

出國報告(出國類別：短期進修)

細胞色素 P450 27C1 對於維生素 A 的 3,4-脫氫反應預防了 P450 所媒介的進一步代謝

服務機關：國防醫學院

姓名職稱：王鴻展 上校教師

派赴國家：美國

出國期間：111 年 9 月 29 日至 112 年 4 月 3 日

報告日期：112 年 5 月 8 日

摘要

細胞色素P450 (P450, CYP) 27C1表現於人體皮膚，並催化維生素A (retinoids)的3,4-脫氫反應。此酵素具有相對高的特異性常數(k_{cat}/K_m)，人體皮膚中約四分之一的維生素A1 (retinol又稱視黃醇)呈現脫氫形式，但其功能尚不明確。3,4-去氫維生素A酸(也稱為雙去氫維生素A酸，ddRA)對於維生素A酸X受體和維生素A酸受體(RXR α /RAR)具有類似親和力。ddRA的代謝情況尚不清楚，我們認為脫氫反應可能是一種保護機制，用以維持人體中活性維生素A1的水平。然而ddRA理論上可以產生有限的氧化產物。我們優化了人類肝微粒體對於全反式維生素A酸(atRA)的氧化條件，在相同的代謝條件下，atRA有一個緩慢的C4-氧化作用，但卻沒有觀察到ddRA進一步的氧化反應。研究過程也使用UV光譜、NaBH $_4$ 和NaBD $_4$ 還原以及質譜分析，評估了微粒體與ddRA孵育時觀察到的高效液相層析峰，結果發現酵素與ddRA反應，沒有產生任何氧化產物，而且在存有P450輔因子NADPH的情況下也沒有增加任何可能的產物，此外，已知的P450抑制劑對這些化合物的濃度也沒有影響。根據現有的結果，我們得出結論，ddRA不易被P450氧化，而脫氫作用可能是功能性維生素A1維持體內濃度的一種保護機制。

目 次

摘 要	2
目 次	3
本 文	4
一、目的	4
二、過程	6
三、心得及建議	24

目的

源起：

Dr. Guengerich 在生化學界是夙負盛名的科學家，在藥物代謝領域的研究成果不勝枚舉，其中最為人熟知的即是細胞色素 P450 的廣泛研究，此類專題均是對藥學發展影響甚鉅的創新研究。此外，Dr. Guengerich 曾經以訪問教授身分蒞臨本校分享研究成果，因此與本校藥學系有良好的互動及友誼，基於此，本人選擇藉由短期進修的機會前往 Dr. Guengerich 位於 Vanderbilt University 實驗室，期許獲得更多研究經驗。

個人專長：

本人目前主要研究方向為藥動學研究，包含其製藥開發、遞藥傳輸以及代謝研究，並運用串聯質譜及核磁共振技術，解析代謝產物的結構及含量，並進一步進行化合物活性分析。藥物代謝學是銜接藥物化學、生物藥劑學及藥物治療學之間的橋梁，同時也是評估療效及藥物副作用的有效工具，深入探討藥物代謝的機轉，並攫取國外新穎技術將有助於此項科學在臨床應用的發展及進步。

進修目的：

藥物代謝學是涵蓋理論科學並利用新穎技術及精密儀器，分析探討藥物在生物體內的代謝變化並予以驗證，因此可作為銜接藥物化學、生物藥劑學及藥物治療學之間的橋梁。本人欲透過短期進修的機會學習國外目前的新知與技術，並從學術交流活動中截長補短以增強個人與學校的教學及研究能量。另一方面則可藉此機會讓國外學者了解國內的學術環境與研究方向，進一步透過合作的關係，維持雙方學術交流並提升國內學術

風氣。此行第二目的則是參訪該校高等教育的執行方法，尤以藥物代謝學的教學模式為主，以作為爾後是類研究及教學的參考方向。

過 程

學習及研究成果如下摘陳：

1. 緒論

維生素 A 及其衍生物對於調節皮膚內的細胞凋亡、分化和增生扮演重要角色。然而，某些內生性維生素 A 類化合物，尤其是 3,4-去氫維生素 A，其功能和代謝仍未被深入瞭解。全反式-3,4-去氫維生素 A1（又稱維生素 A2 或 3,4-雙去氫維生素 A1）是一條與全反式維生素 A 類化合物並行的皮膚內代謝途徑。1980 年首次在人類皮膚中發現了這些化合物[1]。總體而言，3,4-去氫維生素 A 佔皮膚表皮中維生素 A 的 1/4 [2]。細胞色素 P450 (P450 或 CYP) 27C1 在皮膚中表現，可將全反式維生素 A 催化成 3,4-去氫維生素 A[3-5]。3,4-去氫維生素 A 酸(ddRA)，一種全反式維生素 A1（視黃醇）的一種氧化代謝物，是皮膚內主要的活性維生素 A 類化合物，可以與維生素 A 酸和維生素 A 酸-X 核受體 (RARs/RXR) 結合[6-8]。這些核受體可以結合位於目標基因啟動子區域的 RAR 或 RXR 元件(RAREs/RXREs)上的 DNA 序列。目前尚未確定 atRA 與 ddRA 之間存在不同調控基因，因此 3,4-去氫維生素 A 的功能仍不明確[9,10]。多個研究團隊已經證實，當暴露於紫外線下時，3,4-去氫維生素 A 比其全反式維生素 A 對應物更穩定，能夠保持其穩定性 [9,11,12]。暴露於紫外線下的維生素 A1 會迅速光解[13]。目前，3,4-脫氫維生素 A1 在皮膚中作為潛在的“儲備庫”，用於在紫外線暴露後儲存全反式維生素 A1，是 3,4-脫氫維生素 A1 唯一被提出的獨特功能。atRA 可以進一步代謝為無效的氧化產物。從 atRA 形成的主要代謝物是全反式 4-羥基維生素 A 酸（4-OH atRA）。同時也觀察到全反式 4-

