

# 采用代谢流量分析方法评估二噁英对细胞的代谢干扰\*

张保琴<sup>1</sup> 张海军<sup>1</sup> 王龙星<sup>1</sup> 王金成<sup>1</sup> 杨常青<sup>2</sup> 陈吉平<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 大连, 116023; 2. 满洲里出入境检验检疫局技术中心, 满洲里, 021400)

**摘要** 以肝癌细胞 HepG2 为供试细胞, 选用 5 个不同浓度的二噁英(0、0.001、0.01、0.1 和 1.0 nmol·L<sup>-1</sup>), 探讨 2,3,7,8-TCDD 对 HepG2 细胞的毒性效应. 采用 90% 甲醇离心法实现蛋白与代谢产物的分离, 建立了高效液相色谱-串联三重四极杆质谱(HPLC-MS/MS)分析胞外液中的 23 种代谢产物(20 种氨基酸、乳酸、甘油和尿素)的方法. 建立的 HPLC-MS/MS 分析方法对各化合物的加标回收率可达 91%—105% 之间, 化合物浓度的标准偏差均小于 10%. 在此基础上, 结合代谢流量分析系统研究了 2,3,7,8-TCDD 对 HepG2 细胞内代谢流的影响. 结果表明, 随着浓度的增高, 2,3,7,8-TCDD 对 HepG2 细胞代谢的干扰作用呈增强趋势. 2,3,7,8-TCDD 降低了细胞对葡萄糖的吸收, 并进一步抑制了 HepG2 细胞糖酵解的速率. 此外, 2,3,7,8-TCDD 导致了 HepG2 细胞乳酸代谢流的明显增加, 由此使细胞产生了过量的乳酸.

**关键词** HPLC-MS/MS, 代谢流量分析, 细胞代谢产物, 2,3,7,8-TCDD.

代谢组学的发展为毒理学的深入研究提供了新的技术手段. 随着分析检测手段的多样化发展, 色谱质谱联用技术在代谢组学研究中占据了主导地位并在药物或环境污染物毒理学机制研究中取得了显著进展<sup>[1-3]</sup>, 尤其是液相色谱串联质谱技术在目标化合物定量方面凸显出的优势, 使得该技术在标志物的选择及代谢毒理学方面有了突飞猛进的发展<sup>[4-5]</sup>. 另一方面, 系统生物学的不断发展, 生物体代谢网络的生化数据被不断完善, 不仅对代谢网络研究本身提供了良好的发展空间, 也为代谢网络研究与其它生物学特性相结合的研究方法提供了基础<sup>[6]</sup>. 其中, 代谢流量分析(Metabolic Flux Analysis, MFA)是代谢工程中常用的定量分析方法, 此法通过精确检测胞外的代谢产物的变化量并利用细胞内主要反应的化学计量模型及代谢物的质量平衡关系, 计算出胞内的代谢通量的分布. 通过不同条件下所得代谢通量的差异比较, 可以对环境扰动胞内代谢通量的影响予以评价, 并对代谢网络中的特定途径及反应的重要性进行准确描述<sup>[7-8]</sup>. 因此, 将色谱质谱联用分析技术与代谢组学经典定量方法相结合, 将会成为毒性机制评价的新手段.

二噁英(polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and furans)是目前已知毒性最高的化合物, 关于其毒性和毒理机制研究已开展数十年, 并在代谢组学及基因研究方面取得了一定的进展<sup>[9-10]</sup>. 本文以肝癌细胞 HepG2 细胞为供试细胞, 首次建立了高效液相色谱-三重四极杆质谱(HPLC-MS/MS)分析胞外多种代谢物的高精度定量分析方法, 并依据 HepG2 细胞的本身特性绘制代谢网络图, 在此基础上, 检测胞外代谢物并进行胞内代谢流量的计算分析, 从而评估二噁英对 HepG2 细胞代谢的影响.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

主要仪器设备为: CO<sub>2</sub> 培养箱(New Brunswick 公司)、5415R 型台式离心机(Eppendorf 公司)、配备自动进样器和四元梯度毛细液相泵的 TSQ Quantum Access MA 三重四极杆串联质谱仪(LC-MS/MS, Thermo Fisher). 20 种氨基酸、甘油、尿素和乳酸标准品均购自百灵威, 2,3,7,8-TCDD 购自美国剑桥同位素实验室(纯度 < 99%), 甲醇为色谱纯, 葡萄糖试剂盒购自南京建成公司.

