

实时细胞能量代谢分析和 ^{13}C 稳定同位素示踪法揭示脂多糖刺激巨噬细胞引起的代谢变化

作者

Agnieszka Broda 和
Gerald Larrouy-Maumus
伦敦帝国理工学院自然科学院
生命科学系分子细菌学及感染
MRC 研究中心,
London, SW7 2AZ, UK

Sufyan Pandor
安捷伦科技有限公司
Cheshire, UK

摘要

真核细胞通过线粒体代谢（氧化磷酸化）和非线粒体代谢（糖酵解）产生 ATP。安捷伦 Seahorse 技术是一种极具价值的工具，通过测量细胞耗氧率 (OCR) 和细胞外酸化率 (ECAR)（分别为线粒体呼吸和糖酵解的测量指标），实时监测细胞的生物能量代谢。尽管 Seahorse 能够提供有关细胞生物能量代谢状态的表型信息，但深入了解代谢通路的变化需要测量参与关键代谢通路（如糖酵解、三羧酸 (TCA) 循环、戊糖磷酸途径）的分子代谢物的丰度和相互转化速率。利用 LC/Q-TOF 进行稳定同位素示踪分析可以实现这一目标，从而提供细胞代谢的详细信息。LC/Q-TOF 技术的最新进展整合定性代谢流分析软件，可通过追踪代谢物沿体内代谢通路的转换揭示更多细节。本应用简报介绍了使用 Seahorse XF 技术以及 Agilent MassHunter VistaFlux 软件的 ^{13}C 稳定同位素示踪分析，来研究 RAW 264.7 巨噬细胞对脂多糖 (LPS) 处理应答。本应用简报旨在展示基于 Seahorse 技术的表型分析以及基于 Agilent 6546 LC/Q-TOF 系统的靶向稳定同位素示踪分析整合的强大功能。

前言

近年来，免疫代谢研究显著拓展了我们对免疫细胞功能的认识。代谢的调节对控制细胞命运至关重要^[1,2]。Seahorse 技术能够深入探究相关背景下细胞响应刺激的生物能量代谢状态。实时同步测量耗氧率（OCR，线粒体呼吸氧化磷酸化的指标）和细胞外酸化率（ECAR，糖酵解的指标）的变化可实现这一目标，如图 1 所示。为了进一步了解 OCR 和 ECAR 应答刺激发生变化的机制，代谢组学分析可以直接获取通路活动和代谢物调控的瞬态信息。为获取更详细的代谢通路变化信息，可应用稳定同位素示踪分析（如 ¹³C、¹⁵N、²H）。稳定同位素标记可提供与代谢组学分析不同的细胞内代谢信息。尽管非靶向代谢组学分析可提供代谢通路中不同代谢物的丰度，但有些代谢变化不会引起代谢物水平的显著增加或减少。稳定同位素示踪法通过测量代谢物相互转化的速率以反映代谢酶的调控，可以提供常规非靶向代谢组学无法揭示的信息。这使得稳定同位素示踪研究成为在复杂生物系统中探索代谢变化的一种强大工具。

通过结合 Seahorse 和 LC/Q-TOF 分析可以更深入地了解细胞代谢的全貌，可使得两个平台的结果之间可以相互借鉴和促进，形成互补并进一步指导后续实验，从而更好解答生物学问题（图 2）。

