

行政院衛生署中醫藥委員會九十三年度

研究計畫成果報告

併服富含多酚中藥對西藥減殺除癌(Methotrexate)
動力學之影響

**Effect of polyphenol-rich Chinese herbs on the
pharmacokinetics of methotrexate**

執行機構：中國醫藥大學 藥學系

計畫主持人：李珮端

研究人員：徐素蘭、溫國慶、侯鈺琪、蔡尚元
陳仁元、王孟珠、姬盈璋、江秀梅
夏麒盛、謝佩勳、陳瑩珍

執行期限：九十三年一月一日至九十三年十二月卅一日

＊＊ 本研究報告僅供參考，不代表本會意見 ＊＊

目次

圖次.....	2
表次.....	3
中文摘要.....	4
英文摘要.....	6
壹、前言.....	8
貳、材料與方法.....	12
參、結果.....	19
肆、討論.....	21
伍、結論與建議.....	23
陸、參考文獻.....	24

圖次

- Fig. 1 大黃(A)、黃芩(B)與葛根(C)所含多酚類之化學結構式。.....9
- Fig. 2 Mean (\pm S.E.) serum concentration-time profiles of methotrexate (MTX) after oral administration of MTX alone (●) and coadministration with rhubarb (○) in rats.....29
- Fig. 3 Mean (\pm S.E.) serum concentration-time profiles of methotrexate (MTX) after oral administration of MTX alone (●) and coadministration with Scutellariae Radix (○) in rats.29
- Fig. 4 Mean (\pm S.E.) serum concentration-time profiles of methotrexate (MTX) after oral administration of MTX alone (●) and coadministration with Puerariae Radix (○) in rats.....30

表次

Table 1	Pharmacokinetic parameters of methotrexate (MTX) after oral administration of 5.0 mg/kg MTX alone.	31
Table 2	Pharmacokinetic parameters of methotrexate (MTX) after oral administration of 5.0 mg/kg MTX with Rhubarb decoction (2.0 g/kg).	31
Table 3	Pharmacokinetic parameters of methotrexate (MTX) after oral administration of 5.0 mg/kg MTX with decoction of Scutellariae Radix (2.0 g/kg).	32
Table 4	Pharmacokinetic parameters of methotrexate (MTX) after oral administration of 5.0 mg/kg MTX alone.	32
Table 5	Pharmacokinetic parameters of methotrexate (MTX) after oral administration of 5.0 mg/kg MTX with decoction of Pueraria Radix (4.0 g/kg).	33
Table 6	Comparison of pharmacokinetic parameters of methotrexate (MTX) in rats between receiving MTX alone (5.0 mg/kg) and coadministration with rhubarb (R, 2 g/kg).	33
Table 7	Comparison of pharmacokinetic parameters of methotrexate (MTX) in rats between receiving MTX alone (5.0 mg/kg) and coadministration with Scutellariae Radix (SR, 2 g/kg).	34
Table 8	Pharmacokinetic parameters of MTX in rats after giving oral MTX (5 mg/kg) alone and coadministration with Puerariae Radix (PR, 4 g/kg).	34

併服富含多酚中藥對西藥滅殺除癌 (Methotrexate) 動力學之影響

李珮端

中國醫藥大學 藥學系

摘要

滅殺除癌 (Methotrexate; MTX) 為一重要的西藥，用於類風濕關節炎、牛皮癬、抗癌等，但治療指數非常狹窄，是抗癌西藥中必須進行血中濃度監測的唯一藥物。MTX 之外排與 MRP1、MRP2、MRP3、MRP4 等運送蛋白有關。其不良反應包括肝、血液、胃、及肺毒性。

近年來，許多研究顯示，多酚類化合物主要以硫酸及葡萄糖醛酸結合態代謝物循環於血流中，最近更發現其外排與 MRP1、MRP2、MRP3 等運送蛋白有關，吾人臆測多酚類與 MTX 併服時可能會競爭 MRP1、MRP2 及 MRP3 等，而導致動力學交互作用。

本研究以大白鼠為模型，利用平行設計，單獨口服 MTX 及分別併服大黃、黃芩與葛根水煎劑，定時自心臟穿刺採血，MTX 之血中濃度以螢光偏極免疫測定法定量。血中藥物濃度數據以 WINNONLIN 軟體計算動力學參數，並以 ANOVA 統計組間差異。

MTX 併服大黃、黃芩及葛根後，平均血藥面積分別顯著增加了 199.0 %、178.2 % 與 202.7 %；而平均滯留時間則增加了 199.3 %、170.5 % 與 237.8 %。另外，併服大黃、黃芩及葛根亦顯示增高了大鼠之死亡率。

本研究結果顯示併服富含多酚之中藥顯著抑制 MTX 從體內排出，對服用 MTX 病患可能造成毒性，建議避免併服，以確保用藥安全。

關鍵詞：多酚、滅殺除癌、交互作用、大黃、黃芩、葛根

Effect of polyphenol-rich Chinese herbs on the pharmacokinetics of methotrexate

Pei-Dawn Lee Chao

School of Pharmacy, China Medical University

ABSTRACT

Methotrexate (MTX) is a potent anticancer agent with narrow therapeutic range and also used to treat psoriasis and rheumatoid arthritis. MRP1, MRP2, MRP3 and MRP4 are related with the transport of MTX. Serious adverse effects of MTX include hepatic, hematologic, gastric and pulmonary toxicity.

Most polyphenols were known to present as conjugated metabolites in circulation including glucuronides and sulfates that were associated with transporters MRP1, MRP2 and MRP3. We proposed that polyphenols may compete for MRP1, MRP2 and MRP3 with MTX and resulted in pharmacokinetic interaction. This study investigated the effects of decoctions of Rhubarb (*Rheum palmatum* LINN), Scutellariae Radix (*Scutellaria baicalensis* GEORGI), and Puerariae Radix (*Pueraria lobata* (Wild.) OHWL.) on MTX pharmacokinetics.

Four groups of rats (n = 6-8) were studied in parallel design. Following an overnight fast, rats were given MTX 5.0 mg/kg orally either with water or with decoctions of Rhubarb, Scutellariae Radix and Puerariae Radix, respectively. Blood samples withdrawn via cardiopuncture were assayed for MTX by a specific monoclonal FPIA method. Non-compartment model of WINNONLIN was used for the computation of pharmacokinetic parameters. ANOVA was used for statistical comparison of pharmacokinetic parameters among groups taking $P < 0.05$ as significant.

