

细胞内NAD⁺水平分析方法的研究进展

孙海星* 张晓娟 白玉杰 吴东颖

(山东荆卫生物科技有限公司, 潍坊市抗衰老研究重点实验室, 潍坊 261000)

摘要 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)是存在于所有活细胞中的必需吡啶核苷酸。NAD⁺作为一种重要的辅酶和底物, 参与能量产生、DNA修复、基因表达、钙依赖的二级信使信号和免疫调节作用等多种生物学过程。NAD⁺代谢长期失衡会扰乱机体的生理功能, 导致代谢性疾病、神经退行性疾病以及癌症的发生。NAD⁺的水平随着老龄化以及年龄相关性疾病的发生逐渐降低。最近的研究表明, 提高细胞内NAD⁺水平是延缓衰老, 预防年龄相关退行性疾病的一种有前景的方法。尽管细胞内NAD⁺代谢与人类健康和疾病密切相关, 但NAD⁺含量的检测极具挑战性。目前为止, 开发了多种用于定量分析细胞内NAD⁺水平的分析方法。该文就细胞内NAD⁺水平分析方法作一综述, 着重分析近年来国内外细胞内NAD⁺水平检测的研究进展以及提出未来NAD⁺定量分析所需解决的问题。

关键词 细胞内NAD⁺; 辅酶; 疾病; 衰老; 定量分析方法

Progression in the Analysis of Intracellular NAD⁺ Levels

SUN Haixing*, ZHANG Xiaojuan, BAI Yujie, WU Dongying

(Weifang Key Laboratory of Anti-Aging Research, Shandong Jingwei Biotechnology Co., Ltd., Weifang 261000, China)

Abstract NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide) is an essential pyridine nucleotide that is present in all living cells. As an important coenzyme and substrate, NAD⁺ participates in a variety of biological processes, such as energy production, DNA repair, gene expression, calcium-dependent secondary messenger signals and immunomodulation. Long-term imbalance of NAD⁺ metabolism will disrupt physiological function, promoting several age-related diseases, such as metabolic diseases, neurodegenerative diseases and various cancers. NAD⁺ levels decrease during aging and age-related diseases. Recent studies have shown that increasing the level of intracellular NAD⁺ is a promising method for the treatment of age-related diseases. Although intracellular NAD⁺ metabolism is closely related to human health and diseases, the precise qualification of NAD⁺ content is very challenging. Up to now, a variety of analytical methods have been developed for quantitative analysis of intracellular NAD⁺ levels. This paper reviews the methods of intracellular NAD⁺ level analysis, focuses on the progress of intracellular NAD⁺ level qualification in recent years, and puts forward the problems related to future NAD⁺ quantitative analysis.

Keywords intracellular NAD⁺; coenzyme; disease; aging; quantitative analysis method

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)是关键代谢途径中细胞氧化还

原反应的辅助因子, 在生命科学的各个领域发挥着重要作用。经过一个多世纪的研究, 在NAD⁺的合成、

收稿日期: 2021-01-22

接受日期: 2021-03-08

*通讯作者。Tel: 13792689581, E-mail: 1028282684@qq.com

Received: January 22, 2021

Accepted: March 8, 2021

*Corresponding author. Tel: +86-13792689581, E-mail: 1028282684@qq.com

降解和生物学功能等方面取得了长足的进步。20世纪初, HARDEN和YOUNG^[1]首次在发酵过程中发现NAD⁺。大约30年后, VON EULER^[2]发现NAD⁺是由两个单核苷酸组成的, 即腺苷一磷酸(adenosine monophosphate, AMP)和烟酰胺单核苷酸(nicotinamide mononucleotide, NMN)。随后, WARBURG等^[3]成功分离了NAD⁺, 并描述了其在生物系统中的电子转移作用。进入21世纪后, 大量研究表明, NAD⁺不仅是能量代谢中重要的辅酶, 还参与了多种细胞信号传导途径, 并且在衰老以及年龄相关性疾病中发挥重要作用。人们希望调节其代谢和信号通路, 以对抗代谢紊乱、肿瘤发生、炎症、心血管疾病、神经变性以及与增龄性相关的病理变化^[4]。

1 NAD⁺代谢与合成

NAD⁺的稳态水平由代谢与合成之间的平衡决定。NAD⁺的还原形式NADH是通过无氧糖酵解以及线粒体氧化磷酸化产生腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)的主要氢化物供体, 在葡萄糖发酵过程中的甘油醛-3-磷酸脱氢酶催化的步骤中, NAD⁺作为氢化物受体, 产生NADH和二磷酸甘油酸, 同样, NADH作为醇脱氢酶的氢化物供体, 将乙醛还原为乙醇, 再生NAD⁺。许多氢化物转移酶或氧化还原酶可以使NAD⁺和NADH相互转化, 以减少或氧化小分子代谢物^[5]。在线粒体三羧酸循环中,

NAD⁺转化为NADH, 在这个过程中乙酰辅酶A被氧化成二氧化碳^[6]。作为辅酶参加细胞内氧化还原代谢反应时, NAD⁺水平保持不变。但是在NAD⁺依赖性的信号传导途径中, NAD⁺是不断被消耗的, 因此需要持续合成NAD⁺以维持细胞内NAD⁺浓度的稳定^[7]。

