



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2022.06.015

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2022.06.015

· 临床研究 ·

# 纤维网状细胞通过促进线粒体凋亡对脓毒症急性肾损伤改善作用的研究

李一鸣 王冰清 胡畅 王月 锁进猛 彭志勇

**[摘要]** **目的** 探讨纤维网状细胞(FRC)通过促进线粒体凋亡对脓毒症急性肾损伤(AKI)的改善作用。**方法** 取 10~12 周龄的 C57BL/6 雄性小鼠分别进行小鼠原代肾小管上皮细胞(TECs)及小鼠肠系膜脂肪组织来源的 FRC 的分离培养,采用流式细胞术鉴定 FRC 和原代 TECs、免疫荧光检测 TECs AQP1 的表达、油红染色鉴定 FRC 的干细胞特性。将 TECs 分为 NC 组、LPS 组与 LPS-FRC 组,采用流式细胞术检测 3 组 TECs JC-1 单体百分比、qRT-PCR 检测炎症因子[白细胞介素(IL)-1 和 IL-6] mRNA 表达水平、Western Blot 检测自噬相关蛋白(Pink1、PARKIN)及氧化应激蛋白(HO-1)表达水平、CKK-8 试剂盒检测 TECs 活力并进行比较。**结果** 成功分离并鉴定 FRC 及小鼠原代 TECs。LPS 组 IL-6、IL-1 的 mRNA 表达水平和 JC-1 单体百分比均高于 NC 组及 LPS-FRC 组,LPS-FRC 组 IL-6、IL-1 的 mRNA 表达水平均高于 NC 组( $P<0.05$ )。LPS 组 OD 值低于 NC 组,LPS-FRC 组 OD 值高于 LPS 组( $P<0.05$ )。和 NC 组比较,LPS 组 Pink 1、PARKIN、HO-1 蛋白表达水平均增高;和 LPS 组相比,FRC-LPS 组细胞 Pink 1 和 PARKIN 蛋白表达水平增加,HO-1 蛋白表达水平降低( $P<0.05$ )。**结论** FRC 可促进 TECs 的线粒体自噬,改善脓毒症 AKI。

**[关键词]** 脓毒症急性肾损伤; 纤维网状细胞; 原代肾小管上皮细胞; 线粒体膜电位; 线粒体自噬

[中图分类号] R34

[文献标识码] A

**Research of the ameliorative effect of fibroreticular cells on septic acute kidney injury by promoting mitochondrial apoptosis** Li Yiming, Wang Bingqing, Hu Chang, Wang Yue, Suo Jinmeng, Peng Zhiyong.

Department of Critical Care Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the protective effect of fibroreticular cells(FRC) on septic acute kidney injury(AKI) by promoting mitochondrial apoptosis. **Methods** FRC from primary renal tubular epithelial cells(TECs) and mesenteric adipose tissue were isolated and cultured from male C57BL/6 mice aged 10-12 weeks. FRC and primary renal TECs were identified by flow cytometry, AQP1 expression of primary renal TECs were detected by immunofluorescence, and FRC stem cells characteristics were identified by oil red staining. Renal TECs were divided into NC group, LPS group and LPS-FRC group, the percentage of JC-1 monomer was detected by flow cytometry, the mRNA expression levels of inflammatory factors(IL)-1 and IL-6 were detected by qRT-PCR, the expression levels of autophagy related proteins(Pink1, PARKIN) and oxidative stress protein(HO-1) were detected by Western blotting, and the activity of renal TECs were detected by CCK-8 kit. **Results** FRC and primary renal TECs were isolated and identified successfully. The mRNA expression level of IL-6 and IL-1 and the percentage of JC-1 monomer in LPS group were higher than those in NC group and LPS-FRC group, the mRNA expression levels of IL-6 and IL-1 in LPS-FRC group were higher than those in NC group( $P<0.05$ ). OD value of LPS group was lower than that of NC group, and OD value of LPS-FRC group was higher than that of LPS group( $P<0.05$ ). Compared with NC group, the protein expression levels of Pink 1, PARKIN and HO-1 in LPS group were increased, compared with LPS group, the protein expression levels of Pink 1 and PARKIN in FRC-LPS group were increased, while the protein expression level of HO-1 were decreased( $P<0.05$ ). **Conclusion** FRC can promote the mitochondrial autophagy in TECs and improve septic AKI.

