

牛樟芝成分Antroquinonol的抗癌作用研究

◎ 顧記華

根據民國行政院衛生署公佈去年的數據顯示，惡性腫瘤再度蟬聯國人十大死因的第一名，其中肺癌與肝癌依舊佔最主要的部份。一般來說，肝癌細胞相較於其他的癌細胞，對於現有抗癌藥物的感受性都較差，臨床上到目前為止還沒有有效針對肝癌的抗癌藥物。由於生活環境、種族及飲食習慣的不同，肝癌在國外的發生機率較小，所以對其研究以及重視程度也較少，而相較於這個本土化的癌症，我們更應該加以重視。

牛樟芝又稱為牛樟菇，是一種木材腐朽真菌，屬於非褶菌目、多孔科、多年生蕈菌類，學名為*Antrodia camphorata*，只生長在台灣本土的老齡牛樟樹*Cinnamomum kanehirai* Hay上，為台灣國寶級的珍貴藥用真菌，經常被應用於養生保健上。本研究中所用的Antroquinonol屬於ubiquinone類的化合物，是從牛樟芝的發酵菌絲體所分離得到，我們將針對其在肝癌細胞的作用作一深入研究。AMPK與mTOR這兩個serine/threonine蛋白酶於細胞中分別參與調控胞內能量之恒定與蛋白質的轉譯，本研究發現這兩個酵素在Antroquinonol抗肝癌細胞的作用機轉中，扮演了重要的角色。我們利用Antroquinonol在多種肝癌細胞株以及人類肝臟胚胎細胞WRL-68中進行抑制細胞生長的活性測試，結果顯示，Antroquinonol對於肝癌細胞與正常細胞有不錯的選擇性，於HepG2肝癌細胞中展現出最好的抑制細胞生長活性，對於多種肝癌細胞的作用活性關係為：HepG2> HepG2.2.15>Mahlavu> PLC/PRF/5>SK-Hep1>WRL-68。更進一步的研究發現，Antroquinonol明顯的引發細胞週期停滯於G1期，在沒有影響mRNA表現的情況下造成多種調控G1期的細胞週期調控因子表現下降。進一步探討其原因，發現主要是藉由抑制胞內蛋白轉

譯而非影響DNA轉錄與蛋白質降解機制而來。Antroquinonol在短時間可以明顯的抑制p70^{S6K}（Thr⁴²¹、Ser⁴²⁴與Thr³⁸⁹）與4E-BP1（Thr³⁷、Thr⁴⁶與Thr⁷⁰）的磷酸化，進而阻斷蛋白質合成。TSC1與TSC2間的結合也在Antroquinonol處理下有增加的現象。這些現象在併用AMPK抑制劑後，都可得到回復，推測AMPK在Antroquinonol所引起的作用中扮演了重要的角色。此外，粒線體的破裂與膜電位喪失也提供了AMPK活化的可能原因。簡單來說，Antroquinonol利用活化AMPK導致胞內蛋白質生成途徑的抑制，進而抑制細胞週期的進行，並從而產生抗癌效果。

註：本論文摘自臺大藥學研究所博士班研究生江柏政同學（顧記華老師實驗室）之博士論文，本文已於今年八月被Biochemical Pharmacology期刊所接受。

從混沌中發現真理——淺談使用健保資料庫執行藥物流行病學研究

◎ 臨床所碩二 吳怡霆

依稀記得念小學時有一堂自然科學課的實驗，自然老師將一盤看起來又黑又髒的砂子灑在塑膠盤上，調皮的同學們對眼前這一盤散沙似乎不屑一顧，不過當老師拿著磁鐵放在盤子下面時，只見原本雜亂無章的砂子巧妙的移動、恰如其分的安插在自己的位置，一幅規律的圖案呈現在大家的面前，描繪出磁力線的軌跡，讓大家直呼不可思議……

我是一位臨床藥學所碩士班學生，在臨床藥學所的第二年，我選擇了以健保資料庫執行一項藥物流行病學研究作為碩士論文。在龐大的健保資料庫中，必須從數千萬筆申報記錄中去蕪存菁，透過邏輯性的方法設計，試圖利用各種統計模型去檢定自己的假設。這幾個月來的心路歷程讓我不禁聯想到這個小學時代的回憶，在看似亂無章法的系統中，只要施以特別的外力，或許就可以發現某種規律性，兩者似乎有異曲同工之妙。其實以這種大規模資料庫執行的觀察性研究已行之有年，在學術界也發展出一套可靠的方法學，其研究結果在臨床上也有獨特的價值和地位。但是身為一位剛接觸這個領域的藥學研究生，我想用“菜鳥”的觀點切入，分享一下自己的經驗。

