

# 大豆苷元在人肝微粒体中的单羟化代谢机制

彭文兴<sup>1\*</sup>, 李焕德<sup>1</sup>, 周宏灏<sup>2</sup>

(中南大学 1. 湘雅二医院 临床药学研究室, 湖南 长沙 410011; 2. 临床药理研究所, 湖南 长沙 410078)

**摘要:** 目的 探讨大豆苷元在人肝微粒体中羟基化代谢所涉及的肝细胞色素 P450 (CYP) 同工酶, 为研究其在人体内的代谢提供基础。方法 通过分析大豆苷元在肝微粒体中和重组 CYP 酶中形成的单羟化代谢物的酶促动力学, 分析其酶学模型, 然后用不同 CYP 同工酶选择性抑制剂或底物进行抑制实验, 初步筛选出介导大豆苷元单羟化代谢所涉及的 CYP 同工酶。结果 代谢物的形成动力学符合米氏方程单酶模型。CYP1A2 选择性抑制剂呋喃茶碱和 CYP1A2 单克隆抗体均能明显抑制 3 种单羟化代谢物的形成。而其他 CYP 选择性的抑制剂对 3 种代谢物的形成没有或较小产生抑制作用。用重组酶实验得出相同结果。结论 体外肝微粒体研究表明, 大豆苷元的单羟基代谢主要由 CYP1A2 所介导。

**关键词:** 大豆苷元; 人肝微粒体; 羟基化代谢; 细胞色素 P450 (CYP1A2)

中图分类号: R282.71; R969 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2004)11 - 0892 - 05

## Mechanism of mono hydroxylation of daidzein in human liver microsomes

PENG Wen-xing<sup>1\*</sup>, LI Huan-de<sup>1</sup>, ZHOU Hong-hao<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Pharmacy, Second Xiang Ya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China;

2. Clinical Pharmacology Institute, Central South University, Changsha 410078, China)

**Abstract:** **Aim** To identify the cytochrome P450 (CYP) isoform (s) involved in daidzein mono-hydroxylated metabolites using human liver microsomes. **Methods** Kinetic analysis of the rates of formation of mono-hydroxylated metabolites of daidzein, including 7,8,4'-trihydroxyisoflavone (7,8,4'-THI), 7,3',4'-trihydroxyisoflavone (7,3',4'-THI) and 6,7,4'-trihydroxyisoflavone (6,7,4'-THI), was performed using human liver microsomes (HLM) and recombinant enzymes at substrate concentrations ranging from 0.5 to 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Nine selective inhibitors or substrate probes specific for different CYP isoforms were applied for screening the isoform (s) responsible for mono-hydroxylated metabolism of daidzein. **Results** Michaelis-Menten kinetic parameters were best fitted to one-component enzyme kinetic model. The mean  $K_m$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and  $V_{\max}$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) values were  $27\pm 10$  and  $4.8\pm 2.1$ ,  $54\pm 22$  and  $2.3\pm 1.0$ ,  $51\pm 29$  and  $2.2\pm 0.8$ , for the formation rates of 7,8,4'-THI, 7,3',4'-THI, and 6,7,4'-THI, respectively. Furfurylline, the CYP1A2 specific inhibitor, estrogen, and monoclonal antibody raised against human CYP1A2 (MAB-1A2) apparently inhibited the formation of mono-hydroxylated metabolites. The  $IC_{50}$  of Fur for the formation of 7,3',4'-THI, 6,7,4'-THI and 7,8,4'-THI was 1.0, 0.9 and 0.8  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. The  $IC_{50}$  of estrogen for the formation of 7,3',4'-THI, 6,7,4'-THI and 7,8,4'-THI were 51, 60 and 64  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. The  $IC_{50}$  of MAB-1A2 for the formation of the mono-hydroxylated products was 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , but neither other selective inhibitor nor substrate probes, including coumarin (CYP2D6), sulphaphenazole (CYP2C9/10), omeprazole (CYP2C19), quinidine (CYP2D6), diethyldithiocarbamate (CYP2E1), troleandomycin (CYP3A4) and ketoconazole (CYP3A4), did so with human liver microsomes. **Conclusion** The *in vitro* studies indicated that daidzein mono-hydroxylated products were principally metabolized by CYP1A2 in human.