**[Key words]** Sepsis induced acute kidney injury; Fibroreticular cells; Primary renal tubular epithelial cells; Mitochondrial membrane potential; Mitochondrial autophagy

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81971816);国家自然科学基金青年项目(82102273);武汉大学中南医院优博基金资助项目(ZNYB2020008)

作者单位:430071 武汉,武汉大学中南医院重症医学科

通讯作者:彭志勇, E-mail: pengzy5@whu.edu.cn

脓毒症是由感染引起宿主免疫反应失调导致的多器官功能障碍,进而危及生命的临床综合征<sup>[1]</sup>。肾脏是脓毒症最容易累及的器官,约有 40%~70% 脓毒症患者发生急性肾损伤 (AKI)<sup>[2-3]</sup>。尽管血清胱抑素 C 联合急性生理学与慢性健康状况评分 II 对脓毒症 AKI 有较好的预测价值<sup>[4]</sup>,但由于发病机制不明确,缺乏特异性治疗方法,深入研究脓毒症 AKI 的发病机制并不断寻找新的治疗靶点,有助于改善脓毒症 AKI 预后。纤维网状细胞 (FRC) 是间质来源的成纤维细胞<sup>[5]</sup>,存在于淋巴器官和多种次级淋巴结器官中,包括脾脏、淋巴结、潘氏淋巴结、脂肪相关淋巴组织等<sup>[6]</sup>。FRC 是间质细胞中特异性较强的一类细胞,以 CD45<sup>-</sup> PDPN<sup>+</sup> CD31<sup>-</sup> 作为其分子标记<sup>[7]</sup>。最近的研究提示 FRC 有重要的免疫调节特性,可调控 T 细胞的分化 and 功能<sup>[8]</sup>。有研究发现在盲肠结扎穿孔 (CLP) 诱导脓毒症小鼠模型中,感染早期和晚期应用进行腹腔注射 FRC 可降低血清促炎细胞因子水平及死亡率<sup>[9]</sup>。我们既往研究也证实腹腔注射 FRC 能有效降低脓毒症小鼠死亡率及血液和腹腔灌洗液中的炎症因子水平,进而降低腹腔灌洗液中的细菌负荷<sup>[10]</sup>。然而 FRC 对于脓毒症 AKI 的作用机制尚不清楚。在脓毒症中,多种 Toll 样受体 (TLR) 被激活,脂多糖 (LPS) 可激活 TLR4,加重肾损伤。本研究通过将 FRC 和 LPS 刺激后的肾小管上皮细胞 (TECs) 共培养,观察 FRC 是否通过促进 TECs 线粒体自噬从而改善肾损伤,为研发基于 FRC 的细胞疗法治疗脓毒症 AKI 提供实验依据。

## 材料与方法

1. 材料:C57BL/6 雄性小鼠购自北京维通利华公司,鼠龄 10~12 周。1640、DMEM 培养基购自 Hyclone 公司,胎牛血清 (FBS) 购自 BI 公司 (货号 04-400-1A), Ficoll 分离液购于 Sigma-Adrich 公司,流式抗体 (CD45、PDPN、CD31) 购于 Biolend 公司,Transwell 共培养小室购于 BD 公司,PARK、Pink1 抗体购于 CST 公司 (货号 2132、货号 46421),HO-1 抗体购自 Proteintech 公司 (货号 27282-1-AP),LPS 购自 Invivogen 公司 (货号 tlrl-ebpls)。

