基因组学与应用生物学, 2023 年, 第 42 卷, 第 3 期, 第 327-336 页

研究论文
Research Article

非靶向脂质组学分析伏马菌素 B1 对未成熟树突状细胞脂质代谢的影响

唐开义[1*] 于欢[2*] 喻艳琴[1] 欧沙[2] 王赟[1,2] 曾柱[1,2**] 胡祖权[2**]

1 贵州医科大学基础医学院, 贵州省高等学校感染免疫与抗体工程重点实验室, 贵阳, 550025; 2 贵州医科大学生物与工程学院(健康医药现代产业学院), 贵州省高等学校免疫细胞与抗体工程研究中心/生物与医学工程重点实验室, 贵阳, 550025

* 同等贡献作者

** 共同通信作者, zengzhu@gmc.edu.cn; huzuquan@gmc.edu.cn

摘 要 伏马菌素 B1 (fumonisin B1, FB1)是一种具有免疫抑制作用的真菌毒素。本研究利用 FB1 处理未成熟树突状细胞(immature dendritic cells, imDCs), 通过非靶向脂质组学分析 FB1 对 imDCs 脂质代谢的影响。运用超高效液相色谱串联四极杆静电场轨道阱质谱(UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS)技术采集质谱数据, 通过主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法判别分析(partial least-squares discrimination analysis, PLS-DA)和正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)进行多维统计分析, 比较 FB1 处理组和对照组之间脂质代谢谱的差异, 并以 OPLS-DA 模型的变量权重值(variable importance for the projection, VIP)>1 和$P<0.05$ 为标准筛选差异脂质分子。脂质组学分析结果显示, 从 imDCs 中共检测到 36 个脂质亚类, 1 845 个脂质分子。从 FB1 处理的 imDCs 中筛选出 30 个显著性差异脂质分子, 其中神经酰胺(ceramide, Cer)、磷酸神经酰胺(ceramide phosphate, CerP)、单半乳糖甘油二酯(monogalactosyldiacylglycerol, MGDG)、磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)、鞘氨醇(sphingosine, So)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)和鞘磷脂(sphingomyelin, SM)等亚类的含量显著下降(VIP>1, $P<0.05$), 而甘油二酯(diacylglycerol, DG)和磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)的含量显著升高(VIP>1, $P<0.05$)。研究结果说明 FB1 可能通过干扰 imDCs 的正常脂质代谢来发挥其免疫抑制作用。

关键词 伏马菌素 B1; 树突状细胞; 脂质组学; 脂质代谢物; 鞘脂代谢

Non-targeted Lipomics Analysis of the Effects of Fumonisin B1 on the Lipid Metabolism in Immature Dendritic Cells

TANG Kaiyi[1*] YU Huan[2*] YU Yanqin[1] OU Sha[2] WANG Yun[1,2] ZENG Zhu[1,2**] HU Zuquan[2**]

1 Key Laboratory of Infectious Immune and Antibody Engineering in University of Guizhou Province, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang, 550025; 2 Immune Cells and Antibody Engineering Research Center in University of Guizhou Province/Key Laboratory of Biology and Medical Engineering, School of Biology and Engineering (School of Modern Industry for Health and Medicine), Guizhou Medical University, Guiyang, 550025

* These authors contributed equally to this work

** Co-corresponding authors, zengzhu@gmc.edu.cn; huzuquan@gmc.edu.cn

DOI: 10.13417/j.gab.042.000327

Abstract Fumonisin B1 (FB1) is a mycotoxin with immunosuppressive effect. In this study, FB1 was used to treat immature dendritic cells (imDCs), and non-targeted lipidomics analysis was deployed to analyze the effects of FB1 on the lipid metabolism in imDCs. Mass spectrum data were collected by UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS technology and multivariate statistical analyses were carried out by the principal component analysis(PCA), partial least squares discrimination analysis (PLS-DA) and orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA). The differences of lipid metabolism profiles between FB1-treated group and control group were com-

基金项目: 本研究由国家自然科学基金项目(21906036)、贵州省省级科技计划项目(黔科合基础-ZK[2021]重点 029、黔科合平台人才[2021]5637 号、黔科合基础-ZK[2022]一般 397、黔科合平台人才[2016]5676)和贵州医科大学优秀青年人才培养项目(贵医大优秀青年人才[2021]101 号)共同资助。

引用格式: 唐开义, 于欢, 喻艳琴, 等, 2023. 非靶向脂质组学分析伏马菌素 B1 对未成熟树突状细胞脂质代谢的影响. 基因组学与应用生物学, 42(3):327-336.[TANG K Y, YU H, YU Y Q., et al., 2023. Non-targeted lipomics analysis of the effects of fumonisin B1 on the lipid metabolism in immature dendritic cells. Genomics and Applied Biology, 42(3):327-336.]

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

pared, and the differential lipid molecules were screened with the criterion of variable importance for the projection (VIP) >1 in the OPLS-DA model and $P<0.05$. The results showed that a total of 36 lipid subclasses and 1 845 lipid molecules in imDCs were detected by the lipidomics analysis. After treatment with FB1, 30 lipid molecules in imDCs with significant differences were screened. Among them, the contents of some lipid subclasses, such as ceramide(Cer), ceramide phosphate(CerP), monogalactosyldiacylglycerol(MGDG), phosphatidylcholine(PC), sphingosine(So), phosphatidylserine(PS) and sphingomyelin(SM) decreased significantly (VIP>1, $P<0.05$), while the levels of diacylglycerol(DG) and phosphatidylinositol(PI) increased significantly (VIP>1, $P<0.05$). The research results suggested that FB1 may exert immunosuppressive effect by interfering with the normal lipid metabolism in imDCs.
Keywords　Fumonisin B1; Dendritic cells; Lipomics; Lipid metabolite; Sphingolipid metabolism

伏马菌素是一类由镰刀菌产生的次级代谢产物，可污染食物和饲料，具有较强的毒性效应，包括神经毒性、肝肾毒性、免疫毒性和致癌性(Yazar and Omurtag, 2008; Chen et al., 2021)。在自然条件下，谷物中伏马菌素常与黄曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮等真菌毒素同时产生，引发联合毒性作用(Tolosa et al., 2021)。伏马菌素引起的疾病具有种属特异性，如猪肺水肿、马脑白质软化症、啮齿类动物肝肾毒性、人类食管癌和神经管缺陷等(Yazar and Omurtag, 2008)。伏马菌素 B1 (fumonisin B1, FB1)是一种含量最丰富、毒性最强的伏马菌素，被国际癌症研究机构(international agency for research on cancer, IARC)归为 2B 类致癌物(Ostry et al., 2017)，其化学结构如图 1 所示。现有研究表明 FB1 的毒性作用与诱导细胞凋亡、氧化应激、炎症反应及细胞因子的表达水平有关(Stockmann-Juvala and Savolainen, 2008; Kim et al., 2018; Chen et al., 2021)，但其免疫抑制作用的机制尚不完全清楚。

