基于非靶向代谢组学和脂质组学技术的毛蕊花糖苷治疗小儿慢性肾小球肾炎机制研究

王梦晓, 罗珂珂, 田孟尧, 边宝林, 杨 健, 杨立新, 王宏洁*, 周严严*

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 基于非靶向代谢组学和脂质组学技术考察毛蕊花糖苷 (acteoside, ACT) 对嘌呤霉素氨基核苷 (purinomycin aminonucleoside, PAN) 诱导的幼龄大鼠慢性肾小球肾炎 (chronic glomerulonephritis, CGN) 血清代谢物的影响, 初步探讨其潜在的作用机制。本实验获得中国中医科学院中药研究所动物福利伦理委员会批准 (批准号: 2022B152)。首先采用ELISA试剂盒检测各组大鼠血清细胞因子, 包括IP-10、IL-6、IL-1β、TNF-α, 以评价ACT治疗CGN幼龄大鼠的药效; 整合非靶向代谢组学和脂质组学技术初步揭示其作用机制。结果显示, 与模型组相比, 给药组血清中IP-10、IL-6、IL-1β、TNF-α的水平均显著降低, 说明ACT药效显著。非靶向代谢组学结果显示, 正常组与模型组相比, 共鉴定出23种差异代谢物, 所涉及的通路包括不饱和脂肪酸的生物合成、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成与降解和亚油酸代谢等; 给药组与模型组相比, 共鉴定出25个差异代谢物, 所涉及的通路包括不饱和脂肪酸的生物合成、三羧酸循环、亚油酸代谢等。脂质组学结果显示, 在正常组和模型组中, 共鉴定了68种差异显著的脂质, 所涉及的通路包括omega-3/omega-6脂肪酸合成、T细胞受体和共刺激信号、G蛋白偶联受体激活PKC等通路。经过ACT治疗后, 共有67种差异脂质水平发生显著变化, 上述通路均有显著回调, 还调控了PPARα对脂质代谢的调节和α-亚麻酸和亚油酸代谢等相关通路。差异代谢物和差异脂质相关性分析表明, 代谢物高香草酸、棕榈酸、硫酸吲哚酚以及甘油三酯、磷脂酰胆碱类脂质较为关键。非靶向代谢组学和脂质组学共同调节的通路为不饱和脂肪酸的生物合成和亚油酸代谢。综上所述, ACT主要通过调节甘油三酯和部分磷脂酰胆碱等差异脂质和高香草酸、棕榈酸、硫酸吲哚酚差异代谢物来调控不饱和脂肪酸的生物合成和亚油酸代谢通路以治疗CGN幼龄大鼠。本实验从血清代谢的角度初步阐明了ACT治疗儿童慢性肾小球肾炎的干预机制, 为ACT在CGN患儿中的合理临床应用奠定了坚实的基础。

关键词: 非靶向代谢组学; 脂质组学; 毛蕊花糖苷; 小儿慢性肾小球肾炎

中图分类号: R917 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)06-1873-13

Study on the mechanism of acteoside in the treatment of pediatric chronic glomerulonephritis based on non-targeted metabolomics and lipidomics techniques

WANG Meng-xiao, LUO Ke-ke, TIAN Meng-yao, BIAN Bao-lin, YANG Jian, YANG Li-xin, WANG Hong-jie*, ZHOU Yan-yan*

(*Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China*)

Abstract: This study investigated the effects of acteoside (ACT) on serum metabolites in purinomycin aminonucleoside (PAN)-induced chronic glomerulonephritis (CGN) in young rats using non-targeted metabolomics and lipidomics, and initially explored its potential mechanism of efficacy. The experiment was approved by the

收稿日期: 2025-01-25; 修回日期: 2025-04-28.

基金项目: 国家重点研发计划资助 (2023YFC2308200); 国家自然科学基金项目 (82404971); 中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目 (CI2021A04507).

*通讯作者 Tel: 86-10-64087424, E-mail: hjwang@icmm.ac.cn; yyzhou@icmm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0090

Animal Welfare Ethics Committee of Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences (No. 2022B152). Firstly, ELISA kits were used to detect serum cytokines including IP-10, IL-6, IL-1β, and TNF-α in rats of each group to evaluate the efficacy of ACT. Non-targeted metabolomics and lipidomics techniques were used to determine metabolites and lipids in serum, and integrated analysis was conducted to reveal the mechanism. The results showed that compared with the model group, the levels of IP-10, IL-6, IL-1β, and TNF-α in the serum of the ACT groups were significantly reduced, indicating a significant pharmacological effect of ACT. Non-targeted metabolomics results revealed that 23 different metabolites were identified between the control and model groups, involving pathways such as biosynthesis of unsaturated fatty acids, biosynthesis and degradation of valine, leucine, and isoleucine, and linoleic acid metabolism. Between the ACT and model groups, 25 different metabolites were identified, involving pathways such as biosynthesis of unsaturated fatty acids, the TCA cycle, and linoleic acid metabolism. Lipidomics results showed that 68 significantly different lipids were identified between the control and model groups, involving pathways such as omega-3/omega-6 fatty acid synthesis, T-cell receptor and costimulatory signaling, and G-protein-coupled receptor activation of PKC. After ACT treatment, significant changes were observed in 67 differential lipids, with notable reversal in the aforementioned pathways. It also regulated PPARα modulation of lipid metabolism and related pathways such as α-linolenic acid and linoleic acid metabolism. Correlation analysis of differential metabolites and lipids indicated that metabolites such as homovanillic acid, palmitic acid, indoxyl sulfate, as well as triglycerides and phosphatidylcholines were critical. The commonly regulated pathways by non-targeted metabolomics and lipidomics were biosynthesis of unsaturated fatty acids and linoleic acid metabolism. In conclusion, ACT primarily treats CGN in young rats by regulating the biosynthesis of unsaturated fatty acids and linoleic acid metabolism pathways through differential lipids such as triglycerides and some phosphatidylcholines, and differential metabolites such as homovanillic acid, palmitic acid, and indoxyl sulfate. This study initially elucidated the intervention mechanism of ACT in the treatment of pediatric chronic glomerulonephritis from the perspective of serum metabolism, laying a solid foundation for the rational clinical application of ACT in children with CGN.

Key words: non-targeted metabonomics; lipidomics; acteoside; pediatric chronic glomerulonephritis

慢性肾脏疾病 (chronic kidney disease, CKD) 是一种不可逆的肾脏损伤疾病, 可发展为终末期肾病 (end stage renal disease, ESRD)。CKD 是世界范围内的重大公共卫生问题[1-4]。近期临床研究显示, 除了先天性和遗传因素导致 CKD 外, 慢性肾小球肾炎 (chronic glomerulonephritis, CGN) 是 CKD 是首要因素[5]。目前, 儿童 CGN 的患病率主要集中在 2～12 岁, 在过去几十年中发病率逐年上升, 分析其原因可能与环境污染、生活习惯、遗传因素以及感染等相关。小儿 CGN 对患儿的生活质量和长期预后产生严重影响, 该病主要表现为肾小球的持续性炎症反应, 导致肾小球滤过功能受损。由此可见, 儿童 CGN 的诊断和治疗仍面临着独特的挑战[6]。目前治疗药物通常使用激素和免疫抑制剂。然而, 使用西药具有多种不良反应, 患者依从性差, 且容易产生耐药性[7]。因此, 在中医药理论指导下, 探寻临床疗效确切、不良反应少的中药及有效成分, 对于儿童 CGN 预防和治疗具有极为关键的现实价值。

毛蕊花糖苷 (acteoside, ACT) 是一种水溶性的苯乙醇苷类化合物, 由 3,4-二羟基苯乙醇和咖啡酸两种苷元、葡萄糖和鼠李糖两个糖基构成。ACT 是边宝林研究员课题组研发的国家二类新药地黄叶总苷胶囊 (国药证字 Z20070013) 中的主要活性成分, 占 35%～45%, 其具有广泛的生物活性, 包括抗炎[8-10]、神经保护[8]、抗癌[11-13]、促进成骨细胞的增殖和分化[14,15]等, 且安全、无致畸等不良反应[16]。近年来, ACT 在肾病治疗方面的活性逐渐被发现和认可[17,18]。本课题组前期完成了 ACT 提取纯化、代谢规律和治疗肾炎的初步作用机制[19]。四川美大康药业股份有限公司开展了 ACT 治疗儿童 CGN 的临床研究, 初步发现其临床效果显著。然而, 对于 ACT 治疗儿童 CGN 的作用机制仍未阐明。因此, 本文使用 ELISA 检测了 ACT 干预前后相关细胞因子的变化, 包括 IP-10、IL-6、IL-1β、TNF-α。此外, 基于整合非靶向代谢组学和脂质组学技术研究 ACT 治疗 CGN 幼龄大鼠潜在的生物标志物, 初步探讨其作用机制。此研究将为 ACT 在儿童慢性肾小球肾炎的临床应用奠定科学依据, 同时为 ACT 的新药开发提供前期支撑。