## 2. 方法

(1) 小鼠原代 TECs 提取和培养:麻醉小鼠后取出双侧肾脏,去除髓质,冰上剪碎皮质,0.25% II 型胶原酶中 37℃ 消化 30 min,分别过 70 μm 和 40 μm 细胞筛,在细胞洗涤液冲洗数次,离心后用含 10% FBS 的完全培养基重悬,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养。本实验已通过武汉大学实验动物伦理委员会审批,编号 WP2020-08022。

(2) FRC 的原代分离培养:方法 (1) 中小鼠消毒后逐层打开腹腔,剪下肠系膜脂肪,将剪碎的脂肪组织置于含有 0.2 mg/ml Liberase TL 和 0.025 mg/ml Dnase I 的 DMEM 培养基中 37℃ 消化 30 min,用含 20% FBS 的 DMEM 培养基终止消化,所提取的 FRC 用含 10% FBS 的 DMEM 培养。

(3) 流式细胞仪鉴定 FRC 和原代 TECs:采用流式细胞术检测 FRC 表面 CD45、PDPN、CD31 表达情况。提取 FRC 后,加入流式抗体 CD45、CD31 和 PDPN,CD45<sup>-</sup> CD31<sup>-</sup> PDPN<sup>+</sup> 为 FRC 群;在原代 TECs 中加入 Cdh16 抗体,采用流式细胞术检测 TECs Cdh16 的表达情况。

(4) 免疫荧光检测原代 TECs AQP1 的表达:将原代 TECs 接种到细胞爬片,多聚甲醛固定细胞,通透处理后加入 AQP1 抗体,AQP1 为原代 TECs 特异性标志物,再加入带有荧光素标记的二抗,绿色荧光即为 AQP1 阳性,为原代 TECs。

(5) 油红染色鉴定 FRC 的干细胞特性:在 FRC 中加入成脂分化诱导培养基,对 FRC 进行成脂分化诱导,培养 FRC 14 天后,采用油红染色检测细胞内脂滴形成情况,鉴定其成脂分化能力。

(6) TECs 分组及干预:将 TECs 分为 NC 组、LPS 组与 LPS-FRC 组。原代 TECs 培养 6~7 天,在汇合度达 80% 时,NC 组细胞使用完全培养基培养,LPS 组细胞中加入 10 μl LPS 处理,LPS 终浓度为 50 μg/ml,LPS-FRC 组将 FRC 和 LPS 刺激后的原代 TECs 用 Transwell 小室进行共培养,各组均干预 18 h 后收样,进行后续检测。

(7) 流式细胞术检测 TECs JC-1 单体百分比:3 组原代 TECs 处理 18 h 后,用 0.25% 的胰酶消化,加入 JC-1 试剂,采用流式细胞术检测 JC-1 单体与聚合物的比例,对照组细胞的 JC-1 聚集在线粒体中形成二聚体,发出红色荧光,受刺激后的 TECs 线粒体去极化,JC-1 以单体的形式存在,产生绿色荧光。JC-1 单体是膜电位变化的表现,所以 JC-1 单体百分比变化可代表膜电位变化。

(8) 实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 检测炎症因子 mRNA 表达水平:用 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁的原代 TECs,Trizol 法提取 RNA,采用 NanoDrop 仪器测定 RNA 浓度,取出 1 μg RNA,应用 TOYOBO 逆转录试剂盒进行逆转录,加入 IL-1 和 IL-6 引物及 SYBR Green 试剂进行扩增,用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 IL-1 和 IL-6 的 mRNA 表达水平。

(9) 蛋白质免疫印迹法 (Western Blot) 检测蛋白表达水平:提取 NC 组、LPS 组与 LPS-FRC 组的蛋白,裂

解细胞提取总蛋白,BCA 定量蛋白浓度,配置 SDS page 胶,上样后进行电泳和转膜,加入 TBST 稀释的一抗(PARK、Pink1、HO-1),摇床过夜,TBST 清洗 3 次后孵育二抗,用化学发光行显影和定影,检测自噬相关蛋白(Pink1、PARKIN)及氧化应激蛋白(HO-1)表达水平。

