

編號：CCMP98-RD-103

婦女在更年期或產後服用中藥製劑對體內 總代謝體之影響 (2-2)

陳燕惠
國立臺灣大學

摘要

研究目的：

針對產後婦女，使用生化湯治療產後腹痛及惡露，研究臨床上的徵狀改善，並偵測其體內總體代謝物之變化，驗證服用生化湯對人體代謝的總體影響，其與臨床上的徵狀改善有無相關性？本計畫引入代謝體學(metabolomics)的觀念，利用偵測體內總體代謝物的圖譜，以體內總體代謝物的表現作為指標，在使用中藥方介入後有無改變？

研究方法：

- 一、針對產後婦女經評估產後可使用生化湯者。
- 二、收集(一)實驗組：有腹痛及惡露組使用生化湯(使用前/後)之產後婦女
(二)控制組：無使用生化湯之產後婦女抽取收案時(V1)及服藥五天後(V2)血液做為檢體。
- 三、進行臨床療效評估：包括疼痛視覺量表、惡露日誌等。
- 四、進行血液生化值分析，並以 LC/MS/MS 偵測檢體中之總代謝物。
- 五、以 MarkerView 軟體分析中藥介入，對體內總體代謝之影響及臨床療效之關連性。

結果與討論：

一、中藥方劑生化湯指標成份定量分析

以 HPLC 分析本實驗所使用之生化湯(GMP 廠產品玉女生化湯，為規格化藥湯包)，以煎煮法測得每包指標成份 Ferulic acid 僅為傳統生化湯飲片每劑的 0.25 倍。故本實驗給予產婦 4 包生化湯湯包。

- 二、篩選產後有腹痛、惡露現象之產婦，給予生化湯 5 日。納入試驗者有 56 位，生化湯組 27 人實際完成二次抽血者為 24 人。控制組 29 人，實際完成者為 25 人。
- 三、檢測血液中生化值分析：結果顯示這些生化指標的基礎值並無顯著的差異 ($p>0.05$)。服用生化湯後肝功能指數有些微下降，不過皆在正常值範圍之內，對肝功能並無影響。
- 四、臨床療效評估：服用生化湯組對產後宮縮視覺疼痛有明顯的改善 ($p=5.755E-08$)。但是乳脹疼痛、痔瘡疼痛、宮縮改變程度與控制組無明顯差異 ($p>0.05$)。對於傷口疼痛和惡露量的改善亦未比控制組好。
- 五、檢測血液中代謝物圖譜：以 ESI LC/MS/MS 來檢測服用生化湯的血液檢體的總體代謝物圖譜。服用生化湯前/後、服用生化湯組/控制組，以 PCA 分析總體代謝物，皆落在相同區域無法分羣。顯示總代謝物變化未受服用生化湯影響。

關鍵詞：生化湯、產後疼痛、總體代謝物圖譜

Number: CCMP98-RD-103

The Influence of Chinese Medicine on Metabolomics in Menopausal or Postpartum Women (2-2)

Yen-Hui Chen
National Taiwan University

ABSTRACT

Aim:

To study the relief of abdominal cramp by Sheng Hua Tang in postpartum women. Therapeutic effect and changes in total metabolites were detected. Correlation was analyzed between changes in total metabolites and clinical improvements. The concept of metabolomics was introduced in this project to detect total metabolites spectra as biomarkers of Chinese herbs intervention.

Method:

1. A 2-arm trial will be performed in postpartum women with abdominal cramp.
2. Collect blood samples of the two groups
 - (1) Sheng Hua Tang (before/after treatment)
 - (2) postpartum control without treatment.
3. Evaluation of clinical use includes visual pain score and bleeding diary.
4. Total metabolites detection using LC/MS/MS. Marker View software was employed for analysis of correlation between metabolites changes and clinical benefits.

