

# 黄酮类化合物的代谢研究进展

王立萍<sup>1</sup>, 王新春<sup>2\*</sup>

(1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002;  
2. 石河子大学医学院第一附属医院, 新疆 石河子 832008)

**[摘要]** 黄酮类化合物是一类广泛存在于自然界中的多酚类化合物, 具有治疗心血管疾病、抗氧化、抗炎等多种药理作用。研究表明肝肠引起的首过代谢是限制其临床应用的重要因素。本文综述了黄酮类化合物的代谢研究进展, 以为黄酮类药物的代谢研究及新药开发提供参考。对近几年的文献进行分析、归纳和总结, 分别按照体内法、在体法和体外法介绍黄酮类化合物代谢研究方法的进展和应用前景。体内法中重点介绍了斑马鱼模型、菌群人源化动物模型和基因敲除动物模型; 在体法总结了大鼠单向肠灌注模型; 体外法中主要介绍了 Caco-2 细胞模型、离体消化道内容物温孵法、肝肠微粒体法、肝细胞体外温孵法和基因重组代谢酶法。近年来, LC-MS-MS、微透析技术等仪器和手段的不断发展大大提高了药物分析方法的灵敏度和专属性, 在微量药物浓度测定方面发挥了重要作用。此外, 一些新的模式生物和代谢模型如斑马鱼模型、菌群人源化动物模型、基因敲除动物模型和人源化肝脏嵌合体小鼠模型为黄酮类化合物的代谢研究提供了新的研究思路。目前黄酮类化合物的代谢研究发展迅速, 各种代谢模型及方法必将以自身独特的优势加快人们对该领域的研究步伐, 进一步推动黄酮类新药的开发及临床应用。

**[关键词]** 黄酮类化合物; 代谢; 体内; 体外

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0226-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110226

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140324.1556.012.html>

**[网络出版时间]** 2014-03-24 15:56

## Research Progress on Metabolism of Flavonoids

WANG Li-ping<sup>1</sup>, WANG Xin-chun<sup>2\*</sup>

(1. Pharmacy of College, Shihezi University, Shihezi 832002, China;

2. The First Affiliated Hospital of Medical College, Shihezi University, Shihezi 832008, China)

**[Abstract]** Flavonoids are polyphenolic compounds that are ubiquitous in nature with extensive pharmacological activities, such as the treatment of cardiovascular diseases, antioxidant and anti-inflammatory. However, the clinical application of flavonoids was often limited by first-pass metabolism in the gut and the liver. This article reviews the studies on the metabolism of flavonoids in order to provide references for relative research and new drug development. The paper analyzed and summarized the literature in recent years, the *in vivo*, the *in situ* and the *in vitro* method were introduced. The *in vivo* method mainly included the zebrafish model, the flora humanized animal models and the gene knockout models. The *in situ* method mainly introduced the rat single-pass intestinal perfusion model. The *in vitro* method included the Caco-2 cell model, the gastrointestinal contents hatching method, the enterohepatic microsomal method and the genetic recombination metabolic enzyme method. In recent years, The continuous development of instruments and means such as the LC-MS-MS, the micro dialysis technology greatly improved the sensitivity and specificity of pharmaceutical analysis, which have played an

**[收稿日期]** 20130708(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金新疆联合基金重点项目(U1203204);兵团博士基金项目(2013BB014)

**[第一作者]** 王立萍, 在读硕士, 从事中药民族药研究, E-mail: ewjwxc@163.com

**[通讯作者]** \*王新春, 主任药师, 从事中药民族药研究, Tel: 0993-2855827

important role in determination of trace drug concentration. Furthermore, Some new models, such as the zebrafish model, the flora humanized animal models, the gene knockout models and the humanized liver chimeric mouse model provided some new ideas for the metabolism of flavonoids. The study on the metabolism of flavonoid developed rapidly, Various metabolic models and methods is bounding to accelerate the pace of research in this field and promote the new drug development and clinical application.

