

基于液质联用技术分析肿瘤细胞中的核苷酸

李竑¹, 鲁家骏¹, 严雅琴¹, 陈铭¹

(1.中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200031)

摘要: 核苷酸的过度合成和使用是泛肿瘤细胞的一个普遍代谢特征。细胞内核苷酸的超生理丰度与肿瘤细胞的许多行为密切相关, 包括不受控制的增殖、免疫逃避、转移和化疗抗性。利用高灵敏度的液相色谱-质谱联用仪, 我们可以及时并迅速地对胞内核苷酸代谢异常的信号进行检测分析。但是, 传统的反相色谱体系并不能有效地分离这些强极性的核苷酸代谢物, 因此, 离子交换色谱、离子对色谱、亲和色谱、石墨化碳色谱以及毛细管电泳等被用来进行核苷酸的检测分析。本项研究工作报道了一种基于石墨化碳作为固定相的色谱耦联电喷雾质谱, 并同时对其携带多个磷酸基团的代谢物进行定量分析的有效方法。

关键词: 核苷酸; 肿瘤细胞; 石墨化碳色谱法; 质谱法

中图分类号: (请在 <http://www.ztflh.com> 查询) **文献标识码:**

Direct quantification of intracellular pan-cancer metabolic dependent nucleotides by HPLC-coupled Tandem mass spectrometry

Li Hong¹, Lu Jiajun¹, Yan Yaqin¹, Chen Ming¹

(1. Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200031, China)

Abstract: Hyperactive alteration of nucleotide metabolites (NMs) is a universal feature of cancer cells across different cancer types. Determinants associated with aggressive behaviors of cancer cells, such as uncontrolled proliferation, chemotherapy resistance, immune evasion and metastasis, rely heavily on augmented nucleotide metabolism. The early and rapid detection of nucleotide metabolites when present in too high quantities, or containing certain modifications that are not common in wide types, are many triggered by LC-MS techniques. Due to their high polarity, chromatographic separation of NMs is challenging using traditional C₁₈ columns in reverse phase chromatography. Therefore, alternative approaches are used for the chromatographic retention of NMs, which can be accomplished by IEX, IP, hydrophilic interaction (HILIC), porous graphitic carbon (PGC) chromatography, or capillary electrophoresis (CE). This work presents a simultaneous determination of nucleosides and their mono-, di- and triphosphates using a PGC

stationary phase coupled with electrospray mass spectrometry. The applicability of the method was evaluated in pan-cancer cells, from which pyrimidine-containing nucleosides and nucleotides were successfully separated. Principle component analysis (PCA) showed that UTP was responsible for most of the variance. A comprehensive understanding of the complexity of PGC chromatography was also demonstrated in this study.

Keywords: Nucleotides, cancer cells, porous graphitic carbon (PGC) chromatography, Mass spectrometry

1 研究背景

核酸是细胞内携带遗传信息的物质，基本结构是核苷酸，它们的性质和数量的改变与基因功能密切相关。随着生命科学研究的不断深入，核苷酸的检测分析手段越来越多，包括质谱法、液相色谱法与紫外/质谱联用法、离子对色谱与离子交换色谱法、毛细管电泳与紫外/质谱联用法，以及近几年发展起来的亲水作用色谱和多孔石墨化碳色谱与质谱联用技术等。由于嘧啶核苷酸的极性非常强，含有一个或者多个磷酸基团，并且相对分子质量非常接近，因此如何有效地对这些的嘧啶核苷酸进行分离和分析仍然是个很大的挑战。

石墨化碳 (PGC) 色谱柱中的固定相具有不同于硅胶基质固定相的独特性质，它们由网状交织的石墨带组成。石墨带是一种导电晶体材料，在带负电荷的磷酸基团和 PGC 柱石墨表面的 π -电子之间形成电荷诱导偶极。这种电荷诱导的相互作用促进了极性或非极性分析物如核苷酸的保留。对于非极性化合物，它们也可以通过与流动相以及石墨化碳晶状结构表面所产生的色散力而被保留在色谱柱上，化合物的极性越弱，保留越强。因此，这些与 PGC 色谱柱结合的极性或非极性化合物的过度保留都有可能造成色谱柱的污染，从而导致高度结晶的多孔石墨化碳表面的结合力受损，表现出保留时间的不可重复性[1-3]。这种不可预测的色谱行为严重限制了 PGC 柱的适用性，尽管它对极性化合物的保留率和选择性明显高于硅胶基质作为固定相的反相色谱柱。

