

編號：CCMP95-TP-003

已上市中藥對體內肝臟酵素活性之影響 研究

胡幼圃

國防醫學院教研組

摘 要

研究目的：

為評估上市藥品(方劑)對民眾肝臟代謝機能之影響，本計畫利用體外(人類肝微粒體)的模式分別建立藥物對各種肝臟代謝功能影響的測試系統，並利用這些測試系統去評估常用中藥濃縮製劑對肝臟代謝功能的影響。

研究方法：

本計畫係以人的肝臟微粒體酵素做為評估代謝酵素活性的篩選平台，評估影響的代謝酵素主要有屬於 Phase I 代謝酵素的 CYP3A4, CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 與 Phase II 代謝酵素 UGT2B7，上述酵素均為肝臟含量較多且負責代謝藥物種類較多的酵素。適合 CYP2D6、CYP3A4、CYP1A2、CYP2C9 及 UGT2B7 活性測定之探針藥物分別選定為 dextromethorphan, testosterone, ethoxyresorufin, tolbutamide 及 morphine，這些探針藥物在適當的體外環境下，經由相對應的酵素代謝後分別產生的代謝物為 dextrophan, 6- β -hydroxytestosterone, resorufin, 4-hydroxytolbutamide 及 morphine-3-glucuronide；這些代謝物的產生量經由本實驗室發展出的 HPLC/MS/MS 方法分析後，即可測試出各代謝酵素的活性。本篩檢平台最後以健保使用量最大的前三十名濃縮中藥(龍膽瀉肝湯、加味逍遙散、疏經活血湯、...等等)並以國內前三大中藥廠製劑為測試對象，這些濃縮中藥依一般臨床使用的劑量(視不同藥而定，約 0.4 克至 2 克)，先以擬胃液(依 USPXXII 之規格配製)以 100rpm 在 37°C 下，振搖 2 小時，再以 NaOH 將 pH 值調至 7.4(模擬腸液)繼續振搖 2 小時，最後離心，再取上清液加入酵素活性測試系統，在與未加入濃縮中藥萃取液之控制組比較，即可正確判斷濃縮中藥所含成份對於酵素活性的影響性，最後得到對肝臟酵素活性影響最顯著者，再以大白鼠單劑量及多劑量體內試驗評估對西藥藥動學之實際影響，同時也以肝臟切片方式觀察此中藥對肝臟的

影響。

結果與討論：

1. 本計畫挑選 30 種常用的濃縮中藥來做測試，結果即發現至少有一半以上會對人體肝臟代謝酶素有顯著的影響，比例非常高，因此，建議應再繼續大量且快速地篩檢已上市的中藥製劑，以進一步評估上市中藥用藥的風險。
2. 龍膽瀉肝湯經本計畫之人類肝微粒體體外試驗及大白鼠體內藥動試驗、病理切片觀察，發現在併服 nalbuphine 後會對大白鼠肝有所損傷 HAI score 顯著上升 (1.6 ± 0.89 上升至 4.40 ± 2.07 及 2.67 ± 0.52)，代謝酶素活性也顯著下降，nalbuphine 在體內的吸收量(AUC_{total})大幅增加 25 至 40 倍，體內最高濃度(C_{max})也大幅升高 12 至 15 倍，排除半衰期也增長 3 至 6 倍，已明顯產生藥物-藥物交互作用，未來應再進一步以臨床試驗來確認。
3. 未來中藥新藥上市前，也應測試其對主要肝臟代謝酶素的影響，以進一步評估其上市後用藥的風險。

關鍵詞：肝臟代謝酶素、體外評估系統、濃縮中藥

Number: CCMP95-TP-003

Chinese Medicines Affect the Activity of Hepatic Metabolic Enzymes

Oliver Yoa-Pu Hu, Ph.D.

Research, Development & Continuing Education,
National Defense Medical Center

ABSTRACT

Aims:

To construct the evaluation system to evaluate the metabolic toxicity for Chinese medicine. This project is help to clarify the safety of Chinese medicine and then help the people keeping from hepatic injury when using Chinese medicines and synthetic agents.

Methods:

Simultaneously evaluation system of 5 major hepatic enzymes, CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4, CYP2C9 and UGT2B7, were constructed *in-vitroly* with human liver microsome and LC/MS/MS system.30 marketed Chinese medicines manufactured by first three companies in Taiwan were evaluated for their affects on major hepatic enzymes with the above-mentioned system. After these evaluations, the most potent Chinese medicine was chosen to evaluate its drug-drug interaction with the single dose and multiple dose pharmacokinetic study in SD rats. Pathological observations of liver slices were also conducted to confirm the effects of target Chinese medicine to liver tissues.

Results:

A HPLC/MS/MS system has been established to simultaneously analyzed 5 metabolites of probe substrates of CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4, CYP2C9 and UGT2B7. Basing on this cocktail CYP450 and UGT *in vitro* metabolic system, we have found that 5 of 10 tested Chinese medicines significantly affected the activity of above-mentioned CYP450 or UGT enzymes.

Conclusions:

High ratio of tested Chinese medicines significantly affected the activity of above-mentioned CYP450 or UGT enzymes. So, Large scale screening should be conducted for all of the marketing Chinese medicines. And, all of new Chinese medicines should be evaluated by these systems to confirm their possibility of drug-drug interaction before enter the markets.

Keywords: CYP450, UGT, HPLC/MS/MS

壹、前言

藥物對肝臟產生毒性主要會造成肝臟的血液量的改變及肝細胞本身的損傷，而這些改變及損傷所造成的影響最主要的即是肝臟代謝功能的變化。而肝臟代謝功能的變化即直接可能造成毒性物質的累積、藥物-藥物交互作用的產生等等嚴重影響人體健康的後果，因此，無論中藥或西藥均應特別注意其對肝臟代謝功能之影響。

中藥於國人已有數千年的使用經驗，一般民眾無論是在養生或保健上均有使用的需求及習慣，因此，中西藥併用的機會實較西方社會高出許多。而中藥不同於西藥之處即在於其成份之複雜、作用之廣泛，即便與已有清楚藥物資訊的上市藥物併用亦難避免不良交互作用的發生，而且中藥對肝功能的影響測試未如西藥一樣已成例行要求的試驗。

腸肝的藥物代謝效應常常在口服吸收中扮演非常重要的角色，一個很顯著的例子即為葡萄柚汁反映在小腸及肝的藥物代謝酵素在人的體內的實驗，這個研究包含以葡萄柚汁當作一個選擇性小腸的 CYP3A 同功酶抑制劑¹⁻⁶，而使 felodipine 有較高的口服生體利用率。然而，在葡萄柚汁中負責酵素抑制的活性成份還沒有被真正的確認。這個例子證明：一杯葡萄柚汁就很有可能增加口服利用率，卻使我們更加憂心：國人常用之中藥亦非常可能傷害肝臟及影響人體代謝藥物的酵素進而與上市西藥產生嚴重的交互作用。因此，基於此想法，本計畫的目標即為篩檢、評估以 CYP2D6、CYP3A4、CYP2C9、CYP1A2 及 UGT2B7 代謝活性影響之中藥為指標，進一步評估中藥之毒性。

Cytochrome P450 (CYP450) 為藥物體內代謝以進行氧化還原反應之重要酵素，CYP450 區分為多種亞型(subfamily)，廣泛分佈在肝臟、腸道及其他組織中⁷，以進行 phase I reaction 而利於代謝物排出體外，各種亞型及次亞型一般依據胺基酸序列相似度予以區分⁸，因此其酵素命名橫跨生物界各物種之間，包含動物、植物及微生物，Cytochrome P450 中文譯名為『細胞色素 P450』，Cytochrome 乃指一群含三價鐵離子並附著於細胞內質網的酵素蛋白質，此含鐵蛋白結構及功能類似血紅素(hemoglobin)可負責電子轉移及能量釋放，一般稱之為 heme-group 或 prosthetic group，CYP450 則表示當一氧化碳結合於此酵素後，經可見光分光光譜儀檢測⁹，在波長 450 nm 上具有最大吸光係數，因此定義為 CYP450。

藥物經由各種給藥途徑吸收進入體內後，遵循動力學模式接續進行代謝及排除過程，藥物在體內的代謝方式主要分為一相反應(phase I reaction) 及二相反應(phase II reaction)，兩種機制皆可形成親水性代謝物，以利藥物排出體外。

混合功能單氧化酶(mixed function monooxygenase)是負責體內 phase I reaction 的主要酵素，而 CYP450 則是屬於此型酵素，也就是經由 CYP450, CYP450 reductase, cytochrome b5 等群組蛋白負責藥物的氧化還原及水解反應，而 phase II reaction 則主要為接合反應 (conjugation)，可大致區分為六類，其中以 glucuronidation、sulfation 及 glutathione conjugation 三種最為常見。

Glucuronidation 是體內最主要的 phase II reaction，具有較高的催化容量 (catalytic capacity)，意即當受質濃度增加時，代謝過程仍可維持一階次酵素動力學，glucuronidation 的代謝過程是由醣蛋白酵素 (UDP-glucuronosyltransferase, UGT) 催化受質接上 glucuronic acid 以形成親水性代謝物，而此 glucuronic acid 則來自於一高能量中間體 UDP-glucuronic acid (UDPGA)¹⁰，sulfation 及 glutathione conjugation 則屬低催化容量的 phase II reaction，當體內受質濃度偏高時，即可能產生酵素飽合現象，而遵循零階次酵素動力學。

1994 年 Shimada 及 Yamazaki 等學者，為求瞭解細胞色素的含量比及種類分佈，而分離三十位日本人及高加索人的肝臟酵素，其研究發現雖然西方人細胞色素總體含量較東方人高，但人類肝臟細胞色素的含量比例並不隨人種及性別而有顯著差異¹¹，此研究也提供後續研究者對於藥物代謝及酵素專一性一個相當完整資訊，其中值得討論的是：各型細胞色素的含量以 CYP3A 所佔比例最高約為 28.2%，這個結果同時也輔證過去一般認定體內藥物代謝主要經由 CYP3A 負責 phase I 代謝的定論，然而經由免疫化學分析法鑑定結果，CYP2C subfamily 同時也佔整體 CYP450 酵素含量的 18.2%，其含量比高居第二，僅次於 CYP3A，其次分別是 CYP1A2 (12.7%)、CYP2E1 (6.6%)、CYP2A6 (4.0%)、CYP2D6 (1.5%) 及 CYP2B6 (0.2%)；其中值得注意的是 CYP2D6 僅佔整體含量 1.5% 卻專一性的代謝約 25% 的臨床用藥，由以上分析，本計畫即選擇 Phase I 及 Phase II 中含量最多及代謝藥物最多的 CYP2D6、CYP3A4、CYP2C9、CYP1A2 及 UGT2B7 等代謝酵素來進行與中藥對其代謝活性影響的篩檢。

