



^{13}C 稳定同位素代谢流分析在动物营养代谢研究中的应用进展

龚赛明^{1,2}, 郭秋平¹, 孔祥峰^{1,3}, 段叶辉¹, 印遇龙^{1,3}, 李凤娜^{1,3*}

1. 中国科学院亚热带农业生态研究所, 长沙 410125

2. 西南大学动物科学技术学院, 重庆 400715

3. 中国科学院大学现代农业科学学院, 北京 100049

* 联系人, E-mail: lifengna@isa.ac.cn

收稿日期: 2024-07-31; 接受日期: 2024-12-02; 网络版发表日期: 2025-08-22

国家重点研发计划(批准号: 2022YFD1300503)和中国科学院基础与交叉前沿科研专项(批准号: XDB1120400)资助

摘要 ^{13}C 稳定同位素代谢流分析是一种强大且高效的方法, 通过整合同位素标记代谢物数据与代谢网络模型, 并借助复杂的数学计算方式来精确解析细胞和组织的代谢流量。尽管代谢流分析最初主要用于生物工程和生物医药制造领域, 但随着代谢组学检测技术与生物信息计算的不断进步, 基于 ^{13}C 标记的代谢流分析在哺乳动物生理与病理状态下的细胞、组织及系统代谢研究中得到越来越广泛的应用。本文系统地阐述稳定同位素代谢流分析的基本概念及其在细胞内代谢通量评估中的应用, 着重探讨 ^{13}C 代谢流分析在揭示代谢复杂性和新代谢途径的关键作用, 并总结在哺乳动物模型中对糖代谢、脂肪酸代谢和氨基酸代谢等营养领域的具体应用和结果, 以期为动物代谢生理的机制研究提供新的技术支撑。

关键词 稳定同位素代谢流分析, 动物营养, 糖代谢, 脂肪酸代谢, 氨基酸代谢

代谢是生命活动的基础, 也是所有生物应对外界环境的必要手段。动物新陈代谢通过动态调节的方式, 帮助机体适应周围细胞及生态环境的变化。新陈代谢过程的复杂性主要体现在以下三个方面^[1]: (i) 代谢过程发生在线粒体和细胞质等不同的细胞区室中; (ii) 多细胞环境中包含多种营养基质和大量代谢产物; (iii) 代谢网络中存在大量可逆反应。细胞代谢不仅简单地涉及能量的产生与消耗, 代谢过程中产生的代谢物在调节细胞信号通路、调控基因表达和翻译后蛋白质修饰中与细胞的维持、生长等功能同样联系紧

密^[2]。因此, 动物细胞的新陈代谢的空间与时间的复杂性成为限制科学研究的重要挑战。

尽管通过代谢组学分析评估代谢物水平的方式已在研究生物新陈代谢取得显著的成果^[3], 但是当研究目标是更为深入地了解特定代谢网络的动态特性时, 传统代谢组学的局限性便显现出来。代谢组学多聚焦于某一时间点的代谢物浓度测定^[4], 但代谢物浓度的升高可能来源于上游反应速率的增加或下游反应速率的下降, 仅凭静态信息难以揭示体内代谢的动态本质。因此, 仅通过测量代谢网络中代谢物浓度, 无法清楚、

引用格式: 龚赛明, 郭秋平, 孔祥峰, 等. ^{13}C 稳定同位素代谢流分析在动物营养代谢研究中的应用进展. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 1838–1850
Gong S M, Guo Q P, Kong X F, et al. Advances in the application of ^{13}C stable isotope metabolic flux analysis on animal nutrition metabolism (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 1838–1850, doi: 10.1360/SSV-2024-0030

准确地反映潜在的代谢反应速率^[5]。

同位素标记实验(也称为示踪实验)是将标记底物掺入代谢网络的中间体中,通过同位素示踪剂标记上下游的代谢产物变化,追踪代谢转化过程来评估不同酶反应对特定代谢物的产生或消耗的贡献,从而更全面地展现代谢网络中各物质的动态流通^[6]。除定量分析代谢网络中的通量变化外,同位素示踪实验还适用于代谢通量的定性评估,例如代谢途径对特定碳源的依赖性以及通量在分支处的分配途径^[7]。研究体内代谢的同位素示踪剂可分为放射性同位素(如¹⁴C, ³H, ¹⁸F)和稳定同位素(如¹³C, ²H, ¹⁵N)两种类型,其中¹³C标记的代谢物是最常用的示踪剂。放射性同位素也因其易检测性和高灵敏性在细菌、真菌以及动植物的代谢研究中应用广泛,但由于其放射性的安全问题,通常仅小剂量应用于单一预定义代谢途径的研究,且难以提供中间代谢途径定量示踪底物通量所需的丰富数据^[8]。相比之下,稳定同位素虽牺牲部分检测灵敏度,但能够同时标记多个代谢途径并具有更高的标记深度,从而最大限度从单个试验中采集更多的代谢信息^[6]。

代谢流量分析的研究最初是基于假定的网络化学计量平衡模型,通过细胞外部的速率测量(如葡萄糖摄取率、生长率和CO₂浓度变化等)为细胞内代谢通量提供参考,即所谓的化学计量代谢流量分析。在过去的三十年中,稳定同位素代谢流量分析技术得到开发并广泛应用于原核微生物、真核生物、植物和哺乳动物,揭示多种生物系统的细胞内代谢特性^[9,10]。在工业生物技术和生物医药领域,基于¹³C标记的代谢流量分析主要用于指导代谢工程改造与大规模工业生产。然而,由于哺乳动物细胞新陈代谢过程的复杂性,目前在生物体内代谢网络的研究还不够深入。随着代谢组学检测技术与生物计算方法的进步,许多更先进的代谢流量分析技术得以开发,能够以更高的准确性和精确度解析代谢通量。在这一背景下,利用¹³C示踪剂探测细胞和系统的新陈代谢并结合代谢组学开展的¹³C代谢流分析逐渐成熟,并在哺乳动物生理与病理状态下的细胞、组织及系统代谢研究中得到日益广泛的应用(图1)^[11]。在本综述中,本文详细探讨稳定同位素代谢流分析的基本概念及其建立流程(图2),并重点阐述在动物营养代谢研究中的应用来揭示代谢生理与健康的新认知。

1 ¹³C稳定同位素代谢流分析流程

1.1 同位素标记试验

同位素标记试验中,最常用的稳定同位素是²H, ¹³C, ¹⁵N和¹⁸O(自然丰度分别为0.015%, 1.11%, 0.365%和0.204%)^[9]。其中,¹³C普遍存在于生物有机分子中,且自然丰度相对较高;氘(²H或D)的天然丰度极低,但容易与氢(¹H)相互替代;而¹⁵N和¹⁸O主要用于追踪蛋白质与核酸中的氮途径和细胞的呼吸作用。鉴于其他同位素在灵敏性和实用性上的局限,¹³C构成的标记化合物被广泛用作代谢研究的示踪剂。

在动物细胞试验中,¹³C示踪流程通常包括以下步骤:首先是将标记示踪剂在去离子水中制备成储备液,同时未标记的培养基中预培养细胞^[12]。待细胞生长至预定状态后,将未标记的培养基更换为相同浓度的同位素标记培养基,以尽量减少对细胞的扰动并保持状态稳定。随后,待示踪剂迅速分布于整个代谢途径并达到同位素代谢稳态时采集最终的样品^[13]。

