

文章编号: 1000-4556(2014)01-040-09

NMR 分析胶质瘤细胞系 CHG5 和 U87 的代谢轮廓

邵 巍¹, 顾金苹¹, 黄彩华², 黄子成¹, 季天海^{1*},
林东海^{1*}

(1. 厦门大学 附属成功医院, 厦门大学 化学生物学系生物核磁共振实验室, 福建 厦门 361005;

2. 福建医科大学 运动和康复研究所, 福建 福州 351009)

摘 要: 胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤, 其发病原因和恶性进展机制均不明确, 给胶质瘤的临床诊疗带来很大困难. 胶质瘤恶性进展伴随着癌细胞代谢改变, 但可以反映胶质瘤恶性进展的代谢物信息和分子机制目前仍不清楚. 该研究以两种不同恶性程度的胶质瘤细胞系 CHG5 和 U87 为研究对象, 用基于 NMR 的代谢组学方法分析这两种胶质瘤细胞系的代谢轮廓, 寻找差异性代谢物. 结果表明 CHG5 和 U87 的代谢轮廓存在明显差异. 在高恶性程度的 U87 细胞中, 柠檬酸盐(citrate)等 15 种代谢物有上升趋势; 而乳酸盐(lactate)、牛磺酸(taurine)等 6 种代谢物有下降趋势. 以上结果表明这些差异性代谢物可能与胶质瘤细胞的恶性特性密切相关. 这些从胶质瘤细胞系获取的代谢信息将成为临床标本代谢组学研究的重要前提和有益补充.

关键词: 核磁共振(NMR); 代谢轮廓; 差异性代谢物; 胶质瘤细胞; 恶性程度

中图分类号: O482.53 **文献标识码:** A

收稿日期: 2013-09-01; **收修改稿日期:** 2013-10-13

基金项目: 厦门市科技计划社会发展资助项目(3502Z20124019, 3502Z20104015), 福建省自然科学基金青年创新资助项目(2012D057).

作者简介: 邵巍(1983-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事基于核磁共振的肿瘤细胞代谢组学研究. 电话: 0592-6335744, E-mail: shw6610@gmail.com. *通讯联系人: 季天海, 电话: 0592-6335844, E-mail: kysea-ji@sina.com; 林东海, 电话: 0592-2186078, E-mail: dhlin@xmu.edu.cn.

引言

胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤. 具有发病率、复发率、死亡率高等特点. 根据 WHO 标准, 按照恶性程度将胶质瘤分为 4 级. 低级别胶质瘤(WHO I~II)患者的生存时间在 5~10 年. 高级别胶质瘤(WHO III~IV)的平均生存时间仅有 12~15 个月. 此外, 超过 50%的 WHO II 级胶质瘤会在 5~10 年内转变为高级别胶质瘤^[1,2]. 目前, 人们在胶质瘤恶性进展机制等方面开展的研究, 主要集中在基因和蛋白质水平上. 研究发现, 1p19q 基因的联合缺失(loss of heterozygosity of 1p19q)^[3]以及 IDH1^[4]、MGMT^[5]等基因突变与恶性胶质瘤的进展和预后密切相关. 仅仅是基因和蛋白质的变化, 并不能完全解释胶质瘤恶性进展过程中细胞恶性转化的分子机制. 代谢物处于基因和蛋白质的下游, 是基因和蛋白质功能变化的最终反映. 胶质瘤恶性进展伴随着癌细胞代谢改变, 但可以反映胶质瘤细胞恶性转化的代谢物信息和分子机制目前知之甚少. 从代谢层面上考察胶质瘤细胞恶性转化的研究, 将有助于阐明胶质瘤恶性进展的分子机制, 探索靶向代谢途径治疗恶性胶质瘤的新策略. 因此, 本研究利用 600 MHz ¹H NMR 对两种不同恶性程度的胶质瘤细胞系 CHG5 和 U87 的代谢轮廓进行分析, 寻找差异性代谢物, 重点探讨与胶质瘤细胞恶性程度相关的细胞代谢变化.

