

# 2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	090014
參展科別	醫學與健康科學
作品名稱	以類器官為轉譯研究模式探究乳癌標靶藥引發 腸道副作用之機制與對應策略
得獎獎項	一等獎 美國ISEF正選代表
就讀學校	臺北市私立復興實驗高級中學
指導教師	馬瑪宣
作者姓名	黃榆歲
關鍵詞	<u>腸道類器官、標靶藥物、副作用</u>

## 作者簡介



我是黃榆崴，是台北市私立復興實驗高級中學高一的學生，我從小開始接觸生物醫學相關的實驗，國三開始進入實驗室做更深入與完整的研究，從此對科學產生興趣，希望能夠在醫學研究方面也貢獻自己的一份心力，以促進醫療發展與人類健康。

## 摘要

本研究以腸道類器官(organoid)模擬體內環境，分析乳癌標靶藥物 Lapatinib 與 Tucatinib 對腸道產生副作用的差異。Lapatinib 明顯抑制 ileum 及 colon organoid 的形成，其  $IC_{50}$  低於 Tucatinib 約 1000 倍。其中 Lapatinib 特別對 adult type organoid 較具明顯抑制作用，顯示影響腸道上皮細胞的分化功能。以 RNA seq 與 Ingenuity pathway Analysis 分析藥物對 organoid 中轉錄體表現的影響，Lapatinib 在 colon organoid 中增加腸道發炎、葡萄糖代謝異常、氯離子外流等基因群的表現，並降低 crypt 發展的基因群。其中，Lapatinib 藉由增加 Glut3 的表現提高 organoid 對葡萄糖的吸收，此作用受到 L-ascorbic acid (Vitamin C) 抑制，亦增加 GABA receptor 提高氯離子外流，顯示代謝與電解質失衡及發炎作用可能為 lapatinib 造成腹瀉的主因之一。以 3D organoid 為可信賴的轉譯研究模式，我們發現同屬 HER2 tyrosine kinase inhibitor 的 Lapatinib 與 Tucatinib 對腸道功能產生迥然不同的影響，並發現合併使用 Glut3 inhibitor 或 GABA receptor antagonist 可能可成為減緩 Lapatinib 副作用的對應策略。

## Abstract

In this study, intestinal organoids were established to simulate the internal environment to study the differences in the intestinal side effects caused by Lapatinib and Tucatinib, two HER2-targeted drugs for breast cancer. Lapatinib significantly inhibited the formation of ileum and colon organoids, and its IC<sub>50</sub> is about 1000 times lower than Tucatinib. Lapatinib particularly suppressed the viability of adult type organoids, indicating that it affects the differentiation of intestinal epithelial cells. RNA seq and Ingenuity pathway Analysis (IPA) were used to analyze the effects of drugs on the transcriptomic expression in organoids. Lapatinib increased the expressions of gene sets involved in intestinal inflammation, abnormal glucose metabolism, and chloride flux in colon organoids, and reduced the gene expressions for crypt development. Mechanistically, Lapatinib enhanced the absorption of glucose by colon organoid through upregulation of Glut3, and this effect can be inhibited by ascorbic acid (Vitamin C). Lapatinib also increases chloride efflux through upregulation of GABA receptors. These findings indicate that metabolism and electrolyte imbalance and inflammation may be one of the main reasons for lapatinib-induced diarrhea. By using this reliable translational research model, we found that Lapatinib and Tucatinib, both of them are HER2 tyrosine kinase inhibitors, have very different effects on intestinal function, and our findings suggest Glut3 inhibitor and GABA receptor antagonist as possible strategies to alleviate the side effects of Lapatinib.

# 壹、前言

## 一、研究動機

服用藥物常常造成副作用，容易降低病人服藥的意願，腹瀉、便秘等都是常見的腸道副作用。以抗癌藥物 Lapatinib 為例，服用後會造成腸胃不適、嚴重腹瀉等副作用；然而這些副作用除了腹瀉、腹痛的不適感以外，也有可能影響食物營養甚至藥物的吸收，尤其是 HER2 TKI 是需要每天長期服藥，即使是輕微的腹瀉也會影響病患用藥的服從性。因此，如何降低藥物對腸道的副作用是一個重要的議題，但卻少有研究致力於改善藥物對腸道的影響。再者，在腸道的研究中大多都用一般的細胞株的體外模式(*in vitro*)來做研究，並不能模擬真正的腸道活體環境。若能建立一個模擬活體 (*ex vivo*)的模式，在做動物實驗之前能快速研究藥物是否有腸道副作用，並探討其作用機制，將會非常有助於藥物的發展。

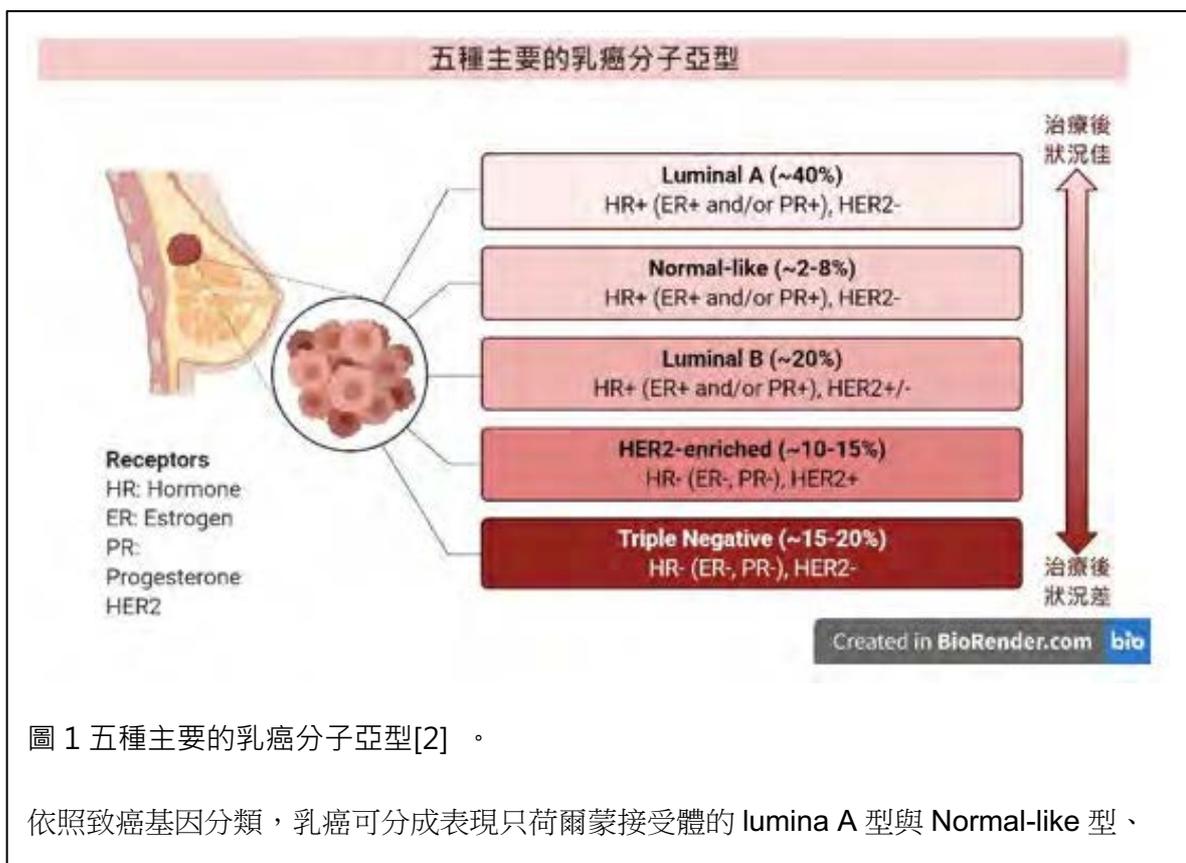
## 二、研究背景

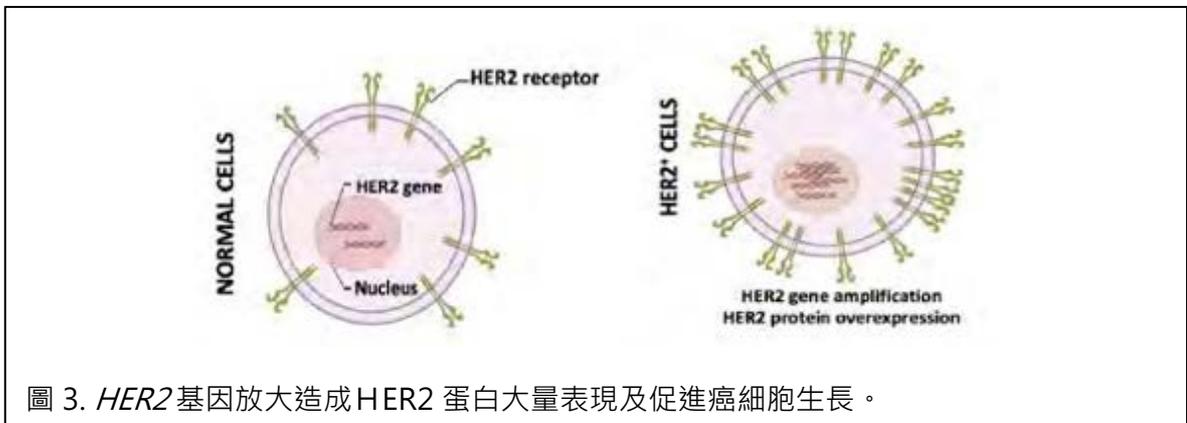
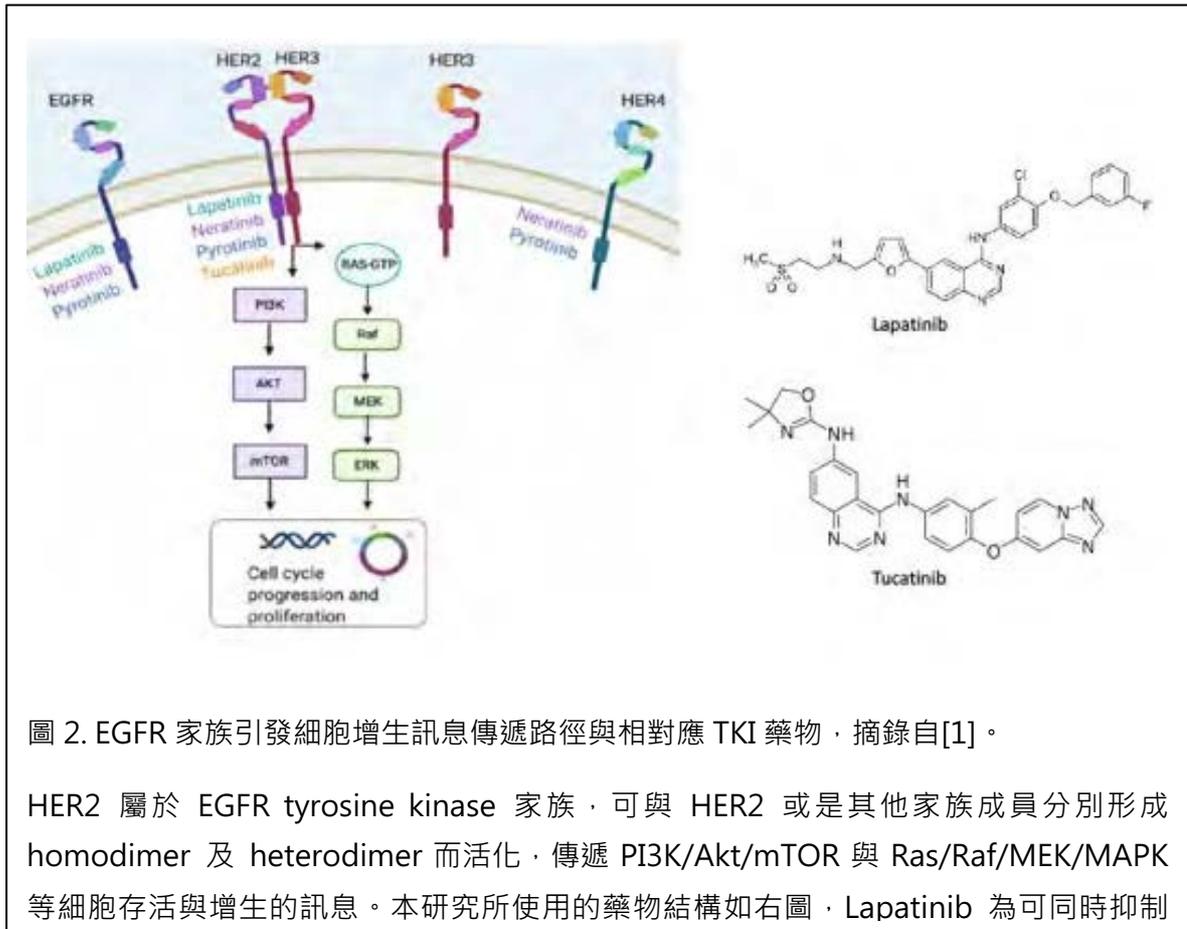
### (一) HER2 於乳癌形成與治療的重要性

#### 1. HER2 與乳癌的關係以及 HER2 的標靶藥物

根據致癌基因表現，乳癌可以分成以下五種(圖 1)，分別是具有賀爾蒙陽性接受體表現的 Luminal A/B 和 Normal-like 以及 HER2 陽性[1]和都沒有這些已知接受體的三陰性乳癌，在這些具有致癌基因的乳癌種類，都有相對應的標靶藥物可以有效的延長病人的存活率並延緩復發率[2]。而 HER2 是人類表皮生長因子受體第二型，屬於 EGFR 家族 [1] (圖 2)，在大約 20-30%的乳癌中過度表達，在乳癌細胞中因為 *HER2* 基因會被放大(圖 3)，導致蛋白大

量表現以及接受體上的酪胺酸激酶過度活化，傳遞強烈的細胞存活與生長訊息，最後形成快速生長的癌症。相對於賀爾蒙陽性乳癌的治療，HER2 陽性乳癌在接受標靶藥物後經常快速產生抗藥性、治療效果較差以外，還有明顯的副作用。迄今為止，FDA(美國食品藥品監督管理局) 批准了三類針對轉移性乳癌的 HER2 標靶藥物，第一種是單株抗體，包括 Trastuzumab 和 Pertuzumab 等等，第二種是抗體-藥物鍵結物，第三種是抑制 HER2 酪胺酸激酶活性的小分子酪胺酸激酶抑制劑(TKI)，包括 Lapatinib(拉帕替尼)、Tucatinib(圖卡替尼)，在這三組中，除了 TKI 以外其餘都是抗體藥物，只有 TKI 因為小分子量可以通過血腦屏障 ( Blood-brain barrier; BBB ) 而在控制腦轉移方面表現出療效，但單株抗體則無法通過 BBB[4]。但病人最後都會對這些藥物產生抗藥性。





## 2. TKI 藥物的種類與治療效果

### (1) Lapatinib

Lapatinib 是一種口服可逆的雙酪胺酸激酶抑制劑，通過與受體在細胞內的 ATP 結合位點結合來阻斷 HER2 及 EGFR 酪胺酸激酶活性，從而抑制腫瘤細胞的生長。美國食藥署 (FDA) 核准拉帕替尼與化療藥物合併使用，可以延

長 HER2 陽性乳癌病人的無病存活率從 4.4 個月延長到 8.4 個月[5]。然而，腹瀉是這個藥物最常見的副作用，嚴重程度從輕度至重度不等，因此，在臨床試驗中仍有相當大比例的患者因此中斷或停止治療[6]。

