

· 药 学 进 展 ·

# 药物肠代谢研究方法 with 中药肠代谢的研究进展\*

杜 秋,狄留庆,单进军,李俊松,赵晓莉,毕肖林

(南京中医药大学中医药研究院,210046)

**[摘 要]** 介绍药物肠代谢研究方法以及中药肠代谢的研究进展。小肠在药物的首关代谢中日益受到重视,其研究的方法学也在不断改进,主要有体外法和在体法。体外法中重点介绍了肠微粒体法、完整组织系统法、Caco-2 细胞模型法及肠组织切片法,从肠道内的 I 相、II 相代谢酶对中药的作用提出肠道代谢的重要性。

**[关键词]** 中药;肠代谢;首关代谢

**[中图分类号]** R969.1;R286

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-0781(2009)12-1595-03

肝脏在药物代谢过程中有非常重要的作用。近年来,小肠肠壁的首过清除率也逐渐受到重视,PAINE 等<sup>[1]</sup>发现虽然小肠内 CYP3A 的量只有肝脏的 1%,但是肠道内 CYP3A 对一些药物,如环孢霉素 A<sup>[2]</sup>、咪达唑仑<sup>[3]</sup>、维拉帕米<sup>[4]</sup>等的首关效应有非常重要的作用,甚至与肝脏相当。笔者综述国内外的相关资料,对目前小肠内药物代谢的研究方法进行了比较。小肠黏膜上皮细胞是口服药物的第一个代谢点,是药物肝外代谢的主要部位之一,通过自身所表达的药物代谢酶(主要是 CYP)氧化代谢多种药物,由此影响药物的首关代谢和生物利用度,对口服药物的毒性和疗效以及药物与药物、药物与食物的相互作用有潜在的影响<sup>[5]</sup>。上皮细胞内具有众多的代谢酶,主要包括多种类型的细胞色素 P450 酶(CYPs)、水解酶、脱氢酶等 I 相代谢酶,葡萄糖醛酸转移酶(UDPGT)、硫酸转移酶(ST)、甲基转移酶(MT)等 II 相代谢酶。I 相酶主要参与药物的氧化、水解、还原等过程,其中 CYP 酶主要负责内源性和外源性化合物的氧化代谢;II 相酶主要参与药物的结合过程,且 II 相酶 UDPGT 和 GST 在机体解毒过程中起着重要的作用。

## 1 药物肠代谢研究方法

**1.1 体外法** 体外方法是研究小肠内药物代谢酶的主要方法,体外代谢研究可以排除体内因素干扰,直接观察酶对底物的选择代谢性,为整体实验提供可靠的理论依据。对于体内代谢转化率低、毒性大及缺乏灵敏检测手段的药物,体外代谢研究是一种良好的研究方法。

**1.1.1 肠微粒体法** 肠微粒体细胞色素 P<sub>450</sub> 混合功能酶系统,是催化多种药物、前毒物、前致癌物等外源性物质的氧化和还

原代谢的主要 I 相酶类。该肠道酶系统在药物的代谢中越来越受到重视。肠微粒体法是由制备的肠微粒体与 CYP450 特定的探针药物在模拟生理温度及生理环境条件下进行生化反应的体系,制备肠微粒体一般采用差速离心法<sup>[1]</sup>。

肠细胞色素 P<sub>450</sub> (CYP450S) 的特点:细胞色素 P<sub>450</sub> (CYP450S) 是肠微粒体混合功能氧化酶系的主要成分,是一组由许多同工酶组成的超基因大家族,涉及大多数药物代谢的 P<sub>450</sub> 酶系主要有 CYP1、CYP2、CYP3 等 3 个家族,根据代谢转化的特点,可有目的地进行诱导,影响其酶的亚型,使其对底物的代谢选择性更强及转化率更高。PAINE 等<sup>[5]</sup>从 31 个人的小肠的十二指肠、空肠的黏膜处刮下微粒体,采用 Western blot 法进行定量分析,得出在人体小肠处 CYP450 亚型的量依次为:3A4 > 2C9 > 2C19 > 2J2 > 2D6,其中 CYP3A、CYP2C9 各占其中的 80% 和 15%,CYP3A4 的表达沿胃肠道向下存在明显梯度。这与人肝脏中的酶分布显著不同。不同诱导药及抑制药诱导或抑制不同 P<sub>450</sub> 酶亚型<sup>[6,7]</sup>,见表 1。