Results & Discussion:

1. Quantitative analysis of Sheng Hua Tang via marker component Sheng Hua Tang bags were extracted by boiling water. Ferulic acid as marker component was detected only 0.25 fold of the traditional prescription using HPLC. The dose was four bags of Sheng Hua Tang in this project.
2. There are 56 persons enrolled. Test group was 27 patients and 24 patients complete the trial. Control group was 29 patients and 25 patients finished the trial.

3. Biochemical data analysis Baseline of the biochemical data was not statistically significant in the two groups. Although SGPT slightly reduced after Sheng Hua Tang treatment in test group, the changes of the titers was irrelevant to hepatic function.
4. Clinical improvement Uterus constriction was significantly improved in women treated with Sheng Hua Tang. Other types of pain were not attenuated.
5. Detection of plasma total metabolites Only minor differences of total metabolites were detected in treated group using ESI LC/MS/MS.

Keywords: Sheng Hua Tang, metabolomics, postpartum women

壹、前言

產後生化湯是產後婦女常用的中藥方劑，主治產後腹痛及惡露。生化湯組成爲當歸、川芎、桃仁、炮薑、炙甘草。此方是源自明末清初的醫家傅青主，撰寫於『傅青主女科』的藥方，取其生出新血、化去舊瘀，所以用「生化」爲名。由於藥簡而效捷，素有產後第一方之譽。當歸及川芎養血活血有興奮子宮平滑肌收縮的作用，桃仁破血去瘀潤腸，三者合用有加強子宮收縮、增強血液循環而促進體內血塊排除之效，炮薑具有溫經散寒增強活血去瘀之力；配合炙甘草則以緩急止痛、協調諸藥、共成活血去瘀、溫經止痛的方劑。服用生化湯的意義在於促進子宮收縮，使惡露排出，避免血栓形成，適用於產後惡露未盡；或自然、人工流產後殘存胎膜所引起之腹痛及異常出血等症。然其真正療效實証及藥理作用機制仍不清楚，引起體內何種變化也不明確。

本研究計畫以生化湯來改善產後腹痛現象。然而中藥無論是單方或複方，都是一個繁雜的含多種純化物的組成物。從藥材方面而言，原料藥材基原的正確性，產品的安全性，一致性都會影響中藥製劑的有效性⁽¹⁾。以行政院衛生署公告的基準方，不同 GMP 廠的產品品質有異，甚至同一藥廠，不同批次製劑的品質亦有差異⁽²⁾，因此以生化湯來探討對產後婦女腹痛及惡露排出的機制有其難度，除了品質難以掌控外，有效成分的篩選，指標成分的追蹤，對體內的靶位(target)的確認及可能造成的影響等都有待解決。

為了克服這些困難，來探討中藥製劑是否對人體造成某些基因、蛋白質、酵素酶、細胞訊息等變化而影響生理反應，甚至造成傷害，我們在本計畫引入代謝體學(metabolomics)的觀念，利用偵測總體代謝物的圖譜，以體內總體代謝物的表現作為指標，來驗證中藥介入後對體內總體代謝物影響的證據以及與臨床上的徵狀改善的相關性。藥物代謝體學(pharmaco-metabolomics)是一個對於藥物介入後，對人體產生影響的總合，以內生性與外加性代謝物的變化來呈現的科學⁽³⁾，屬於宏觀性的研究藥物（一個或多個）的作用。尤其是當這個藥物的作用靶的尚未清楚時，仍能追蹤藥物所造成的影響，以 LC/NMR 或 LC/MS/MS 來偵測代謝物圖譜，利用這種高敏感度的生技技術，對於中藥製劑純化的組成成份不明，作用機制不明，臨床療效不明的情況下，爲一種有效率的技術來探討中藥製劑的作用，毋需追蹤指標成份，因為指標成份的吸收代謝未必能反應有效成分的

藥動及藥效，以及臨床療效。有關利用體內總代謝體的變化來預測藥物對人體的總影響以及藥物效果的可能性的研究報告越來越多^(4,5)，尤其是天然物方面的研究⁽⁶⁾。2008年2月最新一期的期刊 *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 發表了一篇題目為”Metabolomics: a global biomedical approach to drug response and disease”的文章，顯示這個新的研究領域越來越重要⁽⁷⁾。因此測定有腹痛及惡露排出之婦女的總代謝圖譜，有助於找出可能造成生理與病理變化的各種因子。

