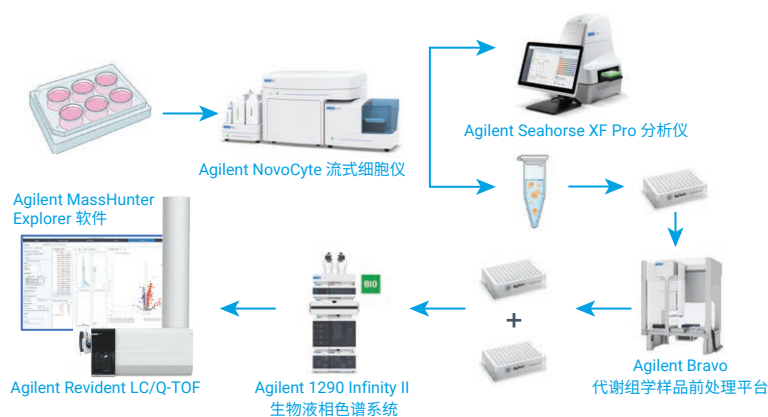


结合生物能量代谢测量与 LC/MS 组学分析阐明细胞和分子对药物处理的 反应



作者

Mark Sartain,
Genevieve Van de Bittner,
Natalia Romero,
James Pyke, Yoonseok Kam,
Maria Apostolidi 和
Dustin Chang
安捷伦科技有限公司

摘要

结合使用多种代谢细胞分析技术可以发现任何单一分析技术无法揭示的新的生物学见解。在本应用简报中，将细胞分辨率的 Agilent Seahorse XF 生物能量代谢分析与分子分辨率的 Agilent Revident Q-TOF LC/MS 代谢组学和脂质组学分析相结合，以研究经药物处理的癌细胞的代谢适应性。经酪氨酸激酶抑制剂处理的白血病细胞表现出线粒体功能下降和代谢途径改变。通过结合线粒体功能、代谢组学和脂质组学相关研究结果，研究人员提出了一个新的生物学假设：经过处理的白血病细胞上调回补作用以克服线粒体功能下降，但这只针对两种抑制剂中的一种。这种涉及多种技术、从细胞到分子的工作流程可用于揭示药物化合物的代谢作用机制和脱靶效应。

前言

癌细胞通过代谢重编程来改变结构单元和能量代谢物的产生^[1]。识别癌细胞内重编程的代谢途径和代谢途径对潜在的治疗药物的反应是开发新治疗靶标或联合疗法的一种颇具前景的策略。为此，互补技术可以提供协同作用，以更深入了解药物诱导的癌细胞代谢途径的调控情况。

具体来说，使用 Agilent Seahorse XF Pro 分析仪，通过测量耗氧率 (OCR) 和细胞外酸化率 (ECAR) 在细胞分辨率水平监测能量代谢。通过 ECAR 和 OCR 数据获得的糖酵解和呼吸速率为了解活细胞功能提供了一个窗口，因为糖酵解和线粒体代谢途径在各种细胞过程中发挥着关键作用，包括活化、增殖、分化、细胞死亡和疾病进展。同时，基于 LC/MS 的组学和定性能量代谢分析通过测量代谢物丰度或其同位素标记掺入程度，在分子分辨率水平监测代谢途径的变化情况。

本应用简报将安捷伦的各种硬件、软件和检测试剂盒整合到了一个全面的工作流程中 (图 1)，以研究两种潜在的酪氨酸激酶抑制剂类抗癌药物对代谢途径的影响。这两种抑制剂是根据之前的应用简报选择的^[2]，使用了 Agilent Seahorse XF 实时 ATP 生成速率测试对包含 80 种酪氨酸激酶抑制剂的化合物库进行筛选，以评估抑制剂对糖酵解和线粒体呼吸 ATP 产生速率的急性效应。

为了确定所选酪氨酸激酶抑制剂影响代谢的可能作用机制，在较长的孵育期后重复进行 Seahorse XF 实时 ATP 生成速率测试，并通过分析质子漏和备用呼吸能力 (SRC) (这两项检测均通过 Agilent Seahorse XF 细胞线粒体压力测试提供) 进一步表征了经药物处理的细胞。采用 Agilent Bravo 代谢组学样品前处理平台的自动化样品前处理技术，通过代谢组学和脂质组学 LC/MS 分析分别评估所选酪氨酸激酶抑制剂对分子代谢的影响^[3]。在发现工作流程中，使用 Agilent Revident LC/Q-TOF 和 MassHunter Explorer 软件分析细胞提取物，并使用 LC/MS 分析来识别对代谢途径的影响。

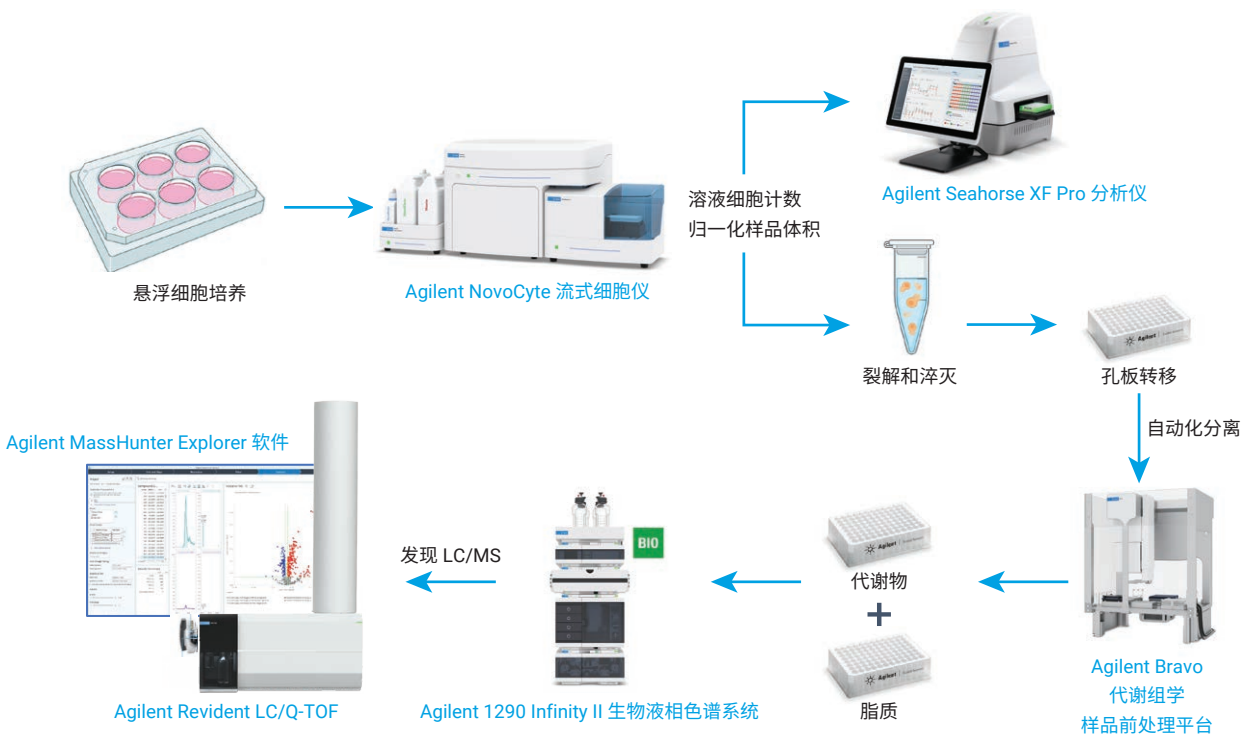


图 1. 工作流程概述，从细胞培养到 Seahorse XF，以及从细胞培养到自动化样品前处理再到 Q-TOF LC/MS 分析。本应用简报中重点介绍的关键技术以蓝色显示。本图中的细胞培养板和微管部分使用 BioRender.com 创建

实验部分

材料

THP-1 细胞系来自 American Type Culture Collection，并在加入了 0.05 mM 2-巯基乙醇 (Life Technologies) 的 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 完全培养基中培养。药物化合物 AG-879 (99% HPLC 级) 和 SU1498 ($\geq 98\%$ HPLC 级)，以及化合物溶剂 DMSO (无菌过滤) 购自 MilliporeSigma。

样品前处理溶剂和化学品

LC/MS 级甲醇 (MeOH)、NMR 级三氟乙醇 (TFE)、 $\geq 99.5\%$ GC 级二氯甲烷、高纯度 ($> 99.5\%$) 乙醇、LC 级或 99.9% 纯丁醇以及 LC/MS 级乙腈 (ACN)。

LC/MS 流动相溶剂和化学品

甲酸铵和醋酸铵购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.)。MeOH (hypergrade, LC/MS 分析, LiChrosolv)、ACN (hypergrade, LC/MS 分析, LiChrosolv) 和 2-丙醇 (hypergrade, LC/MS 分析, LiChrosolv) 购自 Supelco (Bellefonte, PA, U.S.)。用于样品前处理和 LC/MS 分析的超纯水产自配备 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器滤芯的 Milli-Q Integral 系统 (MilliporeSigma)。

