

基于靶向鞘脂组学和转录组学的雷公藤多苷片 对迟发型超敏反应模型的量-效/毒机制初探

王喆[#], 曲亮[#], 张金兰^{*}, 曲枫, 张丹, 林苗, 唐煜

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 雷公藤多苷片具有良好的免疫抑制活性, 但其肝肾组织毒性显著, 并且作用机制尚不明晰。本研究整合靶向鞘脂组学和转录组学技术, 研究给予迟发型超敏反应模型 Balb/c 小鼠不同剂量的雷公藤多苷片后肝肾组织和血浆中鞘脂水平及其合成代谢酶 mRNA 表达水平的变化, 从鞘脂代谢角度揭示其药效和毒性作用机制。结果发现低剂量的雷公藤多苷片可引起血浆中神经酰胺总量显著降低、长链鞘脂和饱和鞘脂比例在肝肾组织中显著降低在血浆中显著升高, 这可能与其药效机制相关; 而高剂量的雷公藤多苷片可引起神经酰胺总量和 1-磷酸-神经酰胺 (C18:0) 水平显著升高, 长链鞘脂比例显著升高, 饱和鞘脂比例在肝肾组织中显著降低、在血浆中显著升高, 这与其毒性作用机制相关。此外, 雷公藤多苷片能导致肝肾组织中多种鞘脂代谢酶的转录水平发生明显变化, 与鞘脂水平变化对应, 其所产生药效和毒性作用与其调控关键酶表达水平有关。总之, 雷公藤多苷片的药效和毒性作用机制与鞘脂代谢密切相关, 发现的多种潜在鞘脂生物标志物为其药效和毒性作用的评价提供了有价值的信息。

关键词: 雷公藤多苷片; 鞘脂组学; 转录组学; 药效; 毒性; 生物标志物

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 11-1868-11

Integrated targeted sphingolipidomics and transcriptomics explore the mechanism of efficacy and toxicity of *Tripterygium* glycosides tablets on delayed-type hypersensitivity model

WANG Zhe[#], QU Liang[#], ZHANG Jin-lan^{*}, QU Feng, ZHANG Dan, LIN Miao, TANG Yu

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: *Tripterygium* glycosides tablets (TGT) have good immunosuppressive activity, but they can also significantly injure the liver and kidney and its mechanism is unclear. In this study, delayed-type hypersensitivity (DTH) Balb/c mouse were administrated with different doses of TGT. Then the changes of sphingolipids levels in live, kidney and plasma as well as the mRNA expression levels of their metabolic enzymes were studied by the integrated targeted sphingolipidomics and transcriptomics methods to reveal the mechanism of efficacy and toxicity of TGT. It was found that low dose of TGT could significantly decrease levels of total ceramide in the plasma, long chain sphingolipids and saturate sphingolipids in the liver and kidney, but increase them in the plasma, which were related to the efficacy mechanism of TGT. High dose of TGT can significantly increase levels of total ceramide, Cer(d18:1/18:0)-1-P, long chain sphingolipids and decrease saturation sphingolipids

收稿日期: 2018-05-30; 修回日期: 2018-07-24.

基金项目: 国家科技重大专项 (天然药物 PK/PD/毒性相关分子信号集成组学研究关键技术, 2018ZX09711001-002-004); 中国医学科学院医学与健康康科技创新工程 (药物药效和安全性相关的关键分析新技术研究, 2016-I2M-3-010).

*通讯作者 Tel: 86-10-83154880, Fax: 86-10-63017757, E-mail: zhjl@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0510

in the liver and kidney, but increase saturation sphingolipids in the plasma, which were related to its toxic mechanism. TGT can also cause significant changes of mRNA expression levels of various sphingolipid metabolic enzymes in the liver and kidney, which were correspond to the changes of sphingolipid levels. The efficacy and toxicity of TGT were related to the regulation of these key enzyme expression levels. In conclusion, the efficacy and toxic mechanism of TGT were closely related to the sphingolipids metabolism. A variety of potential biomarkers were found and they can provide valuable information for the evaluation of the efficacy and toxicity of TGT.

Key words: *Tripterygium glycosides tablets*; sphingolipidomics; transcriptomics; efficacy; toxicity; biomarker

雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook F) 属于卫矛科雷公藤属植物, 在我国具有悠久的药用历史, 具有免疫抑制^[1]、抗肿瘤^[2]等活性。临床上主要使用其多苷提取物的制剂治疗类风湿和慢性肾炎等自身免疫性疾病^[3-5], 具有良好疗效。然而雷公藤多苷片 (*Tripterygium glycosides tablets*, TGT) 对肝肾组织具有严重的毒副作用^[6, 7]: 临床研究发现雷公藤多苷片 ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 治疗 2 个月后患者转氨酶升高^[8]; 过量使用雷公藤多苷片可诱发肾功能异常甚至肾衰竭^[9]。动物实验也发现连续给予雷公藤多苷片 ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 10 天可引起肾小球肾炎模型大鼠血中谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 水平显著升高, 并导致肝组织病变^[10]。连续给予雷公藤多苷片 ($600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 16 天可引起大鼠肾近端小管功能异常及病理异常^[11]。但目前雷公藤多苷片的毒性作用机制研究较少。已报道的仅包括采用代谢组学技术发现其毒性作用与能量代谢紊乱、氨基酸和胆碱代谢上调、肠道菌群失调有关^[12]; 以及与免疫细胞活性受到抑制及诱导炎症因子合成有关^[13]。

鞘脂 (sphingolipid, SPL) 是一类重要的内源性脂质, 参与调节细胞生长、分化、衰老和凋亡等信号传导过程^[14, 15], 包括二氢鞘氨醇 (dihydrosphingosine, dhSph)、二氢神经酰胺 (dihydroceramide, dhCer)、神经酰胺 (ceramide, Cer)、1-磷酸-神经酰胺 (ceramide-1-phosphate, Cer-1-P)、葡萄糖基神经酰胺 (glucosylceramide, HexCer)、半乳糖基神经酰胺 (galactosylceramide, HexCer)、神经鞘磷脂 (sphingomyelin, SM) 等。SPL 及其合成代谢酶共同组成 SPL 代谢网络, 发挥生理功能。研究表明多种疾病都与 SPL 代谢异常相关^[16, 17]。如 I 型糖尿病动物模型中含 C24:1 脂肪酸链的 Cer、SM、HexCer 水平显著升高, Sph-1-P 显著降低^[18]。遗传性感觉神经病 I 型的发病机制为 dhCer 脱氢酶基因发生突变, 导致体内 Cer 水平显著升高, 引起神经细胞凋亡^[19]。头颈部肿瘤组织中 dhCer 合成酶 *Lass1* 的 mRNA 表达显著降低, 其产

物 Cer(C18:0) 显著下调, 并且 SPL 水平与肿瘤发展周期呈高度相关性^[20]。作者之前的研究表明雷公藤多苷片的主要成分雷公藤甲素对迟发型超敏反应 (delayed-type hypersensitivity, DTH) 的抑制作用和组织毒性与其对 SPL 代谢的调节密切相关^[21, 22]。