今日國人使用中藥藥物治療疾病有明顯增加的趨勢，常常中藥與西藥之間產生嚴重交互作用而未發覺，如：金絲桃草(St. John's wort)以常被使用於抗憂鬱症，對於輕度到中度的憂鬱症的治療效果，在德國是很多年的傳統藥草，在美國則以健康食品的膠囊或錠劑食品上市，然而已有數個臨床報告指出使用金絲桃草的萃取物會與多種的處方藥物產生重要的交互作用¹²⁻¹⁹。在相關的仿單中亦增加此項交互作用的警語，主要是經由對腸道及肝臟 CYP3A 酵素的誘導效應，如 Cyclosporin、Protease inhibitor：indinavir、nevirapine、Oral contraceptives：ethinylloestradiol、Anticoagulants、Digoxin、

Antidepressant：amitriptyline 及 Theophylline 造成藥物交互作用，使得藥物療效降低¹²⁻¹⁹。

雖然我國傳統中草藥的使用已有數千年歷史，在【神農本草經】中記載：「藥有君臣佐使，以相宜攝合和」。所謂『君臣佐使』，即制方的法度，也就是中藥處方的準則。『君』乃指制方時，根據病變的主要症候選擇針對性的藥物為主藥；『臣』是指能輔助君藥加強療效的藥物；『佐』是既輔佐君藥，又幫助解決一些其它方面問題的藥物；而『使』乃指某種可以調和諸藥作用的藥物。

而中藥含有豐富的黃酮類，生物黃酮(Bioflavonoid, Flavonoid)這一類的物質，它們多存在於許多各種蔬果中，以花椰菜、胡蘿蔔、柑橘、黃豆、蘋果、蕃茄…等含量較高，黃酮類對於體內肝臟酵素及 P-glycoprotein 的影響，已經證實具有相當影響，實值得系統性探討其與西藥並用時可能產生的影響。因此，天然的中藥，即使是科學中藥亦是由植物或藥草研磨或萃取製成的；即使是單方的科學中藥，其中絕大部分均含有許多物質或成分(而非單一成分)，目前已知已超過 6500 種 Flavonoids 經確認廣泛分佈於中藥植物中，誠如前所言，文獻已証實這些成分可經由抑制或促進負責藥物代謝的酵素，進而可能影響到其他西藥藥物吸收及代謝，以致常常造成了中西藥物交互作用(drug interaction)的可能及影響預期的藥物療效或造成毒性反應。

我們過去多年已進行了許多的中藥藥引的研究，發現許多的中藥藥引純成份的確能有效改變藥物吸收，其中包括可大幅促進 acyclovir, piroxicam 及 buprenorphine 等藥經皮吸收的中藥藥引成份；另外，也發現許多可有效抑制或促進 Phase I 代謝酵素 CYP1A、CYP3A、CYP2C9 及 Phase II 代謝酵素 UGT2B 的中藥藥引成份，而這些研究成果已成功獲得國內及國際共十項專利，另有四項專利正在申請中。此結果亦顯現出一中藥中所含的各個成分可能對各代謝酵素活性有不同程度或相反的影響，因此，對於代謝酵素影響的評估，就實際應用而言，單方應以單方製劑(成品)為主，複方亦應以複方製劑當作一整體來研究，方能真實反映出實際可能發生情形。此研究是針對臨床上常用的科學中藥進行其對人肝之 CYP2D6、CYP3A4、CYP2C9、CYP1A2 及 UGT2B7 酵素活性影響先進行體外快速且大量的評估，如在體外試驗中有發現會顯著影響之中藥製劑，則再進行動物體內試驗及人體臨床試驗，以進一步評估實際可能的影響。本計畫之完成將可替中醫藥委員會建立常用中藥對肝功能影響之基礎資料庫及未來中西藥合併使用，可能造成之影響之資料庫。

貳、材料與方法

一、儀器設備

(一)液相層析串聯式質譜儀分析系統(LC/MS/MS)：

(1)Shimadzu HPLC 液相層析系統：

Central controller x1 (SCL-10Avp)

Autosampler x1 (SIL- 10ADvp)

Pump----- x2 (LC- 10ADvp)

Column oven----- x1 (CTO-10ASvp)

(2)Column: 3 μ m, 50 \times 2.1 mm, Cyano reverse phase column (Hypersil[®])

(3)ABI API 3000 串聯式質譜儀

(二)其他：

Sorvall[®] RT7 高速離心機

二、標準品

Morphine,6 β -hydroxytestosterone, Testosterone, Morphine-3-glucuronide (購自 Cerilliant[™]); Ethoxyresorufin, Tolbutamide, Dextromethorphan, Alamethicin, Resorufin, Dextrorphan, 4-hydroxytolbutamide (購自 Sigma[®])

三、肝微粒製備

本計畫係以人的肝臟微粒體酵素做為評估代謝酵素活性的篩選平台，而此微粒體可能來源是取得肝臟手術中切除部份以下列敘述方式製備微粒體，此方法優點是不會有種族差異的顧慮，缺點是來源較不穩定，未來若需大量篩檢時可能會有問題。

組織均質是現今最常被利用於體外藥物相關研究的實驗方法，而有關藥物代謝的試驗又以肝臟均質法最常為人所利用。

在肝臟均質的製備過程中，所使用的儀器及溶液均需儲放於 4 $^{\circ}$ C 的環境中，除此之外為了避免酵素的降解，操作中的肝均質液所處環境，不論在製備或離心的過程中都不可超過 4 $^{\circ}$ C。

首先，將肝臟組織取出，並置放於 4 $^{\circ}$ C 的 1.15 % 氯化鉀溶液中，以清除組織中多餘的血液並降低其溫度以適合保存，洗滌後將肝臟瀝乾並予以秤重紀錄，並加入四倍肝重的 1.15 % 氯化鉀溶液，以高速均質機進行均質直到溶液中不再有塊狀肝組織出現為止，均質管必須先行放置碎冰中預冷，但應避免管壁結霜。

待均質完全後分裝於離心管內設定 12500 g 初步離心 20 分鐘以去除多餘的細胞外組織，離心後小心取出上層液，內含可溶性肝微粒體、肝細胞、細胞碎片、細胞核及粒腺體等胞器，實驗所需的細胞微粒體部分，可由初步

離心所得到的上層液進行超高速離心而製成：將適才所得之上層液分裝於超高速離心管，每管約 5~6 ml 並將鋁製帽蓋旋緊，設定 100,000 g 超高速離心 2 小時，離心完成後去除管內上清液，並以 1.15 % 氯化鉀溶液清洗管底之微粒體膠狀顆粒，並清除管內殘存之離心上清液，洗滌後將微粒體膠狀顆粒取下，加入與肝等重之 pH 7.4, 0.1M 磷酸緩衝液，並進行第二次均質以得到濃度為 100 % (W/W) 微粒體懸浮液。

製備完成之微粒體懸浮液，其蛋白質含量約為 25 g / per ml 肝均質液，將懸浮液儲放於 -80°C 冷凍庫，約可維持酵素活性八週而不致有影響性的改變，經由上述對於微粒體酵素之製程所製備之懸浮液，即可應用於藥物代謝之研究，實驗中所使用之微粒體酵素應盡快於時限內運用，以避免產生嚴重的誤差而錯判實驗結果。

製備流程將簡略說明於表二，在 Gibson & Skett (1994)²¹ 文獻中也具有完整而詳細的討論。

表二、微粒體酵素製備流程簡略說明表

1. 迅速取得肝臟組織並保持低溫。
2. 將組織以 1.15 % 氯化鉀溶液洗滌、瀝乾及秤重。
3. 製備 20 % (W/W) 之組織均質液。
4. 以初步離心法(12,500 g, 20 min.)取得含微粒體之上層液。
5. 以超高速離心法(100,000 g, 2 hr.)製備微粒體膠狀顆粒，並以磷酸緩衝液儲存。

四、蛋白質含量測定 (Protein content assay)

蛋白質的含量多寡關係於酵素的活性測定，也就是說不同蛋白質含量的微粒體酵素將產生不同程度的藥物代謝，因此正確的蛋白質定量對於酵素活性的測定是必需的。

蛋白質的含量測定乃依循 Lowry Method，以紫外光分光光譜儀測定吸光值對照標準品而決定蛋白質濃度，標準濃度以胎牛血清白蛋白為參考點，微粒體酵素之蛋白質濃度測定方法詳細整理於表三。

表三、微粒體酵素蛋白質含量測定說明表

1. 將微粒體酵素懸浮液以 0.85 % 氯化鈉溶液稀釋 100 倍，倘若濃度太高可提高稀釋倍數為 500 倍【過程於冰上操作】。
2. 取 0.2 ml 上述微粒體酵素稀釋液 (N=3)，空白組之微粒體酵素稀釋液則以 0.2 ml, 0.85 % 氯化鈉溶液取代。
3. 各管檢品加入 2.2 ml Biuret 試劑，混合均勻後室溫下靜置 10 分鐘。
4. 靜置後，各管檢品加入 0.1 ml Folin 試劑，混合均勻後室溫下靜置 30 分鐘。
5. 以紫外光分光光譜儀【波長=550 nm】檢測各檢品吸光值【操作過程不可超過 30 分鐘】。
6. 所得檢品吸光值對照標準品濃度，內插標準曲線即可得到檢品蛋白質濃度【標準品操作過程如下】。

胎牛血清白蛋白標準曲線

(一)取 0.5 ml 胎牛血清白蛋白溶液，以 0.85 % 氯化鈉溶液稀釋 100 倍【0.5 : 50】。

(二)自上述 stock 溶液配置一組標準濃度【N=3】如下表所列：

表四、胎牛血清蛋白標準溶液配製表

No. (N=3)	Dilute protein standard (ml)	0.85% NaCl (ml)	Protein conc.(mg/dl)
1	0	0.2	0
2	0.05	0.15	25
3	0.1	0.1	50
4	0.15	0.05	75
5	0.2	0	100

(三)後續操作過程如表三步驟 3~5。

(四)將所測得之標準品吸光值對應濃度繪製一標準曲線，以作為檢品濃度測定之標準值。

五、雞尾酒酵素活性試驗方法(5 種酵素同時測試法)

