

計畫編號：DOH89-TD-1208

行政院衛生署八十八年下半年及八十九年度
科技研究發展計畫

中藥藥引改善低生體可用率藥物吸收之研究

研究報告

此整合計畫包括：子計畫A-中藥藥引改善降血脂藥口服吸收之研究
子計畫B -CYP1A抑制劑改善藥物吸收之研究

執行機構：國防醫學院藥學系

計畫主持人：鮑力恒

研究人員：子計畫A: 鮑力恒 黃北緯 廖秀曼 郭培中

子計畫B: 蘇慕寰 熊莉珍 王昭日

執行期間：88年11月1日至89年12月31日

目錄

總計劃摘要	3
子計劃 A 封面	8
摘要	9
壹、 前言	19
貳、 材料與方法	19
參、 結果及討論	34
肆、 結論及建議	36
伍、 參考文獻	38
陸、 圖次	44
柒、 表次	57
子計劃 B 封面	61
摘要	62
壹、 前言	66
貳、 材料與方法	68
參、 結果及討論	71
肆、 結論及建議	74
伍、 參考文獻	75
陸、 圖次	79
柒、 表次	94

整合型總計劃摘要

本計劃研究的主要目的是利用傳統中藥藥引的成份來改善低生體可用率藥物之吸收，以期達成增加藥物之吸收，減低其吸收變異程度，增進藥物之臨床實用性。此計劃主要是利用自傳統使用的中藥藥引中篩選具抑制細胞色素酵素 P450 (Cytochrom P450；特別是 CYP3A)或是 P-醣蛋白(P-gp)活性的物質來增加經由此類酵素或蛋白質代謝或是排出藥物的生體可用率。此外，對於經皮吸收之藥物，則是著重對於 1A1 酵素活性抑制劑的篩選，以增加經由此酵素代謝藥物經皮吸收之能力。

此計劃包含兩個子計劃，各子計劃依代謝酵素的性質來選擇適當的模式藥，以評估中藥藥引抑制該酵素的能力。如子計劃 A 是以 Lovastatin 為模式藥，其為 hydroxymethylglutaryl-coenzyme A 還原酶抑制劑，Lovastatin 是 CYP3A 及 P-gp 的受質。而子計劃 B：以 retinoic acid 為經皮吸收之模式藥，其主要是皮膚中 CYP1A1 酵素的受質。

子計劃 A 是以 Lovastatin 為模式藥，其為 hydroxymethylglutaryl-coenzyme A 還原酶抑制劑，Lovastatin 是 CYP3A 及 P-gp 的受質。故子計劃 A 於第一年之計劃下，至目前為止，已建立了一套可靠之模式藥 Lovastatin 於 microsome 溶液，小型動物如老鼠及大型動物如狗之血漿藥物濃度的分析方法，其最低測量濃度(LOD)可低達 10 ng/mL. 此分析方法成功的提供了體外及體內之實驗分析。

同時亦完成了已獲得之五十六種中藥藥引成份老鼠腸中微粒體 活性體外實驗之篩選工作，與先前之肝中微粒體 活性體外實驗之篩選結果，具抑制效果前十名之中藥藥引除排列順序有些差異外，成份大致相同。此結果證實本實驗室已建立標準可信任之體外篩選方法，可有效的篩選其他具有潛力之中藥藥引。本實驗室亦完成模式藥 Lovastatin 於前十名中藥藥引對老鼠肝中微粒體活性之抑制效果下之離體代謝模式。此結果與中藥藥引對老鼠肝中微粒體活性之抑制效果極為相似，可進一步證實離體實驗之一致性。

步證實離體實驗之一致性。

本實驗室更進一步建立以小型動物老鼠為體內實驗動物的實驗模式，結果顯示 HUCHE038 無論於肝或腸中微粒體活性之抑制效果皆高達80%左右。是以本實驗室順利完成第一年的計劃內容，達到於體外及體內初步篩選的過程，並建立初步的體內、體外的相關性，以供第二年的參考。至目前為止，本實驗室更進一步建立以大型動物狗為體內實驗動物的實驗模式，以口服餵食中藥藥引之方法以探討模式藥 Lovastatin 於進行在狗上的體內代謝模式。目前經過三次之實驗結果，可明顯顯示 HUCHE038 可增加模式藥 Lovastatin 之吸收。由於實驗結果之變異性及困難度，本實驗仍繼續執行中，以求結果之一致性。然藥物與中藥藥引一起服用時之吸收變異性可明顯降低。

子計劃 B：以 retinoic acid 為經皮吸收之模式藥，其主要是皮膚中 CYP1A1 酵素的受質。本研究室已完成第一年的計劃，其內容包括：在第一年之計劃中成功的利用裸鼠皮及肝純化出具有 CYP1A1 活性之微粒體的方法，同時確立測定酵素的方法，並從中藥藥引具 flavonoid, terperoid 結構之純成分，進行抑制 CYP1A isozyme 之體外篩選實驗。結果在 56 種中藥藥引在不同濃度成功的篩選出具發展潛力的抑制劑。對模式藥 retinoic acid 的分析，已建立用 HPLC 同時分析 retinoic acid 及其異構物 9-cis retinoic acid 及 13-cis retinoic acid 在血漿中的分析方法。擴大中藥藥引的篩選範圍，用已篩選出前 10 名的中藥藥引結合模式藥物進行體內實驗，是下年度計劃的目標。詳細資料數據請參閱後頁之報告。

Abstract

The goal of this project is to develop and evaluate the incorporation the CYP3A and/or P-gp inhibitor originally existed mainly in the Chinese herbs into the medications with low bioavailability drugs due to the substantial presystemic metabolism mediated by CYP3A4 to improve the oral bioavailability. The same rationales also apply to enhance the permeation of drug through skin using specific CYP1A inhibitor.

The whole project is consisted of two subprojects and is a four-year project for each subproject:

Project A: focus on hydroxymethylglutary-coenzyme A reductase inhibitors (Statins) – lovastatin for oral study. Project B: focus on retinoic acid for transdermal study.

For project A :

Lovastatin, HMG-CoA reductase inhibitors, was chosen as the model drug since it has a low and variable oral bioavailability, and is metabolized by CYP3A in the small intestine and is a known p-glycoprotein substrate. These results also indicated that clinical application of the combination of lovastatin and CYP3A and/or P-gp inhibitor to increase the bioavailability of the drug is feasible and applicable.

We have finished all the studies that planned for the first year project. First of all, we have established an accurate, precise, and specific analytical HPLC methodology for analyzing the model drug in microsomes and in rat and dog plasma. This built a good foundation for the further *in vivo* study. This project has set up an *in vitro* intestinal and liver microsomes system for potential CYP3A inhibitor screening from Chinese herbal ingredients. 56 kinds of Chinese herbs have been screened *in vitro* in both rat intestine and liver microsomes and enzyme activity would be measured with and without the Chinese herb ingredient. The effect of the inhibition of the activity of CYP3A was similar between intestinal and liver microsomes. Inhibition effect of the metabolism of lovastatin by the Chinese herb enhancer was also carried out in rat liver microsomes *in vitro*. The metabolism of lovastatin decreased with the presence of the Chinese herb enhancer.

The liver CYP3A enzyme activity was decreased after pretreated with the Chinese herb enhancer orally for one or three days in rats. The results demonstrate that the Chinese Herb Enhancers (HUCHE038 and HUCHE047) has increased the above 60%~80% inhibition of CYP3A/4 activity and the three-days group has greater effect than the one-day group *in vivo* study no matter in S.D. rat's liver and

intestinal microsome. Besides, *in vitro* study according to the IC₅₀, the top three over the total screening 56 different species of the Chinese Herbal Enhancers the inhibition of Lovastatin metabolism in S.D. rat's liver microsome is HUCHE047 (0.13 mg/mL), HUCHE045(0.18 mg/mL) and HUCHE038 (0.27 mg/mL), respectively. These results established a preliminary *in vitro-in vivo* correlation in rats. This correlation has also been tested in dog. Since the high variability (from low bioavailability of lovastatin) and study for the large animal, the effect of Chinese herbal enhancers has not confirmed. However, the variability of the pharmacokinetic parameter did decrease dramatically in the group with Chinese herbal ingredient than in the control group.

For project B:

Retinolic acid is the substrate of CYP1A1. Numerous studies disclosed that the P450 isozymes of CYP1A subfamily play an important role for the absorption of drug that metabolized by CYP1A in skin. Drug known to be substrates for CYP1A have a low and variable transdermal bioavailability that may be explained by prehepatic metabolism by the skin CYP1A subfamily. Therefore, retinolic acid was used as the model drug.

We have finished first year project. From our past year studies, we have thoroughly search important components from the so-called herbal enhancers according to the frequency used in traditional medicines. Among these components, flavoids, terpenoids and essential oil etc., 56 Chinese Herbal Medicines have been tested for the inhibition of CYP1A1 activity with the concentration of 1,10, and 100 μ M in microsome enzyme which prepared from nude skin and liver. The result showed that 100 μ M HUCHE001 and HUCHE 010 had 100% inhibition effect for CYP1A1 isozyme. We also found that 32 Chinese Herbal Medicines showed over 50% inhibition effects for CYP1A1 isozyme. Only 6 Chinese Herbal Medicines screened did not have significant inhibition effect for skin microsome.

The effects of the Chinese Herbal Enhancer on the live enzyme activity (1A1 and 1A2) would also evaluated by 7-Methoxyresourifin hydroxylase (MROD) method on nude mice after pretreated with the herbal topically. 100 μ M of HUCHE030, HUCHE055, and HUCHE033 decreased the activity of liver CYP1A2 activity by 92.44、90.83 and 89.38%. 100 μ M of HUCHE038 and HUCHE055 had 95.39 and 86.21% inhibition effect for CYP1A1 isozyme in the liver. This study has also successfully established a simple, accurate, and precise high-performance liquid chromatographic method for the determination of model drug retinoic acid and its isomerase metabolism 9-cis and 13-cis retinoic acid in plasma. This

method will be applied to the further in vitro and in vivo studies on the next year.

Key words : Oral Absorption Enhancers, Chinese herbal enhancers, Cytochrom P450, P-glycoprotein, Permerability, Bioavailability, Lovastatin, retinolic acid

計畫編號：DOH89-TD-1208

行政院衛生署科技研究發展合約型計畫

以中藥藥引改善具低生體可用率藥物之口服吸收
Optimization of oral drug absorption using Chinese herbal enhancer for low
bioavailability drug

子計畫 A

中藥藥引改善降血脂藥口服吸收之研究
Improve oral absorption of anti-hypercholesterolemia drug using herbal enhance

第一年研究成果報告

執行機構：國防醫學院藥研所

計畫主持人：鮑力恆

研究人員：郭培中 黃北緯 廖秀曼

執行期限：89年1月1日至89年12月31日

****本研究報告僅供參考用，不代表本署意見****

摘要

本計劃研究的主要目的是利用傳統中藥藥引的成份來改善低生體可用率藥物之吸收，以期達成增加藥物之吸收，減低其吸收變異程度，增進藥物之臨床實用性。此計劃主要是利用自傳統使用的中藥藥引中篩選具抑制細胞色素酵素 P450(Cytochrom P450；特別是 CYP3A)或是 P-糖蛋白(P-gp)活性的物質來增加經由此類酵素或蛋白質代謝或是排出藥物的生體可用率。

子計劃 A 是以 Lovastatin 為模式藥，其為 hydroxymethylglutaryl-coenzyme A 還原酶抑制劑，Lovastatin 是 CYP3A 及 P-gp 的受質。故子計劃 A 於第一年之計劃下，至目前為止，已建立了一套可靠之模式藥 Lovastatin 於 microsomes 溶液，小型動物如老鼠及大型動物如狗之血漿藥物濃度的分析方法，其最低測量濃度(LOD)可低達 10 ng/mL。此分析方法成功的提供了體外及體內之實驗分析。

同時亦完成了已獲得之五十六種中藥藥引成份老鼠腸中微粒體活性體外實驗之篩選工作，與先前之肝中微粒體活性體外實驗之篩選結果，具抑制效果前十名之中藥藥引除排列順序有些差異外，成份大致相同。如中藥藥引對老鼠肝中微粒體活性之抑制效果最高可高達 85% 之抑制效果，其前三名分別為 HUCHE045 (84.79%)，HUCHE023 (75.95%)及 HUCHE038 (71.63%)。而於中藥藥引對老鼠腸中微粒體活性之抑制效果最高亦可高達 89% 之抑制效果，其前三名分別為 HUCHE045 (88.64%)，HUCHE047 (83.34%)及 HUCHE012 (82.58%)。此結果證實本實驗室已建立標準可信任之體外篩選方法，可有效的篩選其他具有潛力之中藥藥引。

於第一年之計劃下，本實驗室亦完成模式藥 Lovastatin 於前十名中藥藥引對老鼠肝中微粒體 活性之抑制效果下之離體代謝模式。其結果以抑制濃度五十(IC50)來顯示中藥藥引對老鼠肝中微粒體 活性之抑制強度。其前三名分別為 HUCHE047 (0.13 mg/mL)，HUCHE045 (0.176 mg/mL)及 HUCHE038 (0.27 mg/mL)。此結果與中藥藥引對老鼠肝中微粒體 活性之抑制效果極為相似，可進一步證實離體實驗之一致性。

本實驗室更進一步建立以小型動物老鼠為體內實驗動物的實驗模式，以口服餵食中藥藥引之方法以進行在老鼠上的體內實驗。以口服餵食中藥藥引如HUCHE038及HUCHE047之老鼠可以一天餵食一次為基準之方式，分為一天及三天兩組，事後犧牲老鼠以檢測肝及腸中微粒體 活性與空白組比較。結果顯示HUCHE038無論於肝或腸中微粒體 活性之抑制效果皆高達80%左右且連服三天之效果大於只服一天。而HUCHE047顯示相似之抑制效果，唯獨於腸中微粒體 活性之抑制效果較低(但亦達60%左右之抑制效果)。本實驗室順利完成第一年的計劃內容，達到於體外及體內初步篩選的過程，並建立初步的體內、體外的相關性，以供第二年的參考。

本實驗室更進一步建立以大型動物狗為體內實驗動物的實驗模式，以口服餵食中藥藥引之方法以探討模式藥 Lovastatin於進行在狗上的體內代謝模式。目前經過三次之實驗結果，可明顯顯示HUCHE038可增加模式藥 Lovastatin之吸收。由於實驗結果之變異性及困難度，本實驗仍繼續執行中，以求結果之一致性。

關鍵詞：口服吸收促進劑；中藥藥引；細胞色素P450(CYP)；P-醣蛋白 (P-gp)；通透率；生體可用率；Lovastatin

Abstract

Lovastatin, HMG-CoA reductase inhibitors, was chosen as the model drug since it has a low and variable oral bioavailability, and is metabolized by CYP3A in the small intestine and is a known p-glycoprotein substrate. These results also indicated that clinical application of the combination of lovastatin and CYP3A and/or P-gp inhibitor to increase the bioavailability of the drug is feasible and applicable.

We have finished all the studies that planned for the first year project. First of all, we have established an accurate, precise, and specific analytical HPLC methodology for analyzing the model drug in microsome and in rat and dog plasma. This built a good foundation for the further *in vivo* study. This project has set up an *in vitro* intestinal and liver microsome system for potential CYP3A inhibitor screening from Chinese herbal ingredients. 56 kinds of Chinese herbal have been screened *in vitro* in both rat intestine and liver microsome and enzyme activity would measure with and without the Chinese herbs ingredient. The effect of the inhibition of the activity of CYP3A was similar between intestinal and liver microsome. Inhibition effect of the metabolism of lovastatin by the Chinese herbal enhancer was also carried out in rat liver microsome *in vitro*. The metabolism of lovastatin decreased with the presence of the Chinese herbal enhancer.

The liver CYP3A enzyme activity was decrease after pretreated with the Chinese herbal enhancer orally for one or three day in rats. The results demonstrate that the Chinese Herbal Enhancers (HUCHE038 and HUCHE047) has increased the above 60%~80% inhibition of CYP3A/4 activity and three-days group has greater effect than the one-day group *in vivo* study no matter in S.D. rat's liver and intestinal microsome. Besides, *in vitro* study according to the IC₅₀, the top three over the total screening 56 different species of the Chinese Herbal Enhancers the inhibition of Lovastatin metabolism in S.D. rat's liver microsome is HUCHE047 (0.13 mg/mL), HUCHE045 (0.18 mg/mL) and HUCHE038 (0.27 mg/mL), respectively. These results established a preliminary *in vitro-in vivo* correlation in rats. This correlation has also been tested in dog. Since the high variability (from low bioavailability of lovastatin) and study for the large animal, the effect of Chinese herbal enhancers has not confirmed. However, the variability of the pharmacokinetic parameter did decrease dramatically in the group with Chinese herbal ingredient than in the control group.

Key words : Oral Absorption Enhancers, Chinese herbal enhancers, Cytochrom P450, P-glycoprotein, Permeability, Bioavailability, Lovastatin.

