

基于毛细管电泳-质谱联用的 PTEN 缺失诱导代谢重编程研究

王志超^{1,2} 刘 静¹ 朴海龙^{*1,2}

¹(中国科学院分离分析化学重点实验室,中国科学院大连化学物理研究所,大连 116023)

²(中国科学院大学,北京 100049)

摘 要 前列腺癌是男性常见的恶性肿瘤之一, PTEN 缺失普遍存在于前列腺癌中,并诱导肿瘤细胞代谢重编程。PTEN 缺失诱导的代谢重编程可能为肿瘤靶向治疗提供信息。本实验基于毛细管电泳-质谱联用技术 (CE-MS) 对 PTEN 缺失后前列腺癌细胞 DU145 及正常前列腺细胞 RWPE1 代谢变化进行系统性分析。在 DU145 和 RWPE1 两种细胞中分别检测到 200 和 214 种代谢物,相比对照细胞,PTEN 敲除后分别含有 28 和 37 种差异代谢物。两种细胞敲除 PTEN 后,均出现苏糖酸升高,异丁基肉碱、二磷酸腺苷、*N*-羟乙酰神经氨酸、天冬氨酸、亚牛磺酸下降。DU145 敲除 PTEN 后,特异的代谢变化为 *L*-2-羟戊二酸、甘磷酸胆碱、维生素 B1、还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽,且都显著升高,这些代谢物或比值的升高能促进肿瘤细胞的增殖、侵袭及抗化疗。同时,发现肌酸酐、肌肽、乙酰神经氨酸等已报道与癌症诊断、预后相关的标志物受 PTEN 调控。通过对两种细胞差异代谢物比较,鉴定了 PTEN 诱导的代谢变化及 PTEN 与其它肿瘤相关基因共同诱导的代谢变化,为 PTEN 对代谢通路的调控分子机制研究提供信息。

关键词 毛细管电泳-质谱联用; 细胞代谢组学; PTEN; 代谢重编程; 前列腺癌

1 引言

前列腺癌 (Prostate cancer, PCa) 是男性最常见的恶性肿瘤之一,致死率在所有男性肿瘤中排第三^[1]。尽管在早期前列腺癌患者中很少出现,但约 60% 的晚期前列腺癌患者存在染色体 10q23 缺失^[2]。染色体 10q23 中起到重要抑癌作用的基因即 PTEN (Phosphatase and tensin homolog)^[3]。PTEN 催化磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, PIP3) 去磷酸化,并生成磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate, PIP2),进而抑制 PI3K/AKT 通路。PTEN 缺失的前列腺癌患者常具有不良预后^[4]。因此,研究 PTEN 缺失引起的细胞功能改变,可能发现潜在的治疗靶点,并提供特异性治疗 PTEN 缺失前列腺癌的手段。PTEN 缺失调控细胞能量代谢,如 β 氧化^[5] 及谷胱甘肽代谢^[6]。Naguib 等发现 PTEN 缺失的细胞对线粒体复合物 I 抑制剂更敏感^[7],从而说明研究 PTEN 突变诱导的代谢变化对靶向治疗 PTEN 缺失肿瘤有重要意义。

生物体内的代谢物种类难以计数,仅 Human Metabolome Database 统计的存在或可能存在的代谢物已超过 40000 个^[8]。在非靶向筛查生物大分子对代谢的影响中需要对生物体内的代谢物进行系统性的分析。代谢组学 (Metabolomics) 是指“系统全面地对生物体系内代谢物进行定性定量分析”^[9]。目前,代谢组学检测的主流技术为色谱-质谱联用技术及核磁共振法。根据色谱分离方式色谱可分为液相色谱、气相色谱、毛细管电泳。代谢重编程是肿瘤细胞的一大特征^[10],其中广泛存在着能量代谢的变化,而这些代谢物普遍具有强极性。毛细管电泳-质谱联用 (CE-MS) 弥补了其它色谱-质谱联用技术对极性及中等极性代谢物分离差的缺点,可用于生物体内极性及中等极性代谢物分析^[11]。CE-MS 的研究集中在接口技术的改进,接口技术主要分为鞘流接口和无鞘流接口^[12]。鞘流接口具有稳定性高的优点,但鞘流的稀释使分析灵敏度降低。无鞘流接口具有更高的灵敏度,但稳定性较低,目前仍在发展中^[13]。

在特定遗传背景下基因才能发挥特定功能,因此治疗靶点的筛选需要在特定遗传背景下进行。如 Kim 等发现 CPS1 (Carbamoyl phosphate synthetase-1) 在 KRAS/LKB1 突变的肺癌细胞中调控嘧啶合

2018-09-18 收稿;2018-11-02 接受

本文系国家自然科学基金项目 (Nos. 81672440, 81702771) 和大连化物所科研创新基金项目 (No. DICP TMSR201601) 资助

* E-mail: hpiao@dicp.ac.cn

成^[14],而维生素 C 只有在 KRAS/BRAF 突变的结直肠癌细胞中才能靶向 GAPDH,并杀死细胞^[15]。因此,基于代谢组学筛选潜在的治疗靶点时需要考虑不同遗传背景的影响。