[ **Key words** ] flavonoids; metabolism; *in vivo*; *in vitro*

黄酮类化合物是一种广泛存在于多种植物中的次级代谢产物,除黄烷醇外大部分与糖成苷,少部分以游离苷元的形式存在。黄酮类化合物具有扩张血管、防御病原体、抗氧化、抗炎及调节细胞信号转导通路等多种生物活性<sup>[1]</sup>。有些黄酮类化合物还可作为 CYP1A1 和 CYP1B1 的底物或抑制剂,从而抑制肿瘤细胞的生长和潜在致癌作用的发生<sup>[2]</sup>。药物生物转化后,代谢物的药理活性变化较为复杂,可能会形成活性或毒性代谢物。因此,药物代谢研究对新药的筛选、设计以及临床安全用药的指导都具有重要的意义。

黄酮类化合物的代谢部位主要是肝脏,由于人的小肠是中药口服吸收的主要部位,存在 I, II 相代谢酶和外排转运体,而且肠道菌群也拥有酶和代谢活性,因此小肠对黄酮类化合物引起的代谢也不容忽视<sup>[3]</sup>。本文通过黄酮类化合物近年来代谢研究取得的新进展进行综述,以期对黄酮类化合物的代谢研究提供一定的参考。

## 1 体内代谢法

体内代谢研究通常是在动物或人给药后的不同时间收集血液、尿液、胆汁或粪便等生物样品,通过分析、分离和鉴定样品中的代谢产物,确定药物在体内的代谢途径。体内法可以综合考虑各种体内因素对药物的影响,能够真实全面的反映药物代谢特征。

体内药物浓度检测方法的不断改进对药物的代谢研究发展至关重要。随着色谱技术及串联接口技术的不断成熟,LC-MS, LC-MS-MS, NMR, TOF-MS 等检测手段在黄酮类化合物的代谢产物分析中得到了广泛的应用,此外高效毛细管电泳技术和微透析技术也在分离和取样中发挥着独特的优势<sup>[4-5]</sup>。

**1.1 斑马鱼系统** 斑马鱼 *Danio rerio* 是一种性情温和、杂食性的淡水鱼。斑马鱼系统自 1981 年首次提出后便受到科学家们的关注,由于其具有繁殖能力强、体外受精和发育、胚胎透明、性成熟周期短、易养殖等诸多优点,随着斑马鱼基因测序工程的完成和胚胎发育遗传学技术的完善,现已被广泛应用于疾病模型的建立和药物活性成分的高通量筛选等研究中<sup>[6]</sup>。此外,斑马鱼体内存在许多药物代谢酶和核受体如细胞色素 P450 酶(CYP450)、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGTs)、孕烷受体(PXR)、芳香烃受体(AHR)等,可用于药物代谢的研究。

将药物溶解于斑马鱼所生活的水中,斑马鱼会自主连续地从溶液中吸收药物,药物的代谢物也会随着斑马鱼的排泄物被连续地排到水中,通过分析药液的成分变化可以掌握药物的部分代谢信息,具有简单、高效、耗费低、所需样品更少

等优点,目前已发展成为中药代谢研究的理想模式生物<sup>[7]</sup>。

有研究<sup>[8]</sup>用斑马鱼模型考察了淫羊藿中的 4 种黄酮类成分淫羊藿苷、宝霍苷 I、朝霍定 A 和朝霍定 C 的代谢情况, HPLC-EIS-MS 鉴定它们的代谢产物,发现淫羊藿苷和朝霍定 C 的代谢产物是通过脱去 C-7 位葡萄糖基,形成宝霍苷 I 和 2"-O-rhamnosylariside(鼠李糖基淫羊藿次苷 II),这些产物很难再脱去它们的鼠李糖基,这与常规代谢方法所得的结果一致。此外,由于很难从淫羊藿中得到足够量的化合物,目前很少有研究报道淫羊藿中其他微量黄酮类物质如朝霍定 A 的体内代谢。在斑马鱼模型中,朝霍定 A 被发现代谢为宝霍苷 I,与淫羊藿苷和朝霍定 C 类似。