1 实验材料和方法

1.1 细胞培养

恶性胶质瘤细胞系 CHG5 和 U87 使用含血清 10%的 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)完全培养基培养. 培养箱条件为: 相对湿度 95%、O₂ 95%、CO₂ 5%, 37℃恒温. 1 d~2 d 给予细胞换液, 3 d 进行传代, 使用混合消化液[0.02% EDTA (乙二胺四乙酸二钠)+0.25% 胰蛋白酶]消化 2 min 后, 收集细胞离心 1 000 rpm, 3 min, 细胞计数, 将 10⁶的细胞接种在培养皿中, 培养 48 h.

1.2 制备细胞萃取液

利用直接刮取法制备细胞萃取液: 倒掉细胞培养液, 在培养皿中加入 2 mL 冷甲醇(-20 ℃), 将细胞灭活后, 刮离培养皿. 按 4:4:2.85 的比例往细胞甲醇混合液中加入 2 mL 氯仿和 1.95 mL 的超纯水. 漩涡振荡 5 min, 静置 15 min; 离心 10 000~14 000 rpm, 4℃, 30 min, 分为两层. 本实验只对水溶性代谢物进行分析. 在进行 NMR 分析前, 使用氮吹仪将上层液体的溶剂(甲醇/水)全部吹干, 重新加入 500 μL D₂O 和 50 μL D₂O 配制的磷酸缓冲液(1.5 mol/L KH₂PO₄, pH=7.4, 含 0.1% TSP), 混合均匀后在 14 000 g, 4℃条件下, 离心 15 min. 随后取上清 500 μL 加入到 5 mm 的核磁管中进行分析.

1.3 核磁共振波谱分析

所用谱图采集都在 Bruker Avance III 600 型谱仪上完成, 实验温度是 298 K. 一维

氢谱采用的脉冲序列为 $[(RD)-90^\circ-t_1-90^\circ-\tau_m-90^\circ-ACQ]$ (Bruker Biospin pulse program library). 其中 $t_1=6.6 \mu s$, $\tau_m=120 \text{ ms}$. 水峰压制在等待时间 (relaxation delay, RD , 3 s) 中进行. 数据采集点 (TD) 32 k, 谱宽 (SW) 为 10 kHz, 累加次数 (NS) 为 256 次, 空采次数 (DS) 16 次. 使用 Topspin2.1 (Bruker Biospin, Germany) 处理谱图, FID (free induction decay) 信号在傅里叶变化之前进行指数窗函数处理 ($1b=0.3 \text{ Hz}$), 变换后的 ^1H NMR 谱图以 TSP 定标.

1.4 数据分析

使用 MestReNova6.5 (Mestrelab Research S.L, Spain) 对样品进行手动相位和基线校正, 然后分段积分. ^1H NMR 谱中的积分区域为 0.8~9.5, 为了消除水对积分的影响, 去除谱图中 4.5~5.5 区域, 积分宽度 (bin) 为 0.003^[6]. 积分后的数据导出保存成 ASC II 格式, 以谱图总面积对积分面积进行归一化得到 X 矩阵. 将 X 矩阵数据导入到 SIMCA-P12⁺ 软件 (Umetrics Inc., Umea, Sweden) 进行主成分分析 (PCA)^[7] 和偏最小二乘分析 (PLS-DA)^[8]. 将 X 矩阵数据导入到 MATLAB2011b (MathWorks, USA), 使用 MATLAB 生物信息学工具箱 (bioinformatics toolbox) 中提供的分层聚类函数 clustergram, 得到样品分类的系统树图和 Heatmap 图. 差异性代谢物寻找, 主要通过 7 次循环交互验证 (7-fold cross validation) 和响应排序验证 (response permutation testing, RPT), 验证 PLS-DA 模型的可靠性, 再进行差异性变量 (bin) 的筛选. 筛选标准主要依据第一预测主成分 (predictive component) 的变量权重重要排序 (variable importance in projection, VIP) 值和载荷权重 (loading weights) 和相关系数 (correlation coefficients, Pcorr).

