

基于质谱技术的细胞代谢组学研究进展

汪思媛 赵星阳 徐玮蔚 刘慧雯*

(哈尔滨医科大学组织学与胚胎学教研室, 哈尔滨 150081)

摘要 细胞代谢组学作为一个新兴领域, 能解决基本的生物学问题, 还能观察细胞内的代谢情况。细胞代谢物浓度可以近似地反映一个组织、器官或细胞的表型。随着代谢组学的发展, 以质谱分析为基础的代谢组学技术研究细胞的代谢物, 其灵敏度高、分辨率好, 能进行多组分的检测, 并能获取分子的结构信息, 这有利于细胞生物学的研究。该文结合目前代谢组学的技术, 对细胞代谢物研究的意义及基于质谱技术的细胞代谢组学的应用进行了综述。

关键词 细胞代谢组学; 质谱; 代谢物

Advances in Cell Metabolomics Based on Mass Spectrometry

Wang Siyuan, Zhao Xingyang, Xu Weiwei, Liu Huiwen*

(Department of Histology and Embryology, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

Abstract Cell metabolomics is an emerging field that addresses fundamental biological questions and allows observation of metabolic phenomena in cells. Cellular metabolite concentrations closely reflect the phenotype of an organism, tissue, or cell. With the development of metabolomics, the technology of metabolomics which is based on mass spectrometry can be applied to study cell metabolites. And it has high sensitivity, good resolution, the capability for multi-species detection and molecular structure identification, which is significant in the research of cell biology. In this review, combining with the current technology of the metabolomics, the study significance of cell metabolites and the applications of cell metabolomics based on mass spectrometry are reviewed.

Keywords cell metabolomics; mass spectrometry; metabolites

在后基因组时代, 生命科学研究已经进入全面、系统和动态的功能探索阶段。多种高通量研究策略如基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学, 还有小RNA测序被组合应用到同一个课题研究中, 多个实验平台产出的数据分析整合更有利于其研究。其中, 代谢组学(metabonomics或metabolomics)是20世纪90年代末发展起来的一门新兴学科, 研究生物体被扰动(如基因突变或环境变化等)后其代谢物(内源性代谢物质)数量、种类的变化及其规律^[1], 其主要研究特定的细胞、器官或生物体

中所有的小分子代谢物(分子量小于1 500 Da)^[2]。基因和蛋白质表达在功能水平上的微小变化可在代谢物上得到放大, 并且许多基因和蛋白质的非功能性变化不会在代谢物上反映出来, 同时, 代谢物的种类要远小于基因和蛋白质的数目以及常见代谢物在各个生物体系中都相似。基于以上优点, 代谢组学研究得到了快速发展。鉴于代谢物是宿主基因组和环境因素相互作用的结果(如肠道微生物对药物和外源性代谢的影响^[3]), 代谢组学或代谢表型测定结果可以提供最佳的生物表征。早期的代谢组学主要是

收稿日期: 2016-12-26 接受日期: 2017-04-21

国家自然科学基金(批准号: 31271287、30371214)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0451-86674518, E-mail: liuhw_11@126.com

Received: December 26, 2016 Accepted: April 21, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31271287, 30371214)

*Corresponding author. Tel: +86-451-86674518, E-mail: liuhw_11@126.com

网络出版时间: 2017-07-24 11:37:16

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170724.1137.006.html>

分析体液和组织中的代谢物, 随着代谢组学技术向自动化、高通量、小型化迈进, 在分析细胞尤其单细胞^[4]上显示出独特的优势。

细胞代谢组学(cell metabolomics)通常被定义为细胞内和膜上小分子代谢物的集合, 而代谢物参与胞内生化反应的多种变化, 其浓度可近似地反映一个组织、器官或细胞的表型。细胞代谢组学分析流程包括以下几个步骤: (1)样品的制备和提取; (2)代谢组学技术的检测与鉴定; (3)模式识别方法和生物信息学数据分析; (4)代谢物作为生物标志物和分子靶点。生物标志物最终被置于代谢网络中用于观察细胞的生化现象^[5]。