仪器

Agilent **NovoCyte Advanteon 流式细胞仪** (三个激光器) 与 Agilent NovoSampler Q 系统 (货号 2010201) 联用。请注意，Agilent NovoCyte Quanteon 和 Penteon 流式细胞仪与 NovoSampler Q 系统配合使用时也适合此工作流程。本应用简报中的数据是使用搭配 NovoSampler Q 系统的 NovoCyte Quanteon 流式细胞仪采集的。流式细胞仪使用的附件和消耗品包括：

- Agilent NovoCyte 质控和校准微球 (货号 8000004)
- Agilent NovoCyte 大储液车 (货号 2010117AA)

Agilent Seahorse XF Pro 分析仪

(产品货号 S7855A) 使用以下消耗品：

- Agilent Seahorse XF 实时 ATP 生成速率测试试剂盒 (货号 103592-100)
- Agilent Seahorse XF 细胞线粒体压力测试试剂盒 (货号 103015-100)
- Agilent Seahorse XFe96/XF Pro PDL FluxPak Mini (货号 103798-100)

Agilent **Bravo 代谢组学样品前处理平台** (产品货号 G5589AA) 搭配以下补充方案：

- 补充性代谢物 + 脂质双重细胞样品前处理 VWorks 方案 (联系安捷伦自动化工作流程专员了解详细信息)

Agilent **1290 Infinity II 生物液相色谱系统**包括以下模块：

- Agilent 1290 Infinity II 生物高速泵 (产品货号 G7132A)
- 配备恒温箱的 Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (产品货号 G7137A)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (产品货号 G7116B)，配备 Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 2 位/10 通生物惰性阀，1300 bar (产品货号 G5641A)

还使用了 Agilent **Revident LC/Q-TOF**，配备双安捷伦喷射流技术离子源 (产品货号 G6575A)。

软件

Agilent **MassHunter 采集软件** LC/Q-TOF 12.0 版用于操作 Revident LC/Q-TOF 系统。

Agilent **MassHunter Explorer 软件** 1.0 版用于特征提取和差异分析。对于代谢物分析，使用 Default-Metabolomics.M 方法，并进行了以下修改：高度过滤器：1500；离子形态：-H，+CH₃COO；启用多遍穷举分组；质量容差 ± 10 ppm；至少一个样品组中至少 75% 的数据文件得分 (MFE) ≥ 70 ；启用 RT 校正 (使用参比数据文件)。对于脂质分析，使用 Default-Metabolomics.M 方法，并进行了以下修改：高度过滤器：600；离子形态：+H，+NH₄；+Na；启用多遍穷举分组；RT 容差 ± 0.15 min；质量容差 ± 10 ppm；至少一个样品组中至少 75% 的数据文件得分 (MFE) ≥ 70 。对于两个项目中的背景扣除，基于萃取空白 (对照) 对所有组应用倍数变化测试，阈值为 2 且最少 1 对。图中给出了其他参数。

Agilent **Mass Profiler Professional (MPP) 软件** 15.1 版用于进一步的差异分析和结果可视化。从 MassHunter Explorer 项目导入文件 (.pfa) 作为数据源。使用“脂质组学”实验类型来创建正离子脂质数据集。采用百分位移位归一化算法 (75%)，将数据集基线校正到所有样品的中值。

使用 Agilent **MassHunter Lipid Annotator** 软件 1.0 版和默认方法参数，但正离子模式分析只考虑 $[M + H]^+$ 和 $[M + NH_4]^+$ 母离子。取消选择 FAHFA 脂质类别。

细胞培养

在经补充的 RPMI 培养基中培养的 THP-1 细胞维持在 $2-8 \times 10^5$ 个细胞/mL。将细胞培养物用 4.98 μ M SU1498、1.36 μ M AG-879 或 DMSO 溶剂（最终 DMSO 含量为 1% (v/v)）处理 2 或 18 小时。如果要进行 18 小时的处理，细胞接种密度为 6×10^5 个细胞/mL，确保在 18 小时后达到目标密度 7.5×10^5 个细胞/mL。在进行 2 小时处理时，细胞取自前一天用于准备 18 小时培养处理的细胞培养物，以确保在开始 Seahorse XF 实验之前经 2 小时和 18 小时处理的细胞在细胞分裂和培养基条件上保持一致。

用于样品归一化的 NovoCyte 细胞计数

使用细胞计数进行 Seahorse XF Pro 分析仪和 LC/MS 样品归一化，并使用配备 NovoSampler Q 的 NovoCyte Quanteon 流式细胞仪以及之前所述的类似程序完成^[4]。将 400 μ L DMSO 对照样品分成两份 200 μ L 等分试样，以建立活/死细胞样品对照。将一份 200 μ L 试样储存在室温下，另一份 200 μ L 试样加热至 65 °C 并持续 10 分钟，以建立死细胞对照。将加热的样品在室温下冷却几分钟后，将活细胞和死细胞样品重新合并轻轻混合。从活/死细胞样品取两份 100 μ L 试样，并从各个实验样品取一份 100 μ L 试样转移至 U 型底 96 孔板中。对于细胞活力分析，除保留一个活/死样品作为未染色对照外，向每个样品中添加 1 μ L 7-AAD (0.1 mg/mL)。用移液器轻轻混合样品，然后将板放入 NovoSampler Q 中进行数据采集。在数据分析期间，使用活/死细胞样品进行活细胞和死细胞设门。对于 Seahorse XF Pro 分析仪细胞计数归一化，使用活细胞计数，因为只有活细胞才会产生 OCR 和 ECAR 信号。对于 LC/MS 细胞计数归一化，使用总细胞计数，因为所有细胞都对峰丰度信号有贡献。

Seahorse XF Pro 分析仪细胞制备

对于 18 小时的处理，将 1.4 mL 的细胞培养物添加到 12 孔板中；加入处理化合物或溶剂，并充分混合样品。18 小时后，用移液器将样品混合均匀，形成均匀的细胞悬液，然后取 100 μ L 进行细胞计数。同时，将各个样品取 1 mL 转移至 1.5 mL 微量离心管中，并在室温下以 $250 \times g$ 离心 5 分钟，使细胞沉淀。细胞计数完成后，去除 1 mL 细胞培养物中的上清液。然后，将 Agilent Seahorse XF RPMI 培养基（包括处理化合物或溶剂）加入各样品中，使其达到 100 万个细胞/mL。将各个样品取 50 μ L 转移至 Seahorse XFe96/XF Pro PDL 细胞培养微孔板中，接种密度为 50000 个细胞/孔。在无 CO₂ 培养箱中静置 20 分钟后，将细胞培养微孔板在室温下以 $300 \times g$ 离心 5 分钟。在细胞接种后、开始 Seahorse 检测之前，向各孔中另外加入 130 μ L 含相应处理化合物或溶剂的 Seahorse 培养基。对于 2 小时的处理，首先对细胞进行计数，然后将细胞重悬在 Seahorse XF 培养基中；等分细胞；添加处理化合物或溶剂；并从每个处理组取 50 μ L 转移至 PDL 细胞培养微孔板中。细胞沉降时间、离心和额外添加 Seahorse 培养基步骤与 18 小时处理方法相同。

LC/MS 代谢组学和脂质组学分析中的细胞裂解和淬灭

为了制备用于 LC/MS 分析的样品，需要应用之前介绍的细胞提取方法^[9]，该方法利用 TFE 在室温条件下裂解哺乳动物细胞并淬灭代谢。值得注意的是，TFE 淬灭克服了冷液体淬灭所面临的挑战，提高了安全性，并且适合自动化系统。NovoCyte 细胞计数用于计算每个样品收获 100 万个 THP-1 细胞所需的细胞培养物体积。收获的细胞样品用 1 mL 室温 PBS 清洗，然后用 100 μ L 1:1 三氟乙醇:水在室温下裂解和淬灭，用涡旋混合器混匀，并在室温下孵育 10 分钟。

Bravo 自动化代谢物与脂质双重分离

使用之前所述的^[3] Bravo 代谢组学样品前处理平台上的自动化方法（图 2），从溶剂处理和药物处理的 THP-1 细胞相应的 TFE 细胞裂解物中依次提取极性代谢物和脂质。该方法利用 96 孔 Agilent Captiva EMR-Lipid 板，该板含有独特的固体吸附剂，可选择性地保留含有酰基链的脂质。简而言之，在蛋白质沉淀后，将经 TFE 淬灭的提取物添加到板中，然后 Captiva EMR-Lipid 吸附剂上方的过滤器会捕获蛋白质。极性代谢物流过吸附剂，脂质被吸附剂捕获。干燥滤液中的极性代

