

· 综述 ·

O-葡萄糖醛酸苷的生物合成研究进展

王梅玲¹, 夏杨柳², 杨梦丽¹, 吴大畅¹, 刘丽坤¹, 葛广波², 杨凌², 侯洁^{1*}

1. 大连医科大学 生物技术系, 辽宁 大连 116044

2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023

摘要: 葡萄糖醛酸结合反应是机体内重要的一类代谢反应, 其中 O-葡萄糖醛酸结合是最常见的反应类型。O-葡萄糖醛酸苷的制备对于准确评估葡萄糖醛酸代谢产物的药理活性及安全性、药物代谢和药动学定量分析等研究至关重要。利用尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 生物合成目标代谢物是制备葡萄糖醛酸苷的重要手段之一。综述了近年来利用生物转化技术制备 O-葡萄糖醛酸苷的研究进展, 包括利用植物、微生物、动物来源及人重组 UGT 酶等不同方法制备 O-葡萄糖醛酸苷的最新进展, 同时还综述了近年来国内外通过对生物反应体系和转化工艺的改进与优化, 实现葡萄糖醛酸苷高效制备的相关技术和工艺特点。

关键词: O-葡萄糖醛酸苷; 葡萄糖醛酸转移酶; 植物生物合成; 动物 UGT 酶; 微生物发酵

中图分类号: O629.13; Q819 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)07-1065-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.07.023

Advances in study on biosynthesis of O-glucuronides

WANG Mei-ling¹, XIA Yang-liu², YANG Meng-li¹, WU Da-chang¹, LIU Li-kun¹, GE Guang-bo², YANG Ling², HOU Jie¹

1. Department of Biotechnology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China

2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

Abstract: Glucuronidation is one of the most important metabolic reactions *in vivo*, while O-glucuronidation is the major reaction type. The synthesis of O-glucuronides is very helpful for the further studies on the evaluation of biological activity and safety of O-glucuronides, as well as drug metabolism and pharmacokinetic studies. The enzymatic catalysis process using UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) is the major method for O-glucuronides biosynthesis. This review summarized the recent progress in enzymatic preparation of O-glucuronides by using different enzyme sources including plants, microorganisms, animals, and recombinant human UGTs. Furthermore, this review also summarized several new techniques to improve the efficacy for biosynthesis of O-glucuronides.

Key words: O-glucuronides; UDP-glucuronosyltransferase; plant biosynthesis; animal UGT; microbial fermentation

葡萄糖醛酸结合反应是一种重要的 II 相代谢清除途径, 负责多种外源和内源性化合物的代谢清除^[1-4]。葡萄糖醛酸结合反应在多种药物及其氧化代谢产物、环境毒物、内源性激素、胆酸和胆红素的代谢清除中发挥着重要作用。此类反应中, 葡萄糖醛酸转移酶 (UDP-glucuronosyltransferase, UGT, EC2.4.1.17)

将葡萄糖醛酸从尿苷二磷酸 (UDP) 葡萄糖醛酸 (UDPGA) 转移到底物的亲核基团上, 生成相应的葡萄糖醛酸苷产物 (图 1)^[3]。UGT 酶介导的葡萄糖醛酸结合反应类型依照葡萄糖醛酸受体的不同可分为 O-葡萄糖醛酸化、N-葡萄糖醛酸化、S-葡萄糖醛酸化和 C-葡萄糖醛酸化四大类。其中 O-葡萄糖醛酸化是

收稿日期: 2014-07-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81273590, 81302793); “973” 计划 (2013CB531800); 辽宁省教育厅科研项目 (L2013345); 辽宁省科技厅自然科学基金 (2013023049); 辽宁省大学生创新创业计划项目 (201310161046)

作者简介: 王梅玲 (1990—), 女, 本科生, 研究方向为生物转化。Tel: (0411)86110351 E-mail: 643339693@qq.com

*通信作者 侯洁, 副教授, 从事靶向抗肿瘤药物研究及药物代谢研究。Tel: (0411)86110321 E-mail: houjie@nankai.edu.cn

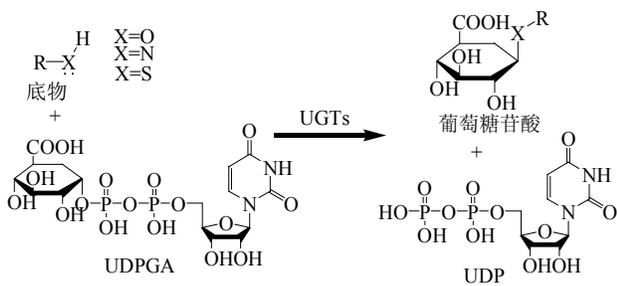


图 1 UGT 酶介导的葡萄糖醛酸化反应

Fig. 1 UGT mediated glucuronidation process

最常见的反应类型，还可依据底物类别的不同分为醇羟基、酚羟基、羧基的 *O*-葡萄糖醛酸化。

UGT 是一个蛋白质超家族，在动物体内主要分布于肝脏、肠道、肾脏等组织的细胞内质网上。人体内的 UGT 主要包括 UGT1 和 UGT2 两大家族，目前已报道的亚型有 19 个 (UGT1A1、1A3、1A4、1A5、1A6、1A7、1A8、1A9、1A10、2A1、2A2、2A3、2B4、2B7、2B10、2B11、2B15、2B17、2B28) [4]。

据统计，UGT 参与了 40%~70% 的临床药物及其 1 相代谢产物的体内代谢，其中绝大部分临床用药的葡萄糖醛酸结合代谢由 UGT1A1、1A4、1A9 和 2B7 参与完成。除此之外，UGT 还参与了大量中药活性成分 (如黄酮类、香豆素类、儿茶酚类及生物碱类)，非药外源性物质 (如啤酒中的黄腐酚等食品化学成分、尼古丁等环境毒物)，以及内源性物质 (如胆红素、胆汁酸、羟甾类激素等) 等结构多样性化合物的体内代谢。