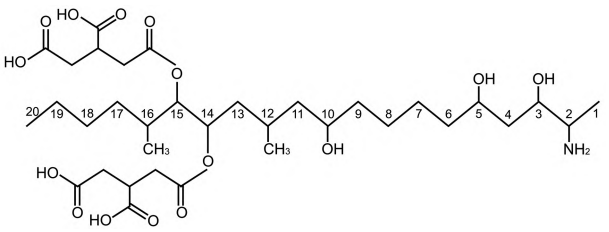


图 1　伏马菌素 B1 结构式

Figure 1　Structure of fumonisin B1

树突状细胞(dendritic cells, DCs)桥接先天免疫和适应性免疫，是机体内功能最强大的专职抗原提呈细胞，分为未成熟与成熟的两种分化和功能状态(Kvedaraite and Ginhoux, 2022)。未成熟树突状细胞(immature DCs, imDCs)主要存在于皮肤、肠道和呼吸道等组织中，具有很强的抗原摄取和处理加工能力。Li 等(2017)研究发现 FB1 能够重塑 DCs 的形态结构，并损伤抗原摄取、加工及提呈的能力，进而调节 DCs 介导的免疫反应。同时，脂类是细胞生物膜的重要组成成分，不仅调节生长发育、物质运输和能量转换等生理过程，而且与心血管疾病、肿瘤和神经退行性疾病等多种疾病的发生发展密切相关(缪秋韵 等, 2019; Harkins et al., 2021)。大量研究表明脂质积累和异常代谢不仅抑制 DCs 的分化成熟(Vazquez-Madrigal et al., 2020)、迁移能力(Kim et al., 2021)、抗原提呈和 T 细胞活化(Herber et al., 2010)等功能，而且影响细胞因子的分泌(Kim et al., 2021)，分析 FB1 对 DCs 的脂质代谢影响将有助于探究伏马菌素的免疫毒性作用模式，并对毒素中毒症的防治具有重要的指导意义。

脂质组学(lipidomics)是一种高通量分析技术，能够系统性地解析生物体或细胞的脂质组成和含量变化，进而阐明相关的生物学功能与机制(缪秋韵等, 2019; Han and Gross, 2022)。超高效液相色谱串联四极杆静电场轨道阱质谱(UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS)是脂质组学研究中的主流质谱分析技术，能够分析和鉴定复杂样品中多种痕量物质，已被广泛应用于多种生物体和细胞的脂质代谢分析(He et al., 2020; Wang et al., 2022)。本研究利用 FB1 处理 imDCs 后，采用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术筛选 imDCs 中的差异脂质分子，解析 FB1 对 imDCs 脂质代谢的影响，为揭示 FB1 的免疫抑制作用机制提供依据。

1　结果

1.1　imDCs 的形态特征

从小鼠(*Mus musculus*)骨髓中分离得到体积小并且呈圆形的骨髓细胞，用重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, rmGM-CSF)和重组小鼠白介素 4 (recombinant murine interleukin 4, rmIL-4)诱导培养。第 3 天时细胞表面突起逐渐增加，细胞呈簇状聚集生长，细胞体积增大。在细胞因子诱导下培养 7 d 后，得到 imDCs。在正置荧光显微镜下观察 imDCs 的形态特征(图 2)，发现细胞表面有许多短小的突起(图 2A)，呈典型的 imDCs 形态特征(图 2A~图 2C)。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

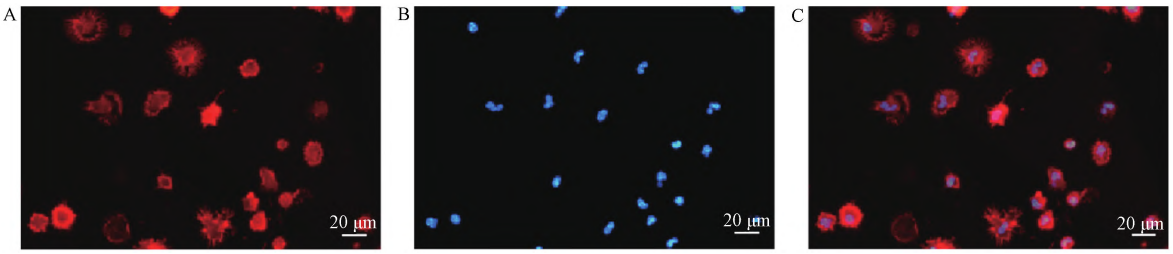


图 2　imDCs 在正置荧光显微镜下的形态特征

（A）imDCs 的纤维状肌动蛋白结构；（B）DAPI 染色后的 imDCs 的细胞核；（C）合并图

Figure 2　Morphological characteristics of imDCs under upright fluorescence microscope

（A）F-actin structure of imDCs；（B）Nuclei of imDCs stained with DAPI；（C）Merged image

1.2　FB1 处理的 imDCs 脂质分子的多维统计分析

在正、负离子模式下，从 imDCs 中共鉴定出 1 845个脂质分子，其中正离子代谢物 1 101 种，负离子代谢物 744 种。为了反映 FB1 处理组和对照组之间的总体分布趋势和变异度，采用主成分分析（principal component analysis，PCA）对两组 imDCs 的脂质代谢物数据进行分析，结果如图 3A 所示。本研究的 PCA 模型在 X 轴方向累积解释率值为 0.726，提示模型具有较高的稳定性和可靠性。为了排除样本分类以外的干扰使组间分离达到最大化，采用偏最小二乘法判别分析（partial least-squares discrimination analysis，PLS-DA）和正交偏最小二乘法判别分析（orthogonal partial least-squares discriminant analysis，OPLS-DA）筛选与分组相关的差异脂质分子，结果如图 3B 和图 3C 所示，两种方法均能够很好地区分两组样本，提示 FB1 处理组和对照组之间的脂质代谢轮廓差异显著。

