

稳定同位素示踪代谢组学技术在葡萄糖分解代谢研究中的应用进展

武文泽¹, 令狐婷¹, 高耀¹, 赵云昊¹, 韩雨梅², 秦雪梅^{1*}, 田俊生^{1*}

(1. 山西大学中医药现代研究中心, 山西太原 030006; 2. 山西大学体育学院, 山西太原 030006)

摘要: 随着核磁共振、质谱等高灵敏度检测技术的快速发展, 稳定同位素示踪代谢组学技术在阐明代谢通路调控机制以及代谢流分析方面应用日益广泛, 且取得了一些突破性的进展。本文对稳定同位素示踪代谢组学在葡萄糖分解代谢调控、代谢流分析、关键代谢通路功能阐释等方面的应用展开综述, 为该技术的推广应用及科学研究提供参考依据。

关键词: 稳定同位素示踪代谢组学; 葡萄糖分解代谢; 代谢通路; 代谢流分析

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)05-1286-07

Application of stable isotope-resolved metabolomics in glucose catabolism

WU Wen-ze¹, LINGHU Ting¹, GAO Yao¹, ZHAO Yun-hao¹, HAN Yu-mei²,
QIN Xue-mei^{1*}, TIAN Jun-sheng^{1*}

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. School of Physical Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: With the rapid development of high sensitivity detection techniques such as nuclear magnetic resonance and mass spectrometry, stable isotope-resolved metabolomics has been widely used in elucidating the regulatory mechanism of metabolic pathways and metabolic flow analysis, and some breakthroughs have been made. In this paper the application of stable isotope-resolved metabolomics in glucose catabolic regulation, metabolic flow analysis and functional interpretation of key metabolic pathways is reviewed, providing references for the wider use and application of this technology.

Key words: stable isotope-resolved metabolomics; glucose catabolism; metabolic pathway; metabolic flux

代谢组学 (metabolomics) 是继转录组学、蛋白质组学及基因组学后发展起来的一门新兴学科^[1]。代谢组学是研究机体葡萄糖分解代谢紊乱的一种重要技术, 可通过核磁共振 (NMR)、质谱 (MS) 等检测平台实现对生物样本的研究。葡萄糖分解代谢网络复杂, 涉

及多种代谢产物, 每一种代谢产物又涉及多条代谢通路, 传统代谢组学因其只能检测机体某一特定时刻代谢物在体内完成复杂代谢后的总量, 而无法精确到具体的代谢通路。

随着核磁共振、质谱等技术的发展, 稳定同位素示踪技术在代谢组学领域的应用已成为生物学研究的重要组成部分。稳定同位素示踪技术是通过检测被标记前体物质在机体的代谢过程, 明确稳定同位素代谢物在相关代谢通路中的来龙去脉, 以此获悉特异的紊乱机制。基于稳定同位素示踪剂和代谢组学的稳定同位素示踪代谢组学充分发挥两者的优势, 可更加准确地研究葡萄糖分解代谢网络中的具体代谢通路。

收稿日期: 2021-02-05; 修回日期: 2021-04-01.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2017ZX09301047); 国家自然科学基金资助项目 (82074147); 山西省科技重点研发计划 (201903D321210); 山西省“1331 工程”协同创新中心建设计划。

*通讯作者 Tel: 86-351-7019297, E-mail: jstian@sxu.edu.cn;

Tel: 86-351-7011202, E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0213

1 稳定同位素示踪代谢组学

稳定同位素示踪代谢组学 (stable isotope-resolved metabolomics, SIRM) 是一种通过分析稳定同位素示踪前体物质到产物的变化规律进而推导代谢通路和通量的方法^[2]。核磁共振、质谱是稳定同位素示踪代谢组学的首选分析工具。核磁共振可无损伤, 无偏向性地对代谢物进行检测; 质谱具有高灵敏性可选择范围地检测代谢物的优点^[3]。将两种分析方法结合起来可准确地发现代谢物的代谢通路以及揭示代谢通量的变化规律。