After coadministrations of decoctions of Rhubarb, Scutellariae Radix and Puerariae Radix, the mean AUC_{0-2880} of MTX were significantly increased by 199.0 %, 178.2 % and 202.7 %, respectively, the mean MRT of MTX were significantly increased by 199.3 %, 170.5 % and 237.8 %, respectively. In addition, coadministration of Rhubarb, Scutellariae Radix and Puerariae Radix markedly enhanced the mortality in rats.

In conclusion, coadministration of polyphenol-rich herbs with MTX resulted in significant inhibition on the elimination of MTX and led to higher toxicity. It seems prudent to avoid the concurrent use of herbal remedies containing polyphenols with MTX.

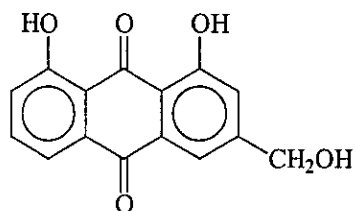
Keywords : polyphenol, methotrexate, herb-drug interaction, Rhubarb, Scutellariae Radix, Puerariae Radix.

壹、前言

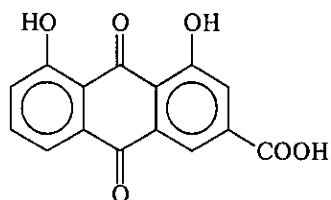
近年來流行病學研究顯示，多酚類化合物對人類各種因氧化壓力所導致的退化疾病，如心血管疾病、癌症、愛滋海默症等都有預防保健的功效⁽¹⁻³⁾。動物之體內、體外研究，亦顯示具有多樣優越的生物活性，其中因清除自由基、抗氧化、抗發炎及抗腫瘤等藥理作用而受到特別重視⁽⁴⁻¹⁰⁾。多酚類化合物多以配糖體型式存在於植物中，口服時經由腸道 LPH (Lactase Phlorizine Hydrolase)⁽¹¹⁾ 及微生物的水解作用而形成非醣體，方可通過腸道吸收⁽¹²⁾。本研究室近年的研究成果顯示，多酚類非醣體在進入體循環後，主要被代謝成硫酸及葡萄糖醛酸之結合態代謝物，而且此些結合態代謝物在體內之滯留時間頗長⁽¹³⁾。

中藥大黃、黃芩與葛根水煎劑皆富含多酚類，大黃含有大黃素(emodin)、蘆薈大黃素(aloe-emodin)、大黃酸(rhein) 及大黃酚(chrysophanol)，此四成分皆屬 anthraquinone polyphenol。黃芩含有黃芩苷(baicalin)、黃芩素(baicalein) 及漢黃芩素，三成分皆屬 flavonoid polyphenol。葛根含有葛根素(puerarin)、大豆苷(daidzin)及大豆苷元(daidzein)，三成分皆屬 isoflavone polyphenol (Fig. 1)。本研究室初步研究結果顯示，此些多酚類除大黃酸與黃芩苷有部分以原形分子循環於血流中外，其餘化合物主要轉化成為硫酸及葡萄糖醛酸結合態代謝物。此些結合態代謝物極性增高、水溶性變佳，且於生理 pH 下多以解離態存在，最後由腎臟排出。最近的研究顯示硫酸及葡萄糖醛酸結合態代謝物之體內命運與 MRP1、MRP2、MRP3 等運送蛋白有關^(14,15,31-36)。

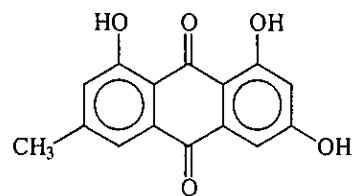
(A)



蘆薈大黃素 (Aloe-emodin)

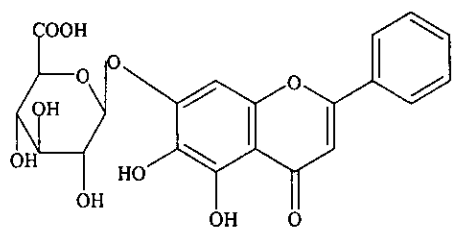


大黃酸(rhein)

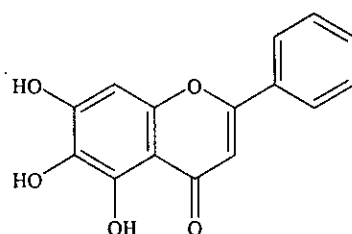


大黃酚(chrysophanol)

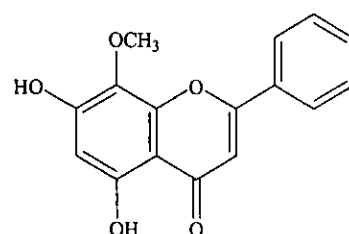
(B)



黃芩苷(baicalin)

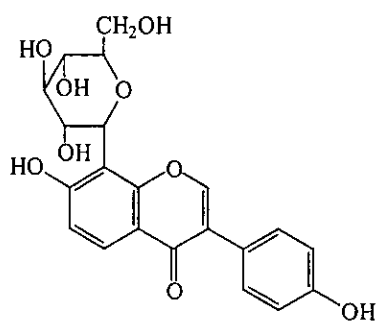


黃芩素(baicalein)

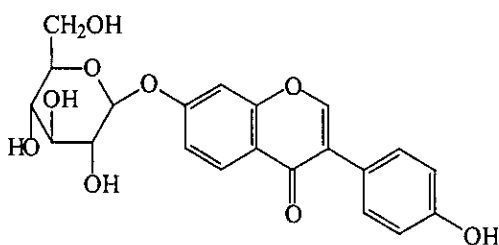


漢黃芩素(wogonin)

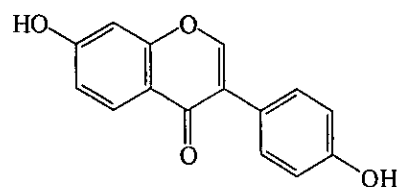
(C)



葛根素(puerarin)



大豆苷(daidzin)



大豆苷元(daidzein)

Fig. 1 大黃(A)、黃芩(B)與葛根(C)所含多酚類之化學結構式。

西藥滅殺除癌(methotrexate, MTX) 臨床上廣泛的應用於類風濕關節炎、牛皮癬、抗癌、氣喘、移植病人等，但治療指數非常狹窄，是抗癌藥中必須進行血中濃度監測的唯一藥物。其不良反應包括胃炎、肝硬化及中樞系統副作用如頭痛、疲倦、抑鬱等^(16,17)。因此任何改變其吸收、代謝或排泄的因素都會對 MTX 的臨床療效或安全造成影響。MTX 的動力學行為顯示，主要依賴膽道及腎臟排除，約有 85 % 以原形藥經腎臟排出，另外一小部分代謝成 7-hydroxymethotrexate，排除半生期約 50 小時。其腎臟排出機轉包括腎小球過濾、主動分泌及再吸收等，具非線性動力學特徵。至於進入細胞的機轉，包括 folate receptor 及 the reduced folate carrier 的參與。MTX 是一 bicarboxylic acid，於體內以解離態存在，其負離子之主動分泌及進出細胞，都是會飽和之過程⁽¹⁸⁻²¹⁾。最近的研究顯示其體內命運與 MRP1、MRP2、MRP3、MRP4 等運送蛋白有關^(14,15, 22)。

