

編號：CCMP95-TP-017

## 桔梗、甘草、黃芩、丹參等 和抗癌藥的交互作用

朱紫汀

中國醫藥大學

### 摘 要

本計畫之目的乃以大鼠藥動模式評估紫杉醇、黃芩、甘草、桔梗、丹參、六味地黃湯、補中益氣湯的交互作用，以提供中西藥合併服用安全性的資料，也從這些單味藥或方劑中發掘一些成分，可能和抗癌西藥併用，以增加其療效，減少抗癌西藥的用量；除了可以節省醫療費用外，也可能降低癌症病人服用抗癌西藥的不適症狀，改善其生活品質，作為未來衛生主管機構對於中西藥併用於特殊疾病，如癌症用藥之參考資訊。

本計畫之方法包括：30 分鐘前灌食大鼠中藥水煮沸液後再灌食紫杉醇，進行藥動試驗，以 HPLC 分析血液樣品紫杉醇濃度的變化，觀察是否有中西藥交互作用。之後再選擇黃芩和其指標成份，一天一次或一天二次經十日餵服後，再灌食紫杉醇，進行藥動試驗，觀察是否有中西藥交互作用。另外以具抗藥（紫杉醇）性細胞株，檢測上述中藥合併紫杉醇是否影響紫杉醇對該細胞株的  $IC_{50}$ 。

以大鼠藥動的實驗結果看出，上述六種中藥，任一種於 30 分鐘前餵服，之後和口服紫杉醇沒有交互作用，但黃芩經十日，一天一次餵服後和口服紫杉醇出現交互作用，如增加餵服頻率至一天二次，十日後和口服紫杉醇出現顯著的 ( $P \leq 0.05$ ) 交互作用（增加紫杉醇  $C_{max}$ 、AUC）。黃芩的指標成分之一，黃芩苷，於 30 分鐘前或經十日，一天一次餵服後和口服紫杉醇都產生顯著的交互作用。黃芩或黃芩苷第一次被發現，在特定情形下和紫杉醇出現顯著的交互作用。黃芩為幾千年來使用的中藥，安全性高，未來能否成為合併紫杉醇治療的理想搭配有待更多的動物實驗結果。純化合物黃芩苷的交互作用結果，可提

供更多機轉方面的資訊以解釋黃芩的功效。黃芩、桔梗、丹參、補中益氣湯和三種純化合物(黃芩苷、黃芩素、環孢靈)均顯著地降低紫杉醇對抗藥性細胞株的  $IC_{50}$ 。如何使用中藥以增加紫杉醇療效，減少紫杉醇用量有待更多的實驗結果。

關鍵詞：中西藥交互作用、黃芩、紫杉醇

Number: CCMP95-TP-017

# **Drug Interactions of Several Traditional Chinese Medicine and Anti-cancer Drug**

Zy-Ting Chu

China Medical University

## **ABSTRACT**

The aim of the project is to use rat as a model to evaluate the effects of traditional Chinese Medicin (TCM) such as Huang Qin (*Scutellerie baicalensis Georgi*), Dan Shen, or licorice root etc on the pharmacokinetics (PK) of paclitaxel. Such TCM-drug interaction results can provide safety information when any of the above commonly used TCM is given together with anti-cancer drug, paclitaxel. At the mean time, it is possible to identify some active ingredients from the above Chinese medicines to potentiate the effectiveness of paclitaxel or lower its effective dosage, in order to save the chemotherapy cost, reduce the side effects caused by paclitaxel, and improve the quality of life of treated cancer patients.

Decoction of Huang Qin, Dan Shen, or licorice root etc. was given orally to rats followed by oral pacliaxel administration for the study of drug-drug interaction. Blood sample was taken at each different time point for HPLC analysis to determine its paclitaxel concentration. Decoction of Huang Qin or pure compound baicalin was given orally once or twice a day to rats for 10 days, followed by oral administration of paclitaxel for the study of drug-drug interaction. Drug (paclitaxel) resistant human cell line was added with paclitaxel alone or paclitaxel together with the traditional Chinese Medicine decoction to evaluate if any of the decoction would influence the  $IC_{50}$  values of paclitaxel.

According to the rat PK results, any of the above TCM when given 30 minutes before the oral paclitaxel administration, no TCM-drug interaction was observed.

When decoction of Huang qin was given once a day for 10 days, interaction was observed. When the feeding frequency increased to twice a day, significant ( $P \leq 0.05$ ) interaction was observed. For baicalin, no matter it was given 30 minutes before or once a day for 10 days, significant interaction was noticed. To our understanding, it is the first time that such results were reported. Huang qin has been used widely by Chinese for over a thousand years. Whether it can be used together with paclitaxel to improve its anticancer effects or bring benefit to cancer patients will be very interesting for us to study further. According to the results of cytotoxicity assay using drug resistant cell line, Huang Qin, JieGeng, Dan Shen, Bu Zhong Yi Qi, baicalin, baicalein, cyclosporine all significantly decreased the  $IC_{50}$  values of paclitaxel.

Keywords: herb-drug interactions, paclitaxel, scutellariae baicalein

## 壹、前言

人類肝臟、小腸中含有許多細胞色素酵素 (Cytochrome P-450, CYP 450) 負責本身化合物和服用的食物、藥物等之代謝作用。若併用兩種都經由同類 CYP 450 代謝的中草藥和西藥時，會因為彼此的競爭、抑制、誘發、或破壞酵素等複雜的交互作用而改變 (包括提高或減低) 西藥的血中濃度及生體可用率。複雜的交互作用導致的可能壞處為，服用西藥的病人因藥物過量而發生身體不適、中毒之情形，或因西藥藥量不足而導致沒有達到預期的療效。後者的範例在國外多種期刊登載，即改善憂鬱症的聖約翰草 (St. John's wort) 的萃取物和喜樹鹼 (camptothecins) 類的抗癌藥物併用造成病人血液內喜樹鹼濃度過低而療效不彰<sup>(1-3)</sup>。

紫杉醇為自 1990 年以來最重要的抗癌藥物之一。對卵巢癌、乳腺癌、肺癌、頭頸癌、鼻咽癌、食道癌、胃癌、膀胱癌等均具療效，在台灣的銷售額約 2-3 億臺幣，全世界的銷售額約為 2-3 億美元。癌症病人於接受化療後除了共通性的骨髓抑制不良反應外，會因不同化療藥物而有不同副作用。紫杉醇的副作用除了骨髓抑制，還包括噁心、嘔吐、口腔潰瘍、食慾不振、身體衰弱等<sup>(4,5)</sup>。病人於化療後常服用中草藥或健康食品以緩解身體的不適、或補血益氣，以提昇免疫力和體力。單味藥黃芩、甘草、丹參常出現於補益類的藥方中，而且許多文獻也報導它們各別有抗發炎和抗癌的效果<sup>(6-9)</sup>，而甘草常用於緩解化療後的口腔潰瘍<sup>(10)</sup>。方劑六味地黃丸、補中益氣湯對減輕化療後的毒副反應和食慾不振及增加免疫力均有助益<sup>(11)</sup>。因此研究這些中草藥和紫杉醇的交互作用有其必要性。

本計畫不僅研究紫杉醇和上述中草藥交互作用可能的負面影響，亦研究可能的正面影響。因為中草藥和西藥併用也可能帶來好處，例如因中草藥、抗癌藥物併用，而提高抗癌藥物效果，或減半抗癌藥物使用劑量。雖然目前看到僅止於基礎研究的一些文獻，不過以純化合物 (西藥) 併用抗癌藥物以增加抗癌藥物效果的文獻很多，例如 van Asperen J 等<sup>(12)</sup>學者於 1998 年以小鼠試驗發現環孢靈和紫杉醇併用能增加紫杉醇的血中濃度。Meerum Terwogt JM 等<sup>(13)</sup>學者於 1999 年以人體試驗得到類似結果，也是近十年的熱門研究題目。如以同樣的概念應用到中草藥，對未來發展中草藥成為抗癌輔助藥可提供一個新的思考方向。