多数底物经 UGT 代谢后，在机体内转变为相应的葡萄糖醛酸结合物 (表 1)，值得注意的是，一些葡萄糖醛酸代谢产物较底物具有更强的药理活性，例如麻醉剂吗啡，在 UGT2B7 的催化下能够发生 6-*O*-和 3-*O*-葡萄糖醛酸结合代谢，其中 6-*O*-葡萄糖醛酸结合物的麻醉效果是吗啡的 100 倍 [5]，而 3-*O*-葡萄糖醛酸结合物却具有中枢兴奋作用。降胆固醇药 S-8921，其葡萄糖醛酸结合物的药效活性是原型药物的 6 000 倍 [6]。

表 1 具有活性的 *O*-葡萄糖醛酸苷代谢产物

Table 1 Active metabolites of *O*-glucuronides

序号	底物	葡萄糖醛酸代谢产物	药理作用
1	吗啡 (morphine) [5]	吗啡-6- <i>O</i> -葡萄糖醛酸 (morphine-6- <i>O</i> -glucuronide)	镇痛作用强于吗啡
2	S-8921 [6]	S-8921- <i>O</i> -glucuronide	表皮钠依赖性胆汁酸转运体抑制剂
3	布诺啡 (buprenorphine) [7]	布诺啡-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸 (buprenorphine-3- <i>O</i> -glucuronide)	与人阿片受体及痛敏肽受体的亲和力更强，同时镇痛作用增强
4	表儿茶素 (epicatechin) [8]	表儿茶素-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸 (epicatechin-3- <i>O</i> -glucuronide)	缓解过氧亚硝基引起的氧化损伤
5	橙皮素 (hesperetin) [9]	橙皮素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸 (hesperetin-7- <i>O</i> -glucuronide)	降血压、血管舒张、抗炎
6	槲皮素 (quercetin) [10]	槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸 (quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide)	抑制脂质过氧化作用，改善阿尔茨海默病类型的海马结构基础突触传递和长时程增强缺陷
7	3-demethylthiocolchicine [11]	3-demethylthiocolchicine- <i>O</i> -glucuronide	肌肉松弛作用

近年来随着对药物代谢及药物代谢产物的深入研究，国内外新药研发人员对 *O*-葡萄糖醛酸苷的药理活性、安全性及成药特征等研究更加重视。但上述研究一直受限于 *O*-葡萄糖醛酸苷的规模化制备，如何高效制备 *O*-葡萄糖醛酸苷已成为新药研发领域面临的一大难题。虽然在特定催化剂的作用下可采用化学合成手段将葡萄糖醛酸供体和不同受体相连接并合成相应的 *O*-葡萄糖醛酸苷，如经典的柯尼希斯-克诺尔反应 (Koenigs-Knorr reaction)，使用溴苄作为葡萄糖酸的给体，在银盐 (Ag₂O、AgClO₄、

Ag₂CO₃)、Hg(CN)₂、CdCO₃ 等催化剂催化下合成 *O*-葡萄糖醛酸苷 [12]。然而化学合成通常反应条件较为苛刻，且需要多步保护和脱保护，目标物的总产率普遍不高，中间体和目标物的后处理步骤往往繁琐，在制备成本及合成效率上都无法令人满意 [13-14]。利用生物方法制备 *O*-葡萄糖醛酸苷具有转化效率高、选择性高、工艺条件简单、温和、副产物少、产物后处理易操作等优点，在近年来日益受到青睐。本文就近年来利用不同酶源制备 *O*-葡萄糖醛酸苷的研究进展进行简要综述，原理如图 2 所示。

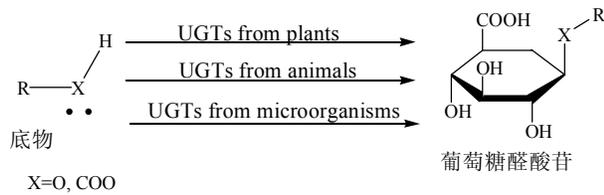


图 2 生物制备 *O*-葡萄糖醛酸苷

Fig. 2 Biosynthesis of *O*-glucuronides

1 植物 UGT 生物合成 *O*-葡萄糖醛酸苷

许多植物细胞中都分布有 UGT，其通常参与催化植物次生代谢的最后一步，即将葡萄糖醛酸糖基从供体 UDPGA 上转移至底物（如黄酮）的酚羟基上。*O*-葡萄糖醛酸化使植物的次生代谢产物具有

更好的溶解度和化学稳定性，同时表现出更低的毒性，以便于其在细胞内的储存和累积。植物中的 UGT 分布广泛，仅拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 中就发现了 107 个 UGT 的编码基因^[15]。植物中广泛存在的 UGT 也造就了形形色色的天然 *O*-葡萄糖醛酸苷化合物，如黄酮类、三萜类的 *O*-葡萄糖醛酸苷在多种高等植物中大量存在且在植物组织中的量较为丰富。这些 *O*-葡萄糖醛酸苷作为植物体内广泛存在的次生代谢产物（图 3 和表 2），不仅可抵御病原菌对植物的侵入，还参与植物内源性激素的代谢平衡，进而对植物的生理生态功能发挥着重要调节作用。

