中國醫藥大學藥物化學研究所

碩士論文

指　導 教 授: 李珮端 教授
共同指導教授: 溫國慶 教授
共同指導教授: 侯鈺琪 助理教授

論 文 題 目

Indican 於大鼠之代謝動力學與其對 Methotrexate 動力學之影響

Pharmacokinetics of Indican and Its Effect on Methotrexate Pharmacokinetics in Rats

研究生　詹淑玲

Shu-Ling Chan

中華民國九十五年五月

目錄

目錄……..... I

附圖目錄……..... III

附表目錄…….....V

中文摘要……..……1

英文摘要……...3

第一章　緒言……..…….5

第二章　總論……..……7

第一節　Indican 之結構與性質……..…..7

第二節　Indoxyl sulfate 之結構與特性……...……8

第三節　多重耐藥性蛋白 (Multidrug-Resistance Associated Protein, MRPs) 之特性……9

第四節　有機陰離子傳輸蛋白 (Organic Anion Transporter, OATs)之特性…….17

第五節　Methotrexate（MTX）之特性……24

第六節　Phenolsulfophthalein (PSP) 之特性…….....29

第三章　實驗材料與方法……..…….…30

第一節　實驗材料……...…30

一、實驗試藥……..30

二、儀器設備……..……...31

三、實驗動物……..33

四、溶液製備……..…34

第二節　實驗方法……..……36
一、Indican 於大鼠體內之代謝動力學……....36
1.靜脈注射 indican 之代謝動力學……36
2.口服 indican 之代謝動力學……43
3.大鼠內生性 indoxyl sulfate 之定量……44
二、Indican 於大鼠體內對 methotrexate 動力學之影響……. 45
三、Indoxyl sulfate 於大鼠體內對 phenolsulphthalein 動力學之影響.
…….… 47
第四章　結果與討論 ……..... 51
第五章　結論 ……..…... 59
參考文獻 ……..…….. 77
附錄 ……..……... 82

附圖目錄

Fig. 1-1. The chromatograms of indican (1), indoxyl sulfate (2) and methyl paraben (3): (a) serum sample after oral administration of indican；(b) endogenous indoxyl sulfate…… . 60

Fig. 1-2. The chromatograms of indican (1), indoxyl sulfate (2) and methyl paraben (3): in serum sample after intravenous administration of indican……..…….....60

Fig. 1-3. Mean (± S.E.) serum concentration-time profiles of indican (●) and indoxyl sulfate (○) after intravenous administration of indican (10.0 mg/kg) to six rats（n=6）……..61

Fig. 1-4. Mean (± S.E.) serum concentration-time profiles of indican (●) and indoxyl sulfate (○) after oral administration of indican (20.0 mg/kg) to six rats（n=6）…….61

Fig. 1-5. Mean (± S.E.) serum concentration-time profiles of indicant (●) and indoxyl sulfate (○) after oral administration of indican (40.0 mg/kg) to six rats（n=6）. ……..……62

Fig. 1-6. Mean (±S.E.) serum concentration-time profiles of indican after oral administration of 20.0 mg/kg (●) and 40.0 mg/kg (○) of indican…….....62

Fig.1-7. Mean (±S.E.) serum concentration-time profiles of indoxyl sulfate after oral administration of 20.0 mg/kg (●) and 40.0 mg/kg (○) of indican. ……..…….63

Fig.1-8. Mean (±S.E.) serum concentration-time profiles of endogenous indoxyl sulfate (●)……..……63

Fig. 2-1. Mean (±S.E.) serum concentration-time profiles of MTX (a) after oral administration of MTX alone (5.0 mg/kg) (●), and coadministration with 10.0 mg/kg (○), 20.0 mg/kg (▼) and 40.0 mg/kg（▽）of indican (left)；the semi-log diagram (right)……. 70

Fig. 3-1. Mean (±S.E.) serum concentration-time profiles of PSP after intravenous administration of PSP alone (5.0 mg/kg) (●) and coadministration with indoxyl sulfate 10.0 mg/kg (○) (left)；the semi-log diagram (right)……74

中國醫藥大學 CHINA MEDICAL UNIVERSITY

附表目錄

Table 1-1. Pharmacokinetic parameters of indicant (ID) and indoxyl sulfate (IDS) of six rats after oral administration of 20.0 mg/kg and 40.0 mg/kg indican and intravenous bolus of 10.0 mg/kg indican…….....64

Table 1-2. The regression equations, concentration ranges and correlation coefficients of indican and indoxyl sulfate in rat serum……65

Table 1-3. Recovery (%) of indican from rat serum (n=3)……..65

Table 1-4. Recovery (%) of indoxyl sulfate from rat serum (n=3)……..65

Table 1-5. Intra-day and inter-day analytical precision and accuracy of indican in rat Serum……66

Table 1-6. Intra-day and inter-day analytical precision and accuracy of indoxyl sulfate in rat serum……..66

Table 1-7. The serum concentrations (nmol/mL) of indican in six rats after oral administration of indican (20.0 mg/kg)……..67

Table 1-8. The serum concentrations (nmol/mL) of indoxyl sulfate in six rats after oral administration of indican (20.0 mg/kg)……...67

Table 1-9. The serum concentrations (nmol/mL) of indican in six rats after intravenous administration of indican (10.0 mg/kg)……...68

Table 1-10. The serum concentrations (nmol/mL) of indoxyl sulfate in six rats after intravenous administration of indican (10.0 mg/kg)……...68

Table1-11. The serum concentrations (nmol/mL) of indican in five rats after oral administration of indican (40.0 mg/kg)……..69

Table 1-12. The serum concentrations (nmol/mL) of indoxyl sulfate in six rats after oral administration of indican (40.0 mg/kg)……...69

Table 2-1. Parmacokinetic parameters of methotrexate among rats after oral administration of methotrexatre alone (5.0 mg/kg) and coadministration with 10.0 mg/kg, 20.0 mg/kg and 40.0 mg/kg of indican (ID)……..71

Table 2-2. The serum concentrations (μmol/L) of MTX in six rats after coadministration of MTX (5.0 mg/kg) and 10.0 mg/kg indican……..72

Table 2-3. The serum concentrations (μmol/L) of MTX in six rats after coadministration of MTX (5.0 mg/kg) and 20.0 mg/kg indican. ……72

Table 2-4. The serum concentrations (μmol/L) of MTX in six rats after coadministration of MTX (5.0 mg/kg) and 40.0 mg/kg indican……73

Table 3-1. The regression equations, concentration ranges and correlation coefficients of PSP in rat serum……74

Table 3-2. Comparison of pharmacokinetic parameters of PSP of six rats administered with intravenous PSP (5.0 mg/kg) alone and with 10.0 mg/kg of indoxyl sulfate (IS)…….……75

Table3-3. The serum concentrations (μg/mL) of PSP in six rats after oral coadministration of PSP (5.0 mg/kg) with indoxyl sulfate (10.0 mg/kg)…….76

Table 3-4. The serum concentrations (μg/mL) of PSP in six rats after oral administration of PSP (5.0 mg/kg) with buffer (pH=7.4)…….….....76

摘　　要

Indican 為藍色染料 indigo、indirubin 的前驅物，存在於中藥板藍根、大青葉中。板藍根、大青葉之基原為十字花科（Cruciferae）菘藍 *Isatis indigotica* FORTUNE 的乾燥根與葉，為臨床常用中藥，具清熱解毒、涼血利咽之功效，在 SARS 期間使用量曾驟增。Indican 在體內會代謝成腎毒性物質 indoxyl sulfate。本研究探討 indican 於大鼠體內的代謝動力學。

大鼠以交叉設計給藥，分別口服 20, 40 mg/kg indican 及靜脈注射 10 mg/kg indican，於特定時間點由心臟採血，血清以 HPLC 方法定量 indican 及 indoxyl sulfate。結果顯示，indican 在大鼠體內會以原型吸收，但主要代謝成 indoxyl sulfate。

Methotrexate（MTX）為一治療指數狹窄的抗癌藥及免疫抑制劑，為多重藥物抗藥性蛋白/有機陰離子運輸蛋白(MRPs/OATs) 之受質。Indoxyl sulfate 亦賴 MRPs/OATs 為運送蛋白。大鼠以平行設計給藥，探討分別併服 10, 20 及 40 mg/kg indican 對 MTX 動力學之影響，MTX 血中濃度以螢光偏極免疫法（FPIA）定量，並利用非室性藥動學模式計算動力學參數，結果顯示，併服 20 及 40 mg/kg indican 對 MTX 之

血藥面積及滯留時間皆顯著提高。

可以推論 indoxyl sulfate 在大鼠體內會與 MTX 競爭共同的運送蛋白，因而導致 MTX 的血藥面積增加與滯留時間延長。因此建議接受 MTX 治療的病人應避免併用含 indican 成分之中藥，以確保用藥安全。

中文關鍵詞：板藍根、代謝動力學、多重藥物抗藥性蛋白、有機陰離子運輸蛋白

中國醫藥大學 CHINA MEDICAL UNIVERSITY

Abstract

Indican (indoxyl-β-D-glucoside), a precursor of the blue dyes indigo and indirubin, is abundant in the roots and leaves of *Isatis indigotica* L., a popular Chinese herb, which was increasingly used by the public during the SARS panic. This study aimed to investigate the pharmacokinetics of indican and furthermore, the effect of coadministration of indican on the absorption and disposition of methotrexate (MTX), a bicarboxylate antimetabolite with narrow therapeutic window, was evaluated.

Indican was orally administered to male Sprague-Dawley rats at doses of 20.0 and 40.0 mg/kg. The blood samples were withdrawn via cardiopunture and assayed by HPLC method for the concentrations of indican and indoxyl sulfate after deproteinization. Our results showed that indican was absorbed *per se* and mostly metabolized into indoxyl sulfate in rats.

Rats were orally given MTX with and without indican at doses of 10.0, 20.0 and 40.0 mg/kg in a parallel design. The blood concentrations of MTX were assayed by fluorescence polarization immunoassay (FPIA) method. Pharmacokinetic parameters were calculated using noncompartment model of WINNONLIN. The results study showed that coadministration of 20.0 and 40.0 mg/kg indican significantly increased the area under the curve (AUC_{0-t}) and mean residence time (MRT) of MTX. In conclusion, indoxyl sulfate, a substrate of MRPs (multidrug

resistance-associated proteins) and OATs (organic anion transporters), may compete MRPs/OATs with MTX to result in the delayed elimination of MTX. We suggested that for the sake of safety, the coadministration of indican-containing herbs with MTX should be avoided.

Key words: *indican*、 *indoxyl sulfate*、 *isatis indigotica L.* 、 *interaction*、 *pharmacokinetics*

第一章 緒言

近年來全世界對於使用中藥興起一股熱潮,一般認為中藥之副作用較小，因此，中藥常被當作保健食品，然而有關中藥代謝動力學及中西藥交互作用卻甚不瞭解。

Indican 為藍色染料 indigo、indirubin 的前驅物，存在於中藥板藍根及大青葉中。板藍根、大青葉之基原為十字花科（Cruciferae）菘藍 *Isatis indigotica* FORTUNE 的乾燥根和葉，為臨床常用之中藥。早在 2000 年前《神農本草經》即有記載。板藍根性寒、味苦，具清熱解毒、涼血利咽的功效，用於溫毒發斑、舌降紫暗、喉痺、爛喉丹痧、大頭瘟疫、丹毒、癰腫。近年來板藍根的抗病毒作用備受重視，SARS 期間更廣泛的被使用。

中醫臨床上，板藍根用於治療病毒性角膜炎、出血熱病毒（雷蘊瑛，1994）。大青葉有廣效的抗菌作用、對於 B 型腦炎病毒具有抑制效果（肖培根，2001）。

Indican 為一水溶性的配醣體，已有研究顯示 indican 在體內會代謝成一種內生性的腎毒性物質 indoxyl sulfate（Boyland et al., 1956）。但有關 indican 的動力學行為尚未有文獻報導。因此本研究以大鼠口服

及靜脈注射 indican，以探討其動力學行為。

Indoxyl sulfate 為多重耐藥性蛋白（multidrug-resistance associated proteins; MRPs）及有機陰離子運送蛋白（organic anionic transports; OATs)之受質（Deguchi et al., 2002）。Methotrexate (MTX) 是葉酸衍生物，為抗代謝藥物，臨床上用於治療風濕性關節炎、牛皮癬、白血病等，其治療指數極低，不良反應包括骨髓抑制、白血球減少、貧血、血小板減少、噁心、嘔吐、下痢以及潰瘍性口腔炎。近年研究指出，MTX 為 MRPs 及 OATs 之受質(Chen et al., Kruth et al., 2001; Zeng et al., 2001)。因此 indoxyl sulfate 是否會與 MTX 競爭 MRPs、OATs 而影響 MTX 之排除，導致增加 MTX 之毒副作用，為一值得探究之問題。因此，本研究以大鼠模型探討併服 indican 對 MTX 動力學之影響。

為進一步瞭解 indican 與 MTX 交互作用的機轉，本研究另以 MRP2 及 OAT 的模型受質 phenolsulfophthalein (PSP)為對象，以 indoxyl sulfate 與 PSP 靜脈注射，探討 indoxyl sulfate 對 PSP 動力學之影響。

因為東方人特殊的用藥習慣，使得中藥與西藥的併用成為一潛藏風險之醫療問題。本研究從 indican 的代謝動力學出發，探討中西藥併服之交互作用，期能確保國人用藥安全。

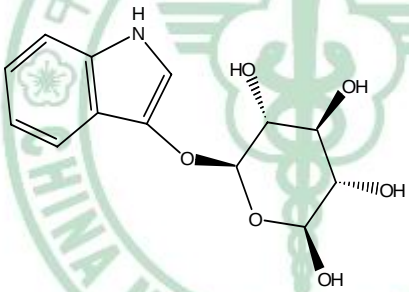
第二章　總論

第一節　Indican 之結構與性質

【化學名】

Indoxyl-β-D-glucoside

【結構式】



【分子式】$C_{14}H_{17}NO_6$

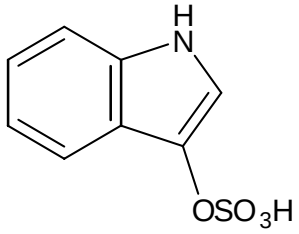
【分子量】295.3

【物化性質】

斜方矛狀針晶，溶點 57-58 ℃。沸點 101℃，溶於水、甲醇、乙醇、丙酮；略溶於乙醚、苯、氯仿、乙酸乙酯、二硫化碳。

第二節　Indoxyl sulfate 之結構與性質

【結構式】



【分子式】$C_8H_7NO_4S$

【分子量】251.31

【性質】

由乙醇水溶液析出淺褐色片晶，於 179-180 ℃分解並昇華。易溶於水；幾乎不溶於冷乙醇。

【毒性】

為一內生性的腎毒性物質，因發現慢性腎病的大鼠及病人體內，indoxyl sulfate 的血中濃度明顯提高。 Indoxyl sulfate 不正常地在體內蓄積，易產生一些病理影響，如抑制藥物和白蛋白結合及抑制主動腎小管分泌，因此成為評估腎臟功能的指標之一。

第三節 多重耐藥性蛋白(Multidrug Resistance Associated Proteins, MRPs) 之特性

多重耐藥性蛋白(Multidrug resistance associated proteins)為 ATP-binding cassette (ABC) proteins 中的 C 家族 (ABCC) （Quan Tian, 2005），目前已發現了 9 種亞型（MRP 1－ 9）。ABC proteins 為體內解毒及防衛機制之一，能將外來物質由體內排出細胞外。目前發現的 ABC 蛋白成員分為 P 醣蛋白（P-glycoprotein；P-gp）、有機陰離子運送蛋白（organic anion transporters; OATs）、有機陽離子運送蛋白（organic cation transporters; OCTs）及 MRPs 等。這些運送蛋白對藥物在體內的吸收、分佈及排泄上扮演著很重要的角色，特別是接受化療的癌症病人，於治療過程中所產生的多重抗藥性（multidrug resistance; MDR）即是因此種蛋白在不同組織上的腫瘤細胞過度表現，將不同的抗癌藥排出細胞外而造成。