氧代維生素 A 酸 (4-oxo atRA)、全反式 18-羥基維生素 A 酸以及次級代謝物。這些產物不會結合到 RAR/RXR，並可以迅速從細胞排出 [14]。此一活性主要被認為是由經細胞色素 P450 (P450, CYP) 酶介導的，特別是 CYP26 家族-26A1、26B1 和 26C1 [15]。許多其他的 P450 酶已被證明在體外催化 atRA 的降解 (包括 P450s 1A1、3A4/5、2C8、2C9 和 4A11) [16]。

3,4-脫氫維生素 A1 在主要 atRA 代謝位點上具有雙鍵。此雙鍵可能會阻止 CYP26 家族酶和其他代謝酶在該位置水解 3,4-脫氫維生素 A1 [17,18]。維生素 A1 經過 3,4-脫氫化被認為是一個不可逆的過程，無法轉化回全反式維生素 A1 [19]。我們假設 3,4-脫氫維生素 A1 比全反式維生素 A1 更具代謝穩定性，使它們潛在地作為細胞內活性維生素 A1 的一個穩定來源。

2. 材料和方法

2.1. 化學品

ddRA 購自 Santa Cruz Biochemical (Dallas, TX)。atRA 購自 Millipore-Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)、Toronto Research Laboratories (Toronto, ON, CA) 或 Santa Cruz Biochemical。4-OH atRA 購自 Toronto Research Laboratories 或 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI)。4-Oxo atRA 購自 Toronto Research Laboratories。所有維生素 A 衍生物庫存溶液均在絕對乙醇中準備，並放在琥珀色玻璃瓶中以避免光照，儲存在 -80°C 的氬氣下。庫存濃度通過每個維生素 A 衍生物在乙醇中的消光係數進行分光光度法確定。光譜也被用於驗證庫存純度。漢密爾頓玻璃針筒 (Hamilton glass

syringes) 用於準備維生素 A 衍生物溶液。實驗中使用的所有其他試劑均為分析級和商業供應。

2.2. 人類肝微粒體

人類肝微粒體根據已發表的方法製備[21]，由 10 名捐贈者的混合肝臟樣本（每位捐贈者 5 克，8 名男性和 2 名女性，年齡介於 33 至 75 歲之間）製備。按照標準程序 [22] 測定了 P450 含量。最終微粒體制劑中的總蛋白質含量是使用 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) 的 Pierce BCA 蛋白質定量試劑盒測定。P450 的測定濃度為 11.3 μM (40.5 毫克微粒蛋白質/毫升)，在正常範圍內，特定的 P450 含量為每毫克蛋白質 0.2-0.5 nmol [22]。同時也會從 Corning Life Sciences (Tewksbury, MA) 購買混合性別的人肝微粒體（來自 150 名捐贈者）。

3. 實驗步驟

3.1. 對 atRA 和 ddRA 進行催化測試

使用人類肝微粒體對 atRA 和 ddRA 進行催化測試，以研究 CYP26 家族酶（以及其他肝 P450 酶）對它們的代謝。在琥珀色瓶中進行孵育，以避免光降解，並在 37°C 的振蕩水浴中進行。進行初步孵育以評估 atRA 和 ddRA 的穩定性，孵育液中包含 150 位捐贈者混合的人類肝微粒體，0.2 mg 微粒蛋白質和 2 mM NADPH，100 mM 磷酸鉀緩衝液（pH 7.4）（最終反應體積為 500 μL ）。孵育混合物在 4°C 的冰上保存，並在 37°C 孵育 5 分鐘，然後用 5 μM 的 atRA 或 ddRA（庫存物質在 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 中溶解，最終 $\leq 1\%$ (v/v)）開始實驗。也在存在 10 mM 的 ketoconazole（一般的 P450 抑制劑）或 R115866（一種 CYP26 特異

性抑制劑[23,24])的情況下進行反應。同時也完成沒有 NADPH 或沒有維生素 A1(C₂H₅OH 載體)的對照孵育。30 分鐘後,反應用含 20 mM 丁苯醌甲醚(BHT)的叔丁基甲基醚(TBME) (以防止化學氧化)混合物(1 mL)進行停止,並放置在冰上。通過離心(3,000 × g, 5 分鐘)分離層後,從上層中取出一個小體積(0.7 mL)並轉移到 1.5 mL 琥珀色瓶中。樣品在氮氣流中乾燥,然後用 50 μL C₂H₅OH 和 50 μL H₂O (50% (v/v) C₂H₅OH, 最終體積)重新懸浮,以進行超高效液相色譜(UPLC)-紫外(UV)分析(20 μL 的小體積)。