壹、前言

口服是藥物最常以投予之方式給藥。事實上，過半數的藥物劑型是以口服攝取的方式來設計，乃為了容易投予，能增加藥物治療的順從性。然而，此途徑可能導致無效及藥物治療的不規則變化，尤其是具有低生體可用率的藥物。自然的，因為吸收得愈完全，藥理反應會變得愈一致且再現性愈強。藥物具有低且高變異性的生體可用率將會導致臨床治療效果的差異，而導致治療效果減弱或毒性反應，這些都將增加整體醫療保健所需的成本。除在經濟上的考量外，對因生體可用率不足而飽受痛苦的癌症口服化學治療製劑尤為重要。所以，這個計劃主要的目的是結合中藥藥引的代謝酵素抑制劑，來促進低而多變的生體可用率藥物的利用率。

這些中藥藥引的應用範圍相當廣泛，可能扮演如下角色：

1. 催化劑：在烹煮及調配中藥過程中，以合成新的活性化合物。
2. 攜帶體：攜帶藥物或活性部分通過障壁到達標的器官，在我們之前的研究中也經實驗證實 glycyrrhizin 及 oleanolic acid 可以增加 acyclovir 的分配係數，因而增加 acyclovir 穿過動物及人皮之累積穿透量超過 10 倍以上。
3. 酵素抑制劑：中藥藥引可為 CYP450 的抑制劑，因此可減少肝臟首渡效應，以增加生體可用率而增加口服吸收之百分比。這也是為何如此

多的含有中藥藥引的藥物常被利用的因素之一。

口服藥物要能顯示其藥效，藥物必需有效的到達作用部位。故生體可用率必需要考慮藥物吸收而進入系統循環或作用部位的速率及程度。除此之外，還須看是否能在小腸完全吸收及小腸及肝臟的代謝效應。為了達到最大的口服利用率及減少輸藥的變異性，腸道的排除以及藥物被主動打出腸道，均應一一加以確認。葡萄柚汁能顯著增加一些藥物的口服生體可用率¹。如 Felodipine 可以經由口服胃腸完全吸收²。然經由實驗報告，Felodipine 有高達平均 15%³ 之肝臟首渡代謝其範圍可由 4% ~36%⁴。而小腸及肝臟的代謝效應是 Felodipine 代謝之主要方式⁵。最近，葡萄柚汁反映在小腸及肝的藥物代謝酵素被研究在人的體內實驗，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⁶⁻¹¹，而引起 felodipine 較高的口服利用率。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去增加口服利用率。合併代謝酵素之抑制劑之處方，可為改善、提高藥理治療藥效而提供一個新的紀元。我們其中一個目標是發展及評估自古就存在的、且具專一性的 CYP3A4 抑制劑：中藥藥引，以改善因受 CYP3A4 代謝而導致低生體可用率的藥物而增進其口服吸收率。

上述提及對口服藥物，腸肝的首渡效應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%¹²，而在小腸的 CYP 有約佔 70%¹³。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¹⁴⁻¹⁷。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¹⁸⁻²³和小腸²⁴⁻²⁹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^{13,25,29,30}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 cDNA³¹。

為決定腸肝中 CYP3A4 對口服製劑吸收潛在而明顯之影響力，必須考慮 CYP3A4 表現具有顯著之病人間的差異性。在個體間，肝中 CYP3A4 的濃度及催化活性至少有 10 倍之差³²。Gupta 等人藉由 erythromycin 做輔助性治療，可使 cyclosporin 的口服利用率顯著地增加³³。Gomez 等人提到以 ketoconazole 做輔助性治療，可由 22% 增加到 56% 而增加 cyclosporine 的口服利用率³⁴。Keog 等人提到使用 cyclosporin 時同時使用 ketoconazole 做輔助性治療的心臟移植病患，每年每位病人可節省美金 5200 元³⁵。Etoposide 乃經由 CYP3A4 所媒介的 O-demethylation 來代謝³⁶。使用一強力的 CYP3A4 抑制劑 ketoconazole 做輔助性治療，可觀察到血漿中 etoposide 的 AUC 可增加 44%³⁷。這些資料表明適當的調控 CYP3A4 之活性對於改善其受質的口服利用率有很大的價值。

之前提到，小腸將藥物主動打出，確實對口服藥物的輸送有相當之影響。P-糖蛋白是一個將藥物打出的幫浦，造成抗藥性的原因，尤其對

化療藥物。事實上，P-醣蛋白的受質包含了各類藥物，也可以這麼說，沒有清楚的結構特徵去定義 P-醣蛋白的受質。P-醣蛋白在組織的各部分均有廣泛的表現，包括腎上腺、膀胱、血腦障壁的細胞、腎臟、肝臟、肺、胰臟、直腸、脾臟以及特別對於口服藥物輸送有關係的地方，如食道、胃、空腸、結腸³⁸⁻⁴⁰。P-醣蛋白的量沿著小腸呈縱向增加，而胃的含量最低，結腸的量最高³⁹。具細胞毒性的藥物皆是 P-醣蛋白的受質，包括 etoposide³⁶、doxorubicin⁴¹、paclitaxel⁴²、topotecan⁴³ 以及 vinorelbine⁴⁴。P-醣蛋白 transporters 有前臨床使用鼠科動物模式的證據提到 P-醣蛋白限制 paclitaxel、docetaxel 和 vinblastin 的腸道吸收^{45,46}。Van Asperen 等人最近也已經調查 P-醣蛋白阻斷劑 SDZ PSC 833 對於 paclitaxel 口服利用率的影響。這個強力 P-醣蛋白抑制劑的影響是顯著的。它在治療前給予會導致 paclitaxel AUC 增加 10 倍。因此，這個研究使用 P-醣蛋白抑制劑，如 quinidine、verapamil 或 SDZ PSC 833，在探索臨床上增加生體可用率的應用是有被發展的潛力。

CYP3A 與 P-醣蛋白可由其於小腸細胞上相互配合分布的情形，同時許多藥物為其共同的受質的性質顯示出其對口服藥物的重要性^{14,15,40,47-49}。同時是 CYP3A4 及 P-醣蛋白的受質，包括有 cyclosporine^{40,50}，sequinavir^{48,51}，etoposide³⁶，paclitaxel⁴² 和 vinorelbine⁴⁴ 等。在細胞之分佈上，P-醣蛋白位於細胞膜上而 CYP3A4 則是在細胞內質網中。由此可知，P-醣蛋白可扮演調節 CYP3A 之代謝作用⁵²。即使在小腸 CYP3A 含量少的時候，小腸中 P-醣蛋白亦會扮演在代謝上一個重要的角色。另外，P-醣蛋白也具有調控、誘導或抑制 CYP3A 之功能。Walkins 和其同伴利用緩慢灌輸藥物到兩位處於無肝時期的肝臟移植者的小腸中，發現

在肝門靜脈中 cyclosporine 的代謝物大於 50% 以上，証實了小腸 CYP3A 對於 cyclosporine 生體可用率的重要性⁵⁰。Fricker 和其同伴利用健康受試者，不同腸道插管給予 cyclosporine 的體內實驗，証實了 P-醣蛋白對 cyclosporine 吸收的重要性⁵⁴。這些結果表示 cyclosporine 的吸收與投藥位置的 P-醣蛋白 mRNA 含量成反比的關係。如果藥物同時是 P-醣蛋白與 CYP3A 的受質，P-醣蛋白可調節藥物之 CYP3A 酵素作用。如此之假說，可以以飲用葡萄柚汁會增加藥物 cyclosporine 血中尖峰濃度及曲線下面積的增加得以證實⁵⁵。葡萄柚汁是一個會選擇性抑制小腸中 CYP (非 CYP mRNA)，但不會破壞肝中及小腸中 CYP1A、CYP2D6 和 P-醣蛋白⁵⁶。由上述的例子証實，CYP3A 與 P-醣蛋白對藥物生體可用率均有重大的影響。可預期抑制 P-醣蛋白或抑制 CYP3A，或同時抑制 CYP3A 及 P-醣蛋白的物質可以合理用於增加生體可用率。

CYP 家族對於其生物活性受質，如 fatty acid、steroid、prostaglandins、glucocorticoids、retinoids 和 leukotrienes 的穩定狀態濃度扮演著決定性的角色。同時，也是皮膚中最重要的藥物代謝酵素。所以，在較好的治療皮膚疾病對策，CYP 家族是一個重要的目標，可調控藥物的生體可用率。

一個理想的口服藥物，在病患口服後的吸收差異要小。Hellriegel⁵⁷ 等人之研究顯示，絕對生體可用率愈低的藥物在不同受試者之絕對生體可用率的變異越大。病患間的差異會在治療指數狹窄的藥物間反應出毒性反應及不當的影響。在最近的藥物交互作用研究中亦發現，像 ketoconazole, fluconazole, clotrimazole, micronazole, erythromycin,

17- α -ethynylestradiol, tri-acetyloleandomycin, gestodene 和 quinine(Watkins 1990)確實可以抑制 CYP3A 或 P-gp 之活性，而增加其受質的吸收。然而，上述提到的交互作用的抑制劑是活性本身有很大的藥物藥理反應，他們不是好的藥物吸收促進劑，特別是對慢性疾病的治療。研發或發現一具專一性且低毒性的 CYP3A4 及/或 P-醣蛋白抑制劑，在減少不同病患間生體可用率差異，增加生體可用率及改善病患生活品質的治療效果，和減少醫療照顧系統的花費，可說是最具開發的實用性領域。

一個 CYP3A 抑制劑在用於增進藥物生體可用率，或作用於治療癌症藥物最少要有下列條件：

1. 除了抑制 CYP3A 家族酵素外，沒有或只有非常輕微的藥理作用。
2. 抑制作用要為可逆的，當抑制劑被排除或代謝時，正常的代謝功能可被恢復。
3. 抑制劑效果要夠強，用最少量的抑制劑可以有明顯的抑制肝臟及小腸 CYP3A 活性。

傳統中藥藥引是使用佔 30% ~75% 數千年歷史的中藥治療，毒性一般來說比新合成的藥物低許多。根據日本厚生省報告，150 種處方包含 Licorice(甘草中的主成份)和 210 種官方傳統中藥成份處方正在使用。此外，最常用的是 licorice (71.4%) ginger 和 jujube 的使用頻率分別為 42.9%、31.9%，在 210 種官方處方成份中。在日本藥典(第二版)，中藥藥引被使用在共先前的 210 種處方，他們是 licorice (71.4%), ginger (42.9%), hoelen (35.2%), paeoniae radix (32.9%), jujube (31.9%), cinnamon (29.5%)。

我們有搜尋和列出最重要的 56 種傳統中藥藥引去抑制 CYP3A 活性，這些成份包含 flavonoids, isoflavonoids, terpenoids 及 essential oils 等。根據我們實驗室已進行的傳統中藥藥引體外搜尋研究實驗結果，成分獲得從數種傳統中藥藥引有明顯強效抑制 CYP3A 活性，在鼠肝微粒體和鼠皮 CYP1A 兩個各自的實驗中使用 ketoconazole, beta-Naphthoflavones 及 α -Naphthoflavones 做為對照控制。

CYP3A 是腸肝中臨床使用藥物的主要代謝酵素，要能與 CYP3A 抑制劑併用的藥物應具有下列性質：

1. 低生體可用率或高變異性質的藥物。
2. 主要受 CYP3A 代謝物的藥物。
3. 主要受 CYP3A 及 P-醣蛋白代謝的藥物。

符合上述條件的包含以下幾類：

1. 鈣離子阻斷劑—felodipine, nisoldipine
2. HMGCoA 抑制劑—atrovastatin, lovastatin
3. 抗組織胺藥物—terfenadine
4. 免疫抑制劑—cyclosporin
5. 化療治劑—paclitaxel
6. HIV 蛋白抑制劑—saquinavir

子計劃A是以Lovastatin為模式藥，其為hydroxymethylglutaryl-coenzyme A還原酶抑制劑，Lovastatin是CYP3A及P-gp的受質。

貳、材料與方法

實驗材料與方法

實驗材料：

- 1、 S.D. rat：6-9 週大，購自國家動物中心
- 2、 藥品：bovine serum albumin(BSA)，glucose-6-phosphate，glucose-6-phosphate dehydrogenase，NADP，NADPH，NADH，Lovastatin，Simvastatin 購自 Sigma Chemical Co., St. Louis MO., U.S.A. acetone，chloroform，formaldehyde，glacial acetic acid，glycerol，methanol ether 購自 Merck Chemical Co., Frankfurt，Darmstadt，Germany.
- 3、 中藥藥引購自長雅藥品公司

實驗方法：

1、 實驗動物微粒體的製備：

微粒體製備方法沿用 Alvares 和 Mannering(1970)之方法。將裸鼠以斷頸方式犧牲後，立即取皮及肝，以下之製備過程保持冰浴或 4 °C，將組織置於 1.15%KCl 溶液中漂洗 3 次以上後，清除結締組織、血塊與脂肪，以吸水紙吸去多餘水分，予以稱重。肝剪碎後加入 1.15%KCl 溶液於均質機 (Teflon pestle-glass homogenizer) 中來回均質 6 次。並以 KCl 溶液調成 4 倍組織重之體積，倒入離心管中，以離心機，在 4 °C 下，以 9,000 X g 離心 20 分鐘，取得含微粒體及可溶部分之上清液。再以 KCl 溶液調至原有 4 倍組織重的體積，以 Beckman L8-80M，在 4 °C 下，以 100,000 X g 離心 1 小時，取得微粒體沉澱。再以 KCl 溶液懸浮成 4 倍於組織重的懸浮液，在 4 °C 下，以 100,000 X g 離心

1 小時，取得 washed microsome，上面覆以 0.1M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 緩衝液 (pH 7.4)，於 -78°C 下保存。

2、微粒體蛋白含量之測定：

沿用 Lowry(1951)之方法。以 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/ml 之 bovine serum albumine 為標準品，標準品與經水稀釋之微粒體懸浮液加入 2 ml alkaline copper 溶液 (為 2% NaCO_3 / 0.1N NaOH , 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2% NaK ttrate 以 100 : 1 : 1 混合而成)，並混合均勻，在室溫下靜置 10 分鐘後加入 0.2 ml 1N Folin-Ciocalteus phenol 試液，立即振盪均勻，靜置 30 分鐘。最後，記錄在 4750 nm 之吸光度，需在 30 分鐘內完成，利用標準品濃度與吸光度作回歸直線而可求得微粒體懸浮液之蛋白質含量。

3、Cytochrome P-450 含量之測定：

沿用 Omura 和 Sato (1964) 之一氧化碳差異光譜法。將皮或肝之微粒體懸浮液，用 2 ml 之約含 1.0-2.5 mg/ml 蛋白質之皮或肝之微粒體懸浮液，加入約 1 mg 之 Sodium dithionite 予以還原，分別 pipet 1 ml 至參考與樣品比色槽中。將 Hitachi 557 UV-Visible spectrophotometer 自 350 nm 至 550 nm 作基準線校正；完成後，將樣品比色槽取出，緩慢注入 CO 15 秒後，放回樣品比色槽，掃描並記錄波長 450 nm 附近最大吸收波長與波長 490 nm 時之吸光度差。

4、Erythromycin-demethylase 之活性測定：

活性之測定乃沿用 Pohl 及 Fouts (1980) 之方法。使用含蛋白質量

約為 0.125 mg 之皮或肝微粒體懸浮液，反應溶液中含 0.1M HEPES buffer (pH 7.8)，5.7 mM glucose 6-phosphate，1.4 單位 glucose 6-phosphate dehydrogenase，5.7 mM MgCl₂，1.8 mg/ml bovine serum albumin 與 1.9 μM 7-ethoxyresorufin，總體積為 1.2879 ml，除空白溶液外，反應以 0.54 μM NADPH 之加入開始。在 16 X100 mm 試管中于 37 °C 恆溫振盪槽內避光反應 10 分鐘後，以 2.5 ml methanol 終止反應，以 180 X g 離心 10 分鐘去除蛋白質沉澱，讀取上清液在 550 nm 為激發波長，585 nm 為發射波長時之螢光強度。經與 0.01 μM，0.1 μM Rhodamine B 標準溶液的螢光強度比較此酵素之 3A4 反應活性。

5、Nash reagent 之活性測定：

活性之測定乃沿用 Pohl 及 Fouts (1980) 之方法。使用含蛋白質量約為 0.125 mg 之皮或肝微粒體懸浮液，反應溶液中含 0.1M HEPES buffer (pH 7.8)，5.7 mM glucose 6-phosphate，1.4 單位 glucose 6-phosphate dehydrogenase，5.7 mM MgCl₂，1.8 mg/ml bovine serum albumin 與 1.9 μM 7-Methoxyresorufin，總體積為 1.2879 ml，除空白溶液外，反應以 0.54 μM NADPH 之加入開始。在 16 X100 mm 試管中于 37 °C 恆溫振盪槽內避光反應 10 分鐘後，以 2.5 ml methanol 終止反應，以 180 X g 離心 10 分鐘去除蛋白質沉澱，讀取上清液在 550 nm 為激發波長，585 nm 為發射波長時之螢光強度。經與 0.01 μM，0.1 μM Rhodamine B 標準溶液的螢光強度比較此酵素之 3A4 反應活性。

6、HPLC 分析方法：

HPLC 是以 Waters 高壓液相層析分析儀，層析柱以 C₈ (5-μm，250

X 4.6 mm)，波長為 238nm，流速為 1.2ml/min，移動相為[(ACN: 0.025M sodium dihydrogenphosphate) (65 : 35 v/v) pH4.5]，以 Isocratic 方式分析。內標準品為 simvastatin。

7. 體內實驗

(一) 大白鼠靜脈注射 Lovastatin 之藥動學研究

本研究之目的：

本研究的主要目的在測定及比較大白鼠在單一劑量靜脈注射 Lovastatin (含或不含篩選之 CYP3A 抑制劑) 後，Lovastatin 在大白鼠體內之吸收、分佈及排除情形。經由分析單一劑量靜脈注射給藥後大白鼠之血漿中之 Lovastatin，即可得知 Lovastatin 在大白鼠體內之吸收、代謝及排除情形，並可證明所篩選之 CYP3A 抑制劑之促進吸收效果，配合口服藥動資料，可進一步求出新舊劑型之絕對生體可用率。

實驗動物：

- A. 種類：大白鼠 (Rat)。
- B. 品系：Sprage-Dawley。
- C. 來源：國科會實驗動物中心。
- D. 開始實驗鼠齡：年輕成鼠，6-9 週大。
- E. 開始實驗體重：大白鼠之體重範圍越小越好，最好之體重範圍為 200-300 克。
- F. 標示方式：在尾部標記。
- G. 實驗數量：20 隻雄鼠。

實驗期間：

大白鼠給藥後將被觀察並收集各種試樣直至 Lovastatin 偵測不到為止（約一天）。

給藥途徑與方法：

靜脈注射。Lovastatin 將根據體重調整劑量，以單一劑量靜脈注射方式給藥。

使用理由：此藥有以靜脈注射方式使用於人類，因此，於大白鼠靜脈注射給藥方式所獲得之資料可用於比較對照人類。同時，由靜脈注射與口服注射之比較可以獲得藥物之生體可用率等藥動學參數。

藥物劑型之製備：

含與不含篩選之 CYP3A 抑制劑之藥物劑型將以適當之溶液製備成適當的濃度，使給藥的體積大約為 0.5-1 ml/kg。

藥物劑型之分析：

製備好的劑型必須分析其化學強度，也就是製劑必須要有相當好的均一性及穩定性。

實驗設計：

A. 動物之適應與選擇

大約 25 隻雄鼠在抵達實驗室後，必須經過至少一週之適應期與觀察期，在此期間動物將被觀察其一般的健康狀況及有無任何疾病徵狀。動物均由供應者給予適當的疫苗。在實驗開始前動物均由獸醫師做一完全的身體檢查。

B. 動物之選擇

在經過觀察期後，若有任何疾病徵狀或有任何重要之不正常生理現象的大白鼠均將淘汰。

C. 動物飼養環境

大白鼠將被飼養在溫度控制在攝氏 20-30 度、濕度控制在百分之 30 至 70 的環境中，另外，並提供每天 12 小時的照光。在實驗期間，大白鼠將被單獨飼養在代謝籠中。

D. 動物飼料

飼料為 Purina Mills 公司出品品質保證之 Rodent Chow® #5002，飼料為無限制供應，且在實驗前不需禁食。

E. 飲水

飲水為無限制供應。

F. 隨機試驗方式

動物之分組以體重為分類標準採用 Xybion 隨機程序隨機分組，使各實驗組的大白鼠體重分佈均勻。動物分為兩組，每組至少有 6 隻雄鼠。

G. 給藥

兩組動物 Lovastatin 的給藥劑量均為每公斤體重 10 毫克。一組為控制組，給藥為不含 CYP3A 抑制劑之 Lovastatin；另一組為實驗組，給藥為含 CYP3A 抑制劑之 Lovastatin。給藥方式是以靜脈注射方式將藥打入頸靜脈中。

