

尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶的研究进展

彭金咏 栾连军¹ (杭州 310031 浙江大学湖滨校区 4221 信箱; ¹ 浙江大学药物研究所)

摘要 目的:介绍尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGT)的最近研究进展;方法:查阅了大量相关文献,总结了UGT的功能、诱导、底物及其基因研究等内容;结果:UGT是一种最重要的II相代谢酶,对它的研究已经深入到基因水平,且可从分子水平上去解释它的作用机理;结论:人们对UGT有了更深更全面的了解。

关键词 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶;尿苷二磷酸葡萄糖醛酸(UDPGA);酶;进展

Advance In The Research of UDP-glucuronosyltransferase

Peng Jinyong (Hubin Campus Zhejiang University Hangzhou 310031)

ABSTRACT OBJECTIVE: To introduce the advance in the research of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) in recent years; **METHOD:** Reading a lot of related materials and summarizing the UGT functions, induction, substrates and its genes research; **RESULTS:** UGT is the most important enzyme in phase II metabolism and the research has been to the level of gene, furthermore using gene technology can explain its mechanism; **CONCLUSION:** people can understand UGT more deeply and widely than before.

KEY WORDS UDP-glucuronosyltransferase (UGT), UDPGA, enzyme, advance

1 概述

尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGT)是化学物质在生物体内进行第II相生物转化时最重要的一种酶。它是一个超基因家族。该酶能催化葡萄糖醛酸与大量的内源性和外源性化学物质进行葡萄糖醛酸结合反应。随着UGT基因的克隆和基因产物的成功表达,人们对UGT的认识逐渐深入。本文试图从UGT的功能、诱导、底物以及它的基因研究等方面的内容作一简要的综述。

2 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGT)的功能与活性

在II相代谢中,最主要的酶是尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGT, EC 2.4.1.17)。它广泛分布于机体的各种组织如肾脏、脑、皮肤、肠、脾、胸腺、心脏等,其中以肝脏中该酶的活性最高。传统的观点认为葡萄糖醛酸转移酶所催化的这种结合反应是发生在第I相反应之后,需依靠第I相反应提供的一些功能基团来完成反应过程。而实际上,许多外源性物质已经具备功能基团,如那些含有-OH、-SH、-COOH、-NH₂等基团的物质,可同时直接进行葡萄糖醛酸化。而UGT的活性则依赖于大量同工酶的存在,它以尿苷-5-二磷酸葡萄糖醛酸(UGA)为糖基供应体与^[1]底物进行结合反应,使它们的的水溶性增加,从而易于随尿与胆汁排出体外。这也是机体的一个解毒的过程。它能导致代谢物失活,修饰毒物的药理活性,然而越来越多的证据表明葡萄糖醛酸化也可导致底物生物活性的增加。如吗啡-6-葡萄糖醛酸苷就比吗啡本身有更强的镇静效果^[2]。值得注意的是UGT不仅能代谢外来的化学物质,而且能代谢大量的内源性化学物质如胆红素、短链脂肪酸、胆汁酸和脂溶性的维生素等。此外

UGT在代谢类固醇和甲状腺激素的过程中也表现出了重要的生理作用。同时,它也能参与大脑中糖脂的生物合成以及芳香类物质的消除。由于UGT能对许多药物进行代谢,近年来被广泛应用于抗肿瘤药的代谢研究当中。Federico Innocenti^[3]等试验了UGT1A1、UGT1A3、UGT1A4、UGT1A6、UGT1A9、UGT2B7与UGT2B5对表柔比星(epirubicin)的代谢研究,结果发现只有UGT2B7能催化表柔比星转化为苷,它是这种表现型的候选基因。Barbiet O^[4]等发现齐夫多定(AZT)也是被UGT2B7所催化。

UGT是一个高度固定化的微粒体酶系,它所催化的葡萄糖醛酸结合反应受到特定亚族酶的表达水平和它们功能状态变化的双重调节^[5]。每个UGTs同工酶在体内的表达水平是由当时的体内状况、组织专属性和环境几个方面的调节因素相互作用的结果。基因缺陷和多态性会影响每个同工酶的活性,产生十分有害的甚至潜在致命性的作用^[6]。这可以从三个例子来说明^[7]。1,历史上发生过“灰婴症”这一严重的副作用事件。这是因为缺乏对UGT活性会受个体发育的影响的了解,给新生儿用霉素后而造成的^[8]。2,控制血清胆红素结合反应的UGT1A1基因的变体会导致先天性急病Crigler-Najjar(UGT1A1基因缺陷引起的高胆红素症)和Gilbert's综合症(先天性高胆红素的温和形式,被认为在UGT1基因上有多态性)的发生^[8]。3,有的结合酶如UGT1A9可被多环芳烃诱导,从而会发生药效的变化(吸烟者体内UGT1A9的底物普萘洛尔的结合反应会增加)^[9]。同时它的活性也与性别和饮食等情况有关。雄性小鼠体内的胆红素-UGT的mRNA基因比雌性小鼠有更高水平的表