近年来, 细胞代谢组学的研究已取得很大进展, 本文将从细胞代谢物研究的意义、几种常见细胞代谢组学技术的比较以及质谱技术在细胞医学领域中的应用研究等方面进行综述。

1 细胞代谢物分析的重要性

细胞是生物体结构和功能最基本的组成单位。细胞内的生命活动由基因、蛋白质、聚糖、脂质和小分子代谢物共同承担, 且上游核酸和蛋白质的功能性变化最终体现在代谢层面, 如细胞信号释放、神经递质、激素、能量传递和细胞间通信等。代谢组学是基因调控网络和蛋白质作用网络的下游, 可以直接“读出(read-out)”生化事件^[6], 被认为是“组学”(基因组学、转录组学、蛋白质组学)研究的最终方向, 所以能够更敏感、更直接、更准确地反应生物体的病理生理状态。此外, 代谢组学与细胞表型和细胞活性有直接关系^[7], 鉴定细胞内和细胞膜中小分子代谢物的特征, 可以让我们得知细胞如何应对外界条件的改变, 有助于我们了解细胞的命运、功能和体内平衡状态。特别是“精准医疗”的提出, 使研究人员把目光放在特定的基因变异以及基因如何调控细胞代谢程序驱动上。这些研究表明, 代谢物谱可用于精准的个性化医疗^[8]。

细胞代谢组学作为一个刚开发的领域, 研究人员利用它去鉴定和发现代谢生物标志物, 区分正常和异常状态以及观察药物和应激剂(包括环境变化)的反应。已有研究表明, 细胞代谢网络强大, 是一个高度互联的调节系统, 能控制细胞生化途径的动态行为^[9-10]。细胞代谢组学与其他代谢组学方法相比, 表现出了更多的优势: 如容易控制实验条件、高度

重现性、更经济、结果更易解释分析; 性别、年龄、环境暴露等混杂因素在体外细胞研究中都不是主要影响因素; 专注于特定的细胞类型可以减少其他因素引起代谢物的差异, 并提供一个更稳定的背景, 从而使细微的代谢物变化更明显^[11]。

2 细胞代谢组学的检测技术

细胞代谢组学的目的是获得可靠和可重复性的定量信息, 但现在没有任何一个单一的技术平台能够检测出所有的代谢物。目前, 应用于代谢组学的检测方法有以质谱(mass spectrometry, MS)为基础的技术以及核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)、傅里叶变换红外光谱仪(Fourier-transform infrared, FT-IR)和拉曼光谱(Raman spectroscopy)等^[8]。较常用的有氢核磁共振(hydrogen nuclear magnetic resonance, ¹H-NMR)、气相色谱-质谱(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS)、液相色谱-质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS)。它们的优缺点见表1^[12]。

2.1 质谱分析

质谱技术在代谢组学领域的应用已逐渐成为主力军。以质谱分析为基础的代谢组学方法来研究细胞的代谢物, 其灵敏度高、无需标记, 能进行多组分检测的同时, 还能获取分子的结构信息^[13], 有利于细胞生物学的研究。目前, 与质谱联用技术主要分类有: 毛细管电泳-质谱(capillary electrophoresis mass spectrometry, CE-MS)、串联质谱(mass spectrometry and mass spectrometry, MS-MS)、GC-MS和LC-MS等。近期, 随着质谱分析器的发展, 如时间飞行分析器、四级杆、离子阱, 特别是静电场轨道离子阱及它们之间的串联使用, 使得质谱能够在浓度很低的情况下直接有选择性地分析化合物。其中, GC-MS和LC-MS使用的是色谱分离法, 减少了基体效应和样品的重复性, 比较经济实用, 已应用于很多领域^[14]。