代谢组学和转录组学可以从整体水平研究生物体受到内在和外在因素刺激后产生的内源性代谢应答, 已广泛用于疾病的诊断治疗、药物药效和毒副作用机制的研究。利用这两种组学方法不仅能够发现中毒诊断和预后评估的生物标志物, 同时为药物毒性作用机制的阐明提供帮助^[23-26]。如马兜铃酸可导致大鼠尿中高半胱氨酸和丝氨酸水平显著上调, 这两种代谢物可作为表征其肾毒性的潜在标志物^[23]。柴胡毒素脑损伤研究中发现了大鼠血浆中 17 种差异代谢物, 并进一步推测柴胡毒素对 γ -氨基丁酸受体的抑制作用可能是其毒性作用机制之一^[24]。研究启示可以通过整合两种组学技术从 SPL 代谢角度探索雷公藤多苷片的药效和毒性作用机制并寻找指征其药效和毒性作用的 SPL 类生物标志物。

因此, 本研究将靶向鞘脂组学技术和转录组学技术相结合, 采用鞘脂组学液质联用分析方法定量分析给予 DTH 模型小鼠不同剂量的雷公藤多苷片后肝肾组织和血浆中的 76 种 SPL, 采用转录组学荧光定量 PCR 方法测定肝肾组织中 29 种 SPL 合成代谢酶的 mRNA 表达水平。采用正交偏最小二乘判别分析等模式识别方法和相关性分析方法分析雷公藤多苷片的药效和毒性作用对 SPL 及其合成代谢酶的影响, 从 SPL 代谢角度揭示其药效和肝肾毒性的作用机制, 寻找表征雷公藤多苷片药效和毒性的 SPL 生物标志物, 为其中毒预测和预后判断提供有价值的信息。

材料与方法

试剂 雷公藤多苷片购自湖北黄石飞云有限公司 ($10 \text{ mg}/\text{片}$, 以雷公藤多苷提取物计), 使用前研磨成细粉后加入 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配置成混悬

液。甲醇 (农残级) 购自美国 Mallinckrodt Baker 公司; 甲酸 (分析级) 购自 TEDIA 公司; 甲酸铵 (质谱级)、牛血清白蛋白、2,4-二硝基氟苯 (2,4-dinitrofluorobenzene, DNFB) 购自 Sigma-Aldrich 试剂公司; 超纯水由美国 Milli-Q 净化系统制备; 所有的 SPL 标准品均购自美国 Avanti Polar Lipids 公司。谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 检测试剂盒均购自中生北控生物科技有限公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、还原态谷胱甘肽 (glutathione reduced, GSH)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。考马斯亮蓝 G250 购自 SERVA 公司; qPCR 相关试剂均购自美国 Invitrogen 公司; 29 种 SPL 酶的引物均由 Life Technologies 公司提供。

动物实验 BALB/c 小鼠 (雄性, 6~8 周龄, 体重 21.3 ± 1.2 g), 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。小鼠在中国医学科学院药物研究所动物房清洁间中饲养 (12 h 光照/黑暗, 温度 23 ± 2 °C, 湿度 $55\% \pm 5\%$, 自由饮水进食)。动物实验遵守中国医学科学院药物研究所动物实验伦理委员会规程。小鼠适应环境两周后开始试验。小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别为对照组 (control)、DTH 模型组 (model)、低剂量雷公藤多苷片模型组 ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 以雷公藤提取物重量计, 相当于治疗剂量, L-TGT)、高剂量雷公藤多苷片模型组 ($900 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 相当于 LD50 剂量, H-TGT)。

采用丙酮-橄榄油 (4 : 1) 混合溶剂溶解配制 0.5% DNFB 溶液。实验第 0 天和第 1 天对模型组和模型给药组小鼠给予 0.5% DNFB 溶液 20 μL 刺激后足, 同时对照组小鼠采用空白溶剂刺激。实验第 9 天对模型组和模型给药组小鼠给予 0.5% DNFB 溶液 20 μL 刺激左耳, 诱发迟发型超敏反应, 右耳涂抹空白溶剂 20 μL 处理。同时对照组小鼠采用空白溶剂处理。在刺激的 1 h 前和 12 h 后, 对照组和模型组小鼠灌胃给予 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液, 给药组小鼠灌胃给予对应剂量的给药液。第 10 天小鼠被处死后, 分取耳片用于耳肿胀系数评价, 血浆用于鞘脂组学分析, 血清用于生化指标测定, 肝肾组织用于荧光定量 PCR、鞘脂组学、氧化应激指标分析, 以及病理组织学检查。

生化指标和氧化应激指标测定 采用东芝 TBA-40FR 全自动生化分析仪测定血清中的 ALT, AST 和 BUN 水平。称取肝肾组织约 0.1 g 加入生理盐水 1 mL, 冰浴下高速匀浆制备 10% 组织匀浆液,

按 200 μL 体积分装, 分别用于测定 SOD 活力、MDA 水平、GSH 的含量、蛋白浓度, 采用组织蛋白浓度对数值进行校正。SOD 测定采用黄嘌呤氧化酶法^[27], MDA 测定采用硫代巴比妥酸沉淀法^[28], GSH 测定采用二硫代双硝基苯甲酸法^[29], 蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝法^[30]测定。

耳肿胀系数测定和组织病理切片检查 采用万分之一天平分别称量同一小鼠左右耳片的重量, 计算耳肿胀系数。耳肿胀系数 (mg) = 左耳片重量 - 右耳片重量。将肝肾组织放入 4% 福尔马林溶液中固化 48 h 后组织包埋在石蜡块中, 制成 4 μm 厚切片, 采用苏木精曙红染色, 用于组织病理学检查。

靶向鞘脂组学分析 靶向鞘脂组学的分析方法参考已发表文献^[21, 22]。肝肾组织和血浆中的 SPL 经甲基叔丁基醚提取后采用 Agilent 6410B 三重四极杆液质联用仪分析。采用 C8 色谱柱 (150 mm \times 3.0 mm, 3 μm ; Peeke Scientific, Redwood City, CA)。二元梯度洗脱, 流动相 A 为含 0.2% 甲酸的 2 mmol \cdot L⁻¹ 的乙酸铵水溶液, 流动相 B 为含 0.2% 甲酸的 1 mmol \cdot L⁻¹ 乙酸铵甲醇溶液, 流速为 0.4 mL \cdot min⁻¹。对于不同类型的 SPL 采用不同的洗脱梯度^[21, 22]。进样量为 10 μL , 柱温为 30 °C。使用 ESI 电离源正离子检测模式, 毛细管电压: 4 000 V, 干燥气温度: 350 °C; 干燥气流速: 6 L \cdot min⁻¹; 雾化气流速: 15 psi; 采用 MRM 分段扫描模式同时测定 76 种 SPL。采用 MassHunter Quantitative Analysis 软件计算 SPL 浓度, 肝肾组织中的 SPL 水平采用蛋白浓度进行校正。

RNA 的分离和实时定量 PCR 分析 采用 Invitrogen RNA 试剂提取肝肾组织中总的 RNA, 然后以 beta-actin 作为内参基因, 采用 SYBR green 法在 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR 系统上进行实时定量 PCR 分析。20 μL 反转录系统包括 cDNA 1 μL 、提取 RNA (含 5 μg) 1 μL 、dNTP 2 μL 、Taq buffer 2 μL 、Taq DNA polymerase 0.2 μL 、SYBR Green I 0.3 μL 、待测酶 (含 5 pmol) 1 μL 、1 μL beta-actin 的上游和下游引物和超纯水 11.5 μL 。PCR 反应顺序为: 95 °C \times 10 s, 60 °C \times 30 s, 40 个循环。数据处理时将 ACTB 基因作为内标基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算 SPL 合成代谢酶基因的 mRNA 的相对表达量, 其中 Ct 值为循环阈值, 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$; $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct 分析组目标基因} - \text{Ct 分析组内标基因 ACTB}) - (\text{Ct 对照组目标基因} - \text{Ct 对照组 ACTB 内标基因})$, 计算不同组相对于对照组的表达量。

