

二维液相色谱-质谱法研究犬肾小管上皮细胞脂质组成及马兜铃酸(I)对其影响

聂洪港¹, 刘冉冉², 杨悠悠³, 刘虎威², 白玉²

(1. 北京大学分析测试中心, 北京 100871; 2. 北京分子科学国家实验室, 生物有机与分子工程教育部重点实验室,

北京大学化学与分子工程学院分析化学研究所, 北京 100871;

3. 中粮营养健康研究院, 营养健康与食品安全北京市重点实验室, 北京 102209)

摘要:采用在线正反相二维液相色谱-质谱联用技术研究了犬肾小管上皮细胞脂质组成及马兜铃酸(I)对其影响。二维色谱的第一维用于分离不同种类脂质, 第二维用于分离同类脂质的不同分子, 进而利用高分辨质谱对脂质分子进行检测。该方法减少了共流出, 降低了电离抑制, 提高了灵敏度与准确性。借助精确质荷比检索数据库、高分辨二级质谱和当量碳数与保留时间规律等方法检测了犬肾小管上皮细胞中 13 类脂质的 1 416 个脂质分子。选取 11 种外源性脂质标准品进行方法验证, 方法的线性关系、检测限、重复性均满足检测要求。在此基础上, 考察了犬肾小管上皮细胞暴露于马兜铃酸(I)后的脂质变化情况, 对改变含量 2~4 倍的 15 个脂质分子进行了鉴定。该实验结果可为马兜铃酸的毒理、病理研究和相关疾病的临床诊断提供丰富的信息, 并展现了二维液相色谱-质谱法在脂质组学研究中广阔的应用前景。

关键词:二维液相色谱-质谱; 犬肾小管上皮细胞; 马兜铃酸; 脂质组学

中图分类号: O657. 63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2016)04-0289-12

doi: 10. 7538/zpxb. youxian. 2016. 0037

Lipid Profiling of Madin-Darby Canine Kidney Cells and Its Lipid Changes Induced by Treatment of Aristolochic Acid (I) Using Two Dimensional Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

NIE Hong-gang¹, LIU Ran-ran², YANG You-you³, LIU Hu-wei², BAI Yu²

(1. Analytical Instrumentation Center, Peking University, Beijing 100871, China;

2. Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, Key Laboratory of Bioorganic Chemistry and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Analytical Chemistry,

College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China;

3. Beijing Key Laboratory of Nutrition Health and Food Safety, Chinese Oil &

Foodstuffs Corporation (COFCO) Nutrition and Health Research Institute, Beijing 102209, China)

Abstract: The mechanisms of lipids separation are as following: different lipid classes

收稿日期: 2016-01-11; 修回日期: 2016-03-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(21175005, 21405006, 21527809)资助

作者简介: 聂洪港(1980—), 男(汉族), 辽宁丹东人, 博士, 从事色谱、质谱仪器及检测技术研究。E-mail: hgnie@pku.edu.cn

通信作者: 白玉(1976—), 女(汉族), 吉林九台人, 副教授, 从事生物分离与检测研究。E-mail: yu.bai@pku.edu.cn

网络出版时间: 2016-07-05; 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20160705.1012.002.html>

are separated by adsorption mechanisms and eluted out of the column in normal-phase liquid chromatography (NPLC), and individual molecular species are separated based on hydrophobicity in reversed-phase liquid chromatography (RPLC). In RPLC, the elution sequence of lipid molecules is determined by both the chain length and the degree of unsaturation in the fatty-acyl chains. To avoid co-elution of molecular species, an online, normal-phase and reversed-phase two-dimensional (2D) liquid chromatography (LC) quadrupole time-of-flight mass spectrometry (Q TOF-MS) system was developed for the lipid profiling of Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells and the investigation of the lipid changes in MDCK cells treated with aristolochic acid (I). Different lipid classes in MDCK cells were separated in the first dimension of the two-dimensional liquid chromatograph system and lipid molecular species were further separated in the second dimension followed by mass spectrometry detection, so that the ion suppression effects were reduced while the detection sensitivity was improved.

All lipids in MDCK cells were identified with high accuracy mass values measured by Agilent 6530 accurate mass Q TOF-MS. The abundant molecular species were confirmed by targeted MS/MS, meanwhile the retention time and low abundance lipid molecules were identified with m/z value and the retention time based on the correlation between the equivalent carbon number (ECN) and the retention time. The measured accurate masses were applied for preliminary identification using the online database with a mass tolerance of less than ± 0.005 on the basis of the predicted elemental composition. 1 416 endogenous lipid species from 13 lipid classes were identified by accurate masses, tandem mass spectra and the retention time. 11 exogenous lipid standards from different classes, including FA 17:0, Hemi BMP(17:0), LPG(17:1), PG(14:0/14:0), Sphingosyl PE(d17:1/12:0), PE(14:0/14:0), LPE(17:1), PS(14:0/14:0), LPC(17:0), PC(14:1/14:1), SM(d18:1/17:0), were selected to be separated in five fractions for the evaluation of this method. The linear regression coefficients ($R^2=0.991\ 7-0.998\ 3$), the limit of detection ($2-5\ \mu\text{g/L}$) and the relative standard deviation of peak area ($0.9\%-7.7\%$) and retention time ($0.01\%-0.11\%$) were all satisfactory.

To investigate the lipid changes in MDCK cells dosed with aristolochic acid (I), 16 MDCK cell samples (each containing 5×10^5 cells) were randomly separated into a dosed group ($n=8$) and a control group ($n=8$). All 16 samples were detected by the 2D LC/MS method. The dosed group and control group were alternately injected to reduce systemic error. During the sequence, one blank sample was injected after every three injections, and no significant carryover of lipids was observed. MS data of all 16 samples were extracted by Mass-Hunter Qualitative Analysis software and analyzed by Mass Profiler Professional software. Through setting threshold parameters, the software presented a list of potential biomarkers whose absolute fold-change of peak area was larger than 2 and p value less than 0.05. By the above-mentioned approach, 15 changed lipid species were confirmed, as their concentrations in the dosed group were 2-4 times of those in the control group. The results would contribute to the study on therapeutic and toxicological mechanisms of aristolochic acids and revealed that this two-dimensional liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry method was a prom-

ising tool for lipidomics research.