此外，如賴妙英等 14 學者以大鼠試驗中草藥併用西藥，發現黃芩

水煮液和環孢靈同時經口給予大鼠，黃芩水煮液導致環孢靈的血中濃度降低。但有趣的是，純化合物黃芩素或黃芩苷和環孢靈一同併用卻能導致環孢靈的血中濃度增加，顯示單味藥黃芩和其中一些主要成分雖然都可影響（降低或增加）另一藥物之血中濃度，但影響的效果和程度不同，值得更深入的探討。而單味藥黃芩、含黃芩的方劑或其中一些主要成分能否影響抗癌藥物（紫杉醇）的血中濃度亦值得研究，將於本計畫中探討。

本計畫將以大鼠模式測試上述中草藥是否影響紫杉醇的血中濃度以提供體內的 PK 資訊；以細胞株檢測上述中草藥否影響紫杉醇對細胞株的  $IC_{50}$  提供細胞毒性的資訊；以人類腫瘤細胞植入裸鼠的動物模式（xenograft model），檢測上述中草藥和紫杉醇併用是否更有效的抑制腫瘤細胞生長，提供體內的 PD 資訊。最後結合三方面的數據作為本計畫的研究結果，期望能對未來癌症病人於併用中草藥之用藥安全性提供有用的資訊，對中草藥與抗癌西藥併用的研究提供具有參考價值的報告。

## 貳、材料與方法

### 一、單味藥（黃芩、甘草、桔梗、丹參）和方劑（六味地黃、補中益氣湯）藥材的採購和基原鑑定

自中藥行採購以上之藥材，取一部份先經基原鑑定無誤後，進行製備水煮液。六味地黃、補中益氣湯方劑各只鑑定其中三味藥；六味地黃為熟地、澤瀉、牡丹皮；補中益氣湯為黃耆、當歸、柴胡。

### 二、單味藥和方劑水煮液製備方法

- ↓ 秤藥材（飲片或方劑 50~400g）。
- ↓ 加入 20 倍的二次水。
- ↓ 浸泡藥材一個晚上（至少六小時）。
- ↓ 隔天煮藥：先開大火使水煮沸，待沸騰後，轉小火並保持水持續燒滾狀態。計時 3 小時。
- ↓ 煮完 3 小時，趁熱過濾。水煎液約剩一半。
- ↓ 之前已水煮一次藥材加入二次水 1 公升（二次）。
- ↓ 重覆以上水煮、過濾之過程。水煎液約剩一半。
- ↓ 重複再水煮第三次（三次）。
- ↓ 趁熱過濾後的濾液靜置沉澱（約需半天）。
- ↓ 將上清液以漏斗過濾（濾紙二次過濾）。
- ↓ 將全數二次過濾濾液混合，減壓濃縮至預設濃度/體積。
- ↓ 分裝、冷藏。

六味地黃和補中益氣湯的成份及比例

六味地黃		補中益氣湯	
處方	重量 (g)	處方	重量 (g)
熟地黃	16	黃耆	12
山茱萸	8	人參	8
山藥	8	白朮	4
澤瀉	6	炙甘草	8
牡丹皮	6	當歸	4
茯苓	6	陳皮	4
		升麻	2
		柴胡	2
總和	50		44

### 三、以薄層層析鑑別丹參水煮液中指標成份之方法

#### (一) 鑑別黃芩、甘草、丹參

取對照標準品 baicalin, baicalein 溶液和黃芩水煮液，各點注於薄層層析板。展開溶媒為正丁醇：水：冰醋酸= 7：2：1；展開距離為 8 公分。以短波 UV (254 nm) 檢出，並照相存檔。取對照標準品 glycyrrhizin 溶液和甘草水煮液，各點注於薄層層析板。展開溶媒為正丁醇：水：冰醋酸= 7：2：1；展開距離為 8 公分。以短波 UV (254 nm) 檢出，並以數位相機照相存檔。製備丹參乙醚萃取液為對照液，取丹參粉末 2.0g，加乙醚 30ml，超音波振盪 30 分鐘，過濾取濾液，揮乾乙醚，殘留物加 1ml 乙酸乙酯使溶解。另外購買丹參酮 II A 標準品，配製 1.2mg/ml 醋酸乙酯溶液，作為對照品。吸取乙醚萃取液、丹參酮 II A、丹參水煮液三種溶液各 20 $\mu$ l，分別點於同一矽膠 G 薄層板上，以二氯甲烷—醋酸乙酯 (19：0.5) 為展開劑，展開，取出，晾乾。拍照存檔。

#### (二) 鑑別六味地黃

取熟地黃、山茱萸、和牡丹皮藥材各 7.5g 左右，分別置於不同的圓底燒瓶，加入甲醇約 20mL 於水浴中加熱迴流 60 分鐘，俟冷後過濾，定容至 10mL，供作六味地黃對照藥材溶液。吸取甲醇萃取液和六味地黃水煮液二種溶液各 20 $\mu$ l，分別點於同一矽膠 G 薄層板上，以正丁醇：水：冰醋酸 (比例各甲醇萃取液稍



有不同)為展開劑,展開,取出取出薄層板,呈色(呈色劑不同,請見結果那部分的說明)、晾乾。拍照存檔。

### (三)鑑別補中益氣湯

取當歸、柴胡、黃耆藥材各 7.5g 左右,分別置於不同的圓底燒瓶,加入甲醇約 30mL 於水浴中加熱迴流 60 分鐘,俟冷後過濾,定容至 10mL,供作補中益氣湯對照藥材溶液。吸取甲醇萃取液和補中益氣水煎液二種溶液各 20 $\mu$ l,分別點於同一矽膠 G 薄層板上,以氯仿或氯仿:甲醇:水(30:10:1)為展開劑,展開,取出薄層板,呈色(呈色劑不同,請見結果那部分的說明)、晾乾。拍照存檔。

## 四、HPLC 分析方法以測量血液中紫杉醇濃度

配製不同濃度(10, 25, 250, 1,000, 5,000, 10,000ng/ml)的紫杉醇標準品,溶於乙腈(acetonitrile)直接經 HPLC 分析,建立標準曲線;同樣一系列的紫杉醇標準品溶於血清,經液相萃取(liquid-liquid extraction)後,HPLC 分析,建立標準曲線。HPLC 分析管柱為 C18 column; mobile phase 為 45-50%乙腈;流速為 1mL/min。內標使用 cephalomannine 溶液。

大鼠之 PK 血清檢體,加入內標,經液相萃取、HPLC 分析,結果和標準曲線比對,計算其中紫杉醇濃度。

## 五、建立大鼠之 PK 評估方法(給藥抽血等)、執行大鼠之藥動實驗

### (一)短期(30 分鐘前)餵服中草藥再和口服紫杉醇進行交互作用之藥動實驗

經數個前試驗,選定灌食大鼠的紫杉醇劑量後,進行中草藥和紫杉醇併用之藥動實驗。灌食一定劑量的黃芩、甘草、桔梗、丹參或六味地黃、補中益氣水煎液,30 分鐘後,給予 30mg/kg 紫杉醇溶液,於 0.5, 1.5, 2.5, 4, 6, 8, 12 小時,共 7 點,以尾巴抽血約 1ml,離心、取上清液(血清)、冷凍, HPLC 分析。依得到的數據計算各個 ACU,  $C_{max}$ , 並繪圖、比較、計算統計上顯著與否(P 值)。單味藥材和複方水煎液實際給予大鼠的劑量列於下表:

	黃芩	甘草	桔梗	丹參	六味地黃	補中益氣	環孢靈(西藥)
人一般劑量/每日(g)	18	20	10	15	25	25	3-30 mg/Kg
換算大鼠一般劑量(g/Kg)	1.8	2	1	1.5	2 g	2	18-187mg/Kg
實際給大鼠劑量(g/Kg)	2	2	1	1	2	2	10mg/Kg

