

· 论著 · 重症烧伤 ·

本文亮点:

- (1) 证实脂肪间充质干细胞(ADSC)外泌体可改善内毒素/脂多糖(LPS)诱导的巨噬细胞线粒体功能障碍,维持ATP含量,抑制巨噬细胞持续向M1极化,减轻炎症反应。
- (2) 证实ADSC外泌体可改善脓毒症小鼠急性肺损伤,减轻氧化应激、炎症反应,该作用可能通过调节巨噬细胞线粒体功能来实现。

Highlights:

- (1) It was confirmed that adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSC) -Exosomes could improve LPS-induced mitochondrial dysfunction in macrophages, maintain ATP content, inhibit the continuous polarization of macrophages to M1, and reduce the inflammatory response.
- (2) It was confirmed that ADSC-exosomes could improve acute lung injury in septic mice, and reduce oxidative stress and inflammatory response. This effect may be achieved by regulating the mitochondrial function of macrophages.



脂肪间充质干细胞外泌体对脓毒症小鼠急性肺损伤的影响及其机制

白晓智¹ 陶克² 刘洋¹ 郝彤¹ 张浩¹ 官浩¹

¹空军军医大学西京医院全军烧伤中心,烧伤与皮肤外科,西安 710032;²温州医科大学附属第一医院创面修复与再生医学中心创面修复科,温州 325015

通信作者:陶克,Email:tao-ke2001@163.com;官浩,Email:guanhao@hotmail.com

【摘要】 目的 探讨人脂肪间充质干细胞(ADSC)外泌体对脓毒症小鼠急性肺损伤的影响及其机制。**方法** 本研究为实验研究。选取第4~5代ADSC,采用差速超高速离心法分离并提取其上清液中的外泌体,对外泌体鉴定后使用。取24只成年雄性BALB/c小鼠,按照随机数字表法(分组方法下同)分成正常对照组、单纯盲肠结扎穿孔(CLP)组和CLP+ADSC外泌体组并进行相应处理,每组8只。伤后24h,采用苏木精-伊红染色观测小鼠肺组织形态,采用原位末端转移酶标记法检测肺组织细胞凋亡情况,采用酶联免疫吸附测定法检测小鼠血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素1 β (IL-1 β)水平,使用相关试剂盒检测肺组织中丙二醛和超氧化物歧化酶(SOD)的含量,采用免疫荧光法检测小鼠肺组织细胞中CD86、CD206的表达。取小鼠巨噬细胞RAW246.7,分为空白对照组、单纯LPS组和LPS+ADSC外泌体组并进行相应处理。培养12h后,采用相关试剂盒检测细胞中ATP含量、线粒体活性氧的阳性细胞百分比、线粒体膜电位情况,采用实时荧光定量反转录PCR法检测细胞中M1极化标志因子诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、M2极化标志因子精氨酸酶-1(Arg1)以及炎症因子TNF- α 和IL-1 β 的mRNA表达量。以上实验除mRNA表达量的检测样本数为3以外,其余各指标的检测样本均为4。**结果** 伤后24h,正常对照组小鼠肺组织结构清晰完整,无炎症细胞浸润;单纯CLP组较正常对照组小鼠的肺组织水肿明显,炎症细胞浸润现象明显,凋亡、坏死细胞明显增多;CLP+

DOI:10.3760/cma.j.cn501225-20240927-00355

本文引用格式:白晓智,陶克,刘洋,等.脂肪间充质干细胞外泌体对脓毒症小鼠急性肺损伤的影响及其机制[J].中华烧伤与创面修复杂志,2024,40(12):1-10. DOI:10.3760/cma.j.cn501225-20240927-00355.

Bai Xiaozhi,Tao Ke,Liu Yang,et al.Effects and underlying mechanism of exosomes of adipose-derived mesenchymal stem cells on acute lung injury of septic mice[J].Chin J Burns Wounds,2024,40(12):1-10.DOI:10.3760/cma.j.cn501225-20240927-00355.



ADSC 外泌体组较单纯 CLP 组小鼠肺组织水肿症状明显减轻,炎症细胞浸润明显减少,细胞凋亡、坏死情况明显改善。伤后 24 h,与正常对照组比较,单纯 CLP 组小鼠血清中 TNF- α 和 IL-1 β 含量均明显增加(t 值分别为 50.82、30.81, $P < 0.05$);与单纯 CLP 组比较,CLP+ADSC 外泌体组小鼠血清中的 TNF- α 和 IL-1 β 含量均明显降低(t 值分别为 16.36、19.25, $P < 0.05$)。伤后 24 h,与正常对照组比较,单纯 CLP 组小鼠肺组织中丙二醛含量明显升高($t = 9.89$, $P < 0.05$),SOD 含量明显降低($t = 5.01$, $P < 0.05$);与单纯 CLP 组比较,CLP+外泌体组小鼠肺组织中丙二醛含量明显降低($t = 4.38$, $P < 0.05$),SOD 含量明显升高($t = 2.97$, $P < 0.05$)。伤后 24 h,与正常对照组相比,单纯 CLP 组小鼠的肺组织中 CD86 阳性细胞明显增多,CD206 阳性细胞明显减少;与单纯 CLP 组相比,CLP+ADSC 外泌体组小鼠肺组织中 CD86 阳性细胞明显减少,CD206 阳性细胞明显增多。培养 12 h 后,与空白对照组比较,单纯 LPS 组 RAW246.7 细胞中 ATP 含量明显降低($t = 6.28$, $P < 0.05$);与单纯 LPS 组比较,LPS+ADSC 外泌体组 RAW246.7 细胞中 ATP 含量明显升高($t = 4.01$, $P < 0.05$)。培养 12 h 后,与空白对照组的 22% \pm 4% 比较,单纯 LPS 组 RAW246.7 细胞中线粒体活性氧的阳性细胞百分比 40% \pm 6% 明显增加($t = 5.04$, $P < 0.05$);与单纯 LPS 组比较,LPS+ADSC 外泌体组 RAW246.7 细胞中线粒体活性氧的阳性细胞百分比 30% \pm 5% 明显降低($t = 2.65$, $P < 0.05$)。培养 12 h 后,与空白对照组相比,单纯 LPS 组 RAW246.7 细胞 TNF- α 、IL-1 β 和 iNOS 的 mRNA 表达均显著增加(t 值分别为 16.51、31.04、7.70, $P < 0.05$),Arg1 的 mRNA 表达量降低但差异无统计学意义($P > 0.05$);与单纯 LPS 组比较,LPS+ADSC 外泌体组 RAW246.7 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 和 iNOS 的 mRNA 表达量均明显降低(t 值分别为 11.38、22.58、5.28, $P < 0.05$),Arg1 的 mRNA 表达量明显升高($t = 7.66$, $P < 0.05$)。 **结论** 人 ADSC 来源外泌体可能通过改善 LPS 诱导的 RAW246.7 细胞线粒体功能障碍,抑制巨噬细胞向 M1 极化,降低炎症反应,从而发挥改善脓毒症小鼠肺损伤作用。

