

編號：CCMP94-RD-032

臨床常用科學中藥與西藥 交互作用之評估

鮑力恆

國防醫學院藥品製造研究所

摘要

目前國內在全民健康保險醫療下及在目前國人的就醫習慣上，民眾常以同時服用中醫及西醫的藥物作為治療疾病方式，同時也因缺乏相關的交互作用資訊，中醫與西醫的疾病診治過程中，用藥安全上常常無法兼顧，此可能造成許多藥物不良反應或是中西藥物交互作用，可導致藥物預期的療效降低，或是影響藥物代謝及排泄而產生毒性反應，造成病人用藥安全的顧慮。因此本研究的目的即在於建立臨床常用的科學中藥與西藥交互作用資料平台，以供醫藥相關人員臨床實用上對於中西藥交互作用發生風險評估之參考，以期能減少可能因中西交互作用而產生的不良反應或副作用，以適時提供醫療團隊或病人相關資訊，更提昇醫療品質。

本實驗主要是利用 Testosterone 與 CYP3A 反應代謝 6 β -hydroxytestosterone 的方式來測定 CYP3A 的活性在交互作用，在實驗方面，將科學中藥加入人肝微粒體反應液中，以 37°C 水浴振搖後，以 LC-MS-MS 測得 6 β -hydroxytestosterone 的生成量，並代入由不同 6 β -hydroxytestosterone 濃度之標準曲線，求得其 6 β -hydroxytestosterone 的生成量，以評估其對藥物代謝酵素之影響。

已順利完成了建立一人肝微粒體 CYP3A 酵素活性篩選評估模式及分析方法，並也達成 50 種常用單方科學中藥篩選評估的目標，其中常見於複方中配方之單方如黃芩、牡丹皮、雞血藤，與黃耆可顯著的抑制 CYP3A 酵素活性，抑制率可達 70%~99% 之間，顯示的確存在臨床中西藥交互作用的可能性。

關鍵詞：中藥、中藥-西藥交互作用、人肝微粒體、細胞色素 3A

編號：CCMP94-RD-032

Evaluation of Chinese medicine extracts -drug interactions

Pao, Li-Heng

School of Pharmacy, National Defense Medical Center, Taipei, Taiwan,
R.O.C

ABSTRACT

Under the national social health care systems and customs of medicine use in Taiwan, coadministration of herbal medicines and drugs is not unusual for patients taken the medicine. The information of systemic herb-drug interactions is still far from practical applications. Therefore, herb-drug interactions might result in a loss of therapeutic efficacy or toxic effects of drug therapy. The purpose of this project is to study the herb extracts and drug interactions systemically to build up the interactions data bank. These herb-drug interactions data may provide useful information for medical professional staffs in prescription and consultation to reduce the chance of adverse effects and improve the quality of medical care.

We have finished all the studies that planned for the first year project. Testosterone was chosen as the model drug since it is a specific substrate of CYP3A enzyme. First of all, we have established an accurate, precise, and specific analytical HPLC/MS/MS methodology for analyzing the model drug and its hydroxyl metabolite in human liver microsome. This project has also set up an in vitro human liver microsome system for potential CYP3A drug interaction screening. 50 kinds of Chinese herbal extract have been screened in vitro and enzyme activity would measure with and without the herbs extract. The results indicate that five out of fifty herbal extracts could significantly inhibited the human liver microsomal CYP3A4 enzyme activity from 70 up to 90%. These results implied that the potential of herbal-drug interactions in long term use of

these herbal extract in clinical and further in vivo study is needed to confirm this finding.

Keywords : herb-drug interactions, human liver microsome, CYP3A,

壹、前言

近年來隨者科技的進步及中藥科學化的政策引領下，我國中藥科學化腳步一值持續穩健的成長，再加上全民健保制度對中藥的給付之促進下，我國各級醫院大部分居設有中醫部及中醫門診，各級醫院多半以科學中藥為主。在這種環境下常使得國內民眾發生同時服用中草藥及西藥的醫療行為。中醫與西醫的疾病診治過程中，用藥安全上常常無法兼顧，這是因為缺乏相關藥物交互作用的資訊，造成了治療藥物相關藥動學參數及藥理活性的改變，因而導致藥物預期的療效降低，或是產生過量之毒性反應，造成病人用藥安全的顧慮。因此，本研究的目的即在於建立臨床常使用的科學中藥與西藥交互作用的資料平台，以供醫療人員於臨床實用上對於中西藥交互作用發生風險評估作參考，期能減少中西藥交互作用產生的不良反應或副作用，提昇醫療品質。

藥物-藥物交互作用可導致一藥物的失調而造成服藥者的死亡、使服藥者住院或延長住院期限及增加醫療成本¹⁻³。1000 位經由急診住院的老年病患，其中 538 位是涉及 1087 項的藥物-藥物交互作用；其中 30 位因此產生嚴重不良反應⁴。近年在美國已上市藥物由市場上撤回原因中，主要也是以藥物-藥物交互作用為主。其中涉及主要的酵素是以細胞色素 CYP 為主。對於口服藥物而言，腸肝的首渡效應(first pass effect)是影響生體可用率的重要因素。而其中主要扮演代謝角色的還是肝細胞中的 CYP3A4。CYP3A4 是 CYP3A 的一個亞型酵素，其亦為細胞色素 P-450 的其中一個重要亞綱的酵素。CYP3A 酵素在人類主要負責第一型代謝，經由非結合性(nonconjugation)反應增進藥物排除，估計在肝中的 CYP 約佔 30%⁵，而在小腸的 CYP 有約佔 70%⁶。所以以目前治療藥物的代謝主要途徑而言即使不以 CYP3A 當作首要的代謝酵素，亦有 50% ~70% 經由 CYP3A 代謝⁷⁻¹⁰。CYP3A 家族中最主要且同性質的就屬 CYP3A4^{18, 19}，它大量存在成人的肝¹¹⁻¹⁶和小腸¹⁷⁻²²中。在小腸 CYP3A 的量通常為肝中找到的 10% ~50%。然而在一些研究報告^{6, 18, 22, 23}也觀察到 CYP3A 的濃度相等或超過於肝中的存量。CYP3A 蛋白質和催化活性，乃順著十二指腸、空腸及迴腸而呈縱向地減少²⁹。肝及小腸的 CYP3A4 就其酵素來討論，它們具有相同的 cDNA²⁴。即使是食物中的成分經由抑制腸肝的細胞色素 CYP3A 酵素，已可產生嚴重的交互作用。如葡萄柚汁(grapefruit juice)其中 bergamottin 及 6',7'-dihydroxybergamottin 具有抑制 CYP3A4 酵素的作

