

中國醫藥大學營養學系
碩士論文

大蒜精油與 atorvastatin 藥物動力學之探討

Effects of garlic oil on the pharmacokinetics of
atorvastatin in rats

研究生：江佳容(Jia-Rong Chiang)

指導教授：李宗貴 博士(Chong-Kuei Lii, Ph.D.)

中華民國一百年七月

July, 2011

中國醫藥大學營養學系

論文口試委員審定書

論文題目：

中文：大蒜精油對大鼠體內 atorvastatin 藥物動力學之探討

英文：Effects of garlic oil on the pharmacokinetics of atorvastatin
in rats

本論文係 江佳容 於中國醫藥大學營養學系碩士班完成之碩士論文，經考試委員審查及考試合格，特此證明。

委員姓名	服務機關	職稱	考試委員簽章
李宗貴	中國醫藥大學	教授	李宗貴
陳炯東	國家衛生研究院	研究員	陳炯東
葉燈光	國家衛生研究院	副研究員	葉燈光
姚賢宗	中國醫藥大學	助理教授	姚賢宗

中華民國

100 年

06 月

29 日

中國醫藥大學營養學系

論文指導教授推薦書

營養學系碩士班：江佳容君所提之論文

中文：大蒜精油對大鼠體內 atorvastatin 藥物動力學之探討

英文：Effects of garlic oil on the pharmacokinetics of atorvastatin in rats

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授 李宗貴 (簽章)

中華民國 100 年 06 月 29 日

目錄

目錄.....	i
圖目錄.....	iii
表目錄.....	v
縮寫表.....	vi
中文摘要.....	viii
英文摘要.....	x
第一章、前言.....	1
第二章、文獻探討.....	2
一、大蒜(Garlic)之簡介.....	2
二、生物轉換酵素系統(biotransformation enzyme system)	6
(一) 第一期藥物代謝作用(Phase I drug metabolism)	7
(二) 第二期解毒作用(Phase II detoxification)	8
(三) 第三期膜轉運作用(Phase III membrane transportation).....	11
(四) 大蒜與藥物交互作用.....	13
(五) 食用大蒜之副作用及安全性評估.....	15
三、生物體之抗氧化防禦系統(antioxidant defense system)	15
四、Atorvastatin 之簡介.....	21
(一) Atorvastatin 之代謝路徑.....	22
(二)Atorvastatin 之安全性評估.....	23
五、調控藥物代謝酵素之訊息傳遞路徑.....	23
六、藥物動力學(pharmacokinetics)	27
(一) 清除率(Clearance, Cl)	28
(二) 半衰期(half-life, $T_{1/2}$)	28
(三) 藥物濃度曲線下面積(area under the curve, AUC)	28
(四) 血中藥物最高濃度(C_{max})	28
(五) 藥物達血中濃度最高之時間(T_{max})	28
第三章、實驗材料與方法.....	29
一、實驗架構.....	29
二、實驗材料.....	30
(一) 實驗動物.....	30

(二) 大蒜精油的製備.....	30
(三) 化學試劑.....	31
三、實驗方法.....	40
(一) 動物飼養.....	40
(二) 實驗分析項目.....	40
第四章、結果.....	53
一、以 HPLC/UV 測定大蒜精油中含硫化合物之含量.....	53
二、大蒜精油對大鼠體重與組織相對重量之影響.....	53
三、大蒜精油對大鼠肝功能指標之影響.....	53
四、大蒜精油處理五天與四週後對大鼠肝臟藥物代謝酵素活性之影響.....	53
五、大蒜精油處理對小腸藥物代謝酵素活性之影響.....	54
六、大蒜精油對大鼠肝臟 CYP1A1/2 蛋白質表現之影響.....	54
七、大蒜精油對大鼠肝臟 CYP2B1、2D1 與 2E1 蛋白質與 mRNA 表現之影響.....	54
八、大蒜精油對大鼠肝臟 CYP2C6 與 2C11 蛋白質與 mRNA 表現之影響.....	55
九、大蒜精油對大鼠肝臟 CYP3A1/2 蛋白質與 mRNA 表現之影響.....	55
十、大蒜精油對大鼠肝臟 UGT1A1 蛋白質與 mRNA 表現之影響.....	56
十一、大蒜精油對大鼠肝臟 GSTs 蛋白質表現之影響.....	56
十二、大蒜精油對大鼠肝臟 P-gp 蛋白質與 mRNA 表現之影響.....	56
十三、大蒜精油對大鼠小腸之 CYP3A1 與 3A2 蛋白質表現.....	56
十四、大蒜精油對大鼠小腸之 UGT1A1 蛋白質表現.....	56
十五、大蒜精油對大鼠小腸 GSTs 蛋白質表現之影響.....	57
十六、大蒜精油對大鼠小腸之 P-gp 蛋白質表現.....	57
十七、大蒜精油對血漿中 atorvastatin (ATV)與 2-hydroxy atorvastatin (2-OH ATV).....	57
第五章、討論.....	78
第六章、結論.....	85
參考文獻.....	86
附錄.....	98

圖目錄

文獻探討

圖一、大蒜精油不同製備方式所存在含硫化合物成份.....	5
圖二、細胞內或外來物質之生物轉換系統.....	6
圖三、人類肝臟與小腸中 CYPs 之平均分佈比例.....	8
圖四、UDPGA 與親和性受質透過 UGT 代謝.....	9
圖五、GST 催化的結合反應.....	10
圖六、ABC 和 OATP 對口服與靜脈注射藥物的作用.....	13
圖七、麩胱甘肽(Glutathione)之結構.....	17
圖八、GSH 之抗氧化功能.....	17
圖九、HO-1 之作用及其代謝產物.....	18
圖十、麩氨酸-半胱氨酸接合酶與 GSH 生合成.....	20
圖十一、Atorvastatin 之代謝路徑.....	22
圖十二、外來物質或內生性物質對核接受器與 CYP450s 之間的交互影響.....	24
圖十三、轉錄因子與核接受器調節 CYP 之路徑.....	26
圖十四、活化 phaseI 與 phaseIII 轉錄因子之訊號路徑.....	27

實驗材料與方法

圖一、大蒜精油製備之設備與精油成品.....	30
------------------------	----

結果

圖一、HPLC/UV 測定大蒜精油中含硫化合物之層析圖.....	59
圖二、大蒜精油對大鼠肝臟 CYP1A1/2 蛋白質表現之影響.....	64
圖三、大蒜精油對大鼠肝臟 CYP2B1、2D1 與 2E1 蛋白質(A)與 mRNA (B)表現之影響.....	65
圖四、大蒜精油對大鼠肝臟 CYP2C6 與 2C11 蛋白質(A)與 mRNA (B)表現之影響.....	66
圖五、大蒜精油對大鼠肝臟 CYP3A1/2 蛋白質(A)與 mRNA (B)表現之影響...67	67

圖六、大蒜精油對大鼠肝臟 UGT1A1 蛋白質(A)與 mRNA(B)表現之影響.....	68
圖七、大蒜精油對大鼠肝臟 GSTs 蛋白質表現之影響.....	69
圖八、大蒜精油對大鼠肝臟 P-glycoprotein 蛋白質(A)與 mRNA (B)表現之影響.....	70
圖九、大蒜精油對大鼠小腸 CYP3A1 與 3A2 蛋白質表現之影響.....	71
圖十、大蒜精油對大鼠小腸之 UGT1A1 蛋白質表現.....	72
圖十一、大蒜精油對大鼠小腸之 GSTs 蛋白質表現.....	73
圖十二、大蒜精油對大鼠小腸之 P-gp 蛋白質表現.....	74
圖十三、大蒜精油處理五天對大鼠血漿 atorvastatin (ATV)和 2-hydroxy atorvastatin (2-OH ATV)濃度之變化.....	76
圖十四、四週的大蒜精油處理對大鼠血漿 atorvastatin (ATV)和 2-hydroxy atorvastatin (2-OH ATV)濃度之變化.....	77



表目錄

文獻探討

表一、大蒜之一般成分及含硫化合物含量.....	4
表二、Cytochrome P450 家族的基本特性.....	8
表三、大蒜與藥物之交互作用.....	14
表四、Statins 類藥物之比較.....	21
表五、調節 CYPs 的核接受器.....	24
表六、核接受器：內生性 ligands 與 DNA response element.....	24

實驗材料與方法

表一、CYPs 與 UGT 之受質與其代謝物.....	46
表二、蛋白質 1°與 2°抗體.....	48
表三、逆轉錄聚合酶連鎖反應之寡核苷酸引子序列.....	50

結果

表一、以 HPLC/UV 測定大蒜精油中含硫化合物之含量.....	59
表二、大蒜精油對大鼠體重、肝臟重、肺臟重之影響.....	60
表三、大蒜精油投予五天或四週對大鼠肝功能指標之影響.....	61
表四、大蒜精油處理五天與四週後對大鼠肝臟酵素活性之影響.....	62
表五、大蒜精油處理對大鼠小腸酵素活性之影響.....	63
表六、大蒜精油處理五天與四週對血漿中 atorvastatin (ATV)與 2-hydroxy atorvastatin (2-OH ATV)對藥物動力學參數之影響.....	76

縮寫表

ACN	Acetonitrile
ALT	Alanine aminotransaminase
AST	Aspartate aminotransaminase
ATV	Atorvastatin
2-OH ATV	2-Hydroxy atorvastatin
AUC	Area under the curve
CYP450	Cytochrome P450
DADS	Diallyl disulfide
DAS	Diallyl sulfide
DATS	Diallyl trisulfide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTNB	5,5-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GAPDH	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
GCLC	Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit
GCLM	Glutamate-cysteine ligase modifier subunit
GO	Garlic oil
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione disulfide
HO-1	Hemeoxygenase
HPLC/MS	High-performance liquid chromatography-Mass spectrophotometer

i.g.	Intragastric intubation
P-gp	P-glycoprotein
PMSF	Phenylmethanesulfon
PPB	Potassium phosphate buffer
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamine
UDPGA	UDP-glucuronic acid
UGT	UDP-glucuronosyltransferases
GST	Glutathione S-transferases



中文摘要

近年來，由於生活型態的改變，比如飲食過量、精緻飲食、缺乏運動、壓力過大等，導致許多慢性病的發生，使得養生保健日漸受到重視。數千年來，大蒜便一直被視為是具有健康促進和疾病預防的辛香料和草藥，也是目前市場上常見保健產品之一，在美國草藥類保健產品年銷售額排名中，更位居第二名。研究顯示大蒜擁有多樣生理活性，比如降血膽固醇、降血糖、抗腫瘤、降血壓、保護肝功能、免疫調節、藥物代謝調節等，其中又以降血膽固醇和降三酸甘油酯最為人所知，所以常有大蒜保健產品和降血脂臨床用藥共同使用現象。由於大蒜中富含的多種硫化物已知會上調多種藥物代謝酵素和細胞膜轉運蛋白的轉錄作用，也有報導指出有些大蒜硫化物會直接抑制藥物代謝酵素的活性，這使得大蒜和藥物共同服用時，兩者間是否產生交互作用，影響了藥效，成為一個必須面對的議題。Atorvastatin (ATV) 為臨床上常用的降膽固醇藥物，藉由抑制 HMG-CoA reductase 活性達到降低膽固醇的效果；在體內主要由 cytochrome P450 (CYP) 3A4 與 UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 負責代謝，最後再透過細胞膜轉運蛋白(P-glycoprotein, P-gp) 將代謝產物運出胞外。本研究因此以雄性六週齡 Sprague-Dawley 大鼠為實驗動物模式，先以胃管灌(i.g.)方式給予 50 或 200 mg/kg 大蒜精油(garlic oil, GO) 5 天或 4 週，完成灌食後隔天，經口給予 ATV (10 mg/kg)，隨後採集 6 小時血液樣本，動物犧牲後，取肝臟和小腸組織樣本，分別作為血漿中 ATV 與 2-OH ATV 濃度變化和肝臟與小腸中藥物代謝酵素與細胞膜轉運蛋白之活性、蛋白質表現、mRNA 表現分析使用。結果顯示：大蒜精油無論處理五天或四週，呈劑量關係增加 ethoxyresorufin O-deethylase (CYP1A1)、pentoxyresorufin O-deethylase (CYP2B1) 與 UGT1A1 酵素活性($p < 0.05$)，在大蒜精油處理四週下，也發現 testosterone 6 β -hydroxylase (CYP3A) 與 dextromethorphan O-demethylase (CYP2D6) 類似劑量關係增加酵素活性($p < 0.05$)。相反的， σ -nitrophenol hydroxylase (CYP2E1) 在五天與四週實驗中以及 diclofenac

4-hydroxylase (CYP2C)在五天實驗中皆受到大蒜精油的處理而被抑制($p<0.05$)；且 CYP1A1、1A2、2B1、2D1、3A1 與 UGT1A1 的蛋白質表現結果類似於酵素活性；此外，RT-PCR 結果也發現肝臟的 CYP2B1、3A1 與 UGT1A1 在大蒜精油處理下，皆呈劑量關係上調基因的表現($p<0.05$)。至於肝臟中的 P-gp 在大蒜精油給予 200 mg/kg 表現下降($p<0.05$)。小腸中，無論五天或四週，UGT 酵素活性與蛋白質以及 P-gp 蛋白質皆受到大蒜精油處理而增加表現。利用 LC/MS 分析發現大蒜精油處理下，血漿中 ATV 與 2-OH ATV 藥物濃度呈劑量關係降低，在五天或四週處理下，血漿中 ATV 的最高濃度(C_{max})以及 2-OH ATV，其高劑量大蒜精油組皆顯著低於控制組($p<0.05$)。依上述結果推論：大蒜精油處理下，降低 ATV 與 2-OH ATV 血漿中的濃度，比如： $AUC_{(0-6)}$ 與 C_{max} ，主要經由調節藥物代謝酵素與膜轉運蛋白之酵素、蛋白質與 mRNA 的表現，因此推論大蒜精油如與 ATV 共同服用下，將可能與 ATV 的代謝產生交互作用，進而降低 ATV 降血膽固醇之藥效。

關鍵字：大蒜精油、Atorvastatin、藥物代謝酵素、藥物動力學、大鼠

Abstract

Due to the changes of living styles including over-eating, lacking of exercise, and consuming too much refined foods in modern society, incidence of chronic diseases increase rapidly. Garlic has been used as a culinary spice and medicinal herb for hundreds of years. It has been well demonstrated that garlic owns a diverse biological activities, such as lowering blood cholesterol, lowering blood triglycerides, lowering blood sugar, lowering blood pressure, anti-thrombosis, anti-tumorigenesis, liver protection, immunomodulation, and modulation on drug metabolism. Currently, garlic is a popular health product worldwide and the total sales were ranked the second in the herb market of the United States of America. Due to the effective hypolipidemic effect of garlic, it is possible that certain peoples will co-intake clinical drugs and garlic products, especially the elderlys and those with hyperlipidemia and chronic vascular diseases. Atorvastatin (ATV), a HMG-CoA reductase inhibitor, is the top sale hypocholesterolemic drug. It is mainly catalyzed by cytochrome P450 (CYP) 3A and UDP-glucuronosyltransferase (UGT), which increase the water solubility of ATV. Followed by the action of CYP3A and UGT, ATV metabolites are excreted out of the cells through membrane transporters, such as P-glycoprotein (P-gp). This raises a possibility whether garlic changes the pharmacokinetic parameters of ATV by modulating drug-metabolizing enzyme and transporter activities. In this study, 6 weeks-old male Sprague-Dawley rats were intragastrically (i.g.) administered 50 or 200 mg/kg GO for 5 consecutive days or thrice a week for 4 weeks. Control rats were given 1 mg/kg corn oil (vehicle). At the day 6, ATV (10 mg/kg) was given orally and bloods were withdrawn at different time intervals for 6h. Liver and small intestine were removed following sacrifice. Results indicated that GO, regardless of treating for 5 days or 4 weeks, dose-dependently increased hepatic

ethoxyresorufin O-deethylase (CYP1A1), pentoxyresorufin O-deethylase (CYP2B1), and UGT1A1 activities ($p < 0.05$). A similar dose-dependent increase of testosterone 6 β -hydroxylase (CYP3A) and dextromethorphan *O*-demethylase (CYP 2D6) were also noted in rat livers for 4-week GO administration ($p < 0.05$). In contrast, σ -nitrophenol hydroxylase (CYP2E1) activity in the 5-day and 4-week experiments and diclofenac 4-hydroxylase (CYP2C) activity in the 5-day experiment were decreased by GO ($p < 0.05$). Immunoblots revealed that CYP1A1, 1A2, 2B1, 2D1, 3A1, and UGT1A1 expressions were similar to the changes of enzyme activities. Moreover, RT-PCR showed that hepatic CYP2B1, 3A1, and UGT1A1 mRNA levels were dose-dependently up-regulated by GO ($p < 0.05$). Lower hepatic P-gp levels were resulted in rat dosed with 200 mg/kg GO ($p < 0.05$). In the small intestine, UGT activity and protein level and P-gp protein level were increased by GO in both 5-day and 4-weeks experiments ($p < 0.05$). By LC/MS, area under the curve (AUC_{0-6h}) of plasma ATV and 2-hydroxylated ATV (2-OH ATV) concentrations were dose-dependently decreased by GO ($p < 0.05$). The maximum plasma concentration (C_{max}) of ATV in 4-week treatment and of 2-OH ATV in both 5-day and 4-week treatments were significantly lower in rats administered with high dose of GO ($p < 0.05$). In conclusion, GO decreases the plasma concentrations of ATV and 2-OH ATV, i.e. AUC_{0-6h} and C_{max} , by modulating drug metabolizing enzymes and membrane transporter activities and/or protein and mRNA expressions. Results suggest that garlic co-administration may interact with ATV metabolism and is likely to reduce ATV blood cholesterol lowering efficacy.

Key words: Garlic oil, Atorvastatin, Drug metabolism enzyme, pharmacokinetics, Rat

第一章、前言

自古以來人類首要追求的關鍵為一健康。隨著保健觀念的興起，眾多消費者也期望透過天然保健食品達到預防或治療效果，因此助長中草藥或食品透過萃取、提煉或半純化等加工過程，提高有效成份，事實上，目前市面上即有眾多經過濃縮的保健產品在販售，也廣為消費者所接受。根據行政院衛生署調查結果顯示，除了惡性腫瘤仍為十大死因之首外，其它慢性疾病死亡率，比如腦血管疾病、心臟病、糖尿病、高血壓以及腎病變等，也都分居前幾名，加總後，它們約佔總死亡率 30% 之普(行政院衛生署 2010 年統計資料)。曾有報告指出約有 15~20% 長期服用處方藥的慢性病患者也會同時使用中草藥，且大多未告知醫師，因此藥物與保健食品或藥物與中草藥間是否發生交互作用(food-drug or herb-drug interaction)，影響藥物之藥物動力學參數或藥效，值得更深入研究與探討。

大蒜數幾千年來一直被認為是具有多樣生理活性之藥用植物，因此普遍被應用於多種疾病的治療，如今進一步透過細胞、動物或人體介入等實驗，更證實了大蒜和其多種硫化物具有降膽固醇、降三酸甘油酯、降血栓、降血糖、降血壓的功效，大蒜保健產品也因此成為保健市場上的熱門產品，然而食用大蒜時是否干擾臨床處方藥的藥效卻仍未釐清，因此，本研究將以大鼠為模式，先予以大蒜精油處理不等時間(五天或四週)，再給予降血脂藥物 atorvastatin，藉由分析(1)大鼠肝臟和小腸藥物代謝酵素暨膜轉運蛋白活性或蛋白質及 mRNA 表現；(2)血漿中 atorvastatin 藥物動力學參數，了解大蒜是否影響或干擾 atorvastatin 的代謝，預期實驗結果將有助於提升消費者食用大蒜保健食品的安全性。

第二章、文獻探討

一、大蒜(Garlic)之簡介

大蒜(Garlic, *Allium sativum*)，屬蔥科(Alliaceae)，為一年生鱗莖草本植物，屬淺根性作物，無主根，發根部位發生在短縮莖週圍。大蒜因具有的獨特風味及成份，為烹調時不可或缺的辛香料，在中東與遠東地區的栽培史，至少有五千年，而在古老之中國、埃及和印度更將大蒜視為高級食品，2008 年大蒜製品仍為全世界最盛行的食品補充品(Irene Lelekis, 2008)。

幾千年來世界各地不但將大蒜當作香料使用，也普遍運用在醫學用途上，李時珍《本草綱目》上記載大蒜性溫味辛，用以治療疑難雜症。近年來，探討大蒜生理特性的文章並不少見，其中較廣泛被研究是其在心血管及其他代謝疾病的預防與治療，例如血管新生作用(atherosclerosis)、高血脂症、血栓、高血壓和糖尿病等(Asdaq and Inamdar, 2009)，亦有文獻指出大蒜具有抑菌(antimicrobial)、抗腫瘤(anticancer)、抗發炎(antiinflammation)、抗氧化 (antioxidation)和刺激免疫反應(immunomodulation)等功效。

在臺灣，大蒜是雲嘉南地區重要的經濟作物，又以雲林縣產量最多，佔總產量 80%以上，大片黑為主要栽植品種，是臺灣品質最佳的蒜頭品種(沈立言, 2004)。

大蒜的營養成分：水份 62~68%、醣類 26~30%、蛋白質 1.5~2.1%、脂質 0.1~0.2%、膳食纖維 1.5%等，詳細含量見表一；根據台灣行政院農業委員會的報告指出，台灣自產大蒜約有 10-20 個蒜瓣其營養成分為：水份 66.2 公克、蛋白質 7.0 公克、脂質 0.3 公克、醣類 24.9 公克、膳食纖維 1.1 公克等(許苑培, 2009)。除此之外，大蒜亦含多種特殊的有機硫化物(organosulfur compounds, OSCs)，含量約 1.1~3.5%，這些含硫化合物不但是大蒜特殊氣味的來源，也被認為與大蒜調節生理機能之功效有關。

大蒜具有獨特風味，這與大蒜中的 allicin (蒜素)與其下游多種油溶性含硫化合

物有關。新鮮大蒜主要的含硫化合物為 alliin(S-allyl-L-cysteine sulfoxide)和少量的 S-methyl cysteine sulfoxide, S-propyl cysteine sulfoxide。Alliin 主要存在完整未被破壞的大蒜中，無色無味，一但經過切碎或壓榨後，釋放出酵素 alliinase 會將 alliin 轉變成具特殊氣味的 allicin。Allicin 並不穩定，會迅速分解、重組，轉化為眾多的下游含硫化合物，比如 DAS (diallyl sulfide)、DADS (diallyl disulfide)、DATS (diallyl trisulfide)、ajoene 等揮發性的產物。

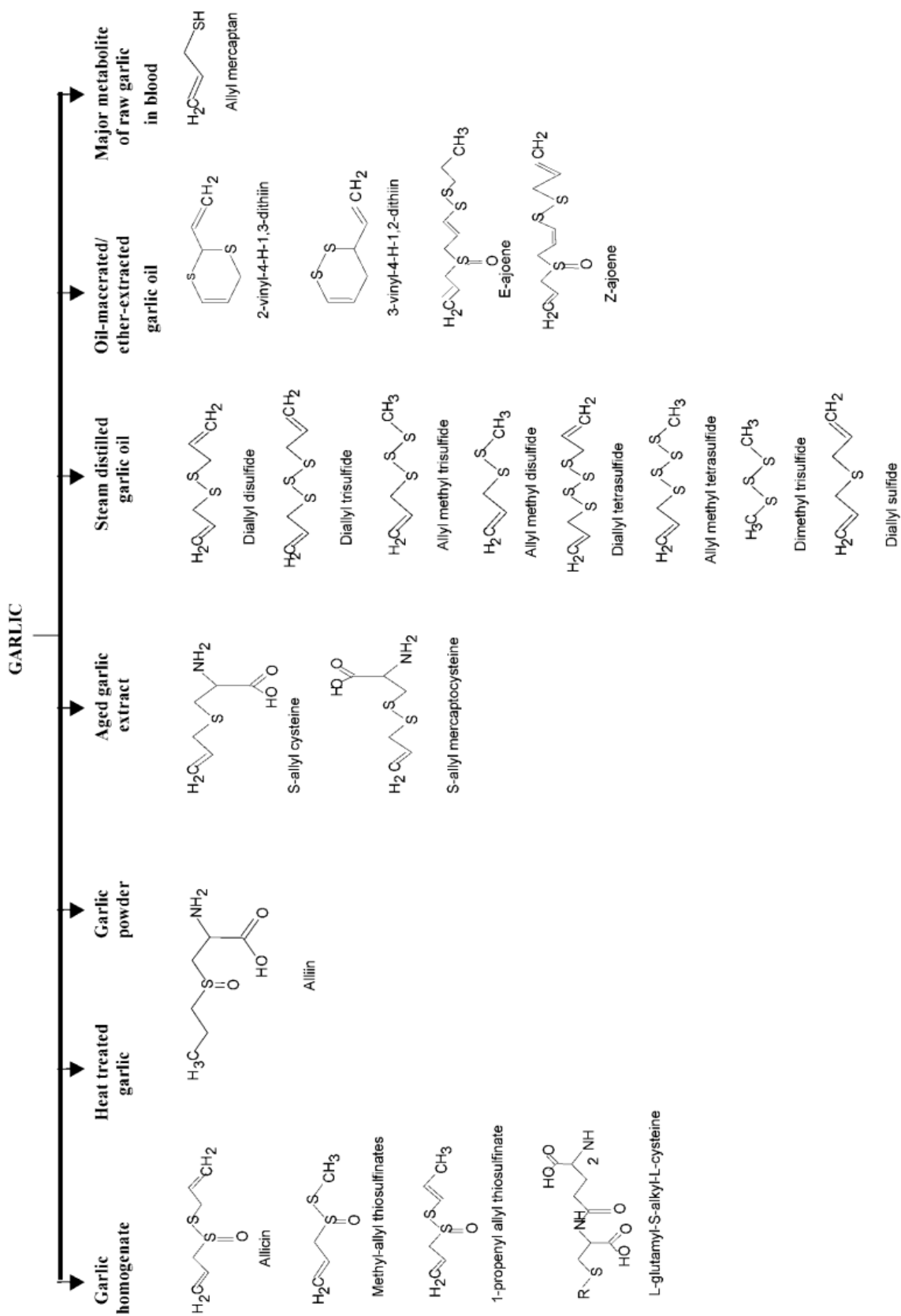
在不同的加工處理方式下，其大蒜產品的含硫化合物組成也有極大不同(圖一)，例如利用水蒸氣蒸餾加熱法所得到的大蒜精油，其主要的含硫化合物成份為油溶性的 DAS、DADS、DATS 等，各佔總硫化物 4%、35~40%和 30~35%之多(Sheen et al., 1996)；另外將生大蒜切片、浸泡於 15~20%酒精中經 20 個月後製成後熟大蒜 (age garlic extract, AGE)，由於此方法會流失較多的 allicin，因此其主要的成份不同於大蒜精油所知的油溶性含硫化合物，而多為較具穩定性、生物可利用性以及抗氧化特性之 S-allylcysteine (SAC)、S-allylmercaptocysteine、allicin 等水溶性硫化物(Borek, 2001)。

DAS 和 DADS 已被證實具有調節藥物代謝酵素活性和基因轉錄作用的生理效應，因此可能具備改變生物體對藥物的代謝能力。目前已有研究指出同時服用大蒜補充劑與抑制愛滋病毒生長的 saquinavir 或 ritonavir 時(Piscitelli et al., 2002)，將影響 saquinavir 或 ritonavir 的藥物動力學(pharmacokinetics)。

表一、大蒜之一般成分及含硫化合物含量(Lawson, 1996)

General composition of garlic	Amount (fresh weight; %)
Component	
Water	62-68
Carbohydrates (mainly fructans)	26-30
Protein	1.5-2.1
Amino acids: common	1-1.5
Amino acid: cysteine sulphoxides	0.6-1.9
γ -Glutamylcysteines	0.5-1.6
Lipids	0.1-0.2
Fibers	1.5
Total sulfur compounds ^a	1.1-3.5
Sulphur	0.23-0.37
Nitrogen	0.6-1.3
Minerals	0.7
Vitamins	0.015
saponins	0.04-0.11
Total oil-soluble compounds	0.15 (whole)-0.7 (cut)
Total water-soluble compounds	97

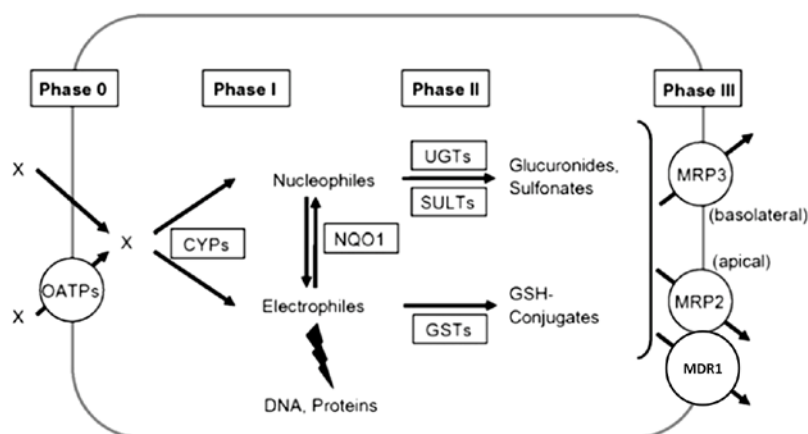
^a Excluding protein and inorganic sulphate (0.5%)



圖一、大蒜精油不同製備方式所存在含硫化合物成份(Banerjee et al., 2003)

二、生物轉換酵素系統(biotransformation enzyme system)

