

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

茵陳蒿促進乙醯胺基肝毒性之機轉

計畫類別：☒個別型計畫

☐整合型計畫

計畫編號：CN90-PH-01

執行期間：90 年 1 月 1 日至 90 年 12 月 31 日

計畫主持人：楊竹茂

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：藥學系

中華民國 91 年 2 月 27 日

嘉南藥理科技大學教師專題研究計畫成果報告

計畫名稱：茵陳蒿促進乙醯胺基酚肝毒性之機轉研究

計畫編號：90-PH-01

執行期間：90 年 1 月 1 日至 90 年 12 月 31 日

計畫類別： ☒ 個別型

☐ 整合型

主持人：楊竹茂

計畫總主持人：

協同研究：

摘要

「茵陳蒿」(In-Chen-How) 為常用中藥，傳統上有清濕熱，利膽退黃的功能，用於急性黃疸型肝炎、膽囊炎等症狀，為許多中藥方劑中之主藥。「乙醯胺基酚」(acetaminophen) 為一種廣用的解熱鎮痛「成藥」，雖然依治療劑量於短期內使用並無立即且明顯的毒性作用發生，然而過量或長期使用，易導致急性肝細胞壞死，甚至死亡。本實驗室之前研究服用茵陳蒿對同時服用乙醯胺基酚的影響時，發現茵陳蒿對乙醯胺基酚所誘發的急性肝臟壞死之毒性作用不但無保護作用反而有加速惡化的現象。由於目前尚無任何研究報告指出茵陳蒿會加速藥物在肝臟內之代謝過程。為了瞭解茵陳蒿是否促進乙醯胺基酚在肝臟的代謝作用而加速 NAPQI 的形成，因此利用西方點墨法 (Western blotting) 分析服用茵陳蒿前後 CYP 酵素蛋白量之變化，另外以螢光偏極化免疫分析法 (TDx) 及高壓液相層析法 (HPLC) 分析服用茵陳蒿後對乙醯胺基酚藥動學的影響，以闡明其相互作用之機轉。由於有報導指出乙醯胺基酚的代謝會隨著年齡的不同而有所改變。為了瞭解高、低齡族群服用茵陳蒿後對乙醯胺基酚藥動學方面的影響，本研究另以 HPLC 的方法分析比較年輕老鼠 (2 個月大) 及年老老鼠 (12 個月大) 之間的差異。

由本研究結果發現，連續餵食年青大白鼠七天茵陳蒿後，肝微粒體中 CYP1A2 及 CYP2E1 之蛋白表現量皆上昇，同時由血中動力學參數顯示，茵陳蒿能使乙醯胺基酚之代謝加快，達到最高血中濃度時間 (T_{max}) 由 1 小時降至 0.25 小時，平均最高血中濃度 (C_{max}) 由 200.6 $\mu\text{g/ml}$ 降至 115.6 $\mu\text{g/ml}$ ；然而對年老大鼠反而能顯著提升其最高血中濃度。由以上結果顯示，茵陳蒿能經由提高肝微粒體中 CYP1A2 及 CYP2E1 之蛋白表現而加速乙醯胺基酚之代謝，增加活性之代謝中間體，進而使肝臟之 glutathione 被耗盡，最後導致肝細胞壞死。

茵陳蒿促進乙醯胺基酚肝毒性之機轉研究

楊竹茂

嘉南藥理科技大學藥學系

前言

「茵陳蒿」(In-Chen-How) 為常用中藥，始載於「神農本草經」，列為上品。傳統上有清濕熱，利膽退黃的功能，用於急性黃疸型肝炎、膽囊炎等症狀，為許多中藥方劑中之主藥。近代化學及藥理的研究也證實茵陳蒿含有多種強效利膽及抗肝炎作用之成分 (Komiya *et al.*, 1976; Yamahara *et al.*, 1982; Kitagawa *et al.*, 1983; Okuno *et al.*, 1988)。「乙醯胺基酚」(acetaminophen) 為一種廣用的解熱鎮痛「成藥」，雖然依治療劑量於短期內使用並無立即且明顯的毒性作用發生，然而其代謝過程中經細胞色素 P450 (cytochrome P450, 簡稱 CYP) 代謝產生具有強度親核性的代謝中間產物 NAPQI (n-acetyl-p-benzoquinoneimine)，此代謝中間產物能迅速與麩胱甘肽 (glutathione) 產生共價結合，甚至使得肝細胞內貯存的麩胱甘肽完全排空，更進一步與肝細胞內之巨分子結合，而使細胞壞死 (Corcoran *et al.*, 1980; Prescott, 1984; Mitchell *et al.*, 1974)；因此過量或長期使用，易導致急性肝細胞壞死，甚至死亡。由於被列為非醫生處方用藥，極易由市面購得，因此因長期服用、過量使用或因小孩誤食過量糖漿製劑而中毒的病例屢見不鮮 (Rollins *et al.*, 1979; Nogen *et al.*, 1978; Moldeus *et al.*, 1978; Bonkowsky *et al.*, 1978; Arker *et al.*, 1977)。