2 结果与讨论

2.1 CHG5和U87细胞萃取液中代谢物信号检测

CHG5 和 U87 两种胶质瘤细胞系来源于不同恶性程度的胶质瘤组织, 因此具有不同的恶性特性. CHG5 来源于 WHO II 级的胶质瘤组织, U87 来源于 WHO IV 级的胶质瘤组织. 利用 Bruker Avance III 600 谱仪对 CHG5 和 U87 两种细胞萃取液进行检测, 获得的 NMR 谱如图 1. 从谱图上可以看出, 细胞萃取液的 NMR 谱中含有丰富的代谢物组成信息. 两种细胞相比, 虽然没有新谱峰产生, 但部分谱峰在面积上存在差异, 这表明两种细胞萃取液的代谢物浓度存在一定差异. 在实验中, 我们做了大量的预试验对细胞萃取液的稳定性和重复性进行比较. 结果显示在相同接种浓度和培养时间条件下, 同一种细胞萃取液的核磁谱图稳定性和重现性良好. 该结果说明, 在相同的培养条件下, 同种细胞可以维持较为稳定的代谢模式. 因此, 不同种细胞在相同培养条件下的代谢模式差异具有可比性.

选用临床患者体液或瘤组织样本进行胶质瘤病理分级相关的代谢组学研究, 往往会存在样本个体因素 (如年龄、饮食、服药等) 或者瘤组织细胞异质性等因素影响肿瘤代

代谢物的测定和差异性代谢物的判别. 直接以培养的肿瘤细胞为对象, 进行代谢组学研究, 可以排除体液和组织样本异质性的缺点, 还具有可控性、稳定性高、重复性好等优点. 因此, 从肿瘤细胞本身获得的代谢信息, 可以成为临床患者体液或瘤组织样本代谢组学的研究重要前提和有益补充.

