

# HepG2 细胞的 $^{13}\text{C}$ 葡萄糖定性代谢流分析

使用 Agilent 6546 LC/Q-TOF 和 VistaFlux

## 作者

Siriluck Wattanavanitchakorn  
和 Sarawut Jitrapakdee  
理学院生物化学系，  
玛希隆大学，泰国曼谷

Israr Ansari,  
Melissa J. Longacre 和  
Michael J. MacDonald  
儿童糖尿病研究中心，  
威斯康星大学医学与公共健康  
学院，  
美国威斯康星州麦迪逊市

Mahmoud El Azzouny 和  
James Pyke  
安捷伦科技有限公司，  
美国加利福尼亚州圣克拉拉市

## 摘要

Agilent 6546 LC/Q-TOF 旨在同时提供卓越的同位素比保真度、宽动态范围以及不受采集速度影响的高质量分辨率。代谢流分析需要将同位素比保真度、高分辨率和动态范围相结合，以获得良好的结果。与 Agilent MassHunter VistaFlux 软件配合使用时，可提供从数据采集到数据分析的完整工作流程，帮助科学家更简单的执行定性代谢流分析。VistaFlux 软件包含用于特征提取、同位素掺入和同位素异数体丰度分析、天然丰度校正、统计分析以及代谢通路可视化的工具。

本应用简报展示了使用  $\text{U-}^{13}\text{C}$  葡萄糖作为示踪物对人癌细胞系的定性代谢流分析。在 6546 LC/Q-TOF 系统上采集数据，并利用 MassHunter VistaFlux 进行分析。该研究证明了丙酮酸羧化酶敲低对 HepG2 细胞的三羧酸循环中葡萄糖代谢流的影响。

## 前言

稳定同位素标记可提供有关细胞内代谢的独特信息。尽管代谢组学分析提供了不同代谢物丰度的良好概况，但是许多代谢变化并不导致代谢物浓度的增加或降低。稳定同位素示踪能够提供常规代谢组学分析无法揭示的深入信息。在稳定同位素示踪分析中，将同位素异数体彼此归一化以计算富集百分比。这种自归一化方法使稳定同位素示踪研究成为一种强大的工具，用以考察可能具有不同细胞数量的挑战性生物系统中的代谢变化。

准确鉴定改变正常的代谢物同位素分布的细微而重要的同位素变化，存在许多挑战。质谱仪 (MS) 应保持准确的同位素丰度和质量数测量，以实现对复杂样品中代谢物的准确鉴定和定量。此外，MS 应同时提供宽动态范围和高分辨率。宽动态范围可应对不同的代谢物浓度和同位素掺入率，而高分辨率可减少共洗脱化合物的干扰。最后，数据分析软件应能准确分配同位素异数体，并执行天然同位素校正，以提供准确的净标记掺入。

6546 LC/Q-TOF 和 VistaFlux 软件提供了完整的定性代谢流分析工作流程。6546 LC/Q-TOF 可同时提供定性代谢流分析所需的同位素比保真度、宽动态范围和高质量分辨率。VistaFlux 软件可提供全面的数据分析和代谢流数据可视化。将这套完整的工作流程应用于经 U-<sup>13</sup>C 葡萄糖处理的丙酮酸羧化酶敲低的 HepG2 细胞。

丙酮酸羧化酶 (PC) 是一种线粒体回补酶，其产生用于生物合成目的柠檬酸循环中间物。该酶对于肝脏和肾脏中的糖异生、脂肪组织中的脂肪新生以及胰腺 β 细胞中葡萄糖诱导的胰岛素分泌至关重要。最近的研究表明，PC 在多种癌症中起着关键作用，其支持这些癌症的多种合成代谢通路。我们之前的研究已经表明，抑制 PC 能够降低高侵袭性乳腺癌细胞的增殖速率，并减少葡萄糖和谷氨酰胺回补<sup>[1]</sup>。本应用简报表明，抑制 PC 对人肝癌细胞 (HepG2) 具有类似的作用。