肠微粒体体外温孵法与其他的体外肠代谢方法比较,具有酶制备技术简单、代谢过程快、结果重现性好、易大量操作、便于积累代谢样品供结构研究等优点。同时,该方法可用于对药物的抑制及体外代谢清除等方面的研究,因而在实际工作中应用较为普遍。但肠微粒体体外温孵法与其他体外肠代谢方法相比,与体内情况的一致性方面存在不足,如缺乏膜转运体及一些酶系统的影响,且很大程度上依靠微粒体分离结果的好坏。

### 1.1.2 完整组织系统法

**1.1.2.1 完整黏膜法 (ussing chamber)** 完整黏膜法一直被用于预

表 1 人肠中 P<sub>450</sub> 酶亚型对应的诱导药、抑制药及代谢特点

酶亚型	诱导剂	抑制剂	代谢特点
CYP1A1	β-萘黄酮,3-甲基胆蒽	α-萘黄酮	肠道内含量较少
CYP2C9	利福平	磺胺吡唑,甲苯磺丁脲,氟康唑	底物:双氯芬酸,甲苯磺丁脲
CYP2C19	利福平	奥美拉唑	底物:美酚妥英
CYP2D6	巴比妥类	奎尼丁,奎宁	可代谢多个底物,如阿米替林、丁呋洛尔、氯丙咪嗪、氟哌啶醇、苯乙双胍、文拉法辛等
CYP2E1	异烟肼、乙醇	双硫仑,咪达唑仑	底物:氯唑沙宗,对乙酰氨基酚
CYP3A4	利福平、地塞米松、苯妥英类	葡萄柚汁,17-α-炔雌二醇	在许多内源性化合物的代谢中起着重要作用,可参与红霉素、鞣醌、环孢霉素、咪达唑仑、硝苯地平 等 38 个类别、共 150 多种药物在体内的代谢

测药物在肠的吸收模型,也被用于评价肠内酶活性<sup>[8]</sup>。把黏膜组织放在转运室的装置上,暴露 1 cm<sup>2</sup> 的面积。膜两侧的腔室里装满 10 mL 有氧 K-R 液,不断通入 95% 氧气、5% 二氧化碳以维持组织活性,以 300 r · min<sup>-1</sup> 的速度搅拌,用水套慢慢加热直到 37 °C,等组织稳定 30 min 后开始实验。对黏膜或浆膜侧缓冲液进行取样分析,测定 I 相底物(表 1)和 II 相底物(7-羟基香豆素)的代谢产物决定小肠代谢酶的活性。可以从形态学、电学参数、渗透特性来评价该模型。完整黏膜法内酶活性研究,受到肠内转运体以及其他因素的影响,可以较系统地研究小肠内酶的活性。但是,该模型在实验过程中只能保持约 4 h<sup>[9]</sup>,易变质,且模型的建立需要较多的小肠组织(约 160 mg 的黏膜组织)。

**1.1.2.2 外翻肠囊法** 外翻肠囊法为剪取一段小肠,一端插管注入 0.9% 氯化钠注射液排除内容物。用一细玻棒将其翻转,使黏膜朝外浆膜朝内。肠一端结扎,另一端接一取样器,注入一定体积 K-R 液于肠囊内并将肠囊置于含有 K-R 液(内含药物)的瓶中,37 °C 孵育,充分供氧,定时取样。可反映其渗透和代谢情况。但是与完整黏膜法一样,虽然保留了组织的完整性,但是存活能力较差,在实验几小时内即丧失活性。

**1.1.3 Caco-2 细胞模型法** Caco-2 细胞系来源于人体结肠腺癌细胞。由于 Caco-2 细胞在培养条件下可自发进行上皮样分化并可形成紧密联结,其形态学、标志酶的功能表达及渗透特征与小肠类似。已被普遍用于药物开发的早期快速筛选过程中。