後續的追蹤研究使用類似的反應條件來評估維生素 A1 的代謝速率和代謝物的生成率,包括 10 個捐贈者混合的人類肝微粒體(1 mg 蛋白質/mL)、10 mM 氯化鎂和一個 NADPH 再生系統(20 μg/mL 酵母葡萄糖 6-磷酸去氫酶、20 mM 葡萄糖 6-磷酸、2 mM NADP⁺)。添加 NADP⁺開始反應,反應在 0、10、20、30、40、50 或 60 分鐘後終止,並與含有 20 mM BHT 的 2 mL TBME 混合並進一步處理。在每種情況下注射 15 μL 樣品進行 UPLC-UV 分析。每個時間點的分析均進行了三次。

樣品的可能 ddRA 代謝物鑑定,使用類似於上述動力學研究的反應條件,但增加了 ddRA 濃度(100 μM),使用較高的人類肝微粒體濃度(2 mg 蛋白質/mL)和較長的單一時間點(60 分鐘)以增加潛在的代謝產物生成。本研究使用了四種條件:(一)標準反應、(二)無 NADPH 生成系統的陰性對照組、(三)加入 10 μM ketoconazole 的微粒體反應對照組、以及(四)除微粒體外,所有反應成分均添加的假手術組。樣品準備方法遵循上述程序。

3.2. 使用還原劑 NaBH₄ 和 NaBD₄ 處理 ddRA 反應

在 ddRA 孵育樣品進行代謝物鑑定的程序後，加入 0.5 mL 的乙醇溶液 NaBH_4 或 NaBD_4 (1 mg/mL)，在暗處孵育 60 分鐘。還原後，用 N_2 氣流去除 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ，接著加入 0.5 mL 含有 5 μL 濃縮 HCl (37%w / w, 11.6 M) 的 H_2O 來消耗過量的硼氫化物。然後將水相溶液與含有 20 μM BHT 的 2 mL TBME 進行渦旋混合。有機相被濃縮並乾燥（在 N_2 氣流下），並用 100 μL 50%水合乙醇 (v/v) 溶解後進行 UPLC-UV 和 UPLC-MS 分析。

3.3. UPLC-UV 和 UPLC-MS 分析

UPLC-UV 分析使用 Waters Acquity UPLC (Milford, MA) 連接到光電二極管陣列檢測器，並以 355 nm (atRA) 或 370 nm (ddRA) 設置。色譜分離在八烷基矽烷 (C18) 柱 (Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm) 上進行，並保持在 40°C。最初的孵育試驗用於評估 atRA 和 ddRA 的穩定性，其使用的 UPLC 分離方式已在先前的文獻中描述 [5]。隨後用於確定維生素 A 醛代謝速率和代謝物鑒定的研究，使用以下特定方法的溶劑 A (0.1% HCO_2H 在 H_2O 中) 和溶劑 B (0.1% HCO_2H 在 CH_3CN 中) (均體積百分比)。為了評估 atRA 消耗和 4-OH atRA 形成，流動相組成和洗脫流速的梯度程序 (A) 如下 (均為體積百分比): 0.4 mL/分鐘的 80% A (0-0.1 分鐘); 0.4 mL/分鐘的 80%-25% A (0.1-2 分鐘); 0.4-0.5 mL/分鐘的 25% A (2-2.5 分鐘); 0.5 mL/分鐘的 25% A (2.5-6 分鐘); 0.5-0.4 mL/分鐘的 25%-80% A (6-6.5 分鐘)，並且最終組成在 1.5 分鐘內維持以重新平衡 (總時間 8 分鐘)。4-OH atRA 和 atRA 的滯留時間分別為 2.6 和 5.4 分鐘。對於 ddRA 孵育，梯度程序 (B) 如下，流速為 0.4 mL/分鐘: 80% A (0-0.1 分鐘); 80%-20% A (0.1-15 分鐘); 20%-80% A (15-15.1 分鐘)，

最終組成保持 2.9 分鐘（總計 18 分鐘）。 ddRA（峰 10）及其衍生物（峰 1 至 9）的滯留時間列於表 1 和圖 5 中。

對於 UPLC-MS 分析，取 15 μ L 樣品注入 UPLC 柱中，並連接 Thermo LTQ-Orbitrap XL 高分辨率質譜儀，該儀器裝有一個大氣壓化學電離（APCI）接口。質譜儀以 60,000 的分辨率在正離子模式下進行全掃描（掃描範圍 100-1,000 m/z）分析。APCI 條件與先前描述的相同[4]。 UPLC 分離使用上述（程序 B）進行。

