

[研究新領域報導]

脂質體學的最終邊界：不飽和脂類異構物的深度分析

國立臺灣大學化學系 郭廷浩(博士班候選人)

徐丞志助理教授

一、簡介

脂質是重要的生物分子，參與了生物體中重要的生理功能，例如細胞訊息傳遞、能量平衡、臟器保護，並受到生物體新陳代謝所調控。生物體的脂肪代謝失衡，將會改變細胞環境，進而連結到疾病狀態，例如癌症、阿茲海默症、心血管疾病等。脂質分子的種類多樣，多數的脂類分子具有疏水性長碳鏈，其碳鏈上具有數目不等的飽和碳—碳雙鍵(C=C)，例如脂肪酸類、磷酸脂類、甘油脂類分子皆屬之。目前文獻上，總計已有報導超過 4 萬 3 千種的脂質分子，而每種脂質分子的結構與功能也不盡相同。

脂質體學(lipidomics)為一門研究脂類分子的獨特學門，最主要的目標，即在大規模地研究生物體中脂質分子組成及含量的時空變化，藉此瞭解脂質代謝背後的複雜網絡。過去二十年來，分析化學技術的快速發展，推動了脂質體學的研究，其中以「質譜儀」(mass spectrometry)的發展最為關鍵。由於質譜儀能提供豐富的分子結構及定量資訊，使得科學家能以高通量方式解析複雜生物系統中的脂質成分，同時也發現許多可作為疾病生物標記物的脂質分子。

然而，目前利用質譜儀鑑定脂質分子的精確化學結構時，仍是目前很大的挑戰。一般來說，當分子被游離進入質譜儀分析時，可利用串聯質譜法(MS/MS)，導入高能氣體進行碰撞誘發解離(CID)，將待測物撞碎，並藉由碎片離子回推其原始化學結構，而這也是市面上商用的質譜儀中，最廣泛使用的串聯質譜法。然而，以 CID-MS/MS 為基礎的結構分析方法，卻無法解析脂肪長碳鍊上的 C=C 位置，而這些 C=C 位置異構物的精確量測，成為了脂質體學研究中的最大挑戰，相關

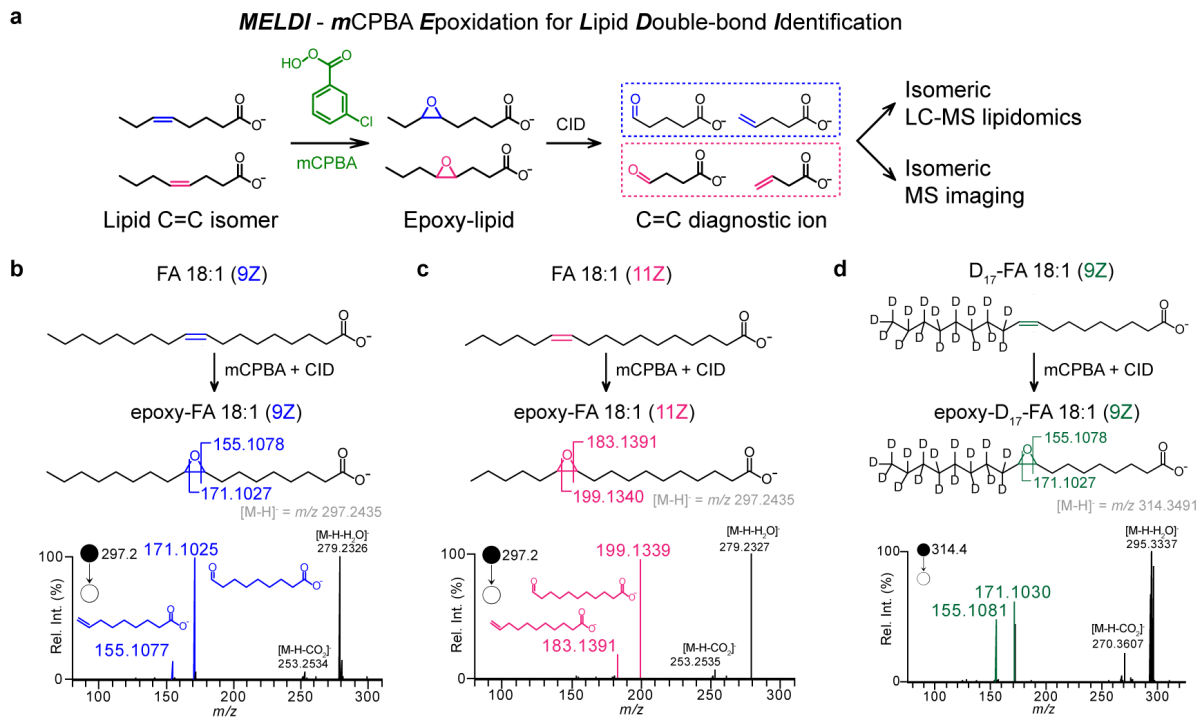
的資訊仍然鎖在黑盒子中。此外，近年已有一些研究指出，脂類異構物的組成變化，與組織細胞型態變化、糖尿病、癌症等皆有極大關聯性，惟其實驗仍仰賴特殊的光化學反應裝置進行衍生化，或使用具臭氧引導裂解(OzID)或是紫外光裂解(UVPD)裝置的專門質譜儀。至今，科學家仍無法使用一般商用質譜儀對脂質異構物進行大規模分析，更不用說是取得它們的分子影像，使得脂質體學的研究進展受到極大限制。

