· 专 论 ·

基于亲水作用色谱-质谱联用技术的脂质组学研究策略探讨

朱黎霞¹, 张英丰^{2*}

1. 南方医科大学珠江医院 中医科, 广东 广州 510282

2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 脂质组学是代谢组学的新兴分支学科, 亲水作用色谱-质谱联用技术 (HILIC-MS) 是脂质组学的新型研究手段。通过从生物样本前处理方法, 色谱、质谱条件建立及分析全程质控角度, 阐明 HILIC-MS 在脂质组学研究中的应用、操作要点、特殊优势及发展潜力, 探讨其在脂代谢疾病中医药临床和科研研究中的应用。

关键词: 亲水作用色谱-质谱联用技术; 脂质组学; 脂代谢疾病; 代谢组学; 研究策略

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2016)22 - 3939 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.22.001

Exploration and thinking about lipidomics study strategy based on HILIC-MS technology

ZHU Li-xia¹, ZHANG Ying-feng²

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Zhujiang Hospital, South Medical University, Guangzhou 510282, China

2. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Lipidomics is a new branch discipline of metabolism. The hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry (HILIC-MS) technology is the new study method of lipidomics. The application, operation points, special advantages, and development potential for HILIC-MS were clarified from the angles of biological sample processing method, chromatography, mass spectrometry conditions establishment, and full analysis on quality control. The feasibility of using HILIC-MS technology to solve some lipid metabolism diseases problem in clinical and scientific research of TCM has been investigated.

Key words: hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry technology; lipidomics; lipid metabolism diseases; metabolism; study strategy

脂质组学是代谢组学的新兴分支学科, 通过系统分析细胞、体液、组织等脂质及其代谢物 (脂质组, lipidome), 识别关键的脂生物标志物, 反映特定生理状态下脂代谢紊乱疾病脂质的整体变化^[1-2]。

脂质是生命体广泛存在的数目巨大、结构各异且易溶于有机溶剂的一类化合物, 组成极为复杂, 根据极性可分为极性和非极性脂质, 根据基本母核和官能团结构又可分为脂肪酸类、甘油酯类、甘油磷脂类、鞘脂类、固醇脂类、孕烯醇酮脂类、糖脂类和多聚乙烯类 8 类。每大类又可分为若干亚类,

如甘油磷脂又被细分 19 类, 最主要的是磷脂酰胆碱 (PC)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰丝氨酸 (PS)、磷脂酰甘油 (PG)、磷脂酰基醇 (PI)、磷脂酸 (PA)、溶血性磷脂酰胆碱 (LysoPC)。

由于脂质组学基本流程是对全部脂质或某一类脂质进行定性、定量无偏检测, 发现不同处理、不同组别、不同组织、不同来源生物样本的脂质代谢轮廓差异性^[3], 通过模式识别、数据挖掘发现脂质生物标志物, 借助现代结构鉴定手段识别并鉴定标志物结构, 阐明脂质代谢网络在正常/病理、干预

收稿日期: 2016-06-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81302882); 广东省科技计划项目 (2014A020221118, 2014A020221102); 广东省中医药局科研课题 (20151303); 广州中医药大学“青年英才”资助项目 (QNYC20140106)

作者简介: 朱黎霞, 副主任医师。Tel: (020)61643456 E-mail: zhulx2007@163.com

*通信作者 张英丰, 副教授。Tel: (020)39358043 E-mail: zyfeng-2006@163.com

前/后的动态变化特征为其核心目标,故生物样本脂质信息的获取及脂质组样品的分析极为关键。

1 脂质组分析的研究现状

根据脂质性质、分析仪器功能及研究目的,质谱(MS)是脂质组学研究最主要的分析仪器,基于电喷雾离子化的“鸟枪法”(shotgun method)^[4-6]是脂质组学常用的分析方法。样品不经色谱柱分离,直接进样后根据脂质分子不同 pH 值条件下电荷差异性进行离子源内分离。正、负离子模式下分开检测不同脂质分子。鸟枪法样品前处理简单、样品用量少、分析时间短,但难以分析低丰度脂质,且加入的锂盐会污染质谱,缩短仪器使用寿命。