## (2) Tucatinib

Tucatinib 是另一種去年剛被 FDA 核准的口服可逆性的 HER2 小分子酪胺酸激酶抑制劑，同樣可阻斷 HER2 過表達細胞中，HER2 及其下游效 AKT 路徑的活化。此外，與拉帕替尼相比，圖卡替尼可提高乳癌腦轉移小鼠的生存率。腹瀉、噁心等同樣是這個藥物常見的腸胃道副作用，但相對上比 Lapatinib 所引發的副作用較低[7]。

## (3) Lapatinib 和 Tucatinib 的比較

雖然 Lapatinib 與 Tucatinib 都是酪胺酸激酶的抑制劑，但 Lapatinib 是影響 HER2 和 EGFR 的雙重抑制劑，而 Tucatinib 是只會影響 HER2 的特異性抑制劑(圖 2)。雖然這兩個藥物對 HER2 陽性乳癌都具有明顯的毒殺作用，但 Tucatinib 的作用則是優於 lapatinib，有較低的 IC50。Lapatinib 則是另外對子宮頸癌、頭頸癌、腎臟癌、大腸癌、前列腺癌等也都有毒殺作用，HER2 與 CDK12 的高表現都與這兩個藥物的抗癌效果有相關性，但 BRCA 突變則是特別跟 tucatinib 的抗癌效果相關，這些結果顯示兩種藥物雖然都是 HER2 TKI，但是也有其各自獨特的作用特性[8]。大多數的研究主要探討兩者藥物在抗癌效果，對於他們引發副作用的差別則是鮮少研究報導。

## (二) HER2 標靶藥物的副作用

### 1. 常見的藥物副作用

在治療的過程中，除了藥物原本被預期的治療效果，任何藥物都可能產生不受歡迎的不良醫學反應，也就是副作用。這些副作用可能會造成病人身體不適，導致其對治療的服從性降低。常見的副作用從頭暈、失眠、腹瀉、便秘到心律不整、癌症，甚至死亡都有。小腸和大腸是副作用最常見的部位之一，佔所有藥物副作用的 20-40%[9]。最常見的包括噁心、嘔吐、腹瀉、便秘、腸胃氣脹、粘膜炎和食慾不振。這些腸道副作用雖然看似不是很嚴重，但不僅會影響病人服藥的服從性，藥物對腸道上皮細胞的破壞還會影響電解質平衡、藥物與食物養分的吸收、腸道菌的分布，嚴重的話會間接造成感染風險、藥物無法到達有效的血中濃度，或是營養不良的情形。美國國家癌症研究院將藥物引發腹瀉分成零到三級（表一），服用藥物若引發三級腹瀉，不僅需要暫時停藥更需要住院治療。因此藥物對腸道產生的副作用不容忽視，建立一個研究副作用的有效且快速平台更是重要，所以本研究將會針對腸道的副作用來探討。

表 1.美國國家癌症研究院腹瀉分級

美國國家癌症研究院腹瀉分級	
零級	無症狀
一級	一天排便次數少於四次
二級	一天排便四到六次，中度腹部絞痛，不影響正常生活
三級	一天排便七到九次，重度腹部絞痛，失禁

## 2. HER2 標靶藥物副作用

服用 HER2 TKIs 這類的抗癌藥物治療經常會引發腹瀉，較嚴重者甚至一個禮拜就會發生，這類藥物是需要每天長期服藥，因此即使是較輕微的腹瀉，長

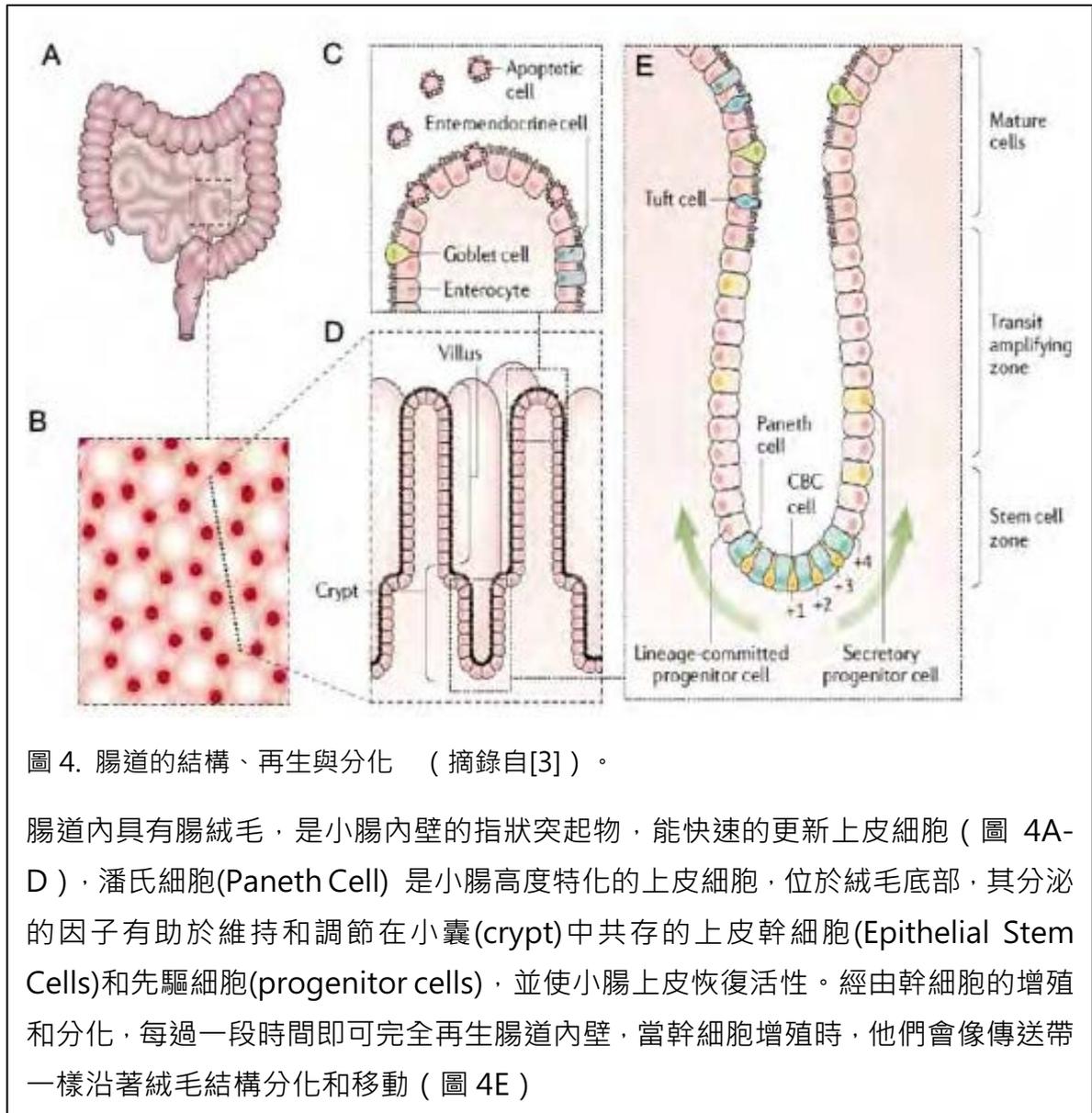
期下來亦會影響病人服藥的順從性，明顯影響病人的治療效果。但是這些藥物如何造成腹瀉甚至腸道損傷的機制尚未釐清。相對於化療已經知道會造成上皮細胞的抑制，酪胺酸激酶的抑制劑尚不清楚其造成腹瀉與腸道損傷的機制有哪些。以拉帕替尼來進行治療的患者通常會伴隨著嚴重腹瀉或皮膚發炎等副作用，而這些副作用明顯降低生活品質，減少病人對於治療的順從性，並導致治療無法順利地持續進行[10]。而拉帕替尼引起的腹瀉可能是因為造成小囊長度、有絲分裂和杯狀細胞型態產生改變，並可能和表皮生長因子受體有關[11]。此項治療引起的腹瀉是腫瘤學中一種重要的臨床毒性，但對其仍知之甚少，尚未有較完整且系統性的研究成果報導。

### (三) 腸道生理功能與結構

#### 1. 腸道生理功能

腸上皮是單細胞層，在食物消化和營養吸收方面發揮著重要作用，同時也是抵禦外部環境的屏障。腸道內具有腸絨毛，是小腸內壁的指狀突起物，能快速的更新上皮細胞(圖 4 A-D)，潘氏細胞(Paneth Cell) 是小腸高度特化的上皮細胞，位於絨毛底部，其分泌的因子有助於維持和調節在小囊(crypt)中共存的上皮幹細胞(Epithelial Stem Cells)和先驅細胞(progenitor cells)，並使小腸上皮恢復活性。經由幹細胞的增殖和分化，每過一段時間即可完全再生腸道內壁，當幹細胞增殖時，他們會像傳送帶一樣沿著絨毛結構分化和移動(圖 4 E)，一旦它們到達絨毛尖端，細胞就會死亡並脫落到管腔中[12]。當腸道在各種類型的刺激所造成的腸道損傷後，腸上皮細胞層具有特殊的自我修復能力，這項過程涉及細胞凋亡以去除受損細胞(圖 4 C)，以及需要尚存活細胞的進行大量增殖以替代流失的組織。近年來，各種研究表明，腸

道再生和修復取決於在靜止狀態的儲備幹細胞群中如何重新啟動早期發育的轉錄程序。藉此，腸道允許自身進行重塑 (renewal) 並誘導新形成的組織組成穩定的腸道腔室。因此，影響腸道幹細胞的自我更新能力可能是藥物引發腸道副作用的關鍵因素。



## 2.腹瀉的原因

腹瀉被定義為糞便稠度降低、含水量增加和每天排便次數，腹瀉的病理生理基礎是腸道水電解質平衡紊亂，這可能是由滲透活性物質攝入增加(滲

透性腹瀉 )、滲透活性電解質分泌增加 ( 分泌性腹瀉 )、發炎刺激物或是感染性病原菌(發炎出血性腹瀉)引起。

目前各類藥物引發腹瀉的可能機制有三種:

- ( 1 ) 氯化物分泌增加，導致電解質的不平衡，腸道菌的生態改變，水分無法吸收
- ( 2 ) 引發發炎反應，讓腸道的蠕動減少，腸道微生物菌的改變
- ( 3 ) 藥物抑制腸道上皮細胞的生長與損傷的修復，導致腸道黏膜的萎縮，無法維持水分的吸收，造成腸道菌生態改變

#### (四)研究腸道副作用的平台

##### 1.現有研究平台的優缺點

過去我們經常依賴細胞培養和動物模型來檢測藥物的特性，二維的細胞培養物一直被當作用來研究人類疾病和治療的體外模型，細胞培養的實驗結果常常是決定一種藥物是否能進行動物或臨床試驗的重要因素，但儘管 2D 細胞培養在醫學上做出了重大貢獻，它們卻無法完全準確地模擬真正活組織的複雜結構、功能與環境，例如缺乏細胞外基質(ECM)與細胞種類的多樣性[13]。而動物模型雖然是三維的環境，但基於動物福祉及實驗經費昂貴，以動物模式測試藥物副作用往往費時又費力。所以三維的類器官應能成為代替這兩種研究方法的最好途徑，它可以更好的模擬器官在人體中對於藥物的反應與影響。

##### 2.類器官的優缺點

類器官就是將欲研究的器官組織放入三維培養基中培養，藉由其中含有各式細胞種類及幹細胞，可以培養出在體外模擬人體器官功能和結構環境的三維

細胞團，這些細胞團雖然不是真正定義上的人類器官，但所培養出來的細胞種類、再生、修復與分化功能相當類似器官組織在活體內的狀況，這項技術已經牢固地確立為生物學研究的重要工具，並且對臨床應用也具有重要意義[14]。類器官主要優勢是可以從有限供應的起始材料中生長，不僅有助於回答許多重要的生物學問題，並可用於藥物篩選以發展個人化療法。在本研究中，我們利用腸道類器官作為評估抗癌藥物對腸道產生副作用的研究平台，並運用轉錄體與 IPA 分析，探討參與副作用形成的可能機制，藉此提供改善腸道副作用的可能策略。

## 貳、研究過程與方法

### 一、實驗流程圖

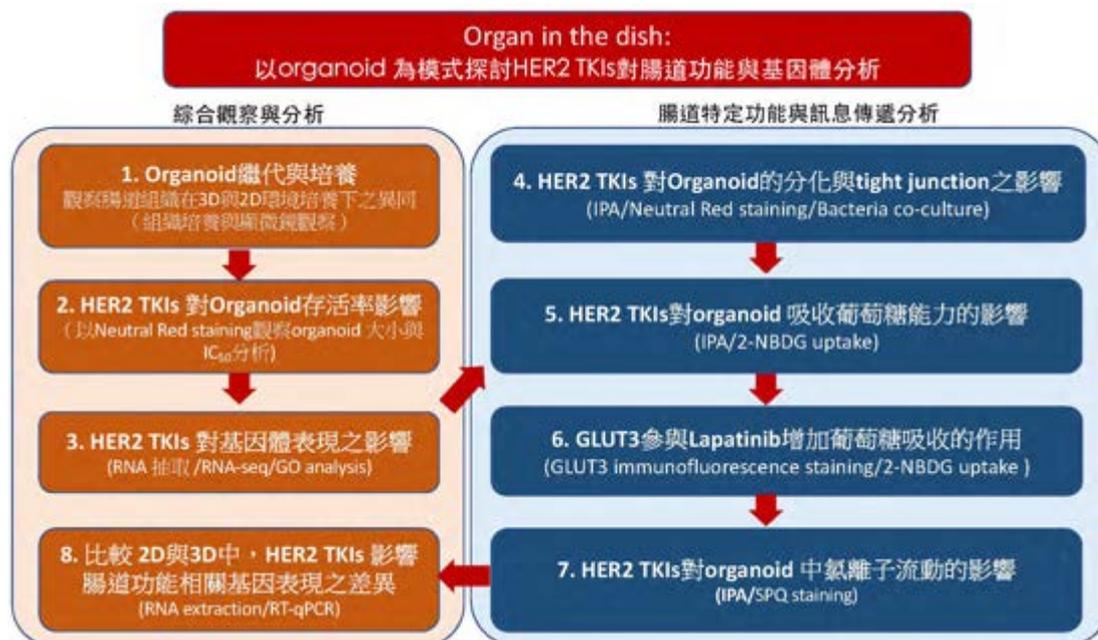


圖 5 本研究實驗總流程圖。

先以綜合性觀察與分析，探討 HER2 TKIs 對腸道(ileum 與 colon)類器官在存活率及基因體表現產生影響的差異(橘色部分)。根據基因體分析結果，進一步分析 HER2 TKIs 對腸道類器官的分化與 tight junction、葡萄糖吸收、氯離子流動的影響(藍色部分)。