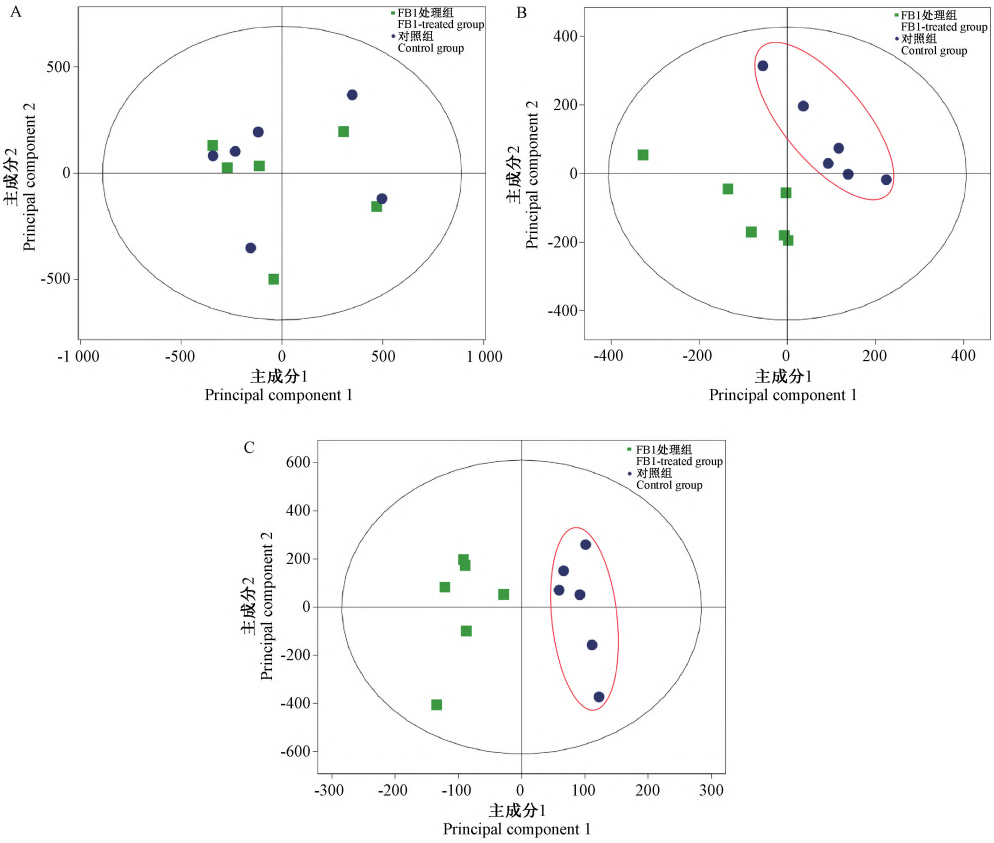


图 3　FB1 处理组和对照组间的模式识别分析

（A）PCA 得分图；（B）PLS-DA 得分图；（C）OPLS-DA 得分图

Figure 3　Pattern recognition analysis between FB1-treated group and control group

（A）The score chart of PCA；（B）The score chart of PLS-DA；（C）The score chart of OPLS-DA

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1.3　FB1 处理的 imDCs 显著性差异脂质分子的筛选

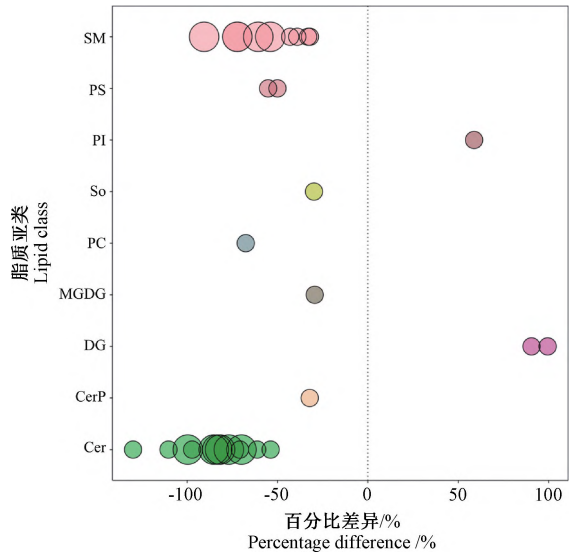
OPLS-DA 模型的变量权重值(variable importance for the projection, VIP)可以反映模型的影响强度和解释能力，以 VIP>1 及$P<0.05$ 作为标准筛选 FB1 处理的 imDCs 中具有生物学意义的差异脂质分子。结果显示，从 1 845 个脂质分子中筛选得到 30 个显著性差异脂质分子，归属为神经酰胺(ceramide, Cer)、磷酸神经酰胺(ceramide phosphate, CerP)、甘油二酯(diacylglycerol, DG)、单半乳糖甘油二酯(monogalactosyldiacylglycerol, MGDG)、磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)、鞘氨醇(sphingosine, So)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)和鞘磷脂(sphingomyelin, SM)等 9 个亚类(表 1，图 4)。

表 1　FB1 处理的 imDCs 的显著性差异脂质分子的数据分析

Table 1　Data analysis of lipid molecules in FB1-treated imDCs with significant differences

