

文章编号: 1004-0374(2011)06-0583-09

鞘糖脂研究进展

王艳萍, 王 征, 朱 健, 俞云会, 许秀坤, 李云森*

(苏州大学生物医学研究院, 苏州 215123)

摘 要: 鞘糖脂位于细胞膜脂质双分子层, 是哺乳动物细胞膜上的必需组成成分之一, 参与细胞的多种生物学活动, 其生物学功能非常复杂。在免疫应答、细胞发育、细胞识别及分化中都发挥重要的作用。组织器官中鞘糖脂的异常表达往往与各种疾病具有明显的相关性。因此鞘糖脂的结构表征、构效关系研究以及与之相关的鞘糖脂生物合成及分解代谢途径的研究已成为近年来的热点问题。最近研究也表明鞘糖脂在疾病的发生发展及治疗过程中都具有至关重要的作用。对鞘糖脂的结构与功能的关系、糖脂的合成代谢以及糖脂的分离分析方法作一综述。

关键词: 鞘糖脂; 分离分析; 功能; 疾病; 合成代谢

中图分类号: **文献标志码:** A

Progress in study of glycosphingolipids

WANG Yan-Ping, WANG Zheng, ZHU Jian, YU Yun-Hui, XU Xiu-Kun, LI Yun-Sen*

(Institutes of Biology and Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: Glycosphingolipids locate in the bilayer lipid membrane. They are important compositions of the membrane of mammals. Their biological function is very complex. They play important roles in the immune response, cell growth, cell recognition, differentiation, etc. The abnormal expressions of glycosphingolipids in various tissues often have obvious associations with diverse diseases. Therefore, structure characterization, QSAR studies, biosynthesis and catabolic pathways of glycosphingolipids have become hot issues in recent years. And the up-to-date studies have shown that glycosphingolipids play an crucial role in the development and treatment of diseases. The current papers about structure, function, biosynthesis and metabolism of glycosphingolipids are summarized.

Key words: glycosphingolipids; separation and characterization; function; diseases; biosynthesis and metabolism

糖脂 (glycolipids) 是糖类通过其还原末端以糖苷键的形式与脂类结合在一起形成的化合物的总称, 广泛分布于动物, 高等植物的花、果、叶, 藻类和微生物等生物体中, 是细菌到人类细胞膜结构的重要组成部分。糖脂的种类比较多, 根据不同类型糖脂结构的不同, 其在生物体中的作用有所不同, 其中研究得较为深入和广泛的是糖鞘脂 (glycosphingolipids)。近年来, 随着生物化学和分子生物学等的发展, 以及新型分离分析技术的涌现, 鞘糖脂的结构、功能及应用研究都取得了很大的进步, 本文将依次从鞘糖脂的结构与功能、疾病的关系, 糖脂的分离分析技术以及鞘糖脂的生物合成代谢等方面对近年来的研究进展作详细的总结。

1 鞘糖脂的结构及生物代谢

1.1 鞘糖脂的结构

鞘糖脂由一个神经酰胺的骨架与一个或多个糖基连接形成 (图 1), 主要包含疏水的脂肪链以及亲水的糖链两部分, 以便其在嵌入细胞膜脂双层的同时将糖链构成的极性端伸向细胞质膜外, 从而成为细胞表面具有生物活性的标志。鞘糖脂的神经酰胺部分由神经鞘氨醇和脂肪链组成, 而糖链的组成较

收稿日期: 2011-01-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000370)

*通信作者: E-mail: yunsenli@suda.edu.cn

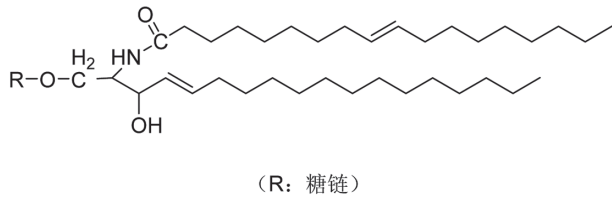


图1 鞘糖脂结构

复杂, 所含基团有 D- 葡萄糖、D- 半乳糖、D- 乙酰氨基葡萄糖、D- 乙酰氨基半乳糖、L- 岩藻糖、D- 甘露糖及唾液酸 (SA) 等。根据糖链组成的不同可将鞘糖脂分为三类: 仅含一个糖基的脑苷脂, 不含唾液酸的非硫酸化的中性鞘糖脂以及含有唾液酸或 / 且被硫酸化的酸性鞘糖脂。其中脑苷脂可被硫酸化成硫苷脂, 而结构复杂的中性或酸性鞘糖脂可由多个单糖组成糖链。鞘糖脂的组成、结构和分布具有组织专一性和专属性, 它们大多数作为细胞膜的组成成分存在于动物组织、海绵和真菌中。虽然某些植物中也含有一些鞘糖脂, 但总体来看鞘糖脂在植物界中的分布并不普遍。另外, 神经节苷脂在神经系统中的含量尤为丰富。

1.2 鞘糖脂的生物合成

根据其核心结构不同, 鞘糖脂主要分为 Gala-、Globo(Gb)-、isoglobo(iGb)-、Ganglio(Gg)-、lacto(Lc)-、Neolacto(nLc)-、Arthro(Ar)- 以及 Mollu(MI)- 等 8 类。

不同类型的鞘糖脂都各自具有不同的合成路径及合成酶。

1.2.1 中性鞘糖脂

中性鞘糖脂是指不含唾液酸的鞘糖脂, 其生物合成是通过在神经酰胺分子上顺序添加单糖而合成寡糖链, 并且该过程是在真核细胞的内质网和高尔基体中进行的。神经酰胺是鞘糖脂和鞘磷脂的共同母体, 是合成鞘糖脂的前提基础, 其在内质网膜中的形成过程如图 2 所示。