2.2 质谱与核磁共振分析的比较

NMR能在一个大的动态分子量范围内重复定量检测代谢物。其最大的优点是: 对样品的处理少、无损害性、不破坏样品的结构和性质, 可在近似的生理条件下进行实验, 也可在一定的温度和缓冲液范围内选择实验条件, 进行实时和动态检测^[15]。高分辨率旋转的核磁共振(high-resolution magic-angle spinning, HR-MAS)能直接检测活体组织中

表1 代谢组学平台之间的比较(根据参考文献[12]修改)

Table 1 Comparison of metabolomics platforms (modified from reference [12])

技术 Technology	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	特殊应用* Special applications*
LC-MS	(1)代谢物覆盖范围广(对分子量在800~2 000 Da的代谢物有更高的精确性 ^[8]) (2)样品制备简单 (3)灵敏度高 (4)化合物分离和检测上灵活(比如: 选择液相色谱柱、流动相) (5)各种开发软件辅助分析	(1)跨平台变化或批处理效应阻碍标准化测量 (2)不定量 (3)破坏性 (4)不能形成多分子离子化合物(如碳氢化合物)	全面(覆盖面广)代谢组学分析
GC-MS	(1)代谢物覆盖范围广(低分子量<500 Da的代谢物有更高精确性 ^[8]) (2)气体或天然挥发性化合物分析 (3)灵敏度高 (4)各种开发软件辅助分析	(1)根据仪器类型和条件变换 (2)不定量 (3)破坏性 (4)不适合热不稳定化合物 (5)从多种衍生物中提取出单一的代谢物	石油化学产品分析
NMR	(1)受控温度下实时和动态监测 (2)实时体内测量 (3)更好地结构分析 (4)无创	(1)灵敏度低 (2)代谢物覆盖率低 (3)自动化光谱处理低 (4)设备和维护成本高	(1)从头解析化合物结构 (2)化学反应动力学分析 (3)应用稳定同位素实时检测体内的代谢研究 (4)活细胞或动物实时成像

*除了代谢组学之外其他方面的应用(石油化工、医疗诊断方面)。

*In addition to metabolomics, other applications are presented (such as petrochemicals, medical diagnostics).

代谢物浓度, 并且磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)和磁共振波谱成像(magnetic resonance spectroscopic imaging, MRSI)可以探索分子的空间信息^[8]。但由于NMR灵敏度低, 有可能形成信号重叠, 且其对样品制备的要求很高, 限制了它检测细胞中多种分子化合物。

3 质谱技术在细胞代谢组学的应用

代谢组学技术利用高分辨率的仪器去识别、量化和了解细胞系统中的所有成分。研究者提取相关的生物代谢标志物或标志物簇, 在此基础上寻找所受影响的相关代谢途径, 确立代谢网络的调控机制, 发现细胞内的途径和网络联系^[16]。研究人员利用基于质谱分析的细胞代谢组学技术, 可以从代谢角度探讨其内在的机制, 已应用于医学的很多领域, 如疾病的诊断、药物的作用机制及药物研发、毒性评价、干细胞及体细胞重编程研究等方面。

3.1 疾病的诊断

随着对疾病复杂性的深入了解及对疾病全面

分析的需要, 细胞代谢组学技术作为监测生物系统内过程的一个重要工具, 有其独特的功能。机体发生病理变化时, 细胞内的代谢物也相应地发生变化, 因此, 对这些变化的代谢物进行分析和检测, 鉴定出与疾病状态相关的生物标志物, 有助于临床疾病的诊断。