达,这可能与基因表达和酶功能状态的差异有关,^[10]维生素A也能影响UGT1A1与UGT1A6的活性,如果吃富含维生素A的食物,UGT1A1与UGT1A6对L-三碘甲状腺原氨酸的催化能力减弱^[11];长期用乙醇喂养小鼠,结果发现小鼠肝中的UGT1A1的mRNA表达增至原来的177%,UGT1A5、UGT2B1、UGT2B3的mRNA的表达都有所增加。^[12]Aoki-K^[13]等研究发现,对人UGT1家族而言,如果用人CMP-唾液酸转送子去代替C或N-末端的细胞浆部分,不会影响hUGT1的基因表达或活性;如果一个嵌合体中的第八螺旋或C-末端被代替,hUGT1也能保持原有的活性,这表明这个螺旋对基质的特异性没有选择作用。相反,如果三种类型的嵌合体包括第一螺旋结构、第一与第二个螺旋,如果从第七螺旋至C-末端的片段被替代,则UGT1没有活性。笔者曾做过UGT对普罗帕酮(propafenone)的立体选择性作用的研究,发现UGT的活性与诱导剂有关,不同的诱导剂诱导产生的UGT对手性药物的R-型和S-型的催化活性不相同。如用苯巴比妥诱导产生的UGT对R-propafenone的催化作用强于对S-propafenone的催化作用;而用地塞米松诱导产生的UGT的催化作用则正好相反。

3 UGT的诱导及其与底物的关系

现已知道许多药物或环境污染物都能增强人或动物机体中某一种或几种药物代谢酶的活性,其中包括UGT,它们是酶的诱导剂。这种现象在药物疗效方面非常重要。这些诱导剂是通过增强合成某一种特定的mRNA来增加蛋白质的合成从而增强药物代谢酶的活性。而不同的UGT同工酶是被一系列不同的诱导剂所诱导的。目前研究最为广泛的是多环芳烃(PAHs)与苯巴比妥(PB)型的诱导物(PB诱导UGT1A1,PAHs诱导UGT1A6与UGT1A9)^[9]。其中PAH型的诱导物包括有3-MC,β-萘黄酮(β-NF)与2,3,7,8-四氯二苯并对二噁英(TCDD)。一般地讲,在小鼠体中,PAH型的诱导剂指的是单酚类如1-萘酚,2-氨基苯酚与抗癌药末托蒽醌。而又有报道说3-MC能诱导产生双酚类的UGT同工酶。而PB型的诱导物则诱导产生吗啡型与氯霉素型的UGT,同时也能诱导产生少量的胆红素与某种类固醇类UGT。其它的已被发现的能诱导产生UGT的是氯贝丁酯与烯诺龙-16α-腈(PCN)或螺内酯(SPI)。然而象雌酮,奥沙西洋与扑热息痛却不能明显地增强某一种UGT的活性。同时某些底物的葡萄糖醛酸化又可被多种诱导剂所诱导,如利尿药呋喃苯胺酸。与之相似,几种不同的UGTs同工酶有不同的底物,也可能一个同工酶有许多底物^[14]。表1列出了不同UGT的代表性底物。同时,在这一过程中也具有竞争抑制性作用。

利用对UGT的诱导研究和cDNA克隆技术,表明在生物体中存在有多种同工酶,而这些同工酶对内源性底物的催化作用也表现特异性。然而几个同工酶又能同时接受一个外源性底物,这就是UGT的重叠底物特异性。如4-硝基苯酚至少是三种UGT同工酶的底物。对药物与其它的一些外源性物质,许多UGT同工酶也表现出底物特异性。对雌