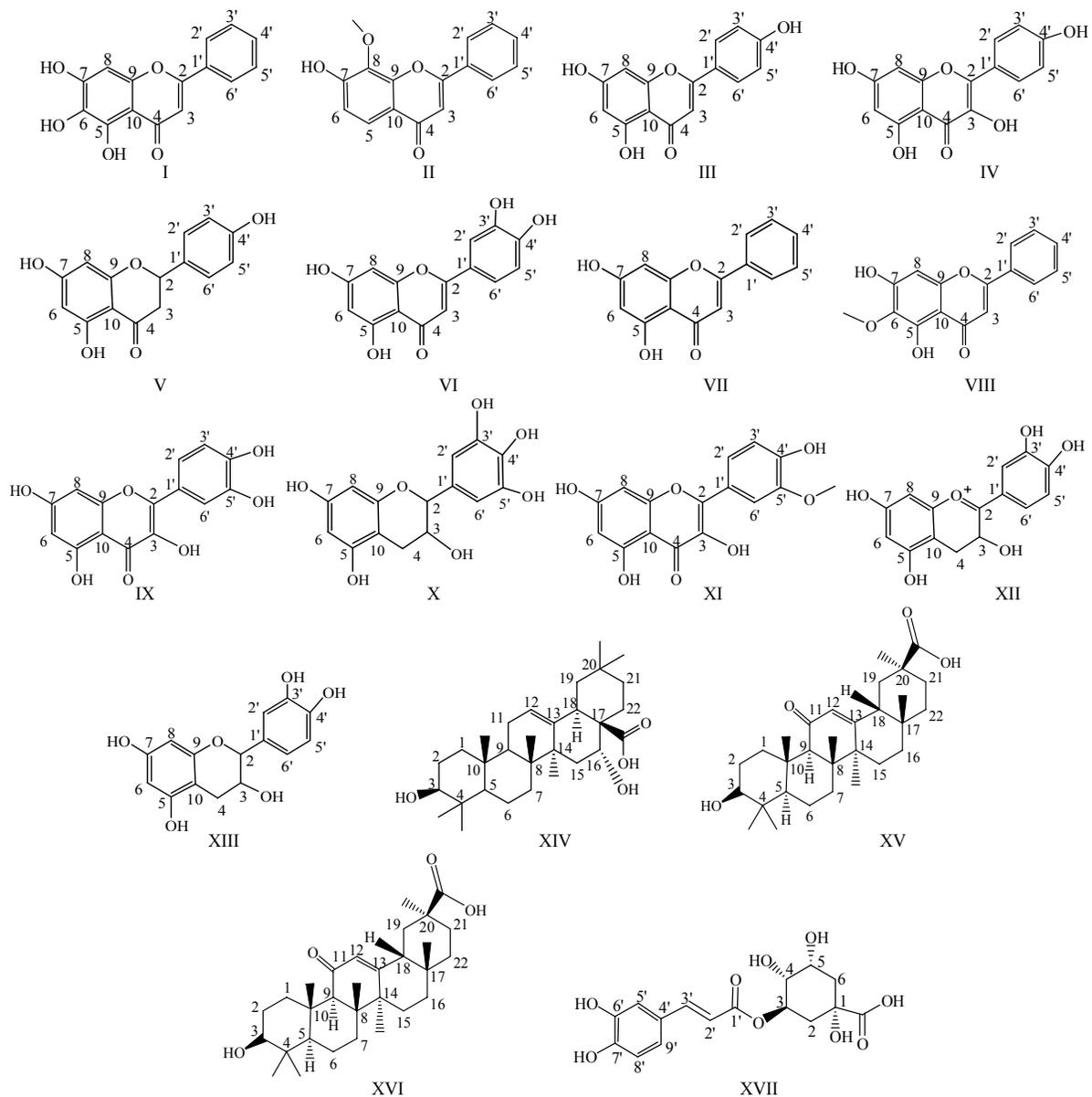


图 3 植物来源的 *O*-葡萄糖醛酸苷元

Fig. 3 Aglycone of *O*-glucuronides from plants

表 2 植物来源的 *O*-葡萄糖醛酸苷
Table 2 *O*-Glucuronides from plants

序号	苷元	葡萄糖醛酸苷名称	葡萄糖醛酸化位置	来源
1	I	黄芩素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (baicalein-7- <i>O</i> -glucuronide) [16-17]	7- <i>O</i> -G	黄芩 <i>Scutellaria baicalensis</i> 根
2	II	汉黄芩素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (wogonin-7- <i>O</i> -glucuronide) [16-17]	7- <i>O</i> -G	黄芩根
3	III	芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (apigenin-7- <i>O</i> -glucuronide) [18-19]	7- <i>O</i> -G	构树 <i>Broussonetia papyrifera</i> 叶
4	IV	山柰酚-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (kaempferol-3- <i>O</i> -glucuronide) [20-21]	3- <i>O</i> -G	黑果山姜 <i>Alpinia nigra</i> 种子
5	V	柚皮素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (naringetol-7- <i>O</i> -glucuronide) [22-23]	7- <i>O</i> -G	化橘红 <i>Citri grandis</i> var. <i>tomentosa</i> 果实
6	VI	木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (luteolin-7- <i>O</i> -glucuronide) [24-25]	7- <i>O</i> -G	忍冬 <i>Lonicera japonica</i>
7	VII	白杨素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (chrysin-7- <i>O</i> -glucuronide) [26-27]	7- <i>O</i> -G	狭叶黄芩 <i>Scutellaria regeliana</i> var. <i>regeliana</i>
8	VIII	千层纸素 A-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (oroxylinA-7- <i>O</i> -glucuronide) [28-29]	7- <i>O</i> -G	木蝴蝶 <i>Oroxylum indicum</i> 根, 黄芩根
9	IV	槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide) [30-31]	3- <i>O</i> -G	柴胡 <i>Bupleurum chinense</i>
10	X	杨梅素-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (myricetin-3- <i>O</i> -glucuronide) [32]	3- <i>O</i> -G	萹蓄 <i>Polygoni avicularis</i>
11	XI	异鼠李素-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸酯苷 (isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucuronic acid ester glycoside) [32]	3- <i>O</i> -G	萹蓄
12	XIII	(-)-表儿茶素-3'- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 [(-)-epicatechin-3'- <i>O</i> -glucuronide] [33]	3'- <i>O</i> -G	文冠果 <i>Xanthoceras sorbifolia</i>
13	XIV	刺囊酸-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (echinocystic acid-3- <i>O</i> -glucuronide) [34]	3- <i>O</i> -G	墨旱莲 <i>Eclipta prostrata</i>
14	XV	齐墩果酸-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (oleanolic acid-3- <i>O</i> -glucuronide) [35-36]	3- <i>O</i> -G	油橄榄 <i>Olea europaea</i> 叶
15	XVI	甘草酸 (glycyrrhizic acid) [37-38]	3- <i>O</i> -G	甘草 <i>Glycyrrhiza uralensis</i>
16	XVII	绿原酸-7'- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (chlorogenic acid-7'- <i>O</i> -glucuronide) [39-40]	7'- <i>O</i> -G	杜仲 <i>Eucommia ulmoides</i> 叶

