

LipidQuan™：利用一种稳定的LC-MS/MS方法快速分析药物吉非替尼代谢后肝组织中的脂质组

Nyasha Munjoma, I.D. Wilson, Lee A. Gethings, Robert S. Plumb

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

脂质和代谢物表型分析为哺乳动物生物学、疾病进展、疗效和人群健康提供了独特的见解。LipidQuan™ <

https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/targeted_omics_method_library/LipidQuan%20Method%20Gu

是一种基于HILIC的快速液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)平台，可用于开发靶向分析。Quanpedia™数据库包含2000多种脂质，可降低方法开发和培训成本，改善鉴定结果和方法专属性（例如，对磷脂相关的MRM使用两个脂肪酰基链片段可提高专属性）。本研究利用了500多种生物相关脂质来筛选组织样品。方法广泛涵盖多种脂质类别，并且有利于测量低丰度的生物活性脂质，例如PA、PS和PC。我们将LipidQuan方法应用于吉非替尼（一种用于治疗各种癌症的表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶结构域抑制剂）静脉(IV)给药后小鼠肝组织的分析。所得数据显示给药后脂质代谢途径失调，且轨迹与时间相关。

优势

- 稳定、可靠的脂质分析

- 能够从2000多种生物相关脂质库中测量500种脂质
- 方法快速、简单，可轻松部署
- 分析速度快，在8 min内即可完成

简介

基于液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)的蛋白质组学、脂质组学和代谢组学研究对了解哺乳动物系统由于疾病、环境变化和暴露于药物或毒物而导致的生物学变化具有巨大潜力¹。脂质组学涉及对所有类型脂质的综合分析，可用于检测和鉴定八种常见脂质类别中的数千种脂质¹。这些脂质组学方法表明，各种疾病和病症已导致这些类别的脂质发生表型变化，包括三阴性乳腺癌、糖尿病性心血管疾病和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)²。

吉非替尼是一类酪氨酸激酶抑制剂(TKI)药物，可与ATP竞争在突变或过表达EGFR受体中的结合口袋³。吉非替尼通过抑制酪氨酸激酶活性防止癌细胞增殖。既往基于血浆的研究显示了药物药理作用导致循环脂质组成变化的证据⁴。

。

LipidQuan是一种稳定、简单且基于HILIC的LC-MS/MS方法，采用稳定标记同位素脂质和奇数链脂质混合物来快速、准确地定量脂质，已被用于筛选500多种脂质。本文展示了LipidQuan在吉非替尼IV给药后获得的小鼠肝脏样品脂质分析中的应用。

实验

研究设计

小鼠血浆样品来自先前在雄性C57Bl/6J小鼠(20–27 g)中进行的吉非替尼药代动力学研究（研究的完整描述见先前出版物）⁴。本研究由Evotec SAS（法国图卢兹）根据国家和欧盟指导原则进行全面管理审查。简言之，吉非替尼在含0.5%羟丙基甲基纤维素HMPC的0.1%聚山梨酯80中配制，并以10 mg/kg的剂量静脉(IV)给药。在给药前和给药后0.5、1、3、8和24小时采集肝脏样品。

样品前处理

使用Want等人(2012) [5]概述的程序从肝脏样品中提取脂质。称取50–60 mg组织样品，加入预先填充硅胶珠的1.5 mL试管中。向试管中加入1 mL二氯甲烷/甲醇(3:1, v/v)溶液，其中含有3000 ng/mL纯氘代神经酰胺LIPIDOMIX (Avanti, 美国亚拉巴马州伯明翰)、SPLASH LIPIDOMIX (Avanti, 美国亚拉巴马州伯明翰)和吉非替尼(d6) (Cayman Chemical, 美国密歇根安娜堡)的250倍稀释液作为内标。使用Bertin Precellys Evolution (Bertin Instruments, 英格兰贝辛斯托克)的组织设置制备组织匀浆，该设置为6000 rpm下3次20 s脉冲与15 s暂停。将试管以2000 g离心10 min，然后将有机层转移至玻璃样品瓶中，在氮气下干燥。对剩余团块重复提取程序以优化提取。