稳定同位素示踪代谢组学对所研究代谢通路的前体物质进行标记, 通过核磁、质谱等追踪所标记的化合物在体内的代谢规律, 利用中间代谢物同位素峰分布来判断具体的代谢通路。将代谢组学比作“停车场”, 稳定同位素示踪代谢组学技术如同给“汽车挂上车牌”, 能在终点的停车场准确找到标记的汽车, 再通过沿途交通拍照, 还能描绘出行路线一样, 可以追踪体内代谢物的来龙去脉活动轨迹, 寻找到特异的代谢通路^[4]。与传统代谢组学相比, 稳定同位素示踪代谢组学不仅能观察机体代谢物的整体代谢变化, 还能观察某一特定代谢物的改变, 由此可明确相关代谢通路并确定紊乱机制。与放射性同位素示踪技术相比稳定同位素示踪技术具有危害性小的特点。然而稳定同位素的测定对仪器设备的分辨率、灵敏度要求较高, 可作为示踪剂的稳定同位素种类少且价格昂贵, 其应用范围也因此受到了较大限制。稳定同位素示踪剂以及高灵敏度检测平台的研发也是亟待解决的问题之一。

2 稳定同位素示踪代谢组学在葡萄糖分解代谢调控中的应用

葡萄糖的分解代谢主要包括糖酵解、三羧酸循环以及磷酸戊糖途径^[5]。近年来, 越来越多的研究发现葡萄糖分解代谢与人类重大疾病的发生有着密切的联系 (如: 神经退行性疾病、肿瘤、糖尿病、抑郁症等), 突显了葡萄糖分解代谢研究的重要性。研究葡萄糖分解代谢在体内的代谢规律, 可为葡萄糖分解代谢紊乱相关

疾病的病机及药物的研发提供思路和方法。稳定同位素示踪代谢组学在葡萄糖分解代谢的应用日益广泛, 研究者对葡萄糖分解代谢的前体物质进行 ^{13}C 标记, 通过对其下游代谢物的同位素分布进行定量分析, 得到葡萄糖分解代谢紊乱疾病的具体代谢通路和药物作用潜在靶点。

2.1 稳定同位素示踪代谢组学研究葡萄糖分解代谢调控的技术流程

稳定同位素示踪代谢组学能检测和鉴定机体内生化反应的代谢产物, 精确地反映葡萄糖分解代谢的通路信息。稳定同位素示踪代谢组学研究葡萄糖分解代谢调控的技术流程是一致的^[6]。图 1 所示为稳定同位素示踪代谢组学在葡萄糖分解代谢研究中的基本流程, 主要包括稳定同位素示踪剂的选择、稳定同位素示踪剂的引入、样本的采集及处理、数据分析和代谢通路分析。

2.1.1 稳定同位素示踪剂的选择 稳定同位素示踪剂的选择取决于所研究的代谢通路。葡萄糖是细胞和组织 (例如: 大脑、肝、骨骼肌) 的主要能源, 在糖酵解、三羧酸循环等重要的葡萄糖分解代谢通路中均扮演重要角色, 因此葡萄糖是研究葡萄糖分解代谢常用的示踪剂^[7]。市面上已有多种 ^{13}C 标记的葡萄糖, 目前使用最广泛的示踪剂是 $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ -葡萄糖和 $[1,2-^{13}\text{C}]$ -葡萄糖。表 1^[8-16]总结了用于葡萄糖分解代谢研究的示踪剂及其示例代谢通路。

Table 1 Isotope tracers commonly used in the study of glucose catabolism and their metabolic pathways

Tracer	Pathways probed	Reference
$[\text{U}-^{13}\text{C}]$ -glucose	Glycolysis, pentose phosphate, tricarboxylic acid cycle	[8-10]
$[1,2-^{13}\text{C}]$ -glucose	Pentose phosphate	[11,12]
$[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -glucose	Pentose phosphate	[13]
$[3,4-^{13}\text{C}]$ -glucose	Glycolysis-tricarboxylic acid cycle interaction	[14,15]
$[3-^{13}\text{C}]$ -glucose	Glycolysis	[16]
$[\text{U}-^{13}\text{C}]$ -glycerin	Gluconeogenesis-pentose phosphate interaction	[16]

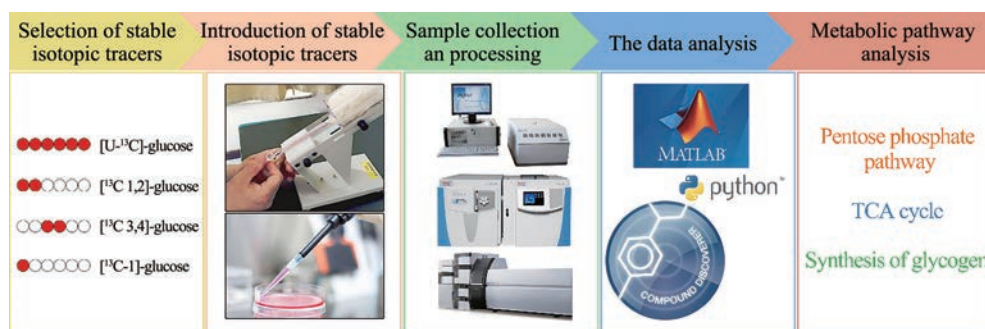


Figure 1 Diagram of the basic process of stable isotope-resolved metabolomics in the study of glucose catabolism

