# 稳定同位素标记技术对多肽纳米药物的体内生物学行为及其肠道微生物环境下的代谢过程解析

1. **导师及课题组介绍**
2. 导师介绍链接（**请将网址链接更新到导师自己的页面**）： https://people.ucas.edu.cn/~changxl
3. 课题组介绍（导师提供）

课题组主要利用稳定同位素13C骨架标记技术追踪研究纳米材料体内的纳米生物学效应和安全性，揭示碳纳米材料在环境复杂生物体系的作用规律和“构-效”机制。研究结果连续发表在环境领域重要的国际学术期刊。迄今已发表 SCI 论文 50 余篇。 2007 年-2015 年，参与组织全国十余个研究机构的一线科研人员收集整理国内外陆续发表的与纳米安全性相关的最新资料，协助完成我国第一套《纳米安全性》丛书（10 册）的编辑和出版，其中包括负责《纳米毒理学—纳米材料安全应用的基础》书籍的撰写和编辑，2010 年北京科学出版社出版。完成《化妆品安全性及管理法规》中“纳米材料毒理学及安全性评价”一章节，2013年北京化学工业出版社出版。关于稳定同位素示踪技术研究，完成 John Wiley &Sons, Ltd. Published 出版社的《Toxicology of Nanomaterials》书籍章节，2016 年出版。 常雪灵研究团队已建立了稳定同位素标记技术和检测平台，从源头合成稳定同位素骨架标记碳纳米材料，建立了高碳背景下碳纳米材料的复杂体系生物体内定量的研究方法，搭建了环境水生生态体系和环境重要农作物的碳纳米材料的纳米生物效应与安全性研究平台。

主持国家自然科学基金青年基金 1 项，面上项目 2 项，北京市自然科学基金面上项目 2 项，国家重点研发计划子课题 2 项。

1. **科创计划项目简介**
2. 项目简介

多肽纳米药物独特的生物相容性与结构可精准调控的优势使其成为最有前景的肿瘤治疗手段之一。囿于多肽与生物环境的化学成分高度同源，以及肠道微生物环境下复杂的生物学过程，传统的分析方法无法实现快速、精确的体内定量检测和代谢转化，限制了多肽纳米药物的研发进程。C-13骨架标记不会改变多肽纳米材料的理化性质，并可对多肽纳米药物及其代谢产物进行内外源区分与定量。我们从多肽纳米药物开发过程对其药物代谢动力学研究的实际需求出发，本项目以稳定同位素示踪为主要技术手段，选择以YSV序列为核心的多肽进行稳定同位素骨架标记，利用自组装技术构建多肽纳米药物，结合同步辐射技术和X射线微聚焦技术，从空间和能量等方面表征其纳米结构、构象和排列以及其与蛋白质结合的构象变化，以超高灵敏度和高精度的同位素比值-质谱仪进行准确定量检测。围绕13C标记可使被标记分子的13C/12C的比值发生改变，检测多肽纳米药物在生物体内的行为，建立针对多肽纳米药物在生物体内的药物代谢动力学的定量检测方法及其在肠道中心与微生物群相互作用的规律和机制的研究方法，进行代谢降解，代谢产物分离和检测分析等，明晰多肽纳米药物在肠道中心的代谢通路，提出药物代谢/效应动力学行为的调控机制，指导临床用药方案设计。这样，将客观而全面的获得多肽纳米药物的靶向分布、组织器官吸收剂量、药物代谢动力学以及代谢产物和结构变化等数据，阐明其可能的代谢行为和机制以及构-效关系，为提高多肽纳米药物的临床前研究和临床应用方案设计提供重要科学依据。

1. 使用的实验方法、仪器设备、数据软件等
2. 实验方法

稳定同位素13C标记多肽纳米药物的鉴别：13C标记多肽纳米药物，其一级结构的确证采用质谱测定相对分子质量，色谱测定氨基酸组成，质谱结合酶切或采用Edman降解测定肽序。多肽的二级结构是肽链因氢键而形成的局部结构，采用X射线单晶衍射、核磁共振、红外、紫外检测方法确证，采用正交表征方法确保能够准确鉴别多肽二级结构。利用同步辐射中小角度散射WAXD和圆二色性（SRCD）光谱技术评估多肽稳定性，解析多肽纳米药物的二级结构。