【关键词】 脓毒症; 急性肺损伤; 间质干细胞; 外泌体; 巨噬细胞; 线粒体功能障碍

基金项目:国家自然科学基金面上基金项目(82272269)

Effects and underlying mechanism of exosomes of adipose-derived mesenchymal stem cells on acute lung injury of septic mice

Bai Xiaozhi¹, Tao Ke², Liu Yang¹, Hao Tong¹, Zhang hao¹, Guan Hao¹

¹Department of Burns and Cutaneous Surgery, Burn Center of PLA, the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; ²Department of Wound Repair, Center for Wound Repair and Regenerative Medicine, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325015, China

【Abstract】 Objective To explore effects and underlying mechanism of exosomes of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSC) on acute lung injury of septic mice. **Methods** The study was an experimental study. ADSC of passages 4–5 were selected, and exosomes in their supernatant were isolated and extracted by differential ultracentrifugation. Exosomes were then used after identification. Twenty-four adult male BALB/c mice were selected and divided into control group, simple cecal ligation and puncture (CLP) group, and CLP+ADSC-exosome group according to the random number table method (the grouping method was the same as below), with 8 mice in each group, which were treated accordingly. At 24 hours after injury, hematoxylin-eosin staining was used to observe the morphology of lung tissues, the in-situ end-labeling method was used to detect the apoptosis of lung tissue cells, the enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in the serum of mice, relevant kits were used to detect the contents of malondialdehyde and superoxide dismutase (SOD) in lung tissues, and immunofluorescence method was used to detect the expressions of CD86 and CD206 in lung tissue cells of mice. Mouse macrophage RAW246.7 was taken and divided into control group, simple LPS group, and LPS+ADSC-exosome group, which were treated accordingly. Twelve hours later, the ATP content, the percentage of mitochondrial ROS positive cells, as well as mitochondrial membrane potential in cells were detected by related detection kits. The real-time fluorescence quantitative reverse-transcription PCR method was used to detect the mRNA expression levels of M1 polarization marker factor inducible nitric oxide synthase (iNOS), M2 polarization marker factor arginase-1 (Arg1), and inflammatory factors TNF- α and IL-1 β in cells. Three samples were used for mRNA expression detection, and four samples were used for the detection of other indicators. **Results** At 24 hours after injury, the lung tissue structure of mice in control group was clear and intact without inflammatory cell infiltration. Compared with that in control group, the

lung tissue edema as well as the inflammatory cell infiltration of mice was much more obvious in simple CLP group. However, compared with that in simple CLP group, the lung tissue edema in CLP+ADSC-exosome group mice was significantly alleviated, the inflammatory cell infiltration was significantly reduced, and the cell apoptosis and necrosis were significantly improved. Twenty-four hours after injury, compared with that in control group, the contents of TNF- α and IL-1 β in the serum of mice in simple CLP group were significantly increased (with t values of 50.82 and 30.81, respectively, $P<0.05$); compared with that in simple CLP group, the contents of TNF- α and IL-1 β in the serum of mice in CLP+ADSC-exosome group were significantly decreased (with t values of 16.36 and 19.25, respectively, $P<0.05$). Compared with that in control group, the content of malondialdehyde in the lung tissue of mice in simple CLP group was significantly increased ($t=9.89$, $P<0.05$), and the content of SOD was significantly decreased ($t=5.01$, $P<0.05$); compared with that in simple CLP group, the content of malondialdehyde in the lung tissue of mice in CLP+ADSC-exosome group was significantly decreased ($t=4.38$, $P<0.05$), and the content of SOD was significantly increased ($t=2.97$, $P<0.05$). Twenty-four hours after injury, compared with that in control group, the number of CD86 positive cells in the lung tissue of mice in simple CLP group was significantly increased, and the number of CD206 positive cells was significantly decreased; compared with that in simple CLP group, the number of CD86 positive cells in the lung tissue of mice in CLP+ADSC-exosome group was significantly decreased, and the number of CD206 positive cells was significantly increased. After 12 hours of culture, compared with that in control group, the ATP content of RAW246.7 cells in simple LPS group was significantly decreased ($t=6.28$, $P<0.05$); compared with that in simple LPS group, the ATP content of RAW246.7 cells in LPS+ADSC-exosome group was significantly increased ($t=4.01$, $P<0.05$). After 12 hours of culture, compared with 22% \pm 4% in blank control group, 40% \pm 6% of positive cells of mitochondrial reactive oxygen species in RAW246.7 cells in simple LPS group was significantly increased ($t=5.04$, $P<0.05$); compared with that in LPS group, 30% \pm 5% of positive cells of mitochondrial reactive oxygen species in RAW246.7 cells in LPS+ADSC-exosome group was significantly decreased ($t=2.65$, $P<0.05$). After 12 hours of culture, compared with that in control group, the mRNA expressions of TNF- α , IL-1 β , and iNOS in RAW246.7 cells in simple LPS group were significantly increased (with t values of 16.51, 31.04, and 7.70, respectively, $P<0.05$), and the decrease in the mRNA expression of Arg1 was not statistically significant ($P>0.05$); compared with that in simple LPS group, the mRNA expressions of TNF- α , IL-1 β , and iNOS in RAW246.7 cells in LPS+ADSC-exosome group were significantly decreased (with t values of 11.38, 22.58, and 5.28, respectively, $P<0.05$), and the mRNA expression of Arg1 was significantly increased ($t=7.66$, $P<0.05$). **Conclusions** Human ADSC-exosomes may play a role in improving lung injury in septic mice by improving LPS-induced mitochondrial dysfunction in RAW246.7 cells, inhibiting macrophage polarization to M1, and reducing the inflammatory response.