本實驗室之前研究服用茵陳蒿對同時服用乙醯胺基酚的影響時，發現茵陳蒿對乙醯胺基酚所誘發的急性肝臟壞死之毒性作用不但無保護作用反而有加速惡化的現象：如死亡率增高；血清中 alanine aminotransferase (ALT) 及 aspartate aminotransferase (AST) 更上昇；加重肝組織壞死的程度等；且實驗結果指出預先服用茵陳蒿後，更會嚴重增強乙醯胺基酚對麩胱甘肽至近乎完全排空的程度 (Yang *et al.*, 1998)。

由於目前尚無任何研究報告指出茵陳蒿會加速藥物在肝臟內之代謝過程。為了瞭解茵陳蒿是否促進乙醯胺基酚在肝臟的代謝作用而加速 NAPQI 的形成，因此利用西方點墨法 (Western blotting) 分析服用茵陳蒿前後 CYP 酵素蛋白量之變化，另外以螢光偏極化免疫分析法 (TDx) 及高壓液相層析法 (HPLC) 分析服用茵陳蒿後對乙醯胺基酚藥動學的影響，以闡明其相互作用之機轉。由於有報導指出乙醯胺基酚的代謝會隨著

年齡的不同而有所改變 (Tanaka, 1988; Rumore and Blaiklock, 1992; Tarloff *et al.*, 1991; Rikans, 1989); 為了瞭解高、低齡族群服用茵陳蒿後對乙醯胺基酚藥動學方面的影響, 本研究另以 HPLC 的方法分析比較年輕老鼠 (2 個月大) 及年老老鼠 (12 個月大) 之間的差異。

實驗材料

一、動物

2 個月大之雄性 Wistar 大白鼠 (體重約為 200~250 g) 及 12 個月大之雄性 Wistar 大白鼠 (體重約為 350~400 g) 購自行政院國家科學委員會之國家實驗動物繁殖及研究中心。

二、材料

茵陳蒿濃縮製劑 (*Artemisia capillaris* Thunb.) 購自科達製藥廠, 經以 HPLC 進行指標成份 (scoparone) 分析証實為綿茵陳製劑。

乙醯胺基酚為市售 Panadol 500mg (美國溫莎藥廠) 錠劑。

Acrylamide, N,N'-methylene-bis-acrylamide (Bis), sodium dodecyl sulfate (SDS), ammonium persulfate, N,N,N',N'-tetramethylene diamine (TEMED), β -mercaptoethanol, bromophenol blue, glycine 購自 Bio-Rad, Laboratories, Richmond, CA., U. S. A.

乙醯胺基酚對照標準品為行政院衛生署藥物食品檢驗局之對照標準品。

β -hydroxyethyltheophylline 購自 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., U. S. A. 其他試劑則為 Merck 之產品。

實驗方法

一、實驗動物之處理

本實驗將大白鼠分成「未投予茵陳蒿」及「投予茵陳蒿」二組。「未投予茵陳蒿」組於實驗期間給予正常飼料及飲水。「投予茵陳蒿」組每天於早上八點、下午一點及下午六點, 依體重分別以灌食器灌食相當於 1.0 gm/kg 之茵陳蒿水懸濁液, 連續七天 (灌食期間採限量攝食, 每次灌食前二小時及晚間取出飼料, 但飲水不限)。

二、乙醯胺基酚懸濁溶液的配製

取 5 顆 Panadol 500 mg Tablet，於研鉢中研成粉末狀，加 1 gm CMC-Na 及 0.5 gm 阿拉伯膠，加水研磨至膠狀，並稀釋至 50 ml (10 mg/ml)。使用前振盪均勻。

三、微粒體 (microsomes) 之製備

實驗動物連續灌食茵陳蒿七天後；沿用 Alvares 和 Mannering (1970) 之方法，犧牲動物後立即取肝。以下之製備過程與溶劑保持在冰浴或 4°C，將組織置於 1.15% KCl 溶液中漂洗 3 次以上後，清除結締組織、血塊與脂肪，以吸水紙吸去多餘水分，予以稱重。組織剪碎後，加入 KCl 溶液於均質機 (Teflon pestle-glass homogenizer) 中來回均質 6 次。並以 KCl 溶液調成 4 倍組織重之體積，倒入離心管中，以 Beckman J2-21 (Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA. U.S.A.) 離心機，在 4°C 下，以 9,000 × g 離心 20 分鐘，取得含微粒體 (microsomes) 之上清液。再以 KCl 溶液調至原有 4 倍組織重的體積，以 Beckman LE-80 (Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA. U.S.A.) 離心機，在 4°C 下，以 100,000 × g 離心 1 小時，取得微粒體沉澱。將微粒體沉澱再度以 KCl 溶液懸浮成 4 倍於組織重體積的懸浮液，在 4°C 下，以 Beckman LE-80 離心機于 100,000 × g 下離心 1 小時，取得微粒體 (washed microsome)，上面覆以 0.1 M KPO₄ 緩衝液 (pH 7.4)，於 -75°C 下保存。