稳定同位素13C标记多肽纳米药物的纯度分析：采用高效液相色谱-质谱（HPLC-MS）对合成的粗品进行纯度检测和结构确证，以1HNMR进行分析表征，以同位素比值质谱仪高精度检测多肽中的 δ13C。

同位素比值质谱分析13C标记的多肽纳米药物生物分布：小鼠尾静脉注射13C标记的多肽纳米药物或注射生理盐水和未标记组的小鼠作为空白对照，并在注射不同时间后依次收集各组小鼠主要脏器组织，将心、肝、脾、胃、肾、肺、脑、肠和肉的样品用滤纸吸干后称重，以上样品和血液样品都用匀浆机匀浆。组织匀浆液冷冻干燥，研磨成粉后进行同位素质谱分析。尿、粪便、骨和皮毛则直接 150 ℃烘干，然后研磨成粉，进行同位素质谱分析。测得的 δ 值计算成多肽纳米药物的含量， 进而计算出 % ID （%注射剂量）和 % ID/g （%注射剂量/克组织）。获得蓄积器官、排泄速率等数据。

13C标记的多肽纳米药物进入肠道后产生短链脂肪酸类型和途径分析：对13C标记多肽纳米药物与肠道中心提取细菌孵育前后样品进行HPLC、MALDI-TOF、凝胶电泳、拉曼和显微镜等一系列测试。对13C标记多肽纳米药物处理的肠道细菌的上清液进行高效液相色谱（HPLC）在体外筛选了一系列短链脂肪酸，包括醋酸盐、丙酸盐、丁酸盐、戊酸（VA）和己酸（CA）。随后，13C标记多肽纳米药物通过口服给药方式处理小鼠28天后，用1ml冷磷酸盐缓冲盐水（PBS）冲洗小肠（回肠，5 cm）和结肠（4 cm），用于醋酸盐、丙酸盐、丁酸盐、戊酸（VA）和己酸（CA）分析，利用前期建立的最先进的稳定同位素示踪技术来揭示13C标记多肽纳米药物的代谢途径。根据短链脂肪酸水平变化筛选确认主要产物，进而对其预期代谢转化途径相关产物进行高效液相色谱和LC-MS/MS测试。

13C标记多肽纳米药物在肠道中心的代谢和转化产物：小鼠取小肠和结肠，经过样品前处理，采用GC/LC/MS/MS 和高效液相-同位素比值质谱检测，结合核磁和拉曼技术确定多肽代谢和转化产物。即生物样品组织经正己烷-丙酮（1:1，V/V），和正己烷-乙酸乙酯（9:1，V/V）两步提取，再用 0.1 mol/L 的磷酸（含0.9%的 NaCl），分离有机相和水相。有机相经浓缩纯化后，经液相色谱分离，二极管阵列检测器检测，再到质谱检测器（四级杆-时间飞行质谱），通过对色谱图和质谱谱图比对，发现不同材料的分子离子峰。改变质谱模式，再次确认。同时，通过优化色谱条件，尽可能让所用的组分分开。以核磁共振光谱、拉曼同位素比值质谱确定每个组分的结构信息，根据结构信息和分子量，推断出组分的结构。

1. 仪器设备

通过扫描电子显微镜(SEM)和透射电子显微镜(TEM)观察多肽纳米药物的形貌和微观结构。同位素比值质谱确定13C标记多肽的体内分布。红外光谱(IR)、拉曼光谱(Raman)、高效液相、气相色谱（HPLC）、质谱（MS）、核磁等对代谢产物进行分析 。

1. 对学生专业知识背景等方面的要求

首先，对生物学、材料科学、化学等多个学科的知识具有基本的了解。需要掌握生物学的基本原理，了解生物体内的组织结构和功能特点，同时还需要学习材料科学的基础知识，包括材料的性能、制备方法、表征技术等。此外，涉及到化学反应和材料表面的改性等内容也需要具备简单的认识。