在动物体外试验中,¹³C示踪剂的施用方法主要通过以下三种方式。(i) 饮食饲喂:通过固体或液体饮食长期口服示踪剂。这种非侵入性方法可最大限度地减少对动物的损伤及技术复杂性,但示踪剂的使用量较大且具有损耗,导致成本高昂,且因动物采食习惯的问题,难以控制固定的摄取时间^[14]。(ii) 灌胃:通过软管或注射器强制口服给药。此方法便捷、微创,且所需同位素示踪剂的剂量较少^[15]。然而,操作不慎可能会对胃黏膜造成刺激,甚至引发胃肠道反应或其他并发症,如胃穿孔、胃出血。(iii) 静脉输注或腹腔注射:在近期的¹³C代谢试验中,这最广泛的示踪剂施用方法^[16-19]。在此方法中,¹³C示踪剂在规定的时间内以恒定的速率输入静脉血液,以评估标记元素参与组织代谢物结合的情况。与静脉推注或腹腔注射相比,静脉连续输注能有效减少因大剂量示踪剂注入体内而造成的稳态剧烈波动。此外,静脉输注可延长血液中同位素标记的稳定性,使血浆代谢物可以与组织进行多次周转^[20],有助于在下游组织代谢物中实现接近恒定的同位素稳态,从而加深标记深度,探索更复杂的代谢途径。然而,静脉输注的缺点是侵入性和技术复杂性,且对需经消化系统的膳食成分的研究可能不是最佳的选择。例如,采用输注循环系统与口服给药这两种不同方式时,果糖的组织特异性代谢存在显著差异^[21]。此外,

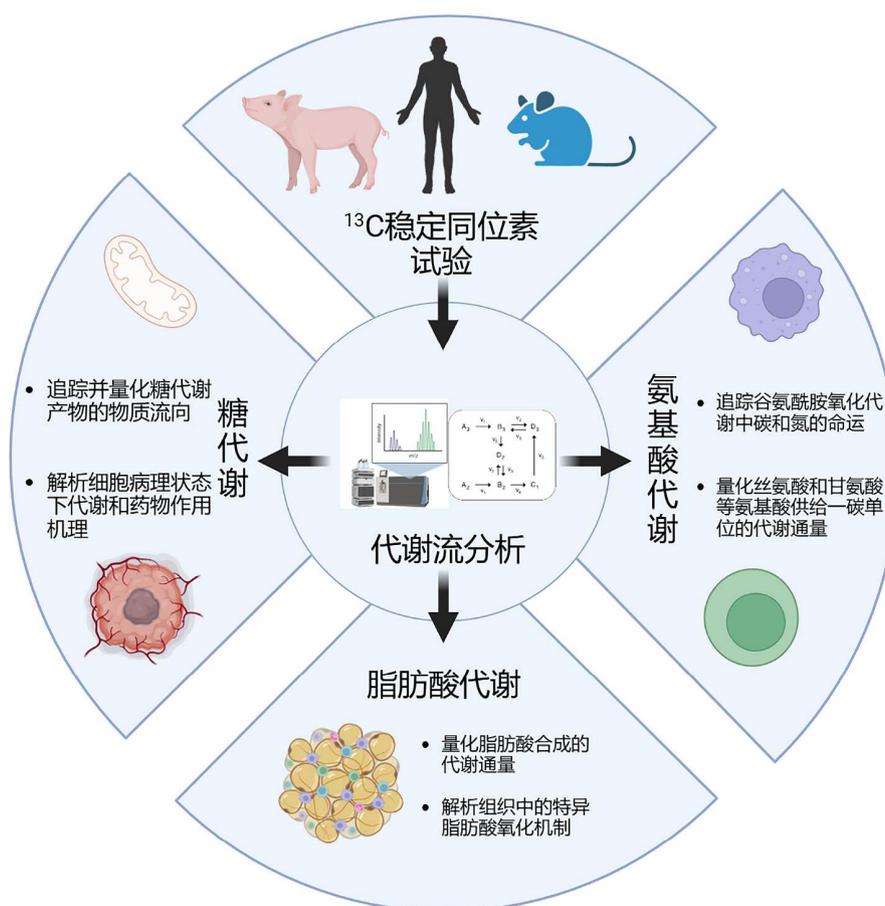


图 1 ^{13}C 稳定同位素代谢流分析在动物营养代谢中的应用

Figure 1 ^{13}C Application of stable isotope metabolic flux analysis in animal nutrient metabolism

腹腔注射也是一种常用方法,尤其适用于低浓度、大剂量示踪剂的应用.腹腔内丰富的血管和淋巴管结构具有较强的吸收能力,使其成为静脉输注的可行替代方案^[22,23].

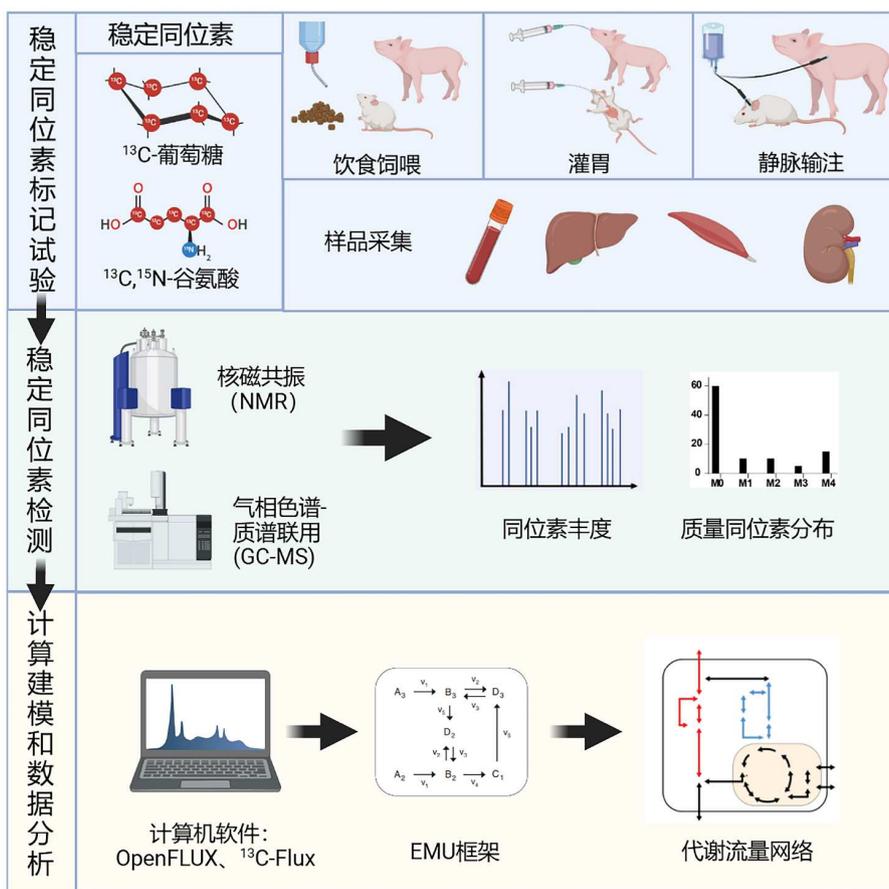
总的来说,目前尚无一种同位素施用方法能在所有方面均被公认为最优.方法的选择应根据具体的研究目的和生物学问题决定.而且样品的收集是整个试验的关键环节,需尽快停止所有代谢反应,并在提取过程中避免任何代谢物的遗漏.此外,在 ^{13}C 示踪剂施用和后续采样期间,试验条件的严格控制和标准化尤为重要,以确保实验数据的可重复性和准确性.

1.2 检测分析方法

稳定同位素代谢流分析中可以应用多种分析技术,在提取细胞或组织代谢物后,应根据所选择的流量

分析技术对样品进行不同的处理.目前,最常用的检测技术包括核磁共振(magnetic resonance imaging, NMR)和质谱(mass spectrum, MS)^[24].

