

非靶向脂质组学揭示巨噬细胞泡沫化进程 脂质代谢功能失调

汪增钰, 刘宝红, 乔亮, 林灵

(复旦大学化学系, 附属中山医院, 上海 200000)

摘要 动脉粥样硬化是一种多因素驱动的慢性复杂性疾病, 主要特征为动脉内壁的脂质积累、炎症反应以及最终的纤维斑块形成。斑块的形成始于异常累积的脂质被动脉壁内的巨噬细胞吞噬, 形成所谓的泡沫细胞。尽管泡沫细胞的形成在血管病理性重塑进程中扮演着核心角色, 但目前对巨噬细胞泡沫化进程中脂质代谢紊乱的深入研究还相对欠缺。本文构建并优化了脂质组学分析流程, 并将该流程用于巨噬细胞泡沫化进程中的代谢重编程分析, 共鉴定到 16 个脂质亚类的 645 个脂质分子。使用主成分分析、时间序列模式分析和火山图分析, 揭示了不同时期的泡沫细胞脂质水平存在显著差异。随着氧化低密度脂蛋白孵育时间延长, 泡沫细胞脂质代谢失调程度增加, 脂质亚类中甘油三酯、溶血磷脂、醚磷脂水平上调, 而磷脂酰丝氨酸水平下调。甘油三酯的显著累积增强了巨噬细胞的炎症反应, 通过进一步吞噬氧化低密度脂蛋白促进了泡沫细胞的形成; 同时, 磷脂酰丝氨酸和溶血磷脂酰胆碱在泡沫细胞晚期合成显著增加, 表明泡沫化进程与细胞凋亡正相关, 这些脂质分子可能作为信号分子趋化巨噬细胞对凋亡细胞的清除。本文不仅揭示了巨噬细胞在泡沫化进程中炎症反应的显著上调, 还阐明了脂质代谢紊乱与细胞凋亡信号传递之间的紧密联系。

关键词 巨噬细胞; 泡沫化; 脂质组学; 炎症反应; 细胞凋亡

中图分类号 O657

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240053

Untargeted Lipidomics Reveals Lipid Metabolism Dysfunction During Macrophage Foaming

WANG Zengyu, LIU Baohong, QIAO Liang*, LIN Ling*

(Department of Chemistry, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200000, China)

Abstract Atherosclerosis is a multifactorial chronic complex disease characterized by the accumulation of lipids, inflammatory responses, and ultimately fibrous plaque formation within arterial walls. Plaque formation begins with the abnormal accumulation of lipids engulfed by macrophages within arterial walls, forming so-called foam cells. Despite the pivotal role of foam cell formation in the pathophysiological remodeling process of blood vessels, in-depth research into lipid metabolism disturbances during macrophage foam cell formation is still relatively lacking. In this study, we constructed and optimized a lipidomics analysis workflow, applying it to analyzing metabolic reprogramming during macrophage foam cell formation. A total of 645 lipid molecules belonging to 16 lipid subclasses were identified. Principal component analysis, time-series pattern analysis, and volcano plot analysis revealed significant differences in lipid levels at different stages of foam cell formation. As incubation time with oxidized low-density lipoprotein increased, the degree of lipid metabolism dysfunction in foam cells increased. Triglycerides, hemolytic phospholipids, and ether phospholipids were upregulated, while phosphatidylserine was downregulated. The

收稿日期: 2024-01-29. 网络首发日期: 2024-04-12.

联系人简介: 林灵, 女, 博士, 副研究员, 主要从事疾病多组学方面的研究. E-mail: linglin@fudan.edu.cn

乔亮, 男, 博士, 研究员, 主要从事基于生物质谱的多组学研究. E-mail: liang_qiao@fudan.edu.cn

基金项目: 福建省自然科学基金(批准号: 2021D029)资助.

Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province, China(No.2021D029).

significant accumulation of triglycerides enhanced the inflammatory response of macrophages, promoting foam cell formation by further engulfing oxidized low-density lipoprotein. Meanwhile, the synthesis of phosphatidylserine and hemolytic phosphatidylcholine increased significantly in the late stages of foam cell formation, indicating a positive correlation between foam cell formation and cell apoptosis. These lipid molecules may serve as signaling molecules to attract macrophages for the clearance of apoptotic cells. This study not only reveals the significant upregulation of inflammatory responses during foam cell formation but also elucidates the close connection between lipid metabolism disturbances and cell apoptosis signaling.

Keywords Macrophage; Cell foaming; Lipidomics; Inflammation; Apoptosis

心血管疾病已成为全球首位死亡原因,其主要基础是动脉粥样硬化。动脉粥样硬化主要指血管内的斑块沉积,导致动脉壁变硬变厚。目前,有大量研究关注斑块的成因及其形成过程,斑块形成的一个重要原因是血管内皮下泡沫细胞的积聚。这些泡沫细胞主要由吞噬了氧化低密度脂蛋白(Oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)的巨噬细胞转化而来,随着病变进展,积聚的泡沫细胞会发生凋亡和坏死,其细胞外的脂质蓄积形成了斑块中的坏死核心。当斑块发生破裂或撕裂时,血液中的凝血因子与斑块内暴露的成分接触,可能触发血栓形成,导致心肌梗死或脑卒中等急性心脑血管事件发生^[1]。

目前认为巨噬细胞和平滑肌细胞对泡沫细胞的形成具有贡献,脂蛋白(特别是 ox-LDL)对血管内皮细胞的损伤是动脉粥样硬化的重要环节。这种损伤促进单核细胞被招募到血管内皮下,并分化成可以吞噬修饰脂蛋白的巨噬细胞。泡沫细胞主要由吞噬了 ox-LDL 的巨噬细胞转化而来。巨噬细胞吞噬的 ox-LDL 经溶酶体水解成为游离胆固醇和游离脂肪酸,脂肪酸被重新酯化形成胆固醇酯储存在脂滴中。巨噬细胞脂质代谢失调会导致泡沫细胞的形成,细胞中过量积聚的胆固醇将启动炎症细胞因子的产生和细胞凋亡途径。晚期病变中,凋亡细胞的清除存在缺陷,从而导致凋亡细胞的继发性坏死。有研究报道,抑制细胞凋亡并非减缓病变进程的方法,相反有促动脉粥样硬化作用^[2];而减缓动脉粥样硬化关键在于凋亡细胞的清除^[3]。巨噬细胞清除低密度脂蛋白的同时会通过吞噬作用清除凋亡细胞,巨噬细胞通过“吃我(eat me)”信号趋向凋亡细胞,凋亡细胞释放的核苷酸可激活巨噬细胞的增殖,对抑制动脉粥样硬化进程有重要作用^[4]。

