Immunofluorescence

1. 將細胞培養於 6 well 蓋玻片(slide)上(3×10^5 cell per well in 2 ml medium)
2. 依實驗設計加入藥物。
3. 使用常溫 2 ml 1xPBS 清洗 2 次並吸乾。
4. 加入 2 ml 3.3% Formaldehyde 靜置 20 分鐘。
5. 吸除 Formaldehyde，使用常溫 2 ml 1xPBS 清洗 2 次並吸乾。
6. 加入 2 ml 0.2% TritonX-100 靜置 10 分鐘。
7. 吸除 TritonX-100,使用常溫 2 ml 1xPBS 清洗 2 次並吸乾。
8. 加入 2 ml 3%BSA,室溫以 Rotor 搖 1 小時。
9. 吸除 BSA,斜放在 slide 外吸除乾淨。
10. 滴 120 μ l 1 抗在 slide 上面,盡量滴在蓋玻片上不要溢出。
11. 靜置於 4°C箱 14~22 小時。
12. 回收 1 抗，使用常溫 2 ml 1xPBS 清洗 2 次並盡量吸乾。
13. 滴 120 μ l 2 抗在 slide 上面，盡量滴在蓋玻片上不要溢出，避光室溫靜置 1 小時。
14. 回收 2 抗，使用常溫 2 ml 1xPBS 清洗 2 次並盡量吸乾。
15. 加入 2 ml Hoechst33342(1μ g/ml) 室溫搖 30min 後吸除
16. 使用常溫 2 ml 1xPBS 清洗 2 次並吸乾。
17. 戴玻片上滴上 10 μ l Fluoromount-G (螢光抗退劑)，蓋上蓋玻片放至乾燥
18. 於螢光顯微鏡觀察。

(六) 西方點墨法 Western Blot

1. 將細胞培養於 6-cm dish 中，吸除上層培養液，再以 2 mL PBS 清洗 1 次，吸除 PBS。
2. 加入 100 μ l lysis buffer (分解液)，再利用細胞刮刀將 dish 上附著的細胞分解液完全刮下，收集於微量離心管中，以 4°C 14000 rpm 離心 5 分鐘。
3. 然後吸取 80 μ l 上清液(即為細胞萃取液)，移至新的微量離心管中，進行蛋白質定量。
4. 定量後取固定蛋白質與 loading buffer 混合，於乾浴機上高於 90°C 加熱 1 分鐘。
5. 配製 SDS-PAGE，上膠 5% Acrylamide，下膠 10% Acrylamide。
6. 將蛋白質與 loading buffer 的混合液加入 SDS-PAGE 的樣品槽。
7. 以 300V 15 mA 的條件電泳。
8. 電泳完成後，將電泳膠片、PVDF 膜與濾紙，組成三明治組，以 8V 150 mA 55 分鐘的條件，將膠片的蛋白轉印到 PVDF 膜上。
9. 將 Blocking buffer (5% 脫脂奶粉配在 TBST buffer)，加入到 PVDF 膜上進行 Blocking 1 小時。
10. 去除 Blocking buffer，加入針對目標蛋白的一級抗體，放於 4°C 冰箱搖隔夜。
11. 回收抗體，以 TBST 清洗 3 次，加入二級抗體，室溫搖 1 小時。
12. 回收抗體，以 TBST 清洗 3 次，加入 ECL，以照膠系統進行照膠。

(七) 報告基因檢測 Reporter gene assay

1. 將細胞培養於 24 孔盤上，每孔 HepG2 6×10^4 cell，Hepa-1c1c7 2.5×10^4 cell。
2. 將 1 μ l pAhRDtkLuc3、GREtkLUC 或 MMTV-LUC plus RSV-lacZ DNA 與 24 μ l 不含血清的培養液混合，將 1 μ l liposome 與 24 μ l 不含血清的培養液混合，靜置 5 分鐘。
3. 將 2 個混合液合併，在靜置 20 分鐘。
4. 將混合液加入細胞的 24 孔盤中，培養 10-16 小時。

5. 將含有混合液的培養液去除，換新的培養液，再依實驗設計加入藥物。
6. 吸除培養液，再以 2 mL PBS 清洗 1 次，吸除 PBS。
7. 加入 60 μ l lysis buffer，再利用細胞刮刀將 dish 上附著的細胞分解液完全刮下，收集於微量離心管中，以 4°C 14,000 rpm 離心 5 分鐘。
8. 然後吸取 50 μ l 上清液，移至新的微量離心管中。
9. 將 5 μ l 上清液加到 96 孔盤中，加入 10 μ l Luciferase 以冷光儀偵測分析。

(八) 細胞活力測試 **Vitality assay**

1. 將細胞培養於 6cm dish，每盤 4×10^5 cell。
2. 依實驗設計加入藥物。
3. 測看細胞存活率。
4. 在無菌操作台內，取上清液到離心管。
5. 取 2 ml PBS 到 dish 中清洗。
6. 用滴管取上清液到離心管。
7. 加入 1 ml trypsin 後放置培養箱中反應 5 分鐘。
8. 將離心管取出放置冰水上。
9. 從培養箱中取出切好的細胞。
10. 將離心管中的液體倒回 dish 中。
11. 用滴管沖洗 dish 並取出到離心管中。
12. 以 1300rpm 離心 5 分鐘
13. 吸除上清液，加入 1mL 的 PBS 打散細胞。
14. 全數取至微量離心管中。
15. 吸取 1 μ l 上清液加 9 μ l Solution 5 - VB-48TM•PI•AO，混合均勻。
16. 吸取加入到專用玻片，以 NucleoCounter NC-3000 進行偵測分析。

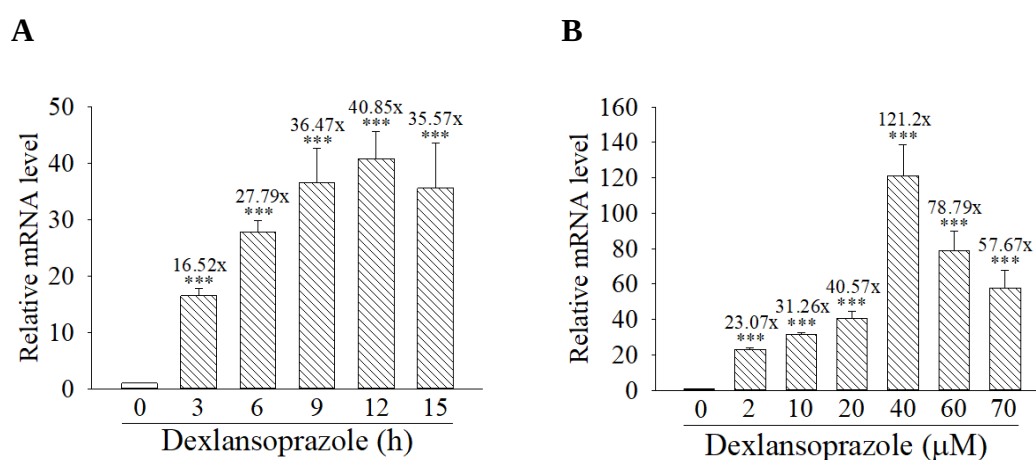
(九) 統計分析

數據代表相同條件下的至少三個獨立實驗，並表示為平均值 $\pm$ 標準差 (SD)。透過 Student's t-test 檢定分析對照數據和用各種化合物進一步處理的數據之間的差異。統計機率 (p) 表示為 * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 和 *** $p < 0.001$ 。當 $p < 0.05$ 時，平均值被認為有顯著差異。

伍、研究結果

一、Dexlansoprazole 刺激 CYP1A1 mRNA 及蛋白質在小鼠細胞內的表達

在 Hepa-1c1c7 細胞中，加入 dexlansoprazole 處理會增加 CYP1A1 mRNA 的表達，且此增加程度與曝露時間和劑量相關。在 Hepa-1c1c7 細胞中，加入 dexlansoprazole (40 μ M) 3 小時後可以檢測到其誘導 CYP1A1 mRNA 的表達，如圖五 A。在加入 12 小時後，mRNA 表達達到最高水平，之後在 Hepa-1c1c7 細胞中逐漸下降。使用 40 μ M dexlansoprazole 進行處理可以達到 CYP1A1 mRNA 表達的最大水平，如圖五 B。

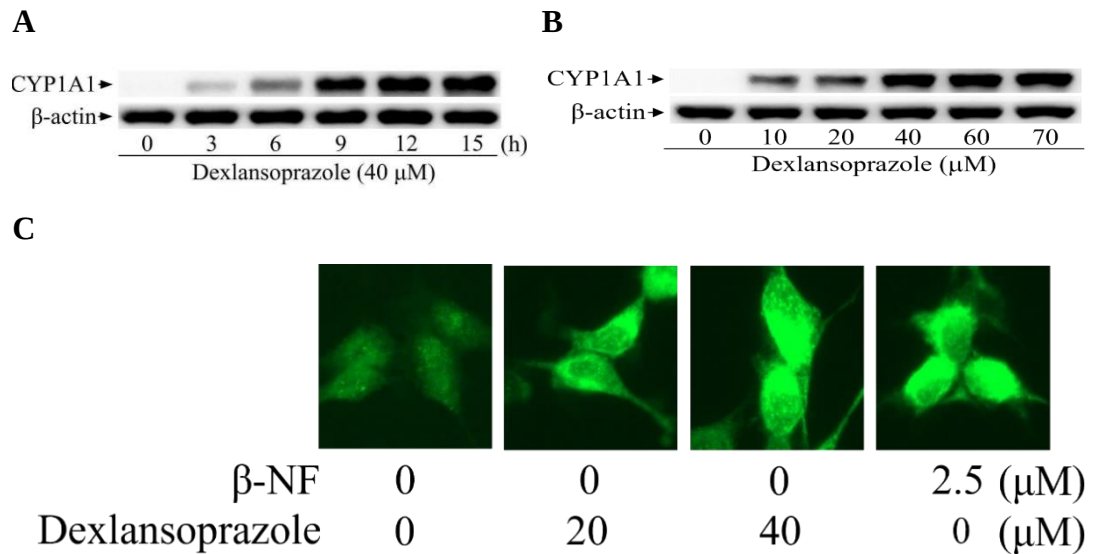


圖五、在小鼠 Hepa-1c1c7 細胞中 dexlansoprazole 誘導的細胞色素 P450 1A1 (CYP1A1) mRNA 表達。(A) Hepa-1c1c7 細胞以 dexlansoprazole (40 μ M) 處理 3-15 小時。(B) Hepa-1c1c7 細胞以 dexlansoprazole (2-70 μ M) 處理 9 小時。收集總 RNA 進行分析。

在 Hepa-1c1c7 細胞中，加入 dexlansoprazole 進行處理會增加 CYP1A1 蛋白的表達，且此增加程度與曝露時間和劑量有關。在 Hepa-1c1c7 細胞中，加入 dexlansoprazole (40 μ M) 3 小時後可以檢測到其誘導 CYP1A1 蛋白表達，如圖六 A。CYP1A1 表達在加入 12 小時後達到最高水平，之後逐漸下降。使用 60 μ M dexlansoprazole 進行處理可以達到 CYP1A1 蛋白表達的最大水平，如圖六 B。

進一步使用免疫螢光染色來研究 CYP1A1 的表達。 β -NF 是一種合成的 AhR 刺激劑， β -NF 誘導的 CYP1A1 表達，被用作陽性對照。Hepa-

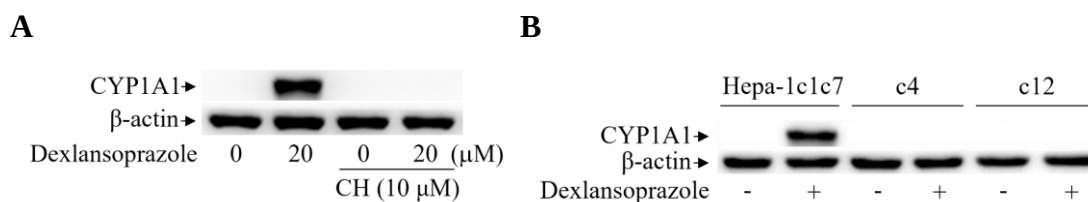
1c1c7 細胞以 dextralansoprazole (20 和 40 μM) 和 $\beta\text{-NF}$ (2.5 μM) 處理 9 小時，CYP1A1 蛋白表達的誘導可透過免疫螢光成像顯示出來，如圖六 C。



圖六、在小鼠 Hepa-1c1c7 細胞中 dextralansoprazole 誘導的細胞色素 P450 1A1 (CYP1A1) 的蛋白表達。(A) Hepa-1c1c7 細胞以 dextralansoprazole (40 μM) 處理 3-15 小時。(B) Hepa-1c1c7 細胞以 dextralansoprazole (10-70 μM) 處理 12 小時。通過 Western blot 分析 CYP1A1 和 $\beta\text{-actin}$ 蛋白的表達。(C) 免疫螢光影像顯示 dextralansoprazole 和 $\beta\text{-NF}$ 誘導的 CYP1A1 表達。Hepa-1c1c7 細胞被 dextralansoprazole (20 和 40 μM) 和 $\beta\text{-NF}$ (2.5 μM) 處理 9 小時。 $\beta\text{-NF}$ 是當作陽性對照用。

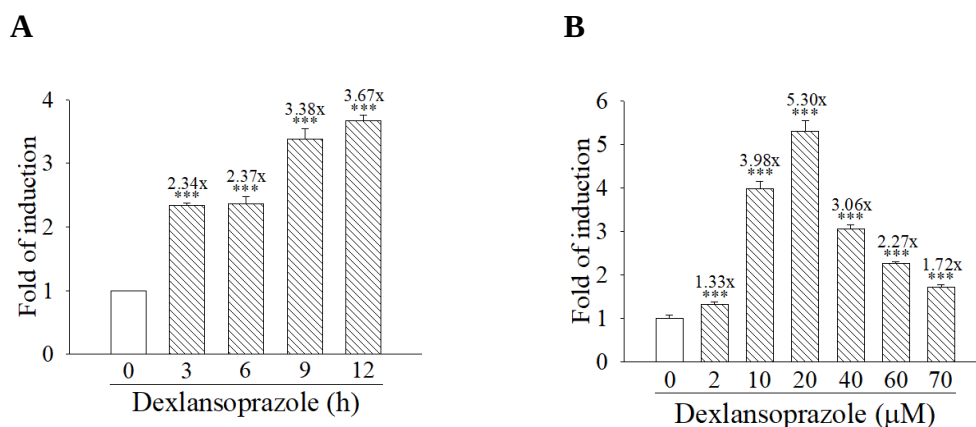
(二) Dextralansoprazole 藉由 AhR 傳訊路徑的方式誘導 CYP1A1 的表達

CH-223191 是 AhR 的拮抗劑。當細胞加入 20 μM dextralansoprazole 和 10 μM CH-223191 時，在 Hepa-1c1c7 細胞中，CH-223191 幾乎完全抑制了 dextralansoprazole 誘導的 CYP1A1 表達，如圖七 A。為了進一步檢驗 dextralansoprazole 是否藉由 AhR 傳訊路徑誘導 CYP1A1 的表達，使用了缺乏 Arnt 的 Hepa-1c1c7 c4 細胞和缺乏 AhR 的 Hepa-1c1c7 c12 細胞。這兩種細胞均缺乏 AhR 信號。當 Hepa-1c1c7、c4 和 c12 細胞以 dextralansoprazole 處理，強烈誘導了 Hepa-1c1c7 細胞的 CYP1A1 表達，但未對 c4 或 c12 細胞產生影響，如圖七 B。



