

# 行政院及所屬各機關出國報告

(出國類別：短期進修)

## 赴美國奧勒岡州大學藥學院 短期進修心得報告

服務機關：國防大學國防醫學院  
出國人 職稱：少校講師  
姓名：陳錦龍  
出國地區：美國奧勒岡州大學藥學院  
出國期間：92/06/25 - 92/12/24  
報告日期：93/01/29

J0/  
109300181

## 行政院及所屬各機關出國報告提要

出國報告名稱：

赴美國奧勒岡州大學藥學院短期進修心得報告

頁數\_\_11\_\_ 含附件：是 否

出國計畫主辦機關/聯絡人/電話

國防大學國防醫學院/楊素足

出國人員姓名/服務機關/單位/職稱/電話

陳錦龍/國防大學國防醫學院藥學系/少校講師/87923100-18888

出國類別：考察 進修 研究 實習 其他

出國期間：92/06/25 – 92/12/24 出國地區：美國奧勒岡州大學藥學院

報告日期：93/01/29

分類號/目：藥學

關鍵詞：p-glycoprotein (p-gp) transporter, multi-drug resistant

內容摘要：(二百至三百字)

美國奧勒岡州大學的藥學院，在美國藥學院排名約 17，平均每位教員獲得之研究計劃經費排名 16，研究成果斐然，該學院學術活動頻繁，除了經常性的學術演講外，還有來自世界各地醫學中心、著名藥廠、生物技術公司等各地的傑出研究學者的特別演講與研究活動，博士班研究生每年約 15 位，醫學圖書館藏書豐富，資料非常完備，因此對於本次出國短期進修擬訂目標為收集研究題材及資料與生物藥學研究技術學習。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網 (<http://report.gsn.gov.tw>)

## 目次

壹 目的	4
貳 過程	4
參 心得	5
肆 建議	10

## 壹 目的

美國奧勒岡州大學的藥學院，在美國藥學院排名約 17，平均每位教員獲得之研究計劃經費排名 16，研究成果斐然，該學院學術活動頻繁，除了經常性的學術演講外，還有來自世界各地醫學中心、著名藥廠、生物技術公司等各地的傑出研究學者的特別演講與研究活動，博士班研究生每年約 15 位，醫學圖書館藏書豐富，資料非常完備，因此對於本次出國短期進修擬訂目標為收集研究題材及資料與生物藥學研究技術學習。

## 貳 過程

自接獲〈九二〉睦目完字第 0920004388 號奉准出國今後，職隨即參加出國講習，並辦理出國前準備事宜，準備妥當後即於九十二年七月四日搭乘華航班機飛美國洛杉磯，轉機至奧勒岡州波特蘭，再搭乘公車至谷心市奧勒岡州大學。職在此收集到一些研究題材與資料，並觀察其研究設計。所進行研究主要為 p-glycoprotein (p-gp) transporter。

參心得

### 一 (p-gp) transporter

在人類 p-glycoprotein (P-gp) 是由 MDR1 及 MDR3 所 encoded，這兩個基因位於 chromosomal 7q21，在嚙齒類動物則由 mdrla，mdrlb 及 mdr2 所 encoded，人類 MDR1 基因含 28 個 exon，encoding 一個含 1280 個 amino acid 的 transporter，此 transporter 具有兩個相同的 subunit，此 transporter 主要存在於小腸 basolateral site、血腦障壁 (brain blood barrier; BBB)、腎臟、癌細胞表面其功能為 efflux pump，在小腸可將有毒物質由 basolateral site 運往 apical site，也就是排入腸腔內，在腎臟可排入尿液中，在 BBB 可避免有毒物質進入腦中，而在癌細胞則會將抗癌藥物排出，是癌細胞產生抗藥性的重要機轉，p-gp 之運作需要 ATP 的能量此類需要 ATP 能量的 transporter 被稱作 ATP binding cascade (ABC)，ABC 共有八個 subfamily，其中最早被發現的就是 p-gps，其他七個 subfamily 被稱為 multi-drug resistant (MDR) protein，MDRs 之功能與 p-gp 相似。

### 二 p-gp inhibitor

如前段所述 p-gp transporter 之功能會將有毒物質(藥物)排入腸腔避免進入腦中及構成癌細胞的抗藥性故而將藥物及 p-gp inhibitor 同時使用可增加藥物的吸收抑制癌細胞的抗藥性而促進抗癌藥進入癌細

