

脂质组学在医药研究中的应用

陆姝欢 杨松 元英进*

(天津大学化工学院制药工程系, 天津 300072)

摘要 脂质组学是对整体脂质进行系统分析的一门新兴学科, 通过比较不同生理状态下脂代谢网络的变化, 进而识别代谢调控中关键的脂生物标志物, 最终揭示脂质在各种生命活动中的作用机制。电喷雾电离-质谱技术是脂质组学领域中最核心的研究手段, 目前已能对各种脂质尤其是磷脂进行高分辨率、高灵敏度、高通量的分析。随着质谱技术的进步, 脂质组学在疾病脂生物标志物的识别、疾病诊断、药物靶点及先导化合物的发现和药物作用机制的研究等方面已展现出广泛的应用前景。

关键词 脂质组学; 电喷雾电离-质谱技术; 脂生物标志物; 医药研究

脂质不仅是组成生物膜的基础物质, 而且通过脂-脂作用及脂质与其他生物分子的相互作用构成复杂的脂代谢网络, 参与大量的生命活动^[1]。上个世纪90年代末期, 代谢组学(metabonomics)逐渐兴起, 由于代谢物的复杂性, 很难用一种手段将所有代谢物一次检测清楚, 因此部分学者根据代谢物的特异性对其进行分类研究, 从而形成了一系列分支研究, 如脂质组学及毒素组学等, 作为最重要的代谢组学分支, 脂质组学是研究的焦点^[2](图1)。电喷雾电离-质谱技术(electrospray ionization mass spectrometry, ESI/MS)的发展也为研究生物体内的整体脂代谢调控提供了技术支持, 在这样的背景下, Han等^[3]于2003年正式提出了脂质组学(lipidomics)的概念——从系统水平上研究生物体内的脂质, 揭示其相互作用及与其他生物分子的作用, 从而兴起了研究脂代谢调控在各种生命

现象中作用机制的新学科。近年来脂质组学引起了世界范围关注, 被广泛应用于生命科学, 尤其是医药研究等领域中。本文从脂质组学的研究内容及现状出发, 介绍脂质组学研究所涉及的技术策略, 并从疾病脂生物标志物的识别等几个方面对脂质组学在医药研究中的应用进行论述。

1 脂质组学研究内容和现状

脂质组学的研究内容为生物体内的所有脂质分子, 并以此为依据推测其他与脂质作用的生物分子的变化, 进而揭示脂质在各种生命活动中的重要作用机制^[4]。通过研究脂质提取物, 可以获得脂质组(lipidome)的信息, 它反映了在特定生理状态下脂质的整体变化。代谢物是生理活动中基因水平和蛋白质水平调控的终端体现, 因此脂质组学能与基因组学及蛋白质组学相互结合相互补充, 对生物现象进行不同层次的分析, 加深对生命本质的了解。自从Han等提出脂质组学的概念之后, 参与脂质组学研究的科研机构不断增加。其中最具代表性的就是堪萨斯州立大学建立的脂质组学研究中心(Kansas Lipidomics Research Center, KLRC)和华盛顿大学的ORY课题组。美国国立综合医学研究所(National Institute of General Medical Sciences, NIGMS)还计划5年内投入3500万美元, 研究题为“脂代谢物和代谢途径研究

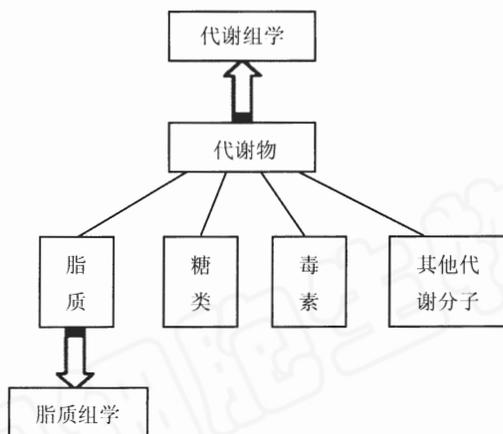


图1 代谢组学与脂质组学的关系示意图

收稿日期: 2006-10-25 接受日期: 2006-12-14

国家杰出青年基金资助项目(No.20425620)