2012 年 1 月 10 日收稿.

\* 国家重点基础研究发展计划(2009CB421602)资助.

\*\* 通讯联系人, E-mail: chenjp@dicp.ac.cn

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 细胞培养与样品前处理

生长对数期的肝癌细胞 HepG2 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,用不同浓度的 2,3,7,8-TCDD(0.001 nmol·L<sup>-1</sup>、0.01 nmol·L<sup>-1</sup>、0.1 nmol·L<sup>-1</sup> 和 1.0 nmol·L<sup>-1</sup>) 处理 48 h. 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法检测细胞增殖情况. 同时,吸取培养 48 h 的细胞培养液 10 μL 至 1 mL 甲醇和水混合液(体积比 90:10)中,漩涡振荡 2 min,然后 15000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,上清液过 0.22 μm 针头过滤器. 采用 HPLC-MS/MS 分析胞外代谢产物浓度的变化情况,并计算胞内代谢路径的改变程度.

### 1.2.2 代谢物分析方法

采用 HPLC-MS/MS 分析 20 种氨基酸、甘油、尿素和乳酸. 液相色谱柱为 Atlantis C18 反相色谱柱 (Waters 公司, 150 mm × 2.1 mm, 3.0 μm); 流动相 A 为纯水,流动相 B 为甲醇;总流速为 200 μL·min<sup>-1</sup>,柱温箱温度为 20 °C,进样量为 10 μL. 梯度洗脱程序为:0—2 min 时甲醇用量为 5%; 3 min 后甲醇用量提高到 40%,保持 5 min;在 1 min 内甲醇用量降到 5%,然后再保持 9 min.

质谱电离方式为电喷雾离子,雾化鞘气和辅助气均为氮气. 质谱扫描模式采用选择性反应检测 (SRM) 模式,数据采集在正离子模式下进行. 质谱条件:离子源温度为 300 °C;鞘气和辅助气压力分别为 5 psi 和 20 psi,电喷雾电压为 3000 V,扫描范围为 m/z 50—300,离子扫描时间间隔为 0.05 s. 20 种氨基酸、甘油、尿素和乳酸的质谱参数见表 1.

表 1 23 种代谢物的质谱参数

Table 1 Parameters of mass spectra of the 23 metabolites

化合物	母离子 (质荷比)	子离子 (质荷比)	碰撞能/eV	透镜电压/V
Gly	76.000	30.728	13	48
Ala	90.000	44.545	9	48
Ser	106.000	60.542	11	44
Pro	116.000	70.328	14	56
Val	118.000	72.228	9	67
Thr	120.000	74.354	10	67
Cys	122.000	105.053	10	72
Leu/Ile	132.000	86.355	7	55
Asn	133.000	74.355	16	73
Asp	134.000	116.178	6	86
Glu/Lys	147.000	130.207	5	55
Gln	148.000	130.190	9	76
Met	150.000	104.111	12	52
His	156.000	110.220	11	49
Phe	166.000	120.195	14	79
Arg	175.000	70.413	26	88
Tyr	182.000	136.125	11	65
Trp	205.000	188.067	6	47
尿素	61.208	44.553	16	76
甘油	93.177	61.418	6	37
乳酸	91.050	45.433	6	31

为保证数据的完整性,增添胞外葡萄糖的变化量分析. 由于葡萄糖不能在 ESI 下检测,因此本研究采用葡萄糖测试试剂盒检测葡萄糖含量.