根據以上所述中藥多酚類成分與 MTX 之分子理化性質及體內代謝動力學特徵，它們都以負離子存在於體循環中。臨床上曾發現，非固醇類抗發炎藥 probencid、aspirin 與 MTX 併用時，會造成 MTX 血中濃度增高，其原因係因它們都以負離子存在於體內，因而發生主動分泌之競爭^(23,37)。根據最近的研究顯示硫酸及葡萄糖醛酸結合態代謝物與 MTX 會共同使用 MRP1、MRP2、MRP3 等運送蛋白^(14,15,22)。吾人臆測中藥多酚成分在體內代謝後，亦會如 probencid、aspirin 等與 MTX 競爭運送蛋白，預期 MTX 之動力學會受到影響而毒性增高。

因為近年來歐美風行之 St. John's wort 與許多西藥發生嚴重的交互作用⁽²⁴⁾

25)，因此中草藥與西藥之交互作用成為用藥安全上之焦點，加上國人中藥與西藥併用的機率不低，產生交互作用之風險值得研究評估。由於富含多酚類中藥廣泛應用於臨床治療與保健食品，基於病患用藥安全考量，本計畫選擇三種具代表性之多酚類中藥大黃、黃芩與葛根，以大白鼠活體模式探討其對 MTX 動力學的影響。

貳、材料與方法

一、實驗材料

(一) 標準品及試劑

1. puerarin、emodin、ethylparaben、2-methylanthraquinon：購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)。
2. rhein、aloe-emodin、chrysophanol：購自 Aldrich Chemical Co, Inc. (Milwaukee, WI, U.S.A.)。
3. baicalin (98%)、baicalein (98%)、wogonin：購自 Wako (Osaka, Japan)。
4. daidzin、daidzein：購自 Fluka Chemie GmbH (Buchs, Switzerland)。
5. ortho-phosphoric acid (85%)：購自 Riedel-deHaën AG (Seelze, Germany)。
6. acetonitrile (LC Grade) 、mthyl alcohol (LC Grade)：購自 J.T. Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ, U.S.A.)
7. ethyl ether：Shimakyu's Pure Chemical (Osaka, Japan)。
8. methotrexate：購自 Wyeth (Münster, Germany)。
9. Methotrexate TDx kit：購自 Abbott Laboratories (Abbott Park, Illinois, U.S.A.)。
10. 去離子水：由 Milli-Q plus (Millipore, MA, U.S.A.) 純水系統製得。

(二) 藥材

大黃、黃芩、葛根藥材飲片購自台中市欣隆中藥行。

二、儀器設備

(一) 儀器

1. 高效液相層析儀 (HPLC) 包括：

幫浦：Shimadzu LC-10AL (Japan)、Shimadzu LC-6AD (Japan)

層析管：COSMOSIL 5C18-AR II (5 μm , 4.6 \times 250 m.m.)、Inertsil ODS-2 (5 μm , 4.6 x 250 mm) GL Science Inc. (Japan)

保護層析管柱：Inertsil ODS-2 (5 μm) GL Science Inc. (Japan)、

管柱前濾膜：SS/Pk (U.S.A.)、Xperten[®] 0.5 μm (UPCH A-102X)

紫外光偵測器：Shimadzu SPD-10A (Japan)、Shimadzu SPD-6A (Japan)

2. TDx Analyzer：Abbott No.9520-04 (U.S.A.)

3. 針頭濾膜 Millex[®] (0.45 μm , 13 mm)：Millipore carrigtwohill, Co. (Cork, Ireland)

三、實驗動物

雄性 Sprague-Dawley 大白鼠，體重 250~350 g，購自國家實驗動物中心，購入後飼養於中國醫藥大學動物中心，光線、溼度及溫度均控制良好，動物適應環境至少一週以上方進行實驗。

四、實驗方法

(一) 藥材之採購與基原鑑定

購自市場之大黃、黃芩與葛根藥材經顯微及五官鑑定後，依傳統製備法，製備水煎劑。精確稱取大黃、黃芩、葛根藥材各 25.0 g，加入 500

mL 水，先行浸潤 30 分鐘，然後以直火加熱至沸騰，轉小火繼續加熱，煮至水煎劑略少於 100 mL，趁熱過濾後加熱水定容至 100 mL，置於 -30 °C 冷凍儲存備用。

(二) 中藥水煎劑中多酚成分之定量分析

經由本實驗室建立之梯度沖提 HPLC 方法並進行確效 (26, 27)，定量三種水煎劑中大黃素、蘆薈大黃素、大黃酸、大黃酚、黃芩苷、黃芩素、漢黃芩素、葛根素、大豆苷、大豆苷元等指標成分含量後，供動物口服實驗用。

1. 大黃水煎劑中 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之定量

水煎劑中非醣體之定量，係取水煎劑 1.5 mL，加入 1.0 mL 內標準甲醇溶液 (50 µg/mL)，以甲醇定容至 10.0 mL，振盪混合均勻，離心 15 分鐘 (9,860g)，取其上清液，經微孔過濾器 (0.45 µm) 過濾後，取 20 µL 濾液注入 HPLC 分析，以檢品中 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 與內標準之波峰面積比值代入各成分之檢量線方程式，求出檢品中 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之含量。

高效液相層析儀 (HPLC) 之分析條件

層析管：COSMOSIL 5C18-AR II，5 µm，4.6×250 m.m.

