

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.10.015

基于脂质组学探讨狼疮定联合泼尼松对 MRL/lpr 狼疮鼠肾脏脂质代谢的影响

王凯丽¹, 许小芬¹, 段巧¹, 卢璐², 胡长锋¹, 张纪达[✉]

1. 浙江中医药大学基础医学院, 浙江省杭州市滨江区滨文路 548 号, 310053; 2. 浙江中医药大学附属第三医院

[摘要] 目的 探讨狼疮定联合泼尼松治疗狼疮性肾炎(LN)的可能作用机制。方法 30 只雌性 MRL/lpr 狼疮小鼠随机分为模型组、激素组和狼疮定联合激素组各 10 只, 10 只同周龄雌性 MRL/MPJ 小鼠作为正常组。狼疮定联合激素组予泼尼松悬液 5 mg/(kg·d) 和狼疮定水煎剂 20 g/(kg·d) 各 0.1 ml 灌胃, 激素组予泼尼松悬液 5 mg/(kg·d) 和生理盐水各 0.1 ml 灌胃, 模型组和正常组予 0.2 ml 生理盐水灌胃。干预 2 周和 8 周观察各组小鼠肾脏组织补体 C3 和 IgG 的沉积情况; 利用多维质谱“鸟枪法”脂质组学技术(MDMS-SL)对各组小鼠肾组织中各类脂质分子[磷脂类: 包括磷脂酰丝氨酸(PS)、溶血磷脂酰乙醇胺(LPE); 鞘脂类: 包括鞘磷脂(SM)、硫苷脂(ST); 4-羟基烯醛类: 包括 4-羟基己烯醛(HHE)、4-羟基烯丙烯醛(HNDE)、4-羟基壬烯醛(HNE)、4-羟基十二碳三烯醛(HNTE)]进行分析, 比较各组脂质分子含量。结果 与正常组比较, 模型组干预 2 周、8 周小鼠肾脏中 PS、SM 含量降低($P<0.01$), LPE、4-羟基烯醛类总量增高($P<0.01$), 小鼠肾脏干预 2 周末出现明显补体 C3 和 IgG 沉积, 小鼠肾组织 HHE、HNDE、HNE、HNTE 含量及总量升高, 干预 8 周出现明显免疫复合物补体 C3 和 IgG 沉积, 肾组织 HHE、HNE 含量及总量升高, ST 含量降低($P<0.01$)。与模型组相比, 干预 2 周、8 周狼疮定联合激素组小鼠 PS、SM 含量升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 干预 2 周激素组及狼疮定联合激素组小鼠免疫复合物补体 C3、IgG 无明显变化, 小鼠 ST 含量降低, 激素组小鼠 HNDE、HNE、HNTE 含量及 4-羟基烯醛类总量降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 干预 8 周激素组及狼疮定联合激素组小鼠免疫复合物补体 C3 和 IgG 沉积情况明显减少, 激素组 HHE、SM 含量升高, 狼疮定联合激素组小鼠 HHE、HNE 含量及 4-羟基烯醛类总量降低, 狼疮定联合激素组 LPE、4-羟基烯醛类总量降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与激素组相比, 狼疮定联合激素组干预 2 周 SM 含量、4-羟基烯醛类总量及各种子类含量升高, 干预 8 周免疫复合物沉积减少更明显, PS 含量、4-羟基烯醛类总量及各种子类含量上调, LPE、4-羟基烯醛类总量降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 肾脏脂质代谢紊乱在 LN 发病前就已发生, 并且随着病情的进展进一步加重; 狼疮定联合激素可能通过调节肾脏脂质代谢紊乱从而改善 LN。

[关键词] 狼疮性肾炎; 脂质组学; 狼疮定; 糖皮质激素; 肾脏; 免疫复合物

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种临床常见的典型的自身免疫性疾病^[1], 常可致皮肤、关节、血液、肾脏等多器官/系统受累^[2]。狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN)是 SLE 患者最常见、最严重的并发症之一, 40%~70% 患者会出现肾脏损害^[3], 是当前导致 SLE 患者死亡的重要原因之一^[4]。研究表明, 绝大多数 LN