**1.2 菌群人源化动物模型** 由于直接采用人体肠道菌群研究药物的代谢存在伦理道德风险,也很难排除饮食、环境及遗传因素等对实验结果的干扰,此外,实验动物的肠道菌群组成及代谢活性与人体肠道菌群差异显著,难以避免种属差异性。因此,利用无菌动物接种人肠道菌群构建的菌群人源化小鼠(human flora-associated, HFA)被认为是研究人肠菌生态和代谢的重要工具。

Tamura 等<sup>[9]</sup>用 HFA 小鼠研究了人肠道菌群对血浆和盲肠中异黄酮(大豆黄酮和染料木黄酮)的影响。将健康小鼠随机分为 4 组,即无菌-异黄酮小鼠(GI)组、菌群人源化-异黄酮小鼠(HI)组、无菌-对照小鼠(GC)组和菌群人源化-对照(HC)组。其中,对照组小鼠服用溶剂 4 d 以上,异黄酮的测定采用 HPLC。结果显示 GI 组小鼠盲肠中大豆黄酮和染料木黄酮的总量明显高于 HI 组,只在 HI 组小鼠血浆和盲肠内容物中检测到代谢物牛尿酚,这个结果说明人的肠道菌群对异黄酮的代谢有重要作用。

**1.3 基因敲除动物模型** 基因敲除(gene knockout)是指将一个结构已知的基因去除,或用其他序列相近的基因取代,然后从整体观察实验动物,推测相应基因功能的技术。基因敲除技术是 20 世纪 80 年代后半期应用 DNA 同源重组原理发展起来的,利用该技术可制备具有人类 P450 药物代谢种属特性的“人源化”整体动物模型。目前已建立了多种 CYP P450-null 小鼠整体动物模型,可用于观察在特定 CYP 亚型基因缺失条件下动物对药物的代谢情况<sup>[6]</sup>。

**1.4 人源化肝脏嵌合体小鼠模型** 人源化肝脏嵌合体小鼠模型是一种将人原代肝细胞异种移植到受体鼠肝内建立的新型动物模型。嵌合肝细胞具有与人肝相同的酶学系统和代谢特点,并能克服种间差异和遗传多态性,可用于评估人源化鼠肝的代谢状况,比较人和啮齿类动物肝细胞在代谢途径、速度和产物上的差异,在药物代谢领域中具有广阔的应

用前景<sup>[10]</sup>。

## 2 在体法

大鼠肠灌注模型是一种最常用的在体代谢研究模型。与其他模型相比,该模型实验条件参数易于控制,可以排除其他器官的干扰和维持肠的完整血液供应,常被作为研究肠代谢的有力工具。

有研究<sup>[11]</sup>用大鼠肠灌注模型考察了黄芩素的代谢,发现黄芩素具有良好的跨上皮细胞透过性并形成葡萄糖醛酸结合物和硫酸结合物,多药耐药相关蛋白(MRP)参与代谢物的外排。Liu 等<sup>[12]</sup>用单向肠灌注模型考察了芍药苷在不同肠段的代谢情况,发现芍药苷的最大吸收和代谢发生在十二指肠和结肠,可明显被乳糖酶-根皮苷水解酶(LPH)抑制剂葡萄糖酸内酯降低,在 P 糖蛋白(P-gp)抑制剂青藤碱和环孢素 A 存在的情况下不代谢。

## 3 体外代谢法

体外代谢法具有快速简便、研究费用相对较低及适合大量化合物的药理学筛选等优点,随着定量构效关系(QSAR)模型等计算机模拟(in silico modeling)方法的发展,体外代谢法将在药物代谢预测中发挥越来越重要的作用<sup>[13]</sup>。目前,黄酮类化合物常用的体外代谢法主要有 Caco-2 细胞模型法、离体消化道内容物温孵法、肝微粒体体外温孵法、肝细胞体外温孵法和基因重组代谢酶法。