脂质在生命活动中发挥着重要作用,是构成细胞膜和细胞器膜结构的主要组成部分,脂质还参与细胞的能量存储和多种细胞信号传导。脂质分子的复杂性主要来自于其头基和脂肪酸链的多样性:脂质的头基决定了脂质的种类和功能,可以具有多种不同的化学结构,如磷酸、胆碱、肌醇和甘油等;其脂肪酸链长度(短链、中链和长链)、不饱和程度(饱和、单不饱和、多不饱和脂肪酸)以及分支(直链或支链)的不同进一步增加了脂质的多样性和复杂性。这些差异影响脂质的物理和化学性质,并且给脂质的功能研究和数据解析带来了诸多高难度挑战。

脂质组学着眼于全面而系统地分析生物样本中的脂质,预测生物分子在与其相互作用过程中的改变,进而研究脂质代谢网络和动态调控在各种生命现象中的作用规律^[5]。近十年脂质组学发展迅速,使高通量解析复杂体系脂质分子种类成为可能,目前可以鉴定到数百种脂质种类^[6]。高灵敏质谱技术的进步极大地推动了脂质组学的发展,基于质谱的脂质组学根据是否预分离可以分为鸟枪法脂质组学(Shotgun lipidomics)和基于液相色谱的脂质组学(LC-based lipidomics)。相比于鸟枪法,基于色谱的脂质组学提供了脂质保留时间维度信息,并且可以通过定量结构保留关系(Quantitative structure retention relationship, QSRR)和等价碳数(Equivalent carbon number, ECN)对保留时间建模预测,色谱分离还降低了质谱分析母离子的复杂度。脂质组学的发展也离不开质谱解析方法的开发,LIPID MAPS收录了一系列 MS 脂质数据解析工具(包括 MS-DIAL^[7], Lipid Data Analyzer^[8], LipidFinder^[9]和 MZmine^[10]等)以及数据整合方案^[11]。同时,LIPID MAPS 是使用最广泛的数据库,其中 LIPID MAPS 结构数据库(LMSD)包含 47000 种脂质,整合了实验鉴定结果、其它数据库、文献报道和预测的结构。然而,相比于蛋白质分子,人们对脂质分子的生物学功能所知甚少,目前也缺少脂质分子功能注释的分析工具。

脂质作为中心法则的下游分子,是重要的生物标志物。脂质组学为动脉粥样硬化研究提供了新维

度的信息, 已有大量关于患者血浆和斑块组织脂质组学的研究报道^[12]. 但动脉粥样硬化中巨噬细胞的脂质组学仍需要进一步表征, 其不同环境下的脂质组成与变化仍然未知. 在方法学上, 本文建立了用于巨噬细胞泡沫化模型的液相色谱-质谱联用的非靶向脂质组学方法, 优化了脂质碎裂能量以及色谱条件, 确保了非靶向脂质组学分析的覆盖范围、灵敏度和重复性. 进而将优化的脂质组学分析流程用于探索巨噬细胞泡沫化进程中脂质代谢重编程这一关键科学问题, 检测了脂质分子的亚类在泡沫化进程中的时序变化, 并量化了泡沫细胞中数百种分子种类. 分析结果揭示了巨噬细胞泡沫化过程中炎症响应和凋亡信号传递的分子机制, 以期巨噬细胞泡沫化过程中的脂质介导炎症响应和凋亡信号的传递机制提供了新的见解.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

人单核细胞 THP-1 细胞株, 中国科学院细胞库; 氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL), 上海昂羽生物技术有限公司; RPMI 1640 培养基、青霉素-链霉素(PS)、 β -巯基乙醇(BME)和胰蛋白酶(Trypsin-EDTA), 美国 Thermo Fisher 公司; 胎牛血清(FBS), 中国 ExCell 公司; 磷酸盐缓冲液(PBS)、EBSS 缓冲盐溶液和 4% 组织细胞固定液, 北京索莱宝科技有限公司; 油红 O-苏木紫染料, 南京建成生物工程研究所有限公司; 甲基叔丁基醚(MTBE), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 甲醇(MeOH)和异丙醇(IPA), 色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司; 乙腈(ACN)和乙酸铵, LC-MS 纯, 德国 Merck 公司; 佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯(PMA), 德国 Merck 公司; 脂质内标 SPLASH[®] LIPIDOMIX[®] Mass Spec Standard, 美国 Avanti 公司.

XBridge BEH 氨基色谱柱(150 mm \times 2.1 mm, 3.5 μ m), 美国 Waters 公司; LC-20AD 型高效液相色谱, 日本岛津公司; Triple TOF[™] 4600 型质谱仪, 美国 AB SCIEX 公司.

1.2 实验过程

1.2.1 细胞培养与模型构建 对人单核 THP-1 细胞使用 RPMI 1640 培养基(10% FBS+1% PS+0.05 mmol/L BME)于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的潮湿气氛中培养, 取 5~12 代对数生长期细胞进行实验. 将细胞接种于六孔板中, 每组 2 \times 10⁶ 个细胞, 用含有 200 ng PMA 的培养基(RPMI 1640+10% FBS)诱导细胞分化为巨噬细胞, 在 EBSS 缓冲液中饥饿 12 h, 再用含有 50 μ g/mL ox-LDL 的培养基(RPMI 1640+2% FBS)诱导巨噬细胞成为泡沫细胞. 实验设置 4 组, 分别为对照组(C1~C6)、泡沫化早期组(E1~E6)、泡沫化中期组(M1~M6)和泡沫化晚期组(L1~L6), 每组设置 6 个生物学重复. 3 个时期的泡沫化细胞分别对应 24, 48 和 72 h 的 ox-LDL 孵育时间, 对照组加入等量空白培养基. 用胰蛋白酶消化, 以 800g 转速离心 3 min 收获细胞, 用 PBS 缓冲液清洗细胞沉淀 2 次, 收获细胞沉淀待后续处理.