研究证实,Caco-2 细胞存在 CYP3A 样活性的酶及 CYP1A,但是表达较少,由于这些酶是影响药物口服吸收和生物利用度的关键酶,CHARLES 等<sup>[10]</sup>利用重组技术在 Caco-2 细胞中引入 CYP cDNAs,从而提高了 CYP3A4 和 CYP2A6 的表达,开拓了 Caco-2 模型在研究药物首关代谢方面的应用,提高了其体内相关性。另外,有研究发现<sup>[11]</sup>,Caco-2 细胞在多孔膜上与 100 nmol · L<sup>-1</sup> 1 $\alpha$ ,25-二羟维生素 D<sub>3</sub> 共培养 2 周后可诱导 Caco-2 细胞内 CYP3A4 mRNA 的表达,与重组技术一样也能形成一个用以研究药物小肠吸收首关效应的细胞模型。Caco-2 细胞也表达与人类小肠上皮细胞相关的磺基转移酶、谷胱甘肽 S-转移酶、 $\beta$ -葡糖醛酸糖苷酶,因此,Caco-2 细胞模型同样可作为药物分子在小肠上皮 II 相代谢研究的有效工具。Caco-2 细胞在药物小肠内的吸收和代谢的研究中有重要作用,但是这些细胞培养不同于正常小肠完整的结构和代谢功能,例如形成完全分化并具有紧密连接的单层细胞生物膜所需培养时间较长(21 ~ 28 d);缺乏分泌黏液的功能,不象小肠上皮能够形成黏液层;随着研究技术的不断改进,用 Caco-2 细

胞模型研究药物肠内代谢将会越来越成熟。

**1.1.4 完整小肠/结肠组织切片法** 小肠/结肠组织切片法是在 37 °C 的琼脂糖溶液中植入充满琼脂糖凝胶的肠段后,置于预冷的组织包埋器中(0 °C),用 Krumdieck 组织切片机精密切割得到的 300  $\mu$ m 厚,约 2 mg 的肠片段,于 WME 液中培养。将该片段分别与睾酮、7-乙氧基香豆素(I 相代谢底物),7-羟基香豆素(II 相代谢底物),CYP 酶的代谢底物(表 1)共同孵育 3 h 后,评价肠内药物代谢酶的活性。KERKHOF 等<sup>[12]</sup>采用此模型研究发现肠内酶的活性以及活力参数在孵育 3 h 后仍然保持稳定,孵育 24 h 后对诱导药  $\beta$ -萘黄酮及抑制药酮康唑也相当敏感。

肠组织切片法是研究药物代谢及其毒性的有效体外系统<sup>[8]</sup>,该法不破坏器官的细胞构成和组织结构,所得结果与体内法相近。不仅完整保留了所有肠药酶及各种细胞器的活性,而且,保留了细胞间的联系及一定的细胞间质,更能反映药物在体内生理情况下的实际代谢过程,且可在较长的孵育时间内保持代谢活性。比较其他的研究方法,该模型有更高的代谢酶活性。该法可以制备大量的切片,效率高,可以大大减少实验动物的用量,目前主要是切片限制了其广泛的应用。总之,该模型在研究体外小肠内的代谢或其他现象有很好的前景。

**1.2 在体法** 研究较多的是大鼠小肠灌注法:麻醉动物,打开腹腔,量取一定长度的肠节段,两端插管,用等渗 0.9% 氯化钠溶液冲洗肠内容物后换灌流液,用一恒流泵灌流肠腔,收集灌流液,测定不同时间灌流液药物浓度。用大鼠肠灌注法研究肠内代谢可以在生理条件下从整体上研究肠内代谢、吸收、分泌过程,结果更加真实可靠。该法要求整段肠的研究,个体差异较大,不适合高通量筛选,可以根据实验需要决定模型的选择。

**1.3 体内法** 主要是测定口服给药的一些探针药物及其代谢底物的颈动脉血、肝门静脉血、尿以及各个组织中的化学指纹谱。该法主要适用于有效成分明确或者具有指标成分的中药及复方,能够说明中药在体内的主要代谢部位,但是具体的代谢产物以及代谢机制有待进一步阐明。

**2 中药肠代谢的研究进展**

**2.1 肠道内的 I 相代谢酶对中药的代谢** 中草药与细胞色素 P<sub>450</sub> 的相互作用日益受到重视。许多学者指出肠壁中 CYP3A4 和 P 糖蛋白(P-gp)按照协同的方式作用于它们的底物,控制药物的吸收。P-gp 通过延长药物与 CYP3A4 酶的接触,降低药物的跨细胞转运,从而增加药物被肠壁 CYP3A4 代谢的机会,并影响药物代谢的程度<sup>[13]</sup>。富含呋喃香豆素成分的胡柚汁<sup>[14]</sup>选择性抑制肠壁组织的 CYP3A4,可以减少许多合用药物首关效应,增加其浓度-时间曲线下面积或最大浓度,从而可提高药物疗效或增加药物不良反应。研究发现黄酮类化合物如槲皮素、金丝桃素、山奈酚<sup>[15]</sup>等小剂量时可以抑制 CYP3A4 的表达,大剂量会诱导 CYP3A4 或 P-gp 的表达,从而影响合用的化合物生物利用度,产生毒性反应。甘草在中草药配方中广泛应用,有研究发现 18 $\alpha$ -甘草酸二铵可抑制多种 CYP1A1、2E1、3A 等同工酶从而减慢合用药物的代谢,但当与五味子配伍时能诱导一些 CYP 同工酶而加快丙米嗪和利多卡因的体内代谢<sup>[16,17]</sup>。贯叶连翘是临床上常用的抗抑郁药,能抑制 5-羟色胺(5-HT)的再摄取,提高脑内的 5-HT