提取物干燥后，用1 mL IPA/乙腈(1:2, v/v)复溶样品，超声处理10 min。使用6份给药前样品提取物生成校准曲线，这些提取物使用6个浓度水平奇数链脂质混合物的IPA/乙腈溶液复溶，浓度范围为5 ng/mL (LPE)~84750 ng/mL (胆固醇酯)。校准溶液中还包括吉非替尼 (Sigma Aldrich, 英国普尔)和O-去甲基-易瑞沙 (Cayman Chemical, 美国密歇根安娜堡)标准品，浓度范围为12 ng/mL~1333 ng/mL。将样品转移至Eppendorf管中，再离心5 min以去除碎屑。将上清液转移至最大回收样品瓶中进行LC-MS分析。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY™ UPLC I-Class流通针式(FTN) Ultrapformance LC™
检测:	Xevo™ TQ-XS串联四极杆质谱仪
样品瓶:	经认证的螺纹颈口最大回收玻璃样品瓶 186000326C
色谱柱:	ACQUITY Premier UPLC™ BEH™ Amide 2.1 x 100 mm, 1.7 μm
柱温:	45 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	0.5 μL

流速: 0.6 mL/min

流动相A: 95%乙腈, 5% 10 mM乙酸铵(v/v)

流动相B: 50%乙腈, 50%水, 含10 mM乙酸铵(v/v)

梯度: 流动相B在2 min内从1%升至20.0%, 然后在3 min内从20%升至80%, 随后重新平衡3 min

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0	0.6	99	1	6
2	0.6	80	20	6
5	0.6	20	80	6
5.1	0.6	99	1	6
8	0.6	99	1	6

质谱条件

MS系统: Xevo TQ-XS

电离模式: 正离子和负离子模式

毛细管电压: 2.8 kV (+) 1.9 kV (-)

采集模式: MRM

离子源温度: 120 °C

脱溶剂气温度:	500 °C
锥孔气流速:	150 L/h
脱溶剂气流速:	1000 L/h
雾化气:	7 bar
离子导入装置偏移1:	3 V
离子导入装置偏移2:	0.3 V

数据管理

使用TargetLynx™ XS vs.4.2（沃特世，英国威姆斯洛）和Skyline（MacCoss Lab Software，华盛顿大学）处理数据。使用TargetLynx软件处理数据，根据脂质的相应天然丰度类别，将氘代神经酰胺LIPIDOMIX和SPLASH LIPIDOMIX的SIL标准品设为内标。使用MetaboAnalyst <<https://www.metaboanalyst.ca/>> ⁶和Spotfire（TIBCO，美国麻萨诸塞州萨默维尔）进行多变量统计分析。

结果与讨论

吉非替尼，即N-(3-氯-4-氟苯基)-7-甲氧基-6-(3-吗啉基-丙氧基)喹唑啉-4-胺（图1），是一种于2003年获批用于治疗某些乳腺癌和非小细胞肺癌(NSCL)以及一些其他特定癌症的药物，商品名为易瑞沙®。吉非替尼通过阻断酪氨酸激酶结构域中靶癌细胞的表皮生长信号发挥作用，被归类为一种表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂。吉非替尼在哺乳动物系统中吸收良好，生物利用度良好，给药后3-7小时观察到血浆峰浓度，平均口服生物利用度为60%。吉非替尼在临床前物种和人体内经历广泛的生物转化（例如，产生大量药物代谢物）。由于吉非替尼作用于酪氨酸激酶通路，并已显示出会引起肝损伤，因此我们研究了吉非替尼在肝脏中的脂质组学效应⁴。