為了解決這個難題，在這篇研究中，我們在臺大化學系的研究團隊，開發一套極為簡便且可立即通用全世界的方法：MELDI (mCPBA Epoxidation for Lipid Double-bond Identification)，可以讓世界上大部分已經商業化的串聯質譜用於解析脂質 C=C 位置[1]。本實驗室利用有機化學中的經典環氧化試劑「間氯過氧苯甲酸(meta-chloroperoxybenzoic acid, mCPBA)」作為脂質的雙鍵衍生化反應試劑，並成功地利用傳統串聯質譜法來鑑定脂質分子 C=C 位置（參考圖一）。以單元不飽和、十八碳的脂肪酸(fatty acid)為例（簡寫為 FA 18:1），針對雙鍵位於第九號碳($\Delta 9$)、第十一號碳($\Delta 11$)的兩種異構物為例，經由 mCPBA 在試管中進行環氧化後，送入質譜儀並利用 CID 進行離子斷片分析，可以精確鑑定到兩者不同的雙鍵位置。在這份研究中，我們進一步結合 MELDI 於液相層析質譜(LC-MS)脂質體學分析與質譜影像(mass spectrometry imaging)，深入解析在生物體中的脂質及其異構物組成。

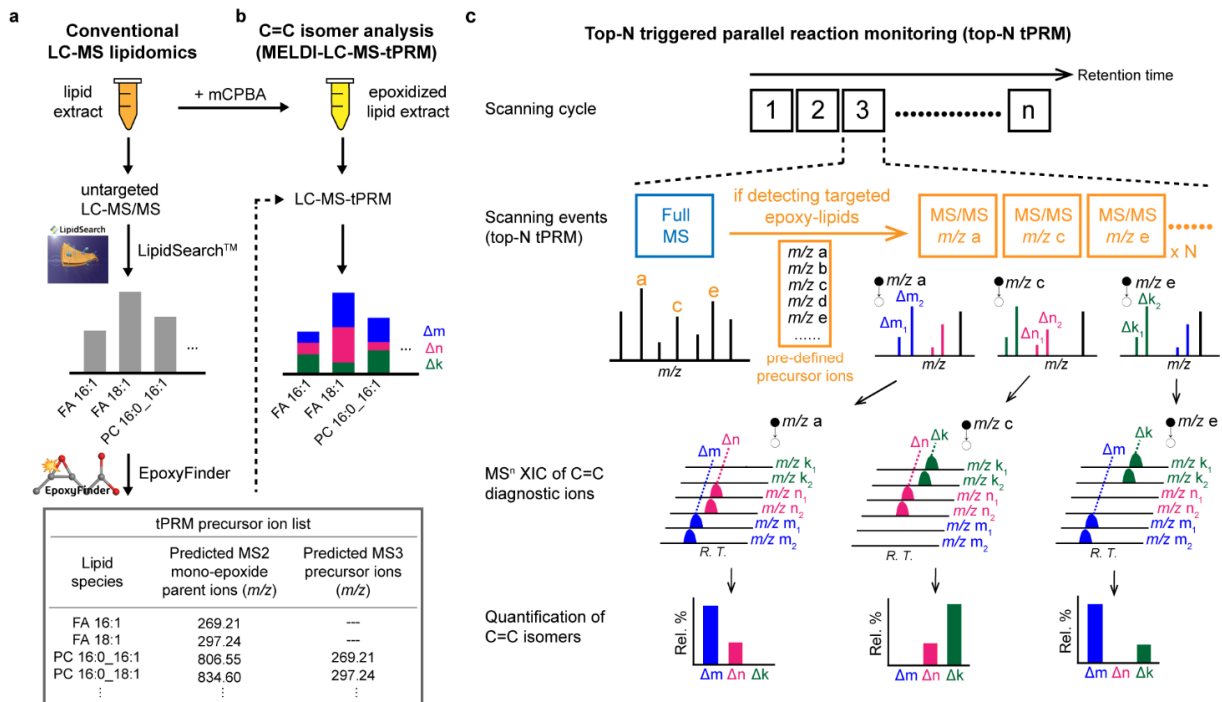
二、研究成果

結合 MELDI 及 LC-MS 脂質體學於大規模分析生物脂質異構物

為了將 MELDI 加入現行 LC-MS 脂質體學



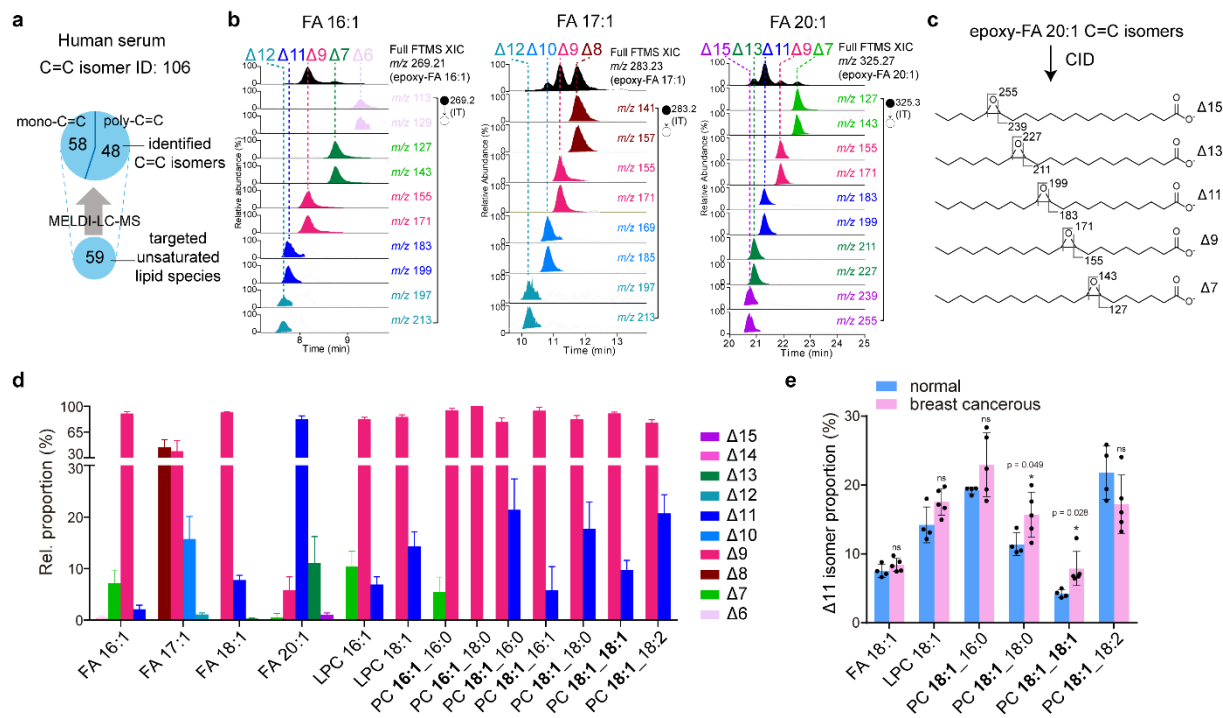
圖一 利用 MELDI 解析脂質 C=C 雙鍵位置示意圖



圖二 結合 MELDI 與 LC-MS 脂質體學進行深度脂質體學研究之分析流程

研究中以取得脂質異構物的資訊，我們開發了一套雙階段的深度脂質體學分析流程（見圖二）。在第一階段，我們保留了傳統脂質體學的實驗流