過去對於藥品在人體上的各種使用資訊，一般認為最可靠的證據就是臨床(人體)試驗，而且最好是多國多中心、隨機分配、雙盲、有控制組的試驗。因為經由嚴格的控制、受試者篩選、試驗設計等，可以消除許多干擾因子而真正解答我們想要知道的問題，例如『這個新藥比起舊的藥品是否真的比較有效？』或者『這個新藥是否對於這個疾病真的有療效且安全？』。因為試驗是針對問題而設計，並且只控制我們欲觀察的變因(如有用藥vs.沒用藥、新藥vs.舊藥)，因此對於

新藥上市時是不可或缺的證據力。然而它的優點卻反而成了自己先天上的束縛，第一就是臨床試驗的時間較短，藥品長期使用造成的影響通常無法被觀察到；第二是臨床試驗受試者人數少，畢竟要收納受試者做人體試驗所費不貲，通常數千人就算是可觀的人數了，因此無法觀察到發生率較低的藥物副作用；第三是臨床試驗為了消除其他干擾因素，受試者經過高度篩選，對於年齡、性別、種族、生理狀況都有特定限制才能納入，然而在藥物上市後使用的族群卻是充滿變異的，可能發生無法預期的不良反應；第四是藥品臨床試驗設計通常是針對特定適應症觀察其效果，以確立其上市後的市場地位，因此無法由臨床試驗得知藥物使用在其他適應症的經驗。基於臨床試驗的先天限制，為了增進藥物使用的安全，在藥品上市後繼續收集使用經驗也是重要的工作。事實上，各國法規單位通常會要求廠商必須進行藥品上市後監視 (post-marketing surveillance)。美國FDA於1997年公布之FDA現代化法案 (FDA Modernization Act, FDAMA) 規範有執行藥品上市後監視的廠商每年根據其研究提出報告，而FDA參考這些數據為藥品加註警語或其他重要訊息以增進藥品使用的安全性。而我國也於2004年通過藥物安全監視管理辦法，明訂廠商應於新藥取得上市許可後五年內，收集國內、國外的藥物安全資訊，合併藥物不良反應通報匯集成藥物安全報告通報衛生署。這些藥品上市後的使用資料被收集後建構成大型的資料庫，因此研究者可以利用這些資料庫去設計所謂的觀察性研究，由於這些研究的執行是利用既有的資料，因此不像臨床試驗可以在實驗前設定諸多限制條件，但由於是藥品在實際臨床環境下的使用資料，而使用人數更遠多於臨床試驗的受試者人數，因此較可以

真實反映出實際使用時的狀況，而且隨著時間累積，可以觀察到一些長期的效果。簡言之，臨床試驗的結果是在最理想的狀態下所測試出來的，就像是汽車開發時在實驗室所執行的各種測試，如風洞測試、氣體流體力學、撞擊測試等，實驗室的環境包括路面、溫度、空氣、撞擊角度及力道都在精密控制之下。而觀察性研究，則像是在觀察汽車真正上路時所遭遇的各種地形、氣候、道路交通狀況時的反應。而如果一輛車因為引擎設計瑕疵而在行駛五年後通常會發生異常，在實驗室中就無法觀察到，但卻可以在上市後的使用經驗被大家察覺。藥物的發展模式其實也是類似的。

而我國全民健保自開辦以來已超過十年，累積了大量的醫療申報資料，因此健保局委託國衛院發行製作全民健康保險資料庫，供研究者執行各種研究。而我的研究使用的是2005年的一百萬人承保人歸人檔，也就是由2005年的承保人中隨機抽樣一百萬人，對照內政部的人口資料確定沒有太大誤差後再擷取這一百萬人各年的醫療申報資料製成。剛開始聽到一百萬人大概還不以為意，畢竟對目前電腦的運算能力來說一百萬只是個渺小的數字，但當我們購買的兩大箱光碟片送進實驗室時，才發現渺小的其實是自己。光是門診和住院的申報資料，就必須耗用一兩百GB的硬碟空間，我們特地準備了一顆600GB的硬碟來存放這些資料。因此要利用這種大樣本的資料執行研究，硬體需求也是相當高的。接著這些龐大的資料的處理都必須利用統計軟體，因此學會使用統計軟體也是必要的生存之道。我們是利用SAS這套軟體來進行，對藥學背景的學生來說，統計學雖然不陌生，但是撰寫程式卻不是一蹴可幾的事。因此我們還參加了校總區計算機中心開的SAS課程。然而這些僅是材料和工具而已，對觀察性研究來說，最重要的精髓是研究方法的設計，一旦方法設計不當，便會產生許多偏差，嚴重時可能整個研究就失去了臨床意義而變得一文不值。