[收稿日期] 2009-02-27 [修回日期] 2009-07-06

[基金项目] \* 国家教育部重点研究项目(基金编号:208051);江苏省中医药局研究项目(基金编号:HZ07069);江苏省普通高校研究生科研创新计划(基金编号:2007238)

[作者简介] 杜秋(1985-),女,江苏靖江人,硕士,专业方向:生物药剂学。电话:(0)13770718590,E-mail:duqiu1985@hotmail.com。

[通讯作者] 狄留庆(1964-),男,江苏海安人,教授,博士,研究方向:中药制剂新型给药系统。电话:025-86798226,E-mail:diliuqing928@163.com。

水平。贯叶连翘能激活体内的药物代谢酶 CYP3A4 的活性,增加 P-gp 的外流转运功能。当贯叶连翘与经 CYP3A4 代谢或经 P-gp 转运的药物合用后,有可能改变这些药物的吸收和代谢,从而产生药物相互作用;当与选择性 5-HT 再摄取抑制剂合用时,也有可能发生药效相加作用,产生不良反应<sup>[18]</sup>。此外,不少文献报道了部分中草药在肝脏中受 CYP450 的代谢的机制,例如人参、银杏提取物等<sup>[19]</sup>。在此基础上,研究其在肠道的代谢机制,对于剂型设计,指导临床合理用药有重要意义。

**2.2 肠道内的Ⅱ相代谢酶对中药的代谢** UDPGT、ST、MT 等Ⅱ相代谢酶在肠道中主要发生结合反应,代谢产物一部分吸收进入血液,另一部分又以结合物的形式外排回肠腔,排出体外。研究较多的为黄酮类化合物<sup>[20]</sup>。黄酮苷在肠道受乳糖根皮苷水解酶(LPH)作用,一部分黄酮苷水解为苷元,黄酮类化合物进入肠壁上皮细胞后,黄酮苷元高浓度快速扩散进入肠黏膜,被这些代谢酶催化生成葡萄糖醛酸、硫酸和甲基结合产物,这些代谢产物一部分随血液进入肝脏进一步代谢转化,而另一部分由肠道上皮 MRP<sub>2</sub> 转运蛋白排回肠腔。所以在体内原型存在的黄酮类化合物很少,大部分以结合物的形式或肠菌降解所产生的酚酸类小分子存在,而研究表明,氧甲基化、硫酸盐、葡萄糖酸苷和氧甲基葡萄糖酸苷复合物是黄酮类化合物在胞内活性最高的几种形态,而促进这些代谢产物吸收可以提高黄酮类化合物的生物利用度。

鉴于中药的多成分体系,笔者认为可以先用上述的体内法采用指纹图谱研究肠道代谢对其影响。如果影响较为显著,选择部分代表性成分进行体外和体内实验,考察 CYP 酶、Ⅱ相代谢酶以及 MRP 等综合作用,这些机制的阐明对于中药复方配伍机制及中西合并用药的合理性有重要的参考价值。

### 3 结束语

小肠代谢研究方法有体外法、在体法和体内法。其中较为常用的是体外法,包括肠微粒体法、扩散池法、Caco-2 细胞模型法及肠组织切片法。广泛应用于药物的代谢途径、体内代谢清除及药物间相互作用研究等,以上方法各有其优缺点,应根据不同的要求和目的分别选择应用。

中药一般是以提取物给药。实验表明,如果以其中的有效成分单体或单体混合物给药,效果不及以提取物给药。提示可能提取物中的其他化学成分或杂质(如鞣质)可能影响活性成分在肠道的代谢,如竞争性的与Ⅱ相代谢酶结合后排出体外,使中药中的活性成分更多的以游离状态吸收进入血液,提高了药物的生物利用度。另外,以中药有效部位给药时,由于结构相似,有些化合物可能会抑制 CYP 同工酶的活性,使相同底物的活性成分吸收更好。因此,研究中药在肠道的代谢特征,从中药在肠道的吸收量的改变、活性成分的变化、毒性成分的降解等方面共同阐明中药临床给药的合理性,为中药新制剂的设计打下坚实的基础。

[DOI] 10.3870/ydyb.2009.12.028

#### [参考文献]

[1] PAINE M F, KHALIGHI M, FISHER J M, *et al.* Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 287(3): 1552 - 1562.