程，將生物脂質萃取物利用 LC-MS 進行分析，使用 LipidSearch 軟體分析數據，以取得脂質分子的種類、碳鏈長度及 C=C 數目（此時 C=C 位



圖三 應用 MELDI-LC-MS 脂質體學於分析人體血清中的脂質異構物

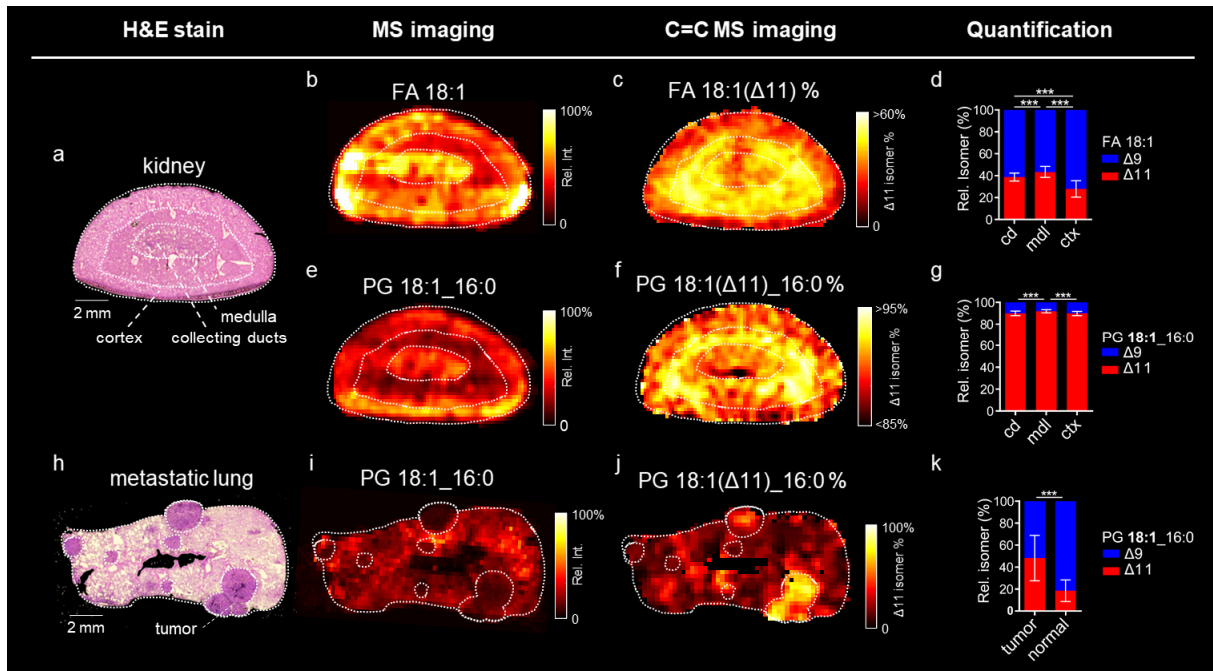
置異構物是無法區別的)，並利用實驗室自行開發的 EpoxyFinder 軟體，擷取其中不飽和脂質異構物的資訊，產生一份標靶環氧化母離子的清單，爾後用於後續的異構物分析。於第二階段，我們首先將脂質萃取物利用 mCPBA 進行衍生化，搭配 LC-MS 中的驅動式平行反應監控 (triggered parallel reaction monitoring, tPRM)，針對目標的脂質環氧化母離子，進行連續 MS/MS 分析以取得脂質的雙鍵位置資訊，並決定每個異構物的相對含量。