患者存在显著的血脂异常, 包括异常脂蛋白血症^[5]、乳糜粒代谢紊乱^[6]、脂质过氧化物作用增强^[7]以及氧化应激增强引起的其他脂质异常等^[8]。根据“脂质肾毒性”假说^[9], 脂质代谢异常可能在 LN 发病中具有重要作用。

目前, LN 治疗仍以糖皮质激素为主, 而长期或大剂量服用会产生各种不良反应, 如高血糖、骨质增生、股骨头坏死等^[10-11]。狼疮定是浙江中医药大学国家级名中医范永生教授治疗 LN 的经验方,

基金项目: 国家自然科学基金(81803861, 81774255)

✉ 通讯作者: zhjd82@tom.com; (0571)86613587

该方以清热解毒、活血化瘀、滋阴益肾为治疗原则，能改善皮损、口腔溃疡、关节痛等症状，降低血沉、血红蛋白，升高补体 C3 等^[12-13]。因此，本研究基于脂质组学技术观察 LN 模型小鼠肾脏脂质代谢情况，探讨狼疮定联合激素治疗 LN 的作用机制。本实验经浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会批准（批准号：IACUU-20190218-01）。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 MRL/MPJ 小鼠 10 只，雌性 MRL/lpr 狼疮小鼠 30 只，均 6 周龄，体重 20~25 g，由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供，实验动物生产许可证号：SCXK（沪）2017-0005，实验动物使用许可证号：SYXK（浙）2018-0012。饲养于浙江中医药大学实验动物中心全封闭 SPF 环境中，饲养环境温度 22~25℃、相对湿度 60%~70%，每日光照 12 h，自由饮食。

1.2 药品与试剂

狼疮定组成：青蒿 12 g，生地黄 15 g，醋鳖甲 12 g，升麻 9 g，白花蛇舌草 15 g，赤芍 12 g，积雪草 15 g，炒薏苡仁 15 g，佛手 9 g，甘草 6 g。中药由浙江中医药大学饮片厂提供，中药与水的比例为 1:10，先浸泡 30 min，武火煮开后换文火煎 1 h，冷却，纱布过滤，置于旋转蒸发仪浓缩成含生药 2 g/ml 的中药液，4℃备用。泼尼松片，上海阿拉丁生化科技有限公司（批号：P116562，5 mg/片），用高纯水配置成 0.5 mg/ml 混悬液，4℃备用。补体 C3（GR3396418-6）、二抗（GR33833345-1）、IgG 抗体（GR3401602-1），Abcam 公司；脂质标准品：磷脂酰丝氨酸（PS，批号：840033P）、溶血磷脂酰乙醇胺（LPE，批号：856735P）、鞘磷脂（SM，批号：860583P），Avanti 公司；硫苷脂（ST，批号：1875），Matreya 公司；4-羟基烯醛（批号：332101），Cayman 公司。色谱纯甲醇（批号：10935307 804），德国 Merck 公司；色谱纯氯仿（批号：35Y2007HY），美国 ACS 公司；溶液纯氢氧化锂（批号：G1705043），上海阿拉丁生化科技有限公司；氯化锂（批号：MR29390）、异丙醇（批号：14080524），生工生物工程（上海）股份有限公司；氯甲酸-9-苄基甲酯（批号：GR8EE-QC）、4-二甲氨基吡啶（批号：WYT3I-OK）、N，N-二甲基甘氨酸（批号：5QNFQ-IGTC），东京化成工业株式会社。

1.3 仪器

VIP6 脱水机，日本樱花公司；AP280-2 包埋机、HM335E 切片机，Microm 公司；eclipse 80i 显微镜，Nikon 公司；数字病理切片扫描系统 Nano-Zoomer 2.0 RS，日本滨松公司；3001 全波长多功能酶标仪，美国 Thermo Fisher 公司；WD-12 氮吹仪，杭州奥盛仪器有限公司；Centrifuge 5702R 离心机，德国 Eppendorf 公司；VORTEX-5 涡旋振荡器，苏州 Qilinbeier 公司；Nanospray ESI 离子源，美国 Advion Bioscience Inc 公司；METTLER-AG135 天平，美国 Mettler 公司；Quantiva 三重四极杆质谱仪，美国 Thermo Fisher 公司。