鼠肝中分离纯化的三种UGT同工酶,利用SDS-PAGE与底物特异性分析表明这三种同工酶具有同源性。目前,临床上所使用的药物有很大一部分是手性药物,葡萄糖醛酸能选择性地与其中一种对映体结合,进而区别不同的对映体。如在小鼠肝微粒体中发现天然的(-)吗啡易形成3-O-葡萄糖醛酸苷,而非天然的(+)吗啡则易形成3-O-葡萄糖醛酸苷与6-O-葡萄糖醛酸苷,且(+)M6G/(+)M3G=3:1,如利用苯巴比妥进行诱导的话,则这一比例变为7.4:1,可见这种结合受诱导剂的影响。后来又发现10-羟基去甲替林的(+)对映体仅在人肝微粒体中与UGA结合,而(-)对映体则仅在十二指肠的微粒中发生结合反应。这说明,葡萄糖醛酸化对底物不仅具有立体选择性,也具有器官特异性。然而,综合所有UGT同工酶来看,如前所述,UGA只能与含有-OH、-SH、-COOH、-NH₂等基团的底物发生结合反应。故可按照结合的基团不同,将葡萄糖醛酸结合反应可分为四种类型,即:O-葡萄糖醛酸苷、S-葡萄糖醛酸苷、C-葡萄糖醛酸苷与N-葡萄糖醛酸苷。如:UDP-glucuronic acid + ROH → R.O-glucuronide + UDP。目前对UGT手性基质的立体选择性作用研究还在进行当中。

Table 1 Isoform specificity of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): representative substrate^[1,9]

Isoform	Endogenous substrates	Exogenous substrates
1A1	bilirubin, Ethinylestradiol, T4	SN-38 (irinotecan metabolite), Buprenorphine
1A3	Estrone	Ethinylestradiol
1A4	Androstenediol 5α, Pregnen-3α, 20α-diol	Imipramine, Amitriptyline
1A6	?	Paracetamol, Naftazone, Naproxen, 1-Naphthol, 2-Naphthol, Propofol, Paracetamol
1A9	Estrone, 4-Hydroxyestrone	Ethinylestradiol, Retinoic acids
1A10	?	Mycophenolic acid
2B4	Hydrodexycholeic acid	?
2B7	Androsterone, Estriol	Morphine, s-oxazepam, or naproxen
	4-hydroxyestrone	Codeine, Ketoprofen, Ibuprofen
	Epitestosterone	Buprenorphine, Naloxone, Lorazepam
	Nonsteroida	anti-inflammatories
	Menthol, propanolol	
2B15	Androgen steroids, testosterone	Eugenol, 4-Hydroxybiphenyl
	Dihydrotestosterone, 4-hydroxyestrone	Phenolphthalein
2B17	Androsterone, testosterone	
	Dihydrotestosterone	

4 UGT的基因研究概况

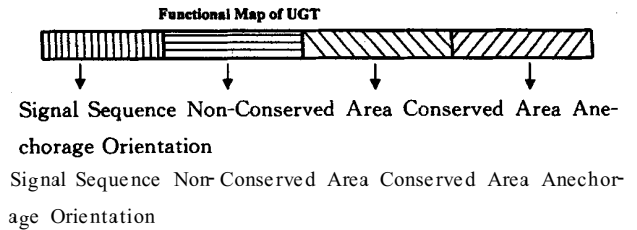
根据克隆的cDNA序列的相似性, Burchell^[15]建议将UGT超基因家族分为两个大家族,即:参与酚和胆红素代谢

的 UGT1 家族,如:UGT1 A6、UGT1 A1、UGT1 A4、UGT1 A2、UGT1 A10、UGT1 A9 等;和参与类固醇代谢的 UGT2 家族,如:UGT2B7、UGT2B1、UGT2B4、UGT2B8、UGT2B15、UGT2B28 等。由上可知,每一大的家族又分为许多亚族酶系统。

在人体中 UGT 家族成员共享羧基端的 246 个氨基酸残基,其氨基端共有 285 个氨基酸残基。不同的同工酶是由不同的氨基端构成的,羧基端成为保守区,它是由第 2、3、4 和 5 外显子所编码,是不同的同工酶与 UGA 结合的共同区域。而氨基端则是与底物结合的部位,该部位决定特定 UGT 同工酶的底物特性。它至少包含 6 个不同的外显子,分别编码六个不同的同工酶。后来,人们又分离到一种酚型 UGT 同工酶 UGT1*02,它与 UGT1 具有同样的羧基端。因此,UGT1 至少有 7 个同工酶,其羧基端是由 4 个外显子编码,组成了 UGT1 的保守序列,唯一不同的是氨基端的第一外显子 UGT1 家族成员来源于同一基因的不同剪切^[16]。到现为止一共分离纯化了至少 18 种人类 UGT 同工酶。并且很多已被克隆。Tarja Forsman^[17]等利用塞梅利基森林病毒为载体对人 UGT1A6 与 UGT1A9 进行了克隆和表达;Guillemette^[18]等发现 UGT1A7 由于在其主要结构位置上第 129、131 与 208 位的氨基酸不同,故可产生四个不同的 UGT1A7 等位基因的变形体,即:UGT1A7*1、UGT1A7*2、UGT1A7*3、UGT1A7*4。