在結構方面，每個 MRP 約含 1325~1545 個胺基酸，皆含有厭水性 transmembrane 區域（TMD）及親水性 cytoplasmic nuleotide-binding domains（NBDs）（Higgins, 1992），其中 TMD 與藥物之結合及外排有關，NBD 則與 ATP 之結合及水解有關（Altenberg, 2004），如圖 2 所示。不同的 MRPs 在組織分佈、受質特性和生理、藥理功能上不盡相同，依其在細胞膜上不同的位置，可分為二類：一類為存在於器官細胞膜上之 basolateral 側的 MRP 1、3、5、6、7，其功能主要為對藥物造成再回收入體循環的作用，另一類為存在於器官細

胞膜上之 apical 側的 MRP 2、4、8、9，其功能是對藥物造成外排的作用。其中 MRP4、MRP5 及 MRP8 具有 12 個 transmembrane region，以及 2 個 nucleotide binding domains，N、C 端皆在細胞內，如圖 2 所示。MRP1-3, MRP6-7 則多了 5 個 transmembrane region，共有 17 個，N 端在細胞外，C 端在細胞內，如圖 4 所示。近年文獻指出，藥物之結合態代謝物，如 glucuronides，sulfates 或 glutathione conjugates 等多為 MRPs 之受質。其中 glucuronides conjugates 為 MRPs 1、 2 、3、 4、7 之受質，sulfates conjugates 為 MRPs 1、 2、3 之受質，glutathione conjugate 則為 MRPs 1、2、3、 4、 5、 6 之受質（Tian, 2005），如表一所示。

不同的 MRPs 分佈的位置不同，因此功能也不盡相同，MRPs 家族中第一個為 1992 年發現的 MRP1，在許多組織上有表現，但在不同組織上的表現程度皆不同。主要的功能是將受質如 glucuronide、sulfate 及 glutathione 的結合態代謝物等排至血液中，以達到保護細胞的目的。MRP2 則於 1996 年被發現，可將受質如 glucuronide，sulfate 及 glutathione 的結合態代謝物等 anionic conjugates 排到膽道或腸腔，但對 glutathione 的親和力較差（Tian, 2005）。MRP3 於 1997 年發現，位於 basolateral membrane，其對於 glucuronide 的受質親和力較 glutathione conjugates 強。MRP4 與 MRP5 於 1997 年被發現，MRP4 的 mRNA 表現在大多數的器官上，但主要在腎臟，其功能可以運送一些內生性的有機陰離子及 steroid 的結合態代謝物，對 glutathione conjugates 具有較高的親和力。MRP5 廣泛地存在於腸、肝、腎及膽道，對 nucleoside 類的受質具有高親和力，如 6-mercaptopurine 和

thiopurine。MRP6 則於 1999 年發現，在肝臟及腎臟有高度表現，MRP6 不運送 glucuronide，sulfate，但為 glutathione 結合態代謝物的運送蛋白，例如 LTC4 及 dinitrophenol。MRP7 於 2001 年發現，存在於大部份的組織中，只是表現量皆很低，為何種受質之運送蛋白仍不清楚。MRP8 於 2001 年發現，主要存在於乳房及睪丸中，少部份表現在肝臟及膽道。MRP9 於 2001 年發現，至目前為止，MRP7-9 的功能仍不清楚。

中國醫藥大學 CHINA MEDICAL UNIVERSITY

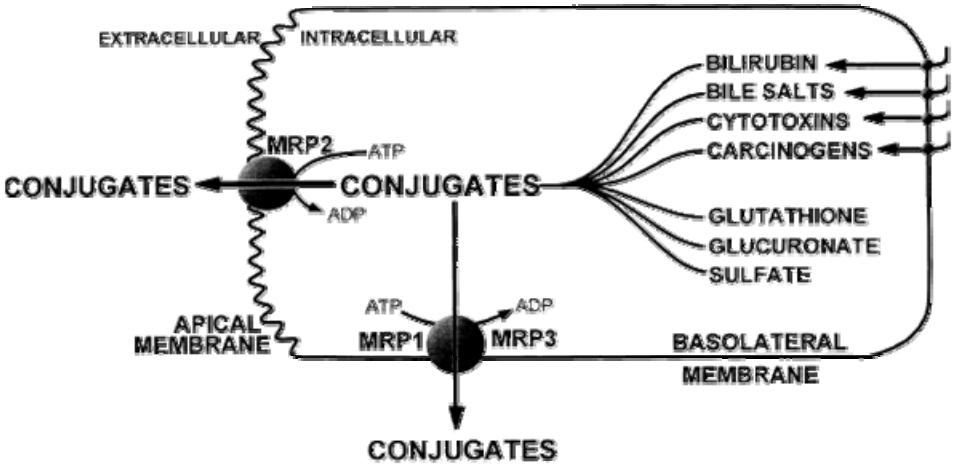


Fig.1. Localization in polarized cells of the conjugate export pumps (apical), MRP1 and MRP3 (basolateral). Endogenous and xenobiotic substances, which may undergo conjugation with gluththione, glucuronate, or sulfate prior to ATP-dependent MRP-mediated export, are indicated. (Dietrich Keppler, 2000).

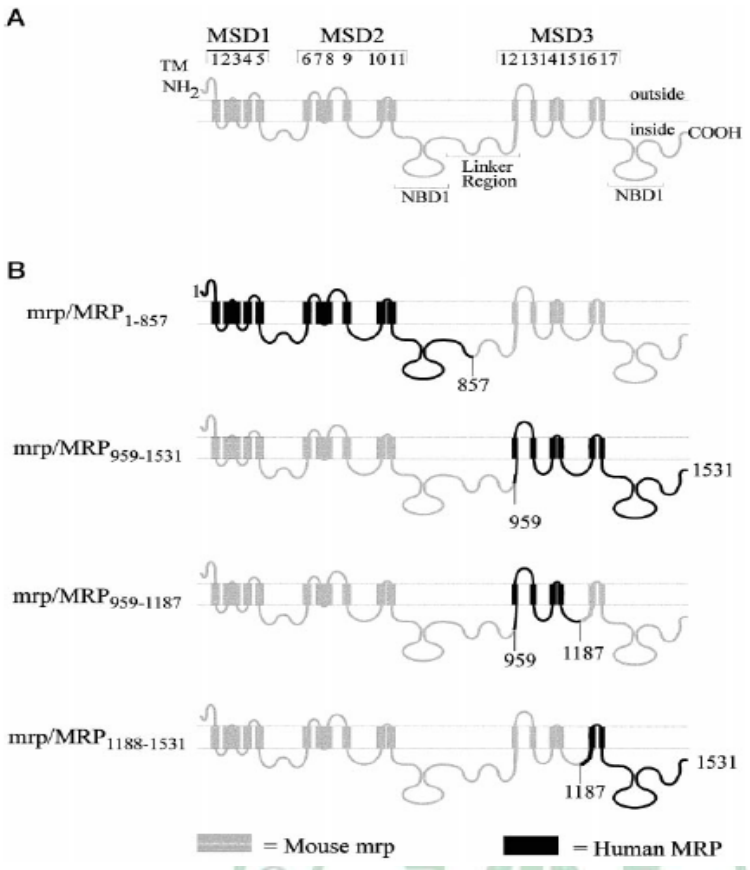


Fig.2. MRPs 之模擬結構空間圖及混成分子示意圖。圖 A 顯示根據實驗數據及電腦模擬輔助設計之 MRP 二級空間結構圖。在此模型圖中，可知此蛋白由 17 個 Transmembrane domain (TM)所組成，可將之分隔為三個區塊，每個區塊稱之為 Membrane-spanning domain (MSD1, MSD2 and MSD3)。在此蛋白中還有其它區域，包括 2 個 nucleotide binding domains 及 linker region。圖 B 顯示主要以人類之 MRP 胺基酸序列圖 (Brenda D, 1999)。

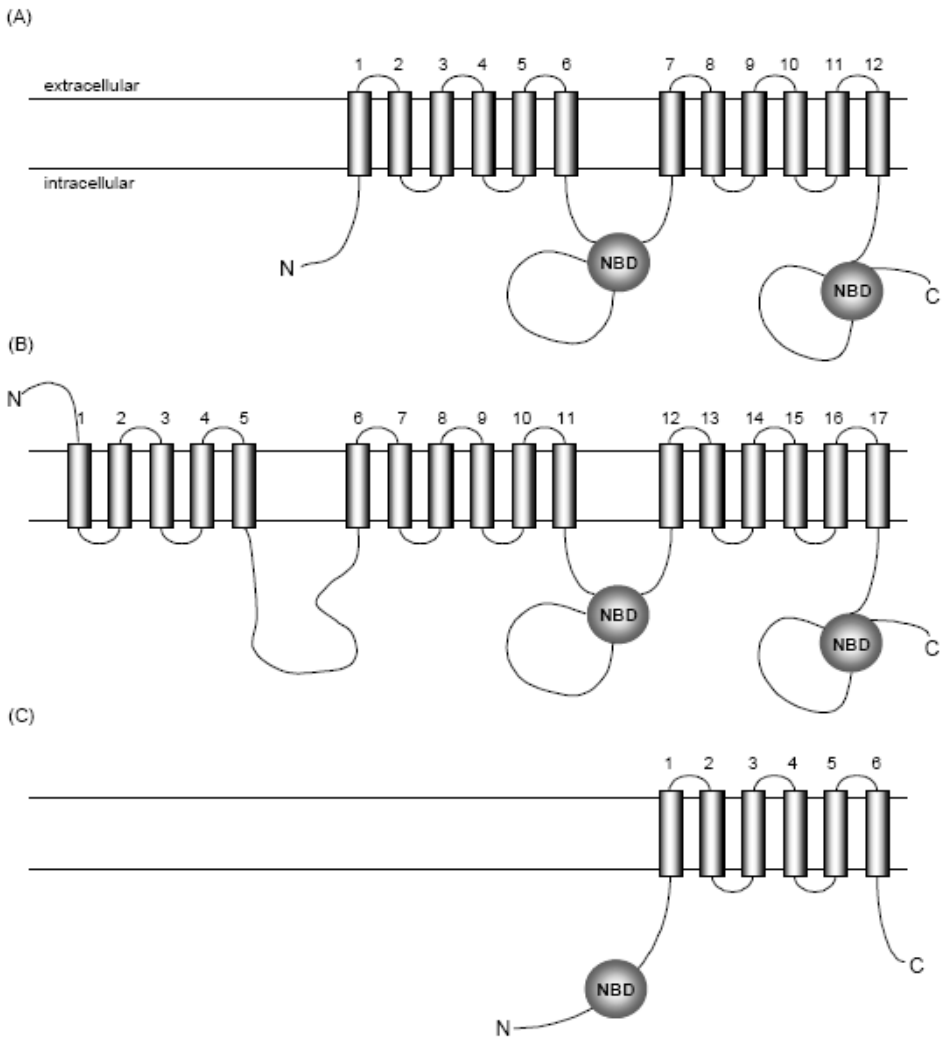


Fig.3. 兩種ABC蛋白之穿膜結構排列圖。 (A)圖：具有12個穿膜蛋白結構及NBD區域之蛋白包括P-gp (MDR1）、MDR3、BSEP(SPgp)、MRP4、MRP5和MRP8。(B)圖：典型之MRP蛋白(MRP1-3和MRP6-7)，包括在N端有5個TM區域、12個穿膜蛋白結構及NBD區域。(C)圖：Half-transporters，例如BCRP只有6個TM及1個NBD (Aherne, G.W, 1978)。

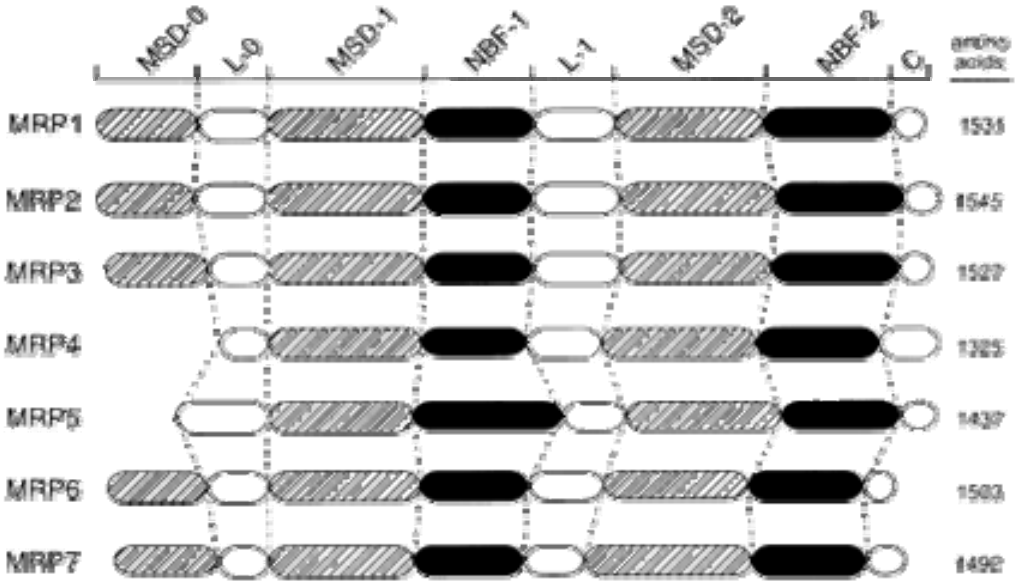


Fig.4. MRPs (1~7)各別結構之圖形簡示圖。其中MSD以條紋橢圓形表示；NBF以黑橢圓形表示。在C-teminus (C) 細胞質區域，包括介在MSD-0和MSD-1、NBF-1和NBF-2中間以空心橢圓標示 (Elizabeth Hopper, 2001)。

Table 1. Tissue distribution, substrates and inhibitors of the MRP family

Name	Symbol	Tissue location	Expression level	Selected substrates
MRP1	ABCC1	all major tissues	differ in various organs and cell line	glucuronide,sulfate and glutathione conjugates, MTX
MRP2	ABCC2, cMOAT	liver, kidney intestine, brain	furosemine, indomethacin	MTX, vinblastine
MRP3	ABCC3	small intestine, pancreas, colon placenta, adrenal	low level in liver, brain, kidney and prostate gland	anionic glucuronide and glutathione, MTX
MRP4	ABCC4	kidneys	low level in other tissues	adefovir,zidovudine naltrexone
MRP5	ABCC5	most tissues	low levels	adefovir, 6-MP mercaptopurine
MRP6	ABCC6	liver, kidney	low level in other tissue	glutathione, cisplatin etoposide, daunorubicin
MRP7	ABCC10	most tissues	very low levels	
MRP8	ABCC11	normal breast, testis	low levels in liver, brain and placenta	5-FU, ddc,MTX PMEA, bile acids
MRP9	ABCC12	breast cancer, normal breast, testis, brain	low levels	

Quan Tian, 2005

第四節 有機陰離子運送蛋白 (organic anion transporters, OATs) 之特性

有機陰離子運送蛋白(organic anion transporters, OATs)由526~568 個胺基酸組成，結構中具有 12 個 TMD，其 C 端與 N 端均位於細胞外，第一個細胞外環有多個糖基化之部位，磷酸化部位則位在第 6 及第 7 個 TMD 之細胞外環上，如 Figure.5 所示。OAT 家族第一個成員為 1997 年發現的 OAT1，座落在 basolateral membrane，其主要表現在腎臟的近端腎小管。在體內具有調節 OA/dicarboxylate 的功能，如表 3-1 所示。OAT 家族在不同的物種及性別的表現有差異，例如 OAT 1 在人體腎臟上的表現沒有性別差異，但是 OAT 3 在肝臟的表現男性遠低於女性（Buist et al., 2002），如 Table.3 所示。目前已發現了 OAT1-5 五個成員，許多動物身上都有 OATs，其中大鼠體內 OATs 之分佈與人類最為接近（Kusuhara＆Sugiyama, 2002; You et al, 2004），如圖 3-2 所示。