微粒體酵素製備及蛋白質濃度測定完成後，即可針對酵素 CYP2D6、CYP2C9、CYP3A4、CYP1A2 或 UGT2B7 進行活性測定以及抑制劑的篩選，而在此之前必須先建立酵素的實驗模式，找尋探針藥物(probe substrate)相關動力學參數，以決定體外試驗(*in vitro* study)的條件及反應環境。適合 CYP2D6、CYP3A4、CYP1A2、CYP2C9 及 UGT2B7 活性測定之探針藥物如表一所示。基本上需測定探針藥物及其經 CYP450 或 UGT 代謝後所產生之代謝物在微粒體溶液中之濃度。參考同時測定多種酵素活之文獻²²，肝臟微粒體酵素反應環境設定如下(總體積=0.5 ml)：

1. 0.1 M 磷酸緩衝液 pH 7.4
2. 0.5 mg 微粒體酵素蛋白
3. 2 mM MgCl₂
4. 20 mM Glucose-6-phosphate
5. 2 IU Glucose-6-phosphate dehydrogenase
6. 2 mM β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
7. 1μM Ethoxyresorufin
8. 400μM Tolbutamide
9. 20μM Dextromethorphan
10. 100μM Testosterone
11. 250μM Morphine
12. 2.1mM Uridine 5`-diphosphoglucuronic acid
13. 25μg/ml Alamethicin

實驗過程均需於冰上操作以維持 4°C 環境，首先需先將 Alamethicin、磷酸緩衝液與微粒體酵素蛋白混合靜置 15 分鐘後，再依序加入其他輔酶及 Ethoxyresorufin、Tolbutamide、Dextromethorphan、Testosterone、Morphine 等母藥，活性測試實驗的反應時間是設定在 30 分鐘，反應溫度為 37°C，反應完後以 250µl Acetonitrile 終止反應。

反應後肝微粒體所產生之 5 種代謝物的量，除以反應時間(30 分鐘)及蛋白質量即可分別代表 CYP2D6、CYP3A4、CYP2C9、CYP1A2 及 UGT2B7 酵素之活性。

表一、探針藥物、使用濃度及其代謝物

Enzyme	Probe substrate	Concentration(µM)	Metabolite
CYP3A4	Testosterone	100	6-β-hydroxy-testosterone
CYP1A2	Ethoxyresorufin	1	Resorufin
CYP2C9	Tolbutamide	1000	4-hydroxy-tolbutamide
CYP2D6	Dextromethorphan	100	Dextrophan
UGT2B7	Morphine	100	Morphine-3-glucuronide

六、分析方法

(一)微粒體懸浮液試樣前處理：

活性試驗之樣品靜置 1 分鐘後加入內部標準品(1mg/ml Gallic acid 及 200 µg/ml Corticosterone)，離心後取上層 10µL 注入 LC/MS/MS 系統進行藥物分析。

(二)HPLC/MS/MS 條件及設定

採用高效能液相層析質譜儀(Liquid Chromatography /Mass/ Mass LC/MS/MS, API 3000 triple-quadupole mass spectrometer equippe with an ionspray LC/MS interface)進行分析，層析管採用 3µm, 50 × 2.1 mm, Cyano reverse phase column (Hypersil®)，移動相採由 A 及 B 組成液 A 為 0.1% formic acid；B 為 0.1% formic acid 加上甲醇，每一分析循環移動相的組成變化如下：0-10 分鐘時為 B 由 5% 線性增加到 85%；8-10 分鐘 B 85%；10-10.5 分鐘 B 為 5%，流速設定為 250µl/min。

MS/MS 系統為 API 3000 型(Applied Biosystem Taiwan Corp., Taiwan, Taipei)使用 turbo ion spray 離子源，在正離子操作模式下，Resorufin 母離子選擇為 214 (m/z)，子離子選擇為 214 (m/z)；Dextrophan 母離子選擇為 258 (m/z)，子離子選擇為 157 (m/z)；6β-hydroxytestosterone 母離子選擇為 305 (m/z)，子離子選擇為 269 (m/z)；Morphine-3-glucuronide 母離子選擇為 462 (m/z)，子離子選擇為 286 (m/z)，在負離子操作模式下，4-hydroxytolbutamide 母離子選擇為 284 (m/z)，子離子選擇為 185 (m/z)。

七、中藥對 CYP2D6、CYP2C9、CYP3A4、CYP1A2 及 UGT2B7 活性影響 體外試驗

中藥影響酵素活性之試驗是以臨床最常用之 30 種中藥(詳見表五)，依一般臨床使用的劑量(視不同藥而定，約 0.4 克至 2 克)，先以擬胃液(依 USPXXII 之規格配製)以 100rpm 在 37°C 下，振搖 2 小時，再以 NaOH 將 pH 值調至 7.4(模擬腸液)繼續振搖 2 小時，最後離心，再取上清液加入前述建立之各種 CYP 酵素活性測試系統，在與未加入濃縮中藥萃取液之控制組比較，即可正確判斷濃縮中藥所含成份對於酵素活性的影響性。

表五、常用 30 種中藥

項次	中藥濃縮製劑	項次	中藥濃縮製劑
1	加味逍遙散	16	蒼耳散
2	疏經活血湯	17	清心蓮子飲
3	正骨紫金丹	18	小柴胡湯
4	芍藥甘草湯	19	小青龍湯
5	葛根湯	20	止嗽散
6	獨活寄生湯	21	炙甘草湯
7	龍膽瀉肝湯	22	四逆散
8	川芎茶調散	23	六味地黃丸
9	麻杏甘石湯	24	杞菊地黃丸
10	血府逐瘀湯	25	桑菊飲
11	辛夷清肺湯	26	一貫煎
12	銀翹散	27	天王補心丹
13	平胃散	28	辛夷散
14	甘露飲	29	半夏瀉心湯
15	知柏地黃丸	30	藿香正氣散

八、中藥於大白鼠體內試驗

(一)藥動試驗

在進行動物實驗之前，大鼠(SD rat)須禁食一日，實驗時首先將大鼠以 Phenobarbital 麻醉後再進行頸動脈插管手術，手術完後需等待大白鼠自手術中恢復(兩小時以上)再給予藥物。

控制組大鼠僅口服給予模式藥物 Nalbuphine 20 mg/Kg (溶於 Q 水，20 mg/mL)，實驗組大鼠另外合併服用龍膽瀉肝湯(B 廠，以擬胃液萃取其成份 60.0 g/L)，給予大鼠龍膽瀉肝湯的濃度，實驗組共分單一給藥組(Single Dose)與多重給藥組(Multiple Dose)。單一給藥組於實驗時，與模式藥合併給予大鼠服用龍膽瀉肝湯萃取液，給予的濃度為標示人體平常服用劑量(每劑 4.0 g)的 5 倍；多重給藥組所給予大鼠的劑量為人體平常服用的劑量，每日 3 次共餵食 7 日，之後於實驗前，給予大鼠模式藥物。控制組、單一劑量組及多劑量組於最後一次給藥後於 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、

8、12 及 24 小時，自大白鼠頸動脈取血 0.5 ml 並加入適量之肝素 (heparin)，以防止凝血，利用超高速離心將血漿分離後置於-80 °C 冰箱冷凍。血液檢品的處理方法是採用串連質譜儀高層液相分析儀的分析方法，探針藥物在大鼠體內隨時間的變化分析後，即可以 WinNonlin 分析探針藥物於大鼠體內的藥動學參數，亦即探針藥物於大鼠體內的吸收、分佈、代謝及排除在併服或不併服中藥製劑之後的變化即可做一比較，由此即可確認中藥製劑對肝臟酵素的實際影響。

(二)病理觀察

上述藥動試驗之大白鼠於抽血完成後，立刻以乙醚麻醉後，取出肝臟、並以福馬林浸泡固定，再以石蠟包埋、切片，再以 H&E 染色，最後由病理醫師以 Modified Histological Activity Index (Modified HAI)判讀評分，肝組織受損越嚴重，其 HAI 分數越高，分數範圍 0-20 分。

參、結果

一、濃縮中藥對 CYP2D6、CYP2C9、CYP3A4、CYP1A2 及 UGT2B7 活性影響體外試驗

本計畫分別針對使用量大的 30 種濃縮中藥以所開發之體外篩檢方法，測試其對肝臟主要代謝酵素 CYP2D6、CYP2C9、CYP3A4、CYP1A2 及 UGT2B7 活性的影響，結果依不同肝臟酵素分別敘述如下：

(一) CYP1A2

在 30 種中藥中一共有 16 種會顯著降低 CYP1A2 活性達到 50% 以上，而顯著降低 90% 以上活性者更有 4 種，依排名分別為蒼耳散、清心蓮子飲、辛夷散及川芎茶調散，其降低 CYP1A2 活性分別達 $99.2 \pm 1.4\%$ 、 $97.2 \pm 4.9\%$ 、 $90.6 \pm 3.7\%$ 及 $90.4 \pm 4.0\%$ 。另外，不同藥廠製劑間的差異整體來看並不會太大，不過其中勝昌製造之一貫煎及平胃散與其他兩廠的活性影響差異較大，值得進一步探討其原因。

(二) CYP2D6

在 30 種中藥中一共有 15 種會顯著降低 CYP2D6 活性達到 50% 以上，而顯著降低 80% 以上活性者更有 5 種，依排名分別為正骨紫金丹、川芎茶調散、小青龍湯、辛夷散及知柏地黃丸，其降低 CYP2D6 活性分別達 $85.4 \pm 7.7\%$ 、 $84.1 \pm 4.9\%$ 、 $83.0 \pm 5.2\%$ 、 $81.9 \pm 8.2\%$ 及 $81.8 \pm 1.8\%$ ，而不同藥廠製劑間的差異整體來看並不會太大，不過其中 C 廠製造之一貫煎及平胃散、A 廠的甘露飲與其他兩廠的活性影響差異較大，值得進一步探討其原因。另外、四逆散對 CYP2D6 活性略有促進的作用。

(三) CYP2C9

在 30 種中藥中一共有 17 種會顯著降低 CYP2C9 活性達到 50% 以上，而顯著降低 80% 以上活性者有 2 種，降低 70% 至 80% 之間者有 6 種，依排名分別為甘露飲、銀翹散、杞菊地黃丸、辛夷散、小青龍湯、川芎茶調散、炙甘草湯及正骨紫金丹，其降低 CYP2C9 活性分別達 $82.2 \pm 8.7\%$ 、 $80.2 \pm 7.6\%$ 、 $77.0 \pm 14.0\%$ 、 $73.7 \pm 9.4\%$ 、 $73.4 \pm 5.8\%$ 、 $71.1 \pm 15.9\%$ 、 $70.9 \pm 5.7\%$ 及 $70.0 \pm 13.7\%$ ，而不同藥廠製劑間的差異整體來看並不會太大，不過其中 A 廠製造之止嗽散及蒼耳散與其他兩廠的活性影響差異較大，值得進一步探討其原因。