这样的工作流程可以为生物学问题更快提供准确答案，因为两个实验均为靶向实验（Seahorse 平台的专属性检测和 LC/Q-TOF 平台的通路驱动实验）。

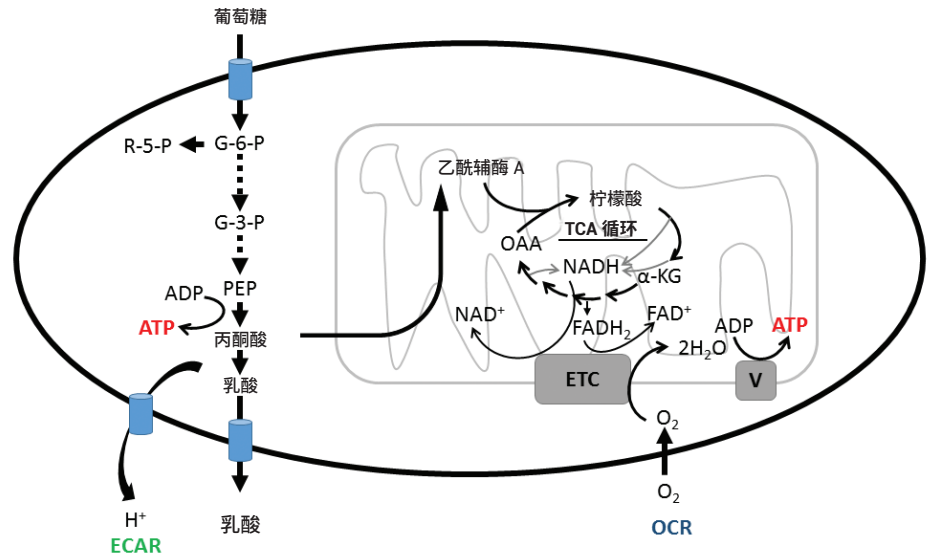


图 1. 细胞代谢通路的示意图，以及使用安捷伦 Seahorse 获得的表型测量值（ECAR 和 OCR）与使用 LC/Q-TOF 的稳定同位素示踪分析相关代谢通路（如糖酵解、TCA 循环和线粒体呼吸）代谢物之间的联系。G-6-P：葡萄糖-6-磷酸；R-5-P：核糖-5-磷酸；G-3-P：甘油醛-3-磷酸；PEP：磷酸烯醇丙酮酸；ECAR：细胞外酸化率；OCR：耗氧率；ETC：电子传递链



图 2. 结合常规表型分析、安捷伦 Seahorse 测量和 LC/Q-TOF 上的稳定同位素示踪分析，来解决生物学问题的 workflows

在免疫代谢研究中，巨噬细胞在病原体识别中起重要作用，表现出响应病原体刺激的一系列即时生理重塑现象。阐明代谢通路和代谢物平衡的调节机制，对于了解巨噬细胞功能及其在外部刺激下的重塑至关重要。其中一个示例为巨噬细胞活化。通过 LPS 和/或干扰素 γ (IFN γ) 等促炎刺激会发生巨噬细胞的经典活化。几项研究表明，活化的巨噬细胞会发生代谢转换，包括糖酵解的快速上调、TCA 循环的重塑和线粒体呼吸的抑制^[3]。这些过程遵循复杂的代谢适应程序，可以通过细胞能量代谢分析实时跟踪^[10]。

例如，衣康酸是一种通过顺式乌头酸脱羧酶 (cadA) 由顺式乌头酸生成的非氨基酸有机酸，已知衣康酸是骨髓巨噬细胞 (BMDMs) 经 LPS 刺激后高度诱导的代谢物之一^[4,5]。该过程对巨噬细胞而言耗能很多，因为巨噬细胞丧失了进行线粒体底物水平磷酸化的能力而依赖糖酵解产能^[6]。

本应用简报介绍了一个将 Seahorse XF 技术与使用 MassHunter VistaFlux 软件的 ¹³C 稳定同位素示踪分析相结合的示例，以了解 RAW 264.7 巨噬细胞对 4 小时 LPS 处理的反应。所提出的工作流程可应

用于不同的细胞类型，以解读免疫代谢的分子机制。

实验部分

细胞培养基和试剂

由冻存细胞 (-80 °C) 制备的 RAW 264.7 细胞置于添加 10% 热灭活胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基 (Dulbecco 改良 Eagle 培养基, Sigma-Aldrich) 的组织培养瓶 (约 0.5×10^5 个细胞/mL) 中培养。在 CO₂ 中 37 °C 孵育 48 小时后，分离融合细胞并培养于新鲜培养基中。重复五到六次分离过程，直到细胞从冷冻中完全复苏。