胞故而可作為抗癌藥的輔助劑

### 三 Caco-2 cell

Caco-2 是源自大腸的一群未分化的癌症細胞株，若將 Caco-2 培養在具有 filter 的 well 中，當細胞長到 confluency 後會開始分化，細胞與細胞間會形成與小腸相同的 tight junction，在 filter 的上方會形成 apical site 及類似小腸的 micro villa，並且具有與小腸 micro villa 相同之胞飲作用，在 filter 下方會形成 apical site，且在 confluency 前 Caco-2 分泌的酵素相近於大腸細胞，但在 confluency 後其分泌之各種酵素則近於小腸細胞，因此 Caco-2 model 可被作為評估小腸藥物吸收之 model，在培養 Caco-2 Cell 時，每平方公分含有 20 萬個細胞可達到 confluency，若以每平方公分 4 萬個細胞種植，約培養 5 天可達到 confluency，在 confluency 後 25 天可達到完全分化。

### 四 Caco-2 clone 27.7 cell

在人體小腸細胞會分泌 CYP 3A，CYP 1A1，CYP 1A2 等多種 cytochrome P450 酵素，其中 CYP 3A4 尤其重要，佔總量的 30% 以上，然而，Caco-2 cell 並非所有細胞株都分泌等量的 CYP 酵素，其中 Caco-2 clone 27.7 細胞株在培養時於培養液中加入 Vitamin D3，Vitamin E，可刺激 Caco-2 clone 27.7 細胞株產生 CYP 3A4，故而 Caco-2

clone 27.7 cell 可作為腸道代謝作用之 model。

#### 五 P-gp 之 substrate、inducer 及 inhibitor

P-gp 之 substrate 有 aldosterone, amprenavir, bilirubin, cimetidine, colchicines, cortisol, CPT-11, cyclosporine, dexamethasone, digoxine, diltiazem, domperidone, doxorubicin, erythromycin, etoposide, fexofenadine, indinavir, itraconazole, ivermectin, loperamide, methylprednisolone, morphine, nelfinavir, paclitaxel, quinidine, rantidine, rhodamine, saquinavir, sparfloxacin, terfenadine, tetracycline, vecuronium, verapamil, vinblastine 等，P-gp 之 inducer 有 amprenavir, clotrimazole, dexamethasone, indinavir, morphine, nelfinavir, phenothiazine, retinoic acid, rifampin, ritonavir, saquinavir, St John's wort 等，P-gp 之 inhibitor 有 atorvastatin, bromocriptine, carvedilol, cyclosporine, erythromycin, GF120918, itraconazole, ketoconazole, LY335979, meperidine, methadone, nelfinavir, pentazocine, progesterone, quindine, ritonavir, saquinavir, tamoxifen, valsopodar, verapamil 等。

#### 六 Nifedipine

Nifedipine 之控釋口服錠劑，吸收率為 90%，絕對生體可用率 45~86%，蛋白質結合率 92~98%，原型 Nifedipine 尿中排除率 1~2%，

半衰期 2~5 小時，可經由口服、舌下及直腸給藥。此外 Nifedipine 主要受 CYP 3A4 及 2D6 作用而代謝，Nidedipine 同時也是 CYP 1A1、1A2、2C9、2D6、3A4 的抑制劑，顯示 Nidedipine 與這些藥物同時使用時，易產生藥物交互作用。Nidedipine 是 p-gp 的抑制劑，因此，併用 Nidedipine 及 propranolol、digoxin、quinidine 等可能增加這些藥物的吸收。由前述資料顯示，Nifedipine 在小腸、大腸吸收良好，但其肝臟首渡效應高。因此，生體可用率僅 45~86%，且主要由肝臟代謝，所以尿中排出率僅 1~2%。

## 七 穿透試驗

### 大腸癌細胞 CaCo-2 之培養

#### A. 培養液

DMEM 800ml

FSB 200ml

Essential amino acid 10ml

Antibiotics (含 penicillin, streptomycin 及 amphotercin) 10ml

$\alpha$ -tocopherol (3mM) 1 $\mu$ l

B. CaCo-2 細胞以每 well  $2 \times 10^6$  個種殖於六孔 transwell 中，每隔兩天更換一次培養液，培養 25 天，使 CaCo-2 細胞分化出 tight junction



及絨毛，再以 HBSS (pH=7.4) 緩衝液清洗 3 次(每次 apical site 1.5 ml, basolateral site 2ml)，用以進行藥物穿透實驗。