神经酰胺形成以后, 在高尔基体中一系列糖基转移酶的催化作用下进行糖基化反应, 生成系列相关中性鞘糖脂, 生物体中主要的中性鞘糖脂合成途径及相关合成酶如图 3 所示^[1]。

1.2.2 酸性鞘糖脂

酸性鞘糖脂是指含一个或者多个唾液酸的鞘糖脂, 其中神经节苷脂 (gangliosides) 是酸性鞘糖脂中的重要成员, 主要存在于神经组织、脾脏与胸腺中。图 4 是以神经节苷脂 (gangliosides) 为代表的酸性鞘糖脂

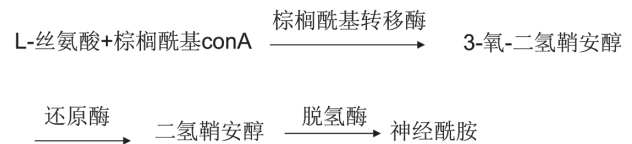


图2 神经酰胺在内质网中形成过程

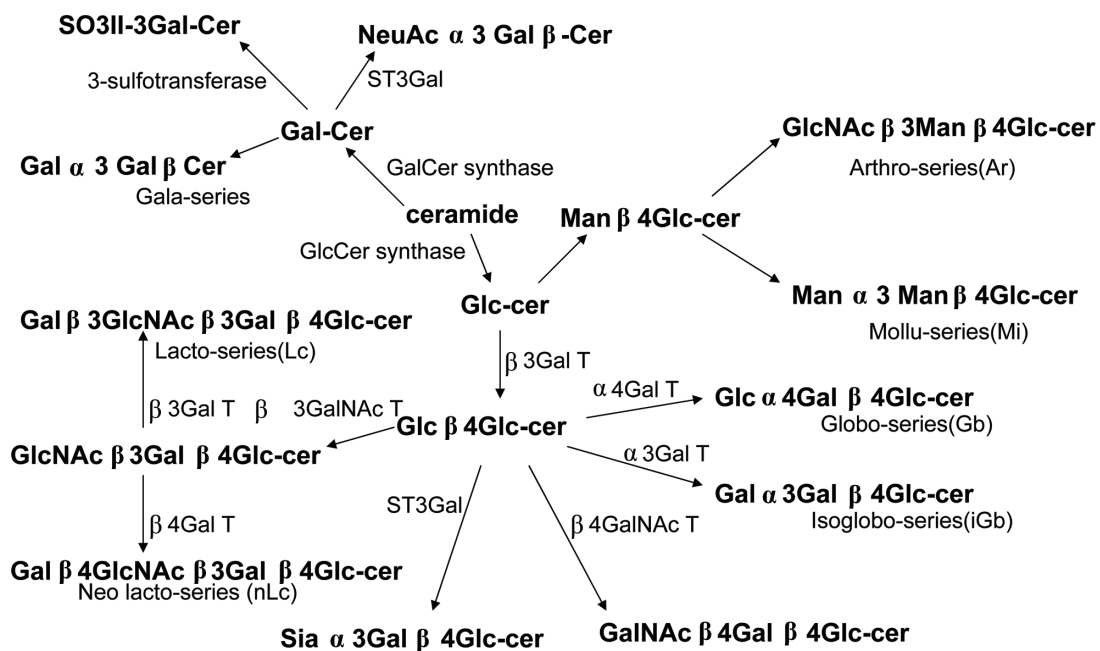


图3 鞘糖脂生物合成路径

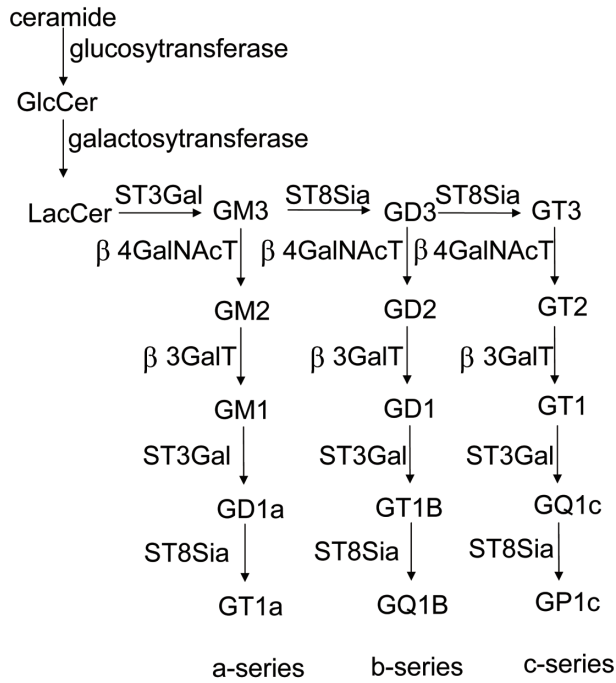


图4 神经节苷脂生物合成路径

糖脂的常见生物合成路径^[2]。

1.3 鞘糖脂分解代谢

1.3.1 溶酶体途径

鞘糖脂的分解代谢主要发生在包涵体和溶酶体中, 这是一个逐步进行的有序的过程。首先, 鞘糖脂要到达包涵体、溶酶体, 其中有许多种不同的途径, 对于一些比较大的结构, 比如含有许多糖脂的衰老细胞, 可以由巨噬细胞等吞噬到胞内; 或者通过受体介导的细胞内吞作用, 由低密度脂蛋白(LDL)将糖脂运输到胞内。在大多数细胞中, 还有一种重要的方式, 就是细胞膜的内吞作用^[3-4]: 聚集了大量鞘糖脂的一部分细胞膜发生内陷, 进入胞质后融合形成早期的内涵体, 在这里早期内涵体经过筛选, 大部分确定要分解的糖脂就会通过小囊泡运输到达溶酶体, 而一小部分需要再利用的鞘糖脂则会逃离溶酶体的分解途径, 直接进入鞘糖脂的合成途径^[5-7]。进入到溶酶体的鞘糖脂的糖链部分, 会从非还原性末端逐个由糖苷外切酶水解释放出来。与糖链合成酶不同, 糖链水解酶不会结合在膜上, 但是它们的作用底物鞘糖脂都是结合在膜上的, 所以糖链的水解需要特异性鞘糖脂激活蛋白(SAPs)来协助糖苷酶与它们的作用底物进行反应。现在已知的有五种SAPs: saposin-A、-B、-C、-D和GM2-activator protein, 在体外实验中, 这些蛋白的作用可由去污剂代替。