4. 結果

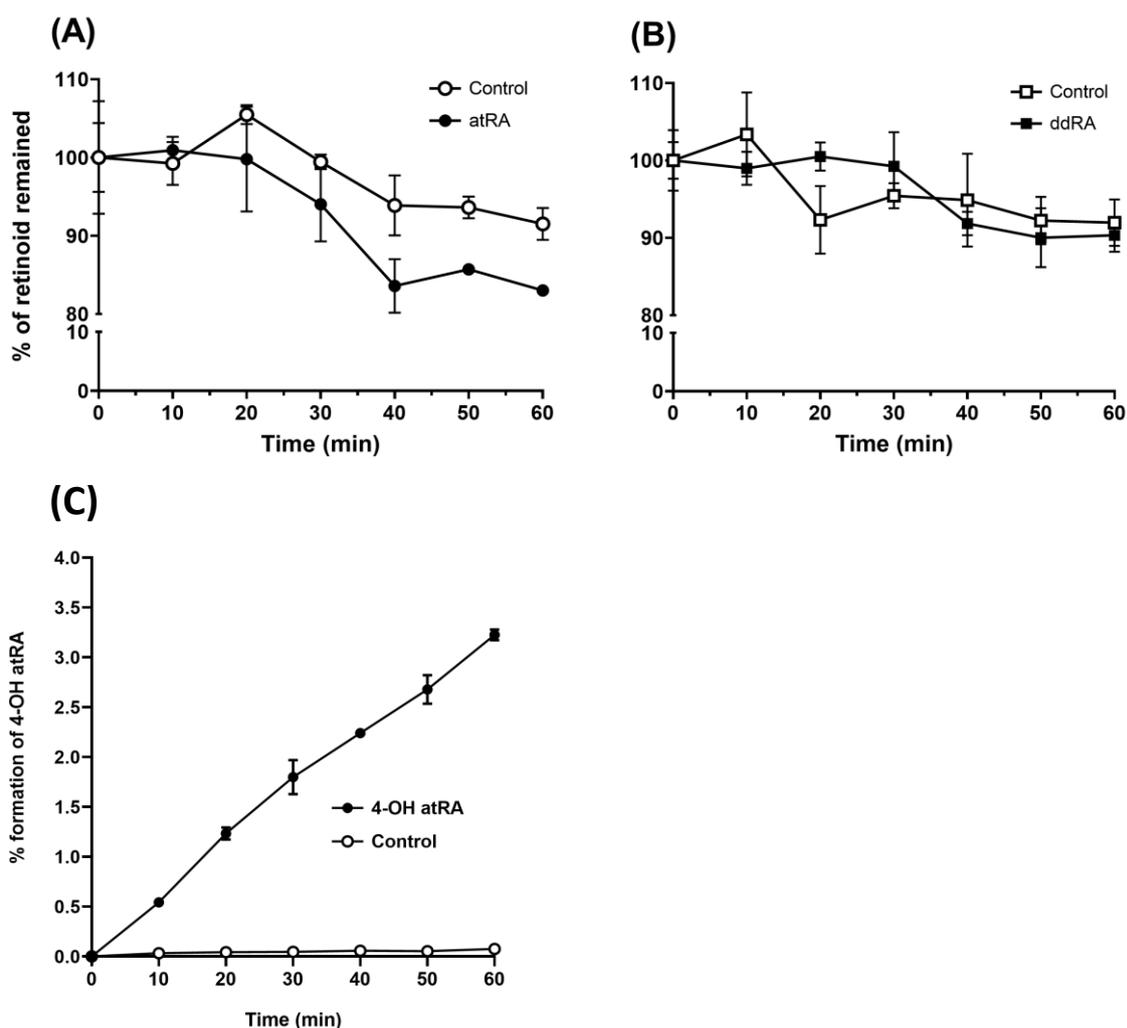
4.1. P450 酵素在人類肝微粒體中容易代謝 atRA 但不容易代謝 ddRA

在人類肝微粒體中評估 P450 酵素將 atRA 和 ddRA 代謝成 4-OH atRA 和 4-oxo atRA 的能力。人類肝微粒體含有許多 P450 酵素，包括負責 atRA 在體內分解的 CYP26 家族酵素。與 atRA 的孵育產生了三個主要的高效液相色譜峰，其中兩個通過與標準品的同時出峰時間，證明是 4-OH 和 4-oxo atRA。與 ddRA 的孵育結果顯示，沒有 P450 介導的代謝物，這可以通過與沒有 NADPH 對照組的比較而得出。評估 CYP26 家族酵素是否介導所有觀察到的 P450 代謝，也進行了與 ketoconazole（一種相對普遍的 P450 抑制劑）和 R115866（一種 CYP26 特異性抑制劑[23,24]）的反應。與 ketoconazole 和 R115866 的孵育都明顯抑制了 atRA 的代謝。與兩種抑制劑孵育的代謝物峰面積的相似性表明，此代謝主要是由 CYP26 介導的。

4.2. 人類肝微粒體中 atRA 但非 ddRA 代謝存在時間依賴性

在人類肝微粒體中，atRA 的降解率約為對照組（未添加 NADPH 生成系統）的 9%

(下圖 A)。4-OH atRA 的生成量與孵育時間 (0-60 分鐘) 呈線性關係 (下圖 C)。大部分 atRA 的消失可以歸因於已知的兩種氧化產物，4-OH atRA 和 4-oxo atRA (濃度未測量)，以及在環境中的一些分解或不穩定性 (例如光)。在 60 分鐘後，ddRA 的 NADPH 依賴性降解程度較小 (約 1.6%) (下圖 B)，這與前述的初步發現一致。



4.3. 確認人體肝微粒體中 ddRA 缺乏代謝物形成

為了辨認可能在含有 NADPH 反應中形成的微粒體中 ddRA 的潛在少量代謝物，分離化合物的梯度沖提時間被延長到 18 分鐘。四種不同 ddRA 處理組的重疊色譜圖顯示在圖 5A 中。在 t_R 3-15 分鐘保留時間範圍內觀察到的幾乎所有峰都與只包含 ddRA 的對照組

(沒有微粒體) 完全重疊。作為潛在的反應產物，選擇了九個可疑峰和 ddRA (峰 1 到 10) 進行結構鑑定 (參考下圖)。除了酵素活化反應外，無 NADPH 或添加 ketoconazole 的研究組對於 P450 依賴性活性作為控制組。與對照組相比，在人體肝微粒體中孵育後未發現新生成的峰。此外，在缺少所需的 P450 輔因子 NADPH 或添加 ketoconazole 的情況下，色譜圖中沒有任何波峰消失。