鸟枪法分析脂质样品时未经色谱柱分离,大量未达到色谱基线分离的化合物极短时间内同时进入离子源会降低其驻留时间及脂质电喷雾离子化效率,进而影响信号稳定性和仪器灵敏度,故适宜的色谱分离对质谱检测就极为关键。

根据色谱分离原理,气相色谱(GC)与质谱联用(GC-MS)能够有效分离脂质,但对分析物挥发性、衍生化的要求制约了 GC-MS 在脂质组学中的应用。液相色谱对分析物没有挥发性要求,亦无需进行衍生化,可在保留脂质完整信息的前提下实现色谱柱上的良好分离,广泛适用于脂质组学研究,根据液相色谱流动相和色谱柱类型的不同,可分为正相色谱(NPLC)和反相色谱(RPLC)2种分离模式。

脂质溶解性各异,既有水溶性、两亲性脂质,也有大量强亲脂性脂质。从色谱分离模式看,NPLC 能够根据特征官能团实现脂质类间分离,但由于 NPLC 多采用三氯甲烷等水不溶性流动相,其对质谱兼容性差,且不利于溶解极性脂质,由于流动相的强挥发性易引起流动相比例发生细微变化而增加保留时间波动,严重影响脂质定性、定量测定结果的重现性;RPLC 根据脂质不饱和度及碳链长度实现脂质类内分离,但不利于脂质类间分离,由于流动相中水相比例较高,非极性脂质溶解性不佳,且强极性、水溶性脂质保留时间过短、分离度较低而信号堆积不利于检测。由此看出,NPLC 和 RPLC 模式进行脂质组学研究各有利弊、各有所长,如何整合分析模式、扬长避短成为脂质组学研究者面临的重要课题。

作为新型色谱分离模式,亲水作用色谱(hydrophilic interaction liquid chromatography,

HILIC)近年来受到越来越多的关注和重视,其分离机制介于正相色谱和反相色谱间,其分离特性整合了 RPLC 和 NPLC 的优缺点。通过采用未键合硅胶极性固定相和水-水溶性有机溶剂为流动相,有利于极性脂质的分离,克服了 NPLC 和 RPLC 在极性脂质分离过程中的不足,使脂质在类间分离的基础上进一步实现类内分离。由于流动相含有高浓度有机相,可增强脂质离子化效率,提高脂质检测灵敏度,与质谱有较好的兼容性^[7-8]。

2 亲水作用色谱-质谱联用技术(HILIC-MS)在脂质组学研究中的应用

HILIC-MS 已成为脂质组学脂质分离鉴定的研究热点^[9-10],国内尚未有相关文献发表。以 HILIC 高效分离脂质,结合质谱检测弥补了传统液相色谱法检测器灵敏度和选择性不高的缺点,克服了鸟枪法可能产生的源内离子抑制现象及无法检测低丰度脂质的问题,能提供精确的相对分子质量及结构信息,具有高分辨率、高灵敏度、高峰容量和高特异性等优点,且无需样品衍生化,已成为脂质组学研究的强有力手段。

生物脂质天然丰度从纳克级到微克级不等,理化性质千差万别,采用 HILIC-MS 既可以实现脂质类间分离,又可实现脂质类内分离,避免了由于未能良好分离而使高丰度脂质较强的质谱信号遮蔽了低丰度脂质信号的情况。基于 HILIC-MS 的脂质组学研究,图谱中每个信号峰都包含了被测分子的定性、定量信息。定性信息是脂质特征图谱和色谱保留时间,是结构鉴定的基础;定量信息是脂质的色谱响应强度,如峰高、峰面积等,是定量比较不同样品或组别差异性的基础。

鉴于 HILIC-MS 在脂质组学中的良好应用前景和巨大潜力,制定合理的研究策略有利于研究的顺利推进。生物样本合适的前处理方法、HILIC-MS 参数的优化及可靠性评价、数据质量实时监控是高质量脂质组学研究的基本条件,构成了脂质组学研究的基本流程。

