

# 细胞代谢组学样品前处理研究进展

徐佳<sup>1,2</sup> 刘其南<sup>2</sup> 翟园园<sup>2</sup> 单进军<sup>1</sup> 姚卫峰<sup>1,2\*</sup> 张丽<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>南京中医药大学江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室, 南京 210023; <sup>2</sup>南京中医药大学江苏省方剂高技术研究重点实验室/江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 南京 210023)

**摘要** 细胞代谢组学是系统生物学的重要组成部分, 是对生物系统进行整体和动态的认识的科学, 主要进行小分子代谢物定性和定量分析研究, 观察代谢物的浓度变化, 从而在细胞水平上考察代谢机制。细胞代谢组学的工作流程包括: 实验设计、样品采集、样品处理、代谢物分析和数据处理。其中, 样品前处理方法不尽相同, 而设计一个合理方便的样品前处理方法对后期开展代谢组学至关重要。现简要综述现阶段对细胞代谢组学样品前处理的研究成果和常用方法。

**关键词** 细胞代谢组学; 样品前处理; 淬灭; 提取; 归一化

## The Research Development of Sample Pretreatment in Cell Metabolomics

Xu Jia<sup>1,2</sup>, Liu Qinan<sup>2</sup>, Zhai Yuanyuan<sup>2</sup>, Shan Jinjun<sup>1</sup>, Yao Weifeng<sup>1,2\*</sup>, Zhang Li<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Jiangsu Key Laboratory of Pediatric Respiratory Disease, Institute of Pediatrics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; <sup>2</sup>Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of Traditional Chinese Medicine Formulae and Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**Abstract** Cell metabolomics is an important part of systemic biology and a scientific for the overall and dynamic understanding of biological systems. It mainly studies the qualitative and quantitative analyses of small molecular metabolites and observes the changes of metabolites to investigate the metabolic mechanism. Cell metabolomics workflow includes experimental design, sampling, sample processing, metabolite analysis, and data processing. The pretreatment methods of cell metabolomics are not the same, and the design of a reasonable and convenient sample pretreatment method for the late development of metabolomics is essential. We present a brief review of the results of the sample pretreatment at this stage and the the method commonly used in cellular metabolomics samples.

**Keywords** cell metabolomics; sample pretreatment; quenching; extraction; normalization

代谢组学(metabolomics)是继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后迅速发展起来的一门新兴学科, 是一门对生物体系(细胞、组织、体液或生物体)在受外部刺激或扰动(某个特定的基因变异或环境变化)下所产生的所有小分子(相对分子质量小于 1 000)代谢产物进行定性和定量分析的科学<sup>[1]</sup>。同

基因组学与蛋白质组学相比, 代谢组学分析方法简单, 无需进行全基因测序以及建立含有大量表达标签的数据库; 与基因和蛋白质数量相比, 代谢物数量相对较少, 易于确证, 便于后续分析。它是比其他组学更能反映细胞、组织、体液或生物体的表型的组学分析<sup>[2]</sup>, 它能够反映物质在体内正在发生或已经

收稿日期: 2017-10-12 接受日期: 2017-12-25

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81573554)、江苏高校“青蓝工程”和江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目(批准号: 2016-YY026)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 025-85811053, E-mail: yaowf@njucm.edu.cn

Received: October 12, 2017 Accepted: December 25, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81573554) and Qing Lan Project and the Six Talents Peak Project of Jiangsu Province (Grant No.2016-YY026)

\*Corresponding author. Tel: +86-25-85811053, E-mail: yaowf@njucm.edu.cn

网络出版时间: 2018-03-09 15:29:38 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180309.1529.014.html>

发生的代谢。早期人们主要以体液和组织为对象进行代谢组学研究,随着现代化、高自动化技术的产生,越来越多的研究者将目光投向了以细胞为对象的代谢组学研究中,侧重以细胞为研究对象的代谢组学表述方式也得到了广泛的使用<sup>[3]</sup>。

细胞代谢组学是系统生物学的重要组成部分,利用高通量的检测技术对细胞内外的小分子代谢物进行定性和定量分析研究,观察细胞内外代谢物的浓度变化,从整体的角度系统全面地观察细胞水平上代谢变化及其机制的一种代谢组学<sup>[4]</sup>。Jain等<sup>[5]</sup>结合质谱法测量了来自NCI-60癌细胞系胞外219种代谢物的消耗和释放(consumption and release, CORE)曲线,并将这些数据与预先存在的基因表达图谱相结合,研究细胞内物质的浓度变化,从而评估疾病的发病机制。细胞系的代谢组学分析可以提供独立或与其他体外测量结合的信息,对系统级分析和生物系统建模至关重要,而且相比较动物模型或临床样品,对细胞进行代谢组学的研究能够直接描述特定细胞类型的代谢,可以让实验不再局限于体内实验,具有周期短、更快速直观、各因素干扰最小等优点,是微观生命体的宏观表现,所以越来越多的研究者将目光放在了细胞代谢组学上。

细胞代谢组学应用广泛,在多个领域均有涉及(图1)。在毒理研究中,将细胞暴露在有毒环境下,分析研究相关代谢通路中代谢物的变化,结果可作为环境中毒物的危害预警<sup>[7]</sup>;在疾病研究中,对病理状态下细胞的差异性代谢物进行检测分析,以阐明发病机制或为临床诊断提供依据<sup>[8-9]</sup>;在中药研究中,