材料与方法

仪器 Ultimate 3000 超高效液相色谱仪 (含自动进样器、柱温箱、在线真空脱气机、低压四元梯度泵、PDA 检测器)、LTQ Orbitrap Velos Pro 质谱仪含高分辨

静电场轨道阱质谱、电子喷雾离子源 (electronspray ionization, ESI)、Thermo Scientific Heraeus Multifuge X1R 高速离心机 (美国 Thermo Fisher 公司); KQ-250B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); XA105-梅特勒−托利多 1/10 万级电子天平、JA503-1/10 千级电子天平 (上海舜宇恒平仪器有限公司); IKA MS3 digital 涡旋仪 (德国 IKA 公司)。

试剂 毛蕊花糖苷为本课题组前期从地黄叶中分离所得 (纯度 > 98%)[20]。嘌呤霉素氨基核苷 (purinomycin aminonucleoside, PAN) 购自上海毕得医药科技有限公司 (批号 BD149557, 250 mg)。大鼠 IP-10 (批号 JLC5001-202401)、IL-6 (JLC1721-202401)、IL-1β (JLC1704-202401)、TNF-α (JLC2062-202401) ELISA 试剂盒购自上海晶抗生物工程有限公司。纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司; 甲醇 (色谱级)、乙腈 (色谱级)、甲酸 (色谱级, 批号 212271) 购自美国 Thermo Fisher 公司。

实验动物 本实验获得中国中医科学院中药研究所动物福利伦理委员会批准 (批准号: 2022B152)。3 周龄 SPF 级雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物使用许可证号: SCXK (京) 2021-0011。饲养于中国中医科学院中药研究所动物实验中心, 动物房温度: 20 ± 2 ℃, 相对湿度: 60% ± 5%, 12 h 光照和黑暗循环。大鼠的饲养和使用均符合中国《实验动物管理条例》。

动物分组及造模 70 只 SD 雄性 3 周龄大鼠适应性喂养 5 天, 24 h 尿蛋白定量确定无蛋白尿后, 随机分为 7 组: 正常组、模型组、ACT 5 mg·kg^{-1} 组、ACT 10 mg·kg^{-1} 组、ACT 20 mg·kg^{-1} 组、ACT 40 mg·kg^{-1} 组、阳性药 (他克莫司, tacrolimus, FK506) 组, 每组各 10 只。其造模与治疗方案如图 1A 所示。实验期间, 观察动物精神情况、行为和毛色有无异常; 每周记录大鼠体重。给药 4 周后, 20% 乌拉坦腹腔注射麻醉大鼠, 剂量为 1.0 g·kg^{-1}, 收集血清, 室温静置 2 h 后, 4 ℃、3 000 r·min^{-1} 离心 10 min, 并储存在−80 ℃超低温冰箱。

血清相关细胞因子测定 按照试剂盒说明书采用 ELISA 方法测定血清中相关细胞因子的变化, 包括 IP-10、IL-6、IL-1β、TNF-α。

基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 的非靶向代谢组学分析 取血清 50 μL, 加入乙腈 200 μL, 涡旋混匀 3 min, 4 ℃下 12 000 r·min^{-1} 离心 15 min。每个样品各取 10 μL 混合制备质控 (quality control, QC) 样本, 在检测过程中, 每检测 6 个样品运行 1 次 QC 样本, 用以保证仪器在分析过程中的稳定性。使用 ACQUITY UHPLC HSS T3 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱; 柱温为 35 ℃; 流动相为 A (乙腈) 和 B (0.1% 甲酸−水); 梯度洗脱: 0～2 min, 5%～55% A; 2～10 min, 55%～95% A; 10～15 min, 95% A; 15～15.5 min, 95%～5% A; 15.5～20 min, 5% A; 流速 0.3 mL·min^{-1}; 进样体积: 1 μL。ESI 源参数设定如下, 分别使用正离子和负离子扫描模式采集数据, 正离子模式下毛细管温度 350 ℃, 毛细管电压 35 V, 喷雾电压 3.5 kV, 鞘气 (N_2) 流速 4.55 L·min^{-1}, 辅助气 (N_2) 流速 3 L·min^{-1}; 负离子模式下毛细管电压 −35 V, 喷雾电压−3.5 kV, 鞘气 (N_2) 流速 4.55 L·min^{-1}, 辅助气 (N_2) 流速 3 L·min^{-1}。样品一级质谱在 FT 模式下进行全扫描 (分辨率为 30 000, 扫描范围 m/z 50～2 000), 二级及三级质谱采用数据依赖性扫描 (data dependent scan)。数据采集和分析采用 Xcalibur, Metworks 和 Mass Frontier 7.0 软件。

基于 UHPLC-Q-Exactive-MS 的脂质组学分析 取血清 40 μL, 加入甲醇 300 μL, 涡旋混匀 1 min。加入甲基叔丁基醚 1 000 μL, 振摇 1 h。加入超纯水 250 μL, 涡旋混匀 1 min。4 ℃下 12 000 r·min^{-1} 离心 10 min。取上清液 400 μL, 低温真空挥干。加入异丙醇−乙腈 (1∶1) 溶液 90 μL、25 μg·mL^{-1} 十九烷酸溶液 5 μL 和 15.16 μmol·L^{-1} PC 12∶0/13∶0 溶液 5 μL, 振摇复溶, 待测。QC 样本由等体积的各样本均匀混合后得到, 且 QC 样本的数据采集方法与其他样本完全一致。在检测过程中, 每检测 6 个样品运行 1 次 QC 样品, 用以保证仪器在分析过程中的稳定性。使用 ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) 色谱柱; 柱温为 55 ℃; 正离子模式流动相为 A (乙腈−水 6∶4, 0.1% 甲酸, 5 mmol·L^{-1} 甲酸铵) 和 B (乙腈−异丙醇 1∶9, 0.1% 甲酸, 5 mmol·L^{-1} 甲酸铵); 梯度洗脱: 0～2 min, 100%～70% A; 2～9 min, 70%～30% A; 9～11 min, 30%～5% A; 11～12 min, 5%～0% A; 12～14 min, 0% A; 14～14.1 min, 0%～100% A; 14.1～16 min, 100% A; 流速 0.26 mL·min^{-1}。负离子模式流动相为 A (乙腈−水 1∶10, 0.04% 乙酸, 1 mmol·L^{-1} 乙酸铵) 和 B (乙腈−异丙醇 1∶1); 梯度洗脱: 0～3 min, 90%～65% A; 3～6 min, 65%～15% A; 6～8 min, 15%～0% A; 8～11 min, 0% A; 11～11.1 min, 0%～90% A; 11.1～13 min, 90% A; 流速 0.3 mL·min^{-1}, 进样体积: 4 μL。ESI 源参数设定如下, 分别使用正离子和负离子扫描模式采集数据, 正、负离子的离子源电压分别为 3.7 和 3.5 kV; 毛细管加热温度为 320 ℃; 鞘气压力为 30 psi, 辅助气压为 10 psi; 溶剂加热蒸发温度为 300 ℃; 鞘气和辅助气均为 N_2; 碰撞气为 N_2, 压力为 1.5 mTorr。一级全扫描参数为: 分辨率 70 000, 自动增益控制目标 1×10^6, 最大隔离时间 50 ms, 质荷比扫描范围 150～1 500。采用外标法

校准质谱质量轴, 质量误差为 5 ppm。代谢物鉴定采用 dd-MS^2 扫描模式 (数据依赖扫描模式), 参数如下: 分辨率 17 500, 自动增益控制目标 1×10^5, 最大隔离时间 50 ms, 最多扫描 10 个离子的二级碎片 (动态排除), 质量分离窗口 2, 碰撞能 30 V, 强度限定 1×10^5。采用 Xcalibur 2.2 SP1.48 软件控制液质系统, 并进行数据采集。

数据分析及处理 应用 Compound Discoverer 软件对采集的 LC-MS/MS 数据进行色谱峰识别、校正和归一化处理, 将得到的数据导入 SIMCA 14.1 软件, 进行主成分分析 (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)。分别挑选出 VIP ≥ 1 及 $P < 0.05$ 或最大差异倍数 > 1.5 的化合物作为对模型有贡献度的标志物。通过 MetaboAnalyst 5.0 平台和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 等数据库进行注释, 寻找各生物标志物所在的相关代谢通路, 进行通路的富集分析。

多组学联合分析 采用生信分析平台欧易云平台 (https://cloud.oebiotech.cn/task/) 将本实验中的差异代谢物和差异脂质进行共表达相关性分析, 根据样本一一对应关系对, 计算两个组学特征之间的相关性, 并将相关性排名前 20 的代谢产物和脂质绘制矩阵图进行可视化分析。采用生信分析平台基迪奥生物信息云平台 (https://www.omicshare.com/) 计算本实验所筛选的差异代谢物与差异脂质之间的相关系数及 P 值, 将数据导入 ChiPlot 分析平台 (https://www.chiplot.online/), 将相关代谢物和脂质进行网络关联。