## 实验部分

### 细胞培养基和试剂

按照之前所述的方法，使用 siRNA 制备丙酮酸羧化酶敲低的 HepG2 细胞<sup>[1]</sup>。产生具有不同抑制水平的五种不同敲低细胞系 (PC179、PC2096、PC3436 和 PC847)。将大约  $3 \times 10^6$  个细胞接种到 60 mm 培养板中。在添加了 10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)、100 单位/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM) 中对细胞进行培养，于 37 °C 下在包含 5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养两天。将该培养基替换为包含 3 mmol/L 葡萄糖的完全 DMEM，并将细胞再培养一天。在实验当天，将细胞与 0 mmol/L 葡萄糖 DMEM 一起温育 30 分钟，然后将该培养基替换为 2 mL 包含 10 mmol/L <sup>13</sup>C 标记葡萄糖的 DMEM，并将细胞置于 37 °C 下温育 30 分钟。对每个细胞系平行分析三次。

### 代谢物提取

用 150 mmol/L 乙酸铵快速清洗后，用 8:1:1 (v/v/v) 甲醇:氯仿:水提取细胞，然后进行超声处理和离心。然后将澄清上清液转移到 HPLC 样品瓶中并进样分析。

### LC/MS 分析

使用与 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统联用的 6546 LC/Q-TOF 采集数据。在配备 UHPLC 保护柱 HILIC-Z, 2.1 mm × 5 mm, 2.7 μm (部件号 821725-947) 的 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 675775-924) 色谱柱上进行色谱分离。首先用水配制 10 倍流动相缓冲储备液 (100 mmol/L 乙酸铵, pH 9.0)，然后加入水 (A) 或乙腈 (ACN, B) 制得最终流动相。为确保浓度在梯度洗脱过程中保持不变，在水溶液和有机流动相中添加 InfinityLab 去活剂添加剂 (部件号 5191-4506)。对合并样品和空白进样进行分析，确保获得良好的色谱稳定性<sup>[2]</sup>。

### 软件包

- MassHunter 采集软件 10.0 版
- Agilent Profinder V10.0
- Omix Premium V1.9.30
- PCDL Manager B.08
- Agilent MassHunter Pathways to PCDL 软件 B.08

表 1. 液相色谱和质谱参数

| 参数            | 值  |
|---------------|--|
| <b>液相色谱条件</b> |  |
| 色谱柱           | InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 675775-924), 配备 UHPLC 保护柱 HILIC-Z, 2.1 mm × 5 mm, 2.7 μm (部件号 821725-947)         |
| 流动相           | A) 10 mmol/L 乙酸铵水溶液, pH 9, 含 5 μmol/L 去活剂添加剂 (部件号 5191-4506)<br>B) 10 mmol/L 乙酸铵的水/ACN 10:90 (v.v) 溶液, pH 9, 含 5 μmol/L 去活剂添加剂 (部件号 5191-4506) |
| 流速            | 0.25 mL/min  |
| 梯度            | 0–2 分钟, B 为 90%<br>2–12 分钟, B 由 90% 降至 60%<br>12–15 分钟, B 为 60%<br>15–16 分钟, B 由 60% 升至 90%<br>16–24 分钟, B 为 90%                               |
| 柱温            | 25 °C  |
| 进样量           | 1 μL   |
| 自动进样器温度       | 6 °C   |

| <b>质谱条件</b> |                          |
|-------------|--------------------------|
| 质谱系统        | 6546 Q-TOF LC/MS         |
| 离子源         | 安捷伦喷射流                   |
| 极性          | 负                        |
| 气体温度        | 200 °C                   |
| 干燥气流速       | 10 L/min                 |
| 雾化器压力       | 40 psi                   |
| 鞘气温度        | 300 °C                   |
| 鞘气流速        | 12 L/min                 |
| 毛细管电压       | 3000 V                   |
| 喷嘴电压        | 0 V                      |
| 碎裂电压        | 125 V                    |
| 锥孔电压        | 65 V                     |
| 八极杆 1 RF 电压 | 750 V                    |
| 采集范围        | m/z 50–1000              |
| 参比质量        | m/z 980.01638 和 119.0363 |

