

稳定性核素氘在生物医学研究中的应用

山东医科大学药学系(济南, 250012) 刘新泳 徐丽君综述 夏宗勤* 审校

摘要: 氘标记物在生物医学研究中的应用, 为人们提供了一个安全、有效、方便的示踪工具。本文综述了氘标记物在生物代谢转变研究方面的示踪技术, 以及在医学诊断和临床治疗方面的应用进展。

关键词: 氘 稳定性核素示踪技术

氘 (^2H) 是较早应用于生命科学研究的稳定性核素, 它克服了放射性同位素氚 (^3H) 在应用方面的某些不利因素, 为人们在生物医学领域中的研究提供了一个安全有效的工具。

氘标记物的种类繁多, 就其在生物医学研究中的应用, 大体可分为下列四个方面: ①应用氘标记物以同位素稀释法测定生物体的体液量; ②应用氘标记物研究外源性和内源性物质在生物体内的代谢转变过程; ③应用氘的同位素效应, 增加药物的稳定性, 降低药物的毒副作用, 提高药物的体内生物利用度, 以增强药物的疗效; ④以氘标记物作为内标物, 利用体外示踪法, 借助气相色谱-质谱 (GC-MS) 分析手段, 用于药物体液浓度检测。

1 体液量的测定

精确测定人总体水份 (Total Body Water, TBW) 是评价全身脂肪量的重要指标, 并可用于评价心、肾、肝等器官功能异常及严重灼伤时水盐代谢状况。

过去, 测定总体液量的方法常以水溶性的安替比林及尿素作为示踪剂, 但由于它们很快被代谢排泄, 或与蛋白质结合或分布不均匀, 因此误差较大。目前, 测定人总体水分含量普遍采用的方法是: 基于同位素稀释法原理, 以氘标记水 ($^2\text{H}_2\text{O}$) 作为示踪剂的测定

方法。这一方法是 50 年代由 Solomon 等人提出的, 作为临床常规测定, 一般包括下面 5 个步骤:

- ① 口服 25ml 的 $^2\text{H}_2\text{O}$;
- ② 在服药后 2~3 小时, 收集尿样;
- ③ 尿液经过炽热的锌粒进行还原;
- ④ 质谱测定 $\text{H}/^2\text{H}$ 的比值;
- ⑤ 计算总体水量 V_2 : $V_2 = \frac{C_1 V_1}{C_2}$ 。

其中, C_1 表示服用 $^2\text{H}_2\text{O}$ 的浓度; C_2 表示体液平衡后尿中 $^2\text{H}_2\text{O}$ 的浓度; V_1 表示服用 $^2\text{H}_2\text{O}$ 的体积。总体水量 V_2 的两次计算差值不得大于 5%, 否则说明体液没有达到平衡。

总体水量的计算是根据 $^2\text{H}_2\text{O}$ 在稀释前后的总的摩尔数不变的原理。近年来发现, 应用上述原始的稀释公式计算 TBW 与实际值相差较大, 常需加上校正因子校正后使用。如罗伟等人 (1994 年) 在测定人 TBW 时采用下列校正公式:

$$\text{TBW}(\text{kg}) = (\alpha \times \text{APE}_d / \text{MW}_d) \times (18.02 / \text{APE}_{\text{BW}}) / (1000 \times \alpha^{-1})$$

式中, d 为标记水重量, MW_d 为标记水分子量, APE_d 为标记水的百分超, APE_{BW} 为标记水进入体内被体内原有水混合平衡后的标记水的百分超, α 为从标记水稀释空间 (即分布容积) 换算成 TBW 的校正因子。

1977 年, Halliday 等人通过改进, 在还原尿液的步骤中, 能还原 2~4g 的 $^2\text{H}_2\text{O}$ 。这

* 上海第二医科大学实验核医学研究室

一步骤的改进,使该法得以广泛地应用于新生儿、儿童、孕妇和哺育期妇女体液量的测定。Coward等人于1979年应用并推广了这一方法,计算了一定时间内新生儿哺乳量,克服了传统称重法测定哺乳量的麻烦。

妇女在怀孕和产后,体内脂肪和水分都有很大的变化。Wong等人^[1]在1989年通过同位素稀释法和人工测量法对比试验,测定了哺育期妇女总体水分及脂肪含量,结果表明:尽管 $^2\text{H}_2\text{O}$ 稀释法在方法学上有某些假定和缺点,但它所测数值更能反映机体的实际变化。该实验测得受试者唾液、尿液、乳汁和呼气中水份的氢的同位素比值 $^2\text{H}/^1\text{H}$ 分别为1.004、0.993、1.002和0.942。这些数值可直接应用于同位素稀释计算中,在不同受试者之间没有显著性差异。