1.4 分组及给药

MRL/lpr 雌性狼疮小鼠 30 只，采用随机数字表法分为模型组、激素组、狼疮定联合激素组各 10 只，10 只同周龄 MRL/MPJ 雌性小鼠作为正常组。激素组灌胃泼尼松悬液 5 mg/(kg·d) 和生理盐水各 0.1 ml，狼疮定联合激素组灌胃泼尼松悬液 5 mg/(kg·d) 和狼疮定水煎液 20 g/(kg·d)^[14]（10 倍成人剂量）各 0.1 ml，模型组和正常组予 0.2 ml 生理盐水灌胃，每日 1 次。

1.5 观察指标及方法

给药 2 周后各组采用随机数字表法选取 5 只处死，剩余 5 只给药 8 周后处死。剪开腹腔，取出肾脏组织，右肾用 4% 多聚甲醛固定，左肾置于 -80℃ 保存留作组织匀浆用。

1.5.1 免疫组织化学法观察肾组织补体 C3 表达 全部小鼠右肾用 4% 多聚甲醛固定，梯度酒精依次脱水、浸蜡包埋后于 -20℃ 冻台冷却，切片，片厚 4 μm，脱蜡，用蒸馏水洗涤 2 min，高压热修复后自来水冷却，3% H₂O₂ 溶液阻断过氧化物酶 10 min，PBS 洗 5 min×3 次，滴加一抗（按说明书提示配比），37℃ 孵育 60 min，PBS 洗 5 min×3 次；滴加二抗，37℃ 孵育 60 min；PBS 洗 5 min×3 次；DAB 显色 1~2 min；复染、透明后封片，显微镜观察补体 C3 在肾小球的沉积情况。

1.5.2 免疫荧光法观察肾组织 IgG 表达 右肾组织脱蜡后用蒸馏水洗涤 2 min，高压热修复后自来水冷却，PBS 洗 5 min×3 次，滴加 IgG 抗体（按说明书提示配比），37℃ 孵育 60 min，PBS 洗 5 min×3 次；DAPI 封片，显微镜观察 IgG 在肾小球的沉积情况。

1.5.3 肾脏脂质分子检测 使用改进的 Bligh-Dyer 方法^[15]，在一次性螺纹端玻璃管中加入 4 ml 氯仿/

甲醇 (1:1, v/v), PS、LPE、SM、ST、4-羟基烯醛等脂质标准品的混合溶液, 氯化锂 2 ml, 振荡仪涡旋, 离心吸出下层 CHCl_3 层, 用氮吹仪吹干, 提取干预 2 周、8 周各组小鼠肾脏样本中脂质分子^[16] [磷脂类包括 PS、LPE; 鞘脂类包括 SM、ST; 4-羟基烯醛类包括 4-羟基己烯醛 (HHE)、4-羟基烯丙烯醛 (HNDE)、4-羟基壬烯醛 (HNE)、4-羟基十二碳三烯醛 (HNTE)]。脂质提取物按 200 $\mu\text{l}/\text{mg}$ 蛋白浓度加入氯仿/甲醇 (1:1, v/v) 溶剂复溶, -20°C 保存备用。

将小鼠肾脏脂质提取物用氯仿/甲醇/异丙醇 (1:2:4, V/V) 溶液 150 倍稀释进样, 最终使脂质总浓度小于 50 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ 。在质谱分析中, 采用第一和第三个四极杆作为独立的质量分析器, 质量分辨率设置为 0.7 Da, 第二个四极杆作为串联质谱分析的碰撞单元。通常情况下, 每一次完整的 MS 扫描都使用全扫描模式下 1 min 的信号平均周期。串联质谱仪采用 PIS 或 NLS 扫描模式下 2~5 min 的信号平均周期, 碰撞气体压力设置为 0.1 mmHg。质谱图均由 Xcalibur 3.0 定制的序列子程序自动获得, 根据文献的方法^[17], 质谱图中各脂质峰经基线校准、同位素校正后, 再根据加入的脂质内标峰高低进行定量。

