

• 综 述 •

稳定同位素示踪技术在内源性物质代谢调控中的应用进展

令狐婷^{1,2,3}, 刘少博^{1,2}, 高 耀^{1,2}, 史碧云⁴, 张 翔⁴, 田俊生^{1,2*}, 秦雪梅^{1,2*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006

3. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

4. 路易斯维尔大学 化学系, 美国 KY 40292

摘 要: 随着高灵敏度检测方法的快速发展, 稳定同位素示踪技术受到越来越多的重视。该技术通过示踪原子追踪标记化合物在机体内的活动规律, 依据中间代谢产物的同位素峰分布来判断其具体的代谢途径, 通过计算通量对整个代谢通路进行综合分析, 从而探究疾病的发生机制及药物代谢的途径和过程。近年来, 稳定同位素示踪技术在生物医药领域的应用逐年增加, 现主要针对其在糖、脂、氨基酸及激素等内源性物质代谢调控中的应用研究进展进行综述。

关键词: 稳定同位素; 代谢流分析; 内源性物质; 代谢调控; 代谢通路

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)11-2678-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.11.029

Applications progress of stable isotopic tracer technique in metabolic regulation of endogenous substances

LINGHU Ting^{1,2,3}, LIU Shao-bo^{1,2}, GAO Yao^{1,2}, SHI Bi-yun⁴, ZHANG Xiang⁴, TIAN Jun-sheng^{1,2}, QIN Xue-mei^{1,2}

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Shanxi Key Laboratory of Active Constituents Research and Utilization of TCM, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

4. Departments of Chemistry, University of Louisville, KY 40292, USA

Abstract: With the rapid development of high-sensitivity detection methods, stable isotope tracing technique has received increasing attention. Stable isotope tracing technique can accurately track the activity of labeled compounds in the body through the tracer atoms and determine their specific metabolic pathways based on the distribution of isotopic peaks of the intermediate metabolites. By calculating the flux, the metabolic pathways are analyzed to provide a basis for the study of disease mechanism and drug metabolism. In recent years, the technique has a wide application in the field of biomedicine. This paper summarizes the applications of stable isotopic tracer technique in the metabolic regulation of endogenous substances such as carbohydrate metabolism, lipid metabolism, amino acid metabolism, hormone metabolism, nucleic acid metabolism, and so on.

Key words: stable isotope; metabolic flux analysis; endogenous substances; metabolic regulation; metabolic pathway

同位素示踪技术 (isotopic tracer technique) 是利用同位素作为示踪剂对研究对象进行标记的微量分析方法, 即把同位素原子引入研究对象中, 通过

质谱仪、核磁共振仪等分析仪器测定其反应后的位置、数量等变化, 从而了解其反应的机制和途径^[1]。在同位素示踪技术应用的初期, 放射性同位素示踪

收稿日期: 2017-12-19

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2017ZX09301047); 山西省科技计划项目 (201603D321077, 201701D22111344); 山西省科技创新重点团队 (201605D131045-18); 山西省重点实验室 (201605D111004)

作者简介: 令狐婷 (1992—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药神经精神药理。Tel: 18703407090 E-mail: linghuting1992@163.com

***通信作者** 田俊生, 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药理与新药研发。Tel: (0351)7019297 E-mail: jstian@sxu.edu.cn

秦雪梅, 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中医药代谢组学研究。Tel: (0351)7011501 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

法因其灵敏度高、检测方便的特点获得了广泛的应用,但由于具有放射性,使其在使用、运输和储存方面存在不便,加之其半衰期一般较短,从而限制了放射性同位素的应用。稳定同位素通常半衰期较长,不受研究时间的限制,几乎不存在毒性,使用也比较方便,因此,应用稳定同位素作为示踪标记物成为代谢通路及代谢机制分析研究的主要手段^[2-4]。

稳定同位素示踪技术(stable isotopic tracer technique)现已广泛应用于分子生物学、医学、农业、工业、环境科学等领域,虽仍有一定的局限性,但在某些方面却是其他分析手段所不能替代的^[5-11]。在代谢调控研究中,采用传统方法对代谢产物进行定量分析时,检测到的化合物是机体代谢的总和,无法区分来自哪条代谢通路,具体的代谢途径只能是推测。而采用稳定同位素示踪技术可对所研究的代谢通路中的前体物质进行针对性的标记(如¹³C-葡萄糖、¹⁵N-谷氨酰胺等),通过示踪原子追踪标记化合物在机体内的活动规律,并依据中间代谢产物的同位素峰分布来判断其代谢途径,通过计算通量对整个代谢通路进行分析,从而为疾病机制的探究及药物作用机制的研究提供依据^[12-15]。