四、西方點墨法 (Western blotting)

本實驗係沿用 Laemmli (1970) 之 discontinuous electrophoresis 方法。製備 7.5% acrylamide 分離膠 (separation gel) 與 3% acrylamide 堆集膠 (stacking gel) 的過程是以不同比例之 Tris-HCl 緩衝液，acrylamide-bis 和 sodium dodecyl sulfate (SDS) 溶液混合均勻並去氣，然後加入 ammonium persulfate 與 TEMED 催化 acrylamide 之聚合反應。而樣品之處理過程為將微粒體在含 0.2 M Tris-HCl (pH 6.8)，0.3% glycerol，6.25% SDS，2.22 mM β-mercaptoethanol 與 0.0625% bromophenol blue 之樣品製備液於沸水處理 3 分鐘後進行電泳。電泳過程中，堆集分離作用時，分別用 20 mA 與 40 mA。電泳完畢後，進行蛋白轉印沿用 Towbin 等人 (1979) 以 transfer buffer (含 25 mM Tris base (pH 8.3)，192 mM glycine 與 20% (v/v) methanol) 將 nitrocellulose (NC) 膜潤溼，再將膠體 (gel) 平鋪於 NC 膜上再覆上以 transfer buffer 潤溼之濾紙，以玻璃輕壓使 NC 膜與膠體之間沒有氣泡產生，置於溼式轉印槽中在 4 °C，以 0.1 A 之電流進行轉印 16 小時。

轉印完畢後，將 NC 膜置於含 5% 脫脂奶粉之 phosphate buffer saline (PBS; 含 0.14 M NaCl，8 mM Na₂HPO₄，2.7 mM KCl 與 1.5 mM KH₂PO₄)，在 37 °C 水浴恆溫槽中振搖 1 小時，再以 100 倍稀釋的一級抗體分別為單株抗體 Mab 1-7-1 (anti-rat CYP1A1) 及 1-98-1 (anti-rat CYP2E1)，在 4 °C 作用 16 小時。反應後，以含 0.5% Tween 20 之

PBS 清洗四次，每次 15 分鐘，以洗去非特異性結合之抗體。接著再用稀釋 1,000 倍的 rabbit anti-mouse IgG (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) 於室溫下作用 1 小時後，以含 0.5% Tween 20 之 PBS 清洗 NC 膜四次，每次 15 分鐘。最後以 enhanced chemiluminescence (ECL) 試劑 (Amersham, Buckinghamshire, U.K.) 反應 1 分鐘，移去過多之試劑後將 NC 膜用保鮮膜包好後反應 5 分鐘，於 X 光片上曝光，以自動洗片機 (X-OMAT M43, Kodak) 洗片，最後以數位影處理系統 ImageMaster (Pharmacia Biotech Ltd., Uppsala, Sweden) 比較其相對濃度。

五、血清之製備

實驗動物連續灌食茵陳蒿七天後；第八天所有實驗動物先以克太拉 (Ketalar, 60~90 mg/kg) 肌肉注射進行麻醉誘導，並添加煩寧 (Valium, 5 mg/kg) 以維持穩定之麻醉深度；麻醉後以 PE-50 於股動脈進行插管手術，且灌食大白鼠 500 mg/kg 乙醯胺基酚後採血。採血時間點分別為灌食乙醯胺基酚前及灌食後 15 分鐘；30 分鐘；60 分鐘；90 分鐘；2 小時；3 小時；4 小時及 6 小時。血漿以 10,000 rpm 離心 10 分鐘取得血清。

六、茵陳蒿對乙醯胺基酚藥動學的影響

1、TDx 免疫分析法

乙醯胺基酚血中濃度之測定是以測試組 Abbott TDx/TDxFLx Acetaminophen reagents (IL, USA) 加入 100 μ l 之血清，使用儀器 Abbott TDx Analyzer (IL, USA)，以 485 nm 為激發波長，525-550 nm 為放射波長，以其放射光之強度計算檢體內測定物質之濃度。測定前以 0.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0 及 250.0 μ g/ml 之標準品作校正曲線，並於測定每十個樣品後，各分別插入高 (150 μ g/ml)、中 (35 μ g/ml)、低 (15 μ g/ml) 之控制血清以確保其準確度。

2、HPLC

HPLC 之測定條件如下：

儀器：島津 (Shimadzu LC-10AD) 高壓液相層析儀、附加移動相自動減壓脫氣裝置 (Gastorr GT-102)、管柱加熱恆溫器及自動注射器 (SIL-10A Autoinjector)。

注射容量：20 μ l。

管柱： μ Bondapak C18, 30 cm $\times$ 4 mm i.d.