【 Key words 】 Sepsis; Acute lung injury; Mesenchymal stem cells; Exosomes; Macrophages; Mitochondrial dysfunction

Fund program: General Program of National Natural Science Foundation of China (82272269)

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 或其严重形式的 ARDS 在大面积烧伤、危重多发伤、脓毒症等危重患者中较为常见,其特征是存在持续的肺部炎症和弥漫性肺泡损伤^[1]。巨噬细胞广泛分布于肺组织。在 ALI 早期阶段,巨噬细胞响应外源性微生物刺激,被迅速激活,随后通过产生多种细胞因子和向肺部招募更多的其他巨噬细胞及中性粒细胞等炎症细胞的形式促进炎症的持续发展,最终导致肺损伤^[2-3]。研究显示,线粒体功能障碍在巨噬细胞持续向 M1 极化的过程中处于关键地位。在 ALI、ARDS 等多种疾病的发生发展中,线粒体功能障碍参与了过度炎症反应和活性氧过度产生^[4-5]。因此,在炎症早期围绕通过调控巨噬细胞线粒体功

能障碍来控制巨噬细胞持续向 M1 极化、过度炎症反应的研究,可能成为治疗 ALI 及 ARDS 的一种有效策略。

脂肪间充质干细胞 (adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSC) 是干细胞家族的重要成员,具有强大的免疫调节和抗炎能力,且易于获得^[6-8]。近年来,大量研究表明,间充质干细胞分泌的可溶性因子和外泌体可以替代细胞作为抑制炎症和促进组织修复的选择^[9-12]。本研究通过构建小鼠盲肠结扎穿孔 (cecal ligation and puncture, CLP) 模型诱发 ALI 动物模型,采用 ADSC 来源的细胞外泌体进行干预,旨在探究 ADSC 外泌体改善小鼠 ALI 的潜在作用及分子机制。

1 材料与方 法

本实验研究遵循空军军医大学动物实验伦理委员会和国家有关实验动物管理和使用的规定。

1.1 动物和细胞及主要试剂与仪器来源

24 只健康无特殊病原体级雄性 BALB/c 小鼠(体重 21~26 g)由空军军医大学动物中心提供,许可证号:SYXK(军)2012-0022。ADSC 取自本实验室冻存的人 ADSC, RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞系购自美国典型培养物保藏中心。

DMEM/F12、1640 培养基、无外泌体胎牛血清购自美国 Gibco 公司, ADSC 专用培养基购自广州赛业公司, 总 mRNA 提取试剂盒、ATP 含量检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体、线粒体超氧化物(mitochondrial superoxide, MitoSOX)检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(主要成分为 JC-1)购自上海碧云天生物技术有限公司, 反转录试剂盒及 PCR 检测试剂盒购自日本 Takara 公司, 40 g/L 多聚甲醛、HE 染色试剂盒购自武汉赛维尔生物科技有限公司, 丙二醛(脂质过氧化产物)和 SOD(自由基代谢产物)检测试剂盒购自南京建成生物科技有限公司, 一步法原位末端转移酶标记法(TdT-mediated-dUTP nick end labeling, TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(荧光基团为异硫氰酸荧光素)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 多聚-D-赖氨酸、4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、外泌体示踪染料 PKH26 红色荧光细胞连接试剂盒购自美国 Sigma 公司, 兔抗小鼠 CD86(M1 型巨噬细胞标志物)单克隆抗体、CD206(M2 型巨噬细胞标志物)单克隆抗体和异硫氰酸荧光素标记的兔抗人 CD9、CD63、CD81 单克隆抗体购自美国 CST 公司。小鼠 TNF- α 、IL-1 β 的 ELISA 试剂盒购自美国 BD 公司。

FACS Aria III 型流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司, 二氧化碳培养箱购自美国 ThermoFisher Scientific 公司, Optima™ XPN 型超高速离心机购自美国 Beckman 公司, Infinite M200 Pro 型全波长多功能酶标仪购自瑞士 TECAN 公司, HT-7700 型透射电子显微镜购自日本 Hitachi 公司, EVOS FL Auto 2 型激光扫描共聚焦显微镜购自美国 Invitrogen 公司, FSX100 型全自动生物图像导航仪购自日本 Olympus 公司, IQ5™ 型实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 人 ADSC 外泌体的分离提取及表征

取人 ADSC, 采用 ADSC 专用培养基进行常规培养, 选用第 4 或第 5 代细胞进行后续实验。参照文献[13]制备人 ADSC 外泌体, 调整其质量浓度为 2 μ g/mL 备用。采用透射电子显微镜在 40 000 倍放大倍数下观察外泌体形态, 采用粒径分析仪检测外泌体粒径。常规采用流式细胞仪检测外泌体 CD9、CD63、CD81 阳性细胞百分比, 其中抗体为异硫氰酸荧光素标记的兔抗人 CD9、CD63、CD81 单克隆抗体(稀释比均为 1:200)。

1.3 动物实验

1.3.1 脓毒症小鼠模型的建立及分组与样本收集

取 24 只 BALB/c 小鼠, 适应性饲养 1 周后按照随机数字表法(分组方法下同)分成正常对照组、单纯 CLP 组和 CLP+ADSC 外泌体组, 每组 8 只。单纯 CLP 组和 CLP+ADSC 外泌体组小鼠均行 CLP 手术建立脓毒症模型^[14-15], 其中 CLP+ADSC 外泌体组小鼠在诱导脓毒症后 2 h 时进行尾静脉注射 100 μ L 由 1.2 制备的外泌体, 单纯 CLP 组小鼠尾静脉注射等量无菌 PBS。正常对照组小鼠仅尾静脉注射等量无菌 PBS。伤后 24 h(正常对照组小鼠取注射 PBS 后相同时间点), 参照文献[16-18], 摘除小鼠眼球, 取血备用; 然后用颈椎脱臼法处死小鼠, 将左肺置于冰上备用, 将右肺采用 40 g/L 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 制成厚度为 5 μ m 切片备用。

1.3.2 肺组织的形态学观察及肺组织细胞凋亡情况的检测

取 1.3.1 切片, 常规行 HE 染色并采用生物图像导航仪于 100 倍镜下观察肺组织形态。同前取切片, 按 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行染色(阳性染色为绿色), 并用 DAPI 复染细胞核(阳性染色为蓝色), 然后置于激光扫描共聚焦显微镜 100 倍放大倍数下观察肺组织细胞凋亡情况。

1.3.3 血清中炎症因子的检测

取 1.3.1 中的血标本, 静置 30 min, 于 4 $^{\circ}$ C 条件下以 1 600 \times g 离心 15 min, 小心吸取上层血清, 按照 ELISA 说明书步骤检测血清中的 TNF- α 和 IL-1 β 水平。样本数为 4。

1.3.4 肺组织的氧化应激水平检测

取 1.3.1 中小鼠右下肺组织, 剪碎并裂解肺组织收集肺组织匀浆液。参照丙二醛和 SOD 检测试剂盒说明书, 采用酶标仪分别于 534 nm 波长和 452 nm 波长处测定匀浆液的光密度值, 反映丙二醛和 SOD 含