近年来,随着气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)、核磁共振法(NMR)等高灵敏度检测方法的使用,稳定同位素示踪技术在生物医药领域中获得了较大的发展及应用^[16-18]。在药物代谢动力学的研究中,使用稳定同位素示踪技术已成为临床药动学研究中极具发展前景的方法^[19-20]。将标记药物与未标记药物同时给予人体,标记药物可作为“生物内标”以消除由于不同时间给药而引起的个体差异,提高了测试的精密度和实验数据的可信性,进而测试药物在特定情况下的药动学特征。Salabei等^[21]采用稳定同位素示踪技术仅用4位受试者就成功地探讨了硝吡啶控释制剂在胃肠道不同部位的吸收情况,该研究有效地运用¹³C₄-硝吡啶为“生物内标”,严格控制了这一高清除率药物可能出现的个体差异,同时还显著降低了样本的用量,很好地解决了临床药动学研究中要求有足够大的受试样本量的问题。

由于稳定同位素示踪技术具有的独特优势,近年来,欧美一些国家的药学研究者将该技术成功地运用于临床药动学的研究中,并先后在荷兰、

英国、美国等地多次召开稳定同位素研究与应用的专题国际会议,以推动该技术的发展。但使用该技术要求条件较高,高纯度稳定同位素标记药物的获得难度大,小量合成价格昂贵,至今仍未普及应用^[22]。

目前商品化的稳定同位素标记试剂多为一些常见的小分子物质,如葡萄糖、氨基酸、脂质等,本文主要针对稳定同位素示踪技术在糖、脂、氨基酸以及激素等内源性物质代谢调控中的应用研究进展进行综述。

1 稳定同位素的概念、原理及优缺点

1.1 基本概念

稳定性同位素是天然存在于生物体内的不具有放射性的一类同位素,其原子核结构是稳定的,不会自发地放出射线而使核结构发生改变。20世纪70年代初被成功引入生物学的多个研究领域,如光合作用途径的研究、光能利用率、植物水分利用率、物质代谢和生物量变化等^[23-26]。迄今发现的稳定同位素有274种,但得到产业化生产并已广泛应用的主要为氘-2(²H)、碳-13(¹³C)、氮-15(¹⁵N)、氧-18(¹⁸O)、氖-22(²²Ne)、硼-10(¹⁰B)等少数几种产品。

1.2 基本原理

稳定同位素示踪技术主要是利用稳定同位素及其化合物的特性来展开。在自然界中,稳定同位素及其化合物与相应的普通元素及其化合物之间的化学性质和生物性质是相同的,只是具有不同的核物理性质,可以被区别检测,因此,可以用稳定同位素作为示踪原子,合成标记化合物(如标记氨基酸、标记药物、标记蛋白质等)来代替相应的非标记化合物。利用标记与非标记化合物的不同特性,通过质谱、核磁共振等分析仪器来测定稳定同位素反应前后的位置及数量变化,从而阐明反应的机制和途径^[27-31]。

1.3 优势与缺点

稳定同位素和放射性同位素均可用来示踪,但在实际应用中,稳定同位素具有放射性同位素无法比拟的优越性^[32-34]:(1)安全、无辐射,稳定同位素对动植物不会造成伤害,在使用、运输和储存的过程中比较方便;(2)半衰期长,放射性同位素因其半衰期太短而没有实用性,限制了其应用,而稳定同位素的半衰期均大于 1×10^{15} 年,因而不受研究时间的限制;(3)可同时测定,放射性同位素一

次只能测定一种同位素, 而稳定同位素允许对不同质量数进行同时测定, 因此可以对同一元素的不同同位素或不同元素的同位素进行同时测定, 从而提高实验效率; (4) 物理性质稳定, 稳定同位素的信号值不会随时间而衰减。

然而, 稳定同位素的测定对仪器设备要求比较高, 尤其是同时标记多种元素时, 则需要超高分辨率的质谱进行测定^[35], 必要时还需要进行衍生化^[36]。此外, 由于可作为示踪剂的稳定同位素种类较少、价格也比较昂贵, 故其应用范围受到了一定的限制, 需要更全面和深入的探究。