收稿日期: 2003-12-31.

基金项目: 美国中华医学基金会 (CMB) 基金资助项目 (99-697,01-755).

通讯作者 Tel: 86 - 731 - 5524222 - 2275, Fax: 86 - 731 - 4436720, E-mail: pwx.csu@163.com

**Key words:** daidzein; human liver microsomes; hydroxylation metabolism; cytochrome P450 (CYP1A2)

大豆苷元(daidzein)为植物中主要异黄酮之一,存在于大豆及多种植物之中。当前研究发现异黄酮具有扩张心脑血管、抗骨质疏松和抗肿瘤的作用<sup>[1]</sup>,国外流行病学调查研究发现,长期服用大豆制品的人群其乳腺癌的发病率明显较其他人群低。异黄酮的抗癌作用机制可能为性激素的调节作用、抑制酪氨酸蛋白激酶活性、抑制拓扑异构酶 II 活性、抗氧化作用和诱发癌细胞凋亡等。

有关异黄酮的代谢在人体尚缺乏研究。药代动力学实验发现口服大豆苷元 7% - 30% 以原形从尿中排出,少于 10% 从粪中排出,表明该物质在体内可能进行广泛的氧化代谢。国外学者采用大鼠和人肝微粒体证实了大豆苷元经肝微粒体代谢,主要生成 3 种三羟基化合物,即 7,8,4'-三羟基异黄酮,7,3',4'-三羟基异黄酮,6,7,4'-三羟基异黄酮<sup>[2,3]</sup>。然而,究竟为哪几种药物代谢酶介导其代谢尚未明了。

现已知,肝及肠道中细胞色素 P450 (CYP) 家族能代谢大量的内源性和外源性物质,而且在大鼠和人肝微粒体研究发现其他一些异黄酮物质经 CYP 代谢<sup>[4]</sup>。因此,本研究的目的是采用人肝微粒体及基因重组酶研究大豆苷元单羟基化代谢所涉及的 CYP 同工酶。

## 材料与方法

**药品与试剂** 大豆苷元,7,3',4'-,6,7,4'-,7,8,4'-三羟基异黄酮(M1, M2, M3),购自 Sigma-Aldrich 公司,呋喃茶碱(furafylline, Fur),雌激素(estrogen),奎尼丁(Qui),醋竹桃霉素(troleandomycin, TAO),二乙二硫氨基甲酸酯(diethyldithiocarbamate, DDC),香豆素(coumarin, Cou),奥美拉唑(omeprazole, Ome),葡萄糖-6-磷酸(G-6-P),氧化型辅酶 II (NADP),葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和  $\beta$  葡糖醛酸酶购自 Sigma 公司(St. Louis, MO, USA);磺胺苯吡唑(sulphaphenazole, Sul)由诺华制药公司(Basel, Switzerland)提供;酮康唑(ketoconazole, Ket)由杨森公司馈赠;乙腈为色谱纯(美国 Tedia 公司),水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

**仪器** 美国 Waters Micromass ZQ 液相色谱-质谱联用仪。

**肝标本的收集及肝微粒体的制备** 从部分肝切除患者获得正常的肝标本,参照文献报道将肝标本

切成碎片,匀浆,加入 Tris 缓冲液,采用差速离心法制备肝微粒体悬液,肝微粒体置于 -80 °C 冰箱中保存,微粒体蛋白测定采用 Lowry 等建立的方法。

**cDNA 表达酶(cDNA expressed enzymes)** 通过以 DNA 传染的人淋巴母细胞分别表达 CYP1A2, CYP3A4, CYP2C19, CYP2C9 和 CYP2D6 同工酶及 CYP1A2 单克隆抗体(MAB-1A2),均购于 Gentest Corp. (Woburn, MA)。