量。样本数为 4。

1.3.5 肺组织中巨噬细胞表型的检测

取 1.3.1 切片,进行抗原修复后常规进行免疫组织化学染色,一抗为兔抗小鼠 CD86、CD206 单克隆抗体(稀释比均为 1:100)、二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体(稀释比均为 1:200),用苏木素染核。目标蛋白阳性染色为棕色,细胞核阳性染色为蓝色。样本数为 4。

1.4 细胞实验

1.4.1 RAW264.7 细胞对外泌体的内化 取 100 μL 由 1.2 制备的外泌体,加入 4 μL 的 PKH26 红色荧光细胞连接试剂,室温避光孵育 5 min 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 、100 000 $\times g$ 离心 1 h,获取沉淀,然后用 100 μL PBS 重新悬浮备用。

调整 RAW264.7 细胞浓度为 5×10^4 个/mL,按照每孔 100 μL 接种于 96 孔板,培养至细胞融合达 70%。取前述 20 μL PKH26 标记的 ADSC 来源的外泌体悬液,加到 RAW264.7 细胞培养液中,避光共培养 12 h 后用 PBS 清洗 3 次。用 40 g/L 多聚甲醛固定 15 min,用 DAPI 染细胞核。在激光扫描共聚焦显微镜 200 倍放大倍数下观察细胞对 PKH26 标记的人 ADSC 外泌体的吞噬情况。

1.4.2 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型及分组处理 取 RAW264.7 细胞,采用含体积分数 10% 胎牛血清的 1640 培养基常规进行细胞培养,待细胞生长至 80% 融合时按随机数字表法,将细胞分为空白对照组、单纯 LPS 组和 LPS+ADSC 外泌体组,在 LPS+ADSC 外泌体组培养基中先加入终质量浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 人 ADSC 外泌体预孵育 1 h,然后参照文献[19]进行 LPS 刺激;对单纯 LPS 组细胞仅进行同前的 LPS 刺激;对空白对照组细胞进行常规培养。培养 12 h 后,收集各组细胞进行如下检测。

1.4.3 RAW264.7 细胞中 ATP 含量检测 取 1.4.2 分组培养 12 h 后的细胞,根据 ATP 含量检测试剂盒说明书测定 ATP 量。样本数为 4。

1.4.4 RAW264.7 细胞中线粒体活性氧的检测 取 1.4.2 分组培养 12 h 后的细胞,加入 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ MitoSOX 试剂。孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次后用流式细胞仪收集细胞。采用 flowJo 软件统计 MitoSOX 荧光强度并计算其阳性细胞百分比,间接反映细胞内线粒体活性氧的阳性细胞百分比。样本数为 4。

1.4.5 RAW264.7 细胞线粒体膜电位的检测 取 1.4.2 分组培养 12 h 后的细胞,根据细胞线粒体

膜电位检测试剂盒说明书加入探针(稀释比为 1:1000),37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次,离心后弃上清液,加 PBS 重新悬浮细胞,图像导航系统拍照检测荧光强度。染色后,若呈现红色荧光则说明线粒体正常,即 JC-1 聚集在线粒体基质中形成聚合物;若呈现绿色荧光,则说明线粒体膜电位下降或丧失,即 JC-1 只能以单体的形式存在于胞浆中。样本数为 4。

1.4.6 RAW264.7 细胞 M1/M2 极化标志因子及炎症因子的 mRNA 表达量检测 取 1.4.2 分组培养后 12 h 的细胞,提取总 mRNA,采用实时荧光定量 RT-PCR 法检测巨噬细胞 M1/M2 极化标志因子 iNOS 和 Arg1,炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 表达,引物序列见表 1。按照荧光定量试剂盒说明书,以 GAPDH 为内参照,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 和 Arg1 的 mRNA 表达进行定量分析。样本数为 3。

表 1 实时荧光定量反转录 PCR 法检测 RAW264.7 细胞的各引物序列及产物大小

基因名称	引物序列(5'→3')	产物大小 (bp)
IL-1 β	上游:TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	105
	下游:GAACGTCACACACCAGCAGGTTA	
iNOS	上游:ACTACTGCTGGTGACAA	106
	下游:GAAGGTGTGTTGAGTTCTCTAAG	
TNF- α	上游:ACTCCAGGCGGTGCCTATGT	160
	下游:GTGAGGGTCTGGGCCATAGAA	
ARG1	上游:ACATTGGCTTCCGAGACGTA	109
	下游:ATCACCTTGCCAATCCCCAG	
GAPDH	上游:TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	150
	下游:TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	

注:IL 为白细胞介素,iNOS 为诱导型一氧化氮合酶,TNF 为肿瘤坏死因子,Arg1 为精氨酸酶-1,GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶

1.5 统计学分析

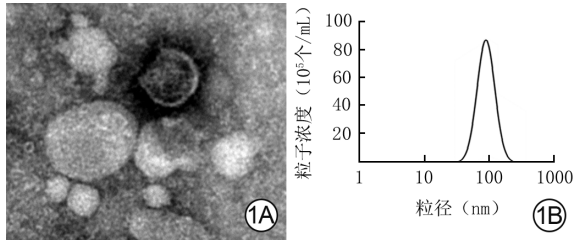
采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。计量资料数据均符合正态分布,以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间总体比较行单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人 ADSC 外泌体的表征

人 ADSC 外泌体呈茶托状结构,粒径分布在 60~150 nm 之间,见图 1。人 ADSC 外泌体的 CD9、CD63、CD81 阳性率依次为 $17.2\% \pm 2.7\%$ 、 $15.4\% \pm$

1.4%、22.8%±1.1%。



注:图 1B 为横坐标经过 lg 处理的数据形成的描记图

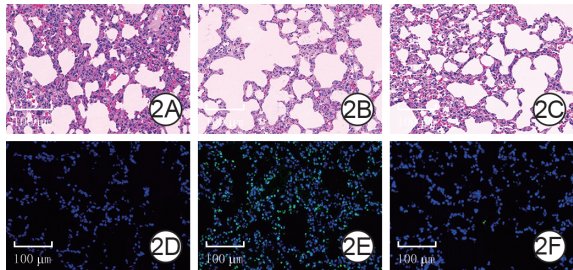
图 1 人脂肪间充质干细胞(ADSC)外泌体的鉴定。1A.可见清晰的囊泡呈茶托状结构 透射电子显微镜×40 000;1B.纳米颗粒跟踪分析仪检测显示粒径为 60~150 nm

Figure 1 Identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells

2.2 人 ADSC 外泌体对 CLP 小鼠 ALI 的影响

2.2.1 对肺组织损伤的影响 伤后 24 h,正常对照组小鼠肺组织结构清晰完整,肺泡连接紧密、无炎症细胞浸润,肺间质较薄、无出血;单纯 CLP 组较正常对照组小鼠的肺组织水肿明显,炎症细胞浸润现象明显,凋亡、坏死细胞明显增多;CLP+ADSC 外泌体组较单纯 CLP 组小鼠肺组织水肿症状明显减轻,炎症细胞浸润明显减少,细胞凋亡、坏死情况明显改善。见图 2。