許多腎毒性物質如內生性的 indoxyl sulfate，indoleacetic acid 及 hippuric acid 皆為有機陰離子運送蛋白的受質。另外許多臨床用藥包括 nonsteroidal anti-inflammatory 藥物如 acetaminophen，diclofenac，indomethacin，antibiotic 藥物如 cephalosporins，penicillins；抗病毒藥物如 acyclovir 及化療藥物如 MTX（Table 2）。OAT 2 只表現於大鼠的腎臟及肝臟。OAT 3 於腎臟、肝臟及膽道上皆有表現。OAT 4 表現於腎臟及胎盤上，具有調節 OA (organic anion)/DC (dicarboxylate)

exchanger 的功能。OAT 5 表現在腎臟上。OATs 的受質多為有機陰離子，正常環境下 OATs 必須負起體內離子的平衡，特別是排除體內第二相代謝產物，如 glucuronides，sulfates 及 glutathione conjugates 等，將之排至尿中。

中國醫藥大學 CHINA MEDICAL UNIVERSITY

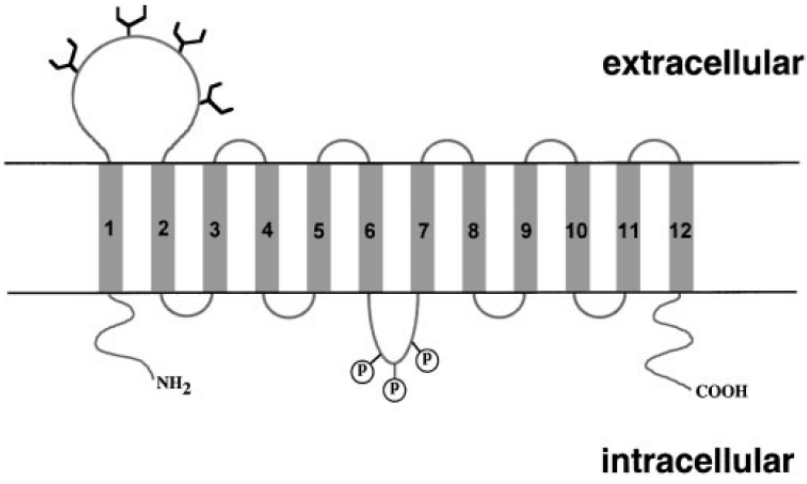


Fig.5　OATs 穿膜蛋白家族的結構圖。包括 12 個穿膜蛋白，磷酸化區域（三個Ⓟ區）。

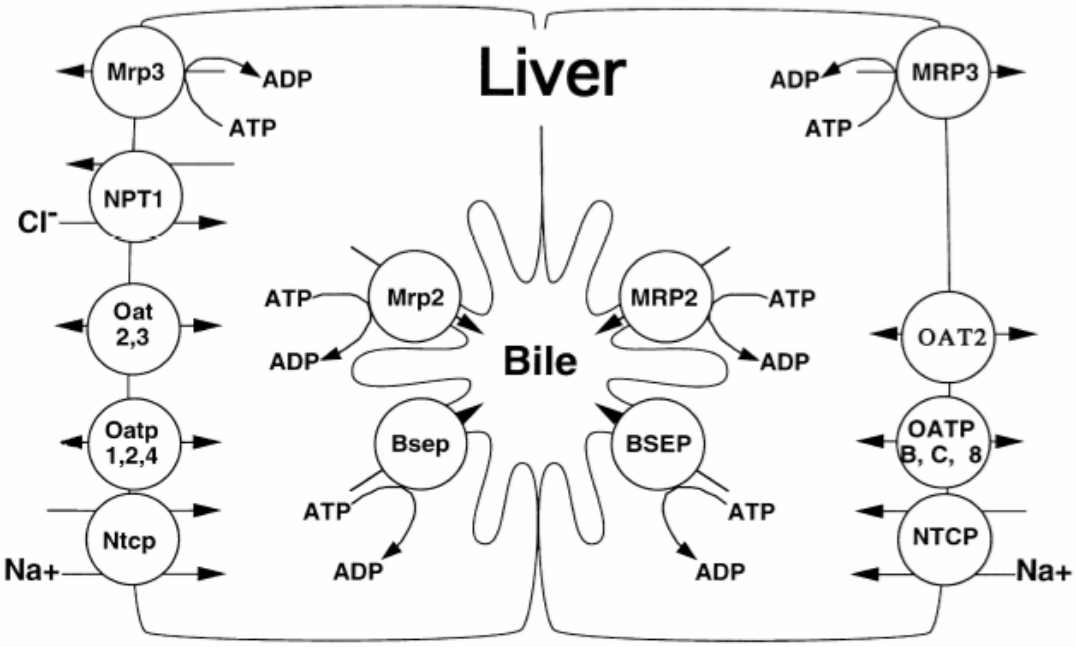


Fig.6 Schematic diagram of drug transporters expressed in the liver in rat and human. Bile salt export pump (Bsep, BSEP) is a primary active transporter for bile acids on the canalicular membrane.

Table 2. Examples of nephrotoxic and neurotoxic agents demonstrated to interact with OATs.

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs		**Uremic toxins**	**Antivirals**
Acetaminophen	Naproxen	Hippuric acid	Acyclovir
Diclofenac	Phenacetin	Indoleacetic acid	Adefovir
Ibuprofen	Piroxicam	Indoxyl sulfate	AZT
Indomethacin	Salicylate		Gidofovir
Ketoprofen			Ganciclovir
Antibiotics	**Chemotherapeutics**	**Heavy metals**	**Mycotoxins**
Cephalosporins	Methotrexate	Cadmium	Ochratoxin A
Penems		Mercury	
Penicillins			
Chlorinated phenoxyacetates		**Neurotransmitter metabolites**	
2.4-Dichlorophenoxyacetic acid		3,4-Dihydroxymandelic acid 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid Homovanillic acid (HVA)	

Douglas H, 2005

Table 3. Selected species, sex, and tissue distribution of OAT family members.

Tissue expression				
Gene	**Species**	**Kidney**	**Liver**	**Choroid Plexus**
Oat 1	mouse	M＞F	－	＋
	rat	M,F	－	＋
	rabbit	＋	ND	ND
	human	＋	－	ND
Oat 2	mouse	M,F	F (K>L)	＋
	rat	M＜F (F;K＞L)	M,F (M;L>K)	＋
	rabbit	＊	＊	＊
	human	＋	＋	ND
Oat 3	mouse	M,F	－	＋
	rat	M,F	M (K＞L)	＋
	rabbit	＋	ND	ND
	human	＋	＋	ND
Oat 4	mouse	＊	＊	＊
	rat	＊	＊	＊
	rabbit	＊	＊	＊
	human	＋	ND	ND
Oat 5	mouse	M,F	－	－
	rat	＋	ND	－
	rabbit	＊	＊	＊
	human	＊	＊	＊
Urat 1	mouse	M＞F	ND	ND
	rat	＊	＊	＊
	rabbit	＊	＊	＊

Symbols: M, male; F, female; －, not expressed; ＋, Expressed; ND, not determined; K, kidney; L, liver;

Table 4. Molecular characteristics of organic anion transporters in the kidney.

Name	Species	Chromosome lacalization	Tissue distribution	Nephron distribution	Membrane localization
Oat1	human	11q11.7	kidney	PT	BLM
	rat		kidney	PT	BLM
	mouse		kidney	PT	ND
Oat2	rat		kidney Liver	ND	ND
Oat3	human	11q11.7	kidney	ND	ND
	mouse	19	kidney	PT	ND
	rat		kidney, liver brain,	ND	ND
Oat4	human		kidney placenta		Luminal
Oat5	mouse		kidney		

PT, proximal tubule; BLM, basolateral membrane

中國醫藥大學 CHINA MEDICAL UNIVERSITY

Table 5. Functional characteristics of organic anion transporters in the kidney.

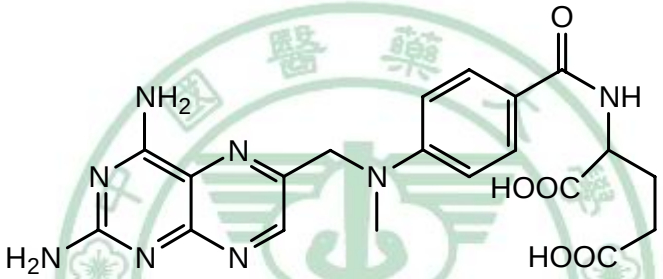
Name	Species	Transport Mechanism	substrates	Inhibitors
Oat1	human	OA/dicarboxylate Antiport	PAH	Furosemide probenecid
	rat	OA/dicarboxylate antiport	PAH;salicylate MTX,cAMP acetylsalicylate, indomethacin,folate	Naproxen piroxican probenecid phenacetin
Oat2	rat	ND	PAH,MTX, PGE,salicylate	ketoprofen rifampincin
Oat3	rat	ND	PAH,cimetidine Estrone-sulfate	proxicam sulfate
Oat4	human	OA-DC exchanger	zidovudine Cimetidine	
Oat5	human		ND	

第五節 Methotrexate（MTX）之特性

【化學名】

N-4-[(2,4-Diamino-6-pteridinyl)methylamino]benzoyl]-L-glutamic acid; 4-amino-N^{10}-methyl-pteroylglutamic acid

【結構式】



【分子式】

$C_{20}H_{22}N_8O_5$

【分子量】

454.45

【物理性質】

Methotrexate (MTX) 幾不溶於水、乙醇、氯仿、乙醚；易溶於鹼金屬的氫氧化物及其碳酸鹽的稀溶液中，微溶於 6N 鹽酸。pKa 值為 4.8 及 5.5。

【藥理作用】

MTX為嘧啶類葉酸衍生物，屬於抗代謝（antimetabolites）藥物。MTX和它的代謝物 polyglutamate 與葉酸（folic acid）的化學構造相似，會競爭二氫葉酸還原酶（DHFR）的葉酸結合位置，與DHFR緊密的結合造成細胞內四氫葉酸（FH_4）的合成受阻，導致胸腺嘧啶核苷（thymidine）和嘌呤核苷酸（purine nucleotides）的合成降低。這些作用最後導致細胞凋亡。 MTX 的 polyglutamate也會在細胞內抑制其它的酵素，特別是amino-imidazole carboxamide ribonucleotide（AICR）transformylase、thymidylate synthase（TS）。

【藥物動力學】

MTX 進入細胞的機轉，包含了 human folate receptor（HFR）及 reduced folate carrier（RFC）的參與 (Strum et al., 1981)，僅於高劑量時經由被動運輸進入細胞。結構中有二個 COOH 於體內會形成負離子，再以主動分泌排出細胞。依賴膽道及腎臟排除，主要約有 85% 以原型藥經腎臟排除。另外約 10% 於肝臟代謝排除。

MTX 在體內會因酵素作用而產生不同活性之代謝物如下：

1. 7-Hydroxy-methotrexate

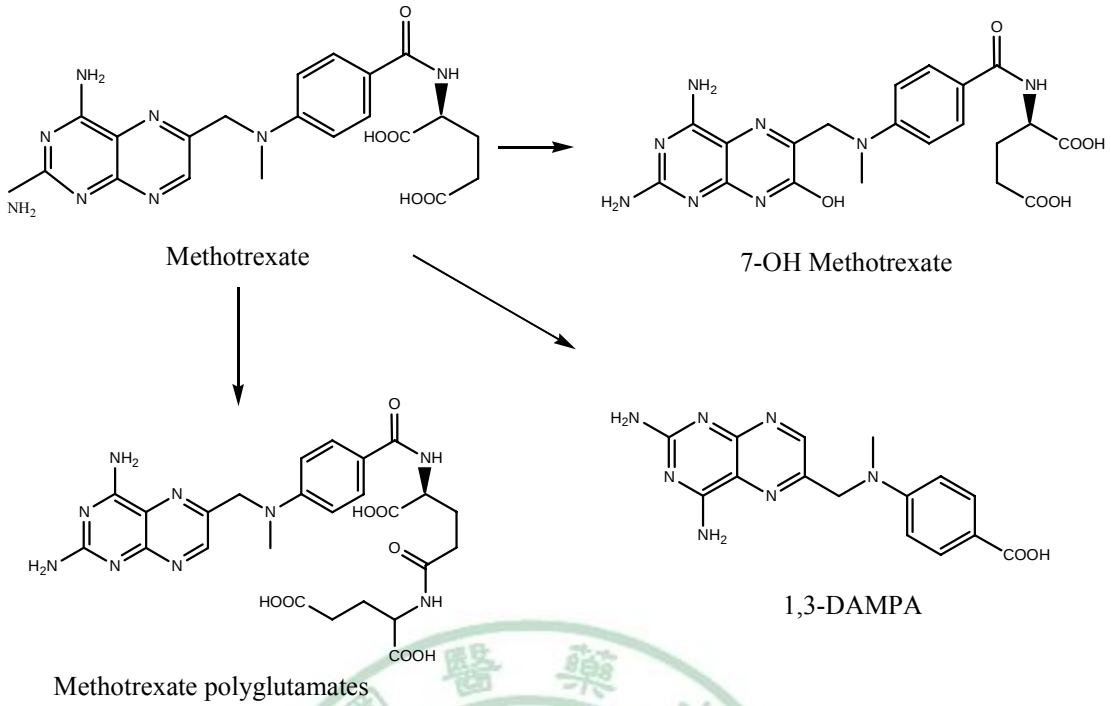
   由肝臟之 aldehyde oxidase 在 pterine ring 上的 C-7 進行氧化所得，其活性約為 MTX 之 1/100~1/200。

2. 2, 4-Diamino-N^{10}-methylpteroic acid (DAMPA)

   MTX 在體內由 carboxypeptidase 代謝成 DAMPA，代謝量大約是注射量的 5% ，其活性約為 MTX 的 1/200。

3. MTX polyglutamates (MTX-$(Glu)_n$)

   MTX 受 polyglutamate synthase 的作用而轉化成鍵結 2-7 個 glutamate 的代謝物。有研究指出不同 glutamyl chain length 的代謝物於細胞內有不同程度的滯留，而 MTX-$(Glu)_n$ 之滯留會增強此藥之細胞毒性（Hillson＆Furst, 1997）。較長鏈之代謝物對 DHFR 有較高的親和力，因而對 DNA 合成及細胞生長有較久之抑制作用。另外，此代謝物在細胞內也會抑制 TS 和 AICAR- transformylase。



Structures of MTX and its major metabolites

【臨床應用】

臨床上作為免疫抑制劑，用於移植病人抑制排斥，並廣泛地用於癌症治療，如絨毛膜癌、淋巴瘤、急性淋巴性白血病（Evans et al., 1986）、非何杰金氏淋巴瘤、骨肉瘤 (Aquerreta et al., 2004) 及乳癌；另外用於治療自體免疫疾病，如風濕性關節炎（Burchini and Orsi,2004；Ward, 1999）、僵直性脊椎炎、多發性硬化症、牛皮癬（Chladek et al., 2002；Grim et al., 2003）、乾癬等。

【副作用】

一般不良反應為骨髓抑制、白血球減少、貧血、血小板減少、噁心、嘔吐、下痢以及潰瘍性口腔炎。這類副作用乃因細胞毒作用於造血系統之速生正常細胞、胃腸道以及皮膚所造成的結果。如果長期治療時可能產生紅斑皮膚疹、肝硬化、急性肝萎縮以及生殖泌尿道等毒性，其表象為腎衰竭、嚴重腎病、卵子或精子發育不全、肺炎、骨質疏鬆以及對光敏感等。

【藥物交互作用】

MTX的血中蛋白質結合率為50~70%，容易與高蛋白結合率的藥物發生交互作用。如與NSAIDs（aspirin，iclofenac，ibuprofen，ketoprofen， naproxen）併用時，因為競爭血中蛋白質結合，使得MTX自由態的濃度增加。另外，因為抑制腎小管的分泌作用或抑制前列腺素的產生而減少腎血流，導致降低了MTX的排除，因而增加MTX的毒性。Penicillins 和 probenecid 亦與MTX競爭抑制腎小管的分泌作用，而增加MTX的毒性。

第六節 Phenolsulfophthalein (PSP) 之特性

Phenolsulfophthalein (PSP) 具有高腎臟清除率，因而廣泛應用於臨床上腎功能的檢測。已有文獻指出 PSP 與 Mrp2/Oat1, 3 具有高度親和力（Shirou, 2003）。另一體內研究指出，當給予 Mrp2 抑制劑時，PSP 的血中濃度明顯增高，經膽道之排除明顯減少。在先天 Mrp2 基因有缺陷的 EHBR 大鼠體內投予 PSP，其膽道排除明顯低於正常大鼠。體外試驗方面，以大腸癌細胞 Caco-2 為模型，同時給予 PSP 與 Mrp2 抑制劑時，PSP 則累積於細胞內（Shirou et al., 2003）。