**肝微粒体孵化条件** 在孵化缓冲液 0.5 mL 中含微粒体蛋白 0.2 g·L<sup>-1</sup>,磷酸钾缓冲液(pH 7.4) 0.1 mol·L<sup>-1</sup>, G-6-P 20 g·L<sup>-1</sup>, NADP 20 mg·L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 13.3 mg·L<sup>-1</sup> 和不同浓度的大豆苷元。混合物置于 37 °C 水浴摇床中,预孵 5 min,然后加入 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 20 U 孵化 30 min,反应物置于冰水中并加乙腈 100  $\mu$ L 终止反应,12 000 × g 离心 10 min,上清液 20  $\mu$ L 注入高效液相色谱-质谱系统。

37 °C 的条件下孵育,在孵育时间 0 - 30 min 和微粒体蛋白浓度 0 - 0.2 g·L<sup>-1</sup>,单羟基化代谢物(包括 M1, M2, M3)形成率呈线性。初始试验,采用 0.5 - 400  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 的一系列大豆苷元浓度,以确定正式实验中大豆苷元的加入浓度,确保合理计算每个代谢物形成  $V_{max}$  和  $K_{max}$ 。所有的孵化实验均进行双份。通过在反应体系中不加入 6-磷酸葡萄糖脱氢酶来证实代谢物的形成是氧化反应的产物。

**抑制试验** 9 种 CYP 同工酶选择性的抑制剂或底物探针用于抑制试验。采用 5 个肝微粒体进行实验,底物大豆苷元的浓度为 50  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>。不同浓度的 CYP 抑制剂(竞争性底物)或单克隆抗体加入微粒体反应系统中,37 °C 孵育 5 min,再加入大豆苷元,整个孵育过程 30 min,孵化混合物最终蛋白质量浓度为 0.2 g·L<sup>-1</sup>。抑制试验分别采用不同浓度的呋喃茶碱和 1A2 单克隆抗体来进行试验。

**分析方法** 参考文献[5],采用高效液相色谱-质谱法测定大豆苷元及其代谢产物,色谱柱为 Waters Xterra MS C<sub>18</sub> 型,流动相为 0.1% 甲酸-乙腈,采用梯度洗脱;ESI 正离子检测;选择离子流色谱见图 1。

大豆苷元在 0.5 - 400  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>、单羟基化代谢物 5 - 200 nmol·L<sup>-1</sup> 浓度与相应的峰高线性关系良好,日内、日间精密度小于 8%,最低检测限均为 5 nmol·L<sup>-1</sup>。大豆苷元的回收率为 95.2% - 99.4%,

代谢物的回收率为 94.8 % - 98.3 %。

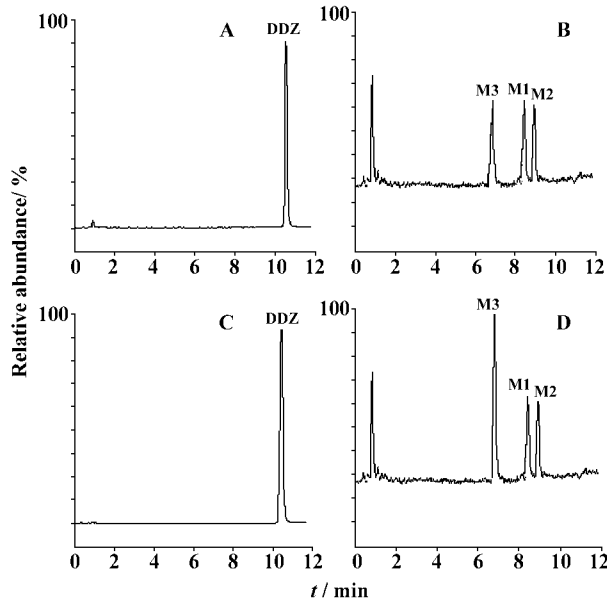


Figure 1 Response of ESI-MS protonated molecule chromatogram for daidzein (DDZ,  $m/z$  255) and THI ( $m/z$  271). Standard elution profile of daidzein (A), of THI (B); elution profile of daidzein (C) and of THI (D) derived from daidzein incubated in liver microsomes reaction mixture