2.2.2 对炎症反应的影响 伤后 24 h,正常对照组、单纯 CLP 组和 CLP+ADSC 外泌体组小鼠血清中 TNF- α 含量分别为 76±4、362±11、221±14,IL-1 β



注:盲肠结扎穿孔(CLP)+脂肪间充质干细胞(ADSC)外泌体组和单纯 CLP 组小鼠均进行组名相应的处理,正常对照组小鼠仅注射磷酸盐缓冲液;凋亡细胞阳性染色为绿色

图 2 3 组小鼠伤后 24 h 肺组织损伤情况和肺组织细胞的凋亡情况。2A、2B、2C.分别为正常对照组、单纯 CLP 组、CLP+ADSC 外泌体组小鼠肺组织损伤情况,图 2B 较图 2A 中的肺组织水肿情况明显,炎症细胞数明显增多,图 2C 较图 2B 肺组织水肿明显改善,炎症细胞数明显减少 苏木精-伊红×100;2D、2E、2F.分别为正常对照组、单纯 CLP 组、CLP+ADSC 外泌体组小鼠肺组织的细胞凋亡情况,图 2E 较图 2D 中的凋亡、坏死细胞数明显增加,图 2F 较图 2E 凋亡、坏死细胞数明显减少 异硫氰酸荧光素-4',6-二脒基-2-苯基咪唑×100

Figure 2 Lung tissue injury and the apoptosis of lung tissue cells of mice in the 3 groups at 24 hours after surgery

含量分别为 43±4、163±6、74±7,组间总体比较,差异有统计学意义(F 值分别为 793.4、437.0, P 值均<0.001)。与正常对照组比较,单纯 CLP 组小鼠血清中 TNF- α 和 IL-1 β 含量均明显增加(t 值分别为 50.82、30.81, P <0.001);与单纯 CLP 组比较,CLP+ADSC 外泌体组小鼠血清中的 TNF- α 和 IL-1 β 含量均明显降低(t 值分别为 16.36、19.25, P <0.001)。

2.2.3 对肺组织氧化应激水平的影响 伤后 24 h,正常对照组、单纯 CLP 组和 CLP+ADSC 外泌体组小鼠肺组织匀浆液中丙二醛含量分别为 (1.57±0.10)、(4.46±0.58)、(2.65±0.59) μ mol/g, SOD 含量分别为 (64.58±7.46)、(37.15±8.03)、(53.25±7.28)U/g,组间总体比较,差异有统计学意义(F 值分别为 36.99、13.17, P 值均<0.001)。与正常对照组比较,单纯 CLP 组小鼠肺组织中丙二醛含量明显升高(t =9.89, P <0.001),SOD 含量明显降低(t =5.01, P =0.002);与单纯 CLP 组比较,CLP+外泌体组小鼠肺组织中丙二醛含量明显降低(t =4.38, P =0.005),SOD 含量明显升高(t =2.97, P =0.025)。

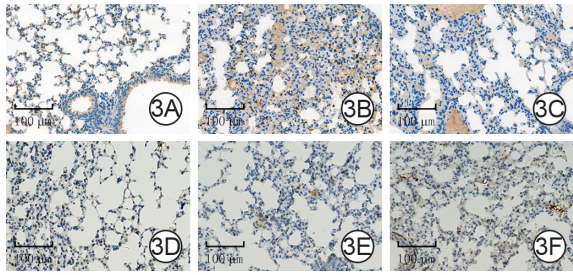
2.2.4 对肺组织巨噬细胞表型的影响 伤后 24 h,与正常对照组相比,单纯 CLP 组小鼠的肺组织中 CD86 阳性细胞明显增多,CD206 阳性细胞明显减少;与单纯 CLP 组相比,CLP+ADSC 外泌体组小鼠肺组织 CD86 阳性细胞明显减少,CD206 阳性细胞明显增多,即外泌体使得巨噬细胞向 M1 极化的情况得到显著改善。见图 3。

2.3 人 ADSC 外泌体对 RAW264.7 细胞的影响

2.3.1 RAW264.7 细胞内化人 ADSC 外泌体的情况 共培养 12 h 后,人 ADSC 外泌体成功被 RAW264.7 细胞吞入细胞质,见图 4。

2.3.2 人 ADSC 外泌体对 RAW264.7 细胞中 ATP 含量的影响 培养 12 h 后,空白对照组、单纯 LPS 组和 LPS+ADSC 外泌体组细胞中 ATP 含量分别为 (13.8±1.5)、(7.9±1.2)、(12.5±2.0)nmol/mg,组间总体比较,差异有统计学意义(F =15.48, P =0.001)。与空白对照组比较,单纯 LPS 组细胞中 ATP 含量明显降低(t =6.28, P <0.001);与单纯 LPS 组比较,LPS+ADSC 外泌体组细胞中 ATP 含量明显升高(t =4.01, P =0.007)。

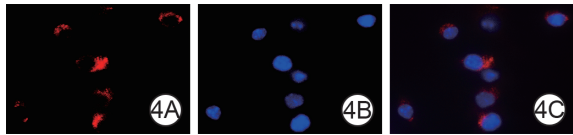
2.3.3 人 ADSC 外泌体对 RAW264.7 细胞线粒体活性氧的影响 培养 12 h 后,正常对照组、单纯



注:盲肠结扎穿孔(CLP)+脂肪间充质干细胞(ADSC)外泌体组和单纯CLP组小鼠均进行组名相应的处理,正常对照组小鼠仅注射磷酸盐缓冲液;细胞阳性染色均为棕色

图 3 3组小鼠伤后 24 h 肺组织中巨噬细胞表型分布情况。3A、3B、3C.分别为正常对照组、单纯CLP组、CLP+ADSC外泌体组 CD86(M1型巨噬细胞标志物)阳性细胞分别情况,图 3B 较图 3A 中的 M1 型巨噬细胞数明显增加,图 3C 较图 3B 中的 M1 型巨噬细胞数明显减少;3D、3E、3F.分别为正常对照组、单纯CLP组、CLP+ADSC外泌体组 CD206(M2型巨噬细胞标志物)阳性细胞分别情况,图 3E 较图 3D 中的 M2 型巨噬细胞数明显增加,图 3F 较图 3E 中的 M2 型巨噬细胞数明显减少

Figure 3 The infiltration of macrophages and the polarization of macrophages in lung tissue of mice in the 3 groups at 24 hours after surgery