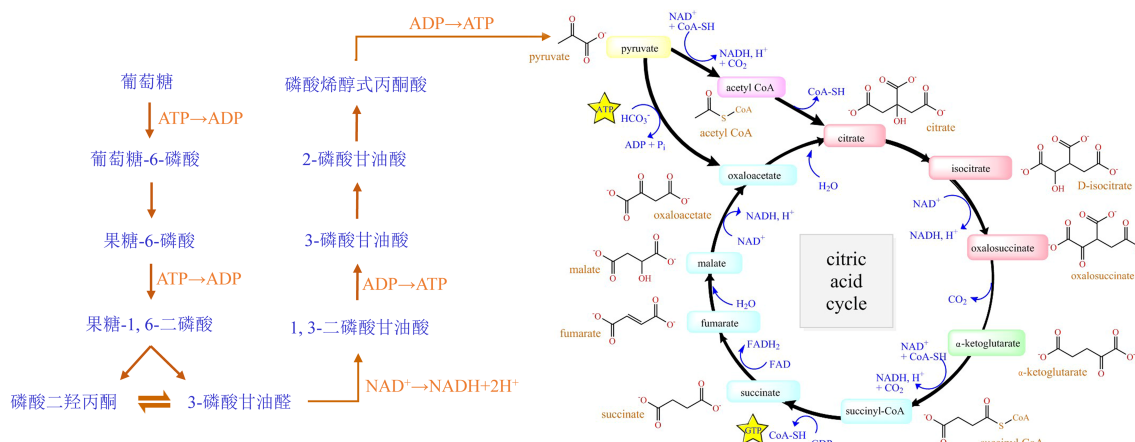


图 1 糖酵解和三羧酸循环 (TCA) 代谢途径

Fig. 1 Metabolic pathway of glycolysis and TCA

Yang 等^[37]发现与野生型心脏祖细胞相比, 糖尿病心脏祖细胞的磷酸戊糖途径和甘油磷脂合成途径均出现失调现象。为了阐明其潜在的生物学机制, 分别从 B6.BKS (D)-*Lepr^{db/db}* (db/db) 和 C57BL/6J (野生型) 小鼠中提取心脏祖细胞并培养, 然后用 $^{13}\text{C}_6$ -葡萄糖孵育心脏祖细胞 3 和 18 h, 利用稳定同位素进行示踪, 对腺嘌呤、尿嘧啶及磷脂酰肌醇的同位素峰分布进行分析, 通过对代谢途径中的通量进行计算, 最终确定糖尿病使磷酸戊糖途径的通量减少, 而使甘油磷脂合成途径的通量增加, 进而紊乱机体的正常代谢。

Sellers 等^[38]借助稳定同位素示踪技术发现丙酮酸羧化酶 (PC) 在非小细胞肺癌增殖过程中起着关键的作用。分别用 $^{13}\text{C}_6$ -葡萄糖/ $^{13}\text{C}_5$ 、 $^{15}\text{N}_2$ -谷氨酰胺对 shRNA 沉默 PC 表达的细胞进行孵育, 通过检测目标代谢物的同位素峰, 判断缺失 PC 后目标代谢物是否能够得到补给。结果表明, 缺失 PC 后, 其

2 稳定同位素示踪技术在内源性物质代谢调控中的应用

2.1 在糖代谢调控中的应用

糖代谢是能量代谢的核心组成部分 (图 1), 在生命过程中承担着重要作用。糖代谢异常与许多重大疾病 (如糖尿病, 缺血性心、脑血管疾病和肿瘤等) 均有密切的联系, 采用稳定同位素示踪技术, 可根据实验所需对糖代谢通路进行相应的同位素标记, 通过同位素示踪剂进行示踪, 能够准确把握疾病最终紊乱了糖代谢中的哪些代谢物, 从而为疾病机制的研究及新药的研发提供依据。

他途径无法对目标代谢物进行补给, 最终证明 PC 在非小细胞肺癌增殖过程中起着关键的作用。此外, Lane 等^[39]也采用稳定同位素辅助代谢组学的方法, 利用 $^{13}\text{C}_6$ -葡萄糖进行示踪, 并借助 NMR 及 MS 分析方法检测目标代谢产物的同位素峰, 透过整个糖代谢途径来追踪 ^{13}C 原子的来龙去脉, 为非小细胞肺癌的临床研究提供依据。

Chen 等^[40]发现在葡萄糖缺乏的情况下, 急性髓细胞白血病 (AML) 细胞具有极强的果糖代谢能力。分别用 $^{13}\text{C}_6$ -葡萄糖/ $^{13}\text{C}_6$ -果糖对 AML 细胞进行孵育, 采用气相色谱-飞行时间质谱对目标代谢物的同位素峰分布进行分析。结果表明, 果糖是人体血液系统中的第二大血糖, 它的细胞转运由 SLC2A5 基因编码的 GLUT5 蛋白转运子介导, 使用 RNA 沉默技术干扰 AML 细胞的 SLC2A5 基因表达, 可显著降低细胞对果糖的摄取以及果糖诱导的细胞增殖。研究结果暗示负责果糖转运的蛋白转运子 GLUT5

将成为治疗急性髓细胞白血病的一个新的靶点，有望与目前常用的肿瘤化疗药物联合使用，极大地改善癌症患者的治疗效果。

在糖代谢研究中，研究者往往会选择对糖酵解及 TCA 循环的前体物质葡萄糖进行同位素标记(如 ^{13}C -葡萄糖、 ^2H -葡萄糖)，必要时会对果糖及谷氨酰胺进行标记(如 ^{13}C -果糖， ^{13}C -、 ^{15}N -谷氨酰胺)，对其下游含同位素标记的中间代谢产物进行定量分析，通过各代谢物的同位素峰分布情况对糖代谢通路进行分析，借助稳定同位素示踪技术为靶向研究糖代谢中某一特定途径提供依据，从而对了解生物体的新陈代谢起到了关键性作用。