60 分鐘的 ddRA 與微粒體和 NADPH 孵育樣品被加入 NaBH₄、NaBD₄ 或 C₂H₅OH (對照組) 進行還原處理。使用重疊比較，UPLC-UV 色譜圖顯示了三組之間的差異，如下圖 B 所示。選擇了十個目標化合物(峰 1 到峰 10)，列出了它們處理前後的精確質量([M+H]⁺，m/z) 和最大吸收值(λ_{max})的數據，如表 1 所示。此外，還包括 atRA、4-OH atRA 和 4-oxo atRA 的參數。

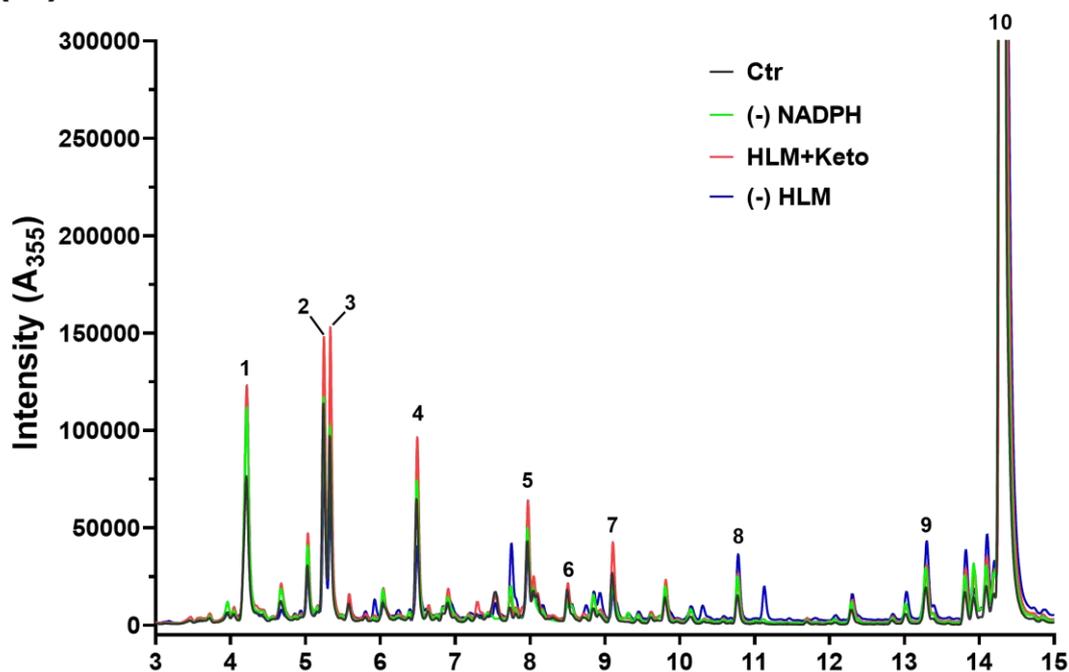
在峰 1 至 10 中，只有峰 4 和峰 6 在 NaBH₄ 和 NaBD₄ 處理後消失，表示這兩個化合物應具有羰基基團。我們使用 NaBH₄ 和 NaBD₄ 處理來確定任何潛在的羰基基團，因為僅使用 NaBH₄ 還原可能會產生一種醇，在 APCI 離子化過程中失去一個水分子並且不會有所不同。從 NaBD₄ 中引入的一個氘將使 m/z 變化 1 amu。由於峰 4 的 λ_{max} 為 362 nm，其觀察到的 m/z [M+H]⁺ 為 331.1899，因此我們推測這種未知化合物具有一個共軛的雙鍵並且與 ddRA 具有相似的 λ_{max} (λ_{max} 370 nm)。峰 4 化合物上的 C3-羥基和 C4-氧代基可能與上述結構特徵吻合。經過 NaBH₄ 處理後，C4-氧代基將被還原為 C4-羥基並變得更親水 (t_R 更短)，分子量將變為 333，λ_{max} 將下降到約 350 nm (與 4-OH atRA 類似，缺乏共軛雙鍵，λ_{max} 352 nm)。此外，它應在 APCI 界面中失去一個水分子 (333-18 =

315)。因此，在 NaBH₄ 和 NaBD₄ 處理組中，峰 2 和峰 3 (λ_{max} 分別為 350 和 352 nm；兩峰的 [M+H]⁺ 均為 313 和 315) 的強度增加可能是此過程的結果。