谢物，然后用 200 μL 4:1 乙腈:水复溶，再进行 HILIC-LC/MS 分析。使用不同的收集板进行脂质洗脱，用更强的洗脱溶剂洗脱脂质，然后干燥并用 200 μL 9:1 甲醇:氯仿复溶，以进行反相 (RP) LC/MS 分析。为了实现更好的复溶，将两块板在室温下以 500 rpm 的速度振荡 20 分钟。对于迭代 MS/MS 实验，从所有含有经处理重复样的孔中取 20 μL 样品混合，在真空下干燥，并在单独的样品瓶用五分之一体积的 9:1 甲醇:氯仿重悬，制备出五倍浓缩的混合脂质样品。



图 2. 细胞裂解物的自动化代谢物 + 脂质双重分离方法^[3]。绿色步骤由 Agilent Bravo 代谢组学样品前处理平台执行

LC/MS 方法

代谢物 HILIC LC 方法参数来自之前的应用简报^[5]。脂质液相色谱方法参数来自之前的应用简报^[6]。表 1 至表 4 提供了实验方法的详细液相色谱条件和 LC/Q-TOF 自动 MS/MS 参数。此外，在负离子模式下采集了各个样品中代谢物的单纯 LC/Q-TOF MS 数据，MS 采集速率为 2 幅谱图/秒。还在正离子模式下采集了各个样品中脂质的 LC/Q-TOF 全离子数据，采集速率为 8 幅谱图/秒，碰撞能量为 0、10、20 和 40 eV。所有工作列表都是随机的。

表 1. 代谢物 HILIC-LC 仪器参数

参数	Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统		
分析柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm (部件号 683775-924)		
在线过滤器	Agilent 1290 Infinity II 生物在线过滤器工具包, 0.3 μm (部件号 5720-0020)		
柱温	15 °C		
进样量	10 μL (MS 和 MS/MS)		
自动进样器温度	5 °C		
进样针清洗	标准清洗, 10 s, 异丙醇:乙腈:水 1:1:1		
流动相	A: 含 20 mM 醋酸铵和 5 μM Agilent InfinityLab 失活剂添加剂 (部件号 5191-3940) 的水溶液, pH 9.3 B: ACN		
梯度程序	时间 (min)	%B	流速 (mL/min)
	0	90	0.4
	1	90	0.4
	8	78	0.4
	12	60	0.4
	15	10	0.4
	18	10	0.4
	19	90	0.4
	19.1	90	0.5
	22	90	0.5
	22.1	90	0.4
23	90	0.4	
停止时间	23 min		
后运行时间	无		

表 2. 代谢物 LC/Q-TOF 仪器参数

自动 MS/MS 方法参数	Agilent Revident LC/Q-TOF
仪器模式	750 易碎裂离子模式
离子源	安捷伦双喷射流离子源
极性	负
气体温度	225 °C
干燥气 (氮气)	9 L/min
雾化器气体	40 psi
鞘气温度	375 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	3000 V
喷嘴电压	500 V
碎裂电压	100 V
锥孔电压	45 V
八极杆 RF Vpp	750 V
参比质量	<i>m/z</i> 112.985587, <i>m/z</i> 980.016375
MS 范围	<i>m/z</i> 50–1400
MS/MS 范围	<i>m/z</i> 25–1000
MS 采集速率	8 幅谱图/秒
最小 MS/MS 采集速率	6 幅谱图/秒
分离峰宽	窄 (约 1.3 <i>m/z</i>)
碰撞能量	10、20 和 40 eV
每个循环的最大母离子数	2
可变采集速率	是, 目标计数 MS/MS: 25000
使用 MS/MS 累积时间限	是
剔除未达到目标 TIC 的母离子	否
母离子阈值	5000 响应值和 0.001%
主动排除	禁用
纯度	严格性 100%, 截留率 30%
同位素模型	常见有机分子
母离子电荷态选择和偏好	1、2、未知, 按电荷态
<i>m/z</i> 纳入范围	<i>m/z</i> 50–1400
迭代 MS/MS 质量误差范围	20 ppm
迭代 MS/MS RT 排除范围	± 0.2 min

表 3. 脂质 RP-LC 仪器参数

参数	Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统																						
分析柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 100 × 2.1 mm, 1.8 μm (部件号 959758-902)																						
在线过滤器	Agilent 1290 Infinity II 生物在线过滤器工具包, 0.3 μm (部件号 5720-0020)																						
柱温	45 °C																						
进样量	5 μL (全离子和自动 MS/MS)																						
自动进样器温度	20 °C																						
进样针清洗	标准清洗, 10 s, 1:1 流动相 A:B																						
流动相	A: 含 10 mM 甲酸铵、0.2 mM 氟化铵和 5 μM InfinityLab 失活剂添加剂的水:乙腈:异丙醇 (5:3:2) 溶液 B: 含 10 mM 甲酸铵和 0.2 mM 氟化铵的水:乙腈:异丙醇 (1:9:90) 溶液																						
流速	0.4 mL/min																						
梯度程序	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>15</td></tr> <tr><td>2.5</td><td>50</td></tr> <tr><td>2.6</td><td>57</td></tr> <tr><td>9</td><td>70</td></tr> <tr><td>9.1</td><td>93</td></tr> <tr><td>11</td><td>96</td></tr> <tr><td>11.1</td><td>100</td></tr> <tr><td>12</td><td>100</td></tr> <tr><td>12.2</td><td>15</td></tr> <tr><td>16</td><td>15</td></tr> </tbody> </table>	时间 (min)	%B	0	15	2.5	50	2.6	57	9	70	9.1	93	11	96	11.1	100	12	100	12.2	15	16	15
时间 (min)	%B																						
0	15																						
2.5	50																						
2.6	57																						
9	70																						
9.1	93																						
11	96																						
11.1	100																						
12	100																						
12.2	15																						
16	15																						
停止时间	16 min																						
后运行时间	无																						

表 4. 脂质 LC/Q-TOF 仪器参数

自动 MS/MS 方法参数	Agilent Revident LC/Q-TOF
仪器模式	1700 稳定离子模式
离子源	安捷伦双喷射流离子源
极性	正
气体温度	320 °C
干燥气 (氮气)	8 L/min
雾化器气体	45 psi
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	1000 V
碎裂电压	175 V
锥孔电压	45 V
八极杆 RF Vpp	750 V
参比质量	m/z 121.050873, m/z 922.009798
MS 范围	m/z 100–1700
MS/MS 范围	m/z 50–1700
MS 采集速率	3 幅谱图/秒
最小 MS/MS 采集速率	3 幅谱图/秒
分离峰宽	窄 (约 1.3 m/z)
碰撞能量	20 eV
每个循环的最大母离子数	3
可变采集速率	是, 目标计数 MS/MS: 25000
使用 MS/MS 累积时间限	是
剔除未达到目标 TIC 的母离子	否
母离子阈值	5000 响应值和 0.001%
主动排除	启用, 在 2 幅质谱图后排除, 在 0.05 min 后释放
纯度	严格性 70%, 截留率 0%
同位素模型	常见有机分子
母离子电荷态选择和偏好	1、2、未知, 按丰度
m/z 纳入范围	m/z 151–1700
迭代 MS/MS 质量误差范围	20 ppm
迭代 MS/MS RT 排除范围	± 0.1 min

结果与讨论

Seahorse XF Pro 分析仪可揭示药物处理通过线粒体解偶联干扰糖酵解 ATP 和线粒体呼吸 ATP 的产生速率

在之前的应用简报中^[1]，使用 Seahorse XF 实时 ATP 生成速率测试对包含 80 种化合物的酪氨酸激酶抑制剂库进行了筛选，以评估抑制剂对癌变 THP-1 和健康外周血单个核细胞 (PBMCs) 中线粒体呼吸 ATP (mitoATP) 和糖酵解 ATP (glycoATP) 产生速率的急性效应。根据这些结果，本应用简报基于活性选择了两种化合物进行进一步研究：AG-879 降低了 THP-1 癌细胞和健康 PBMCs 中的 mitoATP 产生速率，而 SU1498 降低了癌变 THP-1 细胞中的 mitoATP 产生速率，但并未降低健康 PBMCs 中的 mitoATP 产生速率。本文对这些化合物的代谢作用进行了额外的 Seahorse XF 表征。

第一步，使用 Seahorse XF 实时 ATP 生成速率测试测量两种选定药物的急性 (2 小时) 和长时间 (18 小时) 处理对 mitoATP 和 glycoATP 产生速率的影响。药物处理浓度采用先前测定的 mitoATP 半最大抑制浓度 (IC₅₀)^[1]。对于这两种处理时长，AG-879 和 SU1498 都会导致 glycoATP 产生速率增加，以补偿 mitoATP 产生速率的下降 (图 3A 和 B)。经过 18 小时的处理后，与 18 小时 DMSO 溶剂对照相比，总 ATP 产生速率降低了 20%–30%，表明 AG-879 和 SU1498 的急性效应会随着处理时间增加而增强。由于 Seahorse 实验是根据活细胞计数来接种细胞的，因此激酶抑制剂处理后总 ATP 产生速率下降并不是由于细胞活力丧失。值得注意的是，经过 18 小时的处理后，细胞活力仍然很高 (> 92%)，并且溶剂对照组和药物处理组保持一致 (图 3C)。