貳、材料與方法

一、篩選產後有腹痛、惡露之現象之產婦。

二、訂定納入及排除條件，且受試者必須確實了解本研究的試驗性質，並且簽署知情同意書。

納入條件(eligibility criteria)：

(一)產後有子宮痙攣、腹痛及惡露發生之現象

(二)沒有其他疾病，例如：心臟病史(急性心肌梗塞、心率不整)、高血壓、糖尿病、癌症、精神疾病等。

排除條件(ineligibility criteria)：

(一)有下列疾病，例如：心臟病史(急性心肌梗塞、心率不整)、高血壓、糖尿病、癌症、精神疾病等。

(二)有服用 bromocriptine、GnRh associated peptide (GAP)、prostaglandins 等藥物。

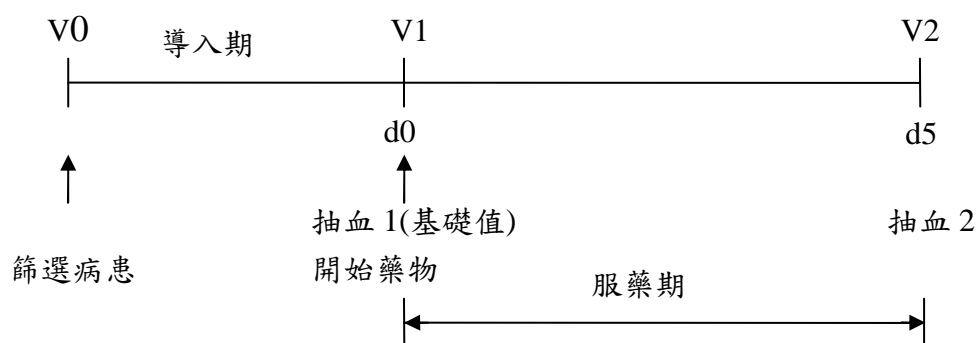
(三)病患無法自行閱讀並填寫本研究之問卷者。

三、本研究為 intend to treat 之試驗。

A 組為生化湯組。收案 27 人實際完成二次抽血者為 24 人。

B 組為控制組。收案 29 人，實際完成二次抽血者為 25 人。

試驗進行流程



四、檢體收集與製備：

A、B 二組病患分別在 V1，V2，收集血液檢體，以液相分配萃取進行檢體製備，自血漿中萃取出總代謝物。以萃取溶劑(甲醇/乙腈/丙酮混和體積比 1：1：1) 400ul 含內標準品(d5-tryptophan 100ug/ml)與 100ul 血清震盪混和 15 分鐘後，以 1600xg 離心 10 分鐘，取上清液真空乾燥。

五、檢測總體代謝物：

以 LC/MS/MS 測定總代謝物，串聯式質譜儀為 API 3000。沖提移動相由(A)乙睛 acetonitrile 與(B)水(內含 0.03% 甲酸)組成，沖提比由 80%A 於 0min，80-85%A 於 0-2min，85%-90%A 於 2-4min，90-95%A 於 4-6min，90%-95%A 於 6-8min，95%A 於 8-12min，95-100%A 於 12-15min，100% A 平衡至 80%A 於 15-20min (表一)。LC/MS/MS 參數設定，以 full ion scan model 進行 Q1 scan，紀錄正離子與陰離子質譜讀值(50-1000 m/z)。得到之代謝物圖譜 Q1 scan 以 MarkerView 軟體進行趨勢分析。

六、療效評估：

記錄受試者在收案時(V1)及服藥後 5 天(V2)，在療效計分工具上的表現，包括婦科史、服藥前/後生化值、服藥後疼痛視覺量表、宮縮視覺疼痛量表、宮縮改變程度、惡露日誌等。