NMR是一种分析同位素代谢的无损伤、非侵入性方法,其能评估同位素富集的位置特异性且能直接区分 ^2H 和 ^{13}C 原子核,被广泛用于人体内 ^{13}C 代谢流量分析^[25].近年来,超极化 ^{13}C 磁共振成像技术的出现显著提高NMR的低灵敏性,使其能够更加准确地实时探测体内代谢过程^[26].MS的原理是通过电离化学成分并根据离子的质荷比对其进行分类.基于MS的分析方法因其在特异性、灵敏度和广泛的检测范围,以及能够有效识别和定量代谢产物,所以在代谢组学研究领域得到广泛的应用.与NMR相比,基于MS的气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrography, GC-MS)和液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-mass

图 2 ^{13}C 稳定同位素代谢流分析流程Figure 2 Flow of ^{13}C stable isotope metabolic flux analysis

spectrometry, LC-MS) 在效率、精度、准确性和高灵敏度方面表现优异, 是 NMR 技术的绝佳替代方案, 尤其适用于小鼠研究或样品量有限的情况^[27,28]. 此外, GC-MS/MS 和 LC-MS/MS 技术通过对单个质量同位素异构体(母体代谢物)的裂解, 能够提供同位素富集代谢物中标记原子位置的附加信息, 即质量同位素分布(mass isotope distribution, MID)^[29,30]. NMR 的主要优点在其非破坏性特点, 使得样品可在 NMR 分析后仍可继续使用. 这一特性使得高分辨率 MS/MS 分析可以与 NMR 光谱提供的特征信息相互补充, 从而获得具有更高精度和准确度的结果. 检测技术的不断进步将进一步推动代谢生物学和营养生理学的研究, 为理解动物代谢的复杂性以及探索疾病发生机制提供新的思路和方法.

1.3 计算建模和数据分析

对检测收集的数据进行分析是确定生物体代谢网

络的最后步骤. 在动物进行代谢流量分析中, 首先需要构建代谢反应网络, 该网络包含细胞中发生的所有相关生化反应的化学计量关系. 反应是否存在的信息可以从文献和生物化学书籍中相应获取, 也可以根据同位素富集数据的定性分析来推断代谢途径的活性或代谢物周转信息. 然而, 代谢途径通常以复杂的方式相互作用来重新排列底物分子结构中的原子顺序, 因此必须借助数学模型来计算同位素标记数据以确定代谢通量^[31].

哺乳动物体内的同位素标记物在代谢网络中的反应往往呈现非稳态特性, 因此, 计算代谢通量需要解决大量描述标记动态的常微分方程. 代谢流分析的核心在于参数估计, 通过优化模型参数来确定通量和代谢物池的大小, 以解释稳态或非稳态同位素标记模式^[32]. 对于含有 n 个碳原子的化合物中, 其构成的化合物的 MID 种类多达 2^n . 虽然简单的 MID 和相应的代谢流量

可以根据数学模型手工计算,但由于实际代谢系统复杂且庞大,涉及可逆反应和循环反应,这使得手动计算分析难以实现,需要借助计算机算法以及相关软件辅助计算^[33]。直到2007年, Antoniewicz等人^[34]开发一种简化同位素异构体计算的新方法,即基本代谢物单元(elementary metabolite unit, EMU)框架。该方法基于高效的分解算法,可识别模拟代谢物同位素异构体所需的最少量标记信息。使用EMU框架模拟的同位素异构体丰度与传统同位素异构体和累积体方法获得的丰度结果一致,但其模型规模小几个数量级,计算效率显著提高,所需算力和时间大幅缩短。

目前,大多数软件使用EMU框架来计算 ^{13}C 同位素分布,其中最常用的软件是OpenFLUX和 ^{13}C -Flux^[35,36]。在代谢流分析软件中,用户输入同位素的质量分布向量(mass distribution vector, MDV)数据会被映射到模型中的对应的反应或代谢物上,随后软件通过迭代计算过程,在给定输入的代谢模型下计算出与外部通量和MDV匹配的最佳内部通量集。最终输出的数据以某一标志代谢物的反应速度为基点,展示出整个网络中各代谢物的相对代谢流量。

2 ^{13}C 稳定同位素代谢流分析在动物营养代谢中的应用

在过去三十年间,代谢流分析方法在农业植物、代谢工程和生物医学等多个领域取得指数级增长的成果。与此同时,稳定同位素代谢流分析也逐渐应用于研究生理和病理状态下的动物代谢,以此来识别独特的疾病代谢特征以及解决药物研发中潜在的瓶颈。因此,本文在接下来的内容中重点展示近年来以 ^{13}C 为示踪剂的代谢流分析在动物糖代谢、脂肪酸代谢和氨基酸代谢等领域的应用进展(表1)。

2.1 动物糖代谢中的应用

糖代谢主要包括糖酵解、三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环、糖异生和磷酸戊糖途径,是生物能量供应与物质转换中的核心环节,也是连接机体组织间代谢产物交流的关键纽带。通过 ^{13}C 同位素标记葡萄糖、乳酸和丙酮酸等碳源中的碳链,可以追踪糖代谢产物的物质流向,并对糖代谢在哺乳动物中的动态过程进行精确量化,这一技术已在哺乳动物中取得里程

碑式的成果,例如葡萄糖-丙氨酸循环和乳酸循环^[64]。在此基础上再引入代谢流分析技术,可以对物质交互进行纵向量化,以此来验证各代谢反应与产物在细胞、组织和器官的生理作用。

哺乳动物的器官是通过血液循环获取营养物质,这些营养物质既可能来源于饮食,也可能通过体内储存的转化而来。TCA循环中分解代谢的碳源来源是代谢生理学中的经典问题。20世纪20年代, Warburg等人^[65]发现癌细胞在有氧条件下比健康细胞产生更多乳酸,这种现象被称为瓦伯格效应。然而,过去几十年来仍未阐明癌细胞利用乳酸来支持自身生长的机制。在骨骼肌、肝脏、心脏和肾脏等组织中, Liu等人^[38]通过代谢流分析构建多种中心碳代谢模型,发现葡萄糖在大多数情况下比乳酸对TCA循环底物的贡献更大。这一结论通过 $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ 葡萄糖在不同动物品系、不同给药方式和不同组织类型中得到验证。在代谢流分析的帮助下,研究人员逐渐清楚地认识到乳酸也是健康细胞和癌细胞中TCA循环的重要碳源^[66]。通过静脉输注 $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ 乳酸标记的流量分析表明,乳酸具有肺癌细胞所有代谢物中最高的循环周转通量,其在正常小鼠中是葡萄糖的1.1倍,在禁食小鼠中是葡萄糖的2.5倍。在大脑之外的所有组织中,乳酸循环周转通量都高于葡萄糖,葡萄糖对组织TCA循环的贡献主要是间接通过乳酸来实现的^[39]。相似地,在骨骼肌中也有研究表明乳酸是主要的TCA循环供能物质。乳酸通过单羧酸转运蛋白(monocarboxylate transporters, MCTs)跨膜运输,其中MCT1在肌肉中高度表达,代谢流分析发现小鼠骨骼肌MCT1的缺失会增加骨骼肌中的糖酵解通量和葡萄糖的TCA循环通量,由此发现MCT1介导的乳酸穿梭通过调节线粒体生物合成和TCA通量在调节肌肉功能中起关键作用^[40]。此外, Hui等人^[37]通过将高碳水或生酮饮食小鼠与禁食小鼠相对比,利用15种不同的 ^{13}C 示踪剂来确定循环营养物质的直接来源。在广泛地计算循环代谢周转和组织中TCA循环的输入后,发现大部分碳通量由两个主要循环进行:葡萄糖-乳酸和甘油三酯-甘油-脂肪酸。为解释之前研究中肝脏TCA循环和糖异生代谢通量估计差异的争议, Hasenour等人^[17]使用 $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ 乳酸和 $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ 丙酮酸示踪肝脏葡萄糖代谢通量,结果揭示肝脏不同 ^{13}C 示踪剂之间的肝脏丙酮酸循环通量存在差异,并且使用 $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ 乳酸和 $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ 丙酮酸估计的肝通量的一致部分与外周示踪