Key words: two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry; Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells; aristolochic acid; lipidomics

马兜铃酸(aristolochic acid, AA)是从马兜铃属植物中提取出的一系列硝基苯蒽环类羧酸,主要成分是马兜铃酸(I)和马兜铃酸(II),其结构示于图1。古人用马兜铃属植物治疗蛇咬伤,现代医学则利用AA的抗炎性能治疗关节炎、痛风、风湿以及脓疮等^[1-2]。但有研究证明,AA是造成马兜铃酸肾病的原因,该病是长期摄入马兜铃属植物后发生的一种快速进行性纤维化间质肾炎^[3-4],其病理表现有肾脏体积缩小、部分两侧肾脏不对称、外形不规整,常伴有肾小管萎缩和肾小管消失等^[5]。该病变以皮质浅层受累最为明显,越往皮质深层病变越轻。探求马兜铃酸肾病的药理、毒理和作用机制一直是该领域的研究热点,代谢组学在相关研究中发挥了重要作用^[6-7]。

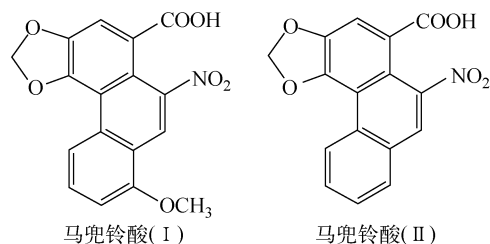


图1 马兜铃酸(I)和马兜铃酸(II)的结构式^[8]

Fig.1 Chemical structures of aristolochic acid (I) and aristolochic acid (II)^[8]

脂质组学是代谢组学最为活跃的分支之一,它通过系统全面地分析生物体中脂质分子的种属、代谢情况,以及与其他分子的相互作用,揭示其在生命活动中对膜的构建、信号传导、调控转录和翻译等过程的影响,阐明脂质及其代谢与细胞、器官和机体的生理、病理之间的关系^[9-11]。色谱、质谱及相关联用技术是脂质组学研究最主要的分析技术^[12-13]。其中,在线正相反相二维液相色谱-质谱联用技术可实现在一次进样中先分离不同种类脂质,再分离鉴定同类脂质中的不同分子,可最大限度地减少共流出、降低电离抑制、增加低丰度脂质分子信息、减少假阳性的检测结果、提升脂质分子鉴定

的准确性和信息量,已被应用于多种样品的脂质组学研究^[14-19]。

本工作拟采用二维液相色谱-质谱联用方法检测肾小管上皮(Madin-Darby canine kidney, MDCK)细胞中磷脂、脂肪酸、鞘脂等脂质成分,并将该细胞暴露于AA(I)中,考察上述脂质化合物含量的变化情况,以期从脂质组学角度为AA(I)的肾毒理学研究和马兜铃酸肾病的临床诊断提供依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

自建二维液相色谱系统:第一维采用美国Agilent公司的1100液相色谱仪,配有四元泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱;第二维采用美国Agilent公司的1200液相色谱仪,配有二元泵和在线脱气机;两维色谱之间的接口包括美国IDEX Health & Science公司的两位六通阀,英国Edwards公司的E2M2真空泵和自制的电热水浴锅。Agilent6530四极杆飞行时间质谱仪:美国Agilent公司产品,配有喷射流离子聚焦技术电喷雾离子源。

仪器控制及数据采集由美国Agilent公司MassHunter Data Acquisition B. 02. 00完成;定性、定量及统计学分析分别由美国Agilent公司MassHunter Qualitative Analysis B. 02. 00、MassHunter Quantitative Analysis B. 03. 01和Mass Profiler Professional 2. 0完成。

1.2 主要材料与试剂

马兜铃酸(I)标准品:由中国药品生物制品检定所提供;磷脂标准品:sn-(1-heptadecanoyl-2-hydroxy)-glycerol-3-phospho-sn-3'-(1', 2'-heptadecanoyl)-glycerol, Hemi BMP (17 : 0); 1-(10Z-heptadecenoyl)-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt), LPG (17 : 1); 1, 2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt), PG (14 : 0/14 : 0); N-(dodecanoyl)-heptadecasphing-4-enine-1-phosphoethanolamine, Sphingosyl PE

(d17 : 1/12 : 0); 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, PE (14 : 0/14 : 0); 1-(10Z-heptadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, LPE (17 : 0); 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt), PS (14 : 0/14 : 0); N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine, SM (d18 : 1/17 : 0); 1-heptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, LPC (17 : 0); 1,2-dimyristoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, PC (14 : 0/14 : 0); 美国 Avanti Polar Lipid 公司产品; 十七烷酸 (heptadecanoic acid) 标准品 FFA (17 : 0)、质谱纯甲酸铵、细胞培养级二甲基亚砷, 均为美国 Sigma-Aldrich 公司产品; 正己烷、乙醇、甲醇和氯仿, 均为色谱纯, 美国 Dikma 公司产品; 实验用纯净水: 中国娃哈哈公司产品; MDCK 细胞: 美国 American Type Culture Collection (ATCC) 公司产品; DMEM 高糖培养基、10% 胎牛血清、1% 谷氨酰胺、1% 青霉素/链霉素和胰酶/EDTA 消化液, 均为美国 Thermo-Fisher 公司产品。

1.3 样品制备

1.3.1 MDCK 细胞培养 MDCK 细胞采用 DMEM 高糖培养基培养, 内含 10% 胎牛血清、1% 谷氨酰胺、1% 青霉素/链霉素, 于 5% CO₂、恒湿和 37 °C 条件下培养, 待 90% 融合后, 用胰酶/EDTA 消化液消化, 制成单细胞悬液; 调节细胞密度为每毫升 5×10^5 个, 以每孔 1 mL 接种于 6 孔细胞培养板, 24 h 后弃去培养液, 用 PBS 清洗 2 次; 向给药组的每个孔内分别加入 200 nmol AA (I), 与未给药对照组一同置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中, 继续培养 24 h; 24 h 后, 给药组的部分细胞死亡, 悬浮在培养基里, 部分仍贴壁; 收集每个样品的培养液, 并用胰蛋白酶消化仍然贴壁的细胞, 将收集的贴壁细胞分别用血球计数板计数。