(10)CCK-8 试剂盒检测 TECs 活力:3 组原代 TECs 处理 18 h 后,加入 CCK-8 溶液,37 ℃下孵育 1.5 h,使用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值(OD 值),采用 OD 值表示细胞活力。

3. 统计学处理:应用 Graphpadprism 8 软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用  $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

1. 小鼠原代 TECs 提取及鉴定情况:光学显微镜下观察小鼠原代 TECs 呈梭形、鹅卵石铺地状(图 1A)。流式细胞仪检测小鼠 TECs Cdh16 表达情况,与空白对照(Blank)相比,原代 TECs 的阳性峰明显(图 1B)。免疫荧光检测原代 TECs AQP1 的表达情况,提示所提取的细胞均为原代 TECs(图 1C)。

2. 小鼠 FRC 提取及鉴定情况:光学显微镜下观察 FRC 形态为新月状贴壁细胞(图 2A)。流式细胞仪检测 FRC 表面标志物(CD45、PDPN、CD31)、PDPN<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup>

占 CD45<sup>-</sup>细胞的 98.8%(图 2B)。用成脂分化培养基诱导 FRC 成脂分化,红色为 FRC 分化的脂肪细胞,提示 FRC 具有成脂分化的干细胞特性(图 2C)。

3. 3 组细胞 IL-6、IL-1 的 mRNA 表达水平及 OD 值比较:LPS 组 IL-6、IL-1 的 mRNA 表达水平均高于 NC 组及 LPS-FRC 组,LPS-FRC 组 IL-6、IL-1 的 mRNA 表达水平均高于 NC 组( $P < 0.05$ )。LPS 组 OD 值低于 NC 组,LPS-FRC 组 OD 值高于 LPS 组( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 3 组细胞 IL-6、IL-1 的 mRNA 表达水平及 OD 值比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-6 mRNA	IL-1 mRNA	OD 值
NC 组	0.92 ± 0.33	0.36 ± 0.13	1.23 ± 0.22
LPS 组	2.02 ± 0.46 <sup>a</sup>	0.87 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.11 <sup>a</sup>
LPS-FRC 组	1.15 ± 0.34 <sup>b</sup>	0.48 ± 0.19 <sup>b</sup>	0.90 ± 0.13 <sup>b</sup>

注:与 NC 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 LPS 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

4. 3 组细胞 JC-1 单体百分比比较:LPS 组 JC-1 单体百分比(78.17 ± 5.78)高于 NC 组(55.87 ± 4.90)和 LPS-FRC 组(63.13 ± 5.66)( $P < 0.05$ )。

5. 3 组细胞自噬相关蛋白和氧化应激蛋白表达水平比较:Western Blot 结果显示,和 NC 组比较,LPS 组 Pink 1、PARKIN、HO-1 蛋白表达水平均增高;和 LPS 组相比,FRC-LPS 组细胞 Pink 1 和 PARKIN 蛋白表达水平增加,HO-1 蛋白表达水平降低( $P < 0.05$ )。见图 3、

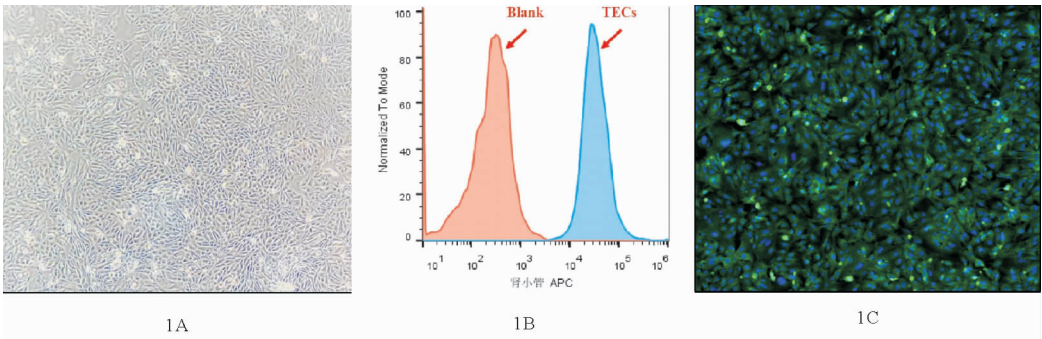


图 1 小鼠原代 TECs 提取及鉴定情况[A:光学显微镜下原代 TECs 形态(×100);B:流式细胞仪鉴定原代 TECs;C:原代 TECs AQP1 的表达情况(AQP1:绿色;DAPI:蓝色;免疫荧光染色,×200)]