表1 动物营养代谢稳定同位素代谢流分析的最新研究进展

Table 1 The latest research advances of stable isotope metabolic flux analysis in animal nutrition metabolism

参考文献	应用领域	研究对象	研究物种	示踪剂	给药方式	检测方式	研究结果
[17]	糖代谢	肝脏代谢	小鼠	[6,6- ² H ₂]葡萄糖、 ² H ₂ O、[U- ¹³ C]丙酸	静脉输注	GC-MS	使用代谢流分析定量测定生理应激过程中肝脏葡萄糖和中间体的通量。
[21]	糖代谢	果糖分解	小鼠	[U- ¹³ C]果糖	静脉输注灌胃	LC-MS	不同器官果糖分解代谢的定量评价。
[37]	糖代谢	TCA循环	小鼠	[U- ¹³ C]葡萄糖、[U- ¹³ C]谷氨酰胺、[U- ¹³ C]乳酸	静脉输注	LC-MS GC-MS	确定乳酸具有所有代谢物中最高的循环周转通量, 并且是大多数组织和肿瘤中的TCA循环主要底物。
[38]	糖代谢	TCA循环	小鼠	[U- ¹³ C]葡萄糖	静脉输注	LC-HRMS	几乎在所有情况下, 葡萄糖作为TCA循环底物的贡献大于乳酸。
[39]	糖代谢	TCA循环	小鼠	15种不同同位素	静脉输注	LC-MS	大部分循环碳通量由两个主要循环携带: 葡萄糖-乳酸和甘油三酯-甘油-脂肪酸。
[40]	糖代谢	TCA循环	小鼠	[U- ¹³ C]葡萄糖、[U- ¹³ C]乳酸	静脉输注	LC-MS	确定MCT1介导的乳酸穿梭通过调节线粒体生物合成和TCA循环通量在调节肌肉功能中起关键作用。
[41]	糖代谢	葡萄糖耐受	小鼠	[U- ¹³ C]葡萄糖	灌胃	LC-MS	揭示机体代谢物和途径与葡萄糖稳态的时间依赖性。
[42]	糖代谢	糖尿病	干细胞衍生的β细胞	[U- ¹³ C]葡萄糖	培养基添加	LC-MS	量化干细胞衍生的β细胞感知葡萄糖的能力, 并确定线粒体回补循环减少是细胞中葡萄糖刺激的胰岛素分泌减少的原因。
[43]	糖代谢	糖异生和糖原生成	人中性粒细胞	[U- ¹³ C]葡萄糖、[U- ¹³ C]谷氨酰胺、[U- ¹³ C]乳酸	培养基添加	LC-MS	揭示中性粒细胞中调节自分泌糖原储存的能力。
[44]	糖代谢	葡萄糖稳态	人肝细胞	[U- ¹³ C]葡萄糖	培养基添加	GC-MS	评估PFOA改变糖酵解与TCA循环的代谢模式。
[45]	糖代谢	TCA循环	牛软骨细胞	[U- ¹³ C]葡萄糖	培养基添加	GC-MS	发现当营养供应增加时, 软骨细胞会从以厌氧为主转变为需氧-厌氧混合表型。
[46]	糖代谢	TCA循环	NIH-3T3细胞	[U- ¹³ C]葡萄糖	培养基添加	GC-MS	发现丹参酮IIA抑制糖酵解和TCA通量, 从而抑制转化生长因子-β1依赖性细胞外基质的产生以及体外成纤维细胞的分化和增殖。
[47]	糖代谢	非小细胞肺癌	人	[U- ¹³ C]葡萄糖	静脉输注	GC-MS NMR	分析肿瘤代谢微环境中糖酵解和TCA循环的贡献。
[48]	糖代谢	非小细胞肺癌	人	[U- ¹³ C]葡萄糖	静脉输注	GC-MS NMR	确定癌细胞丙酮酸羧化酶的活性对TCA循环的影响。
[49]	糖代谢	原发软组织肉瘤	小鼠	[U- ¹³ C]葡萄糖	静脉输注	LC-MS/MS	在线粒体代谢受损的情况下, 葡萄糖衍生的丙酮酸转化为乙酸以维持乙酰CoA池。
[50]	糖代谢	器官代谢交换	猪 小鼠	6种不同示踪剂	静脉输注	LC-MS	基于动/静脉代谢物水平(猪)和 ¹³ C富集(小鼠)的差异分析器官特定的营养利用。
[51]	脂肪酸代谢	脂肪酸合成	小鼠	[U- ¹³ C]葡萄糖、[U- ¹³ C]果糖、 ² H ₂ O	静脉输注	NMR	确定外源性葡萄糖和果糖对脂肪酸合成的贡献。
[52]	脂肪酸代谢	脂肪酸合成	小鼠	[U- ¹³ C ₅ - ¹⁵ N]缬氨酸、[U- ¹³ C ₆ - ¹⁵ N]亮氨酸	自由采食	LC-MS GC-MS	定量单甲基支链氨基酸对脂肪酸合成的贡献。
[53]	脂肪酸代谢	脂肪酸合成	3T3-L1细胞	[1- ¹³ C]葡萄糖、[2- ¹³ C]葡萄糖、[3- ¹³ C]葡萄糖、[4,5,6- ¹³ C]葡萄糖	培养基添加	GC-MS	量化缺氧对脂肪细胞中脂肪生成、从头脂肪生成和代谢重编程的影响。

(表1续)

参考文献	应用领域	研究对象	研究物种	示踪剂	给药方式	检测方式	研究结果
[54]	脂肪酸代谢	甘油三酯合成	小鼠	[U- ^{13}C]棕榈酸	静脉输注	GC-MS	胰岛素对脂肪酸酯化成肝脏甘油三酯合成速率的影响.
[55]	脂肪酸代谢	棕色脂肪组织	小鼠	[U- ^{13}C]葡萄糖	自由采食	UPLC-MS	棕色脂肪组织具有最高的棕榈酸酯合成活性,但对循环没有明显贡献,表明其自主合成燃烧机制.
[18]	氨基酸代谢	胰岛素抵抗	小鼠	混合[U- ^{13}C]支链氨基酸	静脉输注 灌胃	LC-MS	理解哺乳动物系统中组织支链氨基酸氧化的量化框架.
[56]	氨基酸代谢	谷氨酰胺氧化	hESCs	[U- ^{13}C]葡萄糖、 [U- ^{13}C]谷氨酰胺	培养基添加	LC-MS/MS	揭示谷氨酰胺是hPSC细胞氧化磷酸化的主要能源来源.
[57]	氨基酸代谢	谷氨酰胺氧化	小鼠	[U- $^{13}\text{C}_6$ - ^{15}N]谷氨酰胺	眼眶注射	LC-MS GC-MS	定量BAT作为葡萄糖和氨基酸库的能力,并提供BAT燃料利用的全面的概况.
[58]	氨基酸代谢	谷氨酰胺氧化	小鼠肝原代细胞	[U- ^{13}C]葡萄糖、 [U- ^{13}C]谷氨酰胺	培养基添加	LC-MS/MS	揭示氨基酸是小鼠肝细胞中TCA循环和脂肪生成的主要碳供应者.
[59]	氨基酸代谢	谷氨酰胺合成	MCF7细胞	[U- ^{13}C]丝氨酸、 [U- ^{13}C]葡萄糖	培养基添加	CE-MS	量化谷氨酸和谷氨酰胺的生物合成需求.
[60]	氨基酸代谢	丝氨酸合成	CD8 ⁺ T效应细胞	[U- ^{13}C]葡萄糖、 [U- ^{13}C]谷氨酰胺	培养基添加	LC-MS/MS	GOT1通过维持细胞内氧化还原平衡和丝氨酸介导的嘌呤核苷酸生物合成来增强增殖.
[61]	氨基酸代谢	谷氨酰胺氧化	CD8 ⁺ T效应细胞	[U- ^{13}C]葡萄糖、 [U- ^{13}C]谷氨酰胺、 [U- ^{13}C]乙酸盐	培养基添加	GC-MS	CD8 Tef β 细胞在感染过程中改变染料偏好,在感染后期从谷氨酰胺依赖性TCA循环代谢转变为乙酸依赖性TCA循环代谢.
[62]	氨基酸代谢	恶性胶质瘤	人和小鼠	[U- ^{13}C]葡萄糖、 [U- ^{13}C]谷氨酰胺	静脉输注	HPLC-MS	肿瘤细胞生长所需的谷氨酰胺主要由谷氨酰胺合成酶从TCA循环衍生的碳中产生,仅少量由循环贡献.
[63]	氨基酸代谢	叶酸合成	小鼠	[2,3,3- ^2H]丝氨酸	静脉输注	LC-MS	从丝氨酸合成嘌呤和胸苷的一碳单位来源分析胞浆或线粒体叶酸代谢.

