

編號：CCMP98-RD-104

中西藥交互作用體內一體外試驗模型之 建立及相關性探討 (2-2)

李珮端

中國醫藥大學

摘要

研究目的：

國人的特殊用藥習慣，隱藏著中西藥發生交互作用的風險。目前可供快速篩檢中西藥交互作用的簡易模型仍極有限，本計畫以治療指數狹窄的 cyclosporine (CSP)與 methotrexate (MTX)為西藥模型藥物，分別代表 P-glycoprotein (P-gp)與 multidrug resistance proteins (MRPs)之受質，以甘草為中藥模型藥物，建立中西藥交互作用之簡易篩檢模型。

研究方法：

本計畫第二年係基於第一年體內試驗的結果，建立適宜的體外試驗模型。以人類大腸癌細胞株 LS 180 探討甘草酸、甘草次酸、甘草水煎劑及芍藥甘草湯對 P-gp 與 MRP2 受質運輸及基因表現的影響。

結果與討論：

本體外試驗結果顯示，甘草酸、甘草次酸、甘草水煎劑及芍藥甘草湯皆顯著減少 P-gp 受質在細胞中的蓄積，顯示它們皆為 P-gp 的誘導劑；而甘草酸、甘草次酸及高濃度的芍藥甘草湯皆顯著增加 MRP2 受質在細胞中的蓄積，顯示其為 MRP2 的抑制劑，此些現象皆與體內動力學交互作用的結果相符。因此，本計畫所建立的體外細胞模型，應可用於篩檢中藥與 P-gp 或 MRP 受質西藥之交互作用。

關鍵詞：甘草、甘草酸、中西藥交互作用、P-醣蛋白、多重耐藥性蛋白

Number: CCMP98-RD-104

Establishment and Evaluation of an *in Vivo-in Vitro* Model for Herb-drug Interaction (2-2)

Pei-Dawn Lee Chao
China Medical University

ABSTRACT

The special medication habit of Taiwanese may result in potential risks of the herb-drug interaction. Till now, there was limited *in vitro* model available for fast screening of herb-drug interaction. In this study, licorice was used as a model drug of Chinese herb. Cyclosporine (CSP) and methotrexate (MTX) were used as model drugs for substrates of P-glycoprotein (P-gp) and multidrug resistance proteins (MRPs), respectively. By correlating *in vivo* and *in vitro* results, we established a fast *in vitro* screening model for herb-drug interaction.

Based on the findings of *in vivo* pharmacokinetic interactions in the first year, LS 180 was used to investigate the influence of glycyrrhizin (GZ), glycyrrhetic acid (GA), licorice decoction (LD) and Shaoyao Gancào Tang (SYGCT) on the transport of fluorescent substrates and gene expression of P-gp and MRP2.

The *in vitro* results showed that GZ, GA, LD and SYGCT significantly decreased the intracellular accumulation of P-gp substrate and thus were the inducers of P-gp. In addition, GZ, GA and high concentration of SYGCT significantly increased the intracellular accumulation of MRP2 substrate and thus were the inhibitors of MRP2. These *in vitro* results were consistent with the *in vivo* observations. Therefore, these *in vitro* models established in this study can be used for fast screening for the interaction of Chinese herbs with P-gp or MRP substrates.

Keywords: licorice, glycyrrhizin, herb-drug interaction, P-glycoprotein; multidrug resistance proteins

壹、前言

國人近年來在用藥習慣上，除了西藥外，亦常同時服用中藥。此種非經同一醫師處方而中西藥併用的特殊用藥習慣，隱藏著發生交互作用的風險。除了可能導致藥物的療效改變，亦可能增加藥物的不良副作用¹⁻⁴。為預防因中西藥交互作用所造成的用藥風險，或開創中西藥合併治療的利基，亟須建立一個可快速並大量篩測中西藥交互作用的簡易模型，對可能產生交互作用的中藥進行篩測，以期未來能建立中西藥交互作用之資料庫，提供臨床醫療人員及研發人員更安全、更豐富的藥物資訊。目前可供快速大量篩測中西藥交互作用的簡易體外模型尚極有限，國內雖有數位學者進行體外模型之建立及評估，但多著墨於與肝臟粒腺體之細胞色素相關的交互作用研究。

近代文獻報導指出，許多西藥間的交互作用，或中西藥間的交互作用常與 P-醣蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 或多重藥物耐藥性蛋白 (multidrug resistance proteins, MRPs) 等細胞膜上的運輸蛋白有關⁵⁻⁹。P-gp 為 1280 個胺基酸所組成的醣蛋白，為癌細胞產生抗藥性的主要原因之一，亦分佈於正常組織，主要存在於血腦障壁之上皮細胞、肝臟、心臟、脾臟、肺臟、腎臟、小腸、前列腺、子宮內膜及睪丸¹⁰。存在於小腸上皮細胞的 P-gp，將某些藥物排回腸腔，對藥物的口服吸收有抑制的影響¹¹，其他組織的 P-gp 則對藥物的分佈及排除造成影響。目前已知之 P-gp 受質多為親油性及陽離子藥物，如 Table 1 所列^{12,13}。另外，許多近年來的文獻指出，除了 P-gp 外，MRPs 也是造成癌細胞出現抗藥性的主要原因之一，亦屬於 ABC (ATP-binding cassette) transporter。至今已有九個成員被發現，依序命名為 MRP1~9¹⁴。MRPs 亦分佈於正常組織，主要存在於腦、肝臟、肺臟、脾臟、膽道、腎臟、小腸、前列腺、胎盤及睪丸¹²。MRPs 因存在於細胞上的位置不同，而有不同的功能。若位於 basolateral membrane，主要是將受質從細胞內逐出到血液中；若位於 apical membrane，則是將受質由細胞內外排至腸道或尿液中而排出體外。因此藥物的吸收、分佈及排除，深受 MRPs 之影響¹⁵。目前已知之 MRPs 受質多為陰離子藥物及 glutathion conjugates 等，如 Table 1 所列¹³。

免疫抑制劑 cyclosporine (CSP) 為 P-gp 之受質¹⁶⁻¹⁹。臨床上主要用於預防及治療異體移植後的排斥反應，亦常用於治療自體免疫疾病，如牛皮癬、類風濕性關節炎。CSP 於臨床使用時，由於治療指數狹窄，須監測血中濃度。血中濃度太低時，可能發生移植器官排斥；血中濃度過高時，會造成肝毒性、腎毒性及神經毒性等副作用，皆使病人有致命之危險。另一免疫

抑制劑 methotrexate (MTX) 為 MRP1、MRP 2、MRP 3、MRP 4 的受質^{7, 18, 20, 21}，臨床上廣泛使用於治療多種癌症、類風濕關節炎、慢性發炎疾病包括牛皮癬、肝硬化和過敏性氣喘等。因 MTX 之治療指數狹窄，臨床使用時常須監測血中濃度。不良副作用包括急性、慢性肝臟毒性及急性腎衰竭等。MTX 之排除主要經腎臟以腎絲球過濾及主動運輸方式排出體外(約 80-90%)，而其主動運輸的排除與 MRPs 有關，特別是 MRP2。如果併服的中藥影響 P-gp 或 MRPs 的功能時，勢必對 CSP、MTX 之療效與安全造成影響。本研究室過去幾年間，在中醫藥委員會及國科會支持下，主要探討多酚及富含多酚中藥對 CSP、MTX 動力學之影響，已陸續發表於學術期刊²²⁻²⁸。

甘草為一常用中藥，具有抗發炎、抗病毒及促進肝臟功能等作用²⁹⁻³¹。中藥文獻有「十方九草」及「無草不成方」的說法，足見甘草在中藥方劑使用上之重要性；此外，有些食物以甘草作為矯味劑，是藥食同用之中藥。甘草酸（甘草甜素）為甘草之主要成分，具有抗發炎、抗病毒等活性³²⁻³⁴，在日本及歐洲用於治療肝炎^{35, 36}。另外，甘草酸在食物中亦作為甜味劑。有文獻指出，甘草酸對 P-gp 之功能有抑制作用³⁷，且為 MRP2 之受質³⁸，因此可能在體內與西藥中 P-gp 與 MRP2 之受質產生動力學交互作用。本計畫探討甘草酸、甘草水煎劑及芍藥甘草湯對西藥動力學之影響。

本計畫的西藥標的以 CSP 與 MTX 為模型藥物，分別代表 P-gp 與 MRP2 之受質，進行中西藥交互作用的體內及體外試驗。第一年進行體內試驗，以大白鼠為模型，探討併服單劑量及多劑量甘草水煎劑、甘草酸及芍藥甘草湯對 CSP 及 MTX 藥物動力學之影響。根據第一年動物活體實驗結果，第二年進行細胞試驗，對於顯著影響 CSP 動力學之標的，探討其對 P-gp 受質運輸及基因表現之影響；影響 MTX 動力學之中藥，則探討其對 MRP2 受質運輸之影響。LS 180 cell 為人類大腸癌細胞 (Human colon adenocarcinoma cell line)，其結構、功能與人類空腸上皮細胞類似，且 P-gp 及 MRP2 的基因表現明顯^{39, 40}，因此本研究選擇 LS 180 為模型，一方面模擬小腸上 P-gp 之功能及表現，一方面模擬肝臟、腎臟細胞膜上 MRP2 的功能及表現。因其具調控 P-gp 基因表現之上游基因 pregnane X receptor (PXR) 及 steroid xenobiotic receptor (SXR)^{39, 41-44}，可充分表現出 P-gp 之誘導性，因此本計畫以 LS 180 cell 為誘導 P-gp 基因表現之細胞模型。

有關中藥對 P-gp 受質運輸之影響，以 rhodamine 123^{45, 46} 為 P-gp 之典型受質，此化合物為螢光染劑，進入細胞後，即產生強而穩定的螢光，因其靈敏度、選擇性佳，檢品不須進行繁複之前處理步驟，可進行大量篩測。另以 P-gp 之典型抑制劑 verapamil 為 positive control。

有關中藥對 MRP2 受質運輸之影響，以 5-chloromethylfluorescein

diacetate (CMFDA)為 MRP2 之典型受質。CMFDA 為油溶性、不具螢光，以被動擴散方式進入細胞後，經 esterase 水解成 5-chloromethylfluorescein (CMF)，再與細胞內之 glutathione 反應生成親水性、具螢光之 glutathione S-methylfluorescein (GSMF)，並可經由 MRP2 將其外排⁴⁷。另外，以 MRP2 之典型抑制劑 MK-571 當作 positive control。