移動相：CH₃CN---A 0.1% H₃PO₄---B

流速：0.9 mL/min

檢測波長：250 nm

內標準：2-methyanthraquinone (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in methanol)

梯度沖提時間表

Time	A	B
0	50	50
10	60	40
15	85	15
20	85	15
25	50	50

2. 黃芩水煎劑中 baicalin、baicalein 及 wogonin 之定量分析

第一次萃取之檢品解凍後，取 300 μL 加甲醇 700 μL 振盪混合，經 9860 g 高速離心 15 分鐘，取上清液 100 μL 再加甲醇稀釋 30 倍，取 200 μL 甲醇稀釋液加等體積之內標準甲醇溶液 (ethyl paraben, 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，混合後經微孔濾膜 (0.45 μm) 過濾。取 20 μL 注入 HPLC 分析，以檢品中 baicalin、baicalein 及 wogonin 與內標準之波峰面積比值，代入 baicalin、baicalein 及 wogonin 檢量線之方程式，求出各檢品中 baicalin、baicalein 及 wogonin 之含量。

第二次萃取之檢品解凍後，取 300 μL 加甲醇 700 μL 振盪混合，經 9860 $\times\text{g}$ 高速離心 15 分鐘，取上清液 100 μL 再加甲醇適當稀釋後，同上法處理，求出各檢品中 baicalin、baicalein 及 wogonin 之含量。

高效液相層析 (HPLC) 之條件

層析管柱：Inertsil ODS-2 (5 μm , 4.6 x 250 mm)

GL Science Inc. (Japan)

保護層析管柱：Inertsil ODS-2 (5 μm , 4.6 x 50 mm)

GL Science Inc. (Japan)

移動相：氘甲烷與 0.05% 磷酸 (36 : 64, v/v)

流速：1.0 mL/min

檢測波長：270 nm

內標準：ethylparaben (20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in methanol)

3. 葛根水煎劑中 dadzin、dadzain、purazin 之定量分析

精確量取葛根之水煎劑 200 μl ，加入含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethylparaben 之甲醇溶液 200 μl 中，震盪混合均勻，以 9,860 \times g 高速離心 15 分鐘，取上清液，再以 9,860 \times g 高速離心 15 分鐘，取上清液 20 μl 注入 HPLC 分析。

以檢品中 puerarin、daidzin 及 daidzein 與內標準之波峰面積比值代入各成分之檢量線方程式，求出檢品中 puerarin、daidzin 及 daidzein 之含量。

高效液相層析儀 (HPLC) 分析條件

分析管柱：Cosmisil 5C18-AR II (5 μm , 250 \times 4 mm)

保護層析管柱：LiChrospher 100 RP-18 e (5 μm)

移動相：0.05%磷酸水與氘甲烷 (0 min 89:11, 10 min 82:18, 23 min 50:50)

流速：1 ml/min

檢測波長：250 nm

內標準：Ethylparaben (100 µg/ml in Methanol)

(三) 動物及給藥

實驗動物為雄性 Sprague-Dawley 大白鼠 (體重介於 250 ~ 350 g，出生 8 ~ 12 週)。給藥前禁食 12 小時，實驗設計採平行試驗模式，將大白鼠隨機分成四組，每組 6-10 隻，三組以胃管投予 MTX (5.0 mg/kg)，並分別併服相當於 2 g/kg 大黃及黃芩、4 g/kg 葛根之水煎劑，另一組給予 MTX (5.0 mg/kg) 相當體積的水與水煎劑。MTX 以水稀釋成 2.5 mg/mL，動物之使用、處置及管理依照中華民國實驗動物學會所編撰之「實驗動物管理與使用指南」(2002)。

(四) 採血及檢品處理

投藥後併服大黃及黃芩組於 5、15、30、60、120、240、480、1440 和 2880 分鐘，併服葛根組則於 5、15、30、60、120、240、480、1440、2160、2880 及 3600 分鐘以心臟採血方式取得血液檢品。每次採血量為 0.4 mL，將血液檢品置於微量離心管，高速離心 (9860 ×g) 15 分鐘，取上層之血清，貯存於 -20 °C 之冷藏櫃，俟後分析。

(五) 血液中 MTX 濃度之定量

檢品利用 TDx Analyzer 以螢光偏極免疫分析法 (Fluorescence Polarization Immunoassay, FPIA) 定量血液中 MTX 濃度。

檢量線之繪製：取濃度分別為 0、0.05、0.15、0.30、0.60 及 1.00 $\mu\text{mol/L}$ 之血清標準溶液 (TDx methotrexate monoclonal serum reagent) 各 80 μL ，利用 methotrexate kit 以 TDx analyzer 分析，自動繪製檢量線。

血清檢品亦同樣以 methotrexate kit 分析後，自動代入檢量線換算，求得 MTX 濃度。定量範圍為 0.00-1.00 $\mu\text{mol/L}$ ；偵測極限為 0.02 $\mu\text{mol/L}$ 。

(六) 數據處理及統計分析

利用電腦程式 WINNONLIN 之非室體模式 (noncompartment model) 計算動力學參數，並以 ANOVA 分析單服 MTX 與分別併服大黃、黃芩與葛根後血中 MTX 之動力學參數是否具統計上顯著差異 ($p < 0.05$)。

參、結果

一、水煎劑檢品中成分之定量

本研究利用 HPLC 方法定量，相當於 2 g 大黃之水煎劑中 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之含量分別為 2.3、6.4、2.7 及 1.4 mg；相當於 2 g 黃芩之水煎劑中含有 baicalin 125.4 mg、baicalein 11.0 mg 與 wogonin 3.4 mg；而相當於 4 g 葛根之水煎劑則含有 puerarin、daidzin 與 daidzein 分別為 16.0、3.2 與 0.8 mg。

二、富含多酚中藥對 MTX 動力學之影響

本研究以大白鼠為模型，採平行設計，探討大黃、黃芩與葛根水煎劑對 MTX 動力學之影響。單服 MTX 或併服大黃、黃芩與葛根水煎劑後，其血中濃度經時變化圖及血中 MTX 之濃度如 Fig. 3~4 及 Table 1~5 所示。併服大黃組的 MTX 血中濃度在 4 h 前遠低於單服 MTX 組，然而 4 h 後兩曲線交叉，併服大黃組的 MTX 血中濃度反而遠高於單服 MTX 組，顯示大黃顯著抑制 MTX 的吸收，同時又抑制其排除。併服黃芩組的 MTX 血中濃度經時變化顯示，吸收期兩組之間差異不大，但排除期的 MTX 血藥濃度，併服黃芩組遠高於單服 MTX 組。至於併服葛根組與單服 MTX 組相較，血中濃度經時變化於前 6 h 幾乎重疊，而 6 h 後併服葛根組血中之 MTX 之血中濃度顯著高於單服 MTX 組。