注:人ADSC外泌体阳性染色为红色,细胞核阳性为蓝色

图 4 共培养 12 h 后 RAW264.7 细胞吞噬人脂肪间充质干细胞(ADSC)外泌体的情况 PKH26-4',6-二脒基-2-苯基吡啶×200。5A、5B、5C.分别为细胞中的外泌体染色、细胞核染色及复合染色情况,可见人ADSC外泌体成功被RAW264.7细胞吞噬

Figure 4 Phagocytosis of ADSC-exosomes by RAW264.7 cells at 12 hours after co-culture

LPS组和LPS+ADSC外泌体组细胞中线粒体活性氧的阳性细胞百分比分别为 $22\% \pm 4\%$ 、 $40\% \pm 6\%$ 、 $30\% \pm 5\%$,组间总体比较,差异有统计学意义($F=12.61$, $P=0.002$)。与空白对照组比较,单纯LPS组细胞中线粒体活性氧的阳性细胞百分比明显增加($t=5.04$, $P=0.002$);与单纯LPS组比较,LPS+ADSC外泌体组细胞中线粒体活性氧的阳性细胞百分比明显降低($t=2.65$, $P=0.038$)。

2.3.4 人ADSC外泌体对RAW264.7细胞线粒体膜电位的影响 培养 12 h 后,与空白对照组相比,单纯LPS组细胞的线粒体膜电位明显降低;LPS+ADSC外泌体组细胞的线粒体膜电位介于空白对照组和单纯LPS组之间,见图4。

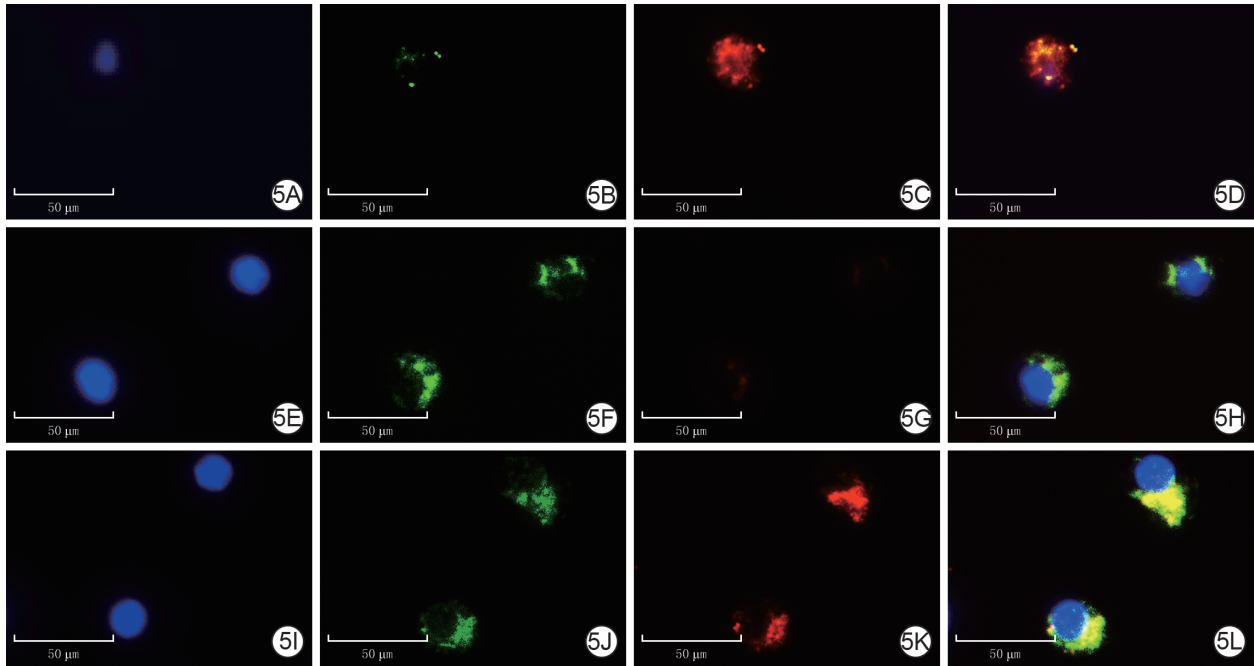
2.3.5 人ADSC外泌体对RAW264.7细胞M1/M2标志因子及炎症因子的影响 培养 12 h 后,

正常对照组、单纯LPS组和LPS+ADSC外泌体组细胞中TNF- α 、L-1 β 、iNOS、Arg1的mRNA表达量组间总体比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。与正常对照组比较,单纯LPS组细胞中TNF- α 、IL-1 β 、iNOS的mRNA表达量均明显升高($P<0.05$),Arg1的mRNA表达量降低但差异无统计学意义($P>0.05$);与单纯LPS组比较,LPS+ADSC外泌体组细胞中TNF- α 、IL-1 β 、iNOS的mRNA表达量均明显降低($P<0.05$),Arg1的mRNA表达量明显升高($P<0.05$)。见表2。

3 讨论

ALI是脓毒症患者常见的并发症之一,属于临床常见的危重症,发病急、病死率高^[20-22]。其特征是肺泡上皮细胞和内皮细胞损伤、肺部炎症细胞浸润及充血性水肿等,严重感染、创伤后的肺部或全身不可控的炎症是主要发病诱因。目前以原发病的对症治疗、呼吸支持为主,总体上缺乏特效的药物及治疗手段,治疗效果不太理想^[1,23-24]。因此,深入探究ALI发生的机制,寻找ALI预防措施及新型治疗药物具有重要意义。

巨噬细胞常通过吞噬作用释放活性氧以及产生炎症细胞因子来发挥免疫调节作用。ALI发生时,大量炎症细胞被募集,其中肺泡巨噬细胞首先被激活并产生大量的活性氧,最终造成细胞和组织损伤,甚至导致MODS。因此,抑制炎症反应及减轻细胞氧化应激损伤,是减轻脓毒症组织器官损伤的重要治疗策略^[5,25-27]。本团队的前期研究及其他学者的研究均显示,ADSC外泌体可以调控巨噬细胞,减轻巨噬细胞引起的炎症反应进而发挥其保护作用^[13,28]。本研究显示,CLP+ADSC外泌体组较单纯CLP组小鼠肺水肿症状明显减轻,炎症细胞浸润明显减少,细胞凋亡、坏死情况明显改善,同时检测到炎症反应因子TNF- α 、IL-1 β 的表达水平明显降低,氧化产物丙二醛含量明显降低,抗氧化物质SOD含量明显升高,这之前研究结果类似。本研究还显示,肺组织中CD86阳性细胞即M1型巨噬细胞减少、CD206阳性细胞即M2型巨噬细胞增多;ADSC外泌体可以下调LPS诱导的M1型巨噬细胞特异性标志物iNOS的mRNA表达,而上调M2型巨噬细胞特异性标志物Arg1的mRNA表达,这表明ADSC外泌体可以抑制LPS诱导的巨噬细胞炎症反应,促进巨噬细胞向M2型极化,通过抑制巨噬细胞