此外，根據本研究室先前對甘草酸的代謝動力學研究顯示，甘草次酸為血中的主要代謝物^{48,49}。在生理 pH 下，甘草次酸為陰離子，可能為 MRPs 之受質。因此甘草次酸亦為體外試驗之重要探討標的。本計畫比對體內、體外試驗的結果，探討其相關性，期能建立細胞體外模型，快速篩測與細胞膜上運輸蛋白 P-gp、MRP2 相關的中西藥交互作用，提供後續中西藥交互作用研究之題材，期能降低中西藥交互作用之風險，並開創中西藥合併治療的利基。

貳、材料與方法

第一節 實驗材料

一、試劑及中藥材

5-Chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA)	Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, U.S.A.)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis MO, U.S.A.)
3-(4',5'-Dimethylthiazol-2'-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis MO, U.S.A.)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen (Grand Island, NY, U.S.A.)
Glycyrrhizin	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)
Glycyrrhetic acid	Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, U.S.A.)
Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)	Invitrogen (Grand Island, NY, U.S.A.)
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	Invitrogen (Grand Island, NY, U.S.A.)
Nonessential amino acid	Invitrogen (Grand Island, NY, U.S.A.)
Rhodamine 123	Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis MO, U.S.A.)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis MO, U.S.A.)
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis MO, U.S.A.)
Trypsin/EDTA	Invitrogen (Grand Island, NY, U.S.A.)
Verapamil	Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis MO, U.S.A.)
甘草	藥行
芍藥	藥行

二、儀器設備

高速離心機	Hermle Labortechnik GmbH (F.R. Germany)
低溫微量高速離心機	Eppendorf AG (Hamburg, Germany)
倒立式顯微鏡	Nikon Co. (Tokyo, Japan)
超音波震盪器	Branson Ultrasonics Co. (Danbury, U.S.A.)
微量移液管	Eppendorf AG (Hamburg, Germany)
二氧化碳培養箱	Thermo Electron Co. (Waltham, U.S.A.)
往復式振盪水槽	Tih Der Scilab Technology Co. (Taipei, Taiwan)
分析天平	Mettler-Toledo GmbH (Greifensee, Switzerland)
無菌操作台	Tsao Hsin Enterprise Co. (Taipei, Taiwan)
渦旋震盪器	Didisystem Laboratory Instruments Inc. (Taipei, R.O.C.)
微量離心管	Axygen Scientific, Inc. (Union city, CA, U.S.A.)

三、細胞

LS 180	食品工業發展研究所 (Hsinchu, Taiwan)
--------	--------------------------------

LS 180 人類大腸癌細胞，以含 10 % 胎牛血清(FBS)並添加非必須胺基酸、penicillin、streptomycin 及 glutamine 的 DMEM 培養液培養。細胞生長於 37 °C 含有 5 % 二氧化碳的培養箱中，每兩天更換培養液。培養至八成滿後進行繼代培養。

第二節 溶液配製

儲存溶液之配製

一、Glycyrrhizin 儲存溶液

精確稱取 9.0 mg glycyrrhizin，溶於 1.0 mL 蒸餾水，得 10 mM 之 glycyrrhizin 儲存溶液。

二、Glycyrrhetic acid 儲存溶液

精確稱取 47.1 mg glycyrrhetic acid，溶於 1.0 mL DMSO，得 100 mM 之 glycyrrhetic acid 儲存溶液。

三、Verapamil 儲存溶液

精確稱取 49.1 mg verapamil，溶於 1.0 mL DMSO，得 100 mM 之儲存溶液。

四、Rhodamine 123 儲存溶液

稱取 3.8 mg Rhodamine 123，溶於 1.0 mL DMSO，得 10 mM 之儲存溶液。

五、5-Chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) 儲存溶液。

將 1.0 mg CMFDA，溶於 215 μ L DMSO，得 10 mM 之儲存溶液。

六、[3-[[3-[2-(7-chloroquinolin-2-yl)vinyl]phenyl]-(2-dimethyl-

carbamoylethylsulfanyl)methylsulfanyl] propionic acid (MK-571) 儲存溶液。

將 5.0 mg MK-571，溶於 1.0 mL 蒸餾水，得 5 mg/mL 之儲存溶液。

第三節 實驗方法

一、甘草水煎劑及芍藥甘草湯之製備

(一)甘草水煎劑之製備

稱取 60 g 甘草，加入 2.4 L 水浸泡 30 分鐘。然後以直火加熱至沸騰，轉為小火慢煮直至體積小於 100 mL，趁熱以紗布過濾藥渣，並以熱水定容至 100 mL，混合均勻後分裝儲存於 -20 $^{\circ}$ C。

(二)芍藥甘草湯之製備

稱取 60 g 甘草及 60 g 芍藥，加入 2.4 L 水浸泡 30 分鐘。然後以直火加熱至沸騰，轉為小火慢煮直至體積小於 100 mL，趁熱以紗布過濾藥渣，並以熱水定容至 100 mL，混合均勻後分裝儲存於 -20 $^{\circ}$ C。

二、甘草酸、甘草次酸、甘草水煎劑及芍藥甘草湯對細胞之毒性試驗

將 LS-180 細胞接種於 96-well plate 中，待細胞完全貼盤後，加入系列濃度之待測檢品，培養 72 小時後加入 MTT solution，4 小時後加入 SDS

solution，利用 microplate reader 以 570 nm 讀取吸光值。

$$\text{細胞存活率}(\%) = \frac{\text{實驗組吸光值}}{\text{控制組吸光值}} \times 100\%$$

三、甘草酸、甘草次酸、甘草水煎劑及芍藥甘草湯對 P-gp、MRP 受質運輸之影響⁵⁰

(一) 甘草酸、甘草次酸、甘草水煎劑及芍藥甘草湯對 P-gp 受質運輸之影響

將 LS-180 細胞培養於 96 孔培養盤(1×10^5 cells/well)，待細胞完全貼盤後，進行試驗。LS-180 cells 之 incubation medium 為 HBSS (Hanks' balanced salt solution) [含 10 mM *N*-2-hydroxyethyl-piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) 及 5.5 mM glucose]，並以 NaOH 調整 pH 值至 7.4。

吸除細胞培養液，以 100 μ L 含 rhodamine 123 (10 μ M) 之 incubation medium 培養 1 小時後，以冰冷的 PBS 清洗細胞三次，再以含系列濃度檢品之 incubation medium 於 37°C 培養 4 小時，隨後以冰冷的 PBS 快速清洗細胞三次，並加入 100 μ L 之 0.1% triton X-100 於室溫反應 30 min 後，利用多功能分析儀以 485 nm 為激發波長，於 528 nm 讀取螢光強度。

另於 96 孔培養盤中加入 200 μ L Bio-rad[®] 蛋白質分析試劑，加入 10 μ L 經 0.1% triton X-100 溶解之細胞液，混合均勻後，利用 microplate reader 於 570 nm 讀取吸光值以測定總蛋白含量。

(二) 甘草酸、甘草次酸、甘草水煎劑及芍藥甘草湯對 MRP 受質運輸之影響

將 LS-180 細胞培養於 96 孔培養盤(1×10^5 cells/well)，待細胞完全貼盤後，進行試驗。LS-180 cells 之 incubation medium 為 HBSS (Hanks' balanced salt solution) [含 10 mM *N*-2-hydroxyethyl-piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) 及 5.5 mM glucose]，並以 NaOH 調整 pH 值至 7.4。

吸除細胞培養液，以冰冷的 PBS 清洗細胞三次。分別加入 50 μ L CMFDA (2 μ M) 及 50 μ L 含系列濃度檢品之 incubation medium 於 37°C 培養 30 分鐘。移除 incubation medium 後，以冰冷的 PBS 快速清洗細胞三次，並加入 100 μ L 之 0.1% triton X-100 於室溫反應 30 min 後，利用多功能分析儀以 485 nm 為激發波長，於 528 nm 讀取螢光強度。

另於 96 孔培養盤中加入 200 μL Bio-rad[®] 蛋白質分析試劑，加入 10 μL 經 0.1% triton X-100 溶解之細胞液，混合均勻後，利用 microplate reader 於 570 nm 讀取吸光值以測定總蛋白含量。

四、甘草酸、甘草次酸、甘草水煎劑及芍藥甘草湯對 P-gp mRNA 表現之影響

(一) 細胞培養

將 LS 180 細胞培養於六孔培養盤(1×10^6 cells/well)，於 37°C 培養 12 小時。待其貼盤後，移除原來之培養液，以冰冷的 PBS 清洗細胞後，分別加入各濃度之檢品，再於 37°C 培養 4 小時。

(二) Total RNA 之萃取(2)

培養 4 小時後，移除培養液，以冰冷的 PBS 清洗細胞後，加入 1 mL 萃取試劑(TRIZOL[®] reagent)使細胞溶解，隨之將溶解物移至 RNAase-free 之微量試管中，於室溫下靜置 5 分鐘。加入 0.2 mL 氯仿，混搖 15 秒，靜置 2~3 分鐘，以 12,000 g 離心 25 分鐘，取 0.4 mL 上清液至新的微量試管，加入 0.5 mL isopropyl alcohol，混搖後靜置 10 分鐘，以 12,000 g 離心 15 分鐘。隨後倒掉上清液，加入 1 mL 75% alcohol，以 7,500 g 離心 5 min，倒掉上清液，倒放至乾。加入 50 μL diethylpyrocarbonate (DEPC) water，混合 15 秒，取 1 μL 加入 49 μL DEPC water，取 50 μL 測定 260/280 之 O.D 比值並定量 total RNA 之濃度。

(三) RT-PCR

1. Reverse transcription

取 5 μg 之 total RNA 樣品加入 PCR 專用試管中，加入 1 μL oligo dT primer (2.5 μM)、1 μL dNTP mix (0.5 mM)，並加入 0.1% DEPC water 將其體積補至 12 μL 。以乾式加熱器於 65°C 反應 5 分鐘後，立即靜置於冰上 2 分鐘，隨後加入 4 μL 5X First-Strand buffer、1 μL 0.1M DTT 及 1 μL SuperScript[™] III transcriptase (200 units/ μL)，混合均勻後，於 50°C 反應 60 分鐘，再於 70°C 反應 15 分鐘，反應產物置於 -20°C 備用。