脂质加合离子形式 The adduct ion form of lipid	脂质分子式 Ion formula	理论质荷比 Cal M/Z	保留时间/分 Retention time/min	变异倍数 Fold change	*P* 值 *P*-value	变量权重值 VIP
DG(18:1_24:1)+NH_4	$C_{45}H_{88}O_5N$	722.666	16.775	2.978	3.007E-02	1.449
DG(16:0_24:1)+NH_4	$C_{43}H_{86}O_5N$	696.650	16.721	2.653	3.499E-02	1.105
SM(d34:1)+H	$C_{39}H_{80}O_6N_2P$	703.575	10.178	0.723	1.143E-02	6.803
SM(d33:1)+HCOO	$C_{39}H_{78}O_8N_2P$	733.550	9.598	0.716	1.903E-02	2.281
SM(d40:1)+HCOO	$C_{46}H_{92}O_8N_2P$	831.660	13.212	0.673	2.021E-02	4.068
SM(d34:1)+H	$C_{39}H_{80}O_6N_2P$	703.575	10.445	0.646	2.399E-02	2.200
PS(18:0_18:2)-H	$C_{42}H_{77}O_{10}NP$	786.529	10.575	0.600	4.958E-02	2.851
Cer(d18:0_24:1)+HCOO	$C_{43}H_{84}O_5N$	694.635	15.068	0.576	1.840E-02	1.481
SM(d35:1)+HCOO	$C_{41}H_{82}O_8N_2P$	761.581	10.727	0.575	1.749E-03	1.938
PS(18:0_22:5)-H	$C_{46}H_{79}O_{10}NP$	836.545	10.454	0.567	2.864E-02	2.970
SM(d41:1)+HCOO	$C_{47}H_{94}O_8N_2P$	845.675	13.746	0.534	4.096E-03	3.569
Cer(d18:1_24:1)+HCOO	$C_{43}H_{82}O_5N$	692.620	14.638	0.531	1.057E-02	2.483
Cer(d18:1_22:0)+HCOO	$C_{41}H_{80}O_5N$	666.604	14.727	0.482	1.595E-04	1.530
Cer(t18:0_24:1)+H-H_2O	$C_{42}H_{82}O_3N$	648.629	14.635	0.477	1.268E-02	3.051
SM(d43:4)+H	$C_{48}H_{92}O_6N_2P$	823.669	13.742	0.469	1.184E-04	1.131
SM(d38:1)+HCOO	$C_{44}H_{88}O_8N_2P$	803.628	12.205	0.469	4.299E-04	1.921
Cer(m19:0_23:2)+H	$C_{42}H_{82}O_2N$	632.634	15.940	0.444	1.950E-03	1.134
Cer(d18:1_16:0)+HCOO	$C_{35}H_{68}O_5N$	582.510	11.514	0.419	1.122E-03	2.066
Cer(m19:0_21:2)+H	$C_{40}H_{78}O_2N$	604.603	14.720	0.412	8.851E-05	1.198
Cer(m19:1_15:1)+H	$C_{34}H_{66}O_2N$	520.509	11.519	0.402	7.091E-04	1.451
SM(d36:1)+HCOO	$C_{42}H_{84}O_8N_2P$	775.597	11.239	0.376	1.909E-03	4.100
Cer(d18:1_24:2)+HCOO	$C_{43}H_{80}O_5N$	690.604	13.663	0.346	1.723E-02	1.756
Cer(d18:1_23:0)+HCOO	$C_{42}H_{82}O_5N$	680.620	15.326	0.335	4.707E-05	1.225
Cer(m19:0_23:4)+H	$C_{42}H_{78}O_2N$	628.603	13.642	0.289	3.278E-02	1.097
Cer(d18:1_18:0)+HCOO	$C_{37}H_{72}O_5N$	610.542	12.517	0.212	2.367E-02	1.041
So(t36:1)-CH_3	$C_{40}H_{80}O_8N_2P$	747.566	10.178	0.740	3.106E-02	5.717
PC(18:1e_20:1)+HCOO	$C_{47}H_{91}O_9NP$	844.644	13.486	0.495	1.436E-02	1.962
PI(18:3e_18:2)-H	$C_{45}H_{78}O_{12}P$	841.524	9.911	1.832	4.973E-02	1.935
MGDG(30:0e)-H	$C_{39}H_{75}O_9$	687.542	10.175	0.743	3.786E-02	1.031
CerP(m44:1)+HCOO	$C_{45}H_{89}O_7NP$	786.638	14.603	0.723	2.591E-02	1.023

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



气泡代表 imDCs 显著性差异脂质分子；气泡大小代表差异的显著性，气泡越大代表差异越显著。

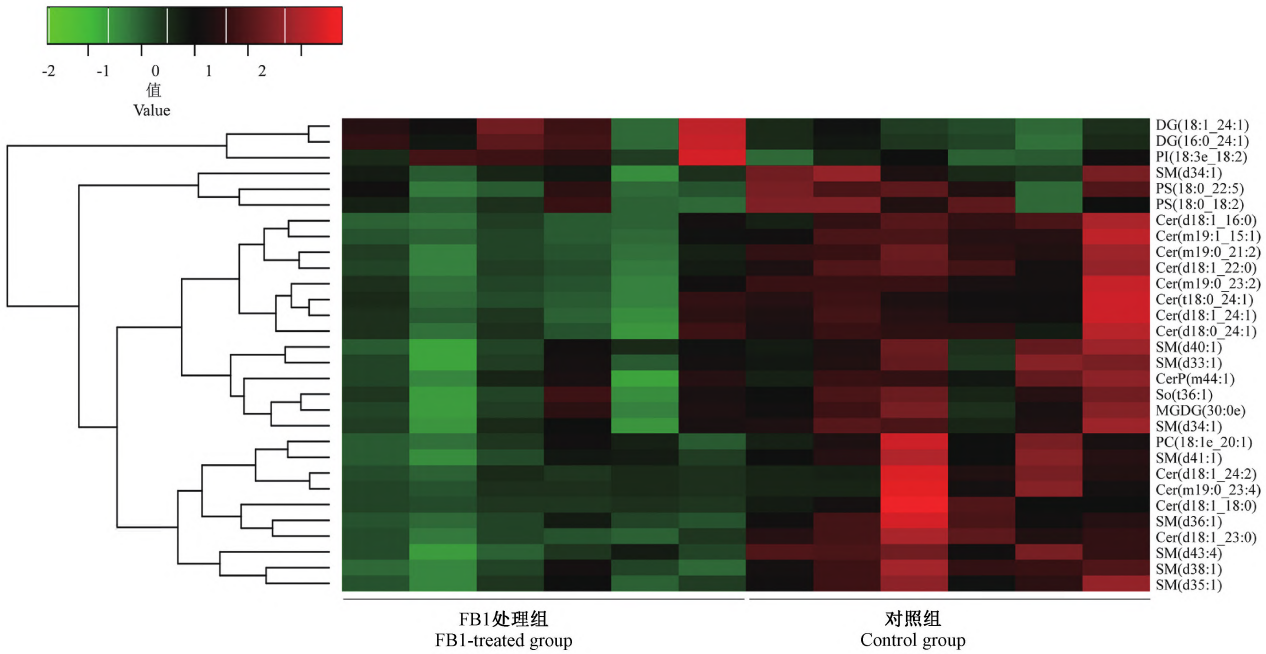
Bubbles represent the lipid molecules in imDCs with significant differences; The bubble size represents the significance of the difference, and the larger the bubble, the more significant the difference.

图 4　FB1 处理的 imDCs 显著性差异脂质分子的气泡图

Figure 4　Bubble chart of lipid molecules in FB1-treated imDCs with significant differences

1.4　FB1 处理的 imDCs 显著性差异脂质分子的聚类分析

为了全面直观地显示样本之间的关系并评价差异脂质分子的合理性，本研究利用 FB1 处理的 imDCs 显著性差异脂质分子（VIP>1，P<0.05）的表达量进行层次聚类分析。结果显示，FB1 处理组和对照组之间有明显的层次聚类，表明 imDCs 差异表达脂质分子在两组样本中的表达模式不同（图 5）。



绿色代表显著性下调的脂质分子，红色代表显著性上调的脂质分子；颜色深浅代表差异的显著性，颜色越深代表差异越显著。

The green color indicates lipid molecules down-regulated significantly, the red color indicates lipid molecules up-regulated significantly; The depth of the color represents the significance of the difference, and the darker the color, the more significant the difference.