當脂溶性內生性物質(例如固醇類荷爾蒙、膽紅素)或外來物質(xenobiotics)例如藥物等，進入生物體內將藉由生物轉換酵素進行代謝，加速其排泄速率。生物轉換系統成員依功能可分為三大類：第一期作用(phase I reaction)主要透過分布於細胞平滑內質網上的 cytochrome P450 (CYP450)進行催化，對親脂性物化合物進行氧化(oxidation)、還原(reduction)以及水解(hydrolysis)作用，使其轉變為更具極性(親水性或親電子性)的代謝產物；第二期作用(phase II reaction)主要由分布於細胞質中(少數則分部於內質網上)的多種結合酵素負責，例如 glutathione S-transferases (GSTs)、sulfotransferases (SULTs)、NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO-1)以及 UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) (主要位於內質網)，透過與胞內水溶性小分子的結合作用(conjugation)，增加產物的水溶性，因而促進其排除；最後再藉由藉由第三期作用(phase III reaction)，成員屬細胞膜上的多種膜運送蛋白(membrane transporters)，例如 P-glycoprotein 和其它 multidrug-resistance-associated proteins (MRPs)等，負責將經 phase I 和 II 酵素作用後生成的產物由胞內送至胞外(Bock, 2003)。在哺乳動物中，肝臟為最大的代謝器官，其他如腎臟、肺臟、小腸等也具有藥物代謝酵素。



圖二、細胞內或外來物質之生物轉換系統 modified from (Bock, 2003)

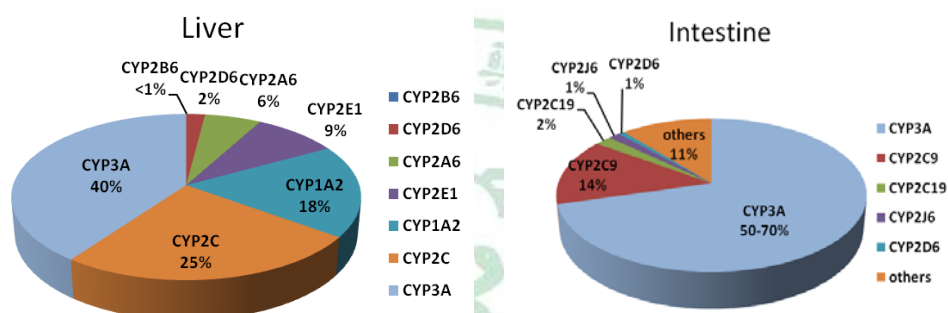
(二)第一期藥物代謝作用(Phase I drug metabolism)

許多藥理活性分子在正常生理酸鹼值下，為脂溶性或非離子性。phase I 酵素系統中包含多種代謝酵素，其中以細胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 最為重要，屬單氧化酶(monoxygenase)，主要分布於細胞內平滑內質網上。進行催化反應時，同時需要 NADPH-CYP reductase 及細胞膜上磷脂質(phospholipids)的共同參與，電子主要透過 NADPH-CYP reductase 將 NADPH 轉移到 CYP 上，並藉由 cytochrome b5 reductase 將 NADH 轉移至 cytochrome b5 以增強代謝活性(Sole and Livingstone, 2005)。CYPs 由許多同功異構酵素(isozymes)所組成，已知人類至少表現有 59 種 isozymes，大鼠體內至少也有 47 種。主要負責代謝內生性(endogenous)與外源性(exogenous)之化合物，以基因同質性(homology)區分，CYP 酵素基因可分屬不同家族(family)，以 1、2、3、4 表示之，每一家族另包含多個次家族(subfamily)，分別以 A、B、C、D 等表示。依其代謝受質之屬性，人類之 CYP 可分為三大類：(1) CYP 5-51 家族主要代謝內生性物質，通常對受質(substrates)具高度親和性且在代謝過程中較容易取得平衡；(2) CYP 1-3 家族對受質有較低的親和性且代謝過程中不易平衡，此外亦具有許多重要的基因多形性(genetic polymorphisms)；(3) CYP 4 家族主要代謝脂肪酸、外來物質及其相關代謝受質(Ingelman-Sundberg, 2004)。目前已知，臨床常見藥物中有 70~80% 種類可被 CYP 1-3 家族所代謝(Bertz and Granneman, 1997; Evans and Relling, 1999)，其胞內分佈位置整理如表二所示。

大部分的 CYPs 存在肝臟中，亦存在小腸黏膜、肺、腎、腦、鼻黏膜和皮膚等組織。肝臟中 CYP 家族含量多寡依次為 CYP3A > CYP2C > CYP1A2 > CYP2E。Lin (2001) 指出小腸黏膜則是肝外組織中最重要藥物代謝轉換的部位，與肝臟一樣小腸中含量最多的也是 CYP3A，約佔 50~70% (Paine et al., 1997; Watkins et al., 1987)。肝臟與小腸中 CYPs 主要分布比例如圖三所示(Shimada et al., 1994)。至於大鼠體內 CYPs 分布情形，也與人類相似(Guengerich, 2004)。

表二、Cytochrome P450 家族的基本特性(Ingelman-Sundberg, 2004)

酵素	代表性受質反應	Probe drugs	主要存在位置
CYP1A2	Ethoxyresorufin O-deethylation	Acetaminphen、Caffeine	肝臟
CYP2C9	Diclofenac 4-hydroxylation	Diclofenac、Tobutamide	肝臟
CYP2D6	Dextromrthorphan O-deethylation	Detromethorphan、Debrisoquine	肝臟
CYP2E1	Chlorzoxazone 6-hydroxylation	Clorzoxazone、Enflurane	肝臟
CYP3A4	Testosterone 6-hydroxylation, Midazolam 1'-hydroxylation	Erythromycin、Midazolam、 Testosterone	肝臟、腸



圖三、人類肝臟與小腸中 CYPs 之平均分佈比例 modified from (Paine et al., 2006; Shimada et al., 1994)

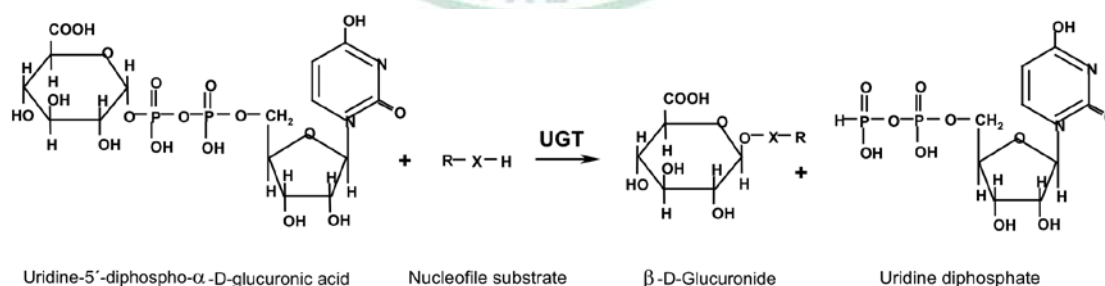
(三)第二期解毒作用(Phase II detoxification)

由多種負責催化結合反應(conjugation)的酵素所組成，主要催化的反應有 glucuronidation、sulfation、methylation、acetylation、glutathionation 以及 amino acid conjugation 等。Phase II 酵素大部分為轉移酶(transferases)，比如 glutathione (GSH) S-transferases (GSTs)、sulfotransferases (SULTs)、UDP-glucuronosyltransferases (UGTs)、amino acid conjugases 等，另外，N-Acetyltransferases (NATs) 和 NAD (P) H:quinone oxidoreductase (NQO)也是 Phase II 酵素成員。Phase II 轉移酶可直接催化外來物質或間接代謝 phase I 的代謝產物與胞內具高水溶性之 GSH、sulfate、glucuronic acid、taurine 和 glycine 等分子結合，生成更具親水性之產物而有利於藉

由尿液或膽汁排出體外(Rushmore and Kong, 2002)。

1. UDP-glucuronosyltransferases (UGTs ; EC 2.4.1.17)

UGTs 主要存在細胞的內質網(endoplasmic reticulum)與核膜上(Mackenzie et al., 1997), 催化受質與 glucuronic acid 結合後, 將使得脂溶性化合物的親水性大為增加, 因此有利於由膽汁與尿液排出體外, 參與許多藥物、植化素和內生性物質例如膽紅素、甲狀腺荷爾蒙及固醇性荷爾蒙的代謝。人體內, 將近 40~70% 臨床用藥可透過 UGTs 行醯醛酸作用。哺乳動物的 UGTs 超過 117 種, 在人類中, 依其基因同源性可分為 UGT1、UGT2, 可分為兩個 subfamily A、B 以及 UGT3 與 UGT8 四個家族。大部分的 UGTs 存在肝臟中(Congiu et al., 2002), 其它如 UGT1A7、1A8 和 1A10 並不存在肝臟中, 主要分布於腸胃道中(Mojarrabi and Mackenzie, 1998; Tukey and Strassburg, 2001)。不同 UGT 酵素的受質親合力也不儘相同, 比如膽紅素為 UGT1A1 的專一受質(Tukey and Strassburg, 2001), 因此降低 UGT1A1 的表現時將增加體內膽紅素的濃度, 造成膽黃症及腦損傷(Meech and Mackenzie, 1997)。UGT 利用 uridine-5'-diphospho- α -D-glucuronic acid (UDPGA) 作為 glucuronic acid 的提供者, 將之結合在內生性與外源性受質上(Jancova et al., 2010) (圖四)。

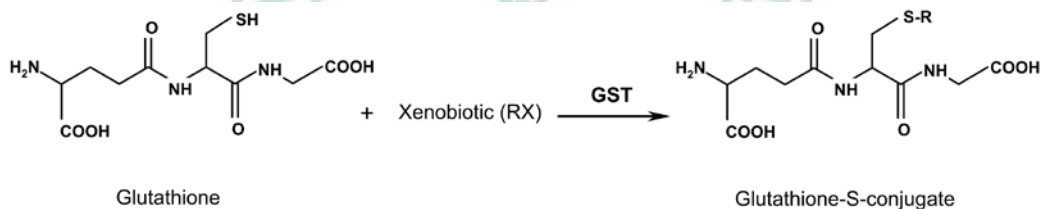


圖四、UDPGA 與親和性受質透過 UGT 代謝(Jancova et al., 2010)

2. Glutathione S-transferases (GSTs ; EC 2.5.1.18)

GSTs 是 phase II 反應中重要的酵素之一，為複合型酵素家族(mutienzyme family)，多數 isozymes 存在細胞質(cytosol)中，僅少部分則存在微粒體(microsome)中。哺乳動物之 GST 可分為八大類，分別是存在細胞質的 α 、 μ 、 σ 、 π 、 τ 、 ζ 和微粒體中的 κ form (Hayes et al., 2005; Pool-Zobel et al., 2005; van Iersel et al., 1999)；廣泛分布於各組織中。

GSTs 藉由催化 GSH 與外來物質或致癌物結合，GSTs 受質包括親核性芳香物質 (nucleophilic aromatic substitutions)、氫過氧化物以及疏水性和親電子性的化合物等，所以胞內如有過多這些化合物發生 GSH 結合反應時，將使得胞內 GSH 含量減少，此時 GSH 如未能及時補充，將增加氧化傷害的機會(圖五) (Jancova et al., 2010)。GSTs 除行解毒反應外，同時也具有過氧化酵素活性(selenium-independent GSH peroxidase)，可將有機過氧化物(organic hydroperoxides)還原為醇類(alcohols)，因此 GSTs 除參與解毒反應外，同時也是抗氧化酵素之一。



圖五、GST 催化的結合反應(Jancova et al., 2010)

由於 GST 的特性，它有廣泛的受質選擇性，比如 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)即是其中之一，而 CDNB 也常作為測量 GST 酵素活性的受質。Manson 等人證實十字花科蔬菜的萃取物與葡萄柚萃取物具有誘發 GST 的現象，被當作 GST 的 inducer (Manson et al., 1997)。

(四)第三期膜轉運作用(Phase III membrane transportation)

轉運蛋白主要的角色是降低內生性物質及外來物質的吸收或增加排除，所以藥物轉運蛋白(drug transporter proteins)的角色於許多醫學領域中受到不少注意，尤其是藥理學(pharmacology)和腫瘤學(oncology)，其調節作用無論在藥物之動力學性質(吸收、分布以及排除)和細胞抗藥性之發展上皆為重要。膜轉運蛋白主要分為三大類：ATP-binding cassette transporters (ABC)、multidrug resistance-associated protein (MRP)和 organic anion transporting polypeptide (OATP)，目前已有 400 種獨立的轉運蛋白質被發現，且遍布身體各部位。近幾年雖對這些轉運蛋白在體內的遺傳變異雖有不少研究，但對它們在藥物的轉運作用機轉上，仍有相當多的地方有待釐清 (Franke et al., 2010)。

1. ATP-binding cassette transporters (ABC)

ABC transporters 家族約有 48 種基因，最廣為研究的是 ABCB1 和 ABCG2 兩者，與跨膜蛋白結合，水解 ATP 產生能量，驅動許多分子穿透細胞膜(Franke et al., 2010)。ABC 轉運蛋白被認為具有高度的受質依賴性(substrate-dependent)，在解毒和防禦抵抗外來物質上扮演著重要的角色(Lin and Yamazaki, 2003)，已知 ABC transporter 基因剔除的 *mdr1a/1b* (-/-) 小鼠，將有血腦障壁功能改變(Schinkel et al., 1997; Schinkel et al., 1994)，小腸之藥物吸收受到影響(Jonker et al., 2002; Sparreboom et al., 1997)，胎兒的藥物暴露(Smit et al., 1999)及藥物對輸精管的損傷(Wijnholds et al., 2000)增加等現象。

ABCB1 是第一個被分離鑑定出來的膜轉運蛋白，又稱為 MDR1 (multi-drug resistant)或 P-gp (p-glycoprotein) (Gottesman and Pastan, 1993)。已知 ABCB1 表現在許多正常的組織中，主要目的是將有毒物質從細胞內排出，避免殘留在胞內，造成傷害。ABCB1 在血腦障壁中高度表現，所以有助於排出腦部的有毒化合物，減少這

些化合物在腦內的濃度(van Tellingen, 2001)。除此之外，ABCB1 也存在於許多具分泌功能的細胞(excretory cells)中，例如腎小管上皮細胞、肝細胞、小腸上皮細胞，以小腸上皮細胞為例，ABCB1 即主要表現在上皮細胞的頂面(apical surface)，已有研究指出 ABCB1 表現的多寡與功能正常與否將影響下消化道(迴腸、空腸和結腸)對藥物的吸收及口服藥物的生物可利用率(bioavailability)。

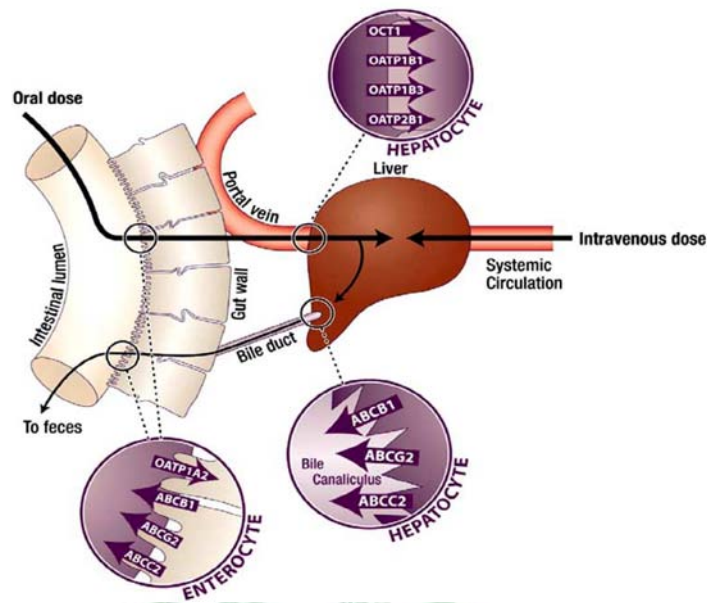
2. Multidrug resistance-associated protein (MRP)

MRP 共有 MRP1 (ABCC1)、MRP2 (ABCC2)、MRP3 (ABCC3)等共 9 個家族，MRP1 和 MRP3 位於肝細胞小管(canalicular)的基底膜上，負責將代謝後的藥物運送至血液中，透過尿液排除；MRP2 則位於肝細胞膜表面，負責將藥物運送至膽汁中(Xu et al., 2005)。

3. Organic anion transporting polypeptides (OATP)

OATP 家族包含至少 300 種以上蛋白質，分成 47 個家族(Hediger et al., 2004)，此膜蛋白利用被動運輸和離子交換方式協助運送、穿透細胞膜。OATP 調節廣泛的兩性有機化合物(amphipathic organic compounds)，並以 sodium-和 ATP-independent 方式運送多種內生性與外源性化合物，包括結合與未結合的膽紅素、類固醇結合物、陰離子 oligopeptides、二價陽離子、甲狀腺素(T3、T4)、膽鹽、外來物質以及藥物等(Hagenbuch and Meier, 2003; Reichel et al., 1999)。

OATP1B1 主要表現在肝細胞的基底膜上，可將血液中的藥物吃入(uptake)肝細胞內(Abe et al., 1999)，進入細胞後，再由 Phase I 及 Phase II 藥物代謝酵素接手作用(圖六)。



圖六、ABC 和 OATP 對口服與靜脈注射藥物的作用(Franke et al., 2010)

(五)大蒜與藥物交互作用

近年來，已有不少研究指出大蒜或大蒜硫化物可改變生物體內多種藥物代謝酶的活性及基因轉錄作用，此外深入了解保健食品消費市場後，可發現慢性病患者或高齡者常是購買這些食品補充劑最大之族群，由於慢性病患者或高齡者同時也是慢性處方藥物高度使用者，因此保健食品和藥物共同服用後，如果引起 herb-drug interaction，將是使得藥效減弱或是使得藥物累積於體內產生毒性之重要關鍵。

Gurley 等人即證實大蒜精油會影響人類的藥物代謝酶 CYP2E1 活性，他們給予受測者大蒜精油每天 1500 mg，為期 28 天，結果發現大蒜精油可顯著抑制了血液中 6-hydroxychlorzoxazone/chlorzoxazone 的比值，指出大蒜精油可抑制 CYP2E1 的酶活性(Gurley et al., 2002, 2005)。在另一有九位自願者參與的實驗中，每人每日服用 1200 mg 大蒜萃取物，分三次給予，持續 21 天，結果發現大蒜萃取物將降低血漿中蛋白質酶抑制劑—saquinavir 曲線下面積(area under the curve, AUC)，同時也使得血漿最大濃度(C_{max})減少 51~54%(Piscitelli et al., 2002)。Saquinavir 已知是 CYP3A4 和

P-GP 的受質，而 CYP3A4 與 P-GP 的活性會被大蒜萃取物所誘發(Plosker and Scott, 2003)。然而 Markowitz 等人卻證實每天投與大蒜萃取物 1800 mg，14 天後並不會改變 dextromethorphan (CYP2D6)和 alprazolam (3A4)之血漿藥物濃度(Markowitz et al., 2003)。近年來針對大蒜和藥物交互作用的研究報告整理如下表(表三)：

表三、大蒜與藥物之交互作用

Preparation	Dose	Model	Effects	Reference
Garlic extract	1200 mg/day for 21 days	9 health adults	↓ saquinavir 51% AUC ↓ C _{max} 54%	(Piscitelli et al., 2002)
Garlic extract	1800 mg /day (600 µg allicin /600 mg tablet)	14 healthy volunteers	Did not significantly affect the activity of CYP2D6 or CYP3A4	(Markowitz et al., 2003)
Garlic oil	1500 mg /day for 28 days	12 elderly adults	↓ 6-hydroxy-chlorzoxazone/chlorzoxazone serum ratios ↓ CYP2E1 activity	(Gurley et al., 2005)
Garlic extract	600mg /day (3.6 mg allicin / tablet), for 17 days	10 Patients (adenocarcinoma of the breast)	No changes on pharmacokinetics of docetaxel	(Cox et al., 2006)
Garlic extract	2000 mg /day (3.71 mg allicin / tablte), for 2 weeks	12 health males	No changes on pharmacokinetics of warfarin	(Mohammed Abdul et al., 2008)
Garlic extract	600 mg taplets (含 12 mg γ-glutamylcysteine 及 4.8 mg alliin), for 21 days	10 health males	↑ p-glycoprotein Independent of CYP 3A4 ↓ saquinavir bioavailability	(Hajda et al., 2010)
Garlic homogenate	125, 250, 500 mg/kg for 30 days	8 Wistar Albino rats	↑ bioavalibility ↑ half-life of hydrochlorthiazide ↓ clearance rate	(Asdaq and Inamdar, 2009)

(六)食用大蒜之副作用及安全性評估

雖然大部分的人服用大蒜似乎是安全的，然而也有報告發現有些人在食用大蒜後，可能會有呼吸困難、口腔或胃灼熱、心灼熱、產氣、噁心、嘔吐和腹瀉等副作用，亦有研究指出在術後服用可能增加出血的機率，大蒜也不適合塗抹在皮膚上，可能造成皮膚灼傷(Ackermann et al., 2001)。

許多研究已證實大蒜可能對部分藥物在體內的作用產生影響，因此改變了這些藥物的藥效，可能藥物包括 acetaminophen (Zhao and Shichi, 1998)、chlorzoxazone (Gurley et al., 2002)、抗癌藥物(paclitaxel) (Cox et al., 2006)、降血壓藥(losartatin)、降血糖藥(glucocorticoids)與抗凝血藥物(aspirin, diclofenac, heparin, warfarin)等 (MedlinePlus®-U.S. National Library of medicine)。亦有實驗證實，如大蒜與其它也具有抗凝血功能的保健食品(如魚油或銀杏、薑與丹蔘等中草藥) 同時服用的話，可能延緩血液凝集，因而增加出血的風險(Evans, 2000) (MedlinePlus®-U.S. National Library of medicine)。

三、生物體之抗氧化防禦系統(antioxidant defense system)

生物體進行氧化作用等代謝時，比如粒線體中氧化磷酸化作用、免疫作用、CYP藥物代謝，常伴隨自由基與活性氧物質(reactive oxygen species)的產生，如超氧陰離子(superoxide anion radical, $O_2^{\cdot-}$)、過氧化氫(hydrogen peroxide, H_2O_2)、氫氧自由基(hydroxyl radicals, $\cdot OH$)及過氧化自由基(peroxyl radical)等，除了來自前述內生性反應外，也有部分活性氧來自外在因子，比如離子輻射、紫外線照射、抽菸、空氣汙染、重金屬、氧化物、藥物等。當胞內或體內製造出過多自由基與活性分子時，它們會和體內許多重要分子如核酸、蛋白質或生物膜上之多元性不飽和脂肪酸發生反應，產生氧化壓力(oxidative stress)，引起生物體氧化性傷害；為抵禦氧化傷害，生物體因此演化出一套抗氧化防禦系統，達到自我保護的效果。依抗氧化的作用性

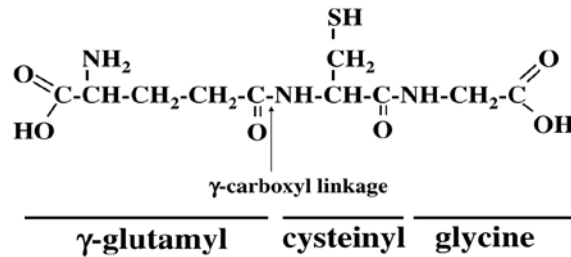
質，此系統可概分為兩類，一類為由非酵素分子組成的抗氧化系統(non-enzymatic antioxidant defense)，主要成員包括脂溶性的維生素 E、類胡蘿蔔素與水溶性的維生素 C、麩胱甘肽(glutathione, GSH)等；另一類則是由多種抗氧化酵素所組成的酵素系統(enzymatic antioxidant defenses)，酵素成員有超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、觸酶(catalase, CAT)、麩胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase, GPx)與血基質氧化酶(heme-oxygenase, HO)等；第三類則是輔助系統，參與成員有麩胱甘肽還原酶(glutathione reductase, GRd)、葡萄糖-6-磷酸去氫酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, GAPDH)和運鐵蛋白(transferrin)等，這些成員分別有各自的生化功能，並未直接與活性分子反應，但是它們卻可透過間接方式，協助抗氧化分子或抗氧化酵素的作用，協同抵抗活性氧分子的生成(Berlett and Stadtman, 1997)。

1. 麩胱甘肽(glutathione, GSH)

麩胱甘肽(glutathione, GSH)為胞內重要三肽分子，由麩氨酸(glutamate)、半胱氨酸(cysteine)及甘氨酸(glycine)三個氨基酸所組成(圖七)，分子量為 307.33 Da，是一廣泛分布於生物體內的天然抗氧化物質，通常以還原態(glutathione, GSH)及氧化態(glutathione disulfide, GSSG)二種型式存在，正常狀態下，還原態 GSH 含量遠高於氧化態，一般細胞中，超過 90% 的 GSH 是以還原態型式存在。哺乳動物細胞內的 GSH 濃度約 1~10 mM 間，以肝臟為例，GSH 濃度可高達 10 mM (Knapen et al., 1999; Lu, 2009; Lu et al., 1999; Soltaninassab et al., 2000)。

證據顯示 GSH 在體內扮演著多種生理角色(Fang et al., 2002; Han et al., 1997a, b) 重要者有：(1)抗氧化作用：清除自由基與過氧化物(Griffith and Mulcahy, 1999; Pompella et al., 2003)；(2)參與外來異物(xenobiotics)的藥物代謝或解毒作用；(3)維持蛋白質分子中硫醇基之氧化與還原狀態間的平衡；(4)作為半胱氨酸的儲存及運送型式；(5)參與維生素 E 再生(Halliwell and Cross, 1994)；(6)參與蛋白質與 DNA 合成、

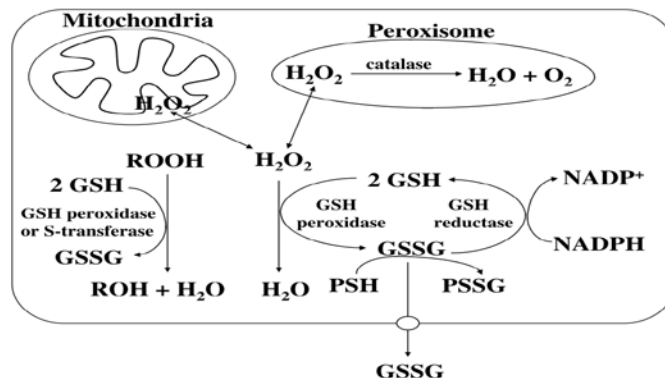
調節細胞生長與代謝；(7)增進免疫功能：刺激干擾素 IL-1 (interleukin)及 IL-2 產生 (Wu et al., 1994)等，其中又以它在抗氧化及藥物代謝上扮演的角色受到最多重視。



圖七、麩胱甘肽(Glutathione)之結構(Lu, 2009)

◆GSH 之抗氧化功能

GSH 的抗氧化作用主要與其 cysteine 側鏈的硫醇基有關，可提供電子給自由基，終止自由基的連鎖反應；GSH 除了直接與活性氧反應外，亦可透過 GSH peroxidase (GPx)的作用，參與胞內過氧化物的還原，因此 GSH 在還原體內過氧化氫與消除自由基中扮演重要角色。在這些反應中，GSH 將形成氧化態的 GSSG，此時 GSSG 在 NADPH 的存在下，可經由 GSH reductase (GRd)的作用，還原為 GSH，提供細胞後續再利用，同時維持胞內還原態和氧化態 GSH 含量的平衡(圖八)。這也解釋胞內 GSH/GSSG 比值的變化所以被視為抗氧化和氧化壓力間平衡的指標的原因(Knapen et al., 1999; Pompella et al., 2003)。

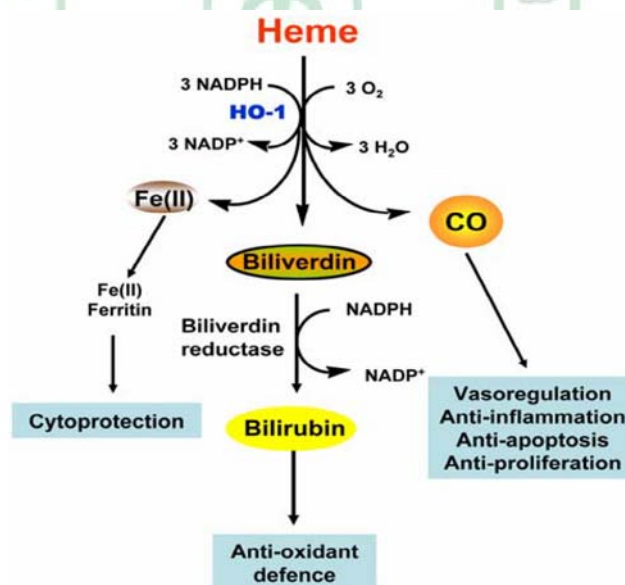


圖八、GSH 之抗氧化功能(Lu, 2009)

2. 血基質氧化酶(Hemeoxygenase, HO; EC 1.14.99.3)

目前已知有三種血基質氧化酶，分別為第一型血基質氧化酶(HO-1)，分子量約 32 kDa，第二型血基質氧化酶(HO-2)，分子量約 34 kDa，以及第三型血基質氧化酶(HO-3)，分子量約 33 kDa。三者可能源自同一基因，所以分子量相近，事實上，HO-1 及 HO-2 二者同源性(homology)約 40%，然而 HO-2 與 HO-3 的同源性則高達 90%。HO-1 屬於誘導表現(inducible)的酵素，多存在於脾臟、肝臟及睪丸組織中(Siow et al., 1999)；HO-2 和 HO-3 則是持續表現(constitutive expression)在腦、神經系統以及心血管組織等各組織細胞中，而且表現量相當高。

由於 HO-1 的可誘發性質，因此被視為是細胞在氧化壓力誘發下重要的抗氧化酵素蛋白質之一。HO-1 負責催化血基質(heme)之分解，產生等莫耳數的膽綠素(biliverdin)、鐵離子(Fe^{+2})以及一氧化碳(carbon monoxide, CO) (圖九) (Farombi and Surh, 2006)。



圖九、HO-1 之作用及其代謝產物(Farombi and Surh, 2006)

許多研究指出，HO-1 受到許多因子的誘發，例如低氧(hypoxia)、血基質(heme)、內毒素、發炎、紫外線、局部缺血(ischemia)、熱休克、重金屬(鎘、砷)等(Clark et al.,