体内NAD⁺主要通过两个途径合成(图1), 利用色氨酸经过一系列代谢反应合成NAD⁺的从头合成途径以及饮食来源中烟酸(nicotinic acid, NA)、烟酰胺(nicotinamide, NAM)和烟酰胺核苷(nicotinamide riboside, NR)在不同酶的催化作用下合成NAD⁺的补救途径^[8]。NAD⁺可以通过细胞外前体来合成, 研究表明, 通过抑制NAD⁺前体的转化来阻止NAD⁺生物合成, 会导致细胞内NAD⁺含量在几个小时内显著下降^[9]。

2 NAD⁺与衰老

近年来研究表明, NAD⁺作为聚腺苷二磷酸核糖聚合酶[poly (ADP-ribose) polymerases, PARPs]、NAD⁺依赖性去乙酰化酶(Sirtuins)、CD38、CD73、CD157和SARM1(sterile alpha and TIR motif-constraining 1)等信号传导途径中几种酶的共底物, 在调节能量代谢、DNA修复、细胞寿命以及昼夜节律等方面发挥重要作用^[10]。

受损的DNA募集PARPs并激活其聚腺苷二磷酸(adenosine diphosphate, ADP)-核糖基化, 急性DNA

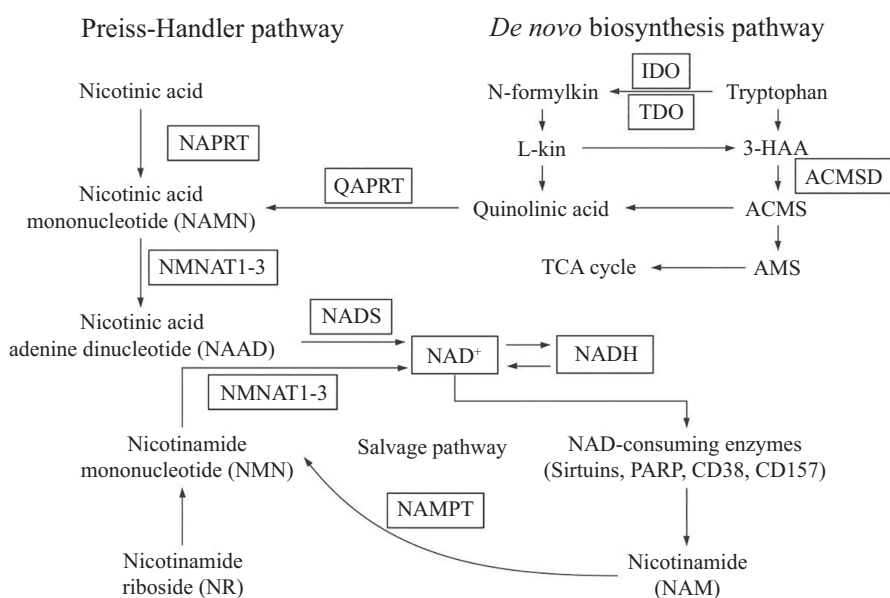


图1 NAD⁺生物合成途径(根据参考文献[9]修改)

Fig.1 NAD⁺ biosynthetic pathways (modified from reference [9])

损伤可以通过电离辐射激活PARPs而引起NAD⁺的突然消耗。PARPs抑制剂作为抗癌药物通过阻止DNA修复使肿瘤细胞对基因毒性药物产生凋亡性杀伤敏感,并在临床试验中发挥作用^[11]。Sirtuins在应对营养和环境干扰(如禁食、饮食限制、DNA损伤以及氧化应激)时起关键作用。一般来说, Sirtuins的激活会触发核转录程序,从而提高代谢效率,并上调线粒体氧化代谢以及产生对氧化应激的抵抗。Sirtuins通过增加抗氧化途径以及通过修复蛋白的去乙酰化或ADP-核糖基化促进DNA损伤修复来培育这种抵抗力。研究表明, Sirtuins能延长酵母、蠕虫、果蝇和小鼠的寿命,并能缓解小鼠模型中多种与衰老相关的疾病^[6]。CD38是一种在内皮细胞和炎症细胞中高度表达的胞外酶,是哺乳动物组织中主要的NAD⁺消耗酶,通过将NAD⁺水解为NAM和环ADP核糖(cyclic ADP ribose, cADPR)来调节细胞NAD⁺代谢,研究表明, CD38可导致年龄性相关的NAD⁺水平的下降^[12]。

3 细胞内NAD⁺水平的检测

NAD⁺参与了数百种生化反应,且不同组织细胞中NAD⁺的水平变化非常大,在哺乳动物细胞中,总的NAD⁺水平范围为300~800 μmol/L,细胞内浓度的变化取决于细胞类型、细胞状态和生长条件。对NAD⁺及其相关代谢产物含量的检测是细胞或组织进行糖酵解、糖异生、脂肪酸氧化等代谢过程能力的有力指标。此外, NAD⁺可能是衰老、营养状态、昼夜节律变化或不同病理的标志。因此,开发一种快速灵敏且可靠的检测细胞内NAD⁺水平方法是非常有必要的。