通过代谢物浓度的升降来观察药物的毒性或治疗效果,以探究中药作用机制和中药活性成分进行筛选<sup>[10]</sup>;在药物作用机制研究中,通过药物作用模型细胞,观察代谢物的改变以阐明药物的作用机制<sup>[11]</sup>。

完整的代谢组学研究流程主要包括样品的制备、数据采集、数据处理与可视化分析以及数据解析等。样品制备包括样品采集和代谢物提取分离<sup>[12-13]</sup>。代谢组学研究离不开代谢物收集,更深入地收集代谢物就显得尤为重要。然而,细胞不同于其他生物样本,它的代谢物丰富但含量较低,不易收获或收获不完全,这就要求我们建立一个有效可靠的处理方法来获得更全面的细胞内代谢物或特定的目标代谢物,确保后期研究的可行性与结果的可靠性。细胞代谢组学实验主要有细胞培养或刺激、淬灭和代谢物提取分离、样品检测、数据分析等步骤<sup>[14]</sup>。本文重点针对细胞代谢组学中细胞内代谢物的样品前处理进行综述。

## 1 样品收集与淬灭

细胞主要有三种处理方式,第一种为液氮淬灭后加入低温提取溶剂<sup>[15]</sup>;第二种是采用低温有机溶剂同时进行细胞的淬灭和代谢物的提取<sup>[16]</sup>;第三种则是用胰蛋白酶消化细胞后进行淬灭提取。

相比较血清和组织,细胞中代谢物的含量较少,在进行代谢组学实验时一般需要收获至少 $10^6$ 个细胞,以确保代谢物能够尽量全面地被仪器检测,然而这个培育过程耗时且繁琐。Zhou等<sup>[17]</sup>开发了一种高通量方案,整合96孔板细胞培养方法,

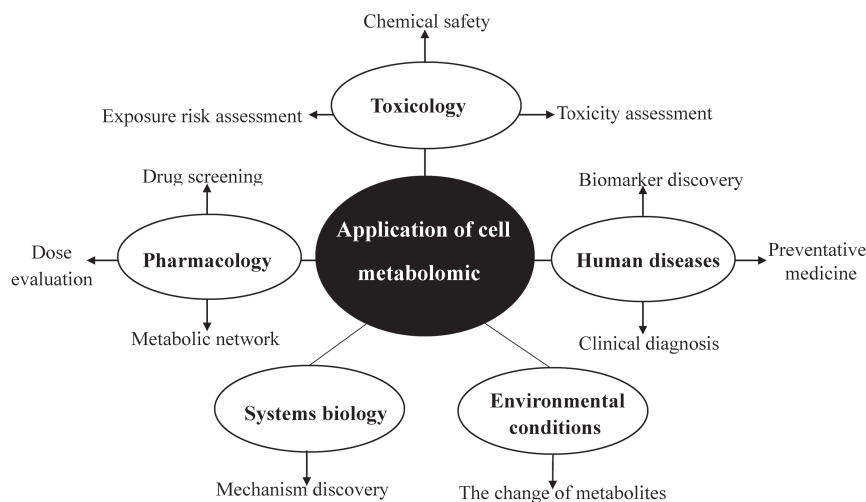


图1 细胞代谢组学分析的研究领域(根据参考文献[6]修改)

Fig.1 The fields of cell metabolomics analysis (modified from reference [6])

结合LC-MS分析手段对人肝癌细胞(HepG2)内的代谢物进行分析,大大降低了代谢组学所需要的细胞量,使细胞培养更加省时方便。常用的细胞收集方法主要有胰蛋白酶消化和刮刀刮取。李黎等<sup>[18]</sup>对原代心肌细胞(primary cardiomyocytes, PC)比较了0.05%胰蛋白酶消化后冰甲醇提取和刮刀刮取后溶剂提取两者细胞收集方式,发现用0.05%胰蛋白酶/0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)消化后,−80 °C甲醇直接提取效果更佳。然而有研究表明,胰蛋白酶消化可能会导致细胞代谢组学特征的变化<sup>[19]</sup>或引入代谢组学假象<sup>[20]</sup>因而不适用,Zhang等<sup>[21]</sup>选用人心肌细胞(adult human ventricular cardiomyocyte cell line, AC16)、大鼠心室心肌细胞[neonatal Sprague-Dawley (SD) rat ventricular cardiomyocytes, NRVCMs]对使用胰蛋白酶处理和直接在乙腈中直接刮取细胞这两种样品采集方式进行了比较,发现胰蛋白酶处理会引起磷酸胆碱的标准化浓度增加和代谢物泄露。结果表明,用磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)洗涤两次,然后直接刮取细胞并用乙腈提取的方式相对较好。Bi等<sup>[22]</sup>对人胰腺癌细胞-1(human pancreatic cancer cells-1, PANC-1)采取了胰蛋白酶消化和刮刀刮取两种细胞收集方式,同样发现了胰蛋白酶消化较刮刀刮取易使代谢物泄露这一缺点。因此在实验中,大多采用刮刀刮取的方式来获取细胞<sup>[23-26]</sup>。