換算大鼠一般劑量：一人一日之劑量（參考中醫藥資訊網或中醫藥書籍）除以體重（60Kg）乘以 6.25

## (二) 長期（十日）給予中藥再和口服紫杉醇進行交互作用之藥動實驗

一日一次灌食一定劑量的黃芩水煮液十日後，第十一日進行黃芩水煮液和紫杉醇合併口服之藥動實驗，抽取 7 個血點，取上清液，進行 HPLC 分析；重覆同樣長期實驗，但以黃芩苷溶液（baicalin）替代黃芩水煮液。另外，一日二次灌食一定劑量的黃芩水煮液十日後，第十一日進行黃芩水煮液和紫杉醇合併口服之藥動實驗，抽取 7 個血點，取上清液，進行 HPLC 分析，依得到的數據計算各個 ACU,  $C_{max}$ ，並繪圖、比較、計算統計上顯著與否（P 值）。

## 六、以具抗藥（紫杉醇）性細胞株，檢測單味藥或方劑與紫杉醇合併後是否影響紫杉醇對此細胞株的 $IC_{50}$

抗藥性細胞株（NCI/ADR-RES）培養在 96-孔盤，24 小時後，加入不同濃度（連續 2 倍稀釋）的紫杉醇，4 天後加入 MTT 試劑，經 4 小時，再加入異丙醇（Isopropanol）呈色，以 spectrophotometry（Biotek Synergy）機器於波長 562nm 讀取數 O.D. 值，並計算  $IC_{50}$ （定義：抑制 50% 細胞生長之藥物濃度）。另外，抗藥性細胞株加上不同濃度（連續稀釋）的紫杉醇和固定濃度的中草藥水煮液，4 天後經 MTT 試劑得到 O.D. 值，計算  $IC_{50}$  是否因加上中草藥水煮液而改變。中草藥水煮液使用之濃度如下：

中草藥水煮液	濃度(μg/mL)	化合物溶液	濃度(μg/mL)
黃芩	112.5	黃芩苷 (baicalin)	26.25
甘草	750	黃芩素 (baicalein)	4
桔梗	450	環孢靈	2
丹參	187.5		
六味地黃	375		
補中益氣	525		

## 參、結果

### 一、單味藥和方劑的基原鑑定

黃芩、甘草、丹參、熟地、澤瀉、牡丹皮；黃耆、當歸、柴胡之基原鑑定結果(照片)由郭昭麟老師提供。避免本報告的電子檔太大，已附於95年期末報告的黃芩、甘草省略，只附牡丹皮和當歸的結果(照片)，請參見圖一、二。

### 二、單味藥和方劑的水煮液製備

上述中藥經水煮、濃縮後，約估濃度列表如下：

	黃芩	甘草	桔梗	丹參	六味地黃	補中益氣
濃度 (g/mL)	0.25	0.5	1	1	0.51	0.9

以濃縮前之水煮液進行薄層層析(TLC)實驗；以濃縮後之水煮液進行大鼠之藥動實驗。

### 三、以薄層層析(TLC)鑑別水煮液中指標成份之方法

已附於95年期末報告的黃芩、甘草之結果不再列入。丹參乙醚萃取液、丹參酮II A 醋酸乙酯溶液、和丹參水煮液，點注於薄層層析板，以二氯甲烷：乙酸乙酯=19：0.5展開8公分。H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/EtOH(1：1) spray reagent，105°C加熱2分鐘呈色拍攝存檔。實驗結果請參見圖三。丹參酮II A 水溶性差不是丹參水煮液理想的對照品，但目前只買到丹參酮II A。乙醚萃取液即表現丹參酮II A 斑點。丹參水煮液於TLC實驗之濃度可能太低。

六味地黃選其中三味藥材，熟地黃、牡丹皮、山茱萸作鑑別。熟地黃之甲醇迴流液和六味地黃水煮液點注於薄層層析板以正丁醇：水：冰醋酸=7：2：1展開，H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/EtOH(1：1) spray reagent，105°C加熱2分鐘呈色拍攝存檔。牡丹皮甲醇迴流液和六味地黃水煮液點注於薄層層析板以正丁醇：水：冰醋酸=4：5：1展開，H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/EtOH(1：1) spray reagent，105°C加熱2分鐘呈色拍攝存檔。山茱萸迴流液和六味地黃水煮液以正丁醇：水：冰醋酸=7：2：1展開，置紫外光(254nm)燈下檢視。三味藥材以山茱萸結果最清晰。請參見圖四。

補中益氣湯只選其中三味藥當歸、柴胡、黃耆作鑑別。當歸甲醇迴流液和補中益氣湯點注於薄層層析板，以氯仿展開，置紫外光(366nm)燈下檢視。柴胡甲醇迴流液和補中益氣湯以正丁醇：水：冰醋

酸=4:5:1 (上層液) 展開，以正丁醇:水:冰醋酸=4:5:1 展開， $H_2SO_4/EtOH$  (1:1) spray reagent,  $105^\circ C$  加熱 2 分鐘呈色，並置紫外光 (366nm) 燈下檢視。黃耆迴流液和補中益氣湯以氯仿:甲醇:水=30:10:1 展開，置紫外光 (254nm) 燈下檢視。請參見圖五。

#### 四、建立 HPLC 分析方法以測量血液中紫杉醇濃度

以不同濃度 (10~10,000ng/ml) 紫杉醇乙腈溶液直接經 HPLC 分析，或以不同濃度紫杉醇加入血清樣品後，再經液相萃取 (liquid-liquid extraction)，建立標準曲線，另配製低、中、高 (50, 500, 10000ng/ml) 三個不同濃度紫杉醇加入血清樣品做品管 (QC)，經液相萃取，測試日間 (inter-day) 準確性 (accuracy) 和精確度 (precision, CV%)，每一次品管測試，每種濃度有五重複 (N=5)，如此共測試四次，得到之值均 $\leq \pm 10.6\%$ ，請參見下表。

N=5, 4-day	50 ng/mL	500 ng/mL	10000 ng/mL
accuracy	106.5	110.6	107.5
CV %	9.2	5.6	7.7

#### 五、執行大鼠之口服藥動實驗

(一) 短期 (30 分鐘前) 餵服中草藥再和口服紫杉醇進行交互作用之藥動實驗

進行十一組單獨口服紫杉醇、或合併口服中草藥加上紫杉醇、或合併口服純化合物加上紫杉醇的大鼠藥動實驗如下：

1. 灌食大鼠紫杉醇 (劑量: 30mg/Kg), 6 隻大鼠 - (作為控制組)
2. 灌食大鼠黃芩水煮液+紫杉醇 (30mg/Kg), 4 隻大鼠。
3. 灌食大鼠桔梗水煮液+紫杉醇 (30mg/Kg), 4 隻。
4. 灌食大鼠丹參水煮液+紫杉醇 (30mg/Kg), 4 隻。
5. 灌食大鼠六味地黃水煮液+紫杉醇 (30mg/Kg), 4 隻大鼠。
6. 灌食大鼠補中益氣水煮液+紫杉醇 (30mg/Kg), 4 隻大鼠。
7. 灌食大鼠黃芩苷 (baicalin, 劑量: 112 $\mu$ mole/Kg) + 紫杉醇 (30mg/Kg), 6 隻。
8. 灌食大鼠黃芩素 (baicalein, 劑量: 112 $\mu$ mole/Kg) + 紫杉醇 (30mg/Kg), 4 隻。

9.灌食大鼠環孢靈（西藥）+紫杉醇（30mg/Kg），4隻—（作為正對照）。

10.灌食大鼠紫杉醇（劑量：10mg/Kg），4隻大鼠。

11.灌食大鼠甘草水煮液 + 紫杉醇（10 mg/Kg），4隻。

十一組中第八組(環孢靈,正對照)、第七組(黃芩苷,baicalin)和第一組(控制組)相比較,有顯著差異( $P \leq 0.05$ );其他各組和控制組比較,均無顯著差異,請參見圖六。結果如下:

組	$C_{max}$ (ng/mL)	$P \leq$	AUC (ng*h/mL)	$P \leq$
單獨紫杉醇 (30 mg/Kg)	45.0±28.8	--	352.4±87.2	--
環孢靈 +紫杉醇	599.9±441.1	0.016	4163.7±1958.1	0.003
黃芩苷 +紫杉醇	243.3±215.9	0.05	1523.3±867.6	0.01
黃芩素 +紫杉醇	66.5±33.5	0.32	443.7±238.8	0.41±
黃芩 +紫杉醇	52.7±32.8	0.72	373.8±76.7	0.7
丹參 +紫杉醇	52.05±37.02	0.76	323.8±174.0	0.74
桔梗 +紫杉醇	80.6±51.6	0.2	348.75±159.72	0.596
六味地黃 +紫杉醇	69.4±27.6	0.23	443.9±156.8	0.26
補中益氣 +紫杉醇	121.9±117.3	0.16	836.7±636.8	0.097
單獨紫杉醇 (10mg/Kg)	49.4±18.6	--	154.2±131.0	--
甘草+紫杉醇 (10mg/Kg)	35.3±30.4	0.46	314.9±43.15	0.06

(二)長期(十日)給予中草藥再和口服紫杉醇進行交互作用之藥動實驗

大鼠藥動實驗如下:

1. 每天灌食一次 2g/Kg 之黃芩水煮液，10 天後進行黃芩+紫杉醇 (30mg/Kg) 交互作用試驗，4 隻大鼠。
2. 每天灌食一定劑量之黃芩苷溶液，10 天後進行黃芩苷+紫杉醇交互作用試驗；黃芩苷溶媒為 glycofurol，4 隻大鼠。
3. 每天灌食二次 2g/Kg 之黃芩水煮液，10 天後進行黃芩+紫杉醇 (30mg/Kg) 交互作用試驗，6 隻大鼠。
4. 每天灌食一定劑量之黃芩苷溶液，10 天後進行黃芩苷+紫杉醇 (30mg/Kg) 交互作用試驗；黃芩苷溶媒為 DMSO，5 隻大鼠。
5. 灌食大鼠黃芩苷 (溶媒為 DMSO) + 紫杉醇 (30mg/Kg)。為了測試黃芩苷溶於不同溶媒，是否影響短期 (30 分鐘前) 黃芩苷和紫杉醇的藥動結果。2 隻大鼠。

長期每天灌食二次之黃芩水煮液、和長期每天灌食一次之黃芩苷與第一組(控制組)相比較，有顯著差異( $P \leq 0.05$ )。請參見圖七、八和以下結果：

組	$C_{max}$ (ng/mL)	$P \leq$	AUC (ng*h/mL)	$P \leq$
單獨紫杉醇 (30mg/Kg)	45.0±28.8	--	352.4±87.2	--
黃芩+紫杉醇 一天一次，十日	134.6±106.9	0.08	762.3±433.9	0.052
黃芩+紫杉醇 一天二次，十日	277.85±163.1 3	0.008	1047.29±697.64	0.037
黃芩苷+紫杉醇 一天一次、十日，glycofurol*	80.5±46.5	0.18	655.8±299.3	0.046
黃芩苷+紫杉醇 一天一次、十日，DMSO*	162.2±86.1	0.01	877.0±489.9	0.031
黃芩苷+紫杉醇， 30 分鐘前，glycofurol	243.3±215.9	0.05	1523.3±867.6	0.01
黃芩苷+紫杉醇， 30 分鐘前，DMSO	203.4±61.8	0.005	1677.2±172.4	0.001

註\*：一天一次灌食溶於 glycofurol 之黃芩苷溶液 10 天後，進行黃芩苷和紫杉醇交互作用試驗的那組大鼠 (4 隻) 不是很健康，藥動試驗當天只有 2 隻大鼠完成試驗。改換 DMSO 為黃芩苷溶媒，大鼠長期 (十日) 都很健康，藥動試驗順利完成。

### 六、以具抗藥（紫杉醇）性細胞株，檢測單味藥或方劑與紫杉醇合併後是否影響紫杉醇對此細胞株的 IC<sub>50</sub>

結果如下：

組	IC <sub>50</sub> (ng/mL)	P≤	組(ng/mL)	IC <sub>50</sub> (ng/mL)	P≤
單獨紫杉醇	791.6±20.7		六味地黃+紫杉醇	583	
甘草+紫杉醇	590.7		黃芩+紫杉醇	456.1±148.5	0.03
桔梗+紫杉醇	568.7±112.2	0.03	黃芩苷+紫杉醇	397.7±171.7	0.03
丹參+紫杉醇	470.7±41.1	0.0003	黃芩素+紫杉醇	463	
補中益氣 +紫杉醇	213.4±2.1	0.0001	環孢靈+紫杉醇	464.6±2.4	0.0002

單味藥或方劑合併紫杉醇，加入具抗藥（紫杉醇）性細胞株後均降低紫杉醇對此細胞株的 IC<sub>50</sub>。甘草、六味地黃的實驗只執行一次無法和單獨紫杉醇比較計算其差異是否顯著，其餘均顯示顯著之差異。請參見圖九、十。



## 肆、討論

研究計畫從構想、撰寫、執行、到完成常因資料和實驗數據的累積和更新有所增減。本計畫亦不例外。計畫原本以大鼠的藥動模式評估四種單味中藥、二種方劑合併紫杉醇口服後是否影響紫杉醇的血中濃度（即是否有中西藥交互作用），實驗方法只著重於短期（30 分鐘前）的餵服中藥後，再進行藥動實驗；經研究初步實驗數據後，決定增加長期（十日）的餵服黃芩後，再以藥動模式評估它和紫杉醇的交互作用。很高興地，在新增的實驗中看到了二者之間的交互作用，也因此提供一個新的研究方向。

以 glycofurol 為溶媒之黃芩苷溶液，一天一次灌食 4 隻大鼠 10 天後，進行和紫杉醇交互作用試驗，藥動試驗當天只有 2 隻大鼠完成試驗，而且 4 隻大鼠 10 天中不是很健康。文獻對長期服用 glycofurol 是否造成動物毒性並無明確答案，所以另找資料，改換 DMSO 為黃芩苷溶媒，重覆以上實驗，發現灌食十日當中，大鼠都很健康，藥動試驗亦順利完成。glycofurol 為溶媒那組大鼠，其器官組織並未保留做病理檢驗；之後時間有限，亦未重覆上述過程以探究原因。黃芩苷和黃芩素不溶於水，glycofurol 和 DMSO 為一些文獻中所用的溶媒。不論黃芩苷溶於 glycofurol 或 DMSO，短期（30 分鐘前）餵服後和口服紫杉醇合併都能明顯地增加血液中紫杉醇濃度。不過黃芩素和紫杉醇合併口服後不會產生交互作用。黃芩苷和黃芩素的結構差在支鍊上的醣類，是否因此而有不同結果？或溶解度的差異或實驗操作問題造成，需進一步探討。如果真有差別也是有趣的發現。

補中益氣湯短期（30 分鐘前）餵服後和口服紫杉醇合併能增加血液中紫杉醇濃度，但未達顯著的程度。或許長期餵服補中益氣湯後再和紫杉醇合併，可看到顯著的效果。如果答案為肯定，以後可考慮以植入人類腫瘤細胞的裸鼠進行實驗，檢驗和紫杉醇併用後對腫瘤細胞生長的影響。至於機轉方面的研究，是否和黃芩相同或相異，亦可進一步探討。

另外有關裸鼠的人類腫瘤細胞植入（xenograft）實驗，原本計畫選擇和紫杉醇有交互作用的中草藥進行評估。因為短期（30 分鐘前）的餵服中藥後並未檢測到和紫杉醇有交互作用，所以未予進行。之後，雖從新增的實驗看到了黃芩和紫杉醇的交互作用，但因時間和經費的限制無法進行，很抱歉目前不能提供結果。希望中醫藥委員會能繼續開放類似性質的招標，我們才有新的研究計畫與經費進行下一步的實驗。