七、代謝物圖譜之變化與所記錄的病患臨床療效評估做相關性分析。

參、結果

一、生化湯之成份定量：

以 HPLC 分析本實驗所使用之生化湯(GMP 廠產品玉女生化湯，為規格化藥湯包免煎煮方)，與民間常用飲片湯劑的成份及含量。發現以沖泡法，生化湯每包指標成份 Ferulic acid 僅為傳統生化湯飲片每劑的 0.24 倍。以煎煮法，每包指標成份為傳統生化湯飲片每劑的 0.25 倍(表二)。經換算產後婦女須服用 4 包玉女生化湯煎煮才能達等量之日劑量(表三)。

二、受試者之篩選與納入：

篩選產後有腹痛、惡露現象之產婦，納入試驗者有 56 位。生化湯組 27 人，給予生化湯 5 日，實際完成二次抽血者為 24 人。控制組 29 人，實際完成二次抽血者為 25 人。

三、血液中生化值分析：

結果顯示這些生化指標的基礎值(V1)，在生化湯組與控制組並無顯著的差異。僅 GPT 及 BUN 在兩組有些差異，但兩組的值皆在正常值範圍之內。(表四)服用生化湯後肝功能指數有些微下降，不過皆在正常值範圍之內，對肝功能並無影響。其他生化指標變化亦皆在正常值範圍之內(表五)。

四、臨床療效評估：

與控制組相比較，服用生化湯組對產後宮縮視覺疼痛有明顯的改善(表六)。但是在其他的視覺疼痛量表如乳脹疼痛、痔瘡疼痛，兩組無明顯差異(表七)。對於傷口疼痛和惡露量的改善亦未比控制組好(表八)。本實驗設計僅觀察五日，完整記錄惡露每日排出量從第一日至第五日。服用生化湯組惡露每日量之變化為增加或減少者約各半，而控制組之惡露每日量變化為減少者佔 95%(表九)。而惡露總排除期間長短及惡露轉弱日數，則記錄較不完整。就現有數據顯示，出現褐色惡露平均日數在控制組僅有 9 位有記錄資料，日數為 16.78；而在生化湯組，19 位有記錄資料，日數為 14.95，低於控制組。然而無統計上的意義($P=0.43986$)。若所有參與試驗者都有完整紀錄，可能會呈現統計意義。至於惡露轉弱日數，在控制組僅有 8 位有記錄資料，日數為 20.88；而在生化湯組，15 位有記錄資料，日數為 17.47，低於控制組。然而無統計上的意義($P=0.18778$)。若所有參與試驗者都有完整紀錄，可能會呈現統計意義。宮縮改變程度與控制組亦無明顯差異(表十)。服用生化湯組 85% 覺得生活品質變好，顯示產婦的舒適度增加。

五、檢測血液中代謝物圖譜：

以 ESI LC/MS/MS 來檢測服用生化湯的血液檢體的總體代謝物圖譜 (metabolic profile) (圖一)。服用生化湯前/後、服用生化湯組/控制組，以 PCA 分析總體代謝物，皆落在相同區域無法分羣。顯示總代謝物變化未受服用生化湯影響(圖二)。這與生化湯組對產後宮縮視覺疼痛有明顯的改善的臨床療效似無相關性。

肆、討論

中藥實證醫學證據至目前為止仍非常缺乏，近年來有些研究者如香港的唐金陵教授，倡導中醫藥研究應以人的實證醫學為主軸，在看到有療效的證據下，再進行機轉的研究，比較能符合有限資源情形下，發展中醫藥的實證醫學。然而其療效又有其評估上一定的難度，因此可以理解，即便世界上這麼多研究者汲汲於中醫藥的研究，但至今仍僅能提供非常有限具療效的證據。為了克服這些困難，來探討中藥製劑是否對人體造成某些基因、蛋白質、酵素酶、細胞訊息等變化而影響生理反應，甚至造成傷害，我們在本計畫引入代謝體學(metabolomics)的觀念，利用偵測總體代謝物的圖譜，以體內總體代謝物的表現作為指標，來驗證生化湯介入後對體內總體代謝物影響的證據以及與臨床上的徵狀改善的相關性。