循环和TCA循环内的同位素平衡不完全有关. Liu等人^[49]等利用 ^{13}C -葡萄糖示踪[U- $^{13}\text{C}_3$]-丙酮酸、[U- $^{13}\text{C}_2$]-乙酸和[U- $^{13}\text{C}_3$]-乳酸的动力学,意外发现糖酵解的最终产物丙酮酸和乳酸的生成速率与乙酸生成速率相当. 此研究表明,在代谢受限的环境中,乙酸从头合成的产生可以维持乙酰辅酶A库并支持细胞增殖. 由于乙酸的从头合成与线粒体代谢紧密耦联,这一过程可能涉及多种潜在的调控机制,并与代谢疾病的病理生理过程存在重要关联.

在研究细胞病理状态下代谢和药物作用机理时,代谢流分析展现重要的应用潜力. 葡萄糖耐量作为一种复杂的表型,其调节涉及多个组织在代谢稳态中的相互作用. Lopes等人^[41]通过对小鼠口服葡萄糖耐量试验期间[U- $^{13}\text{C}_6$]葡萄糖组织衍生碳示踪分布的分析,构建12个代谢相关的器官和血浆的代谢图谱和脂质图谱,揭示代谢物及代谢途径达到葡萄糖稳态的时间依

赖性特征. 此外,代谢流分析还发现在干细胞衍生的 β 细胞中TCA循环的中间代谢物以及甘油醛3-磷酸脱氢酶和磷酸甘油酸激酶下游糖酵解后期的代谢流量减少,导致线粒体补充代谢循环的减缓,最终引发葡萄糖刺激的胰岛素分泌能力下降^[42]. 中性粒细胞在氧气和代谢底物有限的受伤或感染组织中仍能发挥功能,这种中性粒细胞的代谢适应可能是病理机制与靶向治疗的基础. Sadiku等人^[43]通过示踪[U- $^{13}\text{C}_6$]葡萄糖观察到中性粒细胞通过糖异生和糖原生成建立细胞内糖原储备,从而提高中性粒细胞的细菌清除能力和生存适应性. 全氟辛酸对细胞内葡萄糖稳态的破坏作用目前难以明确评估,但Zhang等人^[44]通过 ^{13}C 同位素的代谢流分析发现,全氟辛酸显著抑制HepG2人肝细胞中[U- $^{13}\text{C}_6$]葡萄糖驱动的TCA循环的通量,而对糖酵解的代谢模式未产生显著改变. 这进一步表明代谢流分析是一种强大的工具可用于揭示与葡萄糖代谢相关的污染物毒

性机制. 软骨细胞通常在无氧代谢环境中代谢. 然而, ^{13}C 代谢流分析表明, 当营养物质增加时, 软骨细胞会从无氧代谢转向有氧与无氧相结合的混合代谢模式, 这种代谢转变源于乳酸发酵途径的饱和以及代谢物向TCA循环的溢流^[45,67]. 这种新颖代谢效应的发现为增强软骨细胞的生物合成反应提供一种新方法, 可用于开发人工关节功能的工程软骨组织. 丹参酮IIA具有抗肺纤维化特性, 这主要归因于其抗氧化和抗炎功效, Shan等人^[46]利用 ^{13}C 代谢流分析检测丹参酮IIA在肺纤维化中的代谢调控节点, 发现丹参酮IIA可显著抑制NIH-3T3细胞中糖酵解和TCA循环通量, 从而抑制转化生长因子- β 1依赖性细胞外基质的生成以及成纤维细胞的增殖和分化.

因此, 代谢流分析揭示营养物质通量在哺乳动物生理学中的相对贡献, 并明确葡萄糖和乳酸在组织及病理条件下作为TCA循环底物的差异, 为理解病理机制和开发治疗策略提供强大工具.

2.2 动物脂肪酸代谢中的应用

脂肪酸代谢主要由脂肪酸的从头合成和 β -氧化两部分组成. 虽然许多细胞和组织依赖脂肪酸摄取来满足自身要求, 但大量研究表明脂肪酸的从头合成在癌症、神经发生和代谢综合征等多种情况下发挥着重要的功能^[68]. 在从头合成的新脂质的过程中, 乙酰辅酶A和NADPH是关键原料, 多种底物(包括葡萄糖、果糖、乙酸盐、谷氨酰胺、亮氨酸/异亮氨酸等)通过代谢途径被转化为乙酰辅酶A, 从而为脂肪酸和胆固醇碳链提供碳原子. 稳定同位素示踪法被证明是一种量化各代谢途径对脂肪酸从头合成贡献的有效工具. 在动物和人类中, 使用氘水($^2\text{H}_2\text{O}$)作为示踪剂评估体内脂肪组织周转率的非侵入性方法已有数十年^[69]. 近年来, 基于 ^{13}C 代谢流量分析技术通过细胞内示踪数据来量化脂肪酸合成的代谢通量则是一项新兴手段.

在大多数细胞类型中, 葡萄糖被认为是脂肪酸从头合成的主要碳源. 然而, 有研究通过 ^2H 和 ^{13}C NMR光谱共同解析和量化新合成的脂肪酸, 发现葡萄糖和果糖在相同摄入量的情况下, 果糖对于肝脏而言是更有效的脂肪酸生成底物^[51]. 此外, 在体外培养的脂肪细胞中, 通过追踪 ^{13}C 标记的单甲基支链氨基酸(如亮氨酸和异亮氨酸)分解代谢流量与脂肪酸合成代谢流

量, 发现支链氨基酸产生的乙酰辅酶A是内源性脂肪酸合成的重要原料, 表明氨基酸也是体内新脂肪酸合成中尚未被充分认识的来源^[52,70]. Si等人^[71]通过代谢流分析结合模块化分析算法, 对白色脂肪组织中脂肪酸从头合成的代谢变化进行定量分析, 结果显示磷酸戊糖途径提供成熟脂肪细胞脂肪酸合成所需的60% NADPH, 同时, 丙酮酸转运和氧化反应被发现是促进成熟脂肪细胞脂肪生成表型的关键步骤. Oates等人^[53]利用 ^{13}C -代谢流分析量化细胞中相对净脂肪酸合成率, 发现缺氧条件下脂肪细胞的脂质生成减少大约40%, 而且无论短期(1天)还是长期(7天), 缺氧均会导致类似的细胞代谢重编程. 进一步研究中, 通过给小鼠静脉输注 $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ 棕榈酸, 代谢流分析揭示肝脏中脂肪酸酯化成甘油三酯的合成速率主要受血浆脂肪酸输注速率影响, 与血浆胰岛素浓度的变化无关, 这说明肝脏脂肪酸的酯化过程很大程度上独立于胰岛素作用^[54]. 此外, 对小鼠12个组织器官进行的代谢流分析发现, 棕色脂肪细胞在从头合成棕榈酸的过程中具有最强的棕榈酸合成活性, 但合成的棕榈酸对循环系统没有明显贡献, 表明棕色脂肪具有独特的自主合成-燃烧机制^[55]. 总的来看, 代谢流分析是研究脂肪酸从头合成及其调控机制的重要工具, 为解析脂质代谢异常和开发干预策略提供新视角.