2.1.2 稳定同位素示踪剂的引入方式 示踪剂的引入是稳定同位素示踪代谢组学研究最关键的步骤之一, 目前常见示踪剂的引入方式有多种, 注射是其主要方式。目前注射方案有两种: ① 单次注射: 将稳定同位素标记的示踪剂一次性快速引入体内, 引起同位素丰度急剧升高到达顶峰后逐渐下降。② 持续输注: 即将一定量的稳定同位素示踪剂以恒定的速率通过静脉持续输注到体内。动物水平的持续输注可通过颈静脉、尾静脉的方式实现^[17]。另外, 稳定同位素液体饮食也成为了一种新的示踪剂引入方式, 该方法不仅避免了麻醉和物理创伤对实验的影响, 还实现了对深层次代谢通路的示踪。

2.1.3 分析样本的制备 细胞提取液、血液、组织是稳定同位素示踪代谢组学的主要研究对象。多数代谢物在较短时间内即可发生代谢转化, 因此获得的生物样本需进行生物反应灭活处理。液氮或 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻、加有机试剂或酸碱处理是常用的淬灭、灭活方法^[18]。分析平台的选择是样本制备方法的影响因素之一, 表2展示了核磁共振、质谱在稳定同位素示踪代谢组学应用的比较。核磁共振作为常见的分析平台有如下优势: ① NMR 样品制备简单, 血清和尿液是常用的样本; ② 无损性, 样品的结构和性质不会遭到破坏; ③ 可定量, 信号强度与样品浓度成正比, 可对代谢物进行定量分析。与核磁共振相比, 质谱具有高选择性、高灵敏度使其在结构确证方面具有重要优势。近年来, 质谱在稳定同位素示踪代谢组学的应用呈逐年上升的趋势。

Table 2 Comparison of stable isotope tracer metabonomic analysis techniques

Compare content	NMR	Mass spectrometry
Sensitivity	Low, single detection < 100 metabolites	High, single detection > 1 000 metabolites
Selectivity	Low	High
Repeatability	High	Low
Sample preparation	Simple	Complex
Sample destructive	Non-destructive and recyclable	Destructive and non- recyclable
Targeted analysis	Usually used for non- targeted analysis	Targeted and non- targeted analysis

2.1.4 数据处理与分析 核磁共振、质谱等仪器检测得到的图谱数据, 需 MestRenova、XCMS 等软件对图谱数据进行转换, 获得用于统计分析的数据。数据处理方法由分析技术及应用领域特点决定。无论是核磁共振还是质谱数据在进行分析之前均需对数据进行峰识别、峰对齐、归一化等预处理, 多种数据分析软件如 XCMS、SIMCA-P、MAVEN、MZmine 等可实现数据分析, 其中 SIMCA-P 使用最广泛。近年来, 稳定同位素

示踪代谢组学数据分析多采用多变量分析与单变量分析(如 t -检验, u -检验, F -检验等)相结合的策略对获得的实验数据进行分析。

2.1.5 代谢通路分析 稳定同位素示踪代谢组学属代谢组学范畴, 通过同位素标记、示踪、检测得到的是代谢物信号强度和浓度的关系。对于代谢数据可视化、代谢物的结构、代谢通路的富集仍需借助于传统代谢组学的通路分析。代谢通路分析是在多个平台内容整合后通过富集分析指出代谢物集中的代谢通路, 然后进行重点分析和讨论。通路数据库不仅具有生物化学数据库的相关代谢途径信息, 还包括了一些重要的注释和文献资料证据等。这些资源为研究者们发现新的代谢通路、验证已有的代谢通路提供了材料支持。人体代谢组数据库 (human metabolome database, HMDB)、京都基因和基因组数据库 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、Reactome 数据库及 Metaboanalyst 软件等是常用的分析网站和软件, 通过以上网站和软件可得到目标代谢通路并阐述其病理生理等相关机制^[19]。另外可通过知网、Pubmed 等数据库与已知的生物学功能相关联。