藥物代謝體學(pharmaco-metabolomics)是一個對於藥物介入後，對人體產生影響的總合，以內生性與外加性代謝物的變化來呈現的科學，屬於宏觀性的研究藥物(一個或多個)的作用。尤其是當這個藥物的作用靶的尚未清楚時，仍能追蹤藥物所造成的影響，以 LC/NMR 或 LC/MS/MS 來偵測代謝物圖譜，利用這種高敏感度的生技技術，對於中藥製劑純化的組成成份不明，作用機制不明，臨床療效不明的情況下，為一種有效率的技術來探討中藥製劑的作用，毋需追蹤指標成份，因為指標成份的吸收代謝未必能反應有效成分的藥動及藥效，以及臨床療效。

本研究初步觀察到服用生化湯 5 日後，以 PCA 分析總體代謝物，僅有些微差異。至於是那些代謝物有差異，是否與臨床療效改善有關連，仍需進一步研究。

伍、結論與建議

服用生化湯對產後宮縮視覺疼痛有明顯的改善，證實長久以來產婦使用生化湯的臨床療效。然本計畫執行過程中因民間習俗產後婦女需充分休養，參與臨床試驗意願較低，故本計畫受試者收集不易，且在抽血及問卷詢問過程常因故拒絕配合，使得本計畫納入人數雖已達到預期目標，但是數據收集不易齊全，影響統計結果。

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-103 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. 行政院衛生署公告，衛署藥字第 84056272 號，1995。
2. 莊武璋、李明宗、陳奎福、許順吉、張永賢。加味逍遙散製劑之品質評價。J Chin Med 2003, 4(3): 183-192.
3. Nebert DW, Vesell ES. Can personalized drug therapy be achieved? A closer look at pharmaco-metabonomics. Trends in Pharmacol Sci 2006; 27:580-586.
4. Clayton TA, Lindon JC, et. al. Pharmaco-metabonomic phenotyping and personalized drug treatment. Nature, 2006; 440, 1073-1077.
5. Caudino WM, Quattrone A, et. al. Metabolomics: available results and current research projects in breast cancer and future applications. J Clin Oncol, 2007; 25(19): 2840-2846.
6. Rochifort S, Metabolomics reviewed: a new “omics” platform technology for system biology and implications for natural products research. J Nat Prod, 2005; 66(12): 1813-20.
7. Kaddurah-Daouk R, Kristal B, et. al. Metabolomics: a global biomedical approach to drug response and disease. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2008; Feb, 48: 653-683.

柒、圖、表

表一、血液中總體代謝物以 LC/MS/MS 分析的沖提條件

Minutes	CH ₃ CN :Formic acid 0.3%
0	80:20
1	85:15
2	85:15
4	90:10
6	95:5
8	95:5
12	100:0
15	100:0
20	80:20
0	80:20

Column: Purospher STAR C18 ODS column (5 μ m, 250 \times 4.6 mm) with a suitable guard column (C18, ODS, 5 μ m, 4 \times 3.0 mm) **The mobile phase:** acetonitrile (A) and water containing 0.3% formic acid (B) using the elution gradient 80% A at 0 min, 80–85% A at 0–2 min, 85–90% A at 2–4 min, 90–95% A at 4–6 min, 90–95% A at 6–8 min, 95% A at 8–12 min, 95–100% A at 12–15 min, 100–80% A at 15–20 min.

表二、不同來源之生化湯成份

製劑	成份	藥材處理方式
生化湯 飲片	當歸、川芎、桃心、烤老薑、炙甘草	1000ml水煮沸至800ml
玉女生化 湯(港香蘭)	當歸、川芎、桃仁、甘草克、薑、益母草及 紅花	沖泡方法：2包置1的沸 水沖泡15分鐘

表三、指標成份定量

指標成份	生化湯飲片	港香蘭生化湯
Ferulic acid content (mg/mL)	0.095mg/mL	0.072mg/mL
Total amount pre pack (mg)	0.095mg/mL×800mL =76mg	0.072mg/mL×500mL/2 =18mg
Daily dose (mg/day)	76mg	18mg×4packs =72mg