### 1.2.3 细胞代谢轮廓的构建

根据代谢途径的生物信息学分析 (KEEG) 数据库及相关文献<sup>[7,8,11]</sup>,绘制 HepG2 细胞的代谢网络,如图 1 所示. 绘制的代谢网络包括 71 个细胞生化反应途径,分别为 5 个生物大分子细胞合成反应(核酸-DNA 和 RNA、蛋白质、脂类及有机碳)、41 个胞内反应、24 个胞外反应. 蛋白质的合成来源于 20 种氨基酸,图中未标出. 图中灰色标记部分为胞外代谢物与外界环境的物质交换. 整个代谢网络包括的代谢

路径有:糖酵解、糖异生、戊糖磷酸途径、甘油代谢、三羧酸循环、尿素循环、氨基酸代谢及脂类代谢。

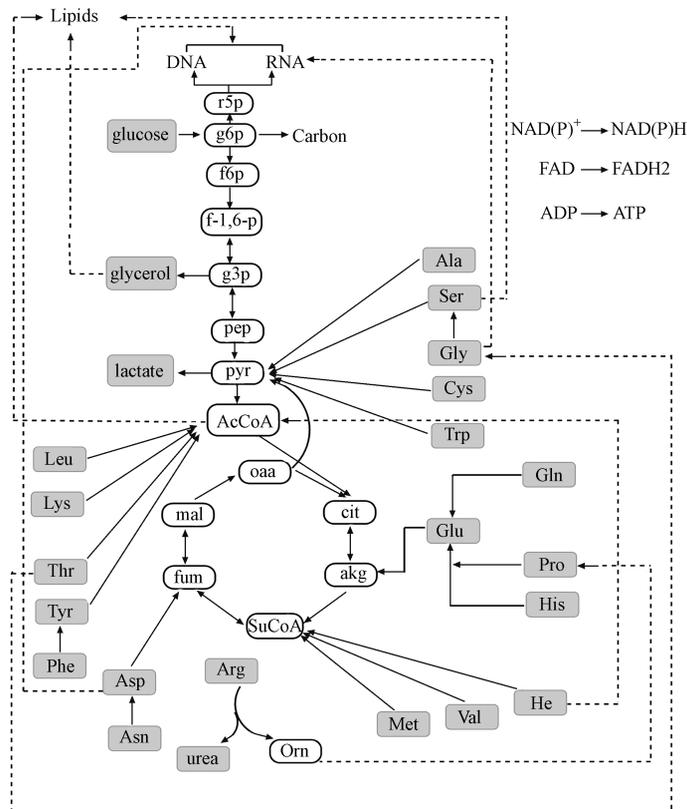


图1 用于代谢流量计算的 HepG2 细胞代谢网络图  
(灰色标记代表胞外代谢产物)

Fig. 1 Metabolic network model for the determination of metabolic fluxes using metabolite balancing in HepG2 cells

#### 1.2.4 代谢通量的计算

图1包括71个变量,根据代谢通量计算的拟稳态假设,不存在分支的代谢途径其反应速率相等,因此图1胞内反应可简化为36个.24个胞外代谢反应的变量可根据上述实验方法的测定结果计算得出,5个生物合成反应速率可根据MTT法检测的细胞增长率及文献<sup>[7]</sup>提供的HepG2细胞成分计算得出.由36个节点代谢物根据拟稳态得到36个方程,在此基础上建立矩阵方程组,应用Matlab软件求解可得各反应途径的代谢通量.

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养液中代谢物的 HPLC-MS/MS 分析方法的建立

#### 2.1.1 样品前处理

细胞培养液中代谢组分的测定要求其前处理方法精密度高、取样量少、处理时间短.由于HPLC-MS/MS对蛋白敏感,检测灵敏度高等特点,而样品中的代谢物浓度相对较高,这就需要前处理过程对样品进行稀释并去除大量的蛋白.本研究比较了离心沉降蛋白后稀释法、有机溶剂沉淀法和固相萃取法(SPE),通过对各处理方法的峰强度以及绝对基质效应和相对基质效应的考察,最终选择90%甲醇离心除蛋白与样品稀释一步完成法,取样量仅需10 μL.结果表明,该方法的重复性RSD < 2.88%,回收率为91.27%—115.07%.