用，如與藥物一起服用可增加主要經由 CYP3A4 酵素代謝藥物，如 cyclosporin, felodipine, nifedipine 等藥物的 Cmax 及 AUC^{25,26}，此等交互作用可於臨床上造成嚴重的藥物不良反應極嚴重副作用的發生。

近幾年，世界各地使用各式各樣的天然製備品有明顯增加的趨勢。越來越多的民眾利用這些天然製備品來做為保健及替代醫療使用。中草藥及類似療法 (Herb and homeopathic remedies) 由 1998 年資料顯示：在歐洲佔有 67 億美金的市場，而在美國亦有 40 億美金的市場，且有持續增加的趨勢。中草藥的使用在古希臘、埃及、中國已有數千年歷史，曼陀羅 (Mandrake, *Mandragora officinarum*) 唯一多年生草藥，含有 atropine 及 scopolamine, 古時用於麻醉、鎮靜劑及止痛劑用。毒芹 (Poison Hemlock, *Conium maculatum*) 亦含有生物鹼，古希臘時代用來處決之用。毛地黃 (foxglove, *Digitalis purpurea*) 至今仍廣泛使用於治療心臟疾病。至今使用的抗癌藥物 tamoxifen 及 Taxol 均來自太平洋紫杉 (Pacific yew, *Taxus brevifolia*)。然而中草藥製劑在大部分的國家，包括美國，均是將其歸類在食品或是營養補充品，因此在販售上並未像成藥或處方藥般受到嚴格的規範，民眾可以輕易的根據自己的需求自行購買此類產品，而相對於這些天然製備品的應用日漸廣泛，這些中草藥製劑其相關的藥理、毒理、藥物動力學、安全性和藥物交互作用的評估資訊便顯得較為的缺乏，因此提供臨床中西藥物交互作用的判斷仍待建立。

而一般使用中草藥的反應，在美國有 18.4% 需經常服用藥物的人有同時服用至少一種中草藥產品或高劑量維他命。1539 位成年人中，34% 使用至少一種非傳統治療，其中 72% 並未告訴醫師自己正在服用中草藥²⁷。在英國，面對面訪問調查於 6 家藥房及 6 家健康食品店的 690 位民眾，其中只有 25.4% 沒使用中草藥製劑，有 74.6% (515 位) 有使用過中草藥製劑 (336 位在藥房，179 位在健康食品店)；這 515 位使用過中草藥製劑者，有 62% 經常性的使用一種以上中草藥製劑，另 38% 偶爾或不定期使用一種以上中草藥製劑。更重要的是當服用西藥或中草藥當發生嚴重不良反應時的反應並不相同²⁸。特別是如果嚴重不良反應症狀解除後仍會繼續服用中草藥的比例較服用西藥高 8.5 倍。而諮詢醫師的比例也遠低於諮詢藥師及其他相關人員來的低，這些都將不利於中藥-西藥交互作用的控制及追蹤。

特別是今日國人使用中藥藥物治療疾病明顯增加的趨勢，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²⁹⁻³⁶。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、Portease 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²⁹⁻³⁶。

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粹取製成的;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,特別是細胞色素 CYP3A 的活性,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

我們研究室曾在衛生署經費支助下進行以中藥藥引改善低身體可用率藥物吸收之研究,此研究曾對 56 種中藥藥引純成分對 CYP3A 酵素活性進行研究,結果其中有許多成分對老鼠的腸及肝臟的 CYP3A 酵素活性有顯著的抑制作用,其中亦有部分成分會增加老鼠的腸及肝臟的 CYP3A 酵素活性。另一研究在國科會之助下進行中西藥交互作用機轉研究,針對金絲桃草與西藥交互作用的研究顯示,金絲桃草萃取物經由體外及體內研究顯示其萃取物對 CYP3A 酵素活性(腸及肝)有促進作用,然而其萃取物中的部份成分(純成分),不論是在體內及體外試驗均對 CYP3A 酵素活性卻有抑制作用。此結果亦顯現出一中藥中所含的各個成分可能對 CYP3A 酵素活性有不同程度或相反的影響,因

此，對於交互作用的評估，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。美國食品藥物管理局(US FDA)對於上市藥品在藥物代謝及藥物交互作用方面公佈的指導原則(Drug Metabolism/Drug Interaction Studies in the Drug Development Process: Studies In Vitro)中已清楚指出負責藥物代謝酵素與臨床產生藥物交互作用的相關性及重要性，並提出可採行的體外評估模式及方法，人體肝微粒體即是其建議用於評估代謝酵素活性的模式之一。故本研究以人類肝微粒體(human liver microsomes)進行科學中藥對最常引起臨床藥物交互作用的CYP3A 酵素活性變化進行評估，研究方法是利用testosterone與CYP3A代謝生成 6 β -hydroxytestosterone 的變化來測定CYP3A的活性強弱以遂行研究目的。預計於兩年計劃階段分別完成臨床常用五十種單方及五十種複方科學中藥可能交互作用的篩選評估；此兩年計畫以體外篩檢為主，期能建立相關中藥西藥交互作用資訊基本平台，以供日後體內或臨床試驗之指標。

貳、材料與方法

1. 試藥：

- | | |
|---|---------------|
| (1) 6 β -hydroxytestosterone..... | SIGMA |
| (2) Testosterone..... | Fluka |
| (3) Magnesium chloride (MgCl ₂)..... | SIGMA |
| (4) Glucose-6-phosphate(G6P)..... | SIGMA |
| (5)Glucose-6-phospha dehydrogenase(G6PD)..... | SIGMA |
| (6)Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADP)..... | SIGMA |
| (7)Potassiumbiphosphate(KH ₂ PO ₄)..... | Merck |
| (8) Acetonitril..... | TEDIA |
| (9)Formic acid..... | Riedel-deHaën |
| (10)Ketoconazole..... | SIGMA |

2. 器材：

2.1 液相層析串聯式質譜儀分析系統(LC/MS/MS):

2.1.1 Shimadzu 高效能液相層析儀系統:

幫浦: SHIMADZU LC-10 AD VP series Binary,
Serial No. C20963807738 LP

自動注射器: SHIMADZU SIL-10AD VP,
Serial No. C21053906286 SA

2.2.2 質譜:美商生命系統 API 3000 LC/MS/MS with
Analyst 1.4

2.2 其他: Sorvall[®] RT7 高速離心機

3. LC/MS/MS 條件

3.1 相層析儀分析條件

3.1.1 分析管柱: Hypersil[®] C18, 3 μ m, 50 \times 2.1 mm.
(Thermo Scientific, USA)

3.1.2 移動相: 0.1%Formic acid in water : ACN = 70 :
30 (v/v)