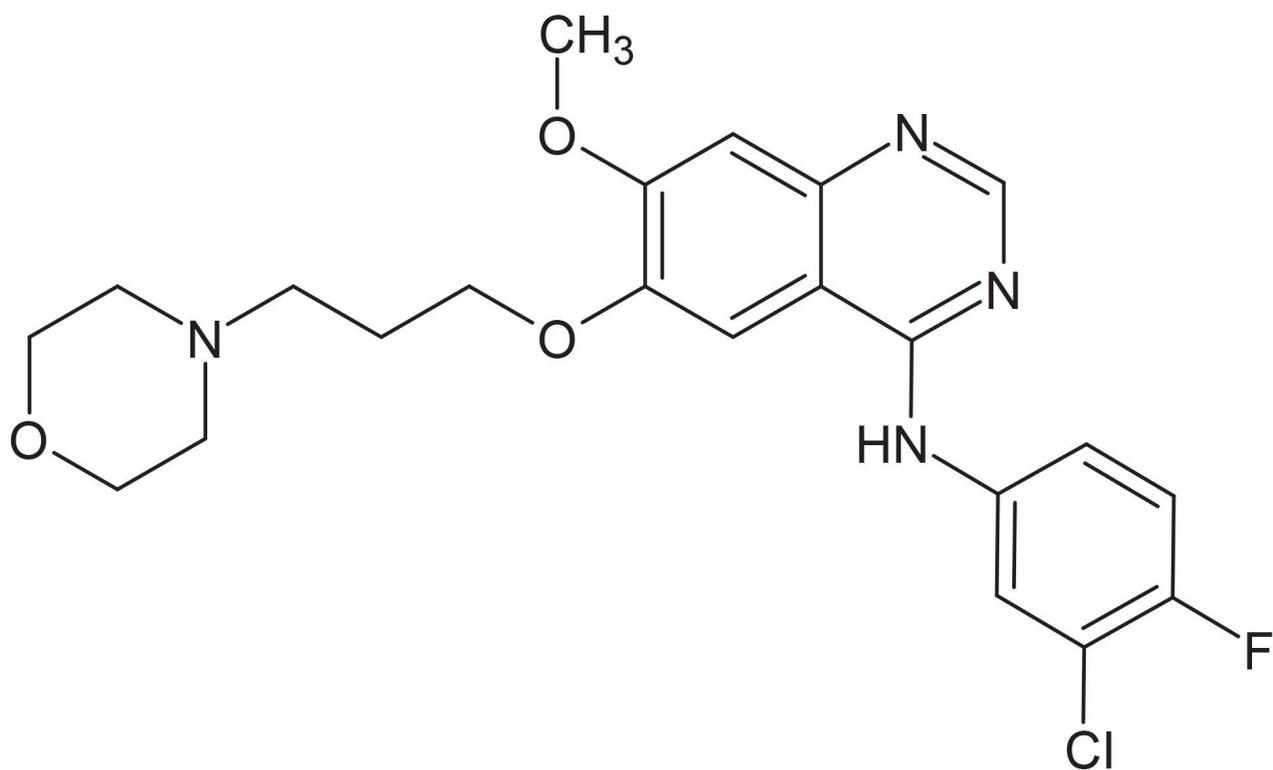


图1.吉非替尼的结构

在开始样品分析之前，多次进样对照空白样品，以确保分析方法的稳定性。在分析过程开始和结束时分析脂质校准曲线。通过合并所有给药前样品得到对照质控品(QC)。通过合并少量各样品得到研究参比QC；还通过合并吉非替尼给药动物各时间点的少量样品得到治疗后QC。每8次样品进样后分析这些研究参比QC、对照QC和治疗后QC。将样品随机分组，使用LipidQuan HILIC-MS/MS方法重复分析三次。

肝脏提取物的代表性正离子和负离子ESI HILIC-MS/MS色谱图如图2和图3所示。这些数据显示了各种脂质在两种电离模式下的分离和检测结果。从这些数据可以看出，脂质基于极性头部基团分类洗脱：“非极性”甘油三酯和胆固醇酯首先洗脱，而LPC和LPE在色谱图结束时洗脱。除脂质类别以外，还可以监测和测量各种酰基肉碱，长链C₁₈和C₁₄肉碱在1.8 min处洗脱，短链C₄至C₀肉碱在2.9~3.8 min之间洗脱。使用该方法，在正离子模式下共定量分析了238种脂质，在负离子模式下监测了232种脂质，不包括内标和校准物。脂质标准品浓度范围为5 ng/mL (LPE)~84750 ng/mL (胆固醇酯)。校准样品的分析表明，该方法产生了超过三个数量级的线性响应。通过上述方法，使用吉非替尼和O-去甲基代谢物校准物标准品确定吉非替尼及其代谢物的保留特性。所得数据显示，吉非替尼和O-去甲基代谢物均在0.7 min处洗脱。

