

## 基于液相色谱-质谱联用技术的代谢组学方法 在细胞种属分类中的应用

栗 晖<sup>1,2</sup>, 于治国<sup>2\*</sup>, 祖旭宇<sup>1</sup>, 刘 峰<sup>1</sup>, 金一宝<sup>1,2</sup>, 蒋宇扬<sup>1,3</sup>, 刘红霞<sup>1\*</sup>

(1. 清华大学深圳研究生院 广东省化学生物学重点实验室, 广东 深圳 518055;

2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 3. 清华大学医学院, 北京 100084)

**摘要** 细胞内的代谢产物可以反映细胞的生理状态。为了考察基于胞内代谢物的指纹图谱对不同种属细胞进行区分的可行性, 利用基于超高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱(UPLC-TOF MS)技术的代谢组学方法对5种不同来源的细胞进行分类, 获得了小分子代谢产物的差异表达谱, 并采用主成分分析(PCA)数据处理方法对各类细胞进行模式识别。研究表明, 不同的细胞种属之间均能呈现显著性差异。该研究可从分子水平对细胞种属进行分类, 为细胞种属的鉴定与评价提供了一种新的技术方法, 为细胞组学的深入研究提供了一种潜在的、非常具有应用前景的技术手段。

**关键词** 超高效液相色谱-飞行时间质谱; 代谢组学; 细胞分类; 主成分分析

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2009)04-0387-04 栏目类别: 研究快报

## Classification of the cell lines in the extraction of intracellular metabolites based on ultra performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry

LI Hui<sup>1,2</sup>, YU Zhiguo<sup>2\*</sup>, ZU Xuyu<sup>1</sup>, LIU Feng<sup>1</sup>, JIN Yibao<sup>1,2</sup>,  
JIANG Yuyang<sup>1,3</sup>, LIU Hongxia<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Chemical Biology of Guangdong Province, Graduate School of Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China;

2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

3. School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract**: Intracellular metabolites can reflect the physiological state of cells. Ultra performance liquid chromatography/time of flight mass spectrometry (UPLC-TOF MS) is a relatively new technique for the separation of complex samples. The aim of this work is to assess the feasibility of metabonomics in cell line sorting. In the work, a total of 5 cell line samples were analyzed by using UPLC-TOF MS and small molecules metabolite profiles from the extraction of intracellular metabolites were obtained. Principal component analysis (PCA) models were used to extract meaningful information from the complex biological samples. The cell line discrimination was highly improved by PCA. These preliminary results suggested that UPLC/MS coupled with pattern recognition show promise for metabonomics. It is a potential and very promising technology for the classification of the cell lines.

**Key words**: ultra performance liquid chromatography/time of flight mass spectrometry (UPLC-TOF MS); metabonomics; cell line sorting; principal component analysis (PCA)

细胞分类学中应用最广泛的是组织化学、电镜技术、流式细胞术等技术手段。流式细胞术根据细

胞的大小和细胞颗粒的复杂程度对细胞进行分类鉴别, 组织化学是根据细胞大小、所含颗粒情况及以细

\* 通讯联系人: 于治国, 博士, 教授, 主要从事中药复方药物代谢动力学及中药质量控制方法研究. E-mail: zhiguo-yu@163.com.  
刘红霞, 博士, 教授. Tel: (0755) 26036035, E-mail: liuhx@sz.tsinghua.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 20672068, 20572060, 90813013)、国家“863”计划专题研究项目(No. 2007AA02Z160)和广东省自然科学基金项目(No. 06028200).