2.2 在脂代谢调控中的应用

脂质是脂肪和类脂的总称，主要包括胆固醇、磷脂和糖脂。运载脂质的可溶性生物大分子称为脂蛋白，所有的血浆脂蛋白均是由脂质和蛋白质组成，血液中的脂质是以血浆脂蛋白的形式存在的。因此，血脂的异常必然反映血浆脂蛋白的异常，脂质转运的异常使脂质代谢发生紊乱，最终导致疾病的产生。借助稳定同位素示踪技术，有望通过标记原子示踪脂质分子间的转化规律，从而明确疾病的发病机制。

Li 等^[41]将 ^{13}C -棕榈酸与牛血清白蛋白加入培养基中孵育人骨骼肌细胞 4、12、24 h，通过静电场轨道阱高分辨质谱(Orbitrap-MS)对人骨骼肌细胞内磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇和磷脂酰甘油等脂质分子进行定量分析，探讨了人骨骼肌细胞内脂质分子之间的转化规律。采用稳定同位素示踪技术，使脂质分子之间的转化变得“可视化”，从而更加清晰准确地把握脂质分子之间的动态变化规律，开启了脂质代谢动态分析的新视野，为生理机制和代谢紊乱的研究提供了新的认识。

Meiser 等^[42]应用稳定同位素辅助代谢轮廓分析研究 DJ-1 功能损失的影响，结果表明 DJ-1 基因

敲除的神经细胞表现出谷氨酰胺通量的降低和色氨酸生物合成的减少。由于这 2 种代谢途径是细胞抗氧化反应的重要因素，这些途径的下调是因为 DJ-1 缺失导致抗氧化反应受损，最终揭示了代谢的改变导致细胞不稳定性增加，并确认了潜在的可用于研究转化医学方法的新的干预点，从而为疾病的诊断及治疗提供了有力的依据。

随着人们生活水平的提高和物质生活的极大丰富，与脂代谢紊乱相关的疾病(如高脂血症、肥胖症、脂肪肝等)的发病率越来越高。临床研究表明，大多数患有脂代谢紊乱相关疾病的患者，同时也会出现腹胀、腹泻、嗝气等消化不良的症状，许多诊断为功能性消化不良的患者也会出现高脂血症、脂肪肝等脂代谢相关疾病。因此，借助稳定同位素示踪技术对脂代谢通路进行示踪，通过示踪原子来探究脂代谢相关疾病紊乱了哪些代谢通路，从而精准确定同种疾病因人而异的不同代谢途径以及不同疾病却有相同的代谢通路，这就与“精准医学”的概念不谋而合。

2.3 在氨基酸代谢调控中的应用

氨基酸在合成代谢和分解代谢中起着关键作用，它们不仅是蛋白质的组成部分，而且是许多关键代谢产物的前体，并被氧化以提供能量。氨基酸在体内的代谢包括 4 个方面(图 2)：①转化为非蛋白的含氮化合物，如嘌呤、嘧啶、胆碱、肌酸、肾上腺素等；②通过脱氨基作用转化为 NH_3 或 α -酮酸， α -酮酸最终转变成糖类、酮体或经过 TCA 氧化成二氧化碳和水，并放出能量；③通过脱羧作用依次转化为胺、醛、酸，最终生成二氧化碳和水；④过剩氨基酸将通过排泄方式排出体外。在氨基酸代谢调控研究中，稳定同位素示踪技术多用于研究氨基酸的合成与转化，通过对特定氨基酸进行同位素标记，根据标记原子追踪该氨基酸的代谢路径，精确了解氨基酸的代谢情况，进而研究其在机体内的重要功能。

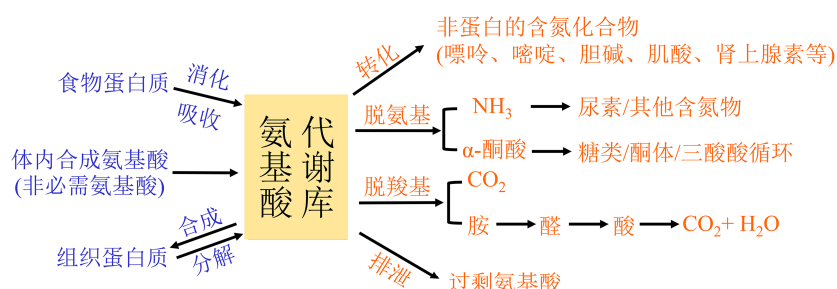


图 2 氨基酸在体内的代谢途径

Fig. 2 Metabolic pathway of amino acids *in vivo*

Cheng 等^[43]研究了冬虫夏草中茶氨酸的积累多于其他植物的机制,比较了冬虫夏草与其他植物(如金花茶、山茶花、玉米、拟南芥和番茄)中茶氨酸的含量,并用稳定同位素示踪技术阐明其生物合成途径。通过质谱法对相关中间体和代谢物进行定量分析发现,补给 2N_5 -乙胺后,所有植物均产生 2N_5 -茶氨酸,这就暗示乙胺的可用性将是茶氨酸在冬虫夏草和其他植物中积累差异的原因。