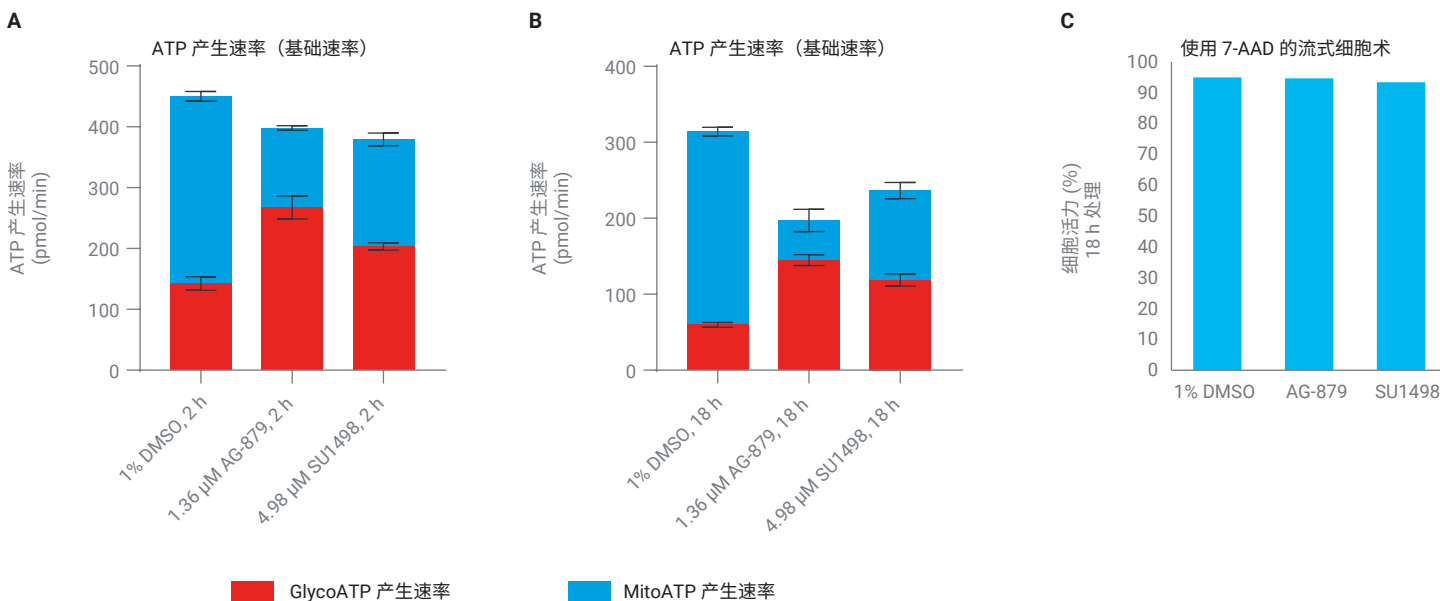


图 3. 安捷伦 Seahorse XF 实时 ATP 生成速率测试表明，药物处理可以改变线粒体和糖酵解 ATP 的产生速率。THP-1 细胞用溶剂对照 (1% DMSO)、1.36 μM AG-879 或 4.98 μM SU1498 预处理 (A) 2 小时和 (B) 18 小时，然后分析 mitoATP 和 glycoATP 的产生速率。(C) 处理 18 小时后，通过流式细胞术和 7-AAD 染色测定细胞活力

为了更深入地研究药物对线粒体呼吸速率的影响，我们分析了质子漏和 SRC，这是 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试试剂盒提供的典型测量指标。质子漏用于量化不同处理组的细胞中线粒体解偶联的程度。术语“线粒体解偶联”是指细胞仍然通过线粒体电子传递链消耗氧，但不能有效地通过这个过程生成 ATP，质子因此泄漏。与溶剂处理过的细胞相比，由于质子漏增加，两种酪氨酸激酶抑制剂均被证明是“线粒体解偶联剂”（图 4A）。为了补偿线粒体解偶联，细胞会增加其 glycoATP 生成速率（图 3A 和 B）。

AG-879 和 SU1498 引起 THP-1 线粒体解偶联的动力学不同。具体而言，AG-879 诱导的质子漏在处理时间从 2 小时变为 18 小时时增加，表明解偶联作用相对较慢（图 4A）。相比之下，SU1498 诱导的质子漏在处理时间从 2 小时变为 18 小时时下降，表明解偶联开始得更快，并且细胞在 18 小时的处理中开始下调耗氧量，以应对之前的解偶联。这种耗氧量的下调可能导致三羧酸 (TCA) 循环中间产物的相对水平发生变化，我们通过 LC/MS 代谢组学分析进行了评估。此外，我们还发现 SU1498 降低了 SRC — 一种通常与细胞适应性相关的特性（图 4B）。AG-879 导致 SRC 完全丧失，表明经 AG-879 处理过的细胞利用生存信号的能力可能较低，而这种生存信号可能通过代谢重编程来驱动耐药性。

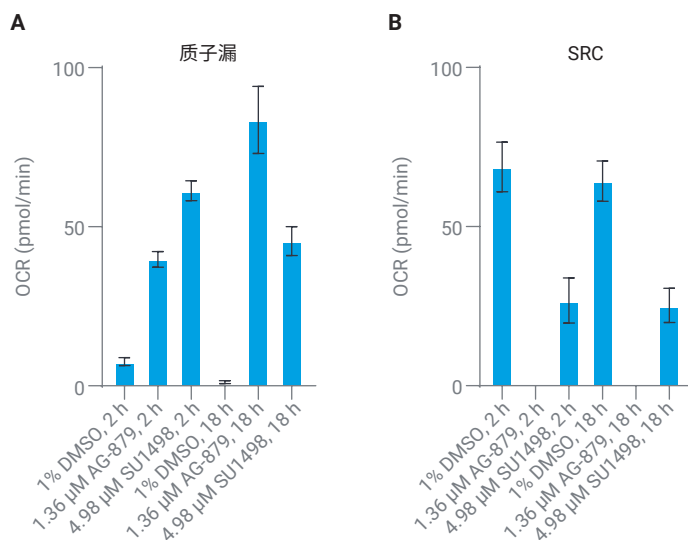


图 4. AG-879 和 SU1498 处理导致线粒体解偶联并降低细胞适应性。THP-1 细胞用溶剂对照 (1% DMSO)、1.36 μM AG-879 或 4.98 μM SU1498 预处理 2 小时和 18 小时，然后分析 (A) 质子漏和 (B) SRC

通过非靶向代谢组学发现了与糖酵解和线粒体呼吸有关的关键代谢物的变化，并且与 Seahorse XF Pro 分析仪结果一致

将复溶的 96 孔代谢物馏分板放入由特殊的生物兼容性合金 MP35N 制成的 1290 Infinity II 生物液相色谱仪流路上分析。这种不含铁的流路在磷酸化化合物的分析中表现出优异的性能^[6]。采用先前建立的、稳定的 HILIC 色谱法分离提取物，该方法非常适合分离细胞代谢物^[5]。采用 Revident LC/Q-TOF 分析液相色谱洗脱液，可提高谱图质量，从而提高质量分辨率、动态范围和同位素保真度。

使用 MassHunter Explorer 处理 HILIC LC/Q-TOF 数据集，该软件提供工作流程引导的用户界面，并将数据提取、归一化、数据分析和非靶向 LC/Q-TOF 数据的特征识别整合到了一个应用程序中。为了实现差异分析并找到受药物处理影响的代谢物，将溶剂对照、AG-879、SU1498 和提取空白数据文件添加

到 MassHunter Explorer 项目中。经过数据提取和归一化后，从项目中删除提取空白和细胞样品中检测到的浓度相似的化合物，剩下 1802 个化合物组。接下来，从项目中删除几个质量与 SU1498 和 AG-879 药物相对应的化合物组，剩下 1797 个化合物组。MassHunter Explorer 图形用户界面 (GUI) 允许用户在导航功能区中前进和后退，并链接不同工作流程的结果。在本例中，首先要鉴定化合物组，然后才能进行统计分析。为鉴定内源性代谢物，使用安捷伦 METLIN 个人化合物数据库与谱库中 471 种化合物的子集进行数据库搜索，该数据库与谱库使用来自真实化学标准品的 HILIC-Z 保留时间进行了优化^[5]。质量和保留时间均被选为必需的数据库 (DB) 匹配标准，最终在 1797 个带标注的化合物组中找到了 101 个 (图 5)。考虑到 DB 搜索采用的质量误差范围为 ± 5 ppm，101 种化合物中有 79 种的实测 Δ ppm 小于 1.0，证明了 Revident LC/Q-TOF 优异的质量准确度。