1.6 统计学方法

运用 SPSS 17.0 统计软件处理数据。计量资料均符合正态分布, 用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法, 以 $P < 0.05$ 为有差异统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肾脏组织补体 C3 和 IgG 比较

肾脏免疫复合物补体 C3、IgG 的沉积情况显

示, 与正常组相比, 干预 2 周模型组小鼠补体 C3、IgG 无明显沉积, 干预 8 周模型组小鼠补体 C3、IgG 沉积明显增多; 与模型组相比, 干预 2 周激素组及狼疮定联合激素组小鼠补体 C3、IgG 无明显变化, 干预 8 周激素组及狼疮定联合激素组小鼠补体 C3、IgG 沉积情况明显减少, 并且狼疮定联合激素组补体 C3、IgG 沉积减少更明显 (见图 1、图 2, 彩图请扫描本文二维码获取)。

2.2 各组小鼠不同时间肾脏中磷脂类脂质比较

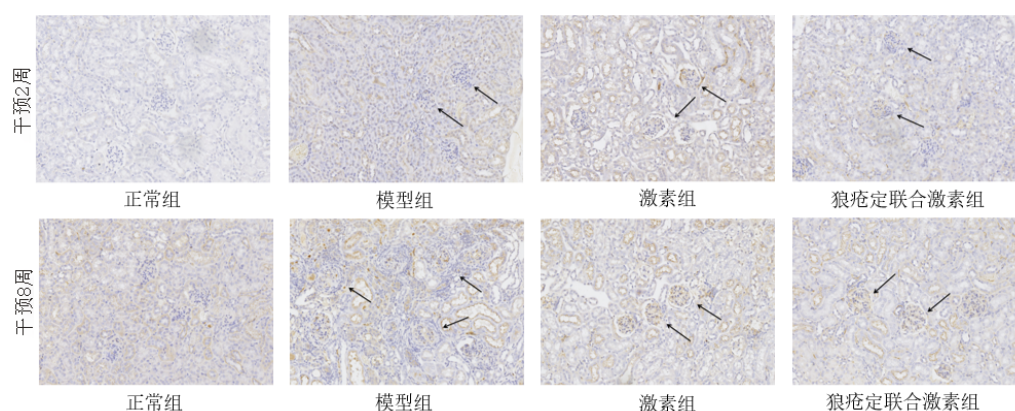
表 1 示, 与正常组比较, 干预 2 周、8 周模型组小鼠 PS 含量降低、LPE 含量升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 狼疮定联合激素组小鼠干预 2 周、8 周 PS 含量升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 干预 8 周 LPE 含量降低 ($P < 0.01$); 与激素组比较, 狼疮定联合激素组小鼠干预 8 周 PS 含量升高、LPE 含量降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 各组小鼠不同时间肾脏中鞘脂类脂质比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组小鼠干预 2 周、8 周 SM 含量降低 ($P < 0.01$), 干预 8 周 ST 含量降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 干预 2 周、8 周狼疮定联合激素组小鼠 SM 含量升高, 干预 2 周激素组和狼疮定联合激素组小鼠 ST 含量降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 干预 8 周激素组 SM 含量, 激素组和狼疮定联合激素组 ST 含量升高 ($P < 0.01$); 与激素组比较, 干预 2 周狼疮定联合激素组 SM 含量升高 ($P < 0.05$)。

2.4 各组小鼠不同时间肾脏组织中 4-羟基烯醛类脂质含量比较

表 3 示, 与正常组比较, 模型组干预 2 周小鼠 HHE、HNDE、HNE、HNTE 含量及 4-羟基烯醛总量升高, 干预 8 周小鼠 HHE、HNE 含量及 4-羟基烯



