

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01368

· 综述 ·

脂质组学在微生物领域中的研究进展

杨宇¹, 曹颖琰², 朱臻宇^{1*}

- 1. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433
- 2. 第二军医大学药学院新药研究中心, 上海 200433

[摘要] 脂质具有重要的生物功能,其代谢与多种疾病的发生、发展密切相关。脂质分析对疾病的发生机制、生物标志物的发现、诊断治疗以及新药研究都有非常重要的意义。脂质组学就是对生物样品中的脂质及其相互作用的分子进行系统的分析。本文就脂质的生物功能以及脂质组学在微生物领域中的分析方法及研究现状作简要评述,并展望了脂质组学在该领域的应用前景。

[关键词] 脂质组学;质谱分析法;微生物学;生物学标记

[中图分类号] R 37 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)12-1368-05

Lipidomics in microbiology: research progress

YANG Yu¹, CAO Ying-ying², ZHU Zhen-yu^{1*}

- 1. Department of Drug Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
- 2. New Drug R&D Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Lipids play important biological roles and their metabolism is closely related to the development and progression of a variety of diseases. Lipid analysis is of great importance for research on disease mechanisms, biomarker discovery, diagnosis and treatment, and drug research. Lipidomics systematically analyze the lipids and molecules that interact with lipids in biological samples. This review introduces the biological roles of lipids and the analytical methods regarding lipidomics in microbiology, and offers a future view of lipidomics in microbiology.

[Key words] lipidomics; mass spectrometry; microbiology; biological markers

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(12):1368-1372]

脂质是一类化学结构多样的代谢物。脂质不仅是构成细胞膜的组成部分和能量储存物质,而且还在生命活动中发挥着多种重要的生物学功能^[1]。脂质组学作为代谢组学的分支,是系统性研究生物体、组织或细胞中脂质及与其相互作用分子的一门学科^[2]。与哺乳动物的脂质组学研究比较,微生物脂质组学研究有以下优点:(1)脂质组相对简单。微生物细胞中的脂肪酸种类较哺乳动物少,没有多不饱和脂肪酸;(2)微生物培养时间短,培养过程相对简单;(3)采用基因敲除技术产生大量突变体,可以通过研究该基因在分子和细胞水平的影响,进一步解析其作用机制等^[3]。近几年,脂质组学在微生物领域的研究得到了快速的发展,如:在微生物的表型研究方面,对浮游型和被膜型白念珠菌的研究发现,2

种形态白念珠菌中的脂质含量存在明显差异,而且脂筏与被膜的形成密切相关^[4];在微生物的传染性研究方面,对新加坡石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridoviruses)胞内代谢物的脂质组学研究表明,病毒的传染性与脂质有关^[5];在微生物耐药机制的研究方面,结果表明临床敏感和耐药的白念珠菌的比较脂质组学研究表明,脂质与耐药性的形成有关^[6]。因此,对脂质及其相互作用分子的研究,成为微生物领域的研究重点。

快速、高通量和高灵敏度分析方法的发展,特别是软电离和高分辨率质谱的应用,极大地促进了脂质组学在微生物领域的发展。

本文从脂质组学在微生物领域的研究方法和研究现状出发,对其在微生物领域的发展前景进行展望。

[收稿日期] 2013-08-30 **[接受日期]** 2014-11-02

[作者简介] 杨宇,硕士. E-mail: yangyulucky@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871261, E-mail: zzyzyfzhu@163.com

1 脂质的分类及其生物学功能

人们常将脂质定义为易溶于有机溶剂的疏水性分子,然而一些脂质如糖苷神经节鞘脂类不仅能溶解于有机溶剂还能溶解于水,因此根据溶解性来定义脂质显得不切实际^[7]。2003年由美国6所脂质实验室创立的“脂质代谢途径研究计划”(Lipid Metabolites and Pathways Strategy, LIPID MAPS)项目根据脂质的结构和性质将脂质定义为疏水性或两性小分子。其提出的脂质分类系统,将脂质分为八大类:脂肪酸类(fatty acids)、甘油酯类(glycerolipids)、甘油磷脂类(glycerophospholipids)、鞘脂类(sphingolipids)、固醇脂类(sterol lipids)、孕烯醇酮脂类(prenol lipids)、糖脂类(saccharolipids)、多聚乙炔类(polyketides)^[8]。