### 3.1 肠体外代谢法

**3.1.1 Caco-2 细胞模型** 近年来,基因重组、基因敲除或化学物质诱导等手段对 Caco-2 细胞内代谢酶和转运蛋白表达的改良使其能更好的模拟小肠研究药物的代谢情况。Chen 等<sup>[14]</sup>考察了染料木黄酮及它的 5 种异黄酮类似物(大豆苷元、大豆黄酮、芒柄花黄素、鹰嘴豆素 A 和樱黄素)在 Caco-2 细胞模型中的代谢差异。除樱黄素主要以硫酸化途径代谢之外,其余化合物均主要发生葡萄糖醛酸化反应,并进一步确证了 7 位羟基是葡萄糖醛酸化的主要部位,而 4' 位羟基是硫酸化的唯一部位。由此可以看出,肠道对异黄酮类化合物的处置存在着结构依赖性。Zhang 等<sup>[15]</sup>在 Caco-2 细胞单层转运实验中发现儿茶素的代谢产物主要是甲基化和硫酸化结合物,MRP 介导代谢物的外排。

**3.1.2 离体消化道内容物温孵法** 目前关于肠道菌群对口服中药代谢的报道越来越多,研究肠道细菌对黄酮类化合物的代谢规律有利于了解其在体内的整个代谢过程<sup>[16]</sup>。采用肠内菌与药物共孵育或粪便温孵法是研究肠内菌对药物代谢的有效方法,即用富含肠内菌的动物或人的粪便悬浮液与药物在厌氧条件下温孵,通过检测原型药物及代谢产物的种类和数量研究药物的代谢情况。

Aura 等<sup>[17]</sup>用人的粪便孵育液体体外培养花青素-3-葡萄糖苷和芸香糖苷,用 HPLC-DAS 和 LC-MS 分析肠道微生物对二者的生物转化,证实了花青素苷的菌群代谢涉及糖苷键的断裂和杂环裂解。杨秀伟等<sup>[18]</sup>离体培养人的肠内细菌对山柰苷进行了代谢研究,经硅胶柱色谱和薄层色谱法分离纯化,得到 4 个山柰苷的人肠内细菌转化产物,(山柰酚 3-O- $\alpha$ -L-

吡喃鼠李糖苷、山柰酚 7-O- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖苷、山柰酚和对羟基苯甲酸)。

### 3.2 肝体外代谢法

**3.2.1 肝微粒体体外温孵法** 肝微粒体法是由制备的肝微粒体(一般采用差速离心法制备)辅以氧化还原型辅酶,在体外模拟生理温度及条件进行代谢反应,然后通过检测手段测定原型药物及代谢产物。肝微粒体含有肝脏表达的所有参与药物代谢的 CYP450 酶,制备技术简单、代谢过程快,常用于药物对酶的抑制及体外代谢清除等方面的研究。

Boersma 等<sup>[19]</sup>用 HPLC,LC-MS,<sup>1</sup>H-NMR 分析了人、鼠肝肠微粒体孵育液中木犀草素和槲皮素的代谢产物,结果表明二者葡萄糖苷酸化发生的主要位置是 7 位、3 位、3' 位或 4' 位羟基部分,这种葡萄糖醛酸化区域选择性使得人肝 UGT1A9 和肠 UGT1A1,UGT1A8 对木犀草素和槲皮素的 II 相代谢尤其显著。和凡等<sup>[20]</sup>将 33 种黄酮类化合物和 CYP450 6 种亚型的探针底物与人肝微粒体共孵育,用 HPLC-MS-MS 技术测定了这些化合物对 6 种 CYP 亚型的抑制作用及代谢性相互作用。