收稿日期: 2009-04-27

胞的染色特征对细胞进行分类<sup>[1]</sup>;而手工镜检技术则是在分类染色后除了根据细胞大小、形态,还依据细胞核大小、染色、染色质结构及细胞浆颜色和浆中颗粒等的变化来确定为何种细胞,是较为直观而准确的结果<sup>[2]</sup>。随着生命科学的发展,从分子水平研究生命现象的技术手段不断产生,其中代谢组学是 20 世纪 90 年代后期产生的新兴学科,其概念最早由 Nicholson 研究小组<sup>[3]</sup>于 1999 年提出,主要是通过考察生物体系(细胞、组织或生物体)受刺激或扰动(如将某个特定的基因变异或环境变化)后,其代谢产物的变化或其随时间的变化来对生物体系进行研究<sup>[4]</sup>,目前已被广泛应用于各个领域(如疾病诊断<sup>[5,6]</sup>、药物研发<sup>[7]</sup>、植物代谢组学<sup>[8]</sup>和微生物代谢组学<sup>[9]</sup>等方面)的研究中。其中植物代谢组学的很多研究集中在细胞代谢组学这个相对独立的分支,主要是通过研究植物细胞中的代谢物在基因变异或环境因素变化后的相应变化来研究基因型和表型的关系及揭示一些沉默基因的功能,进一步了解植物的代谢途径<sup>[10]</sup>。但将细胞代谢组学应用于动物和人的不同种属细胞的分类,通过细胞代谢物的差异表达谱对不同种属细胞进行鉴定与识别方面的研究国内外未见报道。因此,将代谢组学方法用于细胞的分类鉴别,对于传统的细胞形态学和流式细胞分析技术来说,将会是一种潜在的、非常具有应用前景的技术方法。

本课题组对不同来源的细胞进行了代谢组学分析,获得了小分子代谢产物的差异表达谱。研究结果显示,不同细胞之间有显著的差异性,利用它可以很好地实现分类。该研究可与生物大分子的基因表达和蛋白质表达差异谱形成互补,从而进一步完善细胞组学的研究。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

液相色谱-质谱联用(LC-MS)仪:包括 Acquity 超高效液相色谱(UPLC)系统,Q-TOF Premier 四极杆-飞行时间质谱(Q-TOF MS)仪,MassLynx V4.1 工作站(美国 Waters 公司);Microfuge 18 台式离心机(美国 Beckman Coulter 公司)。

乙腈(LC-MS 级)、甲醇(高效液相色谱(HPLC)级)(美国 Fisher 公司);甲酸(HPLC 级,美国 Sigma 公司);去离子水(Milli-Q 纯水机制备);亮氨酸-脑啡肽(美国 Sigma 公司);DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media)高糖培养液(GIBCO 公司);谷氨酰胺、胰蛋白酶(上海生工生物工程有限公司);青霉素、链霉素(华北制药股份

有限公司)。

### 1.2 细胞来源

人肝癌 HepG-2 细胞、宫颈癌 HeLa 细胞、胚肾 293T 细胞、鼠脂肪 3T3 细胞和鼠前脂肪 3T3 L1 细胞,均购自中国科学院上海细胞库。

### 1.3 细胞培养

取人胚肾细胞系 293T、肝癌细胞系 HepG-2、宫颈癌细胞系 HeLa、鼠脂肪细胞系 3T3 和 3T3 L1,分别使其贴壁生长于含 10% 小牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL 的 DMEM 完全培养液中,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的恒温培养箱中培养,当细胞基本汇合时,按 1:3 的比例传代。取对数生长期的细胞进行胰酶消化,用无血清培养基洗涤 3 次,用磷酸缓冲液调节细胞浓度至  $1 \times 10^6$ /mL。每种细胞平行培养 6 份。

### 1.4 细胞处理方法

细胞经离心后,弃去含有胰酶的上清液,残渣中加入 0.5 mL 水使其悬浮,再加入 -48 °C、60% 甲醇 0.5 mL,在 -9 °C 下离心(6 400 r/min)10 min,吸取上清液,保存在 -80 °C 下。取出后加入 0.5 mL、-48 °C 甲醇,在液氮和干冰中冻融循环 2 次,离心(15 000 r/min)5 min,吸取上清液;残渣中再次加入 0.5 mL、-48 °C 甲醇,在液氮和干冰中冻融循环 2 次,离心(15 000 r/min)5 min,合并上清液,过滤后进样分析。

### 1.5 色谱条件

色谱柱:Waters ACQUITY BHE C<sub>18</sub> 柱(2.1 mm × 100 mm,1.7 μm);流动相 A:0.1% 甲酸水溶液;流动相 B:乙腈;流速:0.5 mL/min;梯度洗脱程序:初始时为 5% B,至 8 min 时线性增长至 95% B,然后保持 2 min,0.1 min 后恢复为 5% B,平衡 2 min;柱温 35 °C;进样量:10 μL。

