

非律平和制霉菌素对人羊膜上皮细胞鞘脂类代谢的影响

刘广义¹, 马小琼², 沈 静², 董正伟¹, 杨 军^{1*}

(浙江大学 1. 公共卫生学院毒理学系, 2. 医学院病理及病理生理学教研室, 浙江 杭州 310058)

摘要: **目的** 研究脂类干扰剂非律平和制霉菌素对人羊膜上皮细胞鞘脂类代谢的影响是否相同。**方法** 应用基质辅助激光解吸飞行时间质谱分析方法分析不同剂量非律平和制霉菌素对人 FL 细胞株鞘脂类代谢的影响。**结果** 非律平和制霉菌素均可影响 FL 细胞鞘脂类代谢, 但是非律平(0.2 和 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)诱导了多种新的神经酰胺类分子的合成, 推测主要影响神经酰胺类分子的代谢。而制霉菌素(0.054 和 0.108 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)在诱导了新的神经酰胺分子合成的同时, 还导致鞘磷脂含量的增高, 0.108 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可诱导更多神经酰胺分子的合成, 推测制霉菌素可能对鞘磷脂类分子和神经酰胺类分子的代谢都有影响。**结论** 非律平和制霉菌素均干扰鞘脂类代谢, 但二者的靶点可能不同。

关键词: 非律平; 制霉菌素; 脂类组学; 神经酰胺类; 鞘磷脂类

中图分类号: R394.6, R978.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2007)05-0416-06

鞘脂类(sphingolipids)作为一种以鞘胺基为基础的脂类, 在当前的研究中越来越受到大家的关注。作为脂筏(lipid raft)的主要组成部分, 它们为膜蛋白的相互作用提供了平台^[1]。此外, 鞘脂类和它的代谢产物, 如鞘胺醇(sphingosine)、神经酰胺(ceramide)和鞘磷脂(sphingomyelin)等可以作为第二信使发挥生物功能, 参与了许多重要的信号传导通

路, 对细胞的分化、增殖和死亡^[2-3], 钙的动态平衡, 肿瘤的发生, 抗药性的产生和治疗^[4-5]以及细菌和病毒的感染过程^[6-7]等都有重要的调节作用。

但是很长时间以来, 脂类的研究远远落后于基因和蛋白质的研究。一个最主要的原因就是缺乏一种精确的、高通量的脂类分析方法。传统的分析方法(如同位素标记、薄层层析和高效液相色谱等)虽可提供部分信息, 但很不充足。比如, 利用同位素标记及薄层层析, 发现烷化剂甲基硝基亚硝基胍(*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, MNNG)可诱导神经酰胺的生成并介导凋亡^[2,8]。但是, 由于神经酰胺可有不同的侧链长度、不饱和键数量、构象及手性等, 具体发生变化的是哪一种或几种无法得知。这一问题直到将质谱技术应用在脂类研究才得到了解决。近年来, 一个新的概念脂类组学(lipidomics)被提出, 即利用质谱技术对脂类组(lipidome)的所有成分进行一次性的定性鉴定并定量^[9-12]。与传统的分析方法比较, 质谱技术通量高, 最重要的是可以鉴定出各种类别的脂类分子。利用这一技术, 我们已研究了 MNNG 对细胞鞘脂类代谢的影响, 发现 MNNG 可导致多种神经酰胺和鞘磷脂分子的变化^[7,13]。

在鞘脂类研究中, 各种脂类代谢干扰剂是理解鞘脂类代谢通路所必需的研究工具。大环内酯类多烯型抗生素非律平(filipin)和制霉菌素(nystatin)主要用于治疗真菌类感染, 它们可以和细胞中的胆固醇结合, 形成复合体, 从而导致细胞结构的改变, 特别是可以干扰细胞的脂筏结构。因此它们是经常使用的干扰细胞脂筏的药物^[14-16]。然而它们具体干扰细胞的哪些鞘脂类代谢, 以及如何干扰还没有明确的答案。此外, 二者是否影响相同的或不同的鞘脂类也还不清楚。因此, 本研究利用脂类组学方法研究它们对细胞鞘脂类, 尤其是神经酰胺和鞘磷脂类的影响, 以分析它们发挥作用的途径。