### 二、研究設備及器材

#### 1. 腸道類器官

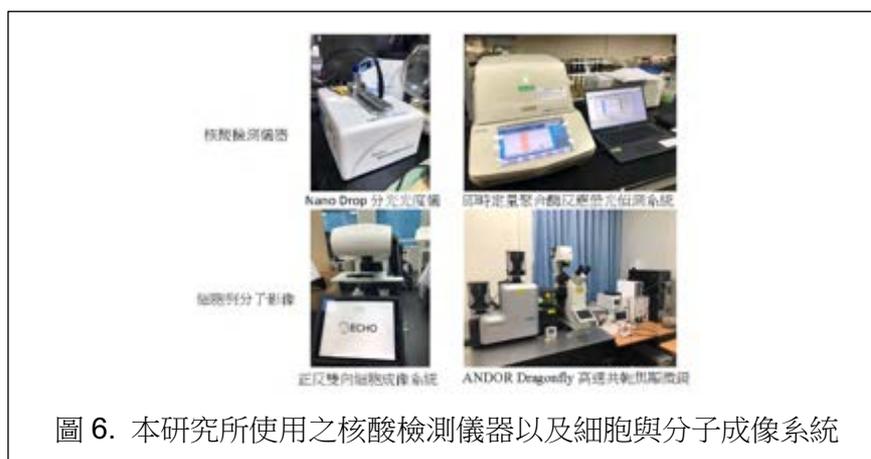
由實驗室研究生自腸道組織建立，與 Matrigel 混合後，經過 organoid 培養液培養數天後觀察是否具有 fetal organoid 及 adult organoid 後，顯示建立具有分化能力之 organoid 後，進行繼代培養並擴增後，儲存於液態氮中，作為本研究主要材料來源。

## 2. 實驗試劑與材料

腸道類器官培養用的 Matrigel® Basement Membrane Matrix, Phenol Red-free (356237) 購買自 Corning。Propidium Iodide Staining Solution (00-6990-50)、2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose) (N13195)、SPQ (6-Methoxy-N-(3-Sulfopropyl)Quinolinium, Inner Salt) (M440) 購買自 Invitrogen。腸道類器官培養用之 96-Well, Nunclon Sphera-Treated, U-Shaped-Bottom Microplate (174925) 與染色用的 DAPI Solution (1 mg/mL) (62248) 購買自 Thermo Scientific。抽取 RNA 試劑 Trizol™ 購買自 Invitrogen (15596026)。Lapatinib (GW-572016, S2111) 與 Tucatinib (Irbinitinib, S8362) 購買自 Selleckchem。Anti-Glut3 antibody (sc74393) 購買自 Santa Cruz。

## 3. 實驗儀器

RNA 抽取後使用 Nano Drop 分光光度儀進行核酸定量，吸光度 260/280 高於 1.8 才用於後續 RNA sequencing (基龍米克斯公司) 分析或是即時定量聚合酶反應螢光偵測系統進行各種基因的定量。2D 或 3D Organoid 組織進行中性紅染色後，以正反雙向細胞成像系統進行觀察與定量。organoid 進行 2-NBDG 吸收、SPQ 染色與 anti-Glut3 antibody 螢光染色後，以 ANDOR Dragonfly 高速共軛焦顯微鏡執行厚組織拍照。



### 三、 研究方法及步驟

#### (一) 類器官的繼代培養與觀察

##### 3D 類器官的繼代培養：

Organoid 繼代之間的最佳間隔是 3 天。以 1 ml tip 吸取在 Matrigel 中的 organoid，並將之懸浮在 15 ml 離心管中的一般細胞培養液中。以轉速 200 g/5 min 離心含有腸道幹細胞的組織液，去除游離的單獨細胞和其他的殘餘組織，再度以 200 g/5min 的轉速離心。加入 500  $\mu$ l trypLE，移液，在培養箱中培養 5 分鐘 加入 1ml organoid 培養基 移液 離心 200g/5min，棄上清，剩餘約 100 $\mu$ l。將此含有腸道幹細胞的組織液與 100% 的 Matrigel 混合，放在 24 孔盤低附著力的培養皿中，放置於 37 度的二氧化碳培養箱中培養，三十分鐘後等待 Matrigel 聚合反應，再加類器官培養液培養。

##### 2D 器官組織培養:

重複以上步驟(一)1. 將含有幹細胞的組織部分懸浮於類器官培養液中，直接至於 96 格孔盤中，每個孔盤中裝 100  $\mu$ l

Organoid 培養液包含 s 50% AdDF+++ medium, 50% L-WRN conditional medium, and supplemented with 50 ng/ml murine EGF (315-09, Peprotech), 10  $\mu$ M Y-27632 (Y-27632, Abmole), 1X B27 supplement (17504-44, Gibco), 1X N2 supplement (17502048, Gibco), 1 mM N-Acetylcysteine (A9165, Sigma), 0.05 mg/ml gentamycin (15710064, Gibco), 1% BSA (A9418, Sigma), and 500 nM A83-01 (2929, Tocris) (for Ileum only)

AdDF+++ medium contains Advanced DMEM/F12 (12634-034, Invitrogen), 10  $\mu$ M HEPES, 1X GlutaMAX supplement (12634-034, Invitrogen), and 50  $\mu$ g/ml primocin (Ant-pm-1, Invitrogen).

#### (二) 中性紅細胞毒性測定(Biovision, K447-1000)

首先，去除待測的類器官組織之培養液並以 1x washing solution 清洗一次。隨後加入 150  $\mu$ l 1x neutral red staining solution，放置於 37°C 的二氧化碳培養箱中培養 2 小時。反應 2 小時後，去除 1x neutral red staining solution 並以 1x washing solution 清洗一次後，加入 100  $\mu$ l solubilization solution，避光下搖晃反應 20~45 分鐘，以正反雙向細胞呈現系統拍照或以微量酵素免疫分析儀測量吸光度(540 nm)。

#### (三) mRNA 萃取與 RNA sequencing

將待測類器官組織樣品以 TRIzol 試劑萃取出 mRNA 並定量後，取至少 2  $\mu$ g 的 mRNA 樣品以 NovaSeq6000 系統(Illumina)分析樣品中不同基因組表現。

#### (四) 定量反轉錄聚合酶連鎖反應分析 (qRT-PCR assay)

將待測樣品以 TRIzol 試劑萃取出 mRNA 並定量後，取適量的 mRNA 樣品均勻混合含有 dNTP 及 Oligo-dT，後續將這些 mRNA 混合物加熱至 65°C 反應 5 分鐘，再快速冷卻至 4°C 五分鐘，再加入含有 DTT、5x First Strand Buffer 及 M-MLV Reverse Transcriptase (200U/ $\mu$ l)，再分別 37°C 反應 2 分鐘，25°C 反應 10 分鐘，37°C 反應 50 分鐘，最後以 70°C 反應 15 分鐘形成完整的 cDNA 產物。接著，以 SYBR Green

Master Mix 標記 cDNA 產物並利用聚合酶連鎖反應偵測特定基因的表現。利用 GAPDH 當作參考基因。

#### (五) 免疫螢光染色 (Immunofluorescence staining)

將類器官組織種在已覆蓋 matrigel 的 8 well chamber slide 等待兩天後，加入預處理的藥物。藥物處理兩天後，移除細胞培養液並以 1x PBS 清洗兩次，接著以含有 2% formaldehyde 與 0.1% glutaraldehyde 的 PBS 室溫下固定類器官組織 30 分鐘，隨後以含有 0.5% Triton X100 的 PBS 通透類器官組織的細胞膜，室溫下反應 1 小時。利用 blocking buffer (含有 1% BSA 的 PBS) 室溫下反應 3 小時後，加入一級抗體 (GLUT3, sc74393, 1:250) 在 4°C 反應過夜。隔日，移除一級抗體並以 1x PBS 清洗兩次後，加入二級抗體 (Alexa Flour 488 donkey anti-mouse IgG, invitrogen A21202, 1:1000) 在 4°C 反應過夜。隔日，移除二級抗體並以 1x PBS 清洗兩次後，即可利用螢光顯微鏡觀察類器官組織上 GLUT3 蛋白質的螢光變化。

#### (六) 細菌共同培養

將已處理待測藥物 24 小時的類器官組織用 HBSS 清洗 3 次後，與 E.coli (OD  $\approx$  1) 在無添加血清的細胞培養液 (DMEM) 共同培養 3 小時。3 小時後，以含有 gentamycin 的 HBSS 清洗 3 次並加入 DAPI 染細胞核，利用正反雙向細胞呈現系統拍照。

#### (七) 2-NBDG 吸收分析

將類器官組織種在已覆蓋 matrigel 的 8 well chamber slide 等待兩天後，加入預處理的藥物 24 小時。藥物培養 24 小時後，移除細胞培養液並以 1x PBS 清洗一次，加

入 300 ul 不含葡萄糖的細胞培養液，放置於 37°C 的二氧化碳培養箱中培養 3 小時。

接著加入 200 ul 帶有綠色螢光的葡萄糖類似物(2-NBDG, 200 uM)，於 37°C 下反應 30 分鐘，隨後加入 DAPI(1:1000)與 PI(50 ug/ul)再避光下培養 10 分鐘後，再以 1x PBS 清洗 3 次，利用正反雙向細胞呈現系統拍照。

#### (八) 氯離子測定(SPQ staining)

將已處理待測藥物 24 小時的類器官組織用 HBSS 清洗 3 次後，加入 hypotonic medium (50% HBSS, 50% water, 5 mM SPQ)，放置於 37°C 的二氧化碳培養箱中培養 15 分鐘。移除 hypotonic medium 後，再以 HBSS 清洗 3 次，加入 DAPI 染細胞核，利用正反雙向細胞呈現系統拍照。

## 參、研究結果與討論

### 一、模擬人體環境之腸道類器官培養及觀察

目的：確認成功培養出腸道類器官，並觀察腸道組織在 3D 與 2D 環境培養下之異同

#### (一)類器官的繼代培養

1. 為了能以較貼近活體狀況的模式來分析藥物的腸道副作用，我們利用腸道 organoid 模式作為研究平台 (圖 7)。將建立好的腸道類器官解凍，並繼代培養於 Matrigel 所形成的 3D 環境中 (圖 8)。
2. 雖然一開始細胞少，在顯微鏡下看不到球狀的細胞團，但是在兩天後可以觀察到腸道組織細胞生長快速，許多細胞團明顯形成且呈現透明狀，這些球狀細胞團即為 Fetal type 的類器官(圖 9 中)。
3. 繼續培養兩三天，部分的 organoid 中間部分顏色較深，似乎開始死亡並形成管腔，但外圍呈現較淡顏色的一層上皮細胞，並分化形成指狀突起 (budding)類似 villi 的結構，即將發育為 Adult type organoids (圖 9 右)。

#### (二) 觀察腸道類器官於 2D 及 3D 環境中培養的形狀差異

為了確認培養於 3D 環境的 organoid 更能貼近真實的生理狀況，我們將腸道組織以相同的類器官培養液分別置於 2D 和 3D 的環境中培養，以便進行後續的實驗。將腸道組織混合 Matrigel 培養兩天後可以發現 3D 中的組織可形成圓球狀且比較具有結構性，繼續培養在四天後部分會分化成 adult organoid，具有類似腸道內壁絨毛(villus)的指狀突出(budding) 的結構，成功形成腸道類器官。然而，將同樣的組織在不混合 Matrigel 情況之下，以 2D 模式培養於一般具有 collagen coating 的培養皿，生長出來的組織平坦的貼附在盤子底部 (attached form)，沒有發育成球狀，且結構比較散亂 (圖 10)。

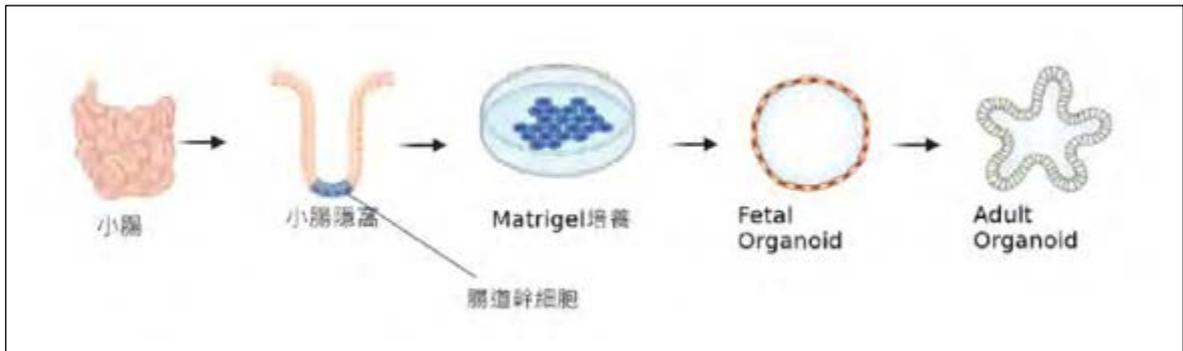


圖 7. 類器官的培養與分化示意圖。

腸道組織經由與 Matrigel 混合後，於 organoid 培養液中培養數天後觀察是否具有 fetal organoid 及 adult organoid，顯示是否建立具有分化能力之 organoid。

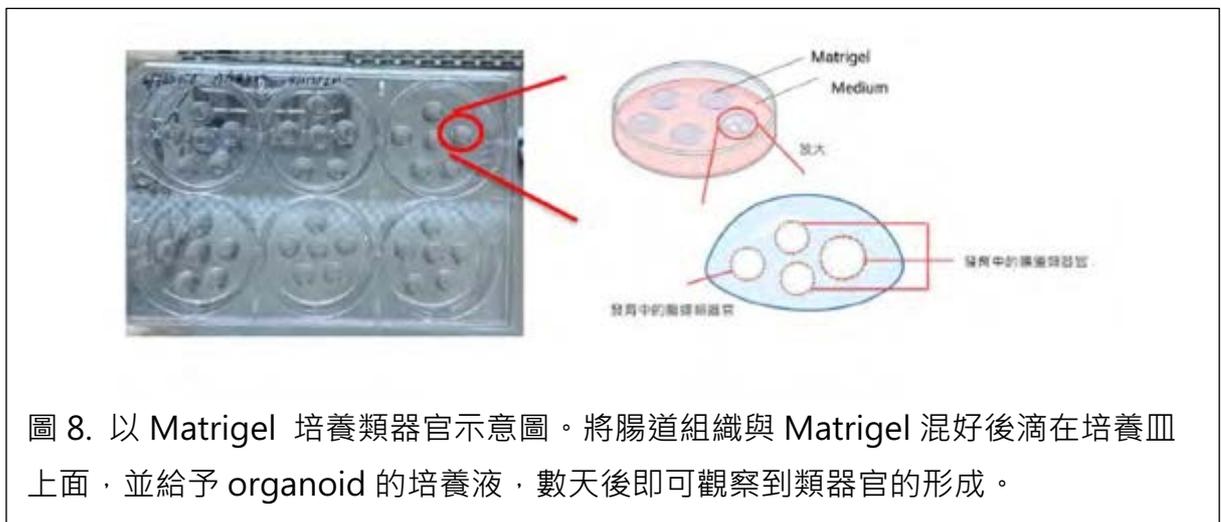


圖 8. 以 Matrigel 培養類器官示意圖。將腸道組織與 Matrigel 混好後滴在培養皿上面，並給予 organoid 的培養液，數天後即可觀察到類器官的形成。