* 通讯作者。Tel: 022-27403888, Fax: 022-27403888, E-mail:

yjyuan@tju.edu.cn

策略(LIPID metabolites and pathways strategy, LIPID MAPS)”的联合项目。欧洲和亚洲同样出现了研究脂质组学的热潮: 格拉茨大学、奥地利科学院及格拉茨技术大学等研究机构共同成立了格拉茨脂质组学研究中心(Lipidomics Research Center Graz, LRC Graz); 新加坡国立大学也成立了以Wenk教授为首的Lipidprofile课题组。这些科研机构通过脂质组学策略在分子生物学和医药研究等领域取得了引人瞩目的成果^[4-6]。

2 研究方法和策略

近年来许多先进的研究技术不断开发并被引入到脂质组学研究中来, 极大地推动了脂质组学的发展, 其中的核心技术就是ESI/MS技术。与其他研究方法相比, ESI/MS方法样品前处理简单、分辨率高、容易实现自动化, 适合对脂质混合物, 尤其是磷脂混合物进行快速、灵敏和高通量的定性定量研究。

通过ESI/MS进行脂质组学研究的策略主要分为两种: 第一种是直接进样分析, 此法的研究对象是脂质电离后的准分子离子及其在碰撞诱导解离(collision-induced dissociation, CID)后生成的碎片离子。由于脂质结构多变, 其电离倾向表现出较大差异, 不同脂质电离后会得到不同极性的准分子离子, 单一的离子模式满足不了对整体脂质的研究。如磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)和鞘磷脂(sphingomyelin, SM)等为中性脂, 电离后易形成阳离子, 适合用阳离子模式进行分析; 磷脂酸(phosphatidic acid, PA)和心磷脂(cardiolipin)等为阴离子脂, 易电离成阴离子, 适合用阴离子模式进行分析; 而磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)等为弱阴离子脂, 介于两者之间, 两种模式均可使用。不同脂质的准分子离子结构存在特异性, 可产生特殊的碎片离子。Brügger等^[7]以这些碎片离子的特性为依据, 提出通过前体离子扫描(precursor-ion scanning, PI)和中性丢失扫描(neutral loss scanning, NL)分析脂质的方法。Han等^[8]对适合进行PI和NL分析的脂质作了详细的分类和总结。Welti等^[9]通过PI扫描分析了PC、磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol, PG)及磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)等拟南芥膜脂在冷冻胁迫下的变化, 同时使用NL扫描分析了磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)及PE等的变化, 最后得到总磷脂组。通过PI和NL两种扫描模式得到的图谱能有效地消除全扫描(full scan)产生的基线噪音, 不过

此法关键在于碰撞能大小的设置及被测分子的结构, 对仪器参数的设定和优化要求较高。第二种是质谱偶合其他分离方法的策略, 即在质谱检测前对样品进行预分离。与直接进样相比, 联用策略能通过脂质的保留时间对其进行定性辅助分析, 进一步提高分析结论的可信性。Taguchi等^[10]在联用技术的应用上取得了较大成功, 通过毛细液相色谱/质谱(Cap-LC/ESI-MS)联用技术从小鼠骨髓瘤NS-1细胞的脂质提取液中找到了500多种磷脂分子。脂质组学研究中常用的液相色谱主要有正相色谱(NPLC)和反相色谱(RPLC)两种。Barroso等^[11]用RPLC/MS分析了阻塞性细支气管炎病人支气管肺泡灌洗液中的磷脂和溶血磷脂; Pacetti等^[12]通过NPLC/MS对囊性纤维化病人血清中的PC进行了检测。联用策略在一定程度上减轻了脂-脂相互作用对定量分析造成的影响, 但是依然存在不足, 如反相色谱分离脂质时, 不同种类的脂质色谱峰重叠现象非常严重, 潜在地导致了离子抑制效应。此外, 还有人采用气相色谱/质谱联用(GC/MS)对脂质进行研究^[13]。值得一提的是, 这两种分析策略在定量脂质时, 几乎都采用了内标法, 不过随着脂质结构的变化, 其信号响应强度可表现出明显差异, 因此内标物的选择和使用将严重影响定量的准确性。Koivusalo等^[14]对这方面进行了详细的论述, 并建议定量一类脂质时, 同时采用含不饱和碳链的内标物和含饱和碳链的内标物。