注:对 LPS+ADSC 外泌体组和单纯 LPS 组细胞进行组名相应的处理,对空白对照组细胞进行常规培养;细胞核阳性染色为蓝色,受损或膜电位下降的线粒体阳性染色为绿色,正常线粒体的阳性染色为红色

图 5 培养 12 h 后 3 组 RAW264.7 细胞中线粒体膜电位情况。5A、5B、5C、5D. 分别为空白对照组细胞呈蓝色荧光、绿色荧光、红色荧光及复合显色情况;5E、5F、5G、5H. 分别为单纯 LPS 组细胞呈蓝色荧光、绿色荧光、红色荧光及复合显色情况;5I、5J、5K、5L. 分别为 LPS+ADSC 外泌体组细胞呈蓝色荧光、绿色荧光、红色荧光及复合显色情况,图 5F 较图 5B 中的线粒体膜电位下降明显,图 5J 中的线粒体膜电位介于图 5B 与图 5F 之间,图 5K 中的正常线粒体荧光强度介于图 5C 与图 5G 之间,

Figure 5 Mitochondrial membrane potential of RAW264.7 cells in the 3 groups at 12 hours after culture

表 2 培养 12 h 后 3 组 RAW264.7 细胞 M1/M2 极化标志因子及炎症因子的 mRNA 表达量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of mRNA expression of markers of macrophages polarization and inflammatory cytokines of RAW264.7 cells in the 3 groups at 12 hours after culture

组别	样本数	TNF- α	IL-1 β	Arg1	iNOS
空白对照组	3	1.01 \pm	1.00 \pm	1.00 \pm	1.00 \pm
		0.17	0.09	0.05	0.04
单纯 LPS	3	85.60 \pm	1648.67 \pm	0.84 \pm	2.46 \pm
		8.87	91.95	0.10	0.33
LPS+外泌体	3	23.03 \pm	382.33 \pm	1.35 \pm	1.44 \pm
		3.47	31.26	0.07	0.07
<i>F</i>		190.96	709.92	36.50	44.67
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
<i>t</i> ₁		16.51	31.04	2.40	7.70
<i>P</i> ₁		<0.001	<0.001	0.077	<0.001
<i>t</i> ₂		11.38	22.58	7.66	5.28
<i>P</i> ₂		<0.001	<0.001	0.002	0.006

注:对 LPS+ADSC 外泌体组和单纯 LPS 组细胞进行组名相应的处理,对空白对照组细胞进行常规培养;LPS 为肉毒素/脂多糖,IL 为白细胞介素,iNOS 为诱导型一氧化氮合酶,TNF 为肿瘤坏死因子,Arg1 为精氨酸酶-1;*F* 值、*P* 值为组间总体比较所得,*t*₁ 值、*P*₁ 值为空白对照组与单纯 LPS 组各指标比较所得,*t*₂ 值、*P*₂ 值为单纯 LPS 组与 LPS+外泌体组各指标比较所得

炎症反应、减轻细胞氧化应激损伤,进而改善脓毒症诱导急性肺损伤。

线粒体是细胞内的主要产能结构,线粒体发生氧化磷酸化的过程不仅可以为细胞生长提供生物能量和生物中间体,还可以通过代谢-表观遗传调节决定细胞状态和功能^[29-30]。在有害物质的刺激下,线粒体易发生肿胀、碎裂、基质密度和嵴的数量减少,最终引起线粒体功能障碍,表现为线粒体活性氧增加、ATP 产生减少、DNA 损伤以及由此产生的氧化应激引起细胞损伤^[31-34]。线粒体功能障碍引起的氧化应激增强可促进大量活性氧生成,进而激活 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 等多种途径,促进 M1 型巨噬细胞的极化,导致一系列瀑布样炎症反应^[35-37]。研究显示,在 ALI、ARDS 等多种疾病的发病过程中,线粒体功能障碍参与了过度炎症反应和过度活性氧产生^[4-5]。与前期研究一致,本研究观察到单纯 LPS 组相较于空白对照的 RAW246.7 细胞 ATP 含量降低,线粒体膜电位下降、线粒体活性氧生成增加。活性氧是细胞有氧代谢过程中产生的中间产物,可与不饱和脂肪酸形成脂质活性氧,从而破坏细胞内膜结构,造成细胞损

伤。线粒体作为氧化磷酸化的关键场所,参与了活性氧的产生和代谢,线粒体不仅是活性氧的主要来源,也是活性氧作用的主要靶点。LPS在诱导炎症反应的同时可进一步促进活性氧生成,继而导致线粒体功能下降及膜电位下降,最终导致线粒体功能紊乱^[38-39]。因此,恢复线粒体功能稳态对于维持巨噬细胞的正常状态和防止对LPS刺激的过度反应至关重要。

总之,本研究显示人ADSC外泌体可被RAW246.7内吞或吞噬,进而改善LPS诱导的巨噬细胞线粒体功能障碍,使细胞内线粒体活性氧水平显著降低,线粒体膜电位得到恢复,从而重新编程巨噬细胞的代谢状态,维持ATP供应,抑制巨噬细胞持续M1极化,减轻炎症反应,并表现出对脓毒症小鼠肺损伤的抑制作用。后期本团队将探究在脓毒症诱发的ALI过程中,人ADSC外泌体改善巨噬细胞线粒体功能障碍,促进组织损伤修复的确切作用机制等。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 白晓智:实验设计、实施研究、起草文章;陶克、官浩:研究指导、论文修改、经费支持;刘洋:分析、解释数据;郝彤、张浩:实施研究、采集数据