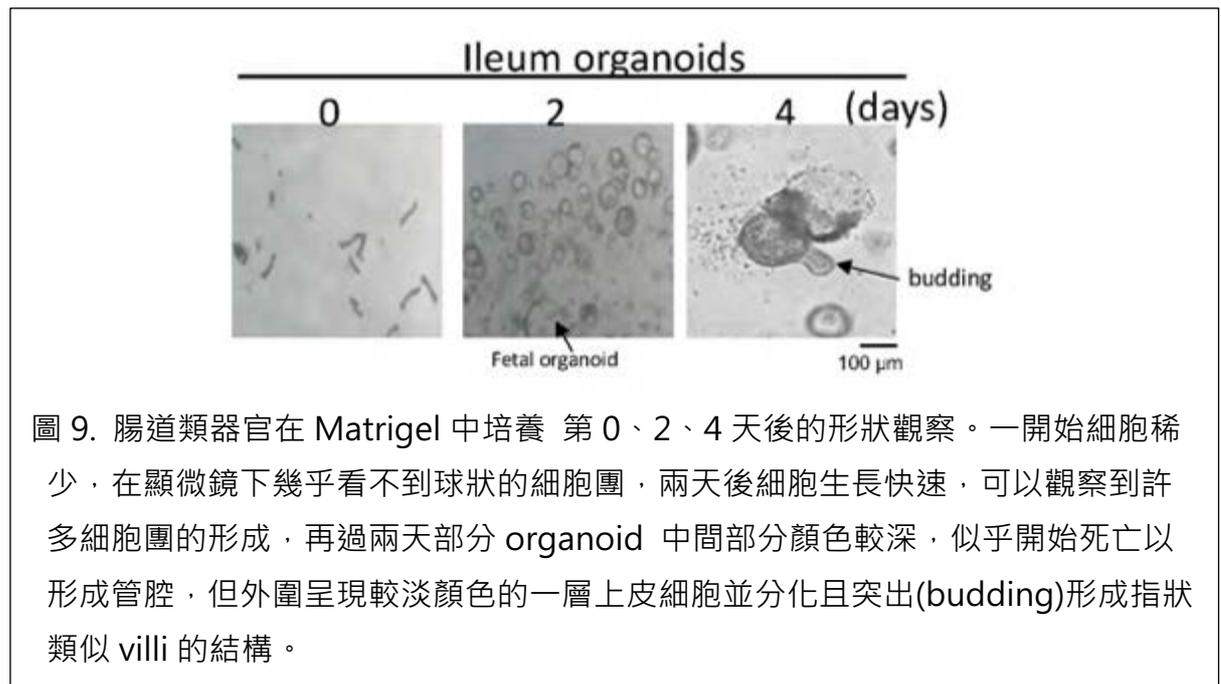


圖 9. 腸道類器官在 Matrigel 中培養 第 0、2、4 天後的形狀觀察。一開始細胞稀少，在顯微鏡下幾乎看不到球狀的細胞團，兩天後細胞生長快速，可以觀察到許多細胞團的形成，再過兩天部分 organoid 中間部分顏色較深，似乎開始死亡以形成管腔，但外圍呈現較淡顏色的一層上皮細胞並分化且突出(budding)形成指狀類似 villi 的結構。

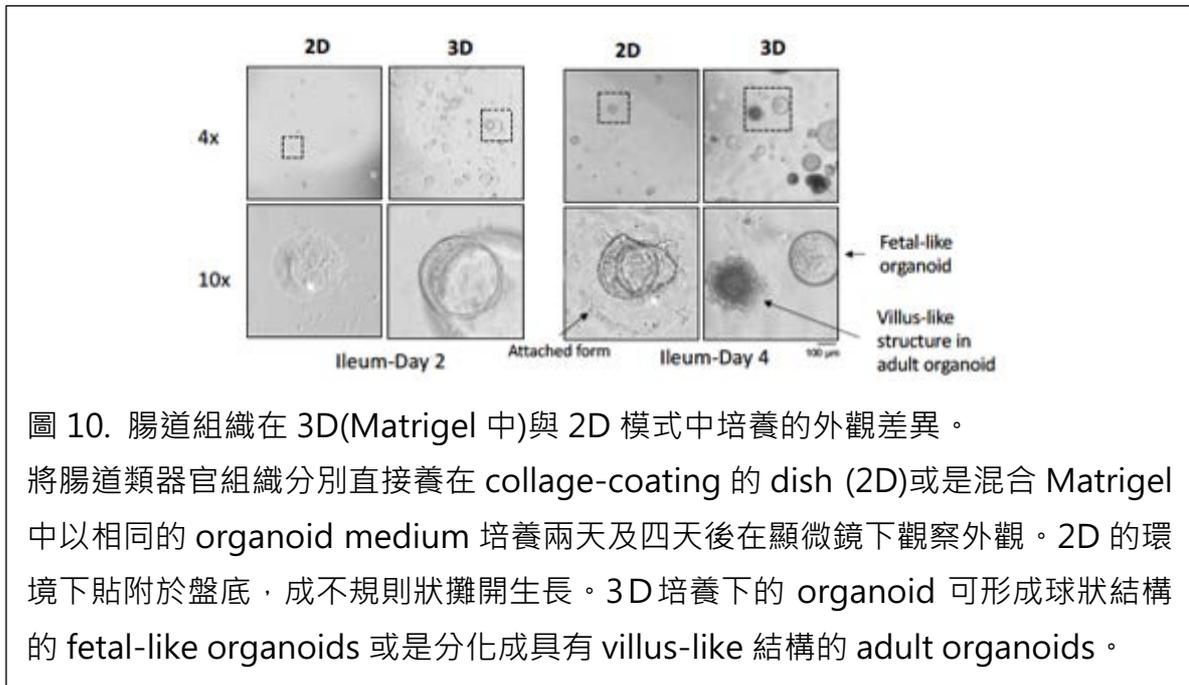


圖 10. 腸道組織在 3D(Matrigel 中)與 2D 模式中培養的外觀差異。

將腸道類器官組織分別直接養在 collagen-coating 的 dish (2D)或是混合 Matrigel 中以相同的 organoid medium 培養兩天及四天後在顯微鏡下觀察外觀。2D 的環境下貼附於盤底，成不規則狀攤開生長。3D 培養下的 organoid 可形成球狀結構的 fetal-like organoids 或是分化成具有 villus-like 結構的 adult organoids。

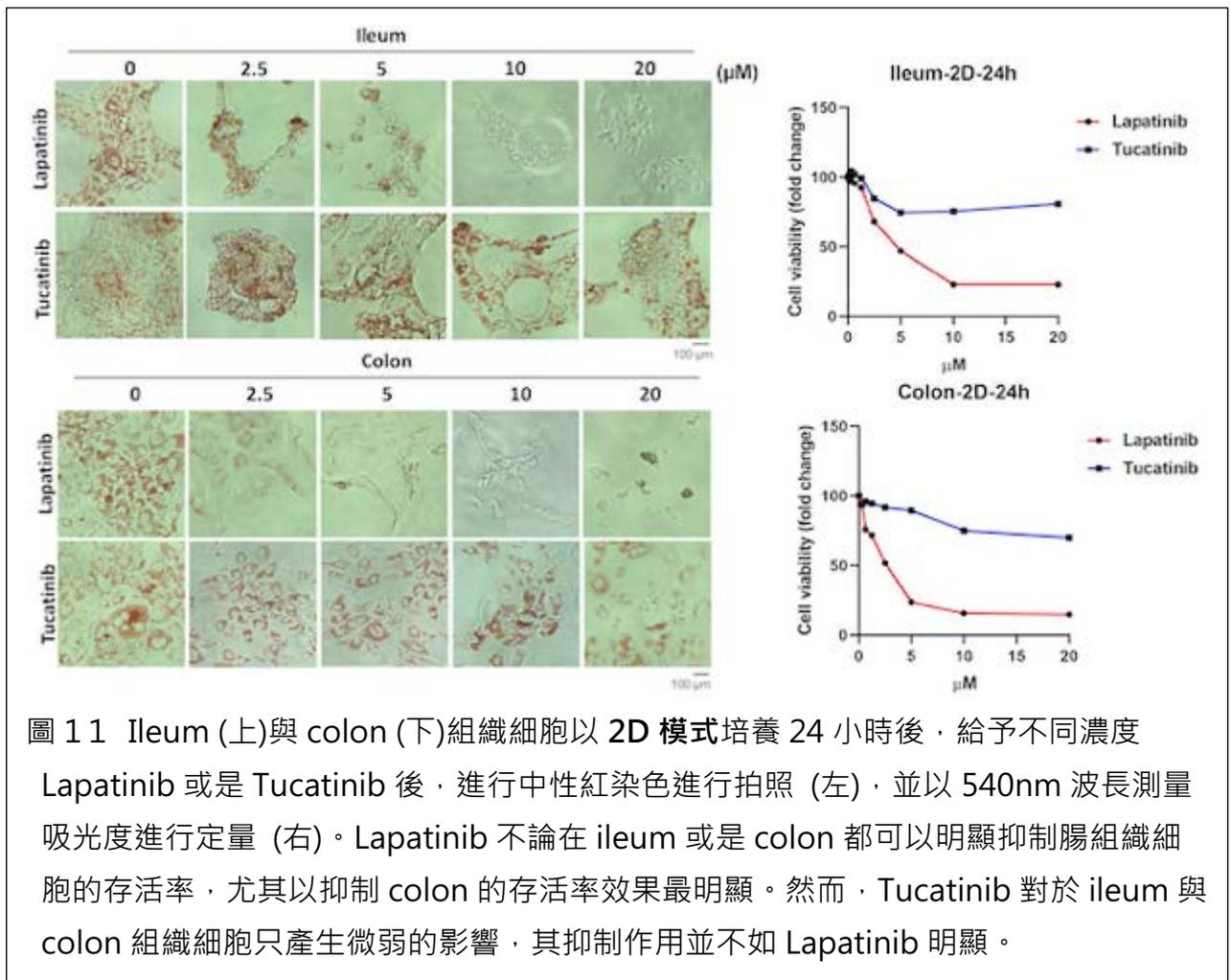
## 二、Lapatinib 比 Tucatinib 更明顯抑制腸道類器官生長

目的：比較兩種不同 HER2 TKIs 對 3D 類器官及 2D 腸組織存活率的影響差異

1. 不同的培養環境不僅影響組織形成特定結構的能力，也可能對藥物的敏感度有著相當大的差異。因此，我們接下來將 3D 類器官及 2D 腸組織均給予不同種類的 HER2 TKIs，分析組織培養環境不同是否對藥物敏感性有很大的差異。Lapatinib 與 Tucatinib 都是屬於可逆性的 HER2 TKIs，而且在臨床上已知 Lapatinib 較 Tucatinib 容易引起嚴重的腸道副作用。因此，我們比較這兩種藥物在不同培養模式下，是否對腸道組織存活率的影響也具有明顯的差異。由於中性紅蓄積在活細胞中的 lysosome 酸性環境 (pH<6.8) 可呈現紅色，因此我們以中性紅染色來測試藥物對細胞存活率的影響。結果發現隨著藥物濃度增加，Lapatinib 明顯抑制 colon 與 ileum 組織在 2D 培養環境中的存活率，其中 Lapatinib 在 2.5  $\mu$ M 的濃度下就可以明顯抑制 colon 組織細胞的生長，而需要較高的 10  $\mu$ M 的濃度下才能明顯抑制 ileum 組織的存活率，顯示 colon 組織對

lapatinib 較具敏感性。然而不管是 colon 或是 ileum，Tucatinib 對這些 2D 腸道組織的細胞存活率影響不明顯，只有殺死少量的細胞 (圖 11)。

2. 在 3D 類器官的培養中，雖然結果同樣顯示 Lapatinib 比 Tucatinib 更容易影響腸道的細胞，尤其是 colon 組織細胞，但是可以另外觀察到兩種藥物除了會造成細胞的死亡以外，還會讓 organoid 球狀組織大小縮小，這是只有 3D 結構才能觀察到的現象 (圖 12)。而且比較這兩個結果後，還可以發現藥物對 2D 細胞的死亡率比對 3D 的類器官更為明顯。在 2D 和 3D 的不同培養環境下，給予這兩個藥物後 24 小時對 3D 類器官的  $IC_{50}$  比 2D 組織多了 2~3 倍；在給予藥物 48 小時後，對 3D 類器官的  $IC_{50}$  甚至比 2D 組織細胞多了幾十倍 (表二)，顯示兩種測試藥物對於 2D 的培養環境下腸道組織的存活率有較明顯的抑制作用。



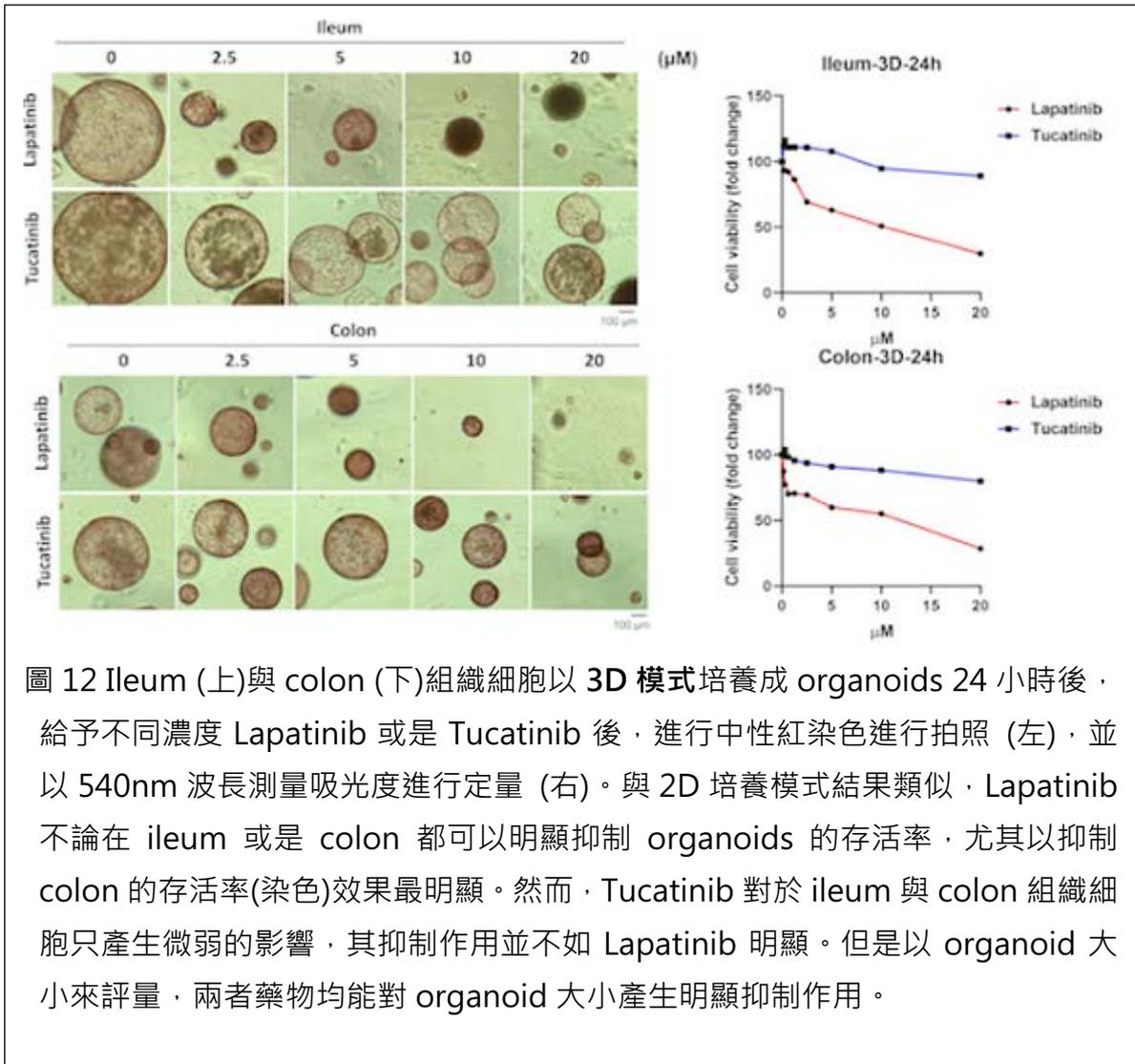


圖 12 Ileum (上)與 colon (下)組織細胞以 3D 模式培養成 organoids 24 小時後，給予不同濃度 Lapatinib 或是 Tucatinib 後，進行中性紅染色進行拍照 (左)，並以 540nm 波長測量吸光度進行定量 (右)。與 2D 培養模式結果類似，Lapatinib 不論在 ileum 或是 colon 都可以明顯抑制 organoids 的存活率，尤其以抑制 colon 的存活率(染色)效果最明顯。然而，Tucatinib 對於 ileum 與 colon 組織細胞只產生微弱的影響，其抑制作用並不如 Lapatinib 明顯。但是以 organoid 大小來評量，兩者藥物均能對 organoid 大小產生明顯抑制作用。