## 伍、結論與建議

以大鼠藥動模式評估中西（紫杉醇）藥交互作用的實驗結果看出，短期（30分鐘前）餵服這些中藥（四種單味藥、二種方劑水煮液）和口服紫杉醇溶液不會產生交互作用，而二種純化合物（黃芩苷、環孢靈）和口服紫杉醇卻有顯著的交互作用（增加紫杉醇  $C_{max}$ 、AUC）。環孢靈為西醫臨床上常用的免疫抑制劑，過去七、八年一些實驗室已於老鼠實驗和人類臨床上證實，合併口服環孢靈和紫杉醇能明顯地增加血液中紫杉醇濃度。黃芩苷（baicalin），是黃芩的指標成分之一。第一次黃芩苷被發現，當它和紫杉醇合併口服後能明顯地增加血液中紫杉醇濃度。之前賴妙英等<sup>(14)</sup>學者以大鼠試驗發現，黃芩苷和環孢靈一同合併口服能導致環孢靈的血中濃度增加。有趣的是，黃芩和環孢靈一同合併口服卻導致環孢靈的血中濃度降低；另外賴妙英等<sup>(14)</sup>試驗發現純化合物黃芩素（baicalein，黃芩的另一指標成分）能導致環孢靈的血中濃度增加，雖然效果較黃芩苷差。但本試驗黃芩或黃芩素和紫杉醇合併口服後均不會產生交互作用。

從本計畫中新增的長期（十日）餵服黃芩後，再進行大鼠藥動實驗的結果看出，一天一次灌食黃芩，十日後和口服紫杉醇出現交互作用。如增加餵服頻率至一天二次，十日後黃芩和口服紫杉醇出現顯著的交互作用。一天一次灌食大鼠黃芩苷，十日後和口服紫杉醇有顯著的（ $P \leq 0.05$ ）交互作用，但和短期（30分鐘前）的餵服黃芩苷比較，其程度反而減少。我們認為黃芩苷於黃芩-紫杉醇交互作用上扮演一定的角色。至於其餘的三種單味藥、二種方劑水煮液是否長期（十日）餵服後會和口服紫杉醇出現交互作用，我們來不及測試。

從黃芩藥動實驗的結果看出，30分鐘前的餵服中藥和長期（十日）餵服中藥後與西藥（口服紫杉醇）是否出現交互作用的答案不盡相同。或許在評估這類問題時可擴大範圍收集資料，包括考慮一般癌症病人使用中藥的習慣等，不宜太快下評論。

之前提出中西藥交互作用可能帶來負面影響，亦可能具正面影響。於實際臨床應用上，是否長期（十日）餵服黃芩可提高紫杉醇之抗癌效果，或減少其副作用？我相信後續的裸鼠植入（xenograft）人類腫瘤細胞之實驗定能給予進一步的肯定答案。

從本計畫中細胞實驗（即檢測單味藥或方劑與紫杉醇合併後是否影響紫杉醇對此細胞株的  $IC_{50}$ ）結果看出，黃芩、桔梗、丹參、補中益氣

湯均顯著地降低紫杉醇的  $IC_{50}$ 。且三種純化合物（黃芩苷、黃芩素、環孢靈）亦有類似的效果。黃芩苷、環孢靈、紫杉醇同為細胞產生抗藥性蛋白質 P-glycoprotein 的受質，本計畫中所用的具抗藥（紫杉醇）性細胞株已知過度表現此蛋白質，因此黃芩顯著地降低紫杉醇的  $IC_{50}$  的可能機轉之一為其抑制抗藥性蛋白質的功能。桔梗、丹參、補中益氣湯降低紫杉醇的  $IC_{50}$  的機轉則有待進一步探討。

## 誌謝

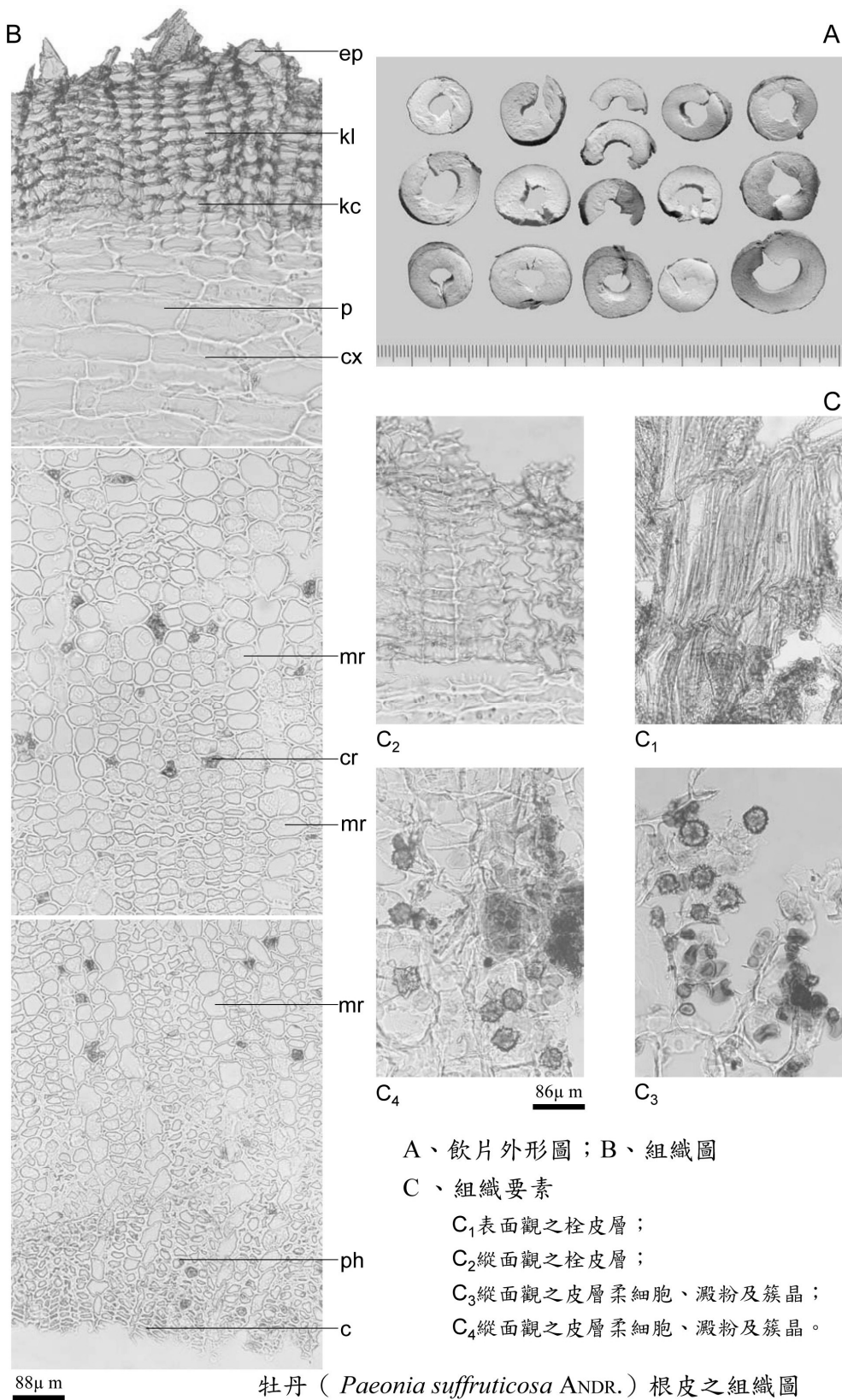
本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP95-TP-017 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. Pal D, Mitra AK.: MDR- and CYP3A4-mediated drug-herbal interactions. *Life Sci* 2006; 78: 2131-45.
2. Izzo AA.: Herb-drug interactions: an overview of the clinical evidence. *Fundam clin Pharmacol* 2005; 19: 1-16.
3. Mathijssen RH, Verweij J, de Bruijn P et al.: Effects of St. John's wort on irinotecan metabolism. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1247-9.
4. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF et al.: Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 1996; 334: 1-6.
5. Rowinsky EK, Donehower RC.: Paclitaxel (Taxol). *N Engl J Med* 1995; 332: 1004-14.
6. Takara K, Horibe S, Obata Y et al.: Effects of 19 herbal extracts on the sensitivity to paclitaxel or 5-fluorouracil in HeLa cells. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 138-42.
7. Chang JY, Chang CY, Kuo CC et al.: Salvinal, a novel microtubule inhibitor isolated from *Salvia miltiorrhizae* Bunge (Danshen), with antimetabolic activity in multidrug-sensitive and -resistant human tumor cells. *Mol Pharmacol* 2004; 65: 77-84.
8. Franek KJ, Zhou Z, Zhang WD et al.: In vitro studies of baicalin alone or in combination with *Salvia miltiorrhiza* extract as a potential anti-cancer agent. *Int J Oncol* 2005; 26: 217-24.
9. Zhang D, Li X et al.: Inhibition of cancer cell proliferation and prostaglandin E2 synthesis by *Scutellaria Baicalensis*. *Cancer Res.* 2003; 63: 4037-43.
10. Das Sk, Das V, Gulati AK et al.: Deglycyrrhizinated licorice in aphthous ulcers. *L Assoc Physicians India* 1989; 37:647.
11. 沈建忠、張文震、楊榮季、劉家昌：補中益氣湯抑制多種惡性細胞腫瘤生長機轉的體外細胞與肺氣虛老鼠模式之先驅研究。行政院衛生署科技研究發展計畫 PMRPD2013，2004。
12. van Asperen J, van Tellingen O, van der Valk MA et al.: Enhanced oral absorption and decreased elimination of paclitaxel in mice treated with cyclosporin A. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2293-97.