表四、服藥前生化值

生化值 (單位)	生化湯組 V1 (n=27)	控制組 V1 (n=29)	p
WBC (103/uL)	8.26	8.97	0.278
RBC (106/uL)	4.15	4.46	0.054
Hemoglobin(g/dL)	11.92	12.34	0.304
Hematocrit(%)	36.93	38.40	0.189
Cholesterol(mg/dL)	253.57	252.48	0.946
AST/SGOT(U/L)	30.78	32.24	0.772
ALT/SGPT(U/L)	37.67	22.79	0.007
BUN(mg/dL)	13.69	11.34	0.007
Creatinine(mg/dL)	0.59	0.58	0.783
Uric acid(mg/dL)	6.03	6.22	0.668

表五、兩組服藥前後生化值比較

生化值 (單位)	生化湯組 (n=24)			控制組 (n=24)		
	V1	V2	p	V1	V2	p
WBC (103/uL)	8.30	7.24	0.023	8.81	7.45	0.003
RBC (106/uL)	4.18	4.71	0.072	4.47	4.56	0.483
Hemoglobin(g/dL)	11.93	12.24	0.509	12.38	12.45	0.824
Hematocrit(%)	37.10	38.04	0.514	38.61	39.75	0.247
Cholesterol(mg/dL)	255.71	234.96	0.013	252.17	238.67	0.104
AST/SGOT(U/L)	31.50	25.92	0.044	27.13	27.25	0.963
ALT/SGPT(U/L)	38.63	27.96	0.005	23.58	33.33	0.282
BUN(mg/dL)	13.60	12.66	0.142	11.28	16.39	0.001
Creatinine(mg/dL)	0.58	0.61	0.100	0.57	0.70	0.009
Uric acid(mg/dL)	6.09	5.97	0.591	5.87	6.50	0.099

表六、服藥後宮縮視覺疼痛量表

平均宮縮視覺疼痛量表	生化湯組(n=20)	控制組 (n=23)	p
(0~100分，分數愈高表愈痛)	14.91333333	42.26811594	5.75511E-08

表七、服藥前後疼痛視覺量表之變化

疼痛項目 (後-前)	生化湯組 V2-V1 (n=22)	控制組 V2-V1 (n=16)	p
傷口疼痛	1.95454	-30	0.005
乳脹疼痛	6.4545	14.6666	0.4599
痔瘡疼痛	10.4347	-5.3333	0.2408