注: 箭头所指为肾小球, 肾小球内的黄色表示 C3 的沉积情况。

图 1 各组小鼠肾组织中补体 C3 表达情况 (免疫组化, $\times 400$)

表 3 各组小鼠肾脏组织中 4-羟基烯醛类脂质含量比较

(nmol/mg 蛋白, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	HHE	HNDE	HNE	HNTE	4-羟基烯醛总量
正常组	干预 2 周	5	0.69±0.07	0.27±0.02	0.70±0.05	0.07±0.01	1.73±0.13
	干预 8 周	5	0.54±0.04	0.22±0.03	0.58±0.07	0.08±0.02	1.42±0.16
模型组	干预 2 周	5	1.25±0.11 ^{a)}	0.60±0.05 ^{a)}	1.40±0.13 ^{a)}	0.20±0.02 ^{a)}	3.46±0.30 ^{a)}
	干预 8 周	5	0.96±0.04 ^{a)}	0.36±0.02	1.11±0.07 ^{a)}	0.16±0.07	2.59±0.15 ^{a)}
激素组	干预 2 周	5	1.01±0.15	0.43±0.05 ^{b)}	0.85±0.05 ^{b)}	0.11±0.01 ^{c)}	2.40±0.21 ^{b)}
	干预 8 周	5	1.18±0.06 ^{b)}	0.50±0.06	1.26±0.04	0.15±0.019	3.09±0.16
狼疮定联合激素组	干预 2 周	5	1.50±0.09 ^{d)}	0.67±0.05 ^{e)}	1.41±0.11 ^{d)}	0.20±0.03 ^{e)}	3.78±0.25 ^{d)}
	干预 8 周	5	0.69±0.06 ^{e) d)}	0.30±0.04 ^{e)}	0.63±0.07 ^{e) d)}	0.07±0.02 ^{e)}	1.70±0.17 ^{e) d)}

注: HHE, 4-羟基己烯醛; HNDE, 4-羟基烯丙醛; HNE, 4-羟基壬烯醛; HNTE, 4-羟基十二碳三烯醛。

a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与激素组比较, $P<0.01$; e) 与激素组比较, $P<0.05$ 。

关代谢产物可以促进 IgG 自身性抗体和细胞因子的产生, 氧化应激增加导致的氧化型磷脂和其代谢产物可能在 SLE 患者体内促进大量抗氧化型低密度脂蛋白和丙二醛修饰低密度脂蛋白等自身抗体的产生^[26]。因此, 氧化应激引起的脂质代谢异常会导致体内炎症水平的异常和免疫功能降低等, 从而加速 LN 的进展。

本研究中, 与正常组相比, 干预 2 周模型组小鼠肾脏中免疫复合物补体 C3、IgG 无明显沉积, 干预 8 周模型组小鼠肾脏中补体 C3、IgG 沉积明显增多, 提示在干预 2 周小鼠体内无明显狼疮发病, 干预 8 周小鼠已经有较为明显的 LN 病理变化。与模型组相比, 干预 8 周激素组和狼疮定联合激素组小鼠补体 C3、IgG 沉积减少, 其中狼疮定联合激素组效果更优, 表明激素和狼疮定联合激素治疗可以减少狼疮鼠肾脏中免疫复合物的沉积, 从而缓解 LN 病情。

对于各类脂质而言, 与正常组相比, 干预 2 周模型组小鼠多种脂质表现出明显的差异, 表明 LN 早期已出现脂质的异常, 提示脂质代谢异常可能是导致 LN 发生的重要因素之。PS 和 LPE 是肾脏中两类重要的磷脂^[27]。PS 参与细胞膜的组成, 能够影响细胞膜的流动性等^[28], 最终可以减缓或抑制 LN 的进程。LPE 不仅是生物体内细胞膜结构的基本成分, 也是多种生物过程的活性分子, 其含量升高会引起炎症反应、免疫失调等^[29]。本研究中, 与模型组比较, 狼疮定联合激素组 PS 含量在干预 2 周、8 周小鼠中有明显升高, LPE 含量在干预 8 周小鼠中明显降低, 提示狼疮定联合激素通过调节狼疮小鼠体内磷脂类相关脂质分子含量, 降低肾脏炎症反应。