2000; Gruber et al., 2010; Minamino et al., 2001))，也有文獻指出，多種天然植化物 (phytochemicals)，如 resveratrol、curcumin、quercetin 等，亦可透過調控 HO-1 表現，因應胞內氧化壓力(Farghali et al., 2009)。上述證據可知，當組織或細胞處於氧化壓力或損傷等壓力情況時，均會誘導 HO-1 的大量表現，達到保護細胞的目的，因此 HO-1 也被稱為誘導性壓力蛋白(inducible stress protein)。

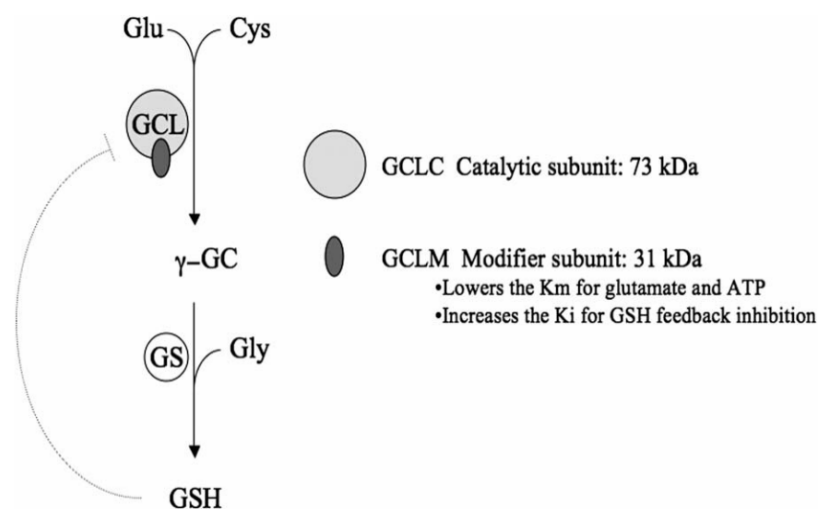
HO-1 具調節多種生理機能的特性，除了藉由本身酵素活性及其反應產物降低細胞氧化壓力的強抗氧化能力外，另外還有(1)抗發炎：可透過降低內皮細胞之黏附因子與趨化因子的表現，直接或間接抑制發炎反應(Chao et al., 2011; Minamino et al., 2001; Vachharajani et al., 2000)；(2)抗細胞凋亡：在 TNF- α 誘發小鼠初代肝細胞損傷模式下，上調 HO-1 表現有助於抑制細胞凋亡(Zuckerbraun et al., 2003)；(3)保護心血管(Idriss et al., 2008)；(4)避免移植的排斥現象：增加 HO-1 活性可防止心血管受到局部缺氧/再灌流(ischemia/reperfusion)的傷害(Yet et al., 2001)。

3. 麩氨酸-半胱氨酸接合酶(glutamate-cysteine ligase, GCL; EC 6.3.2.2)

GCL 又稱 γ - glutamylcysteine synthase (GCS)，為 GSH 生合成之第一反應步驟，也是 GSH 生合成的速率限制酵素(rate-limiting enzyme)。GCL 主要作用為催化 glutamate 上的 γ -羧基(carboxyl group)經由 ATP 的活化，形成醯基磷酸(acyl phosphate)中間產物，再與 cysteine 上 α -胺基形成 γ -glutamylcysteine； γ -Glutamylcysteine 形成後，再藉由 GS 催化與 glycine 結合，即可完成三肽 GSH 的生成。由於 GCL 是決定胞內 GSH 含量多寡的主要酵素，因此在調控體內氧化還原平衡中，扮演著重要角色，所以在多種抗氧化酵素基因中，GCL 基因表現的調節機轉也受到不少的注意。

在低等生物體中，GCL 為單一基因產物；但在多數真核生物體中，GCL 為異質二聚體(heterodimer)，由兩個獨立的蛋白質所構成，一為麩氨酸-半胱氨酸接合酶

催化次單元(glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC)，分子量約 73 kDa，另一則是負責調節 GCLC 活性的麩氨酸-半胱氨酸接合酶調節次單元 (glutamate-cysteine ligase modifier subunit, GCLM) 分子量約為 31 kDa，兩者共同合作形成具催化效率之 GCL (圖十) (Dalton et al., 2000; Franklin et al., 2009; Seelig et al., 1984)



圖十、麩氨酸-半胱氨酸接合酶與 GSH 生合成(Franklin et al., 2009)

GCLC 具有活化 ATP，催化 cysteine 上 α -胺基與 glutamate 上的 γ -羧基形成 γ -glutamylcysteine 之位點。GCLM 本身並不具酵素活性，但可與 GCLC 交互作用，所以在調控 GCL 活性上有著重要的角色。一般情況下，雖 GCLC 的活性受到 GCLM 的調節，但當 GCLC 大量表現時，亦可直接擔負 GCL 活性，單獨催化 γ -glutamylcysteine 的生成，當然和 GCLC/GCLM 形成的異質二聚體相較，單獨 GCLC 的催化活性遠較異質二聚體低(Chen et al., 2005; Seelig et al., 1984)。

四、 Atorvastatin 之簡介

Atorvastatin 是目前市面上常見六種 statins 中的一種，其他則有 fluvastatin、lovastatin、pravastatin、rosuvastatin、simvastatin (蔡慧珊, 2004)。

3-Hydroxy-3-methylglutaryl:coenzyme-A (HMG-CoA) reductase 是催化 HMG-CoA 轉變成 mevalonate 的速率限制酵素，抑制此一酵素將可減少膽固醇合成，使得血膽固醇濃度降低。由於 Statins 在抑制 HMG-CoA reductase 活性上表現出良好的效果，所以臨床上主要應用在降血膽固醇，可(1)抑制內生性膽固醇之合成、(2)降低低密度脂蛋白(LDL)、(3)降低 apolipoprotein B (Apo B)、(4)降低三酸甘油酯(triglycerides)、(5)增加高密度脂蛋白(HDL)，因此有助於減少心血管疾病發生的機會。但各種 statins 之間的效果、藥物動力學之特性、藥物交互作用仍有所差異(表四)。其中 atorvastatin 是目前世界上最廣泛使用的降血脂用藥，市售劑量為 10 mg~80 mg (IMS Health, MIDAS, 2010)。Atorvastatin 為親脂性藥物，在體內主要被 CYP 3A4 所代謝，代謝產物主要經由糞便排除(98%)，其餘則由尿液中排除。

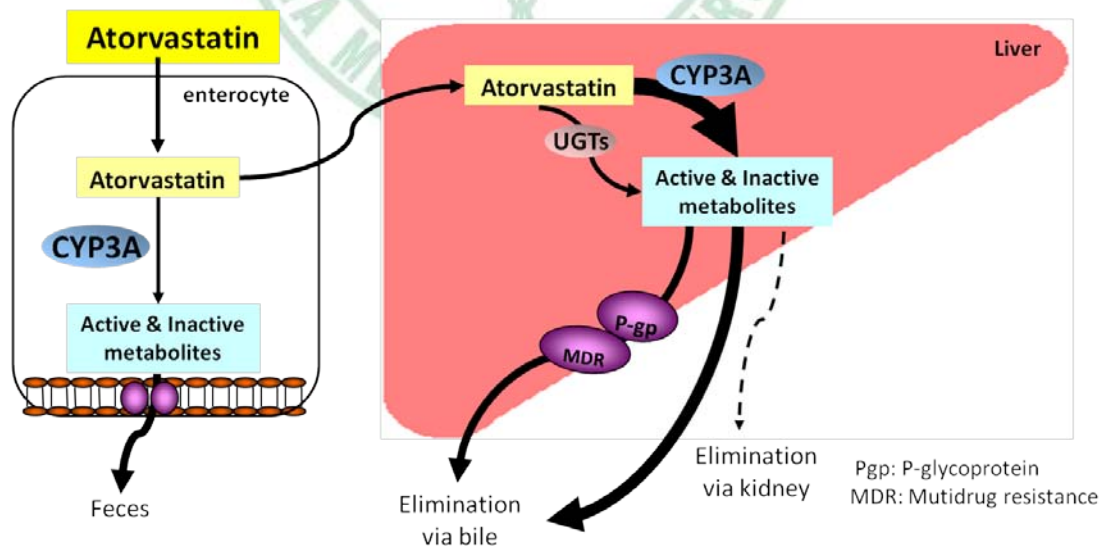
表四、Statins 類藥物之比較(Goard et al., 2010; 蔡慧珊, 2004)

特性 \ 藥物	atorvastatin	lovastatin	simvastatin	Rosuvastatin
生物可利用率%	15	<5	<5	20
蛋白結合率%	80-89	>95	94-89	88-90
血漿半衰期(hr)	14-30	3-4	2-5	19-21
親脂/親水性	親脂	親脂	親脂	親水
代謝	CYP 3A4	CYP 3A4	CYP 3A4	CYP 2C9
排除				
尿液	2 %	10 %	13 %	10 %
糞便	98 %	83 %	60 %	90 %

(一) Atorvastatin 之代謝路徑

經口攝入 atorvastatin 後，透過腸肝循環進行全身性代謝作用(圖十一)，第一個遇到的屏障為負責吸收的腸腔，在小腸上皮細胞中透過 CYP3A4 代謝，產物隨即在腸腔中即被 P-gp 等轉運蛋白送入腸腔中，未代謝的 atorvastatin 則藉血液循環進入肝臟中，此時的 atorvastatin 再藉由 CYP3A4 與 phase II 的 UGTs 的代謝，最後經由尿液或膽汁排出體外。Atorvastatin 在人體內被 CYP3A4 代謝後可生成具活性的 acid 產物 ortho- (2-OH)和 para- (4-OH) hydroxylated atorvastatic acid 及不具活性的 lactone 產物。

由於 atorvastatin 主要藉 CYP3A4、UGTs 以及 P-gp 所代謝，因此，如同時服用也由 CYP 3A4 所代謝的藥物時，例如azole 類抗黴菌藥物、巨環類抗生素、鈣離子阻抗劑(如 diltazem、verapamil)、cyclosporin 或葡萄柚汁(抑制 CYP 3A4 活性)時，均可能降低 atorvastatin 的代謝速率，因此增加藥物滯留時間，當然可能增加 atorvastatin 的副作用。



圖十一、Atorvastatin 之代謝路徑 modified from (Klein et al., 2001)

(二) Atorvastatin 之安全性評估

目前已超過 400 個臨床試驗對 atorvastatin 的能效與安全性進行評估，結果指出 atorvastatin 在劑量 80 mg/day 下是安全的，然而仍有少部分的人可能出現不良現象，如腹瀉、關節痛、鼻咽炎、噁心、嘔吐等副作用，也有些人在服用 80 mg/day 時，可能增加血漿中轉胺酶(AST、ALT)活性。除此之外，若再同時服用 CYP3A4 抑制劑(如 cyclosporine, protease inhibitors)、葉酸衍生物(如 gemfibrozil)或菸鹼酸(≥ 1 g/day)時，則可能發展成橫紋肌溶解(rhabdomyolysis)症，並伴隨急性腎衰竭或肌病變。所以如有上述現象時，應考慮調整服用 atorvastatin 劑量(Pfizer, Inc.)。

五、 調控藥物代謝酵素之訊息傳遞路徑

近年來有許多研究指出，大部分的 CYP 基因表現可透過 ligand-activated nuclear receptors (NRs)或轉錄因子(transcription factors)加以調節。目前已知有 49 種 NR subfamily，但仍有許多 NRs 的 ligand 仍不清楚，因此稱為 *orphan receptors*，或可能不存在的稱為 *true orphans*。核接受器的 ligand 在自然情況下通常為小的且是親脂性的分子，待其以擴散(diffuse)方式進入細胞。

目前較廣泛被研究的三種 *orphan* 核接受器次家族為 Constitutive androstane receptor (CAR, NR1I3)、Pregnane X receptor (PXR, 又稱 NR1I2)與 peroxisome proliferative activating receptors (PPARs, 有 α 、 δ 與 γ 三種形式)，分別調節肝臟中的 CYP2、CYP3 與 CYP4 家族基因的轉錄作用，一般實驗中常見的典型誘發劑(inducer)分別是 phenobarbital (CAR)、pregnenolone 16 α -carbonitrile 和 rifampicin (PXR)與 clofibric acid (PPAR) (Waxman, 1999)。此外，AhR 相較於 PXR 與 CAR，更具基因多型性(genetic polymorphism)。其他參與 CYP 基因調控的核接受器，還有調控 CYP7 的 liver X receptor (LXR)、調控膽酸生合成的 farnesoid X receptor (FXR)。這些接受器結合到 DNA 上前，還須先與另一核蛋白質結合為異質二聚體(heterodimer)，比如

AhR 與 ARNT、PXR 和 CAR 分別與 retinoid X receptor (RXR)，才能調控藥物代謝酶基因轉錄。刺激上述之核接受活化的內生性 ligands 以及各自的 DNA response element 如表六所示，此外，外來物質或內生性物質對核接受器與 CYP450s 之間的交互影響路徑如圖十二所示。

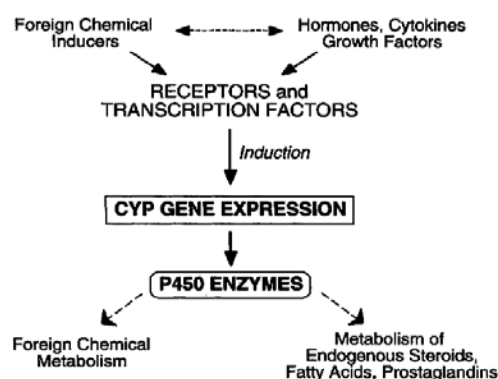
表五、調節 CYPs 的核接受器(Waxman, 1999)

P450 誘導物	影響大鼠肝臟的 CYPs	核接受器
Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)	1A1、1A2、1B1	AhR ^a
Phenobarbital	2B1、2B2	CAR
Dexamethasone	3A1、3A2、3A23	PXR
Fibrate drugs	4A1、4A2、4A3	PPAR α
Cholesterol	7A1	LXR α
Bile acid	7A1	FXR

^aBasic helix-loop-helix protein belonging to the Per-Arnt-Sim family of transcription factors.

表六、核接受器：內生性 ligands 與 DNA response element (Waxman, 1999)

Nuclear receptor	Endogenous ligands	AGGTCA-based DNA response element
CAR	Androstanol, androstenol	DR4 (direct repeat4 bp)
PXR	Pregnenolone, corticosterone	DR3, ER6 (everted repeat 6 bp)
PPAR α	Linoleic acid, arachidonic acid	DR1



圖十二、外來物質或內生性物質對核接受器與 CYP450s 之間的交互影響 (Waxman, 1999)

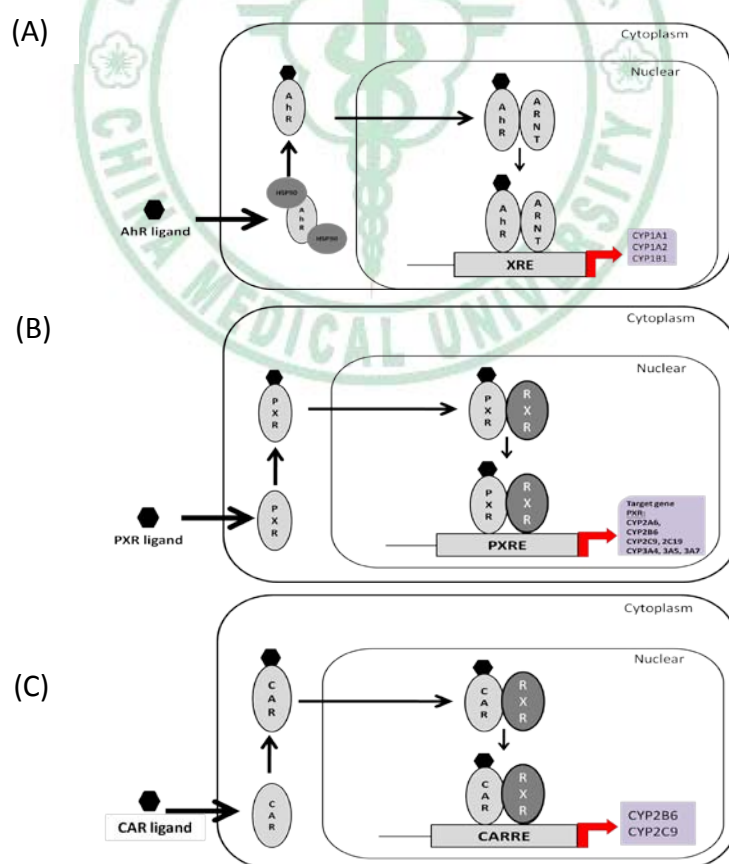
1. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)

AhR 為 basic helix-loop-helix (bHLH) 蛋白質，屬於 Per-Arnt-Sim 家族的轉錄因子(transcription factor)，除了負責誘發人類 CYP1A1、1A2 以及 1B1 的轉錄作用外(Quattrochi et al., 1994; Tang et al., 1996; Whitlock, 1999)，也會誘發許多其他的基因，例如 phase II 的藥物代謝酵素，比如：NQO-1、GST 與 UGT 等，(Schmidt and Bradfield, 1996)。當 AhR ligand 未與受質(ligand)結合稱之為 unligand AhR，可與 chaperon 蛋白，如 HSP90 (heat shock protein 90)等形成雙體(dimer)，這些蛋白可穩定 AhR 並做出正確的摺疊(folding)，因此留在細胞質中(Gu et al., 2000)，一旦 AhR 與其受質結合後，將與 chaperon 蛋白解離，並轉位進入細胞核中，再與 ARNT (AhR nuclear translocator)形成 heterodimer (Hoffman et al., 1991)，隨後與目標基因調控區(promoter)上的 XRE /DRE (xenobiotic response element/dioxin response element)上(圖十三 A)，因此活化 CYP 基因進行轉錄作用(Hankinson, 1994)。

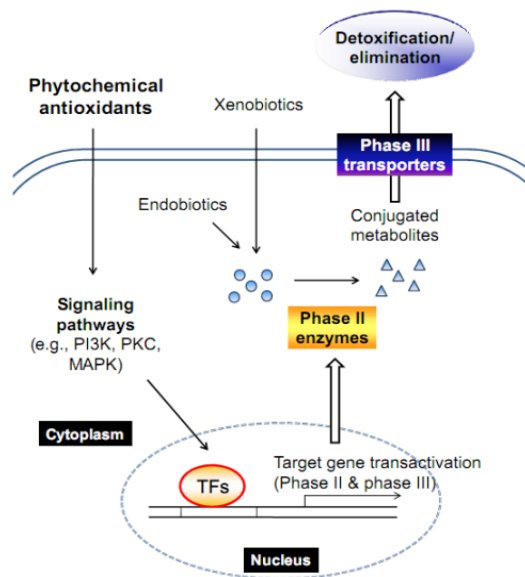
2. PXR

PXR 為 *orphan* receptors，負責調節 CYP3A4、3A7 與 2C9 等，但其中以 CYP3A4 為最重要的目標基因，主要表現在肝臟、小腸與結腸中(Bertilsson et al., 1998)。PXR 的 ligand 具有多樣性的，其中包括親和性較低的內生性物質與化學物質，例如：固醇類荷爾蒙和固醇類代謝物等以及食物來源的成份(coumestrol (香豆素)和類胡蘿蔔素等)(Pichard-Garcia L, 2000)；此外，PXR 也已知可被一些藥物所活化，例如 rifampicin、phenobarbital、RU486 等(Moore et al., 2000)。當活化的 PXR 和 RXR (retinoid X receptor)形成 heterodimer 後，將接合在 PXRRE (PXR response element) 上，因而上調 CYP 基因進行轉錄作用(Waxman, 1999)，其路徑如圖十三(B)所示。至於 CAR 主要以 CYP2B 為目標基因，當 CAR 與 ligand 結合後，活化的 CAR 會與 RXR 形成 heterodimer，隨之與 CARRE (CAR response element)結合(圖十三 C)。

除了 phase I 的 CYPs 調控外，Phase II 解毒酵素基因轉錄作用的調控機制也廣受研究，後來更發現 phase II 結合酵素與 phase III 膜轉運蛋白在活化轉錄因子間有著共同調節的關係(Yang et al., 2010)。綜合許多研究證實，植物化學物質可透過 phosphoinositide 3-kinase (PI3K)、protein kinase C (PKC) 以及 mitogen-activated protein kinases (MAPK) 等訊號路徑誘發 phase II 結合酵素與 phase III 轉運蛋白表現(Yang et al., 2010)，這些訊號進一步活化下游轉錄因子後，將上調 phase II 結合酵素與 phase III 轉運蛋白基因表現，參與的轉錄因子中較為熟知的有 NF-E2-related factor 2 (Nrf2)、CCAAT-enhancer binding protein- β (C/EBP β)、hepatic nuclear factor 1 (HNF1)、peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) 以及 nuclear receptors (比如 PXR、FXR) 等(Yang et al., 2010)，其路徑圖如圖十四所示。



圖十三、轉錄因子與核接受器調節 CYP 之路徑 Modified from (Hukkanen, 2000)



圖十四、參與 phase II 結合酵素與 phase III 轉運蛋白基因轉錄之訊號路徑
(Yang et al., 2010)

六、藥物動力學(pharmacokinetics)

藥物開發的過程中，找到具備良好藥物活性的候選藥物是最重要的，然而具有活性的藥物卻無法同時擁有適當的藥物動力學性質(例如吸收差、半衰期過短或過長等)，即可能無法成為發展為適用藥物的候選者。臨床試驗中藥物動力學試驗屬於藥理與毒理試驗中的一部份，目的在探討人體中對藥物的吸收(absorption)、分布(distribution)、代謝(metabolism)以及排除(elimination)等性質，以及藥物與其代謝產物在體內的濃度隨時間變化與毒性或藥效間的相關性。

藥物動力學模式可分為 compartmental 或 non-compartmental，但無論使用何種模式描述生理現象，都會有許多的限制，因此模式並非分析的必要條件，更重要的是藥物動力學參數的計算，所以藥物動力學分析應著重在精確的參數運算上。常見藥物動力學參數包括清除率(clearance)、分布體積(volume of distribution)、生物可利用性(bioavailability)、吸收速率常數(K_a)、排除常數(K)、半衰期(half-time)、藥物在

體內的平均滯留時間(mean retention time, MRT)、血中最高濃度與時間(C_{\max} , T_{\max})、血中濃度與曲線下面積(area under the curve, AUC)等(林君榮, 2005)。

(一) 清除率(Clearance, Cl)

清除率(Clearance, Cl)，指單位時間內藥物從身體清除的體液體積，被認為是藥物溶解且分布於身體的體液中，而身體為體液分布的空間。清除率的單位為 ml/min 或 L/min，因此清除率可被定義為藥物排除速率除以血漿中藥物之濃度，由下列公式表示：

$$Cl = \text{藥物排除速率} / \text{血漿中藥物濃度}$$

(二) 半衰期(half-life, $T_{1/2}$)

血漿中藥物濃度達到其原始值的一半所需的時間，計算藥物的半衰期可以了解藥物目前的體內濃度。

(三) 藥物濃度曲線下面積(area under the curve, AUC)

AUC 可反應藥物到達全身循環的總量，利用血漿中藥物濃度—時間曲線下，從 $t=0$ 到 $t=\infty$ 的面積，單位是濃度 \times 時間($\mu\text{g}/\text{ml}\times\text{hr}$)。

(四) 血中藥物最高濃度(C_{\max})

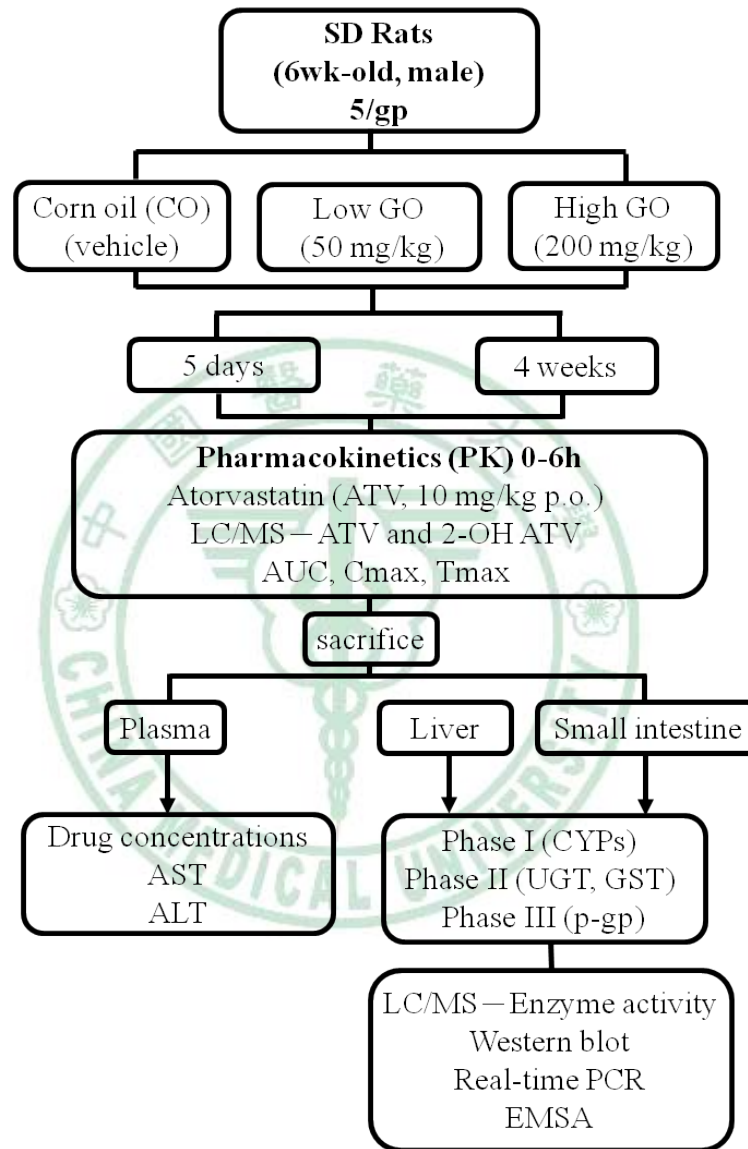
口服藥物後，觀察其血漿中達到最高之藥物濃度，單位是 nmol/ml 或 ng/ml。

(五) 藥物達血中濃度最高之時間(T_{\max})

口服藥物後，觀察其血漿中達到最高濃度所需之時間，單位是 min 或 hr。

第三章、實驗材料與方法

一、實驗架構



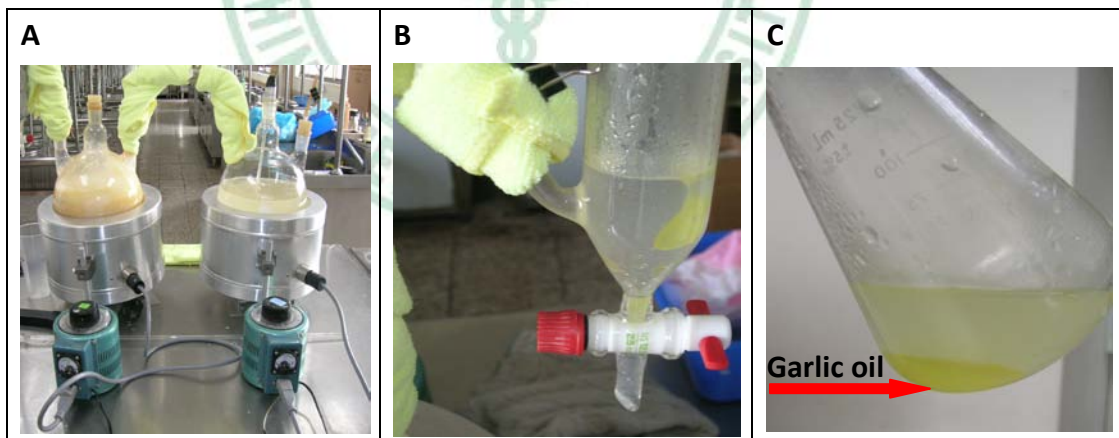
二、實驗材料

(一) 實驗動物

六週齡及十週齡350公克頸靜脈插管雄性 Sprague-Dawley 大鼠由樂斯科生物科技股份有限公司(Bio LASCOTaiwan Co., Ltd)購入。

(二) 大蒜精油的製備

當季新鮮大蒜購自雲林縣北港鎮。製備大蒜精油(GO, garlic oil)時，秤取1公斤脫膜新鮮大蒜放入 Warring blender 中，加入2公升蒸餾水，打碎後，倒入蒸餾瓶中(圖一 A)，以水蒸氣蒸餾法(Steam distillation method)抽取大蒜可揮發成分(圖一 B、C)，所得萃取物以 Na_2SO_4 進行脫水作用後，利用 $0.45\ \mu\text{m}$ nitrocellulose acetate membranes 過濾所得油狀物即大蒜精油，每公斤大蒜約可抽取 2~2.5 g 精油。



圖一、大蒜精油製備之設備與精油成品

(三) 化學試劑

1、 大蒜精油脫水之用藥

- (1) 購自 Wako (Tokyo, Japan)

Sodium sulfate, anhydrous (Na_2SO_4)

2、 大蒜精油之含硫化合物之標準品

- (1) 購自 Sigma Chemical Company (St, Louis, MO)

Diallyl sulfide (DAS) , $\geq 95\%$ (GC)

- (2) 購自 Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan)

Diallyl disulfide (DADS) , $\geq 70\%$ (GC)

- (3) 購自 LKT

Diallyl trisulfide (DATS) , $\geq 98\%$ (GC)

- (4) 購自 Merck Chemical Company (Darmstadt, Germany)

Dimethylsulfoxide (DMSO)

3、 大鼠採血與分析之材料與用藥

- (1) 購自 Sigma Chemical Company (St, Louis, MO)

Heparin

Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA)

- (2) 購自 TERUMO[®] (Tokyo, Japan)

Needle 19_G×1 1/2" R.B.

- (3) 購自台灣特浦份有限公司 (Taiwan)

Top syringe tuberculin with needle 1ml 27_G×1/2" R.B.

Top syringe tuberculin with needle 20 ml 23_G×1" R.B.