另外，有一 OATs 對 PSP 腎臟排泄角色的研究中，分別靜注 OAT1, 3 之受質 PAH 及 cimetidine，結果顯示對 PSP 之血中濃度、尿液排除率及腎臟切片，均造成明顯差異。另有研究顯示，PSP 與 OAT3 的親和力比 OAT1 為高（Shirou et al., 2003）。

綜合各項結果顯示，MRP2/OAT1, 3 等運送蛋白在 PSP 的排除上扮演重要的角色。

第三章　實驗材料與方法

第一節 實驗材料

一、 試藥

1. Acetonitrile (LC Grade)	J.T. Baker, Inc. (Phillipsburg, N J, U.S.A.)
2. Ethyl ether	Shimakyu's Pure Chemicals (Osaka, Japan)
3. Methyl paraben	Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
4. Methyl alcohol (LC Grade)	Mallinckrodt Baker, Inc. (Paris, Kentucky, U.S.A.)
5. Ortho-phosphoric acid (85%)	Riedel-deHaën AG (Seelze, Germany)
6. Indican	Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
7. Indoxyl sulfate	Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
8.Phenolsulphthalein	Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
9. MTX	Wyeth Pharma Gmbh (Wolfratshausen, Germany)

二、儀器

1. 酸鹼測定儀 Microprocessor pH-mV meter	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH & Co. KG (Weilheim, Germany)
2. 高速離心機 Z 200 M/H	Hermle Labotechnik GmbH (Wehingen, Germany)
3. 渦旋振盪器 Vortex Genie G-560	Scientific Industries Inc. (Bohemia, NY, U.S.A.)
4. 超音波振盪器 Bransonic 8120	Branson Ultrasonics Co. (Taiwan.)
5. 控溫往復式振盪水槽 BT-350	Yih Der Instruments Co., Ltd. (Taiwan)
6. 氮氣濃縮裝置 N-EVAP 112	Organomation Associates Inc. (Berlin, MA, U.S.A.)
7. 分析天平 AB 104	Mettler Toledo (Switzerland)
8. 微量移液管 Pipette 2-20 μL, 10-100 μL, 20-200 μL, 100-1000 μL	Eppendorf-Netheler-Hinz Gmbh (Germany)
9. 水壓抽氣機 Eyela Aspirator A-2S	Tokyo Rikakikai Co. Ltd. (Tokyo, Japan)
10. 電熱板 HP-20	Shin Kwang Machinery Industry (Taiwan)
11. 酵素免疫分析儀 ELISA reader	Thermo

11. 高效液相層析儀包括:

(1)幫浦 LC-10AT	Shimadzu (Kyoto, Japan)
(2)層析管 Apollo C18 (250×4.6 mm, Alltech)	Nacalai tesque (Kyoto, Japan)
(3)管柱前濾膜	P.J. Cobert Associates, Inc. (St.Louis, Missouri, USA)
(4)紫外光偵測器 SPD-M10AVP diode array detector	Shimadzu (Kyoto, Japan)
(5)自動注射器 SIL-10A	Perkin Elmer Series 200
12. 螢光光譜儀 Luminescene Spectrometer LS-50B	Perkin Elmer Inc, (Shelton,CT, U.S.A.)
13. 螢光偏極免疫分析儀 TDxFLx Analyzer	Abbott Laboratories (Abbott Park, Illinois, U.S.A.)

三、實驗動物用器材

1. 拋棄式注射針及針筒 3.0 mL syringe (0.55×25 mm) 1.0 mL syringe (0.45×13 mm)	Terumo Medical Corporation (Elkton, MD, U.S.A.)
2. 胃管 (0.9×L 70 mm, 1.5×L 120 mm)	晶龍科技儀器有限公司 (Taiwan)
3. 微量吸管 (200 μL, 1000 μL)	Axygen Scientific, Inc. (Union city, CA, U.S.A.)
4. 微量離心管 (1.5 mL)	Axygen Scientific, Inc. (Union city, CA, U.S.A.)
5. 針頭濾膜 Millex®(0.45 μm, 13 mm)	Millipore Carrigtwohill,Co. (Cork, Ireland)

(四) 實驗動物

Sprague-Dawley 大白鼠，購自國家實驗動物中心，購入後飼養於中國醫藥大學動物中心，環境溫度控制在攝氏 22 ± 1 ℃ 12 小時光照與黑暗循環之環境中，相對溼度維持 50 ± 10 %。動物試驗遵循中國實驗動物學會 2002 年所編撰之「實驗動物飼養與使用操作手冊」（A guide book for the care and use of laboratory animals）。

五、溶液製備

1. 內標準溶液

(1) 精確稱取 methylparaben 10.0 mg，加入甲醇定容至 10.0 mL，即得 1.0 mg/mL 之儲存溶液，再以甲醇稀釋成各種所需濃度之內標準溶液。

(2) 緩衝溶液 (pH 5.0)

取 0.1N 醋酸鈉溶液（1） 68 mL，加入 0.1N 醋酸溶液（2）至 100 mL，再加 1N 氫氧化鈉調至 pH = 5.0 ± 0.1。

（1）0.1N 醋酸鈉溶液：

稱取無水醋酸鈉 0.82 g，加水溶解至 100 mL。

（2）0.1N 醋酸溶液：

量取冰醋酸 (d = 1.049) 0.6 mL，加水至 100 mL。

2. Methotrexate (MTX®) 溶液

(1) 精確量取 MTX (25 mg/mL) 2.0 mL，加水定容至 20.0 mL，即得 2.5 mg/mL 之 MTX 溶液，使用前新鮮製備。

3. 0.1N 氫氧化鈉溶液

量取氫氧化鈉 0.4 克，加水至 100 mL。

中國醫藥大學
CHINA MEDICAL UNIVERSITY

第二節 實驗方法

一、Indican 於大鼠體內之代謝動力學

1. 靜脈注射 indican 之代謝動力學

（1）溶液之製備

(a) Indican 靜脈注射溶液

精稱適量 indican，加蒸餾水為溶媒，配製成 20.0 mg/mL 之溶液，並經 0.22 μm 濾膜過濾滅菌，即得 indican 靜脈注射溶液。

(b) Indican 標準溶液

精稱 indican 1.0 mg，以甲醇溶解並稀釋定容至 1.0 mL，配製成 1.0 mg/mL 之儲備溶液，其他濃度之標準溶液，則以甲醇系列稀釋而得。

(c) Indoxyl sulfate 標準溶液

精稱 indoxyl sulfate 1.0 mg，以甲醇溶解並稀釋定容至 1.0 mL，配製成 1.0 mg/mL 之儲備溶液，其他濃度之標準溶液，則以甲醇系列稀釋而得。

(d) Methyl paraben 內標準溶液

精稱 methyl paraben 1.0 mg，以甲醇溶解並稀釋定容至 1.0 mL，配製成 1.0 mg/mL 之儲備溶液，其他濃度之標準溶液，則以甲醇系列稀釋而得。

(2) Indican 血清標準溶液之製備

精稱 indican，以甲醇溶解並稀釋定容，製備 7.8，15.6，31.3，62.5，125.0，250.0，500.0 μg/mL 等濃度之標準溶液，各取 100 μL 標準溶液，加入 900 μL 空白血清，得濃度分別為 0.78，1.56，3.13，6.25，12.50，25.00，50.00 μg/mL 之血清標準溶液。

(3) Indican 檢量線之繪製

取各種濃度血清標準溶液 200 μL，以 800 μL 含內標 (1.0 μg/mL, methyl paraben) 之甲醇溶液去蛋白，用試管振盪器振盪混合均勻後，高速離心 (9,860 g) 15 分鐘，取上清液，以氮氣吹乾，再以 50 μL 甲醇溶解，取 20 μL 供 HPLC 分析。所得指標成分與內標準之波峰面積比值，分別對其濃度進行線性迴歸，即得檢量線方程式。

4. Indoxyl sulfate 血清標準溶液之製備

精稱 Indoxyl sulfate，以甲醇溶解並稀釋定容，製備 6.25，12.5，25.0，50.0，100.0，200.0 μg/mL 等濃度之標準溶液，各取 100 μL 標準溶液，加入 900 μL 空白血清，得濃度分別為 0.6，1.3，2.5，5.0，10.0，20.0 μg/mL 之血清標準溶液。

5. Indoxyl sulfate 檢量線之繪製

取各種濃度血清標準溶液 200 μL，以 800 μL 含內標 (1.0 μg/mL, methyl paraben) 之甲醇溶液去蛋白，用試管振盪器振盪混合均勻後，高速離心 (9,860 g) 15 分鐘，取上清液，以氮氣吹乾後，再以 50 μL 甲醇溶解，取 20 μL 供 HPLC 分析。所得指標成分與內標準之波峰面積比值，分別對其濃度進行線性迴歸，即得檢量線方程式。

6.給藥與採血

(1) 動物

選用雄性 Sprague-Dawley 大鼠 6 隻，體重介於 310~370 g，實驗前先禁食 12 小時。自由飲水。給藥後繼續禁食四小時。

(2) 給藥

實驗採交叉設計，經由尾靜脈注射給予 10.0 mg/kg Indican 靜脈注射液。

(3) 採血

口服給藥後及靜脈給藥後於 5、15、30、60、120、240、480、720、1440、2880 及 4320 分鐘，以心臟穿刺方式採血 0.8 mL。將血液檢品離心 (9,860 g) 15 分鐘，取上層血清貯存於-30 ℃，俟後分析。

5. 血清中 indican 與 indoxyl sulfate 之定量

取 200 μL 血清檢品，以 800 μL 含內標 (1.0 μg/mL, methyl paraben) 之甲醇溶液去蛋白，用試管振盪器振盪均勻後，高速離心 (9,860 g) 15 分鐘，取上清液，用氮氣吹乾後，以 50 μL 甲醇溶解，取 20 μL 供 HPLC 分析。

6. 高效液相層析(HPLC) 之分析條件

層 析 管：Apollo C18 (5 μm，250 x 4.6 mm)

移 動 相：CH_3CN : 0.1% H_3PO_4 (85:15)

流　　速：1 mL/min

檢測波長：220 nm

內標準品：methyl paraben (1.0 μg/mL)

7. 分析系統及方法之確效

(1) 精密度 (Precision)

將各種濃度之 indican 及 indoxyl sulfate 血清標準溶液，分別於同日內早、午、晚及連續三日之異日間各進行一次層析，並以獲得之檢量線方程式，求得每次的實測濃度值。以三次同日內及三次異日間實測濃度分別求其平均值(mean)、標準偏差 (standard deviation, S.D.)及變異係數 (coefficient of variation, C.V.)。

(2) 靈敏度 (Sensitivity)

將 indican 及 indoxyl sulfate 標準品濃度一再稀釋，直至其波峰面積與雜訊面積之比值為 3 時之濃度為其偵測極限 (LOD, Limit of detection)。

(3) 準確度 (Accuracy)

三次同日內及三次異日間實測所得平均濃度與真正濃度間之相對誤差(relative error)表示之。

(4) 回收率 (Recovery)

(a) Indican 之回收率

將 indican 溶於甲醇，製備 15.6、62.5、250.0 μg/mL 三種濃度之標準溶液，各取 100μL，分別加 900 μL 空白血清及甲醇，使濃度成為 1.6、6.25、25.0 μg/mL，並將此系列標準溶液，依前述檢品處理步驟處理後，利用 HPLC 定量，每種濃度各三重複，所測得之血清濃度，除以相對應之甲醇溶液中檢出濃度，以百分比表示，即為回收率。

(b) Indoxyl sulfate 之回收率

將 indoxyl sulfate 溶於甲醇，製備 12.5、50.0、200.0 μg/mL 三種濃度之標準溶液，各取 100μL，分別加 900 μL 空白血清及甲醇，使濃度成為 1.3、5.0、20.0 μg/mL，依前述檢品處理步驟處理，以 HPLC 定量，每種濃度各三重複，所測得之血清濃度，除以相對應之甲醇溶液檢出濃度，以百分比表示，即為回收率。

8. 數據分析

Indican 及 indoxyl sulfates 之動力學參數係使用 WINNONLIN (version 1.1；Pharsight Corp., U.S.A.) 之非室模式（noncompartment model）及 Excel (version 7.0, Microsoft) 計算。

中國醫藥大學 CHINA MEDICAL UNIVERSITY

2.口服 indican 之代謝動力學

（1）溶液之製備

(a) Indican 口服溶液

精稱適量 indican，加蒸餾水，配製成 10.0 mg/mL 之溶液，即得 indican 口服溶液。

1. 給藥與採血

(1) 動物

選用雄性 Sprague-Dawley 大鼠 12 隻，體重介於 370~420 g，實驗前先禁食 12 小時。自由飲水。給藥後繼續禁食四小時。

(2) 給藥

實驗採平行設計，分別給予 20.0, 40.0 mg/kg indican 口服溶液，經胃管灌食給藥。

(3) 採血

口服給藥後於 5、15、30、60、120、240、480、720、1440、2160、2880、3600 及 4320 分鐘，以心臟穿刺方式採血 0.8 mL。將血液檢品離心 (9,860 g) 15 分鐘，取上層血清貯存於-30 ℃，俟後分析。

3. 大鼠內生性 indoxyl sulfate 之定量

1. 採血

(1) 動物

選用雄性 Sprague-Dawley 大白鼠 6 隻，體重介於 470~550 g，實驗前先禁食 12 h。自由飲水。

(2)採血

於禁食 12 h 後 5、15、30、60、120、240、480、720、1440、2880 及 4320 分鐘，以心臟穿刺方式採血 0.8 mL。將血液檢品離心 (9,860 g) 15 分鐘，取上層血清貯存於-30℃，俟後分析。

分析方法與確效如前一章節所述。

二. Indican 於大鼠體內對 methotrexate 動力學之影響

（1）動物及給藥

選用雄性 Sprague-Dawley 大鼠 25 隻，體重介於 330 ~ 400 g，實驗前禁食 12 小時。自由飲水。給藥後繼續禁食四小時。

將大鼠分成四組，採平行設計給藥，一組給予 5.0 mg/kg MTX 溶液 (2.5 mg/mL in water) 與 indican 溶液 40.0 mg/5.5 mL/kg，第二組併服 indican 溶液 20.0 mg/5.5 mL/kg，第三組併服 indican 溶液 10.0 mg/5.5 mL/kg，第四組給予 MTX 溶液及 5.5 mL/kg 的水。

（2）採血及檢品處理

於給藥後 5、15、30、60、120、240、480、720、1440、2160、2880、3600 及 4320 min，以心臟穿刺方式採血 0.4 mL，置於微量離心管，以 9,860 g 離心 15 min，取血清貯存於 -20℃，俟後分析。

（3）血液中 MTX 之定量

血液檢品利用 TDx Analyzer 以螢光偏極免疫分析法定量血液中 MTX 的濃度。檢量線濃度範圍 0.00 ~ 1.00 (μmol/L)，最低檢測濃度為 0.01 (μmol/L)。

（4）數據處理及統計方法

使用 WINNONLIN (version 1.1；Pharsight Corp., U.S.A.)，採非室體模式（noncompartment model）計算動力學參數，以 ANOVA 及 Scheffe's test 檢定各組間動力學參數是否具統計上之差異（ $p < 0.05$ ）。

中國醫藥大學 CHINA MEDICAL UNIVERSITY

三、Indoxyl sulfate 於大鼠體內對 phenolsulphthalein 動力學之影響

1. 溶液之製備

(1) Indoxyl sulfate 靜脈注射溶液

精稱適量 indoxyl sulfate，以緩衝溶液（pH 7.0）配製成 10.0 mg/mL 溶液，並經 0.22 μm 濾膜過濾滅菌，即得供靜脈注射用溶液。