统计学分析 采用 SPSS 软件进行统计分析, 计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果

1 大鼠血清相关细胞因子的变化

为探讨 ACT 对 CGN 幼龄大鼠炎症反应的药效作用, 通过 ELISA 试剂盒, 对大鼠血清的炎症因子和趋化因子 (包括 IP-10、IL-6、IL-1β、TNF-α) 进行检测。结果如图 1B 所示。血清细胞因子, 与模型组相比, ACT 显著降低了 IP-10、IL-6、IL-1β、TNF-α 的水平 ($P < 0.05$)。

2 血清非靶向代谢组学分析

2.1 血清液质图谱分析 为了深入探讨 ACT 治疗 CGN 幼龄大鼠的作用机制, 以 ACT 20 mg·kg^{-1} 剂量组为例, 对大鼠血清进行非靶向代谢组学和脂质组学检测, 筛选各组差异代谢物和差异脂质, 对差异代谢物和差异脂质进行 KEGG 功能富集分析; 挖掘 ACT 治疗儿童 CGN 的相关通路, 初步阐明其干预机制。

利用 UHPLC-Orbitrap MS 技术, 在正、负离子模式下对血清样本进行数据采集。为了确保实验结果的准

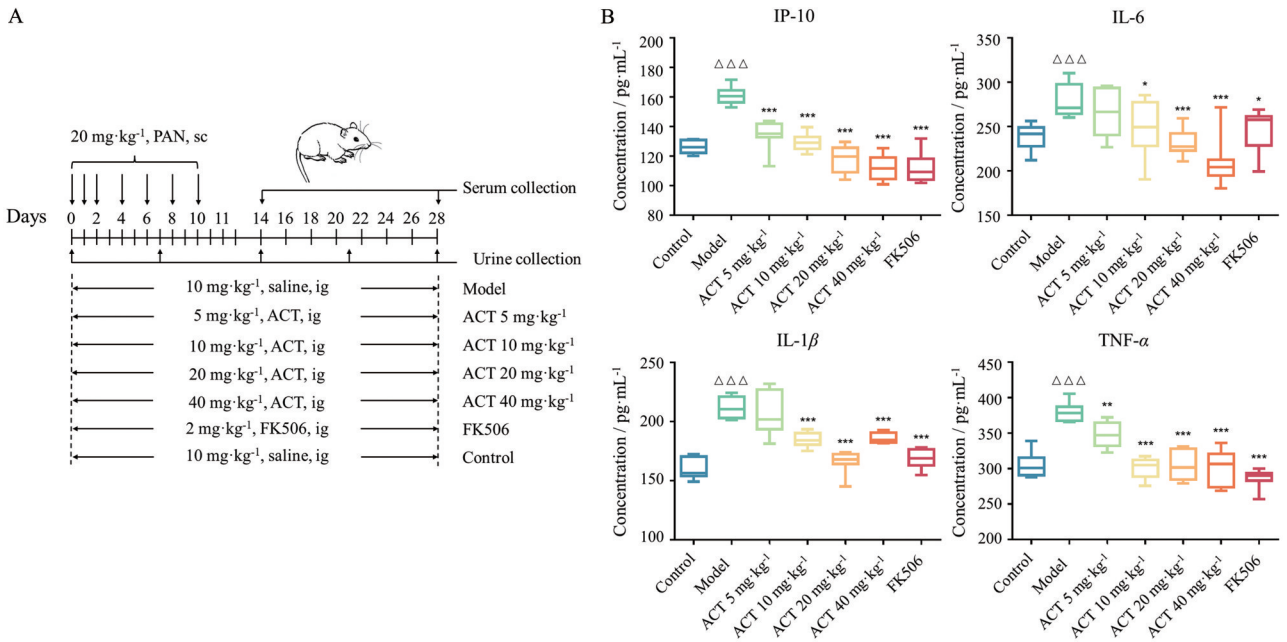


Figure 1 Effect of ACT on CGN rats. A: Modeling method and treatment plan; B: Effect of ACT on serum cytokines in rats. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. $^{\triangle\triangle\triangle}P < 0.001$ *vs* control; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* model. ACT: Acteoside; CGN: Chronic glomerulonephritis; PAN: Purinomycin aminonucleoside; FK506: Tacrolimus; sc: Subcutaneous injection; ig: Oral gavage

确性, 使用QC样品来评价样品采集过程中系统的稳定性和重复性。对比分析发现三组基峰色谱图在峰形上无明显差异, 正常组和模型组以及模型组和给药组的基峰色谱图在峰强度和相对丰度上有明显差异, 如图2所示。推断大鼠血清内源性代谢物在造模后发生紊乱, 给予ACT后有明显回调趋势。

2.2 代谢图谱分析 采用PCA、PLS-DA和OPLS-DA进行分析结果可视化。PCA分析, 见图3A、B, 发现三组明显区分, 血清代谢轮廓呈现明显的组间离散趋势, 表明各组大鼠血清中的代谢物总体分布趋势和组间样本的差异度均出现改变。QC样本聚集良好, 说明系统重复性稳定。

大鼠血清在正、负离子模式下进行PLS-DA, 见图3C、D, 正离子模式下, $R^2X = 0.359$, $Q^2 = 0.294$; 负离子模式下, $R^2X = 0.533$, $Q^2 = 0.687$。各组之间有明显的区分, 说明各组大鼠的血清内源性代谢物有明显差异, 可以进一步分析差异代谢物。同时进行了模型验证, 显示Q^2截距小于0, 未发现过拟合现象, 模型可靠, 见图3E、F。

采用OPLS-DA对正常组和模型组、模型组和给药组进行进一步的系统分析, 见图3G～J。正常组和模型组在正离子模式下, $R^2X = 0.912$, $Q^2 = 0.687$; 在负离子模式下, $R^2X = 0.473$, $Q^2 = 0.952$。模型组和给药组在正离子模式下, $R^2X = 0.887$, $Q^2 = 0.680$; 在负离子模式下, $R^2X = 0.384$, $Q^2 = 0.816$。以VIP ≥ 1及$P < 0.05$或最大差异倍数 > 1.5为标准, 筛选血清中潜在的差异代谢物。

2.3 ACT调节CGN幼龄大鼠的血清代谢紊乱 对正常组和模型组、模型组和ACT组进行差异代谢物分析, 见图4A、B。筛选VIP ≥ 1, $P < 0.05$的代谢物, 基于人类代谢组数据库 (human metabolome database, HMDB), 在正常组和模型组中, 共鉴定了23种差异显著的代谢物。经过ACT治疗后, 共有25种差异代谢物水平发生显著变化。具体结果见表1。为了阐明ACT对CGN起

