

葡萄糖醛酸转移酶 (UGTs) 诱导羧酸药物代谢激活的研究进展

谢彤, 梁艳, 郝海平, 谢林, 王广基*

(中国药科大学药物代谢动力学重点实验室, 江苏 南京 210009)

摘要: 含羧酸基团的药物可以通过葡萄糖醛酸转移酶的代谢转化, 形成亲电子活性的酰基葡萄糖醛酸苷活性中间代谢产物, 然后经过一系列的非酶或酶反应形成蛋白加合物或 DNA 加合物。加合物的形成是含羧酸基团药物形成特异质反应和基因毒性的主要因素。本文以该类药物的代谢激活为例, 阐述了酰基葡萄糖醛酸苷的化学活性、致毒机制、分布特征以及产生的毒性反应, 并探讨了研究现状和前景。

关键词: 羧酸药物; 葡萄糖醛酸转移酶; 酰基葡萄糖醛酸苷; 代谢激活

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 11-1193-07

Advances in study of metabolic activation of carboxyl-acid containing drugs by UGTs

XIE Tong, LIANG Yan, HAO Hai-ping, XIE Lin, WANG Guang-ji*

(Key Lab of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: The metabolic transformation of the drugs containing carboxylic acid groups can lead to the formation of acyl glucuronide metabolites through catalysis by glucuronosyltransferase, and produce pro-acyl glucuronide intermediate metabolites with electronic activity. Then, protein or DNA adducts appeared after a series of non-enzyme or enzyme reactions. These adducts would change the protein activity and potentially lead to idiosyncratic and genotoxicity. In this paper, we discussed the chemical activity, drug-induced mechanisms, distribution and toxicity resulting from this metabolic activation for these drugs, and stated the status and prospects of research in this field.

Key words: carboxyl-acid containing drug; uridine diphosphoglucuronosyl transferase; acyl glucuronide; metabolic activation

肝脏是药物生物转化的主要场所, 许多药物经肝脏代谢酶生物转化后, 水溶性增加、毒性降低, 从而易于排出体外, 但一些药物在体内经生物转化产生了活性的中间代谢物, 这些活性代谢物会激活原癌基因、改变体内的信号转导通路或与相应的组织蛋白、DNA结合形成加合物从而诱发癌症、造成肝肾损伤等。传统的中药存在很多这样的例子: 马兜铃酸经 CYP450 酶、过氧化物酶代谢形成DNA加合物从而激活原癌基因诱发肾损伤; 甘草酸的代谢产物抑制

了羟类固醇脱氢酶从而导致水钠潴留; 黄酮结构的化合物如槲皮素等代谢激活后形成醌式结构, 然后与蛋白结合使组织中关键蛋白失活; 吡咯啉类生物碱如兰莪定可被肝药酶 CYP3A4 和 CYP2B6 代谢产生活性的吡咯型代谢物而诱发癌症; 此外一些化学污染物多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 经代谢激活而致癌^[1]。

一些含羧酸基团的药物 (carboxyl acid-containing drug, CAD) 在体内易与葡萄糖醛酸结合, 形成的葡萄糖醛酸苷 II 相代谢产物水溶性增加、毒性降低。也有一些研究表明, 部分 CAD 的葡萄糖醛酸苷 II 相代谢产物在体内经过一系列的反应后, 与功能蛋白或

收稿日期: 2009-03-23.

*通讯作者 Tel: 86-25-83271128, E-mail: guangjiwang@hotmail.com

DNA 共价结合形成药物-蛋白加合物 (drug-protein adducts), 从而引发毒性反应^[2, 3]。因此, 葡萄糖醛酸转移酶诱导的这种代谢激活是部分 CAD 药物产生细胞毒性的原因之一。

非甾体抗炎药 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 是目前处方量最大的 CAD 药物之一, 在临床上存在着较为广泛的不良反应 (adverse drug reactions, ADRs)。NSAIDs 服用不当往往诱发严重的毒副反应 (toxic effects), 有的甚至会引发致命的过敏性休克。异丁芬酸、苯噻洛芬、佐美酸、伐地考昔、罗非昔布的先后撤市使我们不得不深入思考 CAD 药物代谢激活所诱发的毒副反应及药物合理应用的问题。此外包括他汀类在内的含羧酸酯基团的药物, 经体内处置后形成含羧酸基团的代谢物, 这些羧酸代谢物也会经代谢激活形成酰基葡萄糖醛酸苷。