檢測器：島津紫外線-可見光檢測器 (Shimadzu SPD-10A)。波長 254 nm。

移動相：0.02 M Sodium acetate buffer (pH 4) / Methanol = 70 / 30。

內部標準品之製備：精確秤取 250 mg 之 β -hydroxyethyltheophylline 於 250 ml

之容器瓶中，以 3 N HClO₄ 溶解並稀釋至 250 ml 刻度。

標準品之製備：精確秤取乙醯胺基酚對照標準品 50 mg 於 10 ml 之容器瓶中，以甲醇溶解並稀釋至 10 ml 刻度作為貯存溶液 (stock solution)。自貯存溶液中精確量取適量溶液，經以甲醇連續稀釋後分別加入空白血清中至含標準品濃度為 0.0, 5.0, 10.0, 50.0 及 250.0 µg/ml 之系列標準溶液以供製備標準曲線。

樣品溶液之製備：取 100 µl 血清加入等量之內部標準品混合均勻，以 1500 rpm 離心 5 分鐘去除蛋白質沉澱，取得之上清液直接注射於分離管柱中進行分析。

結果

一、服用茵陳蒿對 CYP 酵素蛋白含量之影響

利用西方點墨法分析，連續餵食七天茵陳蒿對肝微粒體 CYP 蛋白含量之影響，結果顯示如圖一。使用單株抗體 MAb 1-7-1 分析 CYP1A2 及 MAb 1-98-1 分析 CYP2E1 蛋白表現量，結果顯示，服用茵陳蒿後 CYP1A2 及 CYP2E1 之蛋白表現量皆上昇。

二、茵陳蒿對乙醯胺基酚藥動學的影響

1、TDx

圖二為乙醯胺基酚之校正曲線 (calibration curve)；濃度分別為 0.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0 及 250.0 µg/ml。控制血清 150 µg/ml、35 µg/ml 及 15 µg/ml 之回收率分別為 102.4 %、102.0 % 及 101.2 % (表一)。

連續灌食 2 個月大之大白鼠茵陳蒿七天後，投與 500 mg/Kg 乙醯胺基酚，以 TDx 分析乙醯胺基酚血中濃度，結果顯示於圖三。未投與茵陳蒿只投與乙醯胺基酚之血中濃度於 1.0 小時時達到最高 (200.6 µg/ml)；而有投與茵陳蒿則在 0.25 小時時達到最高 (115.6 µg/ml)。半衰期 ($t_{1/2}$) 皆為 4 小時。

2、HPLC

(1) 乙醯胺基酚之定量結果

圖四為乙醯胺基酚之校正曲線 (calibration curve)；濃度分別為 0.0, 5.0, 10.0, 50.0 及 250.0 µg/ml。

(2) 年老大白鼠服用茵陳蒿後對乙醯胺基酚藥動學的影響

連續灌食 12 個月大之大白鼠茵陳蒿 5 天後，投與 500 mg/Kg 乙醯胺基酚，以 HPLC 分析乙醯胺基酚血中濃度，結果顯示於圖五。未投與茵陳蒿只投與乙醯

胺基酚之對照組，在給予乙醯胺基酚後 6 小時內其血中濃度維持在 68.8~92.7 $\mu\text{g/ml}$ ；而有投與茵陳蒿之實驗組在 1.0 小時時達到最高 (169.9 $\mu\text{g/ml}$)。

Table 1. Accuracy test of acetaminophen by TDx method.

Target concentration ($\mu\text{g/ml}$)	N	Found ($\mu\text{g/ml}$) $\pm$ SEM	Mean Recovered (%)	CV (%)
15	5	15.36 $\pm$ 0.46	102.4	2.99
35	7	35.70 $\pm$ 0.30	102.0	0.84
150	6	151.79 $\pm$ 2.38	101.2	1.57