#### 2.1.2 色谱柱、流动相及洗脱条件的选择

20种氨基酸中有两对同分异构体Ile/Leu和Lys/Gln,其母离子和子离子相同,质谱窗口无法将它们分离,必须借助特殊的色谱柱或者苛刻的洗脱条件.文献指出<sup>[4-5,12]</sup>,采用离子对试剂(如九氟戊酸)

和有机挥发酸(如甲酸)有利于增大极性化合物在普通 C18 柱子上的保留,进而使同分异构体分离,但是离子对试剂一方面能大量在 C18 柱上积聚进而影响固定相的性质,对柱子的性能造成一定的损坏,另一方面离子对试剂和有机酸可能会对一些化合物的离子化效率产生影响.所以本实验摒弃了这种方法,选择了 Waters 公司的 Atlantis C18 色谱柱,由于该色谱柱特殊的制备技术(双键键合及兼容 100% 水相)使极性化合物的分离效果得到了大的提升,3  $\mu\text{m}$  的粒径增加了色谱的分离度,不需要任何离子对试剂和有机酸的加入仅通过改变洗脱条件就可以达到良好的分离结果.考察了甲酸的加入对色谱分离的影响,发现对同分异构体的分离影响不大,过程中分别选择了甲醇和乙腈作为流动相进行比较,发现甲醇更有利于氨基酸同分异构体的分离,通过优化洗脱条件,使样品分离在 10 min 内完成,大大缩短了分析时间,提高了分析效率.

### 2.1.3 方法的质量控制

方法的检出限通过实际测定系列低浓度的混合标准样品,以信噪比(S/N)为 3 确定.实验通过标准加入法确定方法的回收率,已处理好的细胞培养液样品中分别加入 50、100 和 500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的混合物标准溶液.依次连续进样 6 次,计算各色谱峰保留时间和 SRM 色谱峰峰面积的 RSD 值.采用建立的 LC-MS/MS 分析方法,各化合物的加标回收率达到了 91%—105% 之间,回收率良好.细胞培养液样品中检测到的标准品离子峰面积的 RSD 均小于 10%,说明仪器的精密度比较高.各代谢物色谱保留时间的 RSD 值均小于 3%,有利于代谢组学数据预处理时的峰对齐.23 种代谢物的检出限、线性范围、相关系数、精密度见表 2.

表 2 23 种代谢物的检出限(LOD)、线性范围、相关系数( $R^2$ )、精密度(以峰面积的 RSD 计)

Table 2 Limit of detect (LOD), linear range, correlation coefficient ( $R^2$ ), precision (RSDs of peak area) and recovery of the 23 compounds

标准品	检出限/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	线性范围/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	相关系数 $R^2$	精密度 (RSD/%) $n=6$
Gly	0.5	5—500	0.990	3.45
Ala	0.05	5—500	0.991	5.42
Ser	0.05	5—500	0.992	3.22
Pro	0.02	5—500	0.990	2.61
Val	0.02	5—500	0.993	3.22
Thr	0.05	20—500	0.995	6.37
Cys	0.5	20—500	0.991	4.56
Leu/Ile	0.02	5—500	0.999	5.11
Asn	0.05	20—500	0.993	3.81
Asp	0.05	20—500	0.991	6.21
Glu	0.02	5—500	0.991	7.56
Gln	0.02	5—500	0.991	3.21
Met	0.02	5—500	0.999	3.58
His	0.02	5—500	0.997	4.98
Phe	0.01	5—500	0.998	8.91
Arg	0.01	5—500	0.990	4.81
Tyr	0.05	5—500	0.999	5.89
Trp	0.02	5—500	0.998	7.62
Lys	0.05	5—500	0.993	5.61
尿素	1	20—500	0.990	9.32
甘油	1	20—500	0.994	8.87
乳酸	1	20—500	0.991	5.62

### 2.2 HepG2 细胞的生长率

实验结果表明,不同浓度的 2,3,7,8-TCDD 对 HepG2 细胞进行 48 h 的处理后,细胞的增殖速率没有表现出太大的差别.主要原因可能是 10% 血清的存在大大抑制了二噁英的细胞毒性<sup>[13]</sup>,以致于没有表现出增值毒性.