收稿日期: 2006-11-01 **接受日期:** 2007-01-31

基金项目: 国家自然科学基金(30300277); 国家自然科学基金(30471956); 国家自然科学基金(30600220)资助项目

作者简介: 刘广义(1981-), 男, 河南省商丘市人, 硕士研究生, 研究方向为细胞应激反应中的脂类组学研究。

* 联系作者 E-mail: gastate@zju.edu.cn Tel/Fax: (0571)88208140

1 材料与方法

1.1 材料

人羊膜上皮细胞株 FL 为本实验室保存。MEM 培养基 (Eagle's minimum essential medium)、L-谷氨酰胺、小牛血清: 美国 Gibco 公司。二甲亚砜 (DM-SO)、非律平、制霉菌素、乙酸乙酯 (ethylacetate) 和 2,5-二羟基苯甲酸 (2,5-dihydroxyl-benzoic acid, 2,5-DHB): 美国 Sigma 公司。Voyager-DE STR MALDI-TOF 质谱仪: 美国 ABI 公司。真空抽干机: 美国 Savant 公司。

1.2 细胞培养和处理

培养液包含 MEM、10% 小牛血清、0.03% L-谷氨酰胺、 $10 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素和 $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素。处理条件如下: 1×10^7 个细胞接种于细胞培养瓶中, 37°C , 5% CO_2 培养, 1 d 后分别加入 0.2 或 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 非律平^[17], 0.054 或 $0.108 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[18] 制霉菌素, 继续培养 30 min^[18-19]。

1.3 鞘脂的提取

将 4×10^7 个细胞溶于 500 μL 氯仿与甲醇 (2:1, V/V) 混合液, 然后加入 1 mL 蒸馏水混匀, $4770 \times g$ 离心 15 min, 吸取下层, 放入真空抽干机抽干。抽干的剩余物加入 500 μL 含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 的甲醇, 放入 55°C 水浴处理 1 h。然后加入 100 μL 的 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸、500 μL 正己烷和 50 μL 蒸馏水, $4770 \times g$ 离心 15 min。分层后, 吸取下层液体放入真空抽干机抽干。抽干后的剩余物加入 0.8 mL 的氯仿、甲醇和水 (86:14:1, V/V/V) 的混合液和 0.2 mL 的氯仿、甲醇和水 (3:48:47, V/V/V) 的混合液, $4770 \times g$ 离心 15 min, 吸取下层, 放入真空抽干机抽干, 剩余物即为鞘脂类样品, 放入 -70°C 储存^[13]。

1.4 MALDI-TOF 质谱分析

样品溶于 5 μL 氯仿和甲醇 (2:1, V/V) 的混合溶液, 然后加入 5 μL 基质液 (包含 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸乙酯和 0.1% 三氟乙酸) 放于 0.5 mL 的离心管中, 将离心管放在漩涡振荡器上混合均匀, 再离心 1 min。取 1 μL 混合物点在样品靶上热风吹。仪器测定条件如下: N_2 激光 337 nm, 加速电压 20 kV, 正离子反射/延迟模式, 延迟时间 100 ns。应用 C_2 -二氢神经酰胺 (dihydroceramide) (相对分子质量 343.6) 校准。处理组和对照组均重复 3 次, 每个样品得到 6 或 7 张质谱图, 只有当一个峰在 5 张以上的图中出现且它的相对丰度大于 3%, 才认为它存在并用

于分析。所有质谱图均按照以上方法分析, 所得到的差异性质谱数据与本实验室建立的鞘脂类数据库^[13]进行比较。目前我们建立的数据库包含了常见的近 90 种标准鞘脂类样品的质谱分析图谱。本研究分析的是神经酰胺和鞘磷脂。神经酰胺的结构是鞘氨醇氨基以酰胺键与一长链脂肪酸羧基相连, 鞘磷脂的结构是神经酰胺的极性头部是磷酸胆碱, 不同的神经酰胺和鞘磷脂只是碳链数和双键数目以及侧链上的一个羟基的变化, 所以利用实验中得到的数据与数据库对比, 根据分子量和神经酰胺及鞘磷脂的基本骨架, 可以推测出成分的结构。