(四) CYP3A4

在 30 種中藥中一共有 15 種會顯著降低 CYP3A4 活性達到 50% 以上，而顯著降低 80% 以上活性者有 3 種，依排名分別為正骨紫金丹、知柏地黃丸及辛夷散，其降低 CYP3A4 活性分別達 $89.6 \pm 6.1\%$ 、 $82.7 \pm 4.1\%$ 及 $82.6 \pm 9.5\%$ ，而不同藥廠製劑間的差異整體來看並不會太大，不過其中 C 廠製造之一貫煎及藿香正氣散與其他兩廠的活性影響差異較大，值得進一步探討其原因。

(五) UGT2B7

在 30 種中藥中一共有 17 種會顯著降低 UGT2B7 活性達到 50% 以上，而顯著降低 90% 以上活性者有 1 種，降低 80% 至 90% 之間者有 4 種，依排名分別為清心蓮子飲、炙甘草湯、桑菊飲、四逆散及龍膽瀉肝湯，其降低 CYP3A4 活性分別達 $92.8 \pm 1.8\%$ 、 $85.8 \pm 4.5\%$ 、 $81.7 \pm 4.8\%$ 、 $80.4 \pm 11.6\%$ 及 $80.3 \pm 0.9\%$ ，而不同藥廠製劑間的差異整體來看並不會太大，不過其中 C 廠製造之平胃散及 A 廠製造之小柴胡湯與其他兩廠的活性影響差異較大，值得進一步探討其原因。

二、中藥對 Nalbuphine 藥動學性質之影響大白鼠體內試驗

Nalbuphine 為嗎啡類強效鎮痛劑，一般用於手術後止痛及癌症疼痛控制，與其他嗎啡類藥物相同的是其主要副作用為呼吸抑制。Nalbuphine 在體內主要是經由 UGT2B7 代謝為 nalbuphine-3-glucuronide，故 UGT2B7 的活性對 nalbuphine 在體內的代謝預期會有顯著的影響。本計畫選擇 nalbuphine 為模式藥，中藥則選擇對 UGT2B7 活性有顯著影響之龍膽瀉肝湯。如圖一所示，當大白鼠口服 nalbuphine，無論是同時給予單劑量(3.25 mg/kg)或多劑量(0.65 mg/kg, QD 7 天)龍膽瀉肝湯後，大白鼠體內血漿之 nalbuphine 濃度均會顯著升高，而由表十一之 nalbuphine 動力學參數來看，nalbuphine 體內最高濃度(C_{max})由控制組的 17 ± 7 ng/mL，在單劑量或多劑量服用龍膽瀉肝湯後，分別顯著升高至 197 ± 283 ng/mL 及 263 ± 85 ng/mL ($p < 0.005$)。代表體內吸收藥物的總量的 AUC_{total}，則由控制組的 39.3 ± 16.2 hr*ng/mL，單劑量或多劑量服用龍膽瀉肝湯後，分別顯著升高至 987.0 ± 1301.8 及 1596.3 ± 321.9 hr*ng/mL ($p < 0.005$)，大幅增加吸收達 25 至 40 倍；而代表藥物代謝速度的排除半衰期(t_{1/2})，由控制組的 3.06 ± 2.50 hr，單劑量或多劑量服用龍膽瀉肝湯後，分別顯著減緩至 17.85 ± 22.29 及 10.1 ± 2.68 hr ($p < 0.05$)，龍膽瀉肝湯顯然會降低大白鼠代謝 nalbuphine 的能力。由此可知，人體併服 nalbuphine 及龍膽瀉肝湯極可能會造成藥物交互作用，而產

生危險。

三、併服龍膽瀉肝湯及 nalbuphine 對大白鼠肝臟組織之影響

以 Modified Histological Activity Index (Modified HAI) 判讀評分單獨給予 nalbuphine 之控制組、同時給予 nalbuphine 及單劑量龍膽瀉肝湯實驗組、同時給予 nalbuphine 及多劑量龍膽瀉肝湯實驗組之肝臟組織切片，其 HAI score 分別為 1.6 ± 0.89 , 4.40 ± 2.07 及 2.67 ± 0.52 ，以 Kruskal-Wallis test 及 Mann-Whitney test 分析三組間之差異，結果發現，單劑量組之 HAI score 顯著高於控制組 ($p = 0.013$)，而多劑量組之 HAI score 雖沒有顯著高於控制組，但其 $p = 0.051$ 已在顯著差異之邊緣，由此可知，併服 nalbuphine 及龍膽瀉肝湯已對大白鼠肝組織造成傷害。

另由圖二至四之控制組的肝組織切片來看，無論是 portal area (bile duct, portal vein, hepatic artery) 或 central vein (CV)，細胞之 morphology 均無異狀；而單劑量組之圖五至十來看，在 central vein (CV) 附近則發現一些異常現象：圖五、六、七及八中在 central vein (CV) 附近均發現有發炎細胞增多(圓圈標記處)現象，圖九及十則在 central vein (CV) 邊緣有細胞破壞現象；由多劑量之圖十一及十二來看，central vein (CV) 附近也發現有發炎細胞增多(圓圈標記處)現象。由以上觀察可知，併服 nalbuphine 及龍膽瀉肝湯已對大白鼠肝組織造成傷害。

肆、討論

- 一、在決定濃縮中藥萃取過程，其實是有可以討論的空間，當然最理想的方式是完全模擬濃縮中藥真正在病人使用時體內的狀況，因此，本計畫是依據這個精神而決定採用擬胃液及擬腸液兩階段方式萃取濃縮中藥，此方式其實也與西藥體外測定溶離性質方法十分接近，當然，這樣的方式跟真正病人體內的情形還是會有差距，因此，未來還是需要以臨床試驗做進一步確認本計畫所得到的結果。
- 二、本計畫所測試的濃縮中藥為國內三大 cGMP 中藥廠的產品，其產品配方跟藥典標準配方會有些差別，各家之間也會有些不同，因此，同一名稱但不同廠商所生產的濃縮中藥對肝臟代謝酵素活性的影響也會有不同。
- 三、肝臟代謝酵素一般均分佈在 central vein 附近較多，而在併服 nalbuphine 及龍膽瀉肝湯後發現 central vein 附近有發炎現象，顯然這是造成代謝酵素活性下降的可能原因。
- 四、nalbuphine 併服龍膽瀉肝湯後，多劑量組對 nalbuphine 之藥動性質影響較單劑量組略有增加但並未達統計上的顯著，由於單劑量組之龍膽瀉肝湯劑量較多劑量組高 5 倍，因此，其對 nalbuphine 之藥動性質的影響並不會少於多劑量組太多。
- 五、nalbuphine 併服龍膽瀉肝湯後，多劑量組之肝組織切片其 HAI score 略低於單劑量組但並未達統計上的顯著，亦即多劑量組之小白鼠肝發病情形較單劑量組緩和，但並不顯著，因單劑量組之龍膽瀉肝湯劑量較多劑量組高 5 倍，由此可知，劑量提高會增強對肝組織的傷害。
- 六、在摘要及結果中所提及之對肝臟代謝酵素活性有「顯著影響」，意指民眾若服用會「顯著影響」肝臟代謝酵素活性之中藥後，其肝臟代謝藥物之機能會較服用前產生明顯之變化，因此，如果民眾同時併服其他藥物時即可能使藥物在體內的濃度產生不預期之變化，進而可能造成藥物失效或產生副作用的情形。

伍、結論與建議

- 一、本計畫挑選 30 種常用的濃縮中藥來做測試，結果即發現至少有一半以上會對人體肝臟代謝酵素有顯著的影響，比例非常高，因此，建議應再繼續大量且快速地篩檢已上市的中藥製劑，以進一步評估上市中藥用藥的風險。
- 二、龍膽瀉肝湯經本計畫之人類肝微粒體體外試驗及大白鼠體內藥動試驗、病理切片觀察，發現在併服 nalbuphine 後會對大白鼠肝有所損傷 HAI score 顯著上升(1.6 ± 0.89 上升至 4.40 ± 2.07 及 2.67 ± 0.52)，代謝酵素活性也顯著下降，nalbuphine 在體內的吸收量(AUC_{total})大幅增加 25 至 40 倍，體內最高濃度(C_{max})也大幅升高 12 至 15 倍，排除半衰期也增長 3 至 6 倍，已明顯產生藥物-藥物交互作用，未來應再進一步以臨床試驗來確認。
- 三、未來中藥新藥上市前，也應測試其對主要肝臟代謝酵素的影響，以進一步評估其上市後用藥的風險。