### 2.3 2,3,7,8-TCDD 对 HepG2 细胞代谢通量的影响

利用 HPLC-MS/MS 检测了不同浓度的 2,3,7,8-TCDD 对 HepG2 细胞处理 48 h 后胞外代谢物的变化情况,检测结果结合代谢流量分析系统,利用 Matlab 软件计算不同浓度的 2,3,7,8-TCDD 对 HepG2 胞内各个代谢路径代谢流量的影响情况(图 2)。结果表明,随着浓度的增高,2,3,7,8-TCDD 对 HepG2 细胞代谢的干扰作用呈增强趋势。2,3,7,8-TCDD 对细胞的毒性机制主要表现在通过降低细胞对葡萄糖的吸收抑制 HepG2 细胞糖酵解的速率。糖酵解可以为接下来的细胞代谢提供中间产物,糖酵解作用的降低可以引发一系列的连锁反应导致细胞代谢紊乱。三羧酸循环代谢流的降低也印证了这一点,三羧酸循环是细胞主要的产能途径,此结果直接导致细胞 ATP 代谢减慢,使细胞的供能发生障碍。另一方面 HepG2 细胞乳酸代谢流呈明显的增加趋势,由此使细胞产生过量的乳酸,很可能导致细胞酸中毒。

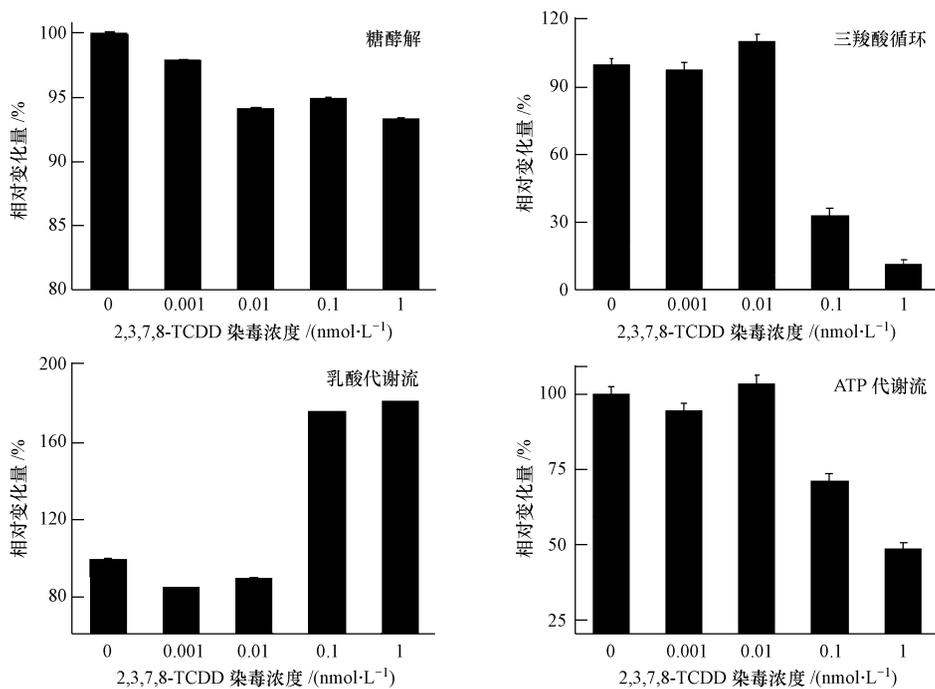


图 2 2,3,7,8-TCDD 对 HepG2 细胞代谢流的影响

Fig. 2 The effect of 2,3,7,8-TCDD on metabolic flux of HepG2 cells

## 3 结论

本研究建立了 HPLC-MS/MS 结合代谢流量分析系统评估污染物细胞毒性的代谢组学方法。通过优化前处理及分析条件,细胞培养液中的 23 种代谢物能在短时间内同时分析测定,通过建立的 HepG2 细胞代谢轮廓图,结合代谢流量分析系统(拟稳态假设),可以精确计算出环境变化对细胞代谢路径的影响。该方法精确可靠,所得信息量丰富。

采用建立的 HPLC-MS/MS 结合代谢流量分析系统评估了二噁英对肝癌细胞 HepG2 代谢的干扰,结果表明,2,3,7,8-TCDD 通过降低细胞对葡萄糖的吸收抑制 HepG2 细胞糖酵解的速率,从而引发一系列的连锁反应导致细胞代谢紊乱进而引发细胞毒性。

### 参 考 文 献

- [1] 彼得汉考克,迈克尔杰克逊,安东尼牛顿,等. 精确质量数 GC-TOF 质谱仪在代谢组学中的应用[J]. 环境化学, 2009, 28(4): 612-613
- [2] Paul R W, April M W, Alan M S, et al. Predicting human developmental toxicity of pharmaceuticals using human embryonic stem cells and metabolomics[J]. Toxicol Appl Pharm, 2010, 247: 18-27
- [3] Gabriela G C, Jessica A Q, Alan M S, et al. Identification of small molecules from human embryonic stem gells using metabolomics[J].