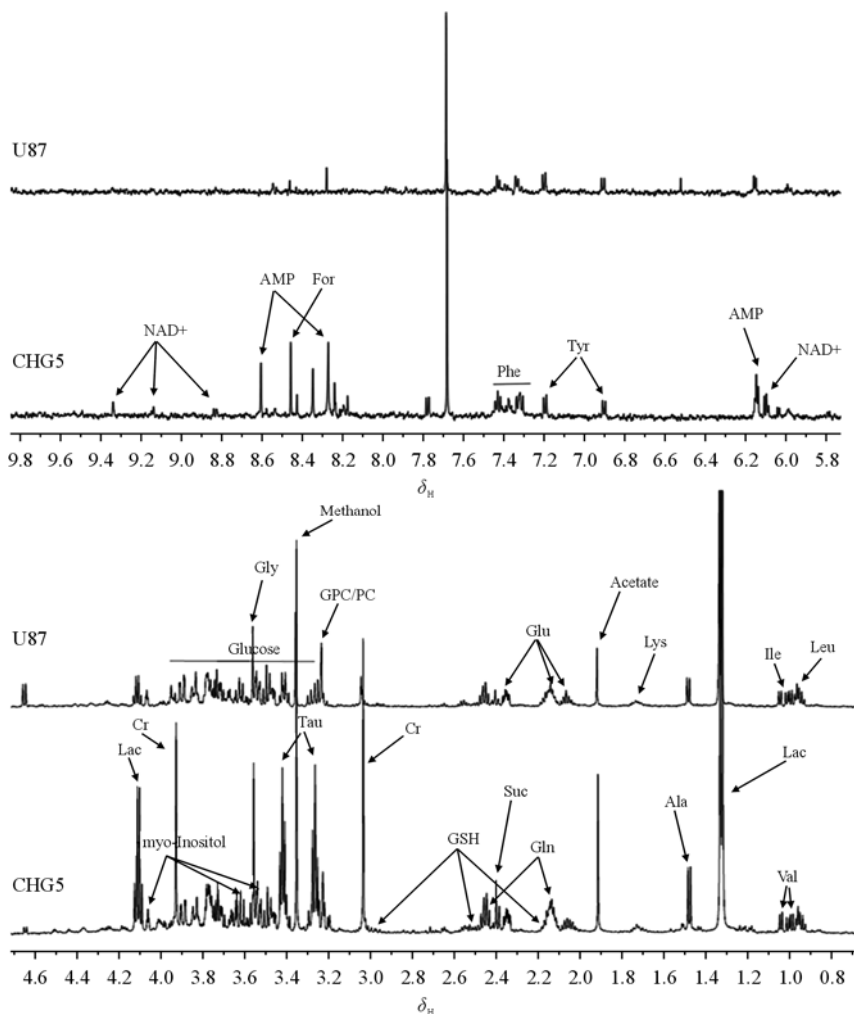


图 1 CHG5 和 U87 的 ^1H NMR 谱图

Fig.1 ^1H NMR spectra of CHG5 and U87 cells

2.2 CHG5 和 U87 的主成分分析和聚类分析

为了观察两种细胞萃取液代谢轮廓是否存在分离趋势, 进行了无监督的 PCA 分析和聚类分析. PCA 结果如图 2. 两种细胞萃取液的每个样品点都落在 95%置信区间的 Hotelling's T_2^2 的椭圆形中. PCA 图上, 可以看到两种样本的分布存在以下趋势: 在第一主成分上 (PC1), 同一种细胞的平行样品点落在极为相近的区域, 不同细胞的样品点之间具有分离趋势. U87 的样本点主要落在左侧 PC1 值较小的区域, CHG5 则落在

右侧 PC1 值较大的区域. 这种分布表明不同恶性程度的胶质瘤细胞的代谢轮廓存在明显差异.

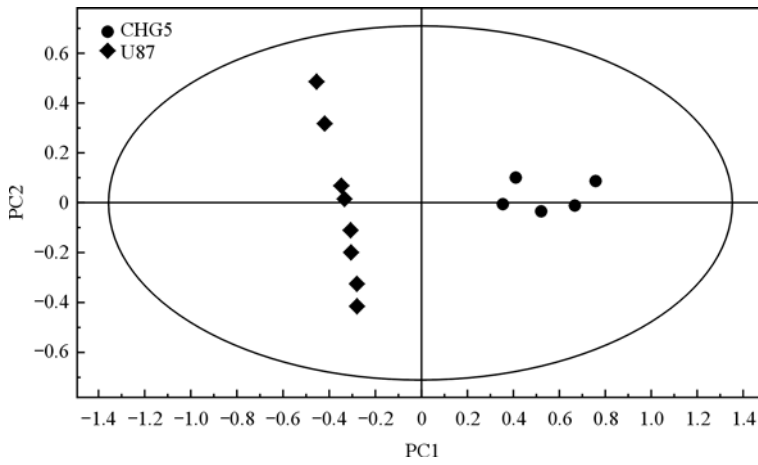


图 2 CHG5 和 U87 的 PCA 散点图
Fig.2 PCA score plot for CHG5 and U87 cells

聚类分析结果如图 3. 根据样本谱峰的 *bin* 值, CHG5 (5 个样本点) 和 U87 (8 个样本点) 可以很好的聚成 2 类. 聚类分析结果再次表明不同恶性程度的胶质瘤细胞的代谢轮廓存在明显差异.

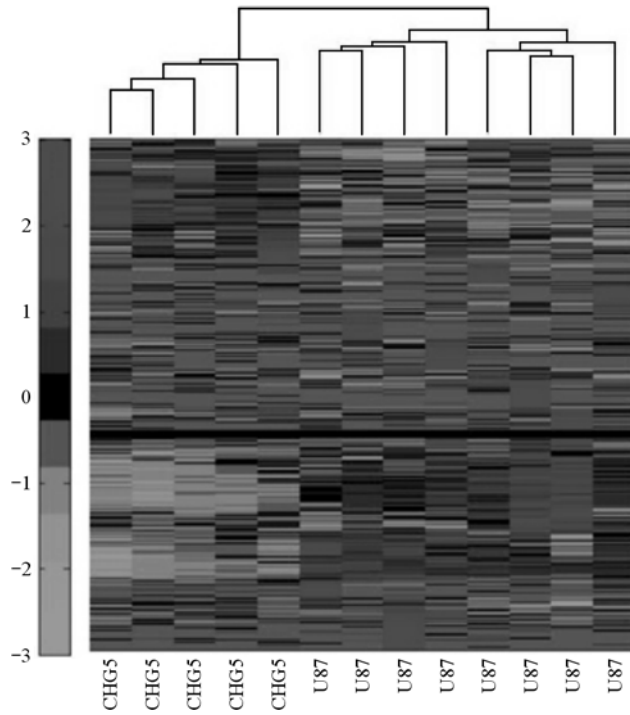


图 3 CHG5 和 U87 细胞代谢物聚类分析图
Fig.3 Clustering analysis of CHG5 and U87 cells

在无监督分析之后,又通过有监督的偏最小二乘判别分析(PLS-DA)进一步验证分类结果的可靠性. PLS-DA 得分图如图 4(a), 该结果表明在以第一主成分和第二主成分构成的空间 ($tp[1] / tp[2]$) 里, CHG5 和 U87 的样本点可以较好区分. 置换排列验证结果如图 4(b), 该结果表明分类模型没有出现拟合现象, 具有很好的数据预测能力.