稳定同位素示踪代谢组学在葡萄糖分解代谢的操作流程已建立, 但分析技术和操作条件的多样化, 使得大量产生的数据和结果缺乏规范性。建立一套完整、规范、标准的稳定同位素示踪代谢组学程序已成为科研工作者研究的热点领域。目前 Nature Protocol 已陆续发表了实体组织和细胞样本分析的操作教程。但对于一些特殊样本如精液、粪便以及数据分析方面仍缺乏公认度较高的标准操作规程。因此, 稳定同位素示踪代谢组学的标准化研究依旧是葡萄糖分解代谢研究重要的技术突破口。

2.2 稳定同位素示踪代谢组学在葡萄糖分解代谢调控中的应用

葡萄糖分解代谢紊乱会影响心血管系统、消化系统及免疫系统等重要生理系统的正常工作^[20]。近年来, 越来越多的研究揭示葡萄糖分解代谢紊乱与多种疾病的发生有密切的联系, 葡萄糖分解代谢的相关通路可作为疾病的治疗靶点。如: 三羧酸循环可作为帕金森病的治疗靶点; 糖酵解是抗肿瘤药物的重要靶点; 抑制磷酸戊糖途径对于 2 型糖尿病的治疗有积极作用^[21-23]。因此, 研究葡萄糖分解代谢对相关疾病病因学的了解以及延缓或治疗疾病药物的研制具有重要意义。

代谢组学可对生物整体、器官或组织的内源性代谢物所受影响因素的变化规律进行研究。但传统代谢组学仍很难检测代谢物的具体过程, 即使检测到葡萄糖分解代谢相关代谢物出现紊乱也无法确定其具体代

谢通路及其药物靶点。稳定同位素示踪代谢组学可以弥补传统代谢组学的只能检测末端代谢物总量,但不能区分代谢物来自哪一种代谢通路的缺陷。研究者通过稳定同位素示踪代谢组学发现抑郁症可通过丙酮酸转化为苹果酸以激活糖异生途径,且其三羧酸循环被抑制。丙酮酸羧化酶、丙酮酸脱氢酶等可能是抗抑郁药物的作用靶点。该研究结果可为抑郁症在葡萄糖分解代谢紊乱的病机阐释以及新药的研发提供了新的见解^[24]。

2.2.1 糖酵解代谢途径 糖酵解过程是生物最古老、最原始获得能量的一种方式,这一过程是生物体共同经历的代谢通路。糖酵解共有十步反应,其中有三个反应是不可逆的。催化这三步反应的酶分别是己糖激酶、磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶。其中磷酸果糖激酶催化的反应是糖酵解的限速反应。稳定同位素示踪代谢组学在糖酵解的应用较为成熟,研究者利用¹³C标记的葡萄糖可对糖酵解代谢通路进行示踪,且¹³C标记的乳酸常作为糖酵解代谢的水平指标。近年来,稳定同位素示踪代谢组学在肿瘤代谢重编程研究中功不可没。研究者采用稳定同位素示踪代谢组学发现,通过抑制癌细胞糖酵解途径可减少癌细胞的增殖。己糖激酶、磷酸果糖激酶、M2型丙酮酸激酶等糖酵解关键酶已成为肿瘤标志物,它们的表达与活性可通过影响癌细胞的糖酵解途径,进而影响癌细胞的增殖^[25]。

Hu等^[26]通过使用稳定同位素示踪代谢组学分析二甲双胍对肝癌细胞糖酵解代谢通量的影响。结果显示二甲双胍可通过降低磷酸果糖激酶-1的代谢通量来降低肝癌组织糖酵解水平,进而发挥其抗肿瘤的作用。缺氧诱导因子1、果糖-2,6-二磷酸酶3、磷酸果糖激酶-1是肝癌细胞代谢重编程的重要关键靶点,这些结果为二甲双胍新药理功能的开发提供了理论依据。

稳定同位素示踪代谢组学在糖酵解的应用不只在肿瘤,其他疾病的研究也取得了一定的进展。研究者发现肌萎缩性侧索硬化症的糖酵解水平与该病的发生发展着密切的联系,但由于传统代谢的局限性使得这一发现变得难以验证。Valbuena等^[27]采用稳定同位素示踪代谢组学的方法明确其在细胞模型的代谢变化。结果显示肌萎缩性侧索硬化症的糖酵解水平出现紊乱,且糖酵解代谢异常归因于丙酮酸脱氢酶激酶表达异常所致。