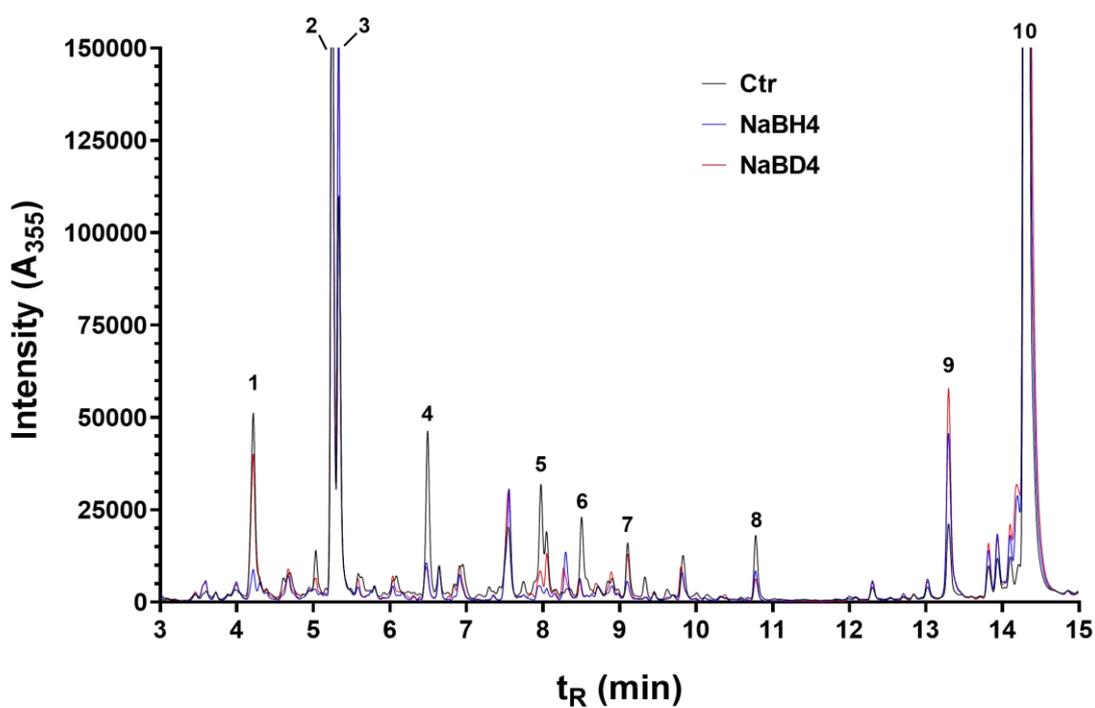
第六個峰的化合物具有獨特的 UV 吸收 (λ_{max} 399 nm)，比 ddRA (λ_{max} 370 nm) 的紅位移更明顯，這表明其結構具有比 ddRA 更多的共軛雙鍵。如上所述，該峰化合物應為酮衍生物，因為在樣品經過 NaBH₄ 或 NaBD₄ 處理後消失了。此外，峰 6 化合物的主要 m/z 值為 313.1799。因此，我們推測該化合物在 C2 或 C4 位置含有一個羰基基團 (表 1)。

在經過 NaBH₄ 處理後，峰 5 和峰 7 消失了，但未經 NaBD₄ 處理時則沒有消失，原因尚不清楚。但這兩個峰的 λ_{max} 值與 ddRA 非常接近，且都有 [M+H]⁺ 在 m/z 315。此外，峰 7 還有一個 [M+H]⁺ 在 m/z 297，可能是一種帶有 m/z 314 的化合物失去了一個水分子的結果。我們推測，這兩個峰的化合物結構可能在環己烷環 (C2-C4) 上含有 3,4-雙鍵和羥基。由於 16-OH 和 18-OH atRA 是 atRA 的兩種次要代謝產物，因此 16-OH ddRA 和 18-OH ddRA 也是峰 5 和峰 7 的可能候選物，但目前尚不清楚它們是否是代謝物，在 ddRA 本身中也存在這些產物，很可能是自氧化產物。考慮化合物極性 (HPLC 上的滯留時間 t_R)、分子量和 λ_{max}，沒有直接證據表示峰 1、8 和 9 是與 ddRA 氧化相關的化合物，它們可能是從製造或儲存中產生的 ddRA 雜質。

(A)



(B)



5. 討論

本研究評估了人類肝微粒體中的 P450 酶對 ddRA 的氧化能力。肝微粒體被作為實驗

對象，因為它們含有主要負責 atRA 4-氧化的 CYP26 家族酶以及其他被確認能夠代謝 atRA 的 P450 酶[25,26]。通過 atRA 的實驗驗證了人類肝微粒體中的 P450 媒介的維生素 A 醛代謝作用。在 CYP26 特異性抑制劑 R115866 的代謝反應中，4-OH atRA 和 4-oxo atRA 的形成主要是由 CYP26 家族媒介的。初步或進一步分析中未發現任何 ddRA 的 NADPH 依賴性代謝產物。雖然這些分析主要集中在微粒體色素 P450 酶上，因為它們已經確認參與維生素 A1 代謝，但其他酶也可能參與 ddRA 的代謝。包含在無肝微粒體的對照條件下的實驗表明微粒體色素 P450 酶之外的微粒體酶不會代謝 ddRA。鑑於使用的是微粒體分離物，未評估粒線體和細胞質酶分解 ddRA 的潛在可能。由於 3,4-去氫維生素 A1 類化合物特別存在於皮膚中，肝微粒體不是最具生理相關性的系統（即相較於使用基於皮膚細胞的系統）來研究潛在的 ddRA 代謝作用，但皮膚的亞細胞分離非常困難[4]，因此皮膚特定酵素在 ddRA 代謝中的可能性無法完全排除，儘管大多數在皮膚中表達的 CYP 酶（除了 P450 27C1[4]）也在肝臟中表達[27]。據我們所知，這是第一個直接評估 ddRA 代謝作用的研究。以前的研究顯示 P450 26C1 無法代謝 3,4-去氫維生素 A1[28]，但 P450 26C1 或其他 CYP26 家族酵素代謝 ddRA 的潛力尚未確定。