3.1.3 流速: 0.25 mL/min

3.1.4 注射體積: 20 μ L

3.1.5 分析時間: 7 mins

3.2 科學中藥在串聯式質譜儀分析條件

3.2.1 Ionization mode : ESI

3.2.2 Ion Spray Voltage (IS) : 5.5 kV

3.2.3 Curtain Gas (CUR) : 9

3.2.4 Nebulizer Gas(NEB) : 10

3.2.5 Temperature (TEM) : 425 $^{\circ}$ C

3.2.6 Collisionally Activated Dissociation (CAD) : 12

3.2.7 Multiple reaction monitoring (MRM) parameter

Analyte	polarity	precursor (m/z)	Product (m/z)	CE (eV)
Testosterone	+	289.3	97.3	34
6 β -hydroxytestosterone	+	305.3	269.3	22
Costicosterone	+	347.1	329.1	22

4.蛋白質的含量測定乃依循 Lowry Method, 以紫外光分光光度計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

4.1 胎牛血清白蛋白標準曲線【標準品操作過程如下】

4.1.1 取 0.5 ml 胎牛血清白蛋白溶液 (100 mg/ml)，以冰冷的 49.5 ml 0.85 % 氯化鈉溶液稀釋 100 倍即成胎牛血清白蛋白儲備液(stock solution, 1mg/ml)。

4.1.2 自上述 stock 溶液配置一組標準濃度系列 (N=3) 如下表所列：

胎牛血清白蛋白標準曲線各濃度配置表

No. (N=3)	Dilute protein standard (ml)	0.85% NaCl (ml)	Protein conc.($\mu\text{g/ml}$)
1	0	0.2	0
2	0.05	0.15	250
3	0.1	0.1	500
4	0.15	0.05	750
5	0.2	0	1000

4.1.3 各管檢品加入 2.2 ml Biuret 試劑 (含 0.75 mmol/L Cupric sulfate, 94 mmole /L sodium hydroxide 及 tartrate, iodide carbonate 等)，混合均勻後室溫下靜置 10 分鐘，接者各管檢品加入 0.1 ml Folin 試劑 (Ciocalten's phenol reagent)，混合均勻後室溫下靜置 30 分鐘，最後反應形成紫藍色，以紫外光分光光譜儀 (波長 = 550 nm) 檢測各檢品吸光值【光譜測定過程不可超過 30 分鐘】。

4.1.4 將所測得之各標準品吸光值扣除背景吸光值對應各濃度繪製一標準曲線，以作為檢品濃度測定之標準值。

4.2 人類微粒體酵素之蛋白質濃度測定方法流程如下所述：

4.2.1 將各批製備之微粒體酵素懸浮液以 0.85 % 氯化鈉溶液稀釋 50 倍，倘若濃度太高可提稀釋倍數至 500 倍 (過程於冰上操作)。

4.2.2 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。

4.2.3 後續反應過程如步驟 4.1.3，檢品吸光值扣除背景吸光

值，內插標準曲線可得到檢品蛋白質濃度，再乘以原來的稀釋倍數即得酵素蛋白濃度。

5. 科學中藥的配製

50 種科學中藥為三軍總醫院 93 年度的用藥量排名，給予藥量方式均為每次 0.4~1.2g，一天三次。故本研究濃度範圍擬設定為分別取 0.4g、0.8g 及 1.2g 的科學中藥溶於 200mL(模擬人服用時喝的水溶液量)37°C 的 Q 水中，配製濃度為 2mg/mL、4mg/mL、及 6mg/mL，實際上小量的做法則將科學中藥 10mg、12mg 及 12mg 分別溶於 5mL、3mL、2mL 37°C 的 Q 水中並以超音波震盪五分鐘，離心取上清液備用。

6. CYP3A 體外篩選模式的建立

本研究方法為利用 CYP3A 專一性的受質 testosterone 與 CYP3A 體外代謝反應生成 6 β -hydroxytestosterone 的變化來測定因加入中藥單方成分而導致 CYP3A 的活性的改變程度。

6.1 建立 6 β -hydroxytestosterone 的標準分析曲線

6.1.1 實驗的人肝微粒體酵素反應液包含 20mM 葡萄糖磷酸、2mM 核酞二磷酸腺酞、2 I.U. 葡萄糖磷酸去氫酵素、5mM 氯化鎂(MgCl₂)溶液、2.0mg/ml 微粒體酵素蛋白(經調整濃度)，與 0.1M 磷酸鹽緩衝溶液，反應液的總體積為 1mL。去蛋白化或終止反應是加入低溫之 Acetonitril(ACN) 1mL。

6.1.2 取 6 β -hydroxytestosterone stock solution 1mg/ml 80 μ L + 20 μ L dilute solvent (Methanol: Q water = 1:1)即成 6 β -hydroxytestosterone 工作液 (working solution, 800 μ g/mL)。

6.1.3 取上述 working solution 120 μ L 加入同體積的 dilute solvent，以序列稀釋作一組標準濃度依序為 400、200、100、50、20、10 μ g/mL，再以稀釋 20 倍方式加入已經去蛋白化(deprotein)的酵素標準反應液中，則標準濃度為 20、10、5、2.5、1、0.5 μ g/mL。

6.2 CYP3A 的活性分析(控制組)

6.2.1 配置 Testosterone 2mM 於 dilute solvent，取 50 μ L

加入步驟 6.1 之人肝微粒體酵素標準反應液 950 μ L 於冰浴下混和之，背景組則以 0.1M PBS 代替。

6.2.2 將上述混合液於 37 $^{\circ}$ C 水浴震盪 30 分鐘後，置於冰浴中以低溫之 ACN 終止反應，再加入內部標準品 Corticosterone(200 μ g/mL)後以 3900 \times g 離心 10 分鐘，取上清液以 LC/MS/MS 測定 6 β -hydroxytestosterone 的吸收值，並代入當次所製作 6 β -hydroxytestosterone 標準濃度曲線，求得 6 β -hydroxytestosterone 的生成量。

6.2.3 觀察每次實驗生成量的變化情形，以監測酵素模式的穩定性。

6.3 陽性控制組及科學中藥單方交互作用之篩選

6.3.1 陽性控制組(positive control)為將 Ketoconazole 工作液混合於步驟 6.2.1 之酵素反應溶液，使其最終濃度為 0.25 及 1 μ M，總反應體積 1mL。