在溶酶体中, 葡糖神经酰胺会被葡糖脑苷脂酶

(GBA1)降解为神经酰胺和葡萄糖, 然后神经酰胺则被酸性神经酰胺酶分解为神经鞘氨醇和脂肪酸。神经鞘氨醇可以经过再酰化作用生成神经酰胺或者作为1-磷酸鞘氨醇(S1P)合成酶的底物合成S1P。

1.3.2 非溶酶体途径

非溶酶体途径的鞘糖脂分解代谢常常与信号转导有关, 代谢产物可以作为信号分子参与信号通路的调节。目前, 对非溶酶体途径的鞘糖脂分解代谢的报道尚不多见。最近, GBA2葡糖苷酶被认为可能会参与非溶酶体途径的鞘糖脂分解代谢。该糖苷酶对抑制剂CBE不敏感, 且在中性条件下具有最强活性。在表达GBA2的细胞培养液中加入带有荧光的作用底物, 可以观察到瞬间的GBA2活性, 这表明GBA2可能锚定在细胞膜的外侧。与溶酶体分解代谢途径不同, 荧光标记的葡糖神经酰胺被GBA2分解后产生的神经酰胺迅速地又生成了神经鞘磷脂, 而不是继续分解成为神经鞘氨醇与脂肪酸, 这说明GBA2与SMS2相伴而生^[8-9]。另外, lactasephlorizin hydrolase(LPH, family 1)是一种对CBE敏感的β-葡糖苷酶, 它结合在细胞膜的外侧, 并且只表达于肠道微绒毛的上皮细胞, 因此LPH很可能是在肠道内消化食物中的鞘糖脂, 这也被视为非溶酶体途径的鞘糖脂分解代谢。LPH能够水解半乳糖神经酰胺、乳糖神经酰胺、葡糖神经酰胺等, 但却不能水解GM1。

1.3.3 分解代谢的调节

鞘糖脂的分解代谢与人们的健康有着非常大的关联, 在鞘糖脂分解代谢中任何一个阶段的微小的异常都会导致疾病的发生。而调控整个分解代谢网络的就是各种分解酶, 当这些酶出现异常时, 就会出现各种疾病。例如, 大多数的异常鞘糖脂代谢病人存在GBA1的基因缺陷, 属于I类代谢病。在这些病人当中, GBA1的作用底物葡糖神经酰胺有选择性的只在组织巨噬细胞中积累, 这些细胞被称为Gaucher细胞。大量Gaucher细胞出现在各种组织中, 与周围的吞噬细胞一起不断分泌一些水解酶和细胞因子, 如chitotriosidase和CCL-18, 就会导致病人出现肝脾肿大、各类血细胞减少、骨骼恶化等临床症状^[10-11]。目前, 许多糖脂分解相关酶的小分子抑制剂或伴侣分子作为研究工具被广泛应用, 其具有治疗糖脂相关疾病的潜在价值。

2 鞘糖脂的主要功能

鞘糖脂作为细胞膜不可缺少的组成部分, 其生

物学功能非常复杂。在免疫应答、细胞发育、细胞识别及分化中都发挥重要的作用。目前对鞘糖脂的功能研究主要集中在以下几个方面：影响细胞活性、影响细胞的黏附分化、影响细胞耐药性、影响疾病的发展与转移等。下面将对中性鞘糖脂和酸性鞘糖脂近年来的相关功能研究分别作一总结。

Zhao 等^[12]通过细胞毒性实验发现肝癌中异常表达的岩藻糖基化中性鞘糖脂对 NK 细胞和 LAC 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性有明显的抑制作用。Zhang 等^[13]发现岩藻糖链可以促进肝癌细胞对层黏蛋白 (Ln) 和纤连蛋白 (Fn) 的黏附作用；岩藻糖基化的中性鞘糖脂 lewis^y 与人乳腺癌 RMG-1 细胞系的生存生长增殖以及卵巢癌细胞黏附的生物学行为有关^[14-15]，过表达的 lewis^y 促进乳腺癌细胞系生存生长繁殖。此外 Wu 等发现岩藻糖链如 lewis^x 可以促进肝癌的发展与转移^[16]，作为 DC-SIGN 的高亲和力配体，Lewis^x 可能有促使 T 细胞向 Th2 细胞方向分化的作用^[17-19]。Liu 等^[19]研究发现鞘糖脂，尤其是 globo 系列的鞘糖脂 (Gb3 和 Gb4)，可以通过活化 cSrc 激酶以及降低 β 连环蛋白信号通路上调 MDR1 的表达而促进肿瘤细胞耐药。此外，近年来大量的研究表明，不同类型的鞘糖脂可以作为 NKT 细胞的外源性或内源性配体，NKT 细胞经其活化后能够分泌 IFN- γ 、IL-4 和 IL-13 等多种细胞因子，在抗肿瘤、抗病毒感染、自身免疫耐受和自身免疫性疾病中发挥着重要作用：一种来源于海洋生物海绵提取物的糖脂类物质—— α -半乳糖神经酰胺 (α -galactosylceramide, α -GalCer) 具有直接激活 NKT 细胞的能力，是公认的 NKT 细胞外源性配体，同时大量动物实验也证实了 α -GalCer 在抗肿瘤及调节自身免疫性疾病过程中的积极作用；近来，Zhou 等^[20-21]的研究报道表明鞘糖脂 iGb₃ 是 NKT 细胞的内源性配体，并进一步研究发现其经 CD1d 分子提呈给 NKT 细胞来刺激 NKT 细胞产生免疫应答。