**3.2.2 肝细胞体外温孵法** 肝细胞体外温孵法是由制备的肝细胞辅以氧化还原型辅酶,在模拟生理温度及条件进行代谢反应,在反应过程中定时从反应体系中取样,检测细胞的活性、药物和代谢物的浓度。原代培养的肝细胞具有充足的天然水平的酶系和辅因子,能保持细胞的完整性,适于研究酶活性及药物对代谢酶的作用,在评估药物代谢过程中药物间相互作用方面有广泛的应用。

Vacek 等<sup>[21]</sup>用原代培养的肝细胞悬液温孵法研究了槲皮素、芦丁、异槲皮苷和花旗松素的代谢,HPLC-ESI-QqTOF MS 法分析代谢产物。结果发现它们主要的代谢产物是甲基化黄酮醇和葡萄糖苷酸化产物,花旗松素的生物转化率最高,主要被转化为硫酸结合物。槲皮素和花旗松素比苷(芦丁和异槲皮苷)更易发生代谢。

**3.2.3 基因重组代谢酶法** 基因重组代谢酶法是利用基因工程及细胞工程,将调控代谢酶系表达的基因整合到大肠埃希菌、杆状病毒或昆虫细胞中,经细胞培养后表达高水平的代谢酶系,纯化后可获得较纯的单一酶亚型。由于 CYPs 和 UGTs 是黄酮类化合物重要的代谢酶,目前以这两种代谢酶的基因重组较为常见。

Si 等<sup>[22]</sup>用 CYP2C9 RECO 系统研究了 CYP2C9 与一系列黄酮及黄酮醇类化合物的相互作用,除黄酮外,其余化合物对 CYP2C9 介导的双氯芬酸 4' 羟基化代谢均有抑制作用,6 位羟基化黄酮是 CYP2C9 的非竞争性抑制剂,其余是竞争性抑制剂。Haza 等<sup>[23]</sup>用表达了人 CYP1A1 和 UGT1A4 的杆状病毒细胞考察杨梅黄酮和槲皮素对杂环胺诱导 DNA 氧化损伤的调节能力,推测二者发挥保护 DNA 氧化损伤的作用可能与抑制 CYP1A1 酶活性有关。于红宇等<sup>[24]</sup>研究了 2 种重组人源化葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A9 和 UGT1A10(分别主要存在于肝脏和肠道)对染料木素的代谢作用,发现二者对染料木素均具有显著代谢作用,随着浓度的增加,UGT1A9 呈现出更快的代谢速率,提示染料木素的主要代谢部位在肝

脏,肠道参与部分代谢。

#### 4 结语

黄酮类化合物因其对人类健康的诸多好处而受到人们的广泛关注。目前的研究证实,除溶解度和吸收性质不理想外,肝肠引起的首过代谢也是限制其临床应用的重要因素,阐明黄酮类药物的代谢机制对其新药开发和临床应用具有重要意义。目前,包括计算机模拟在内的体内外代谢研究已被广泛应用于黄酮类化合物的代谢预测,随着科学技术的迅猛发展,分析化学领域不断涌现出的新的分析仪器和手段大大提高了药物分析方法的灵敏度和专属性,已在微量药物浓度测定、代谢途径分析等方面发挥了重要作用。此外,一些新的模式生物和代谢模型的出现如斑马鱼系统、HFA 小鼠、代谢酶基因敲除小鼠、人源化肝脏嵌合体小鼠模型等也将以各自独特的优势加快人们对黄酮类化合物代谢领域研究的步伐。

#### [参考文献]

[1] Olsen K M, Hehn A, Slimestad R, et al. Identification and characterisation of CYP75A31, a new flavonoid 3'5'-hydroxylase, isolated from *Solanum lycopersicum* [J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10:21.

[2] Androustopoulos V P, Papakyriakou A, Vourloumis D, et al. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes [J]. *Pharm Ther*, 2010, 126:9.

[3] Leoni C, Balduzzi M, Buratti F M, et al. The contribution of human small intestine to chlorpyrifos biotransformation [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 215:42.