为降低癌症治疗过程中的毒副作用,研究在正常细胞及癌细胞中 PTEN 缺失改变的不同代谢变化,并探究针对癌细胞中所特有的代谢变化,对临床治疗具有积极的指导意义。Chow 等^[16]在蛋白水平对 PTEN 在正常细胞及癌细胞中的不同功能作了系统描述,但在代谢物研究领域缺少相关研究。本研究采用 CE-MS,通过比较前列腺癌细胞 DU145 与正常前列腺细胞 RWPE1 分别敲除 PTEN 后的代谢变化,阐释 PTEN 调控的代谢重编程,并确定 PTEN 在肿瘤中引起的特异性的代谢变化。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

搭配电喷雾离子源(G1607A)的毛细管电泳(G7100A)-飞行时间质谱(G6224A)系统(美国安捷伦公司)用于代谢组学分析。电泳分离采用熔融石英毛细管柱(50 μm i. d. $\times$ 80 cm,日本 HMT 公司)进行。

甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司);氯仿(色谱纯,韩国 Duksan 公司);氨水(28%)、甲酸($\geq 95\%$)、乙酸铵($\geq 98\%$)、甘露醇($\geq 98\%$)购自美国 Sigma 公司;CE-MS 所用内标 1(含 10 mmol/L 蛋氨酸磺、D-樟脑-10-磺酸钠盐)及内标 3(含 10 mmol/L 3-氨基吡咯烷二盐酸、*N,N*-二乙基-2-苯基乙酰胺、苯均三酸、3-萘酚-2,7-二磺酸钠)购自日本 HMT 公司;RPMI 1640(C11875500BT)培养基(美国 Invitrogen 公司);胎牛血清(P30-3302,德国 PAN 公司);超纯水由 Mili-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)制备。超滤管(5 kDa,美国 Millipore 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 样品制备及代谢物提取 前列腺癌细胞 DU145 及正常前列腺细胞 RWPE1 购自美国 ATCC (American Type Culture Collection),均培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中。用于 PTEN 敲除的 shRNA 及空载体购自美国 Sigma 公司,序列为:CCGGAGGCGCTATGTGTATTATTATCTCGAGATAA-TAATACACATAGCGCCTTTTTT(TRCN0000002745)、CCGGACATTATGACACCGCCAAATTCTCGAGAATT-TGGCGGTGTCATAATGTTTTTTG(TRCN0000355946)。

分别在 DU145、RWPE1 两种细胞系中构建稳定敲除 PTEN 的细胞系。使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen,11668027,美国)将质粒转染进细胞 48 h 后,在含 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素的培养基中培养筛选。当作为阴性对照的未转染质粒的同种细胞在 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素筛选中全部死亡时,筛选结束,得到稳定低表达细胞系。

细胞培养至 80% 汇合度后进行代谢物提取。快速弃去培养基后,以 5% 甘露醇洗去残留培养基,洗 3 次,每次 10 mL。洗净后,快速将培养皿投入液氮中进行淬灭。淬灭 5 min 后,在培养皿中加 1 mL 甲醇(含体积比 1:400 的内标 1),将细胞随着甲醇刮下并转移至 5 mL Ep 管中。涡旋 30 s 后,加入 1 mL 氯仿并继续涡旋 1 min。最后再加入 0.4 mL 水并涡旋 1 min。冰上静置 10 min 后,在 4℃ 以 15000 g 离心 15 min。每个样品分别取两份各 0.45 mL 上清液至超滤管中,4℃ 12000 g 离心至上清液全部透过滤膜。滤液冻干,于 -80℃ 保存。样品测定时用 20 μL 超纯水复溶(含体积比 1:200 内标 3)。

2.2.2 CE-MS 分析 仪器参数与文献[11]相同,电泳参数:阳离子模式:流动相为 1 mol/L 甲酸,电泳电压 27 kV,进样量为 5 kPa 压力下进样 3 s(约 3 nL);阴离子模式:流动相为 25 mmol/L 乙酸铵(以氨水调至 pH 8.5),电泳电压 30 kV,并施加 1.5 kPa 的压力,进样量为 5 kPa 压力下进样 25 s(约 25 nL)。质谱参数如下:雾化气压力(Nebulizer pressure)135.8 kPa,干燥气温度(Dry gas temperature)300℃,氮吹(Nitrogen flow)7 L/min,离子传输管电压(Skimmer)50 V,采集速度 1.5/s,正负离子模式下毛细管电压(Capillary voltage)分别为 4.0 和 3.5 kV,裂解电压(Fragmentor)分别为 105 和 125 V。