H. 試樣收集

血漿與全血

本研究將以頸靜脈插管方式給藥，並以頸動脈插管方式自大白鼠取得血樣，在插管前以乙醚室將大白鼠麻醉。當大白鼠自手術中恢復後（約三小時），將大白鼠單獨放置在一限制裝置中以減低給藥及取樣時對大白鼠所造成的壓力，之後，Lovastatin 以靜脈注射方式打入頸靜脈，劑量為 10 mg/kg。給藥後 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 與 360 分鐘自大白鼠頸動脈取血 0.5 ml 並加入適量之肝素。在分析前，所有血樣均儲存在 -80 °C 之冰箱中。

在實驗中任何時間，若發現有任何動物病危，則基於人道理由，將以二氧化碳使其安樂死。

I. 試樣分析

各種試樣將以已開發之高效能液相層析法分析其中之 Lovastatin。

資料分析：

資料圖形及表格將包含所給藥物在所有全血、血漿，另外，將以標

準方法估算 Lovastatin 在大白鼠體內之各種藥動學參數，包括相對生體可用率。

統計分析：

資料將以個別動物方式報告，同時並報告每一組動物之平均值及標準差。如有需要也會用到 ANOVA 與其它後續統計方法。

(二)大白鼠口服Lovastatin新劑型之藥動學研究

本研究之目的：

本研究的主要目的在測定及比較大白鼠在單一劑量口服 Lovastatin (含或不含篩選之 CYP3A 抑制劑) 後，Lovastatin 在大白鼠體內之吸收、分佈及排除情形。經由分析單一劑量口服給藥後大白鼠之血漿中之 Lovastatin，即可得知 Lovastatin 在大白鼠體內之吸收、代謝及排除情形，並可證明所篩選之 CYP3A 抑制劑之促進吸收效果。

實驗動物：

- A. 種類：大白鼠 (Rat)。
- B. 品系：Sprage-Dawley。
- C. 來源：國科會實驗動物中心。
- D. 開始實驗鼠齡：年輕成鼠，6-9 週大。
- E. 開始實驗體重：大白鼠之體重範圍越小越好，最好之體重範圍為 200-300 克。

F. 標示方式：在尾部標記。

G. 實驗數量：12 隻雄鼠。

實驗期間：

大白鼠給藥後將被觀察並收集各種試樣直至 Lovastatin 偵測不到為止（約一天）。

給藥途徑與方法：

口服。Lovastatin 將根據體重調整劑量，以單一劑量口服方式給藥。

使用理由：此藥是以口服方式使用於人類，因此，於大白鼠口服給藥方式所獲得之資料可用於比較對照人類。

藥物劑型之製備：

含與不含篩選之 CYP3A 抑制劑之藥物劑型將以適當之溶液製備成適當的濃度，使給藥的體積大約為 0.5-1 ml/kg。

藥物劑型之分析：

製備好的劑型必須分析其化學強度，也就是製劑必須要有相當好的均一性及穩定性。

實驗設計：

A. 動物之適應與選擇

大約 25 隻雄鼠在抵達實驗室後，必須經過至少一週之適應期與觀

察期，在此期間動物將被觀察其一般的健康狀況及有無任何疾病徵狀。動物均由供應者給予適當的疫苗。在實驗開始前動物均由獸醫師做一完全的身體檢查。

B. 動物之選擇

在經過觀察期後，若有任何疾病徵狀或有任何重要之不正常生理現象的大白鼠均將淘汰。

C. 動物飼養環境

大白鼠將被飼養在溫度控制在攝氏 20-30 度、濕度控制在百分之 30 至 70 的環境中，另外，並提供每天 12 小時的照光。在實驗期間，大白鼠將被單獨飼養在代謝籠中。

D. 動物飼料

飼料為 Purina Mills 公司出品品質保證之 Rodent Chow® #5002，飼料為無限制供應，且在實驗前不需禁食。

E. 飲水

飲水為無限制供應。

F. 隨機試驗方式

動物之分組以體重為分類標準採用 Xybion 隨機程序隨機分組，使各實驗組的大白鼠體重分佈均勻。動物分為兩組，每組至少有 6 隻雄鼠。

G. 給藥

兩組動物 Lovastatin 的給藥劑量均為每公斤體重 10 毫克。一組為

控制組，給藥為不含 CYP3A 抑制劑之 Lovastatin；另一組為實驗組，給藥為含 CYP3A 抑制劑之 Lovastatin。給藥方式是以口服方式將藥注入鼠胃。

H. 試樣收集

血漿與全血

本研究將以頸動脈插管方式自大白鼠取得血樣，在插管前以乙醚室將大白鼠麻醉。當大白鼠自手術中恢復後（三小時以上），將大白鼠單獨放置在一限制裝置中以減低給藥及取樣時對大白鼠所造成的壓力，之後，Lovastatin 以口服方式注入鼠胃中，劑量為 10 mg/kg。給藥後 0.17, 0.33, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16 與 24 小時自大白鼠頸動脈取血 0.5 ml 並加入適量之肝素。在分析前，所有血樣均儲存在 -80 °C 之冰箱中。

在實驗中任何時間，若發現有任何動物病危，則基於人道理由，將以二氧化碳使其安樂死。

I. 試樣分析

各種試樣將以已開發之高效能液相層析法分析其中之 Lovastatin。

資料分析：

資料圖形及表格將包含所給藥物在所有全血、血漿，另外，將以標準方法估算 Lovastatin 在大白鼠體內之各種藥動學參數，包括相對生體可用率。

統計分析：

資料將以個別動物方式報告，同時並報告每一組動物之平均值及標準差。如有需要也會用到 ANOVA 與其它後續統計方法。

(三)狗之 Lovastatin 新劑型之藥動學研究：依下述動物實驗之標準進行含與不含中藥藥引口服生體可用率之研究。

本研究之目的：

本研究的主要目的在測定及比較狗在單一劑量口服 Lovastatin（含或不含篩選之 CYP3A 抑制劑）後，Lovastatin 在狗體內之吸收、分佈及排除情形。經由分析單一劑量口服給藥後狗之血漿中之 Lovastatin，即可得知 Lovastatin 在狗體內之吸收、代謝及排除情形，並可證明所篩選之 CYP3A 抑制劑之促進吸收效果。

實驗動物：

- A. 種類：狗（Dog）。
- B. 品系：Beagle。
- C. 來源：Ridglan Farms, Inc., Mount Horeb, Wisconsin。
- D. 開始實驗狗齡：年輕成狗，6-9 個月大。
- E. 開始實驗體重：每個性別 Beagle 狗之體重範圍越小越好，最好之體重範圍為 9-12 公斤。
- F. 標示方式：每隻狗將以個別的耳朵刺青及狗籠識別，每隻狗均以動物編號加上計劃編號為獨一的識別編號。

G. 實驗數量：5 隻雄狗與 5 隻雌狗。

實驗期間：

狗給藥後將被觀察並收集各種試樣直至 Lovastatin 偵測不到為止（約一天）。

給藥途徑與方法：

口服。Lovastatin 將根據體重調整劑量，以單一劑量口服方式給藥。

使用理由：此藥是以口服方式使用於人類，因此，於狗口服給藥方式所獲得之資料可用於比較對照人類。

藥物劑型之製備：

含與不含篩選之 CYP3A 抑制劑之藥物劑型將以適當之溶液製備成適當的濃度，使給藥的體積大約為 400 mg 或 0.38 ml。

藥物劑型之分析：

製備好的劑型必須分析其化學強度，也就是製劑必須要有相當好的均一性及穩定性。

實驗設計：

A. 動物之適應與選擇

大約 12 隻公狗在抵達實驗室後，必須經過至少一週之適應期與觀

察期，在此期間動物將被觀察其一般的健康狀況及有無任何疾病徵狀。動物均由供應者給予適當的疫苗。在實驗開始前動物均由獸醫師做一完全的身體檢查。

B. 動物之選擇

在經過觀察期後，若有任何疾病徵狀或有任何重要之不正常生理現象的狗均將淘汰。

C. 動物飼養環境

狗將被飼養在溫度控制在攝氏 20-30 度、濕度控制在百分之 30 至 70 的環境中，另外，並提供每天 12 小時的照光。在實驗期間，狗將被單獨飼養在代謝籠中。

D. 動物飼料

飼料為 Purina Mills 公司出品品質保證之 Rodent Chow® #5002，飼料為無限制供應，且在實驗前不需禁食。

E. 飲水

飲水為無限制供應。

F. 隨機試驗方式

動物之分組以體重為分類標準採用 Xybion 隨機程序隨機分組，使各實驗組的狗體重分佈均勻。動物分為兩組，每組至少有 6 隻公狗

G. 給藥

兩組動物 Lovastatin 的給藥劑量均為每公斤體重 8~12 毫克。一組為控制組，給藥為不含 CYP3A 抑制劑之 Lovastatin；另一組為實

驗組，給藥為含 CYP3A 抑制劑之 Lovastatin。給藥方式是以口服方式將藥注入狗胃。

H. 試樣收集

血漿與全血

本研究將以頸動脈插管方式自狗取得血樣，在插管前以乙醚室將狗麻醉。當狗自手術中恢復後（三小時以上），將狗單獨放置在一限制裝置中以減低給藥及取樣時對狗所造成的壓力，之後，Lovastatin 以口服方式注入狗胃中，劑量為 10 mg/kg。給藥後 0.5、1.0、1.5、2、3、4、6、9、12 與 18 小時自狗頸動脈取血 0.5 ml 並加入適量之肝素。在分析前，所有血樣均儲存在 -80 °C 之冰箱中。

在實驗中任何時間，若發現有任何動物病危，則基於人道理由，將以二氧化碳使其安樂死。

I. 試樣分析

各種試樣將以已開發之高效能液相層析法分析其中之 Lovastatin。

資料分析：

資料圖形及表格將包含所給藥物在所有全血、血漿，另外，將以標準方法估算 Lovastatin 在狗體內之各種藥動學參數，包括相對生體可用率。

統計分析：

資料將以個別動物方式報告，同時並報告每一組動物之平均值及標準差。如有需要也會用到 ANOVA 與其它後續統計方法。

參、研究結果與討論

1. 完成了已獲得之五十六種中藥藥引成份，這些成份包含 flavonoids，isoflavonoids，terpenoids 及 essential oils 等老鼠腸中微粒體 活性體外實驗之篩選工作(如表二)，與先前之肝中微粒體 活性體外實驗之篩選結果(如表一)，具抑制效果前十名之中藥藥引除排列順序有些差異外，成份大致相同。此結果證實本實驗室已建立標準可信任之體外篩選方法，可有效的篩選其他具有潛力之中藥藥引。

2. 評估離體老鼠對於含或不含中藥藥引成分對於 Lovastatin 吸收的影響。本實驗室完成模式藥 Lovastatin 於前十名中藥藥引對老鼠肝中微粒體 活性之抑制效果下之離體代謝模式(如圖一~圖七)。其結果以抑制濃度五十(IC50)來顯示中藥藥引對老鼠肝中微粒體活性之抑制強度(如表三)。其前三名分別為 HUCHE047 (0.13 mg/mL)，HUCHE045 (0.176 mg/mL)及 HUCHE038 (0.27 mg/mL)。及 HUCHE038 (0.27 mg/mL)。此結果與中藥藥引對老鼠肝中微粒體 活性之抑制效果極為相似，可進一步證實離體實驗之一致性。

3. 本實驗室更進一步建立以小型動物老鼠為體內實驗動物的實驗模式，以口服餵食中藥藥引之方法以進行在老鼠上的體內實驗。結果顯示 HUCHE038 無論於肝或腸中微粒體 活性之抑制效果皆高達 80%左右且連服三天之效果大於只服一天(如圖八及圖十)。而 HUCHE047 顯示相似之抑制效果，唯獨於腸中微粒體活性之抑制效果較低(但亦達 60%左右之抑制效果)(如圖九及圖十一)。本實驗室順利完成於體外及體內初步篩選的過程，並建立初步的體內、體外的相關性，以供第二年的參考。

4. 已建立以大型動物狗為體內實驗動物的實驗模式，以口服餵食中藥藥引之方法以探討模式藥 Lovastatin 於進行在狗上的體內代謝模式，評估狗對於含或不含中藥藥引成份對於 Lovastatin 吸收之影響。目前經過三次之實驗結果(如圖十二及圖十三)，可明顯顯示 HUCHE038 可增加模式藥 Lovastatin 之吸收。由於實驗結果之變異性及困難度，本實驗仍繼續執行中，以求結果之一致性。

5. 大白鼠及狗靜脈注射 Lovastatin 藥動學研究之實驗欲等至大白鼠及狗口服 Lovastatin 藥動學研究告一段落後可立即進行。

肆、結論與建議

於第一年之計劃已完成之項目包括：

1. 已建立了一套可靠之模式藥 Lovastatin 於 microsome 溶液，小型動物如老鼠及大型動物如狗之血漿藥物濃度的分析方法，其最低測量濃度 (LOD) 可低達 10 ng/mL. 此分析方法成功的提供了體外及體內之實驗分析。
2. 同時亦完成了已獲得之五十六種中藥藥引成份，這些成份包含 flavonoids, isoflavonoids, terpenoids 及 essential oils 等老鼠腸中微粒體 活性體外實驗之篩選工作，與先前之肝中微粒體 活性體外實驗之篩選結果，具抑制效果前十名之中藥藥引除排列順序有些差異外，成份大致相同。此結果證實本實驗室已建立標準可信任之體外篩選方法，可有效的篩選其他具有潛力之中藥藥引。
3. 評估離體老鼠對於含或不含中藥藥引成分對於 Lovastatin 吸收的影響。本實驗室完成模式藥 Lovastatin 於前十名中藥藥引對老鼠肝中微粒體 活性之抑制效果下之離體代謝模式。其結果以抑制濃度五十 (IC₅₀) 來顯示中藥藥引對老鼠肝中微粒體 活性之抑制強度。其前三名分別為 HUCHE047 (0.13 mg/mL), HUCHE045 (0.176 mg/mL) 及 HUCHE038 (0.27 mg/mL)。及 HUCHE038 (0.27 mg/mL)。此結果與中藥藥引對老鼠肝中微粒體 活性之抑制效果極為相似，可進一步證實離體實驗之一致性。

4. 本實驗室更進一步建立以小型動物老鼠為體內實驗動物的實驗模式，以口服餵食中藥藥引之方法以進行在老鼠上的體內實驗。結果顯示 HUCHE038 無論於肝或腸中微粒體 活性之抑制效果皆高達 80% 左右且連服三天之效果大於只服一天。而 HUCHE047 顯示相似之抑制效果，唯獨於腸中微粒體 活性之抑制效果較低(但亦達 60% 左右之抑制效果)本實驗室順利完成於體外及體內初步篩選的過程，並建立初步的體內、體外的相關性，以供第二年的參考。

5. 已建立了以老鼠為實驗動物的動物模式，可於老鼠頸靜脈放置插管以供血液抽取之用，以供 *in vivo* 實驗之用。但由於 Lovastatin 於老鼠血漿中代謝極快，故無法評估老鼠體內對於含或不含中藥藥引成分對於 Lovastatin 吸收的影響。此與文獻”Duggan D.E. et. al.,(The physiological disposition of Lovastatin ; ***Drug Metabolism and Disposition***, Vol 17, No. 2, PP166~173.)”中之結果符合，亦即 “Hydrolysis of lovastatin to Hydroxy acid was ~50% and 10%/min for mouse and rat, respectively. But only has 0.8%/min for dog and 0.4%/min for human.”。由此得知 Lovastatin 於老鼠血漿中代謝可高達 50%/分鐘。故以老鼠為實驗動物的動物模式，於老鼠頸靜脈放置插管以供血液抽取之用之模式，並不適合 *in vivo* 實驗之用。

6. 已建立以大型動物狗為體內實驗動物的實驗模式，以口服餵食中藥藥引之方法以探討模式藥 Lovastatin 於進行在狗上的體內代謝模式，評估狗對於含或不含中藥藥引成份對於 Lovastatin 吸收之影響。目前經過三

次之實驗結果，可明顯顯示HUCHE038可增加模式藥Lovastatin之吸收。由於實驗結果之變異性及困難度，本實驗仍繼續執行中，以求結果之一致性。

7.本實驗室評估離體老鼠對於含或不含中藥藥引成分對於Lovastatin吸收的影響；或以小型動物老鼠為體內實驗動物的實驗模式，以口服餵食中藥藥引之方法以進行在老鼠上的體內實驗；或於老鼠頸靜脈放置插管以供血液抽取之用，以供*in vivo*實驗之用；或以大型動物狗為體內實驗動物的實驗模式，以口服餵食中藥藥引之方法以探討模式藥Lovastatin於進行在狗上的體內代謝模式，評估狗對於含或不含中藥藥引成份對於Lovastatin吸收之影響皆以檢測模式藥Lovastatin濃度之增減而沒有分析其於血漿中之主要代謝物Hydroxy acid是否隨Lovastatin之代謝增加而增加。這點我們正積極向原供應廠商索取或購買中，使本實驗更具說服力。

伍、參考文獻

1. Bailey DG, Arnold JMO, Spence JD. Grapefruit juice and drugs: how significant is the interaction? *Clin Pharmacokin* 1994; 26:91-98.
2. Bailey DG, Spence JD, Edgar B, Bayliff CD, Arnold JMO. Ethanol enhances the hemodynamic effects of felodipine. *Clin Invest Med* 1989; 12: 357-362.
3. Edgar B, Regardh CG, Johnsson G, *et al.* Felodipine kinetics in healthy man. *Chin Pharmacol Ther* 1985; 38: 205-211.
4. Blychert E, Edgar B, Elmfeldt D, Hedner T. A population study of the pharmacokinetics of felodipine. *Br J Clin Pharmacol* 1991; 31:15-24.
5. Lundahl J, Regardh CG, Edgar B, Johnsson G. Effects of grapefruit juice ingestion-pharmacokinetics and haemodynamics of intravenously and orally

- administered felodipine in healthy men. *Eur J Clin Pharmacol* 1997; **52**: 139-145
6. Regardh CG, Baamhielm C, Edgar B, Hoffman KJ. Pharmacokinetics and biotransformation of 1,4-dihydropyridine calcium antagonists. *Prog Drug Metab* 1990; **12**: 41-86.
 7. Guengerich FP, Brian WR, Iwasaki M, Sari MA, Baamhielm C, Berntsson P. Oxidation of dihydropyridine calcium channel blockers and analogues by human liver cytochrome P45011A4. *J Med Chem* 1991; **34**:1834-1844.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. Relling MV, Nemeč J, Schuetz E. *et al.* O-demethylation of epipodophyllotoxins is catalyzed by human cytochrome P450 3 A4 *Mol Pharmacol* 45:352-358,1994
 13. 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* 48:1871-1881 1994
 14. 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* 13:129-134, 1995
 15. 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*54:4026-4035.1994
 16. 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* 52:2268-2278,1992
 17. 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* 48:1528-1530,1994