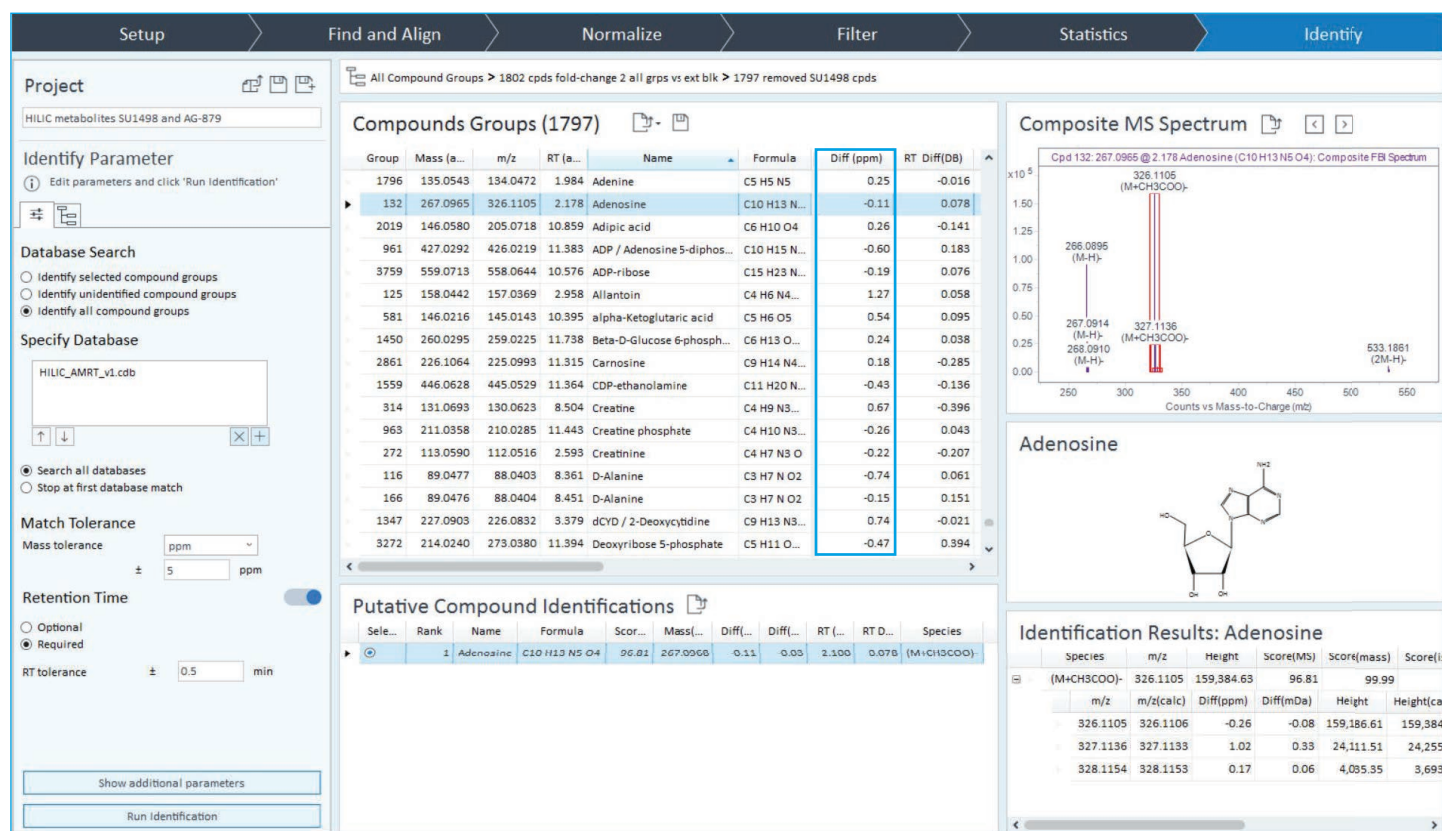


图 5. Agilent MassHunter Explorer 软件 GUI 显示了“鉴定”步骤的结果。采用一个包含 471 种具有 HILIC RTs 的化合物的优化 DB，获得了 101 个带标注的化合物组——图中仅显示一部分。质量公差 ± 5 ppm，RT 公差 ± 0.5 min。实测 Δ ppm 值用蓝色框突出显示

使用火山图作为统计学检验来识别在经药物处理的样品组和溶剂对照组之间表现出显著差异的化合物组。对于 SU1498 处理的样品，131 个化合物组显示出统计显著性，倍数变化 > 1.5

且 $P < 0.05$ (图 6)。使用相同的统计学检验，AG-879 火山图中只有 6 个化合物组表现出显著性 (未显示)。

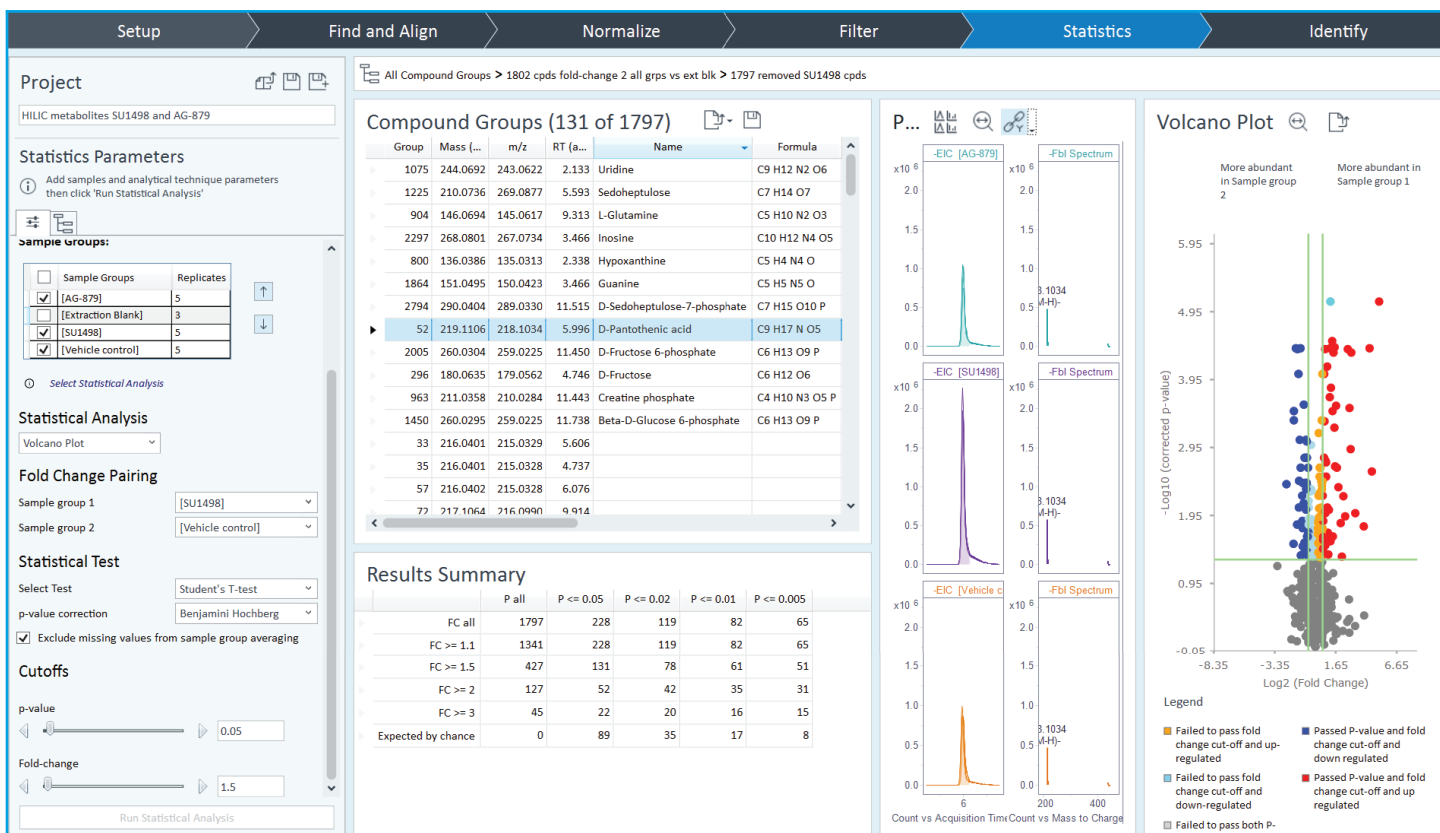


图 6. Agilent MassHunter Explorer 软件 GUI 显示了“统计”步骤的结果。对 SU1498 处理组与溶剂对照组绘制火山图，并显示了应用的参数。选择了 d-泛酸的标注化合物组。链接相应的提取离子色谱图和质谱以便立即进行可视化和验证，并且火山图中的相应数据点会自动以浅蓝色突出显示