[2] KOLARS J C, AWNI W M, MERION R M, *et al.* First-pass meta-

bolism of cyclosporine by the gut[J]. *Lancet*, 1991, 338(8781): 1488 - 1490.

[3] PAINE M F, SHEN D D, KUNZE K L, *et al.* First-pass metabolism of midazolam by the human intestine[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1996, 60(1): 14 - 24.

[4] VON RICHTER O, GREINER B, FROMM M F, *et al.* Determination of *in vivo* absorption, metabolism and transport of drugs by the human intestinal wall and liver with a novel perfusion technique[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2001, 70(2): 217 - 227.

[5] PAINE M F, HART H L, LUDINGTON S S, *et al.* The human intestinal cytochrome P<sub>450</sub> "pie" [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34(5): 880 - 886.

[6] 樊慧蓉, 和凡, 刘昌孝等. Cocktail 探针药物法用于评价细胞色素 P<sub>450</sub> 同工酶影响的研究进展[J]. *中国药理学杂志*, 2006, 41(14): 1045 - 1048.

[7] 李文东, 马辰. 药物体外肝代谢研究进展[J]. *中国药理学杂志*, 2003, 38(10): 737 - 747.

[8] VAN DE KERKHOFF E G, UNGELL A L B, SJOBERG K, *et al.* Innovative methods to study human intestinal drug metabolism *in vitro*: precision-cut slices compared with ussing chamber preparations [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34(11): 1893 - 1902.

[9] POLERTARUTTI B I, PETERSON A L, SJOBERG A K, *et al.* Evaluation of viability of excised rat intestinal segments in the ussing chamber: investigation of morphology, electrical parameters, and permeability characteristics [J]. *Pharm Res (NY)*, 1999, 16(4): 446 - 454.

[10] CHARLES L C, BRUCE W P, HUM. Development of Caco-2 cells expressing high levels of cDNA-derived cytochrome P4503A4 [J]. *Pharm Res*, 1996, 13(12): 1635 - 1641.

[11] FISHER J M, WRIGHTOM S A, WATKINS P B, *et al.* First-pass midazolam metabolism catalyzed by 1 $\alpha$ , 25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub>-modified Caco-2 cell monolayers [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 289(8): 1134 - 1142.

[12] KERKHOFF E G, GRAAF I A M, JAGER M H, *et al.* Characterization of rat small intestine and colon precision-cut slices as an *in vitro* system of drug metabolism and induction studies [J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33(12): 1613 - 1620.

[13] 吴丽花, 马萌. 肠壁 CYP3A 和 P-糖蛋白与口服药物生物利用度 [J]. *中国药房*, 2003, 14(7): 437 - 439.

[14] 尚亚飞, 刘昌, 吕毅, 等. 葡萄柚汁对小白鼠肝和小肠细胞色素 P4503A 活性的影响 [J]. *陕西医学杂志*, 2007, 36(2): 136 - 138.

[15] DHANANJAY P, ASHIM K, MITRA. MDR- and CYP3A4-mediated drug-herbal interactions [J]. *Life Sci*, 2006, 78(18): 2131 - 2145.

[16] 杨静, 彭仁, 孔锐, 等. 18 $\alpha$ -甘草酸二铵对大鼠 CYP 和 II 相酶的影响 [J]. *药学通报*, 2001, 36(5): 321 - 324.

[17] 徐艳霞, 张锦楠, 闫淑莲. 甘草和五味子对大鼠丙米嗪药动学的影响 [J]. *首都医科大学学报*, 2003, 24(2): 121 - 122.

[18] 王仁云. 贯叶连翘与药物的相互作用 [J]. *中成药*, 2007, 24(11): 875 - 877.

[19] 高晓新, 梁爱华, 郑素勤. 中草药对细胞色素 P<sub>450</sub> 酶系影响的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2006, 12(9): 64 - 67.

[20] 裴利宽, 郭宝林. 黄酮类化合物吸收和代谢研究进展 [J]. *中国药理学杂志*, 2006, 41(8): 568 - 572.