(2) Phenolsulphthalein（PSP）靜脈注射溶液

精稱適量 PSP，以緩衝溶液（pH 7.0）配製成 10.0 mg/mL 之溶液，並經 0.22 μm 濾膜過濾滅菌，即得靜脈注射溶液。

(3) PSP 標準溶液

精稱 1.0 mg 之 PSP，以緩衝溶液（pH 7.0）溶解並定容至 1.0 mL，配製成 1.0 mg/mL 之貯存溶液，其他濃度之標準溶液，則以緩衝溶液(pH 7.0)系列稀釋而得。

2. PSP 血清標準溶液之製備

精稱 PSP，以緩衝溶液（pH 7.0）溶解並稀釋定容，製備 3.9、7.8、15.6、31.3、62.5、125.0 μg/mL 等濃度之標準溶液，各取 100 μL 標準溶液，加入 900 μL 空白血清，得濃度分別為 0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.50 μg/mL 之血清標準溶液。

3. PSP 檢量線之繪製

取 100 μL 血清標準品溶液，以 300 μL 之甲醇溶液去蛋白，用試管振盪器振盪均勻後，高速離心（9,860 g）15 分鐘，取上清液 180 μL，加入 20 μL 0.1 N 氫氧化鈉溶液，用試管振盪器振盪均勻後取 200 μL，以 ELISA Reader 分析 560 nm 之吸光值。分別對其濃度進行線性迴歸，即得檢量線方程式。

4. 給藥與採血

(a) 動物

選用雄性 Sprague-Dawley 大鼠 6 隻，體重介於 370 ~ 420 g，實驗前先禁食 12 小時，自由飲水，給藥後繼續禁食四小時。

(b) 給藥

將 6 隻大鼠隨機分成二組，第一組經由尾靜脈注射給藥先給予 10.0 mg/5.0 mL/kg indoxyl sulfate，再立即注射 5.0 mg/2.5 mL/kg PSP。第二組先給予 5.0 mg/2.5mL/kg PSP 靜脈注射溶液，再給予 10.0 mg/5.0 mL/kg 的緩衝溶液（pH 7.0）。

(c)採血

尾靜脈注射給藥後於 30、60、120、240、480、600、720 及 1440 分鐘，以心臟穿刺方式採血 0.6 mL。將血液檢品離心（9,860 g) 15 分鐘，取上層血清貯存於-30℃，俟後分析。

5. 血清檢品之前處理及 PSP 定量

取 100 μL 血清檢品，加 300 μL 甲醇去蛋白，用試管振盪器振盪均勻後，高速離心（9,860 g) 15 分鐘，取上清液 180 μL 加入 20 μL 1 N 氫氧化鈉溶液，再以試管振盪器振盪均勻後，取 200 μL 利用 ELISA reader 分析 560 nm 之吸光值。

6. 數據處理及統計方法

使用 WINNONLIN (version 1.1；Pharsight Corp., U.S.A.)，採非室體模式 (noncompartment model) 計算動力學參數，以 paired Student's *t*-test 檢定各組間動力學參數是否具統計上之差異 ($p < 0.05$)。

中國醫藥大學 CHINA MEDICAL UNIVERSITY

第四章　結果與討論

一、 Indican 於大鼠體內之代謝動力學

本研究開發 HPLC-UV 方法，分析血清檢品。血清以含內標之甲醇去蛋白，16 分鐘內即可完成分析。Indican 檢量線之濃度範圍為 0.78 ~ 50.0 μg/mL，檢量線方程式 y = 0.6096 x－0.0144 ，濃度與波峰面積比值間顯現良好之線性關係（r^2=0.9999）。有關分析方法的確效，分別進行了同日內及異日間的精密度及準確度分析。結果如 Table 10 及 Table 11 所示。顯示此分析方法在同日內及異日間之變異係數（C.V.）均小於 10 %，相對誤差（relative error）均小於 20 %。血清中 indican 之回收率為 94.6~100.0 %，如 Table 8 及 Table 9 所示。Indican 之最低可定量極限（LLOQ）為 0.78 μg/mL，檢測極限（LOD）為 0.1 μg/mL。確效結果顯示，本分析系統之精密度、準確度及回收率皆良好。

大鼠口服 20 mg/kg indican 後，血中有 indican 及 indoxyl sulfate 存在。 Indican 及 indoxyl sulfate 之平均血峰濃度分別為 27.9 ± 3.1 和 13.8 ± 4.2 nmol·mL^{-1}，平均血藥面積分別為 1349.9 ± 158.1 和 31255.6 ± 4805.9 nmol·min·mL^{-1}，平均滯留時間分別為 49.7 ± 6.5 和

2373.3 ± 16.9 min，如 Table 6 所示。 Indoxyl sulfate 之平均血藥面積為 indican 之 23.2 倍，而平均滯留時間為 indican 之 47.5 倍，如 Table 6 所示。

大鼠口服 40 mg/kg indican 後，indican 及 indoxyl sulfate 之平均血峰濃度分別為 75.8 ± 18.2 和 24.2 ± 8.5 nmol·mL^{-1}，平均血藥面積分別為 3956.4 ± 669.4 和 28130.8 ± 1121.5 nmol·min·mL^{-1}，平均滯留時間分別為 46.1 ±1.7 和 2105.0 ± 84.1 min， indoxyl sulfate 之平均血藥面積為 indican 之 7.1 倍，而平均滯留時間為 indican 之 46.6 倍，如 Table 6 所示。

大鼠尾靜脈注射 10 mg/kg indican 後，血中 indican、indoxyl sulfate 之濃度、個別與平均血藥經時變化圖分別如 Table 6 及 Fig 9 所示，indican 及 indoxyl sulfate 之平均血藥面積分別為 1008.7 ± 141.5、39456.8 ± 5850.4 nmol·min·mL^{-1}，平均滯留時間分別為 73.5 ± 21.5、2522.3 ± 84.1 min，indoxyl sulfate 之血藥面積為 indican 的 39.1 倍。顯示 indican 進入血中後，亦發生葡萄糖之水解，並立即代謝成 indoxyl sulfate。比較口服 20 與 40 mg/kg 兩種劑量的動力學行為顯示，indoxyl sulfate 之血藥面積分別為 indican 的 23.2 倍與 7.1 倍。兩劑量的 indoxyl sulfate 之血藥面積並無明顯差異，顯示 indoxyl sulfate 血中暴露並未隨 indican 劑量增加而增加，可以推測由

indican 代謝成 indoxyl sulfate 的過程可能於 20 mg/kg 劑量下已達飽和。因此可以推論，indican 具非線性動力學行為。

Indican 口服後，二小時內有 indican 的原型存在於血中，但二小時之後， indican 幾乎偵測不到。而代謝物 indoxyl sulfate 為主要存在於血中的形式。口服後血藥經時變化圖顯示 indican 快速代謝成 indoxyl sulfate，後者在體內的滯留時間相當長，可能因為 indoxyl sulfate 有腸肝循環。

本研究結果顯示，無論口服或靜脈注射投予 indican，皆主要以代謝物 indoxyl sulfate 存在於血中，且滯留時間相當長。單次給藥後的 72 小時，血中 indoxyl sulfate 的濃度仍明顯高於內生性的 indoxyl sulfate。有文獻指出 indoxyl sulfate 在慢性腎臟病人身上為一個重要的指標 indoxyl sulfate 不正常的蓄積會抑制藥物與血清中白蛋白的結合、甲狀腺功能失常及抑制腎小管的主動分泌，並且加速腎功能的損壞（Tsuneo, 2003）。因此 indican 及含 indican 中藥久服之後的腎毒性值得關注。

二、Indican 於大鼠體內對 methotrexate 動力學之影響

本實驗室先前的研究結果顯示，許多富含多酚之中藥如大黃、黃芩及葛根等與 MTX 併服時，導致部分大鼠死亡（Chao et al., 2002），因此本實驗採平行設計給藥。單服 MTX 與併服三種劑量的 indican 後，血清中 MTX 之濃度及血藥經時變化圖如 Table 18 及 Fig 15 所示。單服 MTX 之平均血藥面積為 75.5 ± 24.2 μmol·min·L^{-1}，平均滯留時間為 338.5 ± 168.0 min；併服 10 mg/kg indican 之平均血藥面積為 145.0 ± 6.9 μmol·min·L^{-1}，平均滯留時間為 1033.7 ± 41.2 min。併服 20 mg/kg indican 之平均血藥面積為 201.3 ± 22.7 μmol·min·L^{-1}，平均滯留時間為 1035.3 ± 43.7 min。併服 40 mg/kg indican 之平均血藥面積為 228.2 ± 35.2 μmol·min·L^{-1}，平均滯留時間為 958.9 ± 83.5 min。比較四組結果，顯示併服 10、20 及 40 mg/kg indican 時，平均血藥面積分別增加了 92 % （$p = 0.20$）、166 % ($p < 0.01$) 及 202 % ($p < 0.01$)；平均滯留時間分別增加了 205 % ($p < 0.001$)、205 % ($p < 0.001$) 及 183 % ($p < 0.01$)，如 Table 2-1 所示。

MTX 化學結構上之羧基於生理 pH 下會形成陰離子。許多研究指出 indoxyl sulfate 為 OATs 與 MRP 1、2、3 及 4 之受質（Deguchi et al., 2002）。MTX 也是 OATs 與 MRPs 之受質（Chen et al., Kruth et

al., 2001; Zeng et al., 2001）。另有研究指出，低濃度 MTX 的長時間滯留比高濃度 MTX 的毒性更高，因為 MTX 與 MRPs 親合力低，當 MTX 以低濃度存在時，polyglutamyl synthase 與 MTX 之結合大於 MRPs，而有利於 MTX-$(Glu)_n$ 代謝物之產生。MTX-$(Glu)_n$ 不是 MRPs 之受質，無法由細胞內外排，因此毒性頗強。因此 indoxyl sulfate 可能與 MTX 於體內會競爭 MRPs 或 OATs 等運送蛋白。當 indican 與 MTX 併用時，可能會因其代謝物 indoxyl sulfate 競爭 OATs 或 MRPs 而使 MTX 之排除減緩，導致 MTX 滯留於體內的時間延長，造成代謝物 MTX-$(Glu)_n$ 增多，而毒性增強。

我們進一步比較不同劑量 indican 對 MTX 動力學的影響，20 mg/kg 及 40 mg/kg indican 口服後對 MTX 血藥面積及滯留時間的增加程度並無顯著差異。反觀 indican 之動力學，20 mg/kg 與 40 mg/kg 兩劑量的 indoxyl sulfate 之 AUC 及 MRT 並無顯著差異。因此，20 mg/kg 與 40 mg/kg indican 口服後，indoxyl sulfate 在體內與 MTX 競爭 MRP_S 與/或 OAT 的程度應相仿。Indican 的非線性動力學行為，應可解釋為何 20 mg/kg 與 40 mg/kg 兩種劑量的 indican 對 MTX 動力學的影響程度沒有明顯差異。

另外，我們由血藥經時變化圖及動力學參數亦可推論，代謝物 indoxyl sulfate 對 MTX 之排除有抑制的作用。

總之，indican 對 MTX 之血中動力學行為影響甚鉅，對於含有 indican 的板藍根或其他植物產品，建議避免與 MTX 以確保用藥安全。

中國醫藥大學 CHINA MEDICAL UNIVERSITY

三、Indoxyl sulfate 於大白鼠體內對 phenolsulphthalein 動力學之影響

本研究以大鼠為模型，引用 phenolsulphthalein (PSP)為 MRP2/OAT1,3 受質的模型分子，探討 MRP2/OAT1,3 對於 indoxyl sulfate 之排除所扮演的角色。本試驗以交叉設計給藥，單獨注射 PSP 及同時注射 PSP 與 indoxyl sulfate 後，分析血清中 PSP 之濃度及血藥經時變化，其結果如 Table.22 及 Fig.16 所示。單獨投予 PSP 之平均血藥面積為 1271.8 ± 124.6 μg·min·mL^{-1}，平均分佈體積為 852.7 ± 180.1 mL；同時投予 indoxyl sulfate 時，PSP 之平均血藥面積為 4071.7 ± 604.2 μg ·min ·mL^{-1}，平均分佈體積為 341.1 ± 51.5 mL。比較二組結果顯示同時投予 PSP 及 indoxyl sulfate 時，平均血藥面積顯著增加了 220 % ($p < 0.01$)，而平均分佈體積顯著減少了 60 %（$p < 0.05$）。

近年研究指出 PSP 為 MRPs/OATs 之受質（Shirou, 2003）。無論體內或體外試驗皆顯示，PSP 與 MRP2 及 OAT1,3 具有高親和力（Shirou, 2003；Kari, 2005）。Indoxyl sulfate 在體內為 MRPs/OATs 的受質，其中與 OAT1,3 具有高親和力。OAT1 是位於近端腎小管的有機陰離子運送蛋白，OAT3 則位於近端腎小管及遠端腎小管，PSP 對 OAT3 的親和力比 OAT1 高。因此當 indoxyl sulfate 與 PSP 併用時，彼此競爭 MRPs/OATs 而導致 PSP 之排除減緩，應可證明在 indoxyl

sulfate 的排除中，MRPs/OATs 扮演重要的角色。

Indoxyl sulfate 是一種內生性的腎毒性物質，並且會蓄積在慢性腎病的大鼠及病人體內。本實驗結果顯示 indoxyl sulfate 對 PSP 可能具抑制作用，表示它們有共同的運送蛋白。

中國醫藥大學
CHINA MEDICAL UNIVERSITY

結 論

1. 本研究建立了 HPLC-UV 分析法，能同時定量血清中 indican 及 indoxyl sulfate 濃度，可提供藥物動力學研究之參考。
2. 大鼠口服及靜脈注射 indican 後，indican 快速的代謝成 indoxyl sulfate，而主要以 indoxyl sulfate 存在於血液中，且滯留時間相當長。透過口服兩種劑量的動力學研究顯示，indican 在大鼠體內表現非線性動力學行為。
3. Indoxyl sulfate 在體內蓄積易加速腎功能損傷，對於含有 indican 的板藍根或其他植物產品，建議長期服用者應注意腎功能。
4. Indican 併服 MTX 時，顯著增加 MTX 的血藥面積及滯留時間。對於吸收期之影響不明顯，而對排除有明顯的抑制作用。建議併用含有 indican 的板藍根或其他相關植物產品時，應避免併服 MTX，以確保用藥安全。
5. 同時靜脈注射 PSP 與 indoxyl sulfate 時，indoxyl sulfate 抑制了 PSP 之排除，應可推論在 indoxyl sulfate 的排除中，MRP2 及 OAT1, 3 扮演重要之角色。

一、 Indican 於大鼠體內之代謝動力學

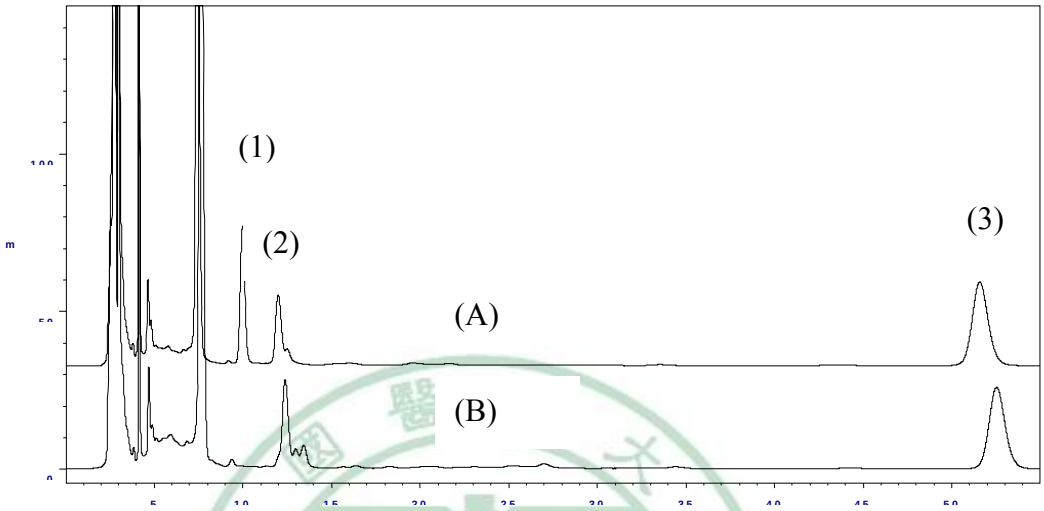


Fig.7 The chromatograms of indican (1), indoxyl sulfate (2) and methyl paraben (3): (a) serum sample after oral administration of indican. (b) Endogenous indoxyl sulfate.