2.3 数据处理

使用安捷伦公司自带软件 Quantitative analysis(B.06.00)、Quantitative analysis(B.06.00)及 HMT 公司 Method Maker 软件对数据进行定性和定量分析。具体步骤如下:(1)通过保留时间与质荷比进行定性分析 HMT 公司(日本)提供含 1000 个代谢物、内标理论质荷比及理论保留时间的数据库。使用

Method Maker 软件,通过代谢物及内标理论保留时间、内标实际保留时间计算在此内标保留时间下代谢物理论保留时间。阳离子模式下使用内标蛋氨酸磺、3-氨基吡咯烷二盐酸、*N,N*-二乙基-2-苯基乙酰胺,阴离子模式下使用内标 *D*-樟脑-10-磺酸钠盐、苯均三酸、3-萘酚-2,7-二磺酸钠。在 Quantitative analysis 软件中,将此理论保留时间与代谢物实际时间进行比对,以偏差在±0.2 min 以内且质荷比与理论值偏差在±0.01 Da 的标准进行鉴定。(2) 定量分析 定性分析后,导出定性的代谢物的峰面积数据,删除在 80% 以上样品中峰面积小于 400 的代谢物。代谢物峰面积使用对应样品所有代谢物的总峰面积校正,校正后的数据用于后续分析。使用 GraphPad Prism 7 (美国)进行绘图及 *t* 检验。*t* 检验中 *p*<0.05 的代谢物使用 MetaboAnalyst(<http://www.metaboanalyst.ca>)^[17]作热图及通路富集分析。

3 结果与讨论

3.1 PTEN 缺失诱导的代谢重编程

通过与含 1000 个代谢物标样的数据库中保留时间及精确质量数进行比对,实现了代谢物准确的定性分析。为考察分析方法对易降解物质准确检测的能力,CE-MS 分析后,根据公式($[ATP] + 0.5 \times [ADP]$)/($[AMP] + [ADP] + [ATP]$)(ATP,腺嘌呤核苷三磷酸;ADP,腺嘌呤核苷二磷酸;AMP,腺嘌呤核苷一磷酸)计算胞内能荷,DU145、RWPE1 两种细胞中能荷均为 0.96,达到正常生物体内能荷水平^[18],表明在分析测试过程中易降解代谢物得到准确检测。

采用 CE-MS 分析 DU145 和 RWPE1 两种细胞系,分别定性得到 200 和 214 种代谢物。DU145 和 RWPE1 敲除 PTEN 后相对对照细胞分别得到 28 种和 37 种差异代谢物,两种细胞共同的差异代谢物有 8 种(图 1A 和 1B)。PTEN 敲除后苏糖酸(Threonic acid)显著升高,异丁基肉碱(Isobutyrylcarnitine)、二

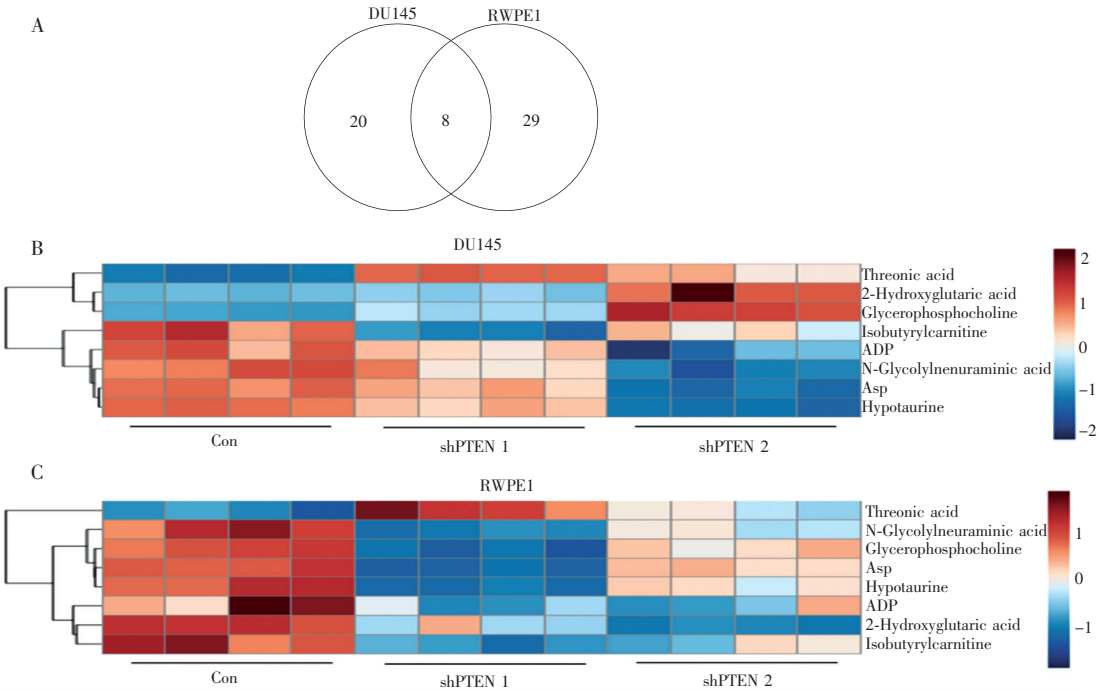


图 1 PTEN 诱导的代谢重编程。(A) DU145 和 RWPE1 两种细胞系中 PTEN 缺失改变的相同及不同的差异代谢物个数。相同的差异代谢物在 DU145 (B) 及 RWPE1 (C) 中变化热图。腺嘌呤核苷二磷酸 (ADP),天冬氨酸(Asp)