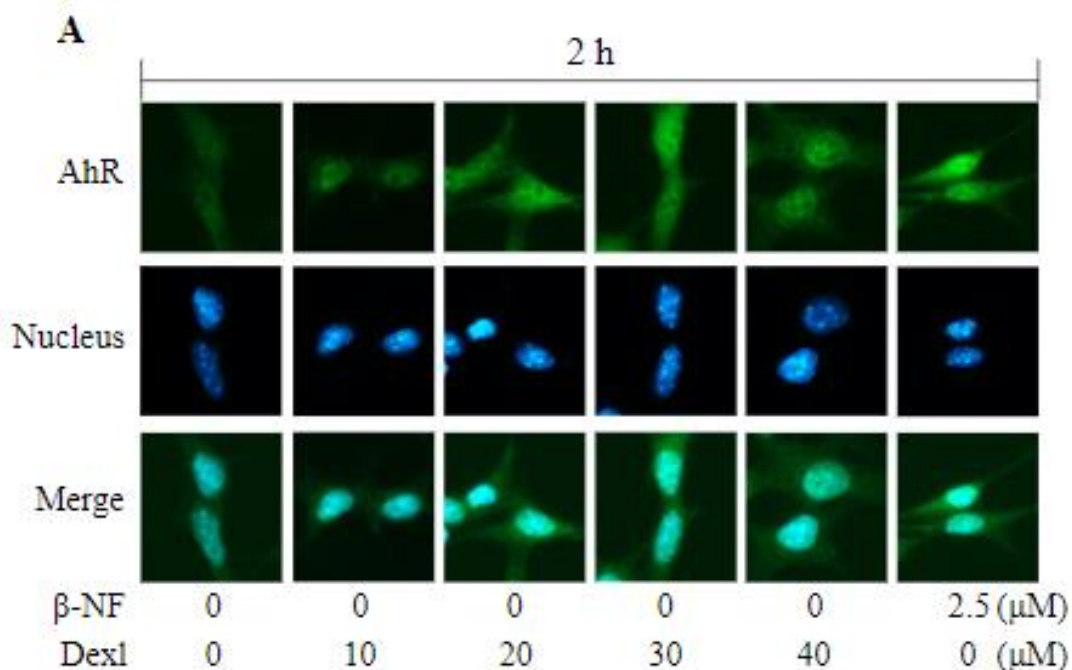
圖七、AhR 訊號影響 dexamethasone 誘導小鼠 Hepa-1c1c7 細胞及其突變衍生物的細胞色素 P450 1A1 (CYP1A1) 表現。(A) Hepa-1c1c7 細胞以 10 μM CH-223191 (CH) 預處理 1 小時，然後以 dexamethasone 處理 12 小時。(B) Hepa-1c1c7、Hepa-1c1c7 c4 (B13NBii1) 和 Hepa-1c1c7 c12 (B15ECiii2) 細胞以 dexamethasone (40 μM) 處理 12 小時。以 Western blot 分析細胞裂解物中 CYP1A1 和 β-actin 的蛋白質表現。

為了檢測 dexamethasone 誘導 AhR 的活性，將含有三個 AHRE 基序的 pAhRDtkLuc3 報告質粒和 RSV-lacZ 報告質粒轉染到 Hepa-1c1c7 細胞。在帶有報告質體的 Hepa-1c1c7 細胞中，dexamethasone 將 AHRE 轉錄活性提高了 3.7 倍，轉錄活性與受 dexamethasone 處理時間有關，如圖八 A。用 dexamethasone (2-70 μM) 處理 9 小時，AHRE 的轉錄活性增加了 5.5 倍，證明轉錄活性與藥物劑量有關，如圖八 B。



圖八、Dexamethasone 對小鼠 Hepa-1c1c7 細胞中 AHRE 的轉錄活性的影響。將報告質體 pAhRDtkLuc3 和 RSV-lacZ 轉染至 Hepa-1c1c7 細胞。(A) 以 dexamethasone (20 μM) 處理 Hepa-1c1c7 細胞 3-12 小時。(B) 以 dexamethasone (2-70 μM) 處理細胞 9 小時。

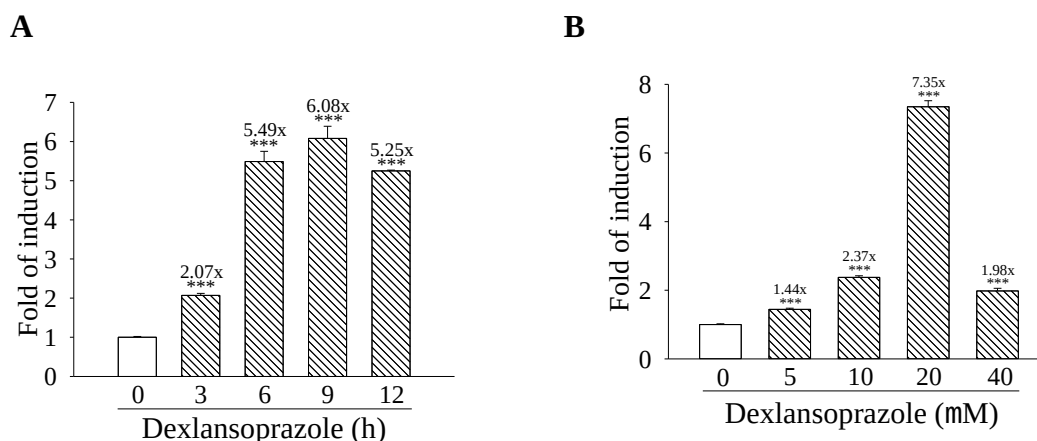
活化的 AhR 將移動到細胞核。為了分析 AhR 是否被 dextralansoprazole 激活，透過免疫螢光成像觀察 AhR 的核定位。以 dextralansoprazole (10、20、30 和 40 μM) 和 $\beta\text{-NF}$ (2.5 μM) 處理 Hepa-1c1c7 細胞 2 小時後，AhR 由細胞質移動至細胞核，如圖九 A。 $\beta\text{-NF}$ 誘導的 AhR 核定位作為陽性對照。螢光染料 Hoechst 33342 顯示了細胞核的位置。



圖九、Dextralansoprazole (Dexl) 誘導 AHR 的核定位。(A) Hepa-1c1c7 細胞以 dextralansoprazole (10、20、30 和 40 μM) 和 $\beta\text{-NF}$ (2.5 μM) 處理 2 小時，然後用 4% 甲醛固定細胞，並用 Hoechst 33342 (5 $\mu\text{g/ml}$)。

(三) Dextralansoprazole 活化人體細胞中 AhR 的轉活化活性

為了確定 dextralansoprazole 是否也誘導人類細胞中 AhR 的轉活化活性，將含有三個 AHRE 基序的 pAhRDtkLuc3 報告質體和 RSV-lacZ 報告質體轉染到 HepG2 細胞。dextralansoprazole 增加 HepG2 細胞中 AHRE 的轉錄活性，轉錄活性與作用時間相關，如圖十 A，並在治療 9 小時時達到最高水平，此後降低。再以 dextralansoprazole (5-40 μM) 處理 9 小時，誘導 AHRE 的轉錄活性，如圖十 B，在 20 μM dextralansoprazole 處理後達到最大水準。



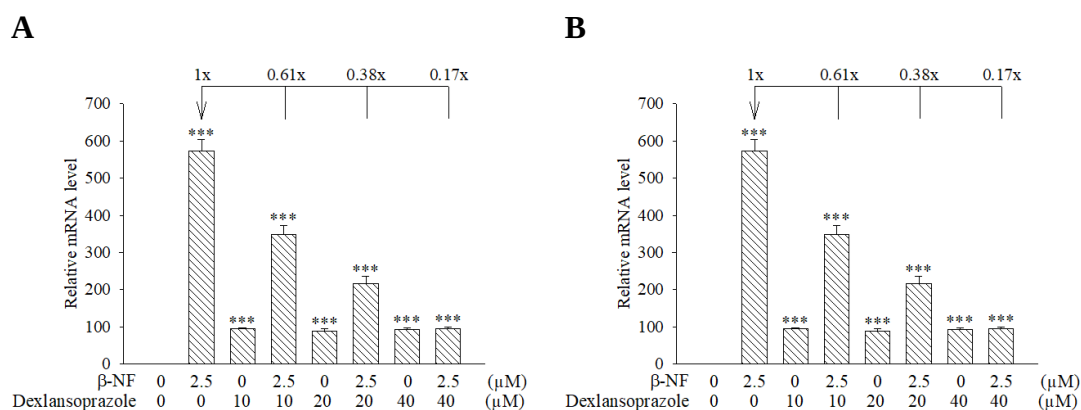
圖十、Dexlansoprazole 對人類 HepG2 細胞中 AHRE 轉活化活性的影響。

將報告質體 pAhRDtkLuc3 和 RSV-lacZ 轉染至 HepG2 細胞。(A) 以 dexlansoprazole (20 μM) 處理細胞 3-12 小時。(B) 以 dexlansoprazole (5-40 μM) 處理細胞 10 小時。

(四) Dexlansoprazole 在人類細胞中抑制 AhR 促進劑誘導的 CYP1A1 mRNA 及蛋白質表達

Dexlansoprazole (10、20 和 40 μM) 與 β-NF (2.5 μM) 共同處理，導致 dexlansoprazole 抑制 HepG2 細胞中 β-NF 誘導的 CYP1A1 mRNA 表現，如圖十一 A。10 μM dexlansoprazole 能夠抑制 39% 的 2.5 μM β-NF 誘導的 CYP1A1 mRNA 表現。40 μM dexlansoprazole 完全消除 2.5 μM β-NF 誘導的 CYP1A1 mRNA 表現。

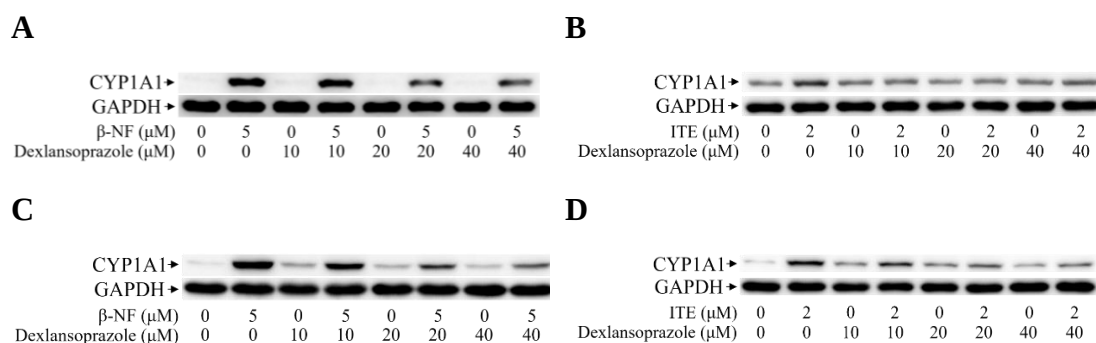
Dexlansoprazole (10、20 和 40 μM) 與 ITE (2 μM) 共同處理導致 dexlansoprazole 抑制 HepG2 細胞中 ITE 誘導的 CYP1A1 mRNA 表現，如圖十一 B。10 μM dexlansoprazole 能夠抑制 2 μM ITE 誘導的 CYP1A1 mRNA 表現的 14%。40 μM dexlansoprazole 抑制 2 μM ITE 誘導的 CYP1A1 mRNA 表現的 62%。



圖十一、Dexlansoprazole 對人類 HepG2 細胞中細胞色素 P450 1A1 (CYP1A1) mRNA 表現的影響。 HepG2 細胞以 10-40 μM dexlansoprazole 預處理 1 小時，然後以 (A) 2.5 μM $\beta\text{-NF}$ 處理 7 小時和 (B) 2 μM ITE 處理 6 小時。收集所有 RNA 用於分析。

Dexlansoprazole (10、20 和 40 μM) 與 $\beta\text{-NF}$ (5 μM) 共同處理導致 dexlansoprazole 抑制 HepG2 細胞中 $\beta\text{-NF}$ 誘導的 CYP1A1 蛋白表達，如圖十二 A。此外，dexlansoprazole (10、20 和 40 μM) 與 ITE (2 μM) 共處理也導致 dexlansoprazole 抑制 HepG2 細胞中 ITE 誘導的 CYP1A1 蛋白表現，如圖十二 B。

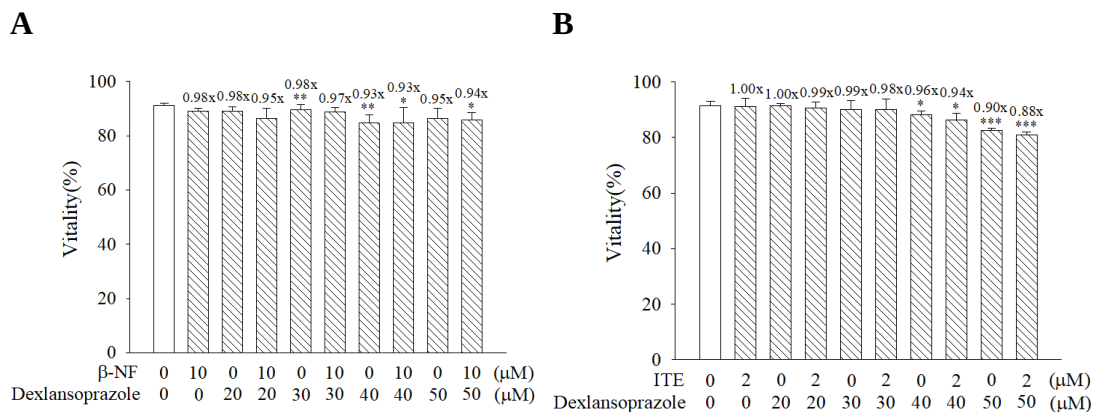
為避免細胞特異性，除了肝細胞株 HepG2 之外，也處理卵巢顆粒細胞株 HO23。Dexlansoprazole (10、20 和 40 μM) 與 $\beta\text{-NF}$ (5 μM) 共同處理導致 dexlansoprazole 也抑制 HepG2 細胞中 $\beta\text{-NF}$ 誘導的 CYP1A1 蛋白表達，如圖十二 C。Dexlansoprazole (10、20 和 40 μM) 與 ITE (2 μM) 的共同處理也導致 dexlansoprazole 抑制 HO23 細胞中 ITE 誘導的 CYP1A1 蛋白表現，如圖十二 D。



圖十二、Dexlansoprazole 對人類 HepG2 和 HO23 細胞中細胞色素 P450 1A1 (CYP1A1) 蛋白質表現的影響。HepG2 細胞以 dexlansoprazole 預處理 1 小時，然後以 (A) 5 μ M β -NF 處理 7 小時和 (B) 2 μ M ITE 處理 6 小時。(A、B) 的 Western blot 顯示的 CYP1A1 蛋白質水平分別根據 GAPDH 蛋白的量進行定量和標準化。HO23 細胞以 dexlansoprazole 預處理 1 小時，然後用 (C) 5 μ M β -NF 處理 7 小時和 (D) 2 μ M ITE 處理 6 小時

(五) Dexlansoprazole 僅輕微降低細胞活力

測定細胞活力，以確認 dexlansoprazole 抑制 β -NF 和 ITE 誘導的 CYP1A1 表達是否是由於細胞活力下降所致。HepG2 細胞與 dexlansoprazole (20-50 μ M) 加 β -NF (10 μ M) 或 ITE (2 μ M) 共同處理 24 小時。相較於對照組，dexlansoprazole 加 β -NF 處理的 HepG2 細胞的最低活力為 93%，如圖十三 A。相較於對照組，dexlansoprazole 加 ITE 處理的 HepG2 細胞的最低活力為 88%，如圖十三 B。Dexlansoprazole 僅輕微降低細胞活力。所以，dexlansoprazole 抑制 AhR 的活性，應該不是因為 dexlansoprazole 對於細胞的毒性而引起。



圖十三、Dexlansoprazole、 β -NF 和 ITE 處理的 HepG2 細胞的活力測定。

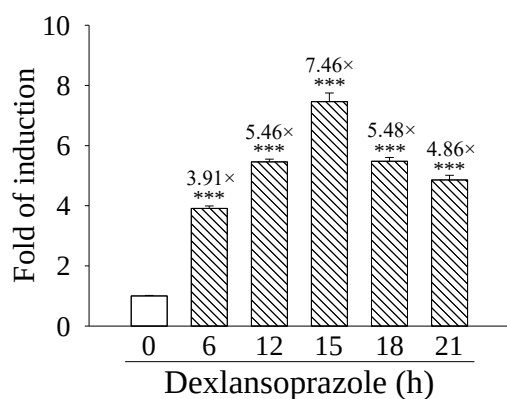
HepG2 細胞以 dexlansoprazole 預處理 1 小時，然後分別以 (A) β -NF (10 μ M) 和 (B) ITE (2 μ M) 處理 24 小時。活力率由健康細胞的百分比表示。條形上方顯示了處理細胞中健康細胞相對於對照細胞的倍數。* 表示與 DMSO 溶劑處理的健康細胞進行比較。