2.3 动物氨基酸代谢中的应用

氨基酸的主要功能是作为蛋白质合成中的单体单元和生物合成反应的底物. 尽管蛋白质种类复杂且分子量大, 难以通过代谢流分析计算氨基酸的具体合成通量, 但氨基酸不仅是肽和蛋白质生物合成的基石, 氨基酸的氧化代谢以及嘌呤、嘧啶等含氮化合物的合成也是维持细胞生长、代谢和免疫的关键途径^[72]. 氨基酸的氧化途径从转氨酶介导的脱氨作用开始, 将氨基转移至 α -酮戊二酸, 随后形成谷氨酸进入尿素循环, 而另一种产物酮酸进入TCA循环, 为生命活动提供能量. 因此, 通过 ^{13}C 标记的谷氨酰胺和 ^{15}N 标记的谷氨酰胺可分别追踪谷氨酰胺氧化代谢中碳和氮的命运, 结合代谢流分析可以定量确定谷氨酰胺对中心碳代谢途径的贡献^[73]. 例如, 代谢流分析通过比较 $[\text{U}-^{13}\text{C}_5]$ 谷氨酰胺与 $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ 葡萄糖示踪人类多能干细胞(hPSCs)的代谢流量差异, 发现hPSCs氧化丙酮酸的能力较差, 而谷氨酰胺是其氧化磷酸化的主要能量

来源。此外, 研究还表明谷氨酰胺氧化代谢不仅通过 α -酮酸产生ATP, 还通过形成谷胱甘肽对TCA循环产生重要影响, 揭示hPSCs中谷氨酰胺代谢的独有特征^[56]。Park等人^[57]通过 ^{13}C 和 ^{15}N 标记的谷氨酰胺的代谢流分析并结合动静脉代谢组学, 量化血液、棕色脂肪和骨骼肌中代谢物的交换流量, 发现约85%的适应性产热碳来自葡萄糖和乳酸, 其余则由谷氨酰胺以外的氨基酸提供。Liao等人^[58]通过代谢流分析对小鼠肝原代细胞中TCA循环底物偏好进行量化检测, 发现氨基酸氧化占线粒体呼吸的约33%, 其次是脂肪酸(12.4%)和丙酮酸(4%); 进一步通过比较 $[\text{U}-^{13}\text{C}_5]$ 谷氨酰胺与 $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ 葡萄糖原代肝细胞中新生脂肪酸中碳的来源, 发现棕榈酸更倾向于吸收来自谷氨酰胺的 ^{13}C 而非葡萄糖, 并且谷氨酰胺及其他氨基酸在提供能量和碳前体方面的效率分别比葡萄糖高约14倍和8倍。这些发现进一步突出氨基酸在肝脏代谢中的关键作用及其优越的能量利用效率。

氨基酸还可以作为一碳单位的供体, 其代谢物过程依赖叶酸作为一碳单位的转移载体, 最终用于合成嘌呤、嘧啶和蛋氨酸等细胞增殖所需的重要原料。代谢流分析能量化丝氨酸和甘氨酸等氨基酸供给一碳单位的代谢通量, 揭示细胞增殖过程中的代谢机制, 特别是在癌细胞中^[74]。丝氨酸是一种非必需氨基酸, 可以被细胞摄取或通过丝氨酸合成途径从糖酵解中间体3-磷酸甘油酸进行合成^[75]。瞬时代谢流分析发现在乳腺癌细胞中 $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]$ 丝氨酸的MID在示踪剂添加后8小时达到稳态, 而嘌呤和谷胱甘肽的同位素分数则遵循瞬态动态, 但每单位代谢物的周转率大致恒定^[59]。同时, 研究还发现甲氨蝶呤(一种著名的嘌呤合成抑制剂)不仅抑制嘌呤合成, 还通过增加AMP/ATP比率、激活AMPK以及抑制蛋白质和谷胱甘肽合成影响细胞代谢^[59]。此外, T细胞的激活、增殖和分化功能与代谢重编程密切相关。Xu等人^[60]使用代谢流分析揭示, 谷氨酸草酰乙酸转氨酶1在促进 CD8^+ T细胞效应(T effector, Tef)细胞分化和功能中的关键作用。 $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ 葡萄糖示踪显示, Tef细胞中谷氨酸草酰乙酸转氨酶1通过调节 α -酮戊二酸的水平和丝氨酸介导的嘌呤核苷酸生

物合成来促进增殖^[60]。Ma等人^[61]利用 ^{13}C 代谢流分析也发现, $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ 谷氨酰胺是 CD8^+ Tef细胞快速增殖早期的主要TCA循环燃料, 支持ATP和嘧啶的从头合成, 而且 CD8^+ Tef细胞在感染后由早期的谷氨酰胺依赖性TCA循环代谢转变为乙酸依赖性TCA循环代谢。此研究利用代谢流分析深入了解Tef细胞代谢的动态, 阐明与体内 CD8^+ Tef细胞功能相关的燃料消耗的不同途径, 有助于识别影响T细胞效应功能以及分化的关键代谢节点。

3 结语与展望

近三十年来, 代谢流分析结合同位素标记、代谢组学和计算机科学等领域成为多学科交叉应用的一个典型案例。简而言之, 代谢流分析将稳定同位素引入生物系统, 并基于已知代谢通路中碳转化的反应网络, 计算通过不同节点的代谢流量。以往的代谢组学侧重于代谢物的识别和定量, 但代谢流分析则是通过研究生物系统中代谢流量或生化反应速率的动态变化, 更准确定量地理解代谢机制。分子流量变化反映遗传和代谢调控的综合结果, 最终决定细胞表型特征。因此, 转录组学、蛋白质组学和代谢组学提供代谢网络潜在功能和能量物质转化的信息, 而代谢流分析则是对通过对网络中每一步反应的流量值进行精细定量, 可认为是对代谢表型的直接衡量。许多疾病(例如癌症)中代谢流量是其重要特征之一, 解析代谢过程速率的变化不仅有助于揭示疾病发生和进展的机制, 还为危险因素的评估以及治疗方法开发提供重要依据。然而, 目前稳定同位素代谢流分析所用的同位素示踪剂和检测分析费用高昂, 研究主要集中于细胞或小鼠等小型试验中, 对于大型哺乳动物组织和器官的系统性分析仍相对较少。尽管如此, 稳定同位素代谢流分析通过引入多种稳态和动态监测方法, 在糖代谢、脂肪酸代谢和氨基酸代谢等领域中拓展对哺乳动物在健康以及病理环境下代谢机制的理解, 为营养代谢活动的深入认识和新型治疗药物的开发提供重要的技术支持。