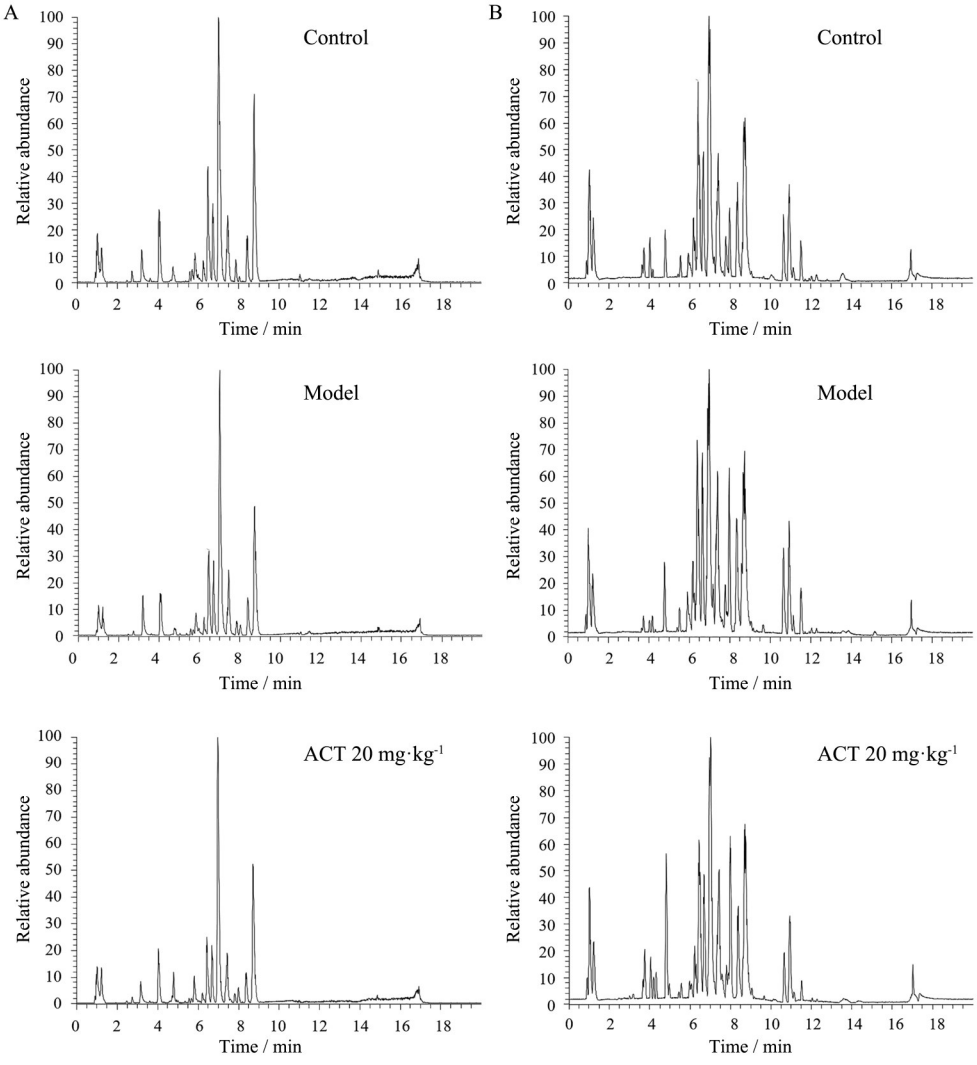


Figure 2 Total ions chromatograph of serum samples of rats in each group. A: Positive ion mode; B: Negative ion mode

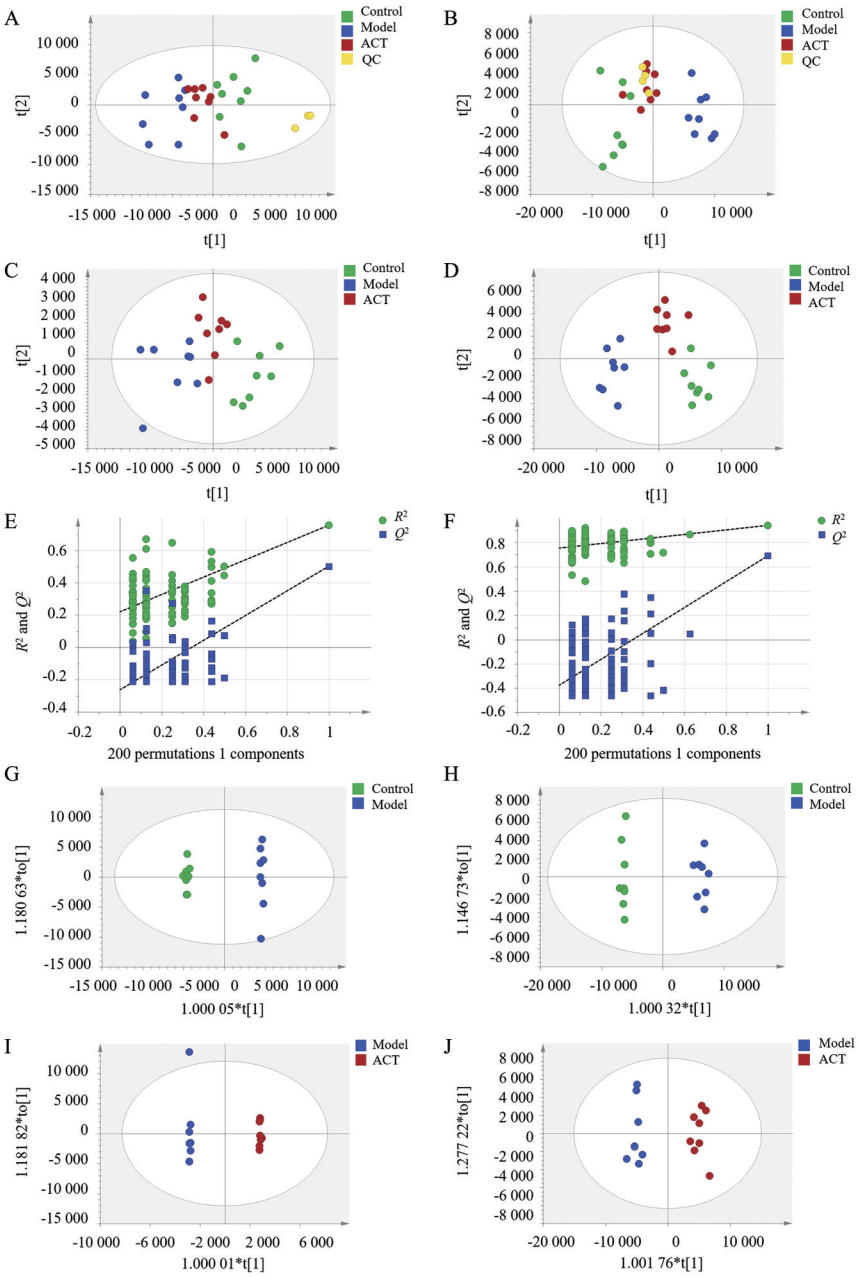


Figure 3 Multivariate statistical analysis. A, B: Plot of PCA scores in positive and negative ion mode; C, D: Plot of PLS-DA scores in positive and negative ion mode; E, F: Plot of PLS-DA model validation in positive and negative ion mode; G−J: Plot of OPLS-DA scores in positive and negative ion mode. PCA: Principal component analysis; PLS-DA: Partial least squares discriminant analysis; OPLS-DA: Orthogonal partial least squares discriminant analysis

作用的代谢通路, 将这些差异代谢物导入代谢分析数据库进行分析。KEGG 功能富集分析显示, CGN 幼龄大鼠不饱和脂肪酸的生物合成、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成、亚油酸代谢和缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解等代谢通路调控异常。而经 ACT 干预后不饱和脂肪酸的生物合成代谢通路显著回调。同时, ACT 还调控了 TCA 循环、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、亚油酸代谢等代谢通路, 见图 4C、D。

3 ACT 改善 CGN 幼龄大鼠引起的血清脂质组学特征

3.1 脂质图谱分析 非靶向脂质组学分析同样对血清样本数据进行 PCA、PLS-DA 和 OPLS-DA 可视化分析。PCA 分析见图 5A、B, 发现三组明显区分, 血清代谢轮廓呈现明显的组间离散趋势, 表明各组大鼠血清中的脂质总体分布趋势和组间样本的差异度均出现改变。

Table 1 Differential metabolites in serum. [a]$P < 0.05$, [b]$P < 0.01$, [c]$P < 0.001$

No.	Metabolite	Model *vs* control		ACT *vs* model	
		Log_2FC	Change trend	Log_2FC	Change trend
1	Docosahexaenoic acid	−0.51	↓[c]	1.11	↑[c]
2	Osbond acid	0.65	↑[c]	−0.086	↓[b]
3	Cholesterol sulfate	−0.41	↓[c]	0.80	↑[a]
4	3-Indoxyl sulphate	0.52	↑[c]	−0.009 3	↓[b]
5	Deoxycholic acid	−0.75	↓[b]	0.66	↑[b]
6	*L*-*α*-Lysophosphatidylcholine	0.25	↑[c]	–	–
7	16-Hydroxyhexadecanoic acid	0.94	↑[b]	–	–
8	Linoleic acid	−0.12	↓[b]	−0.006 2	↓[a]
9	Sulfoglycolithocholic acid	−0.088	↓[b]	0.12	↑[c]
10	Allantoin	1.12	↑[b]	−0.26	↓[a]
11	2-Pentadecanone	−0.54	↓[a]	–	–
12	Isodesmosine	−1.62	↓[c]	0.21	↑[c]
13	*D*-Gluconic acid	0.51	↑[a]	−0.021	↓[a]
14	5-Methoxyindoleacetic acid	−0.011	↓[c]	–	–
15	Palmitic acid	0.64	↑[a]	–	–
16	Arachidic acid	0.065	↑[b]	–	–
17	Ferulic acid 4-sulfate	−2.50	↓[b]	0.25	↑[b]
18	*D*-Tryptophan	2.59	↑[a]	0.49	↑[a]
19	*N*-Acetyl-9-*O*-acetylneuraminic acid	0.91	↑[c]	−0.062	↓[c]
20	Homovanillic acid	3.41	↑[c]	−0.088	↓[c]
21	2-Keto-glutaramic acid	−1.27	↓[b]	−0.85	↓[b]
22	IpA	−1.18	↓[c]	−0.42	↓[c]
23	*N*-Arachidonylglycine	−1.00	↓[b]	−0.98	↓[b]
24	Ethyl eicosapentaenoic acid	–	–	−0.076	↓[b]
25	Malic acid	–	–	1.16	↑[a]
26	*D*-(−)-Erythrose	–	–	−0.42	↓[b]
27	Citric acid	–	–	0.080	↑[b]
28	7-Ketodeoxycholic acid	–	–	−0.34	↓[a]
29	*N*-Undecanoylglycine	–	–	−0.17	↓[a]
30	Glycochenodeoxycholic acid	–	–	1.25	↑[b]
31	Decylubiquinone	–	–	0.93	↑[c]