与其他辅助因子如NADH相比, NAD⁺不发光,因此不能用荧光法检测^[13]。近年来,随着研究的深入,越来越多高效、快速且稳定的分析方法及仪器不断用于NAD⁺水平的检测。其中生化分析,如高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、酶循环分析法、毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)、核磁共振光谱(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)、生物传感器等技术在细胞内NAD⁺水平检测中都得到了比较好的应用(表1)。

3.1 生化分析

3.1.1 高效液相色谱法(HPLC) 在细胞中NAD⁺和

相关代谢物的浓度在1 μmol/L~1 mmol/L变化,因此分析方法必须快速灵敏且稳定。基于液相色谱(liquid chromatography, LC)的分析能够及时测量多个代谢物,每次运行时间从10 min到1 h不等。20世纪70年代,开发了一种通过对吡啶二核苷酸定量分析直接测定氧化还原状态的HPLC^[14]。随后,使用高效液相色谱-紫外法(high performance liquid chromatography-ultraviolet, HPLC-UV)^[15]、高效液相色谱-核磁共振谱法(high performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy, HPLC-NMR)和NAD⁺衍生后的荧光,对细胞内NAD⁺水平进行定量分析。由于样品的复杂性,通过高效液相色谱-紫外-可见分光光度法进行NAD⁺水平定量分析受到严重干扰,在复杂的混合物中,单峰可能具有相同保留时间的其他代谢产物。此外,峰形也易受到样品复杂性的影响。液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometer, LC-MS)联用技术具有特异性强和灵敏度高的优点,是复杂样品中小分子测量的主要分析方法,适用于NAD⁺水平的定量分析^[16],研究人员利用液相色谱-质谱联用技术(HPLC-MS)测定了小鼠红细胞内NAD⁺浓度^[17-18]。

越来越多的研究在LC-MS的基础上优化了对细胞内NAD⁺水平检测的技术。EVANS等^[19]将稳定同位素标记的NAD⁺前体色氨酸、喹啉酸、NA和NAM添加到培养人肝癌细胞(human hepatoma cell, SK-HEP)的培养基中,然后收集细胞,提取NAD⁺,用新开发的液相色谱-电喷雾电离离子阱质谱法测定标记与未标记NAD⁺水平的比值,测量每个前体相对于内标(由面包酵母制备的完全标记¹³C、¹⁵N标记的NAD⁺)形成的NAD⁺含量。结果表明,与等浓度的色氨酸、喹啉酸或NA相比, NAM作为一种NAD⁺前体在体内起主导作用。TRAMMELL等^[16]使用¹⁸O标记联合HPLC-MS技术,在实验提取物中加入¹⁸O标记的NAM和¹⁸O标记的NR定量分析未标记的NAM和NR,对NAD⁺代谢体进行有针对性的定量检测。RATAJCZAK等^[20]为了比较NR和NMN对内源性表达烟酰胺核苷激酶1(nicotinamide nucleoside kinase 1, NRK1)细胞内NAD⁺代谢物的影响,利用稳定的同位素标记化合物(¹⁸O标记的NAM和¹⁸O标记的NMN)联合超高效液相色谱-质谱(ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry, UHPLC-MS)分析,证实哺乳动物细胞需要将细胞外的NMN转化为

表1 细胞内NAD⁺水平分析
Table 1 Analysis of intracellular NAD⁺ levels

分析方法 Analysis method	原理 Principle	优点 Advantage	缺点 Disadvantage
HPLC/HPLC-MS	NAD ⁺ has an absorption peak under 254 nm, and its content is determined by HPLC at the corresponding wave length. HPLC-MS separates various components of the mixture according to the physical and chemical properties of the mixture, and uses mass spectrometry as a detector for quantitative analysis of NAD ⁺	Stable, fast, sensitive, highly reproducible	The instruments and equipment are expensive, and a single sample takes a long time, so it is not suitable for high-throughput measurement and analysis
Enzyme cycle analysis	Ethanol is oxidized to acetaldehyde under the action of ADH, while NAD ⁺ is reduced to NADH. NADH under the action of electron coupling agent PMS, MTT is reduced to blue formazan. Formazan has a maximum absorption peak around 565 nm, and the methylene formed is proportional to the total amount of NAD ⁺ in the sample	Low cost, low sensitivity, high speed and accuracy. It can be used for high throughput analysis	This method measures the total NAD ⁺ content in cells, and does not take into account the NAD ⁺ content of free and protein-bound or differentiated subcellular regions
Capillary electrophoresis	The substance to be tested is injected into the capillaries and applied a high voltage DC electric field as the driving force, and the NAD ⁺ , is separated and incubated with the circulating buffer, and the NAD ⁺ of the substance to be measured is quantified by recording the amount of fluorescent products produced	High efficiency, low background electrolyte consumption, small sample size, simple preparation	Compared with other methods, it has low sensitivity and poor repeatability
NMR	The concentration and distribution of NMR in the sample can be observed and tracked by using the important parameters of NAD ⁺ (chemical shift, longitudinal relaxation time and transverse relaxation time). At present, ³¹ P- ¹ H magnetic resonance spectroscopy (MRS) is mainly used for quantitative analysis of NAD ⁺	Safe, reliable, non-invasive, reproducibility. It can be used for non-invasive targeted metabonomic analysis	Low sensitivity, expensive instruments and equipment; not suitable for laboratory research
Biosensor	The extracted NAD ⁺ enters the bioactive material through diffusion, and after molecular recognition, the biological reaction occurs, and the resulting information is then transformed into a quantitative and processable signal by the corresponding physical or chemical transducer, which is then amplified and output by a secondary instrument, and the NAD ⁺ is quantitatively analyzed	Simple, rapid, specific, accurate, low cost. It can be used not only in the laboratory, but also as a diagnostic tool for medical points	The stability is insufficient and needs to be further improved