1.2.2 细胞油红 O 染色 将细胞用 4% 甲醛固定, 并根据制造商的说明书用油红 O 和苏木素染色试剂盒染色. 首先使用油红 O 染色 10 min, 用蒸馏水清洗 30 s; 再用苏木素染色 3 min, 用 60% 异丙醇脱色 10 s, 重复 3 次. 加热封固剂至 60 $^{\circ}$ C, 封片. 在光学显微镜下拍照, 每组样品做 6 次生物学重复, 每个重复选取 3 张显微镜照片, 使用 ImageJ 软件进行图片统计学分析.

1.2.3 细胞脂质提取 方法优化实验中比较了 3 种脂质提取方法, 每种方法的初始材料为 2 \times 10⁶ 个未经处理的 THP-1 细胞, 用 PBS 缓冲液清洗 3 次后进行 4 次技术重复. 其中, 改进的 Bligh-Dyer 方法如下: 每个样品中加入 625 μ L 甲醇-氯仿-甲酸混合溶剂(体积比 10:10:1), 与 1 μ L 脂质内标 SPLASH[®] LIPIDOMIX[®] 混合均匀; 再加入 275 μ L 0.2 mol/L 的磷酸和 1 mol/L 氯化钾水溶液, 充分混合均匀后置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜提取. 将混合溶液以 1000g 转速离心 5 min, 收集有机层(下层), 用氮气蒸干溶液. MTBE 方法如下: 每个样品中加入 900 μ L 甲醇-MTBE-水混合溶剂(体积比 4:5:5), 与 1 μ L 脂质内标 SPLASH[®] LIPIDOMIX[®] 涡旋混合均匀, 置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜提取. 将混合溶液以 1000g 转速离心 5 min, 收集有机层(上层), 用氮气蒸干溶液. MMI(MeOH, MTBE, IPA)方法具体见下文, 前两种方法使用相同内标进行后续处理.

实验采用单相法提取细胞脂质. 向收获的细胞沉淀中立即加入 500 μL 0 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的脂质提取溶剂 MMIPA (MeOH/MTBE/IPA 体积比 4:3:3). 每个样品中加入 1 μL 脂质内标 SPLASH[®] LIPIDOMIX[®] 涡旋 30 s, 置于冰上超声 1 min, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置过夜. 将混合溶液以 3500g 转速离心 10 min, 取上层清液真空离心抽干, 储存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中待分析. 分析前将样品用 100 μL 溶剂 (ACN/IPA/H₂O 体积比 2:2:1) 复溶, 超声 1 min, 以 12000g 转速离心 20 min, 取 90 μL 上层清液放入样品瓶中, 乱序上机.

1.2.4 液相色谱-质谱分析 使用岛津高效液相色谱 (LC-20AD) 与四极杆-飞行时间质谱 (Triple TOF 46000) LC-MS 联用系统进行非靶向脂质组学分析. 使用 Waters XBridge BEH Amide 酰胺色谱柱 (150 mm \times 2.1 mm, 3.5 μm) 进行液相色谱分离. 流动相 A 为 95% 乙腈-水溶液, 流动相 B 为 50% 乙腈-水溶液, A, B 两相均加入 10 mmol/L 甲酸铵. 色谱梯度: 0~6.2 min, 0.1%~20%B; 6.2~15.4 min, 20%~80%B; 15.4~15.7 min, 80%~0.1%B; 15.7~24.7 min, 0.1%B; 平衡时间 12.5 min, 流速 0.3 mL/min. 质谱数据分别采用正负离子模式采集. 对于正离子模式, 离子源雾化气 Gas 1 和 Gas 2 设置为 50 psi (1 psi=6.895 kPa), 气帘气设置为 35 psi, 离子喷雾电压设置为 5 kV. 对于负离子模式, 电压设置为 -5 kV. 碰撞能量设为 40 eV (正离子模式) 和 30 eV (负离子模式), 在 m/z 150~1800 范围内对离子进行全扫描, 采用数据依赖采集模式 (Information dependent acquisition), 采集 1 张一级谱图后至多采集 10 张二级谱图, 循环时间为 1.3 s, 上样量为 2 μL .

1.2.5 脂质组学数据分析 质谱数据使用 MSConvert 软件转换成 mzXML 文件, 使用 XCMS (版本 3.99) R 包进行一级质谱图峰检测, 峰检测与保留时间校正获得质谱特征矩阵, 包括保留时间、质荷比与峰强度信息. 再次使用 MSConvert 转换质谱数据为 MGF 文件, 与峰强度矩阵上传至在线工具 Lipid4D Analyzer (<http://lipid4danalyzer.zhulab.cn/>) 进行脂质鉴定. 对 XCMS 提取的总离子流强度进行归一化后, 用脂质内标再次进行归一化. 使用 MetaboAnalyst 软件 (版本 5.0) (<http://www.metaboanalyst.ca>) 进行统计学分析, 包括主成分分析 (PCA) 和单因素方差分析 (ANOVA). 使用单因素方差分析筛选多组差异脂质, 设置阈值 $p < 0.05$. 使用 R 包 Mfuzz (版本: 2.60) 对脂质进行时序分析. 使用 Lipidmaps 在线工具 BioPAN (<https://www.lipidmaps.org/biopan>) 进行脂质通路富集分析.

2 结果与讨论

2.1 THP-1 诱导分化巨噬细胞及其分化的泡沫细胞形态变化

动脉粥样硬化是由多因素共同驱动的复杂疾病, 从多个角度对其进行研究尤为重要. 本文聚焦于泡沫细胞形成的关键参与者——巨噬细胞. 为深入理解巨噬细胞在动脉粥样硬化进程中的作用, 本文参照文献 [13] 方法建立了一套体外细胞模型. 采用人类单核细胞系 THP-1 作为模型细胞, 采用佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯 (PMA) 诱导其分化为巨噬细胞样细胞, 分化后的细胞从悬浮生长状态转变为单层贴壁附着在培养皿底部, 并停止增殖. 而后, 采用 ox-LDL 诱导巨噬细胞向泡沫细胞分化, 以 24, 48 和 72 h 来模拟早期、中期和晚期泡沫细胞. 经油红 O/苏木素染色后清晰可见呈红色的脂滴颗粒, 而细胞核呈蓝紫色, 以此证明泡沫细胞模型的构建. 染色结果 [图 1(A)] 显示, ox-LDL 孵育 24 h 后脂滴在巨噬细胞中呈现明显的聚集, 表明早期泡沫细胞的形成. 用 ImageJ 软件对染色图像进行脂滴的相对面积分析 [图 1(B)], 结果表明, 随着孵育时间的累积, 72 h 组脂滴面积接近 24 h 组泡沫细胞的 2 倍, 早、中、晚期泡沫细胞中的脂滴蓄积与对照组巨噬细胞均存在显著差异 (方差分析 $P < 0.05$).