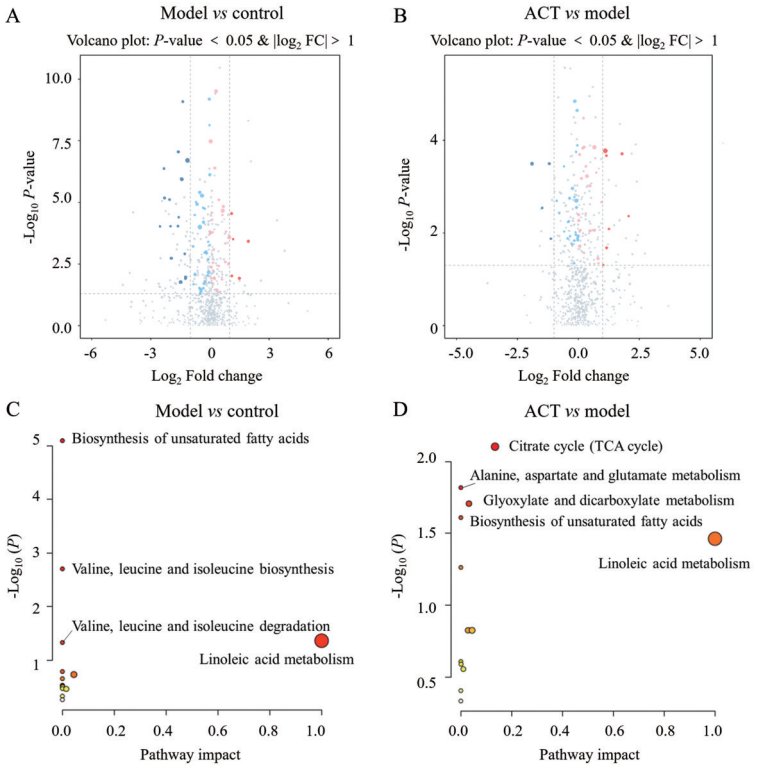


Figure 4 Volcanic map and KEGG pathway bubble map of serum differential metabolites in each group. A, B: Volcanic map; C, D: Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway bubble map

大鼠血清在正、负离子模式下进行PLS-DA, 见图5C、D, 正离子模式下, 正常组、模型组和ACT给药组之间的PLS-DA评分参数分别为 R^2X = 0.495, Q^2 = 0.172; 负离子模式下, R^2X = 0.728, Q^2 = 0.561。并进行了模型验证, 显示 Q^2 截距小于0, 未过拟合, 模型可靠, 见图5E、F。

继续使用OPLS-DA对正常组和模型组、模型组和给药组进行进一步系统分析, 见图5G～J。正常组和模型组在正离子模式下, R^2X = 0.891, Q^2 = 0.821; 在负离子模式下, R^2X = 0.726, Q^2 = 0.504。模型组和给药组在正离子模式下, R^2X = 0.94, Q^2 = 0.824; 在负离子模式下, R^2X = 0.566, Q^2 = 0.467。以VIP ≥ 1及 P < 0.05或最大差异倍数 > 1.5为标准, 筛选血清中潜在的差异脂质。

3.2 ACT调节CGN幼龄大鼠的血清脂质紊乱 对正常组和模型组、模型组和ACT组进行差异脂质分析, 见图6A、B。筛选VIP ≥ 1, P < 0.05的化合物, 基于HMDB数据库, 在正常组和模型组中, 共鉴定了68种差异显著的脂质。经过ACT治疗后, 共有67种差异脂质水平发生显著变化, 见表2。由热图可知, ACT对CGN

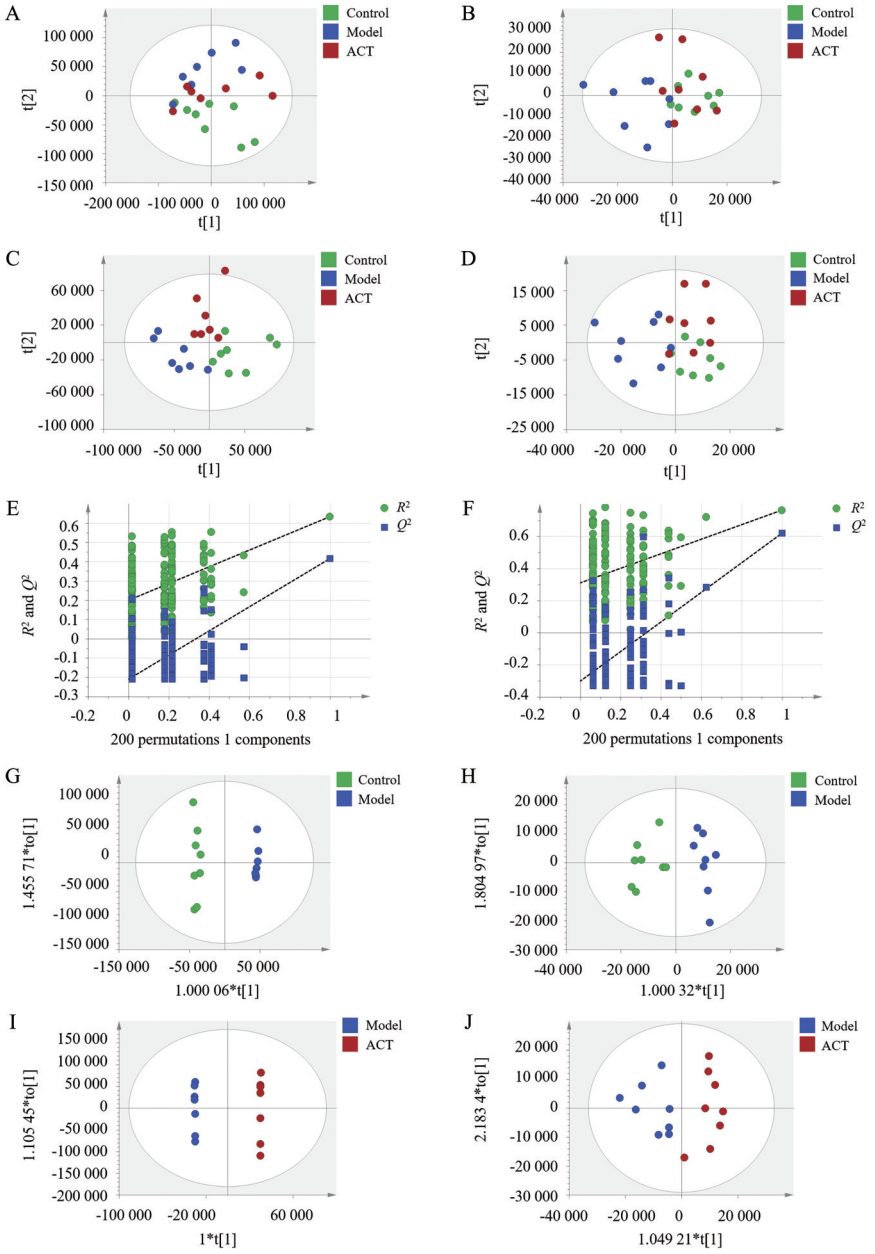


Figure 5 Multivariate statistical analysis. A, B: Plot of PCA scores in positive and negative ion mode; C, D: Plot of PLS-DA scores in positive and negative ion mode; E, F: Plot of PLS-DA model validation in positive and negative ion mode; G−J: Plot of OPLS-DA scores in positive and negative ion mode

Table 2 Differential lipids in serum. [a]$P < 0.05$, [b]$P < 0.01$, [c]$P < 0.001$