4、大鼠血液生化值分析之用藥

(1) 購自 Randox (Antrim, United Kingdom)

AST kit

ALT kit

5、大鼠肝臟均質液、保存液之用藥

(1) 購自 Sigma Chemical Company (St, Louis, MO)

Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA)

Sodium chloride (NaCl)

Potassium chloride (KCl)

Potassium phosphate dibasic anhydrous, ACS reagent (K_2HPO_4)

Potassium phosphate monobasic anhydrous, ACS reagent (KH_2PO_4)

6、大鼠小腸清洗與浸泡之用藥

(1) 購自 Sigma Chemical Company (St, Louis, MO)

Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA)

Dithiothreitol (DTT)

Protease inhibitor cocktail tablet, EDTA free

Phenylmethanesulfon (PMSF)

Sodium chloride (NaCl)

Sodium phosphate dibasic anhydrate, ACS reagent ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)

Sodium phosphate monobasic monohydrate, ACS reagent, ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)

7、大鼠小腸微粒體均質之用藥

(1) 購自 Sigma Chemical Company (St, Louis, MO)

Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA)

Glycerol

Protease inhibitor cocktail tablet, EDTA free

Phenylmethanesulfon (PMSF)

Sodium phosphate dibasic anhydrate, ACS reagent ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Sodium phosphate monobasic monohydrate, ACS reagent, ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

Sodium chloride (NaCl)

8、大鼠肝臟與小腸 P-glycoprotein 均質之用藥

(1) 購自 Sigma Chemical Company (St, Louis, MO)

Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA)

Dithiothreitol (DTT)

Protease inhibitor cocktail tablet, EDTA free

Sodium phosphate dibasic anhydrate, ACS reagent ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Sodium phosphate monobasic monohydrate, ACS reagent, ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

Sodium chloride (NaCl)

Sucrose, ACS reagent

9、CYPs 酵素活性、total cytochrome P450 含量、cytochrome b5 及 NADPH-CYP

P450 reductase 測定之用藥

(1) 購自 Sigma Chemical Company (St, Louis, MO)

Alamethicin

Ethoxyresorufin
Cytochrome c
Diclofenac sodium salt
Dextromethorphen
Dextrophan
Glucose-6-phosphate
Glucose-6-phosphate dehydrogenase
4'-Hydroxydiclofenac, $\geq 98\%$ (HPLC)
6'-Hydroxynitrophenol
1'-Hydroxymidazolam
Magnesium chloride (MgCl_2)
Midazolam
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)
Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)
Potassium phosphate dibasic anhydrous, ACS reagent (K_2HPO_4)
Potassium phosphate monobasic anhydrous, ACS reagent (KH_2PO_4)
 ρ -nitrophenol
4-nitrocatechol
4-nitrophenyl β -D-glucuronide (4-NPG)
Pentoxifyresorufin
Resorufin methyl ether (Methoxyresorufin)
Resorufin-O-deethylation
Sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)
Testosterone

6- β -testosterone

UDP-glucuronic acid (UDPGA)

(2) 購自 ECHO chemical (Taiwan)

Acetonitrile (ACN)

(3) 購自翔源行氣體公司 (Taiwan)

氮氣

10、Atorvastatin 血漿濃度測定之用藥

(1) 購自 Sigma Chemical Company (St, Louis, MO)

Cremophor EL

Ammonium acetate

(2) 購自 Merck Chemical Company (Darmstadt, Germany)

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

(3) 購自 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)

2-hydroxyatorvastatin

(4) 購自 Waterstone Technology LLC (Hancock St , Carmel, USA)

Atorvastatin

(5) 購自 ECHO chemical (Taiwan)

Acetonitrile (ACN)

(6) 購自 Thermo fisher scientific of ACROS organics (Waltham, MA)

Formic acid

11、蛋白質定量

- (1) 購自 Thermo Fisher Scientific Inc.(Rockford, IL, USA)

Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay Kit

12、西方墨點法(Western Blotting)

- (1) 購自 Abcam (MA, USA)

Anti-GCS polyclonal antibody

Anti-cytochrome P450 2C11 polyclonal antibody

- (2) 購自 BD Biosciences (Clontech, CA, USA)

Mouse anti-GST- π

- (3) 購自 Bio Rad Laboratory (Hercules, CA, USA)

30% Acrylmide/Bis Solution, 29:1

Ammonium persulfate

Bromophenol blue

- (4) 購自 Calbiochem (San Diego, CA)

Anti-heme oxygenase-1 rabbit polyclonal antibody

Anti-P-glycoprotein mouse monoclonal antibody

- (5) 購自 Chemicon International, Inc. (Beaford, MA, USA)

Anti-cytochrome P450 2C6 polyclonal antibody

Anti-cytochrome P450 2D1 polyclonal antibody

Anti-cytochrome P450 2E1 polyclonal antibody

Anti-cytochrome P450 3A1 polyclonal antibody

Anti-cytochrome P450 3A2 polyclonal antibody

- (6) 購自 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)

UGT1A1 polyclonal antibody

- γ -GCLm polyclonal antibody
- (7) 購自 Merck Chemical Company (Darmstadt, German)
- 99.8% Ethanol
- Sodium chloride (NaCl)
- (8) 購自 Millipore Corporation (Beaford, MA, USA)
- Anti-GAPDH polyclonal antibody
- Immobilon™ PVDF (Polyvinylidene fluoride) Transfer Membranes
- (9) 購自 PerkinElmer Life Science (Boston, MA, USA)
- Enhanced Chemiluminescence Reagent (ECL kit)
- (10) 購自 Sigma Chemical company (St. Louis, MO, USA)
- N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine (TEMED)
- Rabbit anti-actin monoclonal antibody
- β -Mercaptoethanol
- Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA)
- Glycine
- Glycerol
- Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (TWEEN® 20)
- Ponceau S solution
- Potassium chloride (KCl)
- Potassium phosphate dibasic anhydrous, ACS reagent (K₂HPO₄)
- Potassium phosphate monobasic anhydrous, ACS reagent (KH₂PO₄)
- Sodium dodecyl sulfatate (for electrophoresis, $\geq 98.5\%$ (GC))
- (11) 購自 United States Biological (Swampscott, MA, USA)
- Tris-HCl (Ultra pure)

13、RNA 純化與 real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

(qRT-PCR)分析

- (1) 購自 Kapa Biosystems, Inc. (Woburn, MA, USA)

KAPA PROBE FAST qPCR kit

- (2) 購自 MDBio. Inc. (NJ, USA)生工有限公司

逆轉錄聚合酶連鎖反應之寡核苷酸引子: β -actin, UGT1A1, P-glycoprotein, HO-1, and cytochrome P450 2B1, 2C11, 2D1, 2E1, 3A1, and 3A2 primers

- (3) 購自 Merck Chemical Company (Darmstadt, Germany)

99.8% Ethanol

Isopropanol

- (4) 購自 Molecular Research Center Inc. (Cincinnati, Ohio)

TRI reagent[®]

1-Bromo-3-Chloropropane 99% (BCP, C_3H_6BrCl)

- (5) 購自 Promega Company (Madison, WI, USA)

Oligo(dT)15 Primer

dNTP mix

M-MLV Reverse Transcriptase

Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor

- (6) 購自 GENET BIO (Chungnam, Korea)

Prime Taq DNA Polymerase

- (7) 購自 Protech (Taiwan)

Ultra pure DEPC water

- (8) 購自 Roche (Mannheim, Germany)

Universal ProbeLibrary Probes #6、#7、#12、#121、#18、#63、#65、#68、#76、

14、Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)分析

(1) 購自 GE Healthcare Bio-Sciences AB. (Uppsala, Sweden)

Nylon membrane (Hybone-N⁺)

(2) 購自 Merck Chemical Company (Darmstadt, Germany)

10X TBE buffer

(3) 購自 Pierce Chemical Company (Rockford, IL, USA)

LightShift™ Chemiluminescent EMSA kit (Pierce)

(4) 購自 Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL, USA)

Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Thermo)

(5) 購自 Sigma Chemical Company (St, Louis, MO)

Aprotinin

DL-Dithiothreitol (DTT)

Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA)

Leupeptin

Magnesium chloride (MgCl₂)

N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES)

Nonidet P-40 (Nonionic detergent)

Phenyl methylsulfonyl fluoride (PMSF, C₇H₇F₃O₂S)

Potassium chloride (KCl)

三、實驗方法

(一) 動物飼養

大鼠飼養於中國醫藥大學動物中心，餵養環境控制為室溫 24°C、12 小時晝夜循環(光照時間為 8:00~20:00)及相對濕度 61%的條件下。大鼠經兩天適應後，依體重分組，實驗期間，自由攝取水與飼料(LabDiet[®] rodent 5001, Framingham, MA)，實驗分兩部分進行，(1)短期實驗(五天)：早上(9:00-10:00 AM)以胃管灌方式(ig)餵食玉米油(CO 1mg/kg，對照組)或 50 mg/kg 或 200 mg/kg 兩種不同劑量的大蒜精油(Garlic oil, GO)，每天灌食一次；(2)長期實驗(四週)：劑量同短期實驗，但灌食方式採一週三次。兩組大鼠均於最後一次灌食後當日晚上隔夜禁食，期間僅供應水，次日早上再以胃管灌方式投予 atorvastatin (10 mg/kg)，隨後 6 小時，分於不同時間點經頸靜脈插管(短期)或尾靜脈(長期)採集血液，每次採集血液約 0.2 mL，以肝素為抗凝血劑。

(二) 實驗分析項目

1、 大蒜精油含硫化合物成分之分析-HPLC

大蒜精油之含硫化合物主要利用 HPLC/UV (High-Performance Liquid Chromatography UV detector, HPLC/UV L-7400, Hitachi)分析，並以紫外線可見光分光光度計(UV-visible spectrophotometer)偵測(波長 240 nm)，其所使用的分離管柱為 ZORBAX Extend-C18 (5 μ m, 3.0 \times 250 mm)，樣品注入量為 10 μ l，流速(flow rate)為 0.8 ml/min，移動相(mobile phase)：移動相 A 是二次水(ddH₂O)，移動相 B 是 100% acetonitrile (ACN)，移動梯度如下表所示。所有進入 HPLC 之溶液(移動相 A 與 B)，須經超音波震盪(sonication)脫氣 10 分鐘，即可進行分析，上述實驗皆在室溫下操作。標準品為 diallyl sulfide (DAS)、diallyl disulfide (DADS)、diallyl Trisulfide (DATS) (Chen and Ho, 1998)。

移動相沖提梯度設定：

Time (min)	0	20	30	40	45	50
Mobile phase A (%)	50	50	0	0	50	50
Mobile phase B (%)	50	50	100	100	50	50

比對 GO 的 LC 圖譜與標準品的滯留時間與與標準品的檢量線，即為判定 GO 中含硫化合物之依據。再經定性分析確定 GO 中之含硫化合物的含量。

2、 DAS、DADS 及 DATS 標準品之製備

秤取 1 mg DAS、DADS 及 DATS 標準品溶液，先以少量 DMSO 溶解後，再加甲醇至 1 ml，製成濃度為 1 mg/ml 之儲存溶液。

3、 肝臟微粒體(microsome)的製備

動物犧牲後立即將肝臟取出，用 0.9% NaCl 灌流乾淨，用衛生紙吸乾多餘水份並秤取重量，之後將肝臟組織剪碎混勻，並利用液態氮冷凍，放入-80°C 冰箱中保存備用。

秤取約 1 g 冷凍組織碎片，加入四倍肝重的肝臟均質液(0.1 M potassium phosphate buffer (PPB)，含 1.15% KCl)，利用組織均質器(Teflon pestle-glass homogenizer) (Gal-Col[®])進行均質(4000 rpm)，直到溶液中不再有塊狀肝臟組織為止，均質完後分裝於離心管中，於 4°C 下以 10,000 ×g 離心 15 分鐘，取上清液，重複兩次，再以超高速離心機(Optima™ L-90K Ultracentrifuge, Beckman Coulter) 離心 1 小時(105,000 ×g、4°C)，所得沉澱物即為微粒體，上清液即是細胞質液。以超音波震盪(VIBRA Cell™)方式將微粒體懸浮於 500 μl 0.1M PPB 中(含 1 mM EDTA)，分裝保存於-80°C，兩週內完成藥物代謝酵素活性的測定。

4、小腸微粒體樣品的製備

小腸微粒體製備係參考 Emoto (2000) 等人所發表之方法，簡述如下：大鼠犧牲後，取空腸(jejunum)，先以含 0.9% NaCl、1 mM EDTA、1 mM PMSF 之溶液清洗小腸兩次，將內容物洗出，再灌入含 1.5 mM EDTA、0.5 mM dithiothreitol，以及蛋白酶抑制劑(2 mM AEBSF、1 μ M Phoaphoramido、10 μ M Pepstatin A、0.2 μ M Aprotinin、130 μ M Bestatin、14 μ M E-64、1 μ M Leupeptin) 之 PBS 緩衝液(pH7.4)，用棉線綁住小腸兩端，隨後將浸泡中的小腸置於冰浴上。待完成所有大鼠犧牲，約 2 小時後，剪開棉線，打開空腸，利用玻片刮下腸黏膜，加入四倍量的小腸均質液(50 mM Tris-HCl 含 1 mM KCl、1 mM PMSF、1 mM EDTA、20% glycerol 以及蛋白酶抑制劑(2 mM AEBSF、1 μ M Phoaphoramido、10 μ M Pepstatin A、0.2 μ M Aprotinin、130 μ M Bestatin、14 μ M E-64、1 μ M Leupeptin)，pH7.4)，利用組織均質器(2000 rpm)來回均質 10 秒 3 次，將均質液分裝於離心管中，於 4°C 下以 10,000 \times g 離心 30 分鐘，取上清液，再以超高速離心機於下離心 1 小時(105,000 \times g、4°C)，所得沉澱物即為微粒體，上清液則為細胞質液。取出細胞質液後，加入 100 μ l 含 1 mM EDTA 之 0.1M PPB，放入超音波震盪器，懸浮微粒體，分裝保存於-80°C，藥物代謝酵素活性於當天完成測定，蛋白值測定則於 1 週內完成(Emoto et al., 2000)。

5、肝臟與小腸膜蛋白 P-glycoprotein 樣品的製備

肝臟與小腸黏膜採集方式同上節微粒體樣本所述，至於膜蛋白製備將參考 Dahan (2009) 等人發表之方法，簡述如下：取肝臟組織或腸黏膜，加入四倍量的膜蛋白均質液(PBS 含 1.5 mM EDTA、0.5 mM DTT、0.5 M sucrose 以及蛋白酶抑制劑(2 mM AEBSF、1 μ M Phoaphoramido、10 μ M Pepstatin A、0.2 μ M Aprotinin、130 μ M Bestatin、14 μ M E-64、1 μ M Leupeptin)，pH7.4)，均質器(2000 rpm)來回均質 10 秒 3 次，再利用超音波震盪 10 秒 3 次，均質液分裝於離心管中，離心 10 分鐘(900 \times g、

4°C)，取上清液，分裝保存於-80°C，P-glycoprotein 蛋白值測定則於 1 週內完成(Dahan et al., 2009)。

6、血液收集與血漿分離

大鼠完成大蒜精油灌食後，禁食 10 小時，次日早上經口投予 atorvastatin (10 mg/kg)，隨後 6 小時分別於不同時間點採血，短期實驗大鼠將由頸靜脈插管處採血，長期實驗大鼠則由尾靜脈採血，每次採集約 0.2 c.c，以肝素為抗凝血劑，收集的血液置於冰浴中。完成採集後，血液樣本離心 20 分鐘(4,000 ×g、4°C)，上清液即為血漿，保存於-20°C。

7、血漿 atorvastatin (ATV)與其代謝物 2-OH ATV 濃度測定

取 50 µl 血漿至 1.5 ml 離心管中，加入 1000 µl ACN，室溫下震盪兩分鐘，離心 15 分鐘(10,000 ×g、20°C)，取上清液 100 µl，利用 HPLC/MS (High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrophotometer, HPLC/MS series 1100, Hewlett Packard)進行分析，分離管柱為 XDB-C8 (5 µm, 3.0 × 150 mm)，樣品注入器(Injector)使用 40 µl loop，流速設定為 0.5 ml/min。移動相 A 是 ACN 溶液，移動相 B 是 10 mM ammonium acetate + 0.1% formic 溶於二次水中(ddH₂O)，移動梯度如下表所示。移動相溶液使用前均以超音波震盪器(sonication)進行 10 分鐘脫氣(degas)。上述實驗皆在室溫下操作。

移動相沖提梯度設定：

Time (min)	0	1	3	9	10	15
Mobile phase A (%)	50	50	0	0	50	50
Mobile phase B (%)	70	50	2	2	70	70

比對血漿和 ATV 及 2-OH ATV 兩樣標準品的滯留時間與檢量線，即為判定血漿中藥物濃度之依據。

8、血漿生化值分析天門冬胺酸轉胺酶(Aspartate aminotransaminase; AST)和丙胺酸轉胺酶(Alanine aminotransaminase; ALT)

AST、ALT 測定使用 DiaSYS 的商業組合試劑(DiaSYS, Holzheim, Germany)。分別取血漿樣品 20 μl ，置於 96 孔盤內，加入 200 μl AST 或 ALT 檢驗試劑，置於恆溫式迴轉式震盪器(Thermo shaker, PST-60 HL plus, BIO SAN) 37°C，1 分鐘，立即以酵素免疫分析儀(ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Model 680, BD Biosciences)偵測波長 340 nm 吸光值，取 0、1、2、3 分鐘之吸光值求其斜率($\Delta A/\text{min}$)，並套入公式($\Delta A/\text{min} \times 1746$)即可算出其活性。

9、大鼠肝臟微粒體中 Total CYP450 含量測定

參考 Omura and Sato (1964)發表之方法，微粒體蛋白質濃度以 0.1 M PPB (pH 7.4) 稀釋成 0.5 mg/ml 後，分別取 1 ml 加入兩管 1 ml cuvette 中，放入分光光譜儀，以 400 至 500 nm 做基準線校正歸零後，一氧化硫充氣 30 秒，其中一管加入 4% NADH (blank)另一管則加入約 3 mg 硫代硫酸鈉 (Na_2SO_4)予以還原，1 分鐘後，掃描並記錄 450 nm 與 490 nm 之吸光插，根據吸光係數 $\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，即可算出 total CYP450 含量，單位為 pmol/mg protein (Omura and Sato, 1964)。

10、大蒜精油對大鼠肝臟微粒體中 cytochrome b5 含量測定

同 total cytochrome P450 含量測定，微粒體 cytochrome b5 含量也是根據 Omura and Sato (1964)發表之方法。微粒體蛋白質濃度以 0.1 M PPB (pH 7.4)稀釋為 0.5 mg/ml，分別取 20 μl 加入 96 孔盤中，利用 ELISA 讀取 410 與 424 nm 的吸光，此時所測得之吸光值當作基準值，隨後加入 1 μl 30 mM NADH 啟動酵素反應，立即測量吸光值變化(吸光係數 $\epsilon = 185 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)，即可算出 cytochrome b5 之含量，單位為 pmol/mg protein (Omura and Sato, 1964)。

11、大鼠肝臟微粒體中 NADPH-CYP450 reductase 活性測定

將參考 Philips and Langdon (1962)之方法，將樣品加入 96 孔盤中，反應總體基為 200 μl ，以 cytochrome c 為受質，反應溶液中蛋白質濃度為 0.05 mg/ml，利用 0.1 M PPB (pH 7.4)稀釋，分別取 2 μl 0.05 mg/ml 微粒體蛋白質、20 μl 30 mM MgCl_2 、20 μl 10 mM cytochrome c 與 20 μl 1mM NADPH 反應，於 37°C 均勻震盪 1 分鐘，最後利用 ELISA 讀取 550 nm 之吸光度變化(吸光係數 $\epsilon=19.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)，每 10 秒鐘讀取一次，總共讀取 15 次，利用吸光值變化，即可計算 NADPH-CYP P450 reductase 還原 cytochrome c 之活性，單位為 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ (Phillips and Langdon, 1962)。

12、大蒜精油對大鼠肝臟與小腸中 CYP450 酵素活性測定

分別以 ethoxyresorufin (1 μM)、methoxyresorufin (0.5 μM)、pentoxyresorufin (0.5 μM)、diclofenac (0.8 μM)、dextromethorphan (1 μM)、p-nitrophenol (10 μM)、midazolam (0.85 μM)及 testosterone (12 μM)做為 CYP1A1、1A2、2B、2C、2D、2E 及 3A 的酵素受質，於 96 孔盤中分別加入 10 μl 1mg/ml 微粒體蛋白質、20 μl 30 mM MgCl_2 、149 μl 0.1M PPB (pH 7.4)，攪拌均勻後，加入 20 μl 1 mM NADPH 啟動酵素反應，反應總體積最終為 200 μl ，並於恆溫式迴轉式震盪器(Thermo shaker, PST-60 HL plus, BIO SAN)中以 37°C 反應 15 分鐘，反應完成後，立刻加入冰冷的 acetonitrile (ACN)溶液終止反應，離心 15 分鐘(10000 $\times g$ 、20°C)，取上清液，以 HPLC/MS 方法測定反應所產生之代謝物濃度，並依此計算 CYP 酵素活性(Yao et al., 2008)。

13、大鼠肝臟與小腸中 UGT 酵素活性測定

將肝臟微粒體利用 Hanioka (2001)之方法，以 4-nitrophenol (0.01 mM)當作受質，反應溶液中含有蛋白質濃度 0.01 mg/ml、80 μl 40 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)、20 μl 30 mM MgCl_2 、1 μl 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ alamethicin 以及 20 μl 1.7 μM UDPGA

(UDP-glucuronic acid)，反應總體積最終為 200 μ l。酵素反應在加入 UDPGA 後迅速開始，反應 15 分鐘後，加入冰冷的 acetonitrile (ACN) 終止反應，離心 15 分鐘(10000 \times g、20 $^{\circ}$ C)，取上清液，以 HPLC/MS 方法測定其反應代謝物 4-nitrophenyl β -D-glucuronide 的生成量表示(Hanioka et al., 2001)。

表一、CYPs 與 UGT 之受質與其代謝物

Enzymes	Substrate	Concentration	Metabolites	Referances
CYP1A1	Ethoxyresorufin	1 μ M	Resorufin	(Burke et al., 1994)
CYP1A2	Methoxyresorufin	0.5 μ M	Resorufin	(Szaefer et al., 2003)
CYP2B	Pentoxyresorufin	0.5 μ M	Resorufin	(Szaefer et al., 2003)
CYP2C	Diclofenac	0.8 μ M	4-hydroxydiclofenac	(Kobayashi et al., 2002)
CYP2D	Dextromethorphan	1 μ M	Dextrophen	(Walsky and Obach, 2004)
CYP2E1	ρ -Nitrophenol	10 μ M	4-nitrocatechol	(Sugiyama et al., 2004)
CYP3A	Testosterone	12 μ M	6- β -hydroxytestosterone	(Sugiyama et al., 2004)
CYP3A	Midazolam	0.85 μ M	1'-hydroxymidazolam	(Kanazawa et al., 2004)
UGT	4-Nitrophenol	1.7 μ M	4-nitrophenyl β -D-glucuronide	(Hanioka et al., 2001)

14、蛋白質表現分析—西方墨點法(Western blotting assay)

(1) 蛋白質定量

操作步驟參照 Coomassie Plus Protein Assay Kit 方法，簡述如下：各取 5 μ l BSA 標準品與微粒體、細胞質或膜蛋白樣品，分別置於 96 孔盤內，加入 150 μ l dye reagent (樣本：dye reagent = 1 : 30, v/v)，置於微電腦控溫震盪反應器(Thermomixer compact, eppendorf)上，室溫中均勻搖晃 10 分鐘，試劑將與樣本中蛋白質結合成藍色物質，以酵素免疫分析儀(ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Model 680, BD Biosciences)偵測波長 595 nm 吸光值，再與 BSA 所求得之蛋白質標準品濃度曲線比照後，即可計算樣品蛋白質的濃度。

(2) 西方墨點法(Western blot)

蛋白質濃度定量後，以 5X 濃度的 sample buffer (含 0.5 M Tris、20% glycerol、10% SDS、0.1% bromophenol blue 及 5% β -mercaptoethanol) 及 1 mM potassium phosphate buffer (PPB) 以 1:4 比例稀釋將蛋白質最終濃度調整為 1 $\mu\text{g}/\text{ul}$ ，95°C 下乾浴 5 分鐘，冷卻後，取適量體積之樣品注入 SDS-PAGE 樣品槽中，以 130 伏特電壓進行電泳。

5X sample buffer (保存於 4°C)	
0.5 M Tris (pH 6.8)	10.0 ml
20% SDS	17.5 ml
β -Mercaptoethanol	2.5 ml
Bromophenol blue (w/v)	0.05 ml
Glycerol	10.0 ml
H ₂ O	8.0 ml

Polyacrylamide gel 配方		
	Separating gel 10%	Stacking gel 4%
30% Acrylamide	3.74 ml	0.67 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml	
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)		1.25 ml
H ₂ O	3.66 ml	3.1 ml
20% SDS	50 μl	25 μl
10% Ammonium persulfate	50 μl	25 μl
TEMED	10 μl	10 μl
Total	10 ml	5 ml

電泳完成後，取下膠體，切除 stacking gel，將 separating gel 浸泡於 transfer buffer (含 80% 25 mM Tris、192 mM glycine 及 20% methanol) 中，同時截取一片與 separating gel 大小相同之 PVDF (polyvinylidene fluoride) 轉漬膜，使用前先將此膜浸泡於 99.5% ethanol 中 5 分鐘，再與膠片、濾紙及海綿一起浸泡於 transfer buffer 約 5 分鐘，依序將海綿、濾紙、膠片、PVDF 膜、濾紙、海綿放置於三明治式塑膠板中，固定後，

放入轉漬槽中，以 100 伏特於冰浴中進行轉漬 90 分鐘。

轉漬完成後，取出 PVDF 膜，先以冰冷的 buffer A (25 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、0.3% Tween 20, pH 7.4) 清洗一次，加入 Ponceau S solution 染色，確定蛋白質位置後，剪裁 PVDF 膜，再以冰冷的 buffer A 清洗三次，每次 5 分鐘，隨後將 PVDF 膜浸泡於含 5% 脫脂奶粉 (skim milk) 的 buffer B (含 25 mM Tris-HCl、150 mM NaCl, pH 7.4) 中，置於 4°C 下隔夜或於室溫下 2 小時，進行 blocking 反應。

取出 PVDF 轉漬膜，以冰冷的 buffer A 清洗三次，每次 5 分鐘，接著依一級抗體種類不同，於室溫反應 60 分鐘或 4°C 下反應 overnight，取出後，PVDF 膜再次以冰冷的 buffer A 清洗三次，每次 5 分鐘，隨後加入二級抗體，室溫下反應 40 分鐘後，以冰冷的 buffer A 清洗三次，每次 5 分鐘，最後加入 Enhanced Chemiluminescence Reagent (ECL kit) 呈色，並以冷光數位分析儀 (LAS-4000, FUJIFILM, Japan) 顯像、存檔，待後續蛋白質表現定量分析。

表二、蛋白質 1° 與 2° 抗體

1° 抗體	分子量	蛋白質量	抗體比例
CYP1A1	59.393	20 µg	1:500
CYP1A2	58.259	20 µg	1:500
CYP 2B1	55.93	10 µg	1 : 1000
CYP 2C6	56.00	10 µg	1 : 200
CYP 2C11	57.18	10 µg	1 : 1000
CYP 2D1	57.17	10 µg	1 : 1000
CYP 2E1	56.62	10 µg	1 : 2000
CYP 3A1	57.91	4 µg	1 : 500
CYP 3A2	57.73	4 µg	1 : 500
GST-α	25.63	10 µg	1 : 1000
GST-μ	25.60	10 µg	1 : 1000
GST-π	23.43	10 µg	1 : 1000
UGT 1A1	59.59	10 µg	1 : 1000
P-gp	141.38	10 µg	1 : 1000
GCLC	72.61	10 µg	1 : 1000
GCLM	30.54	10 µg	1 : 1000
HO-1	33.00	10 µg	1 : 1000
GAPDH	35.82		1 : 2000
β-ACTIN	41.73		1 : 1000
2° 抗體			
anti-rabbit			1 : 2000
anti-mouse			1 : 2000
anti-goat			1 : 2000

15、 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

(1) 組織 Total RNA 的抽取

取出冷凍肝臟，敲碎後稱取 50 mg，加入 1 ml TRIzol reagent，利用組織均質器來回均質 10 次(4000 rpm)，將均質樣品置於冰浴中，加入 BCP 100 μ l，均勻震盪 15 秒後呈現粉乳色，室溫靜置 3 分鐘，離心 15 分鐘(11,000 \times g、4 $^{\circ}$ C)，吸取最上層含有 RNA 的上清液至另一乾淨的 1.5 ml 離心管中，加入 500 μ l isopropanol，混合均勻，室溫靜置 10 分鐘使 RNA 沈澱，離心 20 分鐘(11,000 \times g、4 $^{\circ}$ C)，移除上清液，加入 500 μ l 冰的 70% ethanol 清洗殘餘鹽類兩次，離心 5 分鐘(5,000 \times g、4 $^{\circ}$ C)，最後加入 750 μ l 冰的 70% ethanol，並貯存於-20 $^{\circ}$ C 供後續 RNA 表現分析。

(2) RNA 定量

取出保存於 70 % ethanol 的 RNA 樣品，離心 15 分鐘(11,000 \times g、4 $^{\circ}$ C)，倒掉酒精上清液，白色固體狀 RNA 置於室溫下略為風乾，加入 100 μ l (依 RNA 多寡而定) DEPC 水，待 RNA 完全溶解後，取出 2 μ l RNA 溶液，以超微量分光光譜儀 (Nanodrop 1000, Thermo,USA)測定 260/280 nm 吸光值，依此計算 RNA 濃度。