(六) Dexlansoprazole 增強 GRE 轉錄活性

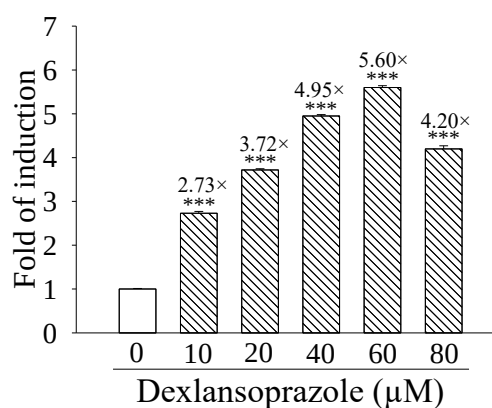
小鼠乳腺腫瘤病毒(MMTV)-LTR 含有 GRE，GR 配體可以增強其轉錄活性。HO23-1B 含有永久轉染 MMTV-pGL4-LUC 報告質體。

Dexlansoprazole (60 μ M) 刺激 HO23-1B 細胞中 MMTV-LTR 的轉錄活性，如圖十四 A。在 HO23-1B 細胞中，在處理 15 小時時達到最高水平，分別增加了 7.46 倍，此後下降。Dexlansoprazole (10-80 μ M) 也誘導 MMTV-LTR 的轉錄活性，分別在 HO23-1B 細胞中以 60 μ M 處理 15 小時時最大誘導增加 5.6 倍，如圖十四 B。為了進一步證實 dexlansoprazole 誘導 GR 的轉活化活性，以 GREkLUC 瞬時轉染 HO23 細胞，GREtkLUC 是一種帶有 GRE 驅動螢光素酶表現的報告質體。Dexlansoprazole (80 μ M) 刺激 GRE 的轉錄活性，如圖十四 C。在處理 18 小時時，它達到最高水平，增加了 15.1 倍，隨後在轉染的 HO23 細胞中下降。Dexlansoprazole (10-80 μ M) 也誘導 GRE 轉錄活性，在轉染的 HO23 細胞中用 80 μ M 處理 15 小時，誘導增加 15.2 倍，如圖十四 D。

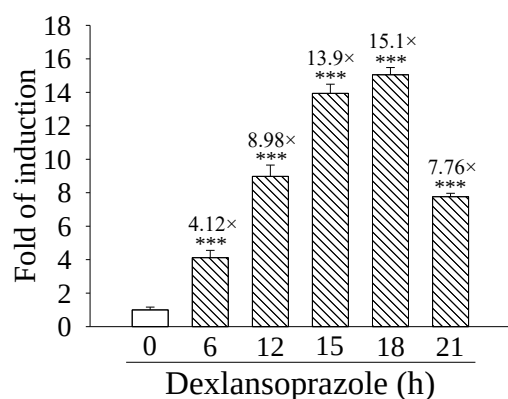
A



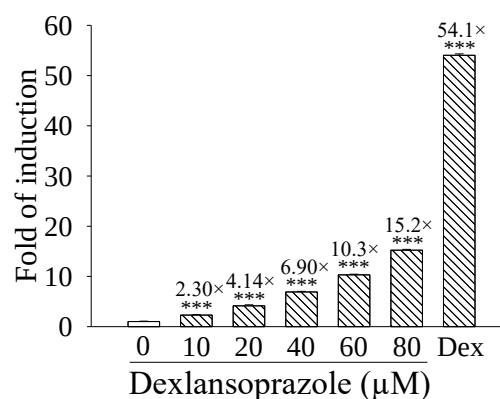
B



C



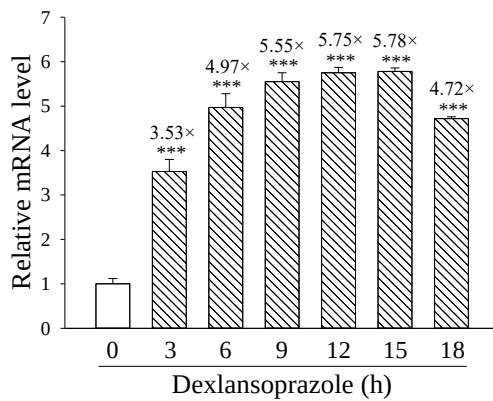
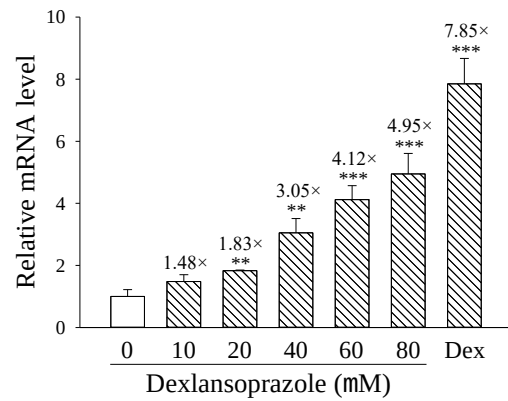
D



圖十四、Dexamethasone 對 MMTV-LTR 啟動子和由 GRE 介導的轉錄活性的影響。(A、B) 兩種人類 HO23-1B 細胞均含有 MMTV-pGL4 報告質粒。(A) HO23-1B 以 dexamethasone (60 μ M) 處理 6-21 小時。(B) 以 dexamethasone (10、20、40、60 和 80 μ M) 處理 HO23-1B 細胞 15 小時。然後打碎細胞並收集用於螢光素酶活性測定和蛋白質測定。(C、D) GREtkLUC 和 RSV-lacZ 報告質粒均轉染至人類 HO23 細胞。(C) 以 dexamethasone (80 μ M) 處理 HO23 細胞 6-21 小時。(D) 以 dexamethasone (10、20、40、60 和 80 μ M) 處理 HO23 細胞 15 小時。然後打碎細胞並收集用於螢光素酶和 β -半乳糖苷酶的活性測定。

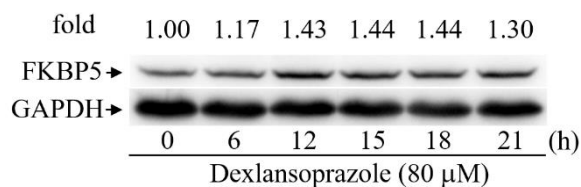
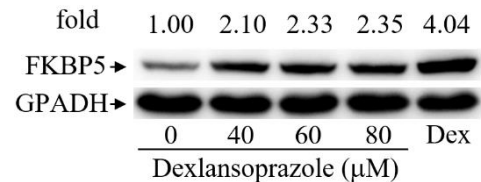
(七) Dexamethasone 增強 FKBP5 的表達

FK506 結合蛋白 5 (FKBP5) 是 GR 目標基因 (Qiu et al., 2019)。加入 dexamethasone 可增加 HO23 和 HepG2 細胞中 FKBP5 mRNA 的表達，並與時間和劑量相關。在用 dexamethasone (60 μ M)處理 3 小時後，在 HO23 細胞中明顯檢測到 FKBP5 mRNA 表現的誘導，在處理 15 小時時達到最大水平，此後降低，如圖十五 A。在用 dexamethasone (10 μ M)處理時可檢測到 FKBP5 mRNA 表現的誘導，並且在用 dexamethasone (80 μ M)處理 HO23 細胞 12 小時時誘導增加高達 4.95 倍，如圖十五 B。

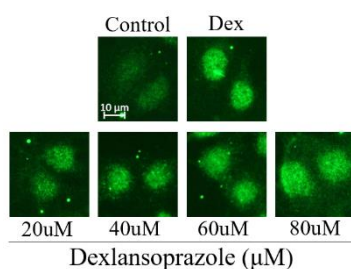
A**B**

圖十五、Dexlansoprazole 誘導的 FKBP5 mRNA 表現。 (A) HO23 細胞以 60 μM dexlansoprazole 處理 3-18 小時。 (B) HO23 細胞分別以 dexlansoprazole (10-80 μM) 和 dexamethasone (Dex) (100 nM) 處理 12 和 15 小時。然後打碎細胞並收集總 RNA。以 RT-qPCR 分析經 GAPDH 標準化的 FKBP5 mRNA 表現。

加入 dexlansoprazole 可增加 HO23 細胞中 FKBP5 蛋白的含量，且具有時間依賴性。在 HO23 細胞中以 dexlansoprazole (80 μM)處理 6 小時後可檢測到 FKBP5 蛋白表現的誘導，如圖十六 A。在處理 12-18 小時時達到最高水平，此後逐漸下降。此外，dexlansoprazole 也增加 FKBP5 蛋白表達，並且還顯示了 dexamethasone 誘導的 FKBP5 蛋白表達，如圖十六 B。由免疫細胞螢光染色進一步檢測 FKBP5 蛋白的表達。以 dexlansoprazole (20-80 μM) 和 dexamethasone (100 nM) 處理 HO23 細胞 15 小時。隨著 dexlansoprazole 劑量增加，HO23 細胞中的 FKBP5 蛋白也增加，如圖十六 C。

A**B**

C

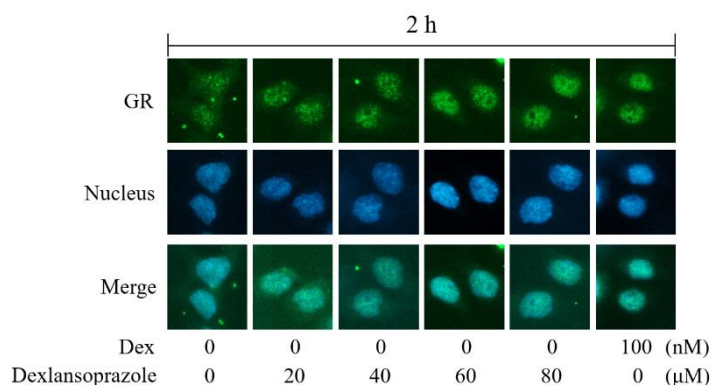


圖十六、**Dexlansoprazole** 誘導的 FKBP5 蛋白表現。(A) 以 dexlansoprazole (80 μ M) 處理 HO23 細胞 6-21 小時。(B) 以 dexlansoprazole (40-80 μ M) 和 dexamethasone (Dex) (100 nM) 處理 HO23 細胞 15 小時。(C) dexlansoprazole 誘導的 FKBP5 蛋白表達，如免疫螢光影像所示。以 dexlansoprazole (20-80 μ M) 和 dexamethasone (100 nM) 處理 HO23 細胞 15 小時。

(八) Dexlansoprazole 誘導 GR 的核定位

為了進一步分析 GR 是否被 dexlansoprazole 激活，透過免疫螢光影像監測 GR 的核定位。當 HO23 細胞以 20-80 μ M dexlansoprazole 和 100nM dexamethasone 處理 2 小時時，GR 明顯轉位到細胞核，如圖十七 A。Dexamethasone 誘導的 GR 入核作為陽性對照。螢光染料 Hoechst 33342 顯示了細胞核的位置。

A



圖十七、**Dexlansoprazole** 誘導 GR 的核定位。(A) HO23 細胞用 dexamethasone (Dex) (100 nM)和 dexlansoprazole (20-80 μ M)處理 2 小時，然後用 4%甲醛固定細胞，並用 Hoechst 33342 對細胞核進行染色。

陸、討論

Dexlansoprazole 是一種被廣泛使用的藥物，它藉由減少胃酸分泌來治療胃食道逆流，因此了解 dexlansoprazole 可能引起的副作用具有相當的重要性。

由參考資料(Larigot, Juricek, Dairou, & Coumoul, 2018)，我們得知 AhR 參與許多生理作用。

CYP1A1 是 AhR 最有名的目標基因。我們的結果顯示 dexlansoprazole 對小鼠細胞中 CYP1A1 mRNA 與蛋白質表現的誘導作用具有時間與劑量依賴性。藉由免疫螢光染色，我們進一步證實 dexlansoprazole 對 CYP1A1 蛋白質表現的誘導作用。

為了確認 dexlansoprazole 是藉由活化的 AhR 誘導 CYP1A1 蛋白質表現，我們採用兩種方法確認我們的猜想。首先，我們先加入人工合成的拮抗劑 CH-223191 到小鼠細胞，再加入 dexlansoprazole，觀察到 CH-223191 顯著地減少了 dexlansoprazole 所誘導的 CYP1A1 蛋白質表現。另外，我們培養兩種突變的小鼠細胞株，c4 與 c12。c4 細胞缺乏 Arnt，一種對 AhR 的活化至關重要的 AhR 輔助蛋白。c12 細胞減少 AhR 蛋白質的表現量。在 c4 與 c12 的細胞中未偵測到 dexlansoprazole 所誘導的 CYP1A1 蛋白質表現。以上的兩個實驗顯示了 dexlansoprazole 藉由活化的 AhR 誘導 CYP1A1 蛋白質表現。

我們的研究結果顯示 dexlansoprazole 調控 AHRE 介導轉錄活性，與接觸的時間與劑量有關聯。又已知 AhR 是藉由 AHRE 調控轉錄作用的。因此我們證實 dexlansoprazole 會活化 AhR。當 AhR 與其配體結合時，AhR 會進入細胞核，並作為一種轉錄因子。dexlansoprazole 與 β -NF 被發現能誘導 AhR 的核定位。這些發現也再次確認在小鼠細胞中，AhR 是被加入之 dexlansoprazole 活化的。

當 AHRE 應用於人類肝臟細胞株 HepG2 時，dexlansoprazole 能刺激 AHRE 所調控的啟動子的轉錄活動，且其具有時間與劑量依賴性。除此之外，dexlansoprazole 也提升了 CYP1A1 mRNA 的表現。因此，證明 dexlansoprazole 在人類肝臟細胞中，作為 AhR 的活化劑。然而，我們的實驗結果也顯示了在人類肝臟細胞中，dexlansoprazole 具劑量依賴性地抑制 β -NF 與 ITE 兩者所誘導的 CYP1A1 mRNA 與蛋白質表現。這表示 dexlansoprazole 活化 AhR 的能力比內源性配體 ITE 及人工合成配體 β -NF 較弱。

我們由細胞活性檢測評估了同時加入 dexlansoprazole 與 β -NF 或 ITE 的情況下，是否具有細胞毒性。使用 dexlansoprazole 加上 β -NF 或 ITE 的處理，在人類肝臟細胞中，分別降低不超過 7%與 12%的細胞活性。而單獨在人類肝臟細胞加入 dexlansoprazole 時，細胞毒性也同樣輕微(minor)。因此，我們的結論是 dexlansoprazole 對 CYP1A1 產生的抑制作用，並非源於加入 dexlansoprazole 或同時加入 dexlansoprazole 與 β -NF 或 ITE 的細胞毒性。

卵巢濾泡中含有卵母細胞，且它是卵巢的基本單位。卵巢顆粒細胞增殖、包圍卵母細胞，並一起在濾泡成熟過程中被卵泡膜細胞包圍。(Havelock, Rainey, & Carr, 2004; Uyar, Torrealday, & Seli, 2013) 顆粒細胞和卵泡膜細胞共同提供類固醇的生物合成，並分別在卵母細胞成熟過程中，介導濾泡刺激素和黃體生成素的訊號傳遞。因此，顆粒細胞對於濾泡的發育至關重要。AhR 廣泛地表現於女性生殖器官中，包括卵巢顆粒細胞(Hernández-Ochoa et al., 2009)因此，我們也分析了 dexlansoprazole 是否會誘導人類卵巢細胞株 HO23 中 AhR 的表現。結果顯示，dexlansoprazole 在人類卵巢細胞中提升了 CYP1A1 的蛋白質表現，但也抑制了 β -NF 與 ITE 兩者所誘導的 CYP1A1 mRNA 與蛋白質表現。根據我們的結果，我們預期 dexlansoprazole 會降低 ITE 活化 AhR 的生理活動。

AhR 與 GR 都是類固醇荷爾蒙受體家族中的一員，且他們在生理功能中都扮演極重要的角色。因此，我們也分析 dexlansoprazole 是否會調節 GR 的作用。