致谢 特别感谢国内外相关团队前期关于稳定同位素代谢流分析的基础性研究, 为本文撰写提供大量素材。

参考文献

- 1 Locasale J W, Cantley L C. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell Metab*, 2011, 14: 443–451
- 2 Nielsen J, Keasling J D. Engineering cellular metabolism. *Cell*, 2016, 164: 1185–1197
- 3 Idle J R, Gonzalez F J. Metabolomics. *Cell Metab*, 2007, 6: 348–351
- 4 Jang C, Chen L, Rabinowitz J D. Metabolomics and isotope tracing. *Cell*, 2018, 173: 822–837
- 5 Kim I-Y, Park S, Kim Y, et al. Tracing metabolic flux *in vivo*: basic model structures of tracer methodology. *Exp Mol Med*, 2022, 54: 1311–1322
- 6 Kim I Y, Suh S H, Lee I K, et al. Applications of stable, nonradioactive isotope tracers in *in vivo* human metabolic research. *Exp Mol Med*, 2016, 48: e203
- 7 Buescher J M, Antoniewicz M R, Boros L G, et al. A roadmap for interpreting ^{13}C metabolite labeling patterns from cells. *Curr Opin Biotechnol*, 2015, 34: 189–201
- 8 Zamboni N, Saghatelian A, Patti G J. Defining the metabolome: size, flux, and regulation. *Mol Cell*, 2015, 58: 699–706
- 9 de Falco B, Giannino F, Carteni F, et al. Metabolic flux analysis: a comprehensive review on sample preparation, analytical techniques, data analysis, computational modelling, and main application areas. *RSC Adv*, 2022, 12: 25528–25548
- 10 Yao R L. Thirty years development of ^{13}C metabolic flux analysis: a review (in Chinese). *Chin J Biotechnol*, 2021, 37: 1510–1525 [姚瑞莲. ^{13}C 代谢流量分析发展30年. *生物工程学报*, 2021, 37: 1510–1525]
- 11 Long C P, Antoniewicz M R. High-resolution ^{13}C metabolic flux analysis. *Nat Protoc*, 2019, 14: 2856–2877
- 12 You L, Zhang B, Tang Y. Application of stable isotope-assisted metabolomics for cell metabolism studies. *Metabolites*, 2014, 4: 142–165
- 13 Cordes T, Metallo C M. Quantifying intermediary metabolism and lipogenesis in cultured mammalian cells using stable isotope tracing and mass spectrometry. *Methods Mol Biol*, 2019, 1978: 219–241
- 14 Sun R C, Fan T W M, Deng P, et al. Noninvasive liquid diet delivery of stable isotopes into mouse models for deep metabolic network tracing. *Nat Commun*, 2017, 8: 1646
- 15 Williams H C, Piron M A, Nation G K, et al. Oral gavage delivery of stable isotope tracer for *in vivo* metabolomics. *Metabolites*, 2020, 10: 501
- 16 Rahim M, Hasenour C M, Bednarski T K, et al. Multitissue $^2\text{H}/^{13}\text{C}$ flux analysis reveals reciprocal upregulation of renal gluconeogenesis in hepatic PEPCK-C-knockout mice. *JCI Insight*, 2021, 6: e149278
- 17 Hasenour C M, Rahim M, Young J D. *In vivo* estimates of liver metabolic flux assessed by ^{13}C -propionate and ^{13}C -lactate are impacted by tracer recycling and equilibrium assumptions. *Cell Rep*, 2020, 32: 107986
- 18 Neinast M D, Jang C, Hui S, et al. Quantitative analysis of the whole-body metabolic fate of branched-chain amino acids. *Cell Metab*, 2019, 29: 417–429.e4
- 19 Samuel V T, Shulman G I. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest*, 2016, 126: 12–22
- 20 Faubert B, Tasdogan A, Morrison S J, et al. Stable isotope tracing to assess tumor metabolism *in vivo*. *Nat Protoc*, 2021, 16: 5123–5145
- 21 Jang C, Hui S, Lu W, et al. The small intestine converts dietary fructose into glucose and organic acids. *Cell Metab*, 2018, 27: 351–361.e3
- 22 Al Shoyaib A, Archie S R, Karamyan V T. Intraperitoneal route of drug administration: should it be used in experimental animal studies? *Pharm Res*, 2020, 37: 12
- 23 Wang S P, Zhou D, Yao Z, et al. Quantifying rates of glucose production *in vivo* following an intraperitoneal tracer bolus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016, 311: E911–E921
- 24 Szyperski T. ^{13}C -NMR, MS and metabolic flux balancing in biotechnology research. *Quart Rev Biophys*, 1998, 31: 41–106
- 25 Wiechert W. ^{13}C metabolic flux analysis. *Metab Eng*, 2001, 3: 195–206
- 26 Goluch S, Frass-Kriegel R, Meyerspeer M, et al. Proton-decoupled carbon magnetic resonance spectroscopy in human calf muscles at 7 T using a multi-channel radiofrequency coil. *Sci Rep*, 2018, 8: 6211
- 27 Wittmann C. Fluxome analysis using GC-MS. *Microb Cell Fact*, 2007, 6: 6
- 28 McCloskey D, Young J D, Xu S, et al. MID max: LC-MS/MS method for measuring the precursor and product mass isotopomer distributions of metabolic intermediates and cofactors for metabolic flux analysis applications. *Anal Chem*, 2016, 88: 1362–1370
- 29 Saborano R, Eraslan Z, Roberts J, et al. A framework for tracer-based metabolism in mammalian cells by NMR. *Sci Rep*, 2019, 9: 2520
- 30 Choi J, Antoniewicz M R. Tandem mass spectrometry: a novel approach for metabolic flux analysis. *Metab Eng*, 2011, 13: 225–233