2 结果

2.1 非律平对 FL 细胞鞘脂类代谢的影响

神经酰胺分子在质谱分析中主要出现在质荷比 ($m:z$) 500 ~ 750 的范围内; 而鞘磷脂分子主要出现在 $m:z$ 750 ~ 900 的范围内。在未经非律平处理的对照 FL 细胞中, 经质谱分析发现极少有神经酰胺分子的存在, 仅有少数几种鞘磷脂分子的存在 (表 1)。由于研究中经常使用的非律平浓度为 0.2 和

Tab 1. Effect of filipin and nystatin on sphingolipids metabolism of human amnion epithelial cells

$m:z$	Control	Filipin/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		Nystatin/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	
		0.2	10	0.054	0.108
536		+	+		
552					+
580		+	+		
612				+	+
624		+	+		
658					+
660		+	+	+	+
668		+	+		
676				+	
720		+	+	+	+
812	+	+	+	++	++
834	+	+	+	++	++
836	+	+	+	++	++

The human amnion epithelial cells were treated with filipin and nystatin, respectively, for 30 min. Lipids were extracted and subjected to matrix-assisted, laser desorption-ionizing-time of flight mass spectrometry analysis. This is the representative mass spectrometry data. $m:z$: mass to charge ratio.

$10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[17], 本研究首先用非律平 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理 FL 细胞 30 min 后, 提取细胞鞘脂类, 进行质谱分析。发现在 m/z 500 ~ 750 的范围内有较大的改变。 m/z 536, 580, 624, 660, 668 和 720 等出现, 表明有新的神经酰胺分子合成(图 1)。而在 m/z 750 ~ 900 范围内的几种鞘磷脂分子峰都没有改变, 表明非律平对于鞘磷脂分子的代谢影响较小, 而对于神经酰胺代谢的影响较大。

进一步用非律平 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理, FL 细胞鞘脂类的变化与 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理的结果一致(表 1), 表明低浓度和高浓度的非律平对于鞘

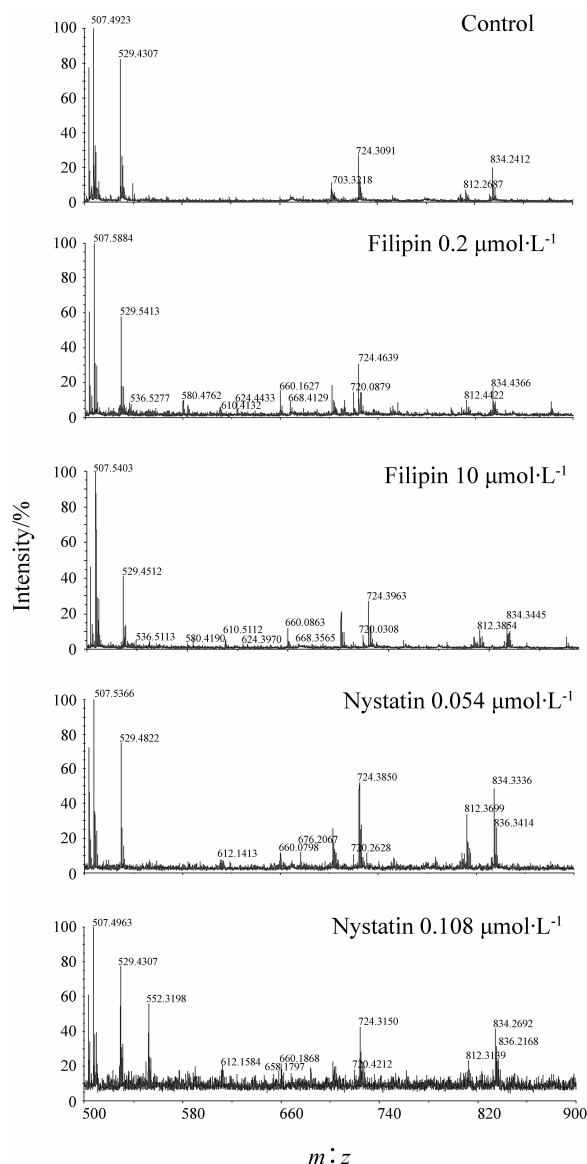


Fig 1. Changes in sphingolipids metabolism induced by filipin and nystatin. See Tab 1 for cell treatments. This is the representative mass spectrometry data.