Fig. 1 Metabolic reprogramming induced by phosphatase and tensin homolog (PTEN) in DU145 and RWPE1 cells. (A) Common and specific differential metabolites number in two cell lines. Heatmaps of common metabolites changes in DU145 (B) and RWPE1 (C) after PTEN silencing. ADP, adenosine diphosphate; Asp, aspartate

磷酸腺苷 (ADP)、*N*-羟乙酰神经氨酸 (*N*-Glycolylneuraminic acid)、天冬氨酸 (Asp)、亚牛磺酸 (Hypotaurine) 显著下降,而甘磷酸胆碱 (Glycerophosphocholine, GPC)、2-羟戊二酸 (2-Hydroxyglutaric acid, 2-HG) 在两种细胞中变化相反。

DU145 细胞中 2-羟戊二酸、甘磷酸胆碱在 PTEN 敲除后显著升高,而在 RWPE1 细胞中则显著下降 (图 2)。

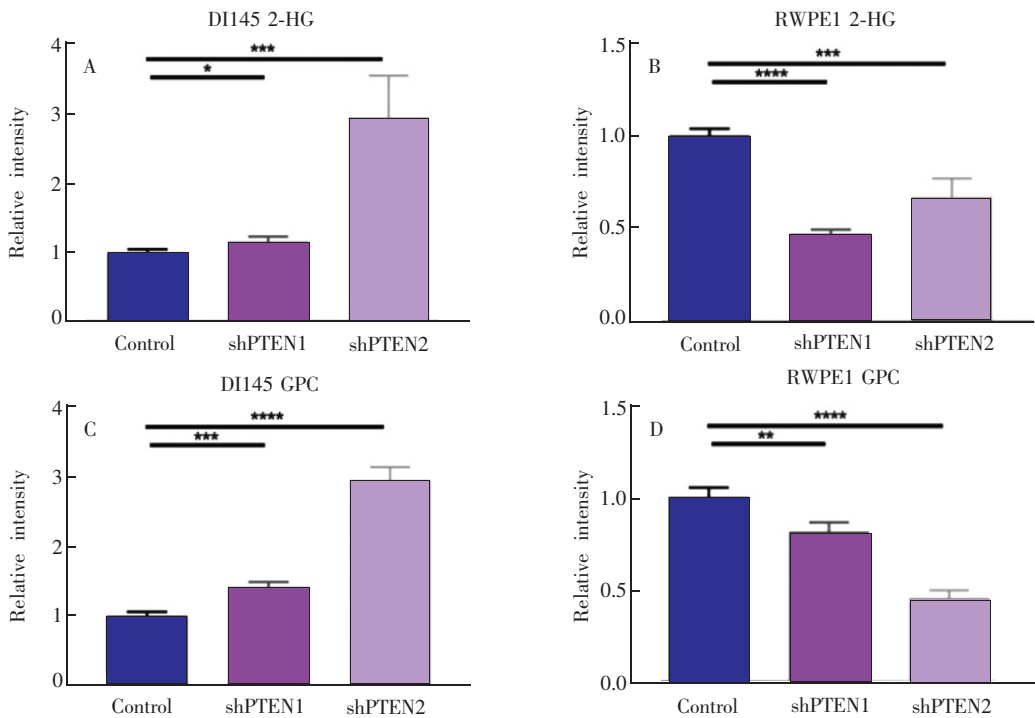


图 2 PTEN 缺失引起的 2-羟戊二酸 (2-HG) 及甘磷酸胆碱 (GPC) 变化;2-羟戊二酸在 DU145 (A) 及 RWPE1 (B) 中的变化;甘磷酸胆碱在 DU145 (C) 及 RWPE1 (D) 中的变化。

Fig. 2 2-Hydroxyglutaric acid (2-HG) and glycerophosphocholine (GPC) changes in two independent PTEN shRNAs transduced cells. 2-HG changes in DU145 (A) and RWPE1 (B). GPC changes in DU145 (C) and RWPE1 (D). *, **, ***, **** represent $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.0001$, respectively. $n = 4$. Data was normalized by average of control