同样，酸性鞘糖脂的生物学功能近年来也得到了深入的研究，并取得了大量的成果。有研究报道酸性鞘糖脂糖链的末端唾液酸残基对肿瘤细胞黏附至 Ln 及细胞趋化性侵袭至为重要，而且是肿瘤细胞黏附至人脐静脉内皮细胞以及趋化性迁移的关键性残基^[13]。此外 Sle^x 还在小鼠胚胎植入以及在胚胎和子宫内膜的识别过程中也发挥重要作用^[22]，Zhang 等^[23]通过转染合成 Sle^x 的 *FUT7* 基因入昆明鼠中上调 Sle^x 的表达，发现 Sle^x 具有增强胚胎植入的作用。Nakamura 等^[24]发现在骨髓性白血病细胞

系 HL60 向单核细胞与粒细胞分化的过程中出现了 GM3 和 NeuAc-nLC 的表达的变化，当 HL60 向单核细胞分化时，GM3 明显上调，NeuAc-nLC 表达下降；而当其向粒细胞分化时，GM3 和 NeuAc-nLC 的表达与之前相反，表明 GM3 和 LC3 可能是决定人骨髓细胞分化方向的最重要的决定簇之一。新近的研究使用更精确的检测方法发现 ganglio 系列的鞘糖脂，如 GM3、GM1、GM2 等在人胚胎干细胞的分化后均明显上调^[25]。

另外，鞘糖脂中神经酰胺是作为细胞信号通路的第二信使存在，可以调节细胞分化、衰老、死亡。通过体内和体外纳米脂质体神经酰胺抗血管生成及其抗肿瘤药效的测定，发现其可以抑制血管发生并诱导肿瘤细胞凋亡，可以在无胸腺小鼠体内抑制肝癌细胞的生长^[26-28]。

3 鞘糖脂与疾病的关系

鞘糖脂之所以与多种疾病都存在一定的关联是由鞘糖脂功能的多样化引起的。目前对疾病组织中鞘糖脂的类别及含量变化的研究发现，在疾病的发生发展过程中往往会伴随着以下两种类型的糖脂异常化：(1) 出现了正常组织中缺失的糖链结构；(2) 某些糖链结构在病变组织中有较高的表达并构成重要的疾病相关抗原。这些糖脂异常表达现象的产生可能会是某些疾病的诱发因素，也可能是某些疾病发生后引发的糖脂代谢异常，但无论是前者还是后者，搞清楚鞘糖脂的变化与某种疾病的内在联系，对该疾病的预防或治疗都有重要的意义。因此，近年来鞘糖脂与疾病的关系也成为了一大研究热点。下面将针对肿瘤、神经性疾病以及糖脂代谢异常引起的遗传性疾病等比较热门的几类疾病与糖脂的关系分别展开论述。

3.1 鞘糖脂与肿瘤

自 1968 年 Hakomori 等开始研究鞘糖脂与肿瘤的关系开始，后续的大量研究和报道均表明肿瘤细胞膜表面鞘糖脂的组成和代谢都会发生变化，如出现新的鞘糖脂抗原、鞘糖脂结构的改变或鞘糖脂谱简单化等^[29]。这些变化与肿瘤的发生发展具有明显的相关性，可以作为肿瘤的标志物。在肿瘤组织中高表达的某些鞘糖脂通常具有较强的特异性，能够诱导信号转导，加速肿瘤转移等。而抑制相关鞘糖脂的高表达则会对肿瘤的发展有明显的缓和效果，并有助于阻断肿瘤的转移途径^[30]，这就为肿瘤的诊断和治疗提供了线索。如 Yogeewaran 和 Salk^[31]的

研究发现恶性程度高或高转移潜能细胞的鞘糖脂糖链的唾液酸化水平增高, 说明唾液酸鞘糖脂可能会促进肿瘤细胞的转移恶化。研究发现 Sle^x 可能通过 P27 来调节肿瘤细胞的生长, 当转染合成 Sle^x 的 *FUT7* 基因后, Sle^x 含量增加使 P27 下调从而加速肿瘤细胞的生长; *FUT7* 基因被沉默后, Sle^x 的表达降低并通过 P27 的上调减慢肿瘤细胞的生长速度^[32-33]。本实验室也利用薄层色谱及质谱等技术验证了肝癌组织中岩藻糖基化鞘糖脂的高表达和白血病患者骨髓样本中 LC3 的高表达。另外, 肿瘤组织中某些鞘糖脂的缺失也与肿瘤的发展变化相关。如 Zhang 等^[34] 发现肾癌患者的肾中不含有正常人肾所具有的长糖链的红细胞糖苷脂 (globoside), 说明中性糖脂中的 globoside 与肾组织的恶变可能有很大的相关性。总之, 无论组织器官中发生个别鞘糖脂的高表达还是缺失, 都可能造成这些器官的恶化甚至癌变, 鞘糖脂与肿瘤的发生发展以及治疗都有密切的联系。