單服 MTX 之平均血藥面積為 73.1 ± 22.9 nmol·min/mL，平均滯留時

間為 404.6 ± 60.7 min；併服大黃之平均血藥面積為 218.6 ± 28.8 nmol·min/mL，平均滯留時間為 1121.0 ± 74.8 min；併服黃芩之平均血藥面積為 203.3 ± 28.6 nmol·min/mL，平均滯留時間為 1094.3 ± 94.4 min；併服葛根之平均血藥面積為 232.4 ± 26.9 nmol·min/mL，平均滯留時間為 1143.4 ± 163.1 min，如 Table 6 所示。併服中藥的三組與單服 MTX 之動力學參數比較，結果如 Table 7 所示，顯示併服大黃後，平均血藥面積增加了 199.0 % ($p < 0.01$)，平均滯留時間增加了 199.3 % ($p < 0.001$)；併服黃芩後，平均血藥面積增加了 178.2 % ($p < 0.01$)，平均滯留時間增加了 170.5 % ($p < 0.001$)；而併服葛根後，平均血藥面積增加了 202.7 % ($p < 0.001$)，平均滯留時間增加了 237.8 % ($p < 0.01$)，半衰期顯著延長，由 279.0 ± 50.3 變為 1084 ± 237.4 min；而 Cl/F 顯著降低，Vd 則無明顯差異 (Table 8)。

三、併服富含多酚中藥對 MTX 毒性之影響

大白鼠死亡率顯示，單獨口服 MTX 之 14 隻大鼠中 1 隻於第 6 天死亡，死亡率為 7.1%，併服大黃組 10 隻大鼠中 3 隻死亡，死亡率為 30%；併服黃芩組 8 隻中 3 隻死亡，死亡率為 37.5%；併服葛根組 7 隻中有 4 隻死亡，死亡率達 57.1%，顯示併服富含多酚類中藥，顯著提高了 MTX 之毒性。併服中藥組大鼠皆於 7~9 天內死亡，顯示牠們皆因為 MTX 之延遲性中毒而死亡。中毒大鼠毛色變差時，其血液中之 macrophage 幾乎沒有吞噬 *E. coli* 的功能，顯示免疫功能盡失。

討論

本實驗原先設計為交叉試驗，即將大鼠分為兩組，一組併服中藥水煎劑及 MTX，另一組則併服等體積水與 MTX，待藥物自體內完全排除後，中藥水煎劑組改為併服水，而原先併服水組則改併服中藥水煎劑；然而實驗進行之後發現，併服中藥水煎劑組之大鼠，服藥數天後，健康情形每下愈況，毛色漸漸失去光澤、豎毛、背部拱起且活動力差，並有腹瀉之現象，部分大鼠於試驗一週後陸續死亡，而存活之大鼠健康狀況亦欠佳，因此本研究設計改採平行試驗方式進行，以免因大鼠第一次試驗後健康狀況不佳而干擾其後一次試驗之結果。

動力學研究指陳，MTX 主要依賴膽道及腎臟排除。本研究結果顯示，MTX 之血中濃度曲線呈現雙峰，於 24 小時呈現第二峰，可以推論 MTX 於鼠體內有腸肝循環之現象。另外，有文獻指出 MTX 於體內因 polyglutamation 而形成鍵結 2~7 個 glutamate 之 polyglutamate 代謝物，此類代謝物延長於細胞內停留的時間，且鍵結長度會增長其滯留時間，導致 MTX 可滯留在腎臟幾個星期，而滯留在肝臟幾個月⁽³⁸⁾，進而增加毒殺細胞作用(cytotoxicity activity)^(28,29,30)，此作用與其藥理活性及毒性相關，因而造成延遲性毒性。另有報告指出，服用 MTX 之大鼠體重顯著降低，攝食量減少，MTX 又可干擾腸道穿透性，而引起電解質流失，干擾腸道功能⁽³¹⁾，吾人臆測可能因此而引起腹瀉現象，導致電解質失衡及水分流失，造成動物死亡。由於併服中藥水煎劑組死亡率明顯高於單服 MTX 組，吾人推測有可能肇因於多酚代謝物與 MTX 相互競爭 MRP 運送蛋白而抑制了 MTX 之排除所致。

本研究結果顯示，併服大黃組於4小時內MTX之血中濃度明顯較單服MTX組為低，而併服黃芩或葛根組之MTX血中濃度，於給藥4小時內與單服MTX組並無太大差異。三組併服中藥大鼠之MTX血中濃度於4小時後顯著超越單服MTX組 (Fig. 2~4)，可見三種中藥對MTX動力學之影響主要是在排除期。併服大黃時對MTX在吸收期的影響反而降低了MTX之血中濃度，顯示大黃的成分抑制了MTX的吸收，吾人推測因大黃主成分rhein之結構為 monocarboxylic acid，而 monocarboxylic acid 可能藉由位於小腸 brush-border membrane 之 proton-gradient dependent monocarboxylic acid transporter (MCT1)運輸進入腸細胞而吸收^(39,40)，因此rhein與MTX二者可能競爭此 transporter，造成MTX之血中濃度顯著降低；至於黃芩主成分baicalin帶有葡萄糖醛酸基團，亦為 monocarboxylic acid，但因其會於腸道內被水解形成baicalein⁽⁴¹⁾，即不帶酸基，因而baicalin於腸內與MTX競爭MCT1之可能性應較低，這或可解釋富含baicalin的黃芩水煎劑對MTX吸收之影響明顯低於大黃水煎劑的原因。

結論與建議

基於本計畫的結果發現，富含多酚之中藥水煎劑對 MTX 的藥物動力學行為影響甚鉅，應盡量避免併服，以免導致 MTX 之延遲毒性。若 MTX 與大黃、黃芩與葛根或含此類藥材之處方併服時，須考慮劑量之調降，以保障用藥安全。因此吾人極力建議 MTX 不宜與富含多酚類之中藥或健康食品同期使用。

肆、参考文献

1. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 1993, 23: 1007-1011.
2. Heertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *Arch Intern Med*. 1995, 155: 381-386.
3. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and cancer risk in The Zutphen Elderly Study. *Nutr Cancer*. 1994, 22: 175-184.
4. Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anion. *Biochem Pharmacol*. 1988, 37: 83-88.
5. Husain SR, Cillard J, Cillard P. Hydroxy radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*. 1987, 26: 2489-2492.
6. Frankel EN, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*. 1993, 341: 454-457.
7. Whalley CV, Rankin SM, Houlst JRS, Jessup W, Leake DS. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins. *Biochem Pharmacol*. 1990, 39: 1743-1749.
8. Wang HK, Xia Y, Yang ZY, Natschke SL, Lee KH. Recent advances in discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents. *Adv Exp Med Biol*. 1998, 439: 191-225.
9. Kaul TN, Middleton E Jr, Ogra PL. Antiviral effect of flavonoid on human viruses.