2. Polymerase chain reaction (PCR)

取 2 μL cDNA 溶液加入 PCR 專用試管中，加入 2.5 μL 10X PCR buffer、0.5 μL dNTP Mix (200 μM)、0.5 μL forward primer (10 μM)、0.5 μL reverse primer (10 μM)、0.5 μL Taq DNA polymerase (5 units/ μL) 並加入無菌水將其體積補至 25 μL 。將試管置於 MyCycler[™] Thermal Cycler 進行聚合反應，反應結束後將 PCR 產物保存於 -20°C。

3. PCR 產物檢測分析

(1) 製膠

秤取 0.8 g agarose 於三角錐瓶中，加入 40 mL 0.5X TAE buffer，微波使其完全溶解。於室溫下靜置冷卻至手可觸摸的溫度，將 agarose 倒入製膠槽，靜置使其凝固，隨後將膠體置於電泳槽中。

(2) 電泳

於電泳槽中倒入 0.5X TAE buffer。注入 3 μ L Marker 與 10 μ L PCR 產物(先與 2 μ L dye 混合均勻)於凹槽內，先以低電壓(50 V)電泳 5 分鐘，再以 100 V 進行電泳。電泳完成後，將膠體取出，以 etidium bromide (0.5 μ g/mL) 染液染 5 分鐘，取出膠體後再以去離子水退染 1~2 分鐘，隨後以 UV Transluminator 觀察，並將電泳結果照像儲存。

五、甘草次酸對P-gp ATPase 之影響

測試甘草次酸對P-gp ATPase影響時，使用Pgp-Glo™ (Promega)試劑組。首先在白色96孔培養盤中加入20 μ L assay buffer，在測試組中，分別加入20 μ L Na_3VO_4 、verapamil及甘草次酸，再加入20 μ L含P-gp的膜蛋白於37°C反應5分鐘。隨後加入10 μ L MgATP，於37°C下開始反應40分鐘，反應結束後加入50 μ L ATP detection reagent，並於室溫下反應20分鐘使其產生冷光，隨之以microplate reader 檢測其冷光強度。

六、數據處理及統計分析

以unpaired Student's t-test分析各組與控制組間之差異。

參、結果與討論

一、甘草酸、甘草次酸、甘草水煎劑及芍藥甘草湯之細胞毒性試驗

為探討甘草酸、甘草次酸、甘草水煎劑及芍藥甘草湯對 LS 180 細胞存活率之影響，本研究採用 MTT 分析的方式進行評估⁵¹。MTT 本身為黃色，會被活細胞中的琥珀酸去氫酶(succinate dehydrogenase)轉化為紫色結晶，經以酸化的 SDS 溶解後，於波長 570 nm 下測定其 O.D.值進行比較。結果如 Figure 1-5 所示，0.5~0.01 % (v/v) DMSO、5000~12.5 μ M 甘草酸、50~0.39 μ M 甘草次酸、3000~23 μ g/mL 甘草水煎劑及 3000~23 μ g/mL 芍藥甘草湯，對 LS 180 細胞之存活率均無明顯影響。

二、甘草酸、甘草次酸、甘草水煎劑及芍藥甘草湯對 P-gp、MRP 受質運輸之影響

(一)對 P-gp 受質運輸之影響

本研究以 LS 180 細胞為模型、以 rhodamine 123 為 P-gp 的典型受質^{45,46}，進行甘草酸、甘草次酸、甘草水煎劑及芍藥甘草湯對 P-gp 受質運輸影響之探討。Rhodamine 123 本身具有螢光，當其進入細胞內後，會被 P-gp 外排到細胞外。如甘草酸、甘草次酸、甘草水煎劑或芍藥甘草湯對 P-gp 之外排作用有影響，rhodamine 123 於細胞內之蓄積即會受到影響。本實驗選用 P-gp 之抑制劑 verapamil 作為 positive control^{52,53}。

加入甘草酸與細胞培養時，結果如 Figure 6 所示，高濃度時(2500、1250 μ M)，對細胞內 rhodamine 123 的蓄積較控制組高，但未達顯著差異；相反的，312.5、200 及 100 μ M 的甘草酸，則分別較控制組低 23.1 %、24.3 % 及 23.1 %，且達顯著差異。

甘草酸為甘草次酸分子接了兩分子葡萄糖醛酸，根據先前甘草酸的動力學研究報導，甘草酸口服後，在腸道須先經由細菌分解成甘草次酸，方能為腸細胞所吸收，而在血液中亦以甘草次酸的形式存在⁵⁴⁻⁵⁶。因此，本研究進行了甘草次酸對 P-gp 受質運輸影響之探討，當以甘草次酸與細胞培養時，結果如 Figure 7 所示，100、50 及 25 μ M 分別顯著降低 rhodamine 123 於細胞內的蓄積達 83.0 %、79.0 % 及 49.1 %。空白溶媒 DMSO 並未造成 rhodamine 123 於細胞內蓄積的改變。結果顯示甘草次酸顯著增加了 rhodamine 123 從細胞外排，可推測甘草次酸為 P-gp 的誘導劑，此一結果與文獻中相關研究報導並不相同。Yoshida 等人³⁷曾利用轉殖人類 *MDR1* 基因的 LLC-PK1 細胞(LLC-GA5-COL150 細胞)及 Caco-2 細胞，探討

P-gp 受質 [^3H]digoxin 於細胞中的蓄積及穿膜運輸，其結果指出，甘草次酸為 P-gp 的抑制劑。反觀本計畫第一年的活體實驗結果，併服甘草酸使 CSP 之血峰濃度及血藥面積均明顯下降，因此若以 Yoshida 等人的體外模型推論體內的交互作用時，可能與真實狀況完全相反。相對的，本研究所採用的細胞模型顯示，甘草次酸為 P-gp 的誘導劑，此與體內的交互作用結果較為一致，因此本研究所採用的細胞試驗模型，應能解釋體內交互作用之機制。至於兩研究結果之歧異，除所選用的細胞株不同外，Yoshida 等人在探討 [^3H]digoxin 於細胞中的蓄積時，是將 [^3H]digoxin 及待測化合物同時與細胞培養，如此，待測物除了細胞的外排外，亦可影響細胞的攝入，而本研究是先讓 rhodamine 123 進入細胞，再加入待測物，此一實驗方式可避免待測物對受質進入細胞產生影響，所得之結果單純為對細胞外排之影響。

比較甘草酸及甘草次酸對 rhodamine 123 於細胞內蓄積影響的程度顯示，甘草次酸在 25 μM 濃度下，即對 P-gp 的外排明顯提高，而甘草酸於 100 μM 以上，方對 P-gp 外排明顯提高，其有效濃度相差 4 倍，推測此一差異可能與甘草次酸的極性較甘草酸低，較易進入細胞膜與 P-gp 作用有關⁵⁷。因此，綜合動力學研究及細胞株試驗結果，推測大鼠併服甘草酸對 CSP 動力學產生影響的分子主要應是甘草次酸。

以甘草水煎劑與細胞培養時，結果如 Figure 8 所示，在 1500、750、375 及 188 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的濃度下，rhodamine 123 於細胞中的蓄積，分別顯著低於控制組 33.4%、37.1%、41.2% 及 38.4%，顯示甘草水煎劑增加了 rhodamine 123 從細胞外排，推測甘草水煎劑應為 P-gp 的誘導劑，此一結果與文獻中體外試驗之報導並不相同⁵⁸。Huang 等人利用大鼠的腸膜及擴散池法 (Ussing chamber) 所進行的體外研究，甘草水煎劑為 P-gp 的抑制劑。然而本計畫第一年的活體研究結果顯示，甘草水煎劑顯著降低 CSP 之血峰濃度及血藥面積，因此，Huang 等人的體外試驗結果與體內的交互作用現象恰相反。相對的，本研究所採用的體外細胞模型顯示，甘草水煎劑為 P-gp 的誘導劑，應能解釋體內交互作用之機制，而兩研究結果間的差異，應是所選用的試驗模型不同所致。

以芍藥甘草湯與細胞培養時，結果如 Figure 9 所示，在 750 及 188 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的濃度下，rhodamine 123 於細胞中的蓄積分別顯著低於控制組 30.7% 及 33.6%，然以 375 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芍藥甘草湯培養時，細

胞內蓄積雖較控制組低，但未達顯著差異。芍藥甘草湯增加了 rhodamine 123 從細胞外排，可推測芍藥甘草湯為 P-gp 的誘導劑。本計畫第一年的大鼠動力學結果顯示，併服芍藥甘草湯使得 CSP 的血藥面積及血峰濃度顯著降低。所以此體外細胞試驗顯示芍藥甘草湯誘導了 P-gp 的功能，應能解釋體內交互作用之機制。

比較甘草水煎劑及芍藥甘草湯對 rhodamine 123 於細胞中蓄積之影響，在 188 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度下，兩者對 P-gp 外排作用皆顯著增加，兩者影響之程度並無顯著差異。因本實驗所用的甘草水煎劑及芍藥甘草湯中含有相等量的甘草，可推測芍藥中之成分應對 P-gp 之外排作用影響不大。

(二)對 MRP 受質運輸之影響

本研究利用 LS 180 細胞為模型、以 CMFDA 為 MRP 的典型受質，進行甘草酸、甘草次酸、甘草水煎劑及芍藥甘草湯對 MRP 受質運輸影響之探討。CMFDA 本身為油溶性、不具螢光，以被動擴散方式進入細胞後，經 esterase 水解成 5-chloromethylfluorescein (CMF)，再與細胞內之 glutathione 反應生成親水性、具螢光之 glutathione S-methylfluorescein (GSMF)，即可經由 MRP2 從細胞外排⁴⁷。如甘草酸、甘草次酸、甘草水煎劑及芍藥甘草湯對 MRP2 之外排作用有影響，GSMF 於細胞內之蓄積即會受到影響。本研究選用 MRP2 之抑制劑 MK-571 作為 positive control⁵⁹。

加入甘草酸與細胞培養時，結果如 Figure 10 所示，在高濃度時(2500、1250 μM)對細胞內 GSMF 的蓄積顯著高於控制組；在 625 μM 以下與控制組則無顯著差異。顯示甘草酸抑制 GSMF 從細胞外排，因此甘草酸應為 MRP2 的抑制劑，此一結果與文獻中體外試驗之報導一致⁶⁰。本計畫第一年的活體實驗結果顯示，併服甘草酸使得 MTX 的血藥面積及平均滯留時間顯著增加，所以此體外試驗顯示甘草酸抑制 MRP2 的外排作用，應可解釋體內交互作用之機制。