但是，PGC 色谱法基于它独特的疏水和电子云保留机理，而能够以超凡能力保留强极性化合物并分离结构性质接近的化合物。用于 PGC 色谱法的许多溶剂和添加剂能够很好地与质谱兼容，避免了高盐浓度或离子对试剂的使用，而这些高盐浓度或离子对试剂却分别是离子对色谱 (IEX) 和离子对试剂 (IP) 色谱所必需的。此外，PGC 的色谱分离行为更类似于传统的反相色谱法 (峰形对称性好、保留时间稳定)，因此相对于 HILIC 方法中经常出

现的色谱柱与基质组分过载（峰畸变、峰分裂和保留时间漂移）的典型问题，PGC 色谱法具有更大的优势。此外，在本研究工作中，由于单磷酸胞苷（CMP）和单磷酸尿苷（UMP）可能会受到三磷酸胞苷（CTP）和三磷酸尿苷（UTP）的源内裂解产生相同离子信号的干扰，影响定量的准确性，因此有必要利用反向洗脱顺序保证单磷酸核苷的出峰时间在二磷酸和三磷酸核苷之前[4-7]。综上所述，内源性核苷和核苷酸在定量分析上带来的保留和分离难题，可以用本研究工作中优化得到的 PGC 方法来很好地解决。

2 实验方法

2.1 仪器

安捷伦 1260 液相色谱仪（LC），配备四元泵和温控自动进样器；安捷伦 6495B 三重四极杆质谱仪，配备 AJS ESI 离子源；带制冷装置的组织均质器；带制冷装置的 SpeedVac 真空旋转浓缩仪。

2.2 试剂和耗材

PGC Hypercarb 柱（内径 3.0mm×150mm，粒径 3 μ m，Thermo Scientific），配有保护柱（3.0mm I.D.×10mm，粒径 3 μ m，Thermo Scientific）。

标准品均购自 Sigma 公司（CAS 编号 65-46-3，含量 \geq 99%）；5'-单磷酸胞苷（CAS 编号 63-37-6，含量 \geq 99%）；5'-二磷酸胞苷（CAS 编号 C9755，含量 \geq 95%）；胞苷 5'-三磷酸：CAS 编号 36051-68-0，含量 \geq 95%）；尿苷（CAS 编号 58-96-8；含量 \geq 99%）；5'-单磷酸尿苷（CAS 编号 3387-36-8；含量 \geq 99%）；5'-二磷酸尿苷（CAS 编号 27821-45-0，含量 \geq 96%）；5'-三磷酸尿苷（CAS 编号 19817-92-6，含量 \geq 96%）

甲醇（CAS 编号 67-56-1，用于 LC-MS 的 Hypertrade, Merck）；乙腈（CAS 编号 75-05-8，用于 LC-MS 的 Hypertrade, Merck）；乙酸铵（CAS 编号 631-61-8，用于质谱分析，含量 \geq 99%，Sigma）；氢氧化铵（CAS 编号 1336-21-6，29%单一金属，10ppb，Adamas-beta）

2.3 建立标准曲线

将 NMs（100mM）的储存液溶解在 100%水溶液，进行倍数稀释后制备标准曲线。选择的浓度范围为：胞苷和胞苷二磷酸的浓度范围为 1.5625 μ M 至 100 μ M；胞苷单磷酸、胞苷三磷酸、尿苷和尿苷二磷酸的浓度范围为 3.125 μ M 至 200 μ M；尿苷单磷酸和尿苷三磷酸的浓度范围为 12.5 μ M 至 800 μ M。根据 LC 峰面积与浓度相关的构建 8 种标准品的标准曲线（图 1）。