数据分析 采用 SPSS18.0 软件 (SPSS Inc.,

Chicago, IL, USA) 比较组间数据差异。其中耳肿胀系数、生化指标和氧化应激指标数据采用 T 检验法; qPCR 数据采用单因素方差分析; 脂组学数据首先采用 Shapiro-Wilktest 检验是否符合正态分布, 对于符合的变量, 采用单因素方差分析, 非正态分布的变量, 采用 Mann-Whitney U test 检验。显著性判断标准为 $P < 0.05$ 。将具有显著性差异的 SPL 导入 Simca-P 软件 (version 12.0.1, Umetrics, Umea, Sweden) 正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least square-discriminate analysis, OPLS-DA)。潜在生物标志物需满足以下标准: ① VIP 值大于 1; ② jack-knife 值不过

0 点; ③ Pcorr 绝对值大于 0.58^[21, 22]。将潜在生物标志物与生化指标和氧化应激指标进行 Spearman 相关性分析, 相关系数 r 绝对值大于 0.6 为判断相关性的标准。

结果

1 雷公藤多苷片对迟发型超敏反应的抑制作用

DTH 属于 T 细胞介导的超敏反应^[31], 是自身免疫性疾病的重要发病机制。本研究采用了经典的 DNFB 刺激法建立 DTH 动物模型^[32], 并采用耳肿胀系数评价模型严重程度。结果如图 1A 所示, 模型组

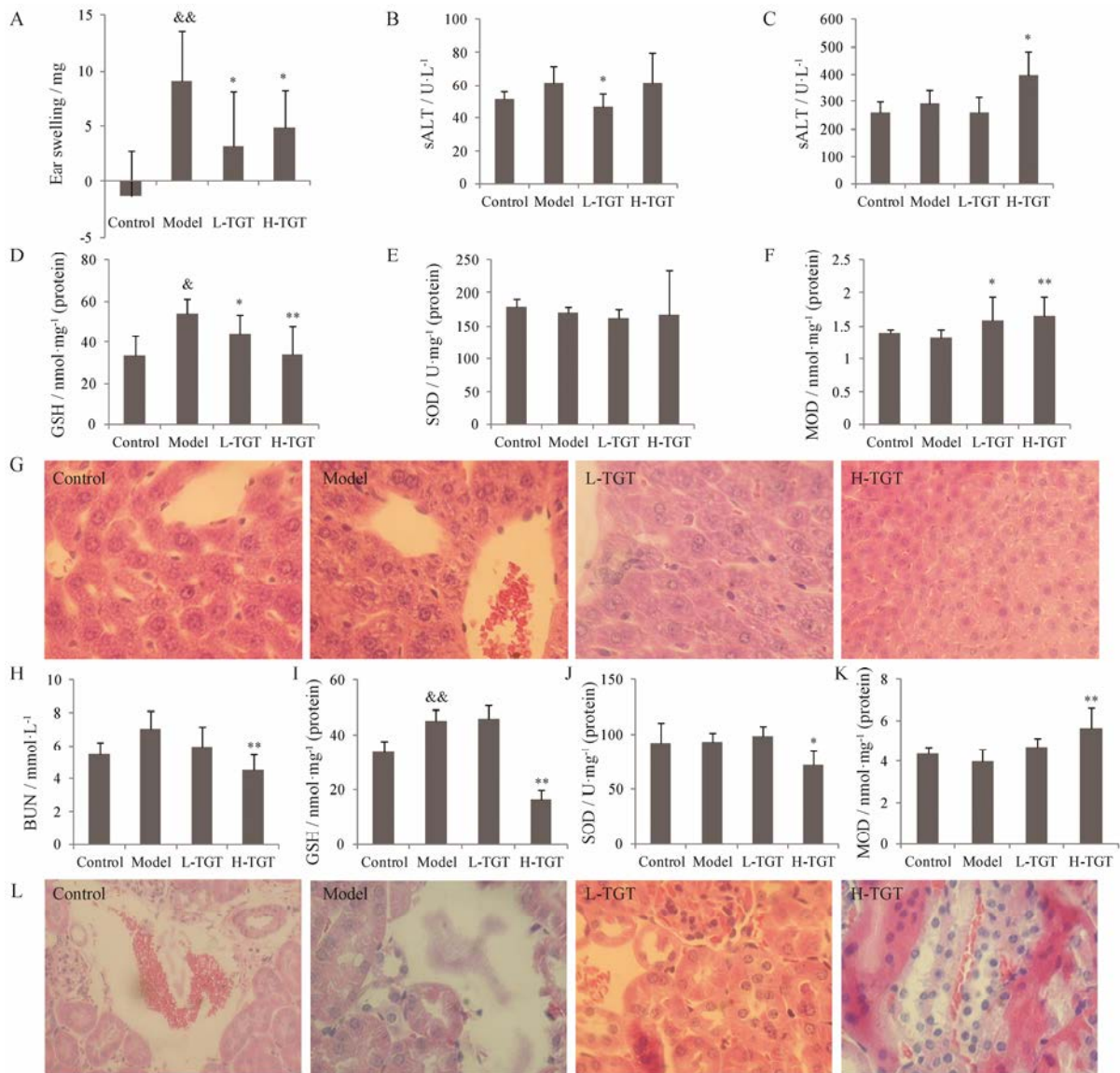


Figure 1 Effects of TGT on liver and kidney tissues of delayed-type hypersensitivity (DTH) model mouse. A: Ear swelling index; B: Alanine aminotransferase (ALT); C: Aspartate aminotransferase (AST); D: Malondialdehyde (MDA) in the liver; E: Glutathione reduced (GSH) in the liver; F: Superoxide dismutase (SOD) in the liver; G: histological picture $\times 200$ in the liver; H: Blood urea nitrogen (BUN); I: MDA in the kidney; J: GSH in the kidney; K: SOD in the kidney; L: histological picture $\times 200$ in the kidney. & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

小鼠的耳肿胀程度比对照组有显著性升高,表明模型建立成功。与模型组相比,低剂量多昔片组和高剂量多昔片组的耳肿胀度分别显著降低了 64.8% 和 47.2%。表明不同剂量的雷公藤多昔片对 DTH 均有显著的抑制作用。

2 雷公藤多昔片对迟发型超敏反应模型小鼠肝肾组织的影响

不同剂量的雷公藤多昔片对 DTH 模型小鼠肝肾组织的影响采用血清中指征肝功能的生化指标 (ALT、AST) 和肾功能的生化指标 (BUN)、肝肾组织中的氧化应激指标 (MDA、GSH、SOD) 和组织病理学检查综合评价。

如图 1B~1G 所示,与模型组相比,低剂量多昔片组小鼠肝组织中 GSH 水平明显降低,同时 MDA 水平显著升高,但未观察到组织病理学异常,表明低剂量的雷公藤多昔片可引起肝脏的抗氧化能力降低,氧化应激水平升高。高剂量多昔片组小鼠 AST 显著升高, GSH 显著降低, MDA 显著升高,组织病理学检查发现 5 例样本出现 1 例病理异常,表现为肝细胞水肿、变性、坏死和再生,表明高剂量的雷公藤多昔片可使肝脏抗氧化能力降低,脂质过氧化产物增加,并发生显著的组织病理变化。