2.2 泡沫细胞形成不同阶段的脂质组学变化

首先对非靶向脂质组学提取方法进行了优化. 比较了 3 种脂质提取方法: Bligh-Dyer 法^[14]、MTBE 法^[15]与 MMI 法^[16]. Bligh-Dyer 方法被认为是脂质提取的金标准, 该方法使用氯仿、甲醇与水组成的两相溶剂. 氯仿层富含脂质位于下层, 且蛋白质等杂质沉淀位于两相之间, 分离步骤较为繁杂. MTBE 方法提取的脂质位于水相上层的 MTBE 层, 且蛋白等杂质沉淀位于离心管底部, 可以通过离心去除. 近年来已开发了单相提取方法用于非靶向脂质组学研究, 本文选用甲醇、MTBE 和异丙醇混合溶剂进行提取, 简称 MMI 法. 3 种方法对于脂质内标的响应水平示于图 2. 可见, MMI 法在 8 种内标脂质中均具有

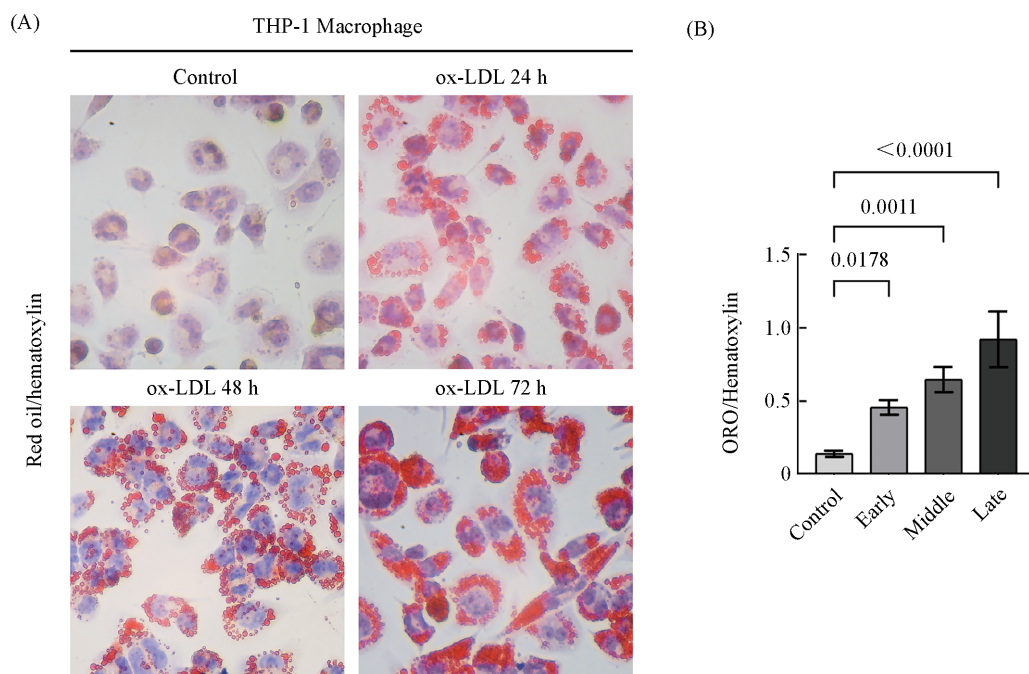


Fig. 1 Red oil O/hematoxylin staining of early(ox-LDL 24 h), middle(ox-LDL 48 h), late(ox-LDL 72 h) stage of foam cells and THP-1 macrophage(Control)(A) and statistical analysis of staining results(B)

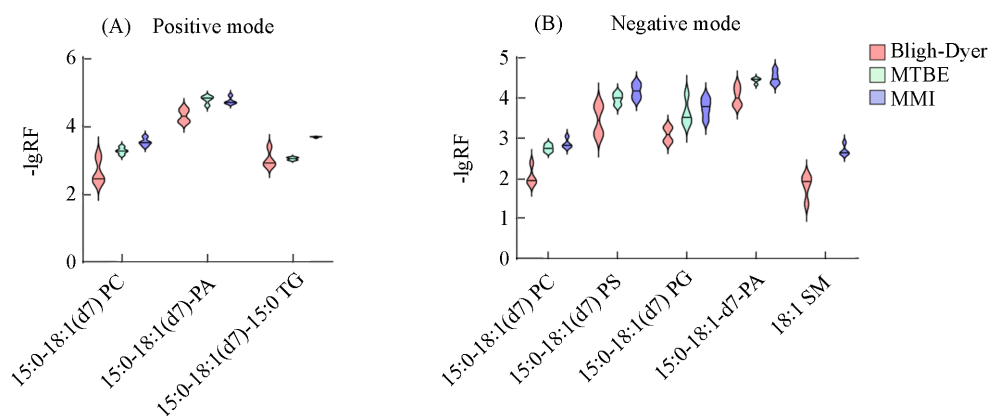


Fig. 2 Response values of lipid internal standards in positive ion mode(A) and negative ion mode(B) for the three methods, with 4 technical replicates for each method(RF=area/concentration)

较好的响应值与重现性. 此方法操作简便, 使用相对安全的溶剂替代氯仿. 此外, 当样本量较小时, 两相法的两层液面高度都较小, 实验操作上较困难, 容易引入杂质, 且需要较高的操作精度来保证较高的重现性. 而MMI法仅需离心提取上层清液进行后续分析, 操作简便, 适用于小样本量(如 1×10^7 以下的细胞样本、细胞器样本等)的非靶向脂质分析. 此外, 对质谱参数与色谱梯度进行了优化, 优化后的参数见1.2.4节液相色谱-质谱分析部分, 确保了非靶向脂质组学分析的覆盖范围、灵敏度和重复性.