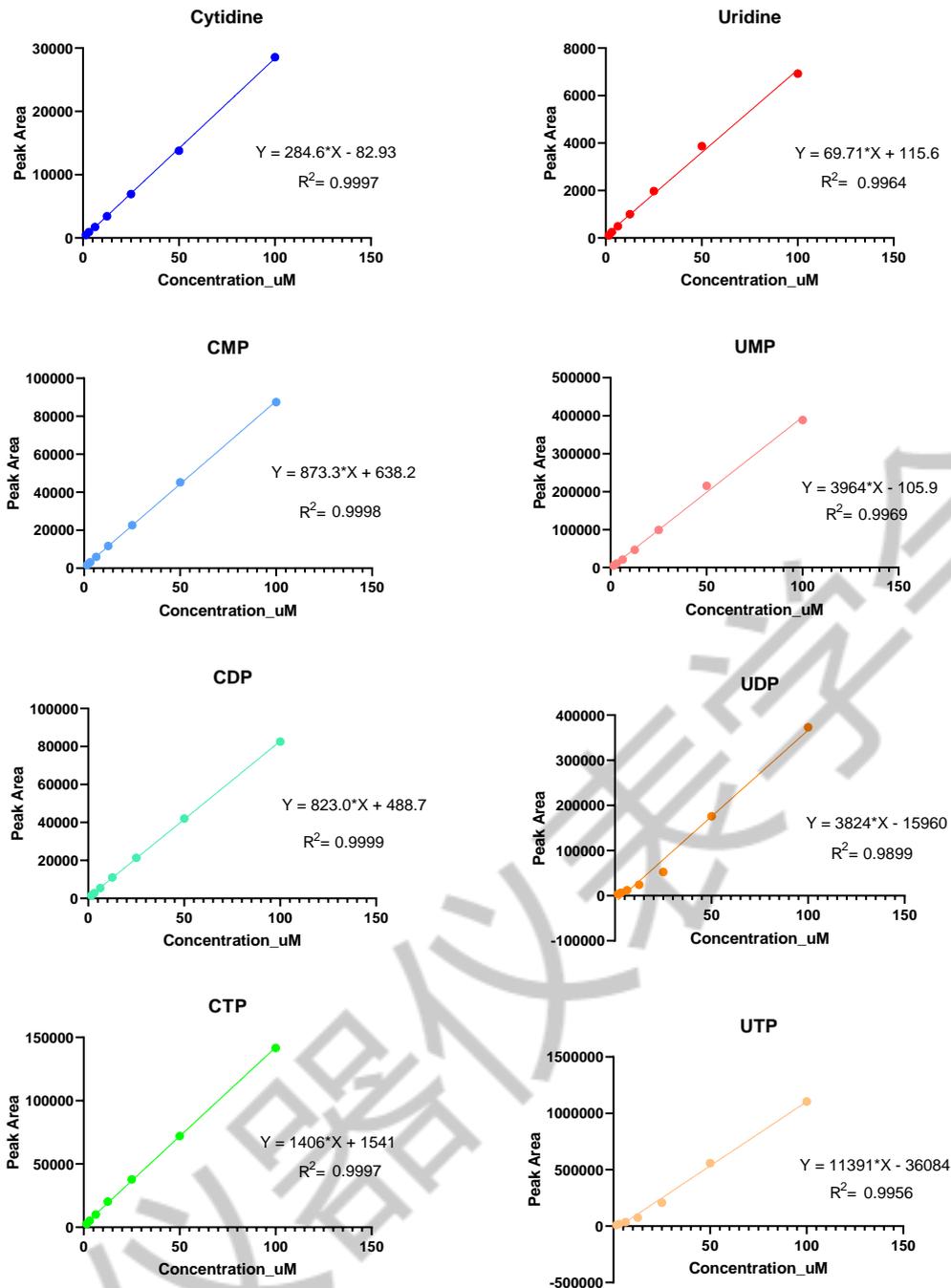


图 1 核苷和核苷酸的标准曲线

2.4 样品提取

本研究中的细胞系均购自中国科学院分子细胞科学卓越中心细胞库。具体的样本信息如表 1 所示。提取前用自动细胞计数器对人宫颈癌 HeLa 细胞 (HeLa 细胞) 进行计数 (密度 $>10^7$ cell / mL)。将培养上清液转移到 2mL 离心管中, 4°C 条件下 300 g 离心 10 分钟, 以收集可能从培养皿上脱落并存在于上清液中的细胞。随后, 完全去除上清液并保留细胞沉淀。用 0.25% 胰蛋白酶酶解细胞 1-3 分钟, 之后快速去除胰蛋白酶, 并用预冷的 PBS 溶液和 100mM 乙酸

铵漂洗两次。将细胞培养皿置于干冰上，加入-80°C 下预冷的 300 μ L 提取溶液（100% 甲醇）提取代谢物。将 300 μ L 提取溶液中的裂解细胞转移到前述的 2 mL 离心管中。在-80°C 下孵育过夜，以充分沉淀细胞裂解物的蛋白质。再加入 80 μ L H₂O 稀释，并在 4°C 下以 13000 rpm 离心 10 分钟。转移上清液到新的离心管中。最后使用真空浓缩仪在 4°C 下，浓缩至干燥的白色/红色颗粒。将颗粒重新溶解在 100 μ L ACN:H₂O（1:1, v/v）中。重旋两次，持续 10 秒，并将 50 μ L 溶液转移到玻璃进样瓶中，尽快上机检测分析。