如图 1H~1L 所示,与模型组相比,低剂量多昔片组未观察到 BUN、氧化应激指标和组织病理的明显变化,表明低剂量的雷公藤多昔片对肾组织无明显的毒性作用。高剂量多昔片组的 GSH 和 SOD 活性

水平均显著降低, MDA 显著升高,同时病理检查发现在 5 例样本中有 2 例出现肾远曲小管上皮细胞水样变性、坏死和细胞结构消失等异常变化,表明高剂量的雷公藤多昔片可导致肾的氧化应激升高和组织异常病变。

通过上述结果可见,低剂量的雷公藤多昔片除了引起肝组织氧化应激水平升高外,没有产生显著的组织病理改变,没有发现显著的毒性;而高剂量的雷公藤多昔片不仅引起肝肾组织中相关生化指标和氧化应激指标的显著异常,还会引起肝肾组织显著的组织病理变化,说明产生了显著的肝肾毒性。

3 迟发型超敏反应和雷公藤多昔片对组织和血浆中 SPL 水平的影响

采用鞘脂组学分析平台^[21, 22]分析小鼠肝肾组织和血浆中的 76 种 SPL,并比较不同组间 SPL 代谢物的差异。与对照组相比,模型组的肝、肾组织和血浆中分别有 2、9 和 6 种 SPL 发生显著变化;与模型组相比,低剂量多昔片和高剂量多昔片组在肝组织中分别有 6 种和 20 种 SPL 发生显著变化,在肾组织中分别有 18 种和 19 种 SPL 发生显著变化,在血浆中分别有 9 种和 30 种 SPL 发生显著变化。

3.1 迟发型超敏反应和雷公藤多昔片对不同亚类 SPL 含量的影响 如图 2A 所示, DTH 可引起小鼠肝肾组织和血浆中 SPL 总量以及不同亚类 SPL 总量发生显著变化。与对照组相比,模型组肝和肾组织中 Cer(d18:1/18:0)-1-P 显著升高,血浆中 Cer 总量显著

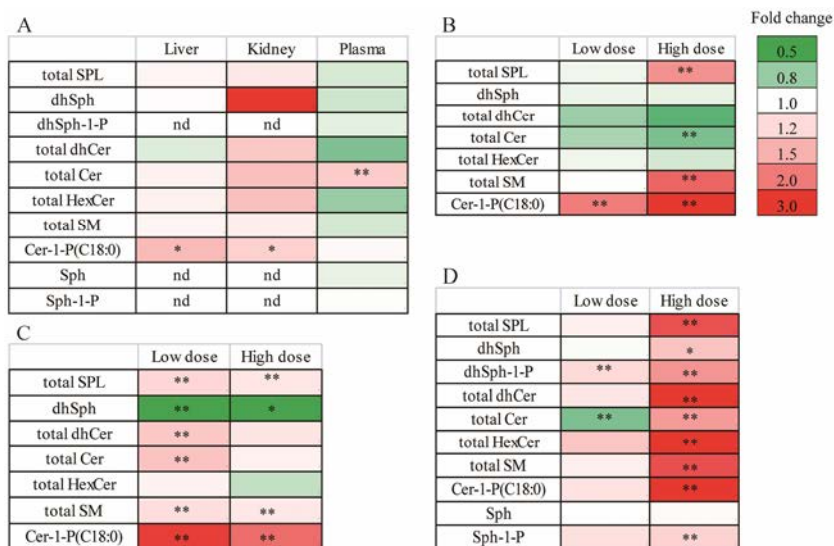


Figure 2 Effects of DTH model and TGT on different subspecies sphingolipids. A: Change in different tissues in DTH reactions; B: Change in the liver exposure to TGT; C: Change in the kidney exposure to TGT; D: Change in the plasma exposure to TGT. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Cer: Ceramide; Cer-1-P: Ceramide-1-phosphate; dhCer: Dihydroceramide; dhSph: Dihydrosphingosine; dhSph-1-P: Dihydrosphingosine-1-phosphate; HexCer: Glucosylceramide or galactosylceramide; SM: Sphingomyelin; Sph: Sphingosine; SPL: Sphingolipid

升高。而 Cer 的升高与疾病和炎症作用相关^[33]。

在肝组织中, 如图 2B 所示, 与模型组相比, 低剂量多苷片组 Cer(d18:1/18:0)-1-P 水平显著升高, 其他亚类 SPL 无明显影响。Cer-1-P 会促进炎症反应^[31], 因此推测低剂量的雷公藤多苷片对于肝脏具有促炎的毒性作用。高剂量多苷片组 Cer 总量显著降低、SPL 总量、SM 总量和 Cer(d18:1/18:0)-1-P 显著升高。高低剂量的雷公藤多苷片均能引起 Cer(d18:1/18:0)-1-P 显著升高, 且呈现剂量相关性, 剂量增加, 其变化加剧, 这可能是大剂量服用多苷片引起肝毒性的原因之一。

在肾组织中, 如图 2C 所示, 与模型组相比, 低剂量多苷片组 SPL 总量、dhCer 总量、Cer 总量、SM 总量、Cer(d18:1/18:0)-1-P 含量显著升高, dhSph 水平显著降低。dhCer 对于细胞凋亡起到抑制作用^[14], 因此其总量升高可能与雷公藤多苷片的药效作用有关。高剂量多苷片组 SPL 总量、SM 总量、Cer(d18:1/18:0)-1-P 显著升高, dhSph 水平显著降低。其中 Cer(d18:1/18:0)-1-P 的升高是雷公藤多苷片引起肾组织毒性的重要作用机制。与肝组织类似, 雷公藤多苷片对肾组织中的 SPL 的影响呈剂量相关性。

在血浆中, 如图 2D 所示, 与模型组相比, 低剂量多苷片组 1-磷酸-鞘氨醇 (dihydrosphingosine-1-phosphate, dhSph-1-P) 水平显著升高, 而 Cer 总量显著降低, Cer 总量的降低可能与其抑制 DTH 的药效作用有关; 而在高剂量多苷片组中, 除 Sph 外, 血浆中各亚类 SPL 含量均呈现显著升高, 其中 HexCer 总量、Cer 总量和 Cer(d18:1/18:0)-1-P 的升高可能与其毒性作用有关。雷公藤多苷片对于血浆中 SPL 含量的影响同样表现出剂量相关性。此外, 高剂量的雷公藤多苷片可引起 Sph-1-P 水平显著升高。有研究表明 Sph 激酶 Sphk 控制底物 Sph 和产物 Sph-1-P 的代谢平衡, 这一代谢反应对控制细胞存活和凋亡过程发挥重要作用^[34], 因此雷公藤多苷片对其调节作用可能是其毒性作用的原因之一。

通过上述结果可见, 高低剂量的雷公藤多苷片可以均引起肝肾组织中的 Cer(d18:1/18:0)-1-P 含量显著升高, 此外, 高剂量的雷公藤多苷片还会引起肝肾组织中其他多种类型的 SPL 显著升高, 进一步导致血浆中 SPL 的整体含量上升, 说明其鞘脂代谢紊乱与其毒性作用密切相关。