甘草次酸與細胞培養時，結果如 Figure 11 所示，在 12.5 及 6.25 μM 下，皆顯著提高 GSMF 於細胞內的蓄積，且具濃度依存性，空白溶媒 DMSO 並未造成 GSMF 於細胞內的蓄積改變，顯示甘草次酸抑制 GSMF 從細胞外排，使得 GSMF 在細胞中的蓄積增加，因此可推測甘草次酸應為 MRP2 的抑制劑，此一結果與文獻報導一致⁶¹。

比較甘草酸及甘草次酸對 GSMF 於細胞內蓄積的影響，顯示甘草次酸在 6.25 μM 濃度下，即對 MRP2 的外排作用產生明顯抑制，而甘草酸則於 1250 μM 濃度以上，方對 MRP2 外排作用有明顯抑制，其有效濃度相差達 20 倍，推測此一差異可能與甘草酸及甘草次酸的極性有關⁵⁷，甘草次酸之極性較甘草酸低，較易進入細胞與 MRP2 作用。根據先前本研究室的動力學研究及相關文獻，甘草酸口服後在血液中主要以甘草次酸的形式存在⁵⁴⁻⁵⁶。本計畫第一年的大鼠動力學實驗顯示，甘草酸顯著增加 MTX 的全身暴露，而本研究所採用的細胞模型顯示，甘草次酸為 MRP2 的抑制劑，應可解釋體內交互作用的機制。因此甘草酸的主要代謝物甘草次酸應為交互作用的肇因成分。

甘草水煎劑與細胞培養時，結果如 Figure 12 所示，在所有測試的濃度下，GSMF 於 LS 180 細胞中的蓄積與控制組間均無顯著差異。顯示甘草水煎劑應未對 MRP2 之功能造成影響。然而本計畫第一年的大鼠動力學研究顯示，併服甘草水煎劑使得 MTX 的血藥面積顯著增加。此體外試驗與活體實驗結果不相符的原因，乃因為甘草水煎劑中的主成分甘草酸於體內轉化成了甘草次酸的緣故⁵⁴⁻⁵⁶。另外，甘草亦含黃酮多酚，其結合態代謝物也可能與 MTX 競爭 MRP2。因此，欲以體外模型探討中藥與 MRP 運輸蛋白間之交互作用，可能須先瞭解中藥的代謝動力學。

芍藥甘草湯與細胞培養時，結果如 Figure 13 所示，在 1.5 mg/mL 的濃度下，GSMF 於 LS 180 細胞中的蓄積，顯著高於控制組，其他濃度則與控制組無顯著差異。顯示芍藥甘草湯在高濃度時抑制 GSMF 從細胞外排，因此芍藥甘草湯應為 MRP2 的抑制劑。本計畫第一年的大鼠動力學結果顯示，併服芍藥甘草湯明顯增加 MTX 之血藥面積及平均滯留時間。此體外試驗雖可解釋此體內交互作用之機制，然其主要肇因成分應為甘草次酸。

三、甘草酸、甘草次酸、甘草水煎劑及芍藥甘草湯對 P-gp mRNA 表現之影響

為了解甘草酸、甘草次酸、甘草水煎劑及芍藥甘草湯刺激 P-gp 受質外排之機轉，本研究進一步探討它們對 LS 180 細胞中 P-gp mRNA 表現之影響。本研究將 LS 180 細胞與待測物共同培養 4 小時，隨之將細胞清洗後萃取其 total RNA，再經由 RT-PCR 及電泳分析後，比較組間 P-gp mRNA 表現之差異。實驗結果如 Figure 14 所示，甘草酸、甘草次酸、甘草水煎劑及芍藥甘草湯皆對 LS 180 細胞的 P-gp mRNA 表現無顯著影響，顯示它們對 P-gp 受質運輸之刺激應不是由於 P-gp mRNA 表現之增加所導致，可推測它們僅

影響了 P-gp 的功能。

四、甘草次酸對 P-gp ATPase 之影響

為探討甘草次酸是否經由調控 Pgp ATPase，提高 ATP 之水解，導致增加 P-gp 對受質之外排，本研究利用 Pgp-Glo™ 試劑組進行相關研究。結果如 Figure 15 所示，所使用的 positive control 之 RLU (relative light units) 值高於空白組，顯示 verapamil 刺激 P-gp ATPase 的活性；而各種濃度的甘草次酸所得之 RLU 均顯著低於空白組，顯示對 P-gp ATPase 有抑制作用，應導致 P-gp 的功能降低。此一結果雖與文獻報導一致⁶²，然而本研究之體外及體內試驗結果皆顯示，甘草次酸明顯增加 P-gp 受質的外排。因此，甘草次酸應非主要經由調控 P-gp ATPase 而提升 P-gp 的功能。

五、中西藥交互作用體內一體外試驗模型之建立及相關性探討

本研究為兩年連續計畫，旨在建立簡易體外-體內關聯模型，提供藥物交互作用發生風險之快速評估平台。甘草酸、甘草次酸、甘草水煎劑及芍藥甘草湯在體內試驗及體外試驗中對 P-gp 及 MRP2 的影響如 Table 2 所示。此結果顯示，本研究所建立之體外細胞模型，除了甘草水煎劑對 MRP2 之影響與體內試驗無一致性外，甘草酸、甘草次酸及芍藥甘草湯之體外與體內之結果皆有良好的相關性，因此，本研究所建立的體外細胞篩測模型，可應用於快速篩測與細胞膜上運輸蛋白 P-gp、MRP2 相關的中西藥交互作用，提供後續中西藥交互作用研究之題材，期能降低中西藥交互作用之風險，並開創中西藥合併治療的利基。

肆、結論與建議

- 一、本研究利用 rhodamine 123 為 P-gp 之典型受質，所建立之體外細胞模型，與先前體內試驗之交互作用結果相符，可作為往後中藥與 P-gp 受質西藥間交互作用之體外篩選模型。
- 二、本研究利用 CMFDA 為 MRP 之典型受質，所建立之體外細胞模型，與先前體內試驗之交互作用結果相符，可作為往後中藥與 MRP 受質西藥間交互作用之體外篩選模型。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號 CCMP98-RD-104 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

伍、參考文獻

1. Klepser TB, Klepser ME. Unsafe and potentially safe herbal therapies. *Am J Health Syst Pharm.* 1999;56: 125-138.
2. Fugh-Berman A. Herb-drug interactions. *Lancet.* 2000;355: 134-138.
3. Cuzzolin L, Zaffani S, Benoni G. Safety implications regarding use of phytomedicines. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006;62: 37-42.
4. Tang J, Sun J, Zhang Y, Li L, Cui F, He Z. Herb-drug interactions: Effect of *ginkgo biloba* extract on the pharmacokinetics of theophylline in rats. *Food Chem Toxicol.* 2007;45: 2441-2445.
5. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39: 361-398.
6. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: The multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92: 1295-1302.
7. Tsuji A. Transporter-mediated drug interactions. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2002;17: 253-274.
8. Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene.* 2003;22: 7537-7552.
9. Takano M, Yumoto R, Murakami T. Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. *Pharmacol Ther.* 2006;109: 137-161.
10. Wachter VJ, Wu CY, Benet LZ. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: Implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol Carcinog.* 1995;13: 129-134.
11. Lin JH, Chiba M, Baillie TA. Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized? *Pharmacol Rev.* 1999;51: 135-158.
12. Endres CJ, Hsiao P, Chung FS, Unadkat JD. The role of transporters in drug interactions. *Eur J Pharm Sci.* 2006;27: 501-517.
13. Chan LM, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: Efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci.* 2004;21: 25-51.
14. Yabuuchi H, Takayanagi S, Yoshinaga K, Taniguchi N, Aburatani H, Ishikawa T. ABCC13, an unusual truncated ABC transporter, is highly

- expressed in fetal human liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;299: 410-417.
15. Calcagno AM, Kim IW, Wu CP, Shukla S, Ambudkar SV. ABC drug transporters as molecular targets for the prevention of multidrug resistance and drug-drug interactions. *Curr Drug Deliv.* 2007;4: 324-333.
 16. Balayssac D, Authier N, Cayre A, Coudore F. Does inhibition of P-glycoprotein lead to drug-drug interactions? *Toxicol Lett.* 2005;156: 319-329.
 17. Marchetti S, Mazzanti R, Beijnen JH, Schellens JH. Concise review: Clinical relevance of drug-drug and herb-drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Oncologist.* 2007;12: 927-941.
 18. Bodo A, Bakos E, Szeri F, Varadi A, Sarkadi B. The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity. *Toxicol Lett.* 2003;140-141: 133-143.
 19. van Gelder T, Klupp J, Sawamoto T, Christians U, Morris RE. ATP-binding cassette transporters and calcineurin inhibitors: Potential clinical implications. *Transplant Proc.* 2001;33: 2420-2421.
 20. Dietrich CG, Geier A, Oude Elferink RP. ABC of oral bioavailability: Transporters as gatekeepers in the gut. *Gut.* 2003;52: 1788-1795.
 21. Yokooji T, Murakami T, Yumoto R, Nagai J, Takano M. Role of intestinal efflux transporters in the intestinal absorption of methotrexate in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2007;59: 1263-1270.
 22. Hou YC, Hsiu SL, Tsao CW, Wang YH, Chao PD. Acute intoxication of cyclosporin caused by coadministration of decoctions of the fruits of *citrus aurantium* and the pericarps of *citrus grandis*. *Planta Med.* 2000;66: 653-655.
 23. Chen HY, Wu TS, Su SF, Kuo SC, Chao PD. Marked decrease of cyclosporin absorption caused by phellamurin in rats. *Planta Med.* 2002;68: 138-141.
 24. Hsiu SL, Hou YC, Wang YH, Tsao CW, Su SF, Chao PD. Quercetin significantly decreased cyclosporin oral bioavailability in pigs and rats. *Life Sci.* 2002;72: 227-235.
 25. Lai MY, Hsiu SL, Hou YC, Tsai SY, Chao PD. Significant decrease of cyclosporine bioavailability in rats caused by a decoction of the roots of