18. 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 USA* 94:2031-2035, 1997
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Wacher, V. J.; Salphati, L.; Benet, L. Z. Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. *Adv. Drug Deliveiy Rev.* 1996, 20, 99-112.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Vincet J. Wacher, Jeffery A. Silverman, Yuanchao Zhang and Lesliw Z. Benet. Role

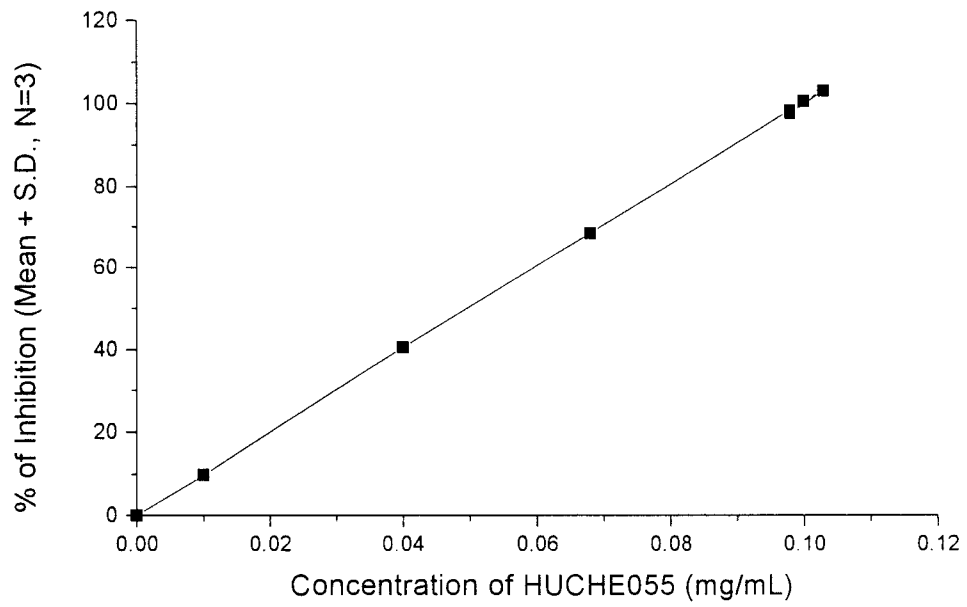
- of p-Glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptide and prptidomimetics. *J. Pharma. Sci.* 1998, 87,1322-1330.
30. Schuetz, E.G.; Schinkel, A. H.; Rolling, M. V.; Schuetz, J. D. P-glycoprotein, a major determinant of rifampicin-inducible expression of cytochrome P450 3A in mice and humans. *Proc. Nat. Acad. Sri. U.S.A.* 1996, 93, 4001-4005.
 31. 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.
 32. Ducharme M. P.; Warbasse, L. H.; Edwards, D. J. Disposition of intravenous and oral cyclosporine after administration with grapefruit juice. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1995, 57, 485-491.
 33. Lown K S.; Bailey, D. G.; Fontana, R. J.; Janardan, S. K; Adair C. H.; Fortlage, L. A.; Brown, M. B.; Guo, W.; Watkins, Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J. Clin. Invest.* 1997, 99, 2545-2553
 34. Shimada, T.; Yamazaki, H.; Mimura, M.; Inui, Y.; Guengerich, F. P. Interindividual variations in human liver cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994,270, 414-423.
 35. Watkins, P. B.; Wrighton, S. A.; Schueta, E.G.; Molowa, D. T.; Guzelian, P.S. Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P450 in the intestinal mucosa of rats and man. *J. Clin. InvesL* 1987, 80, 1029-36.
 36. Benet, L. Z.; Kroetz, D. L.; Sheiner, L. B. Pharmacokinetics: The dynamics of drug absorption, distribution, and elimination. In *Goodman and Gilman's The Pharmacologic Basis of Therapeutics*, 9th ed.; Hardman, J. G., Limbird, L. E.,Molinoff, P. B., Ruddon, R. W., Goodman, A. G., Eds.;McGraw-Hill: New York, 1996; pp 3-27.
 37. Prkinson, A. An overview of current cytochrome P450 technology for assessing the safety and efficacy of new materials. *Toxicol. Pathol.* 4,45-57.
 38. Gonzalez, F J Schilild, B. J.; Umeno, M.; McBride. O. W.; Hardwick, J P Meyer, U. A.; Gelboin, H. V.; Idle, J. R. Human P45OPCN1 sequence, chromosome localization, and direct evidence through cDNA expression that P45OPCN1 is nifedipine oxidase. *DNA* 1988, 7, 79-86.
 39. Hashimoto, H.; Toide, K; Kitamura, R.; Fujita, M.; Tagawa, S.; Iteh, S.; Kamataki, T. Gene structure of CYP3A4, an adult-specific form of cytochrome P450 in human livers, and its transcriptional control. *Eur. J. Biochem.* 1993,218,585-595.
 40. Aoyama, T.; Yamano, S.; Waxman, D. J.; Lapenson, D. P.; Meyer, U. A.; Fischer, V.;

- Tyndale, R.; Inaba, T.; Kalow, W.; Gelboin, H. V.; Gonzalez, F. J. Cytochrome P450 hPCN3, a novel cytochrome P450 III A gene product that is differentially expressed in adult human liver. cDNA and deduced amino acid sequence and distinct specificities of cDNA expressed hPCN1 and hPCN3 for the metabolism of steroid hormones and cyclosporine. *J Biol. Chem.* 1989, 264, 10388-95.
41. Schuetz, J. D.; Molowa, D. T.; Guzelian, P.S. Characterization of a cDNA encoding a new member of the glucocorticoid responsive cytochromes P450 in human liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989, 274, 355-65.
 42. Wrighton S. A.; Ring, B. J.; Watkins; P. B., VandenBranden M. Identification of a polymorphically expressed member of the human cytochrome P450 III family. *Mol. Pharmacol.* 1989, 36, 97-105.
 43. Wrighton S. A.; Brian, W. R.; Sari, M. -A.; Iwasaki, M.; Guengerich, F. P.; Raucy, J. L.; Molowa, D. T.; VandenBranden, M. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P45011IA5 (HLp3). *Mol. Pharmacol.* 1990, 38, 207-213.
 44. Kolars, J. C.; Lown, K. S.; Schiniedlin-Ren, P.; Ghosh, M.; Fang, C.; Wrighton, S. A.; Merion, R. M.; Watkins, P. B. CYP3A gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics* 1994, 4, 247-59.
 45. Lown, K. S.; Kolars, J. C.; Thummel, K E.; Barnett, J. L.; Kunze, K L.; Wrighton, S. A.; Watkins, P. B. Interpatient heterogeneity in expression of CYP3A4 and CYP3A5 in small bowel. Lack of prediction by the erythromycin breath test. *Drug Metab. Dispos.* 1994, 22, 947-55.
 46. McKiimon, R. A.; Burgess, W. M.; Hall, P. de la M.; Roberts-Thomson, S. J.; Gonzalez, F. J.; McManus, M. E. 1995. Characterisation of CYP3A gene subfamily expression in human gastrointestinal tissues. *Gut* 1995, 36, 259-267.
 47. Kivistö, K. T.; Bookjans, G.; Fromm, M. F.; Griese, E.-U.; Münzel, P.; Kroemer, H. K. Expression of CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7 in human duodenal tissue. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1996, 42, 387-389.
 48. Lown, K. S.; Mayo, R. R.; Leiclitman, A. B.; Hsiao, H. L.; Turgeon, D. K.; Schmiedlin-Ren, P.; Rossi, S. J.; Brown, M. B.; Guo, W.; Benet, L.; z.; Watkins, P. B. Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporin A. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1997, 62 248-260.
 49. Paine, M. F.; Khalighi, M.; Fisher, J. M.; Shen, D. D.; Kunze, K. L.; Marsh, C. L.; Perkins, J. D. Thummel K E. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997, 283, 1552-1562.
 50. De Waziers, I.; Cugnenc, P. H.; Yang, C. S.; Leroux, J.-P.; Beaune, P. H. Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human

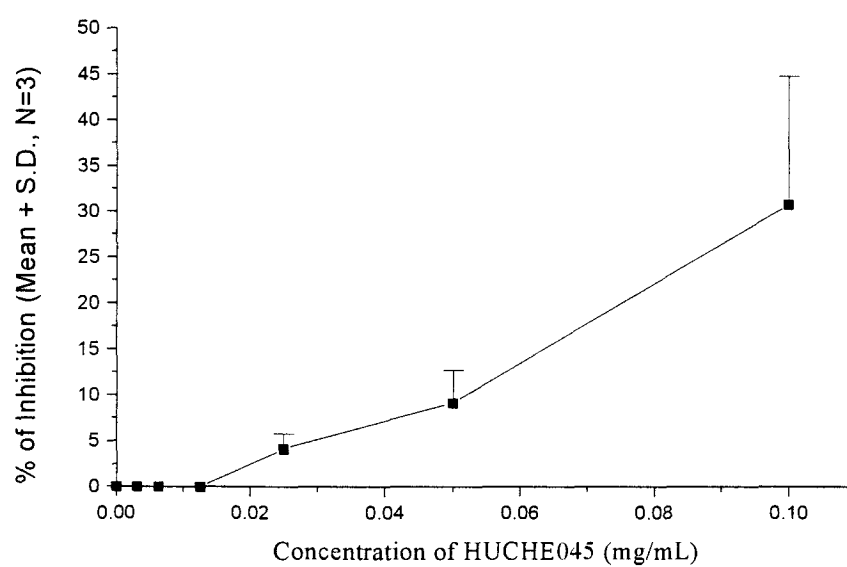
- hepatic and extrahepatic tissues. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 1990,253, 387-394.
51. Lown, K. S.; Gbosh, M.; Watkins, P. B.. Sequences of intestinal and hepatic cytochrome P450 3A4 cDNAs are identical. *Drug Metab. Dispos.* 1998, 26, 185-187.
 52. Guengerich, EP: Characterization of human cytochrome P450 ezymes. *FASEB J* 6:745-748, 1992
 53. Gupta SK: Erythromycin enhances the absorption of cyclosporine. *Br J Clin Pharmacol* 25:401-402,1988
 54. Gomez DY, Wacher VJ, Tomlanovich Si. et al: The effects of ketoconazole on the intestinal metabolism and bioavailability cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 58:15-19,1995
 55. Keogh A, Spratt P. McCosker C, et al: Ketoconazole to reduce need for cyclosporine after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 333:628-633,1995
 56. Kobayashi K, Ratain MJ, Fleming GF, et al: A phase I study CYP3A4 modulation of oral etoposide with ketoconazole in patients with advanced cancer. *Proc Am Soc Cm Oncol* 15:471 1996 (abstr1489)
 57. Hellreiegel ET, Bjomsson TD, Hauck WW: Interpatient variability in bioavailability is related to the extent of absorption: Implications for bioavailability and b

陸、圖次

圖一： By using a positive control, HUCHE055 to see the effect of HUCHE055 on the metabolism of Lovastatin.



圖二: Effect of HUCHE045 (dissolved in DMSO) on Lovastatin metabolism in rat's liver microsome



圖三:: Effect of HUCHE038 on the Lovastatin metabolism in rat's liver microsome

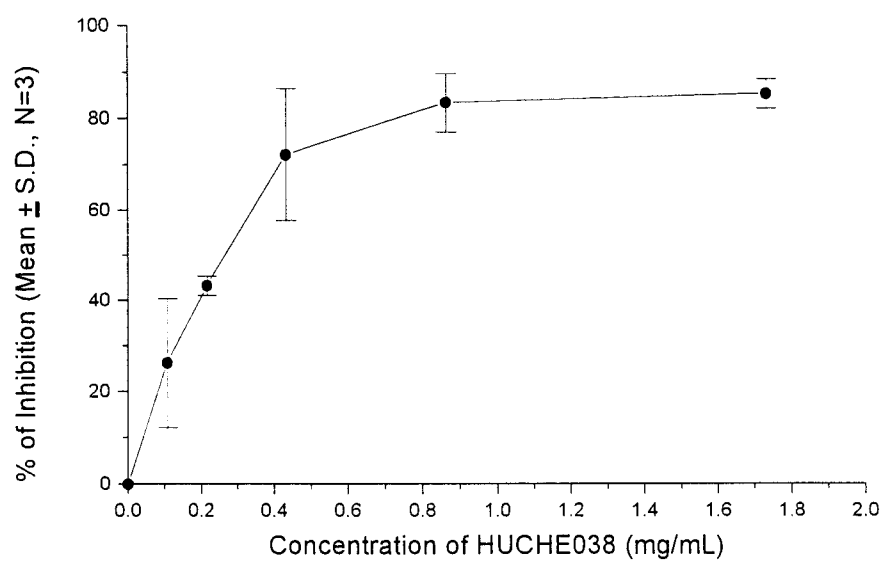
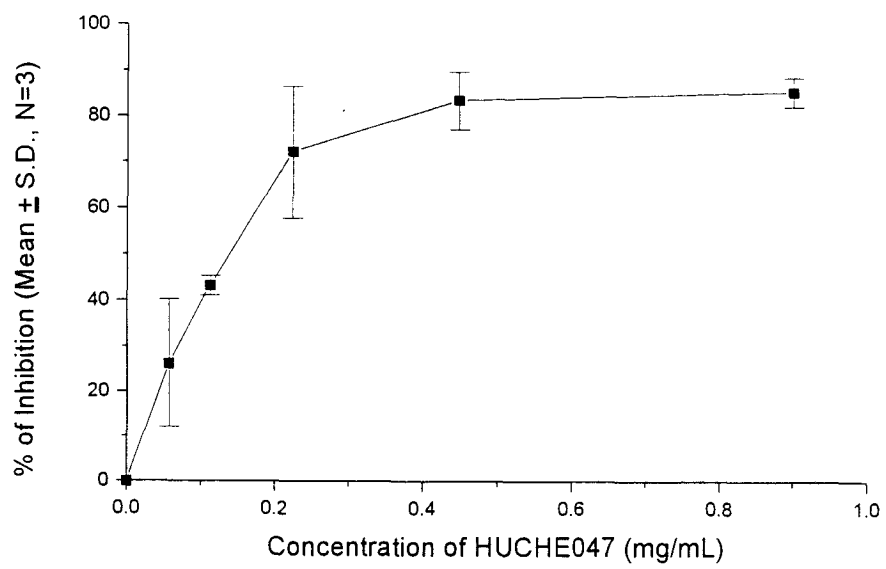
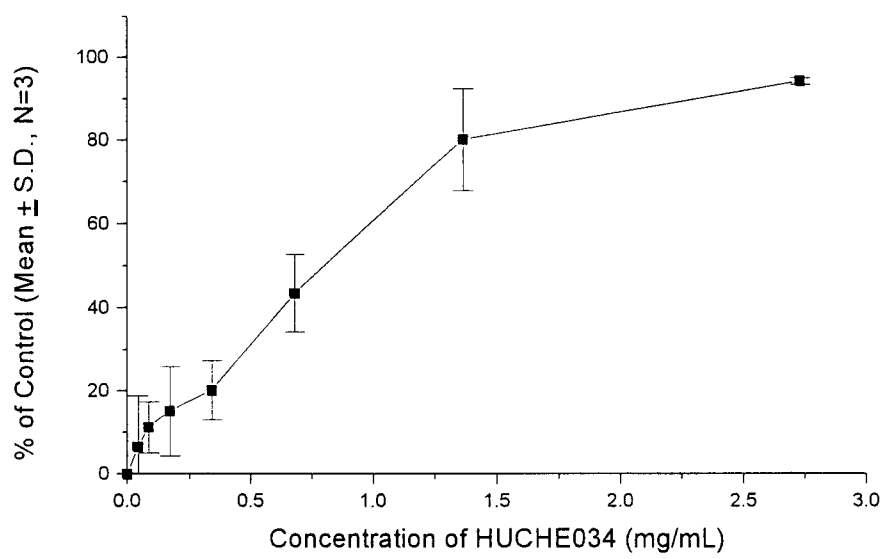


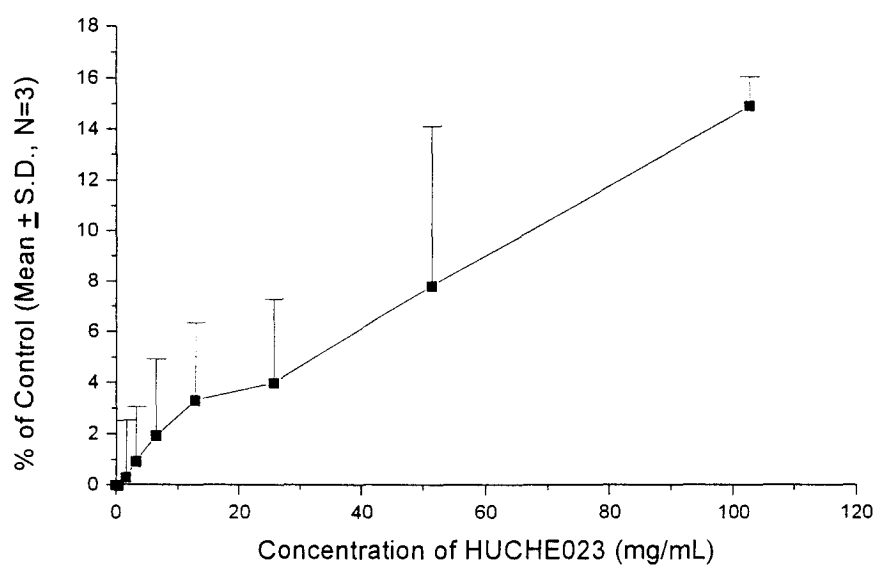
圖 24: Effect of HUCHE047 on the Lovastatin metabolism in rat's liver microsome.



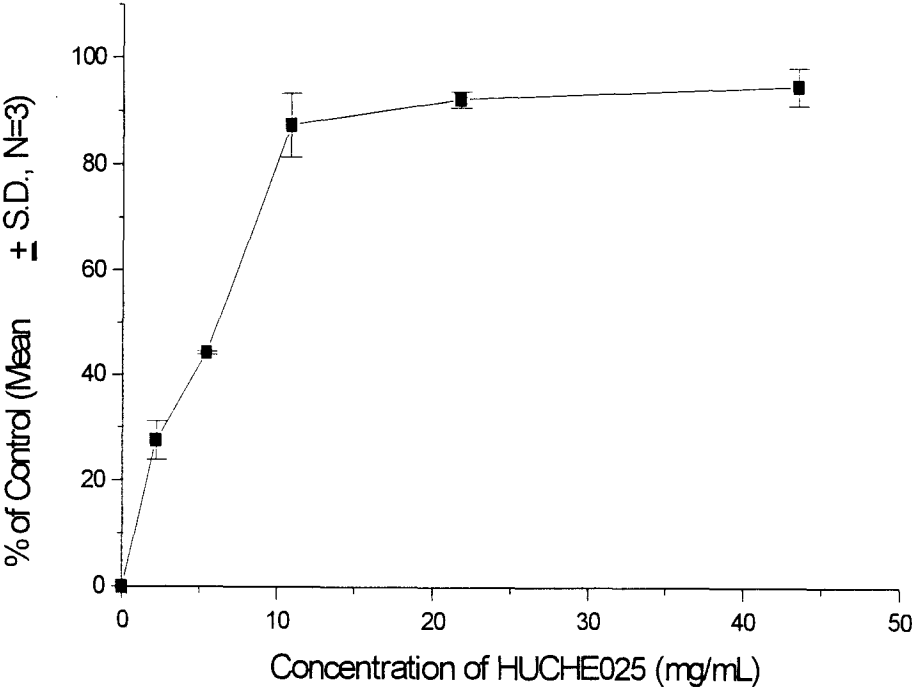
圖五: Effect of HUCHE034 on the Lovastatin metabolism in rat's microsomes.