3.2 迟发型超敏反应和雷公藤多苷片对不同碳链长度 SPL 比例的影响 按照脂肪酸侧链长度, SPL 可分为长链 SPL (16~20 个碳, long chain SPL) 和超长链

SPL (22~24 个碳, very long chain SPL)。如图 3A 所示, 在肝组织中, 与对照组相比, 模型组不同碳链长度的 SPL 比例无显著变化。与模型组比较, 低剂量多苷片组长链 HexCer 的比例显著降低, 高剂量多苷片组长链 SPL、长链 dhCer、长链 Cer 的比例显著升高, 长链 HexCer 的比例显著降低。

在肾组织中, 与对照组比较, 模型组不同碳链长度的 SPL 的比例无显著变化。与模型组比较, 低剂量多苷片组中长链 SM 比例显著降低, 高剂量多苷片组的长链 dhCer 比例显著升高, 这些变化可能与其肾组织毒性作用相关。

在血浆中, 模型组的长链 SM 比例显著低于模型组。与模型组比较, 低剂量多苷片组的长链 Cer、长链 HexCer 和长链 SM 比例显著升高, 低剂量的雷公藤多苷片对于造模引起的长链 SM 比例降低有调节作用, 可能与药效作用相关。高剂量多苷片组的长链 SM 比例显著升高, 长链 Cer 的比例显著降低。

有文献报道长链 Cer 的增加伴随着细胞凋亡, 不同链长的 Cer 之间的平衡对细胞的存活至关重要^[35]。高剂量雷公藤多苷片引起肝组织中长链 Cer 的比例显著升高, 并且肝肾组织中不同链长的多种类型的 SPL 比例发生显著变化, 显示平衡被破坏, 这可能与其毒性作用机制密切相关。

3.3 迟发型超敏反应和雷公藤多苷片对不同饱和度 SPL 比例的影响 按照脂肪酸侧链的不饱和度, SPL 可分为饱和 SPL (不含双键, saturated sphingolipids, satSPL) 和不饱和 SPL (至少含 1 个双键, unsaturated sphingolipids, unsatSPL)。如图 3 所示, 在肝组织中, 与对照组相比, 模型组的饱和 SM 比例显著降低。与模型组比较, 低剂量多苷片组的饱和 dhCer 的比例显著降低, 但高剂量多苷片组的饱和 dhCer、饱和 SM 比例显著上升, 饱和 Cer 和饱和 HexCer 比例显著降低。其中饱和 SM 的比例上升与造模引起的饱和 SM 比例降低相反, 可能与其药效作用相关。

在肾组织中, 与对照组相比, 模型组的饱和 Cer 和饱和 HexCer 的比例显著升高, 而饱和 SM 的比例显著降低。与模型组相比, 低剂量多苷片组中饱和 SPL、饱和 dhCer、饱和 SM 比例均显著降低, 类似地, 高剂量多苷片组的饱和 SPL、饱和 dhCer、饱和 SM、饱和 Cer 比例均显著降低。其中饱和 Cer 的降低对造模引起的饱和 Cer 异常升高有抑制作用, 可能与其药效作用相关。雷公藤多苷片对肾组织中不同饱和度 SPL 的影响随剂量增加而加剧, 这也可能与

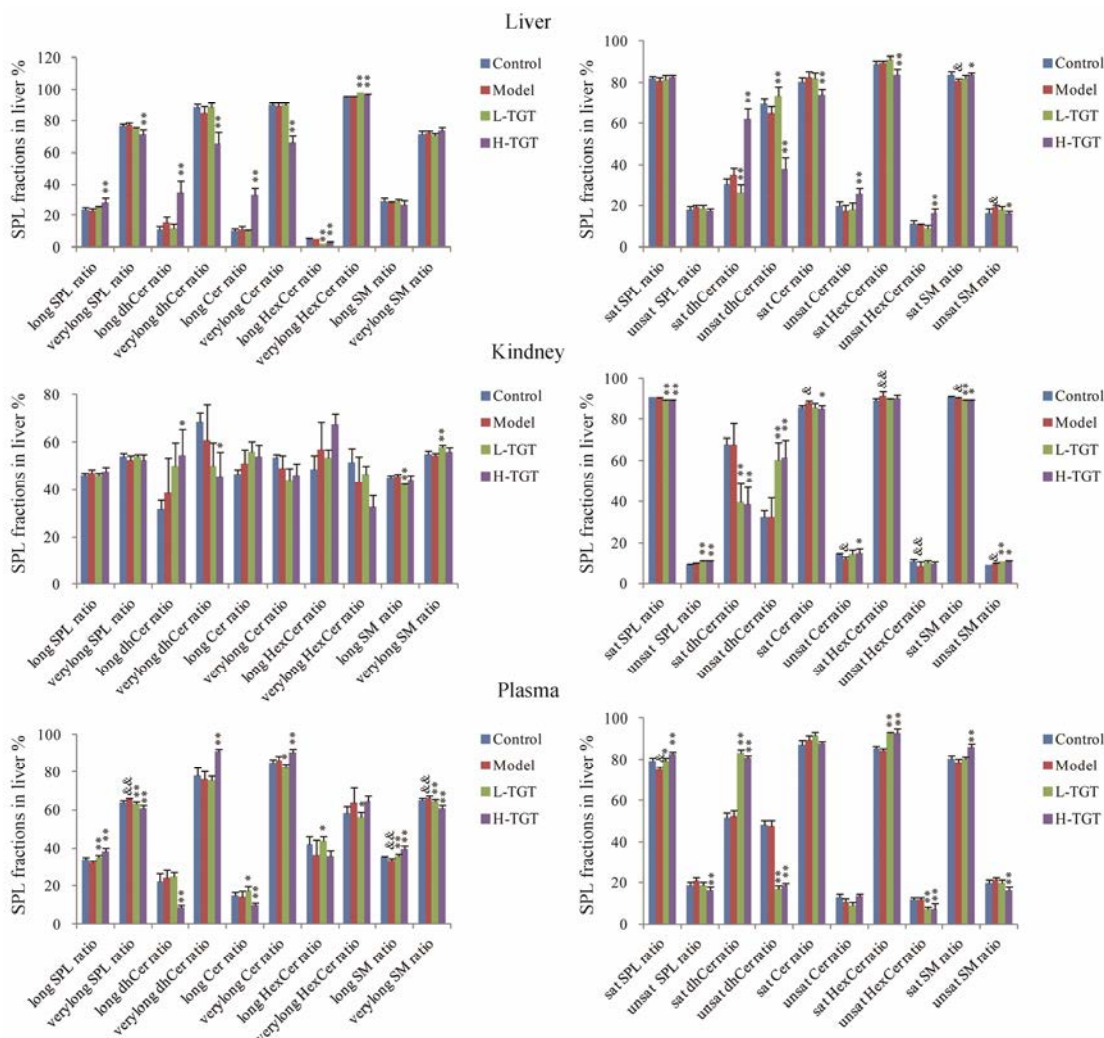


Figure 3 The fractions of SPLs and its subspecies with various length and unsaturated acyl chain in liver, kidney and plasma. &P<0.05, &&P<0.01 vs control group; *P<0.05, **P<0.01 vs model group