UGT2 家族成员可分为 UGT2A 与 UGT2B 两个正家族。UGT2A 是由在嗅觉上皮表达的基因编码;UGT2B 也包含了大量的同工酶,然而比较其 cDNA 序列表明 UGT2B 是由独立的不同的基因编码。但人类的 UGT2B4、UGT2B9 和 UGT2B13 这些基因均定位在染色体 4q13^[19]。UGT2B 能催化胆汁酸、类固醇、脂肪酸、酚和苯并芘等致癌物的代谢。Levesque^[20]等发现都被一个 UGT2B28 基因编码的有 UGT2B28 I 型、UGT2B28 II 型与 UGT2B28 III 型,其中 I 型有 529 个氨基酸,长为 1666bp;II 型在辅因子结合域比 I 少了 308 个 bp;III 型则在被确定的基质结合区域比 I 型少了 351 个 bp。Turgeon、D^[21]等分离纯化了人 UGT2B15 基因并描述了它的特性,发现 hUGT2B15 基因位于串生状的 UGT2B 基因内部,且是第四染色体上的假基因。

伴随着 cDNA 克隆与测序技术到来,对 UGT 分子进行详细的分析已成为可能。早在 1984 - 1985 年间就报道过对 UGT 的 cDNA 进行克隆。最初认为各种 UGTs 是由它们的限制性图谱所决定的,随后核酸分析技术证实了这一点。且通过对 UGT 的 cDNA 的克隆更进一步证实了人体肝脏中多种 UGT 同工酶的存在,如在 COS-1 细胞中能够克隆出人肝中的 UGTh-2,它是通过与老鼠的 cDNA 克隆进行杂交而从噬菌体 cDNA 文库中分离而得到。Markenize 在 COS-7 细胞中表达了由苯巴比妥诱导的克隆型 UGTr-2F,并且利用对小鼠与人体 UGTs cDNA 克隆的序列分析,可绘制出 UGT 的功能图谱,如下:



近年来,人们利用 UGT 的分子生物学技术,对胆红素葡萄糖醛酸化缺陷性疾病进行了广泛的研究。认为 UGT1 基因突变是发生 GS 综合症的基础,但突变位点各不相同^[22]。GS 患者胆红素葡萄糖醛酸化能力下降是由于胆红素 UGT 的表达下降所致^[23]。而 CN 型综合症也是由于大量的基因突变所致,其中 CN-I 型病人是所有的胆红素 UGT 活性完全丧失,并有大量对其突变部位进行研究的报道。而 CN-II 型则是部分失活,Seppen 认为根据 UGT1 残存的酶活性来区分 CN-I 型与 CN-II 型,对是否需要肝脏移植及预测后方面有着重要的临床意义。Kaclakol - A^[24]等发现胆红素主要与 UGT1A1 结合,如果 UGT1A1 基因发生突变或损伤,则会导致 CN 或 GS 综合症。其中 GS 综合症主要与 UGT1A1 基因启动子上游距启动子约 25 - 35 个 bp 处的 TATA 盒有关,同时也发现抗癌药的副作用是减少药物或胆红素与 UDPGA 结合。Bhasker, - C - R^[25]等发现 UGT2B7 在第 268 位氨基酸上的基因多态性就决定其等位基因的多样性及其对药理学、毒理学与生理学等有着重要的临床意义。Guillemette, - C^[26]等发现 UGT1A1 的基因多态性与在非洲的美国人的肺癌有关。

参考文献

- 1 Radominska Pandya A, Czernik PJ, Little JM, *et al*. Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferase. *Drug Metab Rev*, 1999, Nov;31:817.
- 2 Mulder GJ. Pharmacological effects of drug conjugates is morphine β -glucuronide an exception? *Trends Pharmacol Sci*, 1992, 13:302.
- 3 FEDERICO INNOCENTI, LAITHA IYER, JACQUELINE RAMIREZ *et al*. Epirubicin Glucuronidation is Catalyzed by human UDP-glucuronosyltransferase. *Drug Metabolism and Disposition*, 2001, 29(5):686.
- 4 Barbier O, Turgeon D, Giard C, *et al*. AZT is glucuronidated by human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 [UGT2B7]. *Drug Metab Dispose*, 2000, 28(5):497.
- 5 Gueraud F; Paris A. Glucuronidation: a dual control. *Gen Pharmacol*, 1998, 31:683.
- 6 Brierley CH, Burchell B. Human UDP-glucuronosyltransferase: chemical defence, jaundice and gene therapy. *Bioessays*, 1993, 15:749.
- 7 Li Xin, Yu Ying-nian. Advances in Research of Drug Phase II Metabolisms and Conjugation Enzymes. *Journal of Clin Pharmacology of China*, 2001, Nov;6:458.
- 8 Wildt SN, Kearns GL, Leeder JS, *et al*. Glucuronidation in humans. Pharmacogenetic and developmental aspects. *Clin Pharmacokinet*, 1999, 36:439.