脂质结构的多样性赋予了脂质多种重要的生物学功能:(1)构成细胞膜的重要组成部分。很多生物学相关的脂质构成细胞膜的双分子层(主要由甘油磷脂、鞘脂和甾醇组成),而且脂质并不是均匀分布,如线粒体主要由心磷脂组成,内含体主要由磷酸肌醇和单酰/双酰甘油磷酸组成^[1]。(2)是多种细胞重要的能量来源。有些脂质既可氧化供能又可在能量过剩时储存能量进而促进代谢。如甘油三酯^[8]。(3)通过氧化代谢、调节能量及线粒体电子传递链来调控细胞功能^[8]。(4)充当信号分子,如磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸与膜转运和钙调节有关^[9];脂质与蛋白质相互作用形成脂筏,脂筏参与多种信号转导^[10]。

2 脂质组学在微生物领域的研究方法

2.1 样品的制备 根据相似相容原理,常用有机溶剂提取脂质。Guan等^[11]用95%乙醇:水:乙醚吡啶:氢氧化铵(15:15:5:1:0.018)提取酿酒酵母中的磷脂和鞘脂;Imbert等^[12]用氯仿:甲醇(2:1)提取杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*)中的总脂,进而比较三种离子化方法;最经典的提取方法是氯仿:甲醇(1:2)^[6,13-15]。尽管氯仿/甲醇法被认为是脂质提取的金标准,但近年来发现其存在一定的局限性:(1)氯仿是一种可疑的致癌物,甲醇能损害视神经;(2)氯仿密度大,脂质存在于下层氯仿相,提取脂质的同时易引入不溶性基质;(3)氯仿生成光气和盐酸,与不稳定脂质反应。为克服上述

缺点,有学者用甲基叔丁基醚(methyl-tert-butyl ether, MTBE)提取样品中的脂质,该方法简化了富集过程、提高了提取效率、降低了损失率,结果表明,用MTBE提取比脂质提取的“金标准”——氯仿/甲醇效果更好^[16]。

2.2 分析方法

2.2.1 质谱 离子化:近几年,质谱技术的提高极大地促进了脂质组学的发展,特别是软电离技术,如基质辅助激光解析(matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)和电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)。技术的发展使测定微量样品中的脂质组成为可能。MALDI是一种广泛用于蛋白质研究的离子化方法,现已成功应用于脂质分析^[9]。其优点是:(1)脂质及基质在有机溶剂中的溶解度越高,信噪比和重现性就越好;(2)与ESI相比, MALDI对盐的耐受能力强,适用于分析极性脂质,如磷脂^[17]。尽管MALDI和ESI是常用的离子化方法,其同时存在一些局限性,如:质荷比小的基质可干扰MALDI对样品的电离;一些脂质倾向于聚集在一起,可堵塞ESI的毛细管。为解决上述限制,用表面声波雾化(surface acoustic wave nebulization, SAWN)分析细菌中的脂多糖和磷脂。该电离方法可用于分析两性、不稳定和易聚集的脂质^[18]。Imbert等^[12]对3种离子化方法进行比较,表明大气压光电离(atmospheric pressure photoionization, APPI)比ESI、大气压化学电离(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)的定量限和检测限低,对非极性脂质和极性小的脂质的灵敏度高,如:磷脂酰肌醇、角鲨烯和溶血磷脂酰乙醇胺。

质量分析器:三重四级杆(triple quadrupole, 3Q)能产生大量的分子结构信息,成为脂质组学中常用的质量分析器。其有产物离子扫描(product-ion scan)、前体离子扫描(precursor-ion scan)、中性丢失扫描(neutral-loss scan)和选择反应监测(selected reaction monitoring)四种扫描模式,但其质量准确率和分辨率均不高^[19]。其他质量分析器,如飞行时间质谱(TOF)^[20]和离子阱质谱(Ion-Trap)^[21]准确率和分辨率均高,可用于确定脂质分子中的元素组成。

基于质谱的脂质分析策略包括“鸟枪法”脂质组学(shotgun lipidomics)和液相色谱-质谱联用技术

(a comprehensive lipidomics analysis by separation simplification, CLASS)。提取样品后,不经色谱分离直接进质谱分析即为“鸟枪法”脂质组学。Basconillo 等^[22]用该法分析根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)粗脂提取物中的8类脂质。该方法虽具有样品用量少和样品制备简单的优点,但由于离子抑制检测不到含量低和离子化不好的化合物。针对上述缺点,the LIPID MAPS 发展了一种先用色谱分离,再用质谱分析的脂质组学分析方法,即 CLASS。该方法的优点是降低离子抑制,从而提高对含量低和离子化不好的化合物的检测,缺点是前处理复杂、费时,且样品在色谱分离中有损失,所需样品量大^[19]。