此外,神经退行性疾病、糖尿病、心血管疾病糖酵解代谢水平也受到了关注。稳定同位素示踪代谢组学为其提供了技术支撑,为疾病的发生机制及其药物靶点的预测提供新的研究思路。

2.2.2 三羧酸循环代谢途径 在有氧条件下葡萄糖通过糖酵解转化为丙酮酸,丙酮酸进入线粒体进行三羧

酸循环。三羧酸循环并不只是丙酮酸氧化所经历的途径,也是脂肪酸、氨基酸等各种燃料分子氧化分解所经历的共同途径。三羧酸循环的中间体(草酰乙酸、 α -酮戊二酸)是合成糖、脂肪、氨基酸等原料,可见三羧酸循环是联系三大代谢重要的枢纽。每一项重大科学技术的发现都伴随着实验技术的进步,稳定同位素示踪代谢组学在三羧酸循环代谢的研究起到了促进作用。最近一些研究利用稳定同位素示踪代谢组学发现乳酸也可三羧酸循环供能,且乳酸对三羧酸循环的贡献远远大于葡萄糖^[28],这一发现提示乳酸的生理意义和功能需要被重新审视。

研究者通过静脉注射¹³C标记的葡萄糖,发现在正常状态下乳酸的供能是葡萄糖的1.1倍。在禁食状态下乳酸的供能是葡萄糖的2.5倍。该结果显示与葡萄糖相比乳酸是更重要的能量运载体。这一发现打破了对乳酸的传统认识,即乳酸并非缺氧的暂时代谢物,而是三羧酸循环能量转换的重要成员^[29]。

有趣的是在有关肺癌的研究中也发现了类似的结果,研究者利用¹³C标记的葡萄糖在肺癌患者和动物模型均进行示踪,结果发现乳酸与葡萄糖相比在三羧酸循环的贡献占比更高^[30,31]。该结果打破了乳酸是Warburg效应的末端代谢废物的认识,为癌症的诊治研究提供了新的思路 and 方向。

单纯的依靠稳定同位素示踪代谢组学只能获得代谢物对三羧酸循环的相对贡献量,而无法准确获得每种代谢物的净贡献量,数学模型的构建和应用可以弥补这一不足。Ying等^[32]在稳定同位素示踪代谢组学的基础上,通过构建数学模型分别对葡萄糖和乳酸在三羧酸循环的贡献进行了定量研究。结果显示单纯依据稳定同位素示踪代谢组学得到的结果存在一定的偏差,而偏差的解决可通过构建数学模型来纠正。该研究为三羧酸循环代谢通量的研究提供了新的思路和方法。

总的来说,稳定同位素示踪代谢组学在三羧酸循环的研究中起着重要的作用。但通过稳定同位素示踪代谢组学得到的结果还需数学模型加以验证或纠正。

2.2.3 磷酸戊糖代谢途径 磷酸戊糖途径也是葡萄糖分解代谢一条重要代谢通路。磷酸戊糖途径的发现是从研究糖酵解途径开始的。研究者在发生糖酵解的组织匀浆中添加碘乙酸、氟化物等糖酵解过程的抑制剂后,发现葡萄糖的利用还在继续。该现象表明除了糖酵解外还存在未知的糖代谢通路,即磷酸戊糖途径。20世纪30年代发现了磷酸戊糖途径的存在,也认识到该通路的重要性。但通过实验及推理得到的研究结果需要进一步验证。同位素示踪代谢组学的应用不仅使得这条途径得到了进一步确证,还显示了这条途径的普遍性。

自采用 ^{14}C 标记的葡萄糖对组织中的磷酸戊糖途径分析以来,稳定同位素示踪代谢组学在磷酸戊糖途径的应用就从未停止过^[33]。不同的示踪剂被相继研发,但每一种示踪剂都存在着一一定的局限性。 $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -葡萄糖是常用的示踪剂,但该方法需要 $[3-^{13}\text{C}_1]$ -乳酸与乳酸的同位素天然丰度区分^[34]。 $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]$ -甘油用于检测肝脏的磷酸戊糖代谢水平,但该示踪剂只适用于糖异生代谢旺盛的组织^[35]。与其他示踪剂相比,最近发现的 $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -葡萄糖更为方便,该示踪剂可通过乳酸在 ^{13}C NMR的结果直接获得磷酸戊糖的代谢水平^[36]。