誌謝

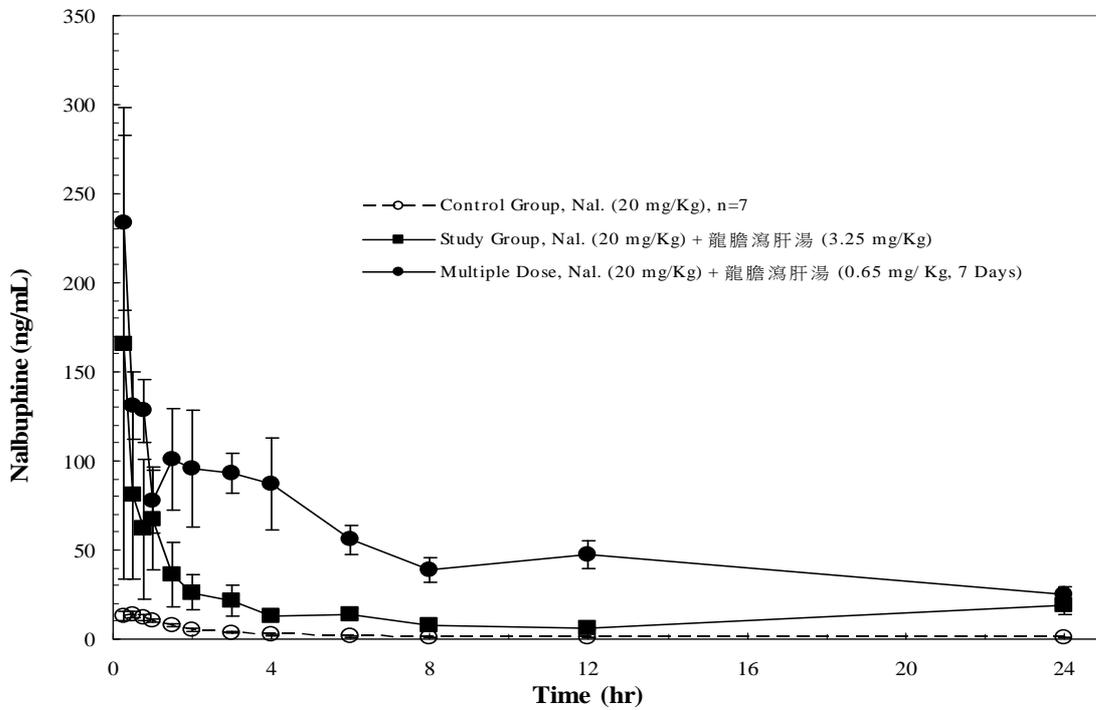
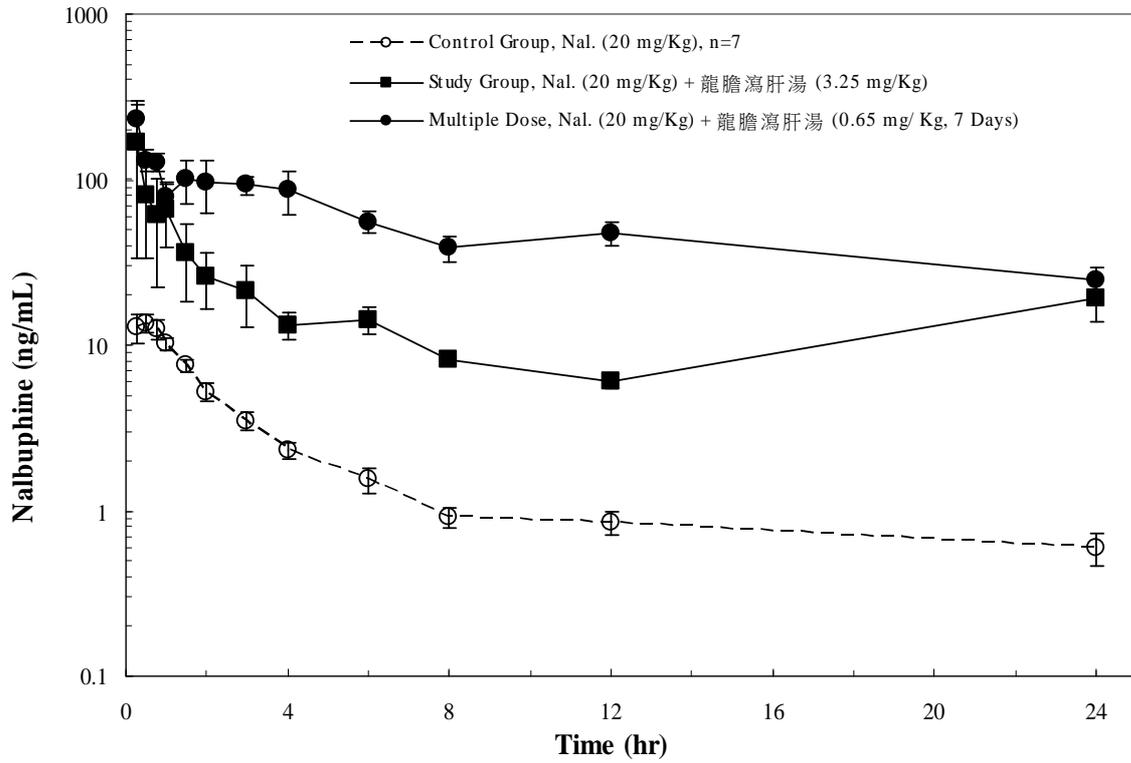
本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號 CCMP95-TP-003 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

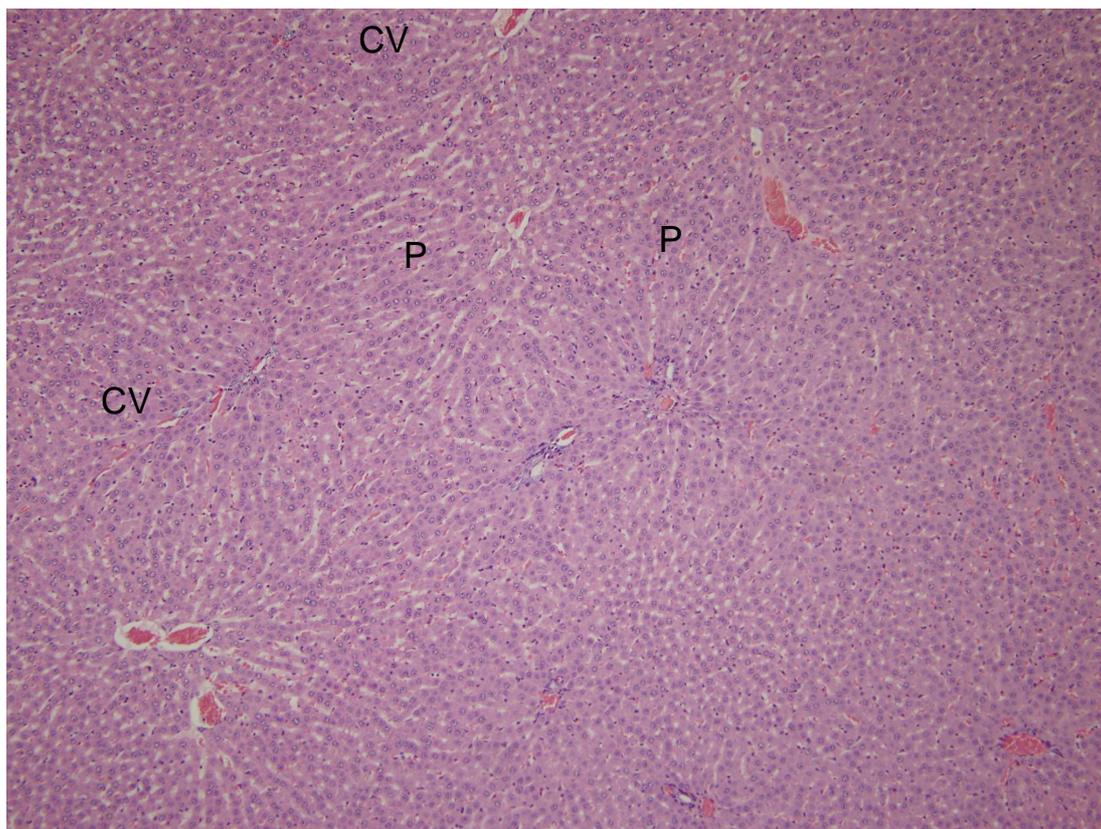
1. Regardh CG, Baamhielm C, Edgar B, Hoffman KJ. Pharmacokinetics and biotransformation of 1,4-dihydropyridine calcium antagonists. *Prog Drug Metab* 1990; **12**: 41-86.
2. Guengerich FP, Brian WR, Iwasaki M, Sari MA, Baarnhielm C, Berntsson P. Oxidation of dihydropyridine calcium channel blockers and analogues by human liver cytochrome P450111A4. *J Med Chem* 1991; **34**:1834-1844.
3. Bailey DG, Bend JR, Arnold JMO, Tran LT, Spence JD. Erythromycin-felodipine interaction: magnitude, mechanism, and comparison with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther* 1996; **60**: 25-33.
4. Kolars JC, Schmiedlin-Rem P, Schuetz JD, Fang C, Watkins PB. Identification of rifampicin-inducible P450_{III}A4 (CYP3A4) in human small bowel enterocytes. *J Clin Invest* 1992; **90**: 1871-1878.
5. De Waziers I, Cugnenc PH, Yan CS, Leroux JP, Beaune PH. Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; **253**: 287-294.
6. Lown KS, Bailey DG, Fontana RJ, *et al.* Grapefruit juice Increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J Clin Invest* 1997; **99**: 2545-2553.
7. Krishna D. and Klotz U., Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clinical Pharmacokinetics* 1994; **26**:144-160.
8. Slaughter R.L. and Edward D.J., Recent advances: the cytochrome P450 enzymes. *The Annals of Pharmacotherapy* 1995; **29**:619-624.
9. Omura T. and Sato R., The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *The Journal of Biological Chemistry* 1964; **239**:2370-2378.
10. Radomska-Pandya A., Czernik P.J., Little J.M., Battaglia E., and Mackenzie P.I., Structure and functional studies of UDP-glucuronosyl-transferase. *Drug Metabolism Reviews* 1999; **31**:817-899.
11. Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Inui Y. and Guengerich F.P., Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1994; **270**:414-423.
12. Barnes J. Anderson LA. Phillipson JD. St John's wort (*Hypericum*

- perforatum L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy & Pharmacology* 2001; **53**(5):583-600.
13. Bergonzi MC. Bilia AR. Gallori S. Guerrini D. Vincieri FF. Variability in the content of the constituents of *Hypericum perforatum* L. and some commercial extracts. *Drug Development & Industrial Pharmacy* 2001; **27**(6):491-7.
 14. Johne A. Brockmoller J. Bauer S. Maurer A. Langheinrich M. Roots I. Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St John's wort (*Hypericum perforatum*). *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 1999; **66**(4):338-45.
 15. Muller WE. Rolli M. Schafer C. Hafner U. Effects of hypericum extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* 1997; **30** Suppl 2:102-7.
 16. Nebel A. Schneider BJ. Baker RK. Kroll DJ. Potential metabolic interaction between St. John's wort and theophylline. *Annals of Pharmacotherapy* 1999; **33**(4):502.
 17. Piscitelli SC. Burstein AH. Chaitt D. Alfaro RM. Falloon J. Indinavir concentrations and St John's wort. [erratum appears in *Lancet* 2001 Apr 14;357(9263):1210.]. *Lancet* 2000; **355**(9203):547-8.
 18. Ruschitzka F. Meier PJ. Turina M. Luscher TF. Noll G. Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet* 2000; **355**(9203):548-9.
 19. Yue QY. Bergquist C. Gerden B. Safety of St John's wort (*Hypericum perforatum*). *Lancet* 2000; **355**(9203):576-7.
 20. 林宜信：建立臺灣中藥用藥安全環境，衛生署中醫藥委員會，93 年 12 月，台北，p:1-6。
 21. Gibson, G. and P. Skett, 1994, "Chapter 4: Factors affecting drug metabolism: internal factors," in *Introduction to drug metabolism*, London: Blackie Academic & Professional.
 22. Dierks EA, Stams KR, Lim HK, et al. A method for the simultaneous evaluation of the activities of seven major human drug-metabolizing cytochrome p450s using an in vitro cocktail of probe substrates and fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Drug Meta & Dispos.* 2001;**29**(1):23-29.