细胞的代谢谱反映取样时细胞的生理状态,所以在提取前,应先对细胞进行淬灭。淬灭,正是为了使细胞代谢酶失活,从而确保代谢物水平只发生微小的变化,减少实验结果的误差<sup>[27]</sup>。理想的淬灭溶剂应能够立即抑制细胞代谢活性,同时对细胞膜不造成显著损伤,防止细胞内代谢物从细胞中泄漏<sup>[28]</sup>,如低温等渗盐水(0.9 *W/V* NaCl, 0.5 °C)既不损伤细胞,同时能够停止ATP转化为ADP和AMP<sup>[29]</sup>。常用的淬灭方式有加入低温有机溶剂<sup>[30-31]</sup>、加入低温等渗溶液<sup>[32]</sup>或加入液氮<sup>[33-34]</sup>。Lorenz等<sup>[35]</sup>指出,在细胞淬灭前用37 °C生理盐水快速冲洗,能提高其灵敏度且不影响代谢变化。在生理盐水冲洗后,应立即加入冷的淬灭溶剂淬灭细胞,以减少代谢紊乱。Hounoum等<sup>[36]</sup>对鼠细胞神经元(NSC-34)观察了三种淬灭方式,分别为−40 °C的甲醇淬灭、−20 °C的甲醇淬灭以及迅速冻存于−80 °C后加入4 °C甲醇淬灭,结果表明,−40 °C的甲醇淬灭最为理想。研究发现,仅以甲

醇为淬灭溶剂会导致代谢物的泄漏<sup>[37]</sup>,故常在甲醇中加入缓冲液如羟乙基哌嗪乙硫磺酸(hydroxyethyl piperazine ethyl sulfonic acid, HEPES)及碳酸氢铵(ammonium bicarbonate, AMBIC)以维持离子强度,避免渗透冲击<sup>[38-39]</sup>。

## 2 样品的提取

由于细胞中有着丰富的代谢物,因而观察提取细胞代谢物的方法至关重要。迄今为止还没有任何一种提取方法能适用于所有的代谢物提取,为此研究者们一直在寻找较为合适相关代谢物的提取方法,尽可能多地把胞内代谢物提取出来,最大程度地减少代谢物的损失。

代谢物的提取量首先依赖于提取溶剂(占主要地位)的选择。不同的提取溶剂收获的细胞提取物的类别不尽相同,主要可分为极性和非极性两大类代谢物。根据相似相溶原理,极性溶剂对极性物质的溶解性较好,非极性溶剂则能促进细胞内的蛋白质沉淀,因此,联合使用提取溶剂能提高代谢物的提取效率<sup>[40]</sup>。目前在细胞代谢组学领域运用最广泛的提取方法为液-液萃取法,常用的提取溶剂有甲醇/水溶液<sup>[41]</sup>、乙腈/水溶液<sup>[29]</sup>、纯甲醇<sup>[42]</sup>和氯仿<sup>[43]</sup>,研究者可以根据自己的实验目的进行选择,优化提取溶剂。另外,也与细胞破碎程度相关,常用的破碎方法有反复冻融<sup>[44]</sup>、超声破碎<sup>[45]</sup>和机械匀浆<sup>[46]</sup>等。

### 2.1 提取极性代谢物

极性提取溶剂主要为含水的有机溶剂,如甲醇/水溶液、乙腈/水溶液、甲醇/氯仿/水溶液等。Zhou等<sup>[17]</sup>比较了甲醇/氯仿/水、纯甲醇、80%甲醇水溶液、纯丙酮、80%丙酮水溶液等五种提取溶剂对HepG2细胞的游离氨基酸的提取效率,发现80%甲醇水溶液有较高的提取率和重现性,可作为最佳提取溶剂。Lorenz等<sup>[35]</sup>对大鼠胰岛素瘤细胞(rat insulinoma cells, INS-1)内代谢物采用四种不同提取溶剂[乙醇、乙腈、甲醇和甲醇/氯仿(9:1)]提取,结果涉及糖酵解、三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环和核苷酸代谢,发现甲醇/氯仿(9:1)作为提取溶剂较合适。Dietmair等<sup>[29]</sup>比较了50%冰乙腈/水溶液、50%冰甲醇/水溶液、50%冰甲醇/水溶液+反复冻融、甲醇/氯仿、80%热甲醇/水溶液、100%冰甲醇、75%热乙醇/水溶液、75%热乙醇/水溶液+HEPES、75%冷乙醇/水溶液、热水、氢氧化钾(KOH)和高氯酸(PCA)



这12种不同的提取方法对细胞内核苷酸、UDP-糖、氨基酸和有机酸等代谢物进行提取,发现50%冰乙醇水溶液对所有单一代谢物都有较高的回收率,为最佳的提取溶剂。高山山等<sup>[47]</sup>对小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)内极性代谢产物的提取方式进行了优化,观察了甲醇、乙醇、甲醇/乙醇/水(2:2:1)、甲醇/氯仿/水(8:1:1)四种提取溶剂,发现甲醇/氯仿/水(8:1:1)作为提取溶剂时色谱峰个数较多,相对提取率高且稳定性也最好。Liu等<sup>[48]</sup>采用80%甲醇水的提取溶剂对人结肠癌细胞(HCT8)进行提取,并结合高分辨率Orbitrap质谱仪,检测到氨基酸与极性脂质的339种代谢物。Yao等<sup>[49]</sup>基于UPLC/QTOF-MS技术,以80%甲醇水溶液作为提取溶剂,通过对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)造模给药的代谢物对比,发现甘氨酸、精氨酸代琥珀酸、腐胺、鸟氨酸、亚精胺、5-羟脯氨酸、二氢尿嘧啶这七种标志性代谢物。