圖六:: Effect of HUCHE023 on the Lovastatin metabolism in rat's microsomes.



圖七: Effect of HUCHE025 on the Lovastatin metabolism in rat's microsomes.



3. *in vivo* study

(a) in S.D. Rat model

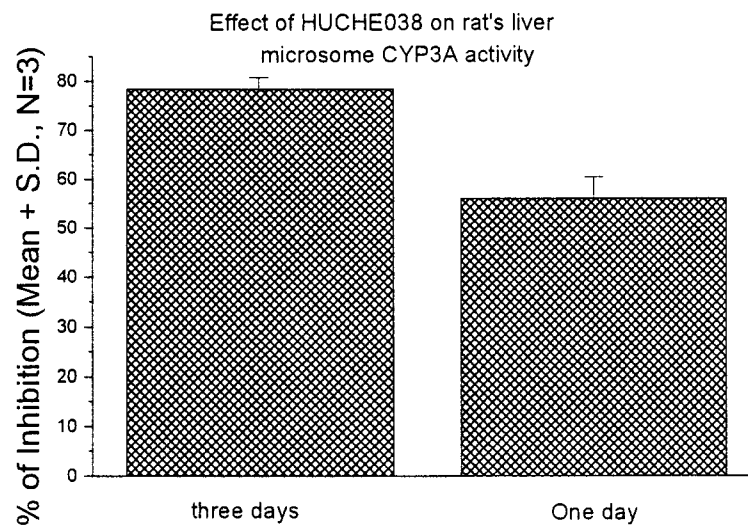
(1) method: feeding method

(2) for HUCHE038 and HUCHE047: 0.25 mL/day, after with 2.5 mL water

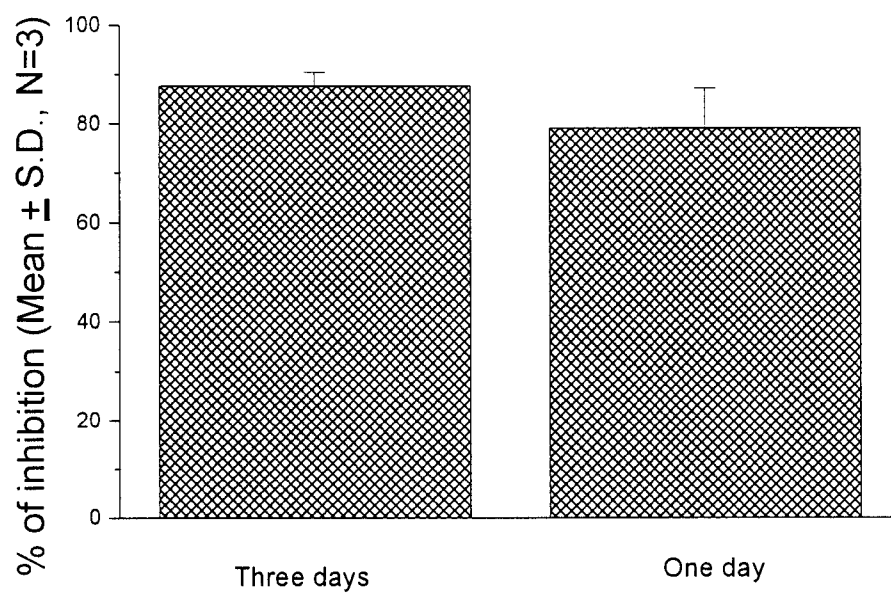
(3) after single dose for one-day experiment and multiple-dose for three-day experiment, all S.D. rat were sacrificed and take intestine and liver for homogenized for microsome preparation.

(4) Results:

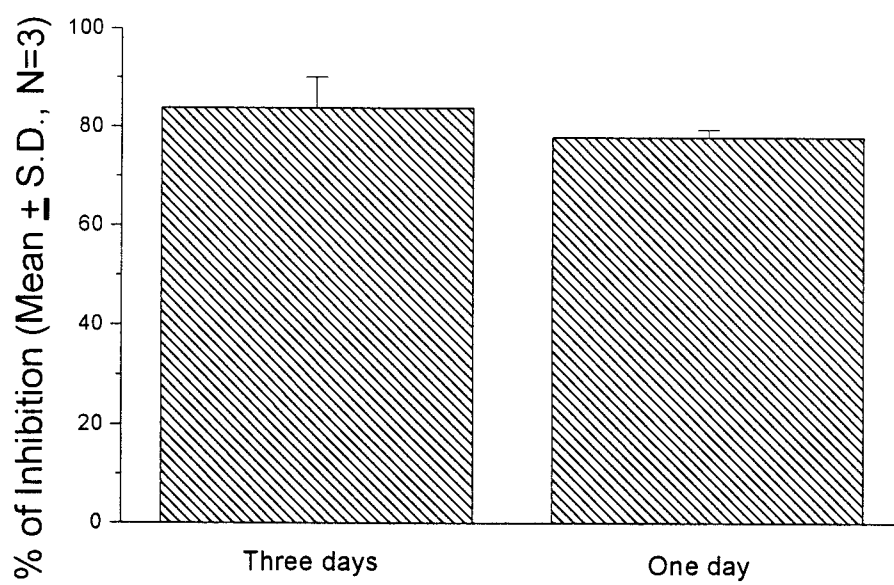
圖八: Effect of HUCHE038 on rat's liver microsome CYP3A activity



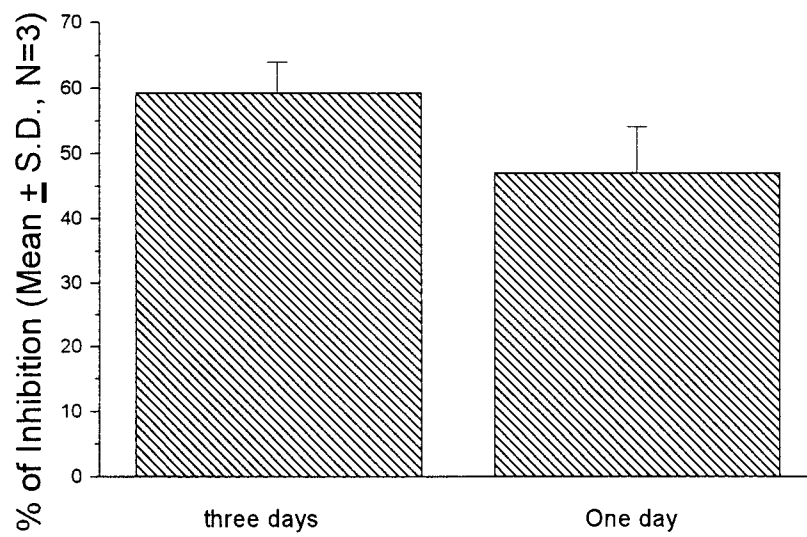
圖九: Effect of HUCHE047 on rat's liver microsome CYP3A activity



圖十: Effect of HUCHE038 on rat's intestinal microsome CYP3A activity

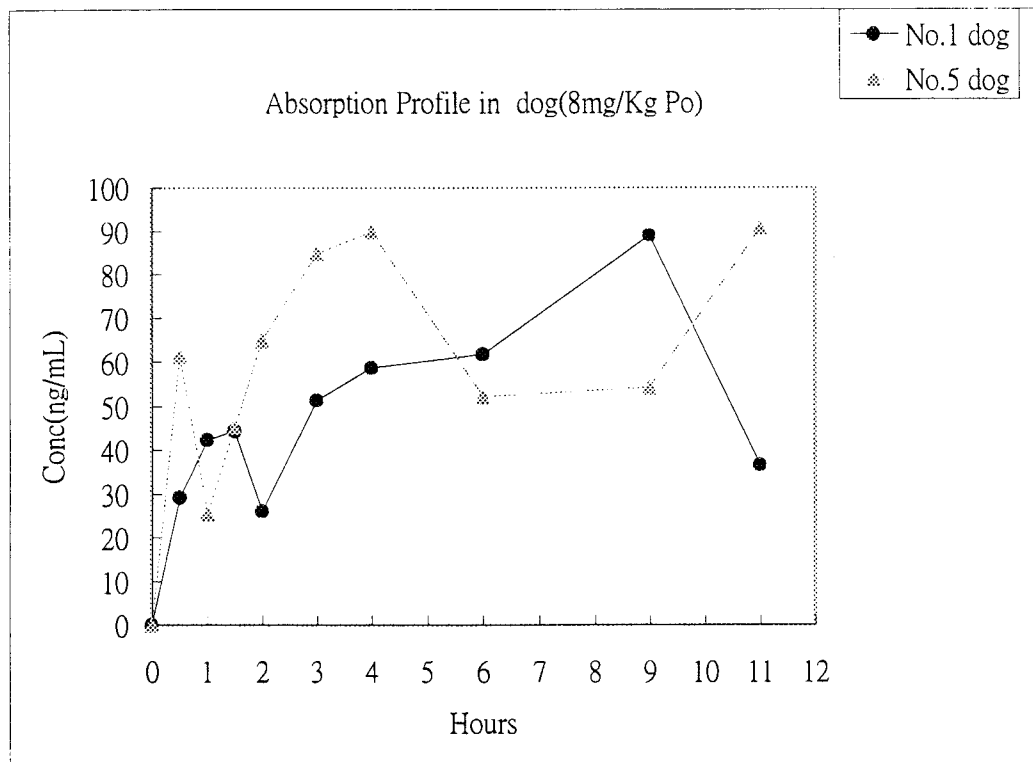


圖十一: Effect of HUCHE047 on rat's liver microsome CYP3A activity



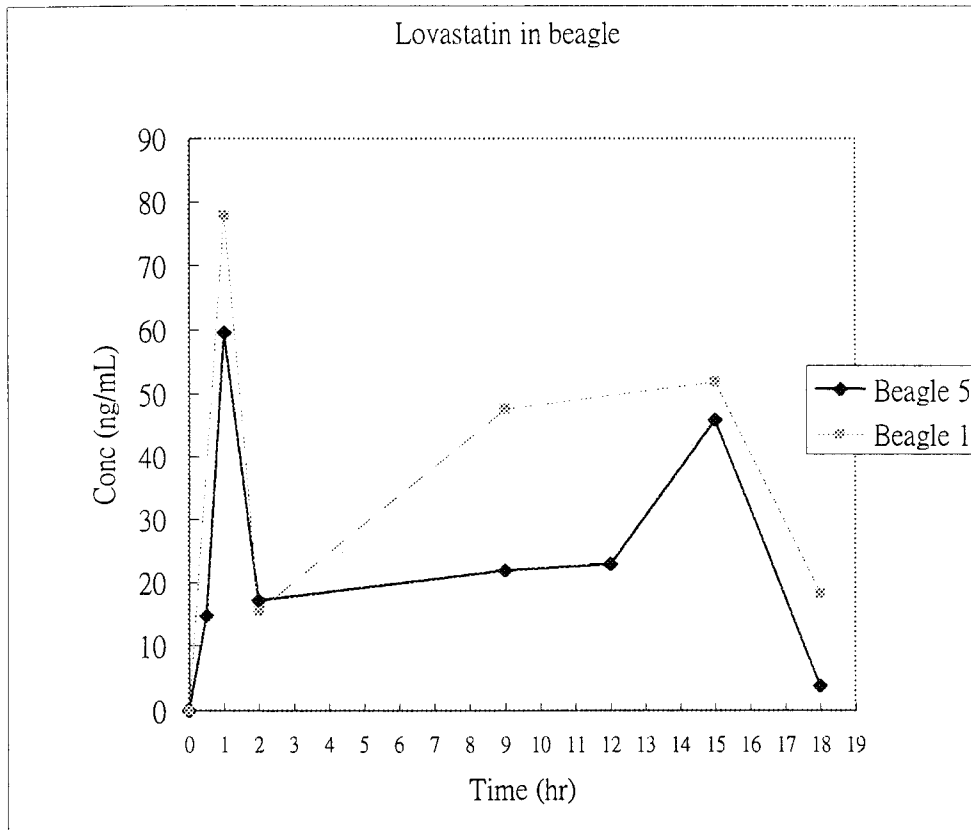
in beagle model:

圖十二: Experimental Procedure for *in vivo* study for the effect of HUCHE038 On Lovastatin metabolism in beagle.



註: No. 1 dog: control group
No. 2 dog: sample group

圖十三: Experimental Procedure for *in vivo* study for the effect of HUCHE038 On Lovastatin metabolism in beagle.



註： Beagle 1 dog: control group
Beagle 2 dog: sample group

柒、表次

表一 : were demonstrated the results of the top ten Chinese herbal enhancers inhibited the activity of CYP3A of *rat liver microsome*. (N=6)

Rank	CHEs	Concn(mM)	% of Control	M.W.	mg
1	HUCHE045	0.004	15.21±1.38	136.2	0.55
2	HUCHE023	0.004	24.05±5.06	610.57	2.44
3	HUCHE038	0.04	28.37±0.00	132.16	5.29
4	HUCHE038	0.4	33.10±1.79	132.16	52.86
5	HUCHE047	0.4	36.41±1.79	136.20	54.48
6	HUCHE034	0.4	42.53±0.49	302.4	120.96
7	HUCHE025	0.4	48.25±4.62	290.30	120.91
8	HUCHE015	0.4	45.42±6.13	290.30	116.72
9	HUCHE019	0.2	51.46±6.68	464.37	116.12
10	HUCHE037	0.4	53.44±1.08	270.24	4.32

表二 : the results of the ten Chinese herbal enhancers inhibited the activity of CYP3A of *rat intestinal microsome*.

Rank	CHEs	Conc.(mM)	% of Control	MW
1.	HUCHE045	0.004	11.364±8.194	136.20
2.	HUCHE047	0.04	16.667±9.462	136.2
3.	HUCHE012	0.1	17.424±5.720	464.37
4.	HUCHE038	0.1	18.939±16.441	132.16
5.	HUCHE038	1	18.939±5.720	132.16
6.	HUCHE012	5.0	19.697±5.249	464.37
7.	HUCHE037	1.0	21.212±7.306	270.24
8.	HUCHE034	0.1	23.485±9.185	302.4
9.	HUCHE034	1.0	32.576±9.462	302.4
10.	HUCHE045	0.002	39.394±5.72	136.20

表三 : Comparison IC50 of Chinese Herbal Enhancers

Rank	Chinese Herbal Enhancers	IC50 (Inhibition Concentration 50)(mg/mL)
1	HUCHE055	0.048
2	HUCHE047	0.130
3	HUCHE045	0.176
4	HUCHE038	0.270
5	HUCHE034	0.810
6	HUCHE025	6.200
7	HUCHE023	320

表四 : The results of the effect of trans-cinnamaldehyde on the lovastatin metabolism in beagle's study.

# of times	AUC of Without CHEs	AUC of With CHEs
1. 12mg/mL	AUC(0~11hrs)=630.17	AUC(0~11hrs)=545.56
2. 12mg/mL	AUC(0~18hrs)=442.38	AUC(0~18hrs)=709.67
3. 14 mg/mL	AUC(0~18hrs)=269.50	AUC(0~18hrs)=750.78

計畫編號：DOH89-TD-1208

行政院衛生署八十八年下半年及八十九年度
科技研究發展計畫

以中藥藥引改善具低生體可用率藥物之口服吸收
**Optimization of oral drug absorption using Chinese herbal enhancer for low
bioavailability drug**

子計畫 B

CYP1A 抑制劑改善生體可用率藥物吸收之研究

**Application of New CYP1A1 Isozyme Inhibitors Improve Absorption of
Low bioavailable Drug**

第一年 研究報告

執行機構：國防醫學院藥學系

計畫主持人：鮑力恆、蘇慕寰

研究人員：王昭日、熊莉珍

執行期間：88年11月日至89年11月日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

摘 要

細胞色素 P450(cytochrome P450, CYP)近幾年來已被證實是藥物吸收產生初次代謝(first pass metabolism)的主要酵素。臨床上不但會導致藥物之初次代謝大幅增加，且使藥效及副作用增大，另外，也證實一些化合物因 P450 的代謝而致癌。皮膚是佔人體最大面積的器官，亦是第一道防線，它可以抵抗外來細菌等的侵犯。研究顯示皮膚亦含 P450，尤以 P450 同功酵素 1A 對藥物代謝與化學致癌物，佔重要的角色。

本研究室至目前為止已完成第一年的計劃所有預定執行的項目，其內容包括：在第一年之計劃中成功的利用裸鼠皮及肝純化出具有 CYP1A1 活性之微粒體的方法，以 7-ethoxyresourufin hydroxylase (EROD) 測試 CYP1A1 isozyme 活性並依文獻報告之 Alpha-Naphthoflavin (α -NF) 為 positive control 成功確立測定酵素的方方法。從中藥藥引中具 flavonoid, terpenoid 結構之純成分，分別配成 1, 10, 100 μ M 溶液進行抑制 CYP1A isozyme 之體外篩選實驗。結果在 56 種中藥藥引在不同濃度成功的篩選出具發展潛力的抑制劑，如 HUCHE001 及 HUCHE010 在 100 μ M 濃度時有 100% 的抑制作用，有 32 種中藥藥引對 CYP1A1 isozyme 活性有 50% 以上之抑制作用，僅有 6 種對 CYP1A isozyme 的抑制作用沒有統計上的意義。另為探討中藥藥引是否穿透皮膚後會有系統性的影響，本實驗室亦建立裸鼠肝微粒體純化的方法，以 7-Methoxyresourufin hydroxylase (MROD) 及 7-ethoxyresourufin hydroxylase (EROD) 分別測試 CYP1A2 及 CYP1A1 isozyme 之活性，同時亦用 56 種中藥藥引配成 1, 10, 100 μ M 溶度進行體外抑制研究。結果發現 HUCHE030、HUCHE055 及

HUCHE033 在濃度 100 μ M 時對 CYP1A2 isozyme 分別有 92.44、90.83 及 89.38%之抑制作用。HUCHE038 及 HUCHE055 在濃度 100 μ M 時對 CYP1A1 isozyme 分別有 95.39 及 86.21%抑制作用。對模式藥 retinoic acid 的分析，已建立用 HPLC 同時分析 retinoic acid 及其異構物 9-cis retinoic acid 及 13-cis retinoic acid 在血漿中的分析方法以供進行體內實驗。

關鍵詞：細胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP)

初次代謝(first pass metabolism)

Retinoic acid

Abstract

The human subfamily of cytochromes P450 had been proved to be the major mechanism for the first pass metabolism of drug absorption. There were also evidences that the human CYPs were the major catalyst in the oxidation of aflatoxins. Therefore, it may be relevant that CYP inhibitors act as cancer chemoprevention agents where these carcinogens are activated by CYP. The skin, the organ with largest surface area, is the first line of defense of human. It also has been found that the inclusion of CYP, especially the subfamily of CYP1A, in skin. Numerous studies disclosed that the P450 isozymes of CYP1A subfamily play an important role for the absorption of drug that is metabolized by CYP1A. Drugs known to be substrates for CYP1A have a low and variable transdermal bioavailability that may be explained by prehepatic metabolism by the skin CYP1A subfamily.