表八、第一天至第五天惡露改變總量

單位	生化湯組 (n=20)	控制組 (n=22)	p value
	0.223915	-0.66996	0.002

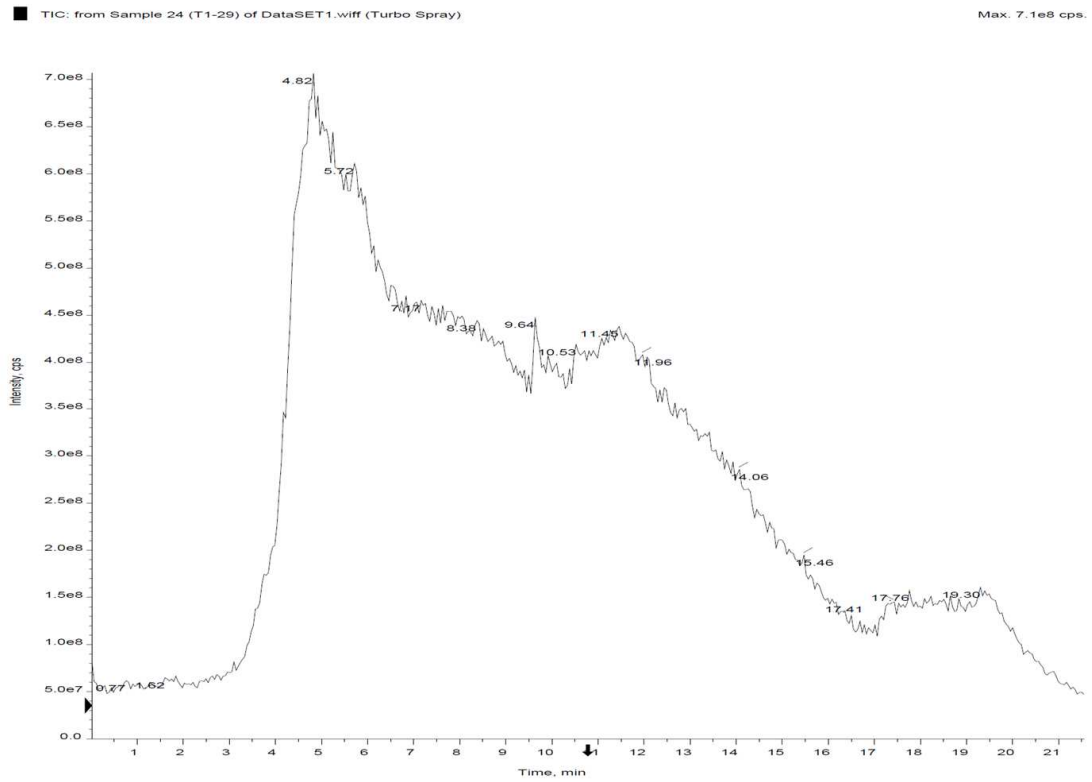
表九、惡露每日量變化

每日量	生化湯組	控制組
減少(人數%)	40%	95%
增加(人數%)	55%	5%
不變	5%	---

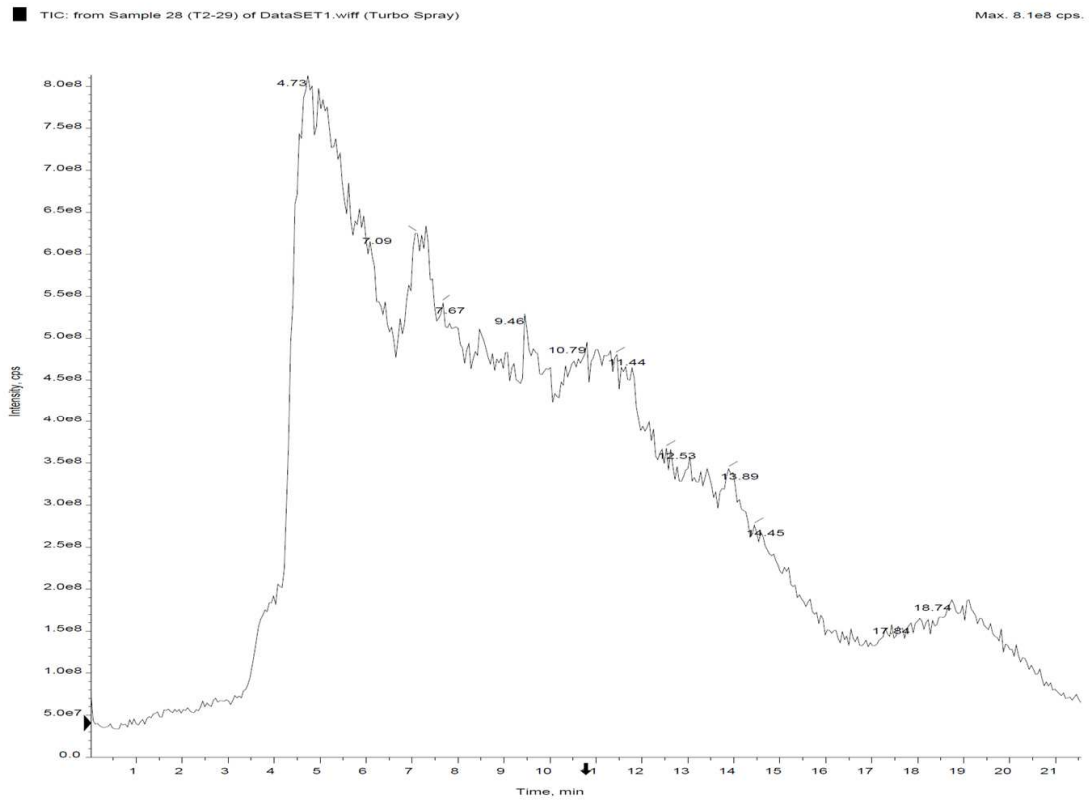
表十、宮縮改變程度

單位	生化湯組 (n=12)	控制組 (n=24)	p value