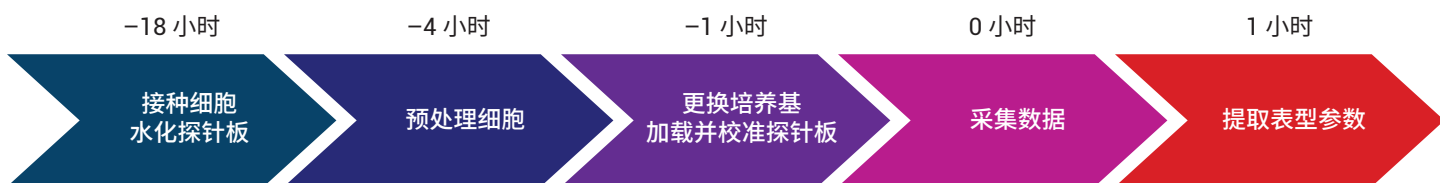
体外表型分析-通过 ELISA 测定细胞因子

在 6 孔板中培养 RAW 264.7 细胞，在 CO₂ 中 37 °C 孵育 3 至 5 个小时贴壁，然后在最终浓度为 100 ng/mL LPS 的培养基或普通培养基中培养细胞 4 小时。收集上清液用于细胞因子 TNF α 分析。根据制造商的说明，使用小鼠 TNF α ELISA 试剂盒 (即用型; Affymetrix eBioscience; Invitrogen 88732486) 测定 RAW 264.7 巨噬细胞产生的 TNF α 。在 450 nm 处测量吸光度读数。

Seahorse XFp 分析仪上的细胞外流量分析

将 RAW 264.7 细胞以 4×10^5 个细胞/mL 的细胞密度接种在 8 孔迷你微孔板上，并放置过夜，使其贴壁。用含 LPS (最终浓度 100 ng/mL) 的培养基或不含 LPS 的普通培养基培养细胞 4 小时后，使用安捷伦 Seahorse XFp 分析仪测量 OCR 和 ECAR。在分析前一天，分别用 400 μ L 和 200 μ L 二次蒸馏无菌水填充工具板的凹槽和孔来水化传感器探针板，并于 37 °C 下在无 CO₂ 培养箱中孵育过夜。在分析当天，将水更换为 200 μ L 经预热的安捷伦 XF 校准液，再孵育 1 小时。此外，将培养基更换为含 10 mmol/L 葡萄糖、2 mmol/L 丙酮酸钠和 2 mmol/L 谷氨酰胺的 180 μ L 安捷伦 Seahorse XF RPMI 培养基 (pH 7.4)，并将细胞在无 CO₂ 培养箱中 37 °C 孵育 1 小时。将含细胞的 Seahorse 迷你微孔板置于 XFp 分析仪中，在 37 °C 下进行后续分析。测量周期包括 3 分钟的混合时间和 3 分钟的测量时间。依次加入以下线粒体抑制剂前，在 37 °C 下测量 3 次基线速率：寡霉素 (2 μ mol/L)、羰基氰-对-(三氟甲氧基)苯胺

Seahorse XFp 分析仪工作流程



(FCCP, 2 $\mu\text{mol/L}$) 和鱼藤酮/抗霉素 A 混合物 (0.5 $\mu\text{mol/L}$), 均来自安捷伦 Seahorse XFp 细胞线粒体压力测试试剂盒。加入每种抑制剂后, 取 3 次读数。由 Seahorse XFp Wave 软件自动计算 OCR 和 ECAR。每个数据点代表 3 个不同孔测量值的平均值, 测量值均根据每孔的细胞数进行了归一化。为更全面地了解一般代谢变化, 使用细胞线粒体压力测试数据结果文件进行了表型分析。