MMTV-LTR 擁有 GRE，且它的轉錄活性可被糖皮質素所誘導。我們發現 dexlansoprazole 可以在人類卵巢細胞中，具時間與劑量依賴性地刺激 MMTV-LTR 的轉錄作用。除此之外，dexlansoprazole 也增強了糖皮質素反應元件 (GRE) 的轉錄作用。這些結果顯示 dexlansoprazole 很可能是 GR 的促進劑。

FKBP5 是一個 GR 調控表現的基因。我們檢測了 dexlansoprazole 是否會誘導 FKBP5 的表現。Dexamethasone 是一個人工合成的 GR 促進劑，且它在這裡被用於作為促進 GR 表現的陽性對照。我們的研究結果顯示 dexlansoprazole 在人類卵巢細胞中，具時間與劑量依賴性地刺激 FKBP5 mRNA 與蛋白質的表現。而 FKBP5 的蛋白質表現由免疫螢光染色進一步確認。免疫螢光染色的圖像顯示了 dexlansoprazole 與 dexamethasone 同樣明顯的誘導了 FKBP5 蛋白質的表現。

GR 在被其配體活化後會由細胞質進入細胞核中。藉由免疫螢光染色，我們

能觀察到，dexlansoprazole 及 dexamethasone 都可以誘導 GR 進入細胞核中。這些結果都顯示了 dexlansoprazole 是 GR 的促進劑。因此，dexlansoprazole 可能會模仿其他內源性 GR 配體，而干擾糖皮質素荷爾蒙的生理作用，作為 GR 的內分泌干擾劑。

柒、研究結論

總結來說，我們的研究顯示了 dexlansoprazole 在人類細胞中是 AhR 與 GR 的促進劑。然而，因為 dexlansoprazole 促進 AhR 的效力低於內源性 AhR 配體 ITE，dexlansoprazole 可能會降低 ITE 和其他內源性 AhR 配體的生理作用。又由於 dexlansoprazole 與內源性 GR 配體在結構上的相似性，它也可能影響 GR 的活性。因此，dexlansoprazole 可能會作為 ITE、AhR 和 GR 的內分泌干擾劑。本研究揭示了 dexlansoprazole 藉由影響 AhR 和 GR 活性而產生的潛在副作用，期望能作為將 dexlansoprazole 胃藥長期開立給病患的醫療人員的參考依據。

捌、參考文獻

- Fass R, Frazier R. The role of dexlansoprazole modified-release in the management of gastroesophageal reflux disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2017;10(2):243-251.
- Goh KL, Choi MG, Hsu PI, Chun HJ, Mahachai V, Kachintorn U, Leelakusolvong S, Kim N, Rani AA, Wong BC, Wu J, Chiu CT, Shetty V, Bocobo JC, Chan MM, Lin JT. Pharmacological and Safety Profile of Dexlansoprazole: A New Proton Pump Inhibitor - Implications for Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease in the Asia Pacific Region. *J Neurogastroenterol Motil*. 2016;22(3):355-366.
- Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y. Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2007;464(2):207-212.
- Murray IA, Patterson AD, Perdew GH. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(12):801-814.
- Nakata K, Tanaka Y, Nakano T, Adachi T, Tanaka H, Kaminuma T, Ishikawa T. Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2006;21(6):437-457.
- Go RE, Hwang KA, Choi KC. Cytochrome P450 1 family and cancers. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2015;147:24-30.
- Song J, Clagett-Dame M, Peterson RE, Hahn ME, Westler WM, Sicinski RR, DeLuca HF. A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(23):14694-14699.
- Wang XS, Cao F, Zhang Y, Pan HF. Therapeutic potential of aryl hydrocarbon receptor in autoimmunity. *Inflammopharmacology*. 2019.

- Juricek L, Coumoul X. The Aryl Hydrocarbon Receptor and the Nervous System. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(9).
- Hernández-Ochoa I, Karman BN, Flaws JA. The role of the aryl hydrocarbon receptor in the female reproductive system. *Biochem Pharmacol*. 2009;77(4):547-559.
- Novotna A, Srovnalova A, Svecarova M, Korhonova M, Bartonkova I, Dvorak Z. Differential effects of omeprazole and lansoprazole enantiomers on aryl hydrocarbon receptor in human hepatocytes and cell lines. *PLoS One*. 2014;9(6):e98711.
- Chen HS, Chiang PH, Wang YC, Kao MC, Shieh TH, Tsai CF, Tsai EM. Benzyl butyl phthalate induces necrosis by AhR mediation of CYP1B1 expression in human granulosa cells. *Reprod Toxicol*. 2012;33(1):67-75.
- Frank F, Ortlund EA, Liu X. Structural insights into glucocorticoid receptor function. *Biochem Soc Trans*. 2021;49(5):2333-2343.
- Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34(9):518-530.
- 螢光顯微鏡 Fluorescence Microscope - 國立中山大學海洋科學學院. (n.d.). 國立中山大學海洋科學學院. <https://marine.nsysu.edu.tw/p/404-1025-254933.php?Lang=zh-tw>
- NucleoCounter® NC-3000TM Advanced Image Cytometer. (n.d.). ChemoMetec. <https://chemometec.com/nucleocounters/nc-3000/>
- CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System. (n.d.). Bio-Rad. <https://www.bio-rad.com/en-tw/product/cfx96-touch-real-time-pcr-detection-system?ID=LJB1YU15>
- Qiu B, Xu Y, Wang J, Liu M, Dou L, Deng R, Wang C, Williams KE, Stewart RB, Xie Z, Ren W, Zhao Z, Shou W, Liang T, Yong W. Loss of FKBP5 Affects Neuron Synaptic Plasticity: An Electrophysiology Insight. *Neuroscience*. 2019;402:23-36.
- Larigot L, Juricek L, Dairou J, Coumoul X. AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim Open*. 2018;7:1-9.
- Havelock JC, Rainey WE, Carr BR. Ovarian granulosa cell lines. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;228(1-2):67-78.
- Uyar A, Torrealday S, Seli E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertil Steril*. 2013;99(4):979-997.

【評語】 052010

Dexlansoprazole 是一種氫離子幫浦阻斷劑(PPI)，也是被廣泛使用的藥物，它藉由減少胃酸分泌來治療胃食道逆流，因其結構含有 hydrocarbon rings，與內源性 AhR ligand (4 ITE) 和內源性 GR ligand (cortisol)的結構部份相似，本研究分析 dexlansoprazole 是否調節 AhR 和 GR 的活性，是否刺激細胞內芳香烴反應元件 (AHRE) 和糖皮質激素受體反應元件 (GRE) 的轉錄活性，進而刺激 AhR 目標基因 CYP1A1 和 GR 目標基因 FKBP5 的 mRNA 和蛋白質表現，並誘導 AhR、GR 移轉入核，此計畫希望有助於了解 dexlansoprazole 的潛在副作用。

1. 本計畫的動機起源自藥物結構與目標 ligand 結構相似，事實上含有 hydrocarbon rings 的藥物相當多，是否都需要考量嗎？實驗動機宜再加強闡述。
2. 本研究對於整個機制思考得很周全，然而實驗數據處理需加強，例如：很多進行統計分析的實驗需說明實驗進行次數，細胞染色圖也需附加比例尺，西方轉印法也最好標註蛋白質分子量大小。

3. 此外，主題為探討胃食道逆流，但細胞株選擇肝細胞株和卵巢顆粒細胞株，是否適當？
4. 結論中提到 dexlansoprazole 可能會作為 ITE、AhR 和 GR 的內分泌干擾劑，因此本研究揭示了 dexlansoprazole 藉由影響 AhR 和 GR 活性而產生的潛在副作用，期望能作為將 dexlansoprazole 胃藥長期開立給病患的醫療人員的參考依據。請闡明潛在的副作用為何及如何防治，如果要依此做為開立藥單的參考其實還是過早下結論。

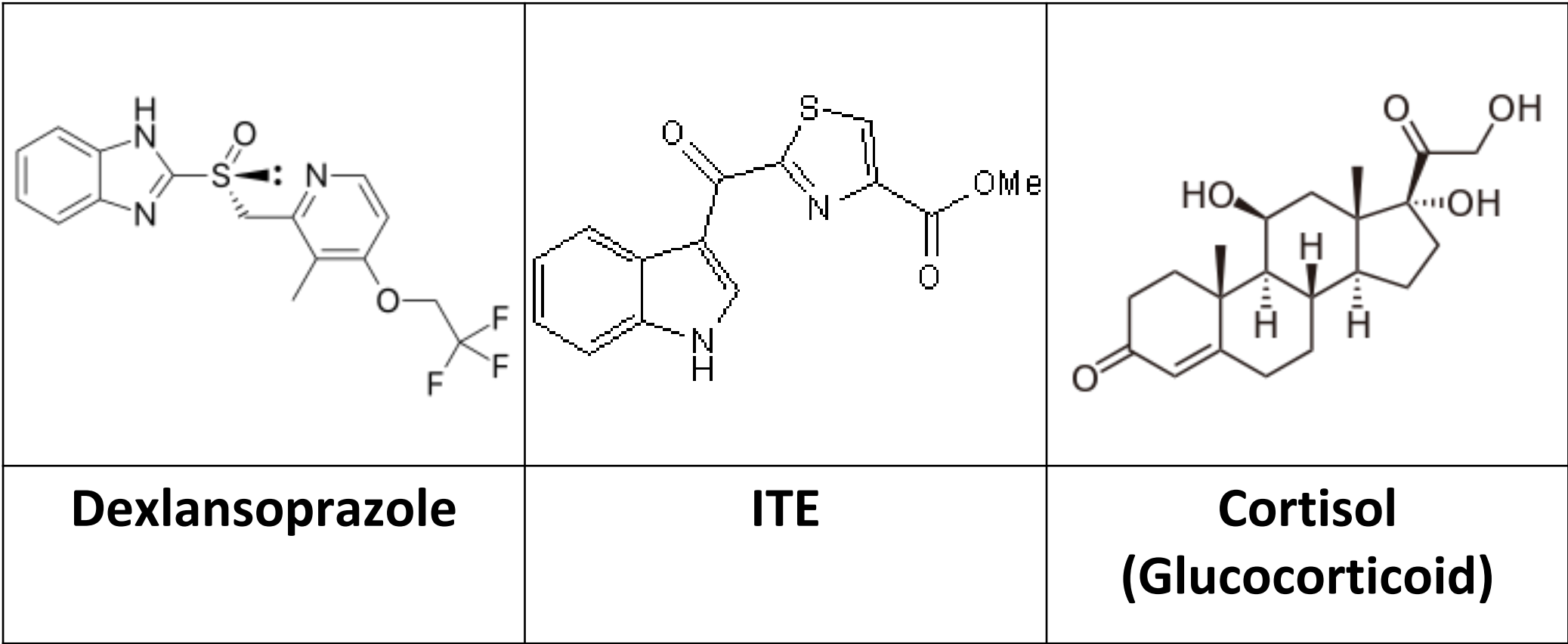
作品簡報

探討Dexlansoprazole的副作用－
可作為 ITE、芳香烴受體和
糖皮質激素受體的內分泌干擾劑

壹、研究摘要

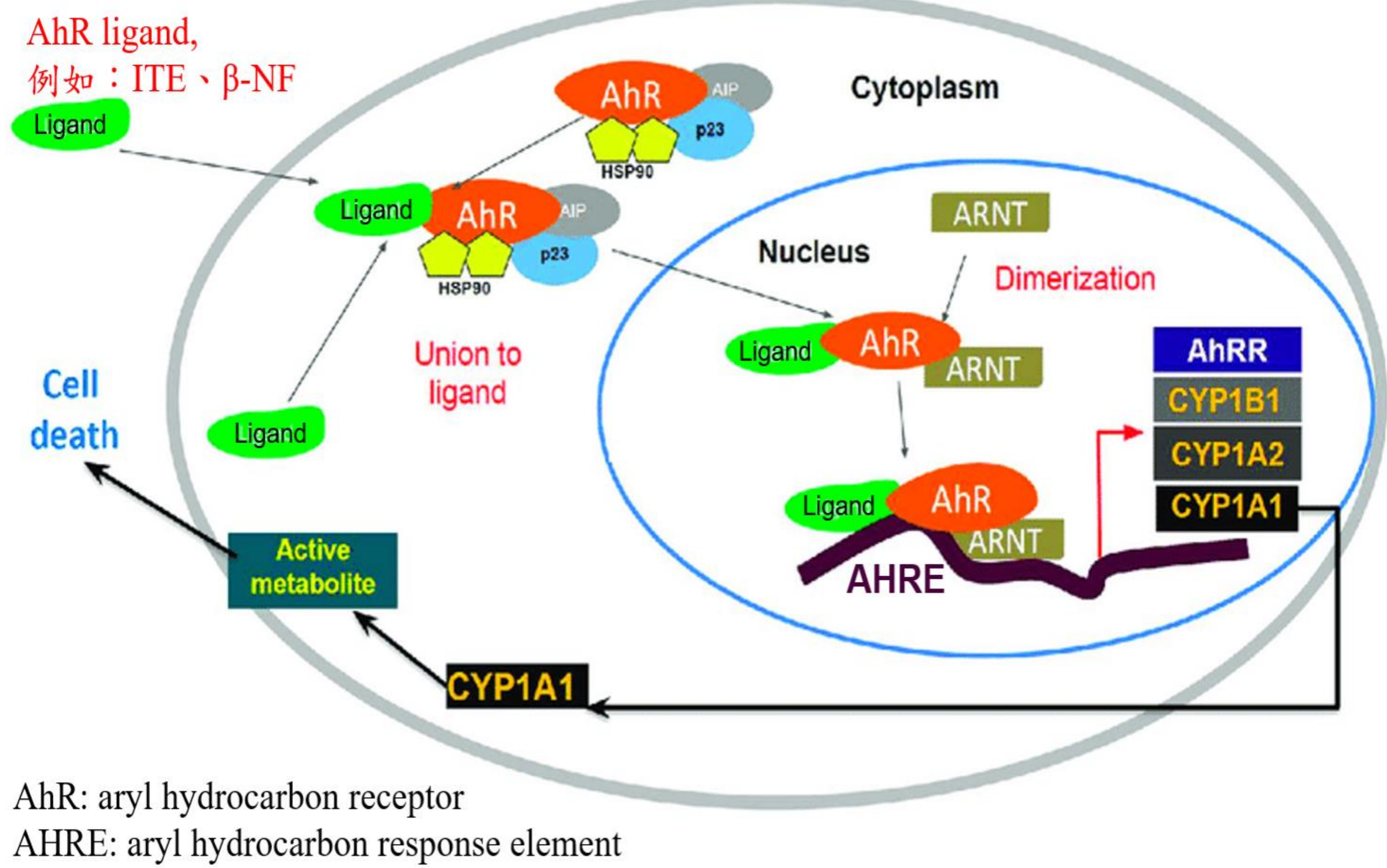
Dexlansoprazole是一種氫離子幫浦阻斷劑 (PPI) — 一類永久結合和阻斷氫離子幫浦的藥物，進而抑制胃酸的形成。此類藥物用於治療糜爛性食道炎和胃食道逆流。Dexlansoprazole的結構與內源性芳香烴受體 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) 的配體 ITE 和內源性糖皮質激素受體 (glucocorticoid receptor, GR) 的配體皮質醇的結構部份相似。此外，AhR和GR屬於類固醇激素受體家族，在生理功能中扮演重要角色。因此，我們將探討dexlansoprazole的副作用，是否會調節AhR和GR的活性。

透過qPCR、Western blot和immunofluorescence，偵測CYP1A1和 FKBP5的mRNA、蛋白質表現量，來判斷是否有活化AhR、GR的活性。此外，我們檢驗dexlansoprazole 調節基因的轉錄活性及誘導AhR、GR由細胞質移轉入細胞核內。據此，我們的研究顯示dexlansoprazole是一種 AhR 和 GR 的促進劑，可能是ITE、AhR 和 GR 的內分泌干擾物。