1.3.2 MDCK 细胞脂质的提取 采用经改进的 Folch 方法^[20]提取 MDCK 细胞脂质。首先从给药组和对照组各选取 8 份细胞样品, 每份样品含有约 5×10^5 个活细胞, 向其中加入 10 mL Folch 溶剂 (氯仿-甲醇溶液, 2 : 1, V/V), 以 3 000 r/min 离心 10 min, 取下层溶液, 氮气吹干, 复溶于 1 mL 环己烷-异丙醇溶液 (7 : 3,

V/V) 中, 待色谱-质谱分析。

1.3.3 方法验证样品的制备 随机选取 10 份细胞样品 (每份含约 5×10^5 个活细胞), 向 1 号样品中加入 11 种脂质标准品各 0.001 μ g, 而 2~10 号样品中 11 种脂质标准品的加入量分别为 0.002、0.01、0.02、0.1、0.2、1、2、10、20 μ g。采用 1.3.2 节方法, 得到 10 个方法验证用样品, 其单一内标浓度分别为 0.001、0.002、0.01、0.02、0.1、0.2、1、2、10、20 mg/L。

1.4 实验条件

1.4.1 色谱条件 第一维色谱柱为 Agilent Rx-SIL 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 150 mm $\times$ 5 μ m), 柱温 25 °C, 进样量 20 μ L; 流动相: A1 为含有 5 mmol/L 甲酸铵的环己烷-异丙醇-水溶液 (30 : 70 : 2, V/V/V), B1 为含有 5 mmol/L 甲酸铵的甲醇-水溶液 (100 : 2, V/V), 流速 0.1 mL/min。

第二维色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C8 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 10 mm $\times$ 3.5 μ m), 柱温 40 °C; 流动相: A2 为含有 5 mmol/L 甲酸铵的甲醇-水溶液 (50 : 50, V/V), B2 为含有 5 mmol/L 甲酸铵的甲醇, 流速 0.3 mL/min。

接口水浴锅温度 50 °C, 在真空泵的作用下, 一维色谱流出的流动相在接口处气化并被真空泵抽出, 被分析物质沉积在样品环中, 当六通阀切换时, 其被转移至第二维色谱系统进行进一步的分离。第一维和第二维液相色谱梯度洗脱条件和六通阀的转换时间列于表 1。

1.4.2 质谱条件 负离子模式; 鞘气温度 350 °C, 鞘气流速 8 L/min; 喷雾气压力 138 kPa; 干燥气温度 300 °C, 干燥气流速 5 L/min; 毛细管入口电压 3 500 V; 碎裂电压 190 V; 锥孔 1 电压 65 V; 质谱采集速率 1.02 spectra/s, 采集范围为 m/z 100~2 000; 在目标二级质谱模式中, 母离子质量窗口 m/z 1.3, 碰撞能量 40 V。

2 结果与讨论

2.1 MDCK 细胞脂质的分离与检测

MDCK 细胞中的脂质提取物在第一维色谱中按其极性差异实现分离, 共检测到 13 类脂质: 游离脂肪酸 (FFA), 磷脂酰甘油 (PG), 降解磷脂酰甘油 (LPG), 磷脂酰肌醇 (PI), 降解磷脂酰肌醇 (LPI), 磷脂酰乙醇胺 (PE), 降解磷脂

酰乙醇胺(LPE),磷脂酰丝氨酸(PS),降解磷脂酰丝氨酸(LPS),磷脂酰胆碱(PC),降解磷脂酰胆碱(LPC),鞘磷脂(SM)和心磷脂(CL)。将第一维色谱分为 5 段(第 1 段含 FFA;第 2

段含 PI、PG、LPG;第 3 段含 PE、CL;第 4 段含 LPI、LPE、PS、LPS;第 5 段含 PC、LPC、SM),分别转移至第二维反相色谱进行进一步的分离,结果示于图 2。

表 1 二维液相色谱梯度洗脱程序

Table 1 Gradient programs of the two dimensional liquid chromatography

第一维液相色谱				接口	第二维液相色谱			
保留时间/ min	流速/ (mL/min)	A1/%	B1/%	阀位置	保留时间/ min	流速/ (mL/min)	A1/%	B1/%
0~9	0.1	100	0	1	0	0.3	50	50
					9	0.3	50	50
9~21	0	100	0	2	20	0.3	40	60
					21	0.3	20	80
					29	0.3	0	100
					31	0.3	0	100
					31.01	0.3	100	0
21~35	0.1	100	0	1	35	0.3	100	0
					37	0.3	30	70
					50	0.3	5	95
37~44	0.1	100	0	1	50.01	0.3	100	0
					54	0.3	100	0
					56	0.3	20	80
					74	0.3	10	90
					76	0.3	0	100
44~54	0.1	0	100	1	80	0.3	0	100
					84	0.3	100	0
					86	0.3	25	75
					90	0.3	20	80
					91	0.3	10	90
54~75	0	0	100	2	95	0.3	0	100
					100	0.3	0	100
					100.01	0.3	100	0
					104	0.3	100	0
					106	0.3	45	55
75~84	0.1	0	100	1	114	0.3	40	60
					114.01	0.3	20	80
					124	0.3	20	80
					139	0.3	15	85
					150	0.3	0	100
84~91	0	0	100	2	154	0.3	10	90
					155	0.3	0	100
					156	0.3	0	100
					157	0.3	0	100
					158	0.3	0	100
91~104	0.1	0	100	1	159	0.3	0	100
					160	0.3	0	100
					161	0.3	0	100
					162	0.3	0	100
					163	0.3	0	100
104~114	0.4	0	100	2	164	0.3	0	100
					165	0.3	0	100
					166	0.3	0	100
					167	0.3	0	100
					168	0.3	0	100
114~144	0.4	100	0	2	169	0.3	0	100
					170	0.3	0	100
					171	0.3	0	100
					172	0.3	0	100
					173	0.3	0	100
114~150	0.1	100	0	2	174	0.3	0	100
					175	0.3	0	100
					176	0.3	0	100
					177	0.3	0	100
					178	0.3	0	100