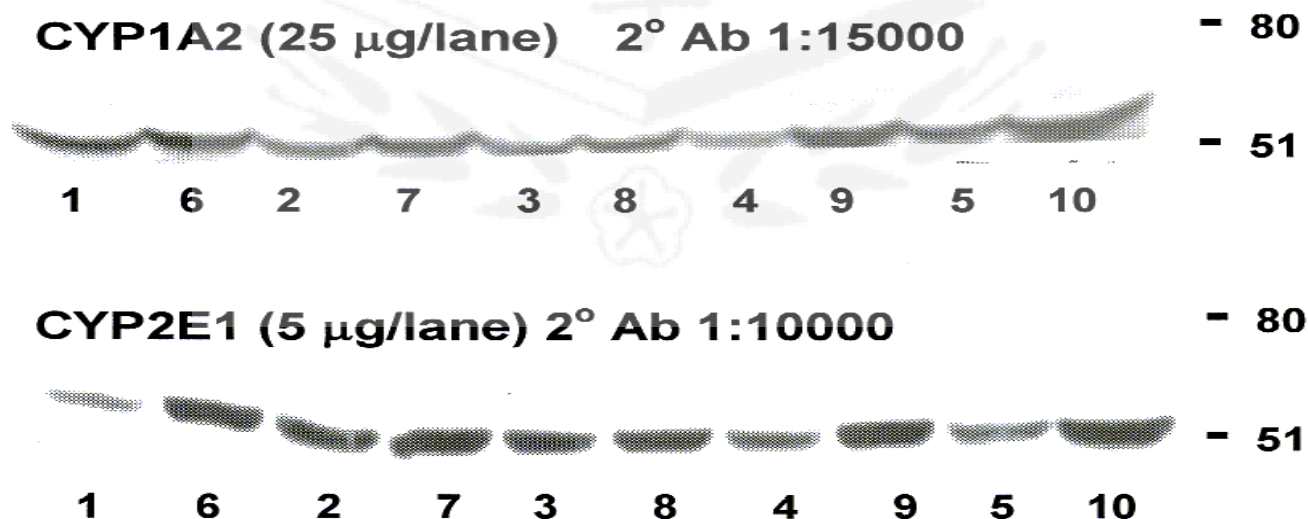


Figure 1. Immunoblot analysis of microsomal CYP enzymes in rat liver. Lanes 1, 2, 3, 4 and 5 contained hepatic microsomal protein from control rats. Lanes 6, 7, 8, 9 and 10 contained hepatic microsomal protein from In-Chen-How treated rats. Twenty five μg microsomal protein were loaded for immunoreaction with mouse anti-rat CYP 1A2 (MAb 1-7-1). Five μg microsomal protein were loaded for immunoreaction with mouse anti-rat CYP 2E1 (MAb 1-98-1). Electrophoresis and immunodetection were carried out as described in the section of "Methods".

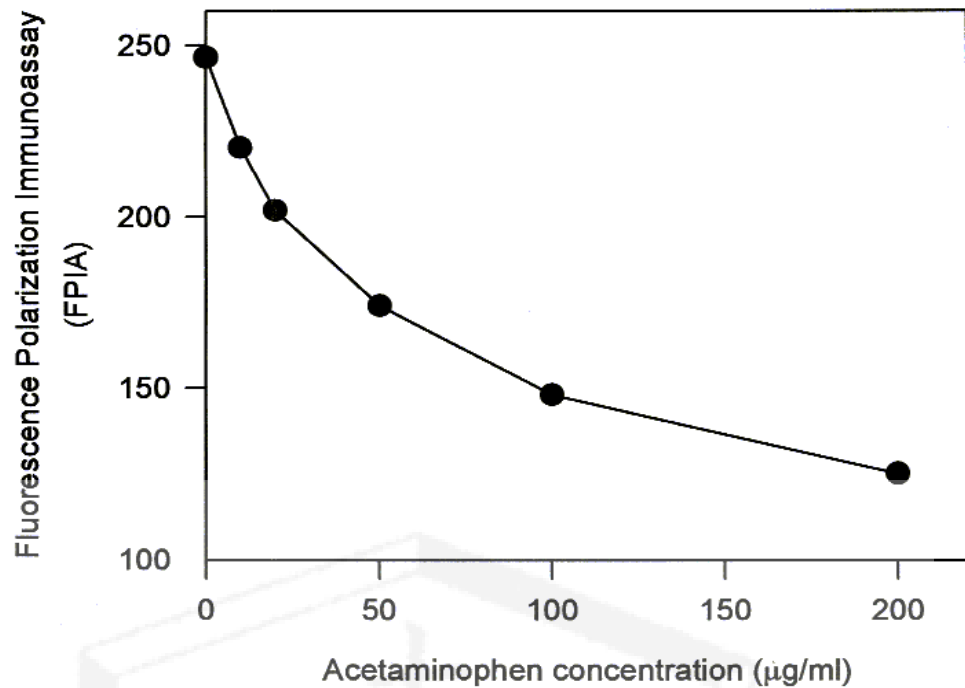


Figure 2. Calibration curve for the TDx analysis of acetaminophen.