13. Meerum Terwogt JM, Malingre MM, Beijnen JH et al.: Coadministration of oral cyclosporin A enables oral therapy with paclitaxel. *Clin Cancer Res* 1999; 5:3379-84.
14. Lai MY, Hsiu SL, Hou YC et al.: Significant decrease of cyclosporine bioavailability in rats caused by a decoction of the roots of *Scutellaria baicalensis*. *Planta Med* 2004; 70:132-37.
15. 范純慧、林美智、謝王昭昭、蔡明哲：中藥檢驗方法專輯（三），製劑薄層層析法，行政院衛生署藥物食品檢驗局，1991年，25-39。

# 柒、圖表



A、飲片外形圖；B、組織圖

C、組織要素

C<sub>1</sub>表面觀之栓皮層；

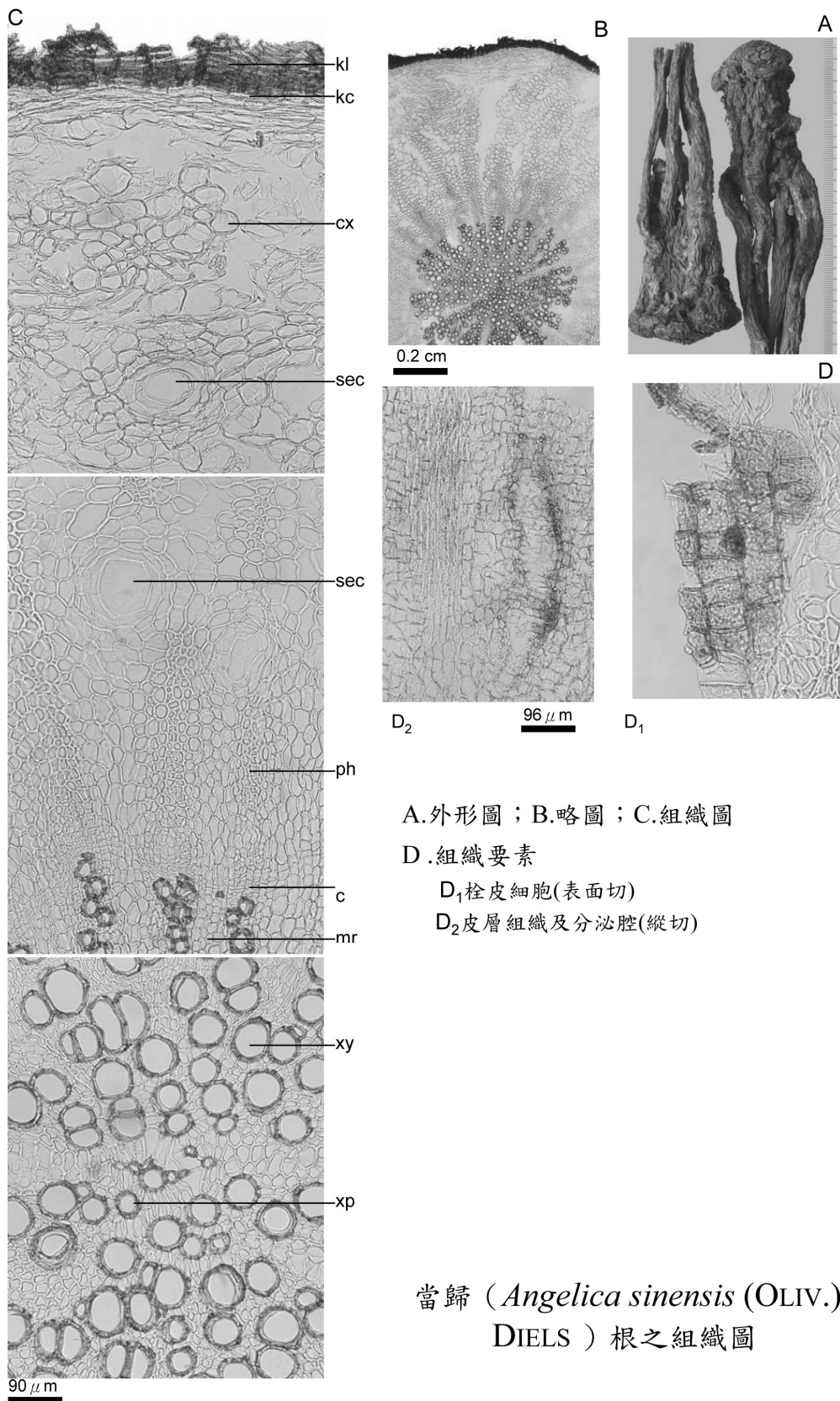
C<sub>2</sub>縱面觀之栓皮層；

C<sub>3</sub>縱面觀之皮層柔細胞、澱粉及簇晶；

C<sub>4</sub>縱面觀之皮層柔細胞、澱粉及簇晶。