(3) RT

製備 RT mixture (每管含 2 μ l 10X PCR buffer，含 2 μ l 10 mM dNTP、1 μ l 250 ng Oligo dT、0.25 μ l 40 units RNase inhibitor、0.25 μ l 200 units reverse transcriptase)於 1.5 ml 離心管中，再分別與 4 μ l 0.2 μ g/ μ l RNA 樣品混合，並加入去離子水至總體積為 20 μ l，混合均勻後進行逆轉錄反應(MJ Mino Thermo Cycler, BD Biosciences)，設定條件：42 $^{\circ}$ C-15 分鐘、99 $^{\circ}$ C-5 分鐘、4 $^{\circ}$ C-10 分鐘，製造 cDNA 產物。

(4) Real-time PCR

接著製備 PCR mixture (每組 Rx 含 5 μ l KAPA PROFAST qPCR kit、1 μ l 10 μ M

probe、0.5 μ l 10 μ M 3' primer、0.5 μ l 10 μ M 5' primer)，於 384 孔盤中依序加入 3 μ l cDNA 以及 PCR mixture 總體積為 10 μ l，離心後經即可利用 real-time PCR (Light Cycler[®] 480, Roche)進行聚合酶連鎖反應 cDNA 複製。設定條件為：enzyme activation 95°C-60 秒、denature 95 °C-2 秒、anneal/extend/acquire 55°C-30 秒。

逆轉錄聚合酶連鎖反應之寡核苷酸引子序列參照表三。

表三、逆轉錄聚合酶連鎖反應之寡核苷酸引子序列

Gene	Gene number	Probe	Primer	Lengt	Position	Tm	%GC	Sequence
<i>CYP2B1</i>	NM_001134844.1	#65	Left	20	1285-1304	59	50	gtgaagctttcatgcccttc
			Right	20	1388-1407	59	50	ccaaatggcttgacacagag
<i>CYP2C11</i>	NM_019184.2	#18	Left	24	1247-1270	59	46	tggtcactttctagatgagag
			Right	20	1318-1337	59	55	ggcttctcctgcacatatcc
<i>CYP2D1</i>	NM_153313.1	#7	Left	19	1210-1228	59	58	gtgcaggacttcgtcatcc
			Right	21	1303-1323	60	48	caggaagtgttctggatggaa
<i>CYP2E1</i>	NM_031543.1	#68	Left	23	1285-1307	59	39	gactattcaaggcattttctg
			Right	23	1390-1412	59	48	ttaggtcaaccagagacttc
<i>CYP3A1</i>	NM_013105.2	#113	Left	20	1063-1082	59	55	gaaactgcaggaggatcg
			Right	23	1105-1127	59	48	tcacagtatcataggtgggag
<i>CYP3A2</i>	NM_153312.2	#12	Left	22	1431-1452	59	45	cgctctactaaagtctgca
			Right	24	1501-1524	59	38	tggtcaagaattgctgtcta
<i>UGT1A1</i>	NM_012683.2	#76	Left	21	1297-1317	60	43	cgcccttaaaactgtcatcaa
			Right	20	1406-1425	59	55	tgctcatcacgtactccac
<i>HO-1</i>	NM_012580.2	#6	Left	19	724-742	59	58	ctaagacccttctctgct
			Right	21	795-815	60	57	tgtctgtgaggactctggtc
<i>P-gp</i>	NM_012623.2	#92	Left	18	3285-3302	60	56	tacaaccatggctgga
			Right	20	3388-3407	59	50	gatgctgcagtcaaacagga
<i>β-actin</i>	NM_031144.2	#63	Left	19	1039-1057	59	58	ctggctcctagcacatga
			Right	20	1095-1114	60	50	tagagccaccaatccacaca

16、Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

(1) 核蛋白萃取

拿出冷凍的肝臟組織取 0.1 g 加入 900 μ l 低張溶液(含 10 mM HEPES、10 mM KCl、0.1 mM EDTA、1.0 mM MgCl₂、0.5 mM DTT、0.5 mM PMSF、4 μ g/ml leupeptin、20 μ g/ml aprotinin，pH 7.4)均質，溫和地混合均勻，冰浴 15 分鐘後，加入 1%NP40 至上清液中，放在冰上 15 分鐘，離心 15 分鐘(6000 xg、4°C)，離心後沉澱物即為細

胞核，再加入 800 μl 低張溶液，使細胞懸浮在低張溶液中，離心 15 分鐘(6000 $\times g$ 、 4°C)，吸取上清液，離心後的細胞沉澱物再加入 100 μl 高張溶液(含 10 mM HEPES、1.0 mM MgCl_2 、0.5 mM DTT、0.2 mM PMSF、4 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin、20 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin、10% glycerol、400 mM KCl、0.2 mM EDTA)打散細胞核，於 4°C 冰箱中溫和震盪 30 分鐘，離心 15 分鐘(12,000 $\times g$ 、 4°C)，所得上清液即為細胞核蛋白萃取液(nuclear protein extract)。細胞核蛋白萃取液以 Coomassie Plus Protein Assay Kit Coomassie Plus 定量，樣品保存於 -80°C 超低溫冷凍櫃，供後續 EMSA 分析使用。

(2) EMSA

製備反應溶液每管含 [50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ poly (dIdC)、1X binding buffer、2.5% glycerol、5 mM MgCl_2 、0.05% NP-40 以及 2 ng biotin 標定之 3A1-DR3 序列【forward: 5'-GTA GAT GAA CTT CAT GAA CTG TCT AG-3'; reverse: 5'-CT AGA CAG TTC ATG AAG TTC ATC TAC-3'】，再分別與 15 μg 細胞核蛋白樣品混合，並加入去離子水至總體積 20 μl 。混合均勻後，室溫下反應 30 分鐘，隨後每管加入 5 μl 5X loading dye，並使每管總體積為 25 μl ，注入到 6% polyacrylamide gels (6% acrylamide solution、1X TBE buffer、1% APS 及 15 μl TEMED)樣品槽中，以 0.5X TBE buffer 為電泳液，在 32 mA 的冰水浴中進行電泳 90 分鐘，隨後以 100 伏特電壓於冰水浴中繼續轉漬 45 分鐘，將 protein-DNA 結合物轉漬至 nylon membrane (HyBond N^+)上。轉漬完成後，取出膜置於紙巾上晾乾 10 分鐘，再於紫外光燈下 cross-link 10 分鐘，以 1X wash buffer 清洗 5 分鐘，將膜放入含 10 ml blocking buffer 的容器內均勻搖晃 20 分鐘，隨後加入 10 μl Streptavidin- Horseradish Peroxidase (HRP)，均勻搖晃 20 分鐘，1X wash buffer 清洗 3 次，每次 5 分鐘，最後加入 Substrate equilibration buffer 平衡 5 分鐘，用 Chemiluminescent Substrate 呈色，利用冷光數位分析儀(LAS-4000, FUJIFILM, Japan) 進行分析。

三、統計分析

各組實驗分析所得之數據以平均值加減一個正負標準差(means±SD)表示，實驗統計分析將採用 SAS 統計套裝軟體中之單因子變異數分析(one-way analysis of variance, ANOVA)並配合 Duncan's test，當 p 值 <0.05 代表各組之間有顯著差異。



第四章、結果

一、以 HPLC/UV 測定大蒜精油中含硫化合物之含量

新鮮製備之大蒜精油使用前，先以 HPLC/UV 測定其中主要之含硫化合物—DAS、DADS、DATS 之含量。和標準品所測得之層析圖比對後(圖一)，定量結果顯示精油中 DAS、DADS、DATS 含量分別為 0.08、0.28 以及 0.52 g/g GO (表一)。

二、大蒜精油對大鼠體重與組織相對重量之影響

不同劑量大蒜精油對大鼠體重與肝、肺兩臟器重量之影響如表二所示，大蒜精油分別管灌五天或四週後，高劑量組大鼠之體重皆顯著低於對照組和低劑量組 ($p<0.05$)。除體重外，相較控制組及低劑量組大鼠，高劑量大蒜精油組也有較高之大鼠肝臟相對重量比 ($p<0.05$)，肺臟重量和肺臟重量比則不受影響；低劑量組大鼠無論體重或肝臟或肺臟相對重量比皆與對照組相似。

三、大蒜精油對大鼠肝功能指標之影響

大蒜精油除影響體重和肝臟相對重外，是否也影響了肝功能，因此進一步分析了大鼠血液中 AST 和 ALT 兩項生化指標值，結果如表三所示，大蒜精油無論在五天或四週處理後，高或低劑量組大鼠和對照組大鼠間皆無顯著之差異，由此可知高劑量之大蒜精油雖減少了體重的增加，而且也使得肝臟相對重量比變大，但 200 mg/kg 劑量並未損傷肝功能。

四、大蒜精油處理五天與四週後對大鼠肝臟藥物代謝酵素活性之影響

結果如表四所示，投予大蒜精油後無論高低劑量皆會顯著增加肝臟中 total P450 含量 ($p<0.05$)，但不影響 cytochrome b5 與 NADPH-CYP450 reductase 含量與活性。而投予大蒜精油五天後，將使得肝臟中 ethoxyresorufin O-deethylase (CYP1A1)、

pentoxyresorfin O-deethylase (CYP2B1)與 UDP-glucosyltransferase (UGT)之酵素活性呈現劑量關係增加($p<0.05$);然而 diclofenac 4-hydroxylase (CYP2C)與 σ -nitrophenol hydroxylase (CYP2E)酵素活性則是以劑量關係受到抑制($p<0.05$)。將大蒜精油投予時間延長為四週時,除 ethoxyresorufin O-deethylase (CYP1A1)、pentoxyresorfin O-deethylase (CYP2B1)與 UGT 酵素活性外, Testosterone 6 β -hydroxylase (CYP3A)及 dextromethorphan O-demethylase (CYP2D)活性也因大蒜精油處理而增加($p<0.05$);而且類似抑制 σ -nitrophenol hydroxylase (CYP2E)酵素活性($p<0.05$)的結果也出現在四週的處理。

五、大蒜精油處理對小腸藥物代謝酵素活性之影響

如表五所示,餵食大蒜精油後,小腸組織中 diclofenac 4-hydroxylase (CYP2C)、testosterone 6 β -hydroxylase (CYP3A)及 midazolam 1-hydroxylase (CYP3A)活性都不受影響。至於 phase II 的 UDP-glucosyltransferase (UGT)活性,無論五天或四週大蒜精油處理,均呈現劑量關係增加,高劑量組顯著高於對照組($p<0.05$)。

六、大蒜精油對大鼠肝臟 CYP1A1/2 蛋白質表現之影響

大蒜精油處理四天與五週後,精加肝臟中 CYP1A1 的蛋白質表現,而 CYP1A2 蛋白質表現,High GO 組皆顯著誘發,相較對照組,分別增加 2.2 與 2.3 倍(圖二)($p<0.05$)。

七、大蒜精油對大鼠肝臟 CYP2B1、2D1 與 2E1 蛋白質與 mRNA 表現之影響

大蒜精油處理五天後,呈劑量關係誘發肝臟 CYP2B1 蛋白質表現,相較對照組大鼠,Low GO 組表現量為 2.7 倍, High GO 組則是 6.8 倍(圖三 A),mRNA 定量結果與蛋白質相似,依序是 Low GO 2.6 倍、High GO 12.6 倍(圖三 B),相似誘發結果

同樣出現在灌食大蒜精油四週的實驗中($p<0.05$)。但在 CYP2D1 蛋白質表現中五天與四週的結果與酵素活性並不一致，在大蒜精油處以五天後，Low GO 與 High GO 兩組大鼠肝臟會增加 CYP2D1 的蛋白質表現，但四週實驗中則無影響。至於大蒜精油對 CYP2E1 蛋白質和 mRNA 表現之影響並不一致，無論五天或四週處理，Low GO 與 High GO 兩組大鼠肝臟 CYP2E1 蛋白質表現量都低於對照組($p<0.05$)，然而大蒜精油對 CYP2E1 mRNA 表現量之影響卻與其對蛋白質之效應相反，五天處理後，Low GO 與 High GO 兩組大鼠肝臟 CYP2E1 mRNA 均高於對照組($p<0.05$)，四週處理後，大蒜精油對 CYP2E1 mRNA 表現則無影響。

八、大蒜精油對大鼠肝臟 CYP2C6 與 2C11 蛋白質與 mRNA 表現之影響

大鼠於大蒜精油處理五天或四週後，CYP2C6 蛋白質表現量只在 High GO 處理下顯著被誘發(圖四 A)；至於 CYP2C11 蛋白質表現，在大蒜精油處理後 High GO 組有顯著增加，但將實驗延長至四週後，相較於控制組皆無差異。此外，CYP2C11 mRNA 的表現則無論五天或四週大蒜精油處理均與對照組相似(圖四 B)。

九、大蒜精油對大鼠肝臟 CYP3A1/2 蛋白質與 mRNA 表現之影響

大鼠無論是以大蒜精油處理五天或四週，肝臟 CYP3A1 蛋白質表現都以劑量關係增加(圖五 A)；mRNA 表現也呈現相似結果，High GO 大鼠在大蒜精油處理五天或四週後，相較對照組，CYP3A1 mRNA 分別增加了 90% 和 65% ($p<0.05$)(圖四 B)。而 CYP3A2 蛋白質表現的增加僅出現於 Low GO ($p<0.05$)(圖五 A)，但在 High GO 下，則顯著被抑制；mRNA 表現也呈現相似結果。

十、大蒜精油對大鼠肝臟 UGT1A1 蛋白質與 mRNA 表現之影響

無論給予五天或四週處理，大蒜精油皆以劑量關係誘發 UGT1A1 之蛋白質表現(圖六 A)，相較對照組，High GO 經五天或四週處理後，表現量分別增加了 150%和 260%；各組間 mRNA 差異與蛋白質表現相似(圖六 B)。

十一、大蒜精油對大鼠肝臟 GSTs 蛋白質表現之影響

觀察大蒜精油處理後對肝臟中三種主要的 GSTs 的蛋白質表現，其結果呈現於圖八中，當大蒜精油處理五天後，High GO 組會顯著增加 GST- α (Ya)的蛋白質表現，但將實驗延長至四週後其表現便不顯著，相對於對照組無顯著差異；另外，當大蒜精油處理五天或四週，皆會呈劑量關係增加大鼠肝臟中的 GST- β (Yb)與 GST- π (Yp)的蛋白質表現且達顯著差異($p < 0.05$)。

十二、大蒜精油對大鼠肝臟 P-gp 蛋白質與 mRNA 表現之影響

觀察大蒜精油處理五天後，High GO 顯著減少肝臟中 P-gp 蛋白質表現($p < 0.05$) (圖九 A)，於四週實驗中，亦有相似的結果；類似抑制 P-gp mRNA 的結果中亦出現於四週實驗的 High GO 大鼠肝臟(圖九 B)。

十三、大蒜精油對大鼠小腸之 CYP3A1 與 3A2 蛋白質表現

大蒜精油處理五天後，Low GO 大鼠小腸之 CYP3A1 蛋白質表現高於對照組(圖十)，但 High GO 時則無影響，若將大蒜精油處理延長為四週後，也有類似的結果；至於 CYP3A2 無論在大蒜精油處理五天或四週後皆無明顯的改變。

十四、大蒜精油對大鼠小腸之 UGT1A1 蛋白質表現

同肝臟 UGT1A1 蛋白質表現，大鼠無論是灌食大蒜精油五天或四週，小腸組織中 UGT1A1 蛋白質表現均呈劑量關係增加(圖十一)，相較對照組，High GO 大鼠以

大蒜精油處理五天或四週後，蛋白質表現量分別增加了 390% 和 250%。

十五、大蒜精油對大鼠小腸 GSTs 蛋白質表現之影響

觀察大蒜精油處理後對小腸中三種主要的 GSTs 的蛋白質表現，結果呈現於圖十二中，當大蒜精油處理五天後，Low GO 與 High GO 會增加 GST- α (Ya)、GST- β (Yb) 與 GST- π (Yp) 的蛋白質表現，但將實驗延長至四週後其表現變得較不明顯，除了 GST- β (Yb) 外，GST- α (Ya) 與 GST- π (Yp) 表現上，無論在 Low GO 或 High GO 中，相較於對照組無明顯差異。

十六、大蒜精油對大鼠小腸之 P-gp 蛋白質表現

大鼠灌食五天與四週後，大蒜精油皆會增加小腸膜蛋白 P-gp 之表現量(圖十三)，Low GO 表現量分別為對照組大鼠的 6.4 和 2.1 倍，High GO 表現量則分別為對照組大鼠的 2.1 和 5.2 倍，由此可見大蒜精油可能藉由增加 P-gp 表現，增加外來物質於腸道中排除，降低外來物質吸收進入血液循環中。

十七、大蒜精油對血漿中 atorvastatin (ATV) 與 2-hydroxy atorvastatin (2-OH ATV) 濃度之影響

根據圖十四、十五結果，且 Atorvastatin 和其代謝產物 2-OH atorvastatin 的動力學參數如表六所示。在灌食大蒜精油五天實驗中，血漿中(0-6 h) atorvastatin 和其代謝產物 2-OH atorvastatin 的藥物濃度(AUC)都呈現劑量關係的減少，在高大蒜精油劑量(High GO)愈處理下，Atorvastatin 的 AUC 顯著較對照組減少 31.5% ($p < 0.05$)，2-OH atorvastatin 則減少了 59.2% ($p < 0.05$)。類似現象同樣發現於灌食大鼠大蒜精油四週的大鼠，Atorvastatin 和 2-OH atorvastatin AUC 在大蒜精油低劑量處理下分別減少 22.8% 和 30.7%，至於高劑量大蒜精油下，側分別降低了 76.4% 和 60.2% ($p < 0.05$)。

大蒜精油對 atorvastatin 動力學參數 C_{max} 與 T_{max} 之影響也表示於表六中。當大鼠在大蒜精油處理五天後給予 atorvastatin，結果顯示血漿中 atorvastatin 的 C_{max} 並不受大蒜精油的影響，然而，2-OH Atorvastatin 的 C_{max} 在高大蒜精油組顯著低於對照組 77.7%，而四週實驗中無論在 atorvastatin 與 2-OH Atorvastatin 中皆可發現 C_{max} 在高大蒜精油組顯著低於對照組 46.1% 與 63.9%，。至於達最高濃度之時間(T_{max})，無論高或大蒜精油給予五天或四週處理，各組間並無顯著差異，Atorvastatin 的 T_{max} 在各組間介於 30-36 分鐘間，2-OH atorvastatin 的 T_{max} 在各組間介於 40-60 分鐘間。此結果顯示大蒜精油餵食時間越長，越容易降低 ATV 給予後的血漿藥物濃度，表示代謝增加，而吸收減少。

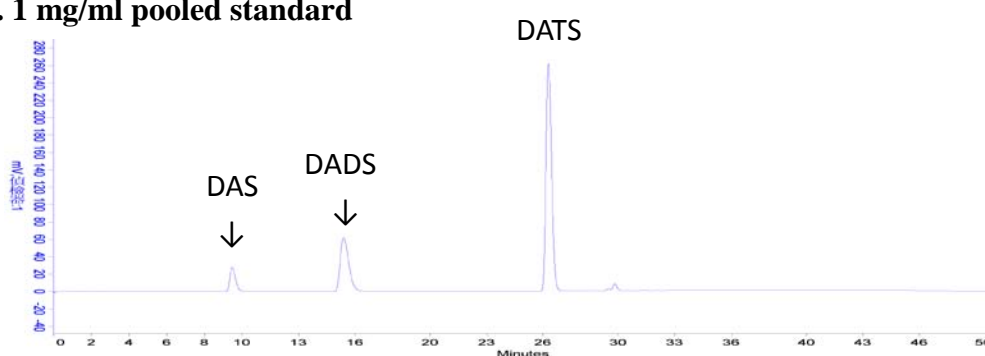


表一、以 HPLC/UV 測定大蒜精油中含硫化合物之含量

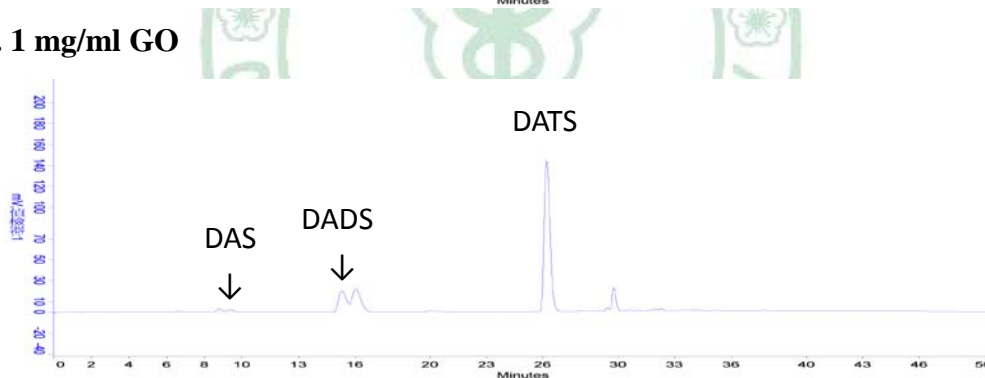
Table 1. Diallyl sulfides content in garlic oil (GO) by HPLC/UV.

Diallyl sulfides	(g/g GO)
DAS	0.08
DADS	0.28
DATS	0.52

A. 1 mg/ml pooled standard



B. 1 mg/ml GO



圖一、HPLC/UV 測定大蒜精油中含硫化合物之層析圖

Figure 1. HPLC/UV chromatograms of (A) 1 mg/ml pooled standard, (B) 1 mg/ml GO.

DAS, diallyl sulfide; DADS, diallyl disulfide; DATS, diallyl trisulfide.

表二、大蒜精油對大鼠體重、肝臟重、肺臟重之影響

Table 2. Body weight and liver and lung tissue weights in rats dosed with garlic oil for 5 days or 4 weeks.

Diet	5 days			4 weeks		
	Con	Low GO	High GO	Con	Low GO	High GO
Initial body weight (g)	251 ± 20.3	251 ± 7.7	251 ± 4.3	235 ± 3.6	235 ± 4.9	236 ± 6.1
Final body weight (g)	278 ± 18.4 ^a	270 ± 5.0 ^a	235 ± 9.5 ^b	406 ± 16.5 ^a	396 ± 29.7 ^a	371 ± 14.3 ^b
Liver weight (g)	8.5 ± 0.6	8.0 ± 0.5	8.5 ± 0.6	11.1 ± 0.7	11.6 ± 0.8	11.4 ± 1.0
Relative liver weight (g/100g BW)	3.1 ± 0.1 ^a	3.0 ± 0.1 ^b	3.6 ± 0.2 ^b	2.7 ± 0.1 ^a	2.9 ± 0.2 ^{ab}	3.1 ± 0.2 ^b
Lung weight (g)	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.4	1.6 ± 0.4	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.1
Relative lung weight (g/100g BW)	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0

Values are mean±SD (n=5). GO, garlic oil; Low GO, 50 mg/kg; High GO, 200 mg/kg.

^{ab}Values not sharing an alphabetic letter are significantly different ($p < 0.05$).



表三、大蒜精油投予五天或四週對大鼠肝功能指標之影響

Table 3. Changes of hepatic function index in rats dosed with garlic oil for 5 days or 4 weeks.

Diet	5 days			4 weeks		
	Con	Low GO	High GO	Con	Low GO	High GO
AST	18.2 ± 2.2	18.6 ± 3.0	20.1 ± 2.7	23.2 ± 4.8	33.3 ± 22.2	21.0 ± 1.7
ALT	12.4 ± 2.6	11.1 ± 2.7	10.3 ± 2.5	10.0 ± 3.7	13.1 ± 4.0	11.6 ± 0.7

Values are mean±SD (n=5). GO, garlic oil; AST, Aspartate aminotransaminase; ALT,

Alanine aminotransaminase; Low GO, 50 mg/kg; High GO, 200 mg/kg.



表四、大蒜精油處理五天與四週後對大鼠肝臟酵素活性之影響*

Table 4. Effect of garlic oil on rat hepatic drug-metabolizing enzyme activities.

Enzymes	Five days			Four weeks		
	Con	Low GO	High GO	Con	Low GO	High GO
Total P450	387 ± 93.3 ^a	487 ± 160 ^{ab}	675 ± 140 ^b	517 ± 111 ^a	816 ± 149 ^b	822 ± 254 ^b
Cytochrome b5	279 ± 59.8	221 ± 30.4	237 ± 87.2	315 ± 56.9	304 ± 84.1	251 ± 85.4
NADPH-CYP450 reductase	40.9 ± 7.3	37.4 ± 7.9	36.0 ± 7.8	37.0 ± 4.2	34.4 ± 4.8	37.5 ± 8.8
Ethoxyresorufin O-deethylase (CYP1A1)	56.5 ± 10.4 ^a	62.0 ± 8.2 ^a	76.3 ± 10.0 ^b	43.9 ± 17.4 ^a	65.0 ± 22.1 ^a	130 ± 31.7 ^b
Methoxyresorufin O-deethylase (CYP1A2)	58.6 ± 10.0 ^a	44.4 ± 5.0 ^b	51.7 ± 9.7 ^{ab}	39.4 ± 11.6	36.5 ± 10.4	48.9 ± 10.1
Pentoxoresorufin O-deethylase (CYP2B1)	16.5 ± 1.1 ^a	23.1 ± 7.2 ^{ab}	30.8 ± 6.7 ^b	12.7 ± 3.9 ^a	18.7 ± 6.0 ^a	69.3 ± 17.1 ^b
Diclofenac 4-hydroxylase (CYP2C)	183 ± 12.4 ^a	171 ± 26.4 ^{ab}	150 ± 17.7 ^b	101 ± 14.1	101 ± 22.1	123 ± 22.2
Testosterone 6β-hydroxylase (CYP3A)	593 ± 114	625 ± 92.2	456 ± 265	571 ± 245 ^a	596 ± 241 ^a	904 ± 202 ^b
Dextromethorphan O-demethylase (CYP 2D6)	138 ± 44.5	157 ± 40.5	153 ± 19.0	158 ± 7.3 ^a	183 ± 18.2 ^a	237 ± 39.4 ^b
σ-Nitrophenol hydroxylase (CYP 2E1)	402 ± 95.3 ^a	302 ± 14.0 ^b	281 ± 54.7 ^b	490 ± 115 ^a	340 ± 38.5 ^b	391 ± 61.5 ^b
UDP-glucosyl transferase (UGT)	2.1 ± 0.3 ^a	2.5 ± 0.1 ^{ab}	2.8 ± 0.7 ^b	1.6 ± 0.2 ^a	2.5 ± 0.4 ^b	3.6 ± 0.8 ^c

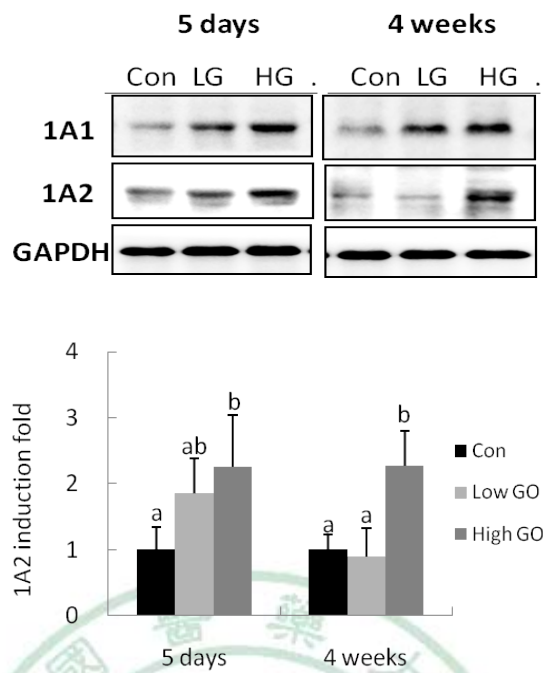
*Rats were orally administered (ig) with corn oil (Con) or garlic oil (GO) in dose of 50 mg/kg (Low GO) or 200 mg/kg (High GO) for 5 days or 4 weeks. Microsomal enzyme activities were determined by LC/MS. Enzyme specific activities: CYP, pmol/min/mg protein; NADPH-CYP450 reductase and UGT, nmol/min/mg protein. The contents of total P450 and cytochrome b5 and c are expressed as pmol/mg protein. Values are mean±SD (n=4~5).^{abc} Values not sharing the same letters differ significantly ($p<0.05$).

表五、大蒜精油處理對大鼠小腸酵素活性之影響

Table 5. Effect of garlic oil on rat intestinal drug-metabolizing enzyme activities*.