## 数据分析

使用 Agilent MassHunter Pathways to PCDL 软件创建了提取自 BioCyc 的三羧酸 (TCA) 循环的安捷伦个人化合物数据库与谱库文件 (.cdb)。此外, 将丙酮酸、天冬氨酸和谷氨酸加入自定义 PCDL 中。将代谢物保留时间加入自定义 PCDL 中, 然后利用该 PCDL 作为数据库, 在 Profinder 中进行批量同位素异数体提取。导出 Profinder 所产生的结果, 在 Omix Premium 软件中实现可视化。图 1 为数据分析工作流程的概述。

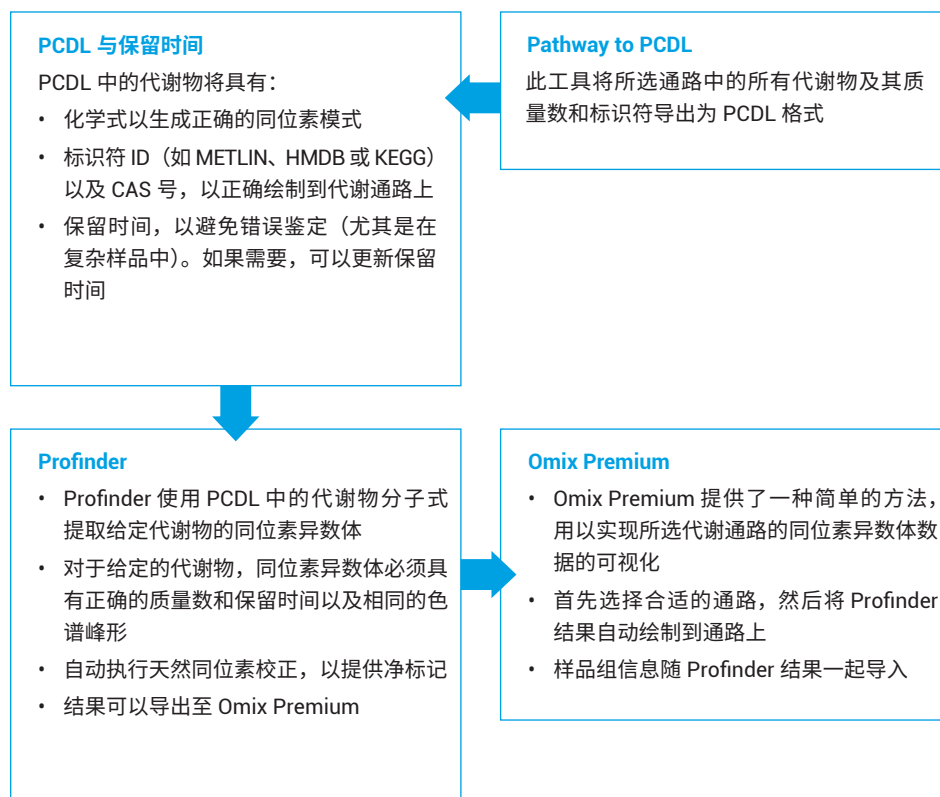


图 1. VistaFlux 数据分析工作流程概述

## 结果与讨论

在 6546 LC/Q-TOF MS 上对代谢流样品进行分析。图 2 显示了分辨率高于 40000 的苹果酸同位素异数体的代表性质谱图，同时表明在七次技术重复测定中，所有同位素异数体的 CV 小于 5% (图 3)。6546 Q-TOF 的高分辨率可减少潜在干扰，提高数据分析的可信度。优异的同位素比重现性使得能够在定性代谢流实验中检测低掺入率。