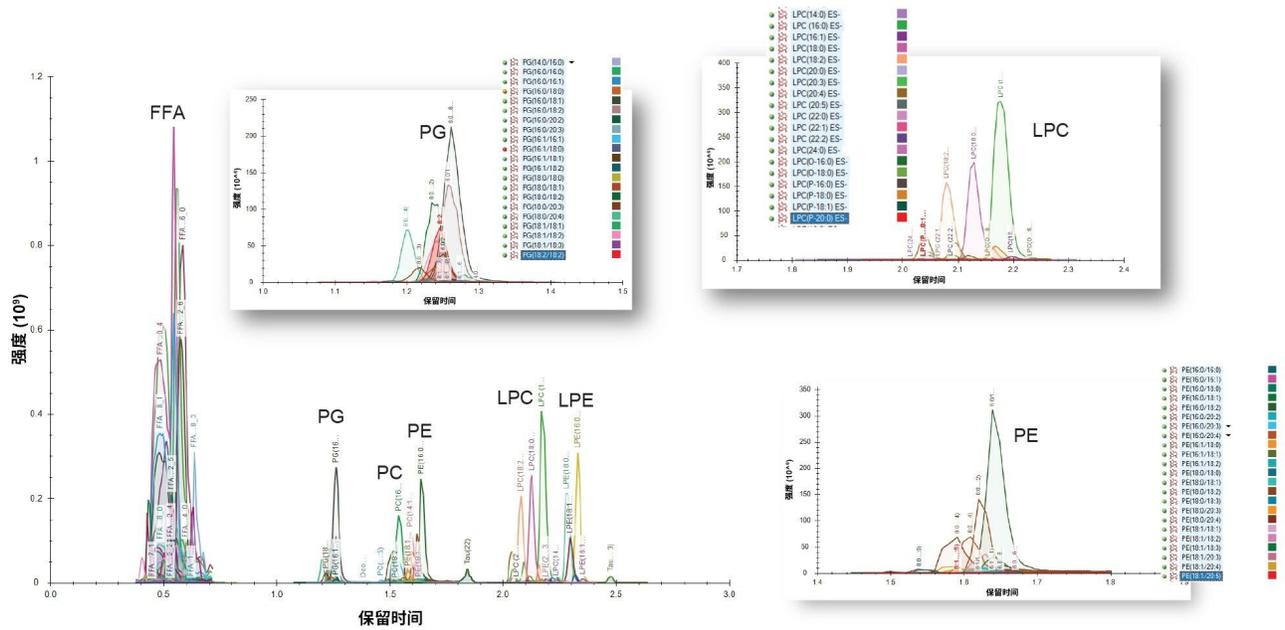


图3.吉非替尼给药后肝脏提取物的负离子ESI HILIC-MS/MS色谱图

将Skyline得出的峰面积转移至MetaboAnalyst，使用无监督PCA和有监督PLSDA方法进行多变量分析。吉非替尼及其代谢物的LC-MS/MS信号未纳入多变量统计分析中。但是，由吉非替尼的正离子ESI LC-MS/MS MRM数据可知，该化合物在0.5 h时间点达到峰浓度，并在研究期间稳步下降，在24 h时间点时无法测量，与之前发表的结果一致^{3,4}。图4所示数据展示了使用PCA和PLSDA方法对负离子模式分析数据进行的多变量统计分析。在正离子和负离子ESI数据集中，治疗后样品组与对照组明显分开，研究参比QC和治疗后QC在各自的组中紧密聚集在一起。从PCA和PLSDA数据处理中可以明显看出，与对照组相比，治疗后样品组的差异明显更大，表明吉非替尼给药导致脂质代谢失调。正离子ESI LC-MS/MS数据观察到类似趋势。