本研究中的食管鳞状细胞癌组织获得了中国科学院分子细胞科学卓越中心研究伦理委员会的批准（2023091）。通过使用配备制冷装置的冷冻研磨仪对快速冷冻的肿瘤组织进行均质化处理（研磨腔体温度-35°C），采用 3mm 氧化锆珠将组织匀浆成细粉末，然后加入 100% 甲醇提取溶液（500 μ L），并在-80°C 下孵育过夜，以充分沉淀组织裂解所产生的蛋白质。4°C、13000rpm 离心 10 分钟后，将 450 μ L 无蛋白上清液（含 NMs）转移到新的离心管中，4°C 下浓缩干燥。加入 100 μ L ACN:H₂O（1:1, v/v）重溶，并转移 50 μ L 溶液到带内插管的样品瓶中，冻存在-80°C 或者立即上机检测。

注意：在分析过程中，样品需要始终保持在 4°C。

表 1 HeLa 细胞样本的生物特征数据

样本名称	样品类型	组别
HeLa NMs 1-1, 1-2, 1-3	control	1
HeLa NMs 2-1, 2-2, 2-3	KD	2
HeLa NMs 3-1, 3-2, 3-3	WT	3
HeLa NMs 4-1, 4-2, 4-3	mutant 1	4
HeLa NMs 5-1, 5-2, 5-3	mutant 2	5
HeLa NMs 6-1, 6-2, 6-3	mutant 3	6
HeLa NMs 7-1, 7-2, 7-3	mutant 4	7
HeLa NMs 8-1, 8-2, 8-3	mutant 5	8
HeLa NMs 9-1, 9-2, 9-3	mutant 6	9

2.5 检测分析

样品的检测采用液质联用分析系统（LC/MS QQQ）。液相色谱方法里所用到的溶剂和梯度洗脱如表 2 和表 3 所示。

质谱离子源参数如下：干燥气和鞘气温度分别设置为 280°C 和 300°C；流速均设定为 12 L/min；喷雾器压力为 25 psi；毛细管电压 3000V；喷嘴电压 1500V；高压和低压离子漏斗的 RF 电压幅度分别为 150V 和 60V。MRM 参数如表 4 所示。数据采集方式为负离子模式。MRM 采集参数如表 4 所示。

表 2 PGC 柱上预处理和分离的步骤

步骤	流动相	时间	效应
1. 预处理	分别含 0.1% 甲酸的水和 95% 乙腈	60 分钟	恢复 PGC 柱晶状表面对核苷酸的选择性结合
2. 预处理	95% 甲醇	5 分钟	提供所有待测物的结合表面
3. 梯度洗脱	流动相 A 和 C	18 分钟	破坏 PGC 表面高水相产生的带电偶极
4. 维护	流动相 B	4 分钟	维持原有的保留能力

表 3 液相色谱中使用的流动相和梯度洗脱方法

时间 (分钟)	A (20mM 乙酸铵, 2.5% 乙腈, pH=9.5)	B (95% 甲醇)	C (100% 乙腈)
0	99	0	1
5	95	0	5
15	70	0	30
16	10	0	90
18	10	0	90
18.1	0	100	0
22	0	100	0
22.1	99	0	1

表 4 质谱方法中 MRM 采集参数的设置

化合物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压 (volt)
胞苷	242	109	-16
胞苷单磷酸	322	79	-28
胞苷二磷酸	402	159	-30
胞苷三磷酸	482	159	-30
尿苷	243	110	-15
尿苷单磷酸	323	79	-28
尿苷二磷酸	403	159	-30
尿苷三磷酸	483	159	-32

2.6 数据分析

液相色谱图中色谱峰峰面积的积分计算采用安捷伦 MassHunter 定量分析软件（适用于 QQQ, B.09.00 版）。

通过 MassHunter 定量分析软件得到的数据进一步采用安捷伦 Mass Profiler Professional (MPP 软件)进行主成分 PCA 和聚类分析。

2.7 方法学验证

在生物学样品的批量检测分析前，分别利用单个 HeLa 细胞样品和食管鳞状细胞癌 (ESCC) 组织样品对检测方法的精密度和稳定性进行评估（表 5）。

由表 5 可知，单个 HeLa 细胞样品和 ESCC 组织样品的相对标准偏差(RSD)均小于 10%。ESCC 样品，分别在 4°C 下储存 0、1、2、4h 的稳定性也非常好，相对标准偏差 (RSD) 均小于 5%。

表 5 精密度和稳定性考察结果

化合物名称	日间精确度 (%)		稳定性(%)
	H1299 (n=3)	ESCC (n=6)	(ESCC, n=4)
胞苷	4.97	4.02	1.34

胞苷单磷酸	2.58	1.56	1.29
胞苷二磷酸	1.78	3.47	3.07
胞苷三磷酸	2.05	3.85	4.59
尿苷	3.03	1.64	1.91
尿苷单磷酸	2.19	2.91	1.76
尿苷二磷酸	1.89	3.75	2.66
尿苷三磷酸	5.15	0.89	1.07