HPLC: 高效液相色谱; HPLC-MS: 高效液相色谱质谱联用; NMR: 核磁共振谱分析; ADH: 乙醇脱氢酶。
HPLC: high performance liquid chromatography; HPLC-MS: high performance liquid chromatography-mass spectrometry; NMR: nuclear magnetic resonance; ADH: alcohol dehydrogenase.

NR, 才能被细胞摄取并转化为NAD⁺。LIU等^[21]开发了一种灵敏、特异的LC-MS/MS, 可同时测量细胞中的NAD⁺和相关化合物的水平, 该方法以流动的甲酸铵-甲醇线性梯度, 在反相高效液相色谱树脂上首次分离出NAD⁺及其相关代谢物, 然后在电喷雾源电离每一种化合物, 并在三重四级串联质谱仪的正多重反应监测模式下进行检测, 结果表明, 每个NAD⁺相关化合物都有很好的线性响应, NAD⁺及相关化合物的定量限制为0.1~1.0 pmol/L, 小鼠红细胞中NAD⁺及其相关化合物的提取效率在84%~114%。BUSTAMANTE等^[22]采用LC-MS/MS技术, 建立了一种灵敏性高、重

现性强以及稳定快速的, 且能够同时定量检测胶质和卵细胞提取物中NAD⁺代谢组分含量的方法。在混合极性多反应监测模式下, 采用双重亲水作用-反向梯度加热电喷雾(heated electrospray probe, HESI)串联质谱检测, 在多功能氨基柱上分离代谢物, 定量分析u251人星形胶质瘤细胞NAD⁺代谢组分中17种代谢产物。DEMAREST等^[23]利用一种快速LC-MS/MS的方法, 通过简单、优化的样品处理程序测定NAD⁺及其代谢物含量, 并将其应用于多种生物基质, 包括培养细胞、人红细胞(red blood cell, RBC)、脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)和灵长类骨骼肌。GI-

ROUD-GERBETANT等^[24]利用UHPLC-MS定量分析小鼠肾脏细胞以及血浆中NAD⁺及其相关代谢组分含量,发现在哺乳动物细胞和组织中,NRH(一种NR的简化形式)是一种比NR更有效的NAD⁺前体。尽管结构上的差异很小,但NRH通过不同的代谢反应来合成NAD⁺,揭示了一条不依赖NRK1合成NAD⁺的途径。

虽然质谱仪为测量NAD⁺代谢组分提供了强大的分析能力,但它们也带来了其他分析技术从未遇到的挑战,包括制定最佳质谱条件、正确分离代谢物以及选择最佳内标物。而且LC-MS/MS成本较高,单个样本耗时较长,不适用于高通量测量分析。更重要的是,由于生物样品的多样性和复杂性,此类方法容易出现伪影,潜在地干扰了检测的特异性和灵敏度。

3.1.2 酶循环分析法 与基于HPLC的定量方法相比,当被分析样品的组成成分非常复杂时,酶分析法可能具有更高的特异性和灵敏度。酶分析法很容易在微量平板阅读器模式下完成,且允许同时分析多个样品。这些优点促进了酶分析法在临床环境下测定生物液中代谢物的应用^[25]。

1936年,WARBURG团队^[26]首先将酶循环法应用于微小分析物的定量分析,这一过程中反应物对分析物循环利用,按比例放大氧化还原指示染料介导的信号,因此不需要额外的纯化或浓缩步骤。随后,酶循环法被用于吡啶核苷酸的分析^[27],为了重新定义该方法,RHODES等^[28]用乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)对考克斯橙苹果中的吡啶核苷酸通过循环反应进行定量分析。在此后的几年中,此方法得到了普及,主要应用于细胞内NAD⁺及其相关化合物的定量分析。在循环分析(主要反应发生的途径)中,样品中含有NAD⁺和NADH,它们与ADH偶合,每当NAD⁺或NADH循环时,就会产生一个高荧光的间苯二酚分子。该荧光由多孔荧光板阅读器直接捕获,因此可以用来间接测量NAD⁺水平(图2)。

大多数研究都依赖于NAD⁺(氧化型)和NADH(还原型)测定的分离萃取:还原物种的基本萃取和氧化物种的分离酸萃取^[29-31]。萃取条件对氧化化合物的稳定性有特殊的影响,氧化化合物在酸中更稳定,还原化合物在碱中更稳定。PARK等^[32]利用荧光产物的酶循环分析法测定小鼠海马组织样品中的NAD⁺水平,研究缺血后给予NMN是否可以改善缺血后组织的能量代谢以及脑损伤。