收集不同时期的泡沫细胞进行非靶向脂质组学分析. 在巨噬细胞对照组和泡沫细胞早期、中期、晚期4组样品中共鉴定到645种脂质分子并获得其定量值. 脂质鉴定结果如图3所示, 包括3个脂质大类和16个脂质亚类. 其中, 甘油磷脂类包括磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰甘油(PG)、磷脂酸(PA)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰丝氨酸(PS)、溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)、溶血磷脂酰胆碱(LPC)和溶血磷脂酰肌醇(LPI); 以鞘氨醇为骨架的鞘脂包括鞘磷脂(SM)、己糖神经酰胺(HexCer)、神经酰胺(Cer)、乳糖神经酰胺(LacCer)和鞘氨醇(Sph); 甘油酯类包括甘油三酯(TG)和甘油二酯(DG). 从选用的脂质内标 SPLASH® LIPIDOMIX® Mass Spec Standard 中共鉴定到6种脂质分子: PC (33:1),

PE(33:1), PG(33:1), PS(33:1), SM(d36:2)和TG(48:1), 进一步使用这6种脂质分子进行内标归一化和保留时间的质量控制. 脂质组学鉴定结果中含量超过总磷脂50%的PC和PE是细胞膜中最丰富的脂质, 两者的比例对细胞膜物理性质(如膜流动性和弯曲性)以及膜蛋白功能有重要影响^[17].

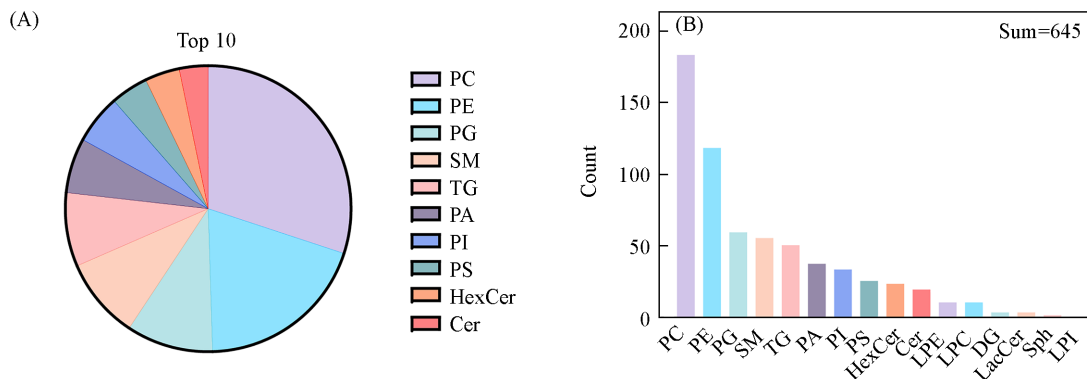


Fig. 3 Distribution of lipid species of top 10 lipid classes identified from four groups of foam cells as well as macrophage(A) and the number of identified lipid species in each lipid class(B)

主成分分析(PCA)结果[图4(A)]显示, 泡沫细胞显著区别于对照组, 早期和晚期泡沫细胞可以区分, 中期泡沫细胞与早、晚期泡沫细胞之间有一定重叠. 上述结果与实验设计相符. 使用单因素方差分析(ANOVA)筛选差异脂质[图4(B)], 设置 P 值阈值为0.05, 结果显示在对照组、早期、中期和晚期组泡沫细胞中有311个脂质的含量在至少两组间发生了显著变化, 占总鉴定数的48%. 311个差异脂质中包括早期泡沫细胞组相对对照组的124个差异脂质、中期泡沫细胞组相对对照组的171个差异脂质以及晚期泡沫细胞组相对对照组的160个差异脂质. 其中, 98个脂质在3个实验组中相对对照组都有显著性差异, 早期、中期与晚期组分别有3, 22与22个独特的差异脂质[图4(C)].

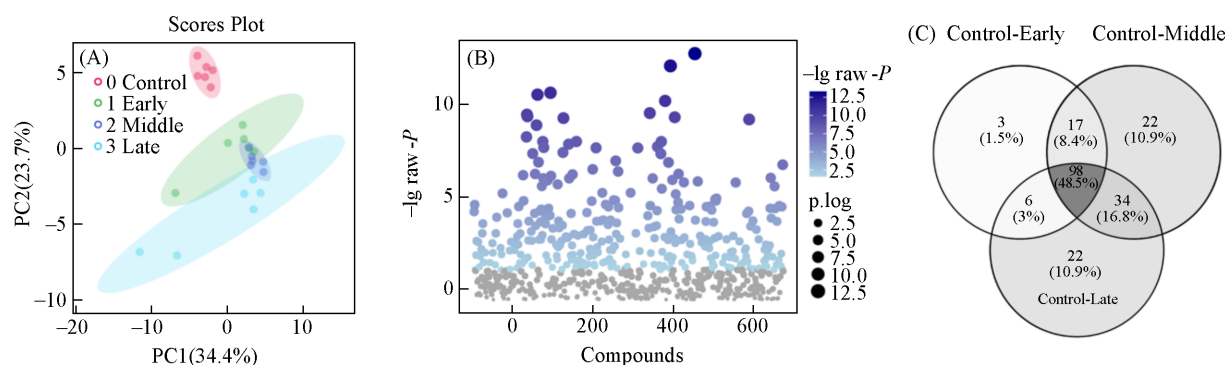


Fig. 4 Overview of lipidomics data

(A) Principal component analysis of foam cell lipidomics data in the control group, early group, middle group, and late group; (B) one-way ANOVA for screening differential lipids; (C) venn diagram of the number of differential lipids between each experimental group and the control group based on one-way analysis of variance.

使用筛选出的差异脂质进行时序分析. Mfuzz 聚类结果显示, 4个时间点间变化趋势可大致分为4个簇: 持续下调、持续上调、上调后趋于稳定与上调后下调. 实验中分别统计了4个簇的脂质组成, 取数量前5的脂质类别绘于图5中. PC在每一个簇中都有大量富集且PC为膜结构的主要成分, 可能与巨噬细胞形态改变有关; 同时每个簇中也存在一些特征脂质. 其中, TG总体主要体现为上调, 在簇2, 3和4中富集, 其中在簇3中占比25.35%. TG是体内最主要的能量存储形式之一: 机体需要能量时, TG在脂肪组织中被水解为甘油和脂肪酸, 脂肪酸随后被运输至线粒体内进行脂肪酸 β 氧化(FAO). FAO是一系列酶促反应的过程, 脂肪酸在此过程中被逐步分解, 产生乙酰辅酶A(Acetyl-CoA), 后者进入三羧酸循环(TCA)进一步氧化, 产生大量ATP为细胞供能. Pearce团队通过实验证实泡沫细胞中促炎信