本研究檢測到的 ddRA 自動氧化產物的普遍存在強調了在表徵維生素 A1 代謝產物時必須小心謹慎。包括適當的對照允許區分酵素媒介的產物形成和自動氧化產物和雜質。本研究的結果表示，3,4-去氫維生素 A1 類化合物不像其相應的全反式維生素 A1 類化合物一樣被代謝。ddRA 對代謝的抵抗力可能代表了皮膚維持細胞內某種活性維生素 A1 水平的一種機制。

6. 結論

本研究的結果表明，3,4-去氫維生素 A1 類化合物不像其相應的全反式維生素 A1 類化合物一樣被代謝，而 ddRA 對代謝的抵抗力可能代表了皮膚維持細胞內某種活性維生素 A1 水平的一種機制。本研究旨在探討 ddRA 是否像 atRA 一樣容易被 CYP 酶降解。即使在使用提高 ddRA 和人類肝微粒蛋白濃度的長時間孵育中，也未檢測到 ddRA 的任何 NADPH 依賴性代謝物。如我們所預期，在人類肝微粒體中觀察到了 atRA 的 P450 介導代謝物。而缺乏對 ddRA 的 P450 介導代謝，表示 3,4-脫氫維生素 A1 在體內具有一個未曾描述的功能。3,4-脫氫維生素 A1 可以作為細胞內更穩定的維生素 A1 來源，即使不暴露於紫外線下也是如此。

7. 參考文獻

- [1] A. Vahlquist, The identification of dehydroretinol (vitamin A2) in human skin, *Experientia*. 36 (1980) 317 – 318. <https://doi.org/10.1007/BF01952299>.
- [2] A. Vahlquist, J.B. Lee, G. Michaëlsson, O. Rollman, Vitamin A in human skin: II Concentrations of carotene, retinol and dehydroretinol in various components of normal skin, *J. Invest. Dermatol.* 79 (1982) 94 – 97. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12500033>.
- [3] V.M. Kramlinger, L.D. Nagy, R. Fujiwara, K.M. Johnson, T.T.N. Phan, Y. Xiao, J.M. Enright, M.B. Toomey, J.C. Corbo, F.P. Guengerich, Human cytochrome P450 27C1 catalyzes 3,4-desaturation of retinoids, *FEBS Lett.* 590 (2016) 1304 – 1312. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12167>.
- [4] K.M. Johnson, T.T.N. Phan, M.E. Albertolle, F.P. Guengerich, Human mitochondrial cytochrome P450 27C1 is localized in skin and preferentially desaturates trans-retinol to 3,4-dehydroretinol, *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 13672 – 13687. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.773937>.
- [5] S.M. Glass, F.P. Guengerich, Cellular retinoid-binding proteins transfer retinoids to human cytochrome P450 27C1 for desaturation, *J. Biol. Chem.* 297 (2021) 101142. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101142>.

- [6] H. Törmä, D. Asselineau, E. Andersson, B. Martin, P. Reiniche, P. Chambon, B. Shroot, M. Darmon, A. Vahlquist, Biologic activities of retinoic acid and 3,4-didehydroretinoic acid in human keratinocytes are similar and correlate with receptor affinities and transactivation properties, *J. Invest. Dermatol.* 102 (1994) 49 – 54.
<https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12371731>.
- [7] B.P. Sani, P.R. Venepally, A.A. Levin, Didehydroretinoic acid: retinoid receptor-mediated transcriptional activation and binding properties, *Biochem. Pharmacol.* 53 (1997) 1049 – 1053.
[https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(97\)00076-2](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(97)00076-2).
- [8] G. Allenby, M.T. Bocquel, M. Saunders, S. Kazmer, J. Speck, M. Rosenberger, A. Lovey, P. Kastner, J.F. Grippo, P. Chambon, Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 30 – 34.
- [9] J.I. Tafrova, A. Pinkas-Sarafova, E. Stolarzewicz, K.A. Parker, M. Simon, UVA/B exposure promotes the biosynthesis of dehydroretinol in cultured human keratinocytes, *Mol. Cell. Biochem.* 364 (2012) 351 – 361.
<https://doi.org/10.1007/s11010-012-1237-7>.
- [10] H. Törmä, A. Bergström, G. Ghiasifarahani, B. Berne, The effect of two endogenous retinoids on the mRNA expression profile in human primary keratinocytes, focusing on genes causing autosomal recessive congenital ichthyosis, *Arch. Dermatol. Res.* 306 (2014) 739 – 747.
<https://doi.org/10.1007/s00403-014-1476-4>.
- [11] B. Berne, M. Nilsson, A. Vahlquist, UV irradiation and cutaneous vitamin A: an experimental study in rabbit and human skin, *J. Invest. Dermatol.* 83 (1984) 401 – 404. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12273464>.
- [12] E. Andersson, I. Rosdahl, H. Törmä, A. Vahlquist, Ultraviolet irradiation depletes cellular retinol and alters the metabolism of retinoic acid in cultured human keratinocytes and melanocytes, *Melanoma Res.* 9 (1999) 339 – 346. <https://doi.org/10.1097/00008390-199908000-00001>.
- [13] M.A. Kane, J.L. Napoli, Quantification of endogenous retinoids, *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ. 652 (2010) 1 – 54.
https://doi.org/10.1007/978-1-60327-325-1_1.
- [14] T.C. Roos, F.K. Jugert, H.F. Merk, D.R. Bickers, Retinoid metabolism in the skin, *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 315 – 333.
- [15] N. Isoherranen, G. Zhong, Biochemical and physiological importance of the CYP26 retinoic acid hydroxylases, *Pharmacol. Ther.* 204 (2019) 107400.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107400>.