定性代谢流分析

代谢物提取

将 RAW 264.7 细胞以 5×10^5 个细胞/mL 的细胞密度接种在 6 孔板上, 孵育 3 至 5 小时使其贴壁。此后, 将培养基更换为添加 4.5 mg/mL [U- $^{13}\text{C}_6$]-葡萄糖的培养基。经或不经 100 ng/mL 培养基浓度的 LPS 处理的细胞, 置于 [U- $^{13}\text{C}_6$]-葡萄糖和 ^{12}C 葡萄糖和 ^{13}C 葡萄糖比例为 1:1 的培养基中孵育 4 小时。将微孔板置于冰上, 小心倒出培养基。用冷的 PBS 洗涤贴壁细胞 3 次, 然后加入代谢物提取缓冲液 (乙腈、甲醇和水, -20°C 下比例为 40:40:20 [v/v/v]), 密度为 10^7 个细胞/mL。然后刮下细胞并转移到一个 Eppendorf 管中。将 100 μL 代谢物溶液与含 0.2% 乙酸的 100 μL 乙腈在 -20°C 下混合, 并在 4°C 下以 17000 g 离心 10 分钟。70% 乙腈的最终浓度与 HILIC 色谱分析的起始条件兼容。然后将上清液转移至安捷伦 LC/MS V 形样品瓶 (部件号 5188-2788), 进样 4 μL 进行 LC/MS 分析。

LC/Q-TOF 数据采集

采用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱与 6546 LC/Q-TOF 系统联用进行数据采集。采用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 \times 100 mm, 2.7 μm 色谱柱 (部件号 675775-924) 上进行色谱分离。HILIC 方法经过优化, 适用于极性酸性代谢物的分析 (详见表 1)。为了轻松制备稳定一致的流动相, 配制含 100 mmol/L 乙酸铵 (pH 9.0) 的 10x 浓缩溶液, 来制备流动相 A 和 B。

表 1. 液相色谱条件

液相色谱条件																			
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 \times 100 mm, 2.7 μm (部件号 675775-924)																		
流动相	A) 10 mmol/L 乙酸铵水溶液, pH 9, 含 5 $\mu\text{mol/L}$ Agilent InfinityLab 去活剂添加剂 (部件号 5191-4506) B) 10 mmol/L 乙酸铵的水/乙腈 10:90 (v:v) 溶液, pH 9																		
流速	0.5 mL/min																		
梯度	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>11.5</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>12</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td colspan="2">后运行时间</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	%A	%B	0	0	100	11.5	30	70	12	0	100	15	0	100	20	后运行时间	
时间 (min)	%A	%B																	
0	0	100																	
11.5	30	70																	
12	0	100																	
15	0	100																	
20	后运行时间																		
柱温	30°C																		
进样量	4 μL																		
Multisampler 温度	6°C																		

表 2. 质谱条件

质谱条件	
质谱系统	Agilent 6546 LC/Q-TOF
SWARM 群集自动调谐选择	m/z 50–750, 易碎裂离子模式
离子源	安捷伦喷射流
极性	负离子模式
干燥气温度	200°C
干燥气流速	10 L/min
雾化器压力	40 psig
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	115
采集范围	m/z 40–1000
参比质量	m/z 68.995758 和 980.016375

目标代谢物列表创建

由于 Seahorse 可提供有关糖酵解 (ECAR) 和线粒体氧化磷酸化 (OCR) 的表型信息, 故使用 Agilent MassHunter Pathways to PCDL 软件创建了与这些通路相关的目标代谢物列表。软件可由公共通路数据库生成包含名称、化学式和各种代号的目标个人化合物数据库 (PCDL)。从预先存在的内部数据库中添加代谢物保留时间到目标 PCDL 中。