肺水肿病人的肺血管外水量增加,可利用氘标水($^2\text{H}_2\text{O}$)来测定之。70年代,Basser等人用吲哚花菁绿(ICG)染料作为血管内示踪物,用 $^2\text{H}_2\text{O}$ 作为扩散示踪剂,根据两种物质的扩散体积的差异,求得肺水肿组织中水的体积。试验采用健康受试者与患者对照法,结果显示:试验组测定值(7.3~9.3ml/kg)明显地高于对照组(2.1~3.1ml/kg)。

体内氘水的测定方法有多种,气体同位素比值质谱法(GIRMS)是目前最为精确的测定方法,其丰度灵敏度可达0.01%,但所测样品必须是纯净的 H_2 形式,故在测定前要对样品进行蒸馏处理,制备比较复杂。作为常规应用,液体中 $^2\text{H}_2\text{O}$ 的含量也可直接用红外光谱法(Infrared Spectroscopy)或滴落法(Falling-Drop Method)(亦称密度测定法,Densitometry)求得,不必非用质谱仪求算气体同位素比值 $^2\text{H}/^1\text{H}^2$ 。然而,这些方法除灵敏度受到限制外,样品制备同样麻烦,且所需氘水的剂量也较大。随着有机质谱技术的推广,Schmit等人于1981年用正丙醇与水交换后,测定正丙醇中氘的同位素丰度来推算水中氘含量;1983年Bencsath等人在此

基础上提出了用“自化学电离”(Self-Chemical Ionization)法对水样中氘的含量直接测定;江骥等人(1995年)用该法测定了中国人总体水分及氘水在成人体内的平衡速度。

2 体内代谢研究

利用稳定性同位素体内示踪技术进行物质在体内代谢转化的研究,可以获得物质在体内的代谢途径、代谢机理以及动力学方面的参数,从而借以诊断疾病。根据目前文献报道,在体内代谢途径研究过程中,常用的氘标记物有氨基酸、葡萄糖、类固醇(甾体类化合物)、有机酸等,这些氘标记物的应用大都是针对某些疾病的研究。

2.1 氘标记氨基酸

应用氘标记氨基酸测定机体相应的酶活力是代谢研究的一个重要方面。如肝炎患者慢性肝功能严重障碍时,常出现血浆苯丙氨酸含量的升高,它是导致肝性脑病及肝昏迷的重要发病机理。为了探讨血浆苯丙氨酸升高的机制,戴滕昌等人(1990年)建立了苯丙氨酸羟化酶整体测定方法:通过给病人注射L-[2,3- ^2H 苯丙氨酸,测定了血浆中苯丙氨酸与酪氨酸的丰度之比,从而在一定程度上可反映苯丙氨酸羟化酶的活力。结果表明,慢性肝功能障碍时,该酶的活力降低,降低的程度与肝功能损害程度呈正比。

应用氘标记苯丙氨酸和酪氨酸对苯丙酮酸尿症(PKU)的鉴别诊断已为人们所熟知。自70年代以来,Curtius等人就致力于对PKU患者体内多种酶活力的研究,包括用L-环-3,5- ^2H 苯丙氨酸和L-环- ^2H 苯丙氨酸测定苯丙氨酸-4-羟化酶活性;用L-[3,5- ^2H 酪氨酸测定酪氨酸-3-羟化酶活性以及利用L-[^2H 色氨酸测定色氨酸-5-羟化酶活性和色氨酸吡咯酶活性的研究等。

应用氘标记氨基酸测定蛋白质中的氨基酸动力学参数是其应用的另一个方面。Jak-sic等人^[3]利用L-[甲基- ^2H]亮氨酸与L-

[1^{13}C]脯氨酸联合,研究了烧伤病人脯氨酸的循环氧化及体内生物合成等代谢过程的变化情况; Lichtenstein 等人^[41]用 [$5, 5, 5\text{-}^2\text{H}$]亮氨酸 [$4, 4, 4\text{-}^2\text{H}$]缬氨酸和 [$6, 6\text{-}^2\text{H}\text{-}1, 2\text{-}^{13}\text{C}$]赖氨酸研究了载脂蛋白 A-I 和 B-100 的代谢动力学方面的特性; Hachey 等人于 1988 年为研究孕妇和哺育期妇女脂蛋白代谢情况,应用 L-[$4, 4, 5, 5\text{-}^2\text{H}$]赖氨酸盐酸盐代替了以往用¹²⁵I 或¹³¹I 标记蛋白的放射性核素测定法。