6.3.2 實驗組為將步驟五配製的各種萃取濃度之科學中藥溶液 230 μ L 混合於人步驟 6.2.1 之酵素反應溶液，總反應體積 1mL。

6.3.3 將上述混合液於 37 $^{\circ}$ C 水浴震盪 30 分鐘後，置於冰浴中並以低溫之 ACN 終止反應，再加入內部標準品 Corticosterone (200 μ g/mL)後以 3900 \times g 離心 10 分鐘，取上清液以 LC/MS/MS 測定 6 β -hydroxytestosterone 的吸收值，並代入不同 6 β -hydroxytestosterone 濃度之標準曲線，求得 6 β -hydroxytestosterone 的生成量，此結果與控制組相比較以評估其對酵素代謝能力之影響。

參、結果

1. 人肝微粒體酵素蛋白質含量測定

1.1 胎牛血清白蛋白標準曲線

經由紫外光光譜分析此一線性濃度範圍為 250~1000 μ g/mL，其結果 $R \geq 0.99$ (如圖一及所示)。

1.2 微粒體酵素蛋白質含量測定：本研究所使用酵素檢品共兩批，

其測定結果為 94/05/26 所製備的 16mg/mL；94/08/08 所製備的 25.72 mg/mL。

2. 建立 CYP3A 酵素活性的分析方法

2.1 線性

經由 LC/MS/MS 測定 6 β -hydroxytestosterone 的標準曲線濃度範圍為 0.5 μ g/mL~20 μ g/mL。由標準曲線異日間(如表一)， $R \geq 0.99$ ，顯示本分析系統在所使用的濃度範圍內線性關係良好，且精密度(precision, %CV)與準確度(accuracy, %err)皆在標準值內。

2.2 準確度與精密度

異日間(n=4)之品管檢品(QC sample)的準確度(accuracy, %err)在 3%以內與精密度(precision, %CV)在 8%以內，皆符合標準值 15%以內，如表二所示。

3. 人肝微粒體進行中藥對西藥主要代謝酵素交互作用的篩選及評估模式

3.1 控制組(Control)

即為 testosterone 在不加任何中藥單方或陽性抑制劑下經由酵素代謝成 6 β -hydroxytestosterone 之生成量。取各控制組(共 16 天)做比較如圖二所示，結果顯示 6 β -hydroxytestosterone 的平均生成量為 10 μ g/mL \pm 0.66，CV%=6.57)，表此一酵素系統的活性穩定性可被接受。

3.2 陽性控制組(positive control)

本實驗以 CYP3A 陽性抑制劑 Ketoconazole 作為陽性控制組(positive control)，目的在監控實驗中微粒體酵素 CYP3A 活性的專一性與穩定性。配製濃度為 0.25 μ M 與 1 μ M。結果如表三所示(N=4)，由結果可知濃度在 0.25 μ M 時，抑制率為 68.5% \pm 0.98，CV 為 1.43；濃度為 1 μ M 時，抑制率為 89.5% \pm 0.82，CV 為 0.92。

4. 五十種單方科學中藥篩選評估

依上述交互作用之篩選方法操作，已完成 50 種單方科學中藥篩選評估，配製濃度為 2mg/mL、4mg/mL 與 6mg/mL 三種低中高不同濃度，抑制率結果如表四所示。其中對 CYP3A 有明顯的抑制效果有黃芩、牡丹皮、雞血藤，與黃耆，對人肝細胞 CYP3A 的影響(% of control)如表五，圖三、圖四、圖五、圖六所示。中等抑制

劑為辛夷花，其餘的 45 種科學中藥均無發現有明顯抑制效果。顯示黃芩、牡丹皮、雞血藤，與黃耆可抑制 CYP3A 酵素的代謝。

肆、討論

1. 科學中藥的配製

原先是以連續稀釋的方法配製低、中、高三種不同濃度，但因考慮高濃度的溶解度不佳，而在連續稀釋時導致中濃度與低濃度的誤差，所以改以分別秤 0.4g、0.8g 及 1.2g 的科學中藥溶於 200mL 水中，配製濃度為 2mg/mL、4mg/mL、及 6mg/mL，並以超音波震盪五分鐘，離心取上清液備用。

2. 萃取方式的比較

科學中藥黃芩及女真子以 37°C 水浴，分別萃取 5、10、15、30、45、60 分鐘與超音波震盪 5 分鐘作比較。結果顯示，在不同的萃取方式下，37°C 水浴分別萃取不同時間與超音波震盪 5 分鐘的萃取液對 CYP3A 活性的抑制效果並沒有顯著的差異。如表六、表七，圖七、圖八所示。

綜合上述結果，我們認為在中藥中的確存在可能和西藥產生交互作用的可能性，尤以顯著的抑制作用所造成的藥物毒性反應更為重要。因此次有抑制作用的單方製劑皆為常用於複方的成分，故預計於下年度由常用複方為標的作更進一步的篩選已獲得更實用的證據。

伍、結論與建議

本研究已順利達成預期目標如下：

1. 建立 CYP3A 酵素活性的分析方法
2. 建立以人肝微粒體進行中藥對西藥主要代謝酵素交互作用的篩選及評估模式
3. 已完成 50 種單方科學中藥篩選評估
4. 將於 95 年度進行動物實驗評估中藥對 CYP3A 之作用。

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CCMP94-RD-032)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. Bates DW, Cullen DJ, Laird N, Petersen LA, Small SD, Servi D, Laffel G, Sweitzer BJ, Shea BF, Hallisey R. Incidence of adverse drug events and potential adverse drug events: Implications for prevention. ADE prevention study group. *JAMA* 1995; 275:29-34.
2. Kohn LT, Corrigan JM, Donaldson MS, eds. To err is human: building a safer health system. Washington, D.C.: National Academy Press, 1999; 23: 27-29.
3. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN, Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998; 279:1200-1205.)
4. 4.J. Am. Geriatr. Soc, 1996; 44:944-48
5. Relling MV, Nemecek J, Schuetz E. et al: O-demethylation of epipodophyllotoxins is catalyzed by human cytochrome P450 3 A4 *Mol Pharmacol* 1994;45:352-358
6. Toffoli G, Simone F Gigante M. et al: Comparison of mechanisms responsible for resistance to idarubicin and daunorubicin in multidrug resistant LoVo cell lines. *Biochem Pharmacol* 1994;48:1871~1881
7. Wachter MJ, Chi-Yuan W. Benet LZ: Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P4503A and P-glycoprotein: Implications for drug delivery and activity In cancer chemotherapy. *Mol Carcinogen* 1995;13:129-134
8. Harris JW, Rahman A. Bok-Ryang K, et al: Metabolism of Taxol by human hepatic microsomes and liver slices: Participation of cytochrome P450 3A4 and unknown P450 enzyme. *Cancer Res*1994;54:4026-4035
9. Hendricks C, Rowinsky E, Grochow L , et al: Effect P-glycoprotein