3.2 鞘糖脂与神经性疾病

鞘糖脂与神经性的疾病也有着紧密的联系^[35]。如 Jennemann 等^[36] 在小鼠的实验中, 去除糖基转移酶相关基因, 使小鼠的鞘糖脂不能正常代谢, 发现小鼠会出现严重的神经性疾病, 并很快的死亡。许多研究者认为, 神经性疾病, 如帕金森综合征和阿尔茨海默病的产生或许与鞘糖脂的变化有着不可忽视的关系。Marks 等^[37] 发现阿尔茨海默病患者的葡萄糖神经酰胺合成酶 GCS 活力降低, 使神经组织内的神经酰胺的水平上升, 而鞘糖脂的水平下降, 从而影响病人的神经系统。

3.3 糖脂代谢异常可以造成遗传性疾病

Kolter 和 Sandhoff^[38] 的研究表明, Tay-sachs 病、Fabry 病和 Gaucher 病等遗传性疾病的产生均是因为细胞溶酶体中缺乏有关鞘糖脂分解代谢的酶。这些酶的缺失又可以引起神经节苷脂的堆积^[39-40], 从而引发疾病。例如, Fabry 病是因为机体内缺少 α -半乳糖苷酶 A, 导致神经节苷脂尤其是 Gb3 的堆积引起的^[41], 因此它也被归类为神经鞘脂贮积症类疾病^[42]; 而 Gaucher 病则是由于 β -葡萄糖苷酶 (β -glucocerebrosidase) 的缺损, 使葡萄糖神经酰胺过度表达引起的^[43-44]。此外, 半乳糖脑苷脂酶的缺乏会引起 Krabbe 病, 己糖胺酶缺乏可以造成 Sandhoff 病和 Tay-Sachs 病等。可以看出, 鞘糖脂代谢异常与遗传性疾病存在显著的因果关系, 调节鞘糖脂的分解代谢水平可能会在以上所列的遗传性疾病的治疗中

发挥重要作用。

4 鞘糖脂的分离分析方法研究

采用新型的现代分离分析技术, 发展鞘糖脂的分离分析方法学, 实现鞘糖脂定性及定量表征研究, 是深入认识鞘糖脂生物学功能及理清鞘糖脂结构及含量变化与疾病发展治疗关系的重要保障。近年来, 随着现代仪器分析技术的发展, 尤其是生物质谱技术的兴起, 鞘糖脂的分离分析方法取得了重大的进展, 下面将重点从分离技术和定性、定量技术三个方面对近年来取得的成果进行简单的综述。

4.1 鞘糖脂分离技术的发展

鞘糖脂在生物体内的含量较少, 因此实现鞘糖脂的富集分离是进行鞘糖脂检测及结构分析的前提基础, 其中鞘糖脂提取方法的发展是实现糖脂富集的第一步, 目前鞘糖脂的提取多采用有机溶剂超声波提取法等。Müthing^[45] 总结出鞘糖脂的提取主要采用氯仿/甲醇/水体系和异丙醇/正己烷/水体系。此外, 其它有机溶剂体系以及索氏提取法等也常见应用。

在完成鞘糖脂的提取后, 进一步的富集分离则主要依赖各种色谱技术。20 世纪 80 年代以前, 鞘糖脂的分离主要以常规柱色谱及薄层色谱技术为主, 但随着分离分析技术的发展, 高效液相色谱技术 (HPLC) 逐渐发展为鞘糖脂分离的重要工具之一, 同时气相色谱技术及毛细管电泳技术等也在鞘糖脂的富集分离中发挥了重要的作用。其中, 在酸性鞘糖脂的分离中阴离子交换色谱的应用较为广泛, 尤其以琼脂糖凝胶为代表, 如 Pörtner 等^[46] 利用 DEAE-fractogel 对神经节苷脂进行了分离表征。而在更加深入的分离, 甚至是单个鞘糖脂的分离中, 则主要采取薄层层析技术 (TLC) 和 HPLC 等分离技术。TLC 主要有以下优点: (1) 设备简单、操作方便、分析时间短; (2) 可以实现对多个样品的同时分离检测, 便于比较; (3) 可以采用糖脂特异性的显色剂以及抗体等进行层析分离后检测, 易于排除非糖脂类化合物的干扰, 实现特异性检测。因此近 30 年来 TLC 在鞘糖脂的分离中得到了极为深入的应用^[47-48]。HPLC 具有更强的分离能力, 能够实现复杂糖脂体系中单个鞘糖脂的分离制备, 并且该技术还便于实现与质谱等结构表征技术的联用, 在鞘糖脂的分离分析中也得到了广泛应用^[44]。两者都有其独特的优势, 在近阶段都将发挥不可替代的作用。

4.2 鞘糖脂定性表征技术的发展

鞘糖脂的结构分析一般包含以下几个方面：(1) 鞘糖脂中包含的单糖的个数和种类；(2) 鞘糖脂中脂肪链的结构；(3) 单糖间的连接顺序和连接位点的确定等。质谱 (MS) 技术和核磁共振 (NMR) 技术是在鞘糖脂结构分析中较为常用的两种工具。其中 MS 具有较高的灵敏度，能够对低含量的鞘糖脂进行很好的检测和定性表征，并且方便与各种色谱分离技术实现在线联用，减少复杂的分离纯化过程，实现生物组织复杂体系中微量鞘糖脂的快速分析。但限于鞘糖脂对照品的缺乏，它往往只能实现大概的结构推断而很难给出确定的化合物结构。与之相比，NMR 技术虽然灵敏度相对较低，对样品量需求较大 (毫克级)，但由于不受对照品的限制，并且利用多维核磁技术能够实现未知化合物的准确定性，因此对于糖脂的结构分析，尤其是新发现糖脂的定性具有不可替代的作用。