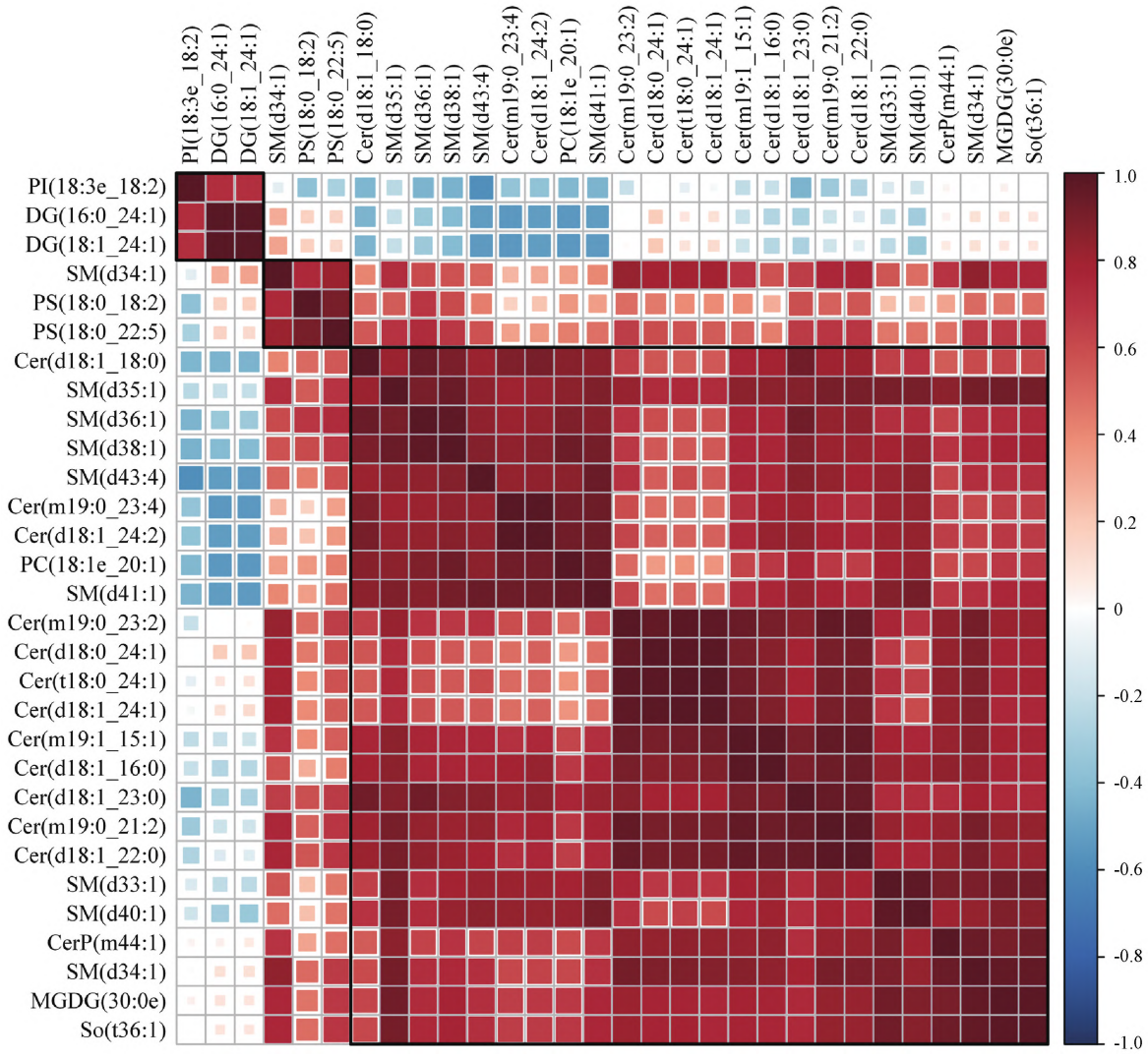
图 5　FB1 处理的 imDCs 显著性差异脂质分子的聚类热图

Figure 5　Clustering heatmap of lipid molecules in FB1-treated imDCs with significant differences

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1.5　FB1 处理的 imDCs 显著性差异脂质分子的相关性分析

为进一步了解 FB1 处理过程中 imDCs 的脂质亚类及脂质分子之间的相互关系，本研究通过相关性分析检测 imDCs 中显著性差异脂质分子（VIP＞1，P<0.05）之间的代谢密切程度。聚类热图表明 FB1 处理的 imDCs 显著性差异脂质分子之间存在高度相关性（图 6），和弦图显示除 PI 外的其他 8 个脂质亚类之间存在共调节关系（$|r|$>0.8，P<0.05）（图 7）。



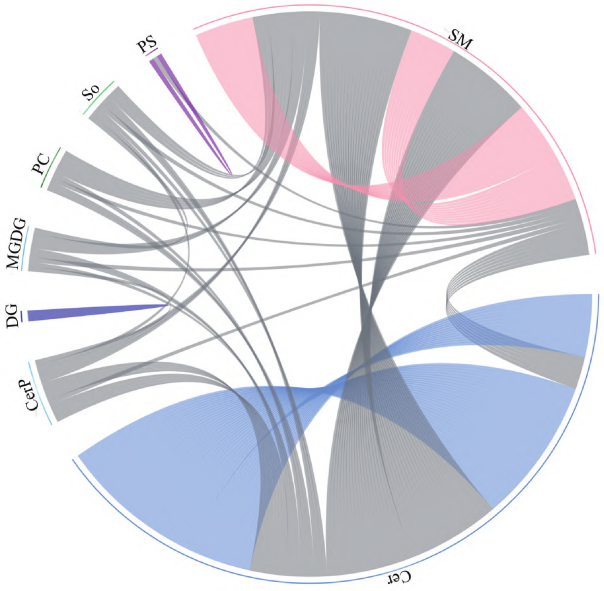
红色表示正相关，蓝色表示负相关；颜色深浅与相关性系数的绝对值大小有关，即正相关或负相关的程度越高，颜色越深。

The red color indicates positive correlation, whereas the blue color indicates negative correlation; The shade of color is related to the absolute value of the correlation coefficient (the higher the degree of positive or negative correlation, the darker the color).