3 结果与讨论

Pabst 等基于 Hypercarb 柱的 LC-MS 检测方法对哺乳动物细胞提取液和植物中的核苷酸进行了很好的分离，并指出新的 PGC 色谱柱在使用前需要过氧化氢还原剂预处理，使用一段时间的 PGC 柱则需要用反冲洗溶剂的强酸/碱缓冲液，如四氢呋喃、丙酮、三氟乙酸盐、盐酸、氢氧化钠再生，并在分析过程中加入了严格的柱平衡和处理步骤，这些操作能够保持最佳分离和再现性，但是操作程序未免有些繁琐[8-9]。本研究优化并验证了一种无需进行柱再生的方法，并成功地将其应用到人宫颈癌症（Hela）细胞中核苷酸的定量分析中。

在运行样品之前，先用含有 0.1% 甲酸的水和含有 0.1% 甲酸（95/5=v/v）的乙腈以 300 μ L/min 的流速对储存在 95% 甲醇中的色谱柱冲洗 60 分钟。之后，用 95% 甲醇进行进一步的预平衡 5 分钟（表 5）。随后用 99% 的流动相 A 和 1% C 平衡 5 分钟。在正式进样前运行 3 到 5 针空白。

流动相 A 的制备使用高浓度的乙酸铵溶液（20mM NH₄AC, pH=9.5）。同时，可以向流动相 A 中添加 2.5-5% 的乙腈以提高 UTP 和 CTP 色谱峰的分离度。所有 8 种化合物的保留顺序依次为：核苷<三磷酸<二磷酸<单磷酸，并且含尿苷的核苷酸比含胞苷的核苷酸更早被洗脱下来。在每次运行中增加关键的维护时间，使用 95% 甲醇清洗 4 分钟，以维持保留时间的一致。这种优化的 PGC 色谱法包括以下三个步骤：步骤 1 和步骤 2 利用含 0.1% 甲酸的高比例水相促进所有分析物结合到柱上；步骤 3 使用乙腈溶液梯度洗脱，通过破坏高比例的水流动相与石墨化碳表面产生的电荷偶极来洗脱分析物，并与石墨化碳表面紧贴产生强烈的色散作用从而保留在晶状结构表面；最后使用 95% 甲醇来确保 PGC 固定相保持在氧化状态以利于获得稳定的保留时间。

由图 3 可见，嘧啶核苷酸的色谱峰基线完全分离，并且携带多个磷酸基团的 CTP 和 UTP 色谱峰对称性良好，没有产生拖尾或者峰过宽的现象。由于尿苷和胞苷及其核苷酸衍生物在

质谱行为上表现出类似的碎裂模式，并且由于同位素丰度的原因，它们的相对分子质量仅相差 1 amu（原子度量单位）（图 2），因此这些化合物在色谱柱上的充分分离在很大程度上避免了由于色谱峰分不开导致的误差，保证了定量分析的准确性。