脂类和神经酰胺代谢的作用无明显差别。

利用我们实验室已经建立的质谱数据库^[13], 搜索以上差异的质谱峰, 可以推断部分分子可能的结构图, 如 m/z 580 和 720 的可能结构见表 2。

Tab 2. Proposed structures for some identified sphingolipids species

m/z		Proposed structure
580	D18C19:0	$\begin{array}{c} \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ (\text{CH}_2)_{17} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
720	T18C25H:0	$\begin{array}{c} \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \\ (\text{CH}_2)_{22} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
T18C16:0		$\begin{array}{c} \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH} \quad \text{O}^- \end{array}$
812	T18C22:0	$\begin{array}{c} \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH} \quad \text{O}^- \end{array}$
D18C23:0		$\begin{array}{c} \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\ \quad \\ \text{NH} \quad \text{O}^- \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ (\text{CH}_2)_{21} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$

D: a double bond in the main chain. T: the main chain is saturated. H: a hydroxyl group in the subside chain.

2.2 制霉菌素对 FL 细胞鞘脂类代谢的影响

研究中常用的制霉菌素浓度是 0.054 和 0.108 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[18]。本研究首先用制霉菌素 $0.054 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理 FL 细胞 30 min 后, 用上述方法提取细胞脂类, 同样进行质谱分析。发现制霉菌素尽管没有诱导新的鞘磷脂分子产生, 但在 m/z 750 ~ 900 范围内 812, 834 和 836 的强度都有所增强, 表明制霉菌素可激活鞘磷脂的合成。同时还诱导了新的神经酰胺分子的合成, 在 m/z 500 ~ 750 范围内, m/z 612, 660, 676 和 720 等出现(图 1)。

进一步用制霉菌素 $0.108 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理细胞

后,发现 FL 细胞鞘脂类的改变与 $0.054 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理的结果有相似性,但也存在差异(表 1),即 $0.108 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 制霉菌素也可抑制鞘磷脂的水解,并诱导新神经酰胺分子的合成。但其诱导神经酰胺的合成作用与 $0.054 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 相比更强一些,有两种新分子 m/z 552 和 658 被诱导。

利用我们实验室已经建立的质谱数据库^[13],搜索以上差异的质谱峰,可以推断部分分子可能的结构图,如 m/z 812 的几种可能结构列于表 2。

3 讨论

鞘脂类与胆固醇在细胞表面形成脂筏,作为蛋白质附着的平台。非律平和制霉菌素是常用来干扰细胞脂筏结构的化学试剂,但对于它们的作用机制还不是很了解。本研究结果表明制霉菌素与非律平对鞘脂代谢的影响明显不同(表 1),如非律平和制霉菌素均诱导了 m/z 660 和 720 的出现,但非律平诱导了 m/z 536, 580, 624 和 668 的出现,制霉菌素诱导了 m/z 612 和 676 的出现,表明非律平与制霉菌素对于神经酰胺代谢的影响有很大区别。此外,非律平对鞘磷脂的代谢无明显影响,而制霉菌素却可影响鞘磷脂的代谢。同时本研究结果还表明,在目前研究中使用的非律平的不同剂量都可干扰鞘脂类的代谢,且无明显差别;但是高剂量制霉菌素的干扰效率较低剂量强,说明制霉菌素的作用可能存在剂量效应关系,但由于检测的剂量较少,还需进一步深入研究。