		IC <sub>50</sub> (μM)			
		24h		48h	
		Lapatinib	Tucatinib	Lapatinib	Tucatinib
3D	Ileum	8.18	10865	99.22	-
	Colon	6.55	21680	85.92	16496
2D	Ileum	4.25	208.05	3.53	170.14
	Colon	2.27	438.83	1.8	810.4

表二. 將迴腸與結腸類器官給予 lapatinib 或 Tucatinib 培養 24 或 48 小時後，以中性紅染色進行存活率評估，依照吸光讀值來分析並計算 IC<sub>50</sub>。

三、Lapatinib 在結腸類器官中明顯增加發炎、葡萄糖吸收、氯離子外流等相關基因群表現，但降低 crypt 細胞增生發展的相關基因表現。

目的：探討不同 HER2 TKIs 對腸道類器官中基因體表現之影響

為了進一步分析Lapatinib 與Tucatinib 影響腸道功能的可能分子機制，將培養於Matrigel 3D 模式中的迴腸與結腸類器官給予藥物24 小時後，抽取RNA 進行RNA sequencing，再以IPA 軟體分別比較Lapatinib 和Tucatinib 對結腸與迴腸相關疾病 與功能基因組的影響 (圖13)。結果發現Lapatinib 對於迴腸與結腸均增加enteritis、colitis、 gastrointestinal inflammation 等腸道發炎相關基因表現，同時亦減少上皮組織發展 (Development of epithelial tissue) 的基因表現。另外，兩種藥物均對迴腸組織增加葡萄糖代謝異常(Glucose metabolism disorder) 與組織死亡(Morbidity or Mortality)機率。

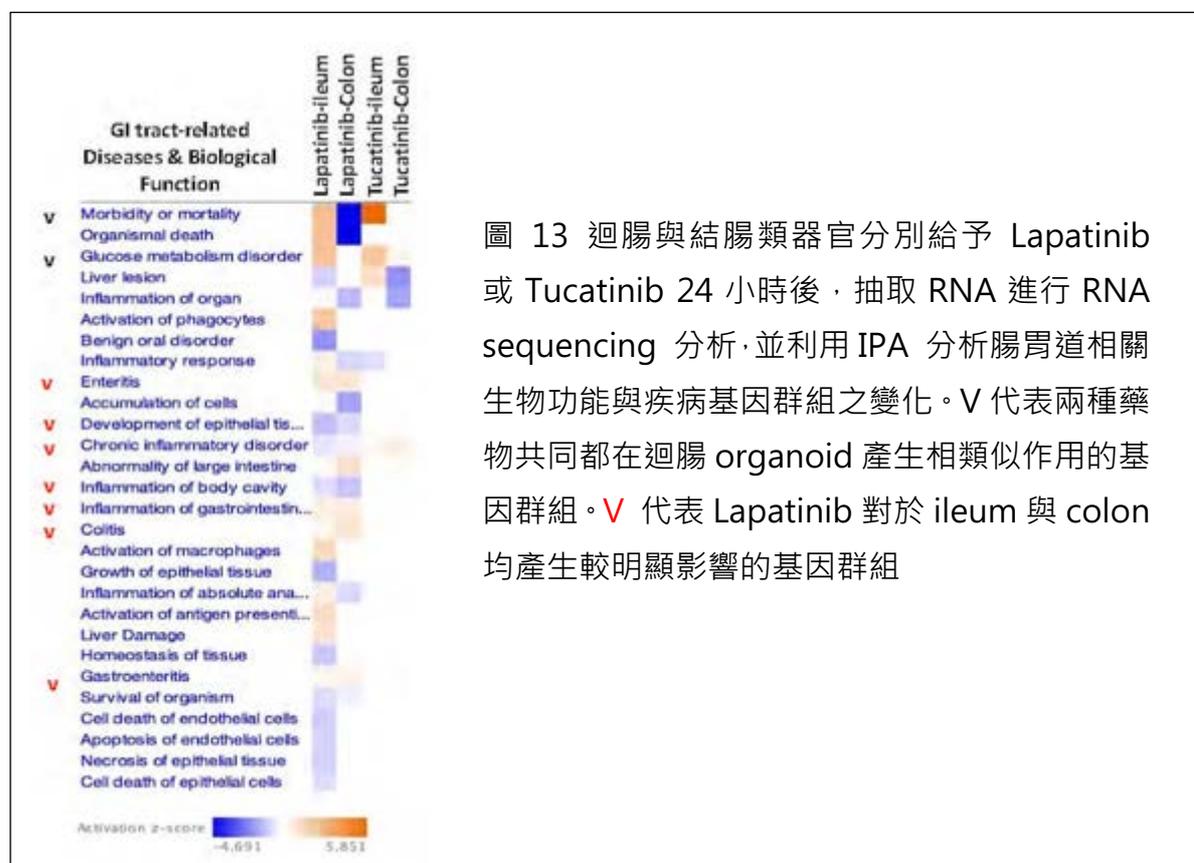


圖 13 迴腸與結腸類器官分別給予 Lapatinib 或 Tucatinib 24 小時後，抽取 RNA 進行 RNA sequencing 分析，並利用 IPA 分析腸胃道相關生物功能與疾病基因群組之變化。V 代表兩種藥物共同都在迴腸 organoid 產生相類似作用的基因群組。V 代表 Lapatinib 對於 ileum 與 colon 均產生較明顯影響的基因群組

#### 四、Lapatinib 明顯降低 Organoid 的分化功能但不影響其 tight junction。

1. 由 RNA-seq 結果得知，Lapatinib 與 Tucatinib 在 ileum 與 colon organoids 中的基因體表現產生相當不一樣的影響。因此，我們進一步以 IPA 在分子層面上，將各個相關基因群組中可能影響的訊息傳遞路徑進行分析。
2. 首先，我們發現在 colon 組織中 Lapatinib 明顯引發許多慢性腸炎相關基因的表現，包含 IL2R、CD74 (Major Histocompatibility Complex, Class II Antigen-Associated)、NOS2、CXCL13 與 REG 家族 ( Regenerating Family Member) 等發炎基因的表現 (圖 14)。
3. Lapatinib 也在 colon 組織中降低 FGF7、ODC1、APOBEC1、NFE2L2 等許多與 crypt 細胞增生與發展相關基因的表現 (圖 15)。整體上可能因此而降低腸道 crypt 的分化功能與結構形成。
4. 由於上述結果發現 Lapatinib 可能影響到 crypt 細胞的生長與分化，因此我們接下來欲探討 lapatinib 影響 adult 或是 fetal-like 哪一種腸道類器官。在給予 Lapatinib 或是 Tucatinib 5 $\mu$ M 培養六天後，同樣用中性紅染色來測試藥物對腸道類器官活性的影響，觀察具類似指型突起 ( budding) 結構的 Adult organoid，以及球狀的 Fetal-like organoid。
5. Lapatinib 除了造成細胞型態的改變以外，更降低 Adult organoid 的中性紅染色，顯示容易受到 Lapatinib 的影響而死亡；此外，Lapatinib 也造成 adult organoid 上的 villus 結構縮短，但不太影響 fetal-like organoid 的中性紅染色，這些結果顯示 Lapatinib 可能對腸道的分化與發展具有較顯著的影響 (圖 16)。而這是 2D 的細胞模式無法測試和發現的。

6. 由於 Lapatinib 會造成結腸類器官的分化功能減弱，我們接著想探討這個藥物是否同時也降低結腸上皮細胞之間的緊密結合(tight junction)功能及腸道的結構，而讓腸道中的大腸桿菌容易進出腸腔而引起感染。我們將結腸類器官培養好之後給予 lapatinib 5  $\mu$ M 一天，再加入帶有綠色螢光蛋白(green fluorescence protein; GFP) 表現的大腸桿菌 (*E.Coli*)進行共同培養。我們結果發現，雖然 lapatinib 會減少結腸類器官的大小與分化，但是不容易促進大腸桿菌進入類器官中(圖 17)，顯示這個藥物可能不至於破壞腸道的完整性而導致腹瀉與感染。

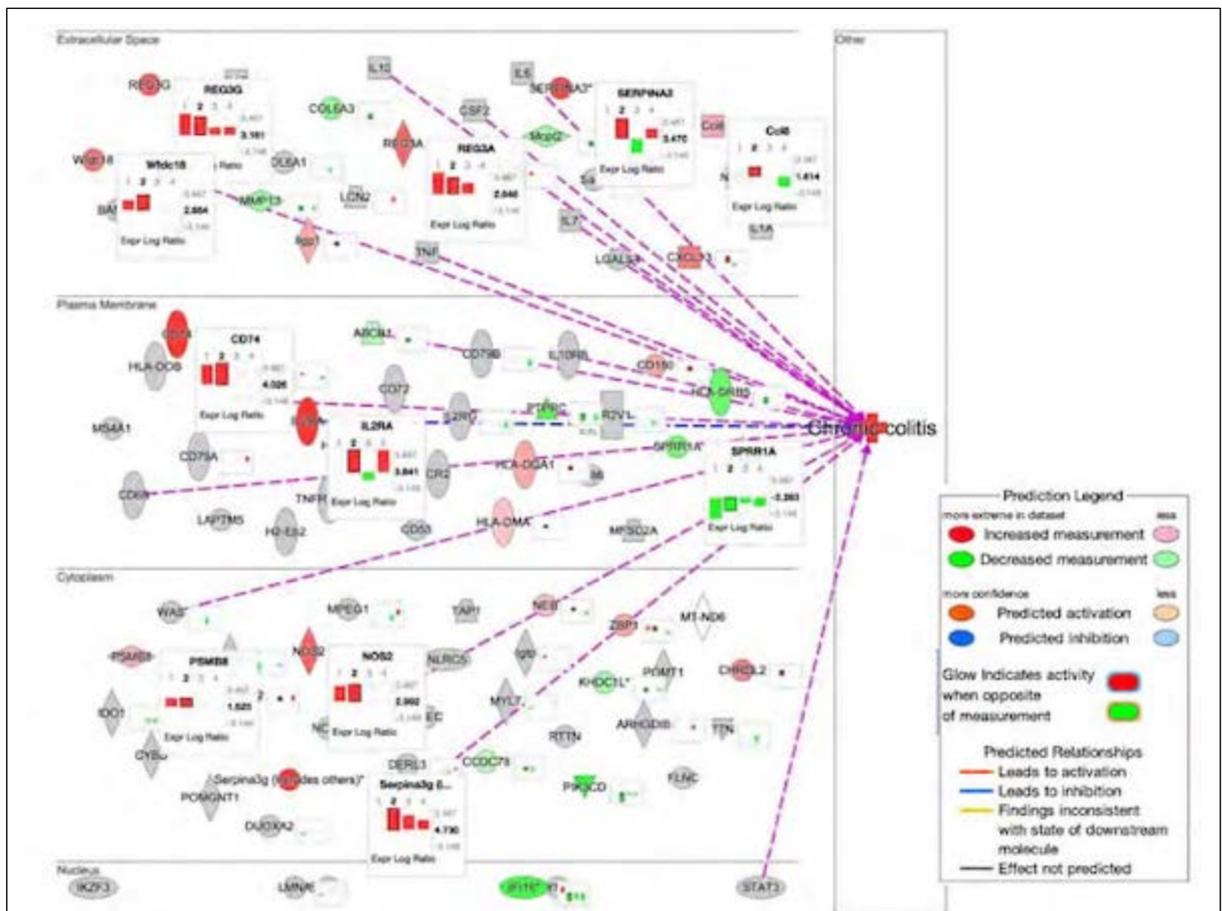


圖 14 Lapatinib 或 Tucatinib 影響迴腸與結腸類器官中慢性腸炎之相關基因的表現量與訊息傳遞路徑。基因表現組別分別為：1. 給予 Lapatinib 之迴腸類器官, 2. 給予 Lapatinib 之結腸類器官, 3. 給予 Tucatinib 之迴腸類器官, 4. 給予 Tucatinib 之結腸類器官。表現量數值為與未給藥的相對應類器官之比較值 (log 2 ratio)。因 Lapatinib 影響結腸類器官最為明顯因此為代表結果。紅色與綠色分別代表在 RNA sequencing 結果中呈現表現增加與下降的基因; 橘色與藍色則是代表根據文獻預測分別會增加與降低的基因，顏色越深代表變化越明顯。