磷酸戊糖途径是动物、植物和微生物普遍存在的代谢通路,稳定同位素示踪代谢组学在磷酸戊糖途径的应用可准确检测其在体内合成与分解规律,从而为疾病机制的研究及新药的研发提供依据。

2.2.4 糖异生代谢途径 糖异生即葡萄糖异生作用,是以非糖物质作为前体合成葡萄糖的过程。非糖物质包括乳酸、丙酮酸、丙酸、甘油以及氨基酸等。机体饥饿和运动时糖异生对机体血糖水平的维持具有重要的作用。目前,稳定同位素示踪代谢组学在量化糖异生在葡萄糖分解代谢的贡献和调控发挥了重要作用。使用最广泛的技术是通过检测氘在新形成的葡萄糖中的掺入量,以确定糖异生代谢水平。

20世纪90年代, Landau^[37]利用 $^2\text{H}_2\text{O}$ 作为示踪剂对禁食人体的糖异生途径进行了研究。结果显示禁食22 h后67%的葡萄糖来自糖异生和禁食42 h后93%的葡萄糖来自糖异生。在后续的研究中通过使用 $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ -葡萄糖结合NMR分析技术对糖异生代谢通路进行定量研究^[38]。

稳定同位素示踪代谢组学在糖异生的应用在不断的更新中,但相比20世纪90年代的示踪剂 $^2\text{H}_2\text{O}$,现研究所用的示踪剂趋于更简单、更实惠、侵入性更小的方向。研究者通过稳定同位素示踪代谢组学对糖异生代谢通路及通量研究,进而促进葡萄糖生理学和病理生理学的研究。

稳定同位素示踪代谢可揭示葡萄糖分解代谢通路的动态信息,已成为研究葡萄糖分解代谢的有力工具。但目前稳定同位素示踪代谢组学在葡萄糖分解代谢的研究基本处在代谢通路的定性研究,定量分析仍存在

应用不足的情况,而后者恰好是稳定同位素示踪代谢组学的优势。由此可见,稳定同位素示踪代谢组学在葡萄糖分解代谢的应用仍具有较大的发展潜力。

3 基于稳定同位素示踪代谢组学的代谢流技术在葡萄糖分解代谢中的应用

代谢流分析(metabolic flux analysis, MFA)是根据代谢通路中各反应的计量关系及实验所测得的数据来确定代谢通量的一种方法^[39]。目前,代谢流分析有基于代谢物浓度平衡的流平衡分析(flow balance analysis, FBA)和基于 ^{13}C 标记信息的代谢流分析(^{13}C metabolic flux analysis, ^{13}C MFA)^[40]。葡萄糖分解代谢是以葡萄糖为主的碳水化合物构成的一系列代谢反应,因此, ^{13}C MFA可被认为是用于葡萄糖分解代谢研究量身定做的又一重要工具。

近年来,能量代谢领域几项重大发现几乎均需代谢流分析来获取代谢变化的关键证据^[41]。代谢流分析在葡萄糖分解代谢研究并非一蹴而就而是一个迭代过程,需多次循环直到计算结果和实验结果匹配为止。目前,多种计算流程和软件被相继研发,表3展示了代谢流分析在葡萄糖分解代谢研究中所用的软件。目前,天然同位素和同位素效应干扰对代谢流分析结果准确性造成一定影响,一系列数学模型的建立旨在提高代谢流分析的准确性。总之,稳定同位素示踪代谢组学的精准化发展,势必会促进代谢流分析在葡萄糖分解代谢中的应用。

4 结语与展望

稳定同位素示踪代谢组学已广泛应用于葡萄糖分解代谢的相关研究,揭示了葡萄糖分解代谢的复杂性、可塑性。由于其可深入分子机制,许多临床药物的潜在靶点研究也从中获益。但该技术仍存在众多不足与挑战,目前研究葡萄糖分解代谢的示踪剂以葡萄糖为主,但涉及葡萄糖分解代谢的代谢物还有氨基酸、脂肪酸等。对于错综复杂的葡萄糖分解代谢研究,现有示踪剂的种类是远远不够的。因此,示踪剂的开发和利用对于葡萄糖分解代谢的进一步研究显得十分重要。