随着科技的进步, 脂质组学研究中还有不少新的方法有待开发, Kraft等^[15]提出使用纳米次级离子质谱(nano secondary-ion mass spectrometry, NanoSIMS)对相分离处理的脂膜进行分析的新方法, 这种技术能在纳米水平上测定膜上不同脂质的分布, 从而获得“脂质膜相结构”的信息。此外荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)、薄层色谱及核磁共振等技术作为补充方法也广泛应用于脂质组学研究中^[4]。

3 脂质组学在医药研究中的运用

越来越多的研究表明, 许多异常的生理状态都与脂代谢紊乱相关, 从系统水平研究生物体不同状态下脂质的变化有助于分析脂代谢网络的作用机制。确定其中关键的脂质及相关酶, 有助于找到潜在的代谢途径异常或致病机制, 最终发展出有效的诊断和治疗手段。根据研究的侧重点不同, 脂质组学在医药研究中的应用可分为4个方面: 疾病脂生物标志物的识

别、疾病诊断脂指标的确定、药物靶点及先导化合物的发现和药物作用机制的研究。

3.1 疾病脂生物标志物的识别

脂质组学在医药研究中最基础的应用就是确定引起生物体病变,或在生物体疾病状态下表达异常的脂生物标志物,分析其在整个病变过程中的变化及与其他生物分子的相互作用,从整体上把握脂代谢紊乱在疾病发生发展中的地位,找到可能的发病机制。

近年来,已有许多研究者通过脂质组学研究发现肥胖、糖尿病、阿尔茨海默病及癌症等均与脂代谢紊乱有一定关联^[16-18]。Han等^[19]运用脂质组学方法分析糖尿病鼠心肌线粒体膜脂急剧减少的细节,指出心磷脂及其直接的代谢前体PG在糖尿病人并发心脏病时起关键作用,并以此为依据,提出了糖尿病心脏病在发病学上的一种可能代谢紊乱机制。通过系统研究病原体的脂质组,还能有效地确定在宿主-病原体交互作用时起作用的脂质,进而找到相关的致病途径。Brügger等^[6]通过使用质谱技术详细比较了HIV与其宿主的膜脂组的差异,发现病毒富集二氢鞘磷脂(dihydro sphingomyelin),而且当抑制宿主细胞的鞘磷脂合成途径后,传染率明显下降,由此推断这类脂质在HIV复制循环中起关键作用。此外,脂质组学还能为病原体某些部位特殊功能的形成提供理论依据, Van Hellemond等^[20]结合蛋白质组学和脂质组学对血吸虫外壳膜的成分进行分析,确定了血吸虫在进行养分摄取和免疫逃避时起作用的外壳上的蛋白质和脂质。发现血吸虫外壳富集宿主缺乏的脂质,而且外壳上富集的蛋白质也与数据库内其他物种的蛋白质不同,这意味着可能是这些特殊的蛋白质和脂质造成了外壳的独特功能。研究生物体在正常状态和疾病状态下脂代谢的整体差异,识别疾病脂生物标志物,结合相关酶的研究,就有可能深入地研究代谢途径或致病机制,最终发展出有效的诊断和治疗手段。