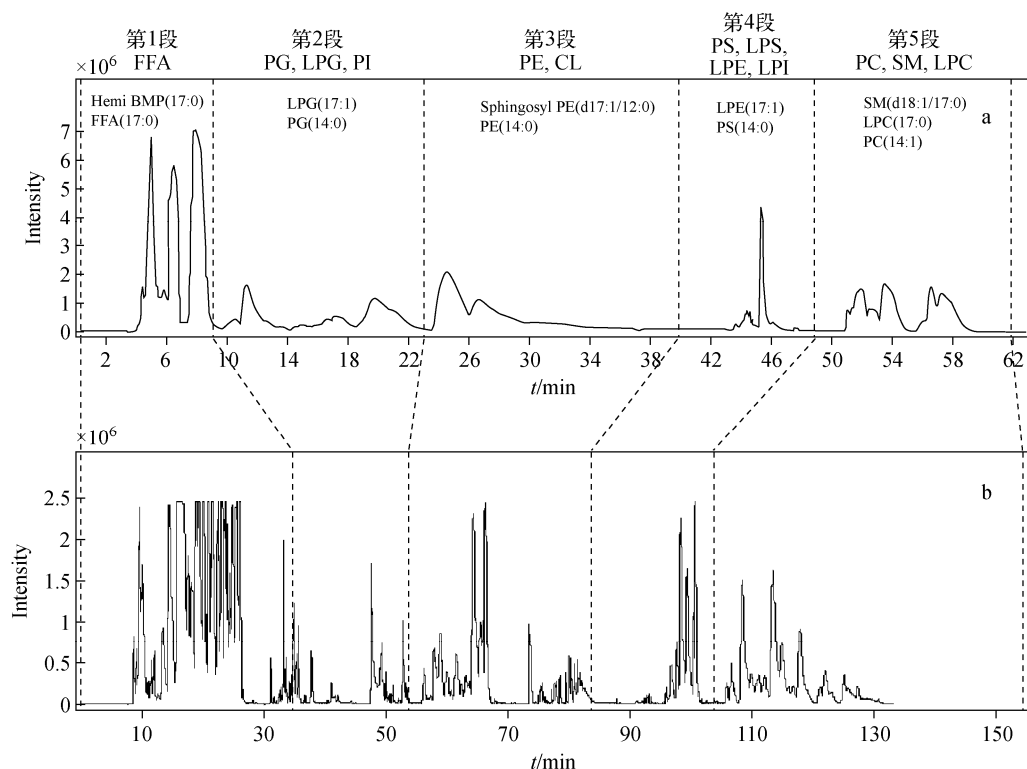


图2 MDCK 细胞脂质的一维(a)和二维(b)液相色谱基峰色谱图

Fig. 2 1D (a) and 2D (b) LC base peak chromatogram of MDCK

将下面3种方式相结合对脂质化合物进行定性:1) 根据精确质量数检索脂质数据库, 推测分子式;2) 根据脂质二级质谱特征碎片离子解析脂质分子结构。根据文献报道^[21-29]及本实验室前期工作经验^[14-19], 除 FFA 外, 其余 12 类脂质化合物在丰度满足二级质谱分析的前提下, 均可得到具有特征性的二级离子, 适用于脂类化合物的结构解析, 主要脂质化合物的离子碎片列于表 2;3) 根据同类脂质分子中支链的当量碳数与其保留时间的关系。

对于大多数含量相对较高的非脂肪酸类脂质化合物, 可以采用精确质荷比、化合物特征碎裂途径和保留时间共同定性; 而低丰度的脂质分子和脂肪酸类化合物通常因为无法得到稳定可靠的二级质谱信息, 则需通过精确质荷比和保留时间进行定性, 下面将分别介绍。

首先, 将一级质谱检测得到的准分子离子质荷比输入 LIPIDMAPS 网站 (http://www.lipidmaps.org/tools/ms/LMSD_search_mass_options.php) 的在线数据库“Search the LMSD for lipids

with a given mass (m/z) value”进行搜索, 数据库软件会列出可能的脂类化合物。Q-TOF MS 在有参比离子校正的情况下, 质量误差可控制在 ± 0.002 以下; 而在没有参比离子进行校正的二级质谱中, 质量误差可达 ± 0.005 以下。与理论计算值相比, 相对质量误差在 ± 0.005 以上则认为未能达到定性要求, 因此本实验设定的质量窗口是 ± 0.005 。例如, 在第 3 段检测到某一分析物离子的质荷比为 766.540 6, 将这一数值输入在线数据库进行检索。因为在第 3 段流出的脂质分子属于 PE 类化合物, 而在数据库检索结果中既符合 PE 类脂质, 又符合质量偏差小于 ± 0.005 的只有 $C_{43}H_{77}NO_8P^-$ PE (38:4) (理论质量数为 766.539 2), 所以基本可以确定该脂质是两脂肪酸支链上含有 38 个碳原子和 4 个不饱和双键的 PE 分子丢失一个 H^+ 形成的准分子离子, 同时可确定这一化合物的分子式。若要确定脂肪酸链的具体信息, 还需要对该化合物的二级质谱进行解析。在结构分析的过程中, 采用 targeted MS/MS 模式选取母离子 (m/z 766.54), 以 40 V 的碎裂能量