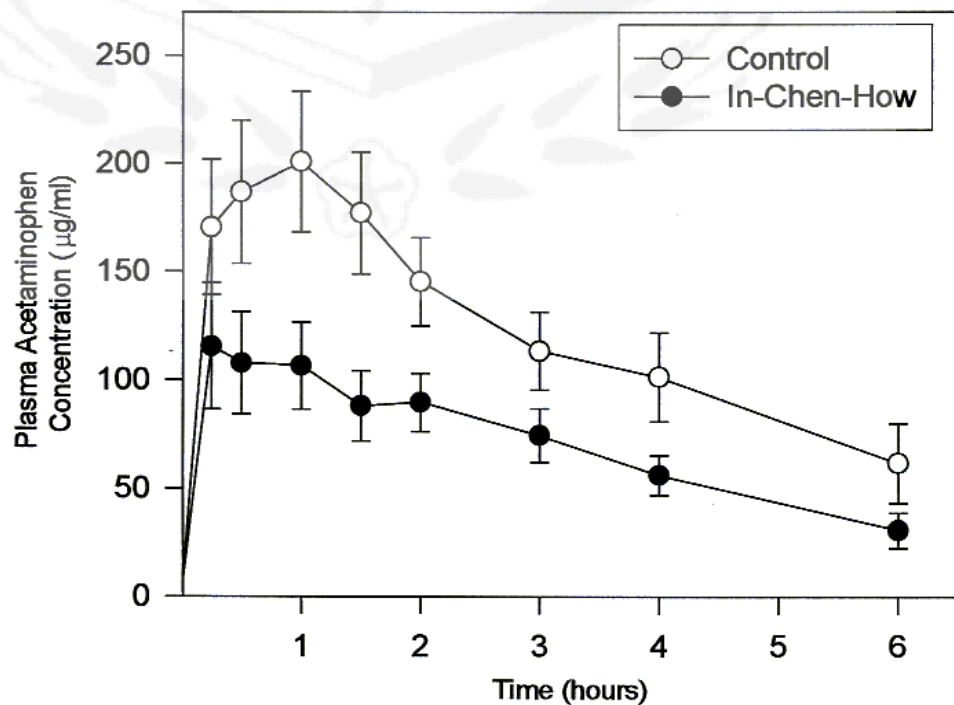


Figure 3. TDx analysis of plasma concentrations of Acetaminophen after the oral administration 500mg. -- Rat had been pretreated with In-Chen-How for 7 days before administration of acetaminophen. Data represent mean $\pm$ SEM of eight 2-month-old rats.