2.1 优化生物样本脂质组前处理方法

生物样本必须经前处理后方可进样分析。通过前处理将脂质组从组成极为复杂的生物基质中转移出来,实现提高仪器响应度、降低基质干扰、获得高质量数据的根本目的^[11]。目前常用的前处理方法有固相萃取(SPE)、液液萃取(LLE)等。固相萃取需要根据目标脂质的性质选择具有适宜保留性能

的固相萃取小柱, 根据脂质和生物基质在小柱上的保留性能不同而被洗脱收集, 小柱仅限单次使用, 需要进行活化、装样、洗脱等多个步骤, 具有成本高、效率低的缺点, 但能够实现脂质和生物基质的良好分离, 有效降低质谱噪声。由于其需要筛选适宜填料小柱并评价脂质和基质的分离特性, 目前在脂质组学中尚未广泛应用。

LLE 具有操作简便、成本低、效率高等诸多优点, 是脂质组学常用的前处理方法, 合适的萃取溶剂是前提条件, 根据脂质在生物基质和萃取溶剂中的溶解性差异, 按分配系数转移到萃取溶剂中, 进而通过氮气保护热挥发或采用离心真空浓缩仪等除去萃取溶剂, 流动相复溶后, 冷冻过夜结合高速离心、微孔滤膜滤过等方法除去不溶性微粒以满足液相进样条件。常用萃取溶剂有氯仿-甲醇 (2:1)、氯仿-甲醇 (1:2)、二氯甲烷-甲醇 (2:1)、甲基叔丁基醚、70%异丙醇-醋酸乙酯 (2:3) 等。常以内标的萃取回收率为核心指标选取 LLE 的最佳萃取溶剂。在生物样品中加入多类脂质非天然同系物内标混匀后, 分别采用上述溶剂处理后进样分析, 重复测定多次, 比较内标物峰面积, 峰面积较大者表明提取效率高。

2.2 优化 HILIC-MS 参数

适宜的色谱柱是脂质良好分离的基础, 良好的质谱检测参数有助于提高脂质响应, 故必须优化 HILIC-MS 参数, 以发挥最佳分离、检测效能。

2.2.1 优化 HILIC 参数 HILIC 柱规格、型号、填料类型、极性脂质与非极性脂质保留性能、流动相组成及其与质谱兼容性评价、体积流量、梯度条件、柱温等。

2.2.2 优化 MS 参数 正、负离子模式下毛细管电压、锥孔电压、离子源温度、脱溶剂气温度、脱溶剂气流量、碰撞能量、扫描间隔时间、扫描模式、扫描质荷比 (m/z) 范围等。

通过预实验最终确定 HILIC-MS 参数, 使每个样品的分析时间适宜 (控制在 30 min 内), 脂质类内、类间分离良好, 仪器响应适中。

2.3 HILIC-MS 的可靠性评价

由于脂质组学研究通常样本量较大, 分析时间较长, 每个样本不少于 15 min, 且多采用梯度洗脱, 故分析条件、仪器响应的可靠性亦会影响脂质组学研究质量, 必须要进行 HILIC-MS 的可靠性评价。

2.3.1 精密度考察 配制高、中、低浓度下的多类

脂质非天然同系物内标混合液, 在优化的 HILIC-MS 条件下, 日内、日间分别连续进样 6 次, 质谱测定分析, 计算各色谱峰保留时间和峰面积的日内、日间 RSD, 评价仪器精密度。

2.3.2 稳定性考察 以相同来源的生物样品加入高、中、低浓度下的多类脂质非天然同系物内标混合液, 在优化的 HILIC-MS 条件下进样测定, 以脂质内标 RSD 值为指标评价生物样品处理前、处理中、处理后、不同存储条件、冻融循环过程中的稳定性。