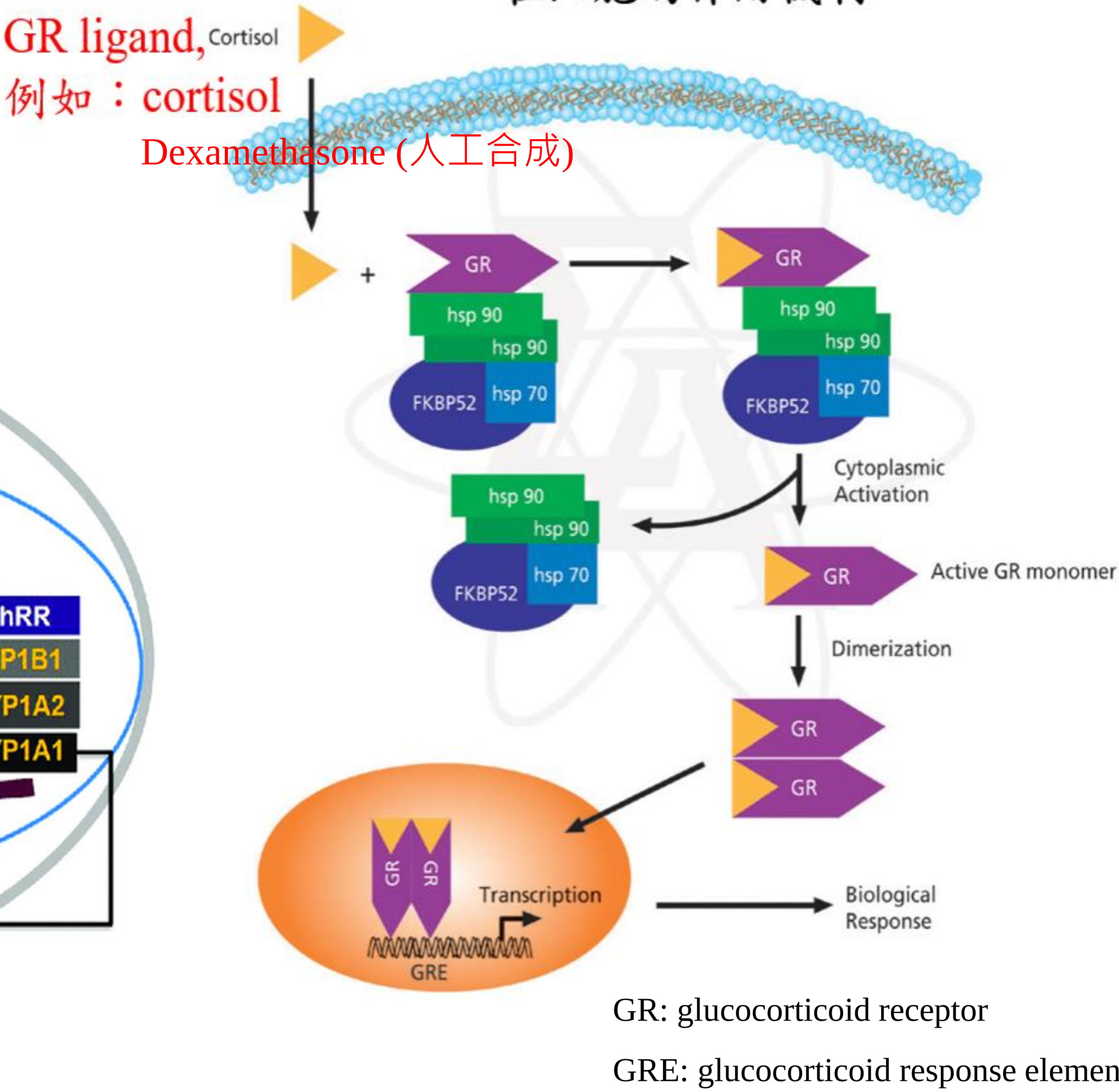
▲圖一、Dexlansoprazole、ITE、Cortisol 的化學結構。

AhR在細胞的作用機制



▲圖二、Aryl hydrocarbon receptor (AhR) 在細胞的作用機制。

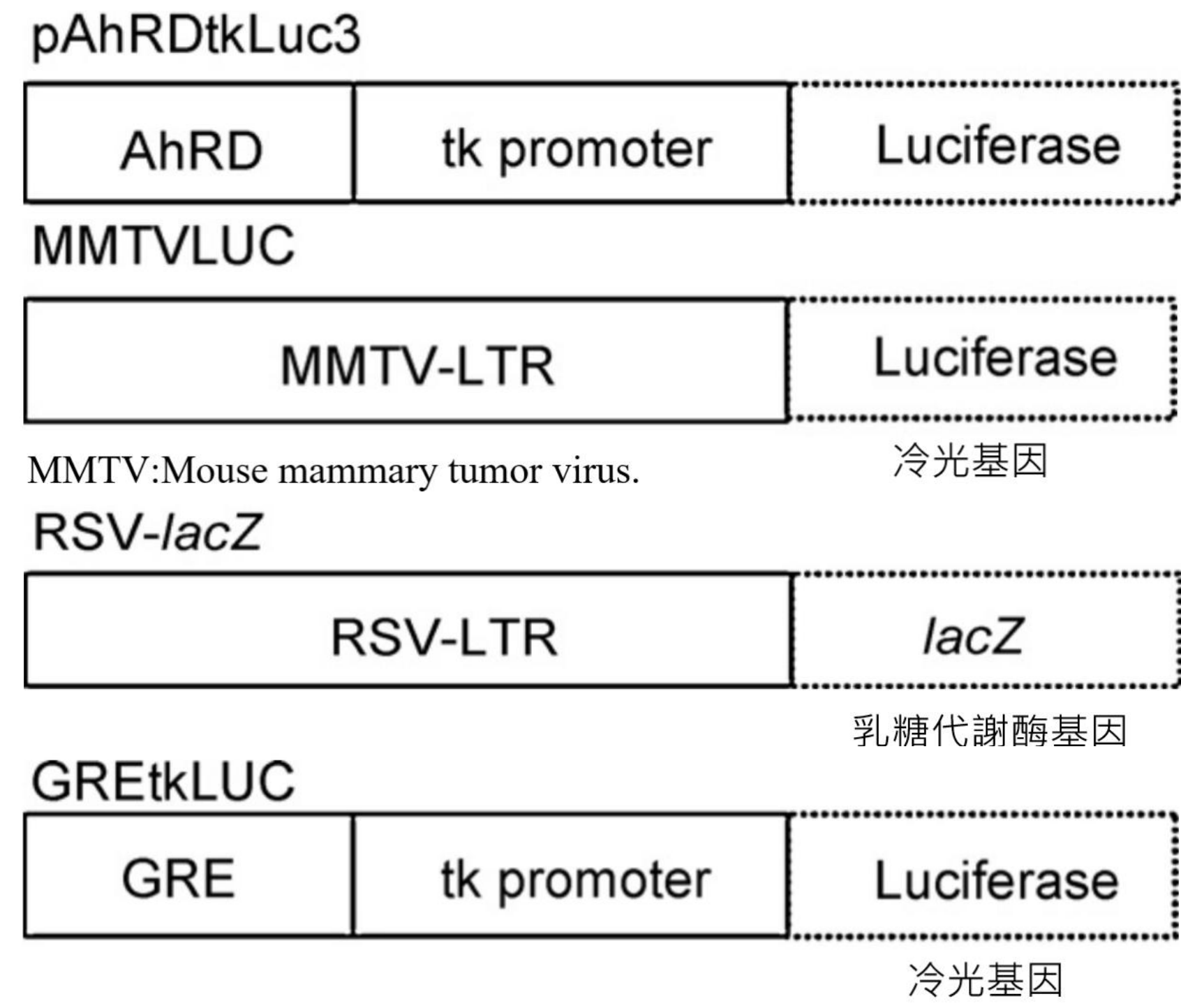
GR在細胞的作用機制



▲圖三、Glucocorticoid receptor (GR)在細胞的作用機制。

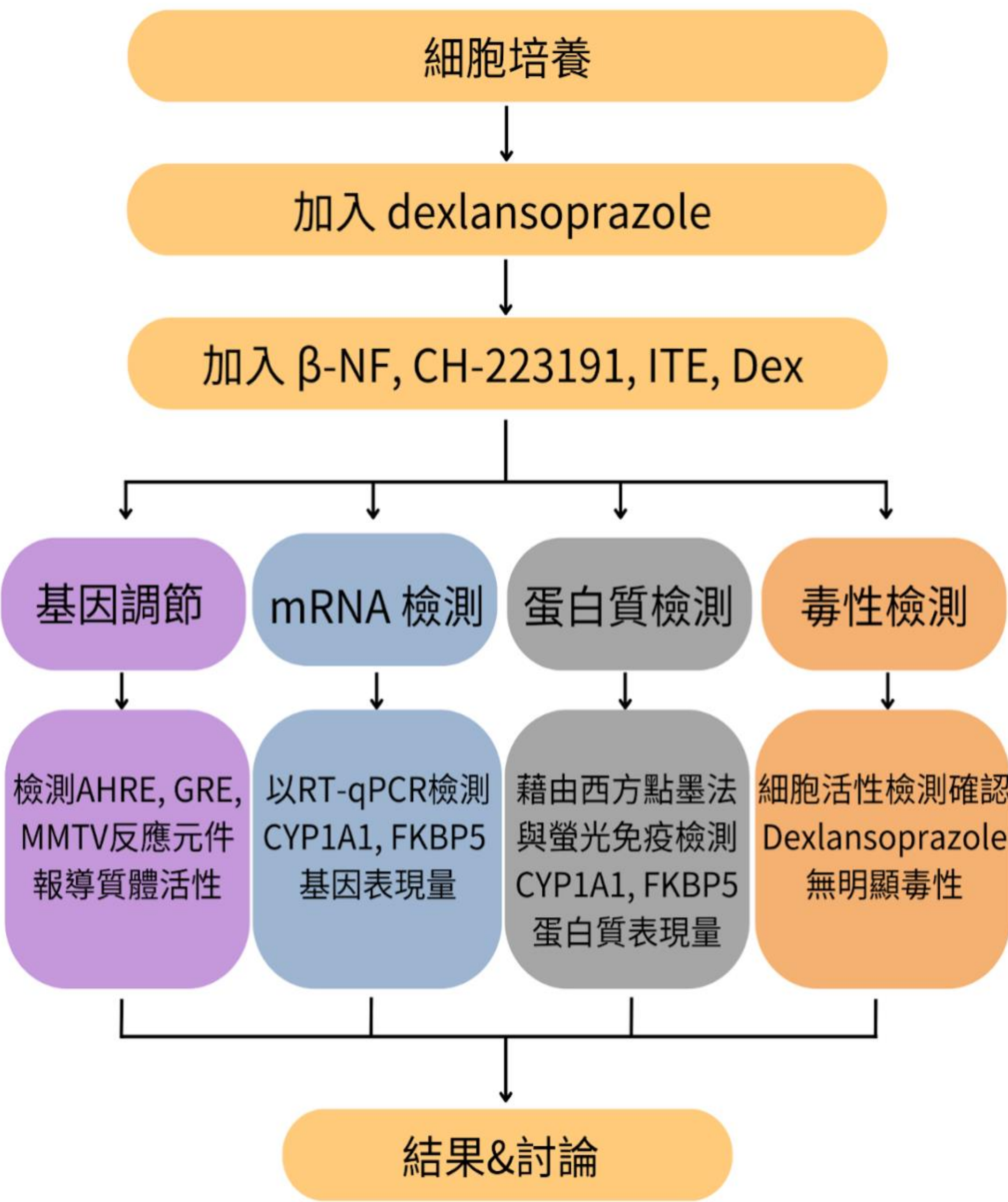
貳、研究目的

- 一、分析dexlansoprazole是否刺激細胞內芳香烴反應元件 (AHRE) 和糖皮質激素受體反應元件 (GRE) 的轉錄活性，如圖四。
- 二、分析dexlansoprazole與AhR和GR配體，是否刺激AhR目標基因CYP1A1和GR目標基因FKBP5的mRNA和蛋白質表現。
- 三、分析dexlansoprazole是否有與AhR、GR配體類似的功能，誘導AhR、GR移轉入核。



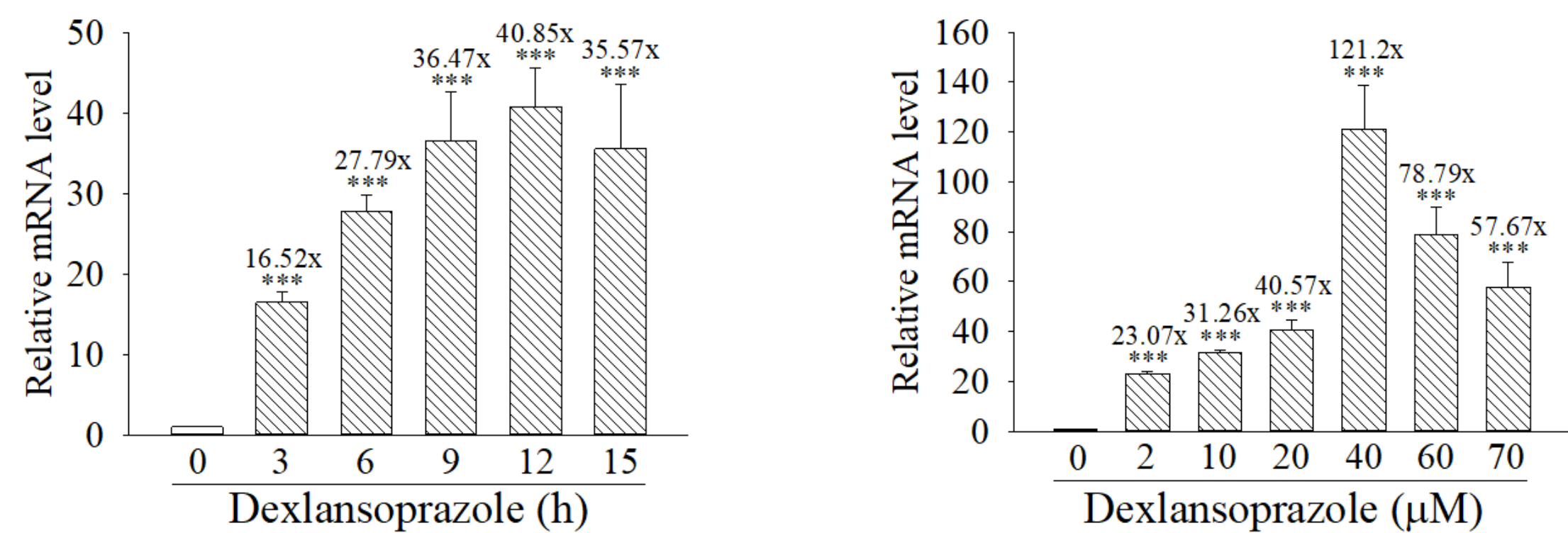
▲圖四、用於探討AhR及GR分別調控基因的AHRE及GRE的報告基因質體 (reporter plasmid) 的部份結構。