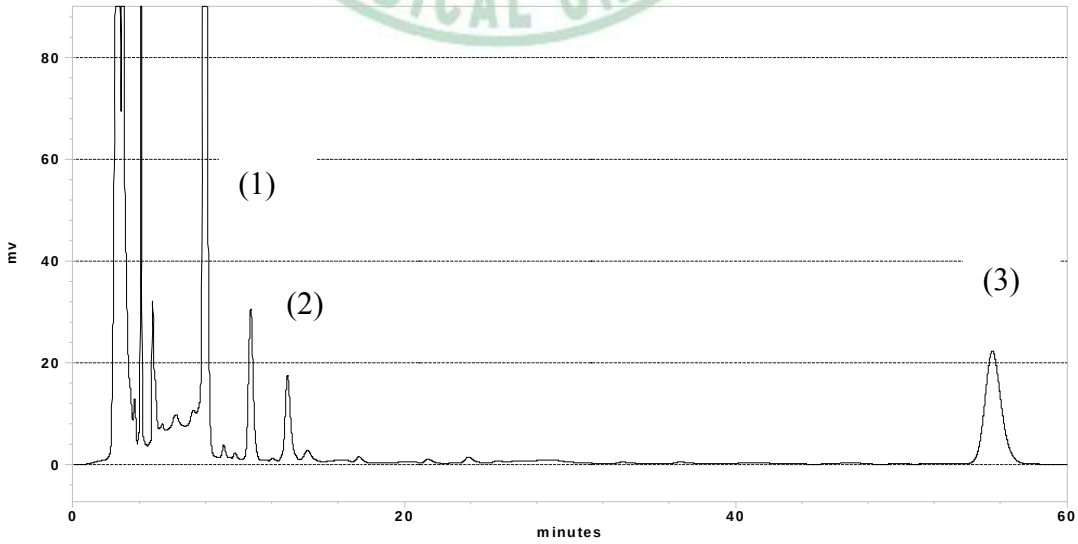


Fig. 8 The chromatograms of indican (1), indoxyl sulfate (2) and methyl paraben

(3): serum sample after intravenous administration of indican.

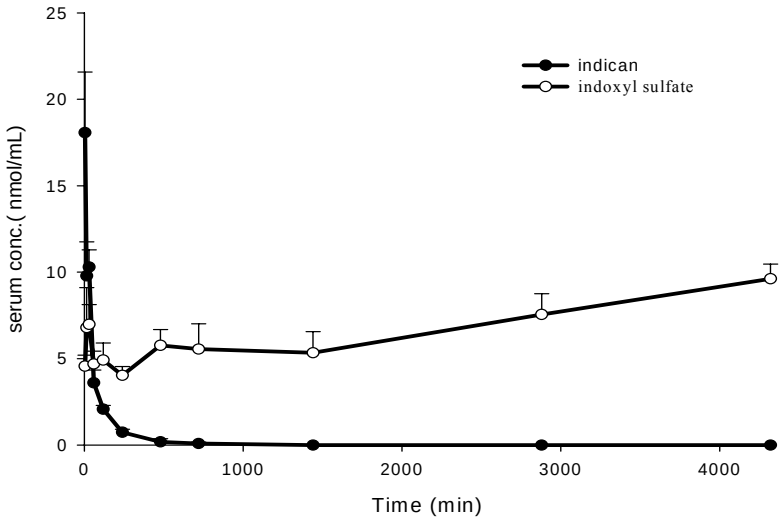


Fig. 9 Mean (± S.E.) serum concentration-time profiles of indican (●) and indoxylsulfate (○) after intravenous administration of indican (10.0 mg/kg) to six rats（n=6）.

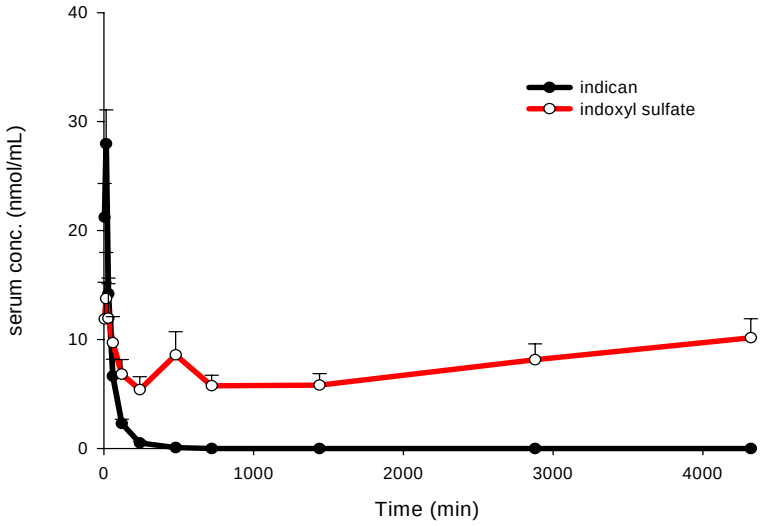


Fig.10. Mean (± S.E.) serum concentration-time profiles of indican (●) and indoxyl sulfate (○) after oral administration of indican (20.0 mg/kg) to six rats（n=6）.

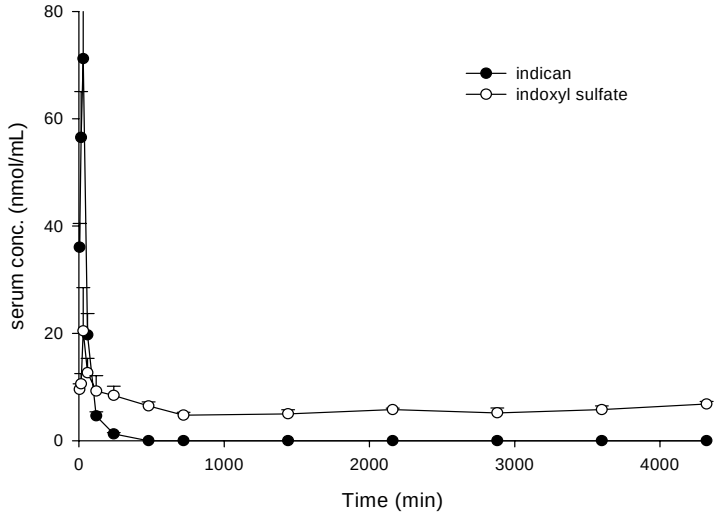


Fig.11 Mean (± S.E.) serum concentration-time profiles of indican (●) and indoxyl sulfate (○) after oral administration of indican (40.0 mg/kg) to six rats（n=6）.

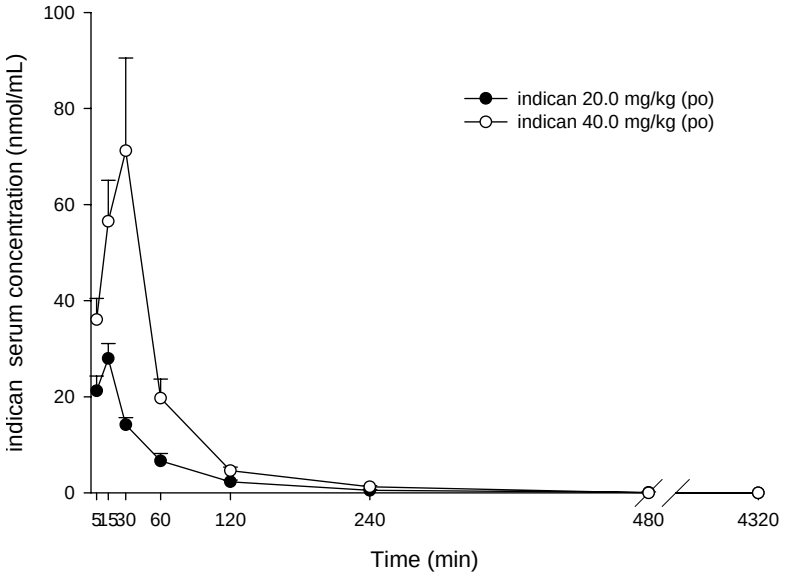


Fig.12 Mean (±S.E.) serum concentration-time profiles of indican after oral administration of 20.0 mg/kg (●) and 40.0 mg/kg (○) of indican.

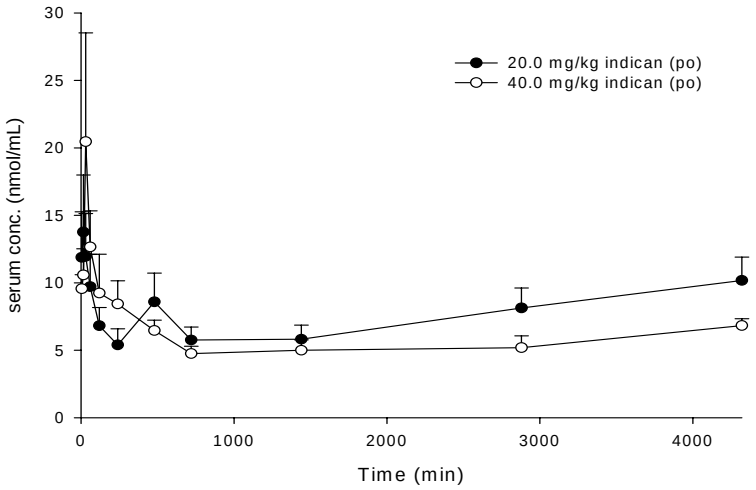


Fig.13 Mean (±S.E.) serum concentration-time profiles of indoxyl sulfate after oral administration of 20.0 mg/kg (●) and 40.0 mg/kg (○) of indican.

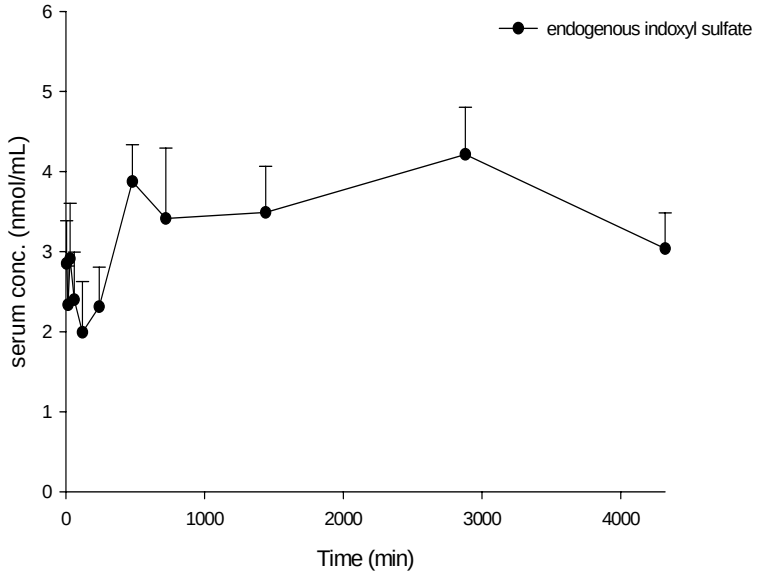


Fig.14 Mean (±S.E.) serum concentration-time profiles of endogenous indoxyl sulfate (●) in rats.

Table 6 Pharmacokinetic parameters of indican (ID) and indoxyl sulfate (IDS) of six rats after oral administration of 20.0 mg/kg and 40.0 mg/kg indican and intravenous bolus of 10.0 mg/kg indican.

Parameter	10.0 mg/kg, iv	20.0 mg/kg, po	40.0 mg/kg, po
Indican			
C_{max}		0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
$AUC_{0\text{-}2880}$	1008.7 ± 141.5	1349.9 ± 158.1	3956.4 ± 669.4
MRT	73.5 ± 21.5	49.7 ± 6.5	45.2 ± 3.7
Indoxyl sulfate			
C_{max}		13.1 ± 2.6	24.2 ± 8.5
$AUC_{0\text{-}2880}$	139456.8 ± 5850.4	31255.6 ± 4805.9	28130.8 ± 1121.5
MRT	2522.3 ± 84.1	2373.3 ± 17.0	2105.0 ± 88.6*
$\frac{AUC_{IDS}}{AUC_{ID} + AUC_{IDS}} \times 100\%$	99%	96%	88%

Data expressed as mean±S.E.

C_{max} (nmol · mL^{-1}): the peak or maximum concentration

$AUC_{0\text{-}4320}$ (nmol · min · mL^{-1}): area under concentration-time curve to the last point

MRT (min): mean residence time

Values are means ± SE. Means in a row without a common superscript differ. $P < 0.05$

Table 7 The regression equations, concentration ranges and correlation coefficients of indican and indoxyl sulfate in rat serum.

Constituents	**Conc. ranges (μg/mL)**	**Regression equations**	**r^2**
Indican	0.78 ~ 50.0	Y=0.60X-0.01	0.99
Indoxyl sulfate	0.63 ~ 20.0	Y=0.83X+0.08	0.99

Table 8. Recovery (%) of indican from rat serum (n=3).

Conc. (μg/mL)	1	2	3	Mean±S.D.
25.0	98.0	90.9	95.0	94.6±3.5
6.3	97.4	102.5	100.3	100.1±2.6
1.6	91.3	99.4	98.1	96.3±4.3

Table 9. Recovery (%) of indoxyl sulfate from rat serum (n=3).

Conc. (μg/mL)	1	2	3	Mean±S.D.
20.0	99.2	96.4	97.5	97.7±1.4
5.0	108.9	94.1	90.1	98.0±9.6
1.3	111.6	97.4	109.2	106.1±7.6

Table 10. Intra-day and inter-day analytical precision and accuracy of indican in rat serum.

Conc. (μg/mL)	Precision				Accuracy	
	Intra-day		Inter-day		Intra-day	Inter-day
	Mean ± S.D.	(C.V.%)	Mean ± S.D.	(C.V.%)	Relative error (%)	Relative error (%)
50.0	50.0 ± 0.2	0.4	50.0 ± 0.4	0.9	0.0	0.01
6.25	6.0 ± 0.2	3.7	6.2 ± 0.0	0.3	-4.7	-1.5
3.13	3.3 ± 0.1	2.2	3.2 ± 0.1	2.2	6.1	2.2
1.56	1.6 ± 0.1	9.3	1.6 ± 0.1	5.8	-0.07	2.3
0.78	0.9 ± 0.1	8.2	0.8 ± 0.0	5.4	10.1	-1.9

Table 11. Intra-day and inter-day analytical precision and accuracy of indoxyl sulfate in rat serum.

Conc. (μg/mL)	Precision				Accuracy	
	Intra-day		Inter-day		Intra-day	Inter-day
	Mean ± S.D.	(C.V.%)	Mean ± S.D.	(C.V.%)	Relative error (%)	Relative error (%)
20.0	20.2 ± 0.3	1.7	20.2 ± 0.1	0.5	0.9	1.0
10.0	9.7 ± 0.4	3.8	9.6 ± 0.7	6.9	-3.4	-4.1
5.0	4.9 ± 0.4	8.1	5.0 ± 0.0	0.6	-1.2	-1.0
1.3	1.4 ± 0.1	5.3	1.4 ± 0.2	10.8	10.8	11.4
0.6	0.7 ± 0.1	7.7	0.7 ± 0.1	7.3	14.9	18.0

Table 12 The serum concentrations (nmol/mL) of indican in six rats after oral administration of indican (20.0 mg/kg).

Time (min) \ Rats	1	2	3	4	5	6	Mean ±S.E.
5	15.4	31.1	23.1	28.7	16.0	13.0	21.2 ±3.1
15	21.8	26.6	27.5	42.6	21.8	27.5	28.0 ±3.1
30	10.8	16.0	16.4	15.7	8.7	17.5	14.2 ±1.4
60	4.9	5.0	6.5	6.8	2.8	13.8	6.6 ±1.6
120	1.5	1.8	2.6	2.5	1.5	3.9	2.3 ±0.4
240	ND	0.7	0.9	ND	0.5	0.9	0.5 ±0.2
480	ND	0.5	ND	ND	ND	ND	0.1 ±0.2
720	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1440	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2880	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4320	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: not detectable

Table 13. The serum concentrations (nmol/mL) of indoxyl sulfate in six rats after oral administration of indican (20.0 mg/kg).