UGT 介导的 *O*-葡萄糖醛酸化使产物的理化性质完全不同于其配基 (水溶性及电负性更强), 利用理化性质上的差异可较容易地从植物提取物或植物细胞培养液中将 *O*-葡萄糖醛酸苷分离纯化, 且收率较高。因此, 借助植物次生代谢合成已成为获取目标 *O*-葡萄糖醛酸苷的一种重要方法。近年来, 随着分子生物学与结构生物学相关技术的快速发展, 许多参与黄酮类及三萜类 *O*-葡萄糖醛酸化代谢的植物 UGT 得以深入研究, 其编码基因、氨基酸序列及其晶体结构、底物选择性和催化活性特征都已被系统研究和报道^[41]。例如, 拟南芥中的 UGT73C6、UGT74F2、UGT75C1 及 UGT78D1, 以及蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn 中的 UGT71G1 对槲皮素和山柰酚等黄酮类化合物的 *O*-葡萄糖醛酸化代谢显示了良好的催化活性。此外, UGT74F2 参与了水杨酸的 *O*-葡萄糖醛酸化^[42], UGT75C1 介导了花青素的 5-*O*-葡萄糖醛酸化^[43], 而苜蓿属植物中的 UGT72L1 则参与了表儿茶酸

3'-*O*-葡萄糖醛酸化^[44]。这些研究不仅对于了解植物体内次生代谢产物的生物合成网络具有重要意义, 也对动物和人体 UGT 的结构特征、底物偏好性和催化属性等研究具有一定指导意义。

2 动物 UGT 制备 *O*-葡萄糖醛酸苷

许多药物及其 I 相代谢产物的 *O*-葡萄糖醛酸苷是经过人体 (动物) UGT 催化后产生的代谢产物, 可通过动物组织中的 UGT 催化制备获得^[45]。与植物相比, UGT 在动物组织中的分布更为广泛, 且功能与人体 UGT 更为接近。部分 UGT 同工酶在大鼠、小型猪等常用实验动物体内的表达量和功能还高于人体组织, 显示出对底物更强的催化能力。许多药物、中药活性成分及食品成分在动物和人体内有相似的代谢产物谱, 因此借助动物 UGT 制备相应的代谢产物对于新药研发意义重大。近年来, 随着体外 UGT 代谢研究的深入, 利用动物组织中分布的 UGT 及重组表达的人源 UGT 制备 *O*-葡萄糖醛酸苷已成为获取 *O*-葡萄糖醛酸苷最直接的途径。体外模

拟葡萄糖醛酸化过程需要 UDPGA 作为辅因子, 同时还需要加入特定的酶源, 通过优化反应条件可实现目标代谢物的高效制备, 部分底物的转化率和产物的收率可接近 100%。依据来源形式的不同动物 UGT 可分为以下 3 种: 1) 动物组织中分离纯化的 UGT 单酶; 2) 动物组织制备物 (主要是肝脏微粒体); 3) 重组 UGT 单酶。

2.1 UGT 的分离纯化

早期为了方便进行工业化和实验室规模制备 *O*-葡萄糖醛酸苷, 利用分离纯化得到的 UGT 单酶进行 *O*-葡萄糖醛酸反应。从 20 世纪 50 年代开始, UGT 的分离纯化得到了迅速发展。Isselbacher 等^[46]报道了从兔肝脏微粒体中将 UGT 进行部分分离纯化, 得到了具有 *p*-硝基苯酚葡萄糖醛酸化的混合酶, 但是由于 UGT 的磷脂依赖性或不稳定性, 并未得到纯化的单酶。Falany 等^[47]从小鼠肝脏中分离得到 3 种 UGT 亚型, 相对分子质量分别为 56 000、50 000 及 52 000, 这 3 种单酶分别具有对 *p*-硝基苯酚、1-萘醇及 4-甲基伞形酮的 *O*-葡萄糖醛酸化能力, 睾酮、 β -雌二醇的 17 位羟基的葡萄糖醛酸化能力, 以及 *p*-硝基苯酚、1-萘醇、雄酮和苯胆烷醇酮的葡萄糖醛酸化能力, 并首次报道分离纯化得到具有 3-OH 葡萄糖醛酸活性的 UGT 亚型。Irshaid 等^[48]将人肝溶于表面活性剂 Emulgen 911 中, 通过 UDP-Hexanolamine-Sepharose 4B 亲和色谱进行分离, 得到相对分子质量分别为 53 000 及 54 000 的 2 个人源化的 UGT, 其中相对分子质量为 53 000 的单酶具有 *p*-硝基苯酚、4-甲基伞形酮及雌三醇的葡萄糖醛酸化能力; 而相对分子质量为 54 000 的单酶只具有 *p*-硝基苯酚、4-甲基伞形酮的 *O*-葡萄糖醛酸化活性, 对雌三醇没有作用。此外, 从内质网上分离 UGT 的过程中需要使用大量表面活性剂, 如 Burchell 等^[49]使用非离子型表面活性剂 Lubrol PX 及 Falany 等^[47]使用 Emulgen 911 将内质网溶解, 然后使用阴离子交换色谱去除酶溶液的表面活性剂, 经 UDP-Hexanolamine-Sepharose 4B 亲和色谱分离提高分离效率, 进一步使用聚焦色谱或等点聚焦色谱进行纯化, 最后用 SDS-PAGE 进行定性分析。虽然单酶有利于反应产物的后续纯化, 但仍然由于 UGT 的磷脂依赖性问题, 许多 UGT 在分离纯化后活性难以保障且稳定性较差, 后续生物转化应用时也存在诸多问题。