2.2 氘标记葡萄糖

Reinauer 等人^[5]应用 [$6, 6\text{-}^2\text{H}$]葡萄糖研究测定了葡萄糖体内代谢的主要参数:在稳态条件下,正常人葡萄糖的更新速率为 $2.42 \pm 0.11 \text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{min})$,葡萄糖氧化速率为 $1.74 \pm 0.08 \text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{min})$,葡萄糖清除率为 $3.04 \pm 0.017 \text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{min})$,葡萄糖的再循环速率为 2.47% [约为 $0.6 \text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{min})$],在高胰岛素浓度下 ($70\text{--}80 \text{mU/L}$),葡萄糖更新速率可增加 30%~40%,而肝葡萄糖生成速率受到抑制。这些参数的测定,对葡萄糖代谢疾病的临床诊断具有很高的参考价值。

应用 [$6, 6\text{-}^2\text{H}$]葡萄糖作为示踪剂,有人研究了新生儿葡萄糖的代谢情况:葡萄糖的生成速率与新生儿大脑发育及智力呈正相关。1988 年, Wolf 等人利用 [$2\text{-}^2\text{H}$]葡萄糖和 [$6, 6\text{-}^2\text{H}$]葡萄糖同时输入的方法,研究了葡萄糖酵解产物磷酸甘油醛的生成速率:氘标记葡萄糖经糖循环后,2 位氘丢失,而 6 位氘仍然存在,通过两种标记葡萄糖血中浓度的变化,可计算出糖酵解过程由己糖到丙糖的转化速率。

2.3 氘标记类固醇(甾体)

Kuster 等人在 1981 年应用氘标记类固醇 [$17, 21, 21, 21\text{-}^2\text{H}$]孕甾烯醇酮,研究了类固醇生物合成缺陷病患者的体内代谢过程:静脉给药 (10mg)后,应用 GC-MS 技术测定了尿中三种代谢产物的排出速率,其结果均

比健康人快。也有人对孕妇体内类固醇的代谢和更新进行了研究报道^[6],所用的氘标记类固醇有: β -羟基- 5α -[$3\alpha, 11, 11\text{-}^2\text{H}$]孕甾烷酮-20-硫酸酯和 5α -[$3\alpha, 11, 11, 20\text{-}^2\text{H}$]孕甾烷- β -20 α -二醇硫酸酯等,通过对受试者 24 小时血样的检测分析,证实了上述类固醇某些代谢步骤,同时阐明了 3α 和 β -羟基类固醇是体内构型不能相互转化的两种物质。

肾上腺素缺乏导致生长发育迟缓等库兴综合征 (Cushingoid),临床上常用考的松激素治疗。为了研究考的松在患者和正常人体内的生成速率,静滴氘标 [$9, 12, 12\text{-}^2\text{H}$]考的松,取血样分析,求出血浆氘标记考的松的浓度,从而计算出考的松的生成速率,结果表明:患者体内考的松合成速率明显增加;考的松的体内分泌与其血药浓度呈正比^[7];健康儿童和青年人体内考的松生成速率与性别无关,测得值为 $9.5 \pm 2.5 \text{mg/d}$,均比前人估计值低得多^[8]。

2.4 氘标记有机酸

羟基丁酸盐作为脂肪酸的一种代谢产物,具有调节热量平衡的作用,其酮式结构是消耗葡萄糖后的大脑供能物质, Gibson 等人^[9]测定了健康人在正常生理状态下尿、血浆和脑脊液中羟基丁酸的浓度,结果分别为 $2.64 \pm 3.46 \text{mmol/L}$ (尿中含 1mol 肌酸酐)、 $1.09 \pm 2.87 \text{nmol/L}$ 、 $0.98 \pm 1.17 \text{nmol/L}$ 。Bougneres 等人于 1986 年用 D-[$6, 6\text{-}^2\text{H}$]葡萄糖与 D-($-$)-3-OH-[$4\text{-}^2\text{H}$]丁酸盐一起静脉注射给新生儿或儿童,测定了酮式结构的体内转化速率,借以研究幼儿大脑营养的需求量。