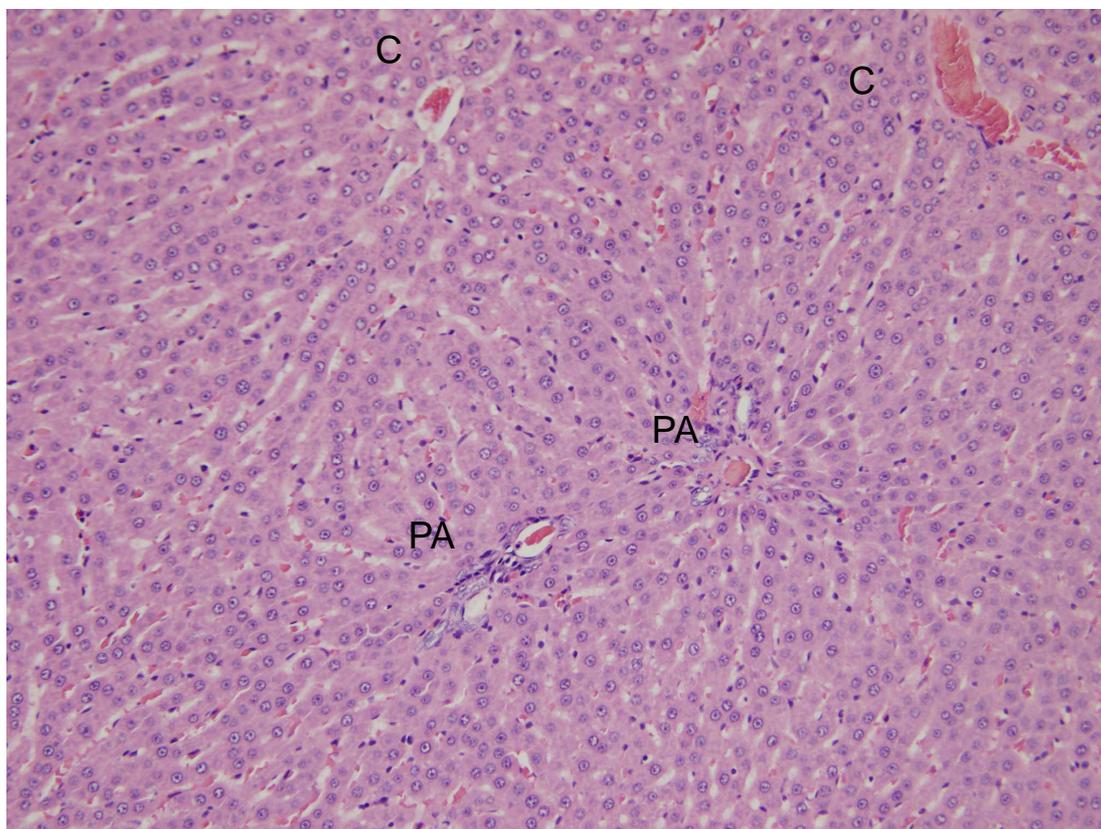
柒、圖、表



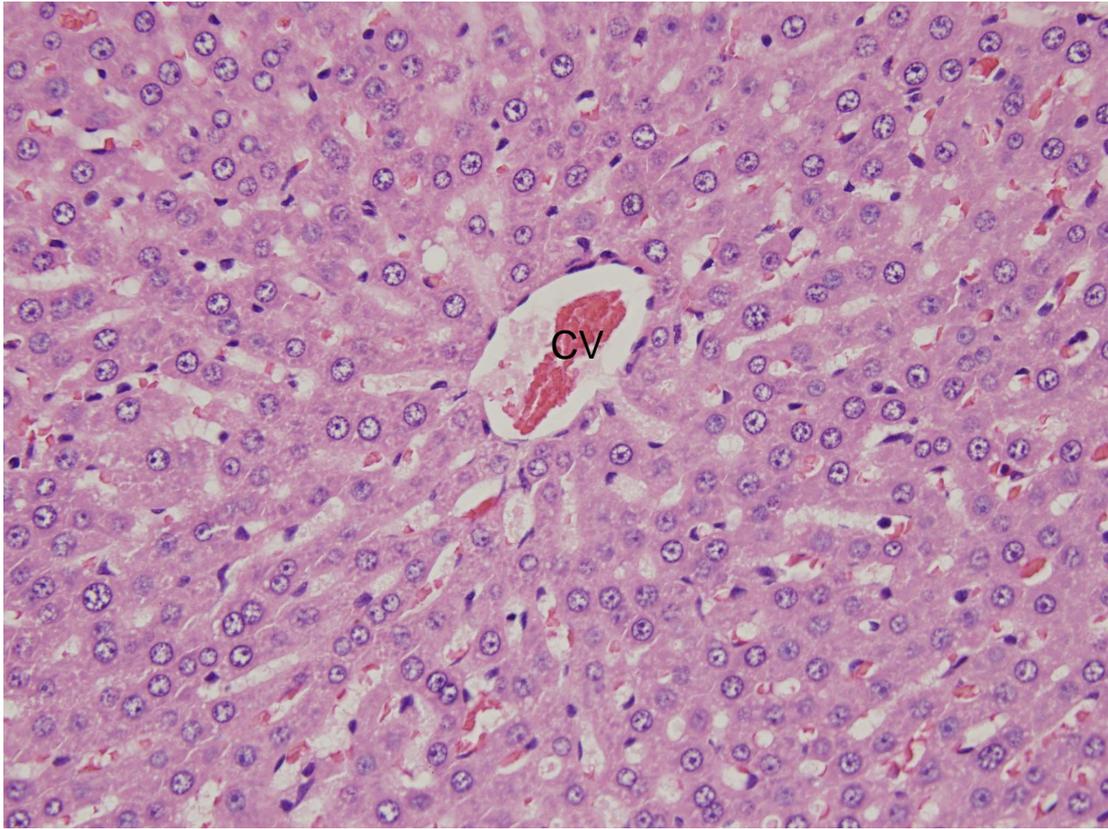
圖一、龍膽瀉肝湯對大鼠肝臟代謝 Nalbuphine 之影響(上圖為半對數座標)



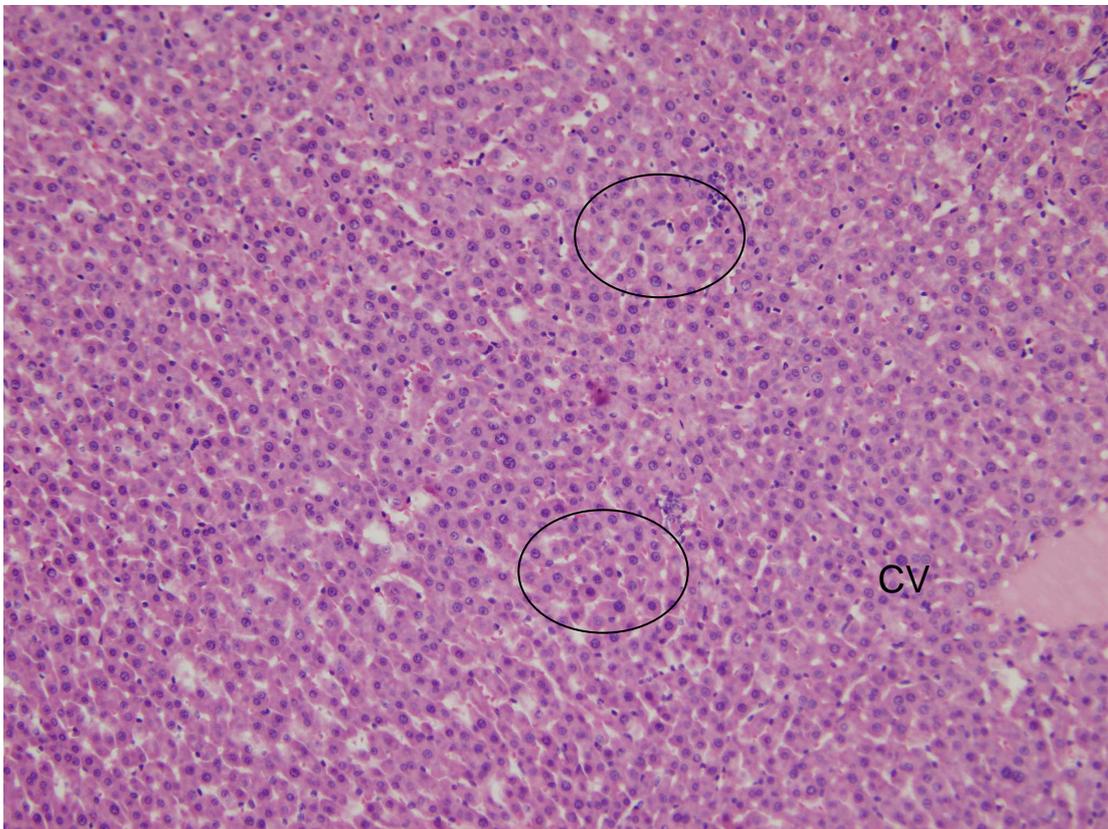
圖二、單獨服用 nalbuphine 之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 100 倍；
PA: portal area (bile duct, portal vein, hepatic artery); CV: central vein



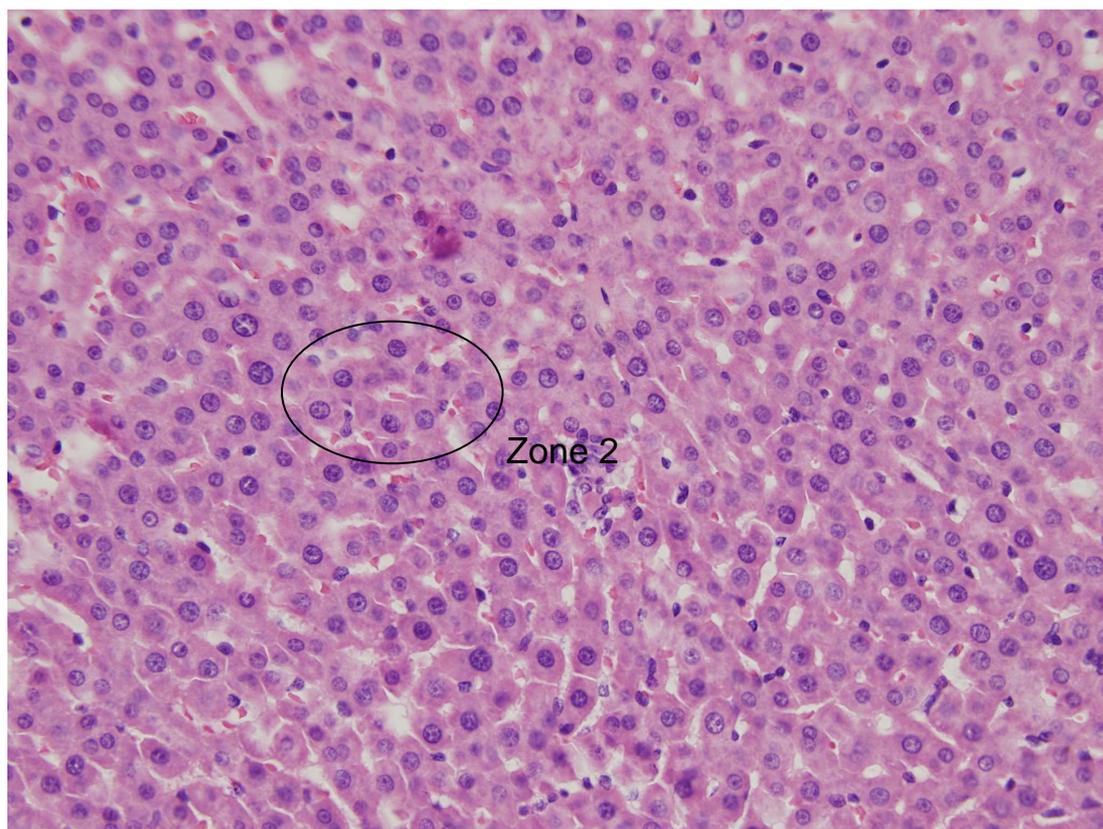
圖三、單獨服用 nalbuphine 之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 200 倍；
PA: portal area (bile duct, portal vein, hepatic artery); CV: central vein