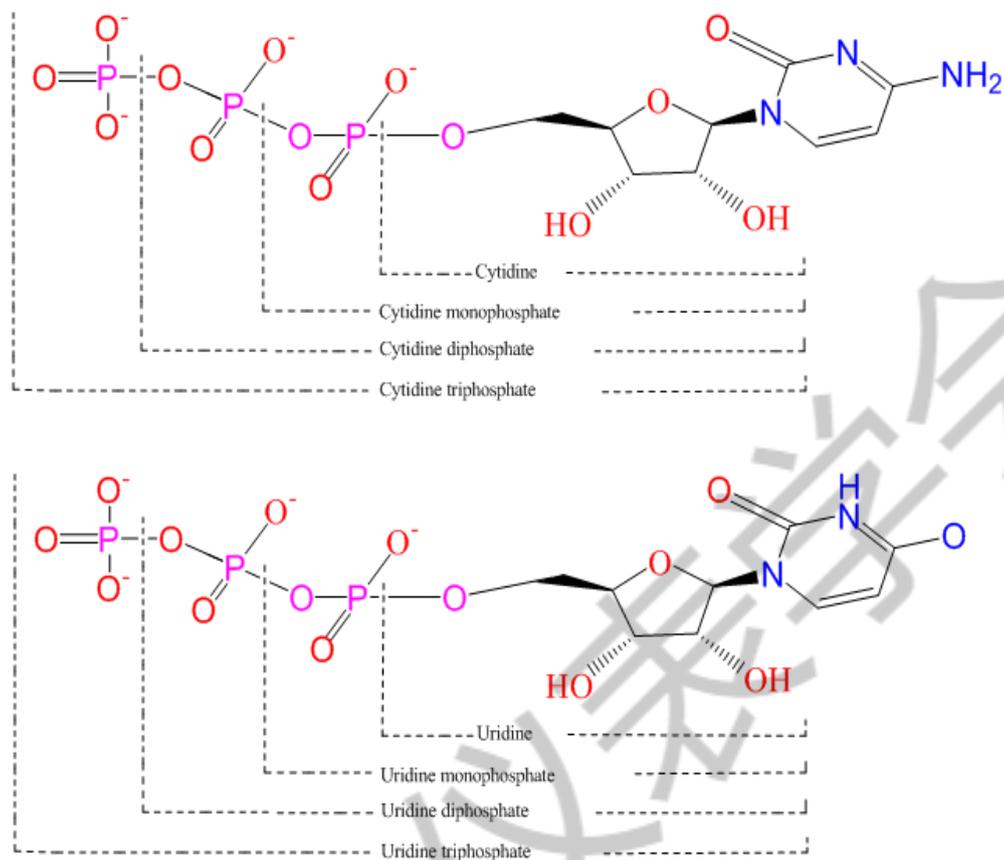


图 2 嘧啶核苷酸的化学结构式

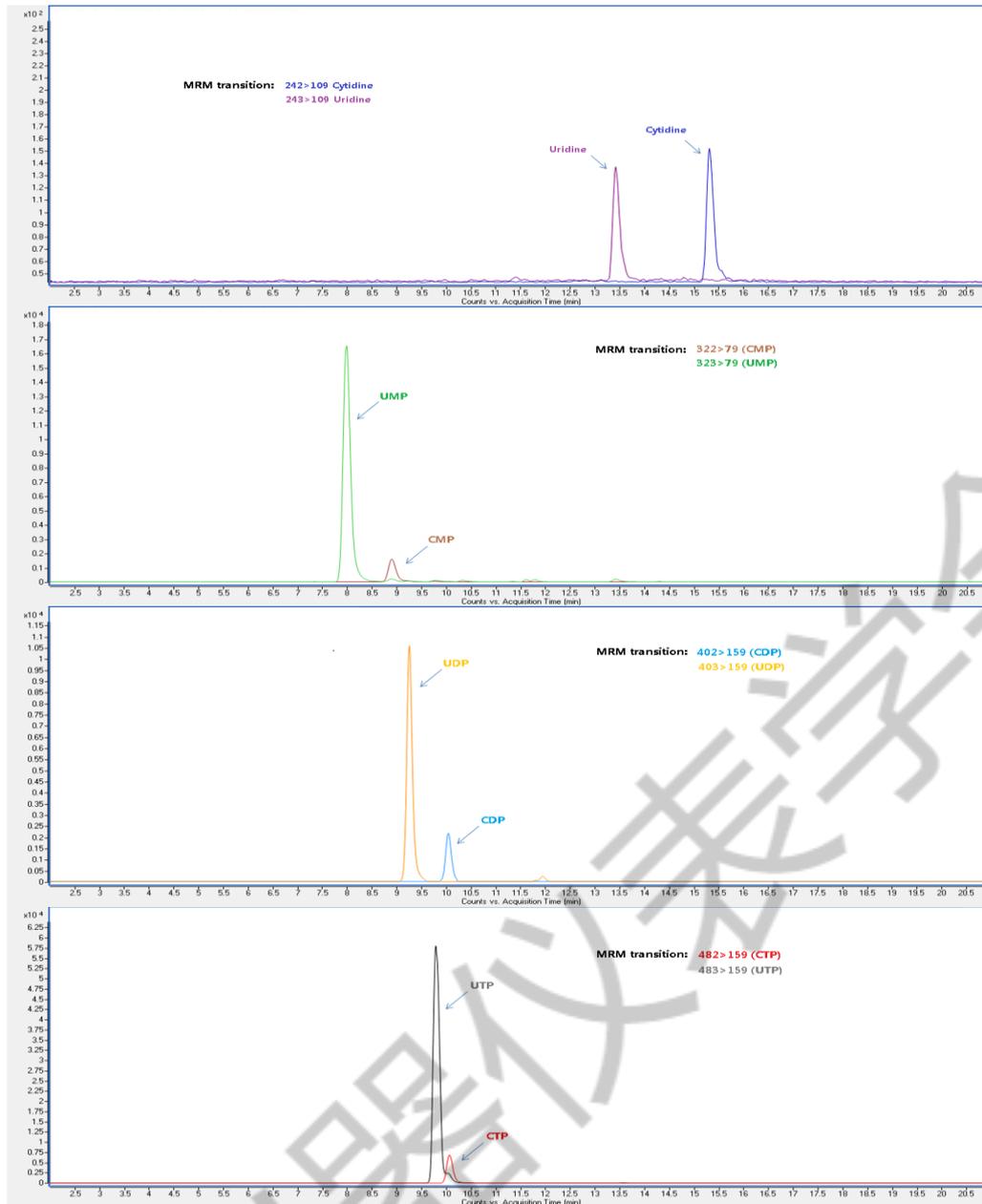


图3 嘧啶核苷酸的分离色谱图

利用无监督的主成分分析 (Principle Component Analysis, PCA 分析) 对 27 个 HeLa 细胞样品中全部化合物浓度变化的分析表明, UTP 的量变贡献最大, 其中红色和棕色数据点分别代表对照和野生型; 其他颜色分别代表不同的基因突变细胞类型 (图 4)。为了进一步研究这些样本的分组聚类情况, 研究者还使用分层条件树软件进行了聚类分析。