Nakamura 等^[44]前期发现啮齿目动物膳食必需氨基酸(NEAAs)作为氮源的重要性,且每个必需氨基酸均具有不同的促生长活力。他们对必需氨基酸进行同位素标记(^{15}N),比较膳食中必需氨基酸氮素代谢的差异,借助氨基酸分析仪和串联质谱分别测定肠道及血浆中氨基酸的浓度和相应的 ^{15}N 丰度。最终揭示了大鼠肠道中必需氨基酸氮代谢的异同,暗示膳食中必需氨基酸的氮素主要通过肠内代谢大量进入氨基酸氮循环。

Croyal 等^[45]通过描述载脂蛋白 M 与脂代谢其他成分间的相互作用来更好地明确其在动脉粥样硬化中的潜在优势。给 14 名男性受试者持续注入 14 h 2H_3 -亮氨酸,每小时取 1 次血样并用液相色谱串联质谱进行分析,脂蛋白中的部分分解速率和产率采用房室模型进行计算。结果表明,低密度脂蛋白动力学在载脂蛋白 M 周转过程中发挥关键作用,血浆三酰甘油对载脂蛋白 M 和 1-磷酸鞘氨醇在脂蛋白间的分布均起作用,进一步证实了载脂蛋白 M 分泌后可被结合到高密度脂蛋白中,然后与非脂蛋白相关的室进行快速交换,也可被结合到低密度脂蛋白被慢慢分解代谢。

此外, CO_2 呼气法是同位素标记氨基酸用于临床诊断的一种新方法。其原理是给患者口服或静脉注射一定量某种 ^{13}C 标记的氨基酸,根据其身体某部位上发生特定的氧化代谢,产生含 ^{13}C 的 CO_2 ,经肺呼出后用 NaOH 吸收,将生成的 $Na_2^{13}CO_3$ 用酸处理获得 $^{13}CO_2$ 气体,经纯化后,利用 ^{13}C -呼气试验专用质谱仪来检测 $^{13}CO_2$ 的浓度变化,绘出 $^{13}CO_2$ 排出特征曲线。某种疾病的患者对某种氨基酸的氧化能力与正常人不同,因此,所获得曲线也存在明显的差异,从而可以进行临床诊断。Kirschman 等^[46]用实验的方法控制两栖类动物的生理应激,通过呼吸测量法和 ^{13}C 呼气试验检测发展和蜕变过程中能量和营养物质的消耗。研究结果为幼虫生长和发育之间生理平衡的近因提供了证据,并为整个生命阶段能量和营养的消耗提供了新的认识。

稳定同位素标记氨基酸的检测方法快速准确、灵敏度高,现已应用于科学研究的各个领域。采用稳定同位素标记的氨基酸作为示踪剂,可准确把握氨基酸的合成与代谢途径,对揭示其在生物体内的转化规律起到了关键性作用;同时还可追踪蛋白质合成与代谢过程,利用患病状况下蛋白质合成的异常来诊断疾病。

2.4 在激素代谢调控中的应用

激素是由内分泌腺或内分泌细胞分泌的高效生物活性物质,在体内作为信使传递信息,对机体生理过程起调节作用的一类化学物质。近年来,稳定同位素自然丰度比在激素代谢研究中广泛应用,通过计算同位素比值,研究激素如何调节组织细胞的代谢活动来影响人体的生理活动。

Ahn 等^[47]研究了头发中碳和氮稳定同位素比值是否与血清瘦素水平有关。血清瘦素是一种调节能量代谢和食物摄入的激素,与胰岛素抵抗和代谢综合征有关。他们收集了 399 个成年人的头发(其中男、女人数分别为 233 和 166,年龄均在 40~70 岁),并计算头发样本中 ^{13}C 和 ^{15}N 的自然丰度比,同时用放射免疫分析法测定血清瘦素水平。研究结果表明,头发中氮稳定同位素比值与血清瘦素水平呈正相关,头发中 ^{15}N 的天然丰度比可作为评估血清瘦素代谢风险的临床指标。此外,Rijnsburger 等^[48]通过颈静脉注入稳定同位素,借助同位素测量内源性葡萄糖的产量和胰岛素的敏感性,该技术为研究激素和营养素对葡萄糖代谢的中枢效应提供了新的研究方法。

2.5 在核酸代谢调控中的应用

核酸可分为脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA),在蛋白质的复制和合成中起着储存和传递遗传信息的作用。核酸不仅是基本的遗传物质,而且在蛋白质的生物合成上也占据重要位置,因而在生长、遗传、变异等一系列重大生命现象中起决定性作用。早在 1958 年 Meselson 和 Stahl 针对大肠杆菌,利用 ^{15}N 标记基因组 DNA,提出了 DNA 半保留复制理论。近年来,稳定性同位素核酸探针(DNA/RNA-SIP)技术得到了广泛应用^[49]。利用稳定性同位素示踪复杂环境中微生物基因组 DNA,实现了单一微生物生理过程研究向微生物群落生理生态研究的转变,能在更高、更复杂的整体水平上定向发掘重要微生物资源,推动微生物生理生态学和生物技术的开发应用。