我們開發的這套深度脂質體學的分析平台，能應用於不同種類的生物脂質萃取物。例如，我們將深度脂質體學應用於分析人體血清中的不飽和脂質，在 59 種常見的單元及多元不飽和脂肪酸類及磷脂類分子中，成功鑑定到至少 100 個 C=C 位置異構物 (如圖三)。此外，針對血清中常見的 18 種單元不飽和脂類，我們深入分析其 C=C 位置異構物組成。例如，在十八碳的脂肪酸中，雙鍵在九號碳上的異構物 (即油酸，FA 18:1 ($\Delta 9$)) 占了超過 90% 的比例，與文獻所述一致。有趣的是，我們發現在單元不飽和和二十碳、二十二碳、二十四碳脂肪酸中，含量占比最大的異構物皆屬於 ω -9 類 (即 C=C 位於自碳鏈尾端往前

數第九號碳)，與文獻中提出油酸作為這些下游脂肪類合成的前驅物相互呼應。我們進一步揭開了磷脂質雙鍵異構物組成的面貌，發現不論是單元或多元不飽和磷脂質，其異構物的組成皆與脂肪酸類相同，此現象亦與脂肪酸作為磷脂質的生合成前驅物有所呼應。此外，我們也鑑定到許多微量的異構物，例如脂肪酸 16:1 ($\Delta 6$)、18:1 ($\Delta 13$)。在過往的研究中，由於分析技術上的限制，這些異構物鮮少被報導，而我們將 MELDI 結合高感度的 LC-MS 脂質體學分析，大幅度的提升觀測的深度，得以鑑定出這些血清中極為罕見的脂質異構物。最後，我們將這套深度脂質體學，用於比較乳癌病人與正常人的血清異構物組成變化，發現血清中的兩種卵磷脂(PC) 18:1_18:2 及 18:1_18:0 中，其 $\Delta 11$ 異構物的含量比例在癌症病人的血清中顯著提升。此項意外的發現，未來將有機會利用大規模的追縱性研究，永來開發乳癌診斷的新方法。

結合 MELD 及質譜影像應用於解析脂質異構物在組織中的空間分布

質譜影像是新興的分子影像技術，可透過非標記方式，同時解析多種分子在組織切片上的空



圖四 結合 MELDI 與 DESI 質譜影像於空間解析小鼠組織中的脂質異構物

間分布，達到類似多重目標物免疫學染色的結果。近年來，質譜影像已被廣泛應用於生物組織分類、癌症診斷、刑事鑑定等領域。然而，在技術上，質譜影像對於相同化學式的分子（例如本文所提的脂質 C=C 位置異構物），即便採用超高解析的質量偵測器，仍無法區別結構異構物之空間分布差異，因而脂類分子的影像研究便大幅受限於此，躊躇不前。

為了解決這個難題，我們將 MELDI 結合脫附電噴灑游離 (desorption electrospray ionization, DESI) 質譜影像，實現了在常壓下對脂質 C=C 位置異構物進行空間解析的目標（如圖四）。為此，我們開發了一套快速的組織樣品處理方法，只需利用空氣噴槍將 mCPBA 溶液均勻噴灑至組織表面後，即可在常溫常壓下，直接在組織切片上，對不飽和脂質進行衍生化，且整套流程輕易簡便，耗時不到十分鐘，接著再採用標靶串聯質譜進行影像分析，便可解析雙鍵位置異構物的空間分布。