## 2.2 提取非极性代谢物

脂溶性代谢物的提取溶剂主要有氯仿、甲基叔丁基醚(methyl tertiary butyl ether, MTBE)、二氯甲烷等。Chao等<sup>[50]</sup>加入了甲醇/氯仿/水溶液对结肠癌细胞(LHCT-116)进行脂质内容的提取,定量了磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)和鞘磷脂(sphingomyelin, SM)。Lorenzen等<sup>[51]</sup>结合GC-MS与LC-MS技术,采用甲醇/二氯甲烷/水(7:14:1)提取溶剂,对细胞中的所有脂质进行了提取检测。Zhang等<sup>[52]</sup>对PANC-1细胞进行了不同脂类的提取,比较了四种提取溶剂(甲醇/MTBE/水、甲醇/氯仿、甲醇/MTBE/氯仿、正己烷/异丙醇),发现甲醇/MTBE/水对溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, LPC)、溶血磷脂酰乙醇胺(lysophosphatidyl ethanolamine, LPE)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)、磷脂酰甘油(phosphatidyl glycerol, PG)、磷脂酸(phosphatidic acid, PA)、心磷脂(cardiolipin, CL)、鞘磷脂(SM)、神经酰胺(ceramide, CER)、三酰基甘油(triacylglycerol, TG)、二酰基甘油(diacylglycerol, DG)、胆固醇酯(cholesteryl ester, CE)和脂肪酸(fatty acid, FA)提供了更好的提取效率。

## 2.3 同时提取极性和非极性代谢物

为了同时获取极性与非极性细胞内代谢物,主

要采用复合式提取溶剂,如甲醇/氯仿/水、甲醇/MTBE/水、甲醇/乙醇/水等。Breitkopf等<sup>[53]</sup>进行氯仿提取后加入甲醇和水进行分层,分别提取到了上层的有机极性小分子和下层的非极性脂质。Zong等<sup>[54]</sup>使用神经细胞(PC-12)与IC<sub>15</sub>(15%抑制浓度)的CdCl<sub>2</sub>进行重金属如镉(Cd)引起的神经毒性实验,实验中使用-20 °C的甲醇和氯仿作为提取溶剂,比较正常组与给药组的代谢物变化,涉及糖酵解和糖异生、生物蝶呤代谢、色氨酸代谢、酪氨酸代谢、甘油磷脂代谢和脂肪酸 $\beta$ -氧化。Fei等<sup>[4]</sup>提出使用甲醇/乙醇/水作为提取溶剂结合HILIC-TOF-MS能够更大范围地检测到极性和脂质代谢物。Hounoum等<sup>[36]</sup>对NSC-34细胞进行-40 °C冰甲醇淬灭后比较了甲醇/水(1:1)、乙醇/水(1:1)、二氯甲烷/甲醇/水(3:3:2)、二氯甲烷/乙醇/水(3:3:2)这四种提取溶剂,发现使用二氯甲烷/甲醇/水(3:3:2)两相提取溶剂可重复性最好且具有较高的可靠性。

细胞内部分有机小分子类代谢物结构不稳定或仪器检测灵敏度较低,则需要在提取后对其进行衍生化处理,常用的衍生化试剂有以下三种:苯肼<sup>[55]</sup>主要针对含 $\alpha$ -酮酸结构式的代谢物;N-叔丁基二甲基硅烷基-N-甲基三氟乙酰胺(N-tert-butyl dimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide, MTBSTFA)<sup>[56]</sup>,通过取代活性氢进行硅烷化反应,适用于气质的检测;邻苄基羟胺(O-benzylhydroxylamine, O-BHA)<sup>[57]</sup>,对活泼氢的加成反应,增大非极性基团,适用于液质的检测。在实验过程中,我们可以根据所要的目标化合物采取合适的代谢物提取方式。

## 3 样品归一化

代谢组学是一个迅速发展的领域,我们对这一主题的大部分理解来自于对细胞系的研究。对于代谢组学的定量分析,主要目的是确定两组或更多组来比较样品中各代谢物的浓度差异。然而,由于细胞密度和处理条件的变化使得细胞增殖不同,难以控制从板上收获的细胞量<sup>[58]</sup>,从而影响提取物中代谢物总量,并且单个样品的大小、重量或体积也会显著影响相对量化的结果,这就需要对细胞进行归一化处理,确保在同一水平上进行代谢物浓度的比较。样品归一化是指在数据采集之前调整样品体积或浓度,或者在数据采集之后调整采集的信号以均