牡丹 (*Paeonia suffruticosa* ANDR.) 根皮之組織圖

圖一 牡丹皮基原鑑定。由郭昭麟老師提供。



圖二 當歸基原鑑定。由郭昭麟老師提供。

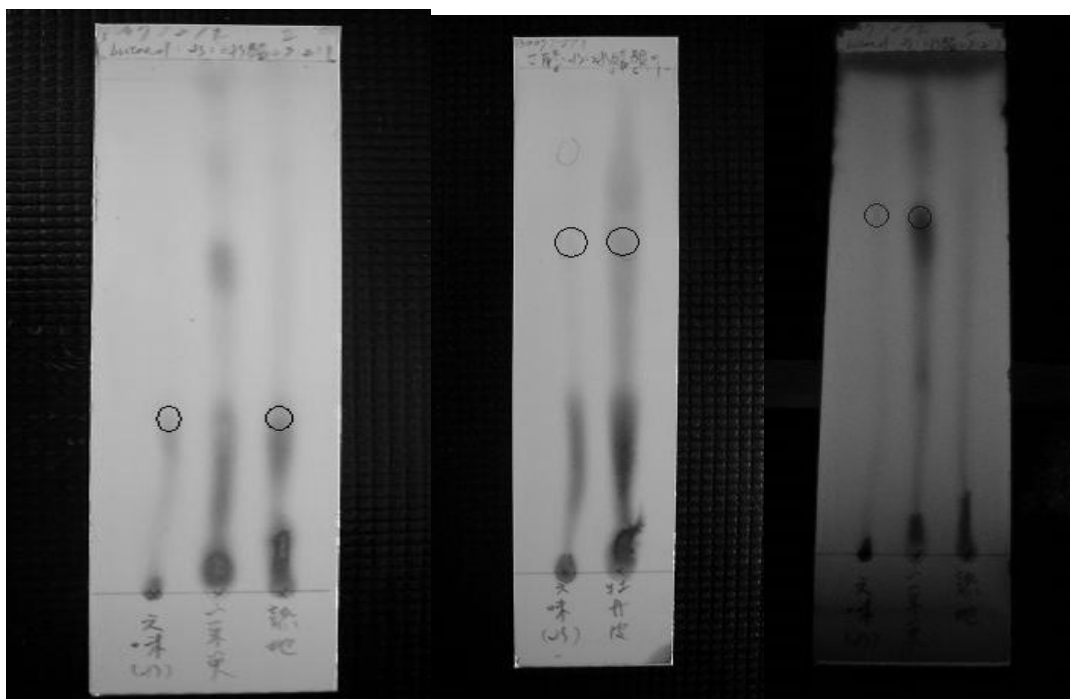


圖三 丹參水煮液之薄層層析結果。圖中三行，左邊為丹參乙醚萃取液，中間為丹參水煮液，右邊為丹參酮IIA溶液。

熟地黃

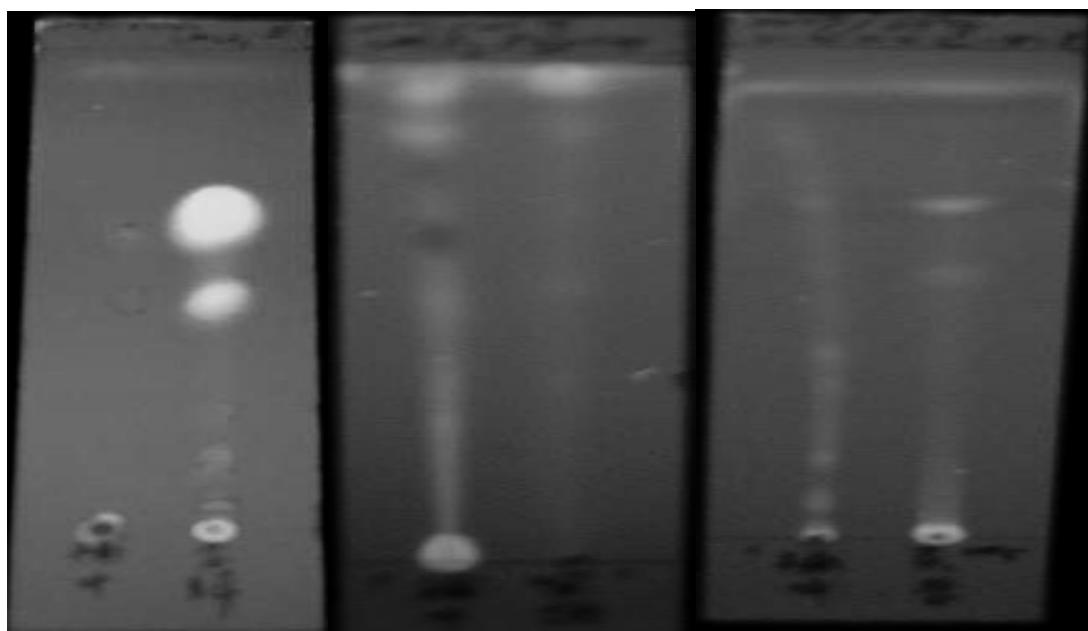
牡丹皮

山茱萸

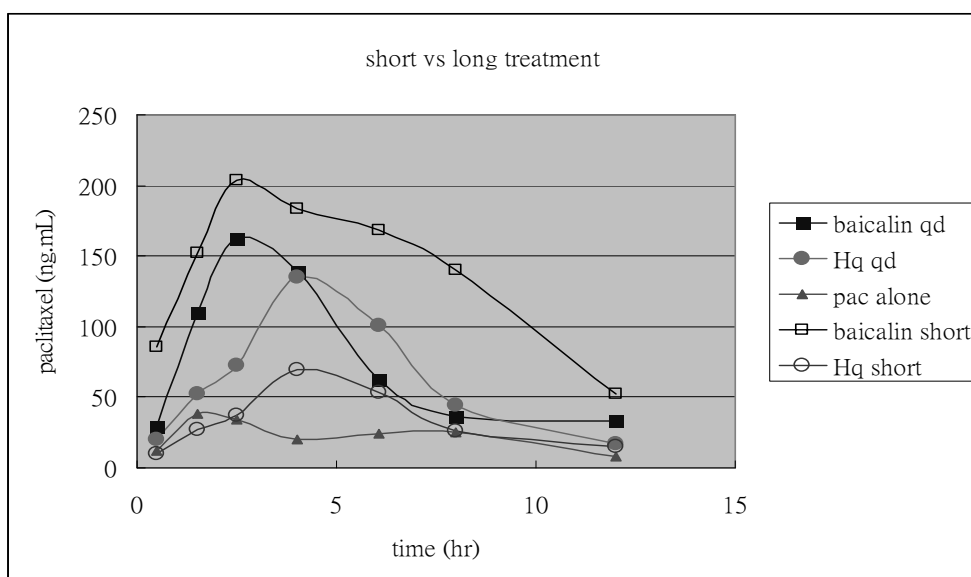


圖四 六味地黃三味藥材之薄層層析結果。圖中有圓圈的二行，左邊為六味地黃水煎液，右邊為各別藥材（熟地黃、牡丹皮、和山茱萸）甲醇萃取液。

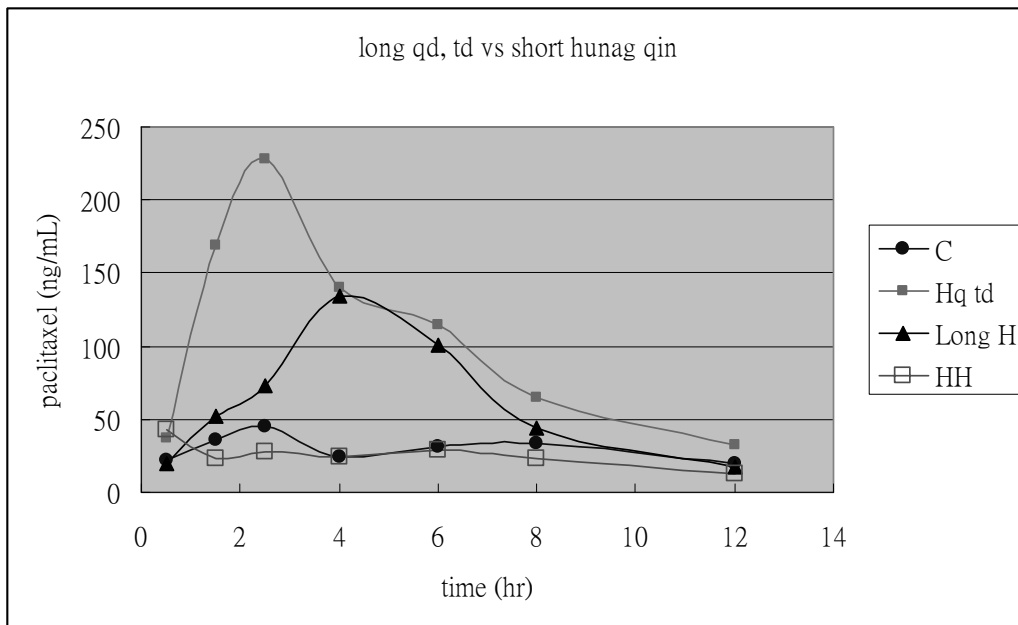




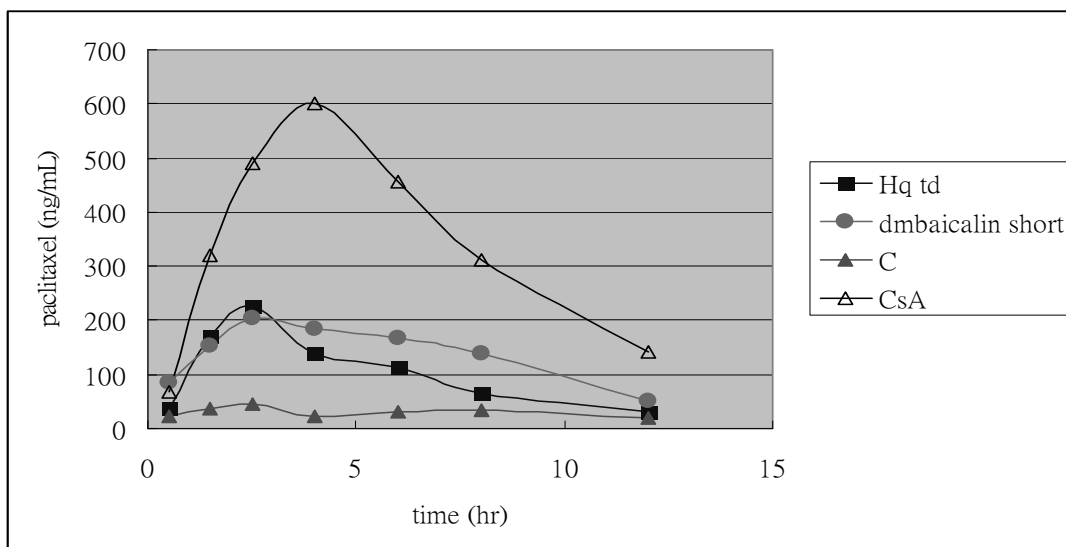
圖五 補中益氣三味藥材之薄層層析結果。圖中二行，左邊為補中益氣水煎液，右邊為各別藥材（當歸、柴胡、黃耆）甲醇萃取液。



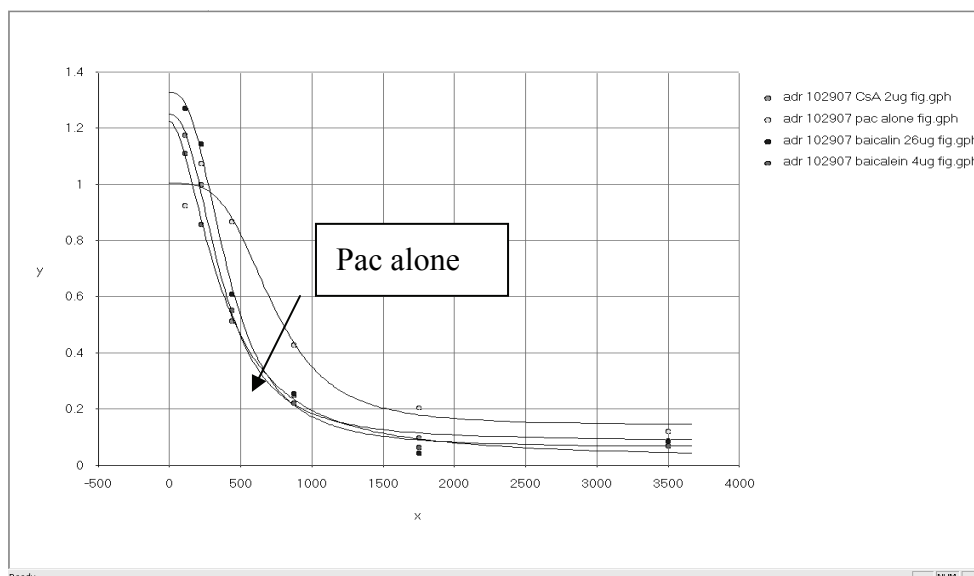
圖六 30 分鐘前餵服黃芩苷、黃芩和十日，一天一次，餵服黃芩苷、黃芩後與紫杉醇溶液合併服用的結果。pac alone：紫杉醇溶液；baicalin short：30 分鐘前黃芩苷；Hq short：30 分鐘前黃芩；baicalin qd：十日，一天一次黃芩苷；Hq qd：十日，一天一次黃芩