2.2 动物组织制备物

2.2.1 肝脏微粒体 动物组织由于廉价易得, 以及

UGT 的分布和活性较高等特点, 在生物制备 *O*-葡萄糖醛酸苷的应用中备受青睐。目前, 动物肝脏微粒体是生物制备 *O*-葡萄糖醛酸苷的主要酶源。虽然 UGT 在组织如肾脏和肠道中也有表达, 但是肝脏中许多 UGT 亚型 (1A1、1A3、1A4、1A6、1A9、2B4、2B7、2B10、2B11、2B15 和 2B17) 的表达量更高, 因此常选用动物肝脏微粒体作为 *O*-葡萄糖醛酸反应的酶源。值得注意的是, UGT 各亚型的表达和功能存在显著的种属差异, 针对不同底物需筛选最优酶源并优化其反应条件以实现葡萄糖醛酸代谢物的高效生物合成。例如, 不同种属动物肝微粒体对胡黄连的 *O*-葡萄糖醛酸化能力差异表现为小鼠 > 大鼠 > 人 > 狗, 而对黄芩素 7-*O*-葡萄糖醛酸化及 6-*O*-葡萄糖醛酸化的能力均表现为小型猪 > 大鼠 > 猴 > 狗 > 人。

动物肝脏微粒体由新鲜肝脏匀浆后离心制得, 具有稳定好、与人肝微粒体催化功能 (包括代谢位点和催化效率) 相似度高、活性好且易于获得等优点。鼠肝微粒体 (RLM) 及猪肝微粒体 (PLM) 是常用的酶源。但有时直接使用动物微粒体制备目标产物的收率仍偏低, 此时可以考虑使用 UGT 的诱导剂提高 UGT 的表达水平, 进而提高肝微粒体对底物的转化效率。常用的诱导剂有氯化联苯诱导剂 (Aroclor 1254 和 3-甲基胆蒎)。表 3 中列举了用动物肝微粒体作为酶源生物合成的 *O*-葡萄糖醛酸苷。

2.2.2 固定化酶 (微粒体) 酶或微粒体的固定化有利于产物与蛋白的分离, 便于后期分离纯化, 并且固定化后可以改善酶的稳定性, 提高酶的利用效率。固定化酶的载体可选用海藻酸钠、琼脂或者以微粒体固定化人工膜 (IAM) 作为填料的液相色谱、多孔纤维膜及固相萃取柱 (SPE) 等^[57]。例如, 使用固定化狗肝微粒体的 SPE 柱可用于制备甲芬纳酸和雌二醇的 *O*-葡萄糖醛酸苷产物。使用 IAM 固定化肝微粒载体时, 其带有半透膜的反应室可以截留大于 1×10^4 的物质, 因此底物可以 6 mL/h 的速度通过反应室, 且反应可持续 20 h, 转化率可达 95%。虽然固定化酶 (微粒体) 的可重复率优于游离酶 (微粒体), 然而其活性的重现性较差, 因此增加了制备过程中的不稳定因素。

2.3 重组人源 UGT

虽然动物组织制备物可用于葡萄糖醛酸苷的合成, 但需要消耗动物资源, 且种属及个体差异导致反应批次间的稳定性差, 极大地阻碍了其规模化制备 *O*-葡萄糖醛酸苷的应用。因此, 发展可持续利

表 3 肝脏微粒体生物制备 *O*-葡萄糖醛酸苷

Table 3 Biosynthesis of *O*-glucuronides with liver microsomes

序号	底物	产物名称	肝微粒体
1	吗啡 (morphine) [50]	吗啡-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (morphine-3- <i>O</i> -glucuronide)	狗肝微粒体
2	吗啡 (morphine) [50]	吗啡-6- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (morphine-6- <i>O</i> -glucuronide)	狗肝微粒体
3	雌二醇 (estradiol) [51]	雌二醇-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (estradiol-3- <i>O</i> -glucuronide)	人肝微粒体
4	对乙酰氨基酚 (acetaminophen) [52]	对乙酰氨基酚- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (acetaminophen- <i>O</i> -glucuronide)	人肝微粒体
5	赭曲霉素 A (ochratoxin A) [53]	赭曲霉素 A- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (ochratoxin A- <i>O</i> -glucuronide)	鼠肝微粒体
6	多巴酚丁胺 (dobutamine) [54]	多巴酚丁胺-1- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (phenolic dobutamine-1- <i>O</i> -glucuronide)	猪肝微粒体
7	多巴酚丁胺 (dobutamine) [54]	多巴酚丁胺-16- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (catecholic dobutamine <i>para</i> <i>O</i> -glucuronide)	猪肝微粒体
8	多巴酚丁胺 (dobutamine) [54]	多巴酚丁胺-15- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (catecholic dobutamine <i>meta</i> <i>O</i> -glucuronide)	猪肝微粒体
9	氯沙坦 (losartan) [55]	氯沙坦- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (losartan- <i>O</i> -glucuronide)	牛肝微粒体
10	zolarsartan[55]	zolarsartan acyl glucuronide	猪肝微粒体
11	双酚 A (bisphenol A) [3]	双酚 A- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (bisphenol A- <i>O</i> -glucuronide)	鼠肝微粒体
12	雌甾酮 (oestrone) [56]	雌甾酮-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 (oestrone-3- <i>O</i> -glucuronide)	鼠肝微粒体

用的、质量可控的 UGT 酶源对 *O*-葡萄糖醛酸苷的规模制备极其关键。在细菌或昆虫细胞中重组表达动物 UGT 是葡萄糖醛酸代谢研究领域的突破性进展。

在哺乳动物细胞中异源表达人源 UGT 时，可以选择如 COS、V79、HEK293 作为 UGT 的受体细胞。此外，大肠杆菌 *E. coli* 及带有组氨酸标签的杆状病毒感染的昆虫细胞系统均可作为 UGT 的表达系统[45,58]。

此外，重组 UGT 的应用范围取决于其催化底物的特异性。例如，UGT1A1、1A7、1A9 和 1A10 用于催化去甲基萘普生的芳香基或烷基葡萄糖醛酸化反应，而 UGT1A3、1A6 和 2B7 只催化烷基葡萄糖醛酸化反应。通过对重组 UGT 选择性催化生成 morphine-3-*O*-glucuronide (M3G) 和 morphine-6-*O*-glucuronide (M6G) 的动力学研究表明 UGT1A1、1A3、1A6、1A8、1A9、1A10 及 2B7 均可催化形成 M3G，但是只有 UGT2B7 具有 M6G 的催化活性。用 8 种重组的人源 UGT 对 13 种黄酮类化合物（7 个黄酮、6 个黄酮醇，均在 C-3、C-4'、C-5 和 C-7 位有羟基）进行葡萄糖醛酸化反应的结果表明：UGT1A3 和 1A7 分别对 7-*O* 位和 3-*O* 位具有葡萄糖醛酸化能力，而 UGT1A8 和 1A9 对 7-*O* 位的选择性优于 3-*O* 位，其他重组 UGT 没有表现出明显的位置偏好性。胆酸的葡萄糖醛酸化中 UGT1A3 对羧基有选择性，而 UGT1A4 对 3 α -羟基有选择性。