批量同位素异数体数据分析

Agilent MassHunter Profinder 10 是 VistaFlux 的批处理模块。导入数据文件并设置好处理分组。将色谱数据与内部数据库中已知保留时间的化合物进行时间比对。使用批量同位素异数体提取向导提取目标代谢物列表的同位素异数体，并校正 ^{13}C 的天然丰度和示踪剂纯度。在稳定同位素示踪分析中，每个代谢物的结果均经过自归一化处理，因为某个同位素异数体的富集百分比是通过相对于其他同位素异数体来计算的。本实验中的 ^{13}C 示踪剂纯度为 50%，因此这些校正的结果是 100% 标记掺入表示 ^{13}C 完全掺入代谢物中。将 Profinder 的结果转移至另一个 VistaFlux 模块 Omix Premium，以轻松实现通路中的代谢流可视化。

统计分析

对于所有实验，用每个条件 2 个生物学重复样品和 4 个技术重复样品的平均值 \pm 标准误差表示数据。使用未配对双尾 Student t 检验进行比较， $p < 0.05$ 认为有统计显著性。

结果与讨论

LPS 刺激诱导 TNF α 的大量增加

RAW 264.7 细胞广泛用于研究巨噬细胞活化的分子机制。本研究通过测量 LPS 刺激后细胞培养基中肿瘤坏死因子 α (TNF α) 的释放量，来评估巨噬细胞活

VistaFlux 工作流程



化。正如预期，由 100 ng/mL LPS 活化 RAW 264.7 细胞 4 小时导致 TNF α 分泌丰度增加 100 倍，证实了细胞处于活化状态 (图 3)。

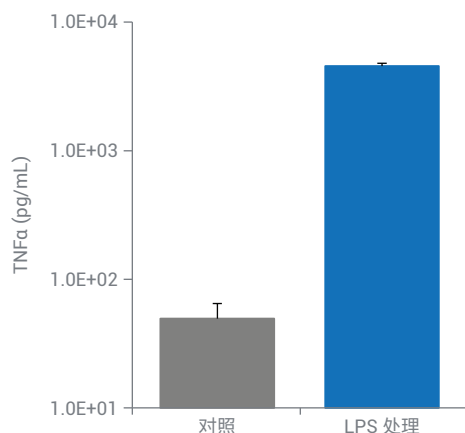


图 3. 100 ng/mL LPS 刺激 4 小时后 RAW 264.7 细胞的 TNF α 水平

LPS 刺激诱导向糖酵解表型转变

为证明 LPS 活化如何影响 RAW 264.7 中的细胞生物能量代谢，本研究使用 Seahorse XFP 分析仪研究了细胞表型 (图 4)。Seahorse 表型分析软件显示细胞基础条件下和应激条件下的代谢活性，以揭示代谢潜能。分析显示，当在基础和应激表型中用 LPS 刺激时，RAW 264.7 总体上向糖酵解表型转换。这与支持糖酵解转换是巨噬细胞促炎功能重要组成部分的文献观点一致^[7-9]。