### 1.6 质谱条件

电喷雾离子源(ESI),采用正离子模式检测,离子源温度为 120 °C,脱溶剂气温度为 300 °C,脱溶剂气流量为 500 L/h,锥孔气流量为 50 L/h,毛细管电压为 3 100 V,锥孔电压为 35 V。每 0.15 s 采集一次谱图。

准确质量测定采用亮氨酸-脑啡肽(leucine-enkephalin,  $m/z$  556.2771)溶液为锁定质量溶液,质量浓度:100 pg/mL,流速:0.05 μL/min,锥孔电压:40 V;采集频率:10 s 采集一次;质量扫描范围: $m/z$  100~1 000。

### 1.7 数据处理

采用 MarkerLynx XS 软件对胞内代谢物总离子流色谱图进行色谱峰识别与峰匹配,并采用主成

分分析(PCA)模式识别对各类细胞进行分类判别分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 细胞内容物提取方法的选择

Catherine 等<sup>[11]</sup>采用不同溶剂(如甲醇、甲醇/氯仿、高氯酸、煮沸的乙醇和氢氧化钾)对胞内代谢物的提取效率进行了详细考察。本实验对上述参考文献的样品前处理方法进行了优化,并在显微镜下跟踪细胞的形态变化和破碎情况。实验结果表明,用  $-48\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、60% 甲醇对细胞进行固化,再用 100% 甲醇在  $-48\text{ }^{\circ}\text{C}$  与液氮之间进行 2 次溶剂提取。每次提取冻融循环 2 次,细胞可破碎完全,提取出的胞内代谢物最多。

### 2.2 色谱和质谱条件的考察

#### 2.2.1 色谱条件

本实验中甲醇细胞提取物中主要以极性化合物为主,因此以 Waters ACQUITY BHE  $\text{C}_{18}$  为色谱分离柱优化色谱条件,考察不同流动相组成(甲醇/甲酸、乙腈/甲酸、乙腈/醋酸铵)、不同洗脱梯度(洗脱时间分别为 13、25 和 35 min)和不同流速(0.25、0.5 mL/min)下的色谱分离情况。实验结果表明,在 1.5 节色谱条件下,在较短时间内细胞提取物中的组分获得了较好的分离,得到的色谱峰较多。同时以 HepG-2 细胞提取物为研究对象,考察了保留时间为 3.08、5.44 和 7.50 min 的 3 个色谱峰在 5 次重复分析中保留时间的稳定性,结果显示 3 个色谱峰保留时间的相对标准偏差(RSD)均小于 0.2%,表明方法具有较好的保留时间稳定性。

#### 2.2.2 质谱条件

在优化的色谱条件下,考察了正、负离子模式下的质谱出峰情况和质谱参数的影响。结果发现,在正离子模式下得到的色谱峰较多,且信号强度较大,因此选择正离子模式对胞内代谢物进行分析与分类鉴别。

### 2.3 细胞胞内代谢物的指纹图谱

在优化的 UPLC-TOF MS 条件下,对人肝癌 HepG-2 细胞、宫颈癌 HeLa 细胞、胚肾 293T 细胞、鼠脂肪 3T3 细胞和鼠前脂肪 3T3 L1 细胞胞内代谢产物进行样品分析,可获得 5 种不同细胞的胞内代谢物的指纹图谱,人肝癌 HepG-2 细胞胞内代谢物的指纹图谱见图 1(其他图略)。对所得的指纹图谱进行组分分析,发现该实验条件下不同细胞的胞内提取物的分子离子峰数目比较接近,一般在  $m/z$  1 900 ~ 2 300 之间,色谱峰的峰容量较大,这为胞内代谢产物的分析提供了丰富的数据信息。