UGT2B7 的 2 个等位基因亚型对羧基及羟基具有葡萄糖醛酸化功能，其中 3 α 位更易发生反应。

此外，为了克服传统辅因子 UDPGA 非常昂贵的问题，近年来，全细胞生物转化系统用于原位催化生成 UDPGA[59-60]。此技术中应用裂殖酵母 *S. pombe* 作为重组 UGT 的宿主菌，共表达人源葡萄糖脱氢酶 (UGDH) 产生辅因子 UDPGA，最终可高效获得 *O*-葡萄糖醛酸苷 (图 4) [61-62]。同时，此系统也可用于制备同位素标记的葡萄糖醛酸苷。

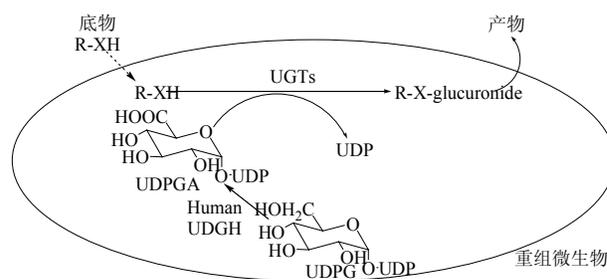


图 4 全细胞生物转化制备 *O*-葡萄糖醛酸苷

Fig. 4 Synthesis of *O*-glucuronides by whole-cell biotransformation

3 微生物发酵法制备 *O*-葡萄糖醛酸苷

微生物发酵法是生物制备 *O*-葡萄糖醛酸苷的另一方向。获得可具有葡萄糖醛酸化能力的高产菌株是微生物发酵制备 *O*-葡萄糖醛酸苷的关键因素，然而相关报道并不多。目前主要集中在抗肿瘤

药物的 *O*-葡萄糖醛酸苷的微生物发酵制备。例如, Briggs 等^[61]首次报道了 1 株具有 *O*-葡萄糖醛酸化雷洛昔芬 (raloxifene) 能力的链霉菌 (*Streptomyces* sp NRRL 21489), 可产生 3 种 *O*-葡萄糖醛酸化产物 (raloxifene-27-glucuronide、raloxifene-6-glucuronide、raloxifene-6,27-glucuronide)。Marvalin 等^[62]发现了 1 株链霉菌 (*Streptomyces* sp. strain M52104), 可转化普萘洛尔生成 β -*O*-葡萄糖醛酸化产物; Caccinelli 等^[63]报道了 *S. peucetius* var *vinaceus* NRRL 15344 和 *S. peucetius* var *castaneus* NRRL 15345 两株菌可分别产生紫红霉酮和阿克拉霉素的 *O*-葡萄糖醛酸化产物。Marvalin 等^[64]还报道了 1 株链霉菌可完成咪达唑仑的 *O*-葡萄糖醛酸化, 生成 1'-羟基咪达唑仑-*O*-葡萄糖醛酸苷。

另一方面, 由于基因工程的迅速发展, 基因突变得到的工程菌也越来越得到重视^[65-66]。Wilkinson 等^[65]将大肠杆菌 β -葡萄糖醛酸苷酶 (EC 3.2.1.31) 基因突变获得糖苷合成酶。糖苷合成酶可在温和条件下一步反应生成 *O*-葡萄糖醛酸苷, 过程更为简便, 且利于规模化。通过对葡萄糖醛酸苷酶的一个关键残基的突变, 即将谷氨酸 504 (E504) 位点突变成非亲核性甘氨酸 (E504G)、丙氨酸 (E504A)、或者丝氨酸 (E504S) 残基, 使得葡萄糖醛酸苷的糖苷键无法水解, 同时, 此糖苷合成酶可以催化氟取代的 α -葡萄糖醛酸和醇的底物生成系列葡萄糖醛酸苷。尽管目前采用微生物发酵法制备 *O*-葡萄糖醛酸苷研究较少, 但由于此方法可获得足量的 *O*-葡萄糖醛酸苷, 因此筛选及构建高产微生物菌株将成为生物制备 *O*-葡萄糖醛酸苷的主要方向。

4 结语与展望

O-葡萄糖醛酸苷是药物在生物体内代谢的最终产物, 近年来在生命过程中的作用越来越受到人们重视, 而且对它的制备也日益关注。传统的化学合成普遍收率不高, 且过程繁琐, 因此生物 (酶) 法获得 *O*-葡萄糖醛酸苷成为新的研究方向。目前肝微粒体作为主要的酶源用于 *O*-葡萄糖醛酸苷的制备, 但只局限于实验室少量规模。随着蛋白重组表达的深入开展, 构建高效的重组人源化 UGT 表达系统及获得 UGT 的高产菌株, 提高生物转化效率及酶的反利用率, 将是今后生物法制备 *O*-葡萄糖醛酸苷的发展趋势。

参考文献

[1] Obach R. Pharmacologically active drug metabolites:

impact on drug discovery and pharmacotherapy [J]. *Pharmacol Rev*, 2013, 65(2): 578-640.