Profinder 中的批量同位素异数体提取是分析同位素异数体数据的最简单、最有效的方法。它包含基于保留时间、精确质量数和色谱峰形来鉴定同位素异数体的算法，可减少假阳性结果。手动检查每种代谢物的所有同位素异数体的数据 (图 4)。单独或合并显示各组经校正的丰度或富集百分比，对重现性进行评估 (图 4)。U-<sup>13</sup>C 葡萄糖在 HepG2 对照细胞中表现出大量的谷氨酸标记，其中 m+2 标记是主要的同位素异数体，而对于丙酮酸羧化酶敲低的细胞，标记率则低很多 (图 4)。为显示代谢通路中的所有代谢物，结果以 Profinder 存档文件 (.PFA) 形式导出至 Omix Premium。Profinder 存档文件包含经天然存在的同位素校正的结果以及样品组信息和化合物标识符。

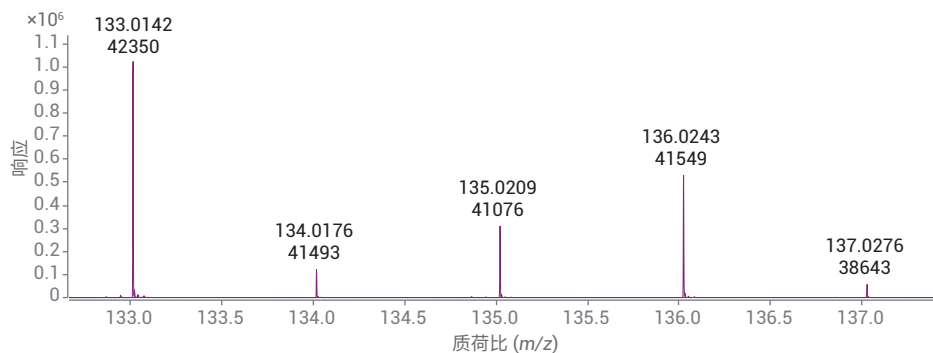


图 2. 苹果酸同位素异数体的质谱图，在每个离子峰上标出了 m/z 和分辨率

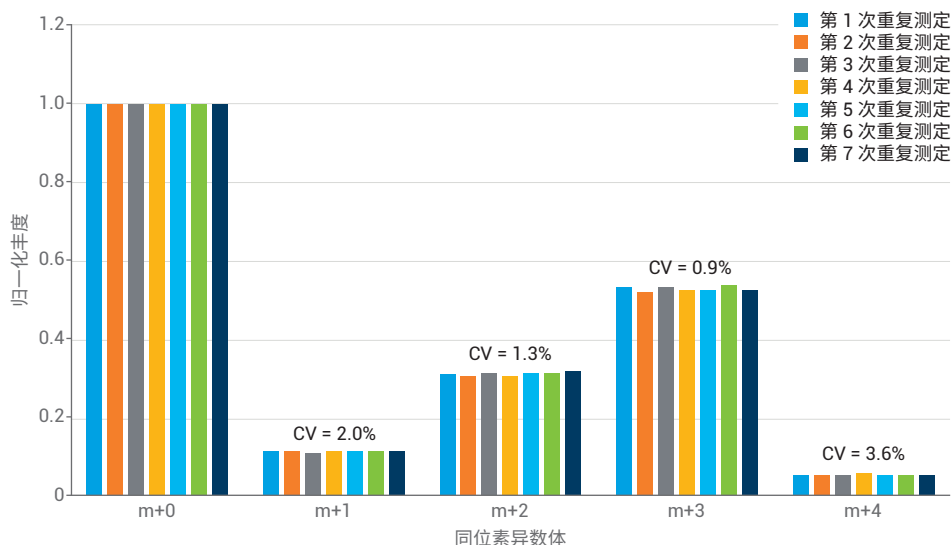


图 3. 七次技术重复测定所得到的所有苹果酸同位素异数体的变异系数 (CV%)