No.	Lipid	Model *vs* control		ACT *vs* model		No.	Lipid	Model *vs* control		ACT *vs* model	
		Log_2FC	Change trend	Log_2FC	Change trend			Log_2FC	Change trend	Log_2FC	Change trend
1	PC(20:4/18:2)	0.69	↑[b]	−0.66	↓[a]	38	DG(18:1/22:5/0:0)	−0.57	↓[a]	0.57	↑[a]
2	TG(16:1/18:1/18:2)	−0.56	↓[a]	0.60	↑[a]	39	TG(16:0/20:0/22:4)	−0.51	↓[a]	0.51	↑[a]
3	PC(18:0/22:6)	0.64	↑[a]	–	–	40	TG(18:0/18:2/20:4)	−0.50	↓[b]	0.50	↑[a]
4	TG(16:1/18:1/22:6)	−0.52	↓[a]	0.63	↑[b]	41	PI(16:0/22:4)	0.29	↑[a]	−0.29	↓[a]
5	TG(16:1/16:0/22:4)	−0.54	↓[a]	0.56	↑[a]	42	PI(18:0/22:6)	0.47	↑[a]	−0.47	↓[a]
6	PC(18:0/22:5)	1.61	↑[a]	−1.85	↓[a]	43	PC(20:0/20:2)	0.52	↑[a]	−0.52	↓[a]
7	CE(22:6)	1.16	↑[c]	0.76	↑[a]	44	CE(16:0)	0.52	↑[a]	−0.52	↓[a]
8	TG(16:1/18:1/22:2)	−0.78	↓[a]	0.73	↑[a]	45	PC(O-18:0/16:0)	0.53	↑[a]	−0.53	↓[a]
9	PC(20:4/20:4)	0.71	↑[b]	−0.71	↓[a]	46	PC(O-16:0/16:0)	0.54	↑[b]	−0.54	↓[b]
10	PC(14:0/22:5)	1.06	↑[c]	−1.10	↓[b]	47	PI(16:0/20:4)	0.55	↑[b]	−0.55	↓[b]
11	TG(18:1/22:6/22:6)	−0.78	↓[c]	–	–	48	PC(P-18:1/20:5)	0.57	↑[b]	−0.57	↓[b]
12	TG(18:1/18:2/20:0)	−0.78	↓[a]	–	–	49	PC(P-18:0/20:4)	0.58	↑[a]	−0.58	↓[a]
13	PC(18:0/22:4)	0.83	↑[b]	−0.85	↓[b]	50	PC(P-18:1/18:0)	0.59	↑[a]	−0.59	↓[a]
14	TG(15:0/18:1/20:3)	−0.87	↓[a]	0.83	↑[a]	51	PC(O-14:0/16:0)	0.63	↑[b]	−0.63	↓[b]
15	TG(15:0/16:0/20:4)	−0.90	↓[a]	0.91	↑[a]	52	PE(P-18:0/18:2)	0.64	↑[a]	−0.64	↓[a]
16	CE(22:4)	1.67	↑[b]	1.07	↑[a]	53	PC(16:0/18:0)	0.68	↑[a]	−0.68	↓[a]
17	PC(O-16:0/18:1)	0.73	↑[b]	−0.76	↓[b]	54	PC(22:1/20:3)	0.68	↑[b]	−0.68	↓[b]
18	TG(18:1/20:0/22:4)	−0.52	↓[a]	–	–	55	PE(P-16:0/22:4)	0.68	↑[b]	−0.69	↓[b]
19	TG(15:0/18:1/22:5)	−0.78	↓[a]	0.81	↑[a]	56	PC(22:1/20:4)	0.69	↑[a]	−0.70	↓[a]
20	PC(20:5/22:5)	1.06	↑[a]	–	–	57	PC(P-16:0/18:3)	0.83	↑[b]	−0.83	↓[b]
21	SM(d18:2/16:0)	0.82	↑[b]	−0.79	↓[a]	58	PE(P-16:0/22:6)	0.94	↑[b]	−0.94	↓[b]
22	CE(22:5)	1.41	↑[c]	−0.77	↓[a]	59	PI(16:0/16:1)	1.06	↑[a]	−1.06	↓[a]
23	PC(P-16:0/20:4)	0.64	↑[c]	−0.56	↓[b]	60	PC(16:1/14:0)	1.06	↑[a]	−1.06	↓[a]
24	PC(14:0/20:4)	1.11	↑[b]	−1.16	↓[b]	61	CE(18:3)	1.07	↑[b]	−1.07	↓[b]
25	PC(P-20:0/18:3)	0.62	↑[c]	–	–	62	LysoPE(22:6/0:0)	1.07	↑[b]	−1.07	↓[b]
26	PC(18:0/18:0)	0.76	↑[a]	−0.94	↓[a]	63	PE(P-18:0/22:6)	1.08	↑[b]	−1.08	↓[b]
27	PC(P-18:0/20:5)	0.68	↑[b]	−0.72	↓[b]	64	GalCer(d18:1/22:0)	1.21	↑[b]	−1.20	↓[b]
28	TG(18:2/22:6/20:5)	−0.56	↓[b]	−0.88	↓[b]	65	GalCer(d18:1/24:1)	1.23	↑[b]	−1.23	↓[b]
29	PC(P-18:0/22:6)	0.67	↑[b]	−0.72	↓[a]	66	LysoPC(22:5)	1.31	↑[a]	−1.31	↓[a]
30	CE(20:5)	1.00	↑[c]	0.95	↑[b]	67	GalCer(d18:1/24:0)	1.33	↑[c]	−1.33	↓[c]
31	DG(18:2/22:6/0:0)	−0.95	↓[b]	1.08	↑[c]	68	GalCer(d18:1/23:0)	1.37	↑[b]	−1.37	↓[b]
32	Eicosadienoic acid	−0.72	↓[c]	0.55	↑[b]	69	TG(18:0/18:2/20:0)	–	–	−0.94	↓[a]
33	Nonadeca-10-enoic acid	−0.58	↓[a]	–	–	70	TG(14:0/20:5/22:5)	–	–	−0.62	↓[a]
34	DG(18:1/20:5/0:0)	−0.68	↓[a]	−0.62	↓[b]	71	CE(20:3)	–	–	0.57	↑[b]
35	DG(16:0/20:4/0:0)	−0.78	↓[a]	0.78	↑[a]	72	TG(16:1/20:5/22:6)	–	–	−0.83	↓[a]
36	DG(18:2/20:5/0:0)	−0.67	↓[a]	0.67	↑[a]	73	CE(20:2)	–	–	0.73	↑[a]
37	DG(18:2/22:5/0:0)	−0.61	↓[a]	0.61	↑[a]	74	α-Linolenic acid	–	–	−0.60	↓[a]

幼龄大鼠的治疗作用主要与对甘油三酯 (triglyceride, TG)、甘油二酯 (diglycerol, DG) 和磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC) 的调节作用相关。同时, 为了阐明ACT对CGN起作用的相关通路, 将这些差异脂质导入脂质分析数据库进行分析。通路富集分析显示, CGN幼龄大鼠omega-3/omega-6脂肪酸合成、T细胞受体和共刺激信号、G蛋白偶联受体激活PKC、I型状肾细胞癌中的MET、胰岛素信号等通路调控异常。而经ACT干预后上述通路均有显著回调。此外, ACT还调控了PPARα对脂质代谢的调节和α-亚麻酸和亚油酸代谢等相关通路, 见图6C、D。

4 ACT调节CGN幼龄大鼠的差异代谢物和差异脂质相关性分析

将本实验中的差异代谢物和差异脂质进行共表达相关性分析, 排名前20的代谢产物和脂质绘制矩阵图, 如图7A所示, 前20所筛选出的脂质基本为TG和PC类, 说明ACT主要调节了CGN幼龄大鼠血清中的TG和PC类脂质, 以改善CGN的症状。同时, 将筛选出差异代谢物和差异脂质相关系数大于0.5或小于−0.5 ($P < 0.05$) 的代谢物−脂质对, 将其进行网络关联, 如图7B所示。结果表明, 代谢物高香草酸、棕榈酸、硫酸吲哚酚以及TG、PC类脂质较为关键。

讨论

在儿童期发病的肾小球疾病的诊断和治疗存在着挑战, 目前尚无有效的治疗药物。课题组前期研究发现ACT治疗肾炎疾病疗效显著[20], 但其作用机制尚未阐明。前期结果显示, ACT可以改善CGN幼龄大鼠的尿蛋白肌酐比值、尿酸等生化指标[8]。本实验首先采用ELISA试剂盒检测各组大鼠血清细胞因子, 包括IP-