[4] 王青虎, 奥乌力吉, 包建华. 高效毛细管电泳法同时测定小白蒿 5 种黄酮类化合物的含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(16):63.

[5] 邓亚利, 陈道阳, 周莉玲. 微透析技术在药物局部药理学研究中的应用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(23):264.

[6] 陈磊, 刘怡, 梁生旺. 模式生物斑马鱼在中药研究中的应用 [J]. *药学报*, 2012, 47(4):434.

[7] 韦英杰, 宁青, 贾晓斌, 等. 基于斑马鱼模型的中药代谢研究思路与方法 [J]. *中草药*, 2009, 40(7):1009.

[8] Wei Y J, Li P, Fan H W, et al. Metabolite profiling of four major flavonoids of herba epimidis in zebrafish [J]. *Molecules*, 2012, 17:420.

[9] Tamura M, Hirayama K, Itoh K, et al. Effects of human intestinal flora on plasma and caecal isoflavones, and effects of isoflavones on the composition and metabolism of flora in human flora-associated (HFA) mice [J]. *Microb Ecol*, 2004, 16:18.

[10] Strom S C, Davila J, Grompe M. Chimeric mice with humanized liver: tools for the study of drug metabolism, excretion, and toxicity [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 640:491.

[11] Li C R, Zhang L, Zhou L M, et al. Comparison of

intestinal absorption and disposition of structurally similar bioactive flavones in radix scutellariae [J]. *AAPSJ*, 2012, 14(1):23.

[12] Liu Z Q, Jiang Z H, Liu L, et al. Mechanisms responsible for poor oral bioavailability of paeoniflorin: role of intestinal disposition and interactions with sinomenine [J]. *Pharm Res*, 2006, 23(12):2768.

[13] Sridhar J, Liu J W, Foroosh M, et al. Insights on cytochrome P450 enzymes and inhibitors obtained through QSAR studies [J]. *Molecules*, 2012, 17:9283.

[14] Chen J, Lin H M, Hu M. Absorption and metabolism of genistein and its five isoflavone analogs in the human intestinal Caco-2 model [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, 55(2):159.

[15] Zhang L, Zheng Y, Zuo Z, et al. Investigation of intestinal absorption and disposition of green tea catechins by Caco-2 monolayer model [J]. *Inter J Pharm*, 2004, 287:1.

[16] 肖娟, 王莹, 王新宏, 等. 中药化学成分肠道菌群代谢的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(5):251.

[17] Aura A M, Martin-Lopez P, O'Leary K A, et al. *In vitro* metabolism of anthocyanins by human gut microflora [J]. *Eur J Nutr*, 2005, 44:133.

[18] 杨秀伟, 张建业, 李军, 等. 山奈昔的人肠内细菌生物转化研究 [J]. *药学报*, 2005, 40(8):717.

[19] Boersma M G, Woude H V D, Bogaards J, et al. Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases [J]. *Chem Res Toxicol*, 2002, 15:662.

[20] 和凡, 钟国平, 赵立子, 等. LC-MS/MS 法研究黄酮类化合物对人肝微粒体细胞色素 P450 酶 6 种亚型的体外抑制作用 [J]. *中国新药杂志*, 2009, 18(24):2340.

[21] Vacek J, Papoušková B, Kosina P, et al. Biotransformation of flavonols and taxifolin in hepatocyte *in vitro* systems as determined by liquid chromatography with various stationary phases and electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2012, 899:109.

[22] Si D Y, Wang Y, Zhou Y H. Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(3):629.

[23] Haza A I, Coto A L, Morales P. Comparison of the ability of myricetin and quercetin to modulate the oxidative DNA damage induced by heterocyclic amines [J]. *Food Nutr Sci*, 2011, 2:356.

[24] 于红宇, 廖景光, 陈历雄, 等. 2 种重组人源化葡糖醛酸化转移酶对染料木素代谢的作用研究 [J]. *中国药房*, 2009, 20(13):976.

[责任编辑 邹晓翠]