衡各个样品中的代谢物的总信号的一个过程<sup>[59]</sup>。细胞样品中常见的归一化方法有细胞数量归一化、蛋白质浓度归一化、DNA浓度归一化等。

细胞数量归一化是对细胞定量最直接的方法,但对贴壁细胞的准确测量需要辅以原位成像或胰蛋白酶消化等技术,准确性易受到细胞悬浮液不均匀性的影响以及等分和转移过程中引入的随机变异的干扰<sup>[60]</sup>,同时该方法需要在细胞收集后进行,这会使淬灭和提取的步骤得到推迟,从而影响细胞中代谢物特征。若细胞发生病变,在大小或形态上会发生显著改变,导致细胞计数不准确,这些都限制了细胞数量归一化法的用途。例如,某些细胞被人巨细胞病毒(HCMV)感染后,其体积约增大2倍,此时采取蛋白质浓度归一化的方法效果会更好<sup>[61]</sup>。Hutschenreuther等<sup>[60]</sup>基于GC-MS研究乳腺癌细胞(MCF-7)代谢时,进行了细胞数量归一化和总离子流图归一化,两者结果相似,因此认为细胞数量归一化处理是一个可以省略的步骤,但此方法只适用于两个对比样品中的细胞提取物浓度差异小于2倍的情况,否则“假阳性”数量将增加到10%以上。Silva等<sup>[62]</sup>比较了细胞数量归一化、蛋白质浓度归一化、DNA浓度归一化这三种细胞提取物代谢组学数据归一化的方法,最终发现,DNA归一化是广泛适用于从贴壁细胞系归一化代谢组学数据的方法,因为DNA浓度与细胞数量成正比,且能避免生长在团块中的细胞系难以准确计数的问题,同时可以避免由提取溶剂带来的蛋白质回收不佳、来自细胞沉淀的蛋白质不完全再溶解以及代谢物提取溶液和剩余细胞沉淀的蛋白质浓度不能得到预期的相关性等问题。Chao等<sup>[50]</sup>通过不同的细胞数量比较了细胞计数、DNA浓度、蛋白质浓度、m/z184的前体离子扫描(precursor ion scan, PIS)这四种归一化法,发现细胞计数在低数量时误差会增大,DNA浓度法由于对细胞碎片DNA提取率的不同使其与PIS相比差异较大,蛋白质浓度归一化在细胞较少时差异最为明显,需要额外的样品制备来提取蛋白质,而PIS归一化法是这些方法中最优的。与核酸量相关的基因组和与蛋白质总量相关的蛋白质组学研究相比,大多数细胞代谢组学研究采用细胞数量归一化法,部分细胞代谢组学研究使用蛋白质含量或DNA含量归一化,但都无法代表总代谢物浓度,Chen等<sup>[63]</sup>采用基质诱导离子抑制(matrix induced ion suppression, MIIS)方法,能够

有效地进行细胞内代谢物总浓度的归一化,提高数据的完整性。

样品归一化最主要的目的是最小化因样品浓度不同导致的差异,从而使组内差异变小,组间差异更加明显。归一化的方法多种多样,目前还缺乏能够被普遍接受的细胞代谢物归一化方法。我们在选择归一化方法时,需要考虑归一化精确度、操作方便性、速度和成本等问题,但从上述研究中不难发现,不管进行哪种归一化方法,前提都需要收获足够多的细胞量,从而减少误差。

#### 4 小结与展望

对于细胞代谢组学来说,重点在于收获足够多的代谢物或尽可能多地提取出目标代谢物,现阶段还没有一个标准化处理方法来全面有效地获取细胞内代谢物,保证结果的重复性和可靠性。本文主要概述了细胞代谢组学中对细胞内代谢物常见的前处理方法,包含了细胞的培养、淬灭、提取和归一化方法。为有效地避免代谢物的损失,在对细胞淬灭前应先快速加入等渗的生理盐水或PBS冲洗细胞表面。相对于液氮,使用低温有机溶剂更为安全,所以较常选择的淬灭方法是加入含有缓冲试剂(如HEPES)的低温有机溶剂,并在-80℃放置一段时间,确保淬灭完全。不同的提取溶剂提取的代谢物种类也不同,由于不同的提取方法是为了分析特定类别的代谢物,因此应根据分析目的选择提取方法。采用甲醇/氯仿/水的混合溶剂能够较全面地提取极性和非极性代谢物,但由于氯仿毒性较大,现常用MTBE代替。归一化方法中,蛋白质浓度和DNA浓度均表现出了较高的测量精密度,运用较广泛。但各自也存在着缺点,比如蛋白质浓度定量需要单独进行试验,增加工作量且不经济。而DNA归一化则需要特定的试剂盒仪器来测量,过夜溶解耗时较长,目前还没有通过DNA浓度归一化来改善代谢组学数据分析的相关研究。相比较而言,蛋白质浓度归一化更为常用。研究者们应根据实验目的开发具体的前处理的方法以提高代谢物覆盖率。

细胞代谢组学研究中,样品前处理直接关系到后续的数据处理与实验的可重复性,而对于不同的细胞类型采取的样品前处理方法有所不同,现阶段还没有能适用于所有细胞系的前处理方法,需要进一步深入研究。同时,代谢组学研究中的样品检测

和数据分析也已经成了细胞代谢组学研究中的关键问题。我们需要通过优化分析技术和方法, 依靠高通量和高分辨率的设备, 以提高细胞内代谢物在仪器中的检测灵敏度, 生成可靠和可重复的数据; 还需要对数据处理算法进行研究优化, 开发更高效的软件, 来满足细胞代谢组学研究的需求。代谢组学技术应用于哺乳动物细胞上, 让我们在细胞代谢机制相互作用上从理论向临床更靠近了一步, 并有可能确定治疗或干预的新目标领域。随着细胞代谢组学的不断优化和应用领域的不断扩增, 相信细胞代谢组学在未来的研究中会有更大的发展空间。