- C. 在 CaCo-2 cell 的 apical site (或 basolateral site) 加入 1  $\mu$ M digoxin 及  $^3$ H-digoxin 1  $\mu$ Ci (或 cyclosporin A, verapamil, indol-3-carbinol, dimmer of indol-3-carbinol 作為 substrate) 作為 tracer 進行藥物穿透實驗。另外，也分別在 apical site 及 basolateral site 加入 0、1、10  $\mu$ M Nifedipine，或加入 0、1、10  $\mu$ M Nifedipine 及 10  $\mu$ M Ketoconazole (Ketoconazole 為 p-gp、CYP 1A1、1A2、2A6、2B6、2C9、2D6、3A4、7、11A1、17 之抑制劑；或 MK571, xanthohumol 等作為抑制劑)，於 0、0.5、1、1.5、2、3 及 4 小時，由 basolateral site 取樣 100  $\mu$ l，並補充 100  $\mu$ l 新鮮緩衝液，100  $\mu$ l 樣品與 900  $\mu$ l scintillation cocktail 混合，再以 scintillation counter 測定。

## 八 討論

1. Indol-3-carbinol (I3C) 是胡蘿蔔，花椰菜等之重要成份，在胃酸中 I3C 會產生 3,3'-diindolylmethane (DIM) 及一些 trimer 化合物，經實驗證明，I3C 在 p-gp 之作用並不明顯，而 DIM 是 p-gp 之 inhibitor，但不是 p-gp 的 substrate。
2. xanthohumol 在 Caco-2 cell transporter 之作用相當有趣，當以

digoxin 作為 substrate 時, xanthohumol 會增加 digoxin 在 basolateral to apical 之 transport, 但若改以 cyclosporin A 作為 substrate 時, xanthohumol 會明顯減少 cyclosporin A 在 basolateral to apical 之 transport, digoxin 和 cyclosporin A 都是 p-gp 的 substrate, xanthohumol 之作用卻完全相反, 由此可知 digoxin 或 cyclosporin A 可能不止經由 p-gp transporter, 也可能經由其他 transporter 運送, 同時也可推論 xanthohumol 也在這些 transporter 有作用。

3. ketoconazole 是 p-gp, CYP 1A1, 1A2, 2A6, 2D6, 3A4, 7, 11A1, 17 等之 inhibitor, 但不是 p-gp 之 substrate, verapamil 是 p-gp 的 substrate, 也同時是 p-gp 的 competition inhibitor, 但在 transporter study 中兩者作用相近, 都會減少 digoxin 或 cyclosporin A 由 basolateral to apical 之 transport。

4. MK571 是 CYP 3A4 之 inhibitor, 但對 p-gp 無明顯作用, 以 digoxin 為 p-gp 的 substrate 且 MK571 為 inhibitor 時, digoxin 在 Caco-2 cell basolateral to apical 之 transport 無變化, 在 Caco-2 clone 27.7 cell 則是減少, 但以統計學考驗皆未達明顯差異。

#### 肆 建議

1. 學術資料: 在國防醫學院由於圖書館經費不足, 所訂學術期刊有

限，因而常須花費時間去台大搜尋資料，浪費許多時間，美國奧勒岡州大學則相當重視學術期刊訂購，因此研究資料搜尋有效率。

2. 研究人力：在國防醫學院由於招生名額限制，研究人力以研究助理為主，碩士班研究生為輔，嚴重限制研究人力的素質與效能且須花費較多人事費用，在台灣各大學研究人力則是以碩士班研究生及研究助理為主，博士班研究生為輔，所需費用較少，且效能較高，然而與美國奧勒岡州大學相較，卻又明顯弱勢了，在美國奧勒岡州大學研究人力是以博士班研究生與博士後研究人員為主，而且人數龐大，效能高，也不須太多人事經費(博士班研究生與博士後研究人員都是低成本、高素質的研究人力)，由此可知國防醫學院研究人力運用嚴重落後於台灣各大學，而台灣各大學研究人力運用嚴重落後於美國大學。
3. 研究經費：美國奧勒岡州大學每位教師每年獲得的研究經費都在千萬台幣以上，國防醫學院教師則僅在為一百萬以下，兩者相比，差異甚大。
4. 儀器設備：美國奧勒岡州大學儀器設備較為老舊，而國防醫學院在 89 年搬遷至新院區，蒙國防部全力支持下，房舍、儀器都相當優良，這是我們的優點，應善加把握利用。