**数据分析** 动力学参数采用 Eadie-Hofstee 曲线进行初步估计,然后经最小线性二乘法,以单酶动力学公式进行计算,公式为  $V = V_{max} \times C / (K_m + C)$ ,其中  $V_{max}$  为最大酶反应速度,  $K_m$  为米氏亲和力常数,  $C$  为反应速度等于 50%  $V_{max}$  的底物浓度。

## 结果

### 1 大豆苷元在人肝微粒体代谢的酶促动力学试验

实验结果发现,大豆苷元在人肝微粒体孵化后主要形成 3 种单羟基代谢物(M1, M2, M3),从 Eadie-Hofstee 曲线可以看出,大豆苷元(0.5 - 400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )形成的单羟基代谢物的量与底物浓度明显相关。从图 2 可以看出 Eadie-Hofstee 曲线呈单相米氏动力学方程,提示可能为单一 CYP 同工酶参与大豆苷元的羟基化代谢。通过酶学动力学计算可得米氏方程参数(表 1),从表可以看出动力学参数之间存在明显的个体差异。

采用基因重组人 CYP 同工酶进行实验发现,在大豆苷元的浓度为 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,仅有 CYP1A2 参与了大豆苷元的单羟基代谢,酶促动力学曲线与肝微粒体实验所得的曲线相似。 $K_m$  和  $V_{max}$  分别为 42.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和 5.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。重组酶包括

CYP3A4, CYP2C19, CYP2C9 和 CYP2D6,均不参与大豆苷元的单羟基代谢。

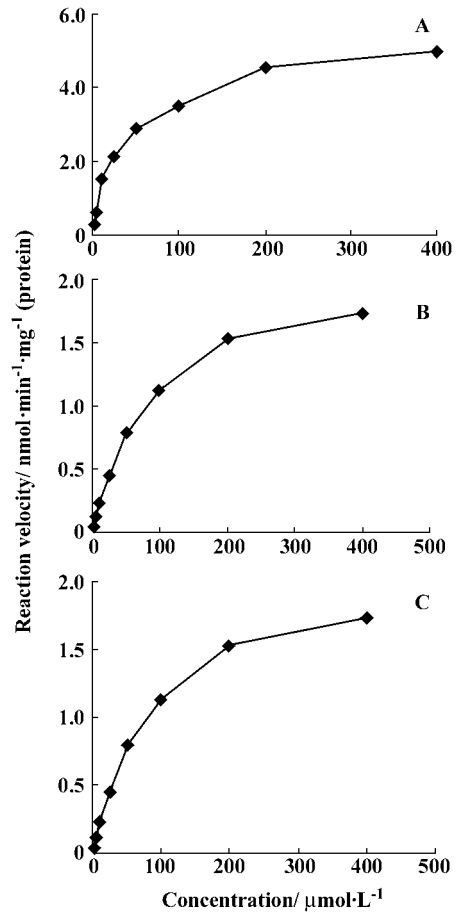


Figure 2 Representative Eadie-Hofstee plots for daidzein hydroxylated metabolites in human microsomes reaction system: 7,8,4'-THI (A), 7,3',4'-THI (B), 6,7,4'-THI (C)

**Table 1 Kinetic parameters of daidzein mono-hydroxylated metabolites obtained from human liver microsomes revealing a monophasic behavior in the Eadie-Hofstee plots**