2.2.2 色谱 薄层色谱(TLC):1960年以来,TLC已用于常规的脂质分析^[23]。Lattif 等^[4]用 TLC 分离粗脂提取物(极性脂质用二维 TLC 分离,非极性脂质用一维 TLC 分离),ESI-MS/MS 分析浮游型和被膜型白念珠菌的脂质轮廓研究表明,不同的生长阶段脂质成分存在明显差异。其中磷脂和鞘脂的含量,被膜型均比浮游型高。脂质在薄层板上易氧化,导致提取回收率低,不能用于高通量的脂质分析,而逐渐被其他的色谱方法取代^[24]。

气相色谱(GC):GC 适用于分析本身具有或经衍生化后具有挥发性和热稳定性的化合物。其常用于分析脂肪酸(fatty acid,FA)。有学者用2种衍生化方法(脂肪酸五氟苯甲基酯和脂肪酸甲代吡啶酯)对大肠杆菌(*E. coli*)细胞膜中的13种FAs定性(11种曾报道,其中2种环丙基FAs是*E. coli*特有的,另外2种是新发现的),同时发现棕榈酸含量最高。并用另外一种衍生化方法(脂肪酸甲酯)对其进行半定量分析^[13]。

高效液相色谱(HPLC):HPLC是一种常用的分离方法,包括正相色谱(根据脂质的类别分离)和反相色谱(根据脂质中脂肪酸的不同分离)。该法虽然前处理复杂,但因灵敏度高而成功用于脂质分析。Oursel 等^[25]用 RPLC-ESI-MSⁿ 分析 *E. coli* 细胞膜上的17种磷脂酰乙醇胺和13种磷脂酰甘油,并对其定量表明磷脂酰甘油是细胞膜的主要成分。

2.3 脂质组学研究的相关数据库 随着脂质组学的快速发展,越来越多的研究机构参与到脂质组学的研究中,促进了脂质的相关数据库的建立。数据

库包括脂质命名、脂质分类、脂质结构、质谱信息等。其中最大的数据库是 LIPID MAPS,除此之外,还有日本脂质数据库(Japanese Pendant LipidBank)、欧盟资助的 LipidomicNet 等^[1]。

3 脂质组学在微生物领域的研究现状

3.1 生物标志物的发现 微生物的多种应激反应伴随着紊乱的脂质代谢,因此脂类生物标志物的寻找对于微生物的研究具有重要意义。如微生物发酵产生乙醇,乙醇是一种可再生能源,可以用于应对目前所面临的能源危机,但酿酒酵母在发酵的过程中,产生的呋喃、苯酚和醋酸对该过程起抑制作用。对亲本菌(SC)和耐呋喃的菌(SCF)、耐苯酚的菌(SCP)、以及耐醋酸的菌(SCA)进行比较脂质组学研究,发现磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇和磷脂酸分别将 SC 与 SCF、SCP、SCA 区分,是这3种耐药菌的生物标志物^[26]。

3.2 药物靶点及新药研发中的应用 目前,已有诸多研究者以脂质代谢物及相关酶为研究对象寻找新的药物靶点,在新药研发中发挥重要作用。如环境含氧量低时,近平滑念珠菌 *C. parapsilosis* 被膜形成伴随 *FAs2* 基因上调^[27],针对这一现象,有学者观察 *FAs2* 敲除菌在外源性添加不同长链 FA 的生长状况,结果表明变异菌毒力明显下降,不能产生不饱和 FA、不能形成正常的生物被膜,同时可被巨噬细胞杀死,表明 *FAs* 可能是潜在的治疗靶标^[28]。脂质组学能提供微生物脂质及相关酶的变化情况,有助于阐述微生物相关的作用机制,对微生物领域的研究起重要意义。

白念珠菌被膜的形成给治疗带来极大的困扰。比较脂质组学研究表明,磷脂和鞘脂在被膜型白念珠菌中的含量明显高于浮游型白念珠菌,通过外加鞘脂代谢通路阻断剂多球壳菌素,进一步证实该通路在被膜形成中起关键作用^[4]。白念珠菌在氟康唑长期重复给药过程中产生了耐药性,对敏感菌和耐药菌的脂质组学研究表明,其脂质轮廓图存在明显差异,其中磷脂酰甘油降低,转录数据也证实了这一点,而磷脂酰甘油与线粒体功能有关,进一步研究表明线粒体功能受损、细胞壁缺陷,表明耐药机制与脂质代谢、线粒体功能和细胞壁完整性有关^[15]。另外,铁离子缺失可提高白念珠菌对药物的敏感性,但作