We have finished our first year project. From our past year studies, we have thoroughly searched for important components from the so-called herbal enhancers according to the frequency used in traditional medicines. Among these components, flavonoids, terpenoids, and essential oils etc., 56 Chinese Herbal Medicines have been tested for the inhibition of CYP1A1 activity with concentrations of 1, 10, and 100 μ M in microsomal enzyme preparations from skin and liver. The results showed that 100 μ M HUCHE001 and HUCHE010 had 100% inhibition effect for CYP1A1 isozyme. We also found that 32 Chinese Herbal Medicines showed over 50% inhibition effects for CYP1A1 isozyme. Only 6 Chinese Herbal Medicines screened did not have significant inhibition effect for skin microsomes.

The effects of the Chinese Herbal Enhancer on the live enzyme activity (1A1 and 1A2) would also be evaluated by 7-Methoxyresorufin hydroxylase (MROD) method on nude mice after pretreatment with the herbals topically. 100 μ M of HUCHE030, HUCHE055, and HUCHE033 decreased the activity of liver CYP1A2 activity by 92.44%, 90.83%, and 89.38%. 100 μ M of HUCHE038 and HUCHE055 had 95.39% and 86.21% inhibition effect for CYP1A1 isozyme in the liver. This study has also successfully established a simple, accurate, and precise high-performance liquid

chromatographic method for the determination of model drug retinoic acid and its isomerase metabolism 9-cis and 13-cis retinoic acid in plasma. This method will be applied to the further in vitro and in vivo studies on the next year.

Key words : Oral Absorption Enhancers, Chinese herbal enhancers, Cytochrom P450, Permerability, Bioavailability, Lovastatin, retinoic acid

壹、前言

皮膚是佔人體最大面積的器官，亦是第一道防線，它可以抵抗外來細菌等。對人體與外界化合物如溶劑、藥物、致癌物等等佔重要的界面角色。皮膚內的細胞色素(CYP)可調控經皮給藥藥物如 fatty acids, steroid, prostaglandins, glucocorticoids, retinoids 及 leukotrienes 等的代謝及生體可用率，進而影響藥物局部或系統性的治療效果。在許多 CYP isozyme 中 CYP1A1 是對高變異生物體代謝酵素中佔重要的角色，如視黃酸 (retinoic acid) 在細胞內受 CYP1A1 代謝成 4-hydroxyle retinoic acid, 以致視黃酸的濃度不夠而影響治療皮膚病及抗癌和防癌等作用，進而使 retinoic acid receptor 因視黃酸缺少而產生疾病及癌症 (如皮膚癌)。

綜合上述，若能尋找出安全、有效且可逆的 CYP1A1 抑制劑，可用來：(1) 使許多初次代謝高的藥得以經皮給藥，減少臨床上許多困擾。(2) 使所謂高變異性藥物 (highly variable drug) 之副作用及其劑量範圍大為降低 (3) 減少因 CYP1A 活性而造成致癌性毒物之毒性 (4) 產生具新意義的新藥 (new combination and/or new administration route)。

中藥使用已有幾千年的人體應用的歷史，本實驗是從中藥中找含有 flavonoid, terperoid 結構之純成分，分別配成 1, 10, 100 μ M 溶液，以 7-ethoxyresourufin hydroxylase (EROD) 測試 CYP1A1 isozyme 活性之體外抑制研究，另為探討中藥藥引經皮吸收後是否有系統作用本實驗室亦取裸鼠肝純化製備微粒體，以 7-Methoxyresourifin hydroxylase (MROD) 及 7-ethoxyresourufin hydroxylase (EROD) 分別測試 CYP1A2

及 CYP1A1 isozyme 活性之體外抑制研究。另以 HPLC 尋求 retinoic acid 及其在細胞內代謝物 9-cis retinoic acid 及 13-cis retinoic acid 快速及較佳的分析方法，以供體內實驗之進行。

貳、材料與方法

- 4、nude mice：BALB/c-nu（11-12weeks）購自國家動物中心
- 5、藥品：bovine serum albumin (BSA)，glucose-6-phosphate，glucose-6-phosphate dehydrogenase，NADP，NADPH，NADH，7-ethoxyresorufin，rhodamine B，all-trans retinoic acid，9-cis retinoic acid，13-cis retinoic acid 購自 Sigma Chemical Co., St. Louis MO., U.S.A.
acetone，chloroform，formaldehyde，glacial acetic acid，glycerol，methanol ether 購自 Merck Chemical Co., Frankfurt，Darmstadt，Germany.
中藥藥引購自長雅藥品公司

3、實驗動物微粒體的製備（皮膚及肝微粒體）：

微粒體製備方法沿用 Alvares 和 Mannering(1970)之方法。將裸鼠以斷頸方式犧牲後，立即取皮及肝，以下之製備過程保持冰浴或 4 °C，將組織置於 1.15%KCl 溶液中漂洗 3 次以上後，清除結締組織、血塊與脂肪，以吸水紙吸去多餘水分，予以稱重。肝剪碎後加入 1.15%KCl

溶液於均質機 (Teflon pestle-glass homogenizer) 中來回均質 6 次。皮膚於均質前先以組織研磨機 (Tissue homogenizer, Polytron) 處理後再予以均質。並以 KCl 溶液調成 4 倍組織重之體積，倒入離心管中，以離心機，在 4 °C 下，以 9,000 X g 離心 20 分鐘，取得含微粒體及可溶部分之上清液。再以 KCl 溶液調至原有 4 倍組織重的體積，以 Beckman L8-80M，在 4 °C 下，以 100,000 X g 離心 1 小時，取得微粒體沉澱。再以 KCl 溶液懸浮成 4 倍於組織重的懸浮液，在 4 °C 下，以 100,000 X g 離心 1 小時，取得 washed microsome，上面覆以 0.1M $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 緩衝液 (pH 7.4)，於 -78 °C 下保存。

4、微粒體蛋白含量之測定：

沿用 Lowry(1951)之方法。以 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/ml 之 bovine serum albumine 為標準品，標準品與經水稀釋之微粒體懸浮液加入 2 ml alkaline copper 溶液 (為 2% NaCO_3 / 0.1N NaOH ，1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ，2% NaK tatrte 以 100 : 1 : 1 混合而成)，並混合均勻，在室溫下靜置 10 分鐘後加入 0.2 ml 1N Folin-Ciocalteus phenol 試液，立即振盪均勻，靜置 30 分鐘。最後，記錄在 750 nm 之吸光度，此測定過程需在 30 分鐘內完成，利用標準品濃度與吸光度作回歸直線而可求得微粒體懸浮液之蛋白質含量。

5、Cytochrome P-450 含量之測定：

沿用 Omura 和 Sato (1964) 之一氧化碳差異光譜法。將皮或肝之微粒體懸浮液，用 2 ml 之約含 1.0-2.5 mg/ml 蛋白質之皮或肝之微粒體懸浮液，加入約 1 mg 之 Sodium dithionite 予以還原，分別 pipet 1 ml

至參考與樣品比色槽中。將 Hitachi 557 UV-Visible spectrophotometer 自 350 nm 至 550 nm 作基準線校正；完成後，將樣品比色槽取出，緩慢注入 CO 15 秒後，放回樣品比色槽，掃描並記錄波長 450 nm 附近最大吸收波長與波長 490 nm 時之吸光度差。

6、7-Ethoxyresorufin O-deethylase 之活性測定：

活性之測定乃沿用 Pohl 及 Fouts (1980) 之方法。使用含蛋白質量約為 0.125 mg 之皮或肝微粒體懸浮液，反應溶液中含 0.1M HEPES buffer (pH 7.8)，5.7 mM glucose 6-phosphate，1.4 單位 glucose 6-phosphate dehydrogenase，5.7 mM MgCl₂，1.8 mg/ml bovine serum albumin 與 1.9 μM 7-ethoxyresorufin，總體積為 1.2879 ml，除空白溶液外，反應以 0.54 μM NADPH 之加入開始。在 16 X100 mm 試管中于 37 °C 恆溫振盪槽內避光反應 10 分鐘後，以 2.5 ml methanol 終止反應，以 180 X g 離心 10 分鐘去除蛋白質沉澱，讀取上清液在以 550 nm 為激發波長，585 nm 為發射波長時之螢光強度。經與 0.01 μM，0.1 μM Rhodamine B 標準溶液的螢光強度比較此酵素之 IA1 反應活性。

7、7-Methoxyresorufin O-deethylase 之活性測定：

活性之測定乃沿用 Pohl 及 Fouts (1980) 之方法。使用含蛋白質量約為 0.125 mg 之皮或肝微粒體懸浮液，反應溶液中含 0.1M HEPES buffer (pH 7.8)，5.7 mM glucose 6-phosphate，1.4 單位 glucose 6-phosphate dehydrogenase，5.7 mM MgCl₂，1.8 mg/ml bovine serum albumin 與 1.9 μM 7-Methoxyresorufin，總體積為 1.2879 ml，除空白溶液外，反應以 0.54 μM NADPH 之加入開始。在 16 X100 mm 試管中于 37 °C 恆溫振盪槽內避

光反應 10 分鐘後，以 2.5 ml methanol 終止反應，以 180 X g 離心 10 分鐘去除蛋白質沉澱，讀取上清液在以 550 nm 為激發波長，585 nm 為發射波長時之螢光強度。經與 0.01 μ M，0.1 μ M Rhodamine B 標準溶液的螢光強度比較此酵素之 1A2 反應活性。

8、HPLC 分析條件：

HPLC 是以 GBC 高壓液相層析分析儀，層析柱以 C₁₈ (10 μ ，300 X 3.9 mm)，波長為 340 nm，流速為 1.0 ml/min，移動相分 A[(methanol：0.02M ammonium acetate) (50：50 v/v) pH6.65]及 B[(methanol：0.1M ammonium acetate (90：10 v/v) pH6.65)，以梯度方式分析。內標準品為 carbazole。

參、結果與討論：

中藥藥引對裸鼠皮 CYP1A1 活性的影響：

以 Alpha-Naphthoflve (α -NF) 為 positive control，結果如圖 1 顯示： α -NF 在 1 μ M 時較控制組有 34.65%的活性。在 10 μ M 時有 8.03%的活性。在 100 μ M 時有 0.83%的活性。此結果顯示： α -NF 在較高的濃度下 (100 μ M) 有強的抑制 CYP1A1 活性的效果 (圖 1)。

本實驗室篩選了 56 種中藥藥引分別配成 1，10，100 μ M 溶液以 7-ethoxyresourufin hydroxylase (EROD) 測試 CYP1A1 isozyme 活性，篩選結果以圖 1 及 2 為例。顯示 HUCHE001、HUCHE026 (圖 1) 及 HUCHE010 (圖 2) 在 100 μ M 時較 α -NF 有更強的抑制作用。

對裸鼠皮微粒體 CYP1A1 活性有抑制作用的中藥藥引前十名如表 1 及圖 3，其生藥名、來源及結構歸類如表 2。其他有 80-50% 抑制作用之中藥藥引如圖 4-5。

中藥藥引對裸鼠皮微粒體進行 CYP1A1 實驗結果，不同濃度之作用不同。在中藥藥引濃度為 1 μ M 時，已達最有效的抑制效果者有：

HUCHE025 (93.11%)，HUCHE052 (76.02%)，HUCHE018 (71.71%)
HUCHE047 (49.7%)，HUCHE013 (34.45%)，HUCHE008 (32.97%)，
HUCHE015 (21.9%)，HUCHE041 (9.05%)，HUCHE051 (1.11%)。

在中藥藥引濃度為 10 μ M 時，已達最有效的抑制效果者有：

HUCHE046 (97.01%)，HUCHE028 (51.16%)，HUCHE023 (47.28%)
HUCHE021 (47.27%)，HUCHE030 (28.27%)，HUCHE036 (3.45%)

在中藥藥引濃度為 100 μ M 時，已達最有效的抑制效果者

HUCHE001 (100%)，HUCHE010 (100%)，HUCHE044 (99.17%)，
HUCHE026 (98.87%)，HUCHE004 (97.47%)，HUCHE055 (96.24%)，
HUCHE033 (91.63%)，HUCHE003 (89.55%)，HUCHE020 (82.74%)，
HUCHE038 (80.17%)，HUCHE024 (67.06%)，HUCHE037 (64.6%)，
HUCHE012 (55.82%)，HUCHE048 (47.57%)，HUCHE022 (40.79%)，
HUCHE034 (40.55%)，HUCHE031 (29.56%)，HUCHE045 (26.36%)，
HUCHE032 (25%)，HUCHE027 (24.09%)，HUCHE002 (23.62%)，
HUCHE054 (22.69%)，HUCHE056 (13.38%)，HUCHE040 (11.77%)，
HUCHE050 (3.6%) (圖 6-9)。某些中藥成份亦有對裸鼠皮微粒體
CYP1A1 促進活性的作用 (圖 10)。

中藥藥引對裸鼠肝微粒體 CYP1A1 活性的影響：

以 Alpha-Naphthoflove 為 positive control，結果：在 1 μ M 時較控制組有 32.90% 的活性。在 10 μ M 時有 11.06% 的活性。在 100 μ M 時有 7.77% 的活性。此結果顯示：Alpha-Naphthoflove 在較高的濃度下（100 μ M）有強的抑制 CYP1A1 活性的效果（圖 11）。

篩選 56 種中藥藥引，抑制 CYP1A1 活性的效果，前 10 名如表 3，其生藥來源及成分如表 4。中藥藥引對裸鼠肝微粒體進行 CYP1A1 實驗結果，不同濃度之作用不同。在中藥藥引濃度為 1 μ M 時，已達最有效的抑制效果者有：HUCHE045（18%），HUCHE015（10%），HUCHE046（4%）。在中藥藥引濃度為 10 μ M 時，已達最有效的抑制效果者有：HUCHE023（12.62%），HUCHE027（12.63%），HUCHE047（6.9%）在中藥藥引濃度為 100 μ M 時，已達最有效的抑制效果者有：HUCHE038（95.39%），HUCHE044（92.23%），HUCHE055（86.21%），HUCHE010（81.95%），HUCHE033（80.83%），HUCHE003（66.61%），HUCHE020（58.36%），HUCHE024（56.22%），HUCHE002（46.51%），HUCHE052（12.74%），HUCHE051（10.9%），HUCHE032（10.85%），HUCHE022（8.32%），HUCHE050（5.3%），HUCHE014（2.32%）。

數種中藥藥引對裸鼠肝微粒體有促進 CYP1A 之活性圖(12-13)。

中藥藥引對裸鼠肝微粒體 CYP1A2 活性的影響：

以 Alpha-Naphthoflove 為 positive control，結果：在 1 μ M 時較控制組有 24.81% 的活性。在 10 μ M 時有 7.72% 的活性。在 100 μ M 時有 4.08% 的活性。此結果顯示：Alpha-Naphthoflove 在較高的濃度下（100 μ M）

有強的抑制 CYP1A2 活性的效果 (圖 14)。中藥藥引中裸鼠肝微粒體 CYP1A1 活性的影響 HUCHE030、HUCHE055 及 HUCHE033 在 100 μ M 時分別有 92.44%、90.83%及 89.38% 等良好的抑制效果。

Retinoic acid 之分析：

本實驗室已成功的以 HPLC 方法在血漿的樣品中分析出模式藥物 All-trans retinoic acid (tRA) 及其代謝物 9-cis retinoic acid (9-cisRA) 及 13-cis retinoic acid (13-cisRA)，其滯留時間分別是 13.7、13.0 及 12.3 分鐘(圖 15)。以 tRA(4.0-1000 ng/ml)及 13-cisRA(10-800 ng/ml) 進行適當實驗包括經密度、準確度、標準曲線同日內及間日內確效實驗皆有良好的線性關係 (n=6) (表 5 及 6)。tRA 及在血漿的樣品中分離在血漿的樣品中分離 13-cisRA 同日間之變異數分別小於 5.26% 及 4.07%。絕對回收率 tRA 及 13-cisRA 分別為 85.6%及 78.9%。LOQ tRA 及 13-cisRA 分別為 4 ng/ml 及 3 ng/ml。

肆、結論與建議

本實驗是已完成研究計劃中之第一年所有進度。建立並確效中藥藥引對裸鼠皮及肝微粒體 CYP1A1 及 1A2 活性抑制的實驗模式，在 56 種中藥藥引中以 3 種不同濃度體外篩選實驗中已找到分別對裸鼠皮及肝微粒體 CYP1A1、CYP1A2 活性有良好抑制效果的藥引及其濃度。模式藥 retinoic acid 及其代謝物之分析方法亦已確認。擴大中藥藥引的篩選範

圍，用已篩選出前 10 名的中藥藥引結合模式藥物進行體內實驗，則是下年度計劃的目標。

伍、參考文獻

- 1、Nihal Ahmad, Rajesh Agarwal, Hasan Mukhtar.: Cytochrome P-450 and Drug Development for Skin Diseases, *Skin Pharmacology*, 1996;9:231-241.
- 2、Conncy AH, Miller EC, Miller JA :The methylated aminoazodyes, V. Evidence for induction of enzyme synthesis in rat by 3-methylcholanthrene, *Cancer Res.* 1956;16:450-459.
- 3、Conncy AH, Miller EC, Miller JA: Substrate induced synthesis and other properties of benzo(a)pyrene hydroxylase in rat liver, *J. Biol. Chem.* 1957;228:753-776.
- 4、Mukhtar H, Bickers DR: Age related changes in benzo(a)pyrene metabolism and epoxide metabolizing enzyme activities in rat skin, *Drug Metab. Dispos.* 1983;11:562-567.
- 5、Mer HP, Mukhtar H, Kaufman I, Das M: Human hair follicle benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene 7,8-diol metabolism:Effect of exposure to a coal tar containing shampoo, *J. Inverst. Dermatol.* 1987;88:71-76.
- 6、Khan IU, Bickers DR, Haqqi TM, Mukhtar H: Induction of VYP1A1 mRNA in rat epidermal keratinocytes by benz(a)anthracene and β -naphthoflavone, *Drug Metab. Dispos.* 1992;22:620-624.
- 7、Rajeh A, Frank kJ, Sikandar GK, et al.,: Evidence for mutiple inducible cytochrome P450 isozyme in sencar mouse skin by pyridine, *Biochem. And Biophys. Res. Comm.* 1994;199(3):1400-1406.
- 8、Frank KJ, Rajesh A, Andreas K, et al., : Multiple Cytochrome P450 Isozyme in Murine