- [16] N.Y. Kedishvili, Retinoic acid synthesis and degradation, *Subcell. Biochem.* 81 (2016) 127 – 161.
https://doi.org/10.1007/978-94-024-0945-1_5.
- [17] R. Shinkyō, L. Xu, K.A. Tallman, Q. Cheng, N.A. Porter, F.P. Guengerich, Conversion of 7-dehydrocholesterol to 7-ketocholesterol is catalyzed by human cytochrome P450 7A1 and occurs by direct oxidation without an epoxide Intermediate, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 33021 – 33028.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.282434>.
- [18] F.P. Guengerich, Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 611 – 650. <https://doi.org/10.1021/tx0002583>.
- [19] R.K. Randolph, M. Simon, All-trans-retinoic acid regulates retinol and 3,4-didehydroretinol metabolism in cultured human epidermal keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 106 (1996) 168 – 175.
<https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12329900>.
- [20] A.B. Barua, H.C. Furr, Properties of Retinoids, in: C.P.F. Redfern (Ed.), *Retin. Protoc.*, Humana Press, Totowa, NJ, 1998: pp. 3 – 28.
<https://doi.org/10.1385/0-89603-438-0:3>.
- [21] A.W. Hayes, C.L. Kruger, eds., *Hayes' Principles and Methods of Toxicology*, 6th ed., CRC Press, London, 2015.
<https://doi.org/10.1201/b17359>.
- [22] F.P. Guengerich, M.V. Martin, C.D. Sohl, Q. Cheng, Measurement of cytochrome P450 and NADPH – cytochrome P450 reductase, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 1245 – 1251. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.121>.
- [23] P. Stoppie, M. Borgers, P. Borghgraef, L. Dillen, J. Goossens, G. Sanz, H. Szel, C.V. Hove, G.V. Nyen, G. Nobels, H.V. Bossche, M. Venet, G. Willemsens, J.V. Wauwe, R115866 inhibits all-trans-retinoic acid metabolism and exerts retinoidal effects in rodents, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293 (2000) 304 – 312.
- [24] C.H. Nelson, B.R. Buttrick, N. Isoherranen, Therapeutic potential of the inhibition of the retinoic acid hydroxylases CYP26A1 and CYP26B1 by xenobiotics, *Curr. Top. Med. Chem.* 13 (2013) 1402 – 1428.
- [25] K. Shrivastava, S.T. Mindaye, M. Getie-Kehtie, M.A. Alterman, Mass spectrometry-based proteomic analysis of human liver cytochrome(s) P450, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 267 (2013) 125 – 136.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.12.008>.
- [26] J.E. Thatcher, A. Zelter, N. Isoherranen, The relative importance of CYP26A1 in hepatic clearance of all-trans retinoic acid, *Biochem.*

- Pharmacol. 80 (2010) 903 – 912.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.05.023>.
- [27] N. Ahmad, H. Mukhtar, Cytochrome P450: a target for drug development for skin diseases, *J. Invest. Dermatol.* 123 (2004) 417 – 425.
<https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23307.x>.
- [28] G. Zhong, D. Ortiz, A. Zelter, A. Nath, N. Isoherranen, CYP26C1 is a hydroxylase of multiple active retinoids and interacts with cellular retinoic acid binding proteins, *Mol. Pharmacol.* 93 (2018) 489 – 503.
<https://doi.org/10.1124/mol.117.111039>.

與 Dr. Guengerich 合照



心得及建議事項

心得：范德堡大學(Vanderbilt University, VU)位於田納西州第二大城納許維爾，其教學醫院同時也是納許維爾首屈一指的醫學中心，該校標榜頂尖醫學研究及人文關懷，在此次短期進修的半年期間，有幸得以近窺該校在基礎及臨床研究的卓越成績，有別於國內藥學教育的規劃及建置，VU的研究所僅建置博士學程，由於該校評比為全美排名前百大頂尖大學，因此學生多半具有相當高的素質及研究能力，並能藉由良好且便利的教育及研究資源，包含：圖書館資料檢索能力、充沛及多樣化的貴重儀器中心、實驗消耗品專責單位以及豐沛研究預算，而將各個實驗室的研發能力發揮到頂點。然而，該校繁瑣的行政程序及多重的管理分層卻是影響工作效率的一大缺點，在死板及高度分工後所出現的「怠速」情形，則是最令人無法苟同的現象。

在教學方面，最令人印象深刻的則是該校大學及研究所教育的教學品質，由於質精且前端的研究發展，因此課程的設計高度結合各實驗室的研究領域及成果，並非侷限於教科書的教條式表述，因此可讓授課學生有更深入的體會，並能將課堂中的學習成果應用於實際研究課題。

在生活上的體驗則是：田納西是美國創國的元老 13 州之一，因此也是相對保守的州郡，當地華人比例不高，所見東方面孔多半是進修學子，而納許維爾是美國目前都市發展速度前十大的城市，此處生活開銷極高，平日膳食必須自行烹飪及料理，因此日常一切幾乎必須完全融入西方的生活模式，對於文化及語文確實達到良好的學習機會。

建議事項：

- 一、現今美國各大城市的生活開銷太過高昂，建議重新審定各城市物價水平以作為生活費核給依據。
- 二、個人有感短期進修過程中，最難掌控是住宿需求搭配合理房屋租金，建議可蒐整各進修地點租房資訊，以供後續國內學者參考運用。