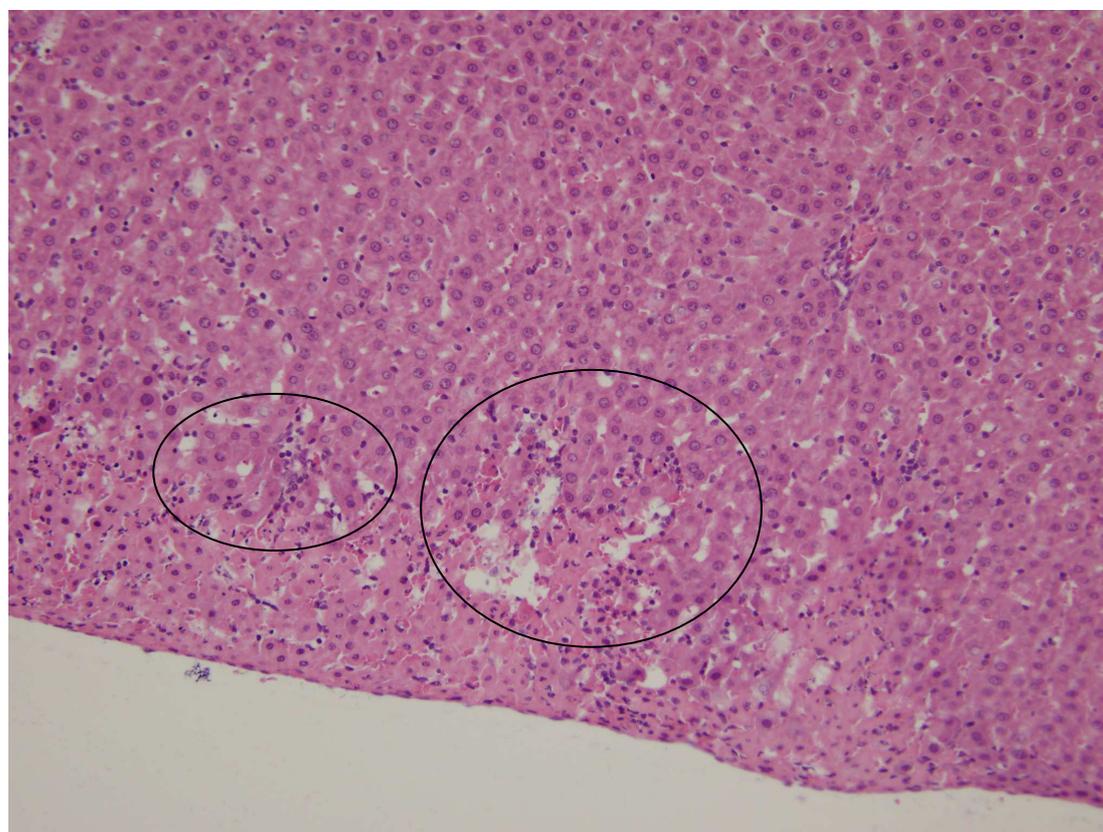
圖四、單獨服用 nalbuphine 之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；
CV: central vein



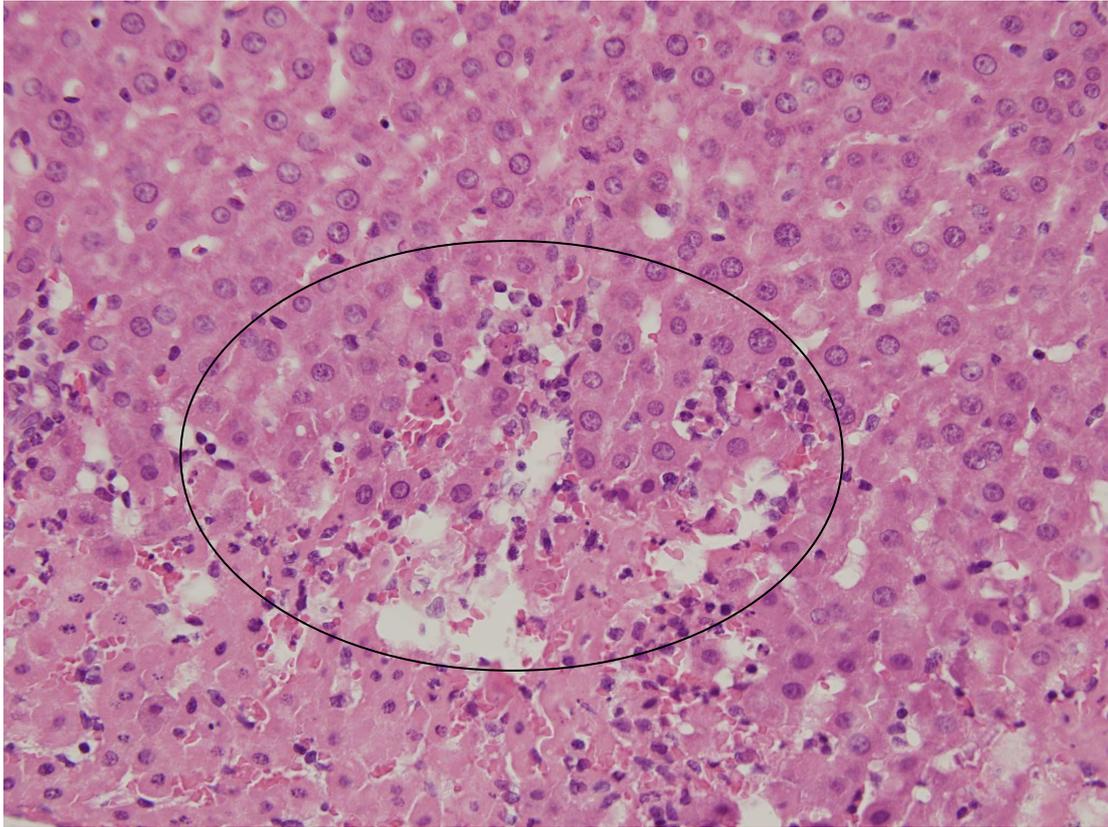
圖五、服用 nalbuphine 及單劑量龍膽瀉肝湯之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，
放大倍率 200 倍；CV: central vein



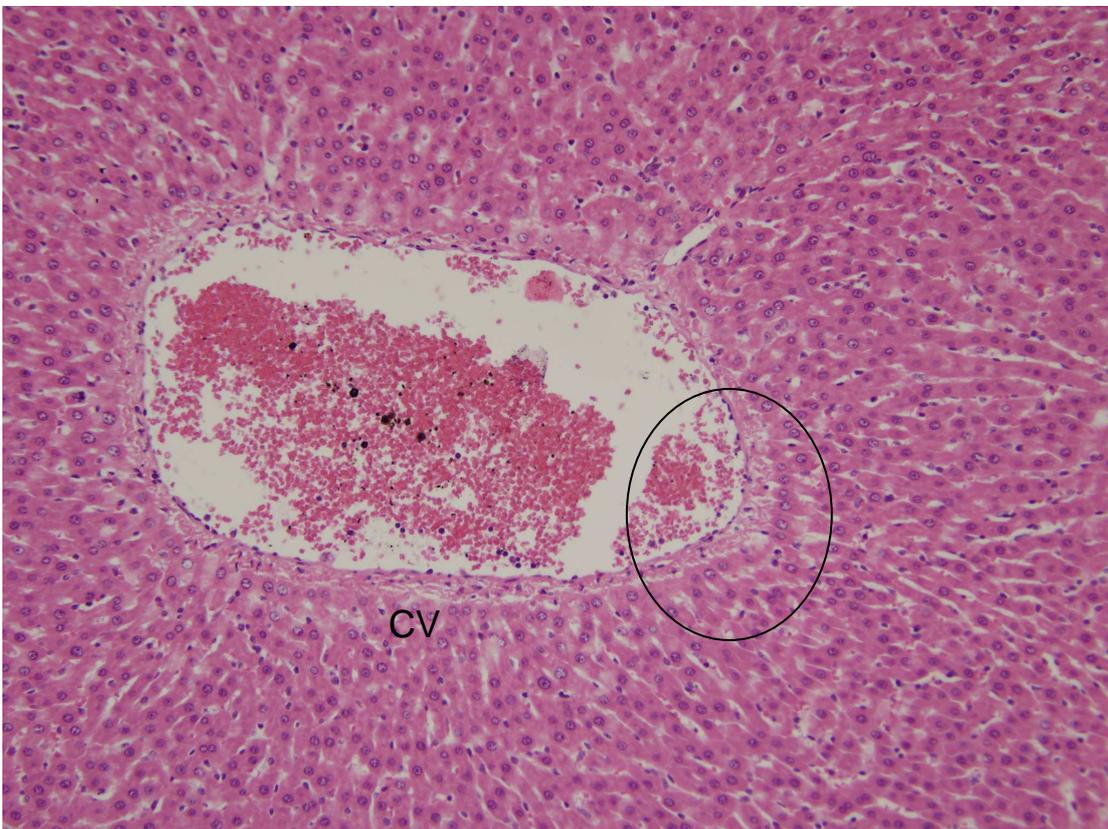
圖六、服用 nalbuphine 及單劑量龍膽瀉肝湯之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；CV: central vein