在过去的三十年里，快原子轰击 (FAB) 质谱、电子电离 (EI) 质谱、电喷雾电离 (ESI) 质谱、基质辅助激光解吸离子化 (MALDI) 质谱以及傅里叶变换离子回旋共振 (FT-ICR) 质谱等各种质谱技术在鞘糖脂化合物相对分子质量测定以及糖链结构表征等都发挥了重要作用^[49-51]，尤其是具有较宽质量数检测范围和较高灵敏度的 ESI-MS 和 MALDI-MS 更是得到了广泛的应用^[52]。从近年来发表的大量研究论文不难发现质谱用于鞘糖脂的结构表征主要有两种形式：一种是单独利用质谱对复杂糖脂体系中的不同鞘糖脂进行结构分析^[53-54]；另一种是色质联用技术^[55-59]。前者主要是依靠鞘糖脂质量数的不同对其进行区别，并进一步利用多级质谱技术进行深入的结构分析。为提高质谱检测的选择性，对样品的前处理要求相对较高，经常需要对鞘糖脂样品进行甲基化等处理。Li 等^[53]在该方向做了大量的工作，在掌握了糖链同分异构体质谱鉴定技术的基础上，不仅采用已有的甲基化方法对大量肝癌组织及白血病患者骨髓样本中的鞘糖脂进行了表征分析，发现了肝癌及白血病患者特征鞘糖脂，并且还发展了氟标记鞘糖脂的质谱检测方法，大大提高了质谱检测的灵敏度和选择性，在生物组织中鞘糖脂的定性表征方面具备了一定的能力。与单独的质谱分析技术相比，色质联用技术具有其独特的优势：不仅将色谱强大的富集分离能力和质谱良好的结构分析能力有机的结合在一起，而且对样品预处理的要求相对较低。如 Müsken 等^[60]利用一种 HPTLC

和 IR-MALDI-TOF-MS 直接联用的技术对鞘糖脂进行了薄层分离后的原位质谱检测分析，保证了灵敏度的同时减少了样品预处理时间，得到了良好的定性结果。

MS 技术并不能解决所有的鞘糖脂定性问题，尤其对于分离纯化得到的新的鞘糖脂，由于对照品的缺乏，仅仅依靠质谱技术很难实现准确结构解析，此时，核磁共振技术则会给出较为准确的结构信息。因此，近年来，NMR 技术在鞘糖脂定性表征中的应用也常见报道。如 Paściak 等^[61]利用 NMR 技术对经过 TLC 及 HPLC 等分离纯化得到的主要糖脂进行了准确的结构分析；Zhang 等^[62]则利用 NMR 技术对从牛脑中分离得到的一个中性鞘糖脂进行了结构确定。随着技术进步，微线圈探针技术和高场核磁共振技术等许多 NMR 新技术和新方法也逐渐被应用到糖脂的结构解析中^[63]，为鞘糖脂的结构分析带来了革命性变化。

4.3 鞘糖脂分离技术的发展

鞘糖脂定量研究是实现其结构与功能间关联的重要桥梁，生物组织中鞘糖脂含量的变化往往与生物组织功能的异常化以及生物体病变的产生发展都具有显著联系，因此，鞘糖脂定量分析技术近年来也得到了极大的关注。鞘糖脂定量方法的发展主要依赖于糖脂分离及检测水平的提高，伴随着 HPTLC 以及 HPLC 等分离技术的进步和蒸发光散射检测器 (ELSD) 以及质谱等检测技术的发展，鞘糖脂定量分析工作近年来取得了较为显著的成就^[64-66]，为糖脂类化合物进一步的功能研究奠定了基础。

5 结论与展望

鞘糖脂是细胞表面的多功能调节因子，疾病组织细胞膜表面鞘糖脂的变化可能与细胞发育、分化和凋亡等的异变密切相关。无论是组织中鞘糖脂定性定量表征分析，还是鞘糖脂结构与功能、疾病之间的关系的研究都吸引了基础和临床等大量科学家的关注。到目前为止，虽然大量的研究报道都显示鞘糖脂在肿瘤等多种疾病组织中都存在一定程度的异常表达现象，证明了鞘糖脂和各种疾病之间显著的相关性，但多数疾病与鞘糖脂异常表达之间具体的因果关系尚不明确，深入研究鞘糖脂的生物合成及分解代谢途径，对了解各种疾病的发病原因、实现疾病的早期诊断、掌握病情的发展状况以及发展针对性的治疗方案也都具有重要意义。同时，作为研究鞘糖脂构效关系的重要前提基础，鞘糖脂高效

分离分析技术的发展也势在必行。目前虽然在鞘糖脂定性定量分析中建立了 HPLC-MS 及 HPTLC-MS 等先进联用技术, 取得了一定的成就, 但由于生物组织中鞘糖脂的超低含量及其所处基质的高复杂性, 决定了高效、高通量分离分析技术发展的必要性。例如新型分离材料的研发、高灵敏度高选择性检测技术的发展以及多种自动在线联用方法的开发, 都将大大提高鞘糖脂的定性定量表征水平, 进而加速鞘糖脂构效关系的研究, 促进鞘糖脂相关疾病的诊断治疗水平的提高。

[参 考 文 献]