其次，需要具备文献阅读理解能力，快速了解多肽纳米药物领域的最新发展动态。

最后，需要具备创新意识和实践能力。了解最新的研究成果和技术进展，同时还需要具备实践能力，能够将所学知识应用到实际生产和研究中。

1. 项目预期目标、成果和收获

本项目以YSV序列为核心肽链的多肽纳米药物为研究对象，以稳定同位素示踪为主要技术手段，建立高灵敏度、高稳定性的13C骨架标记方法，结合同位素比值质谱仪定量检测结合同步辐射检测技术，实现多肽纳米材料在体内的生物学行为探索，得到多肽纳米药物在生物体内的吸收、分布、代谢、排泄（ADME）和归趋等过程的相关数据，为多肽纳米药物实际开发中药物代谢动力学的方法学的研究提供高效、灵敏的定量分析方法和重要参数。更重要的是，在利用同位素标记和示踪技术对13C标记的多肽纳米药物在体外和体内的代谢-转化过程进行全面研究，阐明多肽进入肠道后产生短链脂肪酸的途径，对肠道微生物群的影响以及进一步影响肠道干细胞及其他功能，进而为肠道相关疾病的治疗提供帮助。

具体回答以下科学问题：

i. 多肽纳米药物体内药物代谢动力学与其他纳米材料相比有何独特性？ 建立高灵敏度、高稳定性、本征标记检测方法。

ii. 多肽纳米药物体内药物代谢动力学对其效应动力学有何影响？明晰其在体内的蓄积器官、药物代谢动力学以及排泄行为，寻找提高药物效应的方法。

iii. 多肽纳米药物在肠道中心通过哪些特定途径和肠道细菌参与进行代谢，代谢产物及生物学影响？揭示多肽纳米药物的生物学行为，阐明其功能性影响。

其中的关键技术

1. 体内13C标记多肽纳米药物的定量分析

由于多肽纳米药物本身的独特性，生物介质的复杂性，使环境生物体中多肽纳米药物的定量研究尤为艰难，然而多肽纳米药物在生物体内的高灵敏的定量检测，却是多肽纳米药物体内代谢过程研究的重要前提。本项目利用稳定同位素 13C 标记技术，以富含13C的试剂标记待测肽段内氨基酸骨架进行原位示踪，研究其在细胞和小鼠内的代谢机制和规律。因采用13C骨架标记的方法，具有高灵敏度（可达10-12数量级）、无放射性、对生物体无害并克服半衰期的限制实现长期示踪的优点。此外，作为一种本征标记，并不会改变多肽纳米药物本身的性质，可作为一种通用的方法应用到多种多肽纳米药物药代力学研究中。为多肽类药物的进一步发展和应用中关键的体内代谢过程和安全性评估问题，提供数据和参考，建立一套适合测定不同多肽纳米药物少量或痕量的样品前处理技术，进行稳定同位素比值和液质联用的测试，计算多肽纳米药物在各个器官的蓄积量，是本研究项目需要解决的。

1. 13C标记多肽纳米药物体内代谢、转化产物及其纳米结构变化分析

多肽纳米药物在生物体内代谢过程非常复杂，是阻碍多肽纳米药物开发的重难点之一。多肽类药物与其他类型药物不同，其生物体内作用过程复杂，不但受自身理化性质的影响，也会受存在与机体内的多种多样结合蛋白的影响，比如蛋白受体、自身抗体等。其复杂的代谢过程导致多肽纳米药物还存在着体内半衰期短，稳定性欠佳等缺点，因而我们利用稳定同位素13C标记技术，以富含13C的试剂标记待测肽段内氨基酸骨架进行原位示踪，结合同步辐射检测技术，研究其在肠道中心与肠道菌群相互作用的代谢机制和规律及其可能的纳米结构变化。在具体实施实验中，需要根据试验条件优化，摸索样品的高效液相色谱分析方法，进行质谱、核磁、同步辐射检测等技术分析，确定多肽纳米药物在生物体系中的代谢、转化产物及其结构变化，这无疑是需要在项目执行过程中重点解决的关键技术。

1. **其他说明**

无。