- 31 Alves T C, Pongratz R L, Zhao X, et al. Integrated, step-wise, mass-isotopomeric flux analysis of the TCA cycle. *Cell Metab*, 2015, 22: 936–947
- 32 Lugar D J, Sriram G, Maranas C D. Isotope-assisted metabolic flux analysis as an equality-constrained nonlinear program for improved scalability and robustness. *PLoS Comput Biol*, 2022, 18: e1009831
- 33 Dandekar T, Fieselmann A, Majeed S, et al. Software applications toward quantitative metabolic flux analysis and modeling. *Brief BioInf*, 2014, 15: 91–107
- 34 Antoniewicz M R, Kelleher J K, Stephanopoulos G. Elementary metabolite units (EMU): a novel framework for modeling isotopic distributions. *Metab Eng*, 2007, 9: 68–86
- 35 Quek L E, Wittmann C, Nielsen L K, et al. OpenFLUX: efficient modelling software for ^{13}C -based metabolic flux analysis. *Microb Cell Fact*, 2009, 8: 25
- 36 Antoniewicz M R. Methods and advances in metabolic flux analysis: a mini-review. *J Industrial Microbiol Biotechnol*, 2015, 42: 317–325
- 37 Hui S, Cowan A J, Zeng X, et al. Quantitative fluxomics of circulating metabolites. *Cell Metab*, 2020, 32: 676–688.e4
- 38 Liu S, Dai Z, Cooper D E, et al. Quantitative analysis of the physiological contributions of glucose to the TCA cycle. *Cell Metab*, 2020, 32: 619–628.e21
- 39 Hui S, Ghergurovich J M, Morscher R J, et al. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nature*, 2017, 551: 115–118
- 40 Zhang L, Xin C, Wang S, et al. Lactate transported by MCT1 plays an active role in promoting mitochondrial biogenesis and enhancing TCA flux in skeletal muscle. *Sci Adv*, 2024, 10: eadn4508
- 41 Lopes M, Brejchova K, Riecan M, et al. Metabolomics atlas of oral ^{13}C -glucose tolerance test in mice. *Cell Rep*, 2021, 37: 109833
- 42 Davis J C, Alves T C, Helman A, et al. Glucose response by stem cell-derived β cells *in vitro* is inhibited by a bottleneck in glycolysis. *Cell Rep*, 2020, 31: 107623
- 43 Sadiku P, Willson J A, Ryan E M, et al. Neutrophils fuel effective immune responses through gluconeogenesis and glycogenesis. *Cell Metab*, 2021, 33: 411–423.e4
- 44 Zhang R, Chen B, Lin L, et al. ^{13}C isotope-based metabolic flux analysis revealing cellular landscape of glucose metabolism in human liver cells exposed to perfluorooctanoic acid. *Sci Total Environ*, 2021, 770: 145329
- 45 Tarantino R, Jensen H M, Waldman S D. ^{13}C metabolic flux analysis in chondrocytes reveals a novel switch in metabolic phenotype. *Tissue Eng Part A*, 2024, 30: 550–562
- 46 Shan B, Zhou H, Guo C, et al. Tanshinone IIA ameliorates energy metabolism dysfunction of pulmonary fibrosis using ^{13}C metabolic flux analysis. *J Pharm Anal*, 2024, 14: 244–258
- 47 Hensley C T, Faubert B, Yuan Q, et al. Metabolic heterogeneity in human lung tumors. *Cell*, 2016, 164: 681–694
- 48 Sellers K, Fox M P, Bousamra Ii M, et al. Pyruvate carboxylase is critical for non-small-cell lung cancer proliferation. *J Clin Invest*, 2015, 125: 687–698
- 49 Liu X, Cooper D E, Cluntun A A, et al. Acetate production from glucose and coupling to mitochondrial metabolism in mammals. *Cell*, 2018, 175: 502–513.e13
- 50 Jang C, Hui S, Zeng X, et al. Metabolite exchange between mammalian organs quantified in pigs. *Cell Metab*, 2019, 30: 594–606.e3
- 51 Silva J C P, Marques C, Martins F O, et al. Determining contributions of exogenous glucose and fructose to *de novo* fatty acid and glycerol synthesis in liver and adipose tissue. *Metab Eng*, 2019, 56: 69–76
- 52 Green C R, Wallace M, Divakaruni A S, et al. Branched-chain amino acid catabolism fuels adipocyte differentiation and lipogenesis. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 15–21
- 53 Oates E H, Antoniewicz M R. ^{13}C -Metabolic flux analysis of 3T3-L1 adipocytes illuminates its core metabolism under hypoxia. *Metab Eng*, 2023, 76: 158–166
- 54 Vatner D F, Majumdar S K, Kumashiro N, et al. Insulin-independent regulation of hepatic triglyceride synthesis by fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 1143–1148
- 55 Chen Q, Li H, Tian H, et al. Global determination of reaction rates and lipid turnover kinetics in *Mus musculus*. *Cell Metab*, 2023, 35: 711–721.e4
- 56 Tohyama S, Fujita J, Hishiki T, et al. Glutamine oxidation is indispensable for survival of human pluripotent stem cells. *Cell Metab*, 2016, 23: 663–674
- 57 Park G, Haley J A, Le J, et al. Quantitative analysis of metabolic fluxes in brown fat and skeletal muscle during thermogenesis. *Nat Metab*, 2023,

5: 1204–1220

- 58 Liao Y, Chen Q, Liu L, et al. Amino acid is a major carbon source for hepatic lipogenesis. *Cell Metab*, 2024, 36: 2437–2448.e8
- 59 Tedeschi P M, Johnson-Farley N, Lin H, et al. Quantification of folate metabolism using transient metabolic flux analysis. *Cancer Metab*, 2015, 3: 6
- 60 Xu W, Patel C H, Zhao L, et al. GOT1 regulates CD8⁺ effector and memory T cell generation. *Cell Rep*, 2023, 42: 111987
- 61 Ma E H, Dahabieh M S, DeCamp L M, et al. ¹³C metabolite tracing reveals glutamine and acetate as critical *in vivo* fuels for CD8 T cells. *Sci Adv*, 2024, 10: eadj1431
- 62 Tardito S, Oudin A, Ahmed S U, et al. Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. *Nat Cell Biol*, 2015, 17: 1556–1568
- 63 Ducker G S, Chen L, Morscher R J, et al. Reversal of cytosolic one-carbon flux compensates for loss of the mitochondrial folate pathway. *Cell Metab*, 2016, 23: 1140–1153
- 64 Felig P. The glucose-alanine cycle. *Metabolism*, 1973, 22: 179–207
- 65 Warburg O, Posener K, Negelein E. The metabolism of cancer cells. *Biochem Z*, 1924, 152: 319–344
- 66 Faubert B, Li K Y, Cai L, et al. Lactate metabolism in human lung tumors. *Cell*, 2017, 171: 358–371.e9
- 67 Tarantino R, Jensen H M, Waldman S D. ¹³C metabolic flux analysis in chondrocytes reveals a novel switch in metabolic phenotype. *Tissue Eng Part A*, 2024, 30: 550–562
- 68 Wallace M, Metallo C M. Tracing insights into *de novo* lipogenesis in liver and adipose tissues. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 108: 65–71
- 69 Strawford A, Antelo F, Christiansen M, et al. Adipose tissue triglyceride turnover, *de novo* lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with ²H₂O. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 286: E577–E588
- 70 Wallace M, Green C R, Roberts L S, et al. Enzyme promiscuity drives branched-chain fatty acid synthesis in adipose tissues. *Nat Chem Biol*, 2018, 14: 1021–1031
- 71 Si Y, Yoon J, Lee K. Flux profile and modularity analysis of time-dependent metabolic changes of *de novo* adipocyte formation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292: E1637–E1646
- 72 Ling Z N, Jiang Y F, Ru J N, et al. Amino acid metabolism in health and disease. *Sig Transduct Target Ther*, 2023, 8: 345
- 73 Mirveis Z, Howe O, Cahill P, et al. Monitoring and modelling the glutamine metabolic pathway: a review and future perspectives. *Metabolomics*, 2023, 19: 67
- 74 Pan S, Fan M, Liu Z, et al. Serine, glycine and one-carbon metabolism in cancer (Review). *Int J Oncol*, 2021, 58: 158–170
- 75 Hasenour C M, Wall M L, Ridley D E, et al. Mass spectrometry-based microassay of ²H and ¹³C plasma glucose labeling to quantify liver metabolic fluxes *in vivo*. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*, 2015, 309: E191–E203

Advances in the application of ^{13}C stable isotope metabolic flux analysis on animal nutrition metabolism

GONG SaiMing^{1,2}, GUO QiuPing¹, KONG XiangFeng^{1,3}, DUAN YeHui¹, YIN YuLong^{1,3} & LI FengNa^{1,3*}

¹ Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China

² College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China

³ College of Advanced Agricultural Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

* Corresponding author, E-mail: lifengna@isa.ac.cn

^{13}C stable isotope metabolic flux analysis is a robust and efficient method that integrates isotope-labeled metabolite data with metabolic network models, employing advanced mathematical computations to accurately ascertain cellular and tissue metabolic fluxes. Although initially developed for applications in bioengineering and biopharmaceutical manufacturing, metabolic flux analysis based on ^{13}C labeling has increasingly found broad utility in studying cellular, tissue, and systemic metabolism in mammalian physiology and pathology, driven by advancements in metabolomics detection technologies and computational biology. This review systematically elaborates on the fundamental concepts of stable isotope metabolic flux analysis and its methodologies for evaluating cellular metabolic fluxes, with a particular emphasis on the pivotal role of ^{13}C metabolic flux analysis in uncovering metabolic intricacies and novel metabolic pathways. Furthermore, this review summarizes the applications of ^{13}C metabolic flux analysis in nutritional fields such as carbohydrate metabolism, fatty acid metabolism, amino acid metabolism within mammalian models, with the aim of furnishing innovative technical support for mechanistic research into animal metabolic physiology.

stable isotope metabolic flux analysis, animal nutrition, carbohydrate metabolism, fatty acid metabolism, amino acid metabolism

doi: [10.1360/SSV-2024-0030](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0030)