- scutellaria baicalensis*. *Planta Med.* 2004;70: 132-137.
26. Chiang HM, Fang SH, Wen KC et al. Life-threatening interaction between the root extract of *pueraria lobata* and methotrexate in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;209: 263-268.
 27. Fang SH, Hou YC, Chao PD. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions of morin and cyclosporin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;205: 65-70.
 28. Yang CY, Chao PD, Hou YC, Tsai SY, Wen KC, Hsiu SL. Marked decrease of cyclosporin bioavailability caused by coadministration of ginkgo and onion in rats. *Food Chem Toxicol.* 2006;44: 1572-1578.
 29. Aly AM, Al-Alousi L, Salem HA. Licorice: A possible anti-inflammatory and anti-ulcer drug. *AAPS PharmSciTech.* 2005;6: E74-82.
 30. Hirabayashi K, Iwata S, Matsumoto H et al. Antiviral activities of glycyrrhizin and its modified compounds against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1) in vitro. *Chem Pharm Bull.* 1991;39: 112-115.
 31. Fiore C, Eisenhut M, Krausse R et al. Antiviral effects of *glycyrrhiza* species. *Phytother Res.* 2007;22: 141-148.
 32. Okimasu E, Moromizato Y, Watanabe S et al. Inhibition of phospholipase A2 and platelet aggregation by glycyrrhizin, an antiinflammation drug. *Acta Med Okayama.* 1983;37: 385-391.
 33. Yuan H, Ji WS, Wu KX, Jiao JX, Sun LH, Feng YT. Anti-inflammatory effect of diammonium glycyrrhizinate in a rat model of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2006;12: 4578-4581.
 34. Harada S. The broad anti-viral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope. *Biochem J.* 2005;392: 191-199.
 35. Sato H, Goto W, Yamamura J et al. Therapeutic basis of glycyrrhizin on chronic hepatitis B. *Antiviral Res.* 1996;30: 171-177.
 36. Orlent H, Hansen BE, Willems M et al. Biochemical and histological effects of 26 weeks of glycyrrhizin treatment in chronic hepatitis C: A randomized phase II trial. *J Hepatol.* 2006;45: 539-546.
 37. Yoshida N, Koizumi M, Adachi I, Kawakami J. Inhibition of P-glycoprotein-mediated transport by terpenoids contained in herbal medicines and natural products. *Food Chem Toxicol.* 2006;44: 2033-2039.

38. Shimamura H, Suzuki H, Tagaya O, Horie T, Sugiyama Y. Biliary excretion of glycyrrhizin in rats: Kinetic basis for multiplicity in bile canalicular transport of organic anions. *Pharm Res.* 1996;13: 1833-1837.
39. Huwyler J, Wright MB, Gutmann H, Drewe J. Induction of cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein by the isoxazolyl-penicillin antibiotic flucloxacillin. *Curr Drug Metab.* 2006;7: 119-126.
40. Netsch MI, Gutmann H, Luescher S et al. Inhibitory activity of a green tea extract and some of its constituents on multidrug resistance-associated protein 2 functionality. *Planta Med.* 2005;71: 135-141.
41. Hartley DP, Dai X, Yabut J et al. Identification of potential pharmacological and toxicological targets differentiating structural analogs by a combination of transcriptional profiling and promoter analysis in LS-180 and caco-2 adenocarcinoma cell lines. *Pharmacogenet Genomics.* 2006;16: 579-599.
42. Zhou J, Liu M, Zhai Y, Xie W. The antiapoptotic role of pregnane X receptor in human colon cancer cells. *Mol Endocrinol.* 2008;22: 868-880.
43. Zhou C, Tabb MM, Sadatrafiei A, Grun F, Blumberg B. Tocotrienols activate the steroid and xenobiotic receptor, SXR, and selectively regulate expression of its target genes. *Drug Metab Dispos.* 2004;32: 1075-1082.
44. Li Q, Sai Y, Kato Y, Tamai I, Tsuji A. Influence of drugs and nutrients on transporter gene expression levels in caco-2 and LS180 intestinal epithelial cell lines. *Pharm Res.* 2003;20: 1119-1124.
45. Anderle P, Niederer E, Rubas W et al. P-glycoprotein (P-gp) mediated efflux in caco-2 cell monolayers: The influence of culturing conditions and drug exposure on P-gp expression levels. *J Pharm Sci.* 1998;87: 757-762.
46. Troutman MD, Thakker DR. Rhodamine 123 requires carrier-mediated influx for its activity as a P-glycoprotein substrate in caco-2 cells. *Pharm Res.* 2003;20: 1192-1199.
47. Förster F, Volz A, Fricker G. Compound profiling for ABCC2 (MRP2) using a fluorescent microplate assay system. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;69: 396-403.
48. Hou YC, Hsiu SL, Ching H et al. Profound difference of metabolic pharmacokinetics between pure glycyrrhizin and glycyrrhizin in licorice decoction. *Life Sci.* 2005;76: 1167-1176.
49. Ching H, Hsiu SL, Hou YC, Chen CC, Chao PD. Comparison of pharmacokinetics between glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in rabbits. *J*

- Food Drug Anal.* 2001;9: 67-71.
50. Jia JX, Wasan KM. Effects of monoglycerides on rhodamine 123 accumulation, estradiol 17 beta-D-glucuronide bidirectional transport and MRP2 protein expression within caco-2 cells. *J Pharm Pharm Sci.* 2008;11: 45-62.
 51. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65: 55-63.
 52. Clarke G, O'Mahony SM, Cryan JF, Dinan TG. Verapamil in treatment resistant depression: A role for the P-glycoprotein transporter? *Hum Psychopharmacol.* 2009;24: 217-223.
 53. Bansal T, Mishra G, Jaggi M, Khar RK, Talegaonkar S. Effect of P-glycoprotein inhibitor, verapamil, on oral bioavailability and pharmacokinetics of irinotecan in rats. *Eur J Pharm Sci.* 2009;36: 580-590.
 54. Ploeger B, Mensinga T, Sips A, Meulenbelt J, DeJongh J. A human physiologically-based model for glycyrrhizic acid, a compound subject to presystemic metabolism and enterohepatic cycling. *Pharm Res.* 2000;17: 1516-1525.
 55. Takeda S, Ishihara K, Wakui Y et al. Bioavailability study of glycyrrhetic acid after oral administration of glycyrrhizin in rats; relevance to the intestinal bacterial hydrolysis. *J Pharm Pharmacol.* 1996;48: 902-905.
 56. Lin SP, Tsai SY, Hou YC, Chao PD. Glycyrrhizin and licorice significantly affect the pharmacokinetics of methotrexate in rats. *J Agric Food Chem.* 2009;57: 1854-1859.
 57. Ichikawa T, Ishida S, Sakiya Y, Akada Y. High-performance liquid chromatographic determination of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in biological materials. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1984;32: 3734-3738.
 58. Huang BB, Li GF, Ren F et al. Effect of glycyrrhiza inflata and daphne genkwa on permeabilities of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate across rat jejunum membranes in vitro. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2008;33: 2521-2526.
 59. Gutmann H, Fricker G, Torok M, Michael S, Beglinger C, Drewe J. Evidence for different ABC-transporters in caco-2 cells modulating drug uptake. *Pharm Res.* 1999;16: 402-407.
 60. Horikawa M, Kato Y, Tyson CA, Sugiyama Y. The potential for an

- interaction between MRP2 (ABCC2) and various therapeutic agents: Probenecid as a candidate inhibitor of the biliary excretion of irinotecan metabolites. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2002;17: 23-33.
61. Yoshida N, Takada T, Yamamura Y, Adachi I, Suzuki H, Kawakami J. Inhibitory effects of terpenoids on multidrug resistance-associated protein 2- and breast cancer resistance protein-mediated transport. *Drug Metab Dispos.* 2008;36: 1206-1211.
62. Nabekura T, Yamaki T, Ueno K, Kitagawa S. Inhibition of P-glycoprotein and multidrug resistance protein 1 by dietary phytochemicals. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;62: 867-873.

陸、圖、表

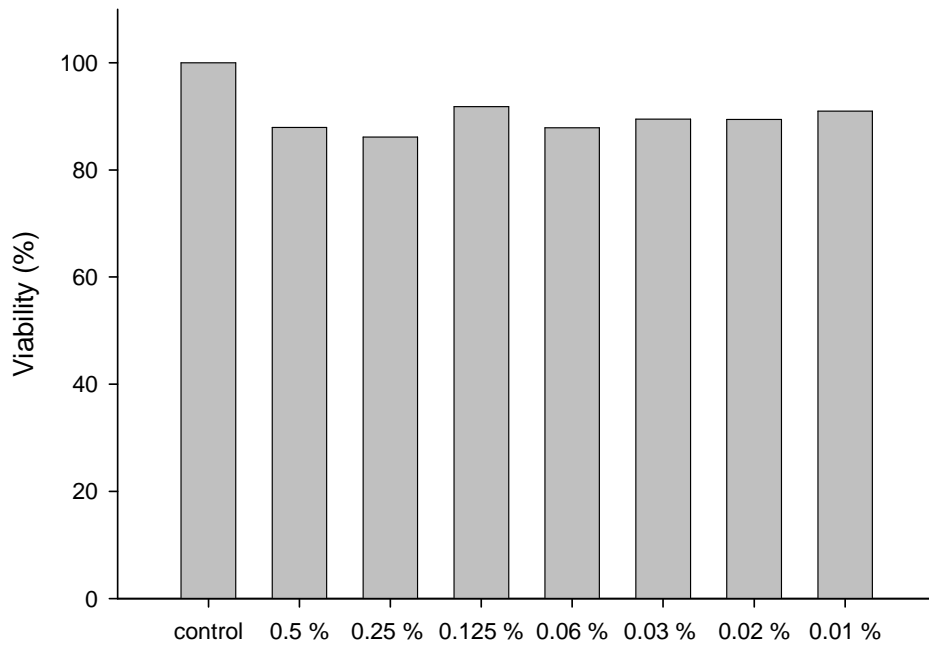


Figure 1. Effects of different concentration of DMSO on the viability of LS 180 cells.