其药效和毒性作用相关。

在血浆中，模型组饱和 SPL 的比例与对照组相比显著降低。与模型组相比，低剂量多昔片组中饱和 SPL、饱和 dhCer、饱和 HexCer 的比例显著升高，高剂量多昔片组的饱和 SPL、饱和 dhCer、饱和 HexCer、饱和 SM 比例显著升高，其中高低剂量雷公藤多昔片对饱和 SPL 升高与造模引起的饱和 SPL 异常降低有相反的抑制作用，可能与其药效作用相关。雷公藤多昔片对血浆中不同不饱和度 SPL 的影响随剂量的增加而加剧，可能与其药效和毒性作用相关。

有文献^[36]报道，饱和与不饱和的 Cer 的比例会影响细胞膜的性质和形态，改变细胞膜的流动性，对细胞的功能产生显著影响，雷公藤多昔片对肝组织中不同不饱和度 SPL 的调节，尤其是高剂量的雷公藤多昔片，可能会打破组织细胞膜中 SPL 的分布平衡，从而引起肝肾细胞的功能，产生毒性作用。

4 迟发型超敏反应和雷公藤多昔片对组织中 SPL 代谢酶的 mRNA 表达水平的影响

从鞘脂组学研究结果发现雷公藤多昔片的药效与毒性作用均与 SPL 代谢密切相关，因此进一步采用转录组学方法研究其对 SPL 代谢酶的调控作用，深入揭示雷公藤多昔片影响 SPL 代谢的机制。在肝组织中，与对照组相比，模型组共发现 12 种 SPL 代谢酶的转录水平发生显著变化；与模型组相比，低剂量多昔片和高剂量多昔片组分别有 13 种和 17 种 SPL 代谢酶的 mRNA 表达水平发生显著变化。在肾组织中，与对照组相比，模型组共发现 6 种 SPL 代谢酶的转录水平发生显著变化；与模型组相比较，低、高剂量多昔片组分别有 12 种和 2 种 SPL 代谢酶的 mRNA 表达水平发生显著变化。

4.1 SPL 代谢酶 mRNA 表达水平对 SPL 含量的影响

雷公藤多昔片通过调节相应 SPL 的合成代谢酶，

进而调节不同类型 SPL 在体内的水平, 如图 4 所示。当给予低剂量的雷公藤多苷片后, 与模型组比较, 肾组织中 dhCer 脱氢酶 1 (degenerative spermatocyte homolog 1 lipid desaturase, Degr1) 水平显著升高, 进而引起反应产物 Cer 的水平升高, 这可能是其毒性作用的调节机制。

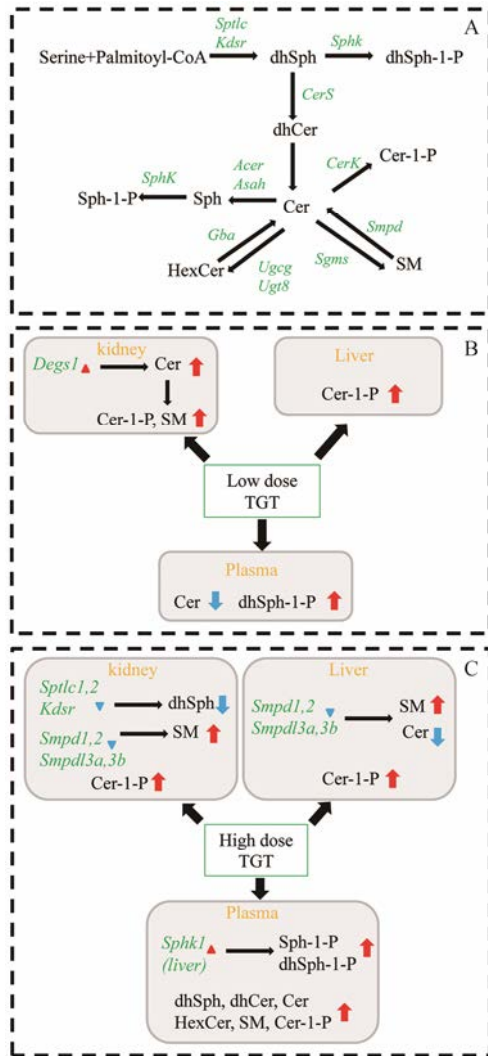


Figure 4 Possible regulatory effect of TGT on key enzymes and sphingolipids in different tissues. A: Network of sphingolipid metabolism; B: Possible regulatory effect of low dose TGT; C: Possible regulatory effect of high dose TGT

雷公藤多苷片在高剂量下会引起肝和肾组织中 SM 水解酶 (sphingomyelin phosphodiesterase, Smpd) 1 和 2 转录水平显著降低, 导致两种组织中 SM 水平显著升高。高剂量多苷片组 Sph 激酶 1 (sphingosine kinase 1, Sphk1) 的 mRNA 表达水平显著上调, 引起血浆中 Sph-1-P 和 dhSph-1-P 的水平显著升高。而 Sph-1-P 对于细胞凋亡具有抑制作用^[37], Sphk 对 SPL 代谢的调节作用可能决定了细胞的凋亡或存活^[36], 因此, 高剂量的雷公藤多苷片对 Sphk 酶的调节与其毒性作用相关。此外, 高剂量多苷片组小鼠肾组织中的丝氨酸棕榈酰基转移酶 (serine palmitoyltransferase, long chain base subunit, Sptlc) 1 和 2 的 mRNA 表达显著下调, 进一步引起了 dhSph 水平显著降低。同时肝组织中 Smpd1 的 mRNA 表达显著降低, 导致了肝组织中代谢产物 Cer 总量显著降低。从上述结果可见, 雷公藤多苷片能够显著调节相关 SPL 合成代谢酶的 mRNA 表达水平, 导致 SPL 代谢的变化, 进而引起雷公藤多苷片的毒性作用。

4.2 Cer 合成酶 CerS 对不同碳链长度 SPL 比例的影响 现已发现真核生物具有 6 种 Cer 合成酶 (ceramide synthase, CerS), 这 6 种酶对不同碳链的 dhCer 具有高度选择性^[38], 因此这些酶的转录水平变化对组织和细胞中不同碳链长度 SPL 比例变化产生较大影响^[39]。结果如表 1 所示, 在肝组织中, 与模型组相比, 低剂量多苷片组小鼠肝中负责合成超长链 Cer 的 CerS2、CerS4 的 mRNA 表达分别升高了 2.6 倍和 2.8 倍, 而合成长链 Cer 的 CerS1、CerS5、CerS6 则分别为模型组的-1.1、2 和-1.5 倍, 鞘脂组学结果显示长链 dhCer 和 Cer 的比例均无显著变化。与模型组相比, 高剂量多苷片组小鼠肝中 CerS2、CerS4 酶的 mRNA 表达分别降低了 38 倍和 209 倍, 而 CerS1、CerS5、CerS6 则分别降低了 1.5、51 和 33 倍, 相应地, 长链 dhCer 和 Cer 的比例显著升高。

肾组织与肝组织相似, 如表 1 所示, 给予不同剂量的雷公藤多苷片后, 6 种 CerS 酶的转录水平发生了

Table 1 Change of 6 CerSs at transcriptional levels in liver and kidney induced by TGT

Enzymes	Specific substrate	Liver		Kidney	
		Low dose of TGT	High dose of TGT	Low dose of TGT	High dose of TGT
CerS1	C18, C20 (long chain)	-1.1	-1.5	1.2	-3.7
CerS2	C22, C24 (very long chain)	2.6	-38	-2.7	-101.2
CerS3	No specificity	7.5	-1.6	-1.6	-5.4
CerS4	C22, C24 (very long chain)	2.8	-208.8	-4.6	-957.7
CerS5	C16 (long chain)	2	-51.4	-1.3	-476.8
CerS6	C16 (long chain)	-1.5	-32.6	-4.1	-101.2