在偏酸性或缺氧条件下,细胞通过酶(乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶)的非特异性催化合成 L 型 2-羟戊二酸^[19,20]。肿瘤细胞中普遍存在偏酸性或缺氧环境^[21,22],因此推测 PTEN 缺失后引起相关酶活性变化,但是只有在肿瘤细胞中才能通过酶的非特异性催化合成 L-2-羟戊二酸,而在正常细胞中则不存在这种环境。在乳腺癌中,侵袭性更强的癌细胞有更高的甘磷酸胆碱^[23,24],但 Stewart 等^[25]报道升高甘磷酸胆碱引起肿瘤转移能力下降。结合前列腺癌中肿瘤细胞和正常细胞缺失 PTEN 后相反的甘磷酸胆碱变化,推测 PTEN 与其它基因共同作用调控甘磷酸胆碱,在不同遗传背景下,甘磷酸胆碱引起的效应不同。

综上所述,PTEN 缺失在肿瘤细胞中引起促癌代谢物 2-羟戊二酸和甘磷酸胆碱的积累,而在正常细胞中反而引起两种代谢物下降。

3.2 PTEN 缺失在癌症细胞中改变的特异性代谢重编程

20 种代谢物在 DU145 细胞中敲除 PTEN 后有显著差异,而在 RWPE1 中无显著变化 (图 1A),即这 20 种差异代谢物为特定肿瘤遗传背景下 PTEN 缺失诱导的。20 种差异代谢物如表 1 所示。对这 20 种差异代谢物进行通路富集分析发现,硫胺(维生素 B1)代谢途径 (Thiamine metabolism) 及谷胱甘肽代谢途径 (Glutathione metabolism) 变化最为显著 (图 3A)。

两种代谢途径均涉及硫代谢并调节细胞内还原势。PTEN 敲除后维生素 B1 升高,而硫胺素焦磷酸降低 (图 3B)。维生素 B1 作为多种因子的辅酶能够促进肿瘤增殖及增强对化疗的抗性,且肿瘤会更多

表 1 DU145 中 PTEN 缺失后改变的特有差异代谢物
Table 1 Specific metabolites changes in DU145 induced by PTEN

化合物名称 Name	变化倍数 Ratio		显著性 <i>p</i> value	
	shPTEN1	shPTEN2	shPTEN1	shPTEN2
辛酸肉碱 Octanoylcarnitine	0.86	0.32	4.15×10^{-2}	6.54×10^{-6}
乙酰神经氨酸 <i>N</i> -Acetylneuraminic acid	0.79	0.58	1.24×10^{-3}	7.26×10^{-5}
甘油酸 Glyceric acid	0.62	0.60	4.31×10^{-3}	1.48×10^{-3}
黄素单核苷酸 FMN	0.64	0.61	1.30×10^{-5}	8.78×10^{-6}
氧化型谷胱甘肽 GSSG	0.85	0.65	4.50×10^{-3}	8.62×10^{-5}
烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 NADP+	0.84	0.65	3.53×10^{-2}	2.55×10^{-3}
肌肽 Carnosine	0.71	0.67	3.85×10^{-2}	3.50×10^{-3}
硫胺素焦磷酸 Thiamine diphosphate	0.78	0.74	3.75×10^{-2}	9.78×10^{-3}
半胱氨酸 Cys	0.65	0.79	5.05×10^{-3}	1.97×10^{-2}
烟酸腺嘌呤二核苷酸 Deamido-NAD+	0.23	0.83	3.04×10^{-8}	1.02×10^{-3}
维生素 B1 Thiamine	1.54	1.19	3.24×10^{-5}	1.36×10^{-2}
谷氨酸-谷氨酸二肽 Glu-Glu	1.13	1.27	3.22×10^{-2}	1.72×10^{-3}
肌酸酐 Creatinine	1.18	1.32	1.53×10^{-4}	2.22×10^{-5}
吡哆醇 Pyridoxine	1.25	1.36	1.83×10^{-2}	9.76×10^{-5}
N8-精胺 N8-Acetylspermidine	1.85	1.43	1.30×10^{-4}	3.89×10^{-2}
1-磷酸核糖 Ribose 1-phosphate	1.28	1.68	7.26×10^{-4}	1.65×10^{-2}
丁基肉碱 Butyrylcarnitine	1.15	1.99	1.78×10^{-2}	3.07×10^{-5}
<i>N</i> -乙酰谷氨酸 <i>N</i> -Acetylglutamic acid	1.51	2.08	3.73×10^{-4}	4.37×10^{-3}
鸟苷 Guanosine	1.80	4.57	4.07×10^{-3}	1.15×10^{-5}
XA0055 *	1.22	1.48	2.44×10^{-2}	9.71×10^{-3}

* 表示确定为代谢物,但未定性出结果。
* Means that it is authenticated metabolite, but not identified.