许多商品化的NAD⁺定量试剂盒都是基于NAD⁺还原为NADH的酶促反应,通常是由乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)或ADH催化的。在这些可逆反应中,为了确保NAD⁺几乎完全还原为NADH,两者的平衡被第二次酶或非酶反应所改变,而生成的NADH将人造染料还原为吸光或荧光产物。尽管由此克服了由反应可逆性施加的限制,但其他潜在缺点包括常规使用的LDH和ADH对NAD⁺的亲合力相对较低(K_m 约为0.2 mmol/L),因此它们对NAD⁺提取试剂的敏感性会降低,进而影响NAD⁺的提取效率^[34]。ARTEM团队^[23]开发了一种简单的基于微孔板的酶分析方法,利用甲酸脱氢酶(formate dehydrogenases, FDH)可以快速和特异地定量分析哺乳动物组织的甲醇-乙酸提取物或线粒体的甲醇提取物中的NAD⁺。

酶循环法分析技术具有成本低、灵敏度高、速度快、结果可靠的优点,利用全波长酶标仪可实现自动化及高通量分析,是目前体内NAD⁺水平分析的较佳选择,然而,这种方法测量的是细胞内NAD⁺或NADH的总量,没有考虑游离态和蛋白质结合态或分化的亚细胞分区。此外,组织活检和提取的要求使得酶循环分析与完整组织的纵向研究不兼容^[35]。

3.1.3 毛细管电泳(CE)法 CE是早期用于测定单个细胞内的不同成分的一种方法。CE具有效率高、背景电解质消耗低、进样量小、样品制备简单等优点,是识别和分离带电化合物的有力工具^[36]。目前,

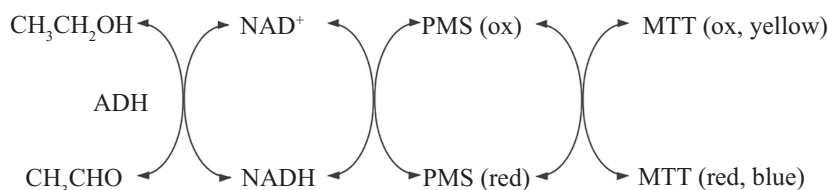


图2 NAD⁺循环原理(根据参考文献[24,33]修改)

Fig.2 NAD⁺ cycling principle (modified from references [24,33])

CE已被用来测定单个细胞中不同类别细胞内的成分,如神经递质、氨基酸、酶以及一些代谢物的水平。

由于NAD⁺和NADH携带不同的电荷,两者可以通过CE分离。XIE等^[37]建立了一种基于酶循环反应的CE方法,可同时测定单个细胞中的NAD⁺和NADH的含量。他们利用该方法测定了大鼠成肌细胞内NAD⁺和NADH的水平。

尽管CE有明显的优势,但它的性能不如其他分析技术,如HPLC。研究表明,CE的缺点是灵敏度较低和重复性较差。CE的低灵敏度通常与最常用的紫外-可见光分光光度计(UV-visible spectrophotometer, UV-Vis)探测器的应用有关。在UV-Vis检测中穿过内径较窄的分离毛细管时的光程较短,因此我们可以通过使用灵敏度或选择性更高的探测器来改善CE的性能^[38]。

3.2 核磁共振(NMR)光谱技术

大多数检测NAD⁺水平的研究依赖于对细胞提取物的分析,但是由于化合物不稳定以及代谢受阻等原因,该结果可能不能代表处于特定代谢状态活细胞的组成。NMR光谱技术是应用最广泛的分析技术之一,在材料学、生物学、化学和医学^[39]等领域有着广泛的应用,特别是在生物学和医学领域的重要性越来越高。此外,核磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)是医学上最重要的诊断工具之一^[40-41]。

自1970年以来,基于磁共振(magnetic resonance, MR)技术的体内³¹P磁共振光谱(magnetic resonance spectroscopy, MRS)已用于研究完整细胞和器官中的细胞代谢^[42]。组织细胞中NAD⁺的非侵入性定量对于活体研究是非常必要的,特别是不能进行活组织检查的器官,如大脑^[43]。一项使用³¹P MRS的研究显示,人脑中NAD⁺的含量随着年龄的增长而下降^[44]。NAD⁺和NADH分子都有两个磷酸基团,理论上,³¹P MRS可能是研究细胞内NAD⁺代谢和氧化还原状态的一个很好的候选方法。然而现实中还是面临着一些挑战,尽管在活体³¹P光谱中已鉴定出NAD⁺信号,但人们普遍认为代谢物中NAD⁺浓度低于体内核磁共振检测水平;另一个挑战是在活体³¹P中很难从重叠信号中分辨出个体的NAD⁺和NADH共振光谱,尤其是在相对较低的磁场中。LU等^[45]开发了一种新的基于MR的量化方法,该方法使用高场MR扫

描仪获取完整动物(猫)大脑中的内源性³¹P MR分子信号。与早期的³¹P MRS研究不同的是,该方法能够利用NAD⁺在给定磁场强度下的特定光谱特性,于理论模型的基础上进行精确预测,从而将NADH的磁共振信号从NAD⁺的磁共振信号中分离出来。因此,通过将体内NAD⁺谱与模型模拟谱相匹配,可以同时定量分析NAD⁺和NADH水平。研究表明,这种方法在9.4 T和16.4 T的超高磁场强度下对动物大脑很有效^[45]。