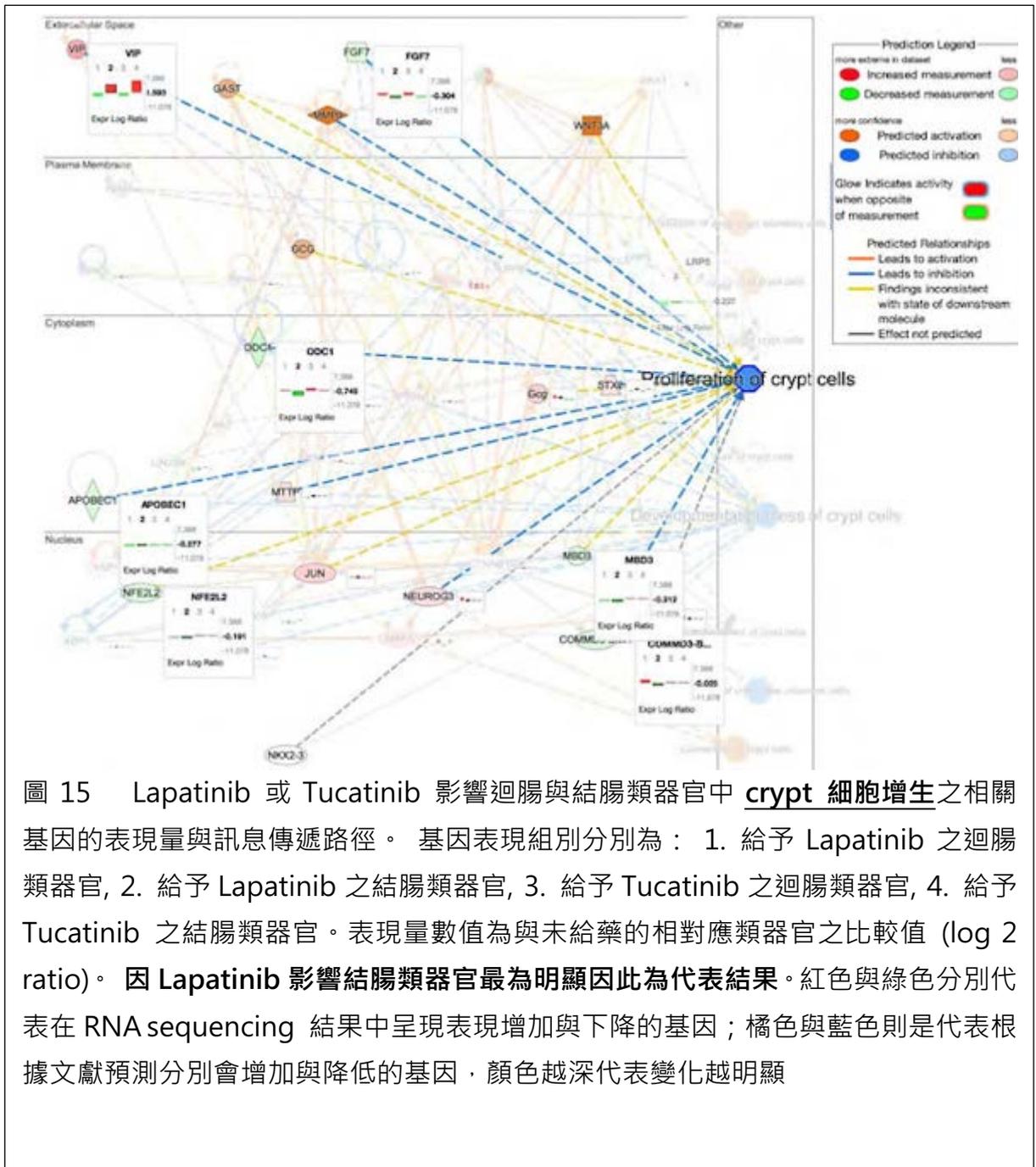


圖 15 Lapatinib 或 Tucatinib 影響迴腸與結腸類器官中 crypt 細胞增生之相關基因的表現量與訊息傳遞路徑。基因表現組別分別為：1. 給予 Lapatinib 之迴腸類器官, 2. 給予 Lapatinib 之結腸類器官, 3. 給予 Tucatinib 之迴腸類器官, 4. 給予 Tucatinib 之結腸類器官。表現量數值為與未給藥的相對應類器官之比較值 (log 2 ratio)。因 Lapatinib 影響結腸類器官最為明顯因此為代表結果。紅色與綠色分別代表在 RNA sequencing 結果中呈現表現增加與下降的基因；橘色與藍色則是代表根據文獻預測分別會增加與降低的基因，顏色越深代表變化越明顯

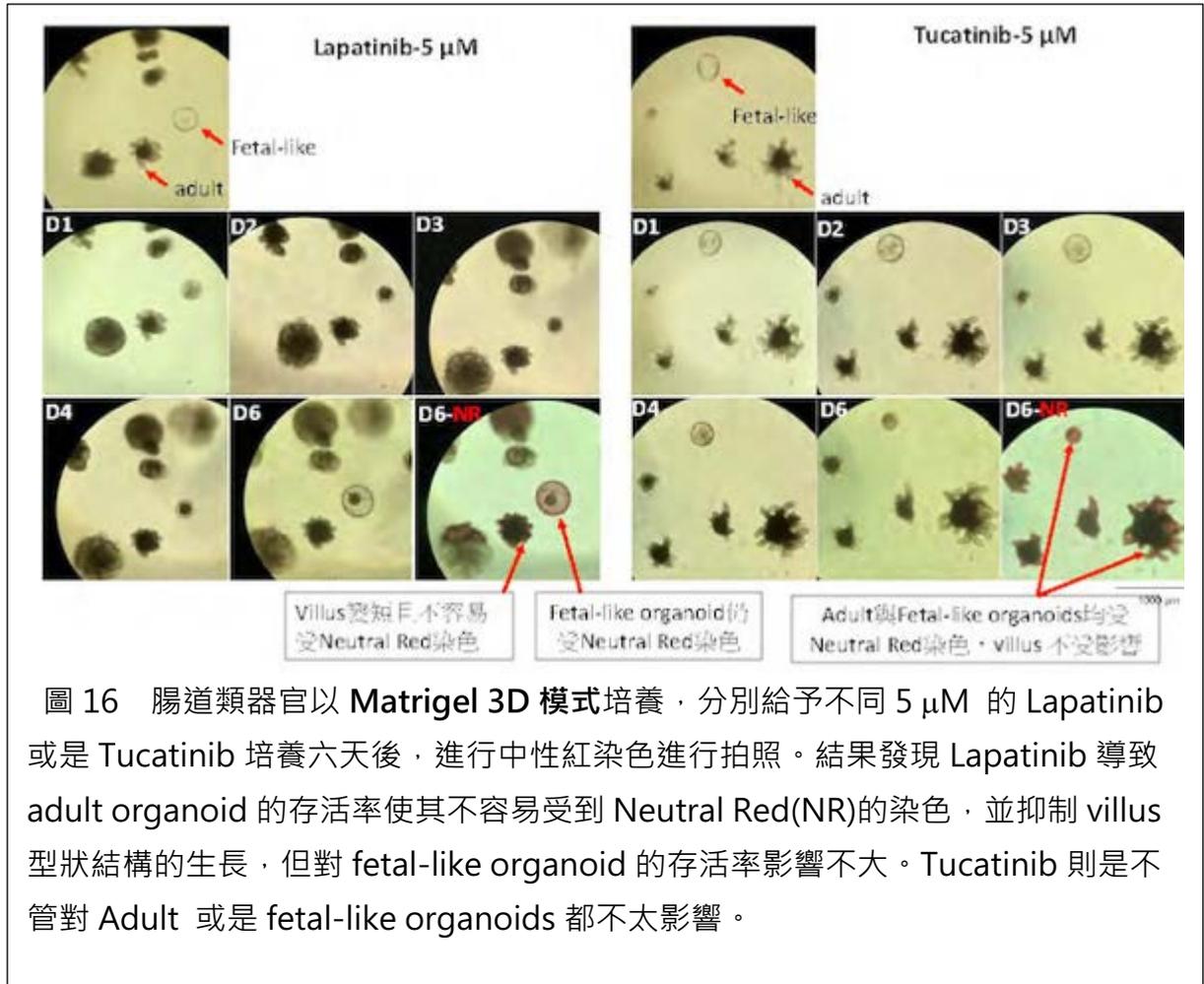


圖 16 腸道類器官以 Matrigel 3D 模式培養，分別給予不同 5  $\mu\text{M}$  的 Lapatinib 或是 Tucatinib 培養六天後，進行中性紅染色進行拍照。結果發現 Lapatinib 導致 adult organoid 的存活率使其不容易受到 Neutral Red(NR)的染色，並抑制 villus 型狀結構的生長，但對 fetal-like organoid 的存活率影響不大。Tucatinib 則是不管對 Adult 或是 fetal-like organoids 都不太影響。

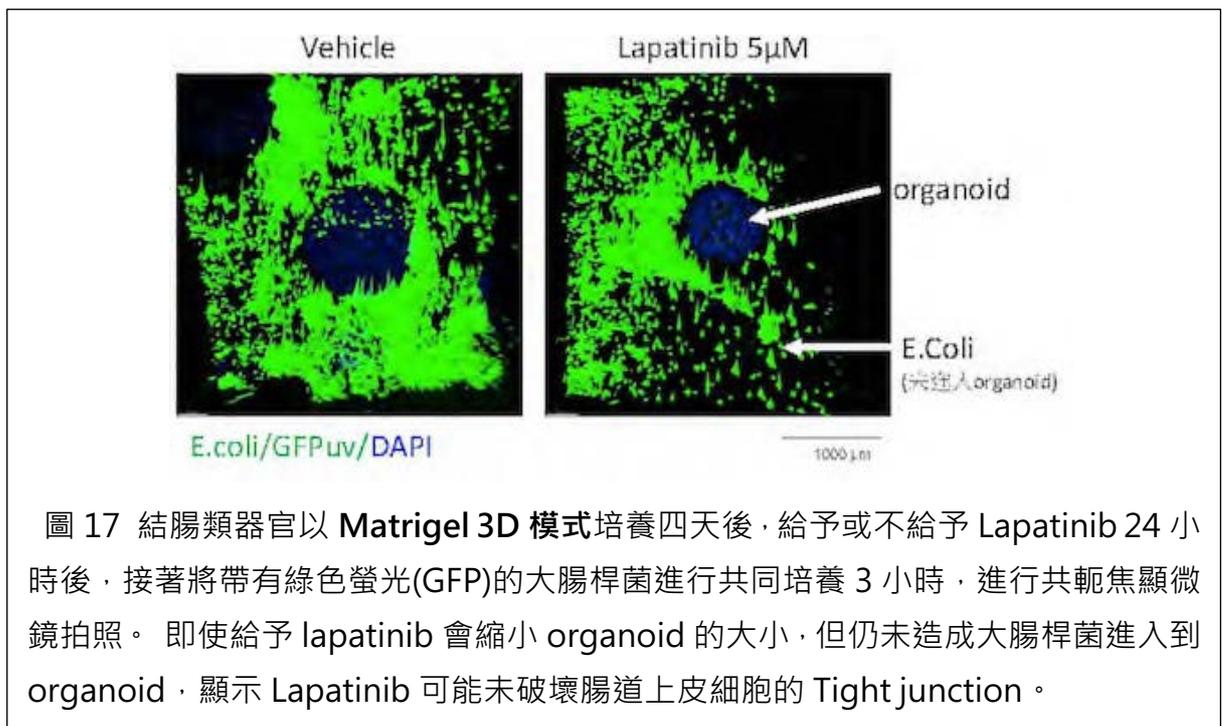


圖 17 結腸類器官以 Matrigel 3D 模式培養四天後，給予或不給予 Lapatinib 24 小時後，接著將帶有綠色螢光(GFP)的大腸桿菌進行共同培養 3 小時，進行共軛焦顯微鏡拍照。即使給予 lapatinib 會縮小 organoid 的大小，但仍未造成大腸桿菌進入到 organoid，顯示 Lapatinib 可能未破壞腸道上皮細胞的 Tight junction。

## 五、HER2 TKIs 對 organoid 吸收葡萄糖能力的影響

1. 在圖 13 中的結果顯示 HER2 TKIs 可能會增加葡萄糖吸收與代謝異常，因此我們以 IPA 分析 Lapatinib 與 Tucatinib 在迴腸與結腸類器官中是否影響葡萄糖轉運蛋白的表現。
2. 結果發現 Lapatinib 在結腸類器官中明顯增加 SCL2A3 (GLUT3)與 SCL2A5 (GLUT5)基因表現，Tucatinib 則是在結腸類器官中明顯增加 SCL2A3 (GLUT3) 與 SLC5A2 (SGLT2)的表現。顯示這兩種藥物都可共同增加 GLUT3 表現外，也都各自特異性地分別增加 GLUT5 與 SGLT1 的表現 (圖 18)。
3. 由於這兩種藥物均會增加 glucose transporter，因此我們進一步進行功能分析，我們以葡萄糖的螢光類似物 2-NBDG 來觀察兩種藥物對類器官吸收葡萄糖的影響，同時以碘化丙啶染色 (PI staining) 來觀察細胞死亡的情況。PI 是一種螢光嵌入劑，透過插入鹼基之間而與 DNA 結合可用於染色核酸，PI 的螢光激發最大值為 493 nm (藍綠色)，發射最大值為 636 nm (紅色)。結合 DNA 後，PI 的量子產率提高了 20-30 倍，PI 的激發/發射最大值移至 535 nm (綠色) /617 nm (橙紅色)。由於 PI 不具有膜滲透性，因此可根據膜完整性區分壞死、凋亡和健康細胞。結果發現僅有 Lapatinib 會增加 organoid 對 2-NBDG 的吸收。有趣的是，增加 2-NBDG 吸收的細胞同時也增加 PI 的染色訊號，而給予 Tucatinib 則較不易出現這些現象 (圖 19)。
4. 這些結果顯示，增加葡萄糖吸收造成代謝異常或許是藥物引發腸道組織損傷的原因之一。

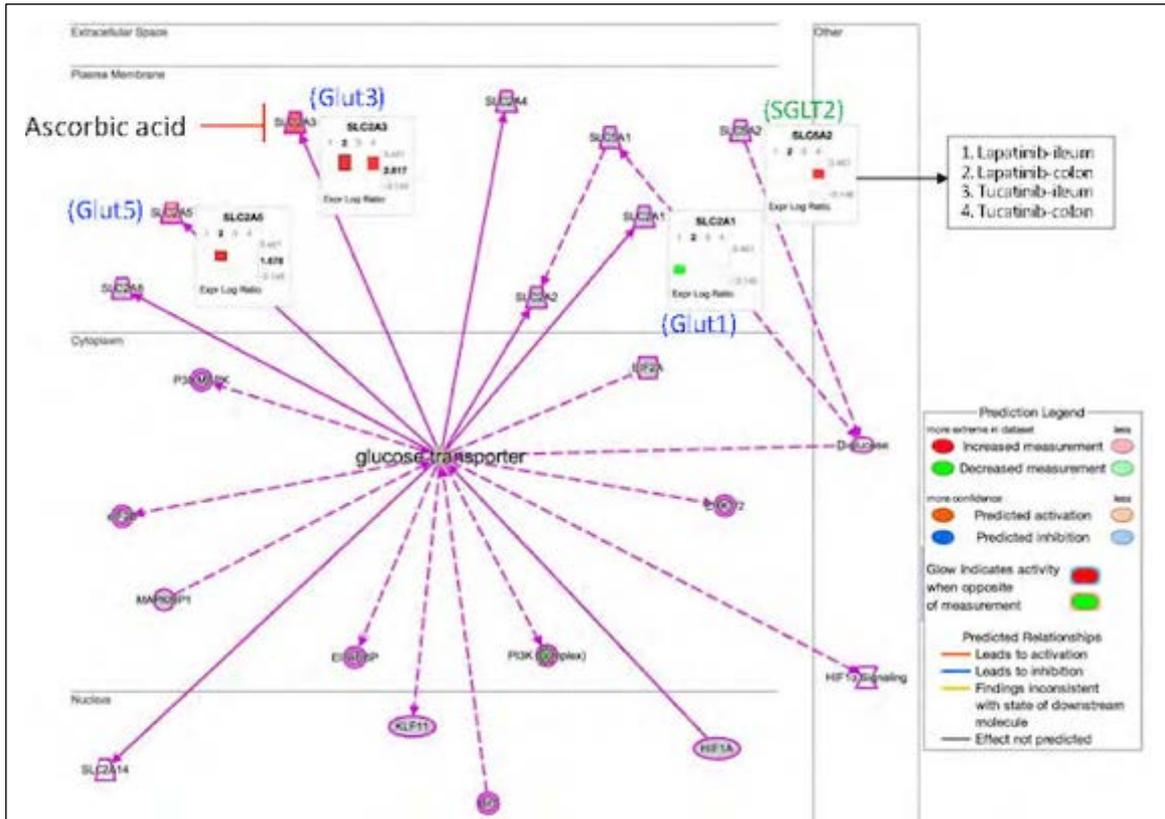


圖 18 Lapatinib 或 Tucatinib 影響迴腸與結腸類器官中 **Glucose transporter** 之相關基因的表現量與訊息傳遞路徑。基因表現組別分別為：1. 給予 Lapatinib 之迴腸類器官, 2. 給予 Lapatinib 之結腸類器官, 3. 給予 Tucatinib 之迴腸類器官, 4. 給予 Tucatinib 之結腸類器官。表現量數值為與未給藥的相對應類器官之比較值 (log 2 ratio)。因 Lapatinib 影響結腸類器官最為明顯因此為代表結果。紅色與綠色分別代表在 RNA sequencing 結果中呈現表現增加與下降的基因；橘色與藍色則是代表根據文獻預測分別會增加與降低的基因，顏色越深代表變化越明顯