近来不断有研究表明, 一些 CAD 在体内经生物转化形成酰基葡萄糖醛酸苷, 会通过不同的机制引发相应的毒性反应, 它们可以作为半抗原与细胞内大分子加合引发机体的免疫应答, 或刺激中性粒细胞或巨噬细胞的增殖, 或与 DNA 加合诱发基因突变等^[4]。本文主要针对 CAD 经葡萄糖醛酸转移酶诱导的代谢激活形成酰基葡萄糖醛酸苷 (acyl glucuronides, AGs), 以及 AGs 的致毒机制、分布情况以及所诱发的毒性反应进行介绍, 并探讨了由这种代谢激活引起的毒副反应的研究前景和现阶段研究所存在的难点。

1 AGs 的形成

葡萄糖醛酸转移酶 (uridine diphosphoglucuronosyl transferases, UGTs) 是一种以鸟苷-5'-二磷酸葡萄糖醛酸 (uridine diphosphoglucuronic acid, UDPGA) 为糖基供体与底物反应的酶。一般含羧酸或酚羟基的药物都会通过该酶催化, 反应过程如图 1 所示, 经反应后其水溶性增加, 易于排出体外。葡萄糖醛酸结合反应是各种外源或内源性物质灭活的重要途径, 它对药物的代谢消除有重要的作用^[5]。然而一些 CAD 药物如双氯芬酸、布洛芬、酮洛芬、二氟尼柳等与葡萄糖醛酸结合后, 生成的糖苷具有亲电子活性, 易与细

胞内功能大分子物质形成加合物, 若在肝细胞中大量蓄积, 将引发毒性反应。

UGTs 广泛分布于机体各个组织器官, 包括肝脏、肠、肾脏等, 在肝脏中表达最高^[4]。UGTs 存在于胞浆内质网中, 迄今为止已确认 46 个 UGTs 亚型, 依据克隆的 cDNA 序列的相似性分成两个大家族: 参与酚和胆红素代谢的 UGT1 家族以及参与类固醇代谢的 UGT2 家族。近年来研究表明主要有 3 类亚型的 UGTs 参与 CAD 的葡萄糖醛酸化: UGT1A3、UGT1A9 和 UGT2B7, 其中 UGT2B7 在 CAD 的葡萄糖醛酸化中起重要作用^[5, 6]。Kayo 等^[7]通过重组 UGTs 实验发现 3 种酶的活性为: UGT2B7 >> UGT1A3 ≈ UGT1A9; Nicolas 等^[8]报道, UGT2B7 是参与霉酚酸-酰基葡萄糖醛酸的形成的主要亚型酶。此外胃肠道中特异性表达的 UGT1A7、UGT1A8、UGT1A10 也参与部分 CAD 的葡萄糖醛酸化代谢^[9, 10]。UGTs 的底物较为广泛, 不同亚型酶的底物存在交叉性, 影响 CAD 的葡萄糖醛酸化代谢。Mano 等^[11]报道, 内源性物质胆酸的葡萄糖醛酸化会影响氟比洛芬毒性产物 AG 的形成。UGTs 的活性在个体生长发育过程中会发生变化, CAD 作为 UGTs 的底物会随之发生药理学方面的改变。不同亚型的 UGTs 在体内的表达水平受当时体内状况、组织专属性和环境等几方面因素相互作用的影响, 在研究 CAD 代谢激活时必须综合考虑。

2 AGs 在体内的分布

CAD 进入体内, 通过有机阴离子转运体被肝细胞主动摄取, 经葡萄糖醛酸化后经转运蛋白, 分泌到胆汁并释放入肠道, 在肠道菌群的作用下水解释放出原形药, 后者被重吸收经门静脉再度到达肝脏。在肝肠循环过程中, 转运系统对 CAD 在肝脏的暴露情况起重要作用。当 CAD 在体内的分布因转运系统失衡而被破坏时, 活性代谢物 AGs 形成的速率和数量会增加, 使 AGs 在肝细胞中蓄积, 达到一定水平后诱发相应的毒性反应。