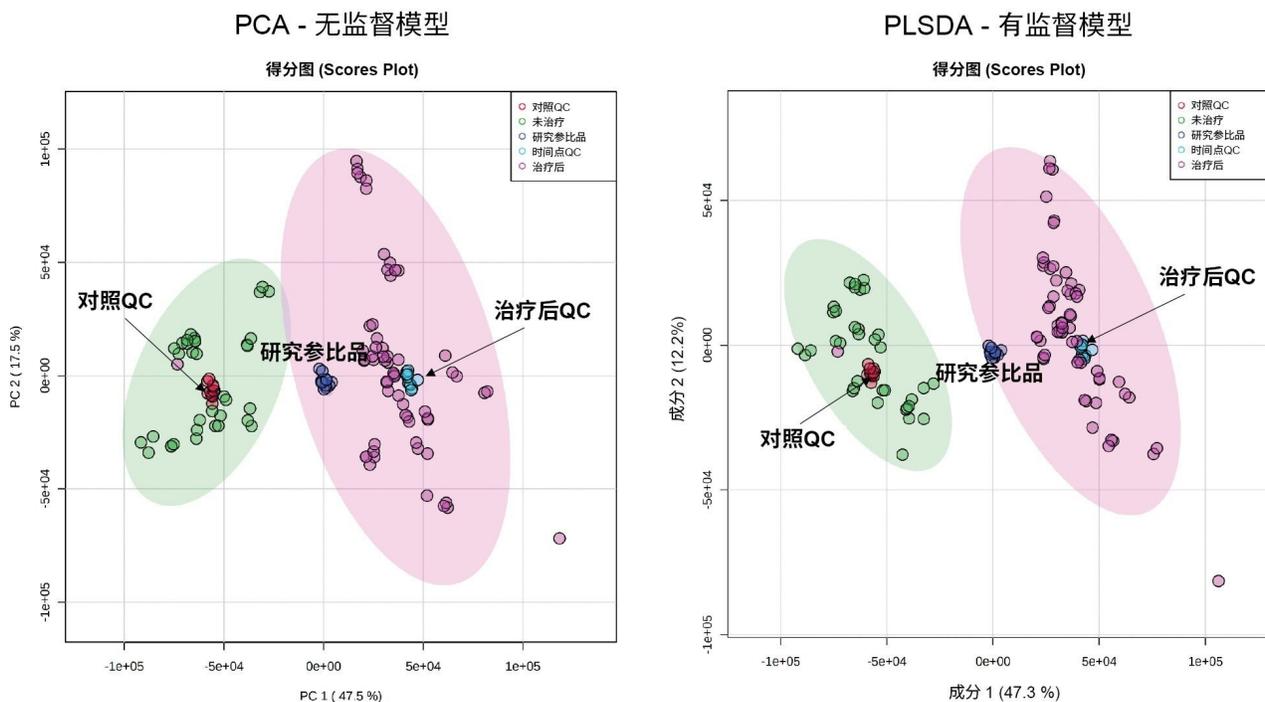


图4.基于负离子LC-MS/MS肝脏提取物数据的PCA和PLSDA模型

仅对吉非替尼IV给药组的数据进行了PLSDA分析，如图5所示。在该数据分析中，可以在0.5 h、1 h、3 h、8 h和24 h时间组的代谢信号中观察到清晰的时间相关轨迹。从该数据可以清楚地看出，在24 h时间点处，样品未恢复给药前位置，说明在24 h时仍然存在脂质失调。统计分析显示，导致在PLSDA模型中观察到代谢变化的前25个特征中，大部分特征对应于游离脂肪酸(FFA)、PE、PG、LPC和LPC。正离子ESI数据也观察到类似结果，在SM、TG和PC脂质中观察到的贡献对观察到的数据差异有重要影响。

由负离子ESI LC-MS/MS分析获得的其中四种失调脂质LPE (18:0)、PG (16:0/18:1)、PE (18:0/20:4)和LPC (20:4)的峰面积响应时间曲线见图6。尽管每种脂质的时程曲线有所不同，但它们都表现为浓度随时间稳定增加，在8 h时间点处达到最大值，在24 h时间点处浓度下降。