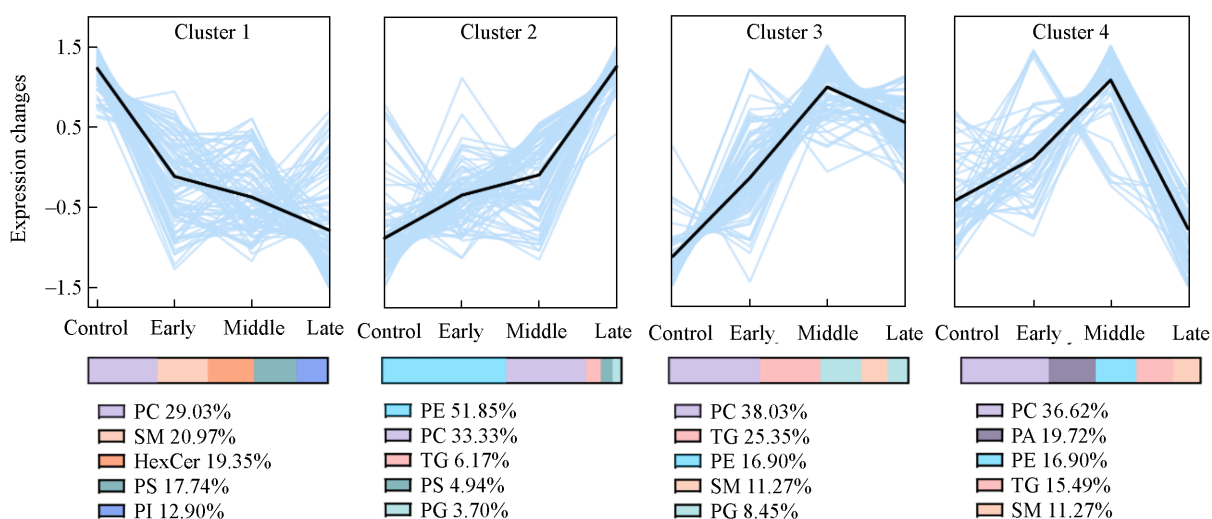


Fig. 5 Mfuzz clustering of significant changed lipid species and the top 5 lipid classes enriched in each cluster

号会导致细胞FAO减少、TG合成增加，这与本文泡沫化进程介导TG含量显著上调的结果一致^[18]，TG的合成会增强巨噬细胞炎症反应^[19]。值得注意的是，与炎症相关的鞘脂HexCer和SM在泡沫化进程中主要体现为下调，在簇1中HexCer占比19.35%，SM占比20.37%。

进一步探究了脂质分子水平的变化，分别绘制了3个时期的泡沫细胞相较于巨噬细胞的火山图。由图6可见，存在大量上调脂质(早期92个，中期149个，晚期139个)，其中66个为3个时期共同上调的脂质，包括大量的甘油三酯，如TG(46:3)，TG(50:4)和TG(48:3)等。晚期泡沫细胞比中期有更多的醚磷脂上调，如PE(O-36:3)和PE(P-38:2)等。醚磷脂(ether phospholipids)是一类特殊的磷脂，至少有一条脂肪酸链不是通过常见的酯键，而是通过醚键与甘油骨架相连。与酯键相比，醚键在化学上更稳定，致使醚磷脂在氧化应激等情况下比普通的磷脂更具抵抗性^[20]。图6(C)鉴定到的醚磷脂拥有更多

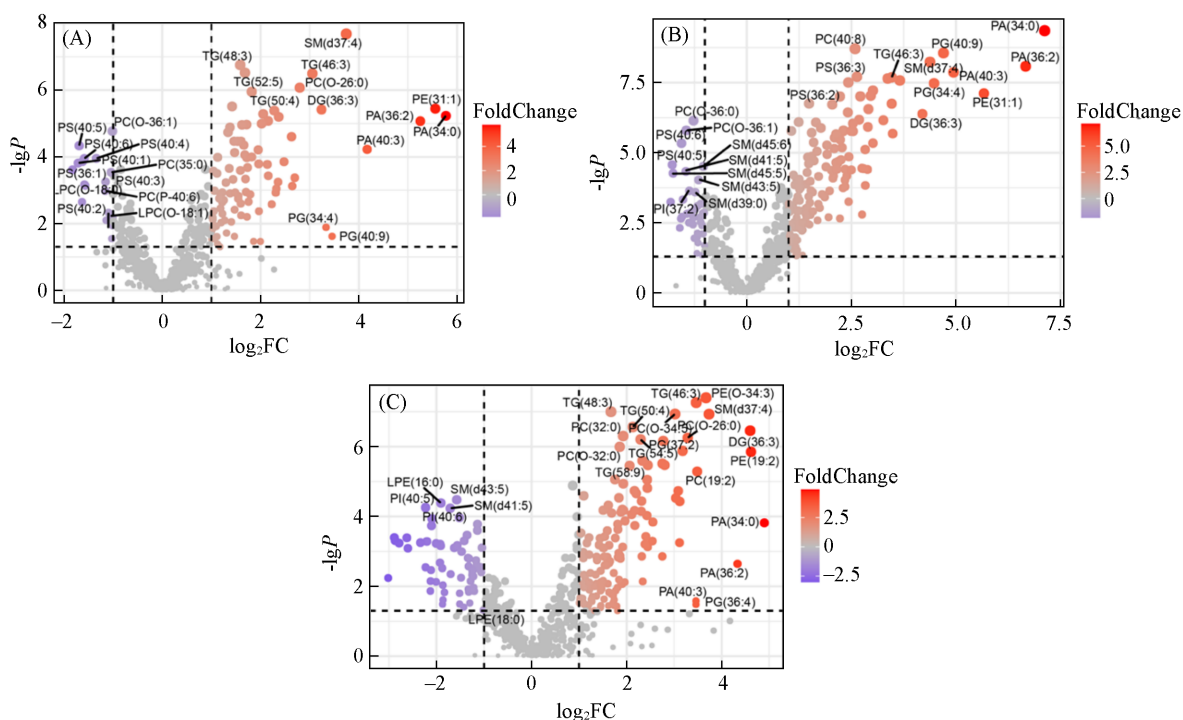


Fig. 6 Volcano plot of early(A), middle(B) and late(C) stage of foam cell compared to macrophage (FC>2 or <0.5, P<0.05)