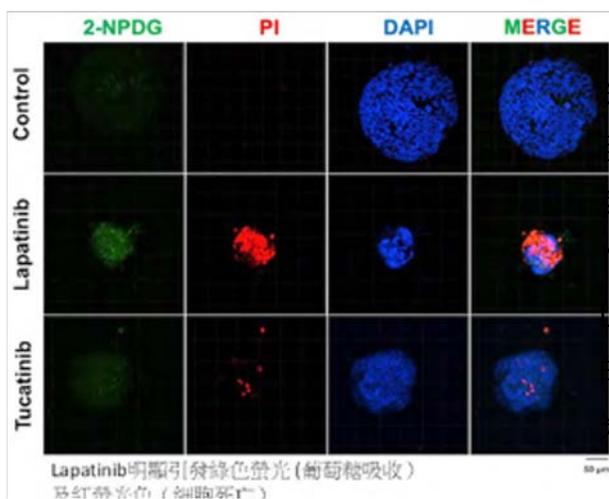
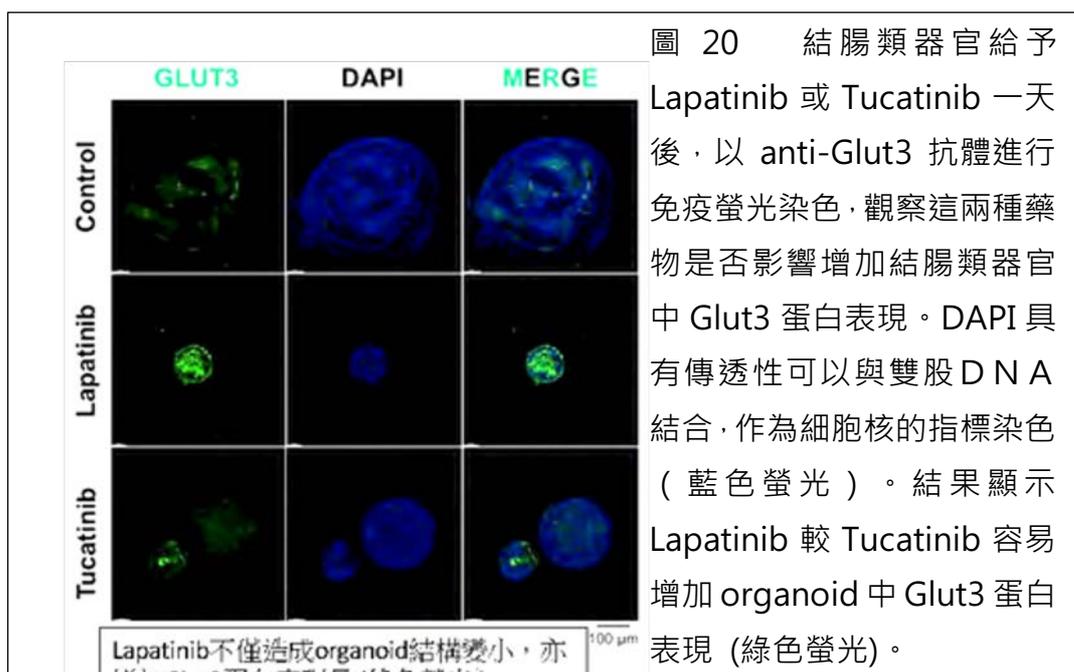
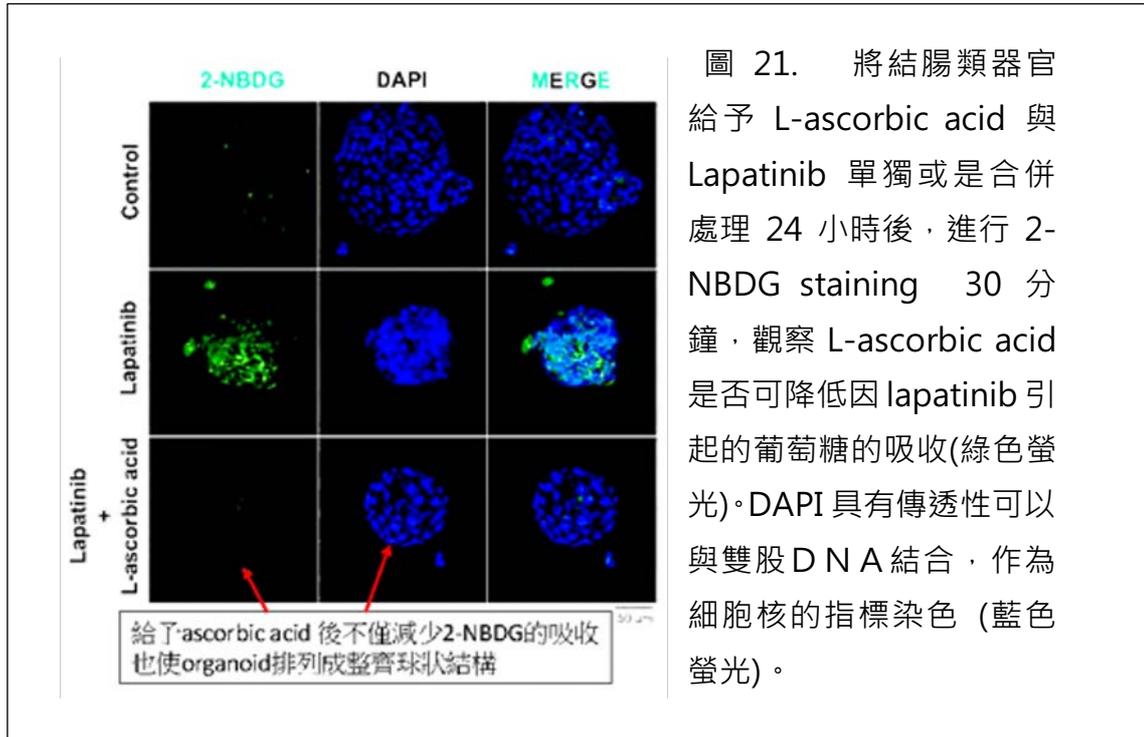


圖 19 以 2-NBDG 及 PI staining 分別觀察 Lapatinib 或 Tucatinib 是否影響結腸類器官中葡萄糖的吸收與細胞死亡。DAPI 具有傳透性可以與雙股 DNA 結合，作為細胞核的指標染色。Lapatinib 明顯引發代表葡萄糖吸收的綠色螢光與代表細胞死亡的紅色螢光。

## 六、GLUT3 參與 Lapatinib 增加葡萄糖吸收的作用

1. 接著我們驗證 GLUT3 的表現是否的確受到兩個藥物的影響，利用 anti-GLUT3 抗體進行免疫螢光染色，結果發現 colon organoid 中的 Glut3 蛋白表現的確在給予 Lapatinib 處理 24 小時後明顯增加，Tucatinib 增加 Glut3 表現得作用相對上則較不明顯 (圖 20)，此結果與 RNA-seq 結果相符合。
2. 由於 Lapatinib 會造成大量葡萄糖吸收與 Glut3 蛋白表現，因此我們推測 Lapatinib 是經過增加 Glut3 表現而促進 colon organoid 吸收葡萄糖能力。Ascorbic acid 也就是 Vitamin C 已經被發現可以抑制 Glut3 所參與的 glucose uptake [15]。我們發現將 colon organoid 同時給予 Ascorbic acid 時，可以抑制 Lapatinib 所增加的 2-NBDG 吸收；同時在 DAPI 進行細胞核染色過程中，也可以觀察到原本 Lapatinib 會造成 organoid 的細胞核染色緻密但結構扭曲且雜亂，在合併給予 ascorbic acid 後，organoid 的結構變回原本排列整齊的球形狀態 (圖 21)。
3. 這些結果顯示，給予 ascorbic acid (vitamin C)或許可以緩解 Lapatinib 對腸道結構的影響並減少其副作用。然後，此項推論需要更進一步的實驗證明。

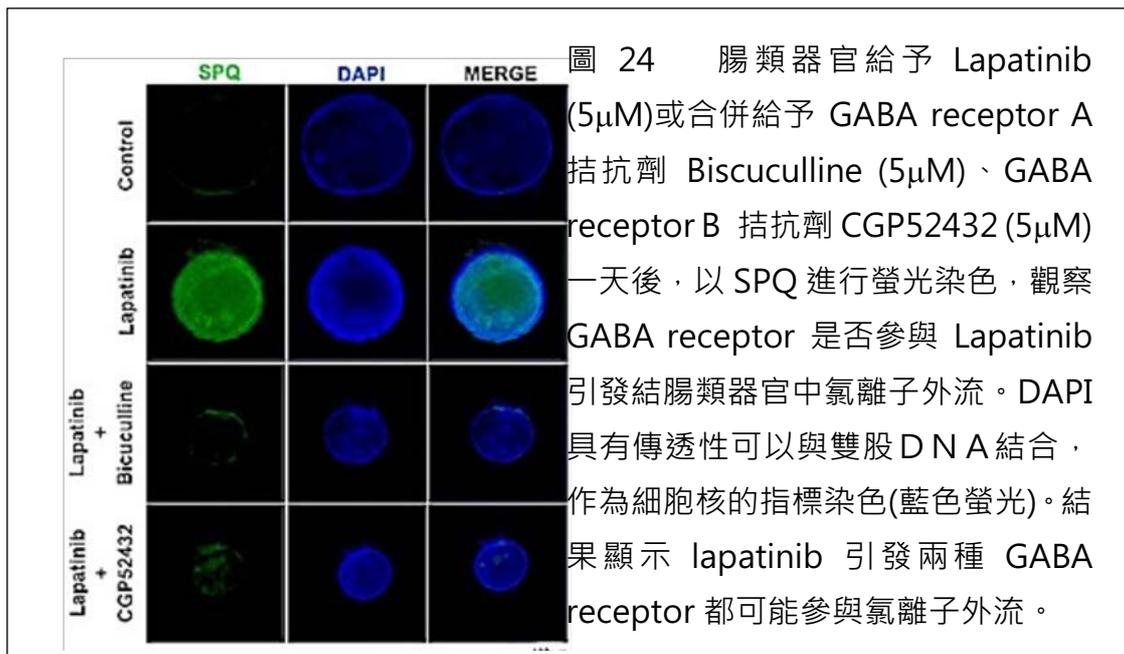
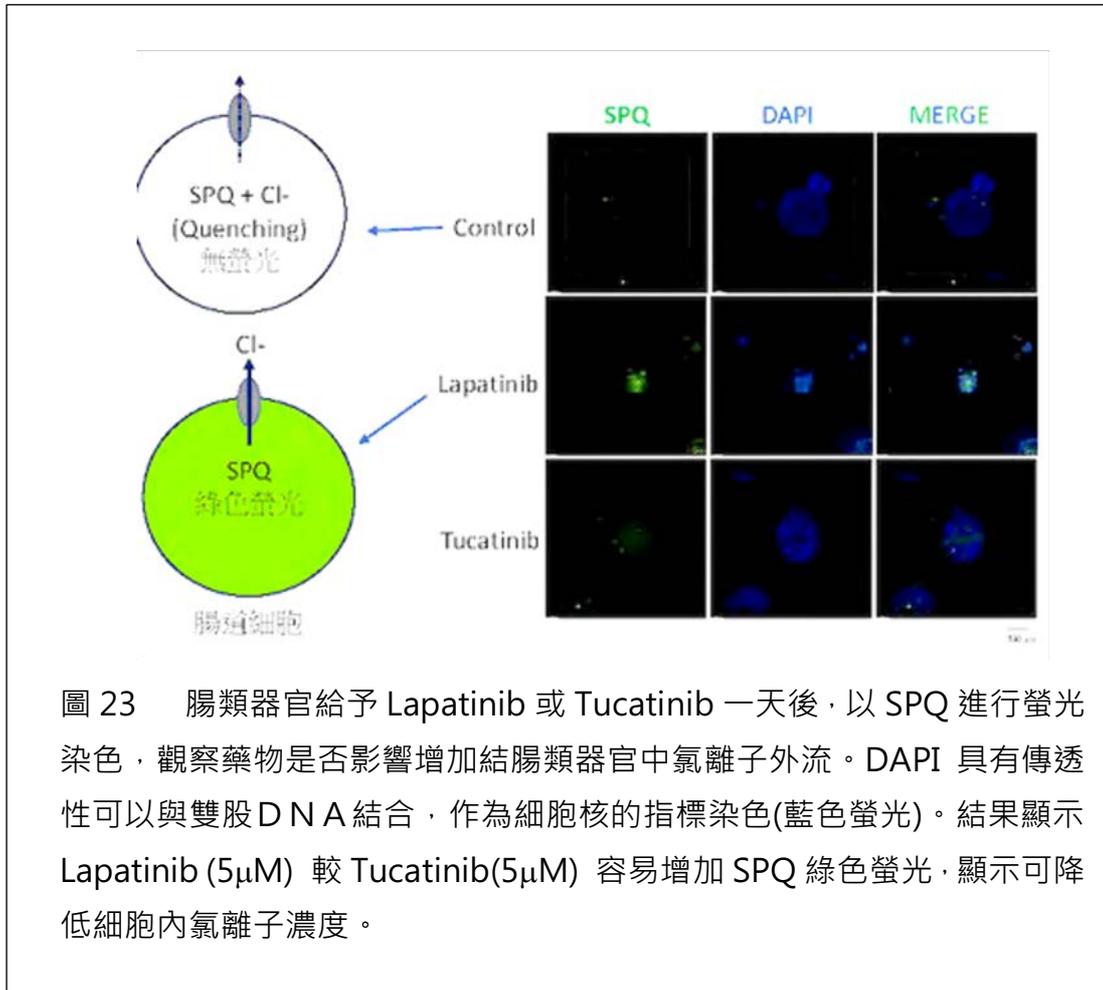