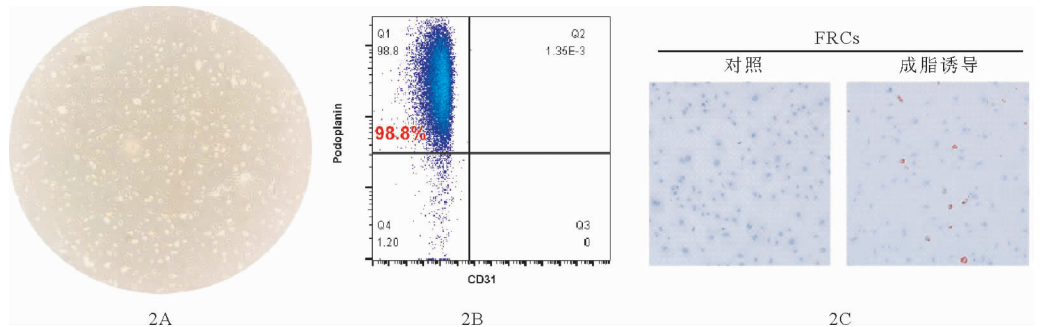


图 2 小鼠 FRC 提取及鉴定情况[A:光学显微镜下 FRC 形态(×100);B:流式细胞仪鉴定 FRC:CD45、PDPN、CD31 抗体标记 FRC,选取 CD45<sup>-</sup>细胞进一步画十字门分析 FRC 水平,横坐标为 CD31,纵坐标为 PDPN;C:FRC 干细胞特性鉴定:成脂诱导分化培养基培养 FRC,红色为 FRC 分化成的脂肪细胞(油红染色,×100)]

表 3。

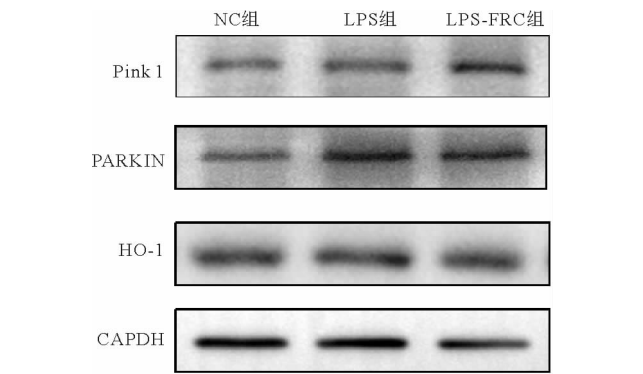


图 3 Western Blot 检测 TECs 内线粒体自噬相关蛋白 (Pink 1、PARKIN) 和氧化应激蛋白 (HO-1) 的表达

表 3 3 组细胞自噬相关蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Pink 1	PARKIN	HO-1
NC 组	0.74 $\pm$ 0.11	0.49 $\pm$ 0.08	1.06 $\pm$ 0.13
LPS 组	0.97 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.75 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	1.44 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>
LPS-FRC 组	1.56 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	1.32 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	0.97 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>

注:与 NC 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 LPS 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