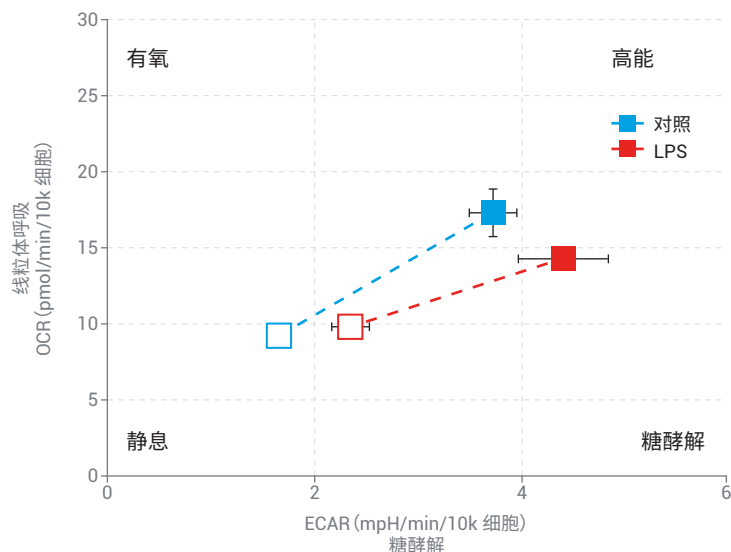


图 4. 测得的代谢表型分析的 OCR 与 ECAR 曲线 (三个重复样品)。空心方框代表基础表型，实心方框代表应激表型 (加入寡霉素和 FCCP 后的代谢能力)。经 100 ng/mL LPS 刺激 4 小时后，RAW 264.7 细胞诱导向糖酵解活性升高的方向转变

LPS 刺激使碳流量向衣康酸合成方向重新定向

如先前 Seahorse XFp 分析结果所示，LPS 刺激 RAW 264.7 细胞会使 ECAR 有所增加。如前所述，ECAR 是糖酵解的关键指标。因此，为深入了解 LPS 刺激导致 ECAR 变化引起的代谢物转换变化，我们进行了 [U-¹³C₆]-葡萄糖稳定同位素示踪分析，重点关注参与中心碳分解代谢和 TCA 循环的代谢物（表 3）。在含 [U-¹³C₆]-葡萄糖的培养基中用或不用 LPS 刺激培养 RAW 264.7 细胞 4 小时，并通过 LC/MS 测定 ¹³C 的掺入。

如图 5 所示，乳酸和丙酮酸均显示出极高水平的 ¹³C 掺入，标记率达到 95%，与所进行的处理无关。然而，主要变化发生在顺式乌头酸（特别是衣康酸）水平，其中 LPS 活化显著改变同位素异数体分布。实际上，在 LPS 刺激下，观察到 M+1、M+2、M+4 和 M+5 的 ¹³C 掺入大幅增

加，M+0 的掺入减少。这与已知 LPS 激活促进衣康酸产生的文献一致^[4,5]。根据此处提供的 XF 数据，LPS 刺激导致糖酵解增加。因此，我们研究了该通路中代谢物同位素异数体分布的变化。如图 5 所示，我们观察到参与糖酵解的代谢物中 ¹³C 的掺入增加，以及 TCA 循环的氧化分

支导致衣康酸的产生。观察到 TCA 循环还原支路中相关代谢物减少，证实 LPS 刺激下，TCA 循环还原分支的代谢物转换受到抑制。总之，这些数据表明，在 LPS 刺激后，RAW 264.7 细胞将其碳流量重新定向至衣康酸产生，导致 TCA 循环中 ¹³C 周转的改变。

表 3. 用于同位素异数体提取的目标代谢物列表，显示了 8 个对照样品的平均测量保留时间

信息通路	代谢物	分子式	RT (min)	CAS
ECAR	β-D-葡萄糖-6-磷酸盐	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	9.60	15209-12-8
	D-果糖-6-磷酸盐	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	8.22	643-13-0
	β-D-果糖-1,6-二磷酸	C ₆ H ₁₄ O ₁₂ P ₂	10.2	488-69-7
	D-甘油醛-3-磷酸	C ₃ H ₇ O ₆ P	7.03	591-57-1
	二羟丙酮磷酸	C ₃ H ₇ O ₆ P	7.95	57-04-5
	丙酮酸	C ₃ H ₄ O ₄	1.40	127-17-4
	乳酸	C ₃ H ₆ O ₃	2.21	50-21-5
OCR	柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	8.88	77-92-9
	顺式乌头酸	C ₆ H ₈ O ₆	7.86	585-84-2
	D-苏式-异柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	6.94	6061-97-8
	酮戊二酸	C ₅ H ₆ O ₅	6.04	328-50-7
	L-谷氨酸	C ₅ H ₉ NO ₄	6.25	56-86-0
	琥珀酸	C ₄ H ₆ O ₄	6.54	110-15-6
	富马酸	C ₄ H ₄ O ₄	6.88	110-17-8
	L-苹果酸	C ₄ H ₆ O ₅	6.79	97-67-6
	L-天冬氨酸	C ₄ H ₇ NO ₄	1.22	56-84-8
	衣康酸	C ₅ H ₆ O ₄	6.68	97-65-4