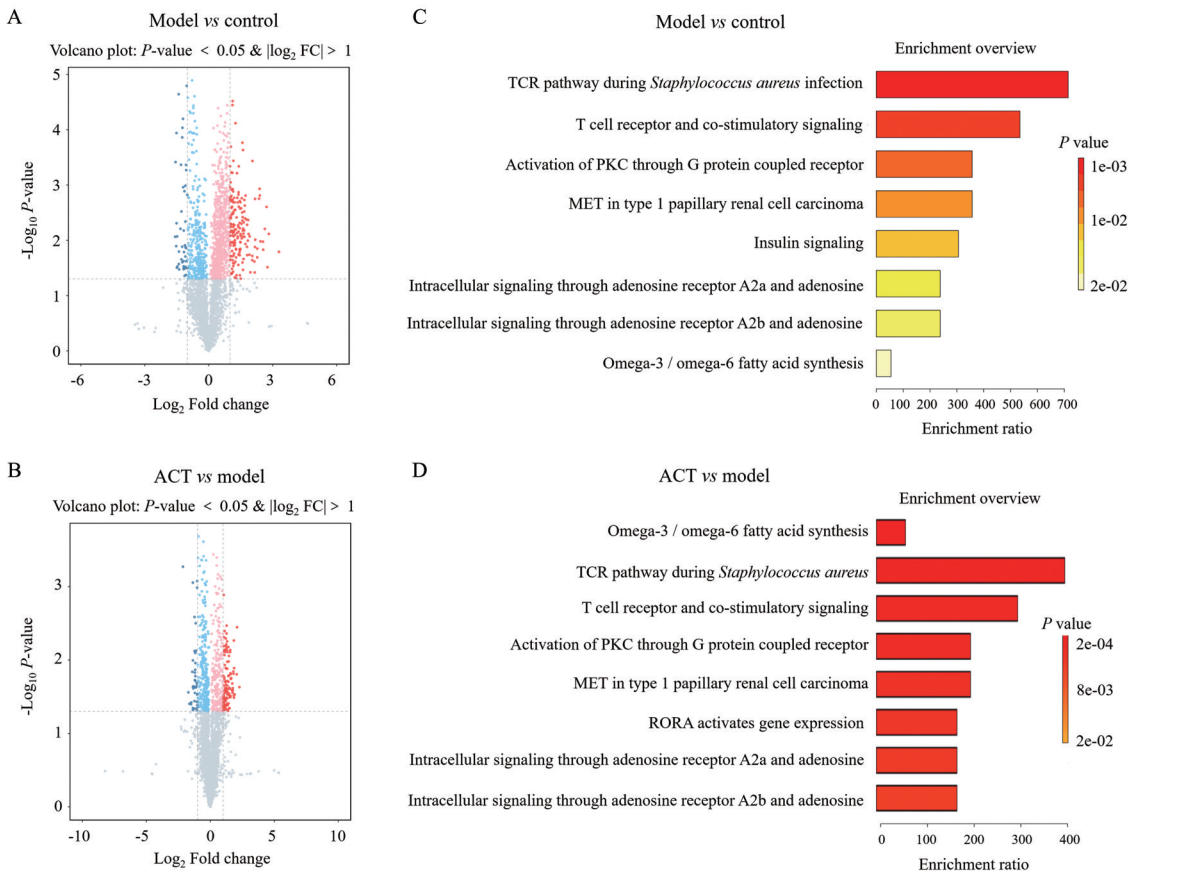


Figure 6 Volcanic map and KEGG pathway bubble map of serum differential lipids in each group. A, B: Volcanic map; C, D: KEGG pathway bubble map

10、IL-6、IL-1β、TNF-α, 结果显示, 与模型组相比, ACT显著降低血清中IP-10、IL-6、IL-1β、TNF-α的水平 ($P < 0.05$)。结果说明ACT具有显著抑制炎症反应的药效作用。进一步采用非靶向代谢组学技术和非靶向脂质组学技术对ACT治疗CGN幼龄大鼠的作用机制展开研究。非靶向代谢组学结果显示, 正常组与模型组相比, 共鉴定出23种差异代谢物, 所涉及的通路包括不饱和脂肪酸的生物合成和氨基酸代谢等; 给药组与模型组相比, 共鉴定出25个差异代谢物, 所涉及的通路包括不饱和脂肪酸的生物合成、三羧酸循环、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、亚油酸代谢。非靶向代谢组学结果表明, ACT治疗CGN幼龄大鼠与血清中不饱和脂肪酸的生物合成密切相关。进一步对血清脂质代谢进行测定分析。脂质组学结果显示, 在正常组和模型组中, 共鉴定了68种差异显著的脂质, 其中, ACT对CGN幼龄大鼠的治疗作用主要与对TG、DG和PC的调节作用相关。所涉及的通路包括omega-3/omega-6脂肪酸合成、T细胞受体和共刺激信号、G蛋白偶联受体激活PKC、I型乳头状肾细胞癌中的MET、胰岛素信号等通路。经过ACT治疗后, 共有67种差异脂质水平发生显著变化, 上述通路均有显著回调, 还调控了PPARα对脂质代谢的调节和α-亚麻酸和亚油酸代谢等相关通路。由此可见, 非靶向代谢组学和脂质组学共同调节的通路为不饱和脂肪酸的生物合成和亚油酸代谢。

流行病学研究表明[21], 在肾脏疾病状态下, 生物样本中通常缺乏omega-3长链多不饱和脂肪酸, 循环多不饱和脂肪酸有助于保护肾脏功能。有研究表明[22], omega-3多不饱和脂肪酸对IgA肾病有益, 高饮食摄入omega-3多不饱和脂肪酸可以改善糖尿病肾病。多不饱和脂肪酸, 尤其是亚麻酸和亚油酸的低摄入量与慢性肾脏疾病相关[23]。在慢性肾小球肾炎发生发展过程中, 亚油酸代谢途径可能发生改变, 其代谢产物如前列腺素、白三烯等炎症介质的生成可能增加。同时其在代谢过程中会产生氧化脂质, 这些炎症介质和氧化脂质会引发肾脏局部的炎症反应, 加剧氧化应激损伤, 导致肾小球损伤、系膜细胞增生、细胞外基质积聚等, 进而加重肾脏病变[24]。

此外, 差异代谢物和差异脂质的网络关联分析表明, 代谢物高香草酸、棕榈酸、硫酸吲哚酚以及TG、PC

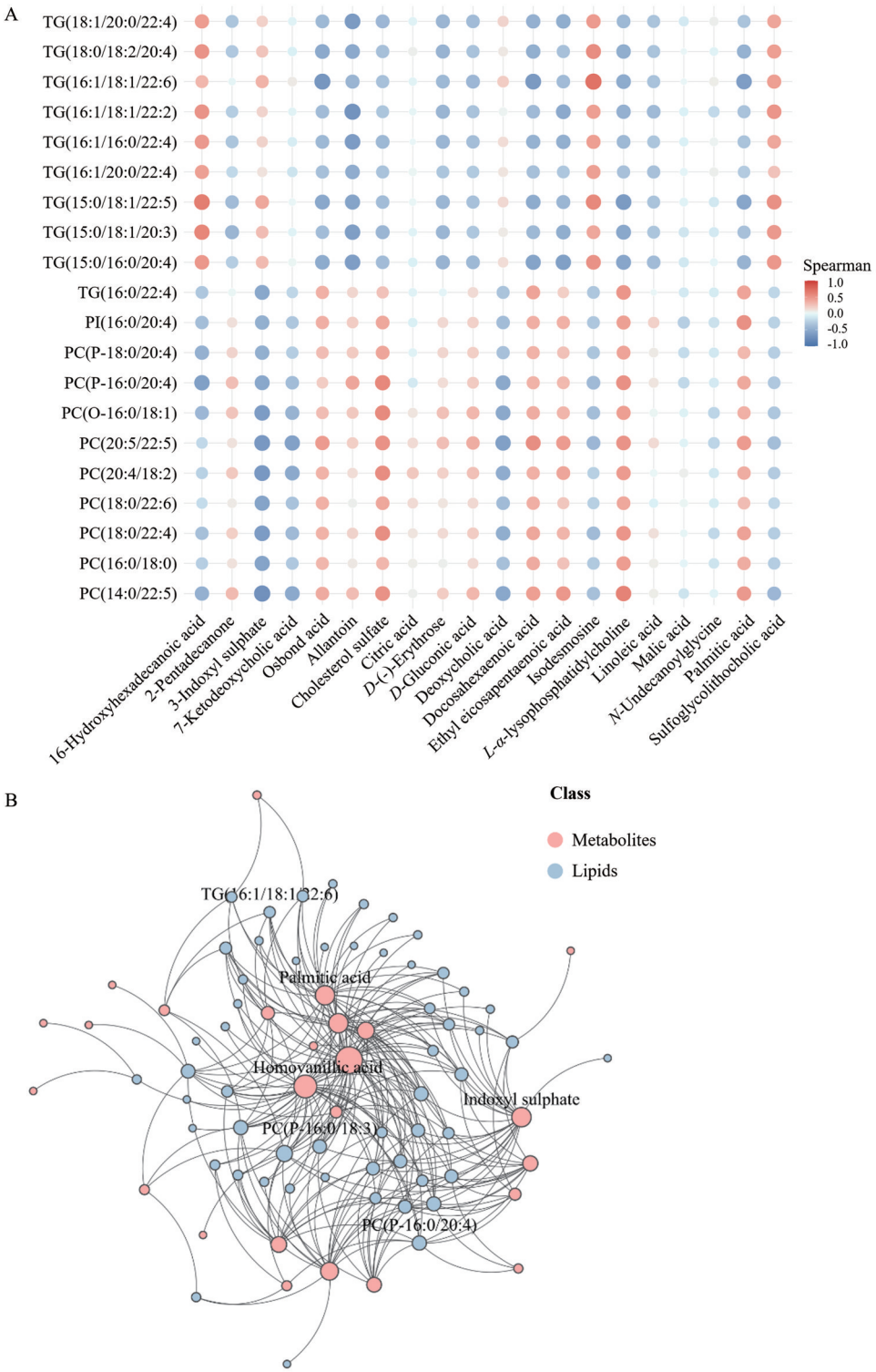


Figure 7 Correlation analysis. A: Matrix of correlation between different metabolites and different lipids in each group; B: Association analysis of different metabolite-lipid pairs in each group