用机制并不清楚。用转录组学研究铁离子缺失菌,发现参与钙调神经磷酸酶信号通路的基因下调,同时涉及麦角甾醇和鞘脂合成的基因也下调。然后对其进行脂质组学研究发现总甾醇降低,总神经酰胺磷酸肌醇显著降低,表明铁离子缺失影响脂质代谢、即铁离子通过钙调神经磷酸酶信号通路及脂质代谢发挥作用^[14]。

正链 RNA 病毒利用宿主细胞膜完成其基因组复制。其具体的机制并不了解。转录组学研究表明,该病毒在感染或复制时,宿主细胞中参与脂质代谢的基因上调,脂质组学研究表明病毒 RNA 复制时,宿主磷脂显著变化,特别是磷脂酰胆碱(PC)。用靶标基因组学研究得到相似的结论,表明 PC 在病毒复制过程中发挥着重要作用,调节 PC 的合成可能是一种新的抗病毒方法^[29]。大量实验研究结果表明^[30],将基因组与脂质组联系起来,利用相关性和多变量等统计学方法研究不同状态下的脂质变化,有助于精确解析脂质作用机制和发现新的药物作用靶点。

3.3 发酵条件优化的机制研究 发酵过程中的乙醇产量对燃料酒精、酒以及其他酒精性饮料生产效率的影响非常重要。然而,乙醇浓度的增加可减缓糖向乙醇的转化。文献^[29]对 22 种乙醇耐受能力不同的工业酿酒酵母菌进行脂质组学研究,从而评价脂质与发酵动力学参数之间的关系。结果表明,脂质成分与乙醇浓度有关,是菌种乙醇耐受能力的指标,而且影响乙醇耐受能力的最大细胞浓度也与脂质相关。其中,乙醇产量不高的菌种与发酵早期较高水平的磷脂酰肌醇有关,而具有较高细胞浓度和乙醇产量的菌种与磷脂酰胆碱有关。

4 展 望

脂质组学自诞生以来得到了快速的发展,其在微生物领域的重要性逐渐引起大家的关注。与基因组学、蛋白质组学相比,脂质组学还处于发展阶段,同时仍面临着很多挑战,如脂质结构的多样性,没有统一的提取标准,会造成对结果解释的差异;生物信息学数据库的不完善;人们对脂质组学的重视程度还不够等。但脂质组学的巨大发展潜力是不容忽视的。随着新的技术方法在脂质研究中的应用,脂质组学的发展将会得到极大地促进,如成像质谱(imaging mass spectrometry, IMS)能对脂质定位,提供脂质的空间分布;氘交换质谱(deuterium exchange mass spectrometry, DXMS)是研究与脂质和细胞膜有关的蛋白质及酶的位置和方向的一个强大的工具^[18]。与此同时,将脂质组学数据与蛋白质组学和基因组学数据联系起来,覆盖整个系统生物学,能让我们进一步了解脂质的变化及其功能,为生物标志物的发现和药物的研发提供更好的平台,从而促进生命科学、医药领域的发展。

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

5 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] Wenk M R. Lipidomics: new tools and applications [J]. *Cell*, 2010, 143: 888-895.
- [2] Lagarde M, Geloën A, Record M, Vance D, Spener F. Lipidomics is emerging [J]. *Biochim Biophys Acta* 2003, 1634: 61.
- [3] Gaspar M L, Aregullin M A, Jesch S A, Nunez L R, Villa-Garcia M, Henry S A. The emergence of yeast lipidomics [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1771: 241-254.
- [4] Lattif A A, Mukherjee P K, Chandra J, Roth M R, Welti R, Rouabhia M, et al. Lipidomics of *Candida albicans* biofilms reveals phase-dependent production of phospholipid molecular classes and role for lipid rafts in biofilm formation [J]. *Microbiology*, 2011, 157: 3232-3242.
- [5] Wu J, Chan R, Wenk M R, Hew C L. Lipidomic study of intracellular Singapore grouper iridovirus [J]. *Virology*, 2010, 399: 248-256.
- [6] Singh A, Prasad R. Comparative lipidomics of azole sensitive and resistant clinical isolates of *Candida albicans* reveals unexpected diversity in molecular lipid imprints [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e19266.
- [7] Loizides-Mangold U. On the future of mass-spectrometry-based lipidomics [J]. *FEBS J*, 2013, 280: 2817-2829.
- [8] Gross R W, Han X. Lipidomics at the interface of structure and function in systems biology [J]. *Chem Biol*, 2011, 18: 284-291.
- [9] Wenk M R. The emerging field of lipidomics [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4: 594-610.
- [10] Simons K, Toomre D. lipid rafts and sign transduction [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1: 31-39.
- [11] Guan X L, Wenk M R. Mass spectrometry-based profi-