- [1] Kamerling JP. Comprehensive glycoscience. Japan: Elsevier Science, 2007: 639-41
- [2] Hidari KJ, Kawashima I, Tai T, et al. *In vitro* synthesis of disialoganglioside (G(D1- α)) from asialo-G(M1) using sialyltransferases in rat-liver golgi vesicles. *Eur J Biochem*, 1994, 221(1): 603-9
- [3] Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(8): 603-12
- [4] Singh RD, Puri V, Valiyaveetil JT, et al. Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids. *Mol Biol Cell*, 2003, 14(8): 3254-65
- [5] Kolter T, Sandhoff K. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21: 81-103
- [6] Schulze H, Kolter T, Sandhoff K. Principles of lysosomal membrane degradation: cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793: 674-83
- [7] Trinchera M, Ghidoni R, Sonnino S, et al. Recycling of glucosylceramide and sphingosine for the biosynthesis of gangliosides and sphingomyelin in rat liver. *Biochem J*, 1990, 270: 815-20
- [8] Boot RG, Verhoek M, Donker-Koopman W, et al. Identification of the non-lysosomal glucosylceramidase as β -glucosidase 2. *J Biol Chem*, 2007, 282(2): 1305-12
- [9] Yildiz Y, Matern H, Thompson B, et al. Mutation of β -glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility. *J Clin Invest*, 2006, 116(11): 2985-94
- [10] Boot RG, Verhoek M, de Fost M, et al. Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood*, 2004, 103(1): 33-9
- [11] van Breemen MJ, de Fost M, Voerman JS, et al. Increased plasma macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α and MIP-1 β levels in type 1 Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772(7): 788-96
- [12] Zhao Y, Zhang JR, Fan SD, et al. Isolation and purification of hepatoma associated fucosylated neutral glycosphingolipids and its effect on cytotoxicity of NK and LAK cells. *WCJD*, 1998, 6 (11): 948-50
- [13] Zhang Y, Zhang XY, Liu F, et al. Relationship between terminal sialyl and fucosyl residues of glycans on cell surface and cell biological behaviors. *Acta Biol Exp Sin*, 2002, 35(4): 271-7
- [14] Hao YY, Lin B, Zhao Y, et al. α 1,2-fucosyltransferase gene transfection influences on biological behavior of ovarian carcinoma-derived RMG-I cells. *J Mol Cell Biol*, 2008, 41(6): 435-42
- [15] 李飞飞, 林蓓, 郝莹莹, 等. Lewis y抗体对 α 1,2岩藻糖转移酶基因转染后卵巢癌细胞体外抑制作用. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(3): 435-42
- [16] Wu LH, Hu P, Wu W, et al. Fucosylated glycans associated with development and metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *Prog Biochem Biophys*, 2009, 36(1): 33-41
- [17] Steinman RM, Pope M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *J Clin Invest*, 2002, 109(12): 1519-26
- [18] Ramakrishna V, Trembl JF, Vitale L, et al. Mannose receptor targeting of tumor antigen pmel17 to human dendritic cells directs anti-melanoma T cell responses via multiple HLA molecules. *J Immunol*, 2004, 172(5): 2845-52
- [19] Liu YY, Gupta V, Patwardhan GA, et al. Glucosylceramide synthase upregulates MDR1 expression in the regulation of cancer drug resistance through cSrc and β -catenin signaling. *Mol Cancer*, 2010, 9: 145
- [20] Zhou D, Mattner J, Cantu C 3rd, et al. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science*, 2004, 306(5702): 1786-9
- [21] Zhou D. The immunological function of iGb3. *Curr Protein Pept Sci*, 2006, 7(4): 325-33
- [22] 李南, 魏莎莉, 杨戎, 等. sLex在小鼠胚泡植入早期子宫内膜中的表达及作用. *生殖与避孕*, 2007, 27(8): 497-501
- [23] Zhang Y, Liu S, Liu Y, et al. Overexpression of fucosyltransferase VII (FUT7) promotes embryo adhesion and implantation. *Fertil Steril*, 2009, 91(3): 908-14
- [24] Nakamura M, Tsunoda A, Sakoe K, et al. Total metabolic flow of glycosphingolipid biosynthesis is regulated by UDP-GlcNAc:lactosylceramide $\beta \rightarrow 3$ N-acetylglucosaminyltransferase and CMP-NeuAc:lactosylceramide $\alpha 2 \rightarrow 3$ sialyltransferase in human hematopoietic cell line HL-60 during differentiation. *J Biol Chem*, 1992, 267(33): 23507-14
- [25] Liang YJ, Kuo HH, Lin CH, et al. Switching of the core structures of glycosphingolipids from globo- and lacto- to ganglio-series upon human embryonic stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(52): 22564-9
- [26] Kolesnick RN, Kronke M. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 1998, 60: 643-65
- [27] Hannun YA, Obeid LM. Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem Sci*, 1995, 20: 73-7
- [28] Tagaram HR, Divittore NA, Barth BM, et al. Nanoliposomal