的不饱和脂肪酸,多不饱和脂肪酸可作为脂质过氧化的底物,增加铁死亡敏感性^[21].而下调的脂质数目由早期的19个增长到晚期的65个,早期主要体现为PS的下调,晚期主要体现为SM的下调.在细胞凋亡的早期阶段,PS暴露在细胞膜外侧,是经典的“吃我”信号^[22].鞘磷脂SM是细胞中最丰富的鞘脂,在形成和维持细胞膜的脂筏(Lipid rafts)方面扮演着关键角色.脂筏是细胞膜上的微小区域,富含胆固醇和SM,能够有效调控信号转导以及膜蛋白的排序和运输;脂筏还在病原体入侵的过程中扮演着复杂而双面的角色^[23].SM在脂筏中的存在影响着细胞膜的微环境,Aramaki等^[24]发现脂筏中的鞘脂参与诱导巨噬细胞凋亡的活性氧(ROS)生成.文献^[25]报道了鞘脂在巨噬细胞吞噬凋亡细胞中的作用.SM通过鞘磷脂酶水解产生神经酰胺Cer,参与细胞信号传导;Cer经神经酰胺酶脱酰产生鞘氨醇Sph.SM的下调可能提示其水解产生的Cer作为第二信使调控细胞凋亡,但Cer在质膜上合成,在细胞外环境释放,细胞内Cer的浓度在实验中并未发生显著性变化.

2.3 泡沫细胞脂质通路分析

进一步使用BioPAN对早期和晚期泡沫细胞进行脂质反应分析和通路分析,共覆盖到364种鉴定到的脂质分子(图7).该分析建立了已有知识与脂质定量结果之间的映射.节点形状表示脂质亚类,节点颜色代表通路状态;两个节点之间的箭头表示两种脂质之间的反应方向,箭头颜色取决于反应.重点关注了晚期泡沫细胞的通路转变,图7显示了DG到TG转化通路的激活和TG到DG转化通路的抑制,TG的胞内蓄积介导了巨噬细胞泡沫化进程.醚磷脂反应链(O-PE→O-LPE, Z-score=2.41)和溶血磷脂反应链(PC→LPC, Z-score=1.854, PE→LPE, Z-score=2.561, PI→LPI, Z-score=1.957)被激活,上调了溶血磷脂含量,加速了脂肪酸链的水解.同时,LPC作为凋亡细胞“找到我(Find me)”信号,对于调节巨噬细胞吞噬凋亡细胞的过程至关重要.这些脂质通路的改变指示晚期泡沫细胞的功能失调,并可能预示着细胞凋亡的发生.早期与晚期泡沫细胞有相似的通路激活或抑制状态,不同之处在于:晚期组体现了PI→LPI与O-PE→O-LPE通路更强的激活,即溶血磷脂的进一步激活;早期具有更强的PS合成,对应早期凋亡状态的PS在细胞膜的外翻;PC→PA通路由早期的抑制转向晚期的激活,即PC水解通路的激活.而PA具有小的头部基团,被认为有助于细胞膜囊泡的融合与裂变,并且PAK有作为第二信使放大细胞内信号的作用,同时PAK也作为细胞吞噬作用激活后的结果.这些与早期泡沫细胞的对比说明晚期泡沫细胞存在潜在的信号释放增强.

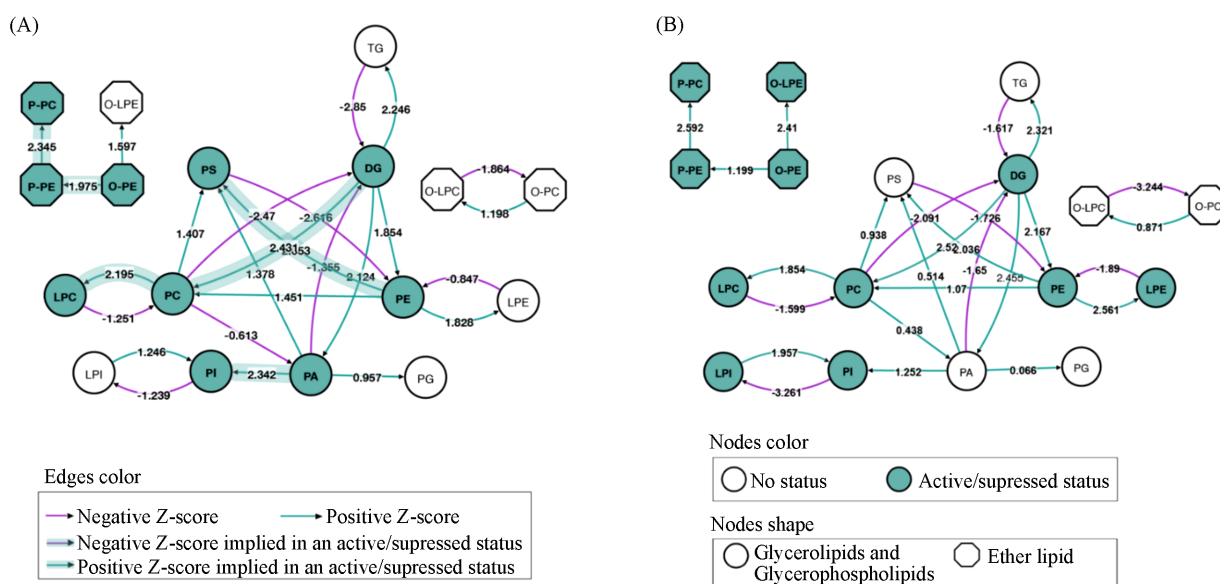


Fig. 7 Reaction chains of the early(A) and late(B) stage of foam cells

3 结论

通过时间序列的脂质组学分析,发现了在巨噬细胞泡沫化进程中显著变化的脂质分子.甘油三酯

TG的显著累积增强了巨噬细胞的炎症功能,进一步吞噬氧化低密度脂蛋白,促进泡沫细胞的形成;另一方面,磷脂酰丝氨酸PS与溶血磷脂酰胆碱LPC在晚期合成增加,指示晚期泡沫细胞的凋亡,这些脂质可能作为信号分子趋化巨噬细胞对凋亡细胞的清除.以上发现为巨噬细胞泡沫化过程中脂质介导的炎症响应和凋亡信号传递提供了新见解.未来还需要进一步探索更多的脂质亚类分子行使生物学功能的关键信号轴,以及这些信号分子如何调控巨噬细胞有效清除凋亡细胞,为减缓动脉粥样硬化进程提供新的治疗机会.此外,本文采用的非靶向脂质组学方法具有广泛的适用性,在未来研究中还需要对实际临床样本中的泡沫化细胞脂质失调进行分析,如可将本文建立的脂质组学流程用于颈动脉剥脱术获取的血管内膜组织,以验证所得结论在实际体内体系中的适用性.