### 参考文献 (References)

- Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999; 29(11): 1181-9.
- León Z, García-Cañaveras JC, Donato MT, Lahoz A. Mammalian cell metabolomics: experimental design and sample preparation. *Electrophoresis* 2013; 34(19): 2762-75.
- Fiehn O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002; 48(1/2): 155-71.
- Fei F, Bowditch DM, Mccarry BE. Comprehensive and simultaneous coverage of lipid and polar metabolites for endogenous cellular metabolomics using HILIC-TOF-MS. *Anal Bioanal Chem* 2014; 406(15): 3723-33.
- Jain M, Nilsson R, Sharma S, Madhusudhan N, Kitami T, Souza AL, *et al.* Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science* 2012; 336(6084): 1040-4.
- Hayton S, Maker GL, Mullaney I, Trengove RD. Experimental design and reporting standards for metabolomics studies of mammalian cell lines. *Cell Mol Life Sci* 2017; 74(24): 4421-41.
- Verma N, Pink M, Boland S, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. Benzo[a]pyrene-induced metabolic shift from glycolysis to pentose phosphate pathway in the human bladder cancer cell line RT4. *SCI Rep-UK* 2017; 7(1): 9773.
- Willmann L, Schlimpert M, Hirschfeld M, Erbes T, Neubauer H, Stickeler E, *et al.* Alterations of the exo- and endometabolite profiles in breast cancer cell lines: A mass spectrometry-based metabolomics approach. *Anal Chim Acta* 2016; 925: 34-42.
- 何小燕, 陈建丽, 向 欢, 高 耀, 田俊生, 秦雪梅, 等. 谷氨酸和皮质酮诱导的PC12抑郁症细胞模型差异性的<sup>1</sup>H NMR代谢组学研究. *药学报*(He Xiaoyan, Chen Jianli, Xiang Huan, Gao Yao, Tian Juansheng, Qin Xuemei, *et al.* Comparative study of the corticosterone and glutamate induced PC12 cells depression model by <sup>1</sup>H NMR metabolomics. *Acta Pharm Sin*) 2017; 52(2): 245-52.
- Shi JX, Zhou J, Ma HY, Guo HB, Ni ZY, Duan JA, *et al.* An *in vitro* metabolomics approach to identify hepatotoxicity biomarkers in human L02 liver cells treated with pekinenal, a natural compound. *Anal Bioanal Chem* 2016; 408(5): 1-12.
- Bai J, Wang MX, Chowbay B, Ching CB, Chen WN. Metabolic profiling of HepG2 cells incubated with S<sup>-</sup> and R<sup>+</sup> enantiomers of anti-coagulating drug warfarin. *Metabolomics* 2011; 7(3): 353-62.
- álvarez-Sánchez B, Priego-Capote F, de Castro ML. Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. *Trends Anal Chem* 2010; 29(2): 111-9.
- álvarez-Sánchez B, Priego-Capote F, de Castro ML. Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection. *Trends Anal Chem* 2010; 29(2): 120-7.
- Van Gulik WM, Canelas AB, Taymaz-Nikerel H, Douma RD, Jonge LP, Heijnen JJ. Fast sampling of the cellular metabolome. *Methods Mol Biol* 2012; 881(881): 279-306.
- Jiang GT, Kang HY, Yu YQ. Cross-platform metabolomics investigating the intracellular metabolic alterations of HaCaT cells exposed to phenanthrene. *J Chromatogr B* 2017; 1060: 15-21.
- Yuan M, Breitkopf SB, Yang XM, Asara JM. A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nat Protoc* 2012; 7(5): 872-81.
- Zhou LN, Yin PY, Luo P, Tang L, Wang ZC, Gao P, *et al.* High throughput metabolic profiling based on small amount of hepatic cells. *Electrophoresis* 2017; 38(18): 2296-303.
- 李 黎, 张 兴, 申秀萍, 钱 鑫, 张宗鹏, 刘昌孝. 体外心肌毒性代谢组学样品预处理及UPLC/Q-TOF-MS条件优化. *药物评价研究*(Li Li, Zhang Xing, Shen Xiuping, Qian Xin, Zhang Zongpeng, Liu Changxiao. Optimization of sample pretreatment and UPLC/Q-TOF-M conditions for metabolomic studies of *in vitro* cardiotoxicity. *Drug Evaluation Research*) 2016; 39(4): 564-71.
- Teng Q, Huang WL, Collette TW, Ekman DR, Tan C. A direct cell quenching method for cell-culture based metabolomics. *Metabolomics* 2009; 5(2): 199-208.
- Du Y, Wang FQ, May K, Xu W, Liu HC. Determination of deamidation artifacts introduced by sample preparation using <sup>18</sup>O-labeling and tandem mass spectrometry analysis. *Anal Chem* 2012; 84(15): 6355-60.
- Zhang M, Sun B, Zhang Q, Gao R, Liu Q, Dong FT, *et al.* Establishment and optimization of NMR-based cell metabolomics study protocols for neonatal Sprague-Dawley rat cardiomyocytes. *Anal Biochem* 2017; 517: 50-2.
- Bi H, Krausz KW, Manna SK, Li F, Johnson CH, Gonzalez FJ. Optimization of harvesting, extraction, and analytical protocols for UPLC-ESI-MS-based metabolomic analysis of adherent mammalian cancer cells. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405(15): 5279-89.
- 史栋栋, 况媛媛, 王桂明, 彭章晓, 王 彦, 阎 超. 细胞代谢组学用于羽扇豆醇干预人乳腺癌细胞 MCF-7的机理探究. *色谱*(Shi Dongdong, Kuang Yuanyuan, Wang Guiming, Peng Zhangxiao, Wang Yan, Yan Chao. Mechanism research on the lupeol treatment on MCF-7 breast cancer cells based on cell metabolomics. *Chin J Chrom*) 2014; 32(3): 278-83.
- 余欣尉, 吴 谦, 吕 望, 王 彦, 马小琼, 陈 喆, 等. 基于液相色谱质谱联用技术的肺癌细胞代谢组学分析. *色谱*(Yu Xinwei, Wu Qian, Lü Wang, Wang Yan, Ma Xiaoqiong, Chen Zhe, *et*