V2-V1	0.95833	1.04166	0.85289

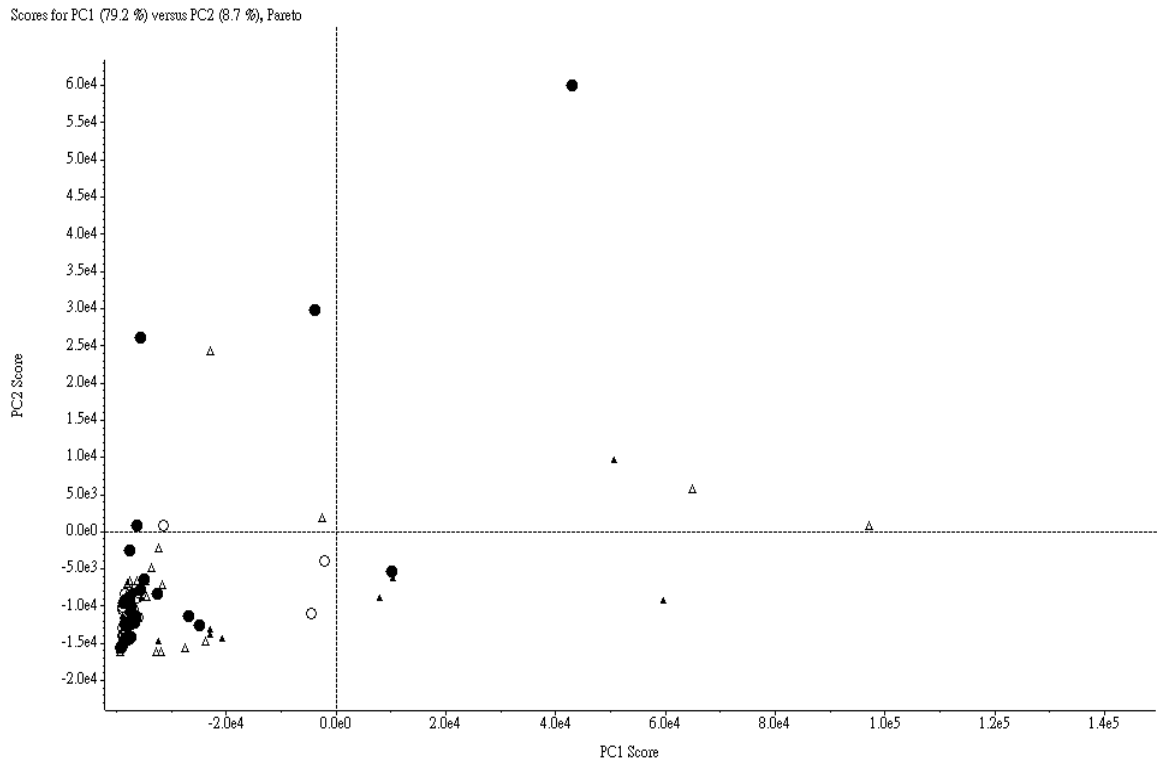
A 服藥前



B 服藥後



圖一、服用生化湯產婦之 LC/MS/MS 總代謝物圖譜(Q1 Scan)



圖二、產後婦女服用/未服用生化湯製劑其血中總代謝物之 PCA 分析

- △：控制組入案後第一天(V1)，
- ▲：控制組入案後第五天(V2)，n=25。
- ：生化湯組入案後第一天(V1)，
- ：生化湯組服用後第五天(V2)，n=25。