- Skin: Induction of P450 1A, 2B, 2E, and 3A by Dexamethasone, *J. Invest. Dermatol.* 1994;102:970-975.
- 9 · Haider R, Rajesh A, David RB and Hasan Mukhtar: Purification and Molecular Characterization of β -Naphthoflavone-Inducible Cytochrome P-450 from Rat Epidermis, *J. Invest. Dermatol.* 1992;98:233-240.
 - 10 · Marguerite WC, Anja HN, Roberta JP, Diter M, and James RF: Foreign Compound Metabolism by Isolated Skin Cells from the Hairless Mouse, *The American Soci. for Pharmaco. and Experi. Therap.* 1983;225(3):770-777.
 - 11 · Tsuneo Omura and Ryo Sato: The Carbon Monoxide-binding Pigment of liver Microsomes, *The J. of Biolog. Chem.* 1964;239(7): 2370-2378.
 - 12 · Elizabeth AD, Anders A, Christopher EM, Pierre C, and John JV: Human Skin Level of Retinoic acid and Cytochrome P-450-derived 4-Hydroxyretinoic acid after Topical Application of Retinoic acid In vivo Compared Concentrations Required to Stimulate Retinoic acid Receptor-Medicated Transcription In Vitro, *J. Clin. Invest.* 1992;90:1269-1274.
 - 13 · Susan SJ, Barbara ZT, and Hershel J: First trimester topical tretinoin and congenital disorders, *Lancet*, 1993;341:1181-1182.
 - 14 · Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ: Photoaging and Topical Tretinoin: Therapy, Pathogenesis, and Prevention, *Archives of Dermatology*, 1997;133(10)1280-1284.
 - 15 · Haider Raza and Hasan Mukhtar: Difference in inducible of cytochrome P-4501A1, monooxygenases and glutathione S-transferase in cutaneous and extracutaneous tissue after topical and parenteral administration of β -Naphthoflavone to rats, *Int. J. Biochem.* 1993;25(10)1511-1516.
 - 16 · Fuhr U, Klittich K, Staib AH: Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal, naringenin, on CYP1A2 dependent metabolism of caffeine in man, *British J. of Clin. Pharmacol.* 1993;35:431-436.
 - 17 · Fuhr V, and Kummenrt LA: The fate of naringin in human. A Key to grapefruit

- juice-drug interaction ? , *Clin. Pharmacol. Ther.* 1995;58: 365-373.
- 18 · Stephen JM, John MF, and James WB: Cytochrome P450 dependent deethylase activity in rat and hairless mouse skin microsomes, *Biochem. Pharmacology*, 1982;31(24):4011-4018.
 - 19 · Elizabeth AD, Sewon K, and John JV: Retinoic acid isomers applied to human skin in vivo each induce a 4-hydroxylase that uncatalyzes only trans-retinoic acid, *The J. of Invest. Derma.* 106(2):316-320.
 - 20 · Buchmann A, Wannemacher R, Kulzer E et al.,: Immunohistochemical localization of the cytochrome P450 isozyme LMC2 and LM4B (P4501A1) in 2,3,7,8,-tetrachlordibenzo-p-dioxin-treated zebrafish, *Toxicology and Applied Pharma.* 1993;123(1):160-169.
 - 21 · Li XY, Astrom A, Duell EA, Qin L, et al.: Retinoic acid antagonizes basal as well as coal tar and glucocorticoid-induced cytochrome P4501Aa expression in human skin. *Carcinogenesis* 1995;16:519-524.
 - 22 · Wang Z, Boudjelal M, Kang S, et al.,: Ultraviolet irradiation of human skin cause functional vitamin A deficiency, preventable by all-trans retinoic acid pre-treatment, *Nature Medicine*, 1999;5(4): 418-422.
 - 23 · Roberta JP and James RF: A Rapid Method for Assaying Metabolism of 7-Ethoxyresorufin by Microsome Subcellular Fractions, *Analytical Biochem.* 1980;107:150-155.
 - 24 · Hasan Mukhtar and Wasiuddin AK: Cutaneous Cytochrome P-450, *Drug Metabolism Rev.* 1989;20(2-4):657-673.
 - 25 · S. Bezek, M Kukan, WF Pool, and TF Woolf: The effect of cytochrome P4501A induction and inhibition on the disposition of the cognition activator tacrine in rat hepatic preparations, *Xenobiotica*, 1996;26(9):935-946.
 - 26 · I. Leclercq, JP Desager, C Vandenplas, Y Horsmans: Fast determination of low-level cytochrome P4501A1 activity by high-performance liquid chromatography with

fluorescence or visible absorbance detection, *J. of Chromatography B*, 1996;681: 227-232.

27 · Bing-Kou Tang and Werner Kalow, Wichitra T, Donald JB, Maurice EV, et al.: Specificity of Substrate and Inhibitor Probes for Human Cytochromes P450 1A1 and 1A2, *The J. of American for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1992; 265(1):401-407.

28 · Raza II, Agarwal R, Bickers DR, Nukhtar R: Purification and molecular characterization of β -naphthoflavone inducible cytochrome P-450 from rat epidermis, *J. Invest. Dermatol.* 1992;98:233-240.

陸、圖次

Fig. 1.

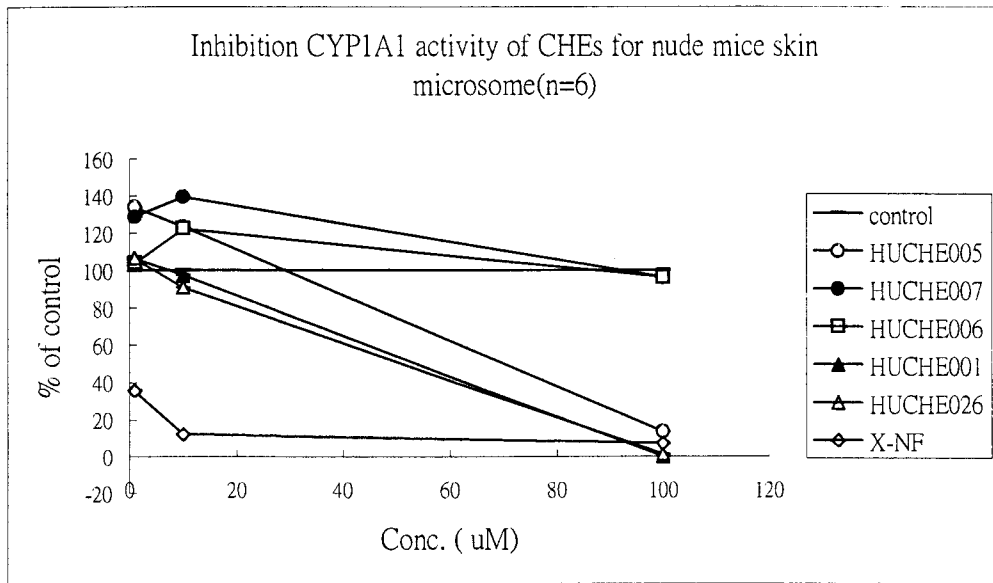


Fig. 2.

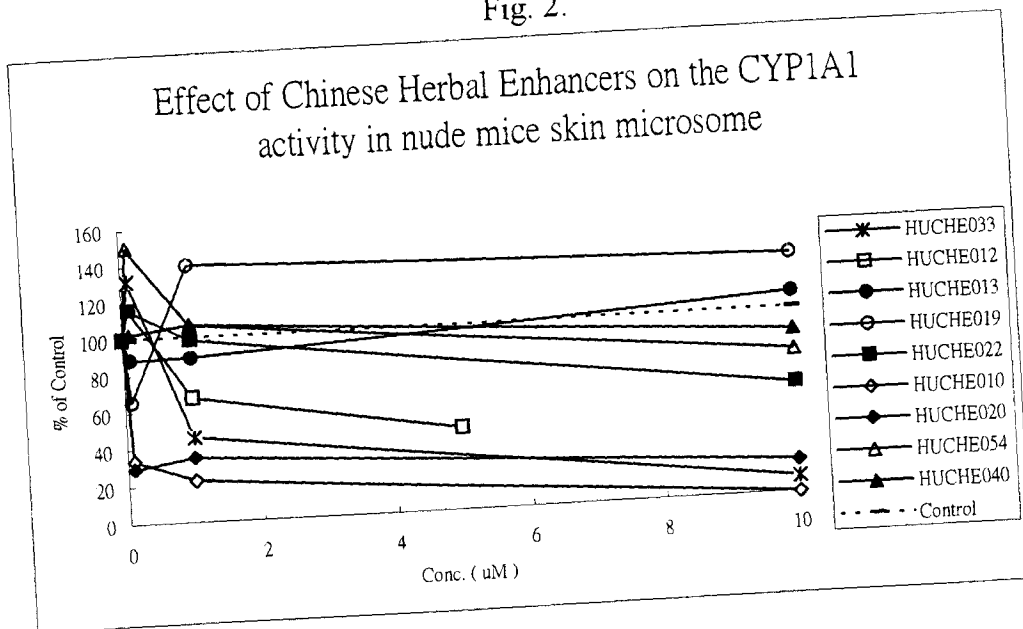


Fig. 3.

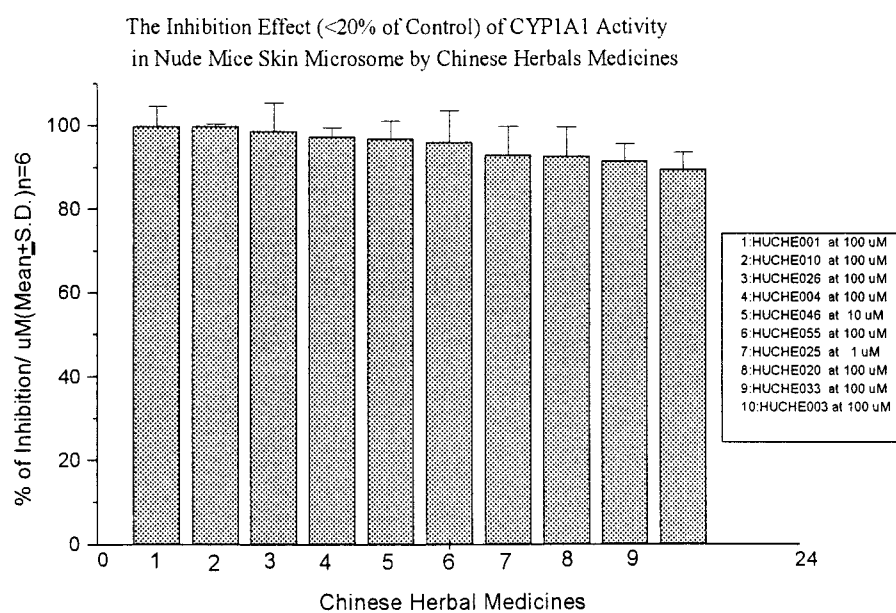


Fig. 4.

The Inhibition Effect (20-50% of Control) of CYP1A1 Activity
in Nude Mice Skin Microsome by Chinese Herbs Medicines

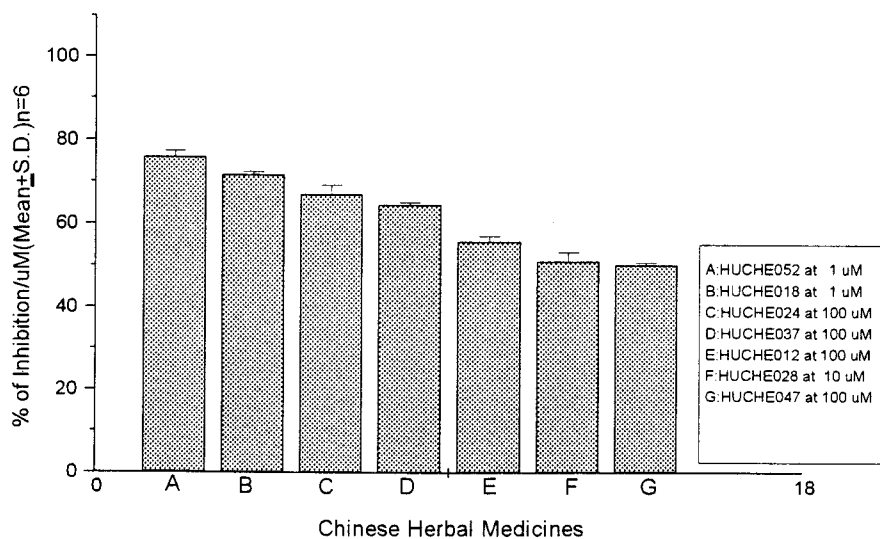


Fig. 5.

The Inhibition Effect (20-50% of Control) of CYP1A1 Activity in Nude Mice Skin Microsome by Chinese Herbs Medicines

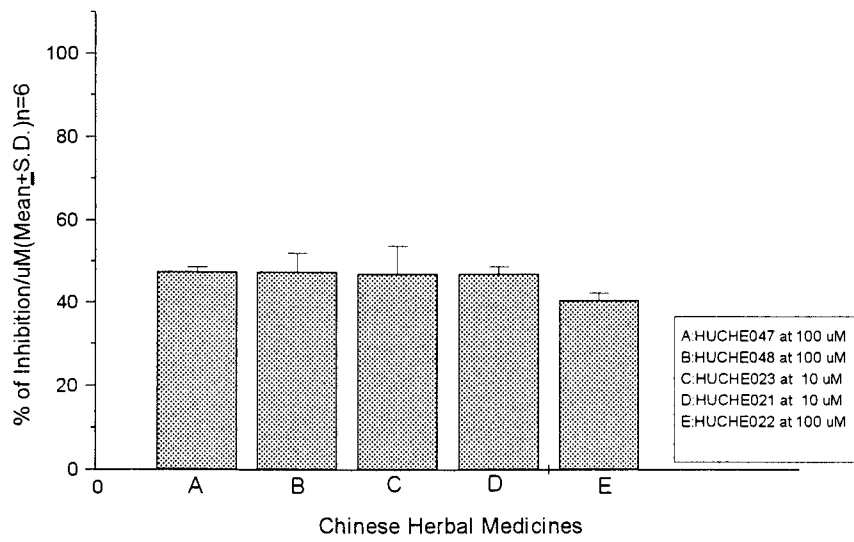


Fig. 6.

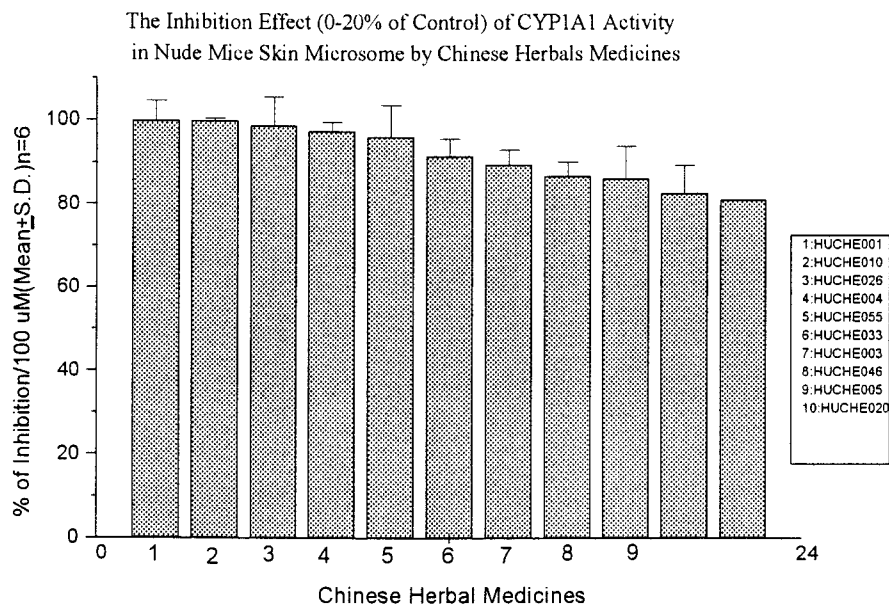


Fig. 7.

The Inhibition Effect (20-50% of Control) of CYP1A1 Activity
in Nude Mice Skin Microsome by Chinese Herbs Medicines

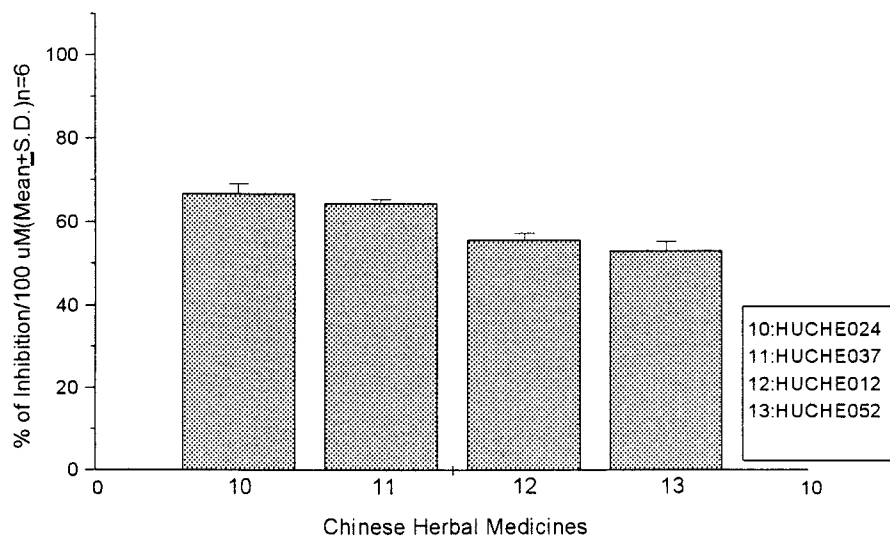


Fig. 8.

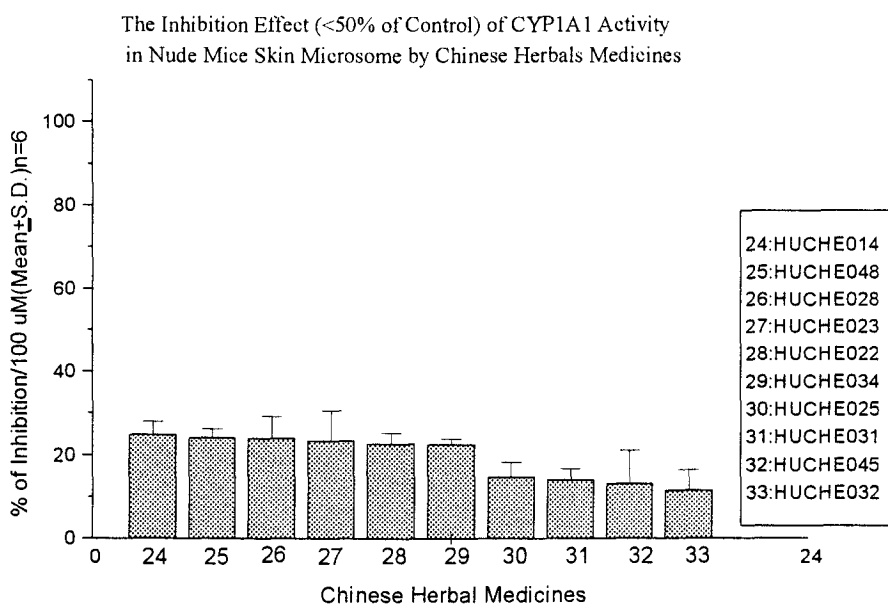


Fig. 9.