这 9 组样本的聚类情况如热图 (图 5) 显示。其中, 横坐标代表单个样本的 Log_2 的对数值, 蓝色或红色色块越深, 则代表代谢物的量变越显著。

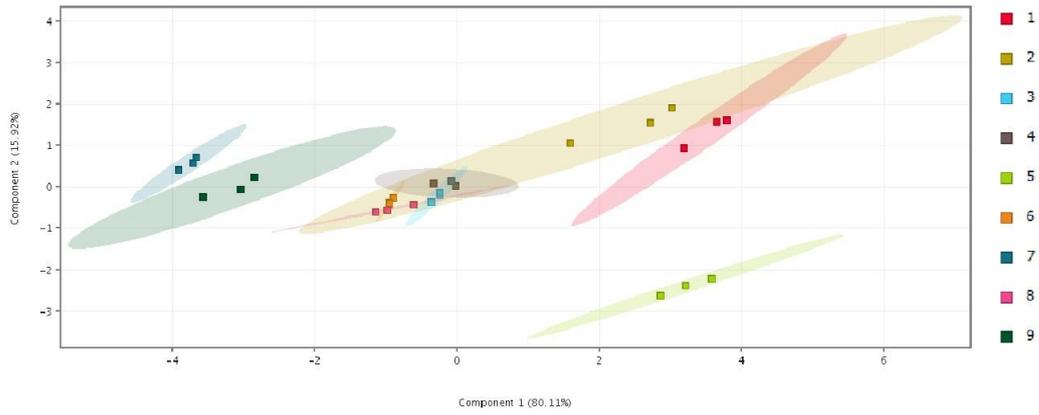


图 4 主成分分析 (PCA 图)

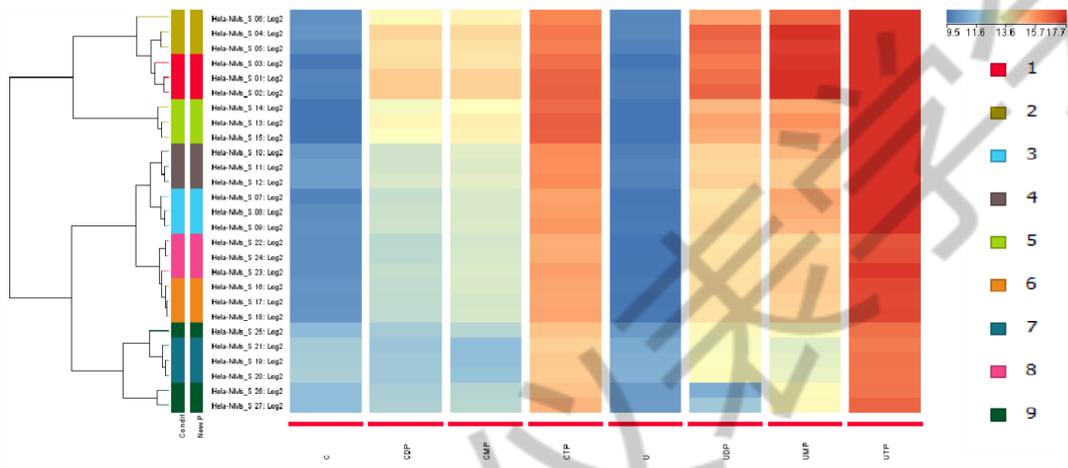


图 5 聚类分析图

综上所述，该检测方法可以广泛应用于不同种类的肿瘤细胞（如 H1299、A549 和 HeLa 细胞等）和肿瘤组织（如 ESCC 等）中嘧啶核苷酸的分析。经过优化后，也可适用于嘌呤类核苷酸的定量分析，例如未修饰的 AMP 及其磷酸腺苷琥珀酸 AMPS（图 6）。