表 2 主要脂质化合物的离子碎片
Table 2 Fragments of major lipid classes

脂质种类	母离子	脂质种类特征碎片	分子种属特征碎片
PI	[M-H] ⁻	[M-H-R ₁ 'CH=C=O-180-R ₂ 'CH=C=O] ⁻	[R ₁ 'COO] ⁻
		[M-H-R ₁ 'COOH-R ₂ 'COOH-74] ⁻	[M-H-R ₁ 'COOH-162] ⁻ 或
			[M-H-R ₁ 'CH=C=O-180] ⁻
		[M-H-R ₁ 'CH=C=O-R ₂ 'COOH-74] ⁻	[M-H-R ₁ 'COOH] ⁻
		[M-H-R ₁ 'COOCH-R ₂ 'COOCH ₂ CH] ⁻	[M-H-R ₁ 'CH=C=O] ⁻
		[M-H-R ₁ 'COOH-R ₂ 'COOH] ⁻	
		[M-H-R ₁ 'CH=C=O-R ₂ 'COOH] ⁻	
PG	[M-H] ⁻	[M-H-R ₁ 'COOH-R ₂ 'CH=C=O-74] ⁻	[R ₁ 'COO] ⁻
		[M-H-R ₁ 'COOH-R ₂ 'COO-CHCHCH ₂] ⁻	[M-H-R ₁ 'COOH-74] ⁻
		[M-H-R ₁ 'COOH-R ₂ 'COOH] ⁻	[M-H-R ₁ 'CH=C=O-74] ⁻
		[M-H-R ₁ 'COOH-R ₂ 'CH=C=O] ⁻	[M-H-R ₁ 'COOH] ⁻
		[M-H-R ₁ 'CH=C=O-R ₂ 'CH=C=O] ⁻	[M-H-R ₁ 'CH=C=O] ⁻
PC	[M+HCOO] ⁻	[M-H-CH ₃ -(CH ₃) ₃ NCHCH ₂ -R ₁ 'CH=C=O-R ₂ 'COOH] ⁻	[R ₁ 'COO] ⁻
			[M-CH ₃ -R ₁ 'CH=C=O] ⁻
			[M-CH ₃ -R ₁ 'COOH] ⁻
PE	[M-H] ⁻		[M-H-R ₁ 'COOH] ⁻
		[M-H-R ₁ 'CH=C=O-R ₂ 'COO-CH ₂ CHOHCH] ⁻	[R ₁ 'COO] ⁻
		[M-H-R ₁ 'COOH-R ₂ 'COOH] ⁻	[M-H-R ₁ 'COOH] ⁻
		[M-H-R ₁ 'COOH-R ₂ 'CH=C=O] ⁻	[M-H-R ₁ 'CH=C=O] ⁻
PS	[M-H] ⁻	[M-H-R ₁ 'CH=C=O-R ₂ 'CH=C=O] ⁻	
		[M-H-87-R ₁ 'CH=C=O-R ₂ 'COOH] ⁻	[R ₁ 'COO] ⁻
		[M-H-87-R ₁ 'CH=C=O-R ₂ 'CH=C=O] ⁻	[M-H-87-R ₁ 'COOH] ⁻
CL	[M-H] ⁻		[M-H-87-R ₁ 'CH=C=O] ⁻
		[M-2H-R ₃ 'COO-R ₄ 'COO-CH ₂ CHCH ₂ PO ₄ CH ₂ CHOCH ₂	[R ₁ 'COO] ⁻
		-R ₁ 'CH=C=O-R ₂ 'COOH] ⁻	
		[M-2H-R ₃ 'COO-R ₄ 'COO-CH ₂ CHCH ₂ PO ₄ CH ₂ CHOCH ₂	[M-2H-R ₃ 'COO-R ₄ 'COO] ⁻
		-R ₁ 'CH=C=O-R ₂ 'CH=C=O] ⁻	CH ₂ CHCH ₂ PO ₄ CH ₂ CHOCH ₂ -
			R ₁ 'COOH] ⁻
		[M-2H-R ₁ 'COO-R ₂ 'COO-CH ₂ CHCH ₂ PO ₄ H-R ₃ 'COOH-	
SM(d18 : 1)	[M+HCOO] ⁻	R ₄ 'COOH] ⁻	
		[M-2H-R ₁ 'COO-R ₂ 'COO-CH ₂ CHCH ₂ PO ₄ H-R ₃ 'COOH	
		-R ₄ 'CH=C=O] ⁻	
		[M-2H-R ₁ 'COO-R ₂ 'COO-CH ₂ CHCH ₂ PO ₄ H-	
		R ₃ 'CH=C=O-R ₄ 'CH=C=O] ⁻	
SM(d18 : 1)	[M+HCOO] ⁻	[M-CH ₃ -R ₁ 'CH=C=O] ⁻	[R ₁ 'COO] ⁻
			[M-(CH ₃) ₃ NCH ₂ CH] ⁻
			[M-H-N(CH ₃) ₃] ⁻
SM(d18 : 1)	[M+HCOO] ⁻		[M-CH ₃] ⁻

对母离子进行碎裂,采集碎片离子信息,得到其二级质谱图,示于图 3。图中, m/z 303.232 9 和 m/z 283.263 4 离子分别是 20 : 4 和 18 : 0 脂肪酸根的离子; m/z 480.309 7 和 m/z 462.298 7 离子分别对应于 PE(38 : 4)负离子以烯酮和脂肪酸的形式中性丢失一个 20 : 4 脂肪酰基侧链后形成的离子; m/z 196.036 6 和 m/z 140.011 2 离子是所有 PE 分子的特征碎片离子; m/z 196.036 6 代表 PE 准分子离子的两个脂肪酰基侧链,其中一个以脂肪酸的形式,另一个以烯酮的形式全部中性丢失后产生的特征离子; m/z 140.011 2 离子则是乙醇胺磷酸负离子。这些碎片离子的信息与文献[21-29]报道一致,因此可推断出这一分子的两个脂肪酰基的组成是 18 : 0 和 20 : 4,脂质分子可确定为 PE(18 : 0/20 : 4)。大部分脂质分子的碎裂机理已被详细研究过,根据这些脂质分子的特征碎裂路径和产生的特征离子,可以对产生稳定可靠二级质谱的高丰度化合物进行定性分析。

由于脂肪酸类化合物和其他丰度相对较低的脂质化合物很难得到稳定的二级质谱信息,因此,本实验采用在数据库中搜索检测到的准分子离子质荷比以确定其可能的分子信息,并结合保留时间进行辅助定性。实验发现,同类脂质分子在反相色谱分离中的保留时间与其支链的当量碳数相关,支链上含有相同碳原子个数的同类脂质分子随着支链上碳碳双键个数的增加疏水性减弱,在反相色谱柱上的保留时间缩短,这与文献[14]发现的规律一致。利用这个规律,可以对无法得到二级质谱信息的脂类化合物进行辅助定性,这比仅使用精确的准分子离子质量对化合物定性更加准确。

通过上述 3 种方式对 MDCK 细胞脂质提取物的二维液相色谱-质谱结果进行分析,在 13 类脂质中共检测到 1 416 个脂质分子,结果列于表 3。其中,PC 和 PE 是检出脂质分子个数最多的两类脂质化合物,占总个数的 68%;其他 11 类脂质分子仅占总个数的 32%。