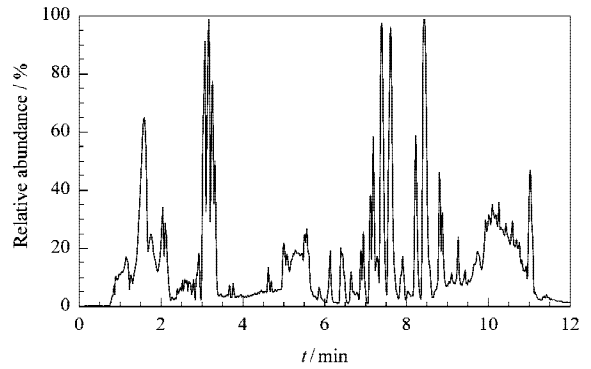


图 1 HepG-2 细胞胞内代谢物的 UPLC-MS 基峰强度色谱图  
Fig. 1 Typical UPLC-MS base peak intensity chromatogram of metabolite profile of HepG-2 cell lines

采用 PCA 方法对 5 种细胞的胞内提取物进行分析,分类图见图 2。由图 2 可以看出,这 5 种细胞可以明显地被分类,说明人的不同细胞系之间有显著性差异,人与鼠细胞种属之间也有显著不同。从图 2 中还可以看出, HepG-2、HeLa、3T3 L1 聚类较好,而 293T 和 3T3 比较分散,我们认为,相对而言,正常细胞处于分化的初级阶段,各种生长代谢调控具有多向性,这就造成了正常细胞的分散性比较强,各种细胞聚类相对较分散,而肿瘤细胞是在正常细胞的基础上进一步分裂分化形成的,处于相对较高级的分化阶段,造成肿瘤细胞聚类相对较为集中。

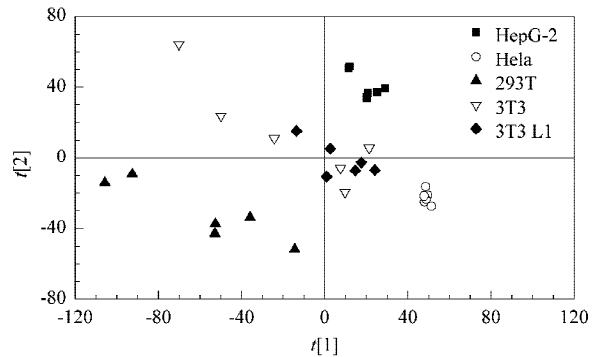


图 2 5 种细胞代谢物的分类图  
Fig. 2 Score plot of 293T, HepG-2, HeLa, 3T3 and 3T3 L1 cell lines

### 2.4 细胞胞内代谢物中主要标志物的确认

以 5 种细胞的胞内提取物为分析对象,采用 PCA 方法和偏最小二乘法对分析结果进行统计分析,可明显观察到 Loading plot 中具有许多分散点(散点图略)对分类贡献比较大,一些物质在 5 种细胞中都存在,但相对含量不同,说明细胞种属之间代谢产物的相对含量有显著不同;还有一些物质只存在于某种特定细胞而其他细胞中含量非常低甚至观察不到,这些物质则极有可能就是引起细胞种属之间显著性差异的生物标志物。同时,我们注意到

肿瘤细胞和正常细胞之间也存在显著性差异,一些物质在两种肿瘤细胞中的含量明显高于正常细胞,有可能是肿瘤细胞区别于正常细胞的生物标志物。

利用 MarkerLynx XS 软件自带的数据库检索

系统,对一些具有显著性差异的物质进行了初步的结构鉴别,获得了 10 种可能的潜在生物标志物的结构信息(见表 1)。同时,对这 10 种物质在不同细胞中的相对含量进行了初步分析,统计结果见图 3。

表 1 10 种潜在生物标志物的结构鉴定结果

Table 1 Ten potential biomarkers and their identification results by MS in ESI+ scan mode

No.	Retention time/min	m/z	Potential biomarker
1	0.8386	203.0520	sebacic acid
2	0.8442	170.0340	2,3-dihydrodipicolinate
3	0.8487	222.0294	3-hydroxypropylmercapturic acid
4	0.8637	258.1087	pterin-4 $\alpha$ -carbinolamine
5	0.8681	268.1041	adenosine
6	0.8763	218.1373	N-acetylcitrulline
7	5.6814	183.9896	4-pyridoxate
8	10.2614	220.1111	4-amino-2-methyl-5-phosphomethylpyrimidine
9	10.7718	415.3171	diosgenin
10	10.7937	364.0860	guanosine monophosphate (GMP)