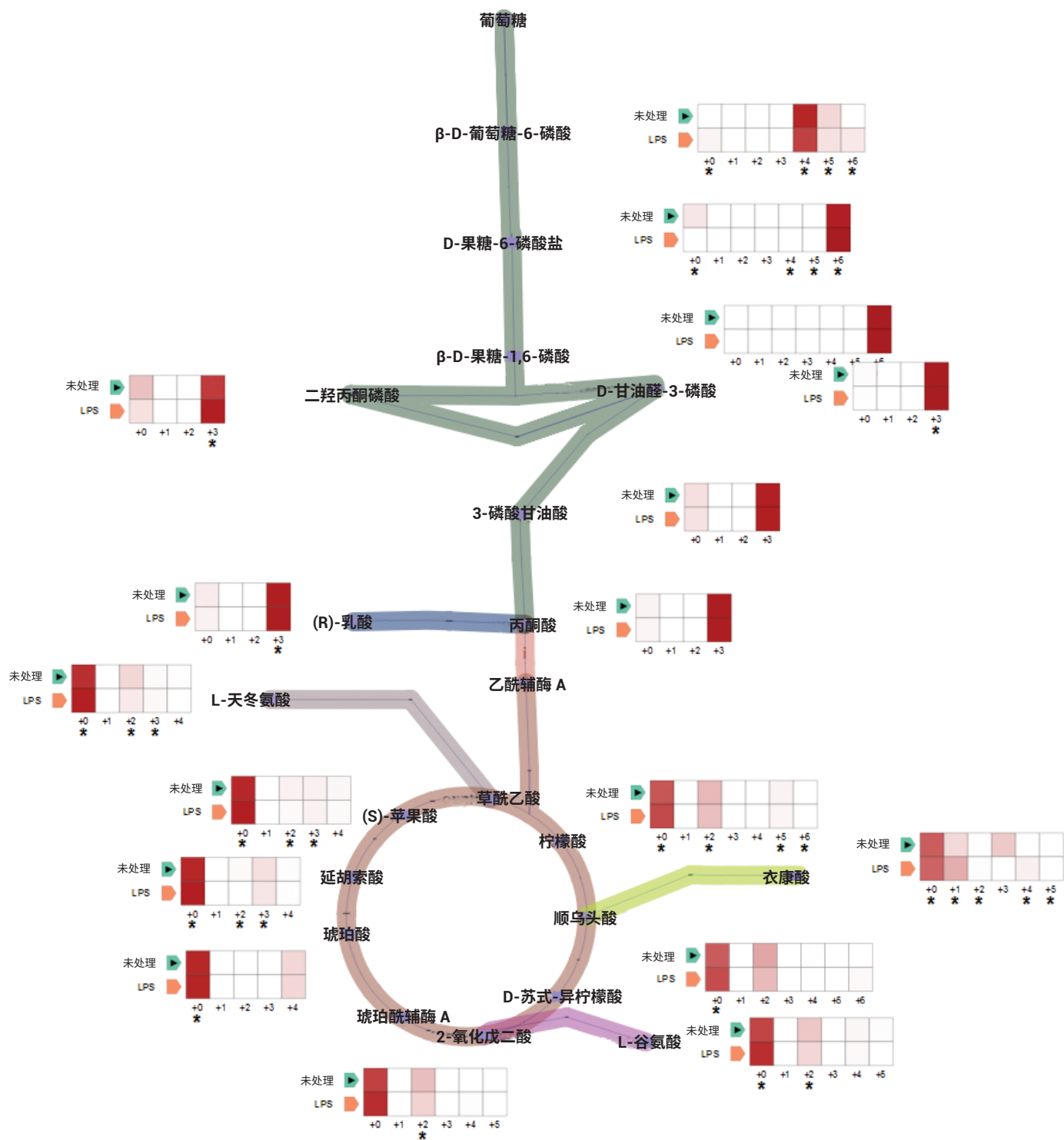


图 5. 与未经处理的 RAW 264.7 细胞 (对照) 相比, 经 100 ng/mL LPS 刺激 4 小时的 RAW 264.7 细胞 $[U-^{13}C_6]$ -葡萄糖稳定同位素示踪分析的总结。结果显示为通路的热点图, 其中每个热点图显示对照和处理细胞每种同位素异数体的校正丰度。用 * 表示统计显著性

结论

将实时细胞外流量信息与 ^{13}C 稳定同位素示踪相结合，可以更深入地了解巨噬细胞活化机制。Seahorse 技术从宏观角度提供有关代谢表型和两种主要能量代谢通路活动的信息， ^{13}C 稳定同位素示踪分析则可在微观上洞察通路中变化的分子信息。

Seahorse XF 分析试剂盒可实现实时的活细胞代谢分析。利用该技术，揭示了活的巨噬细胞表型的糖酵解改变，这是促炎巨噬细胞活化的先决条件。通过定性代谢流分析研究代谢细节时证实了这一点。与基础情况相比， ^{13}C 向糖酵解代谢产物掺入的增加证实了糖酵解速率的增加。代谢流分析还表明衣康酸（一种由促炎巨噬细胞产生的有效抗微生物化合物）的产生增加，从而提供了代谢变化更详细的信息。

该工作流程和使用的相关技术可以推广到其他不同的细胞类型，用于在表型和代谢物水平对细胞代谢进行研究，揭示应对外部刺激和遗传调控的分子机制。

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

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

DE.5524421296

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，2020
2020年4月14日，中国出版
5994-1846ZHCN

参考文献

1. O'Neill, L. A.; Kishton, R. J.; Rathmell, J. A Guide to Immunometabolism for Immunologists. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 553–65
2. Loftus, R. M.; Finlay, D. K. Immunometabolism: Cellular Metabolism Turns Immune Regulator. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 1–10
3. Kelly, B.; O'Neill, L. A. Metabolic Reprogramming in Macrophages and Dendritic Cells in Innate Immunity. *Cell Res.* **2015**, *25*, 771–84