Panneerselvam等^[17]使用超高效液相色谱-串联质谱(ultra-performance liquid-chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)和气相色谱-飞行时间质谱(gas chromatography with time-of-flight mass spectrometer, GC-TOFMS)研究了受损的范可尼贫血(fanconianemia, FA)肿瘤抑制信号通路的人膀胱癌细胞的代谢特征, 分析FAVL高表达(FAVL-high)和FAVL低表达(FAVL-low)的膀胱癌细胞, 发现18种代谢物(如蛋氨酸、苯丙氨酸和苏氨酸等)在这两种细胞之间有显著差异, 并且这些代谢物与细胞的增殖和凋亡有关。他们还在代谢水平上证明了FAVL诱导损害的FA途径有助于膀胱癌的发展, 对在基因及其功能水平上研究癌细胞起到了辅助作用, 有利于

癌症的诊断和预后。

Hu等^[18]通过高效液相色谱质谱法分析酒精诱导的人肝L-02细胞的代谢物,发现并鉴定了8种代谢物参与酒精诱导细胞的氧化应激反应,如苹果酸、氧化型谷胱甘肽和苯丙氨酸等,这些生物标志物为酒精诱导形成的疾病诊断提供了重要的靶点。

3.2 药物的作用机制及药物研发

当药物作用于机体后,不仅可以研究药物本身的代谢变化,还可以通过研究细胞中小分子代谢物的变化来得知机体表型的改变,特别是对中药里某些成分的鉴定。因此,可用代谢组学平台来阐明药物的作用机制或发现新的化合物,为药物的研发提供一个框架。

O'Brien等^[19]用纳米激发质谱成像(nanostructure-initiator mass spectrometry imaging, NIMS)在单细胞水平上分析化疗药雷帕霉素或3'-脱氧氟胸苷(3'-deoxy-3'-fluorothymidine, FLT)处理后的Burkitt淋巴瘤细胞,通过检测单细胞中内源性代谢物3'-脱氧磷酸化氟胸苷(FLT monophosphate, FLT-MP)的量来监测药物的代谢情况。LC-MS/MS也用来分析多细胞中的代谢物,得出与上面相同的结论,以此来证明癌症对多西他赛治疗的敏感性。这些研究结果证实了单细胞代谢组学对体外肿瘤代谢的临床前研究有益。

Alonezi等^[20]利用LC-MS技术检测了两种人卵巢癌细胞系A2780和A2780CR暴露于蜂毒肽后的变化。他们发现, A2780细胞系相对于A2780CR细胞系来说,氨基酸和三羧酸循环的中间产物降低,而胆碱和甘油磷酸胆碱的含量却大幅度升高,且A2780细胞系比A2780CR细胞系更能抵抗蜂毒肽的溶解作用。代谢组学技术作为强有力的工具能为体内监测肿瘤的标准化疗提供可能确定的关键代谢标志物。

3.3 毒性评价

通过代谢组学技术可以评估化合物毒性,它的研究和测试结果可以提前预警,保护人类免受周围环境或药物中化学成分的危害。

Jin等^[21]用飞行时间气相质谱仪分析二氧化钛(titanium dioxide, TiO₂)纳米颗粒对小鼠成纤维细胞的毒害作用。通过测定小鼠成纤维细胞和相应培养基中的代谢物,发现TiO₂纳米颗粒能引起细胞糖代谢紊乱、线粒体损伤、氧化应激增加,使细胞严重受损。代谢组学方法检测TiO₂纳米颗粒对细胞毒性有很大意义,有助于理解其潜在的分子机制。

在临床前毒性评价中, Juan等^[22]用LC-MS为基础的无靶标分析技术去测试HepG2细胞中药物的肝毒性,这种方法能探究到肝毒性的早期标志物。基本的代谢功能(如:糖酵解、尿素循环、氨回收、氨基酸、氮、嘌呤和脂质的代谢途径),能维持细胞的稳态并为其提供能量,这些在HepG2细胞肝毒性中都会发生显著的变化,这为临床前药物评价提供有利依据。