- expression on the accumulation and cytotoxicity of topotecan (SK & F 104864), a new camptothecin analogue. *Cancer Res* 1992;52:2268-2278
10. Wils P, Phung B, Warney A. et al: Polarized transport of docetaxel and vinblastine mediated by P-glycoprotein in human intestinal epithelial cell monolayers. *Biochem Pharmacol* 1994;48:1528-1530
 11. Sparreboom A, Van Asperen J, Mayer U, et al: Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci* 1997; USA 94:2031-2035
 12. Borst, P.; Schinkel, A. H.; Smit, J. J. M.; Wagenaar, E.; Van Deemter, L.; Smith, A. J.; Eijdem, E. W. H. M.; Baas, F.; Zaman, G. J. R. Classical and novel forms of multidrug resistance and the physiological functions of P-glycoprotein in mammals. *Pharmacol. Ther.* 1993; 60: 289-299.
 13. Fojo, A. T.; Ueda, K.; Slamon, D. J.; Poplack, D. G.; Gottesman, M. M.; Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 1987; 84: 265-269.
 14. Thiebaut, F.; Tsuiuo, T.; Hamada, H.; Gottesman, M. M.; Pastan, I.; Willingham, M. C. Cellular localization of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987; 84: 7735-7738.
 15. Wacher, V. J.; Wu, C. -Y.; Benet, L. Z. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and cancer chemotherapy. *Mol. Carcinog.* 1995; 13: 129-34.
 16. Wacher, V. J.; Salphati, L.; Benet, L. Z. Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1996;20: 99-112.
 17. Murray, G. I.; Barnes, T. S.; Sewell, H. F.; Ewen, S. W. B.; Melvin, W. T.; Burke, M. D. The immunocytochemical localisation and distribution of cytochrome P-450 in normal human hepatic and extrahepatic tissues with a monoclonal antibody to human cytochrome P-450. *Br. J Clin. Pharmacol.* 1988; 25: 465-475.
 18. Fitzsimmons, M. E.; Collins, J. M. Selective biotransformation of the

- human immunodeficiency virus protease inhibitor saquinavir by human small-intestinal cytochrome P450 3A4. Potential contribution to high first-pass metabolism. *Drug Metab. Dispos.* 1997; 25: 256-266.
19. Tateishi, T.; Soucek, P.; Caraco, Y.; Guengerich, F. P.; Wood, A. J. J. Coichicine biotransformation by human liver microsomes. Identification of CYP3A4 as the major isoform responsible for coichicine demethylation. *Biochem. Pharmacol.* 1997; 53: 111-116.
 20. Wu, C.-Y.; Benet, L. Z.; Hebert, M. F.; Gupta, S. K.; Rowland, M.; Gomez, D. Y.; Wacher, V. J. Differentiation of absorption and first-pass gut and hepatic metabolism in humans: Studies with cyclosporine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1995;58:492-497.
 21. Kim, A. B.; Dintaman, J. M.; Waddell, D. S.; Silverman, J. A. Saquinavir, an HIV protease inhibitor, is transported by ~P-glycoprotein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; in press.
 22. Vincet J. Wacher, Jeffery A. Silverman, Yuanchao Zhang and Lesliw Z. Benet. Role of p-Glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptide and prptidomimetics. *J. Pharma. Sci.* 1998;87:1322-1330.
 23. Schuetz, E.G.; Schinkel, A. H.; Rolling, M. V.; Schuetz, J. D. P-glycoprotein, a major determinant of rifampicin-inducible expression of cytochrome P450 3A in mice and humans. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93: 4001-4005.
 24. Fricker, G.; Drewe, J.; Huwyler, J.; Gutmaun, H.; Beglinger, C. Relevance of P-glycoprotein for the enteral absorption of cyclosporin A, in vitro-in vivo correlation. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 118: 1841-1847.
 25. 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.
 26. 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.
 27. Eisenber DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Van R,

- Kessler RC. Trends in alternative medicine used in the United States, 1990-1997: results of a follow-up National Survey. *JAMA* 1998;280:1569-75
28. Barnes J, Mills SY, Abbot NC, Willoughby M and Ernst E. Different standards for reporting ADR to herbal remedies and conventional OTC medicines: face-t-face interviews with 515 users of herbal remedies. *Br. J. Clin. Pharmacol* 1998;45:496 -500
 29. 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*. 53(5):583-600, 2001.
 30. 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
 31. 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
 32. 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
 33. 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
 34. 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
 35. 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
 36. Yue QY. Bergquist C. Gerden B. Safety of St John's wort (*Hypericum perforatum*). *Lancet*. 2000;355(9203):576-7

柒、圖、表

表一、異日間(Between-run)標準曲線的資料

Run Number	Back-calculated concentration of standards						Slop	Intercept	r
	濃度(μg/mL)								
	0.5	1	2.5	5	10	20			
1	0.41	1.09	2.66	5.16	10.3	19.4	0.0436	0.0139	0.9995
2	0.49	1.01	2.52	4.91	10.3	19.8	0.0413	0.0033	0.9997
3	0.4	1.16	2.36	5.6	10.2	19.3	0.0357	0.0141	0.9988
4	0.44	1.03	2.46	5.72	10.1	19.3	0.0474	0.0047	0.9977
Mean	0.43	1.07	2.50	5.35	10.23	19.45			
S.D.	0.04	0.07	0.13	0.38	0.10	0.24			
CV	9.28	6.30	5.02	7.07	0.94	1.22			
Relative Error(%)	-13.15	7.25	0	6.95	2.25	-2.75			

表二、異日間(Between-run)品管檢品(QC sample)的分析結果

Splick Concentration (μg/mL)	濃度(μg/mL)				Mean	S.D.	CV	Relative Error(%)
1.5	1.38	1.59	1.52	1.67	1.54	0.12	7.99	2.67
8	7.92	7.79	8.12	8.43	8.07	0.28	3.45	0.81
15	14.5	15.8	15	15.6	15.23	0.59	3.88	1.50

表三、正控制組對人肝細胞 CYP3A 的影響 (n=3)

	(% of control)		
	Mean	S.D.	CV(%)
Ketoconazole-0.25uM	31.59	1.25	3.95
Ketoconazole-1uM	10.23	0.85	8.31

表四、50種常用科學中藥(第1~25名) 對人肝細胞CYP3A的影響(% of control)