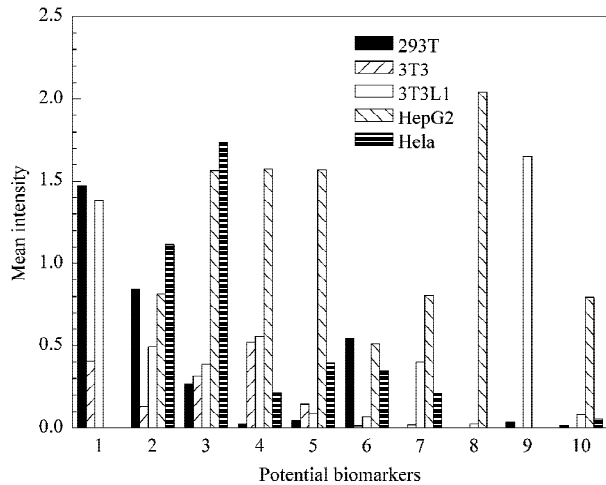


图 3 10 种潜在标志物在 5 种细胞内的相对含量

Fig. 3 Relative contents of 10 potential biomarkers in the 5 cell lines

For the ten potential biomarkers, see Table 1.

以上实验结果表明,利用代谢组学技术可很好地实现细胞种属之间的分类。该研究初步进行了细胞种属之间的差异性物质分类及结构鉴定,今后将进一步优化 UPLC-MS 分析方法,扩大研究的细胞种类,深入研究这些显著性生物标志物的结构及其在细胞代谢过程中的作用,研究结果将会对细胞种属分类的识别和鉴定起到极大的促进作用。

### 3 结论

本文利用液相色谱-质谱联用技术开展了人肝癌 HepG-2 细胞、宫颈癌 HeLa 细胞、胚肾 293T 细胞、鼠脂肪 3T3 细胞和鼠前脂肪 3T3 L1 细胞的代谢组学研究,获得了 5 种细胞内代谢物的指纹图谱。结果显示 5 种细胞在主成分分析的模式识别结果中可以完全区分。这一研究结果表明,利用基于细胞

代谢物检测、多维统计分析的代谢组学研究,可为细胞种属的鉴定与评价提供一种新的技术方法。对该方法进一步研究和应用,则有望建立不同细胞的代谢产物指纹图谱库,为更多种类细胞的分类鉴定与识别提供新的技术方法和实验依据,从而与传统的细胞分类技术进行相互验证和补充。

除此之外,继续寻找对细胞分类贡献较大的差异性物质,识别与鉴定每一种细胞内特定差异性标志物,将对细胞的种属鉴定提供更加丰富的理论与实验依据,这也是本课题组今后的工作重点,期望能对细胞组学方面的研究起到积极的促进作用。

### 参考文献:

[ 1 ] Wang Y, Sun H S, Wang Y, et al. Chinese Journal of Zoology (王岳,孙虎山,王宜艳,等. 动物学杂志),2009,44(1): 87

[ 2 ] Zhou L Y. Jilin Medical Journal (周兰玉. 吉林医学),2008, 17(29):1482

[ 3 ] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. Xenobiotica,1999,29 (11):1181

[ 4 ] Nicholson J K, Bollard M E, Lindon J C, et al. Nat Rev Drug Discov,2002,1(2):153

[ 5 ] Sreekumar A, Poisson L M, Rajendiran T M, et al. Nature, 2009,12(457):910

[ 6 ] Chen J, Zhao X J, Fritsche J, et al. Anal Chem,2008,15 (80):1280

[ 7 ] Robertson D G, Reily M D, Baker J D. J Proteome Res, 2007,6(2):526

[ 8 ] Dixon R A, Gang D R, Charlton A J, et al. J Agric Food Chem,2006,54(24):8984

[ 9 ] Dalluge J J, Smith S, Sanchez-Riera F, et al. J Chromatogr A,2004,1043(1):3

[ 10 ] Wolfram W, Oliver F. Cur Opin Biot,2002,13(2):156

[ 11 ] Catherine L W, Warwick B D, Stephanie S, et al. Anal Chem,2008,80(8):2939