讨 论

我国脓毒症发病率高,易导致多器官功能障碍,如肾脏、脑、肺等<sup>[11]</sup>。肾脏是脓毒症最容易影响的器官,约有 50% 脓症患者发生 AKI。单独阻断某一个分子并不能减缓炎症反应的总体进程,因细胞可对多个分子或炎症通路作出动态反应,越来越多的研究者将目光转向细胞疗法。近年来间质细胞引起广泛关注<sup>[12]</sup>,与免疫细胞相比,间质细胞具备强大的自我更新能力和免疫调节能力,可显著提高脓毒症小鼠的生存率<sup>[13]</sup>。本研究将 FRC 和原代 TECs 共培养,结果表明共培养可有效抑制 TECs 分泌炎症因子,促进 TECs 发生线粒体自噬,改善肾损伤。

在本研究中,我们提取了小鼠肠系膜脂肪来源的 FRC,并应用流式细胞仪鉴定了 FRC,结果和既往文献报道一致<sup>[14]</sup>。FRC 占淋巴结非造血结构细胞的 20%~50%<sup>[15]</sup>,是淋巴结的支撑结构,分泌细胞外基质<sup>[16]</sup>,将可溶性抗原和信号分子快速运输至淋巴结实质<sup>[17]</sup>,并将浆细胞产生的 IgM 运送到循环系统。在稳态下,FRC 为免疫细胞提供支持性微环境,为适应性免疫反应奠定基础<sup>[18]</sup>;当病原菌感染时,FRC 通过与临近的免疫细胞相互作用,调节先天性免疫和适应性免疫。

本研究将 FRC 和 LPS 预处理的 TECs 共培养,发现 FRC 可抑制 TECs 分泌炎症细胞因子 IL-6、IL-1 的 mRNA 表达水平,增强 TECs 活力;通过应用 JC-1 试剂盒检测 TECs 的线粒体膜电位,发现 FRC 可降低 JC-1

单体百分比,促进线粒体自噬蛋白 Pink 1 和 PARKIN 表达水平增高,氧化应激蛋白 HO-1 表达水平降低,进而促进原代 TECs 发生线粒体自噬,改善肾损伤。线粒体在维持细胞内氧化还原和钙稳态方面发挥着重要作用<sup>[19]</sup>。细胞器特异性自噬有利于细胞维持正常的结构和功能,受损的线粒体形成双层膜包裹成泡状结构,包裹线粒体,进而被溶酶体中的水解酶消化。受损的线粒体会产生更多的活性氧 (ROS),而过量的 ROS 会对线粒体造成进一步的损害<sup>[20]</sup>,线粒体自噬通路在 AKI 的发生发展和修复中具有重要作用。PINK1-Parkin 介导的线粒体自噬在化疗药物顺铂导致的肾脏毒性过程中可被激活,并对肾损伤发挥保护作用<sup>[21]</sup>。此外线粒体自噬的 PINK1-Parkin 通路可通过抑制线粒体 ROS 和 NLRP3 炎性小体激活预防造影剂诱导的 AKI<sup>[22]</sup>。在肾脏缺血再灌注的模型中,以线粒体自噬的方式清除受损线粒体可缓解肾损伤<sup>[23]</sup>。

综上,FRC 可减少 TECs 分泌炎症因子,促进 TECs 线粒体自噬,缓解肾损伤,基于 FRC 的细胞疗法为脓毒症 AKI 的治疗提供了新思路。

参 考 文 献

[1] 谭乐明,杨成,周水英,等. 脓毒症的早期诊断相关研究进展[J]. 中国医药,2020,15(5):796-800.

[2] Rudd KE,Johnson SC,Agesa KM,et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study[J]. Lancet,2020,395(10219):200-211.

[3] 胡天佑,王洪亮. 脓毒症急性肾损伤的新型生物学标志物[J]. 临床内科杂志,2021,38(9):588-590.

[4] 魏茂碧,张治琴,马洲,等. 血清胱抑素 C 联合急性生理学与健康状况评分 II 对脓毒症急性肾损伤的预测价值分析[J]. 临床内科杂志,2021,38(9):619-622.

[5] Malhotra D,Fletcher AL,Astarita J,et al. Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks[J]. Nat Immunol,2012,13(5):499-510.

[6] Mueller SN,Germain RN. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system[J]. Nat Rev Immunol,2009,9(9):618-629.