SM 和 ST 是鞘脂类脂质的组成部分^[27]4, 其中

SM 与氧化应激、能量代谢等关系密切, 对于维持细胞膜的结构和功能十分重要, ST 的变化可引起肾小球的滤过性变化, 最终对小鼠的尿蛋白水平产生一定的影响^[30]。本研究中, 与模型组比较, 狼疮定联合激素组干预 2 周、8 周小鼠 SM 含量升高, 干预 8 周 ST 含量明显升高, 表明狼疮定联合激素可以增加鞘脂类脂质分子含量, 调节氧化应激反应, 改善炎症水平, 从而治疗 LN。4-羟基烯醛是脂质过氧化的最具有代表性的物质, 由 HHE、HNDE、HNE、HNTE 等分子构成^[27]183, 它可以导致炎症介质的释放, 引起组织的炎症反应^[31]。本研究中, 与模型组比较, 激素组干预 2 周、狼疮定联合激素组干预 8 周 4-羟基烯醛总量明显降低。有研究表明, 激素治疗会产生脂质代谢紊乱等毒副作用^[32], 提示激素治疗早期或激素的长期应用可能导致脂质代谢紊乱从而加剧 LN 病情, 这一变化在长期联合复方狼疮定治疗之后得以缓解, 从而体现狼疮定联合激素的长期治疗意义, 即狼疮定可以改善激素治疗的毒副作用。

综上所述, 狼疮鼠肾脏中存在免疫复合物的异常沉积及各类脂代谢的改变, 而狼疮定联合激素的长期服用可以调节脂质代谢和免疫复合物补体 C3、IgG 沉积情况, 同时也可以减轻激素治疗的毒副作用, 从而缓解 LN 病情。此研究结果可为中药复方狼疮定的临床应用提供理论依据, 并可为狼疮定日后更深层次的作用机制研究提供基础。本研究尚存在局限性, 仅探讨了肾脏中各类脂质含量变化, 研究不够深入, 今后将对血清及其他组织中脂质含量进行检测, 以进一步进行验证。