2.6 其他

近年来,稳定同位素示踪技术在神经递质及生长因子等其他内源性物质的代谢调控中也得到了广泛应用。在中枢神经系统中,神经递质是担当“信使”的特定化学物质。Welford 等^[50]给大鼠注射¹³C/¹⁵N-色氨酸,借助稳定同位素示踪技术监测大鼠体内 5-羟色胺的合成,从而阐明肺损伤后肺组织中 5-羟色胺升高的机制。生长因子是一类与特异的、高亲和的细胞膜受体结合,调节微生物正常生长代谢所必需的多肽类物质。Owino 等^[51]指出“国际原子能机构”支持使用稳定同位素技术评估和解决营养不良的问题,借助稳定同位素示踪技术研究体内维生素 A 的生物转化及生物利用度以及铁、锌和蛋白质的吸收和保留等,从而揭示生物体内的转化规律。

3 结语与展望

稳定同位素示踪技术已广泛应用于糖、脂、氨基酸及激素等代谢调控的研究中,但目前大部分研究仅限于通过对单一的化合物进行标记并对单一的代谢通路进行分析,对于机体复杂而庞大的代谢网络而言是远远不够的。现已有研究者开始将稳定同位素示踪技术与代谢组学相结合,以同位素标记的前体化合物为起始原料,通过分析其中间代谢产物的同位素峰分布,研究生物体内天然产物在机体内的生物合成路径,该技术的引入给代谢组学的发展带来了新的思路。借助稳定同位素示踪技术,采用不同元素对不同化合物进行同时标记,有望实现对生物体内所有代谢物进行定量分析,寻找代谢物与生理病理变化的对应关系,以探索疾病形成的机制,寻求预防和治疗疾病的有效途径。

如果把代谢组学比喻为“停车场”,那么代谢流就相当于是“高速公路”,而稳定同位素则像是高速公路上每辆车的“车牌”。通过“车牌”来追踪每辆车在抵达“停车场”前在“高速公路”上行驶的具体路径,并借助“车牌”对每辆车的流量进行计算,从而掌握庞大又复杂的“交通网络”。目前,稳定同位素示踪技术用于代谢流的研究已成为当下的热点。代谢流分析针对特定的通路,借助稳定同位素示踪技术,通过计算通路中各个途径的通量来阐明代谢物是如何形成的,这样的信息能够解释许多生物系统中与功能相关的生物学问题,可将代谢通路的研究提升到更高的水平和层次。

但由于国内在数据预处理方面尚不完善,一直采用开源的软件(XCMS、mzMatch 等)和开放的

数据库(KEGG、HMDB 等)相结合的方法,尚未开发出针对同位素示踪代谢组学数据分析的全自动软件,特别是同位素峰的自动匹配和精确定量,这些特征对同位素示踪代谢组学用于解决生物学相关的通路分析至关重要。此外,稳定同位素示踪剂的选择、引入方式、剂量等也是稳定同位素示踪技术应用的关键因素,对实验的成败起着决定性作用。

因此,稳定同位素示踪技术虽以其独特的优势在生命科学和医学领域迅速发展起来,某种程度上对代谢组学的发展也起到了一定的推动作用,但该技术的应用还存在较大的挑战,仍有诸多难题需要不断克服和解决。

参考文献

- [1] Fan T W, Lorkiewicz P K, Sellers K, *et al.* Stable isotope-resolved metabolomics and applications for drug development [J]. *Pharmacol Therap*, 2012, 133(3): 366-391.
- [2] 徐大刚, 李良君, 杜晓宁, 等. 稳定同位素技术的研究与发展 [A] // 中国核学会 2009 年学术年会论文集 [C]. 北京: 中国核学会, 2009.
- [3] Charidemou E, Ashmore T, Griffin J L. The use of stable isotopes in the study of human pathophysiology [J]. *Int J Biochem Cell B*, 2017, doi: 10.1016/j.biocel.2017.07.012.
- [4] 李银凤, 张哲乾, 尚占环. 我国动物组织器官稳定同位素研究进展 [J]. *核农学报*, 2015, 29(3): 605-615.
- [5] Chiu H H, Tsai I L, Lu Y S, *et al.* Development of an LC-MS/MS method with protein G purification strategy for quantifying bevacizumab in human plasma [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(28): 6583-6593.
- [6] Hentschker C, Dewald C, Otto A, *et al.* Global quantification of phosphoproteins combining metabolic labeling and gel-based proteomics in *B. pumilus* [J]. *Electrophoresis*, 2017, doi: 10.1002/elps.201700220.
- [7] He D, Xie X, Yang F, *et al.* Quantitative and comparative profiling of protease substrates through a genetically encoded multifunctional photocrosslinker [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56(46): 14521-14525.
- [8] 卢佳希, 张倩. 同位素示踪技术在测定钙吸收中的应用 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2012, 18(4): 366-370.
- [9] Liu C, Li Z, Chang X, *et al.* Apportioning source of erosion-induced organic matter in the hilly-gully region of loess plateau in China: Insight from lipid biomarker and isotopic signature analysis [J]. *Sci Total Environ*, 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.097.
- [10] Rochman F F, Sheremet A, Tamas I, *et al.* Benzene and naphthalene degrading bacterial communities in an oil