[7] Valencia J,Jiménez E,Martínez VG,et al. Characterization of human fibroblastic reticular cells as potential immunotherapeutic tools[J]. Cytotherapy,2017,19(5):640-653.

[8] Brown FD,Sen DR,LaFleur MW,et al. Fibroblastic reticular cells enhance T cell metabolism and survival via epigenetic remodeling[J]. Nat Immunol,2019,20(12):1668-1680.

[9] Fletcher AL,Elman JS,Astarita J,et al. Lymph node fibroblastic reticular cell transplants show robust therapeutic efficacy in high-mortality murine sepsis[J]. Sci Transl Med,2014,6(249):249ra109.

[10] Xu L,Li Y,Yang C,et al. TLR9 signaling in fibroblastic reticular cells regulates peritoneal immunity[J]. J Clin Invest,2019,129(9):3657-3669.

[11] 郑毅隼,钟鸣. 脓毒症相关性脑病:现状与展望[J]. 临床内科杂志,2021,38(9):577-579.

[12] Wang Y,Chen X,Cao W,et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications[J]. Nat Immunol,2014,15(11):1009-1016.

[13] Németh K,Leelahavanichkul A,Yuen PST,et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production[J]. Nat Med,2009,15(1):42-49.



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2022.06.016

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2022.06.016

# · 论著摘要 ·

## 桥本甲状腺炎患者内脏脂肪 M1 型巨噬细胞与胰岛素抵抗的相关分析

杨敏 张瑞 吴跃跃 孙田歌 丁和远 盛励 王芳 查兵兵 刘军

[关键词] 桥本甲状腺炎; 内脏脂肪 M1 型巨噬细胞; 胰岛素抵抗

[中图分类号] R581.4

[文献标识码] A

桥本甲状腺炎 (HT) 又名慢性淋巴细胞细胞性甲状腺炎, 发病核心是炎症细胞及炎症因子浸润甲状腺<sup>[1]</sup>。最新研究发现, HT 患者可伴有胰岛素抵抗 (IR)<sup>[2-3]</sup>, 甲状腺功能亢进或减退均伴有不同程度的 IR, 但具体机制尚不清楚。此外, 有学者发现 HT 患者肾脏组织甲状腺过氧化物酶抗体 (TPO) 染色阳性, 也反映出 HT 患者中多器官的自身免疫损害<sup>[4]</sup>。IR 是一种慢性系统性低度炎症, 巨噬细胞 (MØ) 浸润内脏脂肪是 IR 发生的关键步骤<sup>[5]</sup>。脂肪组织的 MØ 存在不同的表型: M1 型 MØ, 主要参与促进细胞免疫和炎症; M2 型 MØ, 主要参与减轻炎症的发生<sup>[6]</sup>, 促进组织的修复。本课题组前期研究发现甲状腺功能正常的 HT 患者及诱导 HT 模型小鼠均伴有 IR, 本研究通过检测 HT 患者大网膜内 MØ 的水平, 明确内脏脂肪 MØ 水平与 IR 的相关性及 MØ 在其中所扮演的角色, 为探讨 IR 治疗新靶点提供依据。

### 对象与方法

1. 对象: 选取 2018 年 7 月 ~ 2018 年 11 月在我院因单纯性胆结石入院行手术治疗患者 48 例, 其中男 29 例, 女 19 例, 年龄 18 ~ 60 岁, 平均年龄 (43.84 ± 9.12) 岁。根据是否合并 HT, 将全部患者分为 nHT 组 (未合并 HT) 30 例和 HT 组 (合并 HT) 18 例。HT 诊断标准: (1) 具有典型临床表现伴血 TPOAb 和 (或) TGAb 水平升高 (≥40 U/ml), 无明显临床表现伴 2 次 (间