MassHunter Explorer 软件 GUI 会显示主成分分析 (PCA) 图, 该图会随着每个应用的归一化步骤、过滤和统计学检验自动更新。基于 131 种显著性化合物组的 PCA 显示, 药物处理组和溶剂对照组之间明显分离 (图 7A)。主成分 1 (X 轴) 对图的变异性贡献最大 (68%), AG-879 组介于 SU1498 和溶剂对照组之间。图 7B 展示了 AG-879 和 SU1498 的结果比较以及标注代谢物的行为。值得注意的是, AG-879 处理组中所有六种显著性化合物组也出现在了 SU1498 处理组中, 并且三种共有的标注代谢物在两种药物处理下都有所降低。总而言之, (1) PCA 对样品组的分离程度, (2) AG-879 中显著性化合物组的数量较少, 以及 (3) 两种处理下代谢物的共同行为都表明, 与 SU1498 处理相比, AG-879 处理对细胞代谢产生了类似但更弱的影响。由于与 SU1498 相比, 线粒体解偶联动力学对 AG-879 的反应似乎较慢, 因此使用 AG-879 进行更长时间的处理后, 与 18 小时的 AG-879 处理相比, 可能会在更多化合物组中检测到显著的增加和减少。或者, AG-879 的作用较弱可能是由于这些细胞丧失 SRC 造成的, 这可能会降低细胞使用替代代谢途径的能力。

根据 Seahorse XF Pro 分析仪的结果, 从某些代谢物的增加或减少可以得出几个结论。对于两种药物处理, 属于糖酵解和平行戊糖 (PP) 磷酸途径的几种磷酸糖都有所减少。Seahorse XF Pro 分析仪的结果表明, 两种药物处理下 glycoATP 生成速率均增加 (图 3), 综合来看, 这表明糖酵解 (以及可能的 PP 途径) 的增加会消耗糖酵解中间产物, 包括磷酸糖。相反, SU1498 处理时泛酸增加, 泛酸是 TCA 循环和脂质生物合成所需的辅酶 A (CoA) 的前体。需要提醒的是, SU1498 处理时的质子漏数据表明, 处理 18 小时后 TCA 循环会下调, 这与该前体化合物的积累密切相关。SU1498 处理后最显著的变化是尿苷、肌苷、次黄嘌呤和鸟嘌呤显著增加, 它们都是参与嘌呤和嘧啶代谢的代谢物。由于核糖-5-磷酸是嘌呤和嘧啶生物合成的前体, 因此糖酵解和 PP 途径能量代谢增加可能会影响这些代谢物。相应地, 嘌呤/嘧啶代谢的另一种前体 L-谷氨酰胺在 SU1498 处理后减少。因此, 在使用 Seahorse XF Pro 分析仪鉴定的主要能量代谢途径之外, 通过 LC/MS 可以检测到其他受干扰的代谢物, 从 LC/MS 分析中获得的见解可能揭示这些细胞的新缺陷, 从而为组合疗法提供新思路。

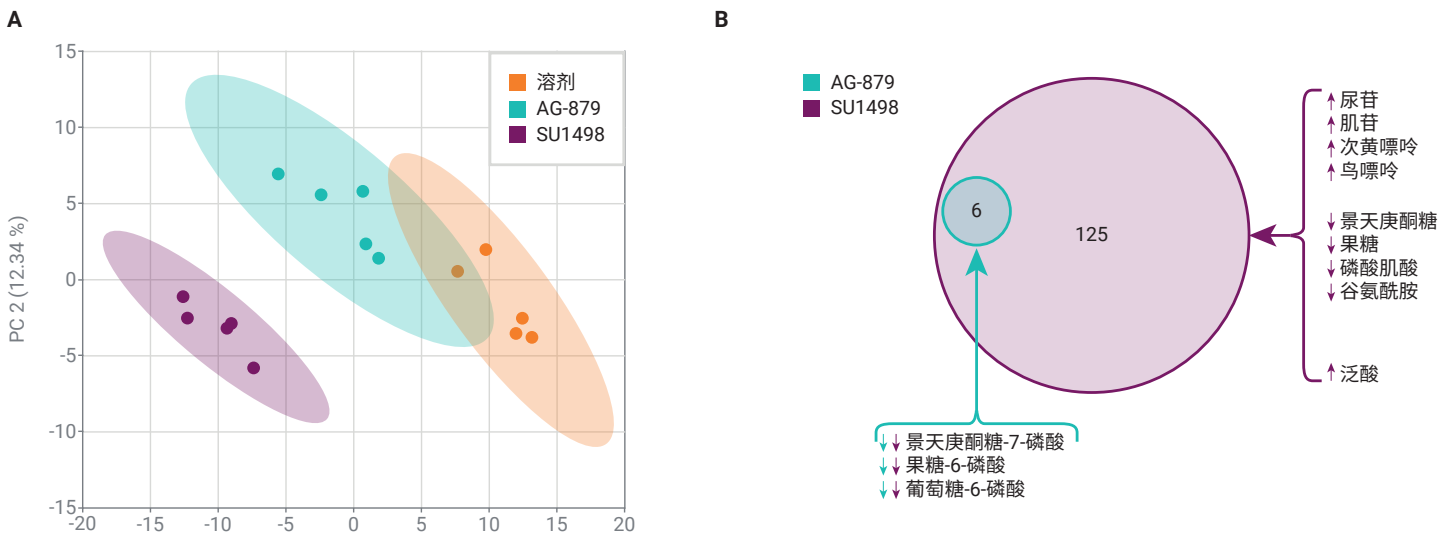


图 7. AG-879 和 SU1498 结果比较。(A) 基于 131 种显著性化合物的 PCA。(B) 文氏图显示了 AG-879 和 SU1498 处理之间共有的显著性化合物组, 并标明了标注代谢物和变化趋势。箭头表示药物处理组的代谢物水平相对于溶剂对照组增加 (↑) 或降低 (↓)

通过非靶向脂质组学揭示了与糖酵解和线粒体呼吸相关的关键脂质的变化，并且与 Seahorse XF Pro 分析仪和 LC/MS 代谢组学结果一致

将复溶的 96 孔脂质板放置在 1290 Infinity II 生物液相色谱中，连接 Revident LC/Q-TOF，其硬件配置与用于代谢物分析的硬件配置相同。使用针对脂质分离进行优化的成熟 RP-LC 方法而非 HILIC-LC 分离提取物^[6]，并在 Revident LC/Q-TOF 上以正离子模式分析洗脱液。

脂质组学数据分析的工作流程与之前所述的代谢物分析工作流程类似。首先，为了实现差异分析并找到受药物处理影响的脂质，将溶剂对照、AG-879、SU1498 和提取空白数据文件添加到 MassHunter Explorer 项目中。经过数据提取和归一化后，从项目中删除提取空白和细胞样品中检测到的浓度相似的化合物，剩下 2662 个化合物组。

化合物组进行标注后再进行统计分析。为了实现脂质标注，首先使用 MassHunter Lipid Annotator 软件建立脂质数据库。该脂质数据库是通过计算机模拟 MS/MS 谱库与 MS/MS 谱

图进行匹配建立的，MS/MS 谱图是从代表性的混合细胞提取物中获得的，这些提取物来自于本研究中使用的 THP-1 细胞及其处理方法以及另一项研究中使用的 K562 细胞及其处理方法。具体来说，分析了一组六个正离子和六个负离子模式迭代 MS/MS 数据文件。结果表明，正离子模式下标注了代表 16 个类别的 562 种脂质 (图 8A)，负离子模式下标注了代表 22 个类别的 500 种脂质 (图 8B)。导出 MassHunter Lipid Annotator 软件中的结果，并在 MassHunter Explorer 软件中按顺序搜索生成的数据库 (.cdb) 文件，以将标注对应到 MassHunter Explorer 项目中的化合物组 (图 8C)。尽管 MassHunter Explorer 项目是根据正离子数据文件创建的，但计算出的化合物组的中性质量可以与数据库中的中性质量进行匹配，而不受极性的影响。通过额外搜索负离子数据库可以得到更多的标注，并且某些标注的特异性程度更高，因为从负离子模式 MS/MS 数据中可以推断出更多的酰基链信息。选择质量和保留时间作为必需的 DB 匹配标准，实现了 2662 个化合物组中 507 个化合物组的标注，覆盖了 23 个脂质类别。