- sands tailings pond [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1845-1856.
- [11] Zhao X, Li F D, Ai Z P, *et al.* Stable isotope evidences for identifying crop water uptake in a typical winter wheat-summer maize rotation field in the North China Plain [J]. *Sci Total Environ*, 2017, 618: 121-131.
- [12] Zhao Y, Jia W, Sun W, *et al.* Combination of improved ^{18}O incorporation and multiple reaction monitoring: A universal strategy for absolute quantitative verification of serum candidate biomarkers of liver cancer [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(6): 3319-3327.
- [13] Bruntz R C, Lane A N, Higashi R M, *et al.* Exploring cancer metabolism using stable isotope resolved metabolomics (SIRM) [J]. *J Biol Chem*, 2017, doi: 10.1074/jbc.R117.776054.
- [14] 田颖, 杨晓光, 朴建华. 稳定同位素技术在组织蛋白质代谢研究中的应用 [J]. *卫生研究*, 2008, 37(1): 112-114.
- [15] 林树海, 蔡宗苇. 同位素示踪技术定量分析肿瘤细胞中的代谢重编程 [J]. *色谱*, 2015, 33(2): 112-115.
- [16] Lai Z, Kind T, Fiehn O. Using accurate mass gas chromatography-mass spectrometry with the MINE database for epimetabolite annotation [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(19): 10171-10180.
- [17] Legeron R, Xuereb F, Chaignepain S, *et al.* A new reliable, transposable and cost-effective assay for absolute quantification of total plasmatic bevacizumab by LC-MS/MS in human plasma comparing two internal standard calibration approaches [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1070: 43-53.
- [18] Fan T W, Lane A N. NMR-based stable isotope resolved metabolomics in systems biochemistry [J]. *J Biomol Nmr*, 2017, 49(3/4): 267-280.
- [19] Wotherspoon A T, Safavinaeini M, Banati R B. Microdosing, isotopic labeling, radiotracers and metabolomics: relevance in drug discovery, development and safety [J]. *Bioanalysis*, 2017, 9(23): 1913-1933.
- [20] Younis I R, Ahmed M A, Burman K D, *et al.* Stable isotope pharmacokinetic studies provide insight into effects of age, sex, and weight on levothyroxine metabolism [J]. *Thyroid*, 2017, 28(1): 41-49.
- [21] Salabei J K, Lorkiewicz P K, Mehra P, *et al.* Type 2 diabetes dysregulates glucose metabolism in cardiac progenitor cells [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(26): 13634-13648.
- [22] Bode H, Brendel E, Ahr G, *et al.* Investigation of nifedipine absorption in different regions of the human gastrointestinal (GI) tract after simultaneous administration of ^{13}C - and ^{12}C -nifedipine [J]. *Eur Clin Pharmacol*, 1996, 50(3): 195-201.
- [23] 李高. 稳定同位素标记药物在临床药代动力学研究中的应用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2000, 16(1): 58-62.
- [24] Gao J, Zhao B, Dong S, *et al.* Response of summer maize photosynthate accumulation and distribution to shading stress assessed by using $^{13}\text{CO}_2$ stable isotope tracer in the field [J]. *Front Plant Sci*, 2017, doi: 10.3389/fpls.2017.01821.
- [25] Ellsworth P Z, Ellsworth P V, Cousins A B. Relationship of leaf oxygen and carbon isotopic composition with transpiration efficiency in the C_4 grasses *setaria viridis* and *setaria italic* [J]. *J Exp Bot*, 2017, 68(13): 3513-3528.
- [26] Taylor G T, Suter E A, Li Z Q, *et al.* Single-cell growth rates in photoautotrophic populations measured by stable isotope probing and resonance raman microspectrometry [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1449.
- [27] Louyakis A S, Mobberley J M, Vitek B E, *et al.* A Study of the microbial spatial heterogeneity of bahamian thrombolites using molecular, biochemical, and stable isotope analyses [J]. *Astrobiology*, 2017, 17(5): 413-430.
- [28] Fan T W M, Warmoes M O, Sun Q, *et al.* Distinctly perturbed metabolic networks underlie differential tumor tissue damages induced by immune modulator β -glucan in a two-case ex vivo non-small-cell lung cancer study [J]. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*, 2016, 2(4): 1-18.
- [29] 周愿, 单亦初, 张丽华, 等. 基于稳定同位素标记的蛋白质组学定量方法研究进展 [J]. *色谱*, 2013, 31(6): 496-502.
- [30] Creek D J, Chokkathukalam A, Jankevics A, *et al.* Stable isotope-assisted metabolomics for network-wide metabolic pathway elucidation [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(20): 8442-8447.
- [31] Metallo C M, Walther J L, Stephanopoulos G. Evaluation of ^{13}C isotopic tracers for metabolic flux analysis in mammalian cells [J]. *J Biotechnol*, 2009, 144(3): 167-174.
- [32] Chen Y J, Huang X, Mahieu N G, *et al.* Differential incorporation of glucose into biomass during Warburg metabolism [J]. *Biochemistry*, 2014, 53(29): 4755-4757.
- [33] 刘占峰, 李良君, 任征, 等. 同位素标记葡萄糖的研究进展 [J]. *核技术*, 2013, 36(1): 1-7.
- [34] 刘占峰, 岳海艳, 袁其朋, 等. 同位素标记氨基酸的应用研究进展 [J]. *核技术*, 2004, 27(9): 681-686.
- [35] 张爱华, 董明, 阮小林, 等. 稳定同位素示踪技术应用研究进展 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(10): 2652-2654.
- [36] Lane A N, Tan J, Wang Y, *et al.* Probing the metabolic