参考文献

[1] 中华医学会风湿病学分会, 国家皮肤与免疫疾病临床医

- 学研究中心,中国系统性红斑狼疮研究协作组. 2020 中国系统性红斑狼疮诊疗指南[J]. 中华内科杂志, 2020, 59(3):172-185.
- [2] 吴海竞, 陆前进. 系统性红斑狼疮发病机制的研究进展[J]. 皮肤科学通报, 2018, 35(3):249-257, 235.
- [3] ALMAANI S, MEARA A, ROVIN BH. Update on lupus nephritis [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2017, 12 (5) : 825-835.
- [4] KOSTOPOULOU M, ADAMICHOU C, BERTSIAS G. An update on the diagnosis and management of lupus nephritis [J]. Curr Rheumatol Rep, 2020, 22(7):30.
- [5] REICHLIN M, FESMIRE J, QUINTERO-DEL-RIO AI, et al. Autoantibodies to lipoprotein lipase and dyslipidemia in systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(11):2957-2963.
- [6] BORBA EF, BONFA E, VINAGRE CG, et al. Chylomicron metabolism is markedly altered in systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum, 2000, 43 (5) : 1033-1040.
- [7] FROSTEGARD J, SVENUNGSSON E, WU R, et al. Lipid peroxidation is enhanced in patients with systemic lupus erythematosus and is associated with arterial and renal disease manifestations [J]. Arthritis Rheum, 2005, 52 (1) : 192-200.
- [8] LU L, HU C, ZHAO Y, et al. Shotgun lipidomics revealed altered profiles of serum lipids in systemic lupus erythematosus closely associated with disease activity [J]. Biomolecules, 2018, 8(4):105.
- [9] RUAN XZ, VARGHESE Z, MOORHEAD JF. An update on the lipid nephrotoxicity hypothesis [J]. Nat Rev Nephrol, 2009, 5(12):713-721.
- [10] 何尚映, 林洁, 黄鹏, 等. 他克莫司胶囊联合醋酸泼尼松龙片治疗系统性红斑狼疮的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(5):398-400.
- [11] 范永升, 温成平, 李学铭, 等. 激素并用解毒祛瘀滋阴方治疗系统性红斑狼疮的临床疗效观察[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(10): 626-627.
- [12] 温成平, 范永升, 李永伟, 等. 中西医结合治疗系统性红斑狼疮的增效减毒作用研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31(3):305-309.
- [13] 胡金波, 谷恒存, 丁志山, 等. 解毒祛瘀滋阴方治疗系统性红斑狼疮小鼠的代谢组学研究[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(1): 60-65.
- [14] 杨斐, 胡樱. 实验动物学基础与技术[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2010:408.
- [15] BLIGH EG, LIGH EG, DYER WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. Can J Biochem Physiol, 1959, 37(8):911-917.
- [16] HAN X. Lipid alterations in the earliest clinically recognizable stage of Alzheimer's disease: implication of the role of lipids in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Curr Alzheimer Res, 2005, 2(1):65-77.
- [17] YANG K, CHENG H, GROSS RW, et al. Automated lipid identification and quantification by multidimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics [J]. Anal Chem, 2009, 81(11):4356-4368.
- [18] SAHAY M, SAIVANI Y, ISMAL K, et al. Mycophenolate versus cyclophosphamide for lupus nephritis [J]. Indian J Nephrol, 2018, 28(1):35-40.
- [19] 夏梦. 表现为肾病综合征的狼疮性肾炎的临床研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [20] 范永升. 系统性红斑狼疮的中医临床探索与实践[J]. 浙江中医药大学学报, 2019, 43(10):1030-1035.
- [21] YOON H, SHAW JL, HAIGIS MC, et al. Lipid metabolism in sickness and in health: emerging regulators of lipotoxicity [J]. Mol Cell, 2021, 81(18):3708-3730.
- [22] HOLOWKA D, BAIRD B. Roles for lipid heterogeneity in immunoreceptor signaling [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1861(8 Pt B):830-836.
- [23] CANNON AE, CHAPMAN KD. Lipid signaling through G proteins [J]. Trends Plant Sci, 2021, 26(7):720-728.
- [24] MOK CC. Towards new avenues in the management of lupus glomerulonephritis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12 (4):221-234.
- [25] 赵艳霞. MRL/lpr 狼疮鼠肝组织脂质代谢特征及解毒祛瘀滋阴方的调节作用研究[D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2018.
- [26] HU C, ZHANG J, HONG S, et al. Oxidative stress-induced aberrant lipid metabolism is an important causal factor for dysfunction of immunocytes from patients with systemic lupus erythematosus [J]. Free Radic Biol Med, 2021, 163: 210-219. doi: 10.1016/j. freeradbiomed. 2020. 12. 006.
- [27] 韩贤林. 脂质组学: 脂质的综合质谱分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2019.
- [28] YU M, XIE R, ZHANG Y, et al. Phosphatidylserine on microparticles and associated cells contributes to the hypercoagulable state in diabetic kidney disease [J]. Nephrol Dial Transplant, 2018, 33(12):2115-2127.
- [29] BONDARENKO AI, MALLI R, GRAIER WF. The GPR55 agonist lysophosphatidylinositol directly activates intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels [J]. Pflugers Arch, 2011, 462(2):245-255.
- [30] INOUE T, TAGUCHI I, ABE S, et al. Sulfatides are

associated with neointimal thickening after vascular injury [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 211(1):291-296.

[31] HU C, WANG M, HAN X. Shotgun lipidomics in substantiating lipid peroxidation in redox biology: methods and applications [J]. *Redox Biol*, 2017, 12: 946-955.

doi: 10.1016/j.redox.2017.04.030.