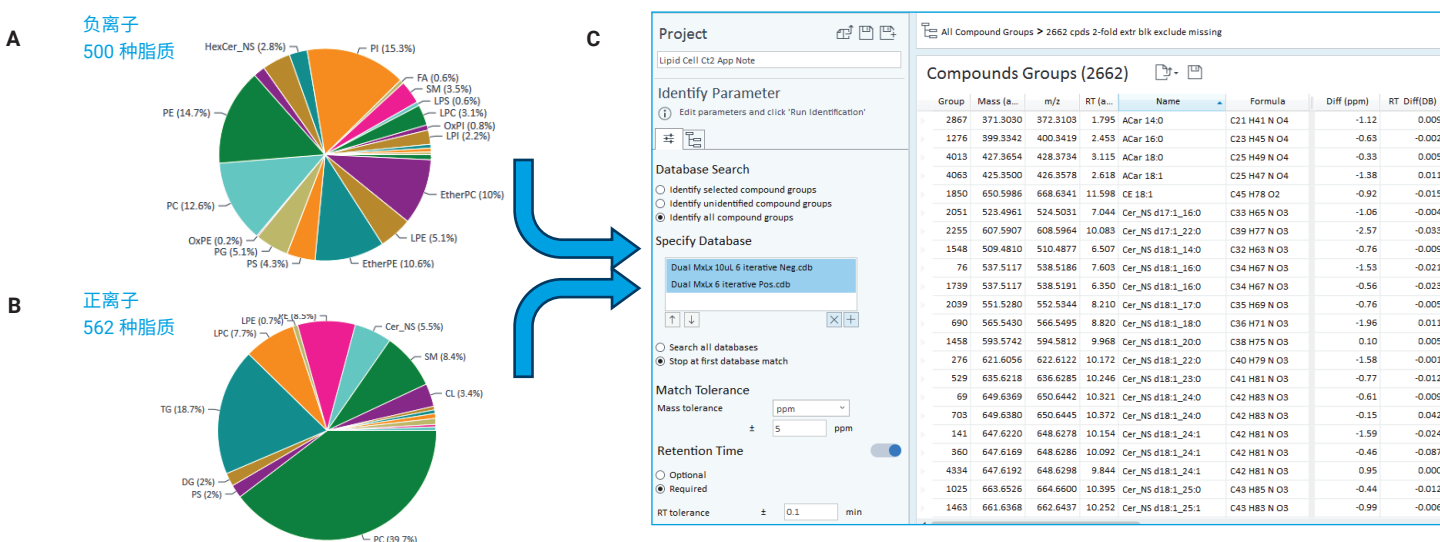


图 8. 脂质标注策略。在 Agilent MassHunter Lipid Annotator 软件中以每批 6 个迭代 MS/MS 数据文件进行分析。图中所示为 (A) 负离子模式和 (B) 正离子模式下主要脂质类别的百分比饼图。(C) 在 Agilent MassHunter Explorer 软件的“鉴定”工作流程步骤中按顺序使用数据库。质量容差 ± 5 ppm，RT 容差 ± 0.1 min

与代谢物分析一样，使用火山图找出显著性脂质化合物。对于 SU1498 处理的样品，521 个化合物组显示出统计显著性，倍数变化 > 1.5 且 $P < 0.05$ (图 9A)。使用相同的统计学检验，AG-879 火山图中只有 23 个化合物组表现出显著性 (图 9B)。基于 521 种显著性化合物的 PCA 图显示，药物处理组和溶剂对照组之间明显分离 (图 9C)，而文氏图表明，在 SU1498 处理中也观察到了 AG-879 处理中的所有 23 种显著性化合物组 (图 9D)。总的来说，这些脂质结果与代谢物结果非常相似，再次表明与 SU1498 处理相比，AG-879 处理对细胞代谢产生了类似但更弱的影响。再次强调，这可能是 AG-879 处理时动力学较慢 (如质子漏数据所示) 或 AG-879 处理的细胞丧失 SRC 所致。对于标注的脂质，最明显的结果是 62 种甘油

三酯 (TG) 脂质增加，与溶剂对照相比，在 SU1498 处理下增加至高达八倍。使用 Seahorse XF Pro 分析仪获得的 SU1498 质子漏数据表明，TG 含量的增加可能与泛酸一样，与 TCA 循环下调后能量代谢前体的积累有关。或者，谷氨酰胺水平下降和 TGs 水平上升也表明，SU1498 处理的细胞可能通过重编程和回补作用来适应处理药物，其中谷氨酰胺用于为 TCA 循环提供能量以产生脂质。这也许也可以解释泛酸的增加，因为在回补过程中产生的乙酰辅酶 A 是泛酸激酶的反馈抑制剂，可将泛酸转化为 4'-磷酸泛酸。在某些情况下，回补作用用于支持糖异生，从而为更高的糖酵解代谢提供能量，以支持 glycoATP 产生和其他生物合成过程。

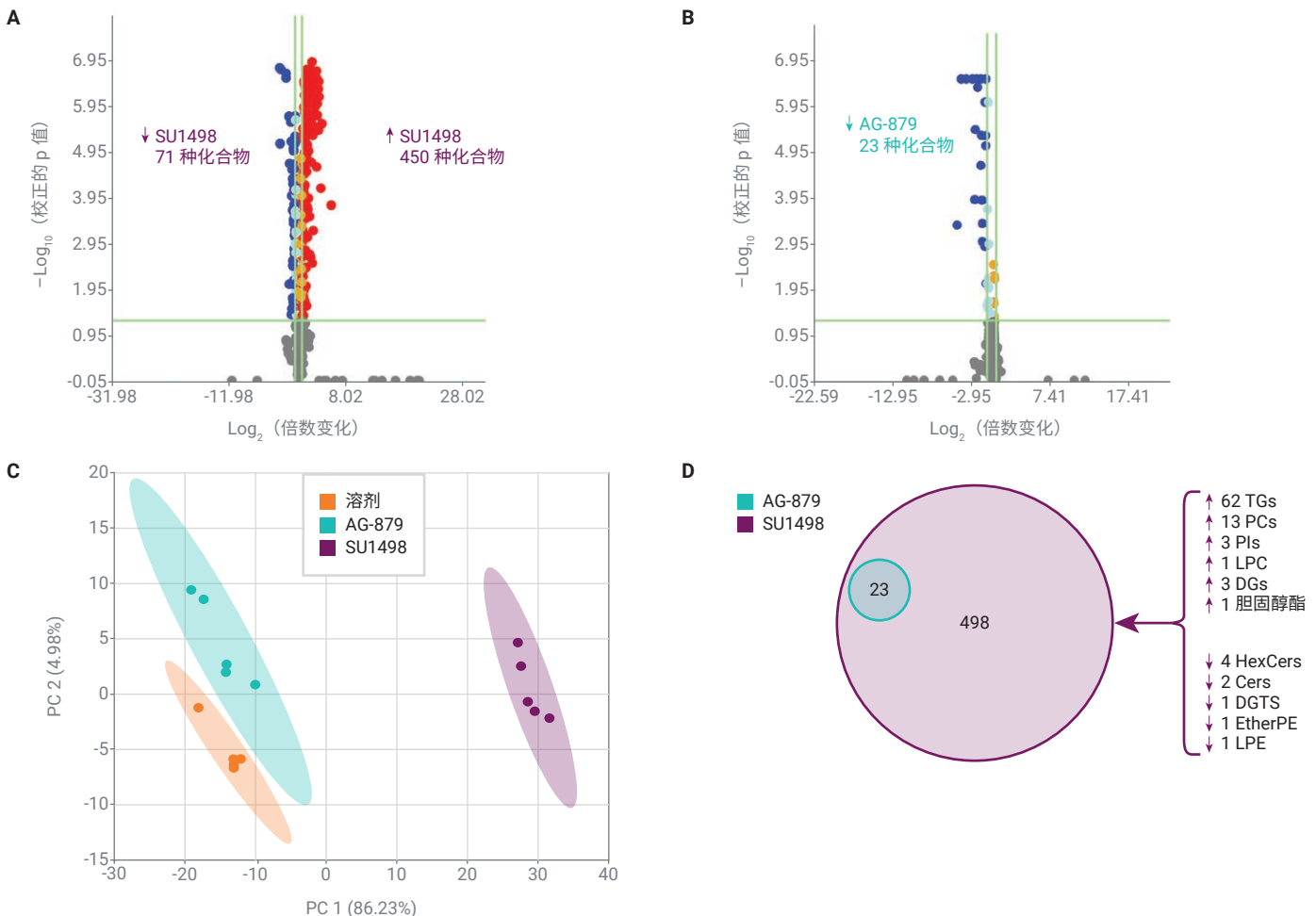


图 9. AG-879 和 SU1498 脂质结果比较。对 (A) SU1498 处理组与溶剂对照组以及 (B) AG-879 处理组与溶剂对照组进行火山图分析 (Student t 检验, $FC > 1.5$, $P < 0.05$, Benjamini-Hochberg 校正) (C) 基于 521 种显著性化合物的 PCA。(D) 文氏图显示了 AG-879 和 SU1498 处理之间共有的显著性化合物组，并标明了 92 种标注脂质和变化趋势。箭头表示 S1498 处理后脂质水平增加 (↑) 或降低 (↓)