ZHU等^[44]进一步根据上述方法的可行性,在7 T人体磁共振扫描仪作用下对健康人脑中的细胞内NAD⁺和NADH含量以及NAD⁺/NADH的氧化还原状态进行无创评估,该项研究证明了超高(7 T)磁场³¹P MRS光谱分解在体内NAD⁺水平定量分析中的可行性,并揭示了人脑的细胞内NAD⁺和NADH含量以及NAD⁺/NADH的氧化还原状态在人类衰老中发挥的作用。最近,一种非水抑制的表面线圈定位的¹H MRS技术被用来定量分析啮齿动物和人脑中NAD⁺水平^[46]。NAD⁺与水之间可能存在的间接交叉弛豫会导致NAD⁺的信号强度降低数倍,因此避免水分干扰是检测NAD⁺水平的关键。因此,传统的水抑制¹H MRS方法不能用于检测NAD⁺。这种非水抑制¹H MRS方法的优点是不受其他代谢物的干扰,且灵敏度是³¹P-MRS方法的15倍,该方法利用SVS(standard visualization system, SVS) ¹H MRS脉冲序列在7 T时检测来自人脑局部性的NAD⁺信号,并使用水信号作为内部浓度参考来量化NAD⁺信号。在对一小部分健康志愿者的研究中发现,枕叶皮质NAD⁺浓度随年龄增长而下降^[41]。

与³¹P NMR方法相比,¹H NMR方法更有优势。³¹P NMR信号的检测在很大程度上仍然局限于MR系统,而目前所有的MR系统都能适用于¹H NMR方法,另外¹H NMR方法可能更灵敏,不需要超高磁场,且对磁场均匀性等实验参数相对不敏感。如何选择检测方法最终将取决于实验的可用性。

3.3 生物传感器

NAD⁺水平的常规测量方法如LC-MS或者酶循环分析法比较耗时且费力,所需要的仪器设备较为昂贵,这使得此类方法不适合在医疗保健点中应用。为了解决这些问题,YU等^[47]开发了一种生物传感器,可以在护理点定量分析NAD⁺水平。该传感器可以快速定量分析生物样品中的NAD⁺水平,既可以在实

实验室使用,也可以在护理点使用。该生物传感器是一种半合成的发光传感器蛋白,在与 NAD^+ 结合时会发光的颜色从蓝色变为红色。这种依赖于 NAD^+ 的颜色变化使生物传感器能够在纸基分析中使用。在纸基分析中,通过使用简单的数码相机或平板阅读器测量发射光的颜色定量 NAD^+ 。进一步使用这种方法对细胞培养或组织、血液样本中的 NAD^+ 水平进行量化,此结果与LC-MS检测方法的结果一致。

4 讨论

综上所述, NAD^+ 相关检测方法的研究已经取得了较大的进步,每一种方法都有其独特的优势,也有相对不足之处。事实上, NAD^+ 水平在生理过程中是不断变化的,不同组织中 NAD^+ 的周转率有很大差异,如果只测量稳态 NAD^+ 水平,这种差异将被掩盖。常用的 NAD^+ 检测技术是针对细胞提取液进行的。但是提取液的制备过程破坏了样本的固有空间信息,特别是在亚细胞尺度上,并且导致常用的这些方法不能可靠地用于评估游离 NAD^+ 。因此,最主要的是要监测 NAD^+ 的产生和消耗的途径,以及它们在细胞、组织、生理状态和疾病之间的差异。

LIU等^[48]提出了一种同位素示踪方法来量化细胞培养和小鼠体内的 NAD^+ 的合成和消耗通量:引入标记的NAM或其他形式的 NAD^+ 前体,外源的NAM足够丰富且稳定,然后检测 NAD^+ 标记;用LC-MS进行定量标记,通量分析结果可以揭示组织特异性的 NAD^+ 代谢。利用同位素示踪来了解体内 NAD^+ 代谢的基本特征,为更加有效地预防衰老和疾病提供一种有希望的方法策略。

5 展望

NAD^+ 在表观遗传学和能量代谢中发挥着重要作用。研究证明,细胞内和细胞外 NAD^+ 水平的改变与氧化应激诱导的细胞变性和癌症有关,随着年龄的增长,体内 NAD^+ 水平是不断降低的,而体内 NAD^+ 水平的降低可促使许多与衰老性相关疾病的发展^[49]。目前有许多与 NAD^+ 前体相关的产品,通过补充 NAD^+ 前体可以提高体内 NAD^+ 水平,旨在预防衰老相关性疾病。服用 NAD^+ 前体后短时间内血液中 NAD^+ 水平会迅速提高,但是补充 NAD^+ 前体后,组织细胞中的 NAD^+ 水平是否也能提高,以及各组织或者细胞内不同功能分区中 NAD^+ 水平变化是否存在差异,这方面

的研究需要广大科研工作者继续深入挖掘。

新的观点认为, NAD^+ 水平受细胞内 NAD^+ 合成的分区和动态调节^[50]。那么, NAD^+ 在体内的分区有哪些调节作用?特定分区中的 NAD^+ 水平如何与 NADH 水平以及其他信号代谢产物相互作用?在单个细胞中,分区的 NAD^+ 的变化是什么?蛋白质结合 NAD^+ 比例的变化如何影响细胞不同部位的游离 NAD^+ 的浓度?继续开发检测细胞内 NAD^+ 水平的新方法将是解决这些问题的关键。