图 6　FB1 处理的 imDCs 显著性差异脂质分子的相关性聚类热图

Figure 6　Correlation clustering heatmap of lipid molecules in FB1-treated imDCs with significant differences

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



外环上的弧线表示 imDCs 的显著性差异脂质亚类，内环连接线的起点表示有显著性差异的脂质分子；彩色线条表示亚类内部脂质分子的相关性，深灰色线条表示脂质不同亚类之间的相关性。

The curve on the outer circle represents the lipid subclasses in imDCs with significant differences, and the starting point of the connecting line on the inner circle represents the lipid molecules with significant differences; The colored lines show the correlation of lipid molecules in subclasses, whereas the gray lines show the correlation of lipid molecules between different subclasses.

图 7　FB1 处理的 imDCs 显著性差异脂质亚类之间的相关性分析

Figure 7　Correlation analysis of lipid subclasses in FB1-treated imDCs with significant differences

2　讨论与结论

目前，脂质组学分析一般采用液相色谱-质谱联用技术，检测方式上主要分为靶向和非靶向两类。由于非靶向分析能够无偏向地系统性解析样本中各种类型脂质的含量（缪秋韵 等，2019；Han and Gross，2022），本研究采用基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 的非靶向脂质组学技术结合 LipidSearch 软件分析 FB1 对 imDCs 脂质代谢的影响。在正、负离子模式下鉴定出 36 个亚类，1 845 个脂质分子，其中甘油磷脂类、鞘脂类和甘油脂类等脂质分子的数量较多。以 OPLS-DA 模型的 VIP>1 及 $P<0.05$ 作为标准，从 FB1 处理的 imDCs 中筛选出 30 个具有生物学意义的差异脂质分子，但有 6 个脂质分子的变异倍数（fold change）略大于 0.67。其中，DG 和 PI 的含量显著升高，而 Cer、CerP、MGDG、PC、So、PS 和 SM 的含量显著下降，表明 FB1 使 imDCs 的脂代谢出现紊乱。

磷脂双分子层是构成细胞膜的基本支架，主要由甘油磷脂与鞘磷脂两大类组成，可维持稳定的细胞结构，为膜蛋白的相互作用提供适宜的疏水环境，保障细胞内生命活动的有序进行（Zhang et al.，2021；Morita and Ikeda，2022）。大量研究表明细胞膜和细胞骨架之间存在紧密联系（Ehrhardt and Bezanilla，2013），细胞膜上富含胆固醇和鞘磷脂的脂筏在响应各种刺激时依赖于与细胞骨架的相互作用及细胞骨架的动态重组（Head et al.，2014），通过细胞极化、细胞迁移、生物物理学特性改变、力学和化学信号转导、免疫细胞活化等实现细胞的基本功能（Head et al.，2014；Parshina et al.，2019；Uray and Uray，2021）。本研究结果显示，FB1 处理的 imDCs 中甘油脂类 DG 的含量显著升高，但甘油磷脂类（PC 和 PS）和鞘脂类（Cer、CerP、So 和 SM）的含量均显著降低，暗示 FB1 使 imDCs 的细胞内环境稳态受到破坏，可能造成细胞形态结构改变，并影响物质运输、细胞代谢、信息交流和免疫反应等生理功能，其作用模式和分子机制还有待研究。

鞘脂有共同的鞘氨醇碱骨架，其由丝氨酸和长脂肪链的酰基辅酶 A 从头合成神经酰胺，之后转换为鞘氨醇、鞘磷脂、鞘糖脂和其他化合物（Grösch et al.，2012）。该途径的主要步骤：L-丝氨酸和棕榈酰辅酶 A 通过丝氨酸棕榈酰转移酶缩合形成 3-酮二氢鞘氨醇；在 3-酮二氢鞘氨醇还原酶作用下转化为二氢神经鞘氨醇（sphinganine，Sa）；经神经酰胺合成酶的 N-酰化形成二氢神经酰胺；在二氢神经酰胺去饱和酶的作用下转化为神经酰胺。鞘脂也是鞘磷脂类信号通路中重要的起始信号，可在鞘磷脂酶的作用下水解生成神经酰胺，同时，神经酰胺能够在鞘磷脂合酶作用下生成 SM，或经神经酰胺酶水解为 So 和游离脂肪酸（Stockmann-Juvala and Savolainen，2008；Levy and Futerman，2010）。FB1 与 So 和 Sa 结构相似，通过竞争性抑制神经酰胺合成酶来抑制鞘脂类的生物合成（Stockmann-Juvala and Savolainen，2008；Chen et al.，2021）。研究发现 FB1 可以抑制大鼠原代肝细胞中鞘脂类的生物合成，其主要原因是神经酰胺合成酶的作用受到抑制（van der Westhuizen et al.，1998），与本研究中 imDCs 鞘脂类分子的差异性表达结果相一致，说明 FB1 同样影响 imDCs 的鞘脂代谢途径。

神经酰胺作为细胞信号转导过程中重要的第二

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

信使，在细胞分化、内吞作用、黏附迁移和细胞骨架动力学等过程中发挥重要作用（Wegner et al., 2016; Jeffries and Krupenko, 2018）。有研究报道神经酰胺的蓄积是调控免疫细胞功能的关键，通过参与调节 DCs 的分化成熟和抗原提呈能力，介导中性粒细胞的胞外陷阱形成和细胞因子表达，调控巨噬细胞的氧化应激和凋亡以及在炎症过程中介导 T 细胞的反应，从而影响机体的免疫应答（Hollmann et al., 2016; Albeituni and Stiban, 2019）。Abuawad 等（2020）采用液相色谱-质谱联用方法分析 THP-1 细胞系诱导分化为巨噬细胞过程中的代谢谱，结果显示 M1 型和 M2 型巨噬细胞具有不同的代谢特征，其中鞘脂和嘧啶代谢在 M1 型巨噬细胞中的含量显著增加，被认为是 M1 巨噬细胞的潜在关键特征代谢物。Sun 等（2022）利用脂质组学和转录组学分析发现在虾过敏小鼠模型中，脾脏 DCs 中的脂代谢发生显著变化，并证实三油酸甘油酯和神经酰胺能够调节 DCs 的免疫功能。神经酰胺在细胞生长过程中起着重要作用，本研究通过脂质组学分析发现 FB1 处理的 imDCs 中 Cer 类差异代谢物 Cer（m19：0_21：2）+H、Cer（m19：0_23：2）+H、Cer（m19：0_23：4）+H、Cer（t18：0_24：1）+H-H_2O、Cer（m19：1_15：1）+H、Cer（d18：1_16：0）+HCOO、Cer（d18：1_18：0）+HCOO、Cer（d18：1_22：0）+HCOO、Cer（d18：1_23：0）+HCOO、Cer（d18：0_24：1）+HCOO、Cer（d18：1_24：1）+HCOO 和 Cer（d18：1_24：2）+HCOO 等含量显著降低（VIP>1，P<0.05），表明 FB1 能够干扰 imDCs 的神经酰胺合成与代谢，提示 FB1 的免疫抑制作用可能与鞘脂代谢异常有关。