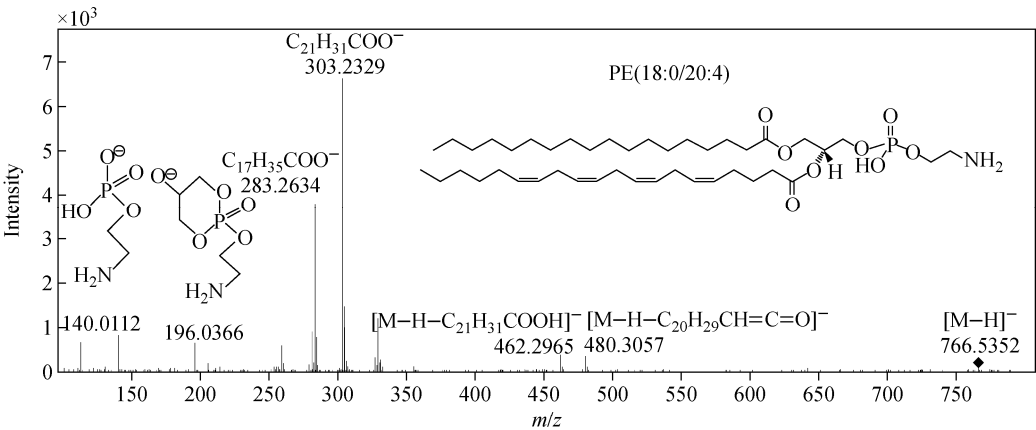


图 3 负离子模式下,母离子 m/z 766.54 的二级质谱图

Fig. 3 Tandem mass spectrum of precursor ion m/z 766.54

表 3 二维液相色谱-质谱检测得到的 MDCK 细胞中主要脂质的数量

Table 3 Lipid species amounts of each class in MDCK determined by 2D LC/MS

脂质种类	PI	PG	PC	PE	PS	LPI	LPG	LPC	LPE	LPS	CL	SM	FFA	总数
脂质分子个数	88	10	490	473	77	13	7	56	44	19	55	30	54	1 416

2.2 方法验证

从 11 类脂质中各选取 1 个外源性脂质标准品,使其保留时间较均匀地分布于第一维色

谱中,5 段中每段含有 2~3 个脂质标准品:第 1 段含 FFA(17 : 0)和 Hemi BMP(17 : 0);第 2 段含 LPG(17 : 1)和 PG(14 : 0/14 : 0);第

3 段含 PE(14 : 0/14 : 0)和 Sphingosyl PE(d17 : 1/12 : 0);第 4 段含 LPE(17 : 0)和 PS(14 : 0/14 : 0);第 5 段含 SM(d18 : 1/17 : 0)、LPC(17 : 0)和 PC(14 : 0/14 : 0)。采用这 11 个脂质标准品,按 2.4 节方法配制 10 个浓度水平的验证样品,每个浓度水平连续检测 3 次,且每个浓度水平之间插入一次空白溶剂的分析。计算时对测试标准品的萃取离子色谱峰进行积分,得到该化合物相应浓度的峰面积,将每个浓度水平测得的 3 次峰面积取平均值与相应的浓度建立线性方程。计算得到

的 11 个脂质标准品的线性方程、线性范围、线性回归系数 R^2 、检测限(LOD)、相对标准偏差(RSD)等,列于表 4。可知,11 种验证标准品的线性回归系数均大于 0.991 7,表明 11 种标准品在相应的范围内质谱信号响应和浓度具有良好的线性关系。除 PS(14 : 0/14 : 0)的 LOD 为 5 $\mu\text{g/L}$ 外,其余 10 种脂质标准的 LOD 都达到 2 $\mu\text{g/L}$,峰面积和保留时间的相对标准偏差分别小于 7.7%和 0.11%($n=6$),这说明本方法可满足定量比较分析的需要,适用于脂质组学的相关研究。

表 4 11 种标准品的方法验证结果
Table 4 Method validation results with 11 standards

区段	标准品	保留时间/ min	线性方程 ¹	线性范围/ (mg/L)	回归系数 R^2	检测限/ ($\mu\text{g/L}$)	相对标准偏差 ² /%	
							峰面积 ³	保留时间
1	FA 17 : 0	22.80	$y=1106x+235210$	0.02~10	0.996 1	2	5.4	0.04
	Hemi BMP(17 : 0)	30.84	$y=3526x+223912$	0.01~2	0.9947	2	3.6	0.04
2	LPG(17 : 1)	39.76	$y=8502x-46171$	0.01~2	0.9937	2	6.4	0.01
	PG(14 : 0/14 : 0)	44.74	$y=4392x-4858$	0.01~2	0.9960	2	4.7	0.03
3	Sphingosyl PE(d17 : 1/12 : 0)	61.97	$y=10439x-18974$	0.01~2	0.9976	2	5.4	0.03
	PE(14 : 0/14 : 0)	64.17	$y=3495x-16511$	0.01~2	0.9983	2	5.5	0.03
4	LPE(17 : 1)	89.33	$y=10692x-36505$	0.01~2	0.9917	2	5.0	0.00
	PS(14 : 0/14 : 0)	94.18	$y=991x-163$	0.02~10	0.9972	5	7.7	0.11
5	LPC(17 : 0)	115.85	$y=8637x+434471$	0.01~2	0.9943	2	4.1	0.01
	PC(14 : 1/14 : 1)	120.23	$y=5852x-6111$	0.01~2	0.9973	2	2.4	0.01
	SM(d18 : 1/17 : 0)	127.75	$y=3186x+804376$	0.01~2	0.9977	2	0.9	0.02

注:1. y 为萃取离子峰的峰面积, x 为标准品浓度($\mu\text{g/L}$);2. 标准品浓度 0.1 mg/L, $n=6$;3. 萃取离子色谱图的峰面积

2.3 马兜铃酸(Ⅰ)对 MDCK 细胞中脂质含量的影响

采用 Mass Profiler Professional 软件对给药组和对照组各 8 份细胞脂质提取物的二维液相色谱-质谱结果进行统计学分析,主成分分析(PCA)结果示于图 4。可见,16 个样品被分成 2 组,该软件给出了区分这 2 组数据做出主要贡献的化合物列表,通过对这些化合物设定阈值,即峰面积的绝对倍数变化大于 2 且 p 值小于 0.05,共找到 2 组中峰面积存在显著差异的 15 个脂质分子,结果列于表 5。