4. Lampropoulou, V. et al. Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. *Cell Metab.* **2016**, *24*, 158–66
5. Mills, E. L. et al. Itaconate is an Anti-Inflammatory Metabolite that Activates Nrf2 via Alkylation of KEAP1. *Nature* **2018**, *556*, 113–117
6. Nemeth, B. et al. Abolition of mitochondrial substrate-level phosphorylation by itaconic acid produced by LPS-induced Irg1 expression in cells of murine macrophage lineage. *FASEB J* **2016**, *30*, 286–300
7. Van den Bossche, J. et al. Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 684–696
8. Van den Bossche, J.; Baardman, J.; de Winther, M. P. Metabolic Characterization of Polarized M1 and M2 Bone Marrow-Derived Macrophages Using Real-time Extracellular Flux Analysis. *J. Vis. Exp.* **2015**, doi:10.3791/53424
9. Artyomov, M. N.; Sergushichev, A.; Schilling, J. D. Integrating Immunometabolism and Macrophage Diversity. *Semin. Immunol.* **2016**, *28*, 417–424
10. Kam, Y. 等人, Real Time Discrimination of Inflammatory Macrophage Activation Using Agilent Seahorse XF Technology (使用安捷伦 Seahorse XF 技术实时辨别炎性巨噬细胞活化), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-8342EN, **2018**