2.4 HILIC-MS 数据质量的实时监控

在优选的 HILIC-MS 条件下, 为获得高质量的脂质组学数据, 分析误差控制在不影响多变量统计分析的范围内, 需从多方面控制数据质量。

2.4.1 制备多类脂质非天然同系物内标混合样本 测试序列中穿插进样混标样本, 通过混标的保留时间和峰面积 RSD 值, 实时监测系统的稳定性和可靠性。

2.4.2 制备生物物质控样本 混合多个生物样本为生物物质控样本。在正式进样检测样本前先连续进样 6~10 次生物物质控样本, 对系统进行预适应和预平衡, 增加分析结果的稳定性和可靠性。正式测样后每测定 8~12 个样本穿插进样 1 次生物物质控样本。测定结束后对生物物质控样本进行主成分分析 (PCA), 以 PCA 结果评价脂质样本序列测定过程的稳定性和可靠性。

3 基于 HILIC-MS 的脂质组学研究策略

灵敏、稳定、可靠、高效的分析测试平台是进行脂质组学研究的前提, HILIC-MS 大大提升了脂质组学的研究效率, 所获取的高质量数据奠定了进一步数据挖掘的基础。

脂质是机体的重要组成物质, 鉴于脂质在机体中的广泛分布、生命活动的深度参与、调节生理机能的重要作用, 大量疾病的发病机制、病理改变和脂质密切相关, 如高脂血症、动脉粥样硬化^[12-13]、糖尿病、糖尿病肾病、肿瘤^[14]、非酒精性脂肪肝^[15]、脑卒中、多囊卵巢综合征^[16]、慢性肥胖、关节炎^[17]、亚健康、阿尔茨海默病^[18]等。研究脂质及脂质代谢网络在疾病发生、发展中的作用特点和机制, 有助于进一步深化对疾病的认识、提高临床疗效^[19]。

中医药在脂代谢相关疾病治疗上具有临床特色和优势, 基于 HILIC-MS 的脂质组学研究策略是解决中医药临床和科研若干问题的有力武器, 有着广阔的应用前景。

3.1 中医证型客观化研究

证型是中医临床特有概念,是对疾病某一类型外在症状所做出的整体评判和分类,辨证论治构成了中医临床的精髓。不同证型具有不同的内在物质基础和外在表现,通过对血液、尿液等生物样本进行脂质组学研究,进行不同证型下脂质信息与外在症状的关联性分析,并进行系统化、整体性评判,揭示不同证型脂质代谢网络间的差异性和趋同性,探讨构成证型的脂质物质基础,是脂代谢疾病中医证型客观化研究的可行之路,国内已有中医证本质的脂质组学研究报告。殷婷婷等^[20]比对了强直性脊柱炎湿热证组与强直性脊柱炎非湿热证组的血清脂质指纹图谱,发现其脂质轮廓存在明显差异,其中差异较明显的脂类代谢物主要是甘油磷脂酰胆碱类(GPC)和三酰甘油类(TG),其可能为强直性脊柱炎湿热证脂质代谢的特异性本质及病理生理学物质基础。黄珮^[21]进行了正常人、肝郁脾虚型高脂血症患者及非肝郁脾虚型高脂血症患者的血浆脂质组学研究,发现肝郁脾虚证组高脂血症患者的脂质标志物可能为 PG、PS、FA 和 SP 等脂质。

3.2 中医临床疗效评价研究,阐明中药作用机制

中医临床具有简、验、便、廉等优势,通过中药干预、针刺、心理疏导等多方面措施,借助于受体、酶、信号通路、神经生物学机制等发挥干预作用,从而使脂代谢疾病下游表达产物-失衡的脂质代谢网络逆转和趋于再平衡,达到治疗疾病的目的。通过对生物样本脂质的全面检测和整体评判,清晰揭示临床干预前/后脂质的整体轮廓的阶段变化,为脂代谢疾病临床疗效评价提供依据和参考。Rabiei 等^[22]采用脂质组学手段研究了橄榄叶提取物对大鼠脑卒中模型的保护作用,与对照组相比,50、75、100 mg/kg 剂量的橄榄叶提取物可显著提升大鼠脑胆固醇、胆固醇酯、脑苷脂、磷脂酰胆碱水平,降低脑神经酰胺水平,75、100 mg/kg 剂量可增加大鼠脑三酰甘油水平,表明其脑保护作用可能与调节脑脂质水平变化有关。