采用四极杆飞行时间质谱对上述 15 个离子进行二级碎裂,由碎片离子推测可能的碎裂路径,进一步确认其可能的分子组成与结构信息。以 LPE(O-16 : 1)为例,其二级质谱图和

碎裂路径示于图 5。

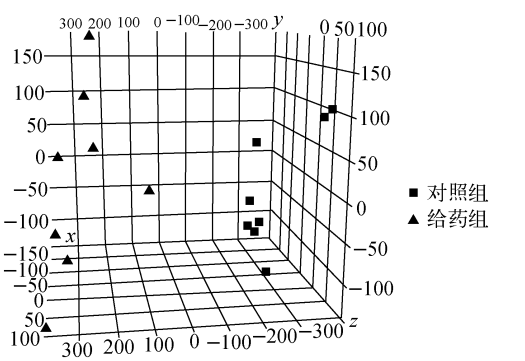


图 4 用 AA(Ⅰ)处理的 MDCK 细胞和对照组数据的主成分分析图

Fig. 4 PCA results of dosed with AA(Ⅰ) and control MDCK groups

表 5 用 AA(I)处理后 MDCK 细胞中含量变化的脂质化合物
Table 5 Changed lipid species in MDCK cells dosed with AA(I)

脂质分子	保留时间/min	<i>m/z</i>	变化规律	变化倍数
FFA(20 : 4)	22. 870	303. 2320	up	2
FFA(24 : 1)	26. 214	365. 3418	up	4
LPG(22 : 6)	39. 736	555. 2732	up	3
LPG(20 : 4)	39. 738	531. 2733	up	2~3
LPG(16 : 0)	39. 908	483. 2725	up	2~4
LPG(18 : 1)	40. 168	509. 2885	up	2
LPG(O-18 : 1)	40. 653	495. 3080	up	2
LPI(20 : 3)	88. 948	621. 3035	up	2
LPE(20 : 5)	88. 978	498. 2616	up	2~3
LPE(20 : 4)	89. 353	500. 2776	up	2
LPE(22 : 4)	89. 988	528. 3086	up	2
LPE(O-16 : 1)	90. 044	436. 2832	up	2
LPE(O-18 : 1)	91. 072	464. 3144	up	2
PC(O-36 : 6)	128. 987	762. 5438	up	2~3
PC(O-36 : 5)	131. 596	764. 5589	up	2~3

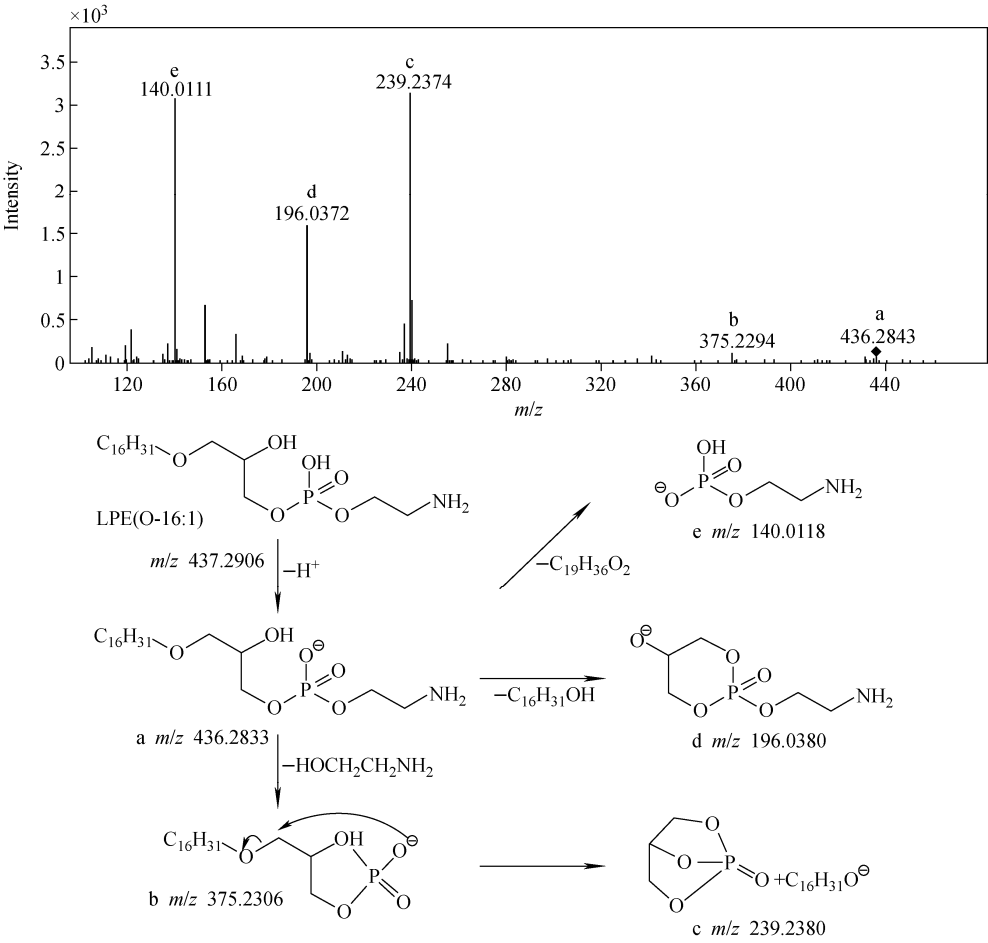


图 5 LPE(O-16 : 1)的二级质谱图和碎裂路径

Fig. 5 Tandem mass spectrum and fragment pathways of LPE (O-16 : 1)

15个脂质分子的含量在给药组中有明显变化,这可能同AA(I)与MDCK细胞的DNA形成加合物,其转录成的蛋白对脂质合成的调控能力降低有关;也可能是AA直接与相关蛋白作用,改变其活性,致使脂质合成不受控,脂质的大量合成占用了过多的能量,造成了细胞凋亡,或超量的脂质影响了细胞的正常代谢使其凋亡。上述推断仍需进一步研究的验证。给药前后含量发生明显变化的脂质分子可能会由细胞渗入尿液,使其在尿液中的含量增加,这有望为临床诊断马兜铃酸肾病提供一种无损检测的方法。