在肝细胞膜上表达有不同数量和功能的膜转运

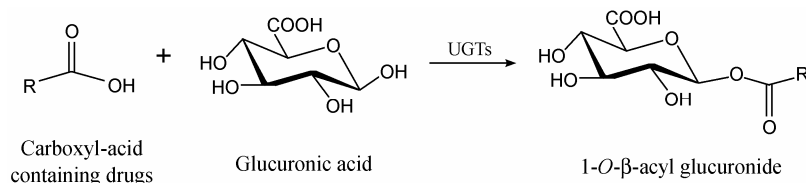


Figure 1 Formation of AGs (acyl glucuronides) bioactivated by UGTs (uridine diphosphoglucuronosyl transferases)

蛋白, 组成 CAD 的转运系统。肝细胞基底膜上表达的 Na^+ 非依赖型的有机阴离子转运多肽 (organic anion transporters proteins, OATPs) 能够主动从血窦腔摄取 AGs 进入肝细胞中; 在肝细胞的基底外侧膜上, 多药耐药蛋白 Mrp3、Mrp4、Mrp5、Mrp6 依赖 ATP 释能介导 AGs 从肝细胞向血转运^[12]; Mrp2 则介导 AGs 从肝细胞向胆汁转运^[13-15]。Westley 等^[16]报道, 霉酚酸酐基葡萄糖醛酸苷在 Mrp2 基因敲除大鼠中的胆汁排泄量明显减少。正是由于特异性的转运系统的存在, AGs 在肝的分布形成了一定的浓度梯度, 血窦腔 AGs 浓度较低于肝细胞中 AGs 浓度, 而肝细胞中 AGs 浓度低于胆管中 AGs 浓度^[2]。由于胆管中存在高浓度的 AGs, 因此胆管膜蛋白成为 AGs 形成加合物的主要靶点。AGs 肝分布的这种特性也提示: 用血药浓度替代治疗靶点的药物浓度来评价药物的安全性并不总是合理的。当血浆中的 AGs 浓度较低处于安全范围时, 肝细胞中的 AGs 可能会不断蓄积而产生毒性。因此, 对于 CAD 不能简单的用血浆浓度来评价药物的安全性。

肝细胞膜上转运蛋白介导的 AGs 转运是影响其在体内暴露情况的重要因素之一, 当 AGs 在肝细胞中不断蓄积, 即可能存在某些外排转运体的抑制作用, 蛋白加合物形成的速度和数量会随之增加, 肝脏毒性反应加速发生; 相反, 某些摄取转运体被饱和, AGs 则在循环系统蓄积, 血浆蛋白加合物的生成速率增加, 肝外组织产生毒性反应的可能性增加。Westley 等^[16]报道了霉酚酸 UGT 代谢产物与 Mrp2 抑制剂环孢素 A 的相互作用。药动学研究表明, CAD 血浆药物浓度一时间曲线具有双峰特征, 即其体内分布出现再分布的过程。这种再分布的现象虽然会延长药效, 但 AGs 诱发毒性反应的发生几率也随之增加。

3 AGs 的致毒机制

AGs 的化学活性已经得到了深入的研究, 其化学结构中的酯基结构和单糖结构使其具有亲电子活性。由于这些活性基团的存在, AGs 易于发生一些非酶反应, ① 水解反应: AGs 水解重新形成原形药结构; ② AGs 分子内部重排: 酰基在葡萄糖醛酸结构的邻羟基之间转移形成 2-, 3-, 或 4-O-AGs 迁移异构体 (migration isomers, MIS); ③ 分子间的置换: 内源性大分子物质中存在的亲核基团-SH、-OH、-NH₂ 与 AGs 进行转酰基反应形成共价加合物^[17, 18]。

肝细胞代谢形成的 AGs, 其结构不稳定, 酸性条

件下易水解。而体内代谢形成的 AGs, 在肠道菌群高活性的 β -葡萄糖醛酸苷酶的作用下水解, 生成相应的原形药, 经小肠重吸收入血。水解环境的 pH 和苷元的结构是影响苷水解速率的主要因素, 在 pH 5 时 AGs 不稳定易于水解^[12]; 而当苷元中存在斥电子基团时水解速率会增加, 相反亲电子基团则使水解速率降低。