参考文献 (References)

- [1] HARDEN A, YOUNG W J. The alcoholic ferment of yeast-juice. Part II: the conferment of yeast-juice [J]. *Proc Biol Sci*, 1906, 78(526): 369-75.
- [2] VON EULER H. Fermentation of sugars and fermentative enzymes [J]. New Jersey: World Sci, 1999: 144-55.
- [3] WARBURG O, CHRISTIAN W. Pyridin, the hydrogen-transferring component of the fermentation enzymes (pyridine nucleotide) [J]. *Biochem Z*, 1936: 287-91.
- [4] ARENAS-JAL M, SUÑÉ-NEGRE J M, GARCÍA-MONTOYA E. Therapeutic potential of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 879: 173158.
- [5] LIU Y, CLEMENT J, GRANT R, et al. Quantitation of NAD^+ : why do we need to measure it [J]? *Biochim Biophys Acta*, 2018, 1862(12): 2527-32.
- [6] IMAI S, GUARENTE L. NAD^+ and sirtuins in aging and disease [J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(8): 464-71.
- [7] NIKIFOROV A, KULIKOVA V, ZIEGLER M. The human NAD metabolome: functions, metabolism and compartmentalization [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2015, 50(4): 284-97.
- [8] YOSHINO J. ACMSD: a novel target for modulating NAD^+ homeostasis [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2019, 30(4): 229-32.
- [9] VERDIN E. NAD^+ in aging, metabolism, and neurodegeneration [J]. *Science*, 2015, 350(6265): 1208-13.
- [10] LI J, BONKOWSKI M S, MONIOT S, et al. A conserved NAD^+ binding pocket that regulates protein-protein interactions during aging [J]. *Science*, 2017, 355(6331): 1312-7.
- [11] CURTIN N. PARP inhibitors for anticancer therapy [J]. *Biochem Soc Trans*, 2014, 42(1): 82-8.
- [12] CHINI C, HOGAN K A, WARNER G M, et al. The NADase CD38 is induced by factors secreted from senescent cells providing a potential link between senescence and age-related cellular NAD^+ decline [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 513(2): 486-93.
- [13] KANAMORI K S, DE OLIVEIRA G C, AUXILIADORA-MARTINS M, et al. Two different methods of quantification of oxidized nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) and reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) intracellular levels: enzymatic coupled cycling assay and ultra-performance liquid chromatography (UPLC)-mass spectrometry [J]. *Bio Protoc*, 2018, 8(14): e2937.
- [14] MIKSIC J R, BROWN P R. Reactions of reduced nicotinamide adenine dinucleotide in acid: studies by reversed-phase high-