- J Med Virol. 1985, 15: 71-79.
10. Middleton EJ. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol.* 1998, 439: 175-182.
 11. Nemeth K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr.* 2003, 42: 28-42.
 12. Victor D, Winter J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal bacteroides from humans. *Biochem J.* 1987, 248: 953-956.
 13. Chao PDL, Hsiu SL, Hou YC. Flavonoids in Herbs: Biological fates and potential interactions with xenobiotics. *J Food Drug Anal.* 2002, 11: 135-145.
 14. Kruh GD, Zeng H, Rea PA, Liu G, Chen ZS, Lee K, Belinsky MG. MRP subfamily transporters and resistance to anticancer agents. *J Bioenerg Biomembr* 2001, 33: 493-501.
 15. Zeng H, Chen ZS, Belinsky MG, Rea PA, Kruh GD. Transport of methotrexate (MTX) and folates by multidrug resistance protein (MRP) 3 and MRP1: effect of polyglutamylation on MTX transport. *Cancer Res.* 2001, 61: 7225-7232.
 16. McKendry RJ. The remarkable spectrum of methotrexate toxicities. *Rheum Dis Clin North Am.* 1997, 23: 939-954.
 17. Fraser AG. Methotrexate: first-line or second-line immunomodulator? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003, 15: 225-231.
 18. Schwab M, Klotz U. Pharmacokinetic considerations in the treatment of inflammatory bowel disease. *Clin Pharmacokinet.* 2001, 40: 723-751.
 19. Grim J, Chladek J, Martinkova J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases. *Clin Pharmacokinet.* 2003, 42: 139-151.
 20. Hillson JL, Furst DE. Pharmacology and pharmacokinetics of methotrexate in

- rheumatic disease. Practical issues in treatment and design. *Rheum Dis Clin North Am.* 1997, 23: 757-778.
21. Bannwarth B, Pehourcq F, Schaeferbeke T, Dehais J. Clinical pharmacokinetics of low-dose pulse methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacokinet.* 1996, 30: 194-210.
 22. Chen ZS, Lee K, Walther S, Raftogianis RB, Kuwano M, Zeng H, Kruh GD. Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res.* 2002, 62: 3144-3150.
 23. Furst DE. Practical clinical pharmacology and drug interactions of low-dose methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1995, 34 Suppl 2: 20-25.
 24. Ruschitzka F, Meier PJ, Turina M, Luscher TF, Noll G. Acute heart transplant rejection due to St. John's wort. *Lancet.* 2000, 355: 548-549.
 25. 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*). *Clin Pharmacol Ther.* 1999, 66: 338-345.
 26. Lai MY, Hou YC, Hsiu SL, Chen CC, Chao PDL. Relative flavone bioavailability of *Scutellariae Radix* between traditional decoction and commercial powder preparation in humans. *J Food Drug Anal.* 2002, 10: 75-80.
 27. Lai MY, Hou YC, Hsiu SL, Chen CC, Chao PDL. Urinary pharmacokinetics of baicalein, wogonin and their glycosides after oral administration of *Scutellariae Radix* in humans. *Biol Pharm Bull.* 2003, 26: 79-83.
 28. Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP. Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacol.* 2000, 47(2-3): 247-257.
 29. Sczesny F, Hempel G, Boos J, Blaschke G. Capillary electrophoretic drug

- monitoring of methotrexate and leucovorin and their metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998, 718(1): 177-185.
30. Saxena M, Henderson GB. Identification of efflux system for large anions and anionic conjugates as the mediators of methotrexate efflux in L1210 cells. *Biochem Pharmacol.* 1996, 51: 974-982.
31. Carneiro-Filho BA, Lima IP, Araujo DH, Cavalcante MC, Carvalho GH, Brito GA, Lima V, Monteiro SM, Santos FN, Ribeiro RA, Lima AA. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis. *Dig Dis Sci.* 2004, 49(1): 65-72.
32. Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol.* 1999, 55: 929–937.
33. Kawabe T, Chen ZS, Wada M, Uchiumi T, Ono M, Akiyama S, Kuwano M. Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Lett.* 1999, 456: 327–331.
34. van Aabel RA, van Kuijck MA, Koenderink J B, Deen P M, van Os CH, Russel FG. Adenosine triphosphate-dependent transport of anionic conjugates by the rabbit multidrug resistance-associated protein Mrp2 expressed in insect cells. *Mol Pharmacol.* 1998, 53: 1062–1067.
35. Zeng H, Liu G, Rea PA, Kruh GD. Transport of amphipathic anions by human multidrug resistance protein 3. *Cancer Res.* 2000, 60: 4779–4784.
36. O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Mellon FA, O'Brien NM, Williamson G. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic

- model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem Pharmacol.* 2003, 65(3): 479-491.
37. Ekstrom PO, Giercksky KE, Andersen A, Slordal L. Alterations in methotrexate pharmacokinetics by naproxen in the rat as measured by microdialysis. *Life Sciences.* 1997, 60(24): PL 359-364.
38. Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10 edition, The McGraw Hill, New York, USA, 2001.
39. Tamai I, Takanaga H, Maeda H, Sai Y, Ogihara T, Higashida H, Tsuji A. Participation of a proton-cotransporter, MCT1, in the intestinal transport of monocarboxylic acids. *Biochem Biophysical Res Commu.* 1995, 214(2): 482-9.
40. Tamai I, Sai Y, Ono A, Kido Y, Yabuuchi H, Takanaga H, Satoh E, Ogihara T, Amano O, Izeki S, Tsuji A. Immunohistochemical and functional characterization of pH-dependent intestinal absorption of weak organic acids by the monocarboxylic acid transporter MCT1. *J Pharmacy Pharmacol.* 1999, 51(10): 1113-1121.
41. Akao T, Kawabata K, Yanagisawa E, Ishihara K, Mizuhara Y, Wakui Y, Sakashita Y, Kobashi K. Baicalin, the predominant flavone glucuronide of *scutellariae radix*, is absorbed from the rat gastrointestinal tract as the aglycone and restored to its original form. *J. Pharmacy Pharmacology.* 2000, 52(12): 1563-1568.