Group	7,8,4'-THI		7,3',4'-THI		6,7,4'-THI	
	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$
HL01	30.46	3.36	83.57	2.36	47.77	1.41
HL02	22.20	8.01	61.06	3.95	28.61	2.98
HL03	34.71	4.82	51.37	2.18	73.60	3.12
HL04	10.86	2.61	21.70	1.16	19.06	1.44
HL05	36.07	5.01	51.46	1.78	88.37	2.12
$\bar{x} \pm s$	27 ± 10	4.8 ± 2.1	54 ± 22	2.3 ± 1.0	51 ± 29	2.2 ± 0.8

Daidzein (0.5 - 400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) incubated with 5 human liver microsomes (HL01 - HL05).  $K_m$  ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ): Michaelis-Menten constant;  $V_{max}$  [ $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}(\text{protein}) \cdot \text{min}^{-1}$ ]: Maximum reaction velocity.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 2 大豆苷元在人肝微粒体代谢的酶抑制试验

不同浓度的各种 CYP 同工酶特异性抑制剂(或底物)对大豆苷元在肝微粒体的单羟基代谢的抑制

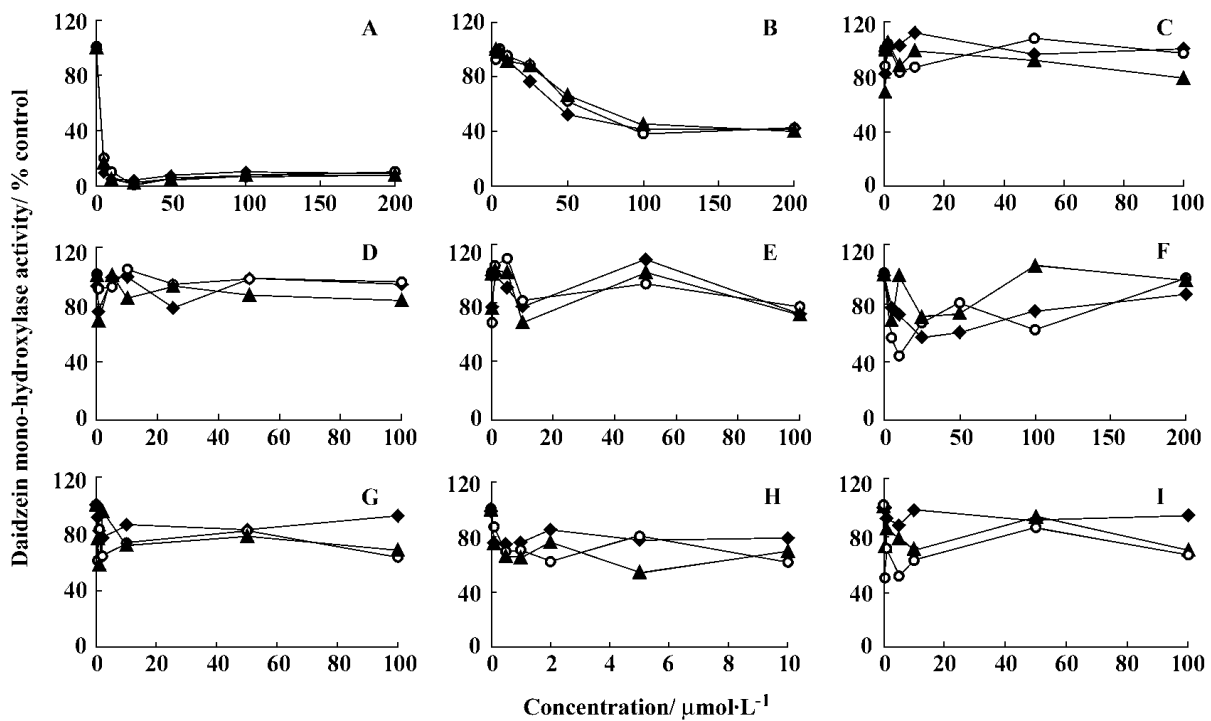
情况见图 3。根据不同肝微粒体得到的代表性的  $K_m$  值,选择实验所用大豆苷元的浓度为  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。实验发现呋喃茶碱和雌激素对单羟基代谢物的形成具有明显的抑制作用,与呋喃茶碱相比,雌激素稍弱些;而其他 CYP 特异性的抑制剂或底物对代谢物的形成无或有很弱的抑制作用(图 3)。呋喃茶碱抑制形成 M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> 和 M<sub>3</sub> 的  $IC_{50}$  分别为 1.0, 0.9 和  $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,最大抑制浓度为  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;雌激素抑制形成 M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> 和 M<sub>3</sub> 的  $IC_{50}$  分别是 51, 60 和  $64 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,雌激素对形成 M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> 和 M<sub>3</sub> 的最大抑制率分别为 58%, 62% 和 60%。选择适当抑制剂浓度(呋喃茶碱浓度为  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 雌激素为  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )进行酶促动力学试验,计算动力学参数,见表 2。单克隆抗体 MAB-1 A2 抑制形成单羟基代谢