AGs 中固有的酰基和单糖结构决定了其化学性质较为活泼。CAD 通过 UGTs 的代谢形成 1-O- β -AGs, 其结构中的羰基碳原子具有亲电子活性, 而蛋白质的-NH₂ 作为亲核基团, 进攻碳原子发生转酰基反应, 同时葡萄糖醛酸脱落。1-O- β -AGs 正是通过这种“转酰基机制” (transacylation mechanism) 形成了蛋白质-药物的加合物 (protein-drug adducts), 从而进一步诱发毒性反应的发生。

UGTs 催化形成的 1-O- β -AGs 不稳定, 在体内会发生分子内部可逆的重排, 形成 2-O-、3-O-、或 4-O- β -AGs 迁移异构体 MIS。分子内重排形成的 MIS 通过瞬间开环形成链状醛基结构 (类似于糖的开链), 这一反应是可逆的, 链状醛基结构可环合再度转化成 β -糖苷或 α -糖苷产物 (即差向异构化)。开环形成的醛基结构, 会与蛋白质的-NH₂ 形成亚胺 (即西弗碱) 结构。形成的 3-O-和 4-O- β -亚胺 AGs 随后通过 Amadorri 重排形成稳定的蛋白加合物。通过这样的方式形成加合物的过程, 称为蛋白质的“亚胺机制” (imine mechanism)。Wang 等^[19]通过大鼠肝灌流实验证实这种“亚胺机制”在形成肝蛋白加合物中的重要性。以上两种蛋白质结合物形成的机制都会使内源性功能蛋白失活, 反应机制见图 2, 蛋白加合物的形成是药物产生毒性的基础。研究表明, CAD 羧酸部分的结构会影响 AGs 的化学活性: α -位未被取代的乙酸型 CAD 所形成的 AGs 的活性最高, 如托美丁和佐美酸; α -位被单取代的 CAD 活性次之; 而 α -位被完全取代的 CAD (如呋噻咪) 所形成的 AGs 的活性最小^[20]。

4 AGs 所诱发的药物毒性反应

4.1 特异质反应 现在临床较常用的羧酸药物主要为非甾体抗炎药、贝特类降脂药、他汀类降脂药等, 这些 CAD 药物都存在较为复杂的 ADRs, 涉及胃肠道、心血管、内分泌、皮肤、肝肾、生殖系统等。肝肾是 CAD 活性代谢物 AGs 高暴露的组织, 也是 AGs 产生结合蛋白的主要靶点所在, 因此肝肾发生的 ADRs 较其他组织居多。研究发现某些较为严重的