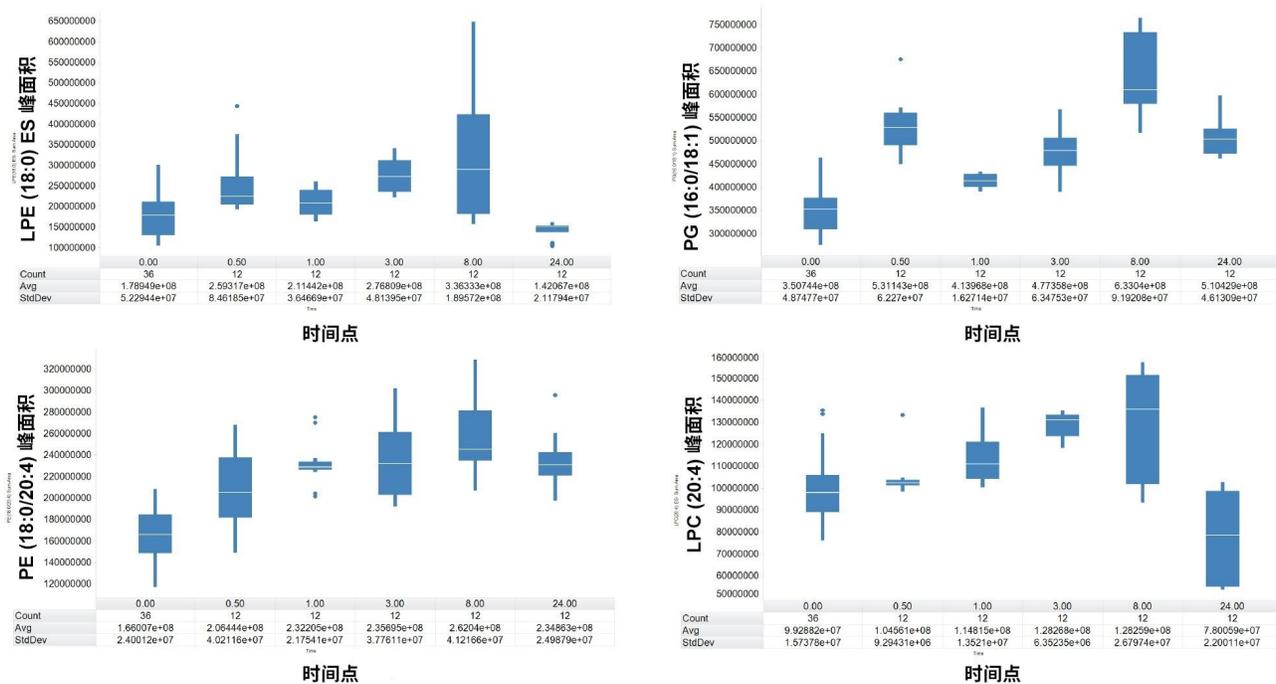


图6. 在24小时期间失调的选定脂质的峰面积响应箱线图

结论

代谢组学和脂质组学分析提供了一种机制，用于观察和了解暴露于药物或毒物后代代谢组和脂质组的变化，也可用于监测疾病进展。LipidQuan为定量测定生物体液中的脂质提供了一种快速简单的方法，可以在正离子模式和负离子模式组合实验中监测500多种脂质。本研究将LipidQuan应用于EGFR抑制剂吉非替尼IV给药后小鼠肝脏提取物中脂质的定量。QC数据分析也显示未观察到与时间相关的漂移或分析数据的差异，进一步凸显了该方法的稳定性。数据揭示了给药组中脂质信号的时间相关轨迹，其中FFA、PE、PG、LPE和LPC对负离子ESI数据中观察到的差异有重要影响，而SM、TG和PC在正离子数据中表现出显著影响。

参考资料

1. Han X. Lipidomics for Studying Metabolism. *Nat.Rev. Endocrinol.* 2016, 12, 668–679.
2. Eghlimi R, Shi X, Hrovat, J, Xi B, Gu H. Triple Negative Breast Cancer Detection Using LC-MS/MS Lipidomic Profiling. *J. Proteome Res.* 2020, 19, 2367-2378.
3. McKillop D, Hutchison M, Partridge E.A, Bushby N, Cooper C.M, Clarkson-Jones J.A, Herron W, Swaisland H.C. Metabolic Disposition of Gefitinib, an Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Rat, Dog and Man. *Xenobiotica* 2005, 34, 914–934.
4. Molloy B.J, King A, Mullin L.G, Gethings L.A, Riley R, Plumb R.S, Wilson I.D. Rapid Determination of the Pharmacokinetics and Metabolic Fate of Gefitinib in the Mouse Using a Combination of UPLC-MS/MS, UPLC/QToF/MS, and Ion Mobility (IM)-enabled UPLC/QToF/MS. *Xenobiotica* 2021, 51, 434-446.
5. Want, E., Masson, P., Michopoulos, F. *et al.* Global Metabolic Profiling of Animal and Human Tissues via UPLC-MS. *Nat Protoc*, 2013, 8, 17–32. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.135> <
<https://doi.org/10.1038/nprot.2012.135>> .
6. Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., Wishart, D.S., Xia, J. MetaboAnalyst 4.0: Towards More Transparent and Integrative Metabolomics Analysis. *Nucl.Acids Res.*, 2018, 46, W486–494.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134889751>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007598ZH, 2022年4月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号