MassHunter Explorer 软件中的结果可以导出到 MPP，以实现高级统计分析和可视化。因此，为了更深入地了解脂质结果，将 MassHunter Explorer 项目以 .pfa 文件导出到 MPP 中。创建脂质矩阵图以实现各脂质类别中丰度差异的可视化。基于 TG 的脂质矩阵图清晰地显示，与溶剂对照相比，SU1498 中的 TG 脂质丰度几乎普遍增加（图 10A），这与之前提到的 MassHunter Explorer 火山图推断的结果类似。然而，矩阵图

还揭示了 TG 脂质特征的细微差异，表明在 SU1498 处理后，双键含量较高的 TGs 通常会增加更多。磷脂酰肌醇 (PIs) 的脂质矩阵图表明，除两种特定脂质 (PI 18:1_18:2 和 PI 38:6) 外，PI 特征基本不变（图 10B）。这些脂质的 MS/MS 谱图为它们与多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 之间的酯化反应提供了证据，这些多不饱和脂肪酸包括亚油酸 (18:2) 和花生四烯酸 (20:4)，它们均参与类二十烷酸的生物合成（未显示）。众所周知，PI 是

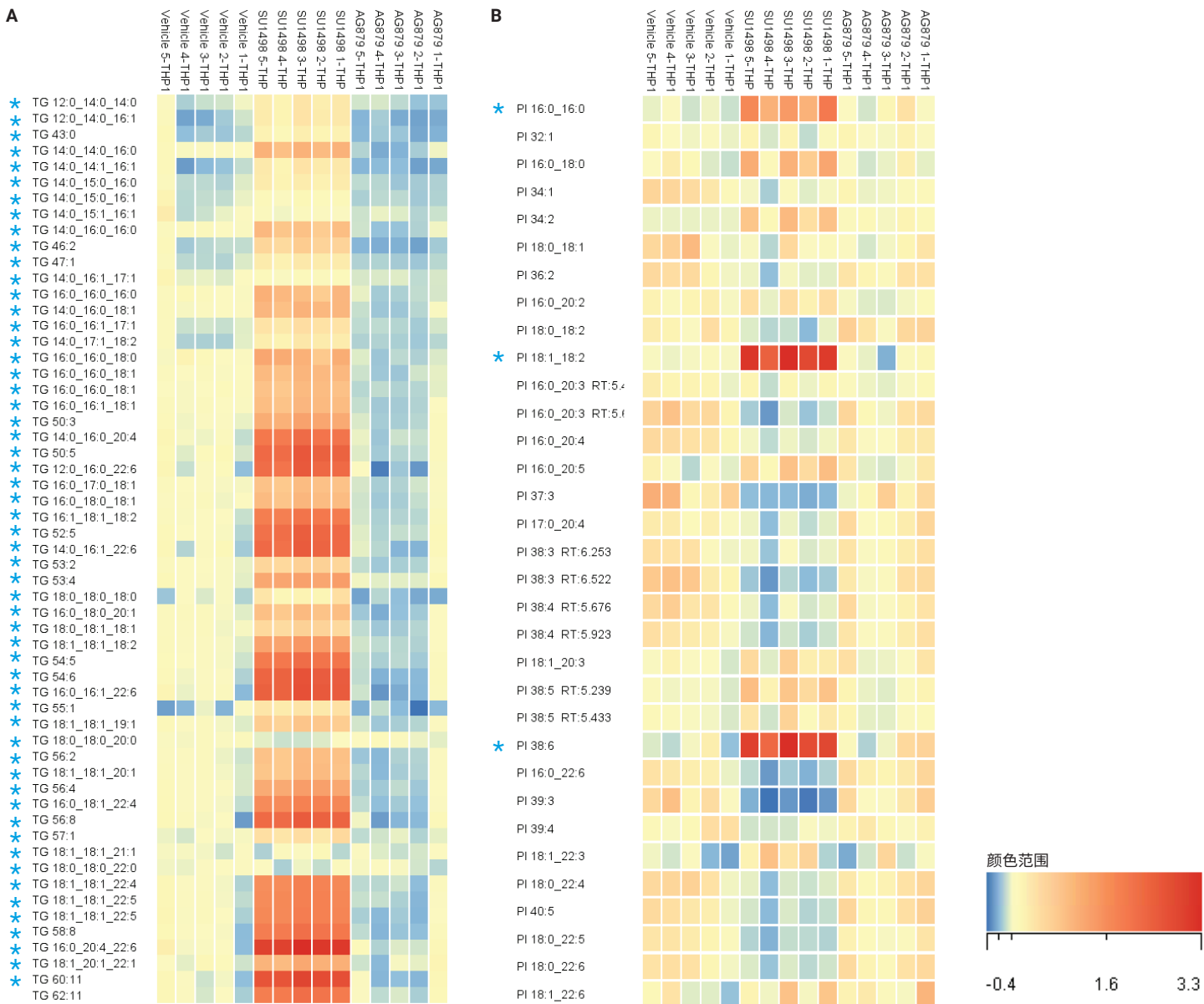


图 10. 安捷伦 MPP 软件的脂质矩阵图，图中为 SU1498 处理、AG-879 处理和溶剂对照重复样中的 (A) 57 种 TG 脂质和 (B) 33 种 PI 脂质。经 SU1498 处理后，通过 Agilent MassHunter Explorer 软件火山图分析发现的含量增加的显著性化合物以蓝色星号 (*) 表示

这些信号脂肪酸的储存库，并且这些特定的 PI 脂质在癌细胞中会减少，特别是发生 p53 突变的细胞，例如本研究中使用的 THP-1 细胞系。结果表明，SU1498 处理会增加 THP-1 细胞中这些 PI 脂质的水平，这可能会影响这些细胞的下游信号转导生物过程。

结论

本应用简报介绍了一种结合 Agilent Seahorse XF Pro 分析仪和 Q-TOF LC/MS 的端到端工作流程，可更深入地了解癌细胞对药物处理的细胞和分子代谢反应。具体而言，基于 AG-879 和 SU1498 处理的 XF 实验证实了之前的结果^[1]，另外还证明了这两种药物都会导致线粒体解偶联。通过非靶向代谢组学发现了糖酵解和线粒体呼吸中受影响的关键代谢物的变化，并且与 XF 结果一致，此外还发现了参与嘌呤/嘧啶代谢的其他受影响代谢物。非靶向脂质组学分析表明，经 SU1498 处理后，TG 含量增加，且含 PUFA 的 PI 脂质也增加，后者表明，SU1498 处理可能导致信号转导生物过程发生改变。值得注意的是，综合包括线粒体解偶联 (XF)、谷氨酰胺减少和泛酸增加（代谢组学）以及 TGs 大幅增加（脂质组学）等结果，可以考虑一个新假说，即 SU1498 处理的细胞重编程了其信号转导通路以通过回补来生成脂质。只有通过结合多种细胞分析技术才有可能形成这一假说。AG-879 处理后检测到的代谢物和脂质变化较为有限，这可能是由于多种因素造成的，包括 AG-879 导致的 SRC 丧失、两种抑制剂之间的动力学不同以及所选的药物浓度。未来的研究方向可能包括 (1) 进一步挖掘未识别的显著特征，(2) 使用 Agilent MassHunter VistaFlux 软件进行定性能量代谢分析^[8]，(3) 使用 Agilent Seahorse XF 底物氧化压力测试试剂盒评估药物处理对能量代谢的影响，以及 (4) 对健康 PBMC 细胞进行类似研究，将对代谢途径的影响与 THP-1 癌细胞进行比较。

参考文献

1. Vander Heiden, M. G.; *et al.* Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **2009**, 324(5930), 1029-1033
2. Kam, Y. 等. 抗癌候选药物的快速生物能量代谢功能筛选, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-5651ZHCN, **2023**
3. Van de Bittner, G. C.; *et al.* An Automated Dual Metabolite + Lipid Sample Preparation Workflow for Mammalian Cell Samples (用于哺乳动物细胞样品的自动化代谢物 + 脂质双重细胞样品前处理工作流程), *安捷伦科技公司技术概述*, 出版号 5994-5065EN, **2022**
4. Wang, G.; *et al.* Using the Agilent NovoCyte Flow Cytometer for Immune Suspension Normalization in Agilent Seahorse XF Assays (在安捷伦 Seahorse XF 实验中使用 Agilent NovoCyte 流式细胞仪进行免疫细胞悬液归一化), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-6245EN, **2023**
5. Yannell, K.; *et al.* An End-to-End Targeted Metabolomics Workflow (端到端靶向代谢组学工作流程), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-5628EN, **2023**
6. Huynh, K. 等. 用于血浆脂质组详细分析的综合、优化、高通量方法, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-3747ZHCN, **2021**
7. Feith, A.; *et al.* Improved Metabolomic Analysis Using an Iron-Free Flow Path (使用不含铁的流路改善代谢组学分析), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-4622EN, **2022**
8. Wattanavanitchakorn, S. 等. HepG2 细胞的 ¹³C 葡萄糖定性能量代谢分析, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-0713ZHCN, **2019**

www.agilent.com

RA45477.0354166667

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2024
2024 年 7 月 30 日, 中国出版
5994-7449ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