- ling of phospholipids and sphingolipids in extracts from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Yeast*, 2006, 23: 465-477.
- [12] Imbert L, Gaudin M, Libong D, Touboul D, Abreu S, Loiseau PM, et al. Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for a lipidomic analysis of *Leishmania donovani* [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1242: 75-83.
- [13] Oursel D, Loutelier-Bourhis C, Orange N, Chevalier S, Norris V, Lange C, et al. Identification and relative quantification of fatty acids in *Escherichia coli* membranes by gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21: 3229-3233.
- [14] Hameed S, Dhamgaye S, Singh A, Goswami S K, Prasad R. Calcineurin signaling and membrane lipid homeostasis regulates iron mediated multidrug resistance mechanisms in *Candida albicans* [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e18684.
- [15] Singh A, Yadav V, Prasad R. Comparative lipidomics in clinical isolates of *Candida albicans* reveal crosstalk between mitochondria, cell wall integrity and azole resistance [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e39812.
- [16] Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia T V, Shevchenko A, Schwudke D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics [J]. *J Lipid Res*, 2008, 49: 1137-1146.
- [17] Shu X, Li Y Y, Liang M, Yang B, Liu C G, Wang Y F, et al. Rapid lipid profiling of bacteria by online MALDI-TOF mass spectrometry [J]. *Int J Mass Spectrom*, 2012, 321-322: 71-76.
- [18] Yoon S H, Huang Y, Edgar J S, Ting Y S, Heron S R, Kao Y, et al. Surface acoustic wave nebulization facilitating lipid mass spectrometric analysis [J]. *Anal Chem*, 2012, 84: 6530-6537.
- [19] Harkewicz R, Dennis E A. Applications of mass spectrometry to lipids and membranes [J]. *Annu Rev Biochem*, 2011, 80: 301-325.
- [20] Yichoy M, Nakayasu E S, Shpak M, Aguilar C, Aley S B, Almeida I C, et al. Lipidomic analysis reveals that phosphatidylglycerol and phosphatidylethanolamine are newly generated phospholipids in an early-divergent protozoan, *Giardia lamblia* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2009, 165: 67-78.
- [21] Xu R J, Qiao B, Li B Z, Lu H, Chen Y, Yuan Y J, et al. Comparative lipidomic analysis of *Cephalosporium acremonium* insights into industrial and pilot fermentations [J]. *Biotechnol Bioproc E*, 2012, 17: 259-269.
- [22] Basconcello L S, Zaheer R, Finan T M, McCarry B E. A shotgun lipidomics approach in *Sinorhizobium meliloti* as a tool in functional genomics [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50: 1120-1132.
- [23] Bennett R D, Heftmann E. Thin-layer chromatography of sterols [J]. *J Chromatogr*, 1962, 9: 359-362.
- [24] Peterson B L, Cummings B S. A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples [J]. *Biomed Chromatogr*, 2006, 20: 227-243.
- [25] Oursel D, Loutelier-Bourhis C, Orange N, Chevalier S, Norris V, Lange C M. Lipid composition of membranes of *Escherichia coli* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using negative electrospray ionization [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21: 1721-1728.
- [26] Xia J M, Yuan Y J. Comparative lipidomics of four strains of *Saccharomyces cerevisiae* reveals different responses to furfural, phenol, and acetic acid [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 99-108.
- [27] Rossignol T, Ding C, Guida A, d'Enfert C, Higgins D G, Butler G. Correlation between biofilm formation and the hypoxic response in *Candida parapsilosis* [J]. *Eukaryot Cell*, 2009, 8: 550-559.
- [28] Nguyen L N, Trofa D, Nosanchuk J D. Fatty acid synthase impacts the pathobiology of *Candida parapsilosis* *in vitro* and during mammalian infection [J]. *PLoS One*, 2009, 4: e8421.
- [29] Castorena K M, Stapleford K A, Miller D J. Complementary transcriptomic, lipidomic, and targeted functional genetic analyses in cultured *Drosophila* cells highlight the role of glycerophospholipid metabolism in Flock House virus RNA replication [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 183.
- [30] Cowart L A, Hannun Y A. Using genomic and lipidomics strategies to investigate sphingolipid function in the yeast heat-press response [J]. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33: 1166-1169.