參、研究架構



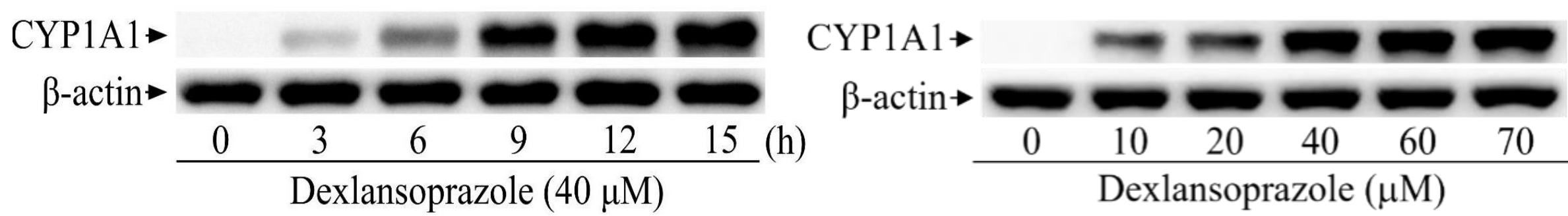
伍、研究結果

一、Dexlansoprazole 刺激 CYP1A1 mRNA 及蛋白質在小鼠細胞內的表達



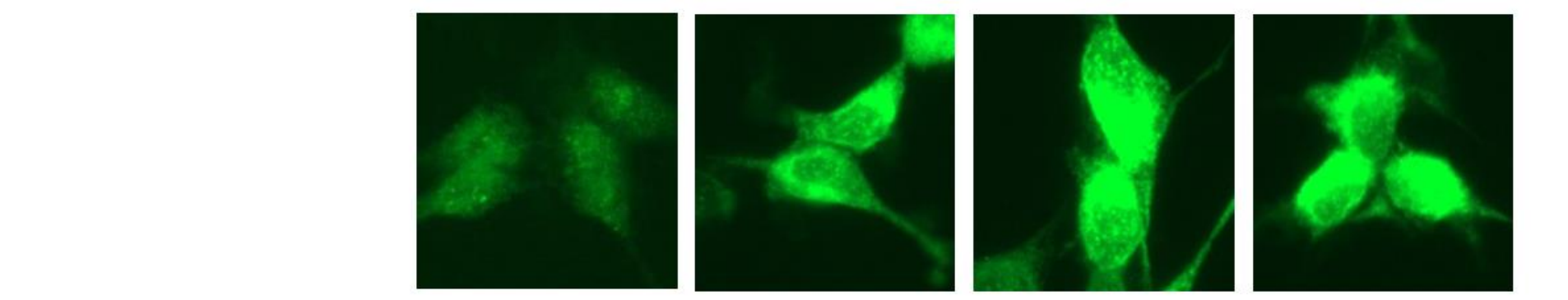
▲ 圖五A、Hepa-1c1c7 細胞以 dexlansoprazole (40 μM) 處理 3-15小時。

▲ 圖五B、Hepa-1c1c7 細胞以 dexlansoprazole(2-70 μM) 處理9小時。



▲ 圖六A、Hepa-1c1c7細胞以 dexlansoprazole (40 μM) 處理 3-15小時。

▲ 圖六B、Hepa-1c1c7 細胞以 dexlansoprazole (10-70 μM) 處理 12小時。

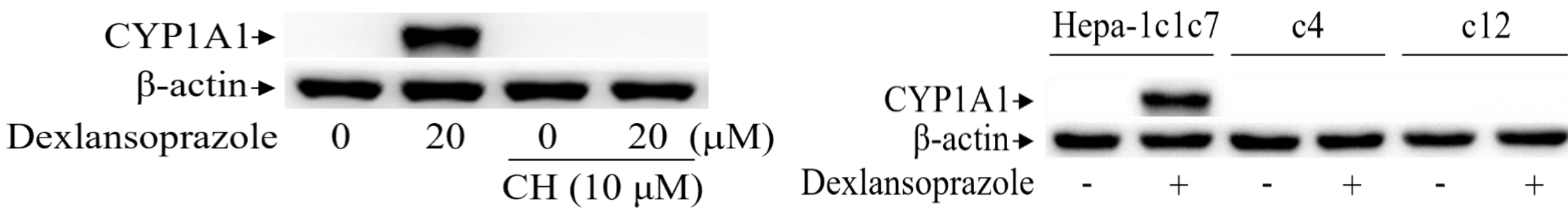


β-NF 0 0 0 2.5 (μM)

Dexlansoprazole 0 20 40 0 (μM)

▲ 圖六C、免疫螢光影像顯示dexlansoprazole和β-NF誘導的CYP1A1表達。Hepa-1c1c7細胞被dexlansoprazole (20和40 μM) 和β-NF (2.5 μM) 處理9小時。

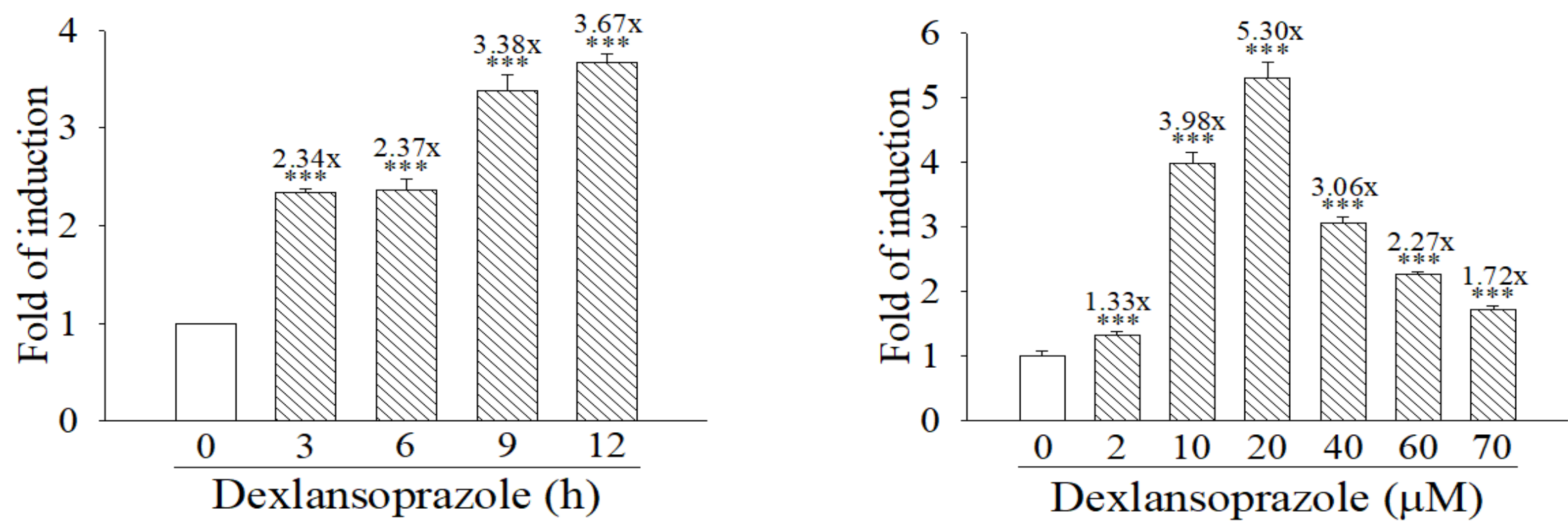
二、Dexlansoprazole 藉由AhR傳訊路徑的方式誘導 CYP1A1的表達



▲ 圖七A、Hepa-1c1c7 細胞以 10 μM CH-223191 (CH) 預處理 1 小時，然後以dexlansoprazole處理 12 小時。

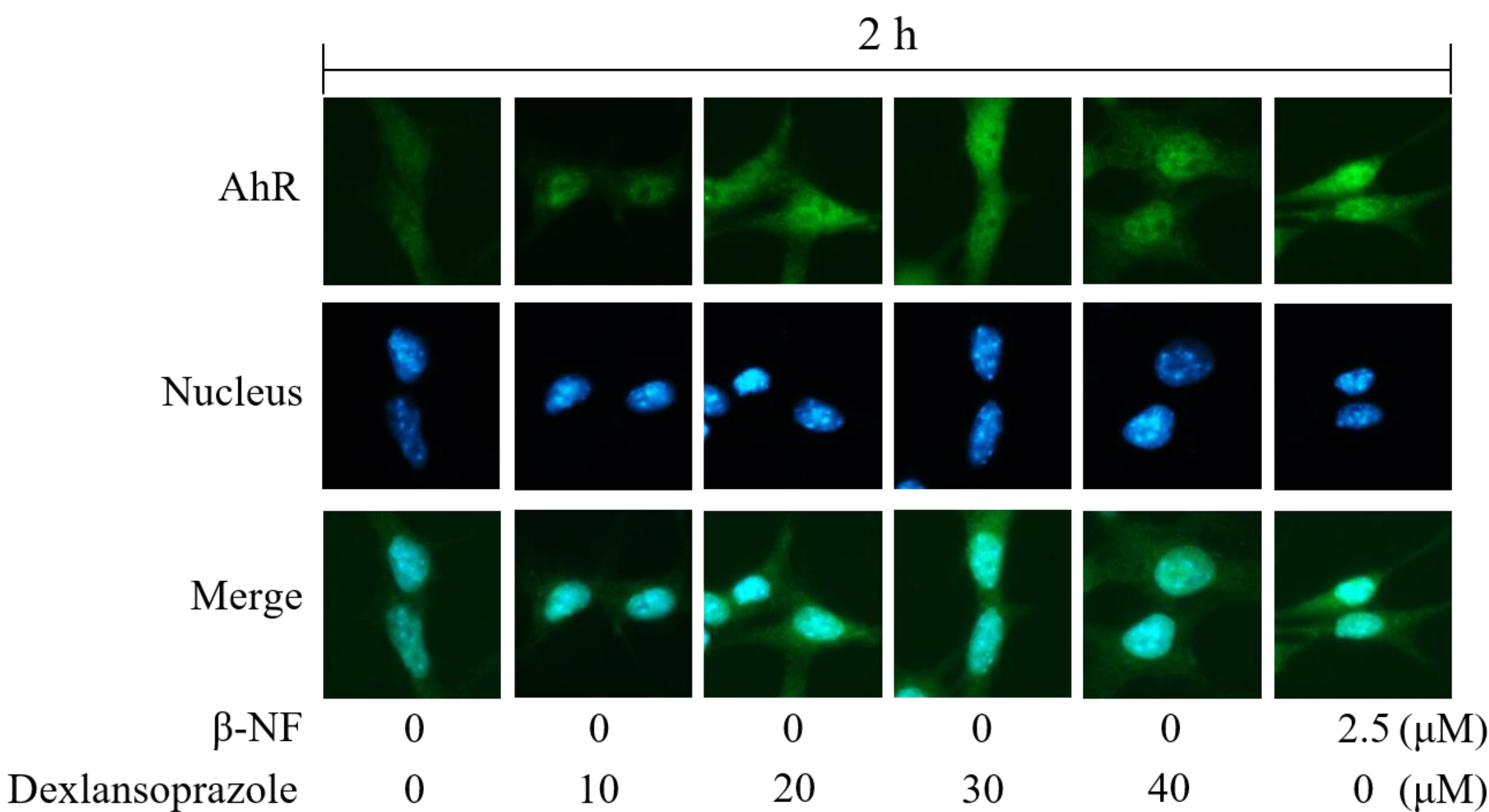
▲ 圖七B、Hepa-1c1c7、Hepa-1c1c7 c4 (B13NBii1) 和 Hepa-1c1c7 c12 (B15ECiii2) 細胞以dexlansoprazole (40 μM) 處理 12 小時。

將報告質粒pAhRDtkLuc3與 RSV-lacZ 轉染至Hepa-1c1c7細胞中。



▲ 圖八A、以dexlansoprazole (20 μM) 處理 Hepa-1c1c7 細胞 3-12 小時。

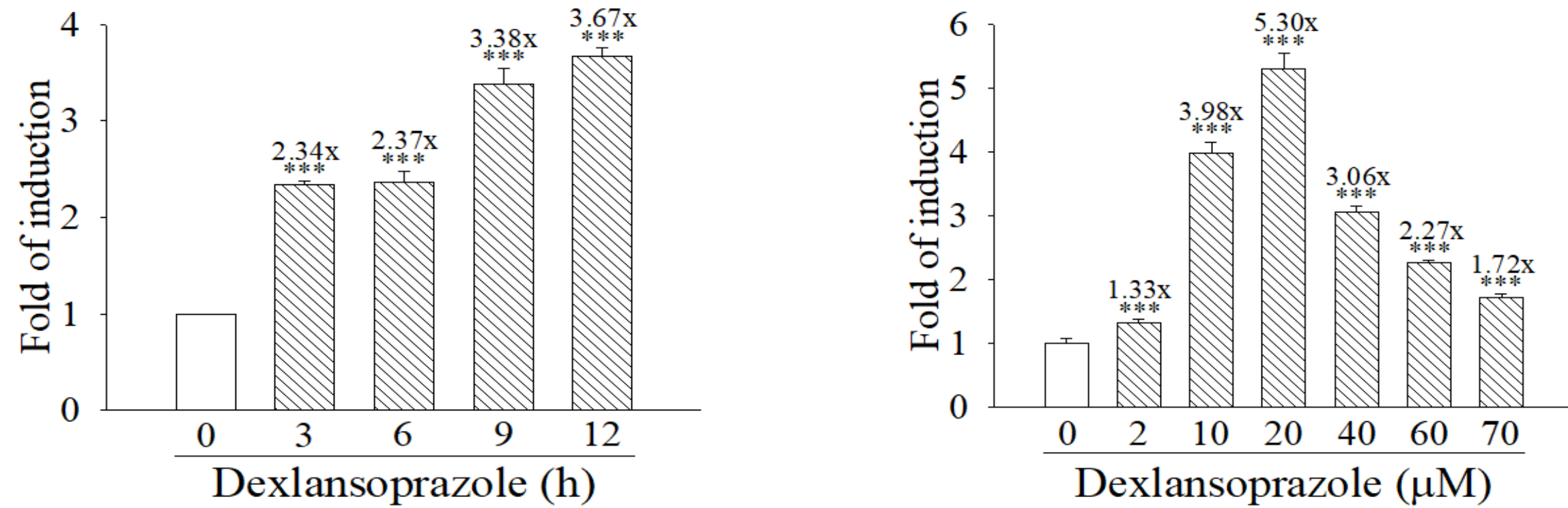
▲ 圖八B、以dexlansoprazole (2-70 μM) 處理Hepa-1c1c7細胞 9 小時。



▲ 圖九A、Hepa-1c1c7 細胞以dexlansoprazole (10-40 μM) 和 β-NF (2.5 μM) 處理 2 小時，然後用 4% 甲醛固定細胞，並用 Hoechst 33342 (5μg/ml)對細胞核進行染色。

三、Dexlansoprazole活化人體細胞中 AhR 的轉活化活性 (transactivation activity)

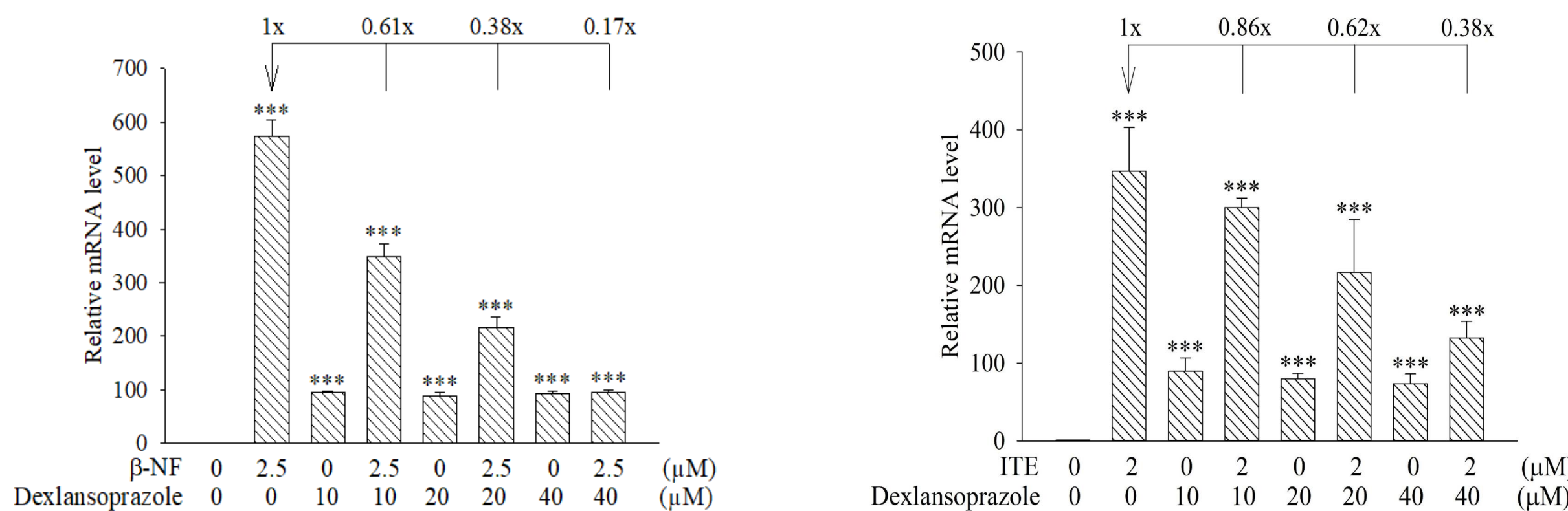
將報告質粒pAhRDtkLuc3與 RSV-lacZ 轉染至HepG2細胞中。



▲ 圖十A、以dexlansoprazole (20 μM) 處理HepG2細胞 3-12 小時。

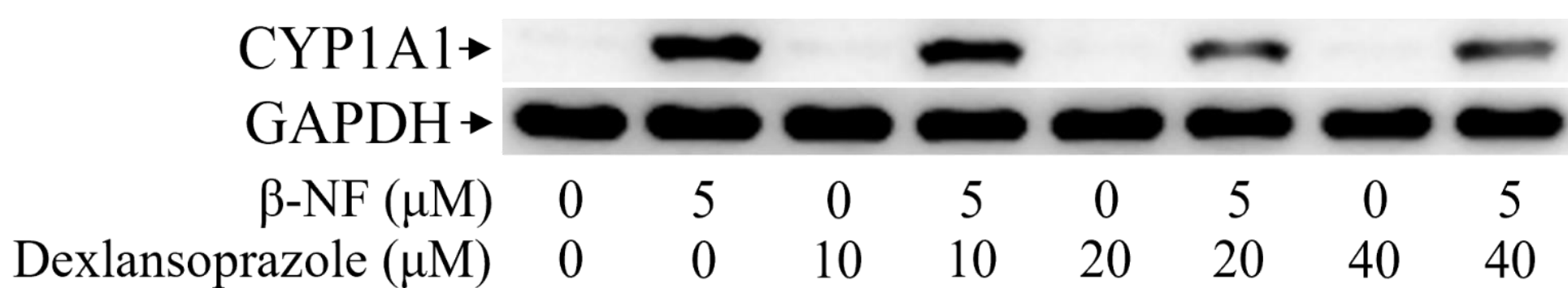
▲ 圖十B、以dexlansoprazole (5-40 μM) 處理HepG2細胞 10 小時。