在神经酰胺的代谢通路中存在一条从头合成途径(*de novo* synthesis),还有一条与鞘磷脂可逆的合成/水解途径,即神经酰胺通过鞘磷脂合成酶(sphingomyelin synthase)的作用可进一步合成为鞘磷脂,而鞘磷脂又可被鞘磷脂酶水解为神经酰胺(图 2)。因此当鞘磷脂酶被激活时,鞘磷脂被水解减少,而神经酰胺量升高。本研究结果表明,非律平诱导了新的神经酰胺分子的产生。因此,非律平极有可能激活了神经酰胺的从头合成途径,导致新的神经酰胺分子的生成,而同时神经酰胺与鞘磷脂的合成和水解途径则不受影响,因而鞘磷脂类的代谢没有显著变化。制霉菌素也同样可能激活神经酰胺的从头合成途径,导致新神经酰胺分子的出现,但同时也可以通过激活神经酰胺向鞘磷脂的转化途径,或抑制鞘磷脂向神经酰胺的水解而导致鞘磷脂分子

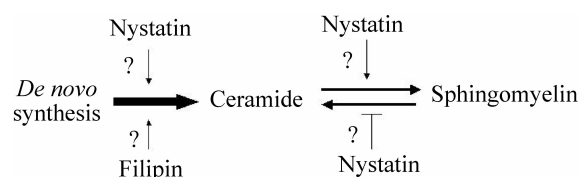


Fig 2. Proposed mechanism for effects of filipin and nystatin on sphingolipids metabolism. \uparrow : activation; T: inhibition; ?: there is a possibility.

的累积(图 2)。根据非律平和制霉菌素作用后神经酰胺和鞘磷脂的不同变化,可以根据鞘脂类代谢的通路^[6],推测二者干扰其代谢的不同靶点,为进一步深入研究提供信息,这是传统方法所无法做到的。

此外,在肿瘤细胞中通过调节鞘脂类代谢,增加神经酰胺的水平已经成为一种治疗肿瘤的新方法,有些药物已进入临床验证阶段^[4, 20-21]。本研究发现非律平和制霉菌素作用于细胞也可以引起细胞神经酰胺代谢的改变,那么这两种药物对肿瘤的生长是否有一定的作用,为认识非律平和制霉菌素的药物作用提供了新视角。

Wenk^[12]在 2005 年发表文章提出脂类组学将是未来研究发展的一个热门方向,本研究进一步体现了脂类组学技术在当前脂类研究中的重要性。通过此项技术,不同的神经酰胺、鞘磷脂分子可以被鉴定出来,并进行相对定量,而且每一个分子的可能结构还可以通过与数据库的对比得到解析,这都是传统的脂类研究技术所无法达到的。虽然本研究中采用的 MALDI-TOF 方法在定量上有不足之处,但能满足在一次实验中鉴别出不同的鞘脂类分子并对这些鞘脂类分子进行相对含量比较的实验要求。随着脂类组学新技术如 LC-MS/MS 的不断发展,定量的问题将得到更好的解决,为今后鞘脂的研究提供更先进的研究手段。

4 参考文献:

- [1] Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes [J]. *Nature*, 1997, **387**(6633):569-572.
- [2] Yang J, Duerksen-Hughes PJ. Activation of a p53-independent, sphingolipid-mediated cytolytic pathway in p53-negative mouse fibroblast cells treated with *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(29):27129-27135.
- [3] Hannun YA, Luberto C. Ceramide in the eukaryotic