Time (min) \ Rats	1	2	3	4	5	6	Mean ±S.E.
5	6.6	9.4	17.6	25.5	2.8	9.4	11.9 ±3.4
15	7.0	8.8	21.0	30.8	2.6	12.3	13.8 ±4.2
30	6.3	7.6	21.3	18.6	1.8	16.2	12.0 ±3.2
60	6.5	4.9	15.5	16.2	2.5	12.7	9.7 ±2.4
120	4.7	4.4	10.8	10.4	3.0	7.7	6.8 ±1.3
240	7.0	3.2	8.0	9.0	2.1	3.2	5.4 ±1.2
480	4.3	5.4	15.7	14.3	3.8	8.0	8.6 ±2.1
720	5.0	4.1	9.8	4.7	3.7	7.3	5.8 ±1.0
1440	4.9	3.6	7.7	10.1	4.3	4.3	5.8 ±1.0
2880	8.4	5.4	12.2	12.8	4.3	5.9	8.1 ±1.5
4320	8.0	6.8	14.2	16.1	5.4	10.4	10.2 ±1.7

Table 14. The serum concentrations (nmol/mL) of indican in six rats after intravenous administration of indican (10.0 mg/kg).

Time (min) \ Rats	1	2	3	4	5	6	Mean ±S.E.
5	20.3	22.4	10.2	18.5	30.4	6.6	18.1 ±3.5
15	7.5	14.4	8.6	11.2	14.9	2.0	9.8 ±2.0
30	12.4	7.4	7.8	13.6	10.7	9.8	10.3 ±1.0
60	3.6	1.3	5.0	6.0	3.9	1.8	3.6 ±0.7
120	2.4	1.3	2.0	3.0	1.9	2.0	2.1 ±0.2
240	1.1	ND	1.0	1.1	0.7	0.7	0.7 ±0.2
480	1.1	ND	ND	ND	ND	ND	0.2 ±0.2
720	0.5	ND	ND	ND	ND	ND	0.1 ±0.1
1440	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2880	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4320	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Table 15 . The serum concentrations (nmol/mL) of indoxyl sulfate in six rats after intravenous administration of indican (10.0 mg/kg).

Time (min) \ Rats	1	2	3	4	5	6	Mean ±S.E.
5	7.5	4.4	4.2	4.8	2.9	3.5	4.6 ±0.6
15	18.1	4.3	5.3	6.0	4.1	2.9	6.8 ±2.3
30	7.2	3.6	5.8	10.5	4.7	10.0	7.0 ±1.1
60	3.6	2.7	4.6	7.3	3.5	6.5	4.7 ±0.7
120	4.2	3.8	3.6	9.7	3.0	5.2	5.0 ±1.0
240	2.4	5.6	4.2	5.2	2.8	4.1	4.0 ±0.5
480	8.5	4.8	8.4	2.9	4.9	5.0	5.8 ±1.0
720	12.7	3.0	4.7	4.8	5.0	3.1	5.5 ±1.5
1440	9.8	5.1	7.6	4.9	2.7	1.9	5.3 ±1.2
2880	9.6	7.3	12.0	5.9	7.1	3.5	7.6 ±1.2
4320	9.6	10.6	13.2	8.0	7.5	8.9	9.6 ±4.0

Table16 The serum concentrations (nmol/mL) of indican in five rats after oral administration of indican (40.0 mg/kg).

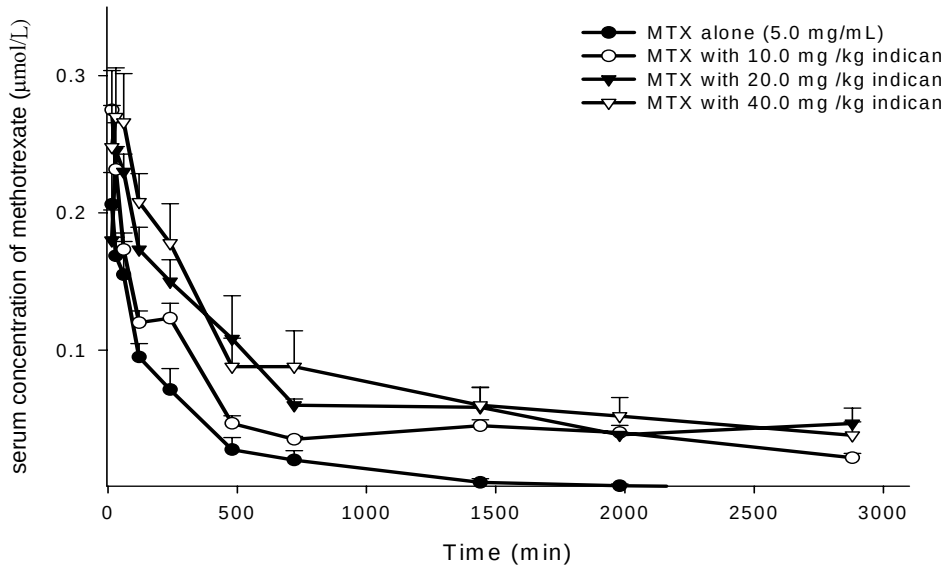
Time (min) \ Rats	1	2	3	4	5	6	Mean ±S.E.
5	28.3	22.9	50.8	30.8	37.0	46.6	36.1 ±4.4
15	89.9	42.3	64.3	28.4	60.7	53.4	56.5 ±8.5
30	162.1	75.5	38.3	33.6	65.8	52.0	71.2 ±19.3
60	30.2	31.0	19.8	5.3	14.4	17.6	19.7 ±4.0
120	5.1	2.6	5.8	2.3	4.6	7.3	4.6 ±0.8
240	1.2	2.4	0.8	0.6	1.1	1.3	1.2 ±0.3
480	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
720	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1440	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2880	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4320	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Table 17. The serum concentrations (nmol/mL) of indoxyl sulfate in six rats after oral administration of indican (40.0 mg/kg).

Time (min) \ Rats	1	2	3	4	5	6	Mean ±S.E.
5	6.8	4.4	11.8	8.2	7.5	9.9	9.6 ±1.0
15	15.5	4.3	15.0	3.1	8.8	8.1	10.6 ±2.0
30	26.5	3.6	10.1	7.3	8.3	12.4	20.5 ±8.1
60	23.7	2.7	14.2	6.8	5.9	10.3	12.7 ±2.7
120	22.3	3.8	8.8	6.6	7.1	9.5	9.2 ±2.9
240	12.1	5.6	5.7	7.2	4.9	15.2	8.4 ±1.7
480	7.3	4.8	6.1	6.8	6.6	8.9	6.5 ±0.8
720	4.9	3.0	3.3	5.0	4.1	7.1	4.8 ±0.5
1440	5.0	5.1	3.0	4.7	3.7	8.4	5.0 ±0.8
2160	6.0	5.3	5.0	6.9	5.3	6.2	5.8 ±0.3
2880	3.5	4.7	8.1	7.2	5.2	2.4	5.2 ±0.9
3600	7.0	7.0	4.9	7.5	5.1	3.3	5.8 ±0.7
4320	5.8	7.2	8.1	5.6	6.0	8.4	6.8±0.5

二、Indican 於大鼠體內對 methotrexate 動力學之影響

（A）



（B）

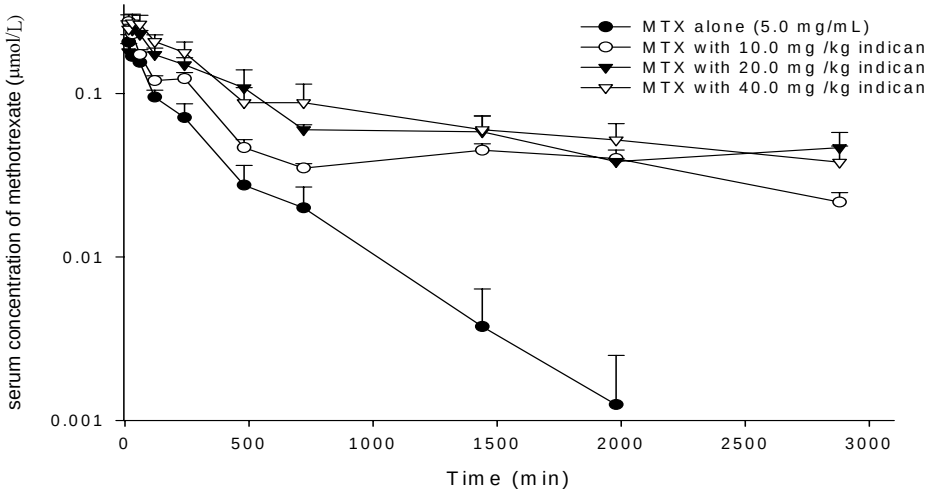


Fig.15 Mean (±S.E.) serum concentration-time profiles of MTX (a) after oral administration of MTX alone (5.0 mg/kg) (●), and coadministration with 10.0 mg/kg (○), 20.0 mg/kg (▼) and 40.0 mg/kg(▽) of indican (A)；the semi-log diagram (B).

Table 18 Parmacokinetic parameters of methotrexate among rats after oral administration of methotrexatre alone (5.0 mg/kg) and coadministration with 10.0 mg/kg, 20.0 mg/kg and 40.0 mg/kg of indican (ID).

Parameter	MTX alone	MTX + ID (10.0 mg/kg)	MTX + ID (20.0 mg/kg)	MTX + ID (40.0 mg/kg)
	n=7	n=6	n=6	n=5
C_{max} (μmol · L^{-1})	0.27 ± 0.03	0.28±0.03	0.26±0.04	0.30±0.03
AUC_{0-2880} (μmol · min · L^{-1})	75.5±24.2 [a]	145.0±6.90[ab]	201.3±22.7[b]	228.2±35.2[b]
Vz/F (L)	19.6±3.5	37.3±4.7	36.1±6.36	28.3±2.07
CL/F (L · min^{-1})	0.06±0.0[a]	0.02±0.0[b]	0.01±0.0 [b]	0.02±0.0 [b]
MRT (min)	338.5±168.0[a]	1033.7±41.2 [b]	1035.3±43.7 [b]	958.9±83.5 [b]

Data expressed as mean±S.E

Vz/F: volume of distribution of the central compartment (L)

CL/F: total body clearance (L · min^{-1})

Values are means ± SE. Means in a row without a common superscript differ. $P < 0.05$

Table 19. The serum concentrations (μmol/L) of MTX in six rats after coadministration of MTX (5.0 mg/kg) and 10.0 mg/kg indican.

Time (min) \ Rats	1	2	3	4	5	6	Mean ±S.E.
15	0.3	0.2	0.4	0.2	0.3	0.3	0.3 ±0.0
30	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3	0.2 ±0.0
60	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2 ±0.0
120	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1 ±0.0
240	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1 ±0.0
480	0.1	0.1	0.1	ND	0.1	ND	0.1 ±0.0
720	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1440	0.1	0.1	ND	ND	ND	0.1	ND
1980	ND	0.1	0.1	ND	ND	ND	ND
2880	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Table 20. The serum concentrations (μmol/L) of MTX in six rats after coadministration of MTX (5.0 mg/kg) and 20.0 mg/kg indican.

Time (min) \ Rats	1	2	3	4	5	6	Mean ±S.E.
15	0.28	0.20	0.17	0.15	0.13	0.15	0.18 ±0.02
30	0.34	0.25	0.23	0.24	0.19	0.22	0.25 ±0.02
60	0.25	0.22	0.21	0.23	0.28	0.19	0.23 ±0.01
120	0.18	0.14	0.21	0.14	0.23	0.14	0.17 ±0.02
240	0.19	0.18	0.11	0.14	0.18	0.10	0.15 ±0.02
480	0.09	0.06	0.07	0.11	0.26	0.06	0.11 ±0.03
720	0.07	0.05	0.05	0.07	0.07	0.05	0.06 ±0.00
1440	0.04	0.05	0.05	0.04	0.13	0.04	0.06 ±0.01
1980	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04 ±0.00
2880	0.02	0.04	0.04	0.04	0.10	0.04	0.05 ±0.00

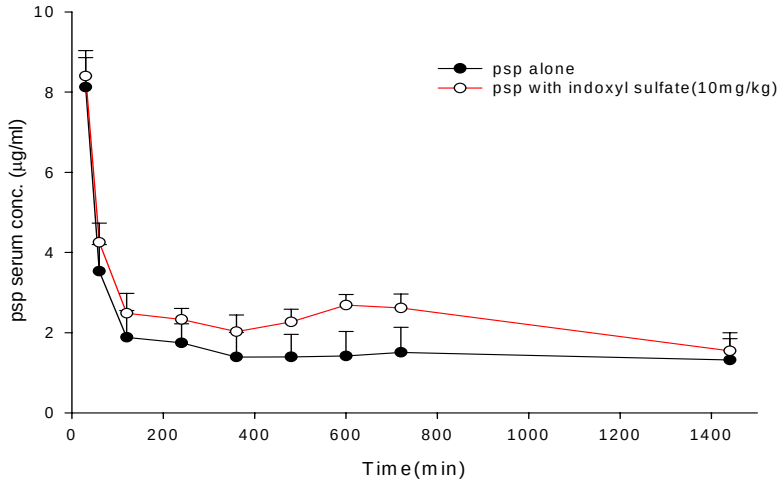
Table 21. The serum concentrations (μmol/L) of MTX in six rats after coadministration of MTX (5.0 mg/kg) and 40.0 mg/kg indican.

Time (min) \ Rats	1	2	3	4	5	Mean ±SE
15	0.21	0.35	0.22	0.28	0.18	0.18 ±0.02
30	0.19	0.40	0.28	0.25	0.23	0.25 ±0.02
60	0.20	0.36	0.24	0.19	0.34	0.23 ±0.01
120	0.18	0.28	0.22	0.20	0.16	0.17 ±0.02
240	0.20	0.27	0.18	0.14	0.10	0.15 ±0.02
480	0.14	0.10	0.12	0.03	0.05	0.11 ±0.03
720	0.19	0.08	0.07	0.05	0.05	0.06 ±0.00
1440	0.10	0.05	0.07	0.02	0.06	0.06 ±0.01
1980	0.09	0.04	0.07	0.01	0.05	0.04 ±0.00
2880	0.07	0.04	0.04	0.01	0.03	0.05 ±0.00

CHINA MEDICAL UNIVERSITY

三、Indoxyl sulfate 於大鼠體內對 phenolsulphthalein 動力學之影響

（A）



（B）

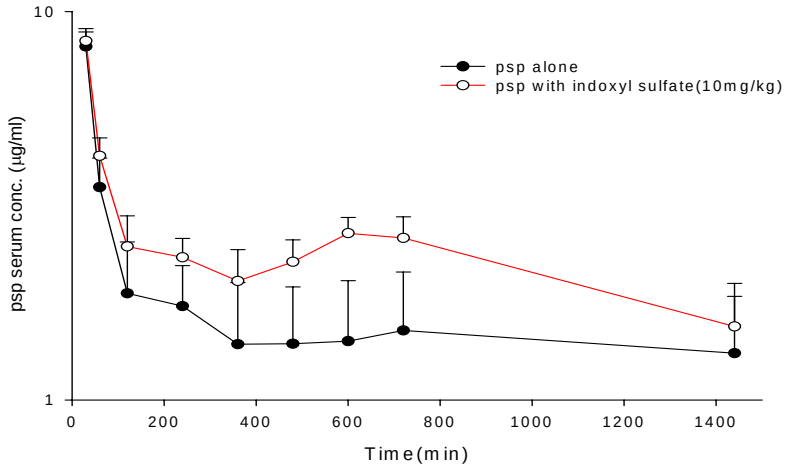


Fig 16 Mean (±S.E.) serum concentration-time profiles of PSP after intravenous administration of PSP alone (5.0 mg/kg) (●) and coadministration with indoxyl sulfate 10.0 mg/kg (○) (A)；the semi-log diagram (B).

Table 22. The regression equations, concentration ranges and correlation coefficients of PSP in rat serum.