- ceramide prevents *in vivo* growth of hepatocellular carcinoma. *Gut*, 2010, doi: 10.1136
- [29] Zhang ZC, Zhang JR, Zhang J. Glycosphingolipids and tumor therapy. *Med Recap*, 2000, 8: 368
- [30] Radin NS. Chemotherapy by slowing glucosphingolipid synthesis. *Biochem Pharmacol*, 1999, 57(6): 589-95
- [31] Yogeewaran G, Salk PL. Metastatic potential is positively correlated with cell surface sialylation of cultured murine tumor cell lines. *Science*, 1981, 212(4502): 1514-6
- [32] Wang QY, Guo P, Duan LL, et al. α 1, 3 Fucosyltransferase stimulates the growth of hepatocarcinoma cells via cyclin dependent kinase inhibitor p27Kip1. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(2): 171-8
- [33] 余尚扬, 蓝秀万, 何敏, 等. RNA干扰沉默 α 1, 3岩藻糖转移酶-VII基因对人肝癌细胞增殖的影响. *肿瘤防治研究*, 2010, 37(5): 507-10
- [34] 张健, 张积仁, 周殿元. 肾透明细胞癌及胚胎肾中性糖脂表达的研究. *肿瘤*, 2000, 20(4): 249-51
- [35] Sabourdy F, Kedjouar B, Sorli SC, et al. Functions of sphingolipid metabolism in mammals--lessons from genetic defects. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2008, 1781: 145-83
- [36] Jennemann R, Sandhoff R, Wang S, et al. Cell-specific deletion of glucosylceramide synthase in brain leads to severe neural defects after birth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 12459-64
- [37] Marks N, Berg MJ, Saito M. Glucosylceramide synthase decrease in frontal cortex of Alzheimer brain correlates with abnormal increase in endogenous ceramides: consequences to morphology and viability on enzyme suppression in cultured primary neurons. *Brain Res*, 2008, 1191: 136- 47
- [38] Kolter T, Sandhoff K. Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2006, 1758: 2057-79
- [39] Ballabio A, Gieselmann V. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2009, 1793: 684-96
- [40] Sabourdy F, Kedjouar B, et al. Functions of sphingolipid metabolism in mammals--lessons from genetic defects. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2008, 1781: 145-83
- [41] Ohshima, T, Murray GJ, Swaim WD, et al. α -Galactosidase a deficient mice: a model of fabry disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(6): 2540-4
- [42] Sweeley C, Klionsky B. Fabry's disease: classification as a sphingolipidosis and partial characterization of a novel glycolipid. *J Biol Chem*, 1963, 238: 3148-50
- [43] Beutler E, Grabowski G. Gaucher disease[M]// Scriber CR, Beudet AL, Sly WS, et al. The metabolic and molecular basis of inherited diseases. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 2001: 3635-68
- [44] Xu YH, Jia L, Quinn B, et al. Global gene expression profile progression in Gaucher disease mouse models. *BMC Genomics*, 2011, 12: 20
- [45] Mùthing J. Analysis of glycosphingolipids by high-performance liquid chromatography. *Method Enzymol*, 2000, 312: 45-64
- [46] Pörtner A, Peter-Katalinić J, Brade H, et al. Structural characterization of gangliosides from resting and endotoxin-stimulated murine B lymphocytes. *Biochem*, 1993, 32: 12685-93
- [47] Mùthing J. TLC instructure and recognition studies of glycosphingolipids. *Methods Mol Biol*, 1998, 76: 183-95
- [48] Yu RK, Ariga T. Ganglioside analysis by high-performance thin-layer chromatography. *Methods Enzymol*, 2000, 312: 115-34
- [49] Mùthing J, Distler U. Advances on the compositional analysis of glycosphingolipids combining thin-layer chromatography with mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 2010, 29: 425-79
- [50] Harvey DJ. Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: An update covering the period 2001-2002. *Mass Spectrom Rev*, 2008, 27: 125-201
- [51] Harvey DJ. Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: An update covering the period 2003-2004. *Mass Spectrom Rev*, 2009, 28: 273-361
- [52] Levery SB. Glycosphingolipid structural analysis and glycosphingolipidomics. *Methods Enzymol*, 2005, 405: 300-69
- [53] Li YS, Teneberg S, Thapa P, et al. Sensitive detection of isoglobo and globo series tetraglycosylceramides in human thymus by ion trap mass spectrometry. *Glycobiology*, 2008, 18(2): 158-62
- [54] Li YS, Arigi E, Eichert H, et al. Mass spectrometry of fluorocarbon-labeled glycosphingolipids. *J Mass Spectrom*, 2010, 45(5): 50419
- [55] Zamfir A, Peter-Katalinić J. Capillary electrophoresis-mass spectrometry for glycoscreening in biomedical research. *Electrophoresis*, 2004, 25(13): 1949-63
- [56] Zamfir AD, Bindila L, Lion N, et al. Chip electrospray mass spectrometry for carbohydrate analysis. *Electrophoresis*, 2005, 26: 3650-73
- [57] Nakamura K, Suzuki Y, Goto-Inoue N, et al. Structural characterization of neutral glycosphingolipids by thin-layer chromatography coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight MS/MS. *Anal Chem*, 2006, 78(16): 5736-43
- [58] Distler U, Hülsewig M, Souady J, et al. Matching IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry with the TLC overlay binding assay and its clinical application for tracing tumor-associated glycosphingolipids in hepatocellular and pancreatic cancer. *Anal Chem*, 2008, 80(6): 1835-46
- [59] Karlsson H, Halim A, Teneberg S. Differentiation of glycosphingolipid-derived glycan structural isomers by liquid chromatography/mass spectrometry. *Glycobiology*, 2010, 20(9): 1103-16
- [60] Mùsken A, Souady J, Dreisewerd K, et al. Application of thin-layer chromatography/infrared matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry to structural analysis of bacteria-binding glycosphingolipids selected by affinity detection. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(7): 1032-8

- [61] Paściak M, Sanchez-Carballo P, Duda-Madej A, et al. Structural characterization of the major glycolipids from *Arthrobacter globiformis* and *Arthrobacter scleromae*. *Carbohydr Res*, 2010, 345(10): 1497-503
- [62] Zhang ZC, Zhang JR, Zhang J, et al. Isolation and structural characterization of glob-N from cow brain. *Med J Chin PLA*, 2000, 25(1): 28-30
- [63] Kato K, Sasakawa H, Kamiya Y, et al. 920 MHz ultra-high field NMR approaches to structural glycobiology. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1780(3): 619-25
- [64] Shimizu Y, Nakata M, Matsunuma J, et al. Simultaneous quantification of components of neoglycolipid-coated liposomes using high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr B*, 2001, 754(1): 127-33
- [65] Li YS, Zhou DP, Xia CF, et al. Sensitive quantitation of isoglobotriaosylceramide in the presence of isobaric components using electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Glycobiology*, 2008, 18(2): 166-76
- [66] Yunoki K, Sato M, Seki K, et al. Simultaneous quantification of plant glyceroglycolipids including sulfoquinovosyldiacylglycerol by HPLC-ELSD with binary gradient elution. *Lipids*, 2009, 44(1): 77-83