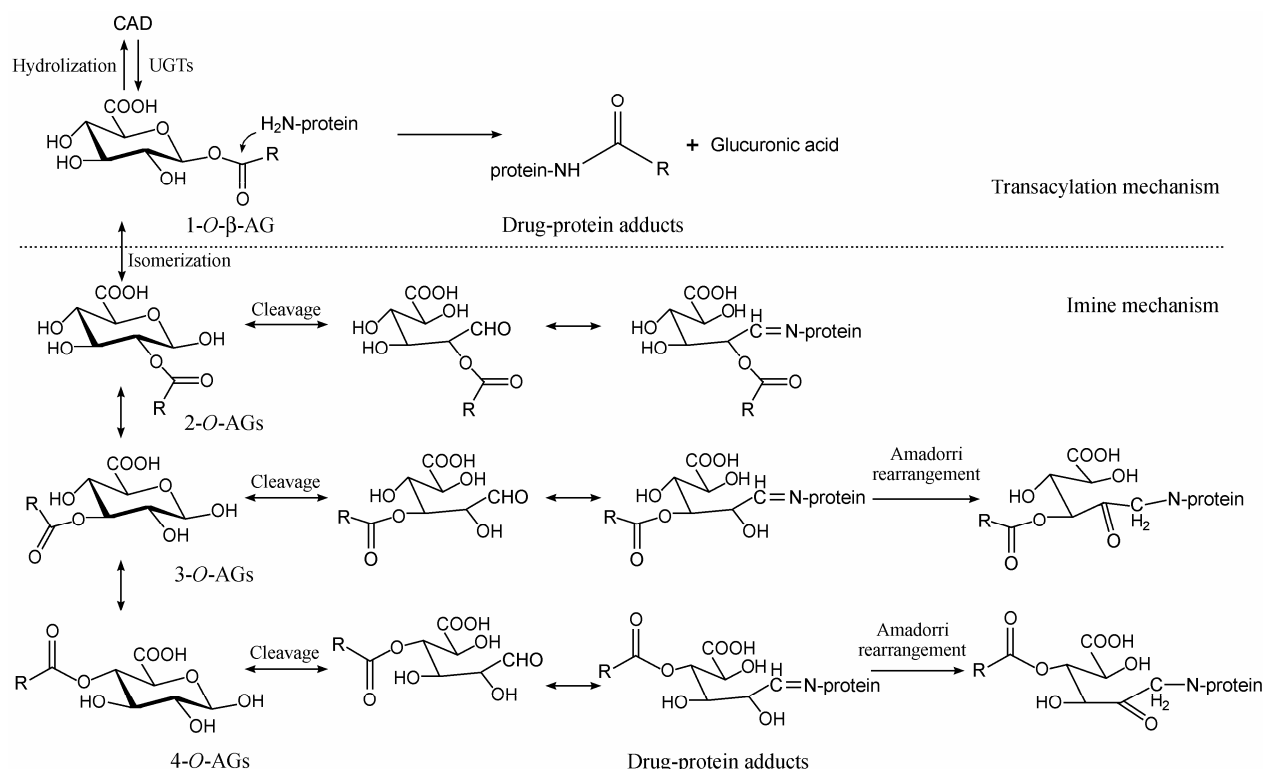


Figure 2 Mechanism of CAD metabolism activation

ADRs 是由于活性代谢物诱发体内免疫应答所产生的, 这些致敏的 ADRs 常表现为发热、高烧、皮疹等, 同时伴随着嗜酸性粒细胞增多的现象。这种无法预测的, 非剂量依赖性的 ADR 为特异质毒性反应 (idiosyncratic adverse drug reactions, IADRs)。IADRs 发病率低, 占全部用药患者 0.01%~5%, 但病程急, 预后性差。

传统的观点认为, 药物代谢激活产生活性代谢物, 这些活性的中间产物作为半抗原, 与细胞内大分子结合成为完全抗原, 抗原加工后经主要组织相容性复合体 (MHC) 限制型抗原提呈细胞提呈至 T 细胞, T 细胞激活后最终导致抗原特异性免疫应答 (the antigen-specific adaptive immune system)。CAD 药物在代谢激活形成 AGs, 与组织蛋白或血浆蛋白结合产生抗原决定簇, 刺激免疫细胞引发特异性的免疫应答。血浆蛋白是 AGs 主要的结合蛋白, 此外, 肝蛋白 DDPIV (membrane enzyme dipeptidyl peptidase IV, CD26)、肝细胞的 UGTs 和微管蛋白 (tubulin) 是 AGs 结合的主要组织靶蛋白^[2]。Shipkova 在进行霉酚酸药代动力学研究时发现, 体内存在霉酚酸 AGs 的血浆蛋白加合物, 并且该加合物的量与体内霉酚酸 AGs 的 AUC 值具有正相关性^[21]; 同时, Shipkova 还

报道, 肝组织中 ATP 合酶、蛋白质二硫化异构酶和硒蛋白也会与霉酚酸酰基葡萄糖醛酸苷共价结合^[22]。Ogilvie 等^[23]通过实验表明, 吉非贝齐代谢形成的 AGs 机制性抑制 CYP2C8, 这可能是亲电子活性的 AGs 与 CYP 蛋白上的赖氨酸共价结合所造成的。体内形成的这些蛋白加合物是诱发免疫应答的基础。1997 年在溶血性贫血患者尿中检测到特异性的 4'-OH 双氯芬酸的特异性抗体^[24]。随后在尿液中又发现了 6-OH 依托度酸和萘普生葡萄糖醛酸苷的特异性抗体^[25, 26], 这些特异性抗体的形成也提示了免疫应答参与了特异质毒性反应的发生。

另一方面, 有研究者认为蛋白加合物的形成并不是引发机体特异质毒性发生的主要原因。一些内源性物质 (如胆酸等) 在体内虽然形成 AGs 但并不诱发致敏反应, 因此, 在传统半抗原假说的基础上, 研究者们提出了一种“危险信号假说”。该假说认为, AGs 在体内是作为一种“危险信号”存在的, 它能促进细胞内氧化应激和线粒体损伤, 同时激活中性粒细胞或巨噬细胞并诱发细胞因子的释放, 具体途径见图 3, 正是这种多方面的综合因素使得机体的免疫防御系统受损, 当再次受到刺激时便产生完整的免疫应答。在此过程中 AGs 并没有形成直接的损伤,