4 总结与展望

本工作采用二维液相色谱-质谱法分析了MDCK细胞中13类脂质共1416种分子种属,并比较了这些脂质在MDCK暴露于AA(I)前后含量的变化,为毒理学研究和潜在临床诊断方法提供了技术手段。二维液相色谱-质谱法在生物脂质轮廓分析,尤其是低丰度脂质分析中,具有灵敏度高、定性准确、信息丰富等特点,有望在脂质组学研究中发挥更加重要的作用。

参考文献:

- [1] RÜCKER V G, CHUNG B S. Aristolochic acids from *Aristolochia manshuriensis* (author's transl)[J]. *Planta Medica*, 1975, 27(1): 68-71.
- [2] PRIESTAP H A. Minor aristolochic acids from *aristolochia-argentina* and mass-spectral analysis of aristolochic acids[J]. *Phytochemistry*, 1987, 26(2): 519-529.
- [3] STIBOROVA M, FREI E, ARLT V M, et al. Metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid, a risk factor for balkan endemic nephropathy[J]. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 2008, 658(1/2): 55-67.
- [4] DEBELLE F D, VANHERWEGHEM J L, NORTIER J L. Aristolochic acid nephropathy: A worldwide problem[J]. *Kidney International*, 2008, 74(2): 158-169.
- [5] POON S L, PANG S T, MCPHERSON J R, et al. Genome-wide mutational signatures of aristolochic acid and its application as a screening tool[J]. *Science Translational Medicine*, 2013, 5(197): 101.
- [6] NIE W, LV Y, YAN L, et al. Prediction and characterisation of the system effects of aristolochic acid: A novel joint network analysis towards therapeutic and toxicological mechanisms[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 5(51): 51 035-51 043.
- [7] ZHAO Y Y, WANG H L, CHENG X L, et al. Metabolomics analysis reveals the association between lipid abnormalities and oxidative stress, inflammation, fibrosis, and nrf2 dysfunction in aristolochic acid-induced nephropathy[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12 936.
- [8] ARLT V M, STIBOROVA M, SCHMEISER H H. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: A review[J]. *Mutagenesis*, 2002, 17(4): 265-277.
- [9] HAN X L, GROSS R W. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by esi mass spectrometry: A bridge to lipidomics[J]. *Journal of Lipid Research*, 2003, 44(6): 1 071-1 079.
- [10] WENK M R. The emerging field of lipidomics[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005, 4(7): 594-610.
- [11] WATSON A D. Lipidomics: A global approach to lipid analysis in biological systems[J]. *Journal of Lipid Research*, 2006, 47(10): 2 101-2 111.
- [12] LI M, YANG L, BAI Y, et al. Analytical methods in lipidomics and their applications[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(1): 161-175.
- [13] CAJKA T, FIEHN O. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2014, 61: 192-206.
- [14] NIE H G, LIU R R, YANG Y Y, et al. Lipid profiling of rat peritoneal surface layers by online normal- and reversed-phase 2d LC Q-TOF MS[J]. *Journal of Lipid Research*, 2010, 51(9): 2 833-2 844.
- [15] LI M, FENG B S, LIANG Y, et al. Lipid profiling of human plasma from peritoneal dialysis patients using an improved 2D (np/rp) LC-QTOF MS method[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405(21): 6 629-6 638.
- [16] LI M, TONG X L, LV P, et al. A not-stop-flow online normal-/reversed-phase two-dimensional

- liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry method for comprehensive lipid profiling of human plasma from atherosclerosis patients[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1 372: 110-119.
- [17] TANG W, LI M, LU X H, et al. Phospholipids profiling and outcome of peritoneal dialysis patients[J]. *Biomarkers*, 2014, 19(6): 505-508.
- [18] WENG R, SHEN S S, YANG L, et al. Lipidomic analysis of *p*-chlorophenylalanine-treated mice using continuous-flow two-dimensional liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2015, 29(16): 1 491-1 500.
- [19] YANG L, CUI X G, ZHANG N N, et al. Comprehensive lipid profiling of plasma in patients with benign breast tumor and breast cancer reveals novel biomarkers[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(17): 5 065-5 077.
- [20] FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 226(1): 497-509.
- [21] HSU F F, TURK J. Characterization of phosphatidylinositol, phosphatidylinositol-4-phosphate, and phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate by electrospray ionization tandem mass spectrometry: A mechanistic study[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2000, 11(11): 986-999.
- [22] HSU F F, TURK J. Studies on phosphatidylglycerol with triple quadrupole tandem mass spectrometry with electrospray ionization: Fragmentation processes and structural characterization [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2001, 12(9): 1 036-1 043.
- [23] ZHANG X, REID G E. Multistage tandem mass spectrometry of anionic phosphatidylcholine lipid adducts reveals novel dissociation pathways[J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2006, 252(3): 242-255.
- [24] HSU F F, TURK J. Charge-remote and charge-driven fragmentation processes in diacyl glycerophosphoethanolamine upon low-energy collisional activation: A mechanistic proposal[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2000, 11(10): 892-899.
- [25] HSU F F, TURK J. Charge-driven fragmentation processes in diacyl glycerophosphatidic acids upon low-energy collisional activation. A mechanistic proposal[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2000, 11(9): 797-803.
- [26] HSU F F, TURK J. Studies on phosphatidylserine by tandem quadrupole and multiple stage quadrupole ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization: Structural characterization and the fragmentation processes[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2005, 16(9): 1 510-1 522.
- [27] HSU F F, TURK J. Differentiation of 1-o-alk-1'-enyl-2-acyl and 1-o-alkyl-2-acyl glycerophospholipids by multiple-stage linear ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2007, 18(11): 2 065-2 073.
- [28] HSU F F, TURK J, RHOADES E R, et al. Structural characterization of cardiolipin by tandem quadrupole and multiple-stage quadrupole ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2005, 16(4): 491-504.
- [29] HOUJOU T, YAMATANI K, NAKANISHI H, et al. Rapid and selective identification of molecular species in phosphatidylcholine and sphingomyelin by conditional neutral loss scanning and MS³[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2004, 18(24): 3 123-3 130.