- al.* Metabonomics study of lung cancer cells based on liquid chromatography-mass spectrometry. *Chin J Chrom* 2013; 31(7): 691-6.
- 25 Zhang HY, Zheng H, Zhao G, Tang CL, Lu SY, Cheng B, *et al.* Metabolo-mic study of corticosterone-induced cytotoxicity in PC12 cells by ultra perform-ance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight mass spectrometry. *Mol Biosyst* 2016; 12(3): 902-13.
- 26 Hu QP, Wei JT, Liu YW, Fei XL, Hao YW, Dong P, *et al.* Discovery and identification of potential biomarkers for alcohol-induced oxidative stress based on cellular metabolomics. *Biomed Chromatogr* 2016; 31(7): 1-9.
- 27 Paglia G, Hrafnisdóttir S, Magnúsdóttir M, Fleming RM, Thorlacius S, Pálsson, BO, *et al.* Monitoring metabolites consumption and secretion in cultured cells using ultra-performance liquid chromatography quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-ToF-MS). *Anal Bioanal Chem* 2012; 402(3): 1183-98.
- 28 Kapoore RV, Coyle R, Staton CA, Brown NJ, Vaidyanathan S. Cell line dependence of metabolite leakage in metabolome analyses of adherent normal and cancer cell lines. *Metabolomics* 2015; 11(6): 1743-55.
- 29 Dietmair S, Timmins NE, Gray PP, Nielsen LK, Krömer JO. Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: development of a metabolite extraction protocol. *Anal Biochem* 2010; 404(2): 155-64.
- 30 Halama A, Riesen N, Möller G, Hrabě de Angelis M, Adamski J. Identification of biomarkers for apoptosis in cancer cell lines using metabolomics: tools for individualized medicine. *J Intern Med* 2013; 274(5): 425-39.
- 31 Xu WQ, Lin DH, Huang CH. NMR-based metabolomic analysis for the effects of creatine supplementation on mouse myoblast cell line C2C12. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2017; 49(7): 617-27.
- 32 Windler C, Gey C, Seeger K. Skin melanocytes and fibroblasts show different changes in choline metabolism during cellular senescence. *Mech Ageing Dev* 2017; 164: 82-90.
- 33 García-Cañaveras JC, López S, Castell JV, Donato MT, Lahoz A. Extending metabolome coverage for untargeted metabolite profiling of adherent cultured hepatic cells. *Anal Bioanal Chem* 2016; 408(4): 1217-30.
- 34 Hu S, Wang JH, Ji EH, Christison T, Lopez L, Huang YY. Targeted Metabolomic Analysis of Head and Neck Cancer Cells Using High Performance Ion Chromatography Coupled with a Q Exactive HF Mass Spectrometer. *Anal Chem* 2015; 87(12): 6371-9.
- 35 Lorenz MA, Burant CF, Kennedy RT. Reducing Time and Increasing Sensitivity in Sample Preparation for Adherent Mammalian Cell Metabolomics. *Anal Chem* 2011; 83(9): 3406-14.
- 36 Hounoum BM, Blasco H, Nadal-Desbarats L, Diémé B, Montigny F, Andres CR, *et al.* Analytical methodology for metabolomics study of adherent mammalian cells using NMR, GC-MS and LC-HRMS. *Anal Bioanal Chem* 2015; 407(29): 8861-72.
- 37 Sellick CA, Hansen R, Maqsood AR, Dunn WB, Stephens GM, Goodacre R, *et al.* Effective quenching processes for physiologically valid metabolite profiling of suspension cultured Mammalian cells. *Anal Chem* 2009; 81(1): 174-83.
- 38 Kronthaler J, Gstraunthaler G, Heel C. Optimizing high-throughput metabolomic biomarker screening: a study of quenching solutions to freeze intracellular metabolism in CHO cells. *OMICS* 2012; 16(3): 90-7.
- 39 Kapoore RV, Coyle R, Staton CA, Brown NJ, Vaidyanathan S. Influence of washing and quenching in profiling the metabolome of adherent mammalian cells: a case study with the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. *Analyst* 2017; 142(11): 2038-49.
- 40 Sheikh KD, Khanna S, Byers SW, Fornace A Jr, Cheema AK. Small molecule metabolite extraction strategy for improving LC/MS detection of cancer cell metabolome. *J Biomol Tech* 2011; 22(1): 1-4.
- 41 Chrysanthopoulos PK, Goudar CT, Klapa MI. Metabolomics for high-resolution monitoring of the cellular physiological state in cell culture engineering. *Metab Eng* 2010; 12(3): 212-22.
- 42 Sellick CA, Knight D, Croxford AS, Maqsood AR, Stephens GM, Goodacre R, *et al.* Evaluation of extraction processes for intracellular metabolite profiling of mammalian cells: matching extraction approaches to cell type and metabolite targets. *Metabolomics* 2010; 6(3): 427-38.
- 43 Haynes CA, Allegood JC, Sims K, Wang EW, Sullards MC, Merrill AH Jr. Quantitation of fatty acyl-coenzyme As in mammalian cells by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res* 2008; 49(5): 1113-25.
- 44 Dettmer K, Nürnberger N, Kaspar H, Gruber MA, Almetter MF, Oefner PJ. Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies: optimization of harvesting and extraction protocols. *Anal Bioanal Chem* 2011; 399(3): 1127-39.
- 45 史栋栋, 王桂明, 况媛媛, 彭章晓, 王彦, 谷雪, 等. 细胞代谢组学用于木犀草素抑制MCF-7细胞的机制研究. *分析化学*(Shi Dongdong, Wang Guiming, Kuang Yuanyuan, Peng Zhangxiao, Wang Yan, Gu Xue, *et al.* Metabonomics Study on Luteolin Intervention of Breast Cancer MCF-7 Cells. *Chinese J Anal Chem*) 2014; 42(8): 1088-93.
- 46 Danielsson AP, Moritz T, Mulder H, Spégel P. Development and optimization of a metabolomic method for analysis of adherent cell cultures. *Anal Biochem* 2010; 404(1): 30-9.
- 47 高山山, 郭慧清, 张泽坤, 白光灿, 高晓燕, 马长华. 基于UPLC-Q-TOF/MS的RAW264.7细胞炎症模型的代谢指纹分析. *中国中药杂志*(Gao Shanshan, Guo Huiqing, Zhang Zekun, Bai Guangcan, Gao Xiaoyan, Ma Changhua. Metabolic fingerprint analysis of RAW264.7 inflammatory cell model by using UPLC-Q-TOF/MS. *Chin Pharm J*) 2017; 42(12): 2373-9.
- 48 Liu XJ, Ser Z, Locasale JW. Development and quantitative evaluation of a high-resolution metabolomics technology. *Anal Chem* 2014; 86(4): 2175-84.
- 49 Yao WF, Li H, Liu QN, Gao Y, Dai J, Bao BH, *et al.* Cellular metabolomics revealed the cytoprotection of amentoflavone, a natural compound, in lipopolysaccharide-induced injury of human umbilical vein endothelial cells. *Int J Mol Sci* 2016; 17(9): 1514.
- 50 Chao HC, Chen GY, Hsu LC, Liao HW, Yang SY, Wang SY, *et al.* Using precursor ion scan of 184 with liquid chromatography-