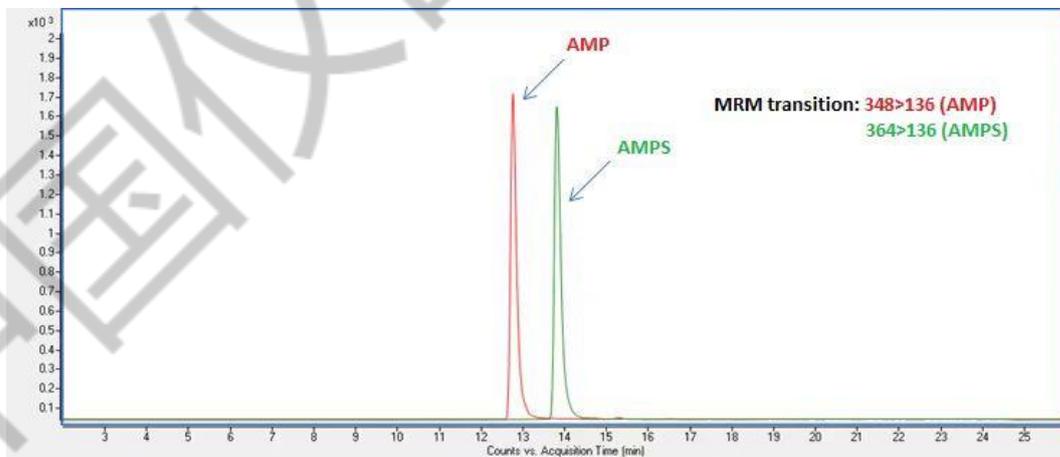


图 6 AMP 和 AMPS 的分离色谱图

4 结论

本文报道了一种基于 PGC 色谱法、直接分析强极性嘧啶核苷酸的液质联用方法，该方法采用反相色谱体系，且无需使用任何离子对试剂，流动相与质谱完全兼容。这种方法通过简单的色谱柱预处理和维护步骤减少了 PGC 色谱柱的频繁再生，为 PGC 色谱法定量分析嘧啶类核苷酸提供了很好的参考。

参考文献:

- [1]Xing J, Apedo A, Tymiak A, et al. Liquid chromatographic analysis of nucleosides and their mono-, di- and triphosphates using porous graphitic carbon stationary phase coupled with electrospray mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry Rcm, 2004, 18(14):1599-606.
- [2]Cohen S, Jordheim L P, Megherbi M, et al.Liquid chromatographic methods for the determination of endogenous nucleotides and nucleotide analogs used in cancer therapy: A review[J].Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 2010, 878(22):1912.
- [3]Bapiro T E, Richards F M, Jodrell D I. Understanding the Complexity of Porous Graphitic Carbon (PGC) Chromatography: Modulation of Mobile-Stationary Phase Interactions Overcomes Loss of Retention and Reduces Variability[J].Analytical Chemistry, 2016, 88(12):6190-6194.
- [4]Kong Z Q, Jia S D, Chabes A L, et al. Simultaneous determination of ribonucleoside and deoxyribonucleoside triphosphates in biological samples by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46 (11): 66
- [5]Gautam N, Alamoudi J A, Kumar S, et al.Direct and indirect quantification of phosphate metabolites of nucleoside analogs in biological samples - ScienceDirect[J].Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 178:112902-112902.
- [6]Straube H, Witte C P, Herde M. Analysis of Nucleosides and Nucleotides in Plants: An Update on Sample Preparation and LC-MS Techniques[J]. Cells, 2021, 10(3): 689.

- [7]Mullen N J, Singh P K. Nucleotide metabolism: a pan-cancer metabolic dependency[J]. Nat Rev Cancer. 2023 Mar 27: 1–20.
- [8]Bustamante S, Gilchrist R B, Richani D. A sensitive method for the separation and quantification of low-level adenine nucleotides using porous graphitic carbon-based liquid chromatography and tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2017 Sep 1; 1061-1062: 445-451.
- [9]Jansen R S, Rosing H, Schellens J H M, et al. Retention studies of 2'-2'-difluorodeoxycytidine and 2'-2'-difluorodeoxyuridine nucleosides and nucleotides on porous graphitic carbon: development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(15):3168-3174.