另外,稳定同位素示踪代谢组学在葡萄糖分解代谢的应用只解决了代谢物在体内的流向问题。目前关于代谢物流速的研究仅处于初步阶段,现阶段缺乏研

Table 3 Common software of metabolic flux analysis in glucose catabolic research

Name of software	Application field	Usage rights
13CFLUX2	Steady state metabolic flow analysis	Free for non-commercial use
FiatFlux	Metabolic flux ratio analysis	Free for academic use
INCA	Steady-state and non-steady-state analysis	Free for academic use
Metran	Steady state metabolic flow analysis	Free for non-commercial use
OpenFLUX	Steady state metabolic flow analysis	Open source
OpenMebius	Steady-state and non-steady-state analysis	Open source

流速的“黄金标准”。随着稳定同位素示踪代谢组学在葡萄糖分解代谢的应用, 数学建模驱动流速问题的解决显得愈加重要。因此, 实验方案、数据处理以及代谢通量计算软件的综合应用将对稳定同位素示踪代谢组学在葡萄糖分解代谢的研究产生重要影响。

作者贡献: 田俊生、秦雪梅、韩雨梅负责文章框架思路及修改; 武文泽负责文章的撰写; 令狐婷、高耀、赵云昊负责收集整理文献资料。所有作者阅读并认可终稿。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Zhang HL, Si YM. Application of metabonomics in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Acta Chin Med (中医学报)*, 2020, 35: 1913-1917.
- [2] Bruntz RC, Lane AN, Higashi RM, et al. Exploring cancer metabolism using stable isotope-resolved metabolomics (SIRM) [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292: 11601-11609.
- [3] Gao YH, Zhang XM, Duan W, et al. Stable isotope tracer-based metabolomics and applications for clinical research [J]. *Life Sci Res (生命科学研究)*, 2017, 21: 558-564.
- [4] Linghu T, Tian JS, Qin XM, et al. Applications progress of stable isotopic tracer technique in metabolic regulation of endogenous substances [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2018, 49: 2678-2685.
- [5] Zhu L. Mechanism of Myostatin Gene Mutation Improving Antioxidant Capacity of Bovine Muscle (Myostatin 基因突变提高牛肌肉抗氧化能力的机制研究) [D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2020.
- [6] Wang S, Kong WJ, Yang MH. Simultaneous determination of 11 mycotoxins in malt by isotope internal standard-UPLC-MS/MS [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 110-115.
- [7] Guerini E, Schadt S, Greig G, et al. A double-tracer technique to characterize absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) of [¹⁴C]-basimglurant and absolute bioavailability after oral administration and concomitant intravenous microdose administration of [¹³C₆]-labeled basimglurant in humans [J]. *Xenobiotica*, 2017, 47: 144-153.
- [8] Fan WM, Warmoes MO, Sun Q, et al. Distinctly perturbed metabolic networks underlie differential tumor tissue damages induced by immune modulator β -glucan in a two-case *ex vivo* non-small-cell lung cancer study [J]. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*, 2016, 2: a000893.
- [9] Sellers K, Fox MP, Bousamra M, et al. Pyruvate carboxylase is critical for non-small-cell lung cancer proliferation [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125: 687-698.
- [10] Lane AN, Fan TW. NMR-based stable isotope resolved metabolomics in systems biochemistry [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 628: 123-131.
- [11] Boros LG, Lerner MR, Morgan DL, et al. [1,2-¹³C₂]-D-glucose profiles of the serum, liver, pancreas, and DMBA-induced pancreatic tumors of rats [J]. *Pancreas*, 2005, 31: 337-343.
- [12] Lee WN, Boros LG, Puigjaner J, et al. Mass isotopomer study of the nonoxidative pathways of the pentose cycle with [1,2-¹³C₂]-glucose [J]. *Am J Physiol*, 1998, 274: E843-E851.
- [13] Lee MH, Malloy CR, Corbin IR, et al. Assessing the pentose phosphate pathway using [2,3-¹³C₂]-glucose [J]. *NMR Biomed*, 2019, 32: e4096.
- [14] Cheng T, Sudderth J, Yang C, et al. Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 8674-8679.
- [15] Sellers K, Fox MP, Deshpande R, et al. Pyruvate carboxylase is critical for non-small-cell lung cancer proliferation [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125: 687-698.
- [16] Sheng H, Jonathan M, Raphael J, et al. Glucose indirectly fuels the TCA cycle in tumors *via* lactate [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7: 115-118.
- [17] Charidemou E, Ashmore T, Griffin JL. The use of stable isotopes in the study of human pathophysiology [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 93: 102-109.
- [18] Dietmair S, Timmins NE, Gray PP, et al. Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: development of a metabolite extraction protocol [J]. *Anal Biochem*, 2010, 404: 155-164.
- [19] Wang XY, Li Y, He JM, et al. Research progress on the regulation of tumor metabolism, tumor immunotherapy and new analytical methods [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2080-2091.
- [20] Bai YH, Wang YY, Yang YL, et al. The research progress of the relationship between brain energy metabolism and mitochondria [J]. *Prog Mod Biomed (现代生物医学进展)*, 2018, 18: 3382-3387.
- [21] Foltynie T. Glycolysis as a therapeutic target for Parkinson's disease [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18: 1072-1074.
- [22] Pathania D, Millard M, Neamati N. Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61: 1250-1275.
- [23] Ge T, Yang J, Zhou S, et al. The role of the pentose phosphate pathway in diabetes and cancer [J]. *Front Endocrinol*, 2020, 11: 365.
- [24] Linghu T, Tian J, Qin X, et al. A unique insight for energy metabolism disorders in depression based on chronic unpredictable mild stress rats using stable isotope-resolved metabolomics [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 191: 113588.
- [25] Zhang BY, Liu AL, Du GH. Energy metabolism disorder and diseases: from effects to potential targets [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1372-1381.
- [26] Hu L, Zeng Z, Xia Q, et al. Metformin attenuates hepatoma cell proliferation by decreasing glycolytic flux through the HIF-1 α /PFKFB3/PFK1 pathway [J]. *Life Sci*, 2019, 239: 116966.