- Stem Cells Dev, 2007, 16: 869-882
- [ 4 ] Mariella Z, Lorena G, Franco Z, et al. Method for the quantification of underivatized amino acids on dry blood spots from newborn screening by HPLC-ESI-MS/MS[J]. J Chromatogr B, 2006, 31:267-273
- [ 5 ] Monique P, Christine V S, Konstantinos P, et al. ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003, 17: 1297-1311
- [ 6 ] Steffen K, Jörg S, Martin G. FluxAnalyzer: exploring structure, pathways, and flux distributions in metabolic networks on interactive flux maps [J]. Bioinformatics, 2003, 19(2): 261-269
- [ 7 ] Jens N, Fozia N, Elmar H, et al. Effects of drugs in subtoxic concentrations on the metabolic fluxes in human hepatoma cell line HepG2 [J]. Toxicol Appl Pharm, 2009, 240: 327-336
- [ 8 ] Lake E Q, Stefanie D, Jens O K, et al. Metabolic flux analysis in mammalian cell culture [J]. Metab Eng, 2010, 12: 161-171
- [ 9 ] Raymond Lo, Trine Celius, Agnes L Forgacs, et al. Identification of aryl hydrocarbon receptor binding targets in mouse hepatic tissue treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin[J]. Toxicol Appl Pharm, 2011, 257: 38-47
- [10] Forgacs Agnes L, Kent Michael N, Makley Meghan K, et al. Comparative metabolomic and genomic analyses of TCDD-elicited metabolic disruption in mouse and rat liver [J]. Toxicol Sci, 2012, 125: 41-45
- [11] Vidya V I, Hong Y, Marianthi G I, et al. Effects of glucose and insulin on HepG2-C3A cell metabolism[J]. Biotechnol Bioeng, 2010, 107: 347-356
- [12] 黄翼飞,胡静. 液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱同时分析烟草中的 20 种游离氨基酸[J]. 色谱,2010, 28(6): 615-622
- [13] Hestermann E V, Stegeman J J, Hahn M E. Serum alters the uptake and relative potencies of halogenated aromatic hydrocarbons in cell culture bioassays[J]. Toxicol Sci, 2000, 53: 316-325

## The influence of dioxin on cell metabolism evaluated by the metabolic network flexibility analysis

ZHANG Baoqin<sup>1</sup>    ZHANG Haijun<sup>1</sup>    WANG Longxing<sup>1</sup>    WANG Jincheng<sup>1</sup>  
YANG Changqing<sup>2</sup>    CHEN Jiping<sup>1\*</sup>

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian, 116023, China;

2. Manzhouli Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Manzhouli, 021400, China)

### ABSTRACT

This study was initiated to explore the toxic effects of dioxins in HepG2 cells when exposed to 2,3,7,8-TCDD at five different concentrations (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 nmol·L<sup>-1</sup>). The separation of proteins and metabolites was achieved by the centrifugation method with 90% methanol as solvent, and then 23 extracellular metabolites (20 underivatized amino acids, lactate, glycerol and urea) were qualitatively and quantitatively analyzed by HPLC-MS/MS. The recoveries of the 23 cell metabolites were 91%—105% and the relative standard deviations (RSDs) of peak areas of the extracted ion chromatograms were below 10%. Meanwhile, the influence of 2,3,7,8-TCDD on the metabolic flux analysis in HepG2 cells was evaluated. The results showed that the disturbance of 2,3,7,8-TCDD on the metabolism of HepG2 increased its concentration. The addition of 2,3,7,8-TCDD decreased the cell absorption of glucose and further inhibited the glycolysis. On the other hand, exposure to 2,3,7,8-TCDD induced a significant increase of lactic acid metabolic flux, and thus caused excessive lactic acid in HepG2 cells.

**Keywords:** HPLC-MS/MS, metabolic flux analysis, cell metabolite, 2,3,7,8-TCDD.