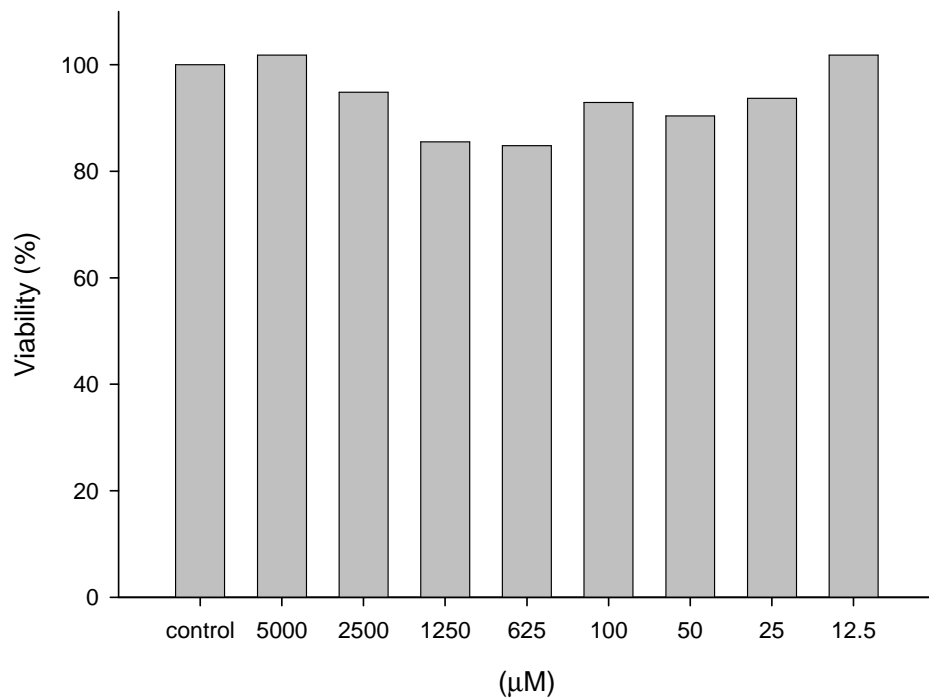


Figure 2. Effects of different concentration of glycyrrhizin on the viability of LS 180 cells.

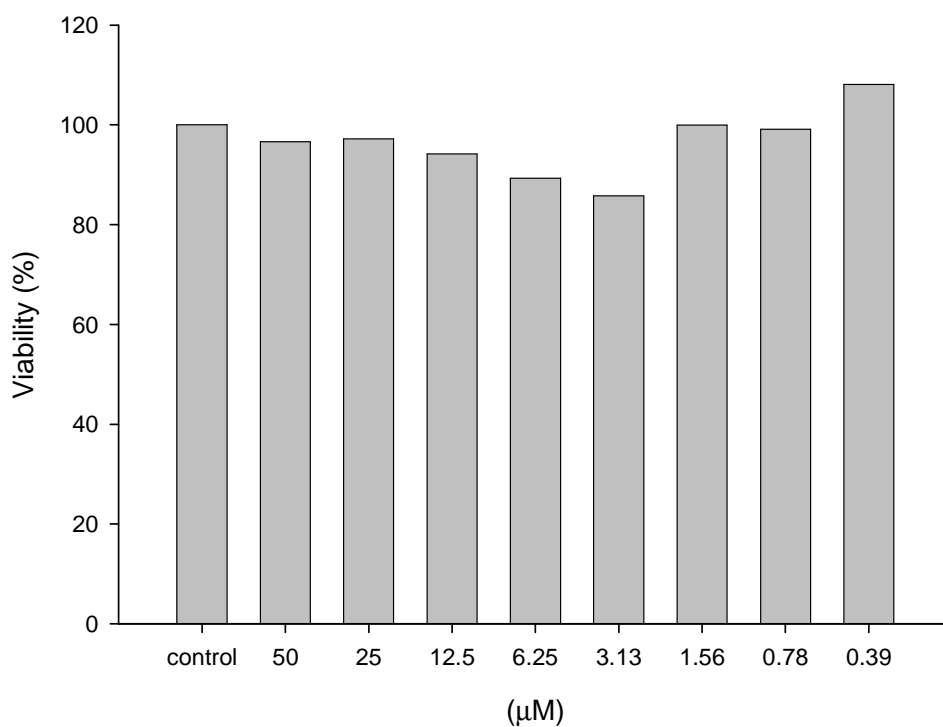


Figure 3. Effects of different concentration of glycyrrhetic acid on the viability of LS 180 cells.

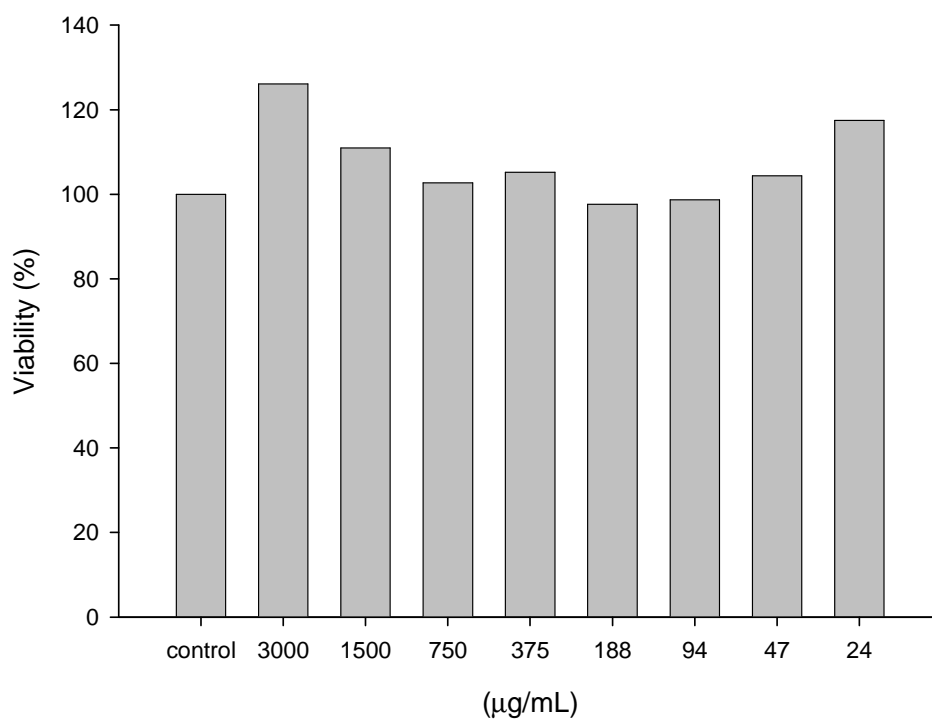


Figure 4. Effects of different concentration of licorice decoction on the viability of LS 180 cells.

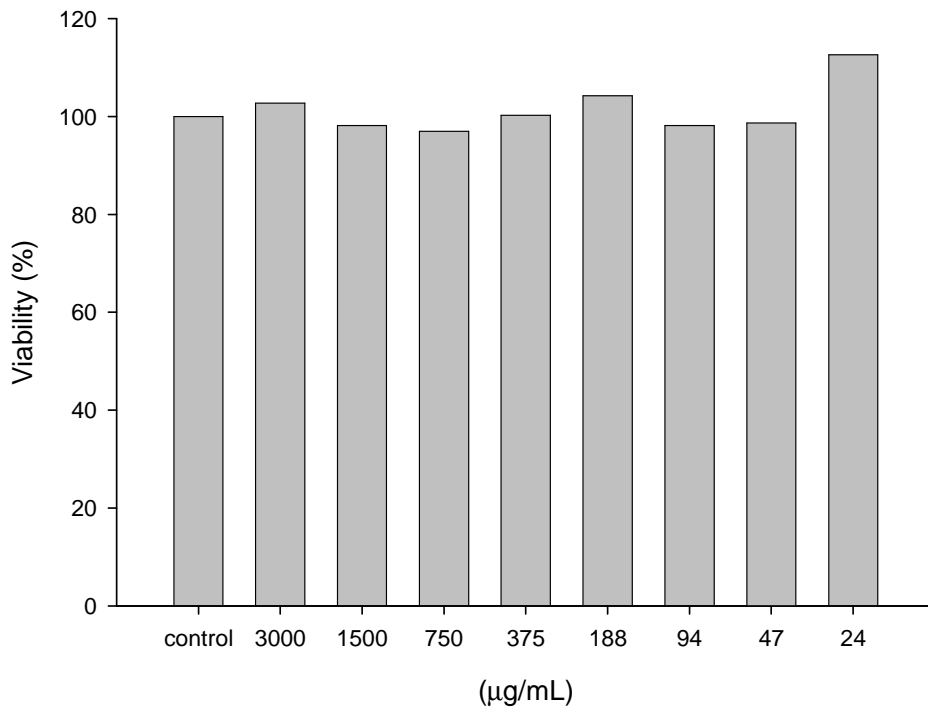


Figure 5. Effects of different concentration of Shaoyao Gancuo Tang on the viability of LS 180 cells.

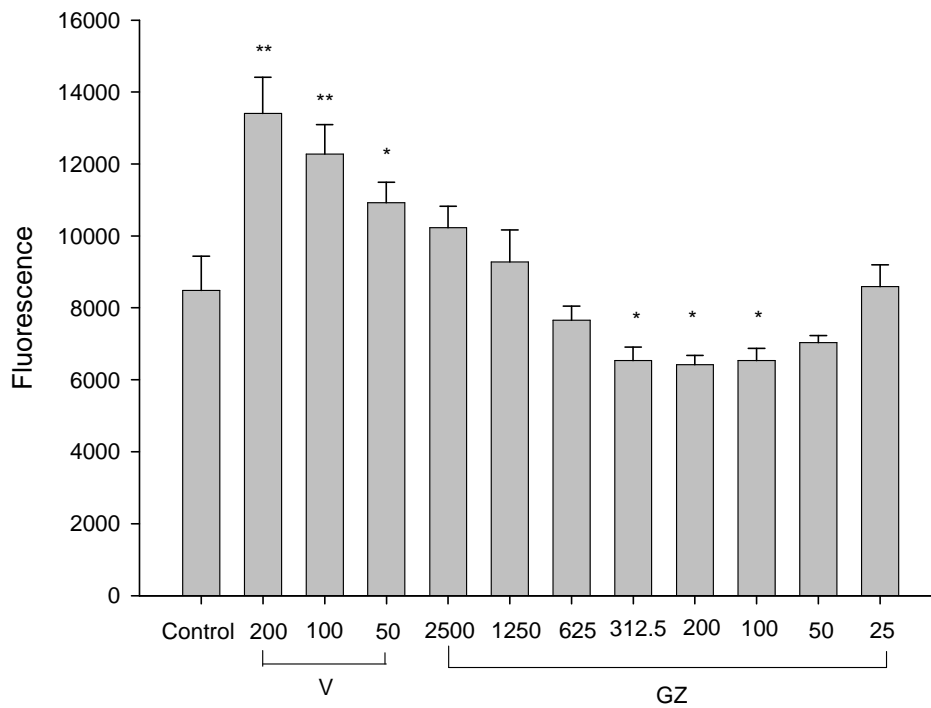


Figure 6. Effects of glycyrrhizin (µM) on the intracellular accumulation of rhodamine 123. Verapamil (V, µM) was used as a positive control.