不同程度的变化, 与不同长度碳链 SPL 的比例变化趋势基本一致, 与文献^[40]报道的酶功能相同。合成超长链 Cer 的 CerS 酶 (CerS2、CerS4) 的降低倍数大于合成长链 Cer 的 CerS 酶 (CerS1、CerS5、CerS6), 从而引起了长链 SPL 的比例显著升高以及超长链 SPL 的比例显著降低^[40]。这些结果显示雷公藤多苷片可能通过调节 CerS 酶的表达从而改变不同长度碳链 SPL 的组成比例。

通过上述对肝肾组织中鞘脂代谢酶的转录组学分析发现, 雷公藤多苷片可以通过调节这些代谢酶, 引起肝肾组织中鞘脂代谢物的显著变化, 进而引起血浆中鞘脂代谢物的改变, 造成机体鞘脂代谢通路改变甚至是紊乱。这与其药效和毒性作用机制密切相关。

5 潜在的 SPL 生物标志物

为了寻找表征雷公藤多苷片药效作用和组织毒性作用的生物标志物, 将组间差异 SPL 进行 OPLS-DA

分析, 筛选出能够区分不同的差异代谢物。其中区分模型组与药效剂量组的 SPL 作为表征药效作用的潜在生物标志物, 如表 2 所示, 在肝、肾组织和血浆中分别发现 2、16 和 2 种 SPL 生物标志物。

将区分模型组与中毒剂量组的 SPL 代谢物与指征肝肾组织毒性的生化指标和氧化应激指标进行相关性分析, 筛选出指征雷公藤多苷片毒性作用的生物标志物。根据生化指标和氧化应激指标结果, 选择 ALT、AST、SOD、GSH 作为评价肝组织毒性作用的指标, SOD、GSH 作为评价肾组织毒性作用的指标。如表 2 所示, 在肝组织和血浆中分别发现 13 和 10 种与潜在的肝毒性生物标志物, 在肾组织和血浆中分别发现 14 和 9 种潜在的肾毒性生物标志物。

讨论

本研究整合鞘脂组学和转录组学技术研究给予

Table 2 Fold changes of SPL biomarkers associated with therapeutic effects, hepatotoxicity and nephrotoxicity of TGT

Sphingolipid	Biomarkers of therapeutic effects			Biomarkers		
	Liver	Kidney	Plasma	Hepatotoxicity in liver	Nephrotoxicity in kidney	Hepatotoxicity and nephrotoxicity in plasma
Cer (d18:1/16:0)		1.535		2.755		
Cer (d18:1/18:0)				3.349		2.769
Cer (d18:1/20:0)				1.99		1.928
Cer (d18:1/22:0)			0.297			
Cer (d18:1/24:0)				0.318		2.314
Cer (d18:1/24:1)		1.775				
Cer (d18:1/18:0)-1-P		2.839		2.581	2.09	3.232
HexCer (d18:1/18:0)						1.612
HexCer (d18:1/18:1)		0.782		0.762	0.698	
HexCer (d18:1/20:0)		0.789				1.924
HexCer (d18:1/22:0)					0.66	
HexCer (d18:1/24:0)				2.221	0.622	4.721
HexCer (d18:1/24:1)		1.671				2.898
dhCer (d18:0/16:0)	0.751					
dhCer (d18:0/18:1)		3.626			3.348	
dhCer (d18:0/20:0)	0.601	0.341			0.453	
dhCer (d18:0/22:0)		0.222			0.161	
dhCer (d18:0/24:0)					0.503	
dhCer (d18:0/24:1)		1.946				
dhSphingosine (d18:0)		0.02				
dhSphingosine (d18:0)-1-P			1.136			
SM (d18:1/14:0)						2.427
SM (d18:1/16:0)				2.307		
SM (d18:1/18:0)		1.248		2.401	1.231	
SM (d18:1/18:1)					1.53	
SM (d18:1/20:0)		1.267		1.829	1.154	
SM (d18:1/22:0)		1.228		2.992	1.133	
SM (d18:1/24:0)		1.283		1.823		
SM (d18:1/24:1)		1.306			1.227	

不同剂量雷公藤多苷片后 DTH 模型小鼠肝肾组织和血浆中 SPL 水平及其相关合成代谢酶的 mRNA 表达水平的变化, 从 SPL 代谢角度探索雷公藤多苷片药效和毒性作用机制。研究结果首先发现不同剂量的雷公藤多苷片对 DTH 均有显著的抑制作用。高剂量的多苷片能引起肝肾组织的损伤, 表现为生化指标异常、氧化应激加剧和组织病理异常。其次, 通过鞘脂组学手段从不同亚类 SPL 含量、不同碳链长度和不饱和度的 SPL 比例角度分析发现: ① 低剂量的雷公藤多苷片可引起血浆中 Cer 总量显著降低, 可能与其药效作用相关; 高剂量的雷公藤多苷片可引起血浆、肝肾组织中 Cer 总量和 Cer(d18:1/18:0)-1-P 水平显著升高, 这些变化可能进一步激活下游与炎症、氧化应激、细胞凋亡相关的信号通路, 导致其毒性作用。② 低剂量的雷公藤多苷片主要引起长链 SPL 比例在肝肾组织中降低在血浆中显著升高, 而高剂量的雷公藤多苷片引起长链 SPL 比例在组织和血浆中均显著升高。此外, 雷公藤多苷片引起饱和 SPL 比例在肝肾组织中显著降低和血浆中显著升高, 并且不同剂量呈现出明显差异。其中一些表现为对 DTH 引起异常变化的抑制, 可能与药效相关; 另外一些则导致了组织中不同碳链长度和不饱和度 SPL 分布的失衡, 从而影响细胞膜的相关形态和功能, 与毒性相关。最后, 通过转录组学手段发现雷公藤多苷片能够导致多种 SPL 代谢酶的转录水平发生明显变化, 它们可能是雷公藤多苷片药效和毒性作用过程中的关键代谢酶, 包括肝组织中的 CerS1、Smpd1、Smpd 2、Sphk1 和肾组织中的 Degs1、Smpd1、Smpd 2。此外, 6 种 CerS 转录水平的差异引起了组织中不同长度碳链 SPL 比例的差异。结合上述鞘脂组学和转录组学的结果可以推测雷公藤多苷片的药效与毒性作用可能是其成分通过对肝肾组织中鞘脂代谢酶的调节, 从而引起肝肾组织中鞘脂代谢的改变甚至是紊乱, 鞘脂代谢物从组织进入循环系统, 进而引起血浆中鞘脂代谢物的显著变化。总之, 雷公藤多苷片的药效与毒性作用机制与 SPL 代谢密切相关, 发现的表征药效和毒性作用的潜在 SPL 生物标志物对于临床上雷公藤多苷片药效和毒性作用的早期评价具有很好的参考价值, 为其减毒增效研究提供了重要信息。