- electrospray ionization-tandem mass spectrometry for concentration normalization in cellular lipidomic studies. *Anal Chim Acta* 2017; 971: 68-77.
- 51 Lorenzen W, Bozhüyük KA, Cortina NS, Bode HB. A comprehensive insight into the lipid composition of *Myxococcus xanthus* by UPLC-ESI-MS. *J Lipid Res* 2014; 55(12): 2620-33.
- 52 Zhang HZ, Gao Y, Sun JH, Fan SC, Yao XP, Ran XR, *et al.* Optimization of lipid extraction and analytical protocols for UHPLC-ESI-HRMS-based lipidomic analysis of adherent mammalian cancer cells. *Anal Bioanal Chem* 2017; 409(22): 5349-58.
- 53 Breilkopf SB, Ricoult SH, Yuan M, Xu Y, Peake DA, Manning BD, *et al.* A relative quantitative positive/negative ion switching method for untargeted lipidomics via high resolution LC-MS/MS from any biological source. *Metabolomics* 2017; 13(3): 30.
- 54 Zong L, Xing JP, Liu S, Liu ZQ, Song FR. Cell metabolomics reveals the neurotoxicity mechanism of cadmium in PC12 cells. *Ecotoxicol Environ Saf* 2018; 147:26-33.
- 55 Zimmermann M, Sauer U, Zamboni N. Quantification and mass isotopomer profiling of  $\alpha$ -Keto acids in central carbon metabolism. *Anal Chem* 2014; 86(6): 3232-7.
- 56 Mamer O, Gravel SP, Choinière L, Chénard V, St-Pierre J, Avizonis D. The complete targeted profile of the organic acid intermediates of the citric acid cycle using a single stable isotope dilution analysis, sodium borodeuteride reduction and selected ion monitoring GC/MS. *Metabolomics* 2013; 9(5): 1019-30.
- 57 Tan B, Lu ZH, Dong SC, Zhao GS, Kuo MS. Derivatization of the tricarboxylic acid intermediates with O-benzylhydroxylamine for liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. *Anal Biochem* 2014; 465(5): 134-47.
- 58 Cao B, Aa JY, Wang GJ, Wu XL, Liu LS, Li MJ, *et al.* GC-TOFMS analysis of metabolites in adherent MDCK cells and a novel strategy for identifying intracellular metabolic markers for use as cell amount indicators in data normalization. *Anal Bioanal Chem* 2011; 400(9): 2983-93.
- 59 Wu YM, Li L. Sample normalization methods in quantitative metabolomics. *J Chromatogr A* 2016; 1430: 80-95.
- 60 Hutschenreuther A, Kiontke A, Birkenmeier G, Birkemeyer C. Comparison of extraction conditions and normalization approaches for cellular metabolomics of adherent growing cells with GC-MS. *Anal Methods-UK* 2012; 4(7): 1953-63.
- 61 Munger J, Bajad SU, Collier HA, Shenk T, Rabinowitz JD. Dynamics of the Cellular Metabolome during Human Cytomegalovirus Infection. *PLoS Pathog* 2006; 2(12): e132.
- 62 Silva LP, Lorenzi PL, Purwaha P, Yong V, Hawke DH, Weinstein JN. Measurement of DNA concentration as a normalization strategy for metabolomic data from adherent cell lines. *Anal Chem* 2013; 85(20): 9536-42.
- 63 Chen GY, Liao HW, Tsai IL, Tseng YJ, Kuo CH. Using the matrix-induced ion suppression method for concentration normalization in cellular metabolomics studies. *Anal Chem* 2015; 87(19): 9731-9.