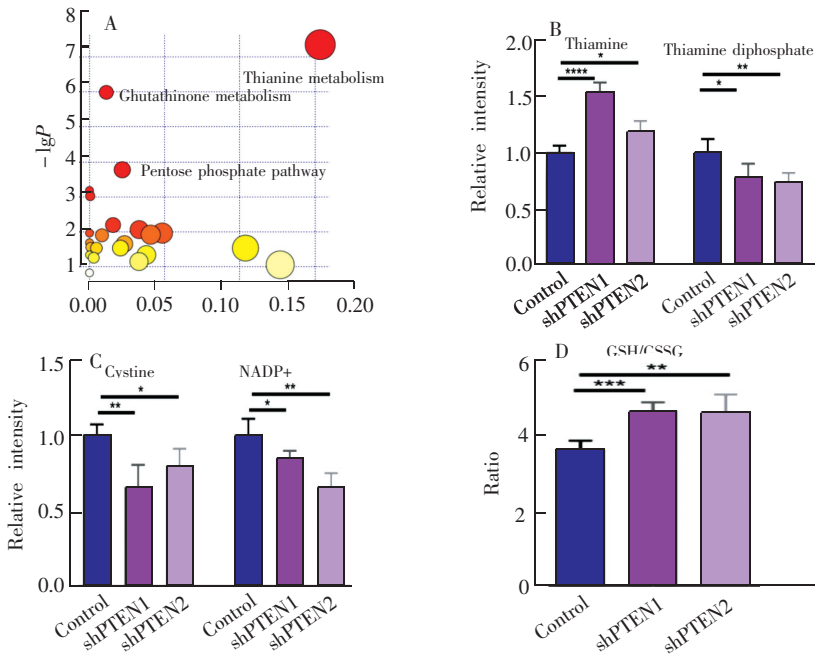


图 3 DU145 中特有的 PTEN 缺失改变的代谢变化:(A)通路富集分析 DU145 中特有的 PTEN 缺失诱导的代谢变化;(B)硫胺代谢通路中的差异代谢物;(C)谷胱甘肽通路中的差异代谢物;(D)DU145 中 PTEN 诱导的 GSH/GSSG 比例变化

Fig. 3 Metabolites changes induced by PTEN and specific in DU145. (A) Pathway enrichment analysis of the changed metabolites specific in DU145; (B) Metabolites changes in thiamine metabolism pathway; (C) Metabolites changes in glutathione metabolism pathway; (D) Ratio changes of GSH/GSSG induced by PTEN. *, **, ***, **** represent $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$, $p<0.0001$, respectively. $n=4$. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP+). Data was normalized by average of control

的从体内摄取维生素 B1^[26]。谷胱甘肽代谢途径从半胱氨酸合成谷胱甘肽,DU145 中 PTEN 缺失后半胱氨酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP+) 下降 (图 3C),还原型谷胱甘肽与氧化型谷胱甘肽比值 (GSH/GSSG) 上升 (图 3D)。谷胱甘肽合成前体半胱氨酸下降、GSH/GSSG 上升可能是由于谷胱甘肽合成速度加快,但半胱氨酸来源不足。PTEN 缺失后 GSH/GSSG 上升,说明细胞内氧化压力降低。谷胱甘肽可维持细胞内还原势,增加肿瘤细胞对化疗的抵抗性^[27]。Lien 等报道激活 PI(3)K/Akt 通路促进谷胱甘肽合成通路上调,并增强对氧化压力抵抗能力^[6]。

肌酸酐 (Creatinine) 在 PTEN 缺失后升高 (图 4A)。血清中肌酸酐上升预示前列腺癌发病几率上升^[28]。肌肽 (Carnosine) 在 PTEN 缺失后降低 (图 4B)。肌肽通过降低缺氧诱导因子 1 表达起到抗增殖的作用^[29]。有研究表明,乙酰神经氨酸 (N-Acetylneuraminic acid) 上调可以作为头颈部癌及非小细胞肺癌的标志物^[30,31],但本研究中 PTEN 突变后乙酰神经氨酸下降 (图 4C)。

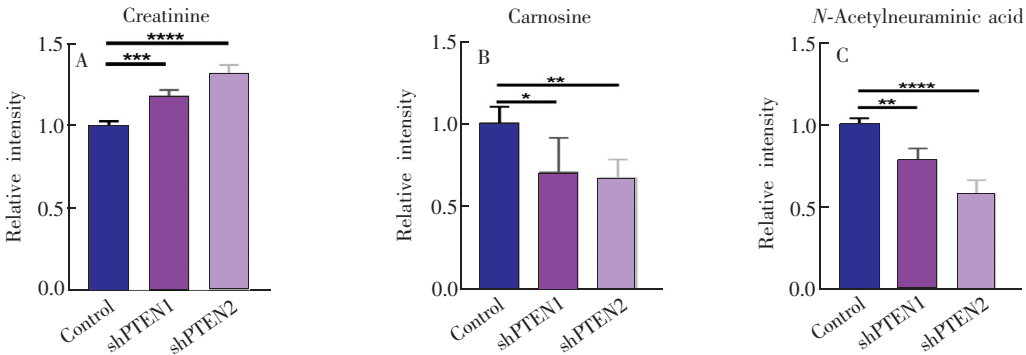


图 4 DU145 中特有的 PTEN 缺失改变的代谢变化中与肿瘤诊断或预后相关的代谢物: (A) 肌酸酐; (B) 肌肽; (C) 乙酰神经氨酸

Fig. 4 Cancer diagnosis and prognosis related metabolites changes induced by PTEN and specific in DU145. (A) Creatinine; (B) Carnosine; (C) N-Acetylneuraminic acid. *, **, ***, **** represent $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$, $p<0.0001$, respectively. $n=4$. Data is normalized by average of control