令人好奇的是，究竟異構物的分布，是否優於傳統的質譜影像，能給出更多重要的脂質代謝訊息呢？首先，我們將這套技術應用在小鼠腎臟組織切片上，試著回答這個問題（圖四）。利用傳統質譜影像分析，我們取得了兩種不飽和脂肪分

子（脂肪酸 18:1，及其生合成下游產物之一，甘油磷脂 PG 18:1_16:0）的空間分布，而這些影像各自包含了 $\Delta 9$ 及 $\Delta 11$ 兩種異構物的分布總合，而與組織化學染色影像對照後，我們發現其其相對含量在髓質 (medulla) 略為減少，而在皮質 (cortex) 及集合管 (collecting ducts) 則較豐富。接著，我們利用連續切片進行異構物影像分析，並解析 $\Delta 11$ 異構物的分布變化，則會發現完全相反的趨勢，即 $\Delta 11$ 的相對比例在髓質是顯著上升的，說明了在髓質中，這些不飽和脂肪在髓質中減少，主要是由 $\Delta 9$ 異構物比例下降所造成。更有趣的是，我們發現 PG 18:1_16:0 主要由 $\Delta 11$ 異構物所組成，而非 $\Delta 9$ 異構物，恰好與其生合成前驅物脂肪酸 18:1 相左。此一現象，推測是由於 PG 的生合成酵素偏好以 FA 18:1 ($\Delta 11$) 異構物為作用物所導致。

最後，我們想瞭解異構物質譜影像是否能用於癌症腫瘤邊界判讀。我們針對小鼠經癌症腫瘤轉移後的肺臟組織切片，同樣針對 PG 16:0_18:1 進行傳統質譜影像及異構物影像分析。在傳統的質譜影像中，我們發現 PG 16:0_18:1 並沒有顯著的異質分布，因而無法判讀腫瘤位置。然而，若採用異構物質譜影像，則會發現 $\Delta 11$ 異構物比例的空間分布，與正常組織區域相比，在腫瘤區域

是顯著上升的。這些結果，指出癌細胞具有異常的不飽和脂質代謝，且其變化層次會發生在異構物的組成上，同時，也顯示了利用異構物組成影像作為癌症腫瘤邊界判讀的潛力。

三、結語

在脂質體學的研究發展中，解析脂質生物標記的化學結構是一個不可或缺的關鍵。然而，脂質類分子中存在着大量的結構異構物，使得脂質的精確化學結構分析益加困難。至今，科學界仍缺乏一套廣用的高通量解析脂質異構物的分析方法。有鑑於此，我們開發了 MELDI，解決這個長年困擾學界的技術難題。MELDI 利用了**便宜易取得的** mCPBA 作為環氧化衍生試劑，結合一般商用的質譜技術，便能達到深度解析生物脂質異構物，更能結合質譜影像，解析異構物在組織

中的空間分布，而這些數據也指出，脂質異構物可以作為生物脂質代謝穩態的指標，及其作為未來疾病診斷的生物標記物的潛力。未來，我們將致力於推廣 MELDI 到全世界的質譜核心實驗室中，期望能夠在脂質體學中，提供更高層次的結構分析資訊，有助於科學家深入瞭解生物脂質的代謝機制。（本文中的內容以及圖片先前均以學術論文形式發表於國際期刊 **Analytical Chemistry** 上，本文作者同時分別為該篇論文之第一作者與通訊作者。）

參考文獻

- [1] T.H. Kuo, H.-H. Chung, H.-Y. Chang, C.-W. Lin, M.-Y. Wang, T.-L. Shen and C.-C. Hsu, *Anal. Chem.*, 91, 11905-11915 (2019).