- stress response[J]. *Trends Cell Biol*, 2000, **10**(2): 73–80.
- [4] Modrak DE, Gold DV, Goldenberg DM. Sphingolipid targets in cancer therapy[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, **5**(2):200–208.
- [5] Kok JW, Sietsma H. Sphingolipid metabolism enzymes as targets for anticancer therapy[J]. *Curr Drug Targets*, 2004, **5**(4):375–382.
- [6] Yang J, Yu Y, Sun S, Duerksen-Hughes PJ. Ceramide and other sphingolipids in cellular responses[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2004, **40**(3):323–350.
- [7] Huang Y, Yang J, Shen J, Chen FF, Yu Y. Sphingolipids are involved in *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine-induced epidermal growth factor receptor clustering[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **330**(2): 430–438.
- [8] Kolesnick R, Hannun YA. Ceramide and apoptosis[J]. *Trends Biochem Sci*, 1999, **24**(6):224–225;
- [9] Han X, Gross RW. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics[J]. *J Lipid Res*, 2003, **44**(6):1071–1079.
- [10] Han X, Cheng H. Characterization and direct quantitation of cerebroside molecular species from lipid extracts by shotgun lipidomics[J]. *J Lipid Res*, 2005, **46**(1): 163–175.
- [11] Han X, Gross RW. Shotgun lipidomics: electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2005, **24**(3): 367–412.
- [12] Wenk MR. The emerging field of lipidomics[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, **4**(7):594–610.
- [13] Huang Y, Shen J, Wang T, Yu YK, Chen FF, Yang J. A lipidomic study of the effects of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine on sphingomyelin metabolism[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005, **37**(8):515–524.
- [14] Awasthi-Kalia M, Schnetkamp PP, Deans JP. Differential effects of filipin and methyl-beta-cyclodextrin on B cell receptor signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **287**(1):77–82.
- [15] Fortin DL, Troyer MD, Nakamura K, Kubo S, Anthony MD, Edwards RH. Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein[J]. *J Neurosci*, 2004, **24**(30):6715–6723.
- [16] Verheijen I, Tourlousse D, Vanderheyden PM, Backer JP, Vauquelin G. Effect of saponin and filipin on antagonist binding to AT 1 receptors in intact cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, **67**(8):1601–1606.
- [17] Khine AA, Tam P, Nutikka A, Lingwood CA. Brefeldin A and filipin distinguish two globotriaosyl ceramide/verotoxin-1 intracellular trafficking pathways involved in Vero cell cytotoxicity[J]. *Glycobiology*, 2004, **14**(8): 701–712.
- [18] Zink S, Mehlgarten C, Kitamoto HK, Nagase J, Jablonowski D, Dickson RC, et al. Mannosyl-diinositol-phospho-ceramide, the major yeast plasma membrane sphingolipid, governs toxicity of *Kluyveromyces lactis* zymocin[J]. *Eukaryot Cell*, 2005, **4**(5):879–889.
- [19] Chu CL, Buczek-Thomas JA, Nugent MA. Heparan sulphate proteoglycans modulate fibroblast growth factor-2 binding through a lipid raft-mediated mechanism[J]. *Biochem J*, 2004, **379**(Pt 2):331–341.
- [20] Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment[J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, **4**(8):604–616.
- [21] Reynolds CP, Maurer BJ, Kolesnick RN. Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy[J]. *Cancer Lett*, 2004, **206**(2):169–180.

Effects of filipin and nystatin on sphingolipids metabolism in human amnion epithelial cells

LIU Guang-Yi¹, MA Xiao-Qiong², SHEN Jing², DONG Zheng-Wei¹, YANG Jun^{1*}

(1. Department of Toxicology, School of Public Health, 2. Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: **AIM** To study whether macrolides polyene antibiotics filipin and nystatin have different effects on sphingolipids metabolism in human amnion epithelial (FL) cells. **METHODS** After FL cells were treated with two concentrations of filipin (0.2 and 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and nystatin (0.054 and 0.108 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), respectively, sphingolipids were extracted and subjected to matrix-assisted, laser desorption-ionizing-time of flight mass spectrometry analysis. **RESULTS** Both filipin and nystatin affected sphingolipids metabolism. However, filipin (0.2 and 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) mainly affected ceramide, and induced the generation of many new ceramide species. On the other hand, nystatin (0.054 and 0.108 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) affected both ceramide and sphingomyelin. In addition to the induction of new ceramide spe-

cies, nystatin also increased the concentration of several sphingomyelin species. Nonetheless, the higher concentration of nystatin (0.108 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) induced the generation of more ceramide species than the lower concentration of nystatin (0.054 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). **CONCLUSION** Both filipin and nystatin affect sphingolipids metabolism, however they may target different steps in the sphingolipids metabolism pathway. **Key words:** filipin; nystatin; lipidomics; ceramides; sphingomyelins

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China (30300277); National Natural Science Foundation of China (30471956); and National Natural Science Foundation of China (30600220)

* Corresponding author.

(本文编辑 齐春会)