四、Dexlansoprazole 在人類細胞中抑制AhR促進劑誘導的 CYP1A1 mRNA 及 蛋白質表達



▲ 圖十一A、HepG2 細胞以 10-40 μM dexlansoprazole預處理 1 小時，然後以 2.5 μM β-NF 處理 7 小時。

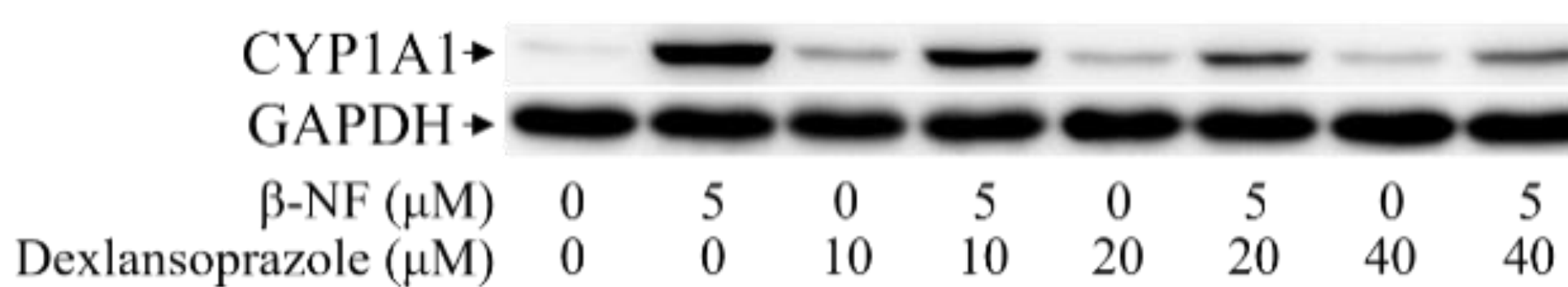
▲ 圖十一B、HepG2 細胞以 10-40 μM dexlansoprazole預處理 1 小時，然後以 2 μM ITE 處理 6 小時。



▲ 圖十二A、HepG2 細胞以dexlansoprazole預處理 1 小時，然後以 5 μM β-NF 處理 7 小時。



▲ 圖十二B、HepG2 細胞以dexlansoprazole預處理 1 小時，然後以 2 μM ITE 處理 6 小時。

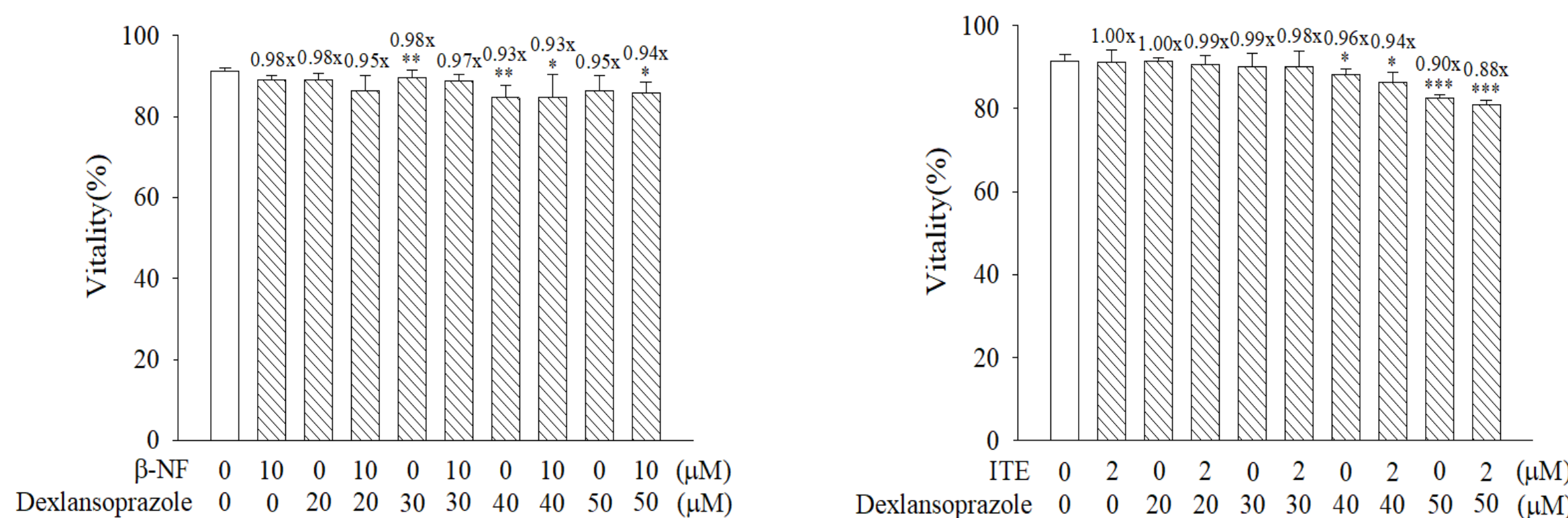


▲ 圖十二C、HO23 細胞以dexlansoprazole預處理 1 小時，然後以 5 μM β-NF處理7小時。



▲ 圖十二D、HO23細胞以dexlansoprazole預處理 1 小時，然後以 2 μM ITE處理6小時。

五、Dexlansoprazole僅輕微降低細胞活力

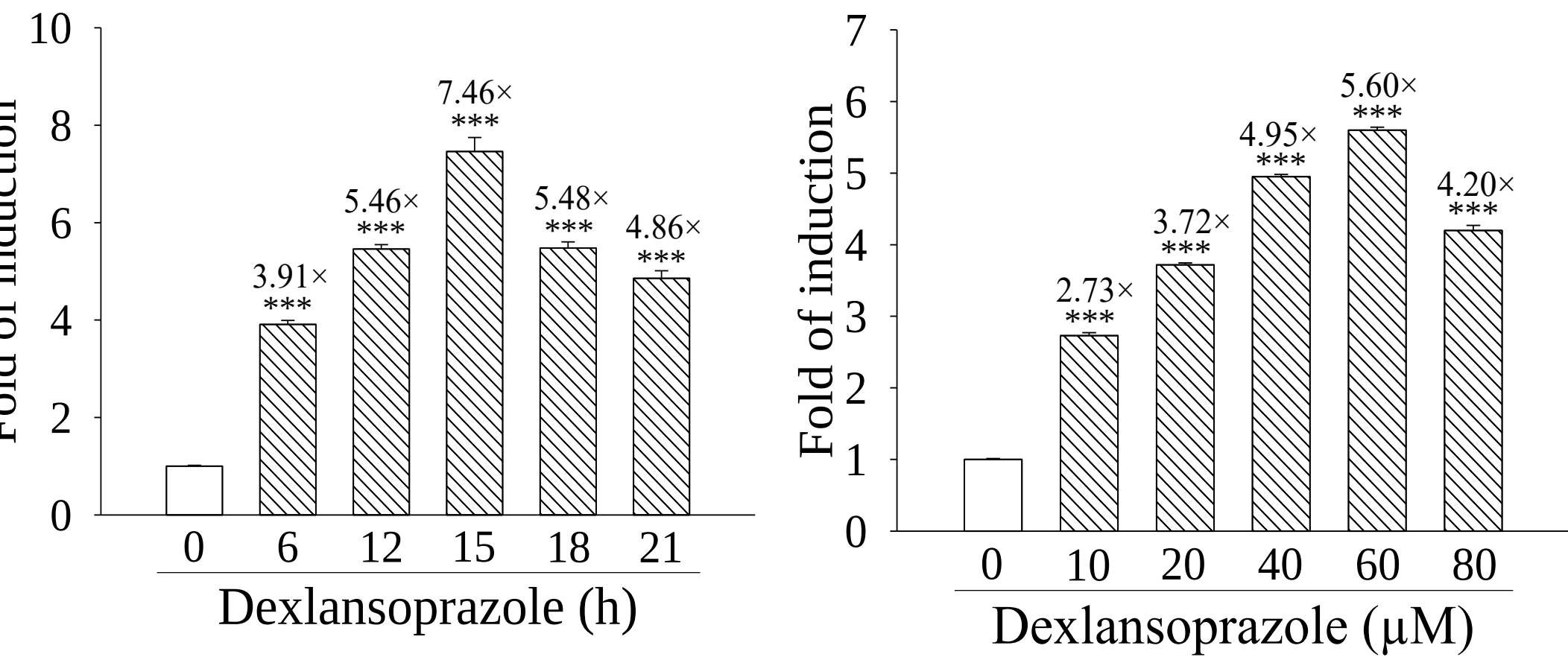


▲ 圖十三A、HepG2細胞以 dexlansoprazole預處理1小時，然後以β-NF (10 μM)處理24小時。

▲ 圖十三B、HepG2細胞以 dexlansoprazole預處理1小時，然後以ITE (2 μM)處理24小時。

六、Dexlansoprazole 增強 glucocorticoid receptor response element (GRE) 轉錄活性

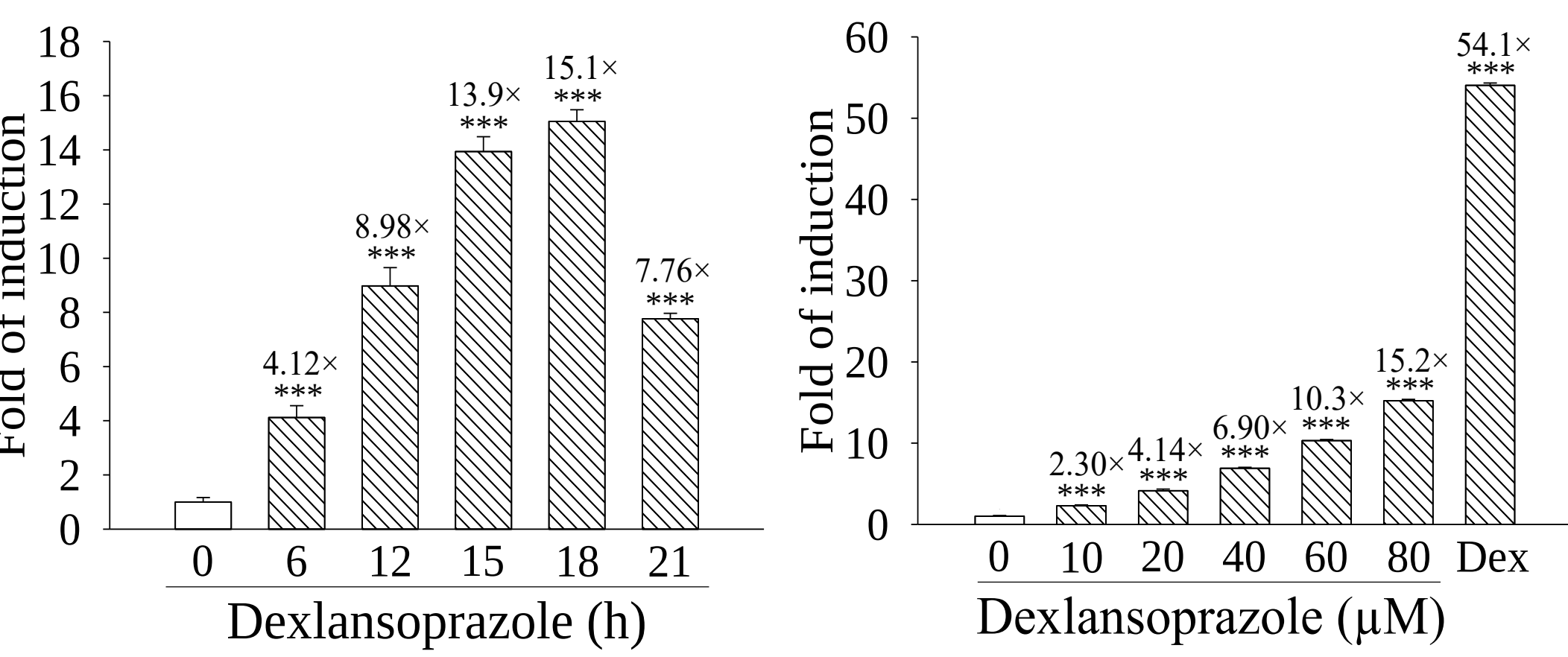
將報告質粒MMTV-pGL4 轉染至HO23-1B 細胞中。



▲ 圖十四A、以dexlansoprazole (60 μM) 處理 HO23-1B 細胞 6-21 小時。

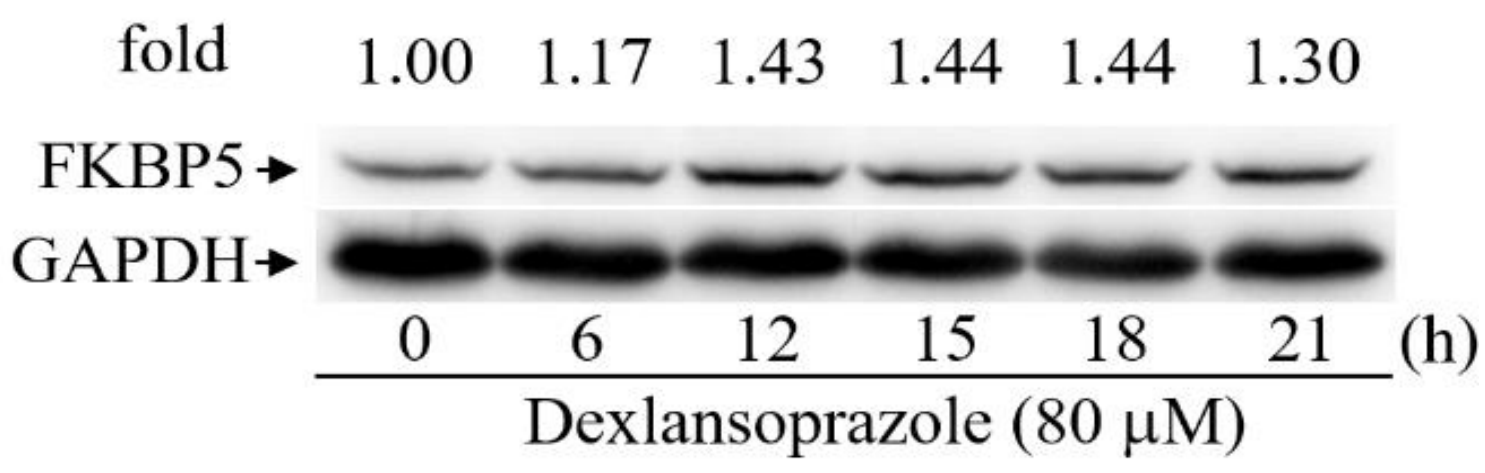
▲ 圖十四B、以dexlansoprazole (10-80 μM) 處理 HO23-1B 細胞 15 小時。