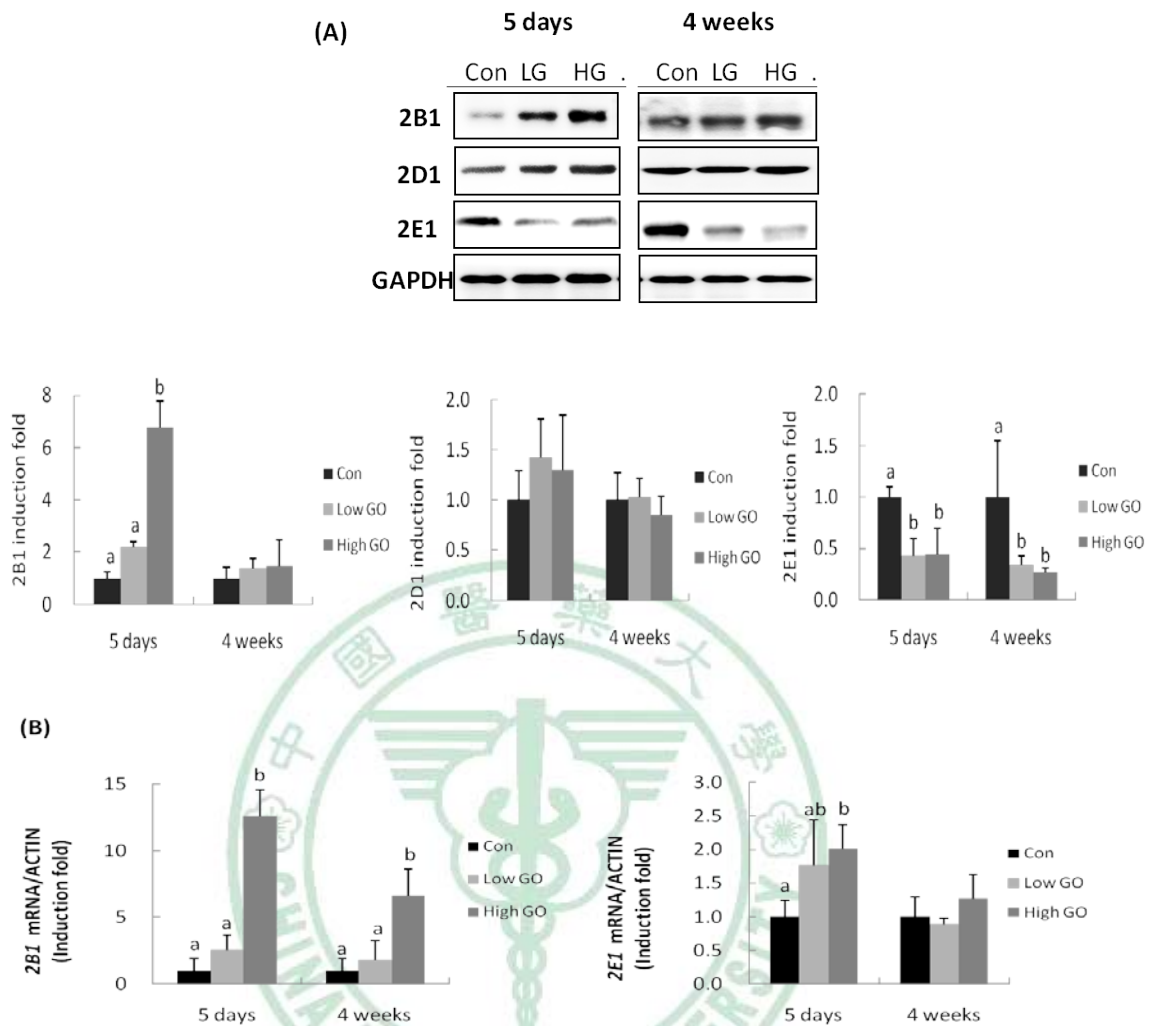
Enzymes	5 days			4 weeks		
	Con	Low GO	High GO	Con	Low GO	High GO
Diclofenac 4-hydroxylase (CYP2C)	1.1 ± 0.4	1.1 ± 0.4	1.0 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.5 ± 0.3
Testosterone 6β-hydroxylase (CYP3A)	4.3 ± 1.6	5.4 ± 2.7	9.5 ± 4.7	26 ± 15.9	40 ± 13.0	26 ± 6.9
Midazolam 1-hydroxylase (CYP3A)	7.1 ± 4.3	10 ± 2.8	15 ± 7.0	17 ± 7.4	25 ± 13.6	26 ± 7.1
UDP-glucurosyltransferase (UGT)	4.8 ± 1.2 ^a	13 ± 3.7 ^b	15 ± 4.9 ^b	3.6 ± 2.0 ^a	7.7 ± 3.7 ^{ab}	11 ± 5.0 ^b

*Rats were orally administered (ig) with corn oil (Con) or garlic oil (GO) in dose of 50 mg/kg (Low GO) or 200 mg/kg (High GO) for 5 days or 4 weeks. Microsomal enzyme activities were determined by LC/MS. Enzyme specific activities are pmol/min/mg protein for CYP2C and 3A and nmol/min/mg protein for UGT. Values are mean±SD (n=4~5). ^{ab}Values not sharing the same letters differ significantly ($p < 0.05$).



圖二、大蒜精油對大鼠肝臟 CYP1A1/2 蛋白質表現之影響

Figure 2. Effect of garlic oil on rat hepatic CYP1A1/2 protein levels. Rats were orally administered (ig) with corn oil (Con) or garlic oil (GO) in a dose of 50 mg/kg (Low GO) or 200 mg/kg (High GO) for 5 days or 4 weeks. A total of 10 μ g microsomal protein was used for Western blot analysis. Protein levels in control rats were set at 1. Values are mean \pm SD (n=4~5). ^{ab}Values not sharing the same letters differ significantly ($p<0.05$).



圖三、大蒜精油對大鼠肝臟 CYP2B1、2D1 與 2E1 蛋白質(A)與 mRNA (B)表現之影響

Figure 3. Effect of garlic oil on rat hepatic CYP2B1, 2D1 and 2E1 protein (A) and

mRNA (B) levels. Rats were orally administered (ig) with corn oil (Con) or garlic oil

(GO) in a dose of 50 mg/kg (Low GO) or 200 mg/kg (High GO) for 5 days or 4 weeks. A

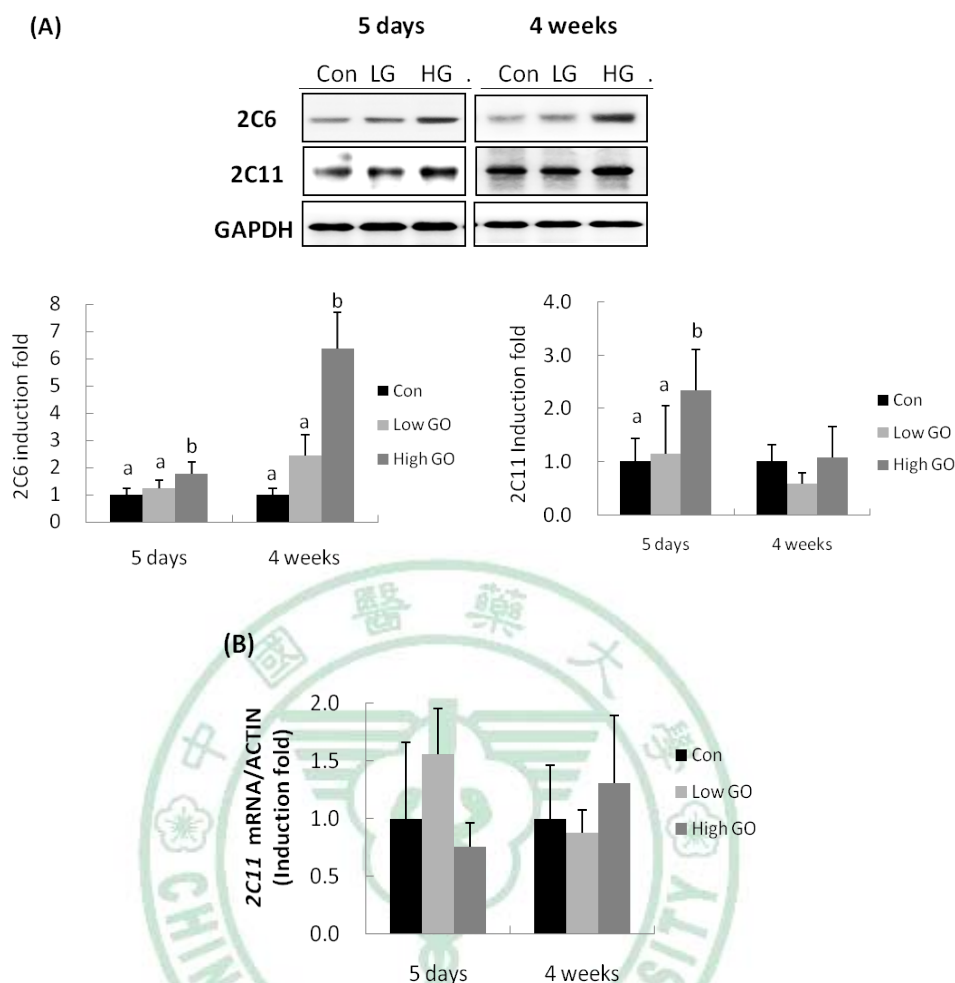
total of 10 μ g microsomal protein was used for Western blot analysis. Changes of

CYP2B1 and 2E1 and β -actin mRNA levels were determined by real-time PCR as

described in Materials and Methods. Protein and mRNA levels in control rats were set at

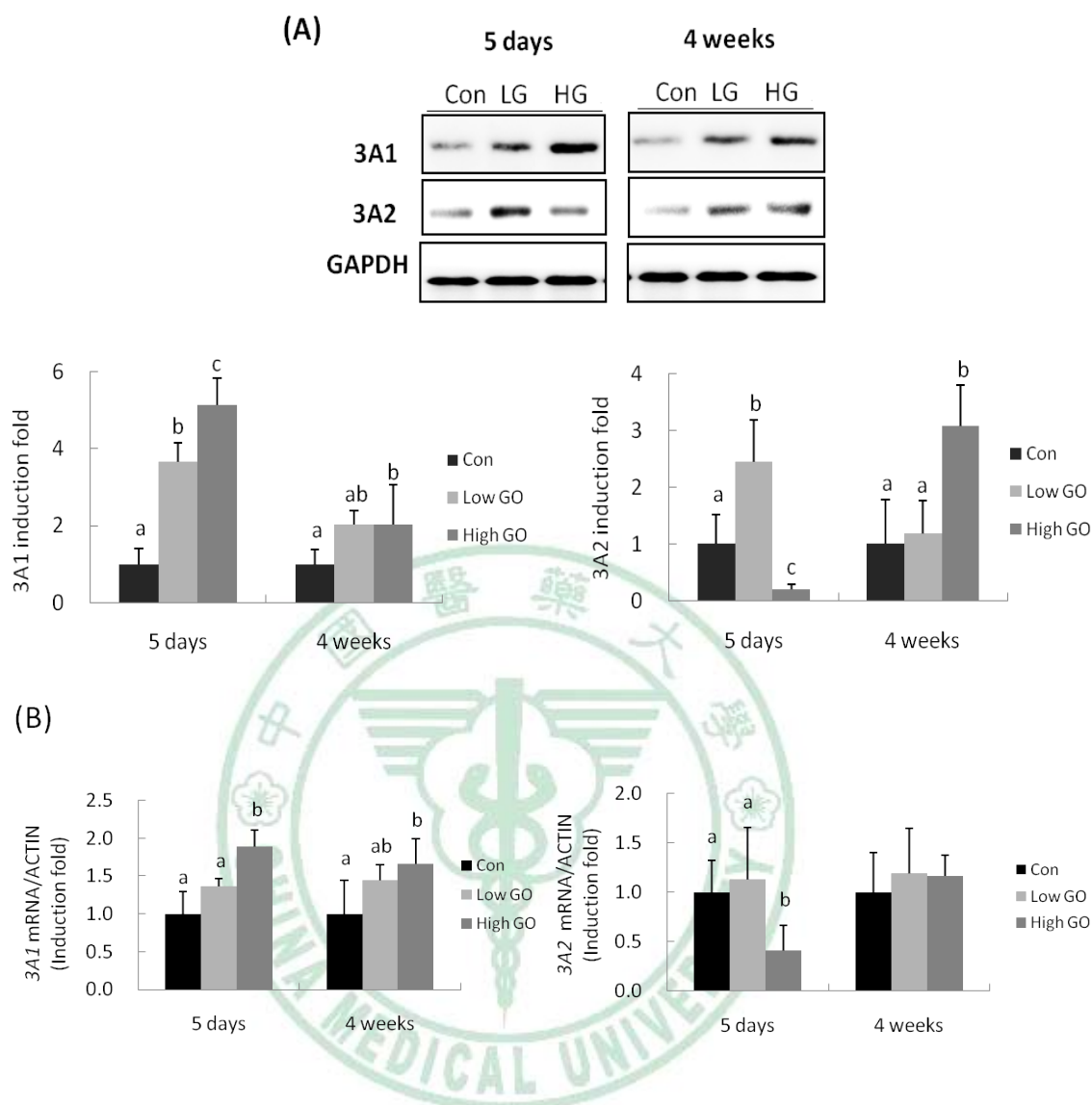
1. Values are mean \pm SD (n=4~5). ^{ab}Values not sharing the same letters differ significantly

($p < 0.05$).



圖四、大蒜精油對大鼠肝臟 CYP2C6 與 2C11 蛋白質(A)與 mRNA (B)表現之影響

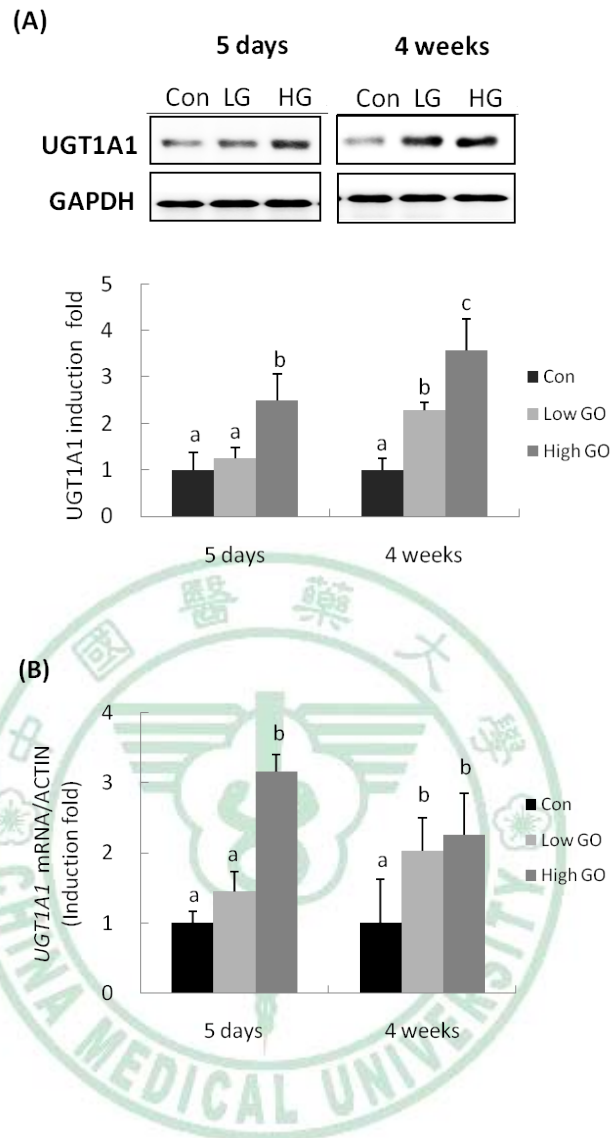
Figure 4. Effect of garlic oil on rat hepatic CYP2C6 and 2C11 protein (A) and mRNA (B) levels. Rats were orally administered (ig) with corn oil (Con) or garlic oil (GO) in a dose of 50 mg/kg (Low GO) or 200 mg/kg (High GO) for 5 days or 4 weeks. A total of 10 μ g microsomal protein was used for Western blot analysis. Changes of CYP2C11 and β -actin mRNA levels were determined by real-time PCR as described in Materials and Methods. Protein and mRNA levels in control rats were set at 1. Values are mean \pm SD (n=4~5). ^{ab}Values not sharing the same letters differ significantly ($p<0.05$).



圖五、大蒜精油對大鼠肝臟 CYP3A1/2 蛋白質(A)與 mRNA (B)表現之影響

Figure 5. Effect of garlic oil on rat hepatic CYP3A1/2 protein (A) and mRNA (B)

levels. Rats were orally administered (ig) with corn oil (Con) or garlic oil (GO) in a dose of 50 mg/kg (Low GO) or 200 mg/kg (High GO) for 5 days or 4 weeks. A total of 10 μ g microsomal protein was used for Western blot analysis. Changes of CYP3A1 and 3A2 and β -actin mRNA levels were determined by real-time PCR as described in Materials and Methods. Protein and mRNA levels in control rats were set at 1. Values are mean \pm SD (n=4~5). ^{abc}Values not sharing the same letters differ significantly ($p < 0.05$).



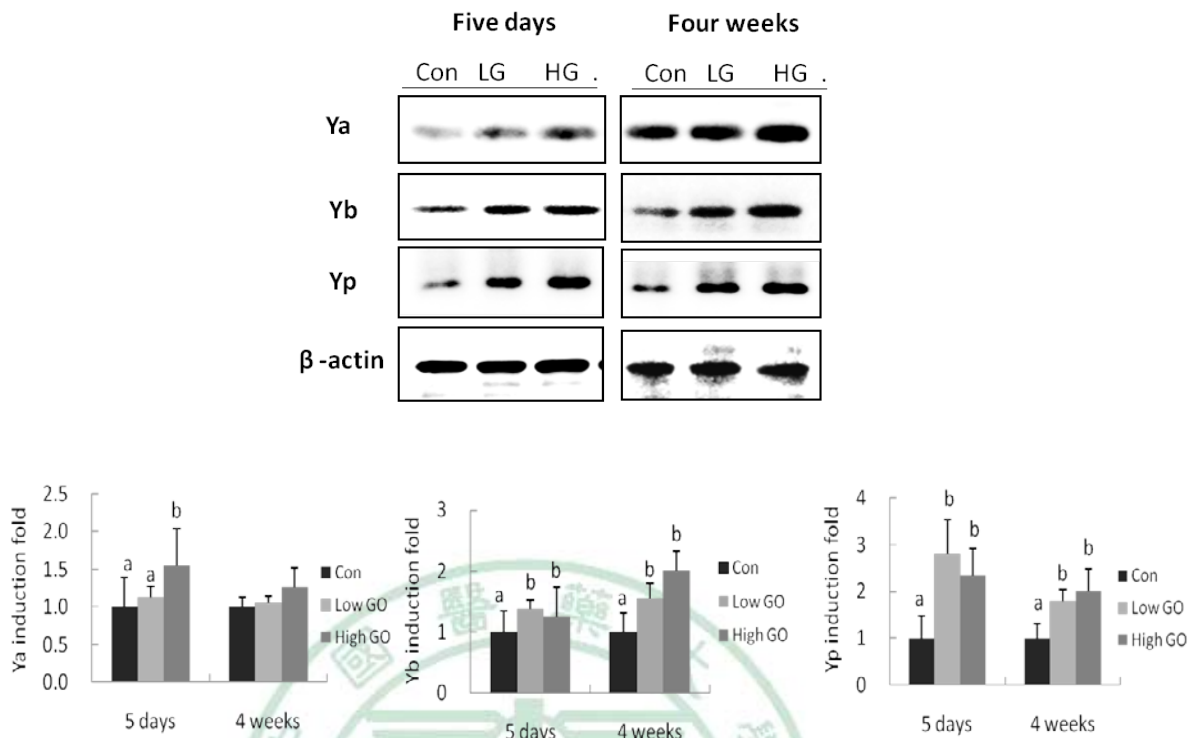
圖六、大蒜精油對大鼠肝臟 UGT1A1 蛋白質(A)與 mRNA(B)表現之影響

Figure 6. Effect of GO on UGT1A1 protein (A) and mRNA (B) expression in rat

livers. Rats were orally administered (ig) with corn oil (Con) or garlic oil (GO) in a dose of 50 mg/kg (Low GO) or 200 mg/kg (High GO) for 5 days or 4 weeks. A total of 10 μ g microsomal protein was used for Western blot analysis. Changes of UGT1A1 and β -actin mRNA levels were determined by real-time PCR as described in Materials and Methods.

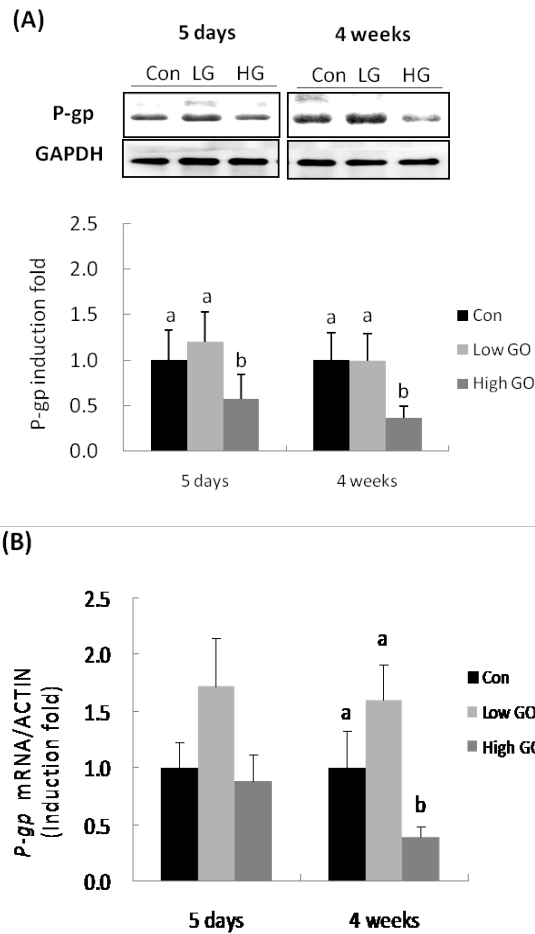
Protein and mRNA levels in control rats were set at 1. Values are mean \pm SD (n=4~5).

^{abc}Values not sharing the same letters differ significantly ($p<0.05$).



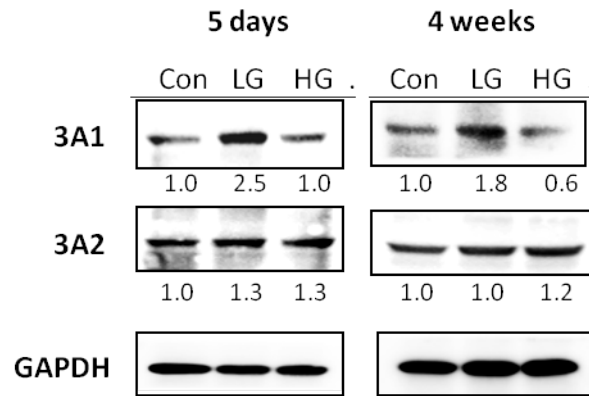
圖七、大蒜精油對大鼠肝臟 GSTs 蛋白質表現之影響

Figure 7. Effect of GO on GSTs protein expression in rat livers. Rats were orally administered (ig) with corn oil (Con) or garlic oil (GO) in a dose of 50 mg/kg (Low GO) or 200 mg/kg (High GO) for 5 days or 4 weeks. A total of 10 μ g cytosol protein was used for Western blot analysis. Protein levels in control rats were set at 1. Values are mean \pm SD (n=4~5). ^{ab}Values not sharing the same letters differ significantly ($p < 0.05$). Ya, GST- α ; Yb, GST- μ ; Yp, GST- π .



圖八、大蒜精油對大鼠肝臟 P-glycoprotein 蛋白質(A)與 mRNA (B)表現之影響

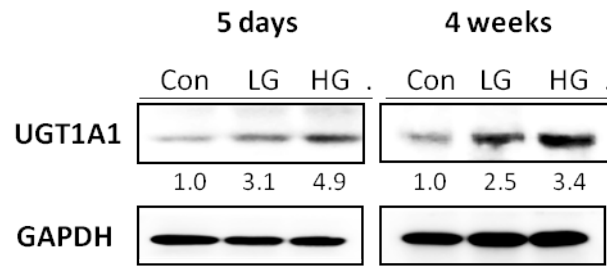
Figure 8. Effect of garlic oil on P-glycoprotein protein (A) and mRNA (B) levels in rat livers. Rats were orally administered (ig) with corn oil (Con) or garlic oil (GO) in a dose of 50 mg/kg (Low GO) or 200 mg/kg (High GO) for 5 days or 4 weeks. A total of 50 μ g protein was used for Western blot analysis. Changes of P-glycoprotein (P-gp) and β -actin mRNA levels were determined by real-time PCR as described in Materials and Methods. Protein and mRNA levels in control rats were set at 1. Values are mean \pm SD (n=4~5). ^{ab}Values not sharing the same letters differ significantly ($p < 0.05$).



圖九、大蒜精油對大鼠小腸 CYP3A1 與 3A2 蛋白質表現之影響

Figure 9. Effect of garlic oil on rat intestinal CYP3A1 and 3A2 protein expression.

Rats were orally administered (ig) with corn oil (Con) or garlic oil (GO) in a dose of 50 mg/kg (Low GO) or 200 mg/kg (High GO) for 5 days or 4 weeks. Equal amount of microsomal protein from each rat in the same treatment was pooled, and a total of 100 µg pooled protein (n=4-5) was used for Western blot analysis. The level in control rats was set at 1.



圖十、大蒜精油對大鼠小腸之 UGT1A1 蛋白質表現

Figure 10. Effect of GO on phase II enzyme-UGT1A1 protein expression in rat

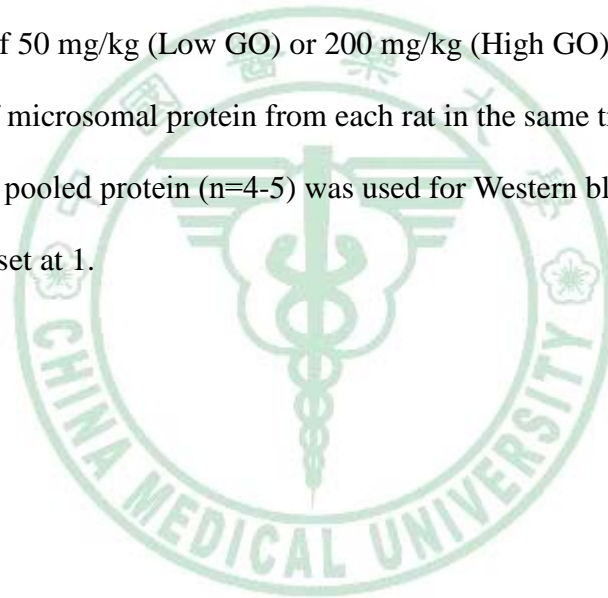
intestine microsomes. Rats were orally administered (ig) with corn oil (Con) or garlic oil

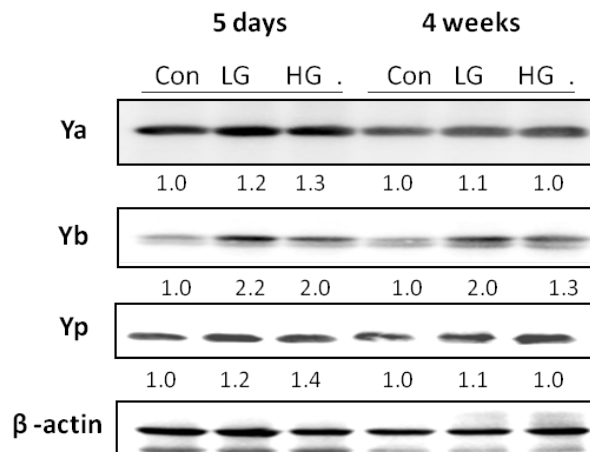
(GO) in a dose of 50 mg/kg (Low GO) or 200 mg/kg (High GO) for 5 days or 4 weeks.

Equal amount of microsomal protein from each rat in the same treatment was pooled, and

a total of 100 µg pooled protein (n=4-5) was used for Western blot analysis. The level in

control rats was set at 1.



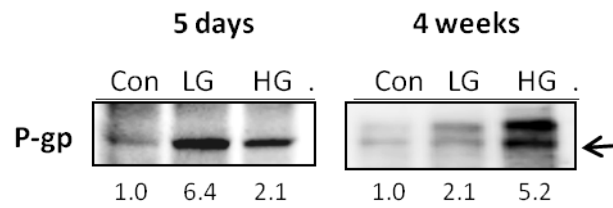


圖十一、大蒜精油對大鼠小腸之 GSTs 蛋白質表現

Figure 11. Effect of GO on Phase II enzyme—GSTs protein expression in rat

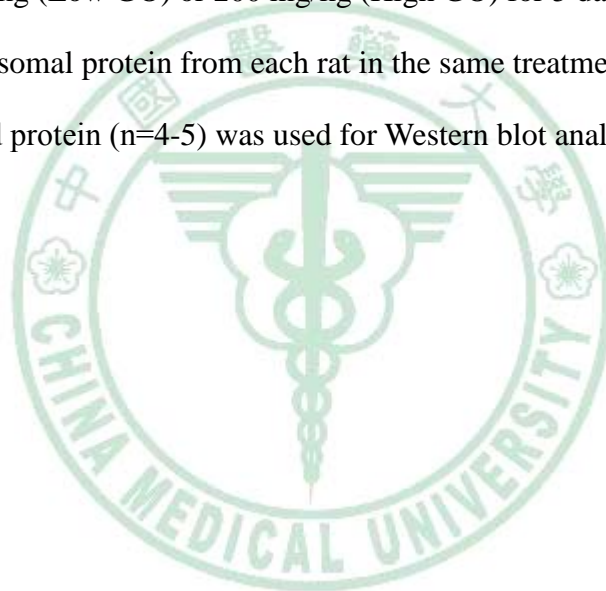
intestine microsomes. Rats were orally administered (ig) with corn oil (Con) or garlic oil (GO) in a dose of 50 mg/kg (Low GO) or 200 mg/kg (High GO) for 5 days or 4 weeks.

Equal amount of microsomal protein from each rat in the same treatment was pooled, and a total of 100 μ g pooled protein (n=4-5) was used for Western blot analysis. The level in control rats was set at 1. Ya, GST- α ; Yb, GST- μ ; Yp, GST- π .



圖十二、大蒜精油對大鼠小腸之 P-gp 蛋白質表現

Figure 12. Effect of GO on phase III enzyme-P-gp protein expression in rat intestine microsomes. Rats were orally administered (ig) with corn oil (Con) or garlic oil (GO) in a dose of 50 mg/kg (Low GO) or 200 mg/kg (High GO) for 5 days or 4 weeks. Equal amount of microsomal protein from each rat in the same treatment was pooled, and a total of 100 μ g pooled protein (n=4-5) was used for Western blot analysis. The level in control rats was set at 1.