3.3 脂代谢疾病诊断标志物的发现

脂质组学研究很重要的目的是为临床服务,寻找脂代谢疾病不同证型或不同亚型的脂质标志物,从而为辨证分型、疾病进展阶段精准判断等提供支撑。Han 等^[23]发现硫苷脂(sulfatide)可能为早期阿尔茨海默病的脂质生物标志物,有利于其早发现、早治疗。

通过脂质组学研究,借助于现代分析仪器、大

数据分析、模式识别方法,发现潜在的脂质生物标志物。在脂质代谢网络视野和背景下,阐明脂质标志物在脂代谢疾病发生、发展过程中所扮演的排他性角色、地位和作用,发现其与脂质代谢疾病的独特联系和高相关性,进而将其发展为具有可供临床诊断价值的诊断标志物,开发出相应诊断试剂或快速检测方法,必将成为转化医学联系基础研究和应用研究的桥梁。

3.4 揭示中药复方配伍机制

通过不同配比的中药复方作用于动物和人体,获得相应的脂质代谢网络的变化,深入分析脂质代谢网络与中药复方配伍间的内在联系,挖掘基于脂质组学的配伍机制。

3.5 建立中药药动-药效(PK-PD)研究模型

PK-PD 结合模型的建立需要灵敏、特异性、量化的药效指标,但药效指标的粗放性、滞后性与药动指标的精细性存在不可调和的矛盾。脂质生物标志物体现了机体对药物的特征性响应,且强度随药物浓度变化而变化。以脂质生物标志物为药效指标,有效解决脂代谢疾病药效变化不灵敏、缺乏量化药效指标的 PK-PD 模型构建的技术难题。

3.6 中药安全性评价

脂质组学也是中药毒性机制及毒性标志物研究的有力手段,发现脂质标志物在致毒过程、毒性消退中的动态变化,揭示有毒中药的致毒机制,为其临床安全、合理应用提供依据。Cai 等^[24]采用 UHPLC/Q-TOF MS 结合心电图(ECG)研究附子提取物对心脏的毒性作用,结果表明附子的心脏毒性具有剂量依赖性,被鉴定的参与磷脂、鞘脂、饱和脂肪酸氧化、不饱和脂肪酸过氧化代谢的 14 个脂质代谢产物,被认为是附子毒性的潜在生物标志物,其所采用的及脂质组学研究方法理论也适用于马兜铃等有毒中药致毒物质基础及脂质生物标志物研究。

4 结语

鉴于 HILIC-MS 在解决脂质组学生物样本分析中所具有的特殊优势和巨大潜力,必将成为脂质组学研究的有力武器。通过筛选脂质组适宜前处理方法及色谱、质谱联用参数,又好又快地获取海量脂质信息,结合模式识别及数据挖掘等方法,分析脂质代谢网络对内、外环境改变所带来的动态调节过程,提供了全新视野角度下若干中医药临床和科研问题的完整解决方案,将极大提升脂代谢疾病中医临床诊断的精准性、疗效评价的客观性。