柒、圖

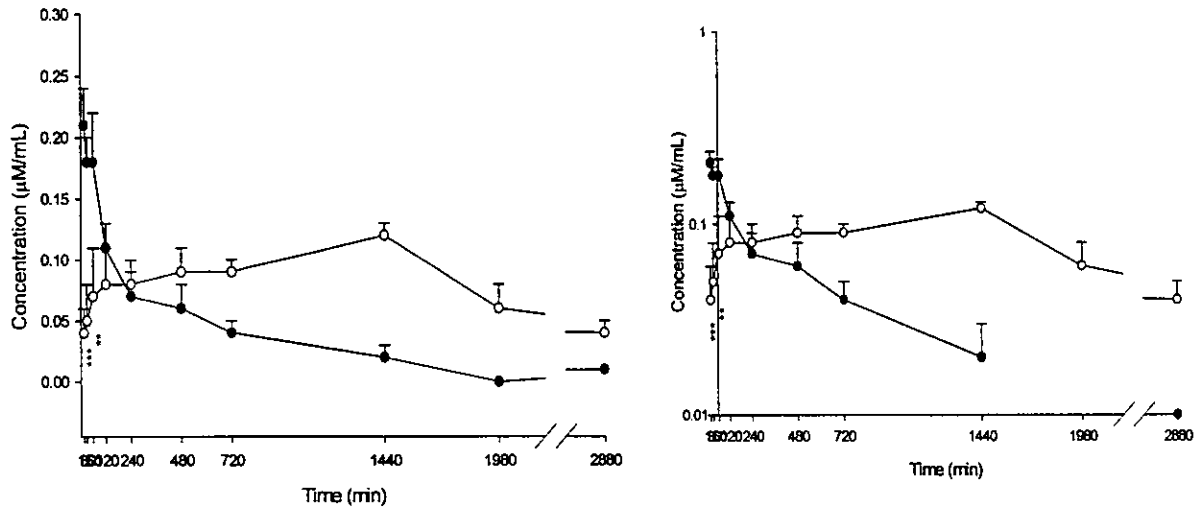


Fig. 2 Mean (\pm S.E.) serum concentration-time profiles of methotrexate (MTX) after oral administration of MTX alone (●) and coadministration with rhubarb (o) in rats.

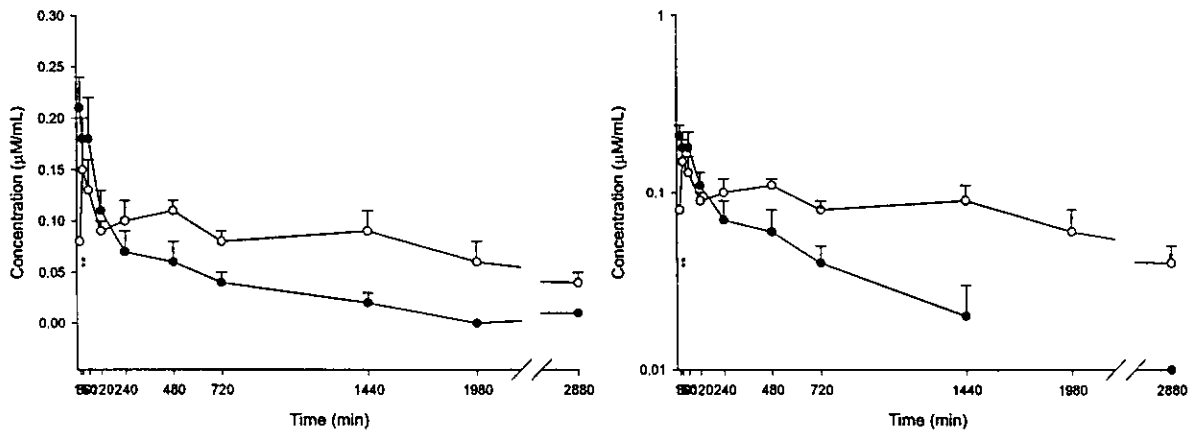


Fig. 3 Mean (\pm S.E.) serum concentration-time profiles of methotrexate (MTX) after oral administration of MTX alone (●) and coadministration with Scutellariae Radix (o) in rats.

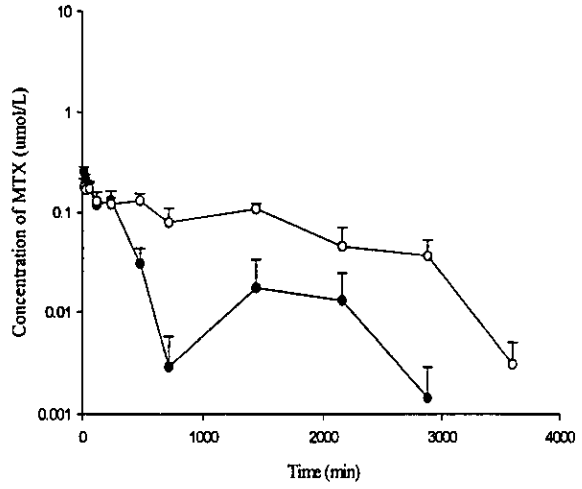
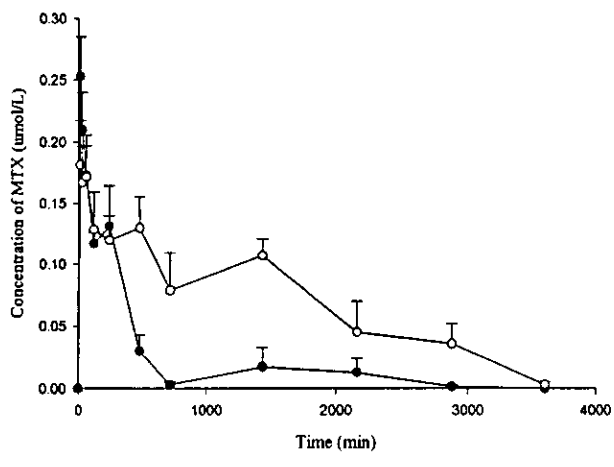


Fig. 4 Mean (\pm S.E.) serum concentration-time profiles of methotrexate (MTX) after oral administration of MTX alone (●) and coadministration with Puerariae Radix (○) in rats.

Table 1 Pharmacokinetic parameters of methotrexate (MTX) after oral administration of 5.0 mg/kg MTX alone.

Parameters	Rats						Mean	± S.E.
	1	2	3	4	5	6		
AUC ₀₋₂₈₈₀	69.6	54.6	49.2	28.8	51.8	184.7	73.1 ± 22.9	
C _{max}	0.3	0.3	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2 ± 0.0 ₃	
T _{max}	60.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	22.5 ± 7.5	
MRT	538.5	299.8	279.8	306.4	364.1	639.0	404.6 ± 60.7	
t _{1/2}	481.0	383.1	366.8	386.1	322.7	615.2	425.8 ± 43.4	

AUC_{0-t} : area under serum concentration – time curve to the last point. (nmol · min · mL⁻¹)

C_{max} : concentration of peak serum level. (nmol · mL⁻¹)

T_{max} : time of peak serum level. (min)

MRT : mean residence time. (min)

t_{1/2}: half life (min)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of methotrexate (MTX) after oral administration of 5.0 mg/kg MTX with Rhubarb decoction (2.0 g/kg).