4 结论

通过对前列腺癌细胞系 DU145 及正常前列腺细胞系 RWPE1 分别敲低 PTEN 后进行 CE-MS 分析,研究了 PTEN 在癌细胞及正常细胞中生物学功能的异同。PTEN 缺失引起的代谢变化中 DU145 所特有的为 L-2-羟戊二酸、甘磷酸胆碱、维生素 B1、GSH/GSSG 等。这些代谢物或比值在 PTEN 缺失的 DU145 细胞中均上升,进而对肿瘤细胞增殖、侵袭、抗化疗都有促进作用。这些变化只出现在 PTEN 缺失的前列腺肿瘤细胞 DU145,而并未出现在 PTEN 缺失的正常前列腺细胞 RWPE1 中,因此推测癌细胞中 PTEN 可通过特定的代谢物含量改变促进肿瘤的发生发展。但是,PTEN 与其它肿瘤相关基因的相互作用有待进一步研究。

References

1 Torre L A, Bray F, Siegel R L, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. *Ca. Cancer J. Clin.*, **2015**, 65(2): 87–108

2 Gray I C, Phillips S M, Lee S J, Neoptolemos J P, Weissenbach J, Spurr N K. *Cancer Res.*, **1995**, 55(21): 4800–4803

3 Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang S I, Puc J, Miliarsis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner S H, Giovanella B C, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler M H, Parsons R. *Science*, **1997**, 275(5308): 1943–1947

4 Mithal P, Allott E, Gerber L, Reid J, Welbourn W, Tikishvili E, Park J, Younus A, Sangale Z, Lanchbury J S, Stone S, Freedland S J. *Int. J. Urol.*, **2014**, 21(12): 1209–1214

5 Kachaylo E, Tschuor C, Calo N, Borgeaud N, Ungethüm U, Limani P, Piguet AC, Dufour J F, Foti M, Graf R, Clavien P A, Humar B. *Hepatology*, **2017**, 66(3): 908–921