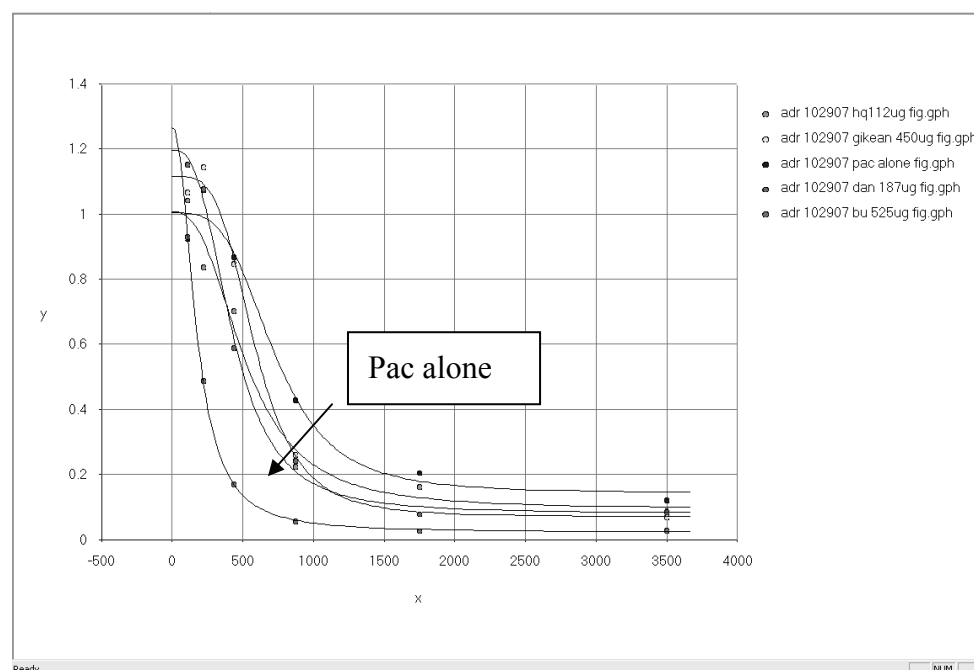
圖七 30 分鐘前、或長期，一天一次、或長期，一天二次餵服黃芩後與紫杉醇溶液合併服用的結果。C：紫杉醇溶液；HH：30 分鐘前黃芩；Long H：十日，一天一次黃芩苷；Hq td：十日，一天二次黃芩



圖八 30 分鐘前餵服黃芩苷和十日、一天二次餵服黃芩、黃芩後與紫杉醇溶液合併服用的結果。C：紫杉醇溶液；dmbaicalin short：30 分鐘前黃芩苷；Hq td：十日、一天二次黃芩；CsA：30 分鐘前環孢靈



圖九 不同濃度（連續稀釋）的紫杉醇和固定濃度的中草藥水煎液和抗藥性細胞株一同培養，4 天後經 MTT 試驗得到之細胞存活曲線。X 軸為連續稀釋的紫杉醇濃度（ng/mL），Y 軸為細胞存活比。Pac alone：紫杉醇溶液；baicalin：黃芩苷；baicalein：黃芩素；CsA：環孢靈



圖十 不同濃度（連續稀釋）的紫杉醇和固定濃度的中草藥水煎液和抗藥性細胞株一同培養，4 天後經 MTT 試驗得到之細胞存活曲線。X 軸為連續稀釋的紫杉醇濃度（ng/mL），Y 軸為細胞存活比。Pac alone：紫杉醇溶液；hq：黃芩；gikan：桔梗；dan：丹參；bu：補中益氣