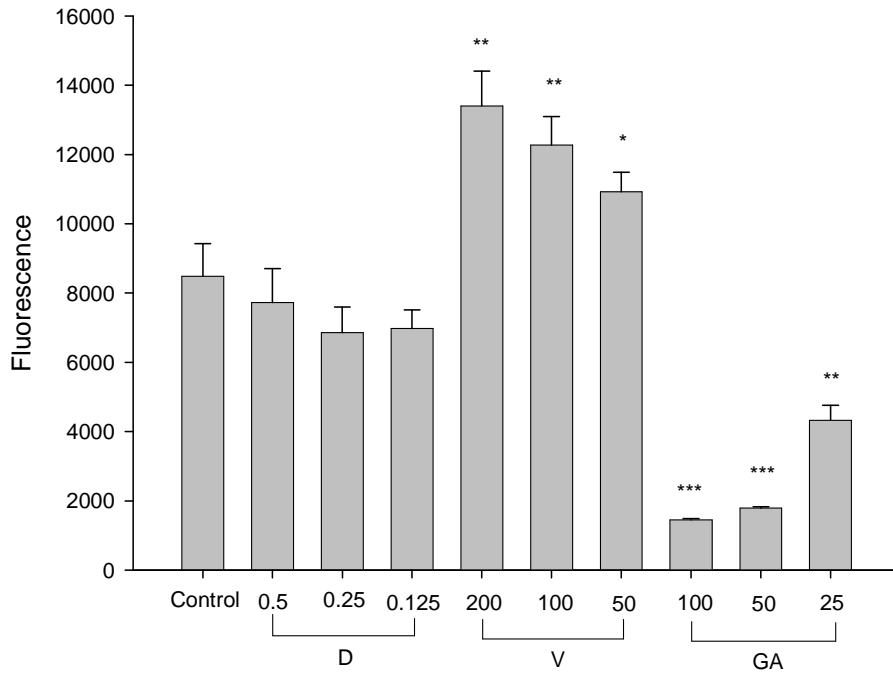


Figure 7. Effects of glycyrrhetic acid (μM) and correspondent concentration of DMSO (D, %, v/v) on the intracellular accumulation of rhodamine 123. Verapamil (V, μM) was used as a positive control.

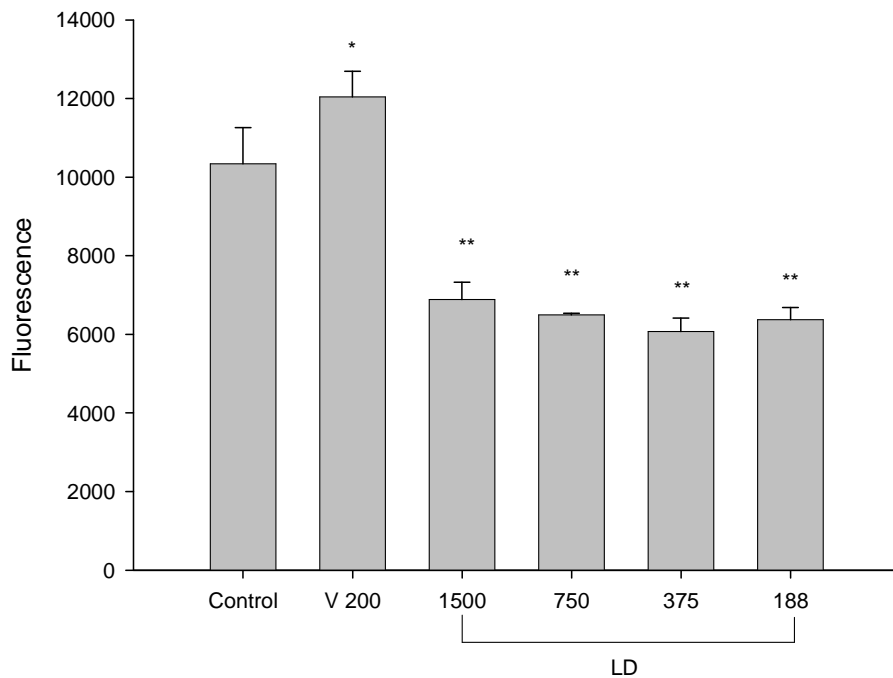


Figure 8. Effects of licorice decoction (LD, $\mu\text{g/mL}$) on the intracellular accumulation of rhodamine 123. Verapamil (V, μM) was used as a positive control.

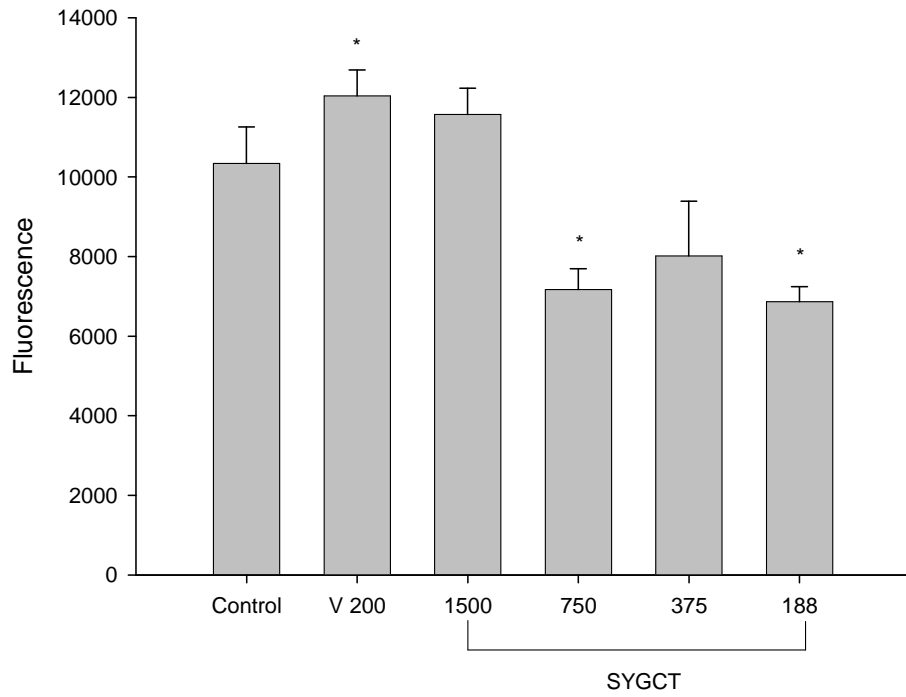


Figure 9. Effects of Shaoyao Gancao Tang (SYGCT, $\mu\text{g/mL}$) on the intracellular accumulation of rhodamine 123. Verapamil (V, μM) was used as a positive control.

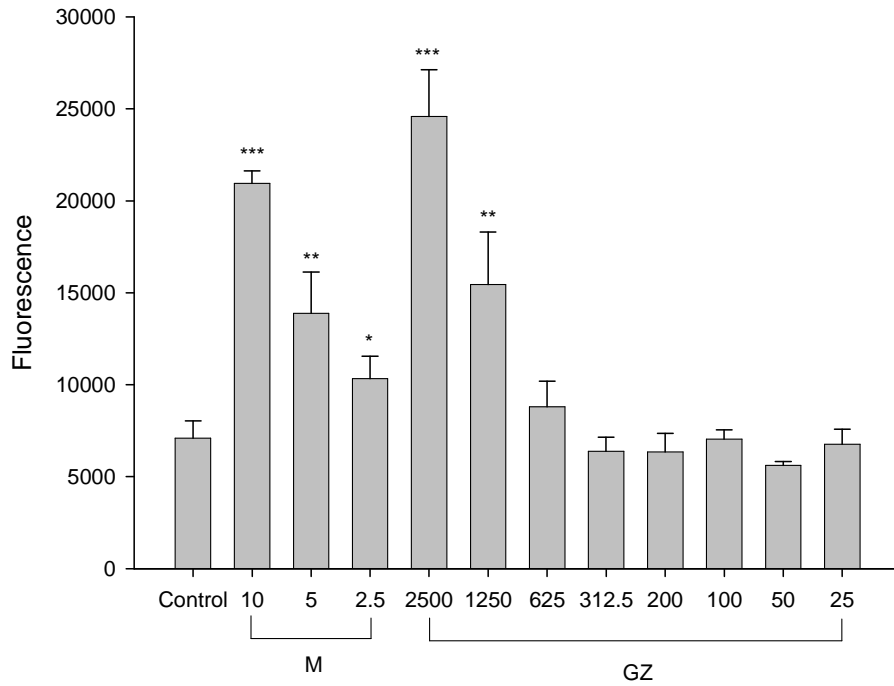


Figure 10. Effects of glycyrrhizin (GZ, μM) on the intracellular accumulation of GSMF. MK-571 (M, μM) was used as a positive control.