- [2] Harbourt D, Fallon J, Ito S, et al. Quantification of human uridine-diphosphate glucuronosyl transferase 1A isoforms in liver, intestine, and kidney using nanobore liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(1): 98-105.
- [3] Yang G, Zhu L, Lv X, et al. Highly efficient preparation of bisphenol A glucuronide [J]. *Chem J Chin Univ*, 2014, 35(2): 314-318.
- [4] Zhu L, Ge G, Liu Y, et al. Characterization of UDP-glucuronosyltransferases involved in glucuronidation of diethylstilbestrol in human liver and intestine [J]. *Chem Res Toxicol*, 2012, 25(12): 2663-2669.
- [5] Kilpatrick G, Smith T. Morphine-6-glucuronide: actions and mechanisms [J]. *Med Res Rev*, 2005, 25(5): 521-544.
- [6] Trelu M, Filali-Ansary A, Françon D, et al. New metabolic and pharmacokinetic characteristics of thiocolchicoside and its active metabolite in healthy humans [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2004, 18(4): 493-501.
- [7] Brown S, Holtzman M, Kharasch E. Buprenorphine metabolites, buprenorphine-3-glucuronide and norbuprenorphine-3-glucuronide, are biologically active [J]. *Anesthesiology*, 2011, 115(6): 1251-1260.
- [8] Natsume M, Osakabe N, Yasuda A, et al. *In vitro* antioxidative activity of (-)-epicatechin glucuronide metabolites present in human and rat plasma [J]. *Free Radic Res*, 2004, 38(12): 1341-1348.
- [9] Yamamoto M, Jokura H, Hashizume K, et al. Hesperidin metabolite hesperetin-7-*O*-glucuronide, but not hesperetin-3'-*O*-glucuronide, exerts hypotensive, vasodilatory, and anti-inflammatory activities [J]. *Food Funct*, 2013, 4(9): 1346-1351.
- [10] Shirai M, Moon J H, Tsushida T, et al. Inhibitory effect of a quercetin metabolite, quercetin 3-*O*-beta-*D*-glucuronide, on lipid peroxidation in liposomal membranes [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(11): 5602-5608.
- [11] Kurata H, Suzuki S, Ohhata Y, et al. A novel class of apical sodium-dependent bile acid transporter inhibitors: the amphiphilic 4-oxo-1-phenyl-1, 4-dihydroquinoline derivatives [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14(5): 1183-1186.
- [12] 朱向明, 俞 飙, 惠永正. 葡萄糖醛酸苷的合成研究进展 [J]. *有机化学*, 2000, 20(2): 146-454.
- [13] Wimmer Z, Pechová L, Šaman D. Koenigs-Knorr synthesis of cycloalkyl glycosides [J]. *Molecules*, 2004, 9(11): 902-912.
- [14] Reiss P, Burnett D, Zaks A. An enzymatic synthesis of glucuronides of azetidinone-based cholesterol absorption inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 1999, 7(10): 2199-2202.
- [15] Li Y, Baldauf, S, Lim E, et al. Phylogenetic analysis of

- the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(6): 4338-4343.
- [16] Kovács G, Kuzovkina I, Szöke É, *et al.* HPLC determination of flavonoids in hairy-root cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *Chromatographia*, 2004, 60(1): S81-S85.
- [17] Liu G, Ma J, Chen Y, *et al.* Investigation of flavonoid profile of *Scutellaria baicalensis* Georgi by high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(23): 4809-4814.
- [18] 王 丽, 马 远, 陈随清. 构树叶中牡荆素、芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖醛酸苷的含量测定 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(35): 21647-21649.
- [19] Nielsen S, Young J, Daneshvar B, *et al.* Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects [J]. *Br J Nutr*, 1999, 81(6): 447-455.
- [20] Calderón-Montaña J, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, *et al.* A review on the dietary flavonoid kaempferol [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2011, 11(4): 298-344.
- [21] Chen A, Chen Y. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention [J]. *Food Chem*, 2013, 138(4): 2099-2107.
- [22] 孙国玲, 钱大玮, 段金廛, 等. 大鼠灌胃毛橘红醇提物血浆中柚皮苷、柚皮素及其代谢产物液质分析 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(12): 1580-1585.
- [23] 袁旭江, 林 励, 陈志霞. 化橘红中酚性成分的研究 [J]. *中草药*, 2004, 35(5): 498-500.
- [24] O'Leary K, Day A, Needs P, *et al.* Flavonoid glucuronides are substrates for human liver beta-glucuronidase [J]. *FEBS Lett*, 2001, 503(1): 103-106.
- [25] López-Lázaro M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin [J]. *Mini-rev Med Chem*, 2009, 9(1): 31-59.
- [26] Horvath C, Martos P, Saxena P. Identification and quantification of eight flavones in root and shoot tissues of the medicinal plant huang-qin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) using high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1062(2): 199-207.
- [27] Yuldashev M, Batirove É, Malikov V. Flavonoids of the roots of *Scutellaria comosa* [J]. *Chem Nat Compd*, 1996, 32(4): 592-593.
- [28] Choudhury S, Datta S, Talukdar A, *et al.* Phytochemistry of the family bignoniaceae-A review [J]. *Assam Univ J Sci Technol: Biol Envir Sci*, 2011, 7(1): 145-150.
- [29] 温华珍, 肖盛元, 王义明, 等. HPLC 法测定不同规格并头黄芩的黄芩苷和汉黄芩苷含量 [J]. *中草药*, 2005, 36(4): 600-602.
- [30] Li T, Peng T. Traditional Chinese herbal medicine as a source of molecules with antiviral activity [J]. *Antivir Res*, 2013, 97(1): 1-9.
- [31] Derlindati E, Dall'asta M, Ardigò D, *et al.* Quercetin-3-O-glucuronide affects the gene expression profile of M1 and M2a human macrophages exhibiting anti-inflammatory effects [J]. *Food Funct*, 2012, 3(11): 1144-1152.
- [32] Granica S, Piwowarski J, Poplawska M, *et al.* Novel insight into qualitative standardization of *Polygonum avicularis* herba (Ph. Eur.) [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 72: 216-222.
- [33] Natsume M, Osakabe N, Oyama M, *et al.* Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat [J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 34(7): 840-849.
- [34] Yang H, Hwangbo K, Zheng M, *et al.* Quercetin-3-O-β-D-glucuronide isolated from *Polygonum aviculare* inhibits cellular senescence in human primary cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2014, doi: 10.1007/s12272-014-0344-2.
- [35] Sultana N, Ata A. Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds [J]. *J Enzym Inhib Med Chem*, 2008, 23(6): 739-756.
- [36] Eddouks M, Chattopadhyay D. *Phytotherapy in the Management of Diabetes and Hypertension* [M]. Bentham: Science Publishers, 2012.
- [37] Fu B, Liu J, Li H, *et al.* The application of macroporous resins in the separation of licorice flavonoids and glycyrrhizic acid [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1089(1/2): 18-24.
- [38] Lin J. Mechanism of action of glycyrrhizic acid in inhibition of Epstein-Barr virus replication *in vitro* [J]. *Antiv Res*, 2003, 59(1): 41-47.
- [39] Huang M, Smart R, Wong C, *et al.* Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate [J]. *Cancer Res*, 1988, 48(21): 5941-5946.
- [40] Clifford M. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden [J]. *J Sci Food Agric*, 1999, 79(3): 362-372.
- [41] Wang X. Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(20): 3303-3309.
- [42] Dean J, Delaney S. Metabolism of salicylic acid in wild-type, ugt74f1 and ugt74f2 glucosyltransferase mutants of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Physiol Plant*, 2008, 132(4): 417-425.
- [43] Tohge T, Nishiyama Y, Hirai M, *et al.* Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an