- 9 Bock KW, Gschaidmeier H, Heel H, *et al.* Functions and transcriptional regulation of PAH-inducible human UDP-Glucuronosyltransferases. *Drug Metabolism Reviews*, 1999, 31: 411.
- 10 ZHANG Hong-Jun, ZHU Xue-Guang, YE Ying-Jiang. Gender-related differences in the activity of hepatic bilirubin UGT of C57BL/6J mice. *Journal of Beijing Medical University*, 1999, 31(1): 65.
- 11 Valerie Haberkorn, Jean-Marie Hegbel, Jacques Mounie, *et al.* Influence of vitamin A status on the regulation of UGT1A1 and UGT1A6 expression by L-triiodothyronine. *British Journal of Mutation*, 2001, 85(3): 289.
- 12 Yan Q-Li, David A Prentice, Monique L-Howard *et al.* Alcohol up-regulates UGT mRNA expression in rat liver and in primary rat hepatocyte culture. *Life Science*, 2000, 66(7): 575.
- 13 Aoki K, Sura Wada G-H, Segawa H, *et al.* Expression and activity of chimeric molecules between human UDP-glucuronosyltransferases and CMP-sialic acid transporter. *J Biochem (Tokyo)*, 1999, 126(5): 940.
- 14 Burchell B, Coughtrie M W. Genetic and environmental factors associated with variation of human xenobiotic glucuronidation and sulfation. *Environ Health Perspect*, 1997, 105: 739.
- 15 Burchell B, *et al.* The UDP-glucuronosyltransferases gene superfamily, suggested nomenclature based on evolutionary divergence. *DNA Cell Biol*, 1991, 10(7): 487.
- 16 Wooster R, *et al.* Cloning and expression of a new member of the human liver phenol/bilirubin, UDP-glucuronosyltransferases cDNA family. *Biochem J*, 1991, 278: 465.
- 17 Tarja Forman, Pia Lantala, Kenneth Lundstrom *et al.* Production of human UGT1A6 and 1A9 using the Semliki Forest Virus expression system. *Life Science*, 2000, 67(20): 2473.
- 18 Guillemette C, Ritter J-K, Augeun D-J, Kessler F-K. Structural heterogeneity at the UDP-glucuronosyltransferases I locus: functional consequences of three novel missense mutations in the human UGT1A7 gene. *Pharmacogenetics*, 2000, 10(7): 629.
- 19 Momaghan G, *et al.* Of a human YAC containing an overlapping cluster of UGT2 genes and its regional localization in chromosome 4q13. *Genomics*, 1994, 23: 496.
- 20 Levesque E, Turgeon D, Carrier JS, *et al.* Isolation and characterization of the UGT2B28 encoding a novel human steroid conjugating UDP-glucuronosyltransferase. *Biochemistry*, 2001, 40(13): 3869.
- 21 Turgeon D, Carrier JS, Levesque E. Isolation and characterization of the human UGT2B15 gene, localized within a cluster of UGT2B genes and pseudogenes on chromosome 4. *J Mol Biol*, 2000, 295(3): 489.
- 22 Boanna PJ, *et al.* The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDPGT in GS. *N Engl J Med*, 1995, 333: 1171.
- 23 Dierks P, *et al.* Three regions upstream from the cap site are required for efficient and accurate transcription of the rabbit beta-globin genes in mouse 3T6 cell. *Cell*, 1993, 32: 695.
- 24 Burchell B, Soars M, Monaghan G, *et al.* Drug-mediated toxicity caused by genetic deficiency of UDP-glucuronosyltransferases. *Toxicol Lett*, 2000, 112(11): 3333.
- 25 Bhasker CR, McKinnon W, Stone A. Genetic polymorphism of UDP-glucuronosyltransferases at amino acid 268: ethnic diversity of alleles and potential clinical significance. *Pharmacogenetics*, 2000, 10(8): 678.
- 26 Guillemette C, Millikan RC, Newman B. Genetic polymorphisms in uridine diphosphate glucuronosyltransferases 1A1 and association with breast cancer among African Americans. *Cancer Research*, 2000, 60(4): 950.