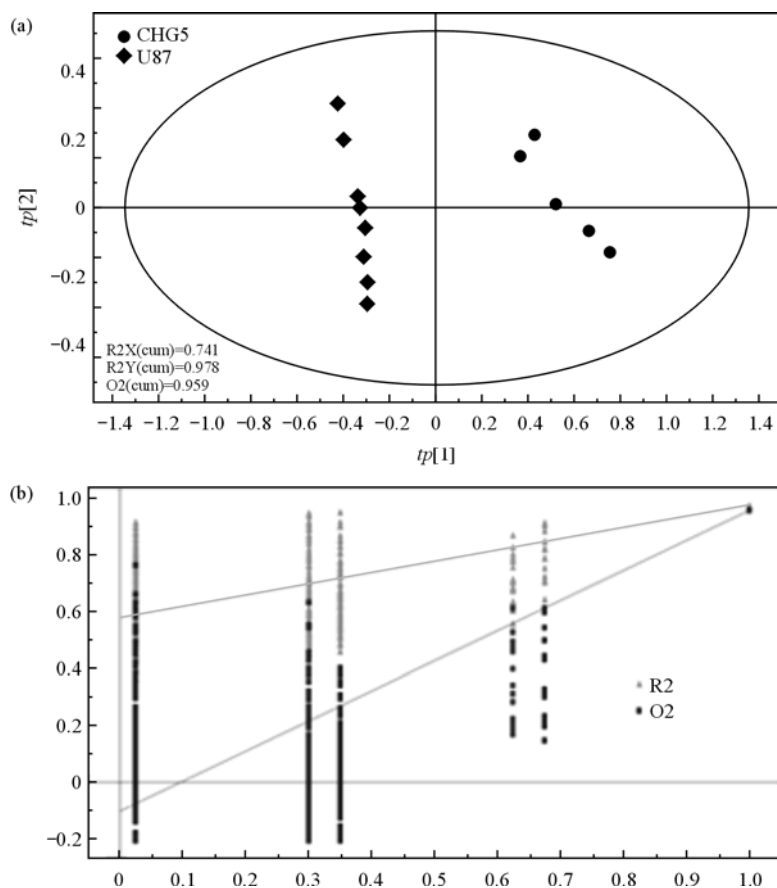


图 4 CHG5 和 U87 的 PLS-DA 分析. (a) PLS-DA 得分图; (b) 置换排列验证图

Fig.4 PLS-DA analysis of CHG5 and U87 cells. (a) PLS-DA score plots; (b) Permutation test

2.3 CHG5 和 U87 的差异性代谢物分析

两种胶质瘤细胞萃取液的代谢谱图可以明显区分. 在良好的分类模型基础上, 通过计算第一预测组分的 VIP 值和相关系数 $|r|$, 进一步寻找引起模型差异的代谢物, 并对变化显著的代谢物进行指认和归属. OPLS-DA 的 loading 图显示 (图 5), 共有 21 种代谢物变化较为显著. 这些差异性代谢物主要包含氨基酸、糖、有机酸、胆碱等多类物质, 主要涉及三羧酸循环、糖酵解、氨基酸合成与降解等代谢途径.

利用峰面积积分, 对这些物质进行相对浓度定量. 我们发现在高恶性程度的 U87 细胞的萃取液中, 柠檬酸盐 (citrate)、延胡索酸盐 (fumarate)、葡萄糖 (glucose)、

谷氨酸盐 (glutamate)、谷氨酸 (glutamine)、甘油磷脂酰胆碱 (GPC)、谷胱甘肽 (GSH)、异亮氨酸 (isoleucine)、亮氨酸 (leucine)、赖氨酸 (lysine)、肌醇 (myo-Inositol)、苯丙氨酸 (phenylalanine)、苏氨酸 (threonine)、酪氨酸 (tyrosine)、缬氨酸 (valine) 等 15 种代谢物有上升趋势; 而丙氨酸 (alanine)、乳酸盐 (lactate)、牛磺酸 (taurine)、甲酸盐 (formate)、肌酸 (creatine)、乙酸盐 (acetate) 等 6 种代谢物有下降趋势。