References

- [1] Tao X, Cush JJ, Garret M, et al. A phase I study of ethyl acetate extract of the Chinese antirheumatic herb *Tripterygium wilfordii* Hook F in rheumatoid arthritis [J]. *J Rheumatol*, 2001, 28: 2160–2167.
- [2] He MF, Liu L, Ge W, et al. Antiangiogenic activity of *Tripterygium wilfordii* and its terpenoids [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 121: 61–68.
- [3] Li LS. Clinical study of *Tripterygium wilfordii* Hook in treating glomerulonephritis [J]. *Chin J Intern Med (中华内科杂志)*, 1981, 20: 216–220.
- [4] Canter PH, Lee HS, Ernst E. A systematic review of randomised clinical trials of *Tripterygium wilfordii* for rheumatoid arthritis [J]. *Phytomedicine*, 2006, 13: 371–377.
- [5] Ho LJ, Lai JH. Chinese herbs as immunomodulators and potential disease-modifying antirheumatic drugs in autoimmune disorders [J]. *Curr Drug Metab*, 2004, 5: 181–192.
- [6] Jiang YS, Zhao S. *Tripterygium wilfordii* Hook induced acute toxicity with kidney involvement in 17 cases [J]. *Chin J Kidney Dis (中华肾脏病杂志)*, 1987, 3: 167.
- [7] Chen LN, Cai H, Yu DY. Clinical analysis of 10 cases of *Tripterygium wilfordii* Hook induced toxicity [J]. *Jiangsu Med J (江苏医药)*, 1987, 13: 667.
- [8] Xu G, Tu W, Jiang D, et al. *Tripterygium wilfordii* Hook F treatment for idiopathic refractory nephrotic syndrome in adults: a meta-analysis [J]. *Nephron Clin Pract*, 2009, 111: c223–c228.
- [9] Bi KB. Acute renal failure induced by *Tripterygium wilfordii* Hook F: clinical analysis of 20 cases [J]. *Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学杂志)*, 2000, 6: 502.
- [10] Wan YG, Zhao Q, Sun W, et al. Contrasting dose-effects of multi-glycoside of *Tripterygium wilfordii* Hook. F on glomerular inflammation and hepatic damage in two types of anti-Thy1. 1 glomerulonephritis [J]. *J Pharmacol Sci*, 2012, 118: 433–446.
- [11] Dan H, Peng RX, Ao Y, et al. Segment-specific proximal tubule injury in *Tripterygium* glycosides intoxicated rats [J]. *J Biochem Mol Toxic*, 2008, 22: 422–428.
- [12] Chen M, Ni Y, Duan H, et al. Mass spectrometry-based metabolic profiling of rat urine associated with general toxicity induced by the multiglycoside of *Tripterygium wilfordii* Hook. F [J]. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21: 288–294.
- [13] Tang SX, Yang X, Ding RL, et al. Study on the “time-toxicity” relationship and mechanisms of immunotoxicity of liver injury induced by *Tripterygium* glycosides in rats [J]. *Pharm Clin Chin Mater Med (中药药理与临床)*, 2012, 28: 78–82.
- [14] Young MM, Kester M, Wang HG. Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy [J]. *J Lipid Res*, 2013, 54: 5–19.
- [15] Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid

- signalling: lessons from sphingolipids [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2008, 9: 139–150.
- [16] Kolter T. A view on sphingolipids and disease [J]. *Chem Phys Lipids*, 2011, 164: 590–606.
- [17] Napolitano G, Karin M. Sphingolipids: the oil on the TRA Fire that promotes inflammation [J]. *Sci Signal*, 2010, 3: pe34.
- [18] Fox TE, Bewley MC, Unrath KA, et al. Circulating sphingolipid biomarkers in models of type 1 diabetes [J]. *J Lipid Res*, 2011, 52: 509–517.
- [19] Dawkins JL, Hulme DJ, Brahmabhatt SB, et al. Mutations in SPTLC1, encoding serine palmitoyltransferase, long chain base subunit-1, cause hereditary sensory neuropathy type I [J]. *Nat genet*, 2001, 27: 309–312.
- [20] Karahatay S, Thomas K, Koybasi S, et al. Clinical relevance of ceramide metabolism in the pathogenesis of human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): attenuation of C18-ceramide in HNSCC tumors correlates with lymphovascular invasion and nodal metastasis [J]. *Cancer lett*, 2007, 256: 101–111.
- [21] Qu F, Wu CS, Hou JF, et al. Sphingolipids as new biomarkers for assessment of delayed-type hypersensitivity and response to triptolide [J]. *PLoS One*, 2012, 7: 5806–5819.
- [22] Qu L, Qu F, Jia Z, et al. Integrated targeted sphingolipidomics and transcriptomics reveal abnormal sphingolipid metabolism as a novel mechanism of the hepatotoxicity and nephrotoxicity of triptolide [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 170: 28–38.
- [23] Chen M, Su M, Zhao L, et al. Metabonomic study of aristolochic acid-induced nephrotoxicity in rats [J]. *J Proteome Res*, 2006, 5: 995–1002.
- [24] Zhang Z, Lu C, Liu X, et al. Global and targeted metabolomics reveal that bupleurotoxin, a toxic type of polyacetylene, induces cerebral lesion by inhibiting GABA receptor in mice [J]. *J Proteome Res*, 2013, 13: 925–933.
- [25] Joseph P, Umbright C, Sellamuthu R. Blood transcriptomics: applications in toxicology [J]. *J Appl Toxicol*, 2013, 33: 1193–1202.
- [26] Amin RP, Vickers AE, Sistare F, et al. Identification of putative gene based markers of renal toxicity [J]. *Environ Health Persp*, 2004, 112: 465–479.
- [27] Sun YI, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase [J]. *Clin Chem*, 1988, 34: 497–500.
- [28] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction [J]. *Anal Biochem*, 1979, 95: 351–358.
- [29] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1959, 82: 70–77.
- [30] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254.
- [31] Adam J, Pichler WJ, Yerly D. Delayed drug hypersensitivity: models of T-cell stimulation [J]. *Brit J Clin Pharmacol*, 2011, 71: 701–707.
- [32] Feng YH, Zhou WL, Wu QL, et al. Low dose of resveratrol enhanced immune response of mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23: 893–897.
- [33] Maceyka M, Spiegel S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease [J]. *Nature*, 2014, 510: 58–67.
- [34] Haass NK, Nassif N, McGowan EM. Switching the sphingolipid rheostat in the treatment of diabetes and cancer comorbidity from a problem to an advantage [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 165105.
- [35] Hartmann D, Lucks J, Fuchs S, et al. Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth [J]. *Int J Biochem Cell B*, 2012, 44: 620–628.
- [36] Pinto SN, Silva LC, Futerman AH, et al. Effect of ceramide structure on membrane biophysical properties: the role of acyl chain length and unsaturation [J]. *BBA-Biomembranes*, 2011, 1808: 2753–2760.
- [37] Laychock SG, Tian Y, Sessanna SM. Endothelial differentiation gene receptors in pancreatic islets and INS-1 cells [J]. *Diabetes*, 2003, 52: 1986–1993.
- [38] Mizutani Y, Kihara A, Igarashi Y. Mammalian Lass6 and its related family members regulate synthesis of specific ceramides [J]. *Biochem J*, 2005, 390: 263–271.
- [39] Hartmann D, Wegner MS, Wanger RA, et al. The equilibrium between long and very long chain ceramides is important for the fate of the cell and can be influenced by co-expression of CerS [J]. *Int J Biochem Cell B*, 2013, 45: 1195–1203.
- [40] Mullen TD, Spassieva S, Jenkins RW, et al. Selective knockdown of ceramide synthases reveals complex interregulation of sphingolipid metabolism [J]. *J Lipid Res*, 2011, 52: 68–77.