3.4 干细胞及体细胞重编程研究

干细胞具有与其能量需要相适应的特殊代谢类型,还会影响干细胞多能性的表达。通过研究干细胞的代谢特征和体细胞重编程过程中的代谢变化,能够了解细胞的代谢状态和代谢途径,这可能为研究干细胞的命运及体细胞重编程过程中发生的代谢物变化的机制提供依据。

Panopoulos等^[23]利用液相色谱-电喷雾串联四级杆-飞行时间质谱(liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight MS, LCESI-QTOF-MS)的代谢组学技术分析了人角质形成细胞、人成纤维细胞以及由体细胞(如人角质形成细胞和人成纤维细胞)诱导而成的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)和胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)4种细胞的代谢物,发现不同细胞类型表现出不同的代谢物特点,但是iPSCs和ESCs表现出不同于亲本细胞的多能性代谢特征——细胞能量代谢发生了显著改变。他们还发现,体细胞诱导成多能干细胞的过程中,细胞从有氧氧化的代谢状态变成无氧糖酵解状态,并且通过增加糖酵解促进剂,细胞重编程的效率会提高。这不仅发现了细胞的代谢状态能控制细胞的命运,而且为揭示体细胞重编程过程中代谢机制提供了依据。

Gu等^[24]在研究糖酵解途径对人多能干细胞状态影响时,用¹³C标记同位素标记葡萄糖和LC-MS联用的方法分析原始人胚胎干细胞(naïve human embryonic stem cells, naïve hESCs)和原代人胚胎干细胞(primed human embryonic stem cells, primed hESCs)中的代谢物,发现原始人胚胎干细胞比原代人胚胎干细胞产生更多的乳酸和能量代谢的中间产物(如葡萄糖-6磷酸),表现出糖酵解水平升高,并用培养液中标记的葡萄糖产生较多的核苷酸和丝氨酸。这提示,潜在的代谢途径能调节细胞的自我更新和影响细胞的命运。

4 结语与展望

虽然生物体系复杂,代谢物种类多、差异大、浓度分布范围广,但是以质谱为基础的细胞代谢组学能够对代谢物同时进行检测和分析,能更好地了解代谢物如何影响细胞的命运。

经过十几年的发展,细胞代谢组学研究取得了很大的进步,但是目前仍无法全面进入“精准医学”和相关健康领域的产业化服务。鉴于细胞代谢物的技术和分析方法面临着通量和标准化的瓶颈,如何有效地提高数据的准确性和可重复性,建立其相对完整的代谢数据库,定量化和标准化被认为是代谢组学研究向前发展的一个必经之路。此外,未来代谢组学研究重点还有如何合理有效地将它与不同平台和不同组学的数据进行整合,挖掘出更多有效的数据和方法,尽量全面准确地对代谢物进行定性定量分析。日益完善和发展的细胞代谢组学推动了生物学研究不断前进,使它向着实用性方向发展,在医药研究中具有广阔的前景。

参考文献 (References)

- Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: Platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(2): 153-61.
- Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, *et al.* HMDB: the human metabolomedatabase. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(Database issue): D521-6.
- Wilson ID, Nicholson JK. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Transl Res* 2017; 179: 204-22.
- Emara S, Amer S, Ali A, Abouleila Y, Oga A, Masujima T. Single-cell metabolomics. *Adv Exp Med Biol* 2017; 965: 323-43.
- Zhang A, Sun H, Xu H, Qiu S, Wang X. Cell metabolomics. *OMICS* 2013; 17(10): 495-501.
- Halama A. Metabolomics in cell culture—a strategy to study crucial metabolic pathways in cancer development and the response to treatment. *Arch Biochem Biophys* 2014; 564: 100-9.
- den Ouden H, Pellis L, Rutten GE, Geerars-van Vonderen IK, Rubingh CM, van Ommen B, *et al.* Metabolomic biomarkers for personalised glucose lowering drugs treatment in type 2 diabetes. *Metabolomics* 2016; 12: 27.
- Cacciatore S, Loda M. Innovation in metabolomics to improve personalized healthcare. *Ann N Y Acad Sci* 2015; 1346(1): 57-62.
- Chen R, Mias GI, Li-Pook-Tham J, Jiang Lihua, Lam Hugo YK, Chen R, *et al.* Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. *Cell* 2012; 148(6): 1293-307.
- Zhang A, Sun H, Han Y, Yuan Y, Wang P, Song G, *et al.* Exploratory urinary metabolic biomarkers and pathways using UPLC-Q-TOF/MS coupled with pattern recognition approach. *Analyst* 2012; 13(18): 4200-8.
- Cuperlović-Culf M, Barnett DA, Culf AS, Chute I. Cell culture metabolomics: Applications and future directions. *Drug Discov Today* 2010; 15(15/16): 610-21.
- Liu X, Locasale JW. Metabolomics: A primer. *Trends Biochem Sci* 2017; 42(4): 274-84.
- 龚晓云,熊行创,张四纯,方向,张新荣. 单细胞质谱分析方法研究进展. *中国科学: 化学(Gong Xiaoyun, XiongXingchuang, Zhang Sichun, Fang Xiang, Zhang Xinrong. Recent advances in mass spectrometry based single cell analysis methods. Scientia Sinica Chimica)* 2016; 46(2): 133.
- Gika HG, Theodoridis GA, Plumb RS, Wilson ID. Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 87: 12-25.
- Arnold JM, Choi WT, Sreekumar A, Maletic-Savatic M. Analytical strategies for studying stem cell metabolism. *Front Biol* 2015; 10(2): 141-53.
- Wang D, Bodovitz S. Single cell analysis: the new frontier in 'omics'. *Trends Biotechnol* 2010; 28(6): 281-90.
- Panneerselvam J, Xie G, Che R, Su M, Zhang J, Jia W, *et al.* Distinct metabolic signature of human bladder cancer cells carrying an impaired fanconi anemia tumor-suppressor signaling pathway. *J Proteome Res* 2016; 15(4): 1333-41.
- Hu Q, Wei J, Liu Y, Fei X, Hao Y, Pei D, *et al.* Discovery and identification of potential biomarkers for alcohol-induced oxidative stress based on cellular metabolomics. *Biomed Chromatogr* 2017; doi: 10.1002/bmc.3907.
- O'Brien PJ, Lee M, Spilker ME, Zhang CC, Yan Z, Nichols TC, *et al.* Monitoring metabolic responses to chemotherapy in single cells and tumors using nanostructure-initiator mass spectrometry (NIMS) imaging. *Cancer Metab* 2013; 1(1): 4.
- Alonezi S, Tusiimire J, Wallace J, Dufton MJ, Parkinson JA, Young LC, *et al.* Metabolomic profiling of the effects of melittin on cisplatin resistant and cisplatin sensitive ovarian cancer cells using mass spectrometry and biolog microarray technology. *Metabolites* 2016; 6(4): 35-53.
- Jin C, Liu Y, Sun L, Chen T, Zhang Y, Zhao A, *et al.* Metabolic profiling reveals disorder of carbohydrate metabolism in mouse fibroblast cells induced by titanium dioxide nanoparticles. *J Appl Toxicol* 2013; 33(12): 1442-50.
- Juan Garcia-Canaveras JC, Jimenez N, Gomez-Lechon MJ, Castell JV, Donato MT, Lahoz A. LC-MS untargeted metabolomic analysis of drug-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. *Electrophoresis* 2015; 36(18): 2294-302.
- Panopoulos AD, Yanes O, Ruiz S, Kida YS, Diep D, Tautenhahn R, *et al.* The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res* 2012; 22(1): 168-77.
- Gu W, Gaeta X, Sahakyan A, Chan AB, Hong CS, Kim R, *et al.* Glycolytic metabolism plays a functional role in regulating human pluripotent stem cell state. *Cell Stem Cell* 2016; 19(4): 476-90.