物的  $IC_{50}$  为  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 讨论

目前发现大豆异黄酮具有广泛的生物学活性和对人体有益的作用,因此,研究其体内外代谢对阐明其作用机制有重要意义。最近国外学者研究证实大豆苷元在大鼠及人肝微粒体进行了氧化代谢,显示大豆苷元为肝脏细胞色素 P450 氧化酶很好的底物<sup>[2,3]</sup>。本研究首次阐明了 CYP1 A2 同工酶参与了大豆苷元的代谢。

体外大豆苷元与肝微粒体或细胞色素 P450 基因重组酶均能形成 M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> 和 M<sub>3</sub>。此结果与 Kulling 等<sup>[3]</sup>的报道一致。尽管单羟基代谢物可进一步代谢成二羟基化或多羟基化代谢物,但单羟基



◆—◆ 7,8,4'-THI; ○—○ 7,3',4'-THI; ▲—▲ 6,7,4'-THI; A: Furafylline; B: Estrogen; C: Diethyldithiocarbamate; D: Troleandomycin; E: Quinidine; F: Coumarin; G: Omeprazol; H: Ketoconazole; I: Sulphaphenazole

Figure 3 Effect of CYP-specific inhibitors on daidzein metabolism at  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  of daidzein. Data represent formation rates relative to control activity (without inhibitor), mean values of 5 liver microsomes

Table 2 Effects of furafylline and estrogen on the metabolism of daidzein in human liver microsomes

Group/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	7,8,4'-THI			7,3',4'-THI			6,7,4'-THI		
	$K_m$	$V_{max}$	$K_i$	$K_m$	$V_{max}$	$K_i$	$K_m$	$V_{max}$	$K_i$
Furafylline 1	20.46	1.36	2.15	32.51	1.32	1.10	28.17	1.41	0.94
Estrogen 50	32.21	3.01	3.57	36.87	2.95	2.56	34.35	2.12	2.12

$K_m$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ): Michaelis-Menten constant;  $V_{max}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$  (protein)  $\cdot\text{min}^{-1}$ ]: Maximum reaction velocity;  $K_i$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ): Constant of inhibition