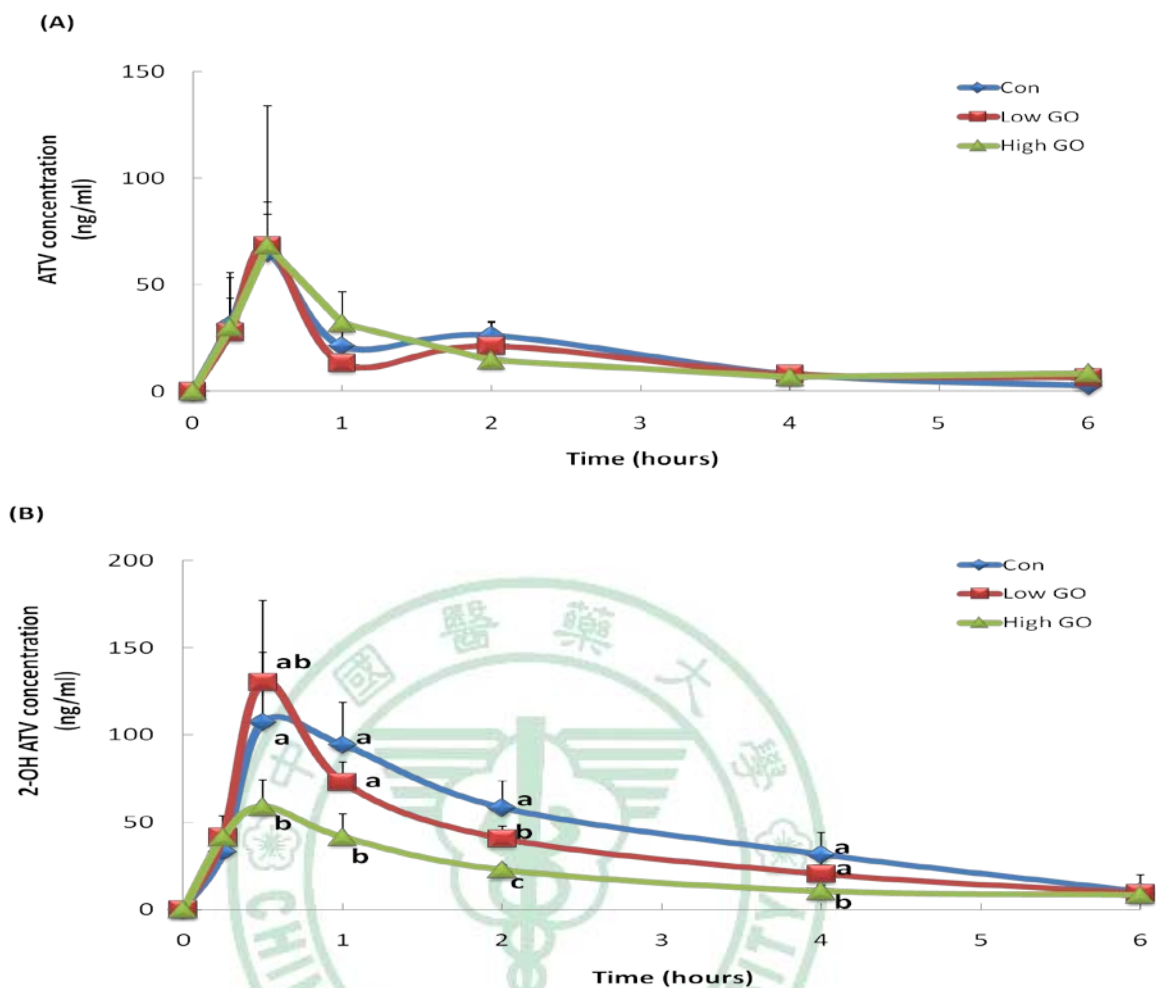
表六、大蒜精油處理五天與四週對血漿中 atorvastatin (ATV)與 2-hydroxy atorvastatin (2-OH ATV)對藥物動力學參數之影響*

Table 6. Effects of garlic oil on pharmacokinetic patterns of plasma atorvastatin (ATV) and 2-hydroxy atorvastatin (2-OH ATV)*.

	5 days			4 weeks		
	Con	Low GO	High GO	Con	Low GO	High GO
ATV						
AUC, ng/ml x h	106.7 ± 17.7 ^a	95.2 ± 25.2 ^{ab}	73.1 ± 10.2 ^b	76.3 ± 21.5 ^a	58.9 ± 33.8 ^a	18.0 ± 12.4 ^b
Cmax, ng/ml	64.7 ± 19.8	70.8 ± 22.6	55.3 ± 63.8	57.8 ± 12.8 ^{ab}	88.3 ± 35.5 ^a	12.9 ± 1.6 ^b
Tmax, min	30.0 ± 0.0	36 ± 13.4	30.0 ± 0.0	30.0 ± 0.0	30.0 ± 0.0	30.0 ± 0.0
2-OH ATV						
AUC, ng/ml x h	289.9 ± 61.4 ^a	238.0 ± 61.3 ^a	118.8 ± 23.7 ^b	286.4 ± 89.6 ^a	198.4 ± 50.4 ^{ab}	114.0 ± 50.1 ^b
Cmax, ng/ml	109.2 ± 39.6 ^{ab}	138.2 ± 52.6 ^a	58.9 ± 15.4 ^b	106.5 ± 41.8 ^{ab}	115.1 ± 38.8 ^a	38.4 ± 4.4 ^b
Tmax, min	42.0 ± 16.4	36 ± 13.4	30.0 ± 0.0	42.0 ± 16.4	48 ± 16.4	42.0 ± 0.3

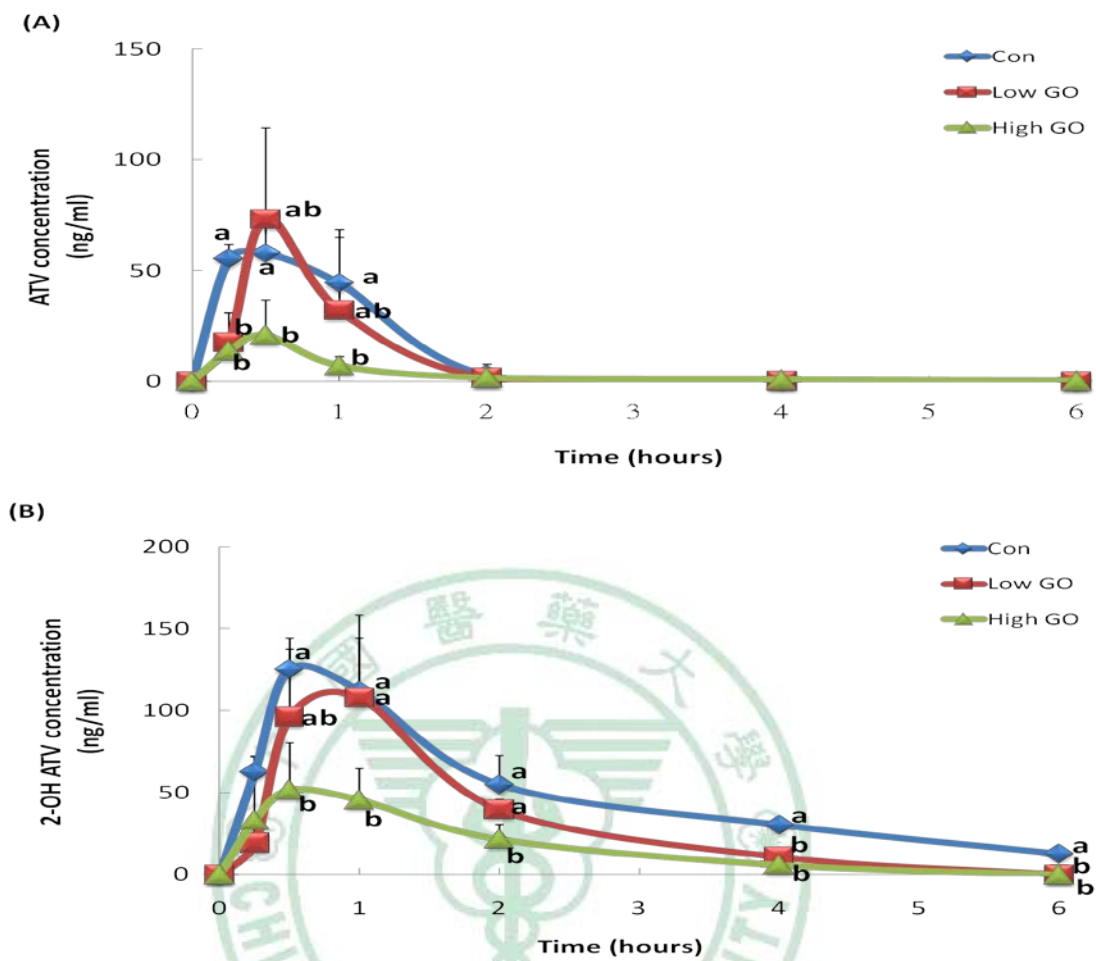
*Rats were orally administered (ig) with corn oil (Con) or garlic oil (GO) in a dose of 50 mg/kg (Low GO) or 200 mg/kg (High GO) for 5 days or 4 weeks. At the next day of the final dosage of garlic oil, atorvastatin (10 mg/kg) was orally administered to rats. Blood samples were collected at different time intervals over a 6-h period. Plasma ATV and 2-OH ATV were determined by LC/MS. Values were the mean±SD (n=4~5).

^{ab}Values not sharing the same letters differ significantly ($p < 0.05$).



圖十三、大蒜精油處理五天對大鼠血漿 atorvastatin (ATV)和 2-hydroxy atorvastatin (2-OH ATV)濃度之變化

Figure 13. Effects of 5-d garlic oil treatment on plasma concentrations of atorvastatin (ATV) and 2-hydroxy atorvastatin (2-OH ATV). Rats were orally administered (ig) with corn oil (Con) or garlic oil (GO) in a dose of 50 mg/kg (Low GO) or 200 mg/kg (High GO) for 5 days. At day 6, atorvastatin (10 mg/kg) was orally administered to rats. Blood samples were collected at different time intervals over a 6-h period. Plasma ATV and 2-OH ATV were determined by LC/MS. Values in each time point are mean±SD (n=4~5). ^{abc}Values not sharing the same letters differ significantly ($p<0.05$).



圖十四、四週的大蒜精油處理對大鼠血漿 atorvastatin (ATV)和 2-hydroxy atorvastatin (2-OH ATV)濃度之變化

Figure 14. Effects of 4-week garlic oil treatment on plasma concentrations of atorvastatin (ATV) and 2-hydroxy atorvastatin (2-OH ATV). Rats were orally administered (ig) with corn oil (Con) or garlic oil (GO) in a dose of 50 mg/kg (Low GO) or 200 mg/kg (High GO) for 4 weeks. At the next day of the final dosage of garlic oil, atorvastatin (10 mg/kg) was orally administered to rats. Blood samples were collected at different time intervals over a 6-h period. Plasma ATV and 2-OH ATV were determined by LC/MS. Values in each time points are expressed as the mean±SD (n=4~5). ^{abc}Values not sharing the same letters differ significantly ($p < 0.05$).

第五章、討論

從營養保健角度來看，蔬果除了可以提供必須營養素外，蔬果之中另存在著眾多具有價值的天然植物化學成分(phytochemicals)，比如：多酚類(phenols)、黃酮類(flavonoids)、有機硫化物(organosulfur compounds, OSCs)、吲哚類(indoles)等。蔥蒜屬植物(allium)，比如大蒜、洋蔥、青蔥等，即以富含 OSCs 著稱，以萃取自新鮮大蒜的大蒜精油為例，它就含有數十種具特殊風味的揮發性有機硫化合物，又以 DAS、DADS 以及 DATS 這三個各擁有二個烯丙基的硫化物最具代表性，一般認為它們也是大蒜生理活性的主要活性成份。不少流行病學調查、人體介入實驗或動物實驗都證實，大蒜可有效降低血中膽固醇和三酸甘油酯的能力，因此被認為在預防心血管疾病和高血壓等慢性疾病上極具潛力，事實上大蒜相關產品也是目前市場上熱銷的保健食品，可以想像應該有不少人會將之和降血脂質的藥物共同使用。因此本實驗主要目的是探討大蒜精油對藥物代謝酵素之間影響的效應，並藉此影響觀察大蒜精油和降血脂藥物共同服用後，是否影響藥物在體內的藥物動力學參數。

本實驗結果顯示，大鼠體重在 200 mg/kg 高劑量大蒜精油灌食下將受到影響(表二)，連續五天灌食使得高劑量組體重顯著低於控制組(278 vs. 235 g)，然而延長灌食時間到四週，體重減輕現象並未加劇，反而縮小(406 vs. 371 g)，顯示高劑量大蒜精油對大鼠體重影響應屬初期現象；另在臟器重量上，肝臟相對重量比也因體重降低，使得高劑量組明顯高於控制組。至於 50 mg/kg 低劑量大蒜精油則不影響體重變化和肝臟相對重量比。大蒜精油的可能毒性曾有類似報導，Davenport and Wargovich 於 2005 年發表的研究報告中即指出，當大鼠給予大蒜精油硫化物 DAS (200 mg/kg) 四週後，大鼠體重與控制組相比減少 16%，且於八週犧牲時，也觀察到肝臟腫大現象，但給予 allyl methyl sulfide (AMS) 200 mg/kg，並不影響大鼠體重與肝重比，因此作者認為這可能是 DAS 產生肝毒性所致(Davenport and Wargovich, 2005)。但在本實驗中，無論是五天或四週處理，由大鼠血液中 AST 與 ALT 兩項生化指標在三組間並

無差異的結果看來(表三)，大蒜精油雖使得大鼠體重低於對照組，但應未對肝臟造成損傷，因此推測造成大鼠體重下降的原因可能和大蒜精油的刺激性有關，因此影響了腸胃道的吸收等功能，事實上，在動物犧牲時的確觀察到高劑量大蒜精油組大鼠之小腸黏膜呈現發炎現象。已知油溶性含硫化合物具有刺激性與致過敏的特性，其中以 DAS 最容易引起過敏現象(Papageorgiou et al., 1983)。Imada (1990)也指出，allicin 是生大蒜中主要的刺激物，而油溶性含硫化合物比水溶性含硫化合物更具毒性，但是當大蒜經過合適的提煉將可降低毒性(Imada, 1990)。此外，曾有研究比較不同方式製備的大蒜對腸黏膜的傷害，結果發現生大蒜粉造成的腸黏膜損傷最嚴重，煮熟大蒜的傷害次之，相對地，後熟大蒜最安全，不易造成任何不適現象(Hoshino et al., 2001)。

哺乳動物體內的藥物代謝系統一般分為 phase I、II 及 III，分別藉著 phase I 酵素將外來物質或內生性親脂性受質予以氧化(oxidation)、還原(reduction)或水解(hydrolysis)，轉變為更具極性(親水性或親電子性)的代謝產物，再利用 phase II 酵素的結合水溶性小分子作用，增加產物的水溶性，最後則經由細胞膜上的多種 phase III 運送蛋白，將經 phase I 和 II 酵素作用後生成的產物送出胞外。因此藉由這些酵素和運送蛋白的參與，將能加速藥物排出體外的速率，避免殘留體內。本實驗針對數種藥物代謝酵素在肝臟和小腸組織間是否受到大蒜精油的影響進行分析，結果發現肝臟的 CYP1A、2B、UGT1A1 酵素活性在五天和四週期實驗中皆呈劑量關係增加，且蛋白質與 RT-PCR 的結果相似。至於五天實驗中 CYP2C 以及五天或四週實驗中 CYP2E 皆受到大蒜精油處理下而抑制酵素活性的表現。此外，肝臟中 P-gp 蛋白質與 mRNA 也在高劑量大蒜精油組中表現下降；值得注意的是，雖 CYP2C 活性因大蒜精油處理而減少，但 CYP2C6 蛋白質含量卻是增加，而 2E1 則是在大蒜精油處理下，無論高低劑量或長短時間處理，蛋白質表現與酵素活性變化一致，均顯著減少，然而 2E1 mRNA 表現在五天處理條件下，卻是表現增加；至於小腸中我們僅測得

CYP3A1/2、UGT、GSTs 與 P-gp 的酵素或蛋白質表現，結果與肝臟測得的結果相似，其中 CYP3A 酵素活性有增加趨勢，CYP3A1 蛋白質表現在低劑量大精油處理下也是增加，UGT1A1 酵素活性和蛋白質表現、P-gp 蛋白質表現無論處理時間長短皆呈劑量關係增加。這些結果顯示大蒜精油給予大鼠五天後即可影響肝臟和小腸組織中藥物代謝能力，而且此一效應可持續至 4 週後；除 CYP2C 與 2E 外，多數 phase I 和 II 酵素活性暨蛋白質/mRNA 表現都因大蒜精油而增加。

大蒜硫化物是否能被吸收、其體內生物可利用率(bioavailability)都是探討大蒜生理活性的重要依據，Amagase (2006)給予小鼠口服 10 mg alliin，10分鐘後，估計攝入的 alliin 在胃、小腸、肝臟的分佈比例分別約有 7.2%、22.4% 及 2.5% (Amagase, 2006)；Lachmann 等人(1994)也發現，當大鼠以口服方式給予 60 mg/kg alliin，分析四小時後血漿中 alliin 濃度，據此估計 alliin 的生物可利用率約僅為 16.5% (Lachmann et al., 1994)。影響大蒜含硫成份生物可利用率的因素很多，比如小腸吸收率、體內代謝速率、清除率等，以參與小腸吸收率和清除率的膜上 membrane transporters 為例，Berginc 等人(2010)證實 SAC、DADS、methyl disulfide、allyl methyl disulfide 等大蒜硫化物會增加腸組織中分泌型 membrane transporters (P-gp 和 MDR2) 與吸收型 (monocarboxylate transporter 1 和 organic anion transporter polypeptide) 的活性，因此增加 Rho123 的排出 (efflux)，影響了藥物在小腸的吸收；該作者進一步測試後熟大蒜水萃物對小腸(十二指腸和空腸)排出不同藥物之影響，結果也指出後熟大蒜水萃物顯著增加空腸對 lorsatan、atorvastatin、pravastatin 的通透率(permeability)，同時 atorvastatin 在十二指腸的通透率也因後熟大蒜水萃物處理而增加(Berginc et al., 2010)。根據 Wu 和 Benet (2005)的報告，Atorvastatin 在 Biopharmaceutics Classification System (BCS) 藥物分類系統中被歸為 class II，具有低溶解性與高滲透性的特性，主要透過藥物代謝酵素作用，並透過 efflux transporter 運出胞外，所以小腸 apical efflux transporters (如：P-gp 和 MDR2) 活性高低將影響藥物的吸收和進入體內的多寡，至於肝臟 efflux transporters 活

性高低則影響藥物的清除(Wu and Benet, 2005)。根據上述研究的證據，或許可推測本實驗之大蒜精油給予後改變ATV於血中濃度，可能與大蒜精油增加小腸P-gp的表現，同時也抑制了肝臟P-gp的表現有關。

實驗中也發現有些酵素的活性分析結果與其蛋白質或mRNA表現並不是完全一致，以CYP2C9為例，Diclofenac和testosterone分別被選為CYP2C和CYP3A受質，並以Diclofenac 4-hydroxylase和testosterone 6 β -hydroxylase反應速率作為CYP2C和CYP3A活性代表，雖然diclofenac和testosterone的確是常被選為CYP2C和CYP3A的代表受質，但仍無法排除diclofenac和testosterone被其他CYP酵素代謝的可能性，所以依此測得酵素活性結果仍有可能和特定CYPs蛋白質及mRNA的表現有所出入。另一有趣的發現是大鼠肝臟CYP2E1 mRNA表現和其蛋白質含量及酵素活性變化並不一致，大蒜精油抑制了CYP2E1蛋白質與酵素活性，然而2E1 mRNA表現卻因為大蒜精油處理而增加，這不一致的結果可能和Ingelman-Sundberg提出CYP2E1的表現可受到多重機制所調控有關，除了發生在常見的轉錄階段外，也會發生在轉錄後修飾、轉譯以及轉譯後修飾等階段(Ingelman-Sundberg, 2004)，比如在acetoacetate (AA)處理下，AA除透過PI3K/AKT/mTOR/p70s6k (p70 ribosome S6 kinase)訊號路徑抑制其轉錄作用外，AA也同時降低CYP2E1蛋白質的降解(Abdelmegeed et al., 2005)；在穩定轉染大鼠CYP2E1的倉鼠纖維母細胞V79中，也有學者發現chlormethiazole (催眠鎮靜藥)會抑制CYP2E1的表現，作用機轉除了CMZ抑制轉錄活性外，也有部分因酵素結構的不穩定使其對轉譯後修飾具有高度的親和性(Simi and Ingelman-Sundberg, 1999)。此外，大蒜的衍生物幾乎都可競爭性抑制CYP2E1的表現，但DAS代謝產物為diallyl sulfoxide (DASO)與diallyl sulfone(DASO₂)，其中DASO₂的抑制作用更為快速與顯著，而抑制CYP2E1的機制為mechanism-based inactivation (Jin and Baillie, 1997)。因此推測大蒜精油可能增加CYP2E1的轉錄作用，但後續的轉譯或轉譯後修飾作用可能受阻，因此無法生成蛋白質，又或是CYP2E1的抑制作用

是直接作用在酵素活性結構的層面上；進一步利用細胞實驗，或許有助於釐清大蒜精油對CYP2E1此一特定酵素的真正作用機轉。

近年來也有不少研究利用細胞模式探討大蒜精油調控藥物代謝酵素基因轉錄的作用機轉，以phase II酵素為例：在大鼠clone 9肝細胞株中，DADS以及DATS上調GSTP的基因轉錄作用，即被證實和ERK和JNK訊號路徑有關，因而活化了轉錄因子AP-1與GSTP基因啟動區上GPE I結合(Tsai et al., 2007)等。也有相關的文獻已知調控phase I表現的轉錄因子依各個家族而有所差異，其中CYP3A為大部分藥物代謝的主要酵素，已知當PXR/RXR形成heterodimer後，最後結合到PXRRE (PXR response element)上，進而向上調節CYP3A基因的轉錄作用(Waxman, 1999)。大蒜精油誘發CYP2B1的表現與轉錄因子CAR被活化有關(Fisher et al., 2007)；Zhang等人(2006)也指出，大鼠給予0.8 mg/g DAS處理後，會使得CAR由細胞質中轉移至核內，因此增加CAR與CYP2B1/2 promoter上的NR1 binding element的結合，因此上調了CYP2B1/2的基因轉錄作用(Zhang et al., 2006)。

由於大蒜精油能上調多數的大鼠肝臟暨小腸組織藥物代謝酵素的活性和基因表現，因此大蒜精油和藥物共用時，藥物在體內的動力學參數確實可能因大蒜精油而發生變化。由於大蒜常應用在降血脂，因此本實驗藉由常見的降血膽固醇臨床藥物atorvastatin (ATV)，欲進一步了解兩者間是否存在著交互作用。ATV 是目前臨床上普遍使用的降膽固醇藥物，對全身 HMG-CoA 還原酶活性抑制力約可達 30%，根據 IPI-193 (2001)指出，ATV 口服後，會被快速吸收，大約在服用後 1-2 小時內即可達最高血漿濃度，且 ATV 吸收量和血漿濃度都與 ATV 劑量呈正相關；ATV 之絕對生體可利用率僅約為 14%，生體可利用率偏低原因可能為腸黏膜吸收進入體內前便將其清除，或肝臟首度代謝效應(first pass effect)所致。ATV 進入體內後，通常會被代謝為 ortho- (2-OH ATV)和 para-hydroxylated (4-OH ATV)衍生物以及各種 β -氧化產物，這些代謝產物和 ATV 一樣仍擁有抑制 HMG-CoA 還原酶活性的能力，估計約有

70%被抑制的 HMG-CoA 還原酶活性是來自這些具活性之 ATV 代謝產物。人體 ATV 平均血漿排除半衰期約為 14 小時，但因為 ATV 代謝物仍具有抑制活性，所以對 HMG-CoA 還原酶抑制活性之半衰期可長達 20-30 小時。結果發現，無論預處理大蒜精油五天或四週，大蒜精油均以劑量關係降低 ATV 和其代謝產物 2-OH ATV 之藥物血中濃度曲線下面積(AUC_{0-6h}) (表六)，這與大鼠肝臟與小腸中主要負責代謝 ATV 的 CYP3A 和 UGT 皆因大蒜精油處理而增加一致。除血中藥物濃度 AUC 此一參數外，血中藥物最高濃度(C_{max})及最高濃度出現時間(T_{max})雖未因大蒜精油處理而顯著減少，但高劑量大蒜精油處理組 ATV 與 2-OH ATV 的 C_{max} 仍傾向低於對照組，5 天處理的 ATV 與 2-OH ATV 分別是 64.7 vs. 55.3 ng/mL 和 57.8 vs. 12.9 ng/mL，4 週處理的 ATV 與 2-OH ATV 分別是 109.2 vs. 58.8 ng/mL 和 106.5 vs. 38.4 ng/mL (表六)，此外在藥物代謝上最高濃度(C_{max})出現時間(T_{max})平均在 40-60 分鐘之間，影響小腸的吸收或代謝，使藥物動力學在前段藥物血中顯著降低，並增加肝臟 CYP 藥物代謝酶的作用，導致藥物停留於體內之時間縮短進而減弱藥效。由於 ATV 與 2-OH ATV 血中濃度曲線下面積下降也可能與藥物清除率或小腸吸收有關，所以 P-gp 的表現或許可部分解釋此一現象，由於 P-gp 主要扮演細胞膜上的運輸角色，小腸表現增加，表示藥物被腸細胞吸收將減少，肝臟表現增加，可能表示藥物的代謝物被肝細胞排出將加速。實驗結果發現，投予 50 或 200 mg/kg 大蒜精油後，小腸 P-gp 蛋白質含量都明顯高於對照組大鼠(圖十三)，顯示大蒜精油可能使得小腸細胞減少讓 ATV 和 2-OH ATV 進入血液循環系統；然而大蒜精油對肝臟 P-gp 蛋白質含量的影響則與小腸相反，無論五天或四週處理，高劑量大蒜精油組大鼠肝臟 P-gp 蛋白質表現明顯低於對照組(圖九)，暗示肝細胞將 ATV 代謝產物排出胞外速率將減緩，進一步分析肝組織中 ATV 代謝產物含量將有助於回答此一問題。除此之外，如能配合尿液和膽汁收集，分析其中 ATV 代謝產物濃度，相信將能更深入了解大蒜精油改變 ATV 藥物動力學的作用機轉。

針對大蒜是否會與藥物產生交互作用這一課題，雖已有討論，但相關文獻仍不多見，且實驗結果也未有結論，例如：大蒜和 warfarin 一起使用後，可能延長血液凝集時間並延長 INR (International normalized ratio)，因此增加手術後出血機率及自發性脊髓硬腦膜上血腫等問題(Vaes and Chyka, 2000)；另一有九位自願者參與的實驗中，每次服用 1200 mg 大蒜萃取物，每天三次，21 天後發現大蒜萃取物將降低 saquinavir(蛋白質酶抑制劑)的血漿藥物濃度(Plosker and Scott, 2003)；在 Lin 等人的動物實驗中，他們也認為大蒜精油硫化物 DAS 的代謝產物 diallyl sulfone 可以減少 acetaminophen (解熱鎮痛藥)所造成之肝毒性，這與 diallyl sulfone 抑制 CYP2E1 活性有關(Lin et al., 1996)。此外也有大蒜不影響藥物動力學的實驗，曾有研究證實每日給予乳腺癌但無其他疾病的病人 600 mg 大蒜萃取物，含有 3.6 mg 的 allicin，為期 17 天，結果並不影響 docetaxel (抗腫瘤藥物)的藥物動學(Cox et al., 2006)。



第六章、結論

根據實驗結果證實，大蒜精油處理下可顯著降低大鼠血漿中 atorvastatin 與其代謝物 2-hydroxy atorvastatin 的藥物濃度，主要經由調節藥物代謝酵素與膜轉運蛋白之酵素、蛋白質與 mRNA 的表現。因此推論，大蒜精油如與 ATV 共同服用下，可能與 ATV 的代謝產生交互作用，進而降低 ATV 降血膽固醇之藥效。



參考文獻

- 行政院衛生署 (2010). 十大死因統計資料.
- 沈立言 (2004). 大蒜與健康. 科學發展月刊 384 期, 24-29 頁.
- 林君榮 (2005). 臨床前藥物動力學試驗-特定標的之新藥開發 第九章 127-142.
- 蔡慧珊 (2004). Statins 類藥物在臨床使用之考量. 成醫藥誌 14, 3-6.
- 許苑培 (2009). 品種性狀、生理特性與栽培管理. 行政院農業委員會桃園區農業改良場, 9-14.
- Abdelmegeed, M.A., Carruthers, N.J., Woodcroft, K.J., Kim, S.K., and Novak, R.F. (2005). Acetoacetate induces CYP2E1 protein and suppresses CYP2E1 mRNA in primary cultured rat hepatocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 315, 203-213.
- Abe, T., Kakyo, M., Tokui, T., Nakagomi, R., Nishio, T., Nakai, D., Nomura, H., Unno, M., Suzuki, M., Naitoh, T., *et al.* (1999). Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *The Journal of biological chemistry* 274, 17159-17163.
- Ackermann, R.T., Mulrow, C.D., Ramirez, G., Gardner, C.D., Morbidoni, L., and Lawrence, V.A. (2001). Garlic shows promise for improving some cardiovascular risk factors. *Archives of internal medicine* 161, 813-824.
- Amagase, H. (2006). Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *The Journal of nutrition* 136, 716S-725S.
- Asdaq, S.M., and Inamdar, M.N. (2009). The potential for interaction of hydrochlorothiazide with garlic in rats. *Chemico-biological interactions* 181, 472-479.
- Banerjee, S.K., Mukherjee, P.K., and Maulik, S.K. (2003). Garlic as an antioxidant: the good, the bad and the ugly. *Phytotherapy Research* 17, 97-106.
- Berginc, K., Zakelj, S., and Kristl, A. (2010). In vitro interactions between aged garlic extract and drugs used for the treatment of cardiovascular and diabetic patients. *European journal of nutrition* 49, 373-384.
- Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 272, 20313-20316.
- Bertilsson, G., Heidrich, J., Svensson, K., Asman, M., Jendeberg, L., Sydow-Backman, M., Ohlsson, R., Postlind, H., Blomquist, P., and Berkenstam, A. (1998). Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 12208-12213.