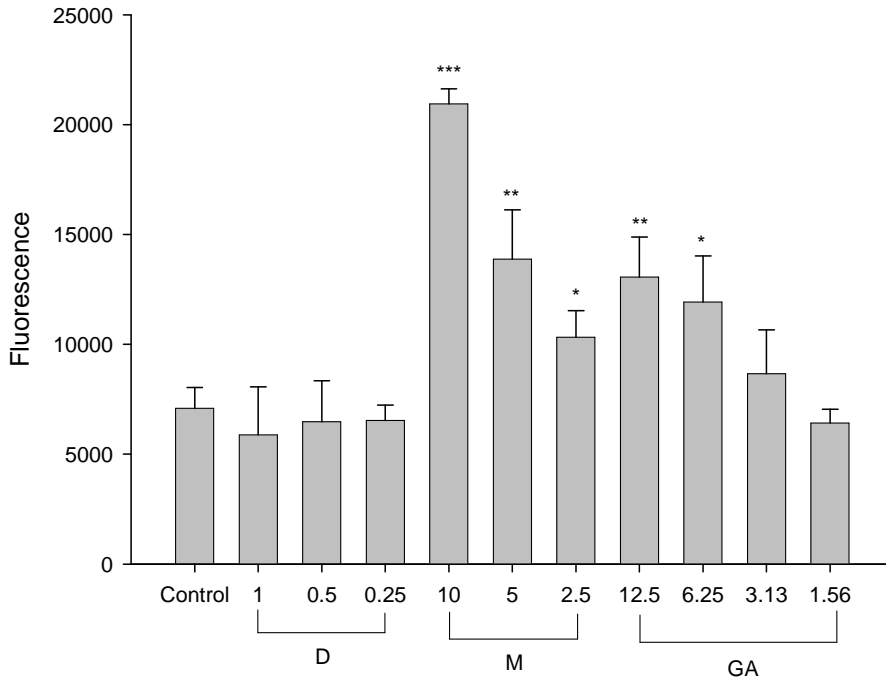


Figure 11. Effects of glycyrrhetic acid (GA, μM) and correspondent concentration of DMSO (D, %, v/v) on the intracellular accumulation of GSMF. MK-571 (M, μM) was used as a positive control.

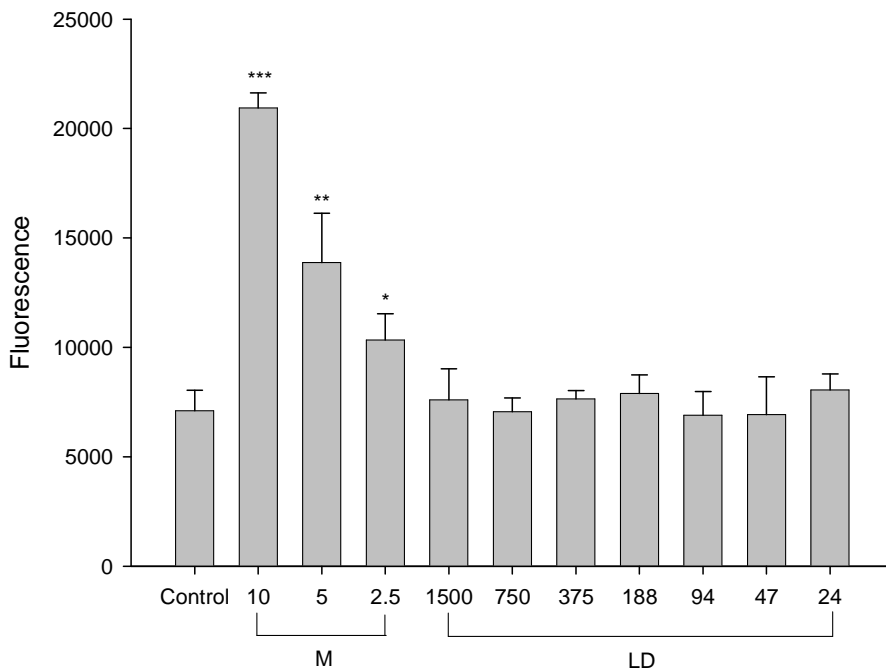


Figure 12. Effects of licorice decoction (LD, $\mu\text{g/mL}$) on the intracellular accumulation of GSMF. MK-571 (M, μM) was used as a positive control.

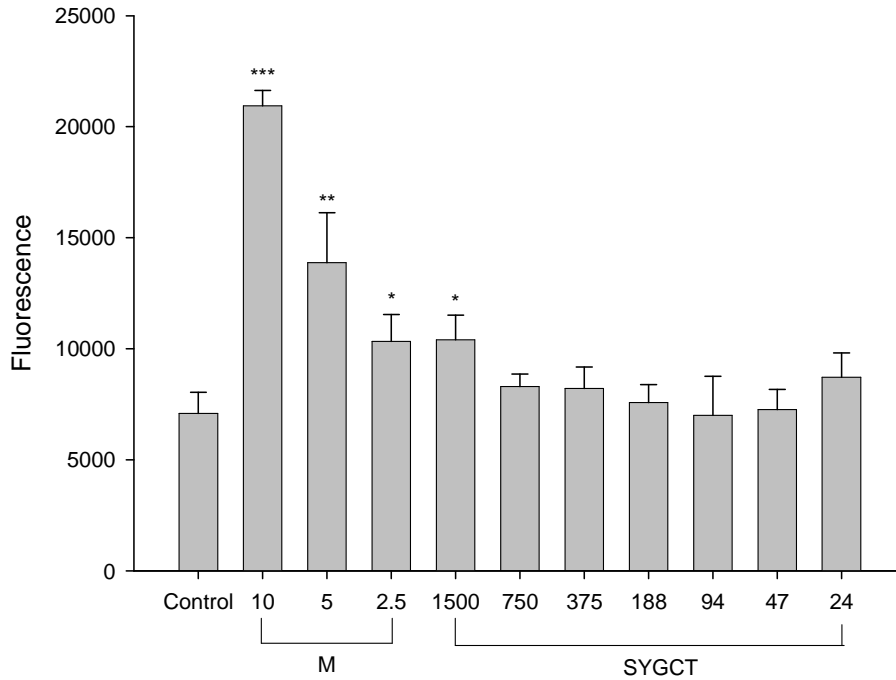


Figure 13. Effects of Shaoyao Gancào Tang (SYGCT, $\mu\text{g}/\text{mL}$) on the intracellular accumulation of GSMF. MK-571 (M, μM) was used as a positive control.

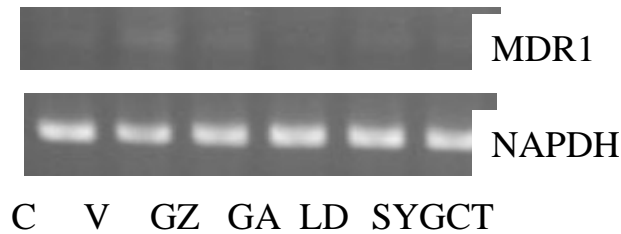


Figure 14. The agarose gel analysis of MDR1 mRNA expression in LS 180 cells after treated with verapamil (V, 200 μM), glycyrrhizin (GZ, 100 μM), glycyrrhetic acid (GA, 50 μM), licorice decoction (LD, 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Shaoyao Gancào Tang (SYGCT, 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectively, for 4 h.

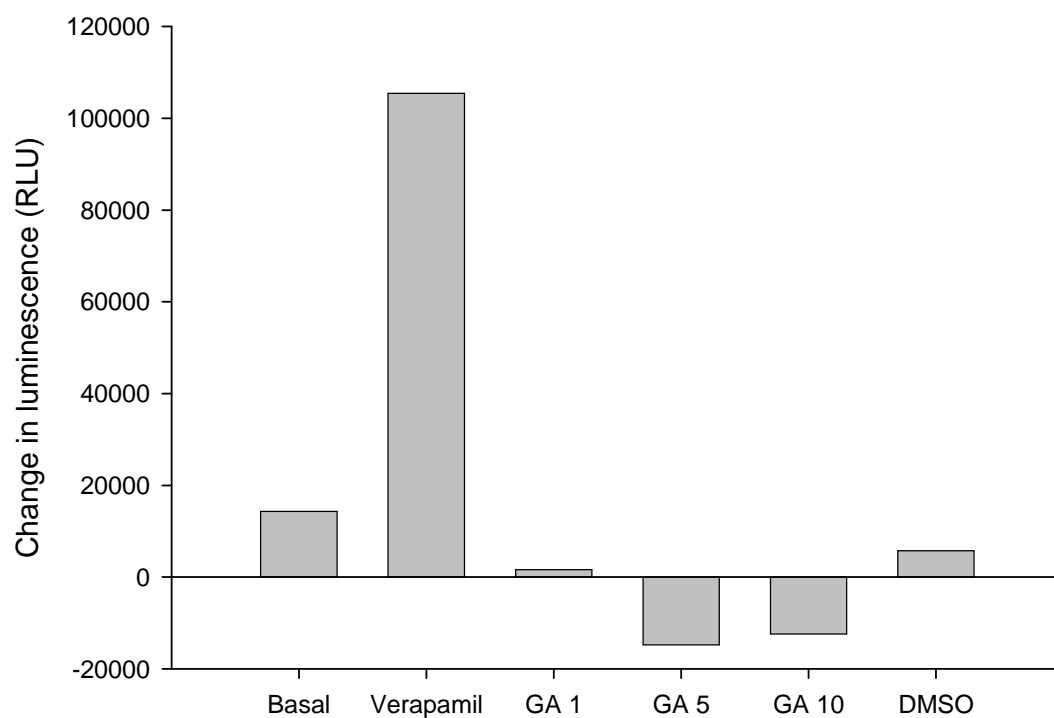


Figure 15. Effects of verapamil (0.5 μ M) and glycyrrhetic acid (GA, μ M) on P-glycotrotein ATPase activity.

Table 1. Substrates of P-gp and MRPs.

Substrates of P-gp	Substrates of MRPs
Amprenavir *Cyclosporine Digoxin Doxorubicin Etoposide Fentanyl Fexofenadine Indinavir Loperamide Morphine Mycophenolate Nelfinavir Quinidine Rifampin Ritonavir Saquinavir Sirolimus Tacrolimus Verapamil Vinblastine Vincristine	Acetaminophen Anthracyclines Antiviral drugs Bile salts Bilirubin Camptothecins Cisplatin Cyclophosphamide Daunorubicin Doxorubicin Etoposide 5-FU Glucuronides Glutathione conjugates Heavy metals LTC ₄ Melphalan 6-Mercaptopurine *Methotrexate Purine Pyrimidine SN-38 Sulfinpyrazone Teniposide Vinca alkaloids

Table 2. Comparison of the effects of glycyrrhizin (GZ), glycyrrhetic acid (GA), licorice decoction (LD) and Shaoyao Gancao Tang (SYGCT) on P-gp and MRP2 *in vivo* and *in vitro*.

	<i>In vivo</i> effects		<i>In vitro</i> effects		Consistency	
	P-gp	MRP2	P-gp	MRP2	P-gp	MRP2
GZ	↑	↓	↑	↓	Yes	Yes
GA	↑	↓	↑	↓	Yes	Yes
LD	↑	↓	↑	—	Yes	No
SYGCT	↑	↓	↑	↓	Yes	Yes

↑ : increased efflux

↓ : decreased efflux