化是其进行氧化代谢的关键步骤。体外研究的酶学

动力学表明,大豆苷元在体外肝微粒体中主要由单

一细胞色素 P450 同工酶代谢,预示体内也可能主要为单一酶所代谢。

在人肝微粒体中, CYP1A2 选择性抑制剂呋喃茶碱明显抑制大豆苷元的单羟基代谢,抑制率在  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  大豆苷元时大于 80%,此浓度与健康志愿者 *po* 经烤制的大豆粉 60 g 后血中异黄酮的峰浓度相似<sup>[6]</sup>。雌激素为 CYP1A2 底物,通过与大豆苷元竞争 CYP1A2 而抑制大豆苷元的代谢,但其对 CYP1A2 的抑制较呋喃茶碱弱,这可能与其本身除了为 CYP1A2 的底物外,还可经 CYP3A 代谢有关。其他 CYP 选择性抑制剂或底物对单羟基代谢物的形成无或有很弱的抑制活性。CYP1A2 重组酶与大豆苷元孵化可形成单羟基代谢物,而 CYP1A2 选择性单克隆抗体 MAB 能明显抑制此反应。相反,采用别的重组酶试验,包括 CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6 和 CYP2C9,均不能代谢大豆苷元。这些结果与 Roberts-Kirchhoff 等<sup>[4]</sup>研究另一主要异黄酮染料木素 (genistein) 的体外代谢结果相似,其单羟基代谢主要由重组酶 CYP1A1 和 CYP1A2 介导,另外 CYP1B1 和 CYP2E1 有较弱的抑制活性;CYP1A1 和 CYP1B1 为肝外代谢酶,而 CYP2E1 在肝脏的蛋白含量较 CYP1A2 低得多,因此在人肝脏中 CYP1A2 对染料木素单羟基代谢起主要作用。

CYP1A2 为肝细胞中重要的酶,催化很多药物和化学物质特别是致癌物质的生物转化。由于大豆苷元主要由 CYP1A2 所介导,有可能与经 CYP1A2 所代谢的药物产生相互作用。已知雌激素(包括雌二醇、孕酮、雌酮和  $17\beta$  雌二醇)主要由 CYP1A2 所代谢<sup>[7,8]</sup>。因此,如果长期服用大豆或含大豆苷元的食物可能会导致体内雌激素水平的改变。如 Lu 等<sup>[8]</sup>报道,绝经前妇女长期食用富含大豆苷元和染料木素的豆类饮食提高尿中 2-羟基雌酮的含量,这可能会对降低乳腺癌的发生具有很重要的意义。另外,值得注意的是,肝外 CYP 同工酶如 CYP1A1 可能也如 Roberts-Kirchhoff 等<sup>[4]</sup>报道的一样,参与了大豆苷元

的代谢。

本研究证明了在人体外肝微粒体中,大豆苷元单羟基代谢主要形成 3 种代谢物(M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> 和 M<sub>3</sub>)。虽然羟化分别在 C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub> 和 C<sub>8</sub> 上,但均为 CYP1A2 所介导。由于试验采用的大豆苷元浓度较体内血中大豆苷元的浓度较高,试验结果还须得到体内试验的验证。

致谢:本实验得到王连生博士、程泽能博士和刘昭前博士的帮助。

## References:

- [1] Temple NJ. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women [J]. *Am J Epidemiol*, 2000, **151**(6): 634 - 635.
- [2] Kulling SE, Honig DM, Simat TJ. Oxidative *in vitro* metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, **48**(10): 4963 - 4972.
- [3] Kulling SE, Honig DM, Manfred M. Oxidative metabolism of the soy isoflavone daidzein and genistein in humans *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, **49**(6): 3024 - 3033.
- [4] Roberts-Kirchhoff ES, Crowley JR, Hollenberg PF, *et al.* Metabolism of genistein by rat and human cytochrome P450s [J]. *Chem Res Toxicol*, 1999, **12**(7): 610 - 616.
- [5] Holder CL, Churchwell MI, Doerge DR. Quantification of soy isoflavones, genistein and daidzein, and conjugates in rat blood using LC/ES-MS [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, **47**(9): 3764 - 3770.
- [6] Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, *et al.* Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako) [J]. *J Nutr*, 1998, **128**(10): 1710 - 1715.
- [7] Badawi AF, Cavalieri EL, Rogan EG. Role of human cytochrome P450 1A1, 1A2, 1B1, and 3A4 in the 2-, 4-, and 16 $\alpha$ -hydroxylation of 17 $\beta$ -estradiol [J]. *Metabolism*, 2001, **50**(9): 1001 - 1003.
- [8] Lu LJ, Cree M, Josyula S, *et al.* Increased urinary excretion of 2-hydroxyestrone but not 16 $\alpha$ -hydroxyestrone in premenopausal woman during a soy diet containing isoflavones [J]. *Cancer Res*, 2000, **60**(5): 1299.