- Bertz, R.J., and Granneman, G.R. (1997). Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clinical pharmacokinetics* 32, 210-258.
- Bock, K.W. (2003). Vertebrate UDP-glucuronosyltransferases: functional and evolutionary aspects. *Biochemical pharmacology* 66, 691-696.
- Borek, C. (2001). Antioxidant health effects of aged garlic extract. *The Journal of nutrition* 131, 1010S-1015S.
- Burke, M.D., Thompson, S., Weaver, R.J., Wolf, C.R., and Mayer, R.T. (1994). Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochemical pharmacology* 48, 923-936.
- Chao, C.Y., Lii, C.K., Tsai, I.T., Li, C.C., Liu, K.L., Tsai, C.W., and Chen, H.W. (2011). Andrographolide Inhibits ICAM-1 Expression and NF-kappaB Activation in TNF-alpha-Treated EA.hy926 Cells. *Journal of agricultural and food chemistry*.
- Chen, C.W., and Ho, C.T. (1998). Thermal Degradation of Allyl Isothiocyanate in Aqueous Solution. *Journal of agricultural and food chemistry* 46, 220-223.
- Chen, Y., Shertzer, H.G., Schneider, S.N., Nebert, D.W., and Dalton, T.P. (2005). Glutamate cysteine ligase catalysis: dependence on ATP and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels. *The Journal of biological chemistry* 280, 33766-33774.
- Clark, J.E., Foresti, R., Sarathchandra, P., Kaur, H., Green, C.J., and Motterlini, R. (2000). Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *American journal of physiology* 278, H643-651.
- Congiu, M., Mashford, M.L., Slavin, J.L., and Desmond, P.V. (2002). UDP glucuronosyltransferase mRNA levels in human liver disease. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 30, 129-134.
- Cox, M.C., Low, J., Lee, J., Walshe, J., Denduluri, N., Berman, A., Permenter, M.G., Petros, W.P., Price, D.K., Figg, W.D., *et al.* (2006). Influence of garlic (*Allium sativum*) on the pharmacokinetics of docetaxel. *clinical cancer research* 12, 4636-4640.
- Dahan, A., Sabit, H., and Amidon, G.L. (2009). Multiple efflux pumps are involved in the transepithelial transport of colchicine: combined effect of p-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 2 leads to decreased intestinal absorption throughout the entire small intestine. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 37, 2028-2036.
- Dalton, T.P., Dieter, M.Z., Yang, Y., Shertzer, H.G., and Nebert, D.W. (2000).

- Knockout of the mouse glutamate cysteine ligase catalytic subunit (Gclc) gene: embryonic lethal when homozygous, and proposed model for moderate glutathione deficiency when heterozygous. *Biochemical and biophysical research communications* 279, 324-329.**
- Davenport, D.M., and Wargovich, M.J. (2005). Modulation of cytochrome P450 enzymes by organosulfur compounds from garlic. *Food and Chemical Toxicology* 43, 1753-1762.**
- Emoto, C., Yamazaki, H., Yamasaki, S., Shimada, N., Nakajima, M., and Yokoi, T. (2000). Characterization of cytochrome P450 enzymes involved in drug oxidations in mouse intestinal microsomes. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 30, 943-953.**
- Evans, V. (2000). Herbs and the brain: friend or foe? The effects of ginkgo and garlic on warfarin use. *Journal of Neuroscience Nursing* 32, 229-232.**
- Evans, W.E., and Relling, M.V. (1999). Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science (New York, NY)* 286, 487-491.**
- Fang, Y.Z., Yang, S., and Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* 18, 872-879.**
- Farghali, H., Cerny, D., Kamenikova, L., Martinek, J., Horinek, A., Kmonickova, E., and Zidek, Z. (2009). Resveratrol attenuates lipopolysaccharide-induced hepatitis in D-galactosamine sensitized rats: role of nitric oxide synthase 2 and heme oxygenase-1. *Nitric Oxide* 21, 216-225.**
- Farombi, E.O., and Surh, Y.J. (2006). Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *Journal of biochemistry and molecular biology* 39, 479-491.**
- Fisher, C.D., Augustine, L.M., Maher, J.M., Nelson, D.M., Slitt, A.L., Klaassen, C.D., Lehman-McKeeman, L.D., and Cherrington, N.J. (2007). Induction of drug-metabolizing enzymes by garlic and allyl sulfide compounds via activation of constitutive androstane receptor and nuclear factor E2-related factor 2. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 35, 995-1000.**
- Franke, R.M., Gardner, E.R., and Sparreboom, A. (2010). Pharmacogenetics of drug transporters. *Current pharmaceutical design* 16, 220-230.**
- Franklin, C.C., Backos, D.S., Mohar, I., White, C.C., Forman, H.J., and Kavanagh, T.J. (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Molecular Aspects of Medicine* 30, 86-98.**
- Goard, C.A., Mather, R.G., Vinepal, B., Clendening, J.W., Martirosyan, A., Boutros,**

- P.C., Sharom, F.J., and Penn, L.Z. (2010). Differential interactions between statins and P-glycoprotein: implications for exploiting statins as anticancer agents. *International journal of cancer* 127, 2936-2948.
- Gottesman, M.M., and Pastan, I. (1993). Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual review of biochemistry* 62, 385-427.
- Griffith, O.W., and Mulcahy, R.T. (1999). The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 73, 209-267, xii.
- Gruber, F., Mayer, H., Lengauer, B., Mlitz, V., Sanders, J.M., Kadl, A., Bilban, M., de Martin, R., Wagner, O., Kensler, T.W., *et al.* (2010). NF-E2-related factor 2 regulates the stress response to UVA-1-oxidized phospholipids in skin cells. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 39-48.
- Gu, Y.Z., Hogenesch, J.B., and Bradfield, C.A. (2000). The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annual review of pharmacology and toxicology* 40, 519-561.
- Guengerich, F.P. (2004). Cytochrome P450: what have we learned and what are the future issues? *Drug metabolism reviews* 36, 159-197.
- Gurley, B.J., Gardner, S.F., Hubbard, M.A., Williams, D.K., Gentry, W.B., Cui, Y., and Ang, C.Y. (2002). Cytochrome P450 phenotypic ratios for predicting herb-drug interactions in humans. *Clinical pharmacology and therapeutics* 72, 276-287.
- Gurley, B.J., Gardner, S.F., Hubbard, M.A., Williams, D.K., Gentry, W.B., Cui, Y., and Ang, C.Y. (2005). Clinical assessment of effects of botanical supplementation on cytochrome P450 phenotypes in the elderly: St John's wort, garlic oil, Panax ginseng and Ginkgo biloba. *Drugs & aging* 22, 525-539.
- Hagenbuch, B., and Meier, P.J. (2003). The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochimica et biophysica acta* 1609, 1-18.
- Hajda, J., Rentsch, K.M., Gubler, C., Steinert, H., Stieger, B., and Fattinger, K. (2010). Garlic extract induces intestinal P-glycoprotein, but exhibits no effect on intestinal and hepatic CYP3A4 in humans. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 41, 729-735.
- Halliwell, B., and Cross, C.E. (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 10, 5-12.

- Han, D., Sen, C.K., Roy, S., Kobayashi, M.S., Tritschler, H.J., and Packer, L. (1997a). Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells by thiol antioxidants. *Am J Physiol* 273, R1771-1778.
- Han, D., Sen, C.K., Roy, S., Kobayashi, M.S., Tritschler, H.J., and Packer, L. (1997b). Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells by thiol antioxidants. *American journal of physiology* 273, R1771-1778.
- Hanioka, N., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Nishimura, T., and Ando, M. (2001). Determination of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 activity in human and rat liver microsomes by HPLC with UV detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 25, 65-75.
- Hankinson, O. (1994). The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon receptor action. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 5, 240-244.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., and Jowsey, I.R. (2005). Glutathione transferases. *Annual review of pharmacology and toxicology* 45, 51-88.
- Hediger, M.A., Romero, M.F., Peng, J.B., Rolfs, A., Takanaga, H., and Bruford, E.A. (2004). The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins Introduction. *Pflugers Arch* 447, 465-468.
- Hoffman, E.C., Reyes, H., Chu, F.F., Sander, F., Conley, L.H., Brooks, B.A., and Hankinson, O. (1991). Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science (New York, NY)* 252, 954-958.
- Hoshino, T., Kashimoto, N., and Kasuga, S. (2001). Effects of garlic preparations on the gastrointestinal mucosa. *The Journal of nutrition* 131, 1109S-1113S.
- Hukkanen, J. (2000). Xenobiotic-metabolizing cytochrome p450 enzymes in human lung. Department of Pharmacology and Toxicology, University of Oulu.
- Idriss, N.K., Blann, A.D., and Lip, G.Y. (2008). Hemoxygenase-1 in cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology* 52, 971-978.
- Imada, O. (1990). Toxicity aspects of garlic. First World Congress on the Health Significance of Garlic and Garlic Constituents. Nutrition International Irvine, CA 47.
- IMS Health. (2010)
<http://www.imshealth.com/portal/site/imshealth/menuitem.a46c6d4df3db4b3d88f611019418c22a/?vgnnextoid=3a4d5e0108d88210VgnVCM10000ed152ca2RCRD&vgnnextfmt=default>. MIDAS.
- Ingelman-Sundberg, M. (2004). Human drug metabolising cytochrome P450

- enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 369, 89-104.
- IPI-193. (2001) <http://www.ktgh.com.tw/Public/tbDrug/200812188367055.pdf>
- Irene Lelekis, P.D.c. (2008). Alternative medicines update: a focus on the most common products your patients are using. *PharmaNote* 23, 1-7.
- Jancova, P., Anzenbacher, P., and Anzenbacherova, E. (2010). Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 154, 103-116.
- Jin, L., and Baillie, T.A. (1997). Metabolism of the chemoprotective agent diallyl sulfide to glutathione conjugates in rats. *Chemical research in toxicology* 10, 318-327.
- Jonker, J.W., Buitelaar, M., Wagenaar, E., Van Der Valk, M.A., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Plosch, T., Kuipers, F., Elferink, R.P., Rosing, H., *et al.* (2002). The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15649-15654.
- Kanazawa, H., Okada, A., Igarashi, E., Higaki, M., Miyabe, T., Sano, T., and Nishimura, R. (2004). Determination of midazolam and its metabolite as a probe for cytochrome P450 3A4 phenotype by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography* 1031, 213-218.
- Klein, T.E., Chang, J.T., Cho, M.K., Easton, K.L., Ferguson, R., Hewett, M., Lin, Z., Liu, Y., Liu, S., Oliver, D.E., *et al.* (2001). Integrating genotype and phenotype information: an overview of the PharmGKB project. *Pharmacogenetics Research Network and Knowledge Base. The pharmacogenomics journal* 1, 167-170.
- Knapen, M.F., Zusterzeel, P.L., Peters, W.H., and Steegers, E.A. (1999). Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 82, 171-184.
- Kobayashi, K., Urashima, K., Shimada, N., and Chiba, K. (2002). Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: screening with cDNA-expressed systems of the rat. *Biochemical pharmacology* 63, 889-896.
- Lachmann, G., Lorenz, D., Radeck, W., and Steiper, M. (1994). The pharmacokinetics of the S35 labeled labeled garlic constituents alliin, allicin and vinylidithiine. *Arzneimittel-Forschung* 44, 734-743.
- Lawson, L.D. (1996). The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. In: Koch, H.P., Lawson, L.D.(Eds.), *Garlic The Science and Therapeutic*

Application of *Allium sativum* L. and related species. Williams and Wilkins Press, USA, pp.37-107.

- Lin, J.H., and Yamazaki, M. (2003). Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clinical pharmacokinetics* 42, 59-98.
- Lin, M.C., Wang, E.J., Patten, C., Lee, M.J., Xiao, F., Reuhl, K.R., and Yang, C.S. (1996). Protective effect of diallyl sulfone against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Journal of biochemical toxicology* 11, 11-20.
- Lu, S.C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular aspects of medicine* 30, 42-59.
- Lu, S.C., Bao, Y., Huang, Z.Z., Sarthy, V.P., and Kannan, R. (1999). Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression in retinal Muller cells by oxidative stress. *Investigative ophthalmology & visual science* 40, 1776-1782.
- Mackenzie, P.I., Owens, I.S., Burchell, B., Bock, K.W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D.W., Iyanagi, T., *et al.* (1997). The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7, 255-269.
- Manson, M.M., Ball, H.W., Barrett, M.C., Clark, H.L., Judah, D.J., Williamson, G., and Neal, G.E. (1997). Mechanism of action of dietary chemoprotective agents in rat liver: induction of phase I and II drug metabolizing enzymes and aflatoxin B1 metabolism. *Carcinogenesis* 18, 1729-1738.
- Markowitz, J.S., Devane, C.L., Chavin, K.D., Taylor, R.M., Ruan, Y., and Donovan, J.L. (2003). Effects of garlic (*Allium sativum* L.) supplementation on cytochrome P450 2D6 and 3A4 activity in healthy volunteers. *Clinical pharmacology and therapeutics* 74, 170-177.
- MedlinePlus. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/natural/300.html>.
- Meech, R., and Mackenzie, P.I. (1997). Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 24, 907-915.
- Minamino, T., Christou, H., Hsieh, C.M., Liu, Y., Dhawan, V., Abraham, N.G., Perrella, M.A., Mitsialis, S.A., and Kourembanas, S. (2001). Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8798-8803.
- Mohammed Abdul, M.I., Jiang, X., Williams, K.M., Day, R.O., Roufogalis, B.D., Liauw, W.S., Xu, H., and McLachlan, A.J. (2008). Pharmacodynamic interaction

- of warfarin with cranberry but not with garlic in healthy subjects. *British journal of pharmacology* 154, 1691-1700.
- Mojarrabi, B., and Mackenzie, P.I. (1998). Characterization of two UDP glucuronosyltransferases that are predominantly expressed in human colon. *Biochemical and biophysical research communications* 247, 704-709.
- Moore, L.B., Parks, D.J., Jones, S.A., Bledsoe, R.K., Consler, T.G., Stimmel, J.B., Goodwin, B., Liddle, C., Blanchard, S.G., Willson, T.M., *et al.* (2000). Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *The Journal of biological chemistry* 275, 15122-15127.
- Omura, T., and Sato, R. (1964). The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *The Journal of biological chemistry* 239, 2370-2378.
- Paine, M.F., Hart, H.L., Ludington, S.S., Haining, R.L., Rettie, A.E., and Zeldin, D.C. (2006). The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 34, 880-886.
- Paine, M.F., Khalighi, M., Fisher, J.M., Shen, D.D., Kunze, K.L., Marsh, C.L., Perkins, J.D., and Thummel, K.E. (1997). Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 283, 1552-1562.
- Papageorgiou, C., Corbet, J.P., Menezes-Brandao, F., Pecegueiro, M., and Benezra, C. (1983). Allergic contact dermatitis to garlic (*Allium sativum* L.). Identification of the allergens: the role of mono-, di-, and trisulfides present in garlic. A comparative study in man and animal (guinea-pig). *Archives of dermatological research* 275, 229-234.
- Pfizer, Inc. <http://www.lipitor.com/aboutLipitor.aspx>.
- Phillips, A.H., and Langdon, R.G. (1962). Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: isolation, characterization, and kinetic studies. *The Journal of biological chemistry* 237, 2652-2660.
- Pichard-Garcia L, P.J.-M.M.P. (2000). Carotenoids activate PXR and are inducers of CYP2B6 and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture (abstract). 13th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 195.
- Piscitelli, S.C., Burstein, A.H., Welden, N., Gallicano, K.D., and Falloon, J. (2002). The effect of garlic supplements on the pharmacokinetics of saquinavir. *Clinical Infectious Diseases* 34, 234-238.
- Plosker, G.L., and Scott, L.J. (2003). Saquinavir: a review of its use in boosted

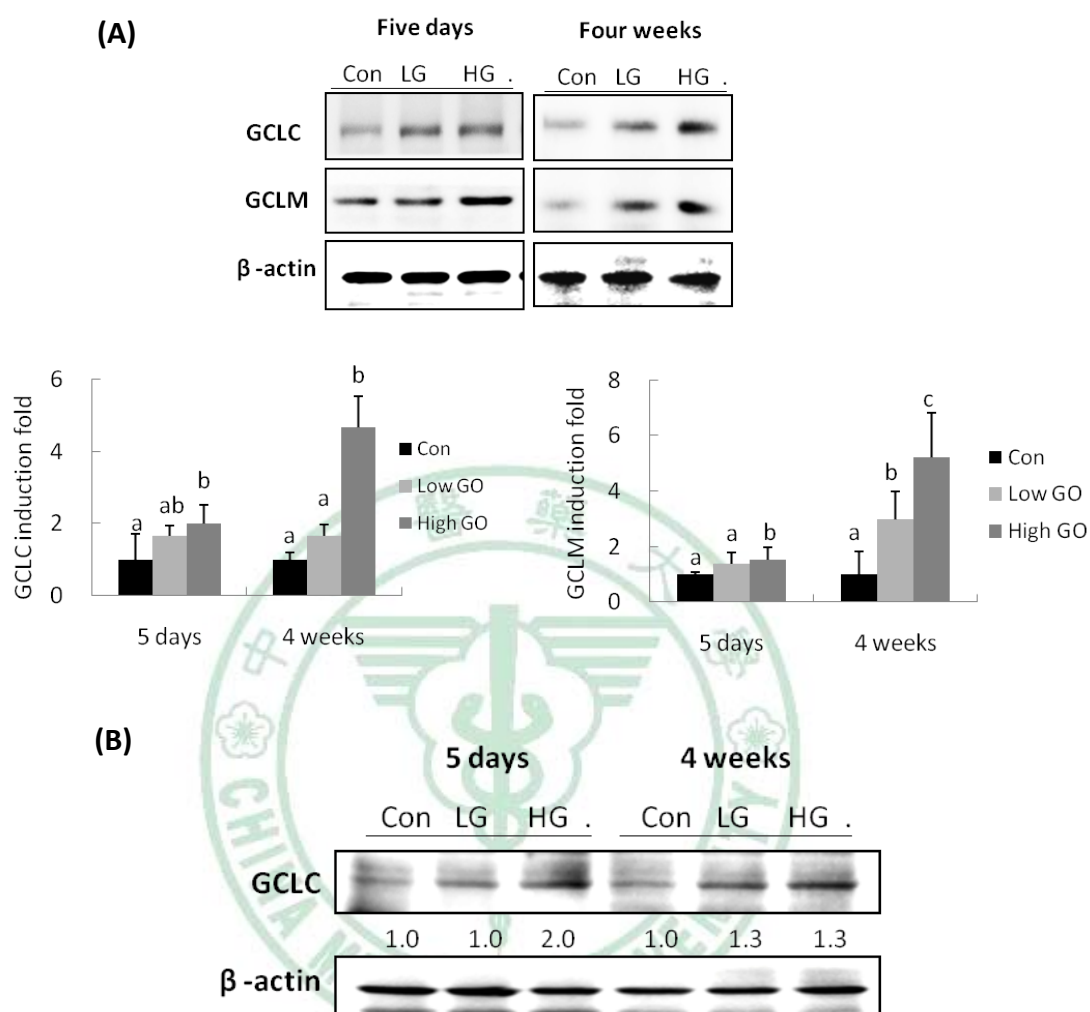
- regimens for treating HIV infection. *Drugs* 63, 1299-1324.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., and Casini, A.F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 66, 1499-1503.
- Pool-Zobel, B., Veeriah, S., and Bohmer, F.D. (2005). Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens -- focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mutation research* 591, 74-92.
- Quattrochi, L.C., Vu, T., and Tukey, R.H. (1994). The human CYP1A2 gene and induction by 3-methylcholanthrene. A region of DNA that supports AH-receptor binding and promoter-specific induction. *The Journal of biological chemistry* 269, 6949-6954.
- Reichel, C., Gao, B., Van Montfoort, J., Cattori, V., Rahner, C., Hagenbuch, B., Stieger, B., Kamisako, T., and Meier, P.J. (1999). Localization and function of the organic anion-transporting polypeptide Oatp2 in rat liver. *Gastroenterology* 117, 688-695.
- Rushmore, T.H., and Kong, A.N. (2002). Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Current drug metabolism* 3, 481-490.
- Schinkel, A.H., Mayer, U., Wagenaar, E., Mol, C.A., van Deemter, L., Smit, J.J., van der Valk, M.A., Voordouw, A.C., Spits, H., van Tellingen, O., *et al.* (1997). Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 4028-4033.
- Schinkel, A.H., Smit, J.J., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., van der Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., te Riele, H.P., *et al.* (1994). Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77, 491-502.
- Schmidt, J.V., and Bradfield, C.A. (1996). Ah receptor signaling pathways. *Annual review of cell and developmental biology* 12, 55-89.
- Seelig, G.F., Simonsen, R.P., and Meister, A. (1984). Reversible dissociation of gamma-glutamylcysteine synthetase into two subunits. *The Journal of biological chemistry* 259, 9345-9347.
- Sheen, L.Y., Lii, C.K., Sheu, S.F., Meng, R.H., and Tsai, S.J. (1996). Effect of the active principle of garlic--diallyl sulfide--on cell viability, detoxification

- capability and the antioxidation system of primary rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology* *34*, 971-978.
- Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y., and Guengerich, F.P. (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* *270*, 414-423.
- Simi, A., and Ingelman-Sundberg, M. (1999). Post-translational inhibition of cytochrome P-450 2E1 expression by chlomethiazole in Fao hepatoma cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* *289*, 847-852.
- Siow, R.C., Sato, H., and Mann, G.E. (1999). Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide? *Cardiovascular research* *41*, 385-394.
- Smit, J.W., Huisman, M.T., van Tellingen, O., Wiltshire, H.R., and Schinkel, A.H. (1999). Absence or pharmacological blocking of placental P-glycoprotein profoundly increases fetal drug exposure. *The Journal of clinical investigation* *104*, 1441-1447.
- Sole, M., and Livingstone, D.R. (2005). Components of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and 'NADPH-independent benzo[a]pyrene hydroxylase' activity in a wide range of marine invertebrate species. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* *141*, 20-31.
- Soltaninassab, S.R., Sekhar, K.R., Meredith, M.J., and Freeman, M.L. (2000). Multi-faceted regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase. *Journal of Cellular Physiology* *182*, 163-170.
- Sparreboom, A., van Asperen, J., Mayer, U., Schinkel, A.H., Smit, J.W., Meijer, D.K., Borst, P., Nooijen, W.J., Beijnen, J.H., and van Tellingen, O. (1997). Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 2031-2035.
- Sugiyama, T., Kubota, Y., Shinozuka, K., Yamada, S., Wu, J., and Umegaki, K. (2004). Ginkgo biloba extract modifies hypoglycemic action of tolbutamide via hepatic cytochrome P450 mediated mechanism in aged rats. *Life sciences* *75*, 1113-1122.
- Szafer, H., Jodynys-Liebert, J., Cichocki, M., Matuszewska, A., and Baer-Dubowska, W. (2003). Effect of naturally occurring plant phenolics on the induction of drug metabolizing enzymes by o-toluidine. *Toxicology* *186*, 67-77.

- Tang, Y.M., Wo, Y.Y., Stewart, J., Hawkins, A.L., Griffin, C.A., Sutter, T.R., and Greenlee, W.F. (1996). Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. *The Journal of biological chemistry* 271, 28324-28330.
- Tsai, C.W., Chen, H.W., Yang, J.J., Sheen, L.Y., and Lii, C.K. (2007). Diallyl disulfide and diallyl trisulfide up-regulate the expression of the pi class of glutathione S-transferase via an AP-1-dependent pathway. *Journal of agricultural and food chemistry* 55, 1019-1026.
- Tukey, R.H., and Strassburg, C.P. (2001). Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract. *Molecular pharmacology* 59, 405-414.
- Vachharajani, T.J., Work, J., Issekutz, A.C., and Granger, D.N. (2000). Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. *American journal of physiology* 278, H1613-1617.
- Vaes, L.P., and Chyka, P.A. (2000). Interactions of warfarin with garlic, ginger, ginkgo, or ginseng: nature of the evidence. *The Annals of pharmacotherapy* 34, 1478-1482.
- van Iersel, M.L., Verhagen, H., and van Bladeren, P.J. (1999). The role of biotransformation in dietary (anti)carcinogenesis. *Mutation research* 443, 259-270.
- van Tellingen, O. (2001). The importance of drug-transporting P-glycoproteins in toxicology. *Toxicology letters* 120, 31-41.
- Walsky, R.L., and Obach, R.S. (2004). Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 32, 647-660.
- Watkins, P.B., Wrighton, S.A., Schuetz, E.G., Molowa, D.T., and Guzelian, P.S. (1987). Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man. *The Journal of clinical investigation* 80, 1029-1036.
- Waxman, D.J. (1999). P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Archives of biochemistry and biophysics* 369, 11-23.
- Whitlock, J.P., Jr. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annual review of pharmacology and toxicology* 39, 103-125.
- Wijnholds, J., deLange, E.C., Scheffer, G.L., van den Berg, D.J., Mol, C.A., van der Valk, M., Schinkel, A.H., Scheper, R.J., Breimer, D.D., and Borst, P. (2000). Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and

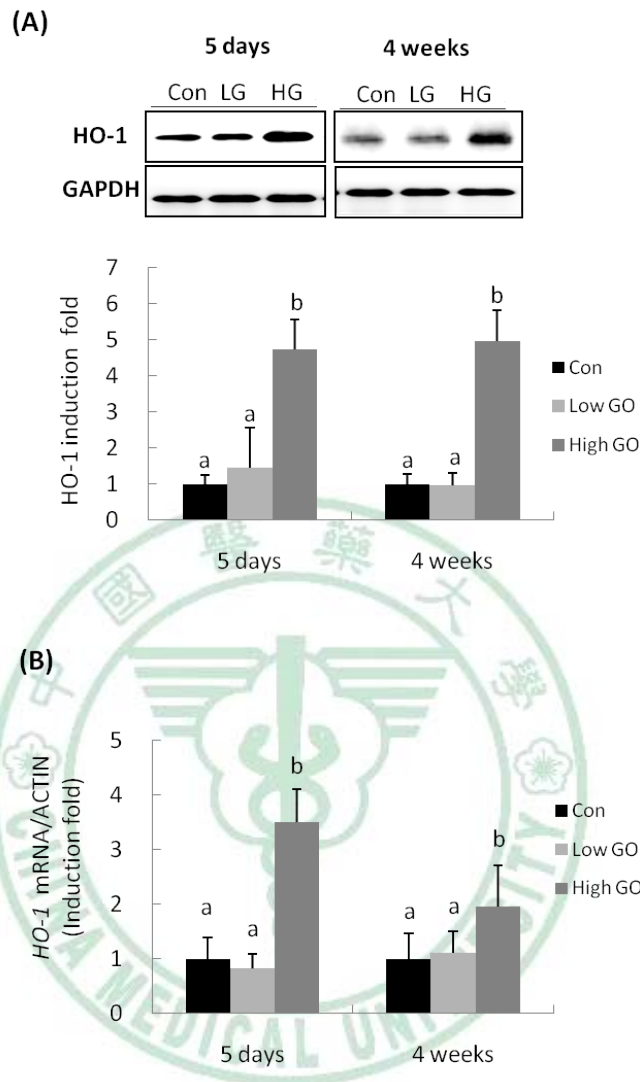
- contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *The Journal of clinical investigation* *105*, 279-285.
- Wu, C.Y., and Benet, L.Z. (2005). Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharmaceutical research* *22*, 11-23.
- Wu, D., Meydani, S.N., Sastre, J., Hayek, M., and Meydani, M. (1994). In vitro glutathione supplementation enhances interleukin-2 production and mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells from young and old subjects. *The Journal of nutrition* *124*, 655-663.
- Xu, C., Li, C.Y., and Kong, A.N. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of pharmacal research* *28*, 249-268.
- Yang, Y.M., Noh, K., Han, C.Y., and Kim, S.G. (2010). Transactivation of genes encoding for phase II enzymes and phase III transporters by phytochemical antioxidants. *Molecules (Basel, Switzerland)* *15*, 6332-6348.
- Yao, H.T., Chang, Y.W., Lan, S.J., and Yeh, T.K. (2008). The inhibitory effect of tannic acid on cytochrome P450 enzymes and NADPH-CYP reductase in rat and human liver microsomes. *Food Chem Toxicol* *46*, 645-653.
- Yet, S.F., Tian, R., Layne, M.D., Wang, Z.Y., Maemura, K., Solovyeva, M., Ith, B., Melo, L.G., Zhang, L., Ingwall, J.S., *et al.* (2001). Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circulation research* *89*, 168-173.
- Zhang, P., Noordine, M.L., Cherbuy, C., Vaugelade, P., Pascussi, J.M., Duee, P.H., and Thomas, M. (2006). Different activation patterns of rat xenobiotic metabolism genes by two constituents of garlic. *Carcinogenesis* *27*, 2090-2095.
- Zhao, C., and Shichi, H. (1998). Prevention of acetaminophen-induced cataract by a combination of diallyl disulfide and N-acetylcysteine. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* *14*, 345-355.
- Zuckerbraun, B.S., McCloskey, C.A., Mahidhara, R.S., Kim, P.K., Taylor, B.S., and Tzeng, E. (2003). Overexpression of mutated IkappaBalpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia formation. *Journal of Vascular Surgery* *38*, 812-819.

附錄



圖一、大蒜精油對大鼠肝臟(A)與小腸(B)GCLC 與 GCLM 蛋白質表現之影響

Figure1. Effect of GO on GCLC and GCLM protein expression in rat livers. Rats were orally administered (ig) with corn oil (Con) or garlic oil (GO) in a dose of 50 mg/kg (Low GO) or 200 mg/kg (High GO) for 5 days or 4 weeks. A total of 10 μ g cytosol protein was used for Western blot analysis. Protein levels in control rats were set at 1. Values are mean \pm SD (n=4~5).^{abc}Values not sharing the same letters differ significantly ($p<0.05$).



圖二、大蒜精油對大鼠肝臟 HO-1 蛋白質(A)與 mRNA(B)表現之影響

Figure 2. Effect of GO on HO-1 protein (A) and mRNA (B) expression in rat livers.

Rats were orally administered (ig) with corn oil (Con) or garlic oil (GO) in a dose of 50 mg/kg (Low GO) or 200 mg/kg (High GO) for 5 days or 4 weeks. A total of 10 μ g microsomal protein was used for Western blot analysis. Changes of HO-1 and β -actin mRNA levels were determined by real-time PCR as described in Materials and Methods. Protein and mRNA levels in control rats were set at 1. Values are mean \pm SD (n=4~5).

^{abc}Values not sharing the same letters differ significantly ($p < 0.05$).