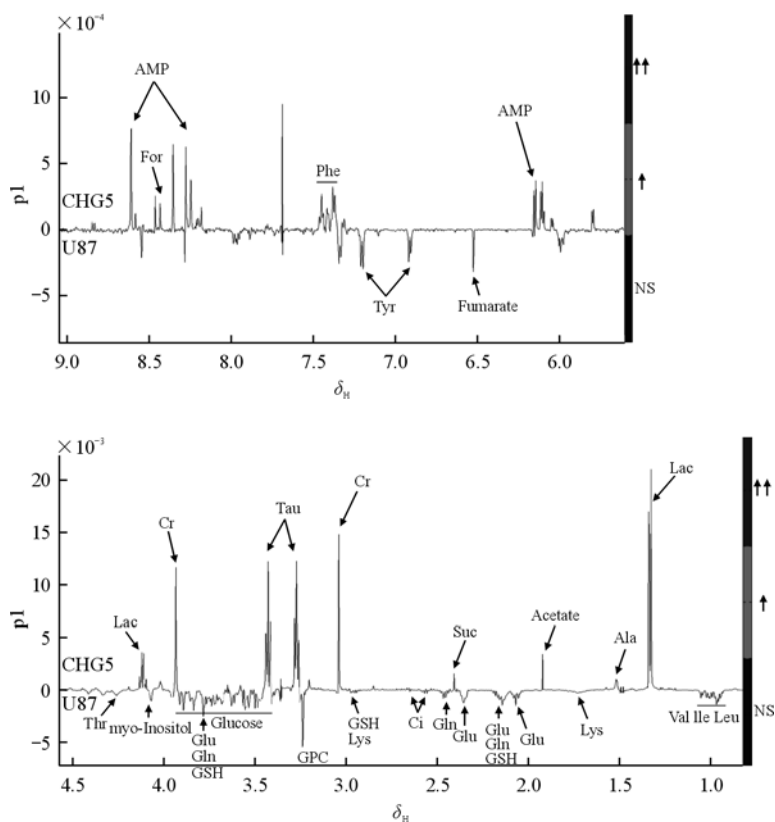


图 5 CHG5 和 U87 的相关系数载荷图

Fig.5 Loading plot of CHG5 and U87 cells

注: (↑↑) 是 $|r| > 0.684$ & $VIP > 1$; (↑) 是 $0.553 < |r| < 0.684$ & $VIP > 1$;

(NS) 表示 $VIP < 1$ or $|r| < 0.533$, 对应的峰没有差异。

这些差异性代谢物大部分与体液或组织样本得到的结果相类似^[9], 但是最为明显不同的是乳酸. 研究表明, 与正常组织相比, 肿瘤组织处在缺氧的状态, 瘤细胞进行糖酵解, 会产生大量乳酸^[10,11]. 利用 ^1H MRS 在不同级别的胶质瘤组织中均可以检测到乳酸峰. 有趣的是, 我们的结果显示在高恶性程度的胶质瘤细胞 U87 萃取液中乳酸的含量明显降低. 有文献报道胶质瘤细胞可以通过单羧酸转运蛋白 MCTs(monocarboxylate transporters)快速将乳酸排到其所处的微环境中去, 如果阻止乳酸的转运, 将会导致瘤细胞侵袭能力下降并诱导凋亡^[12]. 因此可以推测高恶性程度的胶质瘤细胞转运或

者消耗乳酸的能力更强, 该种细胞可能将大量乳酸排到细胞外, 保持细胞内乳酸在较低水平, 从而维持高侵袭能力和抗凋亡能力. 此外, 图 5 显示牛磺酸和肌酸的变化也非常显著. 根据文献报道, 牛磺酸具有调节细胞渗透压, 参与细胞凋亡和抗氧化等多种生理功能. U87 细胞中牛磺酸含量降低, 很可能与其抗凋亡和抗氧化功能增强相关, 在后续研究中我们将进一步对此进行验证. 肌酸是细胞能量存储和利用的重要化合物. 其浓度在能量代谢减退时增加, 而在能量代谢增加时降低. U87 细胞中肌酸含量降低很可能与其能量代谢改变有关.