隔 1 周或 1 周以上) 血甲状腺过氧化物酶抗体 (TPOAb) 和 (或) 抗甲状腺球蛋白抗体 (TGAb) 水平升高 (≥40 U/ml)<sup>[7]</sup>; (2) 血清三碘甲状腺原氨酸 (TT3)、甲状腺素 (TT4)、游离三碘甲状腺原氨酸 (FT3)、游离甲状腺素 (FT4)、促甲状腺素 (TSH) 均在正常参考值范围内。排除标准: (1) 已确诊糖尿病、心血管疾病、脑血管疾病、严重肝肾功能不全、恶性肿瘤及严重精神障碍; (2) 血清 TT3、TT4、FT3、FT4、TSH 指标异常; (3) 正在服用糖皮质激素治疗患者; (4) 妊娠或哺乳期。本研究经我院伦理委员会审批通过, 全部患者均签署知情同意书。

### 2. 方法

(1) 一般资料收集: 收集患者一般情况, 包括性别、年龄、身高、体重、既往病史, 计算 BMI。

(2) 实验室检查指标收集: 包括空腹血糖 (FPG)、ALT、甘油三酯 (TG)、TT3、TT4、FT3、FT4、TSH、TGAb、TPOAb 及空腹胰岛素 (FINS)。

(3) IR 评估: 采用稳态模型 (HOMA) 计算 IR 指数 (HOMA-IR),  $HOMA-IR = FPG (mmol/L) \times FINS (Umol/ml) / 22.5^{[8]}$ 。

(4) 免疫组化染色: 所有患者于腹腔镜中取大网膜脂肪, 4% 多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋; 将贴好的切片熔蜡、乙醇脱蜡。加一抗 CD68、CD206、CD11C, 4 °C 冰箱过夜。次日加二抗, 孵育后苏木素复染、脱水, 盖玻片封片; 显微镜观察并计数: 采用抗 CD68 标记 MØ, 抗 CD11C 和抗 CD206 分别标记 M1 型 MØ 及 M2 型 MØ<sup>[9]</sup>。将组织切片连续切片 3 张, 光学显微镜在 ×200 的视野下取任意 3 个视野计数。

基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会科研课题 (20174Y0118)

作者单位: 200240 上海, 复旦大学附属上海市第五人民医院内分泌科

- [14] Lütge M, Pikor NB, Ludewig B. Differentiation and activation of fibroblastic reticular cells [J]. Immunol Rev, 2021, 302 (1): 32-46.
- [15] Fletcher AL, Malhotra D, Acton SE, et al. Reproducible isolation of lymph node stromal cells reveals site-dependent differences in fibroblastic reticular cells [J]. Front Immunol, 2011, 2 (35): 2.
- [16] Bajénoff M, Egen JG, Koo LY, et al. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes [J]. Immunity, 2006, 25 (6): 989-1001.
- [17] Roozendaal R, Mempel TR, Pitcher LA, et al. Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles [J]. Immunity, 2009, 30 (2): 264-276.
- [18] Buechler MB, Turley SJ. A short field guide to fibroblast function in immunity [J]. Semin Immunol, 2018, 35 (1): 48-58.
- [19] Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, et al. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease [J]. Antioxid Redox Signal, 2016, 25 (3): 119-146.
- [20] Giorgi C, Marchi S, Simoes ICM, et al. Mitochondria and Reactive

Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases [J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2018, 340 (5): 209-344.

- [21] Wang Y, Tang C, Cai J, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is activated in cisplatin nephrotoxicity to protect against kidney injury [J]. Cell Death Dis, 2018, 9 (11): 1113.
- [22] Lin Q, Li S, Jiang N, et al. PINK1-parkin pathway of mitophagy protects against contrast-induced acute kidney injury via decreasing mitochondrial ROS and NLRP3 inflammasome activation [J]. Redox Biol, 2019, 26 (21): 101254.
- [23] Livingston MJ, Wang J, Zhou J, et al. Clearance of damaged mitochondria via mitophagy is important to the protective effect of ischemic preconditioning in kidneys [J]. Autophagy, 2019, 15 (12): 2142-2162.

(本文编辑: 余晓曼)

(收稿日期: 2021-12-03)