- [27] Gu J, Hu X, Shao W, et al. Metabolomic analysis reveals altered metabolic pathways in a rat model of gastric carcinogenesis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 60053-60073.
- [28] Yin MF. The Quantitative Relationship Between the Contribution of Glucose and Lactate to the Tricarboxylic Acid Circulating Isotope and the Net Contribution of Tumor Cells (葡萄糖和乳酸对肿瘤细胞三羧酸循环同位素贡献与净贡献之间的定量关系) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.
- [29] Hui S, Ghergurovich JM, Morscher RJ, et al. Glucose feeds the TCA cycle *via* circulating lactate [J]. *Nature*, 2017, 551: 115-118.
- [30] Hensley CT, Faubert B, Yuan Q, et al. Metabolic heterogeneity in human lung tumors [J]. *Cell*, 2016, 164: 681-694.
- [31] Faubert B, Li KY, Cai L, et al. Lactate metabolism in human lung tumors [J]. *Cell*, 2017, 171: 358-371.
- [32] Ying M, Guo C, Hu X, et al. The quantitative relationship between isotopic and net contributions of lactate and glucose to the tricarboxylic acid (TCA) cycle [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294: 9615-9630.
- [33] Magnusson I, Chandramouli V, Landau BR, et al. Pentose pathway in human liver [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, 85: 4682-4685.
- [34] Lee WN, Boros LG, Lim S, et al. Mass isotopomer study of the nonoxidative pathways of the pentose cycle with [1,2-¹³C₂]-glucose [J]. *Am J Physiol*, 1998, 274: 843-851.
- [35] Miccheli A, Tomassini A, Conti F, et al. Metabolic profiling by ¹³C-NMR spectroscopy: [1,2-¹³C₂]-glucose reveals a heterogeneous metabolism in human leukemia T cells [J]. *Biochimie*, 2006, 88: 437-448.
- [36] Jin ES, Sherry AD, Malloy CR. An oral load of [¹³C₃]-glycerol and blood NMR analysis detect fatty acid esterification, pentose phosphate pathway, and glycerol metabolism through the tricarboxylic acid cycle in human liver [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291: 19031-19041.
- [37] Landau BR. Stable isotope techniques for the study of gluconeogenesis in man [J]. *Horm Metab Res*, 1997, 29: 334-336.
- [38] Landau BR. Quantifying the contribution of gluconeogenesis to glucose production in fasted human subjects using stable isotopes [J]. *Proc Nutr Soc*, 1999, 58: 963-972.
- [39] Wiechert W. ¹³C metabolic flux analysis [J]. *Metab Eng*, 2001, 3: 195-206.
- [40] Antoniewicz MR. Methods and advances in metabolic flux analysis: a mini-review [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2015, 417: 317-325.
- [41] Jang C, Chen L, Rabinowitz JD. Metabolomics and isotope tracing [J]. *Cell*, 2018, 173: 822-837.