4 结论

本工作利用 NMR 技术分析两种不同恶性程度的胶质瘤细胞的代谢轮廓, 指认了两种胶质瘤细胞的差异性代谢物. 主要得到以下结论: 不同恶性程度的胶质瘤细胞系具有明显的代谢模式差异. 找到导致代谢模式差异的差异性代谢物 21 种. 通过两种胶质瘤细胞找到的差异性代谢物很可能与细胞的恶性特性相关. 尽管如此, 进一步明确上游基因和蛋白质对这些恶性特性相关代谢物的调控关系, 成为我们下一步研究的重点.

参考文献:

- [1] Maher E A, Furnari F B, Bachoo R M, *et al.* Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter[J]. *Genes Dev*, 2001, 15(11): 1 311—1 133.
- [2] Compostella A A, Tosoni V, Blatt, *et al.* Prognostic factors for anaplastic astrocytomas[J]. *J Neurooncol*, 2007, 81(3): 295—303.
- [3] Reifenberger J G, Reifenberger L, Liu, *et al.* Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p[J]. *Am J Pathol*, 1994, 145(5): 1 175—1 190.
- [4] Borodovsky A, Seltzer M J, Riggins G J. Altered cancer cell metabolism in gliomas with mutant IDH1 or IDH2[J]. *Curr Opin Oncol*, 2012, 24(1): 83—9.
- [5] Brandes A A, Franceschi E, Tosoni A, *et al.* MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(13): 2 192—2 197.
- [6] Craig A, Cloarec O, Holmes E, *et al.* Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabolomic data sets[J]. *Anal Chem*, 2006, 78(7): 2 262—2 267.
- [7] Pérez-Enciso M, Tenenhaus M. Prediction of clinical outcome with microarray data: a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) approach[J]. *Hum Genet*, 2003, 112(5-6): 581—592.
- [8] Chinnaiyan P, Kensicki E, Bloom G, *et al.* The metabolomic signature of malignant glioma reflects accelerated anabolic metabolism[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(22): 5 878—5 888.
- [9] Weljie A M, Bondareva A, Zang P, *et al.* ¹H NMR metabolomics identification of markers of hypoxia-induced metabolic shifts in a breast cancer model system[J]. *J Biomol NMR*, 2011, 49(3-4): 185—193.
- [10] Cuperlovic-Culf M, Culf A S, Touaibia M, *et al.* Targeting the latest hallmark of cancer: another attempt at 'magic bullet' drugs targeting cancers' metabolic phenotype[J]. *Future Oncol*, 2012, 8(10): 1 315—1 315.
- [11] Colen C B, Shen Y, Ghodoussi F, *et al.* Metabolic targeting of lactate efflux by malignant glioma inhibits invasiveness and induces necrosis: an *in vivo* study[J]. *Neoplasia*, 2011, 13(7): 620—632.

Metabolic Profiles of CHG5 and U87 Glioma Cell Lines Derived by ^1H NMR

*SHAO Wei*¹, *GU Jin-ping*¹, *HUANG Cai-hua*², *HUANG Zi-cheng*¹,
JI Tian-hai^{1*}, *LIN Dong-hai*^{1*}

(1. Chenggong Hospital and College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China;
2. Research institute of Exercise and Rehabilitation, Fujian Medical University, Fuzhou 351009, China)

Abstract: Gliomas are the most common malignant tumors. The lack of detailed information on the progression of gliomas make their clinical diagnosis and treatment a challenging endeavor. In this study, the metabolic profiles of two glioma cell lines (i.e., CHG5 and U87) with different malignancy were analyzed by ^1H NMR. The results showed that there were significant differences in the metabolic profiles of these two cell lines. High levels of 15 metabolites including citratate, and lower levels of 6 metabolites including lactate and taurine were found in the CHG5 cell line, compared to the U87 cell line. The findings of this study suggested that metabolic profiles of glioma cell lines could be associated with their malignant features, thus may potentially be used as a measure in elucidating the molecular mechanisms underlying the progression of gliomas and in the development of non-invasive markers for monitoring of gliomas.

Key words: ^1H NMR, metabolic profile, metabolite, glioma cell lines, malignant features

*Corresponding author: JI Tian-hai, Tel: 0592-6335844, E-mail: kysea-ji@sina.com; LIN Dong-hai, Tel: 0592-2186078, E-mail: dhlin@xmu.edu.cn.