3.2 疾病诊断脂指标的确定

运用脂质组学观察在疾病前后脂质的变化,发现异常的脂质,这些脂质有可能成为指示疾病发生发展的生物标志物,以这些脂质为指标进行检测有助于早期的疾病诊断。Gadomska等^[21]以64例卵巢癌患者、27例良性卵巢肿瘤患者和44例健康的年纪相符的女性为研究对象,检测其血清当中各种胆固醇及脂蛋白的含量变化。发现以载脂蛋白AI(apoAI)和游离胆固醇(FC)为诊断指标排除卵巢瘤的正确率高达95.5%,综合apoAI、FC、高密度脂蛋白游离胆固醇(HDLFC)、

高密度脂蛋白总胆固醇(HDLTC)、载脂蛋白B(apoB)及高密度脂蛋白-3(HDL3)片断诊断卵巢癌的准确率达到97%,这个概率与癌症发展阶段、病人年纪或身体质量指数无关。此外,早有研究报道溶血磷脂酸在卵巢癌的诊断中表现出高度的敏感性和特异性,可作为早期诊断卵巢癌及术后随访的生物学指标^[22]。脂质组学能有效测定疾病时具有生物标记作用的脂质的动态变化,在疾病早期诊断及病程监测方面起重要作用。

3.3 药物靶点及先导化合物的发现

目前人们使用的许多有效药剂,如罗非昔布(refecoxib)等环氧化酶抑制剂及辛伐他汀(simvastatin)等降胆固醇药物的作用靶点都是脂代谢酶,进而调节脂代谢网络。脂质组学为研究疾病状态下脂-脂作用及脂-蛋白质作用提供了平台,通过比较疾病状态和正常状态下细胞或组织中脂质组及相关酶的变化,找到潜在的靶蛋白,与这些靶蛋白特异结合的脂质分子则可能成为有药性的先导化合物,然后对其结构进行分析和优化,进而获得作用于靶蛋白的新的药物分子。Su等^[16]通过脂质组学研究发现糖尿病鼠心肌内钙不依赖性磷脂酶A₂(iPLA₂)的表达对心肌缺血或心律不齐有重要影响。通过研究、模拟和优化与iPLA₂特异结合的脂质分子结构,将有望找到一种有效的以iPLA₂为靶蛋白的治疗糖尿病心肌炎的新药。有趣的是脂结合蛋白的底物专一性并不强,而且这些脂质配体结构差异较大,这使得以脂结合蛋白为靶点寻找到的先导化合物结构具有一定的多样性,提高了先导化合物发现的成功几率。

3.4 药物作用机制的研究

脂质组学能提供药物作用后脂质及相关酶的变化情况,揭示可能的药物作用机制。Adibhatla等^[23]通过对比中风小鼠使用胞苷-5'-二磷酸胆碱(cytidine-5'-diphosphocholine, CDP-choline)前后体内PC及相关磷脂酶的变化,推测了药物的可能作用机制。Huang等^[24,25]运用脂质组学技术,研究了甲基硝基亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)对SM的作用,发现MNNG不但能引起SM代谢的极大改变,而且SM代谢相关的关键酶—酸性鞘磷脂酶在细胞中出现由分散到集中于脂筏的趋势。逆转脂代谢紊乱有利于疾病的治疗,监测药物作用后机体内脂代谢变化情况,及时反应机体生理生化状态的改变,有助于评价药物的药效及确定可能的副作用,故脂质组学还能作为评价药物疗效的一个辅助手段。