科學中藥編號	中文名稱	2mg/mL			4mg/mL			6mg/mL		
		Mean	S.D.	CV (%)	Mean	S.D.	CV (%)	Mean	S.D.	CV (%)
1	黃芩	22.77	1.47	6.48	7.32	0.96	13.18	1.96	0.08	3.93
2	酸棗仁	86.77	5.60	6.45	112.48	9.57	8.51	73.54	18.71	25.45
3	續斷	92.44	6.36	6.88	93.79	6.46	6.88	70.76	8.99	12.71
4	牡丹皮	9.33	1.05	11.30	6.56	0.10	1.52	5.89	1.02	17.40
5	黃耆	13.24	0.83	6.25	11.22	1.10	9.78	11.01	1.16	10.58
6	雞血藤	7.14	0.83	11.58	5.08	0.56	11.10	2.41	0.21	8.72
7	澤瀉	90.30	3.87	4.28	80.37	0.57	0.71	80.10	5.76	7.19
8	川牛七	89.86	7.05	7.85	87.70	5.91	6.74	84.34	1.84	2.18
9	白芍藥	94.66	6.37	6.73	92.53	4.03	4.35	82.70	4.56	5.51
10	枳殼	83.28	7.42	8.91	75.79	10.39	13.71	67.37	2.20	3.27
11	杜仲	90.23	4.56	5.06	84.46	5.74	6.79	88.11	8.11	9.20
12	女真子	93.06	1.80	1.94	84.97	3.57	4.21	84.57	1.34	1.59
13	恬樓實	100.67	7.64	7.59	100.67	6.55	6.51	89.65	0.49	0.54
14	玉竹	106.29	11.80	11.10	101.34	9.76	9.63	117.98	1.62	1.37
15	桑寄生	94.26	0.52	0.56	106.39	7.54	7.09	109.50	1.62	1.48
16	茯苓	112.79	12.78	11.33	112.68	4.01	3.56	114.45	2.12	1.85
17	威靈仙	111.97	6.39	5.70	100.81	8.33	8.27	92.94	12.97	13.96
18	石斛	88.58	3.75	4.23	80.59	9.66	11.99	77.65	3.40	4.38
19	淮牛七	95.29	2.04	2.14	96.68	4.01	4.15	93.53	1.57	1.68
20	山梔子	88.30	8.71	9.86	99.07	3.81	3.84	88.10	5.06	5.74
21	北沙參	95.29	0.75	0.79	95.02	4.71	4.96	85.12	11.80	13.87
22	川芎	83.04	6.91	8.32	77.61	6.74	8.68	75.99	4.96	6.53
23	白僵蠶	94.27	0.67	0.71	91.73	1.31	1.43	88.69	1.79	2.02
24	倒地蜈蚣	93.92	0.45	0.48	90.77	3.08	3.40	85.33	1.84	2.15
25	金銀花	91.09	0.81	0.88	90.16	3.04	3.37	86.15	0.97	1.13

表四、(續)50種常用科學中藥(第26~50名)對人肝細胞 CYP3A 的影響
(% of control)

科學 中藥 編號	中文名稱	2mg/mL			4mg/mL			6mg/mL		
		Mean	S.D.	CV(%)	Mean	S.D.	CV(%)	Mean	S.D.	CV(%)
26	石菖蒲	90.03	2.20	2.45	84.18	2.91	3.45	80.39	1.77	2.20
27	杏仁	94.07	3.87	4.11	97.70	5.54	5.67	104.42	0.55	0.52
28	連翹	94.38	1.86	1.97	92.08	1.15	1.25	87.48	4.31	4.92
29	麥門冬	116.72	3.32	2.85	110.73	4.13	3.73	94.13	3.02	3.21
30	黨參	111.99	7.65	6.83	108.83	2.50	2.30	100.63	2.19	2.17
31	貝母	104.10	2.84	2.73	99.68	2.89	2.90	102.21	3.41	3.34
32	桑葉	88.48	3.13	3.54	81.06	4.24	5.23	69.74	4.34	6.22
33	火麻仁	86.30	2.21	2.56	77.82	16.57	21.29	98.88	12.39	12.53
34	厚朴	87.59	4.78	5.46	75.45	6.37	8.45	72.57	3.09	4.26
35	山楂	89.21	0.50	0.55	89.70	2.52	2.81	84.79	14.49	17.09
36	西瓜絡	94.29	12.43	13.18	85.25	5.01	5.88	92.84	4.20	4.53
37	麥芽	96.53	0.50	0.52	99.42	1.80	1.82	98.55	2.18	2.21
38	遠志	100.31	3.16	3.15	94.76	5.08	5.36	92.14	0.81	0.88
39	貴枝	90.90	5.30	5.83	85.42	1.34	1.57	81.83	1.48	1.81
40	夏枯草	96.90	2.74	2.83	96.02	3.58	3.73	83.21	4.82	5.79
41	生地黃	92.90	3.78	4.07	85.04	6.21	7.30	82.28	1.77	2.16
42	龍骨	101.45	3.63	3.58	100.14	2.85	2.84	103.72	6.78	6.54
43	白朮	97.55	1.23	1.26	96.10	2.39	2.49	93.21	3.36	3.61
44	半夏	99.51	2.25	2.26	102.29	4.84	4.73	100.33	2.26	2.26
45	桃仁	95.49	0.43	0.45	93.10	3.79	4.07	96.24	5.08	5.28
46	蒼朮	91.34	2.34	2.56	93.30	0.11	0.12	87.71	1.82	2.08
47	當歸	94.77	2.23	2.35	84.74	1.52	1.79	88.89	2.32	2.62
48	鈎藤	94.48	1.78	1.89	88.69	5.38	6.06	78.07	4.74	6.08
49	檳榔	93.40	3.28	3.52	80.72	2.61	3.24	70.88	0.55	0.78
50	辛夷花	66.76	2.10	3.15	49.74	1.78	3.57	39.97	1.36	3.41

表五、對人肝 CYP3A 有明顯抑制效果的四種常用科學中藥(% of control)

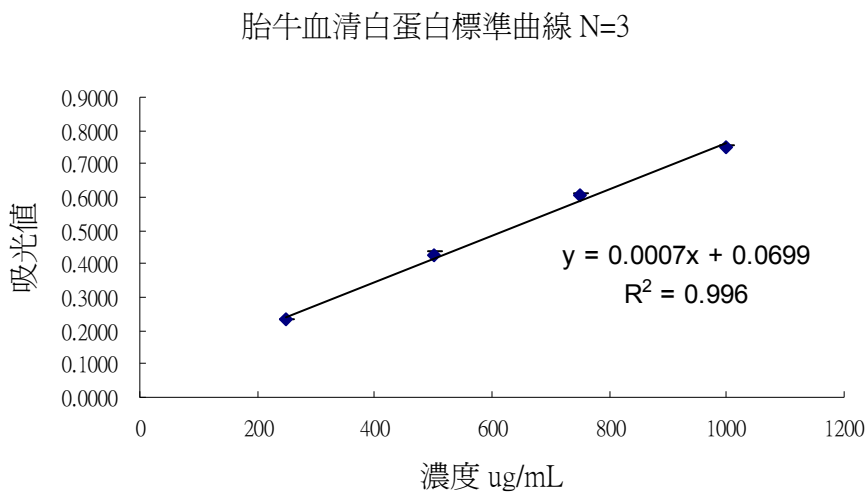
科學中藥編號	中文名稱	2mg/mL			4mg/mL			6mg/mL		
		Mean	S.D.	CV(%)	Mean	S.D.	CV(%)	Mean	S.D.	CV(%)
1	黃芩	22.77	1.47	6.48	7.32	0.96	13.18	1.96	0.08	3.93
4	牡丹皮	9.33	1.05	11.30	6.56	0.10	1.52	5.89	1.02	17.40
5	黃耆	13.24	0.83	6.25	11.22	1.10	9.78	11.01	1.16	10.58
6	雞血藤	7.14	0.83	11.58	5.08	0.56	11.10	2.41	0.21	8.72