6 Lien E C, Lyssiotis C A, Juvekar A, Hu H, Asara J M, Cantley L C, Toker A. *Nat. Cell Biol.*, **2016**, 18(5): 572–578

- 7 Naguib A, Mathew G, Reczek C R, Watrud K, Ambrico A, Herzka T, Salas I C, Lee M F, El-Amine N, Zheng W, Di Francesco M E, Marszalek J R, Pappin D J, Chandel N S, Trotman L C. *Cell Rep.*, **2018**, 23(1): 58–67
- 8 Wishart D S, Feunang Y D, Marcu A, Guo A C, Liang K, Vázquez-Fresno R, Sajed T, Johnson D, Li C, Karu N, Sayeeda Z, Lo E, Assempour N, Berjanskii M, Singhal S, Arndt D, Liang Y, Badran H, Grant J, Serra-Cayuela A, Liu Y, Mandal R, Neveu V, Pon A, Knox C, Wilson M, Manach C, Scalbert A. *Nucleic Acids Res.*, **2018**, 46(D1): D608–D617
- 9 Fiehn O. *Plant Mol. Biol.*, **2002**, 48(1-2): 155–171
- 10 Hanahan D, Weinberg R A. *Cell*, **2011**, 144(5): 646–674
- 11 Zeng J, Kuang H, Hu C, Shi X, Yan M, Xu L, Wang L, Xu C, Xu G. *Environ Sci. Technol.*, **2013**, 47(13): 7457–7465
- 12 Lindenburg P W, Haselberg R, Rozing G, Ramautar R. *Chromatographia*, **2015**, 78(5-6): 367–377
- 13 Gulersonmez M C, Lock S, Hankemeier T, Ramautar R. *Electrophoresis*, **2016**, 37(7-8): 1007–1014
- 14 Kim J, Hu Z, Cai L, Li K, Choi E, Faubert B, Bezwada D, Rodriguez-Canales J, Villalobos P, Lin Y F, Ni M, Huffman KE, Girard L, Byers L A, Unsal-Kacmaz K, Peña C G, Heymach J V, Wauters E, Vansteenkiste J, Castrillon D H, Chen B P C, Wistuba I, Lambrechts D, Xu J, Minna J D, De Berardinis R J. *Nature*, **2017**, 546(7656): 168–172
- 15 Yun J, Mullarky E, Lu C, Bosch K N, Kavalier A, Rivera K, Roper J, Chio I I, Giannopoulou EG, Rago C, Muley A, Asara J M, Paik J, Elemento O, Chen Z, Pappin D J, Dow LE, Papadopoulos N, Gross S S, Cantley L C. *Science*, **2015**, 350(6266): 1391–1396
- 16 Chow L M, Baker S J. *Cancer Lett.*, **2006**, 241(2): 184–196
- 17 Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, Wishart D S, Xia J. *Nucleic Acids Res.*, **2018**, 46(W1): W486–W494
- 18 Atkinson D E, Walton G M. *J. Biol. Chem.*, **1967**, 242(13): 3239–3241
- 19 Intlekofer A M, Wang B, Liu H, Shah H, Carmona-Fontaine C, Rustenburg A S, Salah S, Gunner M R, Chodera J D, Cross J R, Thompson CB. *Nat. Chem. Biol.*, **2017**, 13(5): 494–500
- 20 Intlekofer A M, Dematteo R G, Venneti S, Finley L W, Lu C, Judkins A R, Rustenburg A S, Grinaway P B, Chodera J D, Cross J R, Thompson C B. *Cell Metab.*, **2015**, 22(2): 304–311
- 21 Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T, Baba Y. *Cancer Cell Int.*, **2013**, 13(1): 89
- 22 Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab A K. *Hypoxia (Auckl)*, **2015**, 3: 83–92
- 23 Moestue S A, Borgan E, Huuse E M, Lindholm E M, Sitter B, Børresen-Dale A L, Engebraaten O, Maelandsmo G M, Gribbestad I S. *BMC Cancer*, **2010**, 10: 433
- 24 Giskeødegård G F, Grinde M T, Sitter B, Axelson D E, Lundgren S, Fjøsne H E, Dahl S, Gribbestad I S, Bathen T F. *J. Proteome Res.*, **2010**, 9(2): 972–979
- 25 Stewart J D, Marchan R, Lesjak M S, Lambert J, Hergenroeder R, Ellis J K, Lau C H, Keun H C, Schmitz G, Schiller J, Eibisch M, Hedberg C, Waldmann H, Lausch E, Tanner B, Sehouli J, Sagemueller J, Staude H, Steiner E, Hengstler J G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, 109(21): 8155–8160
- 26 Lu’óng K V, Nguyễn L T. *Cancer Genomics Proteomics*, **2013**, 10(4): 169–185
- 27 Bansal A, Simon C M. *J. Cell Biol.*, **2018**, 217(7): 2291–2298
- 28 Weinstein S J, Mackrain K, Stolzenberg-Solomon R Z, Selhub J, Virtamo J, Albanes D. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **2009**, 18(10): 2643–2649
- 29 Iovine B, Oliviero G, Garofalo M, Orefice M, Nocella F, Borbone N, Piccialli V, Centore R, Mazzone M, Piccialli G, Bevilacqua M A. *PLoS One*, **2014**, 9(5): e96755
- 30 Mathé E A, Patterson A D, Haznadar M, Manna S K, Krausz K W, Bowman E D, Shields P G, Idle J R, Smith P B, Anami K, Kazandjian D G, Hatzakis E, Gonzalez F J, Harris C C. *Cancer Res.*, **2014**, 74(12): 3259–3270
- 31 Fischer F, Egg G. *HNO*, **1990**, 38(10): 361–363

Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Based Metabolomics Analysis of Metabolic Reprogramming Induced by Phosphatase and Tensin Homolog

WANG Zhi-Chao^{1,2}, LIU Jing¹, PIAO Hai-Long^{*1,2}

¹(CAS Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry,
Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

²(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Prostate cancer is the most frequently occurred cancer in males. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) deficiency often occurs in prostate cancer and induces metabolic reprogramming. Metabolic vulnerabilities induced by PTEN deficiency may provide therapeutic targets for cancer therapy. Here, capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) based metabolomics analysis was used for analyzing metabolic changes induced by PTEN deficiency in prostate cancer cell DU145 and normal prostate cell RWPE1. 200 and 214 metabolites were detected, and 28 and 37 differential metabolites were authenticated in PTEN knock-downed DU145 and RWPE1 cells compared to their controls, respectively. Threonic acid levels increased, while isobutyrylcarnitine, adenosine diphosphate, *N*-glycolylneuraminic acid, Asp, hypotaurine levels decreased after PTEN silencing in both cell lines. The specific metabolites changes in DU145 after PTEN silencing were L-2-HG, glycerophosphocholine, thiamine, the ratio of GSH to GSSG, and all of them were increased. These metabolites can promote tumor proliferation, metastasis, and resistance to chemotherapy. Creatinine, carnosine and *N*-acetylneuraminic acid, which had been reported to be biomarkers of cancer diagnosis and prognosis, were regulated by PTEN deficiency. Metabolites changes induced by PTEN deficiency only or combined effect of PTEN deficiency and other cancer-related genes were identified.

Keywords Capillary electrophoresis-mass spectrometry; Cell metabolomics; Phosphatase and tensin homolog; Metabolic reprogramming, Prostate cancer

(Received 18 September 2018; accepted 2 November 2018)

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81672440, 81702771) and the Innovation Program of Science and Research from the DICP, CAS (No. DICP TMSR201601).