综上，本研究基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 的非靶向脂质组学技术从 FB1 处理的 imDCs 中分析鉴定出 30 个具有生物学意义的差异脂质分子，其中显著相关的脂质亚类包括甘油脂类、甘油磷脂类、鞘脂类和糖脂类。研究结果显示 FB1 处理的 imDCs 中鞘磷脂和神经酰胺的含量显著下降（VIP>1，P<0.05），提示 FB1 可能通过影响 imDCs 的细胞膜结构调控其免疫学功能。推测 FB1 可能通过干扰 imDCs 的正常脂质代谢来发挥其免疫抑制作用，为进一步探究 FB1 免疫毒性的分子机制奠定了基础。

3　材料与方法

3.1　主要试剂及仪器

主要试剂及仪器：RPMI-1640 培养基［赛默飞世尔科技（中国）有限公司］、胎牛血清［赛默飞世尔科技（中国）有限公司］、FB1 毒素（青岛普瑞邦生物工程有限公司）、rmGM-CSF（美国 PeproTech 公司）、rmIL-4（美国 PeproTech 公司）、红细胞裂解液（北京索莱宝科技有限公司）、C18 色谱柱（Waters，ACQUITY UPLC CSH C18，1.7 μm，2.1 mm × 100 mm column）、乙腈［赛默飞世尔科技（中国）有限公司，色谱纯］、异丙醇［赛默飞世尔科技（中国）有限公司，色谱纯］、甲醇［赛默飞世尔科技（中国）有限公司，色谱纯］、13 种同位素内标（Cer，LPC，PC，LPE，PE，PI，PS，PA，PG，SM，CE，DG，TG）、Q-Exactive Plus 质谱仪［赛默飞世尔科技（中国）有限公司］、UHPLC Nexera LC-30A 超高效液相色谱仪（日本岛津公司）、正置荧光显微镜（日本尼康公司）。

3.2　实验动物

6~8 周龄的 C57BL/6J 小鼠，SPF 级，购自贵州医科大学实验动物中心，实验设施合格证编号为 SYXK（黔）2018-0001。本研究中动物实验经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准（No. 1702104）。

3.3　实验方法

选取 6~8 周龄 C57BL/6J 小鼠麻醉处死，分离小鼠骨髓细胞，根据常规诱导培养方法获得 imDCs（Liu et al., 2021）。培养骨髓细胞，加入 rmGM-CSF（终浓度为 20 ng/mL）和 rmIL-4（终浓度为 10 ng/mL），置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。隔日半量换液，并加入相应细胞因子培养至第 7 天，再经 CD11c 磁珠阳性分选后得到 imDCs。分别用 PBS（对照组）和 50 μmol/L FB1（FB1 处理组）与 imDCs 细胞共培养 48 h 后，收集细胞计数。对照组和 FB1 处理组分别准备 6 组样本，每组样本的细胞数目为 1×10^7 个，使用 0.9% NaCl 溶液洗涤细胞一次，弃上清液后，用液氮速冻细胞沉淀。分别加入 200 μL ddH_2O 和 20 μL 内标混合物，充分匀浆后加入 800 μL 甲基叔丁基醚溶液；用涡旋混合仪充分混匀，加入 240 μL 预冷的色谱纯甲醇溶液；再次用涡旋混合仪混匀，在低温水浴中超声处理 20 min，在室温条件下静置 30 min；在 10 ℃条件下，14 000 r/min 离心 15 min；吸取液体上层的有机相，用氮气将其吹干。在进行质谱分析时，加入 200 μL 90% 色谱纯异丙醇和乙腈溶液溶解，用涡旋混合仪充分混匀，取 90 μL 溶液在 10 ℃、14 000 r/min 条件下离心 15 min，取上清液进行分析。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3.4 色谱分离

采用 UHPLC Nexera LC-30A 超高效液相色谱仪分离所制备的样品。选取 C18 色谱柱，设置柱温为 45 ℃，固定流速为 300 μL/min。流动相组成 A 为乙腈水溶液，即乙腈与水按 6∶4的体积比混合；流动相组成 B 为乙腈异丙醇溶液，即乙腈与异丙醇按 1∶9的体积比混合。梯度洗脱程序：0～2 min，30% 流动相组成 B；2～25 min，流动相组成 B 从 30% 线性增加至 100%；25～35 min，30% 流动相组成 B。在整个分析过程中使用 10 ℃自动进样器将样品吸入，并采用随机顺序对样本进行连续分析。

3.5 质谱分析

质谱检测时分别采用电喷雾电离（electrospray ionization，ESI）的正离子和负离子模式。制备的样品经色谱分离后进行质谱分析，由 Q-Exactive Plus 质谱仪完成。ESI 源条件设置：加热器温度（heater temp）为 300 ℃，鞘气流速（sheath gas flow rate）为 45 arb，辅助气流速（aux gas flow rate）为 15 arb，吹扫气流速（sweep gas flow rate）为 1 arb，喷雾电压（spray voltage）为 3.0 kV，毛细管温度（capillary temp）为 350 ℃，S-lens RF 水平（S-lens RF level）为 50%，全扫描范围（MS^1 scan ranges）为 200～1 800。在采集脂质碎片和脂质分子的质荷比时，每次完成全扫描后收集 10 个脂质碎片的图谱（MS^2 scan，HCD）。在质荷比为 200 时，MS^1 的分辨率为 70 000，MS^2 的分辨率为 17 500。

4 统计学分析

采用 LipidSearch 软件对检测得到的原始数据进行预处理、质量评估和数据分析。采用 OPLS-DA 模型将对照组和 FB1 处理组样本进行区分，再根据 VIP>1 筛选出差异代谢脂质分子，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

作者贡献

唐开义和于欢是实验研究、数据分析和论文撰写的主要完成人；喻艳琴、欧沙和王赟协助完成数据整理和分析；曾柱和胡祖权提供经费支持，负责实验设计和论文修改。全体作者都已阅读并同意最终的文本。

参考文献

缪秋韵，高雯，李杰，等，2019.脂质组学分析方法进展及其在中药研究中的应用.中国中药杂志，44(9)：1760-1766.［MIAO Q Y，GAO W，LI J，et al.，2019. Progress on lipidomics analytical methods and their applications in studies of traditional Chinese medicines. China Journal of Chinese Materia Medica，44(9)：1760-1766.］

ABUAWAD A，MBADUGHA C，GHAEMMAGHAMI A M，et al.，2020. Metabolic characterisation of THP-1 macrophage polarisation using LC-MS-based metabolite profiling. Metabolomics，16(3)：33.