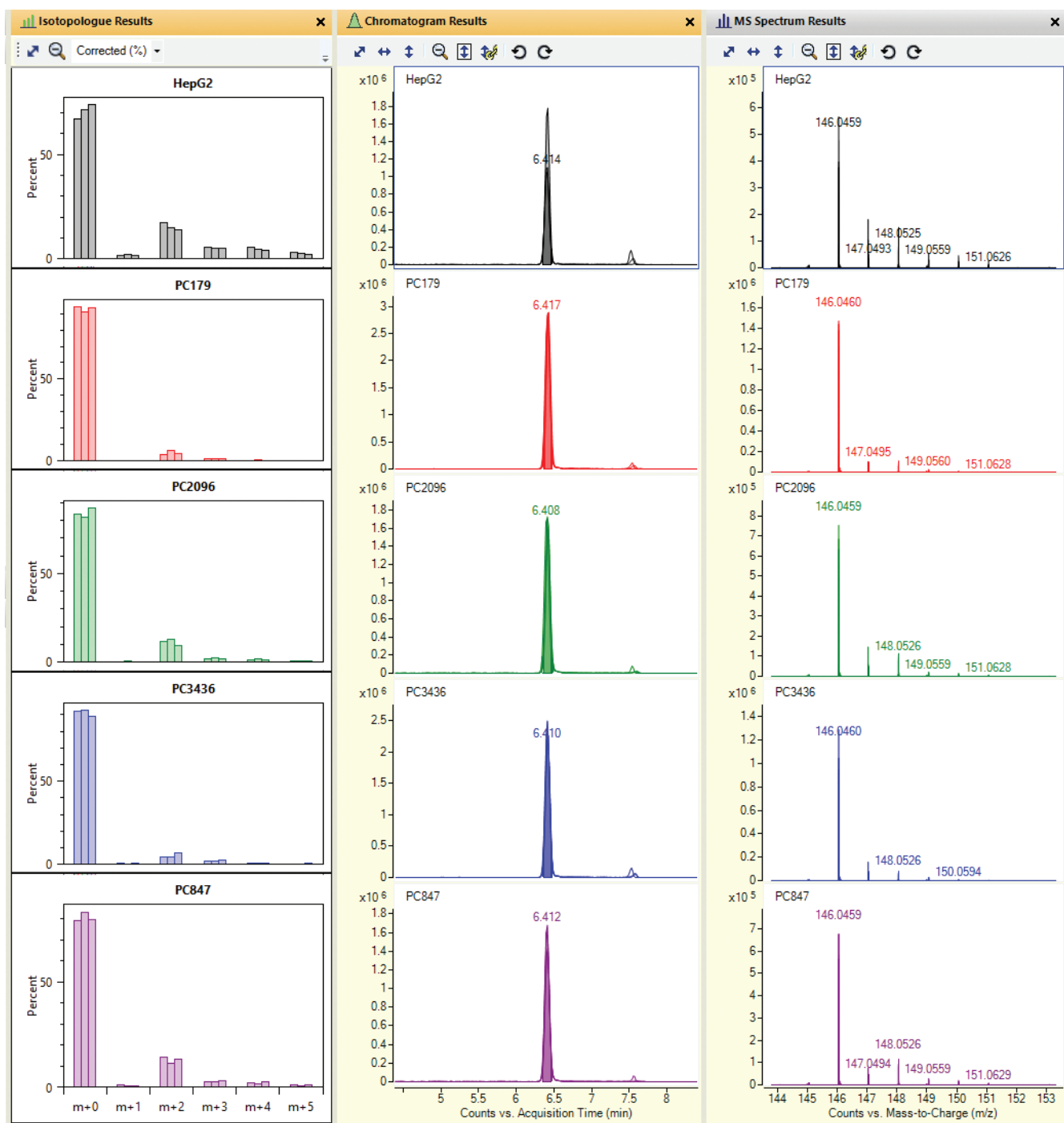


图 4. Profinder 视图，显示了同位素异数体、色谱图和质谱图结果

Omic Premium 提供了专为定性代谢流数据的可视化和解析而设计的图形选项。可使用绝对量或同位素富集比，通过多种方式查看结果。柠檬酸盐结果显示，HepG2 对照细胞的富集率约 50%，而 PC 敲低的细胞仅约 25%，表明丙酮酸羧化酶敲低减少了进入三羧酸循环的葡萄糖通量（图 5A）。敲低细胞中柠檬酸盐的总丰度略低，但标记的柠檬酸盐的丰度显著降低（图 5B）。这表明，敲低细胞的三羧酸循环周转数减少，或者细胞依赖其他回补来源（如谷氨酸）来代替葡萄糖通量的减少并补充三羧酸循环。