4 小结与展望

目前脂质组学还处于一个早期发展阶段, 存在许多限制及挑战: 首先由于起步较晚, 与其他组学相比, 缺乏相应的数据库; 其次脂质种类繁多, 相互作用复杂, 现有的脂质组学分析技术均不能同时将生物样本中的脂质完全检测出来。但是作为代谢组学的分支, 脂质组学表现出巨大的潜力。近年来通过与其他组学结合, 脂质组学研究已取得极大进展, 不但为生物体中脂-脂、脂-蛋白质的相互作用及相关的基因调控提供实验数据支持, 不断完善着生物体的代谢网络, 为寻找潜在的致病机制提供新的手段, 也为毒理学研究提供崭新视角。可以预见, 随着脂质组学研究的不断进步, 脂质组学数据库将不断完善, 人们对脂质的结构及作用机制的认识将逐步加深, 从脂代谢水平诊断疾病和监测病程的准确率将进一步提高, 可望通过调控机体内脂代谢网络来达到治疗疾病的目的。

参考文献(References)

- [1] Gross RW *et al. Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2005, **77**: 52
- [2] Watkins SM *et al. J Lipid Res*, 2002, **43**: 1809
- [3] Han X *et al. J Lipid Res*, 2003, **44**: 1071
- [4] Wenk MR. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, **4**: 594
- [5] Wenk MR *et al. Nat Biotechnol*, 2003, **21**: 813
- [6] Brügger B *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 2641
- [7] Brügger B *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 2339
- [8] Han X *et al. Mass Spectrom Rev*, 2005, **24**: 367
- [9] Welti R *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 31994
- [10] Taguchi R *et al. J Mass Spectrom*, 2000, **35**: 953
- [11] Barroso B *et al. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, **814**: 21
- [12] Pacetti D *et al. Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, **18**: 2395
- [13] Mazzella N *et al. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, **822**: 40
- [14] Koivusalo M *et al. J Lipid Res*, 2001, **42**: 663
- [15] Kraft ML *et al. Science*, 2006, **313**: 1948
- [16] Su X *et al. Biochemistry*, 2005, **44**: 5234
- [17] Fonteh AN *et al. Dis Markers*, 2006, **22**: 39
- [18] Tomiki Y *et al. J Exp Clin Cancer Res*, 2004, **23**: 233
- [19] Han X *et al. Biochemistry*, 2005, **44**: 16684
- [20] Van Hellemond JJ *et al. Int J Parasitol*, 2006, **36**: 691
- [21] Gadomska H *et al. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2005, **120**: 87
- [22] Xu Y *et al. JAMA*, 1998, **280**: 719
- [23] Adibhatla RM *et al. AAPS J*, 2006, **8**: E314
- [24] Huang Y *et al. Acta Biochim Biophys Sin*, 2005, **37**: 515
- [25] Huang Y *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **330**: 430

Application of Lipidomics in Medicine and Drug Development

Shu-Huan Lu, Song Yang, Ying-Jin Yuan*

(Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology,
Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract Lipidomics, aiming to analyze the lipids and their interacting molecules in system level, is a sub emerging field in the metabonomics research field. Different lipids interact with each other and make up a complicated lipid metabolic network which is involved in many physiological processes. Through analyzing the lipid profiles under different physiological conditions, lipidomics research can indicate the changes of the lipid metabolic network and the lipid-based biomarkers that contribute to the changes. With the development of mass spectrometry technology, especially the electrospray ionization mass spectrometry, lipids and in particular the phospholipids can be analyzed in a high throughput manner, which promotes the advances of lipidomics research. Currently, studies on the lipidomics level have been employed in many medicine related fields, such as the discovery of drug targets and the leading chemicals, the effecting mechanism of the drugs and so on. Thus lipidomics opens promising opportunities for disease diagnosis and treatment, as well as drug research and development.

Key words lipidomics; electrospray ionization mass spectrometry; lipid-based biomarkers; medicine and drug research

Received: October 25, 2006 Accepted: December 14, 2006

This work was supported by the National Science Fund for Distinguished Young Scholars (No.20425620)

* Corresponding author. Tel: 86-22-27403888, Fax: 86-22-27403888, E-mail: yjyuan@tju.edu.cn