ALBEITUNI S，STIBAN J，2019. Roles of ceramides and other sphingolipids in immune cell function and inflammation. Adv. Exp. Med. Biol.，1161：169-191.

CHEN J，WEI Z，WANG Y，et al.，2021. Fumonisin B1：mechanisms of toxicity and biological detoxification progress in animals. Food Chem. Toxicol.，149：111977.

EHRHARDT D W，BEZANILLA M，2013. Patterning the cell：membrane-cytoskeleton crosstalk. Curr. Opin. Plant Biol.，16(6)：675-677.

GRÖSCH S，SCHIFFMANN S，GEISSLINGER G，2012. Chain length-specific properties of ceramides. Prog. Lipid Res.，51(1)：50-62.

HAN X L，GROSS R W，2022. The foundations and development of lipidomics. J. Lipid Res.，63(2)：100164.

HARKINS D，COOPER H M，PIPER M，2021. The role of lipids in ependymal development and the modulation of adult neural stem cell function during aging and disease. Semin. Cell Dev. Biol.，112：61-68.

HE C，SUN Z X，QU X C，et al.，2020. A comprehensive study of lipid profiles of round scad（*Decapterus maruadsi*）based on lipidomic with UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS. Food Res. Int.，133：109138.

HEAD B P，PATEL H H，INSEL P A，2014. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton：impact on signaling and function：membrane/lipid rafts，mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. Biochim. Biophys. Acta，1838(2)：532-545.

HERBER D L，CAO W，NEFEDOVA Y，et al.，2010. Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. Nat. Med.，16(8)：880-886.

HOLLMANN C，WERNER S，AVOTA E，et al.，2016. Inhibition of acid sphingomyelinase allows for selective targeting of $CD4^+$ conventional versus $Foxp3^+$ regulatory T cells. J. Immunol.，197(8)：3130-3141.

JEFFRIES K A，KRUPENKO N I，2018. Ceramide signaling and p53 pathways. Adv. Cancer Res.，140：191-215.

KIM D，CHUNG H，LEE J E，et al.，2021. Immunologic aspects of dyslipidemia：a critical regulator of adaptive immunity and immune disorders. J. Lipid Atheroscler.，10(2)：184-201.

KIM S H，SINGH M P，SHARMA C，et al.，2018. Fumonisin B1

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

actuates oxidative stress-associated colonic damage via apoptosis and autophagy activation in murine model. J. Biochem. Mol. Toxicol., 2018: e22161.

KVEDARAITE E, GINHOUX F, 2022. Human dendritic cells in cancer. Sci. Immunol., 7(70): eabm9409.

LEVY M, FUTERMAN A H, 2010. Mammalian ceramide synthases. IUBMB Life, 62(5): 347-356.

LI Y H, FAN Y H, XIA B B, et al., 2017. The immunosuppressive characteristics of FB1 by inhibition of maturation and function of BMDCs. Int. Immunopharmacol., 47: 206-211.

LIU X M, XIA X, WANG X F, et al., 2021. Tropomodulin1 expression increases upon maturation in dendritic cells and promotes their maturation and immune functions. Front. Immunol., 11: 587441.

MORITA S Y, IKEDA Y, 2022. Regulation of membrane phospholipid biosynthesis in mammalian cells. Biochem. Pharmacol., 206: 115296.

OSTRY V, MALIR F, TOMAN J, et al., 2017. Mycotoxins as human carcinogens-the IARC monographs classification. Mycotoxin Res., 33(1): 65-73.

PARSHINA E Y, YUSIPOVICH A I, BRAZHE A R, et al., 2019. Heat damage of cytoskeleton in erythrocytes increases membrane roughness and cell rigidity. J. Biol. Phys., 45(4): 367-377.

STOCKMANN-JUVALA H, SAVOLAINEN K, 2008. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. Hum. Exp. Toxicol., 27(11): 799-809.

SUN S F, LUO J Z, DU H, et al., 2022. Widely targeted lipidomics and transcriptomics analysis revealed changes of lipid metabolism in spleen dendritic cells in shrimp allergy. Foods, 11(13): 1882.

TOLOSA J, RODRÍGUEZ-CARRASCO Y, RUIZ M J, et al., 2021. Multi-mycotoxin occurrence in feed, metabolism and carry-over to animal-derived food products: a review. Food Chem. Toxicol., 158: 112661.

URAY I P, URAY K, 2021. Mechanotransduction at the plasma membrane-cytoskeleton interface. Int. J. Mol. Sci., 22(21): 11566.

VAN DER WESTHUIZEN L, SHEPHARD G S, SNYMAN S D, et al., 1998. Inhibition of sphingolipid biosynthesis in rat primary hepatocyte cultures by fumonisin B1 and other structurally related compounds. Food Chem. Toxicol., 36(6): 497-503.

VAZQUEZ-MADRIGAL C, LOPEZ S, GRAO-CRUCES E, et al., 2020. Dietary fatty acids in postprandial triglyceride-rich lipoproteins modulate human monocyte-derived dendritic cell maturation and activation. Nutrients, 12(10): 3139.

WANG H F, WU Y Y, XIANG H, et al., 2022. UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS-based untargeted lipidomics reveals molecular mechanisms and metabolic pathways of lipid changes during golden pomfret (*Trachinotus ovatus*) fermentation. Food Chem., 396: 133676.

WEGNER M S, SCHIFFMANN S, PARNHAM M J, et al., 2016. The enigma of ceramide synthase regulation in mammalian cells. Prog. Lipid Res., 63: 93-119.

YAZAR S, OMURTAG G Z, 2008. Fumonisins, trichothecenes and zearalenone in cereals. Int. J. Mol. Sci., 9(11): 2062-2090.

ZHANG S Y, ZHOU Z R, QIAN R C, 2021. Recent progress and perspectives on cell surface modification. Chem. Asian J., 16(21): 3250-3258.

(责任编辑 庞晓鑫)
(实习编辑 王伟莉)

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net