为了解详细的标记模式，使用了其他可视化工具，例如热点图，或使用单独的同位素异数体富集图（图 6）。这些图清楚地表明，在与  $U-^{13}C$  葡萄糖一起温育的这一短时间段内，丰度最高的标记是含碳数  $m+2$  和  $m+3$ 。更长的温育时间导致三羧酸循环的周转数增加，因此将标记更多数量的碳。与其他细胞相比，大多数同位素异数体（例如  $m+2$ 、 $m+3$ 、 $m+4$  和  $m+5$ ）在 HepG2 细胞中的富集程度更高，表明敲低细胞与对照细胞相比，三羧酸循环的周转数更少。

为评估谷氨酸是否补充 PC 敲低细胞中的三羧酸循环，我们考察了谷氨酸及其同位素异数体的丰度。未标记的谷氨酸 ( $m+0$ )（图 7）在敲低细胞中的积累量更高，表明其消耗较少。相反，它在对照 HepG2 细胞更活跃三羧酸循环中大量消耗，表明谷氨酸充当了 HepG2 细胞中的回补底物，并且在敲低细胞中的作用小得多。因此，丙酮酸羧化酶敲低不仅改变了三羧酸

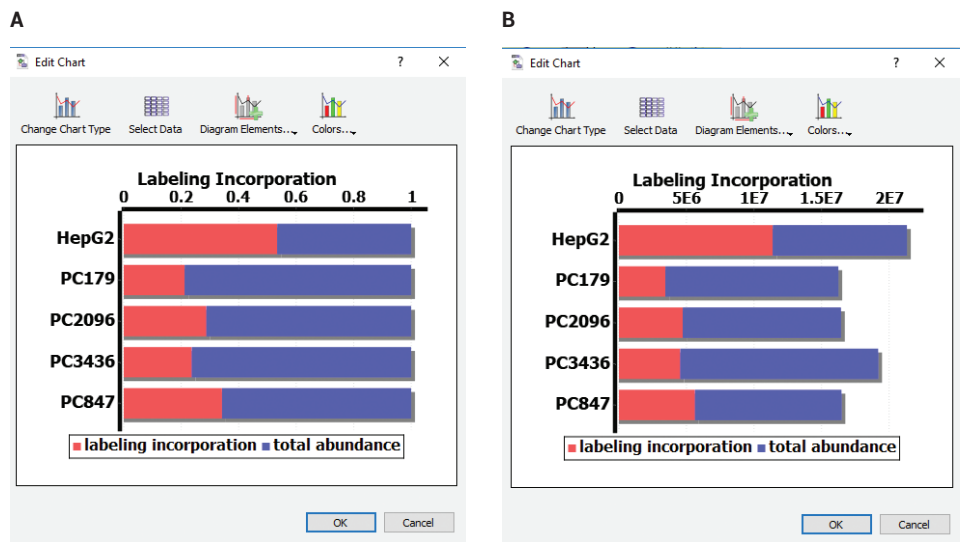


图 5. Omic Premium 软件使用百分比标记 (A) 或丰度 (B) 显示柠檬酸盐结果