类脂质较为关键。高香草酸是由邻苯二酚*O*-甲基转移酶或单胺氧化酶/醛脱氢酶产生的一种稳定的多巴胺代谢物。研究表明, ESRD患者血浆中的高香草酸水平升高, 而糖尿病肾病患者尿液中的高香草酸水平降低, 说明高香草酸水平与慢性肾小球肾炎肾功能受损密切相关[25,26]。文献[27,28]报道, 棕榈酸可诱导人足细胞损伤和肾小管内质网应激等。目前已经明确, 硫酸吲哚酚具有一定的肾脏毒性, 与CKD的加速进展有关。动物实验和体外研究均表明了硫酸吲哚酚与肾纤维化增加和氧化应激存在密切联系。多项研究报道, 硫酸

吲哚酚对肾脏近端小管细胞产生细胞毒性; 临床研究表明, 硫酸吲哚酚的积累可能导致肾功能不全和不良心血管事件[29]。相关性分析发现ACT主要调节了TG和PC类脂质的水平。多项研究表明[30-32], 甘油三酯葡萄糖指数与CKD风险呈非线性相关, 较高的甘油三酯葡萄糖指数可增加CKD风险。文献[33]报道, CKD可导致PC代谢紊乱, PC代谢失调与CKD病理有关。

综上所述, 本研究通过整合非靶向代谢组学和脂质组学技术, 初步阐明了ACT治疗小儿慢性肾小球肾炎的干预机制, ACT主要通过调节TG和部分PC等差异脂质和高香草酸、棕榈酸、硫酸吲哚酚差异代谢物来调控不饱和脂肪酸的生物合成和亚油酸代谢通路以治疗CGN幼龄大鼠。此为ACT在CGN患儿中的合理临床应用奠定了坚实的基础。与此同时, ACT调控不饱和脂肪酸的生物合成和亚油酸代谢通路的关键靶点及ACT通过何种程序性细胞死亡过程调控高香草酸、棕榈酸、硫酸吲哚酚等差异代谢物的紊乱尚未明确, 诸如此类科学问题的解决仍需多学科技术手段进一步探讨。

作者贡献: 王梦晓完成实验数据、论文写作与修改; 罗珂珂、田孟尧协助完成实验; 边宝林、杨健、杨立新提供了方法理论支持和建议; 王宏洁、周严严负责实验设计、论文修改。

利益冲突: 本文作者均声明不存在利益冲突。

References

[1] Meguid El Nahas A, Bello AK. Chronic kidney disease: the global challenge [J]. Lancet, 2005, 365: 331-340.

[2] Chadha V, Warady BA. Epidemiology of pediatric chronic kidney disease [J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2005, 12: 343-352.

[3] Almualm Y, Zaman Huri H. Chronic kidney disease screening methods and its implication for Malaysia: an indepth review [J]. Glob J Health Sci, 2015, 7: 96-109.

[4] Zhang L, Wang F, Wang L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey [J]. Lancet, 2012, 379: 815-822.

[5] Harambat J, van Stralen KJ, Kim JJ, et al. Epidemiology of chronic kidney disease in children [J]. Pediatr Nephrol, 2012, 27: 363-373.

[6] Wenderfer SE, Gaut JP. Glomerular diseases in children [J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2017, 24: 364-371.

[7] Floege J, Amann K. Primary glomerulonephritides [J]. Lancet, 2016, 387: 2036-2048.

[8] Zhang YC, Zhang XW, Wang LC, et al. Protective effects and pharmacophore discovery of verbascoside against oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced neuronal cells injury [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2022, 57: 1017-1023.

[9] Hausmann M, Obermeier F, Paper DH, et al. *In vivo* treatment with the herbal phenylethanoid acteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis [J]. Clin Exp Immunol, 2010, 148: 373-381.

[10] Chen CH, Song TY, Liang YC, et al. Acteoside and 6-*O*-acetylacteoside downregulate cell adhesion molecules induced by IL-1β through inhibition of ERK and JNK in human vascular endothelial cells [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57: 8852-8859.

[11] Wang H, Xu Y, Yan J, et al. Acteoside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against β-amyloid-induced cell injury [J]. Brain Res, 2009, 1283: 139-147.

[12] Song HS, Sim SS. Acteoside inhibits alpha-MSH-induced melanin production in B16 melanoma cells by inactivation of adenyl cyclase [J]. J Pharm Pharmacol, 2010, 61: 1347-1351.

[13] Ohno T, Inoue M, Ogihara Y, et al. Antimetastatic activity of acteoside, a phenylethanoid glycoside [J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25: 666-668.

[14] Chen WN, Li F, Zhu PP, et al. Effects of acteoside on proliferation and differentiation in osteoblasts *in vitro* [J]. Strait Pharm J (海峡药学), 2012, 24: 23-24.

[15] Zhao J, Liu T, Ma L, et al. Protective effects of acteoside on immunological liver injury in rat primary hepatocytes [J]. Northwest Pharm J (西北药学杂志), 2013, 28: 269-271.

[16] Etemad L, Zafari R, Moallem SA, et al. Teratogenic effect of verbascoside, main constituent of *Lippia citriodora* leaves, in mice [J]. Iran J Pharm Res, 2016, 15: 521-525.

[17] Zhou TB, Yin SS. Association of matrix metalloproteinase-9 level with the risk of renal involvement for Henoch-Schönlein purpura in children [J]. Ren Fail, 2013, 35: 425-429.

[18] Zhao M, Qian D, Liu P, et al. Comparative pharmacokinetics of catalpol and acteoside in normal and chronic kidney disease rats after oral administration of *Rehmannia glutinosa* extract [J]. Biomed Chromatogr, 2015, 29: 1842-1848.

[19] Wang MX, Luo KK, Gao WY, et al. Study on biomarkers of acteoside in treating puromycin aminonucleoside nephropathy in young rats based on non-targeted urine metabolomics technology [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2023, 48: 5898-5907.

[20] Gao W, Zhou Y, Li C, et al. Studies on the metabolism and mechanism of acteoside in treating chronic glomerulonephritis [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 302: 115866-115880.

[21] Syren ML, Turolo S, Marangoni F, et al. The polyunsaturated fatty acid balance in kidney health and disease: a review [J]. Clin Nutr, 2018, 37: 1829-1839.

[22] Garman JH, Mulroney S, Manigrasso M, et al. Omega-3 fatty acid rich diet prevents diabetic renal disease [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 296: F306-F316.

[23] Dos Santos ALT, Duarte CK, Santos M, et al. Low linolenic and linoleic acid consumption are associated with chronic kidney disease in patients with type 2 diabetes [J]. PLoS One, 2018, 13: e0195249.

[24] He T, Xiong L, Lin K, et al. Functional metabolomics reveals arsenic-induced inhibition of linoleic acid metabolism in mice kidney in drinking water [J]. Environ Pollut, 2024, 349: 123949-123965.

[25] Saulnier PJ, Darshi M, Wheelock KM, et al. Urine metabolites are associated with glomerular lesions in type 2 diabetes [J]. Metabolomics, 2018, 14: 84-94.

[26] Chashmniam S, Kalantari S, Nafar M, et al. The metabolomics signature associated with responsiveness to steroid therapy in focal segmental glomerulosclerosis: a pilot study [J]. Rev Invest Clin, 2019, 71: 106-115.

[27] Kaewin S, Changsorn K, Sungkaworn T, et al. Fungus-derived 3-hydroxyterphenyllin and candidusin A ameliorate palmitic acid-induced human podocyte injury *via* anti-oxidative and anti-apoptotic mechanisms [J]. Molecules, 2022, 27: 2109-2123.

[28] Hamada S, Mae Y, Takata T, et al. Five-aminolevulinic acid (5-ALA) induces heme oxygenase-1 and ameliorates palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress in renal tubules [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24: 10151-10163.

[29] Ellis RJ, Small DM, Vesey DA, et al. Indoxyl sulphate and kidney disease: causes, consequences and interventions [J]. Nephrology (Carlton), 2016, 21: 170-177.

[30] Ye Z, An S, Gao Y, et al. Association between the triglyceride glucose index and in-hospital and 1-year mortality in patients with chronic kidney disease and coronary artery disease in the intensive care unit [J]. Cardiovasc Diabetol, 2023, 22: 110-120.

[31] Ren X, Jiang M, Han L, et al. Association between triglyceride-glucose index and chronic kidney disease: a cohort study and meta-analysis [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2023, 33: 1121-1128.

[32] Kunutsor SK, Seidu S, Kurl S, et al. Baseline and usual triglyceride-glucose index and the risk of chronic kidney disease: a prospective cohort study [J]. Geroscience, 2024, 46: 3035-3046.

[33] Wang YN, Zhang ZH, Liu HJ, et al. Integrative phosphatidylcholine metabolism through phospholipase A2 in rats with chronic kidney disease [J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44: 393-405.