表六、黃芩之不同萃取方式比較表

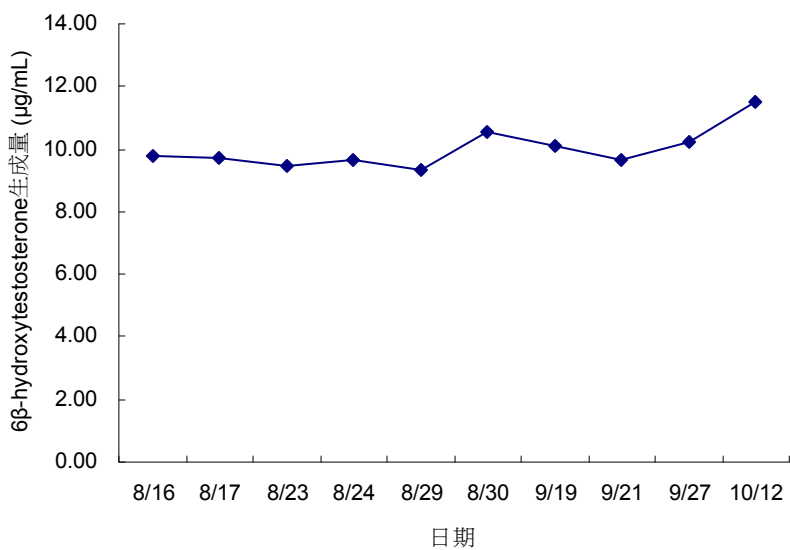
黃芩- 4mg/mL	% of control		
	Mean	S.D	CV(%)
37°C-5 分鐘	6.25	0.21	3.34
37°C-10 分鐘	6.15	0.53	8.66
37°C-15 分鐘	5.88	0.42	7.10
37°C-30 分鐘	5.46	0.54	9.93
37°C-45 分鐘	4.91	0.39	7.86
37°C-60 分鐘	4.95	0.19	3.78
超音波 5 分鐘	7.32	0.96	13.18

表七、女真子不同萃取方式比較表

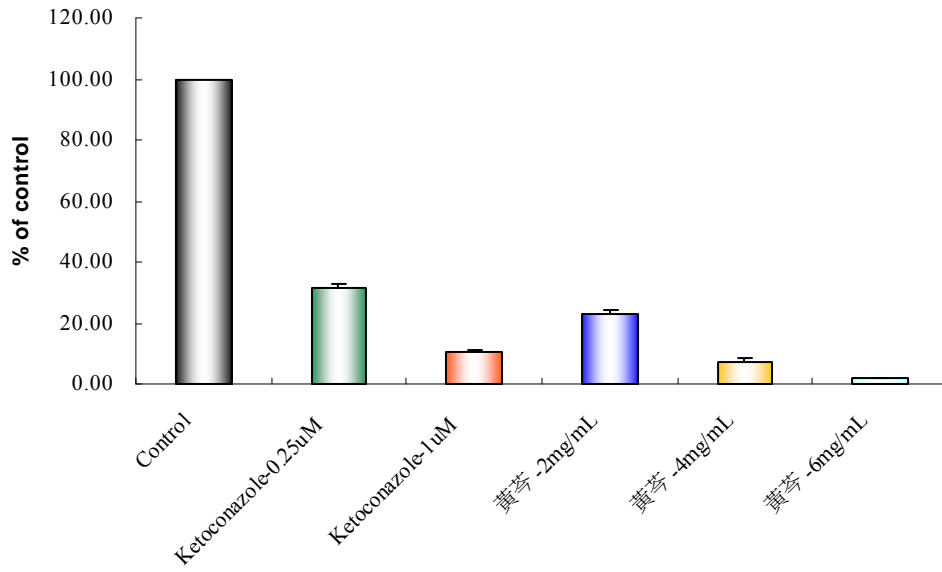
女真子- 4mg/mL	% of control		
	Mean	S.D	CV(%)
37°C-5 分鐘	92.32	6.30	6.83
37°C-10 分鐘	94.00	1.26	1.34
37°C-15 分鐘	93.53	2.04	2.18
37°C-30 分鐘	94.22	3.10	3.29
37°C-45 分鐘	87.84	9.39	10.69
37°C-60 分鐘	86.54	7.10	8.21
超音波 5 分鐘	86.63	0.23	0.27