2.5 其它氘标记物

在代谢研究中,其它类型的氘标记物也有很多报道,如应用 [^2H]甘油和 [$1\text{-}^{13}\text{C}$]脂肪酸研究危重病人总体脂肪分解和脂肪酸再酯化的代谢抑制过程^[10],研究表明,危重病人脂肪分解速率的加速是机体对疾病反应的应答,由于脂肪酸的释放超过了能量的需求,

酰是引起变性血红蛋白血症的毒性代谢途径。

4 体外检验

体外示踪法是将氘标记物作为内标物加到样品中,定量地分析已知物的一种较古老的分析方法。根据这一方法,用氘标记氨基酸测定了蛋白质水解后氨基酸的含量。目前,随着 GC-MS技术的应用,这一方法已用于混合多元组分的含量分析,成为临床体外分析的重要手段。

体液分析是氘标记物应用的一大领域。例如,在类固醇物质的生化研究中,测定低于 10^{-12} g 水平的含量比较困难,但应用氘标记物如 ^2H -雌二醇作为内标,通过 GC-MS技术同位素稀释法,可以测定出儿童血浆内低于 1pg 水平的雌二醇;用 $[1, 2-^2\text{H}]$ 十一烷酸睾丸素可区分血浆中外源性和内源性睾丸素;对性机能低下患者给予十一烷酸睾丸素治疗,药物在体内水解后变成睾丸素,在较低剂量下即可使血浆睾丸素水平增加,将外源性睾丸素用氘标记后,通过测定氘代物而知之,而内源性睾丸素可以非标记物形式测得,依此可指导临床个体用药;肝硬化病人的血浆 α -酮异己酸 (KIC)降低,以 $[5, 5, 5-^2\text{H}]$ -4-甲基-2-酮戊酸 (D_3 -KIC)为内标,用稳定同位素稀释-质谱分析技术建立的人体血浆 KIC定量分析方法,可分析 KIC降低的原因:主要是肝硬化病人机体对亮氨酸脱氨氧化能力降低所致;早期预测胎儿遗传代谢性疾病对于优生优育具有重要意义,丙酸代谢遗传病导致丙酸血症和甲基丙二酸血症,该病在出生后即可表现出来, Sweetman 等人 (1981年)通过在孕妇羊水中加入 $[^2\text{H}]$ 甲基丙二酸和 $[^2\text{H}]$ 甲基枸橼酸进行体外羊水的羧酸分析,作为产前检查; Jacobs 等人 (1984年)应用 3-

羟基- $[^2\text{H}]$ 异戊酸对羊水分析,作为亮氨酸代谢遗传病——羧化酶缺乏症的产前检查,亮氨酸代谢羧化酶缺乏者体内 3-羟基异戊酸浓度降低。

类似测定方法还有用 $[\text{N}-^2\text{H}]$ 吗啡测定尿液中吗啡的浓度; $[^2\text{H}]$ Rimantadine (甲基金刚胺)用于血浆 Rimantadine 的快检;应用 $[^2\text{H}]$ β -内啡肽测定组织中内啡肽含量;应用 (甲基- ^2H) 美沙西汀研究肝功能等。

总之,氘在生物医学领域研究中的应用越来越广泛,氘标记物的应用仅仅是稳定核素示踪技术应用的一个范例,它具有无比的优越性,是一些放射性示踪技术不可取代的。

参考文献

- 1 Wong WW et al. *Brit J Nutr* 1989; 61, 25-33
- 2 Peter K. *Stable Isotope Pharmaceuticals for Clinical Research and Diagnosis*, Gustav Fischer Verlag. Jena. Stuttgart. New York, 1991; P53
- 3 Jaksic T et al. *Am J Clin Nutr*, 1991; 54 408-413
- 4 Lichtenstein AH et al. *J Lipid Res*, 1990; 31: 1693-1701
- 5 Reinauer H et al. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1990; 28 50566
- 6 Anderson RA et al. *Steroids*, 1990; 55 443-457
- 7 Esteban NV et al. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991; 72 39-45
- 8 Linder BL et al. *J Pediatr*, 1990; 117 892-896
- 9 Gibson KM et al. *Biomed Environ Mass Spectrom*, 1990; 19(2): 89
- 10 Klin S et al. *Crit Care Med*, 1991; 19(6): 776-779
- 11 Jacob P et al. *Biol Mass Spectrom*, 1991; 20 247-252
- 12 Benowitz NL et al. *Clin Pharmacol Ther*, 1991; 49 270-277
- 13 Jones PJ. *Can J Physiol Pharmacol*, 1990; 68 955-959
- 14 Shea CR et al. *Cancer Res*, 1989; 49 3961-3965

(收稿日期: 1996-03-20)