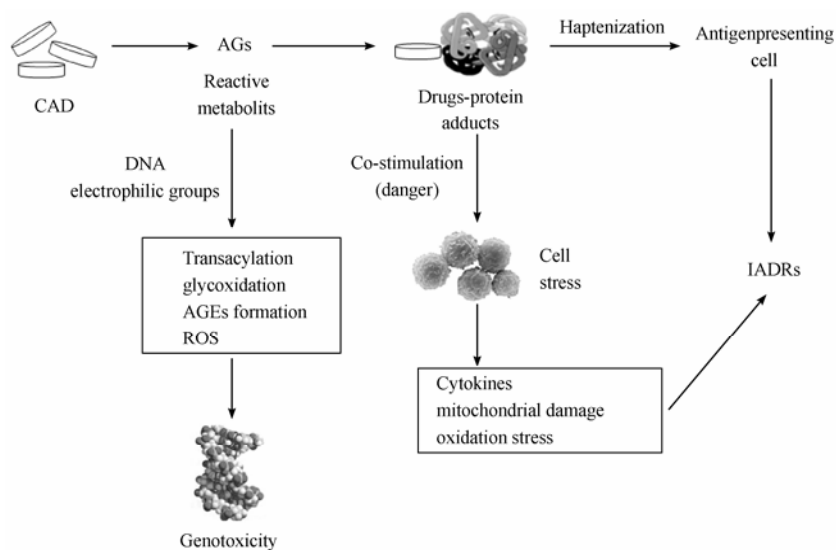


Figure 3 The mechanism of ADRs caused by AGs

它只是作为调节先天性免疫应答 (the innate immune system) 的潜在辅助因子^[27-29]。Deng 等^[30]报道, LPS 诱发的炎症会增加肝脏 IADRs 的发生率; 同时 Aithal 等^[31]研究发现, 双氯芬酸的肝毒性可能与细胞因子 IL 的基因多态性相关; Wieland 等^[32]通过实验表明, 免疫抑制剂霉酚酸形成的酰基葡萄糖醛酸苷会诱导肠中炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的释放并上调这些炎症因子的基因表达。

4.2 基因毒性 近来, 也有研究发现一些 CAD 药物如氯丙酸、丙磺舒、吉非贝齐、苯噻洛芬、萘酚平等代谢后形成的 AGs 会引起 DNA 的损伤, 但其确切的机制尚不明确。Southwood 等^[33-35]根据 AGs 的化学结构及其所表现的亲电子活性, 推断其 DNA 损伤机制有 3 种: ① 与 DNA 的亲核中心 (如嘌呤碱和嘧啶碱中的-NH₂) 发生转酰基反应, 类似于上述的形成蛋白加合物的“转酰基机制”; ② MIS 开键形成的醛基使 DNA 糖基化 (glycoxidation), 随后转化成高级糖基化终产物 (advanced glycosylation end products, AGEs); ③ MIS 自氧化产生氧自由基 ROS (reactive oxygen species) 损伤 DNA。Southwood 等^[33]通过糖基化抑制剂进行实验发现 DNA 损伤主要来自于糖基作用的终产物而非 ROS 的破坏, 同时 Sallustio 等^[34]用鼠肝细胞进行实验也得到了同样的结果。活性代谢物与 DNA 之间的相互作用会导致基因的点突变或基因损伤, 使原癌基因激活或一些抑癌基因的灭活。然而, AGs 对 DNA 的损伤机制需得到进一步的确证。

5 研究前景

随着对活性代谢物 AGs 认识的日益加深, 目前对 CAD 药物代谢激活的研究已有了一定的进展。UGTs 诱导活性代谢物 AGs 的生成是 CAD 产生 ADRs 的基础, 然而无论在细胞水平还是整体动物水平, AGs 共价加合物的形成和 CAD 药物 ADRs 发生的剂量-毒性关系仍然尚未明确。此外, 蛋白加合物所造成器官水平损伤的修饰阈值以及 CAD 药物与被键合的靶蛋白之间存在怎样的构效构动关系, 都有待于进一步的研究。现已提出一些数学模型来预测 CAD 毒性的发生, Liu 等^[36]根据体内 AGs 的 AUC 值与其形成的血浆蛋白加合物具有相关性的特征, 建立了 AGs 药动力学模型, 以预测疾病状态下活性代谢产物 AGs 的体内分布情况, 从而指导合理用药, 但该模型在临床可操作性上存在一些局限性, 需进行改进。深入阐明代谢激活的毒性发生机制以及构效构动关系, 以指导新药的研发, 控制潜在毒性的新药上市, 对发展更为安全有效的新药及拟定解毒措施都有极其重要的指导意义。