將報告質粒GREtkLUC 與 RSV-lacZ 轉染至HO23 細胞中。

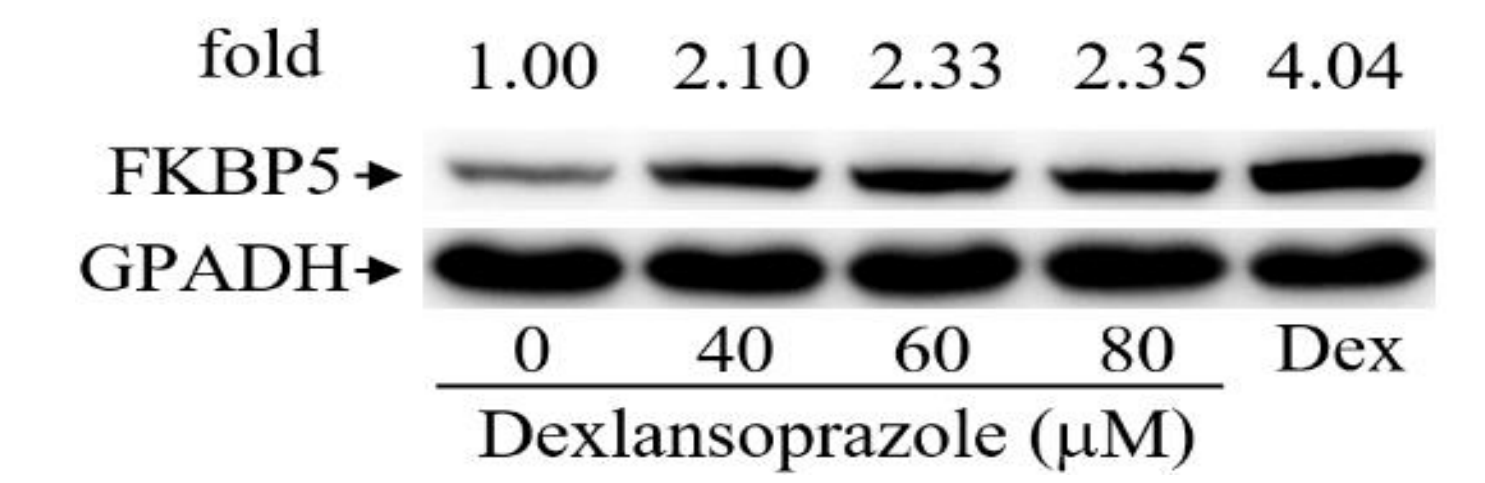


▲ 圖十四C、以dexlansoprazole (80 μM) 處理 HO23 細胞 6-21 小時。

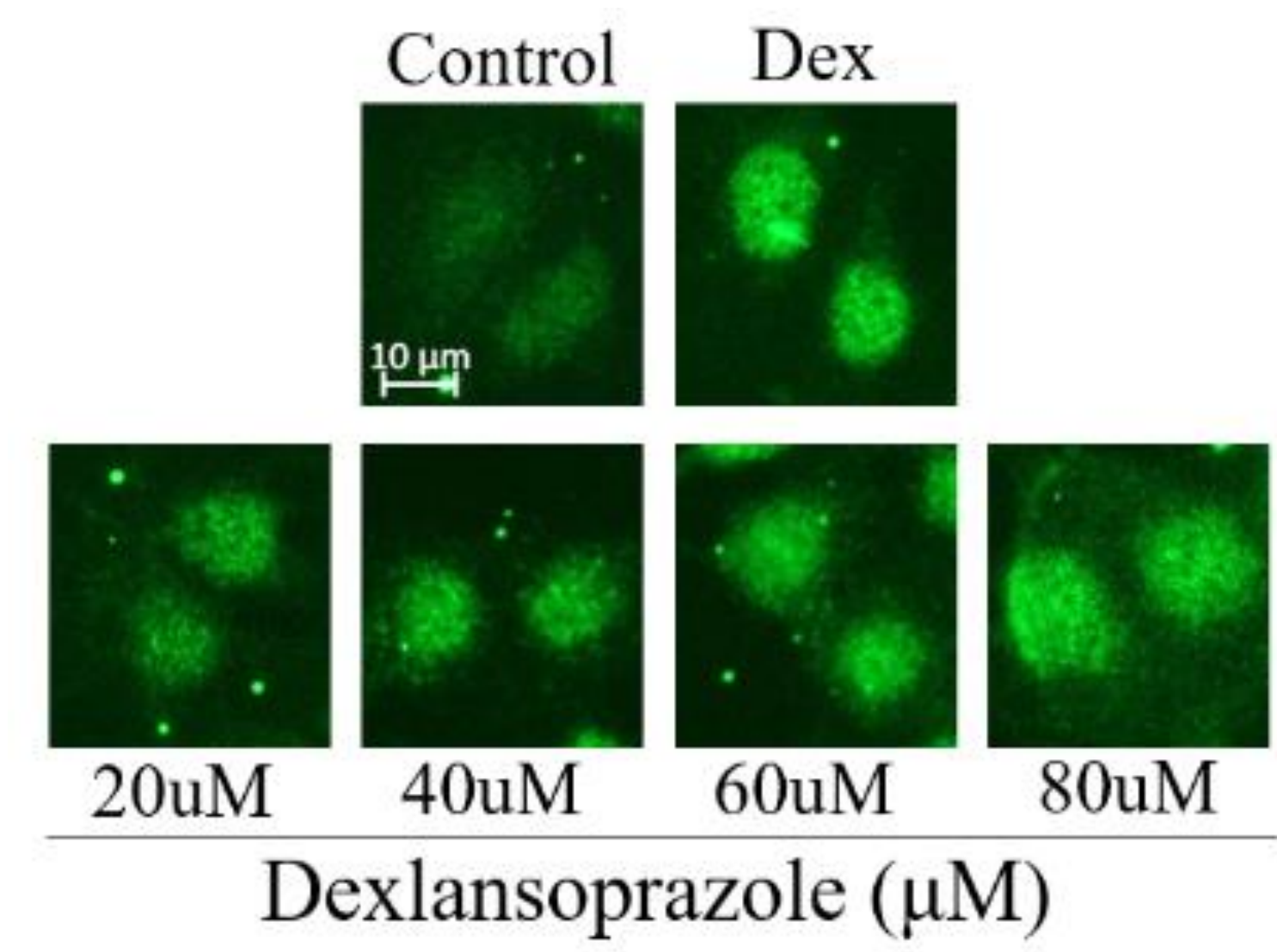
▲ 圖十四D、以dexlansoprazole (10-80 μM) 與dexamethasone (Dex) (100 nM)處理 HO23 細胞 15 小時。



▲ 圖十六A、以dexlansoprazole (80 μM) 處理 HO23 細胞 6-21 小時。

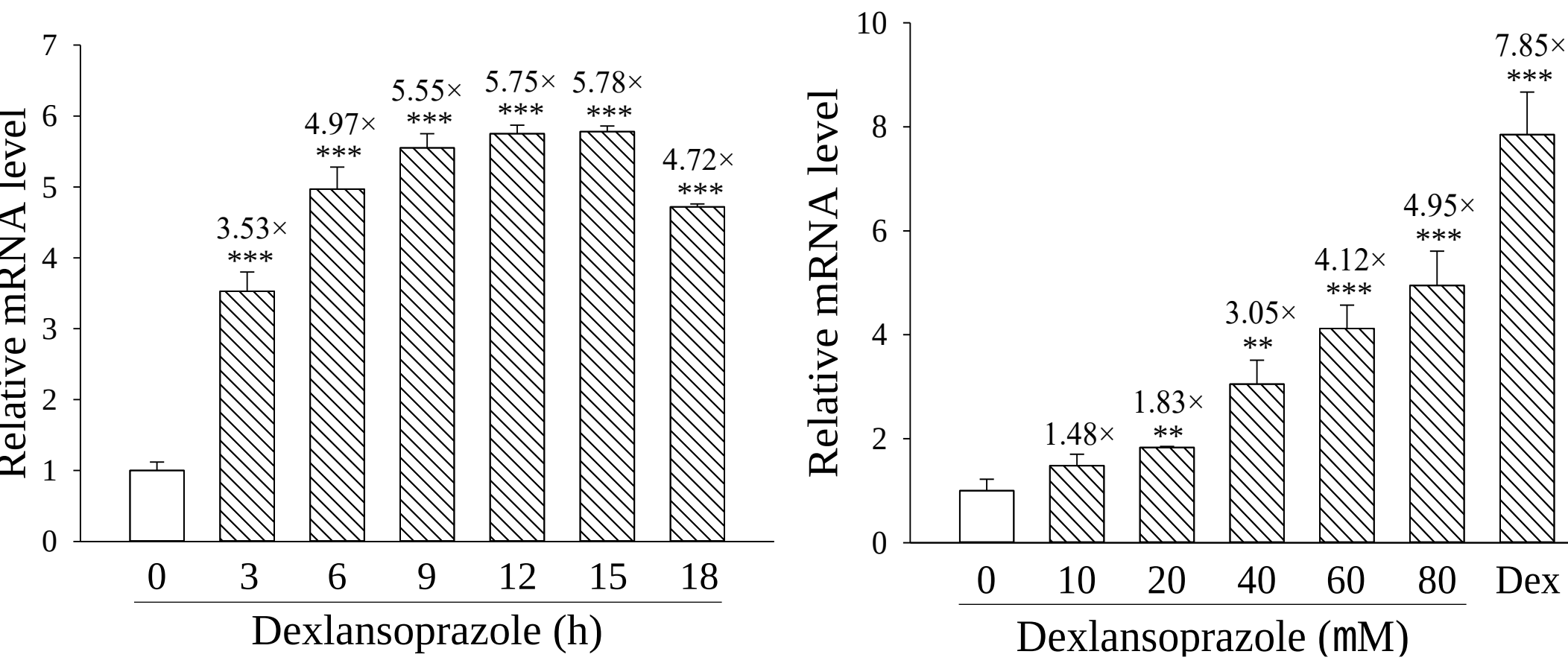


▲ 圖十六B、以dexlansoprazole (40-80 μM) 與 dexamethasone (Dex) (100 nM)處理 HO23 細胞 15 小時。



▲ 圖十六C、Dexlansoprazole誘導的 FKBP5 蛋白表達，如免疫螢光影像所示。以dexlansoprazole (20-80 μM) 和 dexamethasone (100 nM) 處理 HO23 細胞 15 小時。

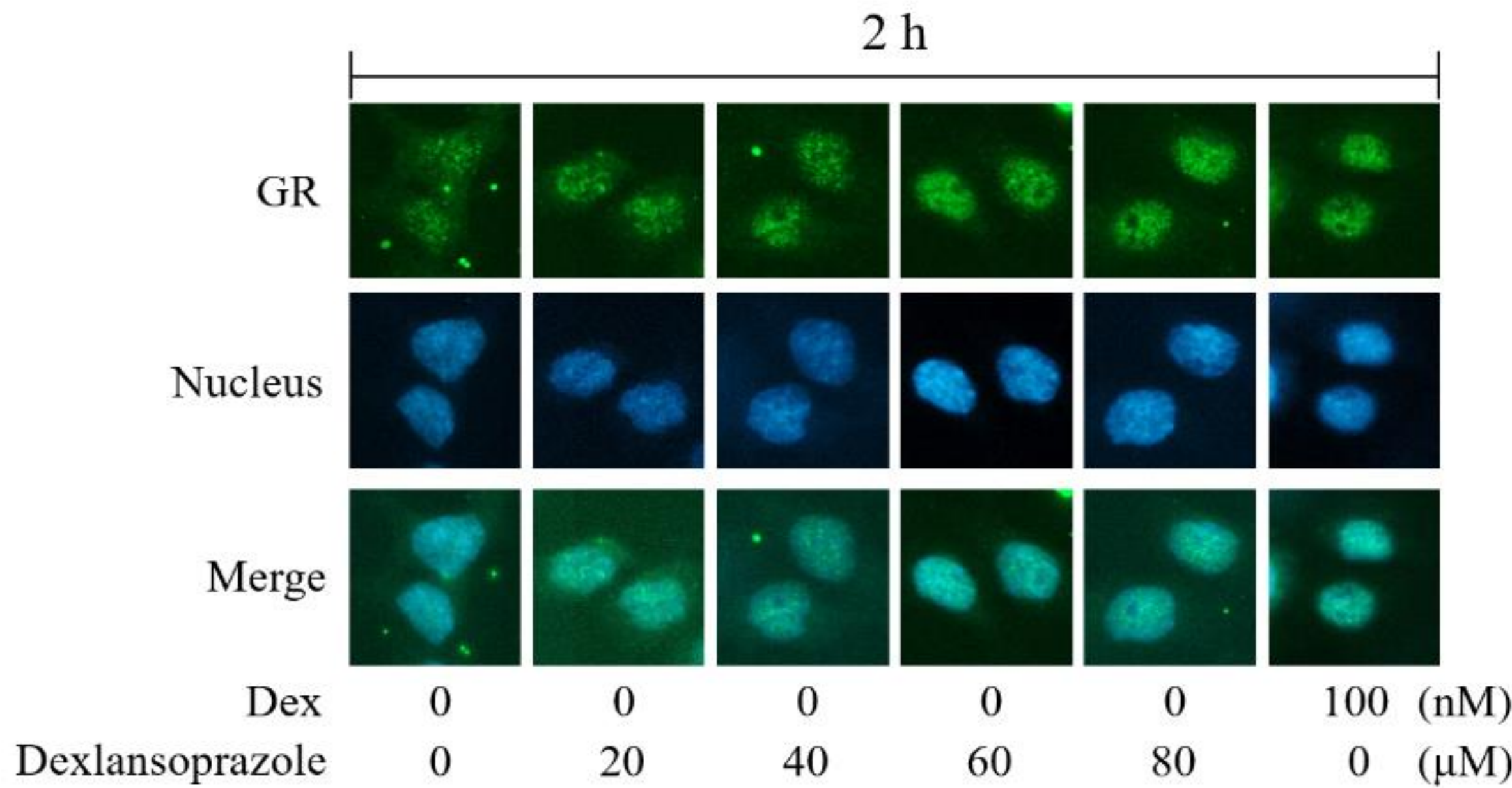
七、Dexlansoprazole增強FKBP5的表達



▲ 圖十五A、以dexlansoprazole (60 μM) 處理 HO23 細胞 3-18 小時。

▲ 圖十五B、以dexlansoprazole (10-80 μM) 與dexamethasone (Dex) (100 nM)處理 HO23 細胞 12 小時。

八、Dexlansoprazole誘導GR的核定位



▲ 圖十七、HO23細胞以dexamethasone (Dex) (100 nM)和 dexlansoprazole (20-80 μM)處理2小時，然後用4%甲醛固定細胞，並用Hoechst 33342對細胞核進行染色。

陸、結果總結

- 一、Dexlansoprazole 增強AHRE 及GRE 的轉錄活性
- 二、Dexlansoprazole 誘導AhR 及GR 的核定位
- 三、Dexlansoprazole 藉由AhR、GR傳訊路徑的方式，分別誘導CYP1A1、FKBP5 的mRNA及蛋白質表達
- 四、Dexlansoprazole 在人類細胞中抑制內源性AhR 的配體 ITE 誘導的 CYP1A1 的mRNA及蛋白質表達

柒、研究結論與討論

我們的研究顯示dexlansoprazole在人類細胞中是AhR與GR的促進劑。然而，因為dexlansoprazole促進AhR的效力低於內源性AhR配體ITE，dexlansoprazole可能會降低ITE和其他內源性AhR配體的生理作用。因此，dexlansoprazole可能會作為ITE、AhR和GR的內分泌干擾劑。本研究揭示了dexlansoprazole藉由影響AhR和GR活性而產生的潛在副作用，期望能作為將dexlansoprazole胃藥長期開立給病患的醫療人員的參考依據。