The Inhibition Effect (<50% of Control) of CYP1A1 Activity
in Nude Mice Skin Microsome by Chinese Herbs Medicines

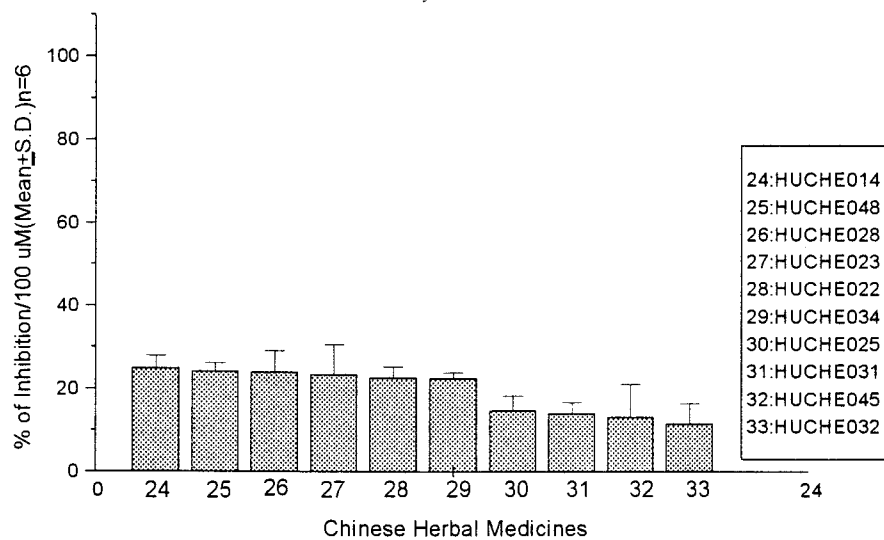


Fig. 10.

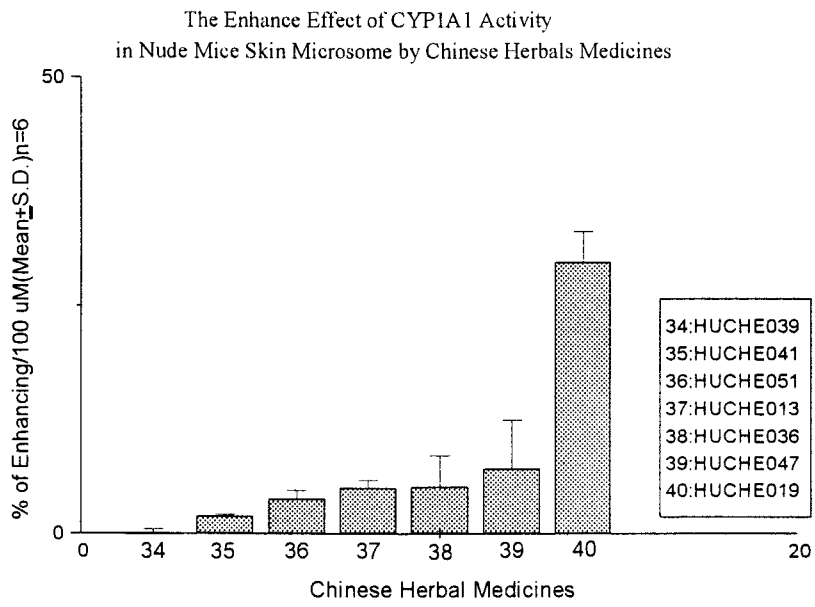


Fig. 11.

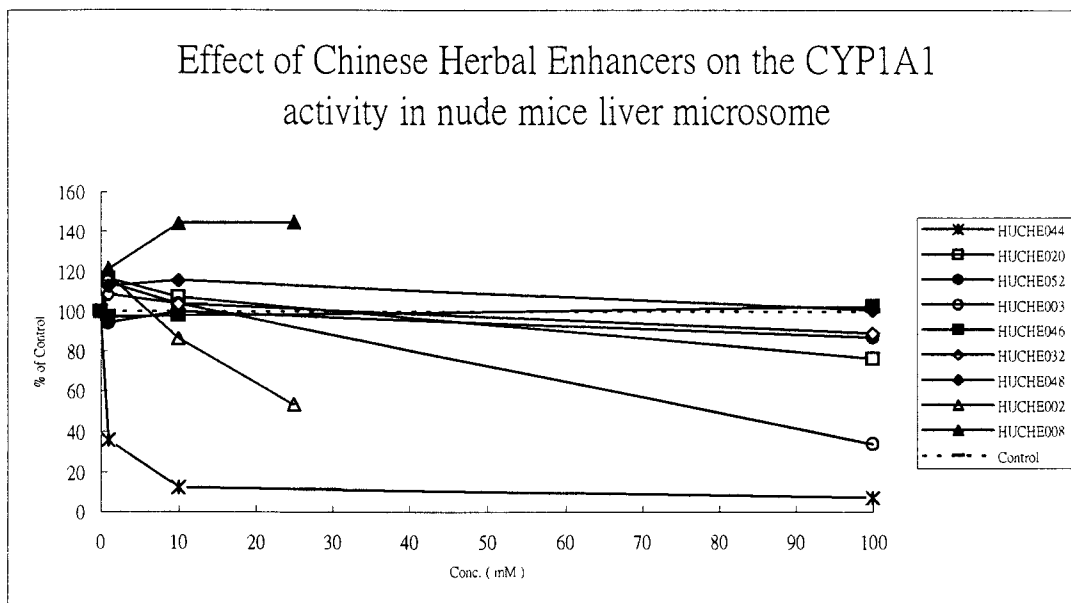


Fig. 12.

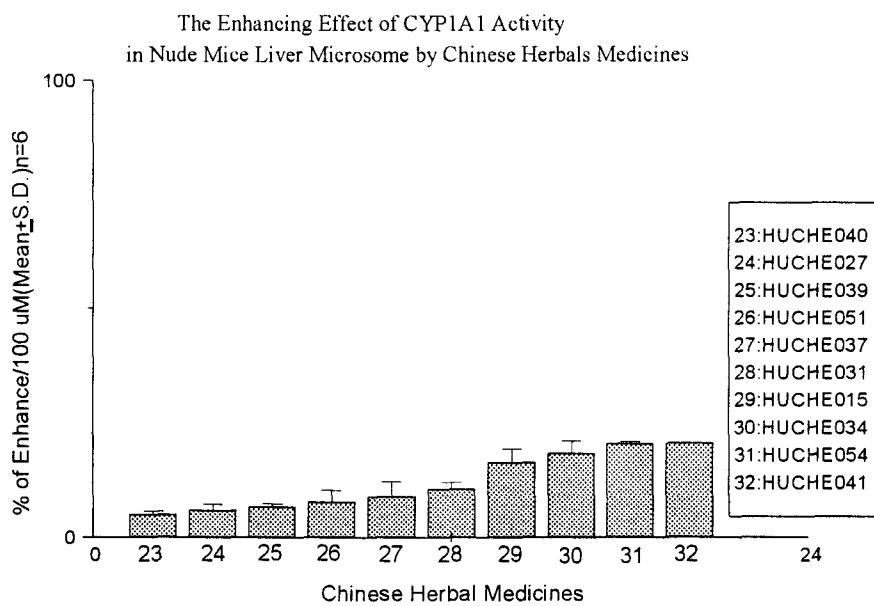


Fig. 13.

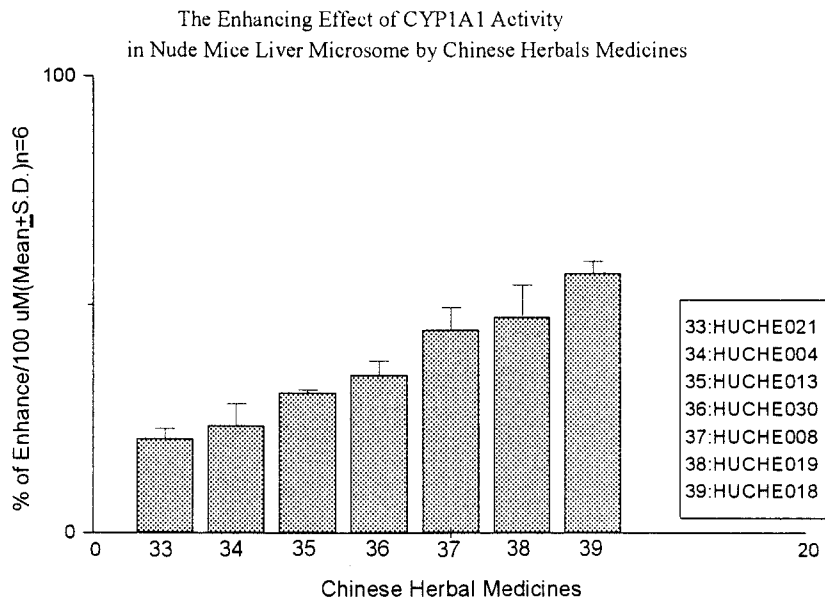


Fig. 14

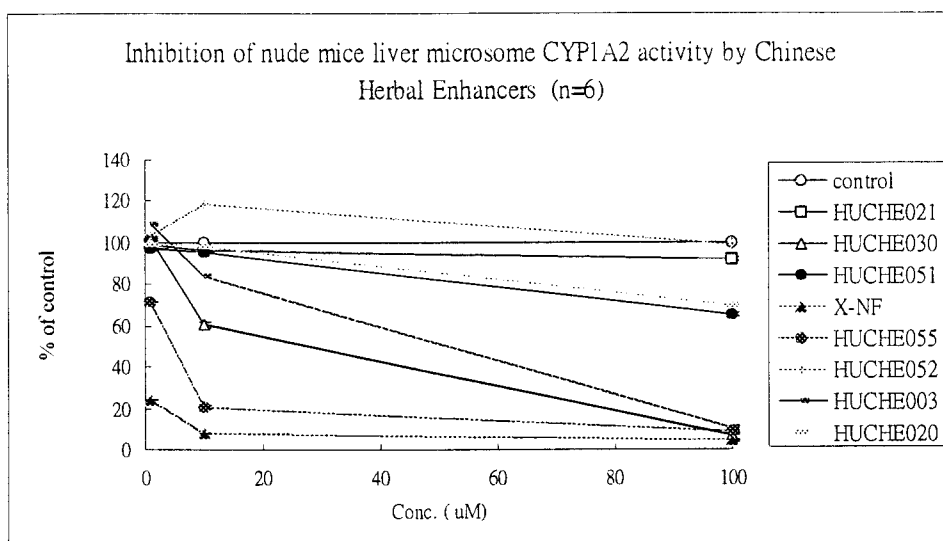
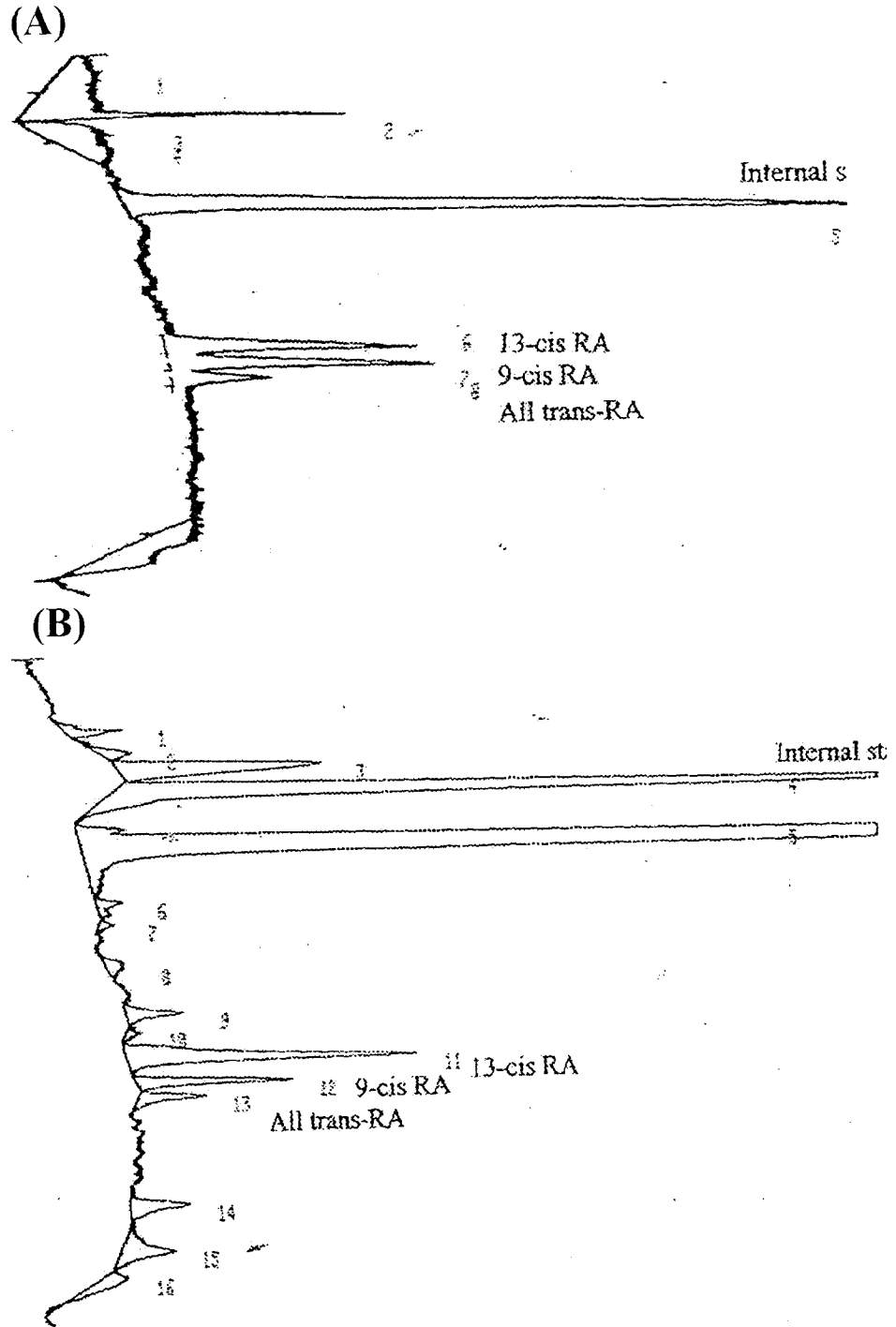


Fig. 15. HPLC chromatogram of tRA, 13-cisRA, and 9-cisRA in stock solution (A) and human plasma (B)



柒、表次

Table 1. The results of the inhibition of CYP1A1 by inhibitors obtained from herbal enhancers (CHE) using nude mice skin microsome.

排名	Compound obtained from Herbl Enhance	Concentration (μM)	% of control	% of inhibition
1	HUCHE001	100	0	100
2	HUCHE010	100	0	100
3	HUCHE026	100	1.13	98.87
4	HUCHE004	100	2.53	97.47
5	HUCHE046	10	2.99	97.01
6	HUCHE055	100	3.76	96.24
7	HUCHE025	1	6.89	93.11
8	HUCHE020	100	7.26	92.74
9	HUCHE033	100	8.37	91.63
10	HUCHE003	100	10.45	89.55

Code number is used instead of the name of the compounds is preventing The early difficulty of future patent application.

Table 2. The sources of the herbal enhancer

排名	中藥藥引	生藥名	生藥名(英文)	成分類
1	HUCHE001	茵陳蒿	Artemisiae Cpillaris	Flovonoid
2	HUCHE010	番瀉葉	Sennae Folium	Flovonoid
3	HUCHE026	黃芩	Scutellariae Radix	Flovonoid
4	HUCHE004	洋地黃	Digitalis Folium	Flovonoid
5	HUCHE046	迴篙花	Cinae Flos(Santonica)	精油
6	HUCHE055			
7	HUCHE025	陳皮	Citri Reticulatae	Flovonoid
8	HUCHE020	枳實	Aurantii Fructus Immaturus	Flavonoid
9	HUCHE033	槲皮	Viscum Coloratum	
10	HUCHE003	洋地黃	Digitalis Folium	Flovonoid

Table 3. The results of the inhibition of CYP1A1 by inhibitors obtained from herbal enhancers (CHE) using nude mice liver microsome.

排名	中藥藥引	濃度(μM)	% of control	% of inhibity
1	HUCHE038	100	0	95.39
2	HUCHE055	100	0	86.21
3	HUCHE010	100	1.13	81.95
4	HUCHE033	100	2.53	80.83
5	HUCHE003	100	2.99	66.61
6	HUCHE020	100	3.76	58.36
7	HUCHE024	100	6.89	56.22
8	HUCHE002	100	7.26	46.51
9	HUCHE045	1	8.37	18.00
10	HUCHE052	100	10.45	12.74

Table 4. The sources of the herbal enhancer

排名	中藥藥引	生藥名	生藥名(英文)	成分類
1	HUCHE038	桂皮	Cinnamomi Cortex	精油
2	HUCHE055			
3	HUCHE010	番瀉葉	Sennae Folium	Flavonoid
4	HUCHE033	槲皮	Viscum Coloratum	
5	HUCHE003	洋地黃	Digitalis Folium	Flavonoid
6	HUCHE020	枳實	Aurantii Fructus Immaturus	Flavonoid
7	HUCHE024			Flavonoid
8	HUCHE002	洋甘菊	Chamomillae Flos	Flavonoid
9	HUCHE045	薑	Zingiberis	精油
10	HUCHE052	大棗	Zizyphi Fructus	Triterpenoid

Table 5 Within-day assay accuracy and precision for the analysis of all-trans retinoic acid (tRA) and 13-cis retinoic acid (cRA) in plasma (n=6)

Added tRA (ng/ml)	Found (ng/ml)	Coefficient Variation (%)	ERR (%)
4	4	3.61	1.19
10	9	5.11	- 5.92
50	52	2.49	4.79
75	75	2.67	- 0.46
400	378	5.25	- 5.58
500	512	2.68	2.37
1000	1013	2.92	1.28

Table 6 Between-day assay accuracy and precision for the analysis of all-trans retinoic acid (tRA) and 13-cis retinoic acid (cRA) in plasma (n=6)

Added cRA (ng/ml)	Found (ng/ml)	Coefficient Variation (%)	ERR (%)
5	5	2.61	1.19
15	15	5.11	- 0.09
25	24	2.49	- 5.13
50	50	2.67	- 0.68
100	108	5.25	7.72
400	406	2.68	1.55
500	481	2.92	- 3.89
800	781	2.07	- 2.36

ERR% : Percent error, estimated by $[(\text{found concentration} - \text{added concentration})/\text{added concentration}] \times 100\%$