[32] HU C, DU Y, XU X, et al. Lipidomics revealed aberrant metabolism of lipids including FAHFs in renal tissue in the progression of lupus nephritis in a murine model[J]. *Metabolites*, 2021, 11(3):142.

Effect of *Langchuangding* (狼疮定) Combined with Prednisone on Renal Lipid Metabolism in MRL/lpr Mice based on Lipidomics

WANG Kaili¹, XU Xiaofen¹, DUAN Qiao¹, LU Lu², HU Changfeng¹, ZHANG Jida¹

1. School of Basic Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, 310053; 2. The Third Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanism of *Langchuangding* (狼疮定) combined with prednisone in the treatment of lupus nephritis (LN). **Methods** Thirty female MRL/lpr LN mice were randomly divided into the model group (10 mice), the hormones group (10 mice) and the combined group of *Langchuangding* and hormones (10 mice), and 10 MRL/MPJ female mice at the same week age were set as normal control group. Prednisone suspension (5 mg/(kg·d)) and *Langchuangding* aqueous decoction (20 g/(kg·d)) each at a dosage of 0.1 ml were given by gavage in the combined group, and prednisone suspension (5 mg/(kg·d)) and normal saline each at a dosage of 0.1 ml were by gavage in the hormone group; in the model and control groups, 0.2 ml normal saline was given by gavage. The deposition of complement C3 and IgG in kidney tissue of mice were detected after 2w- and 8w-intervention. Multidimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics (MDMS-SL) was used to quantify and target various lipid molecules in the kidney tissue including phospholipids such as phosphatidylserine (PS) and lysophosphatidylethanolamine (LPE), sphingolipids such as sphingomyelin (SM) and sulfatide (ST), 4-hydroxyalkenals such as 4-hydroxyhexenal (HHE), 4-hydroxyene acrolein (HNDE), 4-hydroxynonanal Alkenal (HNE) and 4-hydroxydecatrinal (HNTE), and to compare the lipid molecule contents of each group. **Results** Compared to those in the normal group, the content of PS and SM in the kidneys in the model group significantly decreased ($P < 0.01$), while total amount of LPE and 4-hydroxyalkenals increased ($P < 0.01$) after 2w- and 8w-intervention; there was no obvious deposition of complement C3 and IgG, but the contents and total amount of HHE, HNDE, HNE, and HNTE increased after 2w-intervention; obvious deposition of immune complex complement C3 and IgG occurred, while the content and total amount of HHE and HNE increased, and the content of ST decreased after 8w-intervention ($P < 0.01$). Compared to those in the model group, the content of PS and SM in the combined group significantly increased after 2w- and 8w-intervention ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); after 2w-intervention, there was no significant change in the immune complex complement C3 and Ig and decreased ST content in the hormone group and the combined group, and the contents of HNDE, HNE, HNTE and the total amount of 4-hydroxyalkenals in the hormone group decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); after 8w-intervention, the deposition of immune complexes complement C3 and IgG was significantly reduced in the hormone group and the combined group, while the content of HHE and SM increased in the hormone group; the content of HHE, HNE and the total amount of 4-hydroxyalkenals, as well as the total amount of LPE and 4-hydroxyalkenal decreased in the combined group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with those in the hormone group, the content of SM, the total amount of 4-hydroxyenal and the content of various subtypes increased after 2w-intervention, while the deposition of immune complexes decreased more, and the content of PS, the total amount of 4-hydroxyalkenal and the contents of various subtypes increased, with decreased total amount of LPE and 4-hydroxyalkenal after 8w-intervention ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The disorder of renal lipid metabolism occurs before the onset of LN and becomes worsen with the progression of the disease. *Langchuangding* in combination with hormone has the function of regulating renal lipid metabolism disorder and thus delaying the progression of LN.

Keywords lupus nephritis; lipidomics; *Langchuangding* (狼疮定); glucocorticoids; kidney; immune complex

(收稿日期: 2021-08-04; 修回日期: 2022-02-28)

[编辑: 王利芬]