- phenotype of breast cancer cells by multiple tracer stable isotope resolved metabolomics [J]. *Metab Eng*, 2017, 43(Pt B): 125-136.
- [37] Yang Y, Fan T W, Lane A N, *et al*. Chloroformate derivatization for tracing the fate of amino acids in cells and tissues by multiple stable isotope resolved metabolomics (mSIRM) [J]. *Anal Chim Acta*, 2017, doi: 10.1016/j.aca.2017.04014.
- [38] Sellers K, Fox M P, Nd B M, *et al*. Pyruvate carboxylase is critical for non-small-cell lung cancer proliferation [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(2): 687-698.
- [39] Lane A N, Fan T W M, Bousamra M, *et al*. Stable isotope-resolved metabolomics (SIRM) in cancer research with clinical application to nonsmall cell lung cancer [J]. *Omics J Integr Biol*, 2011, 15(3): 173-182.
- [40] Chen W L, Wang Y Y, Zhao A, *et al*. Enhanced fructose utilization mediated by SLC2A5 is a unique metabolic feature of acute myeloid leukemia with therapeutic potential [J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(5): 779-791.
- [41] Li J, Hoene M, Zhao X J, *et al*. Stable isotope-assisted lipidomics combined with nontargeted isotopomer filtering, a tool to unravel the complex dynamics of lipid metabolism [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(9): 4651-4657.
- [42] Meiser J, Delcambre S, Wegner A, *et al*. Loss of DJ-1 impairs antioxidant response by altered glutamine and serine metabolism [J]. *Neurobiol Dis*, 2016, 89: 112-125.
- [43] Cheng S, Fu X, Wang X, *et al*. Studies on the biochemical formation pathway of the amino acid l-theanine in tea (*Camellia sinensis*) and other plants [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(33): 7210-7216.
- [44] Nakamura H, Kawamata Y, Kuwahara T, *et al*. The nitrogen moieties of dietary nonessential amino acids are distinctively metabolized in the gut and distributed to the circulation in rats [J]. *J Nutr*, 2017, 147(8): 1537-1545.
- [45] Croyal M, Chétiveaux M, Ouguerram K, *et al*. Stable isotope kinetic study of apolipoprotein M in healthy subjects [J]. *Atherosclerosis*, 2016, 252: e116-e117.
- [46] Kirschman L J, Mccue M D, Boyles J G, *et al*. Exogenous stress hormones alter energetic and nutrient costs of development and metamorphosis [J]. *J Exp Biol*, 2017, 220(Pt 18): 3391-3397.
- [47] Ahn S V, Koh S B, Lee K S, *et al*. Association between nitrogen stable isotope ratios in human hair and serum levels of leptin [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2017, 243(2): 133-139.
- [48] Rijnsburger M, Eggels L, Castel J, *et al*. A novel, double intra-carotid cannulation technique to study the effect of central nutrient sensing on glucose metabolism in the rat [J]. *J Neurosci Meth*, 2017, 290: 79-84.
- [49] Vogt C, Lueders T, Richnow H H, *et al*. Stable isotope probing approaches to study anaerobic hydrocarbon degradation and degraders [J]. *J Mol Microb Biotec*, 2016, 26(1/3): 195-210.
- [50] Welford R W D, Vercauteren M, Trébaul A, *et al*. Serotonin biosynthesis as a predictive marker of serotonin pharmacodynamics and disease-induced dysregulation [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep30059.
- [51] Owino V O, Slater C, Loechl C U. Using stable isotope techniques in nutrition assessments and tracking of global targets post-2015 [J]. *P Nutr Soc*, 2017, 76(4): 495-503.