参 考 文 献

- [1] Libby P., Ridker P. M., Hansson G. K., *Nature*, **2011**, 473(7347), 317—325
- [2] Thorp E., Li, Y., Bao L., Yao P. M., Kuriakose G., Rong J., Fisher E. A., Tabas I., *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **2009**, 29(2), 169—172
- [3] Maguire E. M., Pearce S. W. A., Xiao Q., *Vascul. Pharmacol.*, **2019**, 112, 54—71
- [4] Kong P., Cui Z. Y., Huang X. F., Zhang D. D., Guo R. J., Han M., *Signal Transduct. Tar.*, **2022**, 7(1), 1—24
- [5] Han X., Gross R. W., *J. Lipid Res.*, **2003**, 44(6), 1071—1079
- [6] Yang K., Han X., *Trends Biochem. Sci.*, **2016**, 41(11), 954—969
- [7] Tsugawa H., Ikeda K., Takahashi M., Satoh A., Mori Y., Uchino H., Okahashi N., Yamada Y., Tada I., Bonini P., Higashi Y., Okazaki Y., Zhou Z., Zhu Z. J., Koelmel J., Cajka T., Fiehn O., Saito K., Arita M., Arita M., *Nat. Biotechnol.*, **2020**, 38(10), 1159—1163
- [8] Hartler J., Trötzlmüller M., Chitruju C., Spener F., Köfeler H. C., Thallinger G. G., *Bioinformatics*, **2011**, 27(4), 572—577
- [9] Alvarez-Jarreta J., Rodrigues P. R. S., Fahy E., O'Connor A., Price A., Gaud C., Andrews S., Benton P., Siuzdak G., Hawksworth J. I., Valdivia-Garcia M., Allen S. M., O'Donnell V. B., *Bioinformatics*, **2021**, 37(10), 1478—1479
- [10] Pluskal T., Castillo S., Villar-Briones A., Orešič M., *BMC Bioinformatics*, **2010**, 11(1), 1—11
- [11] Ni Z., Wölk M., Jukes G., Mendivelso Espinosa K., Ahrends R., Aimo L., Alvarez-Jarreta J., Andrews S., Andrews R., Bridge A., Clair G. C., Conroy M. J., Fahy E., Gaud C., Goracci L., Hartler J., Hoffmann, N., Koczczyński D., Korf A., Lopez-Clavijo A. F., Malik A., Ackerman J. M., Molenaar M. R., O'Donovan C., Pluskal T., Shevchenko A., Slenter D., Siuzdak G., Kutmon M., Tsugawa H., Willighagen E. L., Xia J., O'Donnell V. B., Fedorova M., *Nature Methods*, **2022**, 20(2), 193—204
- [12] Nurmohamed N. S., Kraaijenhof J. M., Mayr M., Nicholls S. J., Koenig W., Catapano A. L., Stroes E. S. G., *Eur. Heart. J.*, **2023**, 44(18), 1594
- [13] Qin Z., *Atherosclerosis*, **2012**, 221(1), 2—11
- [14] Zhang H., Gao Y., Sun J., Fan S., Yao X., Ran X., Zheng C., Huang M., Bi H., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2017**, 409(22), 5349—5358
- [15] Bligh E. G., Dyer W. J., *Can. J. Biochem. Physiol.*, **1959**, 37(8), 911—917
- [16] Bögl T., Mlynek F., Himmelsbach M., Buchberger W., *Talanta*, **2022**, 236, 122849
- [17] Holthuis J. C. M., Menon A. K., *Nature*, **2014**, 510(7503), 48—57
- [18] Huang S. C. C., Everts B., Ivanova Y., O'Sullivan D., Nascimento M., Smith A. M., Beatty W., Love-Gregory L., Lam W. Y., O'Neill C. M., Yan C., Du H., Abumrad N. A., Urban J. F., Artyomov M. N., Pearce E. L., Pearce E. J., *Nat. Immunol.*, **2014**, 15(9), 846
- [19] Castoldi A., Monteiro L. B., van Teijlingen Bakker N., Sanin D. E., Rana N., Corrado M., Cameron A. M., Hässler F., Matsushita M., Caputa G., Klein Geltink R. I., Büscher J., Edwards-Hicks J., Pearce E. L., Pearce E. J., *Nat. Commun.*, **2020**, 11(1), 1—11
- [20] Chen Z., Ho I. L., Soeung M., Yen E. Y., Liu J., Yan L., Rose J. L., Srinivasan S., Jiang S., Edward Chang Q., Feng N., Gay J. P., Wang Q., Wang J., Lorenzi P. L., Veillon L. J., Wei B., Weinstein J. N., Deem A. K., Gao S., Genovese G., Viale A., Yao W., Lyssiotis C. A., Marszalek J. R., Draetta G. F., Ying H., *Nat. Commun.*, **2014**, 14(1), 1—15
- [21] Zou Y., Henry W. S., Ricq E. L., Graham E. T., Phadnis V. V., Maretich P., Paradkar S., Boehnke N., Deik A. A., Reinhardt F., Eaton J. K., Ferguson B., Wang W., Fairman J., Keys H. R., Dančák V., Clish C. B., Clemons P. A., Hammond P. T., Boyer L. A., Weinberg R. A., Schreiber S. L., *Nature*, **2010**, 585(7826), 603—608
- [22] Ravichandran K. S., *J. Exp. Med.*, **2010**, 207(9), 1807
- [23] Bukrinsky M. I., Mukhamedova N., Sviridov D., *J. Lipid Res.*, **2020**, 61(5), 601—610
- [24] Arisaka M., Takano K., Negishi Y., Arima H., Aramaki Y., *Arch. Biochem. Biophys.*, **2011**, 508(1), 72—77
- [25] Petrusca D. N., Gu Y., Adamowicz J. J., Rush N. I., Hubbard W. C., Smith P. A., Berdyshev E. V., Birukov K. G., Lee C. H., Tuder R. M., Twigg H. L., Vandivier R. W., Petrache I., *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285(51), 40322—40332

(Ed.: N, K)