在我的經驗中，最讓人絞盡腦汁的事莫過

於將研究設計套用到資料庫上，該如何篩選資料才能符合設計的需求。往往每個看似簡單的問題都需要深謀熟慮。例如某研究要篩選糖尿病的新診斷病患，所謂的新診斷如何定義呢？健保資料庫雖然每筆申報資料都有診斷碼的欄位，但門診資料只有三欄、住院資料只有五欄，因此像糖尿病這類慢性病不一定會在病人每次就醫時都登記到。往往要用診斷碼再搭配藥物開方記錄來確認其罹病的時間。又例如要觀察某疾病使用A類藥品與B類藥品在併發症上是否有差異。如果是臨床試驗，一開始收納病人後便可以隨機分配到兩組，並且給予兩組受試者不同的藥物。然而資料庫研究就沒辦法這麼做了，如果以整段時間內使用藥品的記錄來看，有人或許兩種藥品均有可能暴露到。因此只能收集研究期間內所有資料，把從頭到尾都未暴露到這個藥的人獨立出來當作對照組。以上雖然只是簡單的描述這些過程，但要利用SAS程式碼來執行這些動作還必須了解每一個指令的邏輯，否則便會產生許多無法察覺的謬誤。另外資料庫中也許很多和一般認知不同的小瑕疵，甚至有錯誤的資料。例如2000年的申報檔案竟然夾雜著就醫日期在1999年或2001年的資料。而也有同學發現就醫日期很詭異的記錄，例如1920、2060年等，也有人每次就醫時登記的生日或性別不一致。另外還會有慢性病處方箋和處方箋釋出的問題，由於病人可以自行去特約藥局領藥，因此在藥品記錄的欄位如處方天數、給藥頻率等往往出現很多缺漏值而格式也千奇百怪，這時候就要輸出到excel報表中，以人工的方式自行校正，想想一次要看幾千甚至幾萬筆的excel資料，做完這研究眼鏡的度數大概又加深了吧，真是讓人不堪回首的回憶。

對我來說，剛接觸資料庫的回溯性研究，遇到以上種種困難會覺得匪夷所思，這些充滿問題的數據到底能夠提供甚麼資訊？如果能像臨床試驗一樣只控制我們想看的變因不就單純許多了嗎？但就如同前面提到，這雖是臨床試驗優越的地方但卻也是它的原罪。而隨著文獻的回顧才發現其實有不少議題的確是必須透過大型資料庫的

研究才能讓我們一窺其全貌。像是某些中樞神經藥物是否會造成病患在多年後發生其他神經、精神疾患？又或者前幾年鬧得沸沸揚揚的COX2專一性非類固醇消炎止痛藥長期使用是否會增加中風的風險。這些問題在臨床試驗中可能都無法觀察到，一旦上市後隨著使用人數增加、使用族群擴大、使用時間增長就漸漸出現一些案例報告，也引起大家的關注。因此透過樣本數大、資料時間長的觀察性研究或許就可以提供一些資訊。只是剛開始自己常常陷入迷思，覺得資料庫使用起來必須如履薄冰，如果心思不夠縝密便會犯下許多錯誤，而且還有許多無法解決的限制，像是病人的菸酒習慣、器官功能等臨床資料根本不得而知。但事情總是有一體的兩面，證嚴法師也曾說，如果換一個角度看有缺口的杯子，它仍然是圓的。如果能夠謹慎利用，盡可能縮小這些限制的影響，並且正確解讀得到的結果，那麼資料庫

的確能發揮其價值，而且達成臨床試驗無法達到的境界。

因此以資料庫進行研究便是這樣一種處處充滿驚奇的活動。在大量的資料中，任何不可思議的狀況都有可能出現，而且原因也讓人匪夷所思。研究的過程必須利用各種方法，排除萬難從中得出結論，有人用了一個很傳神的詞，將之稱為data mining，整個過程的確就像是從一座看似荒蕪的礦山中採取、精煉出彌足珍貴的寶藏。資料庫數量龐大而且又是從臨床環境使用的狀況中所記錄下來，真實世界不就是這樣不遵循常態、充滿高度變異，所以才讓人著迷啊。四散的鐵砂在其他金屬旁並不會有動靜，但只要磁鐵一靠近便乖巧的排列出漂亮的圖形。就像雖然身處在變化多端、紊亂如麻的混沌中，但是只要用正確的方法，或許從混沌中也能尋找出真理。