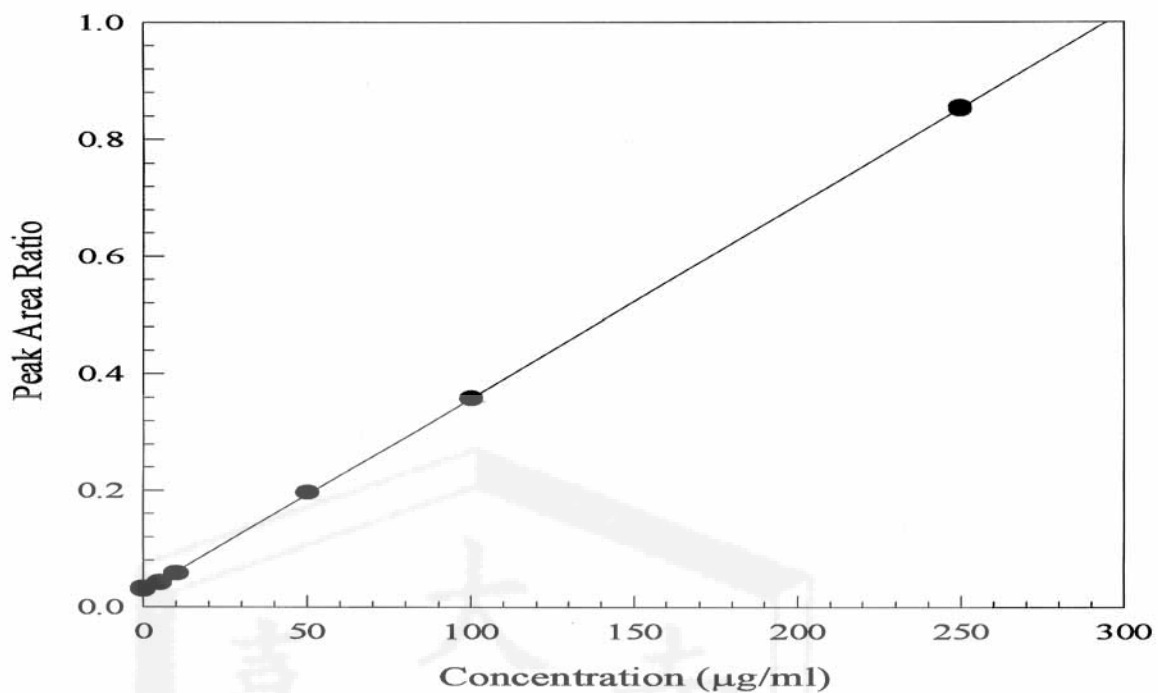


Figure 4 Calibration curve for the HPLC analysis of acetaminophen in rat plasma

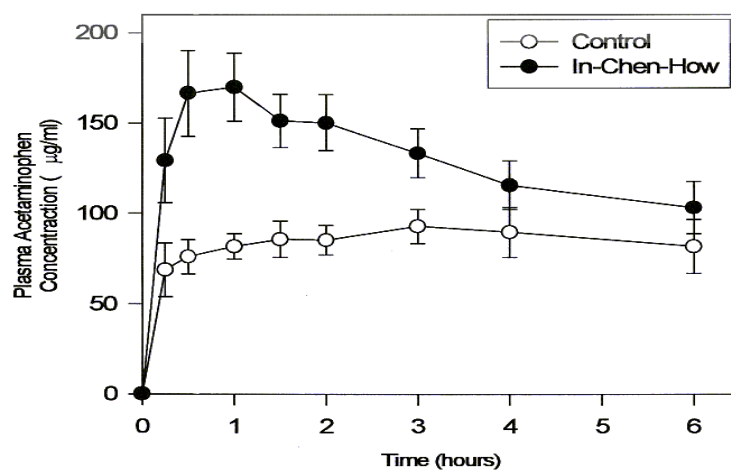


Figure 5. HPLC analysis of plasma concentrations of Acetaminophen after the oral administration 500mg. -●- Rat had been pretreated with In-Chen-How for 7 days before administration of acetaminophen. Data represent mean±SEM of eight 12-month-old rats.

討論

本實驗室之先前研究「茵陳蒿」對「乙醯胺基酚」的影響時，發現茵陳蒿對乙醯胺基酚所誘發的急性肝臟壞死之毒性作用不但無保護作用反而有加速惡化的現象：如死亡率增高；血清中 alanine aminotransferase (ALT) 及 aspartate aminotransferase (AST) 更上昇；加重肝組織壞死的程度等，且實驗結果指出預先服用茵陳蒿後，更會嚴重增強乙醯胺基酚對麩胱甘肽至近乎完全排空的程度 (Yang *et al.*, 1998)。本研究旨在探討其作用機轉。乙醯胺基酚導致肝細胞壞死之機轉早已被證實為其代謝過程中經細胞色素 P450 (cytochrome P450, 簡稱 CYP) 代謝產生具有強度親核性的代謝中間產物 NAPQI (n-acetyl-p-benzoquinoneimine)，此代謝中間產物能迅速與麩胱甘肽 (glutathione) 產生共價結合，甚至使得肝細胞內貯存的麩胱甘肽完全排空，更進一步與肝細胞內之巨分子結合，而使細胞壞死。為了瞭解茵陳蒿是否促進乙醯胺基酚在肝臟的代謝作用而加速 NAPQI 的形成，因此利用西方點墨法 (Western blotting) 分析服用茵陳蒿前後 CYP 酵素蛋白量之變化，另外以螢光偏極化免疫分析法 (TDx) 及高壓液相層析法 (HPLC) 分析服用茵陳蒿後對乙醯胺基酚藥動學的影響。由於另有報導指出乙醯胺基酚的代謝會隨著年齡的不同而有所改變。為了瞭解高、低齡族群服用茵陳蒿後對乙醯胺基酚藥動學方面的影響，本研究另以 HPLC 的方法分析比較年輕老鼠 (2 個月大) 及年老老鼠 (12 個月大) 之間的差異。

由本研究結果發現，連續餵食年青大白鼠七天茵陳蒿後，肝微粒體中 CYP1A2 及 CYP2E1 之蛋白表現量皆上昇，同時由血中動力學參數顯示，茵陳蒿能使乙醯胺基酚之代謝加快，達到最高血中濃度時間 (T_{max}) 由 1 小時降至 0.25 小時，平均最高血中濃度 (C_{max}) 由 200.6 $\mu\text{g/ml}$ 降至 115.6 $\mu\text{g/ml}$ ；然而對年老大鼠反而能顯著提升其最高血中濃度。由以上結果顯示，茵陳蒿能經由提高肝微粒體中 CYP1A2 及 CYP2E1 之蛋白表現而加速乙醯胺基酚之代謝，增加活性之代謝中間體，進而使肝臟之 glutathione 被耗盡，最後導致肝細胞壞死。