- MYB transcription factor [J]. *Plant J*, 2005, 42(2): 218-235.
- [44] Pang Y, Peel G, Sharma S, *et al.* A transcript profiling approach reveals an epicatechin-specific glucosyltransferase expressed in the seed coat of *Medicago truncatula* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(37): 14210-14215.
- [45] Stachulski A, Jenkins G. The synthesis of *O*-glucuronides [J]. *Nat Prod Rep*, 1998, 15(2): 173-186.
- [46] Isselbacher K, Chrabas M, Qutinn R. The solubilization and partial purification of a glucuronyl transferase from rabbit liver microsomes [J]. *J Biol Chem*, 1962, 237(10): 3033-3036.
- [47] Falany C, Tephly T. Separation, purification and characterization of three isoenzymes of UDP-glucuronyltransferase from rat liver microsomes [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1983, 227(1): 248-258.
- [48] Irshaid Y, Tephly T. Isolation and purification of two human liver UDP-glucuronosyltransferases [J]. *Mol Pharmacol*, 1987, 31(1): 27-34.
- [49] Burchell B, Hallinan T. Phospholipid content and activity of pure uridine diphosphate-glucuronyltransferase from rat liver [J]. *Biochem J*, 1978, 171(3): 821-824.
- [50] King C, Finley B, Franklin R. The glucuronidation of morphine by dog liver microsomes: identification of morphine-6-*O*-glucuronide [J]. *Drug Metab Dispos*, 2000, 28(6): 661-663.
- [51] Lee A, Kosh J, Conney A, *et al.* Characterization of the NADPH-dependent metabolism of 17 β -estradiol to multiple metabolites by human liver microsomes and selectively expressed human cytochrome P450 3A4 and 3A5 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 298(2): 420-432.
- [52] Court M, Duan S, Moltke L, *et al.* Interindividual variability in acetaminophen glucuronidation by human liver microsomes: identification of relevant acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase isoforms [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299(3): 998-1006.
- [53] Han Z, Tangni E, Mavungu J, *et al.* *In vitro* glucuronidation of ochratoxin A by rat liver microsomes [J]. *Toxins*, 2013, 5(12): 2671-2685.
- [54] Alonen A, Aitio O, Hakala K, *et al.* Biosynthesis of dobutamine monoglucuronides and glucuronidation of dobutamine by recombinant human UDP-glucuronosyltransferases [J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33(5): 657-663.
- [55] Alonen A, Fiel M, Kostianinen R. The human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A3 is highly selective towards N2 in the tetrazole ring of losartan, candesartan, and zolarsartan [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(6): 763-772.
- [56] Weatherill P, Burchell B. The separation and purification of rat liver UDP-glucuronyltransferase activities towards testosterone and oestrone [J]. *Biochem J*, 1980, 189(2): 377-380.
- [57] Kim H, Waner I. The covalent immobilization of microsomal uridine diphospho-glucuronosyltransferase (UDPGT): Initial synthesis and characterization of an UDPGT immobilized enzyme reactor for the on-line study of glucuronidation [J]. *J Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci*, 2005, 823(2): 158-166.
- [58] Pandya-Radomska A, Bratton S, Little J. A historical overview of the heterologous expression of mammalian UDP-glucuronosyltransferase isoforms over the past twenty years [J]. *Curr Drug Metab*, 2005, 6(2): 141-160.
- [59] Zlotina N, Ustyuzhanina N, Grachev A, *et al.* Stereoselective synthesis of di- and trisaccharide fucoidan fragments bearing α -D-glucuronic acid residue [J]. *J Carbohydr Chem*, 2008, 27(8/9): 429-445.
- [60] Stachulski A, Meng X. Glucuronides from metabolites to medicines: a survey of the *in vivo* generation, chemical synthesis and properties of glucuronides [J]. *Nat Prod Rep*, 2013, 30(6): 806-848.
- [61] Briggs B, Baker P, Belvo M, *et al.* Microbial process for preparation of glucuronides of raloxifene [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1999, 23(3): 194-197.
- [62] Marvalin C, Azerad R. Microbial production of phase I and phase II metabolites of propranolol [J]. *Xenobiotica*, 2011, 41(3): 175-186.
- [63] Cascinelli G, Ballabio M, Grein A, *et al.* A new class of biosynthetic anthracyclines: anthracyclinone glucuronides [J]. *J Antibiot*, 1987, 40(7): 1071-1074.
- [64] Marvalin C, Denoux M, Pérard S, *et al.* Microbial production of phase I and phase II metabolites of midazolam [J]. *Xenobiotica*, 2012, 42(3): 285-293.
- [65] Wilkinson S, Liew C, Mackay J, *et al.* *Escherichia coli* glucuronosyltransferase: an engineered enzyme for the synthesis of beta-glucuronides [J]. *Org Lett*, 2008, 10(8): 1585-1588.
- [66] Wilkinson S, Watson M, Willis A, *et al.* Experimental and kinetic studies of the *Escherichia coli* glucuronosyltransferase: An engineered enzyme for the synthesis of glucuronide conjugates [J]. *J Org Chem*, 2011, 76(7): 1992-2000.