参考文献

- [1] Zhao Y Y, Miao H, Cheng X L, *et al.* Lipidomics: Novel insight into the biochemical mechanism of lipid metabolism and dysregulation-associated disease [J]. *Chemico-Biol Int*, 2015, 240: 220-238.
- [2] Lam S M, Shui G. Lipidomics as a principal tool for advancing biomedical research [J]. *J Gene Genom*, 2013, 40(8): 375-390.
- [3] Navas-Iglesias N, Carrasco-Pancorbo A, Cuadros-Rodríguez L. From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics [J]. *Trends Anal Chem*, 2009, 28(4): 394-403.
- [4] Min H K, Lim S, Chung B C, *et al.* Shotgun lipidomics for candidate biomarkers of urinary phospholipids in prostate cancer [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399(2): 823-830.
- [5] Wang M, Wang C Y, Han R H, *et al.* Novel advances in shotgun lipidomics for biology and medicine [J]. *Prog Lipid Res*, 2016, 61: 83-108.
- [6] Basconillo L S, Zaheer R, Finan T M, *et al.* A shotgun lipidomics study of a putative lysophosphatidic acid acyl transferase (PlsC) in *Sinorhizobium meliloti* [J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877(26): 2873-2882.
- [7] 沈爱金, 郭志谋, 梁鑫淼. 亲水作用色谱固定相的发展及应用 [J]. *化学进展*, 2014, 26(1): 10-18.
- [8] Arapitsas P, Corte A D, Gika H, *et al.* Studying the effect of storage conditions on the metabolite content of red wine using HILIC LC-MS based metabolomics [J]. *Food Chem*, 2016, 197: 1331-1340.
- [9] Cífková E, Holčapek M, Lísá M, *et al.* Lipidomic differentiation between human kidney tumors and surrounding normal tissues using HILIC-HPLC/ESI-MS and multivariate data analysis [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 1000(1): 14-21.
- [10] Ikeda, K, Taguchi R. Highly sensitive localization analysis of gangliosides and sulfatides including structural isomers in mouse cerebellum sections by combination of laser microdissection and hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry with theoretically expanded multiple reaction monitoring [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(20): 2957-2965.
- [11] Teo C C, Chong W P K, Tan E, *et al.* Advances in sample preparation and analytical techniques for lipidomics study of clinical samples [J]. *TrAC Trends Anal Chem*, 2015, 66: 1-18.
- [12] Ekroos K, Jänis M, Tarasov K, *et al.* Lipidomics: a tool for studies of atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2010, 12(4): 273-281.
- [13] Laaksonen R. Lipidomics as a tool for atherosclerosis research [J]. *New Biotechnol*, 2010, 27(1): 18-19.
- [14] Zhang Y Y, Liu Y Y, Li L, *et al.* High resolution mass spectrometry coupled with multivariate data analysis revealing plasma lipidomic alteration in ovarian cancer in Asian women [J]. *Talanta*, 2016, 150: 88-96.
- [15] 丁洁霞, 厉有名. 非酒精性脂肪性肝病的脂质组学研究 [J]. *国际消化病杂志*, 2012, 32(3): 132-133.
- [16] 杨兆鹏, 徐芳, 赵欣捷, 等. 基于液相色谱-质谱联用技术的多囊卵巢综合征患者血清脂质组学分析 [J]. *分析化学*, 2015, 43(10): 1445-1451.
- [17] 潘洁莉, 胡长锋, 韦双双, 等. 基于鸟枪法脂质组学研究环氧酶-2 抑制剂对关节炎模型血清脂代谢的干预作用 [J]. *色谱*, 2016, 34(6): 550-557.
- [18] Astarita G, Piomelli D. Towards a whole-body systems [multi-organ]lipidomics in Alzheimer's disease [J]. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids*, 2011, 85(5): 197-203.
- [19] Rolim A E H, Henrique-Araújo R, Ferraz E G, *et al.* Lipidomics in the study of lipid metabolism: Current perspectives in the omic sciences [J]. *Gene*, 2015, 554(2): 131-139.
- [20] 殷婷婷, 赵春杰, 张英泽, 等. 风湿性疾病湿热证实质的脂质组学研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(1): 210-213.
- [21] 黄珮. 高脂血症肝郁脾虚证患者脂质组学初探 [D]. 广州: 广东药科大学, 2011.
- [22] Rabiei Z, Bigdeli M R, Rasouljan B, *et al.* The neuroprotection effect of pretreatment with olive leaf extract on brain lipidomics in rat stroke model [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(10): 940-946.
- [23] Han X, Holtzman D M, Mckeel D W, *et al.* Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis [J]. *J Neurochem*, 2002, 82(4): 809-818.
- [24] Cai Y M, Gao Y, Tan G G, *et al.* Myocardial lipidomics profiling delineate the toxicity of traditional Chinese medicine *Aconiti Lateralis Radix praeparata* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 147(2): 349-356.