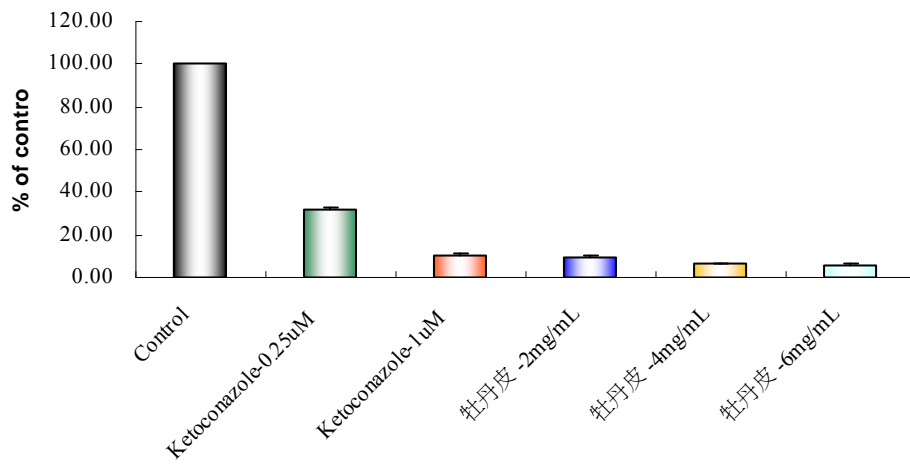
圖一、白蛋白標準濃度分析曲線



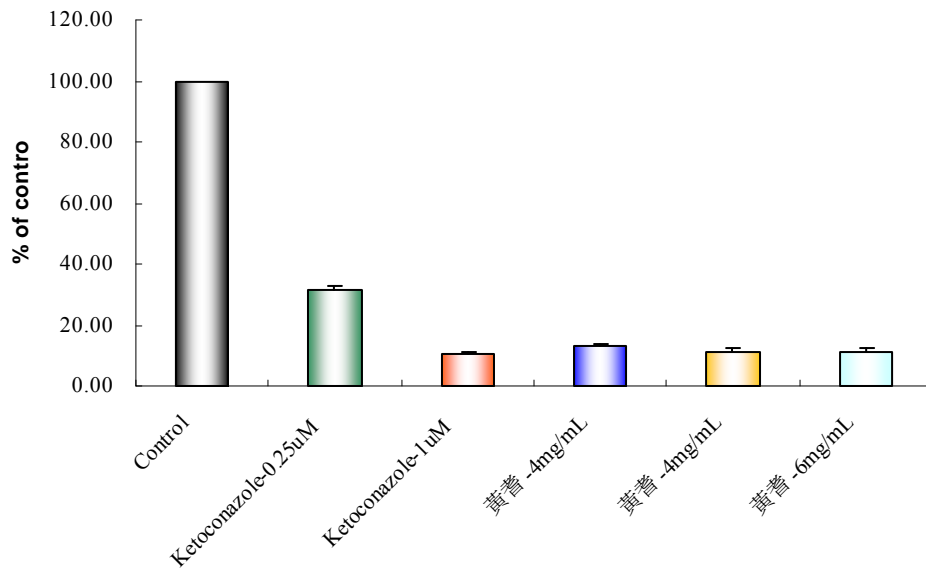
圖二、各正控制組的比較圖(n=3)



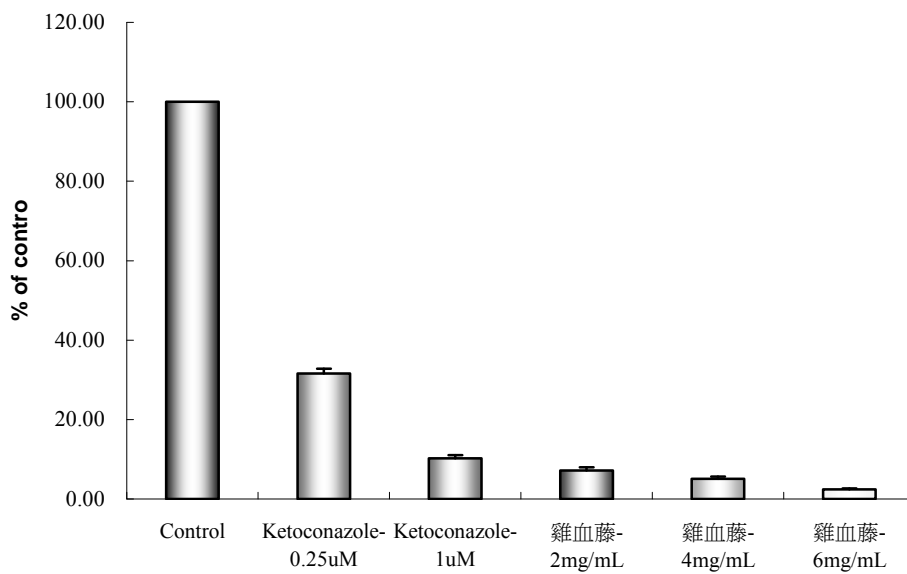
圖三、黃芩對人肝細胞 CYP3A 的影響



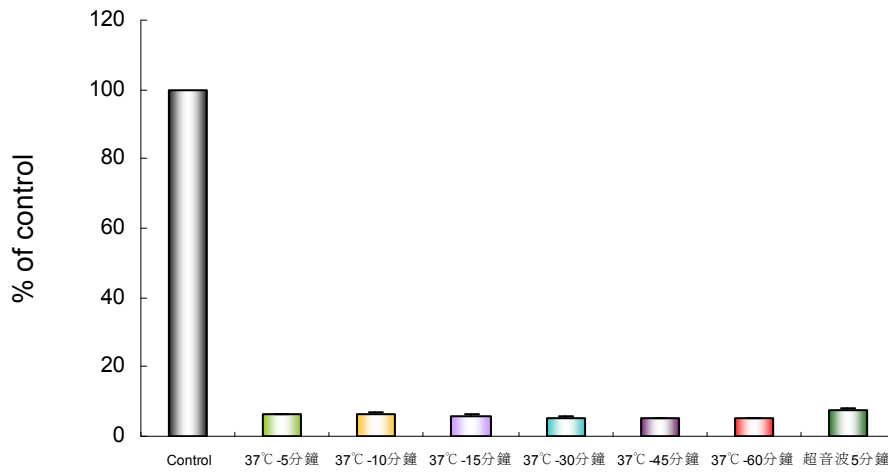
圖四、牡丹皮對人肝細胞 CYP3A 的影響



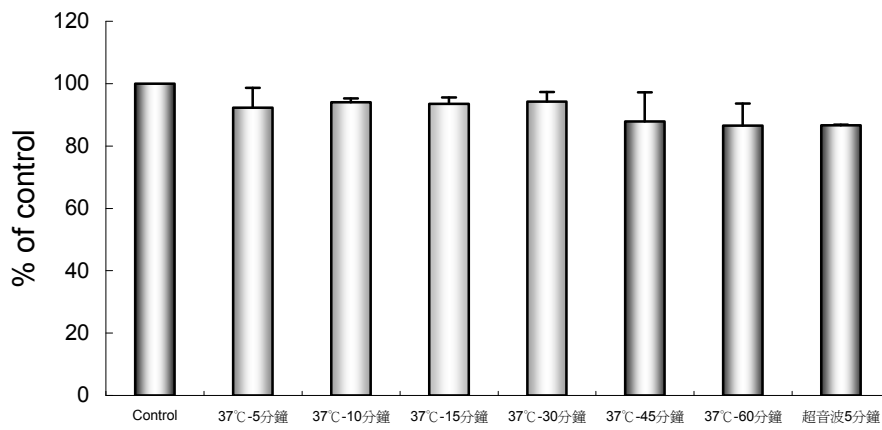
圖五、黃耆對人肝細胞 CYP3A 的影響



圖六、雞血藤對人肝細胞 CYP3A 的影響



圖七、黃芩不同萃取方式比較圖



圖八、女真子不同萃取方式比較圖