Parameters	Rats								Mean	± S.E.
	1	2	3	4	5	6	7	8		
AUC ₀₋₂₈₈₀	349.8	157.6	213.2	261.6	216.8	297.8	127.6	124.1	218.6 ± 28.8	
C _{max}	0.2	0.1	0.1	0.1	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1 ± 0.0	
T _{max}	240.0	1440.0	720.0	720.0	60.0	1440.0	720.0	1440.0	847.5 ± 193.2	
MRT	1468.8	1261.1	1322.3	1475.5	908.4	1196.5	987.4	1068.3	1211.0 ± 74.8	

Table 3 Pharmacokinetic parameters of methotrexate (MTX) after oral administration of 5.0 mg/kg MTX with decoction of Scutellariae Radix (2.0 g/kg).

Parameters	Rats							Mean ± S.E.
	1	2	3	4	5	6	7	
AUC ₀₋₂₈₈₀	142.1	259.4	112.9	338.2	187.5	206.9	176.6	203.3 ± 28.6
C _{max}	0.3	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2 ± 0.0
T _{max}	30.0	1440.0	240.0	1440.0	480.0	30.0	60.0	531.4 ± 242.2
MRT	910.4	1021.6	1190.1	1375.9	1187.2	1315.3	659.7	1094.3 ± 94.4

Table 4 Pharmacokinetic parameters of methotrexate (MTX) after oral administration of 5.0 mg/kg MTX alone.

Parameters	Rats							Mean ± S.E.
	1	2	3	4	5	6	7	
T _{max}	15.0	15.0	15.0	30.0	15.0	30.0	240.0	51.4 ± 34.1
C _{max}	0.3	0.2	0.2	0.4	0.3	0.2	0.3	0.3 ± 0.0
AUC ₀₋₃₆₀₀	202.1	31.8	22.3	103.4	54.2	26.9	88.1	75.5 ± 26.1
t _{1/2}	416.3	219.8	373.2	395.7	112.3	143.2	292.4	279.0 ± 50.3
V/F	11.4	18.1	38.5	20.7	11.2	20.2	16.8	19.6 ± 3.8
Cl/F	0.0 ₂	0.1	0.1	0.0 ₄	0.1	0.1	0.0 ₄	0.1 ± 0.0 ₁
MRT	1324.7	106.6	102.7	360.6	168.8	99.9	206.2	338.5 ± 181.5

T_{max} : time of peak serum level. (min)

C_{max} : concentration of peak serum level. (nmol · mL⁻¹)

AUC_{0-t} : area under serum concentration – time curve to the last point. (nmol · min · mL⁻¹)

t_{1/2}: half life (min)

V/F: volume distribution over F (L/kg)

Cl/F: clearance over F (L/min)

MRT : mean residence time. (min)

Table 5 Pharmacokinetic parameters of methotrexate (MTX) after oral administration of 5.0 mg/kg MTX with decoction of Pueraria Radix (4.0 g/kg).

Parameters	Rats							Mean± S.E.
	1	2	3	4	5	6	7	
T _{max}	60.0	1440.0	15.0	60.0	720.0	30.0	15.0	334.3± 224.7
C _{max}	0.3	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.3	0.2± 0.0
AUC ₀₋₃₆₀₀	354.2	237.1	170.5	185.9	270.8	236.9	171.4	232.4± 26.9
t _{1/2}	2097.4	1304.376	816.3993	811.252	423.9207	1500.13	638.0069	1084.5± 237.4
V/F	9.3	23.8	24.7	23.3	9.5	34.077	13.3	19.7± 3.8
Cl/F	0.0 ₂	0.0 ₁	0.0 ₂	0.0 ₂	0.0 ₂	0.0 ₂	0.0 ₁	0.0 ₁ ± 0.0 ₀
MRT	975.7	1236.6	935.4	1578.3	958.4	1731.4	588.1	1143.4± 163.1

Table 6 Comparison of pharmacokinetic parameters of methotrexate (MTX) in rats between receiving MTX alone (5.0 mg/kg) and coadministration with rhubarb (R, 2 g/kg).

Parameters	Groups	MTX alone (n=6)	MTX+R (n=8)	Difference
		Mean± S.E.	Mean± S.E.	(%)
AUC ₀₋₂₈₈₀ (nmol·min·mL ⁻¹)		73.1± 22.9	218.6± 28.8	199.0 **
C _{max} (nmol·mL ⁻¹)		0.2± 0.0 ₃	0.1± 0.0 ₃	-38.5 *
T _{max} (min)		22.5± 7.5	847.5± 193.2	3666.7 **
MRT (min)		404.6± 60.7	1211.0± 74.8	199.3 ***

*** p<0.001 , ** p<0.01 , * p<0.05.

Table 7 Comparison of pharmacokinetic parameters of methotrexate (MTX) in rats between receiving MTX alone (5.0 mg/kg) and coadministration with Scutellariae Radix (SR, 2 g/kg).

Parameters	Groups	MTX alone (n=6)	MTX+SR (n=7)	Difference
		Mean± S.E.	Mean± S.E.	(%)
AUC ₀₋₂₈₈₀ (nmol · min · mL ⁻¹)		73.1± 22.9	203.3± 28.6	178.2 **
C _{max} (nmol · mL ⁻¹)		0.2± 0.0 ₃	0.2± 0.0 ₂	-29.8
T _{max} (min)		22.5± 7.5	531.4± 242.2	2261.9 ***
MRT (min)		404.6± 60.7	1094.3± 94.4	170.5 ***

*** p<0.001 , ** p<0. 01.

Table 8 Pharmacokinetic parameters of MTX in rats after giving oral MTX (5 mg/kg) alone and coadministration with Puerariae Radix (PR ,4 g/kg).

Parameters	Groups	MTX alone (n=7)	MTX+PR (n=7)	Difference
		Mean± S.E.	Mean± S.E.	(%)
T _{max} (min)		51.4± 34.1	334.3± 224.7	550.0
C _{max} (nmol · mL ⁻¹)		0.3± 0.0 ₃	0.2± 0.0 ₃	-22.2
AUC ₀₋₃₆₀₀ (nmol · min · mL ⁻¹)		75.5± 26.1	232.4± 26.9	202.7 ***
t _{1/2} (min)		279.0± 50.3	1084.5±237.4	288.8***
Cl/F (L/min)		0.1± 0.0 ₁	0.0 ₁ ± 0.0 ₀	-100.0**
V/F (L/kg)		19.6± 3.8	19.7±3.8	-0.0
MRT (min)		338.5± 181.5	1143.4± 163.1	237.8***

*** p<0.001 , ** p<0. 01.