此外, 传统中药中存在的一些有机酸成分如咖啡酸、绿原酸、丹酚酸等可能也存在着 AGs 介导的代谢激活。近来, 中药注射剂不断出现问题, 可能也与某些羧酸成分代谢激活有关。中草药作为保健食品和治疗药物已被广泛并且长期使用, 中药成分的代谢激活研究有助于深入了解中药毒性机制, 有助于理解中药配伍规律, 预防中-西药相互作用所导致的不良反应, 为制定标准化的中药制剂提供可靠依据。

References

- [1] Zhou SF, Xue CC, Yu XQ, et al. Metabolic activation of herbal and dietary constituents and its clinical and toxicological implications: an update [J]. *Curr Drug Metab*, 2007, 8: 526–553.
- [2] Sallustio BC, Sabordo L, Evans AM, et al. Hepatic disposition of electrophilic acyl glucuronide conjugates [J]. *Curr Drug Metab*, 2000, 1: 163–180.
- [3] Boelsterli UA. Xenobiotic acyl glucuronides and acyl CoA thioesters as protein-reactive metabolites with the potential to cause idiosyncratic drug reactions [J]. *Curr Drug Metab*, 2002, 3: 439–450.
- [4] Bailey MJ, Dickinson RG. Acyl glucuronide reactivity in perspective: biological consequences [J]. *Chem Biol Interact*, 2003, 145: 117–137.
- [5] Peng JY, Luan LJ. Advance in the research of UDP-glucuronosyl transferase [J]. *Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学)*, 2002, 19: 373–376.
- [6] Ritter JK. Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyl-transferases in xenobiotic bioactivation reactions [J]. *Chem Biol Interact*, 2000, 129: 171–193.
- [7] Sakaguchi K, Green M, Stock N, et al. Glucuronidation of carboxylic acid containing compounds by UDP-glucuronosyl-transferase isoforms [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 424: 219–225.
- [8] Picard N, Ratanasavanh D, Premaud A, et al. Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism [J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33: 139–146.
- [9] Sabolovic N, Heydel JM, Li X, et al. Carboxyl nonsteroidal anti-inflammatory drugs are efficiently glucuronidated by microsomes of the human gastrointestinal tract [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1675: 120–129.
- [10] Watanabe Y, Nakajima M, Yokoi T. Troglitazone glucuronidation in human liver and intestine microsomes: high catalytic activity of UGT1A8 and UGT1A10 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30: 1462–1469.
- [11] Mano N, Goto T, Nikaido A, et al. Inhibition of the rat hepatic microsomal flurbiprofen acyl glucuronidation by bile acids [J]. *J Pharmacol Sci*, 2003, 92: 2098–2108.
- [12] Zamek-Gliszczynski MJ, Hoffmaster KA, Nezasa K, et al. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 27: 447–486.
- [13] Seitz S, Kretz-Rommel A, Elferink RPJO, et al. Selective protein adduct formation of diclofenac glucuronide is critically dependent on the rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) [J]. *Chem Res Toxicol*, 1998, 11: 513–519.
- [14] Maier-Salamon A, Hagenauer B, Reznicek G, et al. Metabolism and disposition of resveratrol in the isolated perfused rat liver: role of Mrp2 in the biliary excretion of glucuronides [J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 97: 1615–1628.
- [15] Zamek-Gliszczynski MJ, Hoffmaster KA, Humphreys JE, et al. Differential involvement of Mrp2 (Abcc2) and Bcrp (Abcg2) in biliary excretion of 4-methylumbelliferyl glucuronide and sulfate in the rat [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 319: 459–467.
- [16] Westley IS, Brogan LR, Morris RG, et al. Role of Mrp2 in the hepatic disposition of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites: effect of cyclosporine [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34: 261–266.
- [17] Stachulski AV, Harding JR, Lindon JC, et al. Acyl glucuronides: biological activity, chemical reactivity, and chemical synthesis [J]. *J Med Chem*, 2006, 49: 6931–6945.
- [18] Skonberg C, Olsen J, Madsen KG, et al. Metabolic activation of carboxylic acids [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2008, 4: 425–438.
- [19] Wang M, Dickinson RG. Disposition and covalent binding of diflunisal and diflunisal acyl glucuronide in the isolated perfused rat liver [J]. *Drug Metab Dispos*, 1998, 26: 98–104.
- [20] Bolze S, Bromet N, Gay-Feutry C, et al. Development of an *in vitro* screening model for the biosynthesis of acyl glucuronide metabolites and the assessment of their reactivity toward human serum albumin [J]. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30: 404–413.
- [21] Shipkova M, Armstrong VW, Weber L, et al. Pharmacokinetics and protein adduct formation of the pharmacologically active acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid in pediatric renal transplant recipients [J]. *Ther Drug Monit*, 2002, 24: 390–399.
- [22] Shipkova M, Beck H, Volland A, et al. Identification of protein targets for mycophenolic acid acyl glucuronide in rat liver and colon tissue [J]. *Proteomics*, 2004, 4: 2728–2738.
- [23] Ogilvie BW, Zhang DL, Li W, et al. Glucuronidation converts gemfibrozil to a potent, metabolism dependent inhibitor of CYP2C8: implications for drug-drug interactions [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34: 191–197.
- [24] Bougie D, Johnson ST, Weitekamp LA, et al. Sensitivity to a metabolite of diclofenac as a cause of acute immune hemolytic anemia [J]. *Blood*, 1997, 90: 407–413.