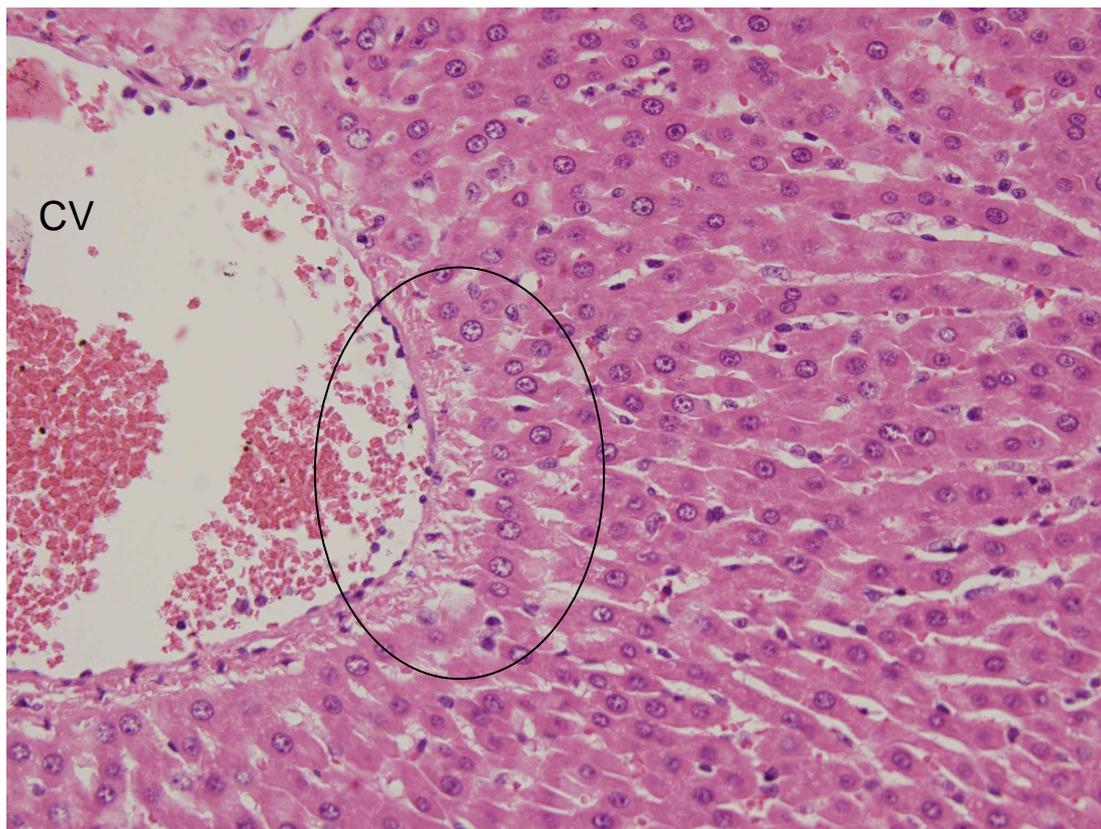
圖七、服用 nalbuphine 及單劑量龍膽瀉肝湯之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 200 倍



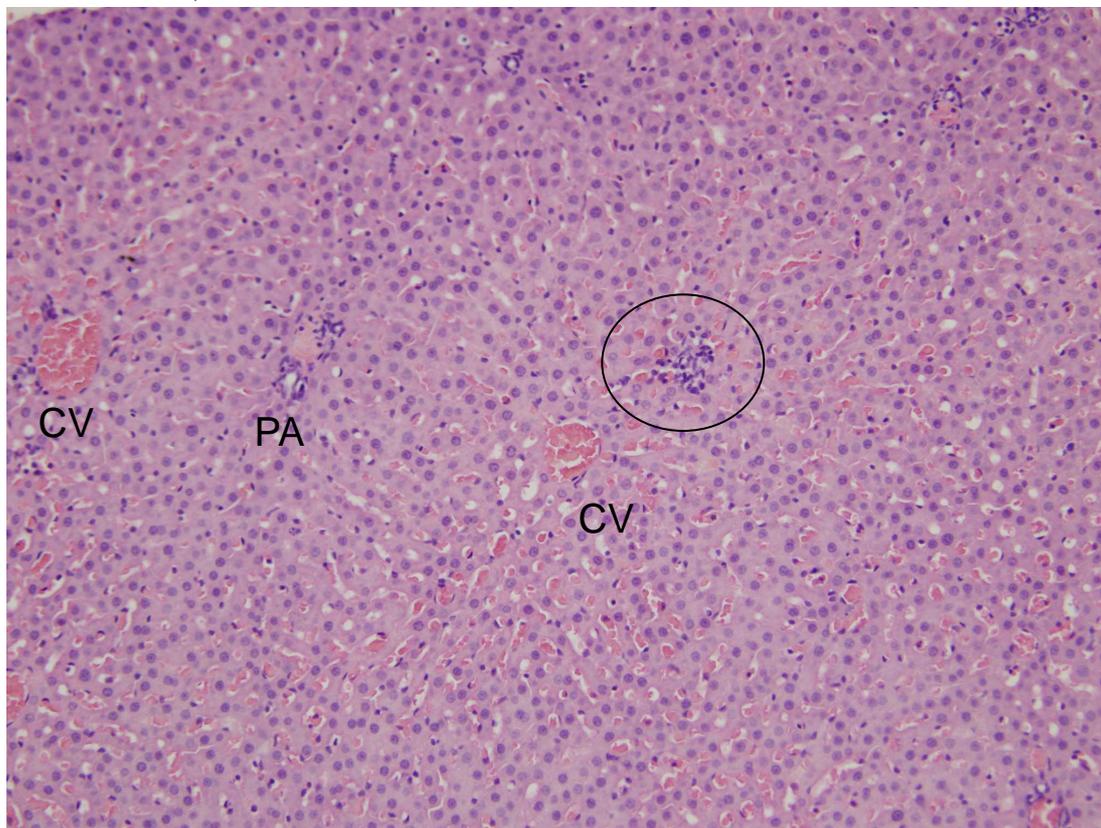
圖八、服用 nalbuphine 及單劑量龍膽瀉肝湯之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍



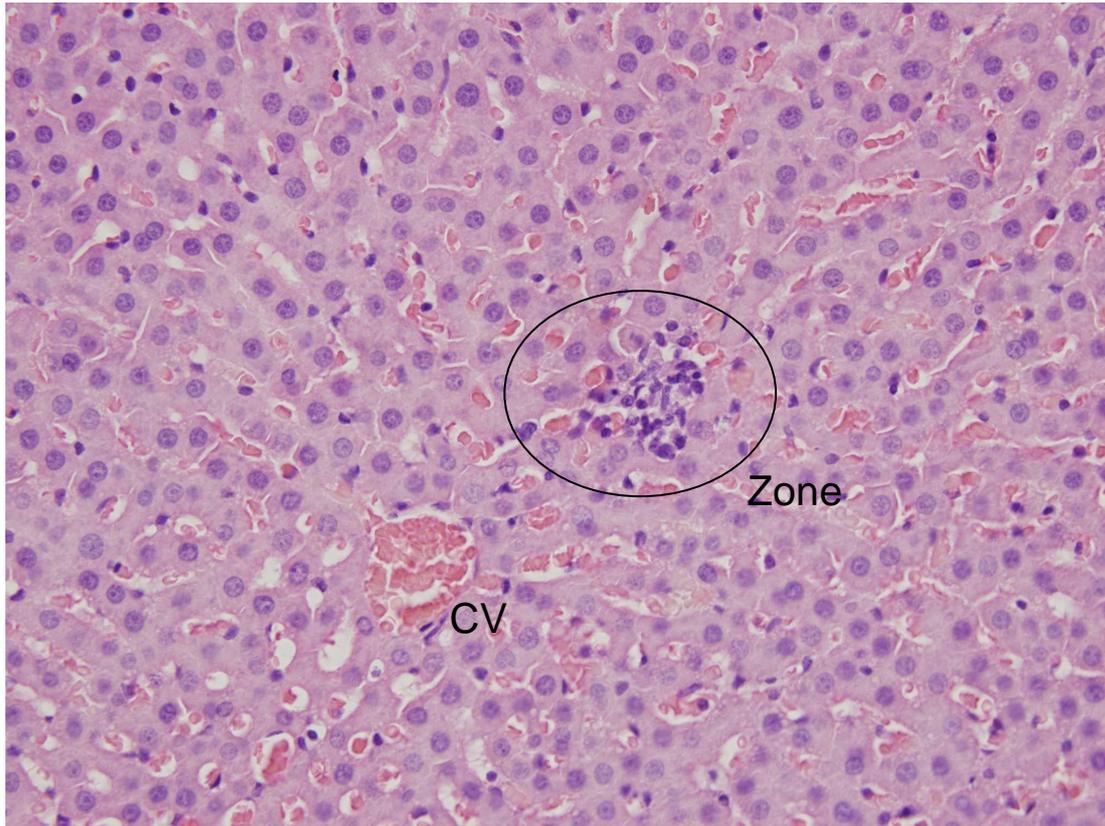
圖九、服用 nalbuphine 及單劑量龍膽瀉肝湯之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 200 倍；CV: central vein



圖十、服用 nalbuphine 及單劑量龍膽瀉肝湯之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；CV: central vein



圖十一、服用 nalbuphine 及多劑量龍膽瀉肝湯之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 200 倍；PA: portal area (bile duct, portal vein, hepatic artery); CV: central vein



圖十二、服用 nalbuphine 及多劑量龍膽瀉肝湯之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；CV: central vein

表十一、龍膽瀉肝湯對大白鼠口服 nalbuphine 之藥動性質之影響

PK parameter	Control Group	Single Dose Group	Multiple Dose Group
	Nal. (20mg/Kg) (n = 7)	Nal. (20 mg/Kg)+龍膽瀉肝湯 (3.25 mg/Kg) (n = 5)	Nal. (20 mg/Kg)+龍膽瀉肝湯 (0.65 mg/Kg for 1 week) (n = 6)
Cmax (ng/mL)	17 ± 7	197 ± 283***	263 ± 85***
Tmax (hr)	0.44 ± 0.19	0.50 ± 0.31	0.75 ± 0.79
AUC _(0-t) (hr*ng/mL)	35.0 ± 13.2	333.8 ± 189.1***	1213.6 ± 224.6***
AUC _(total) (hr*ng/L)	39.3 ± 16.2	987.0 ± 1301.8***	1596.3 ± 321.9***
k (1/hr)	0.336 ± 0.174	0.120 ± 0.144*	0.072 ± 0.018*
t _{1/2} (hr)	3.06 ± 2.50	17.85 ± 22.29*	10.1 ± 2.68*
MRT (hr)	4.57 ± 3.97	30.15 ± 36.91*	15.43 ± 5.42*
CL/F (L/hr/Kg)	610 ± 292	48 ± 37***	13 ± 3***
V/F (L/Kg)	2177 ± 1008	704 ± 513***	183 ± 345***

Data = Mean ± SD

*: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.005