Constituents	Conc. ranges (μg/mL)	Regression equations	r^2
PSP	0.39 ~ 12.5	Y=0.019X-0.00	0.9994
PSP	0.39 ~ 12.5	Y=0.019X+0.001	0.9994

Table 23. Comparison of pharmacokinetic parameters of PSP of six rats administered with intravenous PSP (5.0 mg/kg) alone and with 10.0 mg/kg of indoxyl sulfate (IS).

Parameters	PSP alone n=6	PSP＋IS (10.0 mg/kg) n=6
AUC_{0-1440}	1271.8±124.6	4071.7±604.2**
Vz	852.7±180.1	341.1±51.5*
MRT	397.1±51.3	572.2±21.9**
Half-life	1174.3±659.8	1916.9±1050.4
CL	1.1±0.3	0.3±0.1**

Data expressed as mean±S.E

** $p < 0.01$ compared with PSP alone.

Table 24. The serum concentrations (μg/mL) of PSP in six rats after oral administration of PSP (5.0 mg/kg) with indoxyl sulfate (10.0 mg/kg).

Time (min) \ Rats	1	2	3	4	5	6	Mean ±S.E.
30	6.8	6.6	7.0	10.6	10.4	9.1	8.4 ±0.8
60	4.5	2.6	2.7	6.2	4.7	5.0	4.3 ±0.6
120	1.0	2.2	1.2	4.8	2.8	3.4	2.6 ±0.6
240	2.7	2.2	0.8	2.9	2.6	2.9	2.3 ±0.3
360	0.9	0.9	1.2	3.7	2.7	2.9	2.0 ±0.5
480	2.0	1.0	1.4	3.2	2.6	3.1	2.2 ±0.4
600	2.4	3.1	1.9	4.0	2.4	2.7	2.8 ±0.3
720	2.6	2.7	2.5	4.2	2.5	2.9	2.9 ±0.3
1440	0.6	0.8	0.4	3.1	2.3	2.9	1.7 ±0.5

Table 25. The serum concentrations (μg/mL) of PSP in six rats after oral administration of PSP (5.0 mg/kg) with buffer (pH= 7.4).

Time (min) \ Rats	1	2	3	4	5	6	Mean ±S.E.
30	7.2	5.6	6.8	7.8	3.8	6.2	6.2 ±0.6
60	2.3	2.3	2.7	2.5	1.3	2.4	2.3 ±0.2
120	0.5	1.0	0.5	1.0	0.7	0.8	0.8 ±0.1
240	2.6	0.3	0.2	0.3	0.7	0.8	0.8 ±0.4
360	0.1	0.4	0.1	0.3	0.7	0.3	0.3 ±0.1
480	0.2	0.7	0.0	0.4	0.7	0.5	0.4 ±0.1
600	0.1	0.6	0.0	0.9	0.8	1.2	0.6 ±0.2
720	0.7	0.2	0.2	0.7	0.8	0.9	0.6 ±0.1
1440	0.1	0.4	0.3	0.4	0.5	0.9	0.4 ±0.1

Reference

肖培根，楊世林，藥用動植物種養加工技術，2001，中國中醫藥出版社

Angelini LG. Campeol E. Tozzi S. Gilbert KG. Cooke DT. John P. A new HPLC-ELSD method to quantify indican in *Polygonum tinctorium* L. and to evaluate beta-glucosidase hydrolysis of indican for indigo production. Biotechnology Progress. 19(6):1792-7, 2003

Aquerreta I. Aldaz A. Giraldez J. Sierrasesumaga L. Methotrexate pharmacokinetics and survival in osteosarcoma. Pediatric Blood & Cancer. 42(1): 52-58, 2004.

Bannwarth B. Pehourcq F. Schaeverbeke T. Dehais J. Clinical pharmacokinetics of low-dose pulse methotrexate in rheumatoid arthritis. Clinical Pharmacokinetics. 30(3): 194-210, 1996.

Banoglu E. Jha GG. King RS. Hepatic microsomal metabolism of indole to indoxyl, a precursor of indoxyl sulfate. European Journal of Drug Metabolism & Pharmacokinetics. 26(4):235-40, 2001

Budavari S. The Merck Index, Merck & Co. Inc., 13th ed., NJ, USA. p.4975,1999

Burchini G. Orsi C. Rheumatoid arthritis. New England Journal of Medicine. 351(13): 1360-1361, 2004.

Carneiro-Filho BA. Lima IP. Araujo DH. Cavalcante MC. Carvalho GH. Brito GA. Lima V.Monteiro SM. Santos FN. Ribeiro RA. Lima AA. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis. Digestive Diseases & Sciences. 49(1): 65-72, 2004.

Chan LM. Lowes. SHirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver:efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. Eur J Pharm Sci.;21(1):25-51,2004

Chen ZS, Kawabe T, Ono M, Aoki S, Sumizawa T, Furukawa T, Uchiumi T, Wada M, Kuwano M, Akiyama SI. Effect of multidrug resistance-reversing agents on transporting activity of human canalicular multispecific organic anion transporter.Mol Pharmacol. 56(6):1219-28; 1999

Chen ZS. Lee K. Walther S. Raftogianis RB. Kuwano M. Zeng H. Kruh GD. Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. Cancer Research. 62(11): 3144-3150, 2002.

Deguchi T. Nakamura M. Tsutsumi Y. Suenaga A. Otagiri M. Pharmacokinetics and tissue distribution of uraemic indoxyl sulphate in rats. Biopharmaceutics & Drug Disposition. 24(8):345-55, 2003

Deguchi T. Ohtsuki S. Otagiri M. Takanaga H. Asaba H. Mori S. Terasaki T. Major role of organic anion transporter 3 in the transport of indoxyl sulfate in the kidney. Kidney International. 61(5):1760-8, 2002

Douglas H. Sweet. organic anion transporter (Slc22a) family members as mediators of toxicity. Toxicology and applied pharmacology.204(3):198-215,2005

E. Boyland, P. Sims and D.C. Williams. The oxidation of tryptophan and some related compounds with persulphate, Biochem J, 62:546-550, 1956

Enomoto A. Takeda M. Taki K. Takayama F. Noshiro R. Niwa T. Endou H.Interactions of human organic anion as well as cation transporters with indoxyl sulfate. European Journal of Pharmacology. 466(1-2):13-20, 2003

Enomoto A. Takeda M. Tojo A. Sekine T. Cha SH. Khamdang S. Takayama F. Aoyama I. Nakamura S. Endou H. Niwa T. Role of organic anion transporters in the tubular transport of indoxyl sulfate and the induction of its nephrotoxicity. Journal of the American Society of Nephrology. 13(7):1711-20, 2002

Fraser AG. Methotrexate: first-line or second-line immunomodulator? European Journal of Gastroenterology & Hepatology. 15(3): 225-231, 2003.

Furst DE. Practical clinical pharmacology and drug interactions of low-dose methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. British Journal of Rheumatology. 34 Suppl 2: 20-25, 1995.

Grim J. Chladek J. Martinkova J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases. Clinical Pharmacokinetics. 42(2): 139-151, 2003.

Higaki K, Ishii M, Esumi H, Kanayama M, Ogawara KI, Kimura T. Pharmacokinetic analysis of factors determining elimination pathways for sulfate and glucuronide metabolites of xenobiotics II: Studies with isolated perfused rat liver.Xenobiotica. 33(11):1097-108.; 2003

Hillson JL. Furst DE. Pharmacology and pharmacokinetics of methotrexate in rheumatic disease. Practical issues in treatment and design. Rheumatic Diseases Clinics of North America. 23(4): 757-778, 1997.

Ishizuka H, Konno K, Shiina T, Naganuma H, Nishimura K, Ito K, Suzuki H, Sugiyama Y. Species differences in the transport activity for organic anions across the bile canalicular membrane.J Pharmacol Exp Ther. 290(3):1324-30; 1999

Itagaki S, Chiba M, Shimamoto S, Sugawara M, Kobayashi M, Miyazaki K, Hirano T, Iseki K. Characterization of secretory intestinal transport of phenolsulfophthalein. Drug Metab Pharmacokinet. 20(1):72-8;2005

Itagaki S, Sugawara M, Kobayashi M, Miyazaki K, Iseki K, Mechanism of active secretion of phenolsulfophthalein in the liver via Mrp2 (abcc2), an organic anion transporter, Drug Metab harmacok, 18(4):238-44, 2003

Itagaki S, Sugawara M, Kobayashi M, Nishimura S, Fujimoto M, Miyazaki K, Iseki K., Major role of organic anion transporters in the uptake of phenolsulfophthalein in the kidney, Eur J Pharmacol, 15;475(1-3):85-92. 2003

Kruh GD. Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps.Oncogene. 22(47):7537-52, 2003

Kruh GD. Zeng H. Rea PA. Liu G. Chen ZS. Lee K. Belinsky MG. MRP subfamily transporters and resistance to anticancer agents. Journal of Bioenergetics & Biomembranes. 33(6): 493-501, 2001.

Maugard T. Enaud E. de la Sayette A. Choisy P. Legoy MD. Beta-glucosidase-catalyzed hydrolysis of indican from leaves of Polygonum tinctorium. Biotechnology Progress. 18(5):1104-8, 2002

Minami Y. Nishimura O. Hara-Nishimura I. Nishimura M. Matsubara H. Tissue and intracellular localization of indican and the purification and characterization of indican synthase from indigo plants. Plant & Cell Physiology. 41(2):218-25, 2000

Mukai T, Mera K, Nishida K, Nakashima M, Sasaki H, Nakamura J. Pharmacokinetics of phenol red in rat models of liver damage prepared by liver targeting of carbon tetrachloride. Biol Pharm Bull. 27(4):595-7.2004

Nishida K, Tomiyama N, Mukai T, Nakashima M, Sasaki H, Nakamura J..Absorption characteristics of compounds with different molecular weights after application to the unilateral kidney surface in rats.Eur J Pharm Biopharm. 58(3):705-11. 2004

Nishida K, Yoshida Y, Mukai T, Kawakami S, Sakaeda T, Nakashima M, Sasaki H, Nakamura J. Effect of instillation method on the absorption of phenolsulfophthalein as a model drug from the liver and small intestinal serosal surface in rats.J Pharm Pharmacol. 53(10):1341-6.2001

Niwa T, Ise M, Miyazaki T, Progression of glomerular sclerosis in experimental uremic rats by administration of indole, a precursor of indoxyl sulfate, Am J Nephrol.;14(3):207-12. 1994

Niwa T. Aoyama I. Takayama F. Tsukushi S. Miyazaki T. Owada A. Shiigai T. Urinary indoxyl sulfate is a clinical factor that affects the progression of renal failure. Mineral & Electrolyte Metabolism. 25(1-2):118-22, 1999

Niwa T. Ise M. Indoxyl sulfate, a circulating uremic toxin, stimulates the progression of glomerular sclerosis. Journal of Laboratory & Clinical Medicine. 124(1):96-104, 1994

Ohtsuki S. Asaba H. Takanaga H. Deguchi T. Hosoya K. Otagiri M. Terasaki T. Role of blood-brain barrier organic anion transporter 3 (OAT3) in the efflux of indoxyl sulfate, a uremic toxin: its involvement in neurotransmitter metabolite clearance from the brain. Journal of Neurochemistry. 83(1):57-66, 2002.

Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer.FEBS Lett 17; 2006

Paul M Beringer and Richard L Slaughter. Transporters and their impact on drug Disposition. The annals of Pharmacotherapy. 39. 2005

Quan Tian 1, Jing Zhang 1, Eli Chan 1, Wei Duan 2, Shufeng Zhou. Multidrug resistance proteins (MRPs) and implication in drug development. Drug Development Research.4(1). 1 – 18.2005

Rommel G. Tirona. Richard B Kim. Pharmacogenomice of organic anion transporting polypeptide. Advanced drug delivery reviews. 54.1343-1352.2002

Sakai T, Yamasaki K, Sako T, Kragh-Hansen U, Suenaga A, Otagiri M. Interaction mechanism between indoxyl sulfate, a typical uremic toxin bound to site II, and ligands bound to site I of human serum albumin.
Pharm Res. 18(4):520-4; 2001

Seideman P. Beck O. Eksborg S. Wennberg M. The pharmacokinetics of methotrexate and its 7-hydroxy metabolite in patients with rheumatoid arthritis. British Journal of Clinical Pharmacology. 35(4): 409-412, 1993.

Sekine T, Miyazaki H, Endou H. Molecular physiology of renal organic anion transporters., Am J Physiol Renal Physiol Feb;290(2):F251-61,2006

Shirou I. Mitsuru S.Michiya K. Sachiho N.Michio F. Katsumi M. Ken I, Major role of organic anion transporters in the uptake of phenolsulfophthalein in the kidney. European J of Pharmacology. 475.85-92, 2003

Sonneveld P. Schultz FW. Nooter K. Hahlen K. Pharmacokinetics of methotrexate and 7-hydroxy-methotrexate in plasma and bone marrow of children receiving low-dose oral methotrexate. Cancer Chemotherapy & Pharmacology. 18(2): 111-116, 1986

Strum WB. Characteristics of the transport of pteroylglutamate and amethopterin in rat jejunum. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics. 216(2): 329-333, 1981.

Sun H, Frassetto L, Benet LZ. Effects of renal failure on drug transport and metabolism. harmacol Ther.109(1-2):1-11; 2006

Tohyama K, Kobayashi Y, Kan T, Yazawa K, Terashima T, Mutai M, Effect of lactobacilli on urinary indican excretion in gnotobiotic rats and in man, Microbiol Immunol.;25(2):101-12. 1981

Uwai Y. Saito H. Inui K. Interaction between methotrexate and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in organic anion transporter. European Journal of Pharmacology. 409(1): 31-36, 2000.

Ward MM. Trends in the use of disease modifying antirheumatic medications in rheumatoid arthritis, 1980-1995: results from the National Ambulatory Medical Care Surveys. Journal of Rheumatology. 26(3): 546-550, 1999.

Zeng H. Chen ZS. Belinsky MG. Rea PA. Kruh GD. Transport of methotrexate MTX and folates by multidrug resistance protein MRP 3 and MRP1: effect of polyglutamylation on MTX transport. Cancer Research. 61(19): 7225-7232, 2001.

中國醫藥大學 CHINA MEDICAL UNIVERSITY

附 錄

非室體模式 (Noncompartment model)

T_{max}：藥物到達血中濃度最高之時間 (min)

Cmax：血中藥物最高濃度 (nmol・mL^{-1})，(μg・mL^{-1})，(μmol・L^{-1})

AUC_{0-t} ：血中藥物濃度對時間之曲線下面積 (nmol・min・mL^{-1})，(μmol・min・L^{-1}) ，(μg・min・mL^{-1})

$AUMC_{0-t}$：第一動差時間對時間曲線下面積 (nmol・min^2・mL^{-1})，(μg・min^2・mL^{-1})，(μmol・min^2・L^{-1})

MRT：藥物之平均滯留時間 (min)

附錄一 Glossary

AUC

Area under a curve.

AUC_{last}

AUC (area under a curve) computed to the last observation.

AUMC

Area under the moment curve.

$AUMC_{last}$

Area under the moment curve computed to the last observation.

CL

Total body clearance. CL= Dose/AUC

C_{max}

The peak or maximum concentration.

Compartmental Pharmacokinetic Module

A program for the solution of nonlinear regression problems, constrained parameter estimation problems and systems of differential equations. It includes libraries of pharmacokinetic (PK), pharmacodynamic(PD), PK/PD Link, Indirect Response and simultaneous link models.

Compartments

Many biological systems are made up of a finite number of homogenous, well mixed subsystems called compartments. Classically compartments have been used to represent blood plasma, kidneys, lungs or other organs.

MRT

Mean Residence Time is the average amount of time a particle remains in a compartment or system.

MRT_{last}

Mean Residence Time when the drug concentration profile is not extrapolated to infinity, but rather is based on values up to and including the last measured concentration.

MRTlast = AUMClast / AUClast

T_{max}

The time of peak concentration.

V

Volume of distribution of the central compartment. This is also denoted Vc.

V_{ss}

Volume of distribution at steady state.

Vss = MRT * CL

where MRT = Mean Residence Time and CL= total body clearance