- [25] Cunha PD, Lord RS, Johnson ST, et al. Immune hemolytic anemia caused by sensitivity to a metabolite of etodolac, a nonsteroidal anti-inflammatory drug [J]. *Transfusion*, 2000, 40: 663–668.
- [26] Bougie D, Aster R. Immune thrombocytopenia resulting from sensitivity to metabolites of naproxen and acetaminophen [J]. *Blood*, 2001, 97: 3846–3850.
- [27] Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4: 489–499.
- [28] Boelsterli UA. Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, 192: 307–322.
- [29] Tafazoli S, Spehar DD, O'Brien PJ. Oxidative stress mediated idiosyncratic drug toxicity [J]. *Drug Metab Rev*, 2005, 37: 311–325.
- [30] Deng XM, Stachlewitz RF, Liguori MJ, et al. Modest inflammation enhances diclofenac hepatotoxicity in rats: Role of neutrophils and bacterial translocation [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 319: 1191–1199.
- [31] Aithal GP, Ramsay L, Daly AK, et al. Hepatic adducts, circulating antibodies, and cytokine polymorphisms in patients with diclofenac hepatotoxicity [J]. *Hepatology*, 2004, 39: 1430–1440.
- [32] Wieland E, Shipkova M, Schellhaas U, et al. Induction of cytokine release by the acyl glucuronide of mycophenolic acid: a link to side effects? [J]. *Clin Biochem*, 2000, 33: 107–113.
- [33] Southwood HT, DeGraaf YC, Mackenzie PI, et al. Carboxylic acid drug-induced DNA nicking in HEK293 cells expressing human UDP-glucuronosyltransferases: role of acyl glucuronide metabolites and glycation pathways [J]. *Chem Res Toxicol*, 2007, 20: 1520–1527.
- [34] Sallustio BC, DeGraaf YC, Weekley JS, et al. Bioactivation of carboxylic acid compounds by udp-glucuronosyltransferases to DNA-damaging intermediates: role of glycooxidation and oxidative stress in genotoxicity [J]. *Chem Res Toxicol*, 2006, 19: 683–691.
- [35] Sallustio BC, Harkin LA, Mann MC, et al. Genotoxicity of acyl glucuronide metabolites formed from clofibric acid and gemfibrozil: a novel role for phase-II mediated bioactivation in the hepatocarcinogenicity of the parent aglycones [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 1997, 147: 459–464.
- [36] Liu JH, Smith PC. Predicting the pharmacokinetics of acyl glucuronides and their parent compounds in disease states [J]. *Curr Drug Metab*, 2006, 7: 147–163.