## 七、HER2 TKIs 對 organoid 中氯離子流動的影響

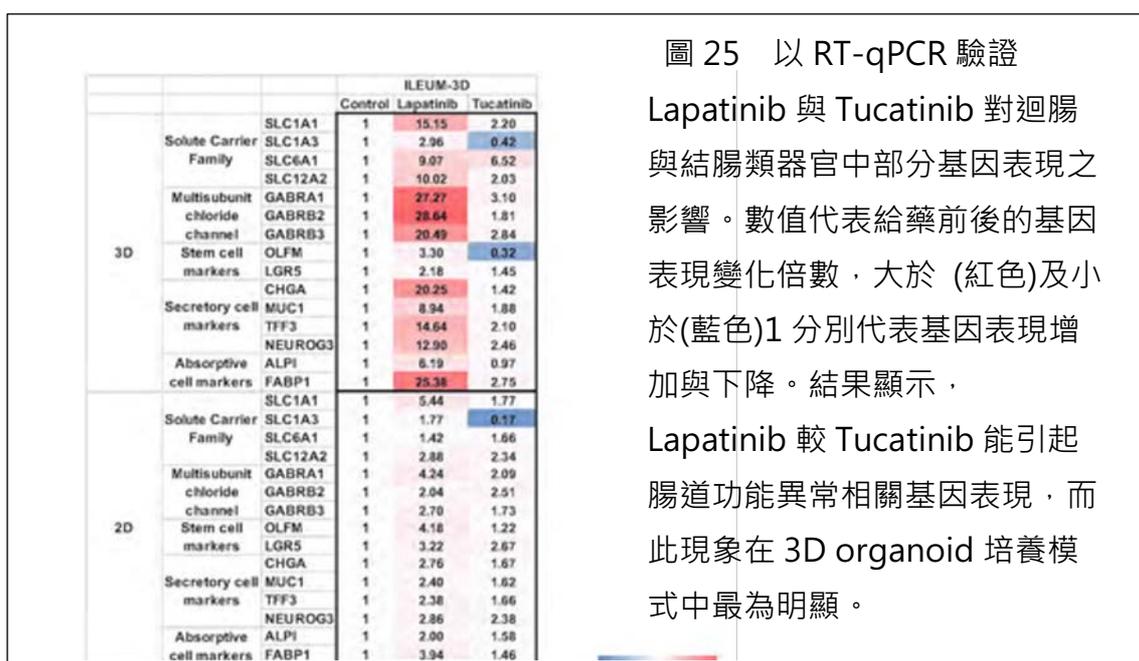
1. 根據文獻報導，腸道電解質平衡異常亦是造成腹瀉的原因之一，氯離子經由 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)自腸上皮細胞的流出至管腔是其中的機制之一 [16]。我們以 IPA 分析的結果發現，Lapatinib 雖然沒有增加 CFTR 的表現量，但卻明顯增加許多 GABA receptor 家族基因在結腸類器官中的表現 (圖 22)，這些作用預測可能增加氯離子外流至細胞外，造成電解質的失衡，亦為造成腹瀉的可能原因之一。
2. 6-methoxy-N-(3-sulfopropyl) quinolinium (SPQ)是一種可以用來偵測細胞內氯離子的螢光探針(probe)，當細胞內的氯離子濃度高時，會與 SPQ 結合並消去(quenching)其螢光，而不具有綠色螢光；然而，當細胞內氯離子因外流而減少時，SPQ 即可脫離氯離子的消光作用而呈現綠色螢光。後的，我們發現將 colon organoid 當給予 Lapatinib 一天進行 SPQ 染色，確實發現





## 八、Lapatinib 於 3D 培養腸道類器官中所引發的基因改變更具有差異性

我們進一步以 RT-qPCR 進行部分基因表現量的驗證，Lapatinib 在 3D organoid 中增加較多的基因表現，然而 Tucatinib 對這些基因的影響則不明顯 (圖 25)，顯示這兩個藥物在腸道 organoid 中的作用的確有顯著的差異。然而，在 2D 的組織細胞中 Lapatinib 增加同樣這些基因表現的作用則不明顯。這些結果再次顯示 3D 與 2D 模式所培養的組織對藥物的敏感性迥然不同。



## 九、討論

1. 腸胃道產生嚴重副作用一直是使用 HER2 標靶藥物治療乳癌常見的臨床問題，由於本類藥物需要長期服藥，長期的腸胃道副作用會影響病人的用藥順從性與治療效果，但相關研究不多，多數的處理方式是停止藥物治療，因此找出有效的相對應策略可以改善這類病人的治療效果。
2. 我們的研究發現 Lapatinib 會明顯增加 glucose 吸收與氯離子外流，這些電解質與碳水化合物的平衡異常已知會造成腹瀉[17]。腸道中有許多葡萄糖轉運

蛋白包括 SGLT1、Glut1、Glut2、Glut5 負責葡萄糖、乳糖、半乳糖的運送 [18]，但我們發現通常在腦部[19]或是大腸癌細胞[20]才會大量表現的 Glut3，卻在正常腸道組織受到 lapatinib 作用而明顯增加。

3. Glut3 在癌細胞中大量表現已被發現會因為增加有氧糖解作用而促進腫瘤組織的發炎環境，做後導致癌症轉移[21]。因此，Lapatinib 引發腸道發炎或許跟 Glut3 的大量表現也有關係。
4. 另一方面，氯離子的失衡已經知道也會造成腹瀉等腸道副作用，以 crofelemer 一種抗分泌的藥物降低氯離子外流也被發現可以減緩抗癌藥物所造成的腹瀉 [22]，其中 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) 可以參與氯離子自腸上皮細胞的流出至管腔是其中的機制之一[16]。
5. ErbB inhibitor 被發現都會活化 CFTR，可能與藥物引發腹瀉有關 [23]，然而我們的結果並沒有看到 CFTR 的 mRNA 受到 lapatinib 改變，但其他與氯離子運送有關的 GABA 家族 receptor 則是被大量增加 (圖 22)，這個家族也被發現與腸道的過敏性腹瀉有關[24]。我們的結果也發現 GABA receptor 的拮抗劑也可以降低 Lapatinib 所引發的氯離子外流，顯示 Lapatinib 可能改變腸道電解質恆定而造成腹瀉。

## 肆、結論與應用

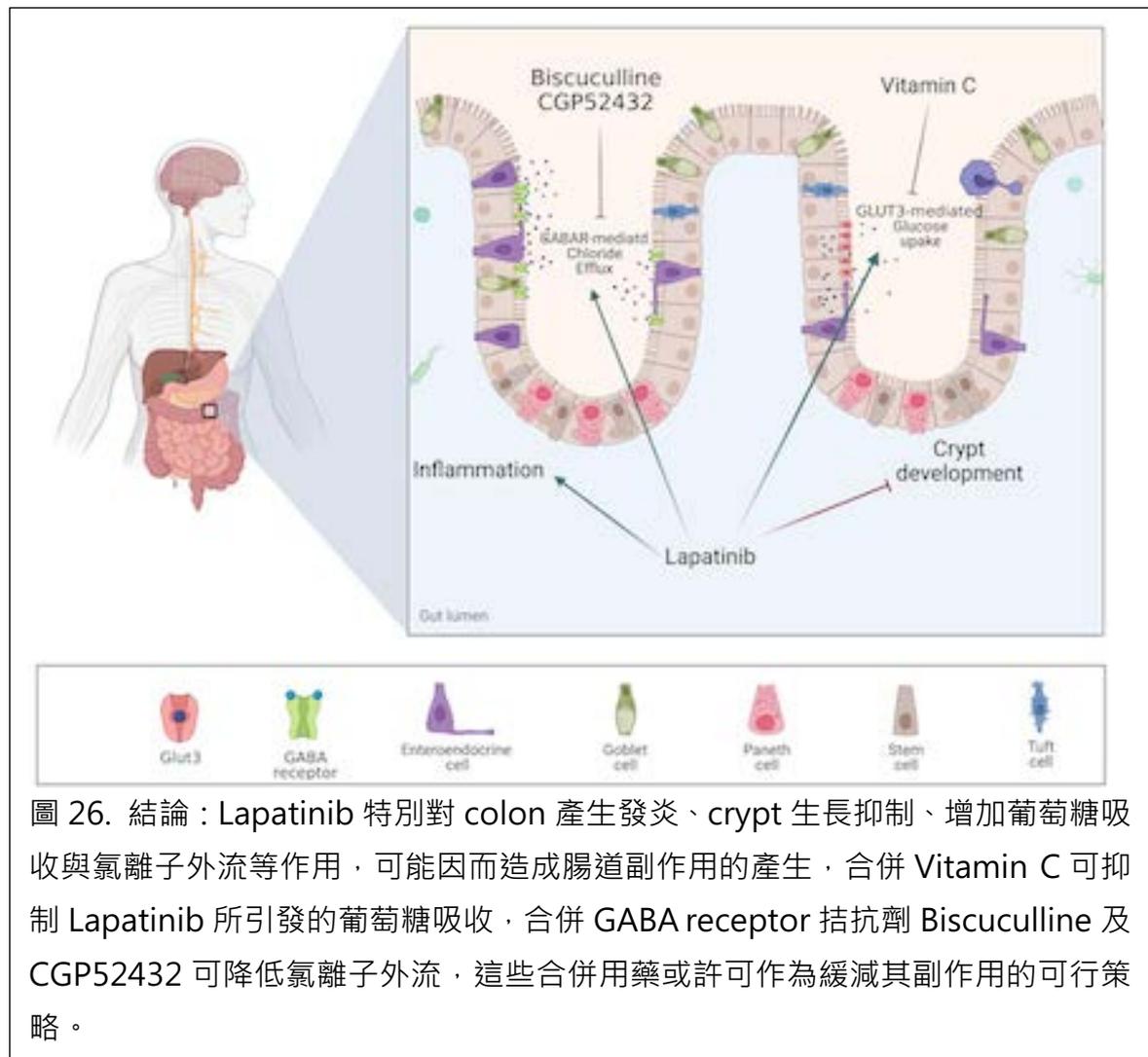
### 一、結論

根據本研究實驗結果發現，雖然同屬於 HER2 TKI 的 Lapatinib 及 Tucatinib 在臨床上都用於轉移性 HER2 陽性乳癌病患，在影響腸道 organoid 的存活率及基因表現卻出現截然不同的作用。以 RNA-seq 搭配 IPA 的分析中，Lapatinib 明顯增加包括腸發炎、葡萄糖吸收、氯離子外流等許多與腸道功能相關基因群的表現，也顯著抑制 crypt 細胞發展與生長相關的基因群，尤其以 colon organoid 受到的影響最為明顯。這些基因改變的現象確實反映在功能性分析中，Lapatinib 明顯造成腸道類器官的存活率下降、葡萄糖吸收增加、氯離子外流等作用，這些腸道功能的改變與 Lapatinib 較 Tucatinib 在臨床上容易造成嚴重腹瀉等腸道副作用相符合。我們的研究結果進一步提供 Lapatinib 改變各種腸道功能的可能分子機制，其中 Lapatinib 可能藉由增加 Glut3 transporter 與 GABA receptor 分別提高腸道類器官的葡萄糖吸收與氯離子外流，而此作用可分別受到 L-ascorbic acid (vitamin C) 及 Biscuculline 或 CGP52432 的抑制 (圖 26)。

### 二、應用

1. 3D 腸道類器官可作為快速且信賴的研究模式，檢測藥物是否對不同腸道部位的功能產生影響並引發副作用的篩檢平台，可分析存活率、幹細胞自我更新、腸道上皮細胞分化、Tight Junction、葡萄糖吸收、氯離子流動等功能。
2. 以 RNA-seq 搭配 IPA 可作為分析藥物對腸道產生功能異常的訊息傳遞路徑與機制探討。

3. 利用此研究模式，本研究發現日常生活中常補充的 vitamin C (L-ascorbic acid) 或 GABA receptor 拮抗劑 (Biscuculline 或 CGP52432) 可以降低 Lapatinib 引發腸道類器官對葡萄糖大量吸收及氯離子外流的作用，或許可用作為緩解此抗癌藥物所產生的腸道副作用。



## 伍、參考文獻

1. Schlam, I. and S.M. Swain, *HER2-positive breast cancer and tyrosine kinase inhibitors: the time is now*. NPJ Breast Cancer, 2021. **7**(1): p. 56.
2. Malhotra, G.K., et al., *Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers*. Cancer Biol Ther, 2010. **10**(10): p. 955-60.
3. Gehart, H. and H. Clevers, *Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019. **16**(1): p. 19-34.
4. Kunte, S., J. Abraham, and A.J. Montero, *Novel HER2-targeted therapies for HER2-positive metastatic breast cancer*. Cancer, 2020. **126**(19): p. 4278-4288.
5. Geyer, C.E., et al., *Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer*. N Engl J Med, 2006. **355**(26): p. 2733-43.
6. Chatsipirois, D., *Safety Profile and Clinical Recommendations for the Use of Lapatinib*. Breast Care (Basel), 2010. **5**(s1): p. 16-21.
7. Murthy, R.K., et al., *Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer*. N Engl J Med, 2020. **382**(7): p. 597-609.
8. Conlon, N.T., et al., *Comparative analysis of drug response and gene profiling of HER2-targeted tyrosine kinase inhibitors*. British Journal of Cancer, 2021. **124**(7): p. 1249-1259.
9. Zeino, Z., G. Sisson, and I. Bjarnason, *Adverse effects of drugs on small intestine and colon*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2010. **24**(2): p. 133-41.
10. Rudlowski, C., et al., *Her-2/neu gene amplification and protein expression in primary male breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2004. **84**(3): p. 215-23.
11. Bowen, J.M., et al., *Determining the mechanisms of lapatinib-induced diarrhoea using a rat model*. Cancer Chemother Pharmacol, 2014. **74**(3): p. 617-27.
12. Clevers, H.C. and C.L. Bevins, *Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts*. Annu Rev Physiol, 2013. **75**: p. 289-311.
13. Mittal, R., et al., *Organ-on-chip models: Implications in drug discovery and clinical applications*. J Cell Physiol, 2019. **234**(6): p. 8352-8380.
14. Brancato, V., et al., *Could 3D models of cancer enhance drug screening?* Biomaterials, 2020. **232**: p. 119744.
15. Beltran, F.A., et al., *Ascorbic acid-dependent GLUT3 inhibition is a critical step for switching neuronal metabolism*. J Cell Physiol, 2011. **226**(12): p. 3286-94.

16. Moon, C., et al., *Drug-induced secretory diarrhea: A role for CFTR*. *Pharmacol Res*, 2015. **102**: p. 107-112.
17. Lehmann, A. and P.J. Hornby, *Intestinal SGLT1 in metabolic health and disease*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016. **310**(11): p. G887-98.
18. Koepsell, H., *Glucose transporters in the small intestine in health and disease*. *Pflugers Arch*, 2020. **472**(9): p. 1207-1248.
19. Szablewski, L., *Glucose Transporters in Brain: In Health and in Alzheimer's Disease*. *J Alzheimers Dis*, 2017. **55**(4): p. 1307-1320.
20. Shimizu, M. and N. Tanaka, *IL-8-induced O-GlcNAc modification via GLUT3 and GFAT regulates cancer stem cell-like properties in colon and lung cancer cells*. *Oncogene*, 2019. **38**(9): p. 1520-1533.
21. Tsai, T.H., et al., *Overexpression of GLUT3 promotes metastasis of triple-negative breast cancer by modulating the inflammatory tumor microenvironment*. *J Cell Physiol*, 2021. **236**(6): p. 4669-4680.
22. Van Seville, Y.Z.A., et al., *Dacomitinib-induced diarrhea: Targeting chloride secretion with crofelemer*. *Int J Cancer*, 2018. **142**(2): p. 369-380.
23. Duan, T., et al., *Intestinal epithelial potassium channels and CFTR chloride channels activated in ErbB tyrosine kinase inhibitor diarrhea*. *JCI Insight*, 2019. **4**(4).
24. Li, Y., et al., *A novel role of intestine epithelial GABAergic signaling in regulating intestinal fluid secretion*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012. **303**(4): p. G453-60.

## 【評語】 090014

此作品很成功的利用類組織評估藥物可能的副作用（腹瀉）。清楚將腸類組織應用於檢視腹瀉副作用的機轉，且同時測試可緩解副作用的機制（GABA transporter inhibitor）。用腸類組織作為臨床試驗前驅藥物副作用評估相當有說服力。data is very solid, presentation skill is good, background knowledge is well prepared. Lapatinib 在結腸類器官中明顯增加發炎、葡萄糖吸收、氯離子外流等相關基因群表現，但降低 crypt 細胞增生發展的相關基因表現，這些基因群的變化應該有西方墨點來確認。