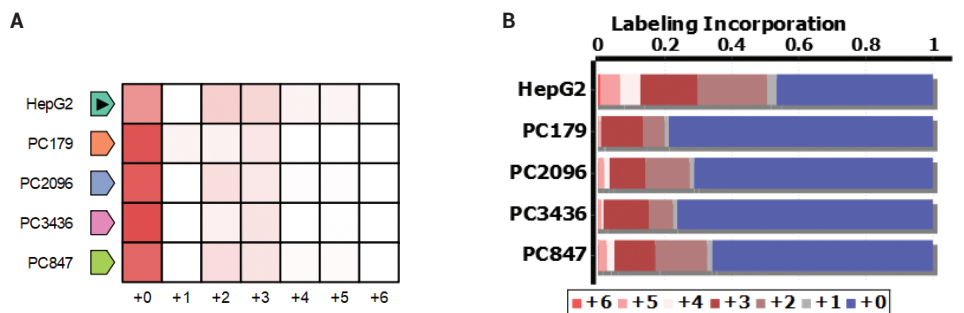


图 6. Omic Premium 软件以热点图 (A) 或单独的同位素异数体富集图 (B) 显示柠檬酸盐结果

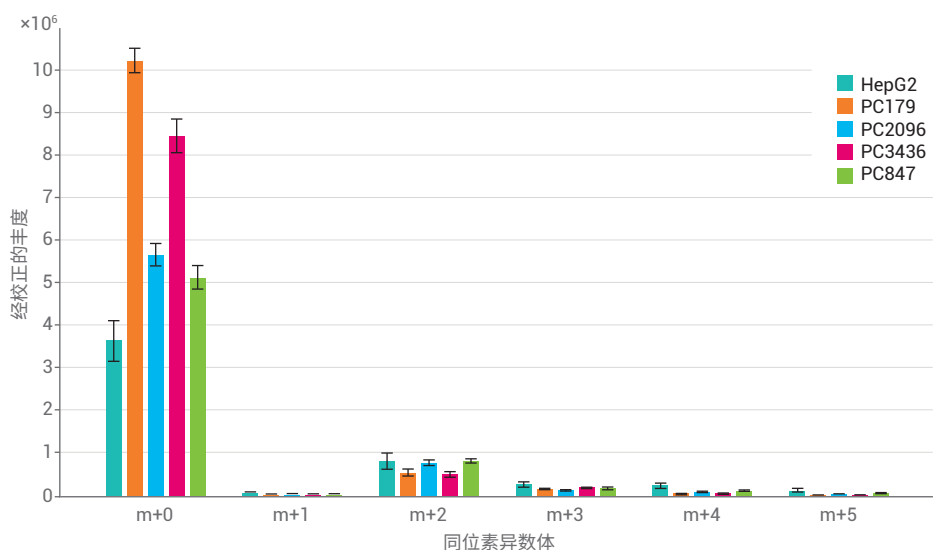


图 7. Omic Premium 软件显示了谷氨酸同位素异数体丰度

循环中的葡萄糖通量，而且减少了进入三羧酸循环的谷氨酰胺回补。这些数据与 PC 敲低对乳腺癌细胞中葡萄糖和谷氨酰胺回

补的影响一致<sup>[1]</sup>。图 8 显示了绘制到三羧酸循环上的代谢物概况及其对应的富集情况。

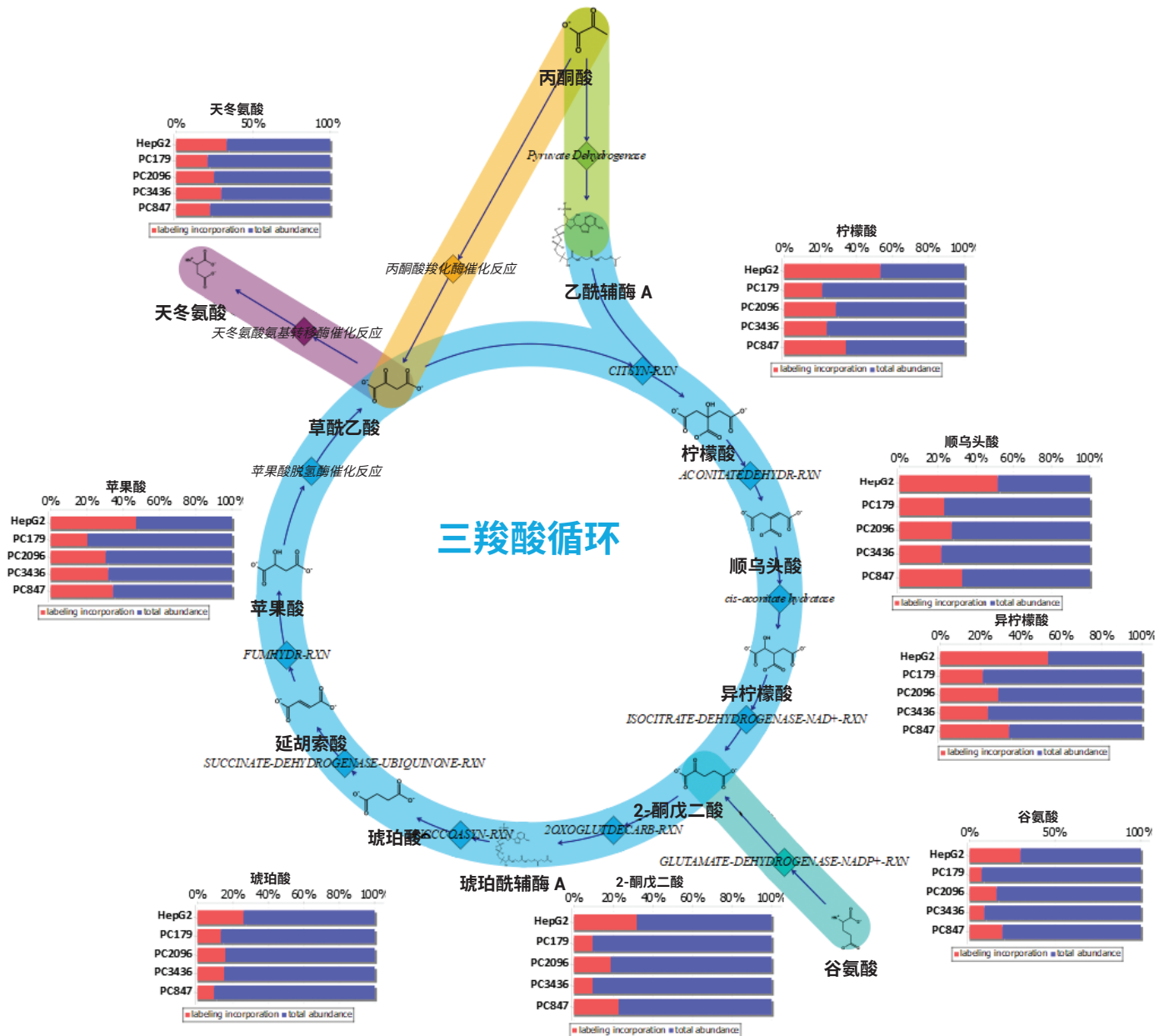


图 8. Omix Premium 软件显示了三羧酸循环及相关代谢物标记

## 结论

6546 LC/Q-TOF 为稳定标记同位素示踪分析提供了优异的同位素比保真度、高分辨率和动态范围。与 VistaFlux 软件相结合，这一平台为定性代谢流分析提供了一套完整的工作流程解决方案。使用该工作流程，丙酮酸羧化酶敲低的 HepG2 细胞表现出较少的葡萄糖氧化。葡萄糖氧化的减少随之降低了谷氨酸回补。

VistaFlux 工作流程为提取同位素异数体信息、校正天然同位素丰度和可视化结果提供了一种快速、强大的解决方案。

## 参考文献

1. Phannasil. P.; *et al.* Mass spectrometry analysis shows the biosynthetic pathways supported by pyruvate carboxylase in highly invasive breast cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **2017**, 1863(2), 537–551
2. Hsiao, J. J. 等，使用 HILIC LC/MS 对哺乳动物细胞培养基进行监测，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5994-0024ZHCN，**2018**

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。