- pressure liquid chromatography [J]. *Biochemistry*, 1978, 17(11): 2234-8.
- [15] STOCCHI V, CUCCHIARINI L, MAGNANI M, et al. Adenine and pyridine nucleotides in the erythrocyte of different mammalian species [J]. *Biochem Int*, 1987, 14(6): 1043-53.
- [16] TRAMMELL S A, BRENNER C. Targeted, LCMS-based metabolomics for quantitative measurement of NAD⁺ metabolites [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2013, 4(5): e201301012.
- [17] YAMADA K, HARA N, SHIBATA T, et al. The simultaneous measurement of nicotinamide adenine dinucleotide and related compounds by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 2006, 352(2): 282-5.
- [18] PENG S, BOGAN KL, SONG P, et al. NAD⁺ metabolite levels as a function of vitamins and calorie restriction: evidence for different mechanisms of longevity [J]. *BMC Chem Biol*, 2010, 10(1): 1-10.
- [19] EVANS J, WANG T C, HEYES M P, et al. LC/MS analysis of NAD biosynthesis using stable isotope pyridine precursors [J]. *Anal Biochem*, 2002, 306(2): 197-203.
- [20] RATAJCZAK J, JOFFRAUD M, TRAMMELL S A, et al. NRK1 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13103.
- [21] LIU L, CUI Z, DENG Y, et al. Surrogate analyte approach for quantitation of endogenous NAD⁺ in human acidified blood samples using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1011: 69-76.
- [22] BUSTAMANTE S, JAYASENA T, RICHANI D, et al. Quantifying the cellular NAD⁺ metabolome using a tandem liquid chromatography mass spectrometry approach [J]. *Metabolomics*, 2018, 14(1): 15.
- [23] DEMAREST T G, TRUONG G T D, LOVETT J, et al. Assessment of NAD⁺ metabolism in human cell cultures, erythrocytes, cerebrospinal fluid and primate skeletal muscle [J]. *Anal Biochem*, 2019, 572: 1-8.
- [24] GIROUD-GERBETANT J, JOFFRAUD M, GINER M P, et al. A reduced form of nicotinamide riboside defines a new path for NAD⁺ biosynthesis and acts as an orally bioavailable NAD⁺ precursor [J]. *Mol Metab*, 2019, 30: 192-202.
- [25] ARTIUKHOV A V, POMETUN A A, ZUBANOVA S A, et al. Advantages of formate dehydrogenase reaction for efficient NAD⁺ quantification in biological samples [J]. *Anal Biochem*, 2020, 603: 113797.
- [26] FANG E F, LAUTRUP S, HOU Y, et al. NAD⁺ in aging: molecular mechanisms and translational implications [J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23(10): 899-916.
- [27] LOWRY O H, PASSONNEAU J V, SCHULZ D W. The measurement of pyridine nucleotides by enzymatic cycling [J]. *J Biol Chem*, 1961, 236: 2746-55.
- [28] RHODES M J C, WOOLTORTON L S. A new fluorimetric method for the determination of pyridine nucleotides in plant material and its use in following changes in the pyridine nucleotides during the respiration climacteric in apples [J]. *Phytochemistry*, 1968, 7(3): 337-53.
- [29] MOTTAHEDEH J, HAFFNER M C, GROGAN T R, et al. CD38 is methylated in prostate cancer and regulates extracellular NAD⁺ [J]. *Cancer Metab*, 2018, 6: 13.
- [30] YOSHINO J, MILLS K F, YOON M J, et al. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD⁺ intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice [J]. *Cell Metab*, 2011, 14(4): 528-36.
- [31] KHADKA D, KIM H J, OH G S, et al. Augmentation of NAD⁺ levels by enzymatic action of NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 attenuates adriamycin-induced cardiac dysfunction in mice [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 124: 45-57.
- [32] PARK J H, LONG A, OWENS K, et al. Nicotinamide mononucleotide inhibits post-ischemic NAD⁺ degradation and dramatically ameliorates brain damage following global cerebral ischemia [J]. *Neurobiol Dis*, 2016, 95: 102-10.
- [33] BRUNNBAUER P, LEDER A, KAMALI C, et al. Thenanomolar sensing of nicotinamide adenine dinucleotide in human plasma using a cycling assay in albumin modified simulated body fluids [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 16110.
- [34] GÜMÜŞ A. Evaluation of ethanol interference on routine biochemical tests [J]. *Am J Clin Pathol*, 2018, 150(6): 507-11.
- [35] XIE N, ZHANG L, GAO W, et al. NAD⁺ metabolism: pathophysiological mechanisms and therapeutic potential [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 227.
- [36] KARTSOVA L A, MAKEEVA D V, KRAVCHENKO A V, et al. Capillary electrophoresis as a powerful tool for the analyses of bacterial samples-science direct [J]. *Trac Trend Anal Chem*, 2020, doi: 2020.116110.
- [37] XIE W, XU A, YEUNG E S. Determination of NAD⁺ and NADH in a single cell under hydrogen peroxide stress by capillary electrophoresis [J]. *Anal Chem*, 2009, 81(3): 1280-4.
- [38] KUBÁŇ P, DVOŘÁK M, KUBÁŇ P. Capillary electrophoresis of small ions and molecules in less conventional human body fluid samples: a review [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 1075: 1-26.
- [39] LAMBERT J B, MAZZOLA E P. Nuclear magnetic resonance spectroscopy an introduction to principles, applications and experimental methods (paper) [J]. *La Recherche*, 2004, 67(4): 295-6.
- [40] LAUTERBUR P C. Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance [J]. *Nature*, 1973(244): 3-6.
- [41] TOURNIER J D. Diffusion MRI in the brain: theory and concepts [J]. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2019(112/113): 1-16.
- [42] OSCHKINAT H, GRIESINGER C, KRAULIS P J, et al. Three-dimensional NMR spectroscopy of a protein in solution [J]. *Nature*, 1988, 332(6162): 374-6.
- [43] BAGGA P, HARIHARAN H, WILSON N E, et al. Single-voxel ¹HMR spectroscopy of cerebral nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) in humans at 7 T using a 32-channel volume coil [J]. *Magn Reson Med*, 2020, 83(3): 806-14.
- [44] ZHU X H, LU M, LEE B Y, et al. *In vivo* NAD assay reveals the intracellular NAD contents and redox state in healthy human brain and their age dependences [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(9): 2876-81.
- [45] LU M, ZHU X H, ZHANG Y, et al. Intracellular redox state revealed by *in vivo* ³¹P MRS measurement of NAD⁺ and NADH contents in brains [J]. *Magn Reson Med*, 2014, 71(6): 1959-72.

- [46] GRAAF R A D, BEHAR K L. Detection of cerebral NAD⁺ by *in vivo* ¹H NMR spectroscopy [J]. NMR Biomed, 2014, 27(7): 802-9.
- [47] YU Q, POURMANDI N, XUE L, et al. A biosensor for measuring NAD⁺ levels at the point of care [J]. Nat Metab, 2019, 1(12): 1219-25.
- [48] LIU L, SU X, QUINN W J 3rd, et al. Quantitative analysis of NAD synthesis-breakdown fluxes [J]. Cell Metab, 2018, 27(5): 1067-80.e5.
- [49] CANTÓ C, MENZIES K J, AUWERX J. NAD⁺ metabolism and the control of energy homeostasis: a balancing act between mitochondria and the nucleus [J]. Cell Metab, 2015, 22(1): 31-53.
- [50] CAMBRONNE X A, KRAUS W L. Location, location, location: compartmentalization of NAD⁺ synthesis and functions in mammalian cells [J]. Trends Biochem Sci, 2020, 45(10): 858-73.