參考文獻

- Alvares, A. P. and Mannering, G. J. (1970). Two substrate kinetics of drug metabolizing enzyme systems of hepatic microsomes. *Mol. Pharmacol.* 6: 206-212.
- Arker, J. D., de Carle, D. J. and Anuras, S. (1977). Chronic excessive acetaminophen use and liver damage. *Annu. Intern. Med.* 87: 299-301.
- Bonkowsky, H. L., Mudge, G. H. and McMurtry, R. L. (1978). Chronic hepatic inflammation and fibrosis due to low doses of paracetamol. *Lancet* 1: 1016-1018.
- Corcoran, G. B., Mitchell, J. R., Vaishnav, Y. N. and Horning, E. C. (1980). Evidence that acetaminophen and N-hydroxyacetaminophen form a common acylating intermediate, N-acetyl-p-benzoquinoneimine. *Mol. Pharmacol.* 18: 536-542.
- Kitagawa, I., Fukuda, Y., Yoshihara, M., Yamahara, J. and Yoshikawa, M. (1983). Capillartemisin A and B, two new choleretic principles from *Artemisiae capillaris herba*. *Chem. Pharm. Bull.* 31: 352-355.
- Komiya, T., Tsukui, M. and Oshio, H. (1976). Studies on "Inchinko." I. Capillarisin, a new choleretic substance. *Yakugaku Zasshi.* 96: 841-854.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.
- Lin, S. Y., Hou, S. J., Perng, R. I., Chen, S. M. and Young, T. K. (1992). Effect of traditional Chinese herbal medicines on the pharmacokinetics of western drugs in Sprague-Dawley rats of different ages (H): Aminophylline-Huan Shao Tan and Aminophylline -Pu Chung Yi Chi Tang. *Mechan. Ageing and Develop.* 66: 99-106.
- Lin, S. Y., Jou, S. J., Wu, W. H., Chen, S. M. and Young, T. K. (1991). Effect of traditional Chinese herbal medicines on the pharmacokinetics of western drugs in SD rats of different ages. I. Aminophylline-Tin chuan Tang and Aminophylline -Hsiao Ching Long Tang. *J. Pharmacobio-Dyn.* 14: 201-206.
- Mitchell, J. R., Thorgeirsson, S. S., Potter, W. Z., Jollow, D. J. and Keiser, H. (1974). Acetaminophen-induced hepatic injury: Protective role of

- glutathione in man and rationale for therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 16: 676-684.
- Mizuno, M., Iinuma, M., Yasuda, K. and Kawada, I. (1988). Combined effect of Chinese medicine and western drug. *Ann. Proc. Gifu Pharm. Univ. (Japan)* 37: 18-28.
- Moldeus, P. (1978). Paracetamol metabolism and toxicity in isolated hepatocytes from rat and mouse. *Biochem. Pharmacol.* 27: 2859-2863.
- Nogen, A. G. and Bremner, J. E. (1978). Fetal acetaminophen overdosage in a young child. *J. Pediatr.* 92: 832-833.
- Okuno, I., Uchida, K., Nakamura, M. and Sakurawi, K. (1988). Studies on choleretic constituents in *Artemisia capillaris* Thunb. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 769-775.
- Prescott, L. F. (1984). Drug conjugation in clinical toxicology. *Biochem. Soc. Trans.* 12: 96-99.
- Rikans, L. E. (1989). Influence of aging on chemically induced hepatotoxicity: role of age-related changes in metabolism. *Drug Met. Rev.* 20: 87-110.
- Rollins, D. E., Bahr, C. V., Glaumann, H., Moldeus, P. and Rane, A. (1979) Acetaminophen: Potentially toxic metabolite formed by human fetal and adult liver microsomes and isolated fetal liver cells. *Science*, 205: 1414-1416.
- Rumore, M. M. and Blaiklock, R. G. (1992). Influence of age-dependent pharmacokinetics and metabolism on acetaminophen hepatotoxicity. *J. Pharm. Sci.* 81: 203-207.
- Tanaka, E. (1988). *In vivo* age-related changes in hepatic drug-oxidizing capacity in humans. *J. Clin. Pharm. Ther.* 23: 247-255.
- Tani, T. (1989). The Chinese herbal medicines to prevent the side effects of western drugs. *Medicine Drug J. (Japan)* 25: 1987-1993.
- Tarloff, J. B., Goldstein, R. S., Sozio, R. S. and Hook, J. B. (1991). Hepatic and renal conjugation (Phase II) enzyme activities in young adult, middle-aged, and senescent male Sprague-Dawley rats. *Exp. Bio. Med.* 197: 297-303.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of

proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.

Yang, J. M., Hung, S. C. and Lin, J. K. (1998). Studies on the interactions between traditional "Chinese medicine" and modern "Western drugs" . I. Influence of "In-Chen-How" (*Artemisia capillaris Thunb.*) on the hepatotoxicity of acetaminophen. *Chin Nan Annual Bulletin* 24: 150-163.

Yamahara, J., Matsuda, H., Sawada, T., Mibu, H. and Fujimura, H. (1982). Biologically active principles of crude drugs. Pharmacological evaluation of *Artemisiae capillaris* Flos. (1). *Yakugaku Zasshi*. 102: 285-291.