参考文献

- Long ME, Mallampalli RK, Horowitz JC. Pathogenesis of pneumonia and acute lung injury[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2022, 136(10):747-769. DOI: 10.1042/CS20210879.
- Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity[J]. *Annu Rev Pathol*, 2020, 15: 123-147. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718.
- Oishi Y, Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration[J]. *Int Immunol*, 2018, 30(11): 511-528. DOI: 10.1093/intimm/dxy054.
- Schumacker PT, Gillespie MN, Nakahira K, et al. Mitochondria in lung biology and pathology: more than just a powerhouse[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 306(11): L962-974. DOI: 10.1152/ajplung.00073.2014.
- Kellner M, Noonpalle S, Lu Q, et al. ROS signaling in the pathogenesis of acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 967: 105-137. DOI: 10.1007/978-3-319-63245-2_8.
- 邱煜程,周显玉,刘菲,等.间充质干细胞及其外泌体在移植中的应用进展[J].*组织工程与重建外科杂志*,2023,19(2): 184-188. DOI: 10.3969/j.issn.1673-0364.2023.02.016.
- Yu T, Liu H, Gao M, et al. Dexmedetomidine regulates exosomal miR-29b-3p from macrophages and alleviates septic myocardial injury by promoting autophagy in cardiomyocytes via targeting glycogen synthase kinase 3β [J/OL]. *Burns Trauma*, 2024, 12: tkae042[2024-09-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39502342/>. DOI: 10.1093/burnst/tkae042.
- 蒲倩,修光辉,孙洁,等.间充质干细胞外泌体在脓毒症多器官功能障碍中作用的研究进展[J].*中华危重病急救医学*, 2021,33(6):757-760. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200908-00620.
- Hu Q, Lyon CJ, Fletcher JK, et al. Extracellular vesicle activities regulating macrophage- and tissue-mediated injury and repair responses[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(6):1493-1512. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.12.014.
- Jing W, Wang H, Zhan L, et al. Extracellular vesicles, new players in sepsis and acute respiratory distress syndrome [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 853840. DOI: 10.3389/fcimb.2022.853840.
- Homma K, Bazhanov N, Hashimoto K, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for treatment of sepsis[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1136964. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1136964.
- Gong T, Liu YT, Fan J. Exosomal mediators in sepsis and inflammatory organ injury: unraveling the role of exosomes in intercellular crosstalk and organ dysfunction [J]. *Mil Med Res*, 2024, 11(1): 24. DOI: 10.1186/s40779-024-00527-6.
- Bai X, Li J, Li L, et al. Extracellular vesicles from adipose tissue-derived stem cells affect Notch-miR148a-3p axis to regulate polarization of macrophages and alleviate sepsis in mice[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1391. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01391.
- Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? [J]. *Trends Microbiol*, 2011, 19(4): 198-208. DOI: 10.1016/j.tim.2011.01.001.
- Jiao Y, Zhang T, Zhang C, et al. Exosomal miR-30d-5p of neutrophils induces M1 macrophage polarization and primes macrophage pyroptosis in sepsis-related acute lung injury[J]. *Crit Care*, 2021, 25(1): 356. DOI: 10.1186/s13054-021-03775-3.
- Bai X, He T, Liu Y, et al. Acetylation-dependent regulation of notch signaling in macrophages by SIRT1 affects sepsis development[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 762. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00762.
- 蔡维霞,沈括,曹涛,等.人脂肪间充质干细胞来源外泌体对脓毒症小鼠肺血管内皮细胞损伤的影响及其机制[J].*中华烧伤与创面修复杂志*,2022,38(3):266-275. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20211020-00362.
- Shen K, Wang X, Wang Y, et al. miR-125b-5p in adipose derived stem cells exosome alleviates pulmonary microvascular endothelial cells ferroptosis via Keap1/Nrf2/GPX4 in sepsis lung injury[J]. *Redox Biol*, 2023, 62: 102655. DOI: 10.1016/j.redox.2023.102655.
- Wu H, Wang Y, Zhang Y, et al. Breaking the vicious loop between inflammation, oxidative stress and coagulation, a novel anti-thrombus insight of nattokinase by inhibiting LPS-induced inflammation and oxidative stress[J]. *Redox Biol*, 2020,32:101500. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101500.
- Xu H, Qi Q, Yan X. Myricetin ameliorates sepsis-associated acute lung injury in a murine sepsis model[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2021, 394(1): 165-175. DOI: 10.1007/s00210-020-01880-8.
- Jin C, Chen J, Gu J, et al. Gut-lymph-lung pathway mediates sepsis-induced acute lung injury[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2020,133(18):2212-2218. DOI: 10.1097/CM9.0000000000

- 000928.
- [22] Yehya N, Smith L, Thomas NJ, et al. Definition, incidence, and epidemiology of pediatric acute respiratory distress syndrome: from the Second Pediatric Acute Lung Injury Consensus Conference[J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2023, 24(12 Suppl 2):S87-98. DOI: 10.1097/PCC.0000000000003161.
- [23] 赵松韵, 万志杰, 曹曦元, 等. 靶向 DNA 损伤应答在小细胞肺癌中的作用研究进展 [J]. *解放军医学杂志*, 2022, 47(8): 838-844. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2022.08.0838.
- [24] 李林, 邢福席, 付全有, 等. 脓毒症急性肺损伤治疗的研究进展 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2024, 34(1): 149-155. DOI: 10.11816/cn.ni.2024-236123.
- [25] Zhang W, Chen H, Xu Z, et al. Liensinine pretreatment reduces inflammation, oxidative stress, apoptosis, and autophagy to alleviate sepsis acute kidney injury[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 122: 110563. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110563.
- [26] Bar-Or D, Carrick MM, Mains CW, et al. Sepsis, oxidative stress, and hypoxia: are there clues to better treatment? [J] *Redox Rep*, 2015, 20(5): 193-197. DOI: 10.1179/1351000215Y.0000000005.
- [27] Joffre J, Hellman J. Oxidative stress and endothelial dysfunction in sepsis and acute inflammation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2021, 35(15): 1291-1307. DOI: 10.1089/ars.2021.0027.
- [28] Wang X, Chen S, Lu R, et al. Adipose-derived stem cell-secreted exosomes enhance angiogenesis by promoting macrophage M2 polarization in type 2 diabetic mice with limb ischemia via the JAK/STAT6 pathway[J]. *Heliyon*, 2022, 8(11): e11495. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e11495.
- [29] West AP, Brodsky IE, Rahner C, et al. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS[J]. *Nature*, 2011, 472(7344): 476-480. DOI: 10.1038/nature09973.
- [30] West AP, Khoury-Hanold W, Staron M, et al. Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response [J]. *Nature*, 2015, 520(7548): 553-557. DOI: 10.1038/nature14156.
- [31] Wang Z, White A, Wang X, et al. Mitochondrial fission mediated cigarette smoke-induced pulmonary endothelial injury[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020, 63(5): 637-651. DOI: 10.1165/rcmb.2020-00080C.
- [32] Videla LA, Marimán A, Ramos B, et al. Standpoints in mitochondrial dysfunction: underlying mechanisms in search of therapeutic strategies[J]. *Mitochondrion*, 2022, 63:9-22. DOI: 10.1016/j.mito.2021.12.006.
- [33] Hoffmann RF, Zarrintan S, Brandenburg SM, et al. Prolonged cigarette smoke exposure alters mitochondrial structure and function in airway epithelial cells[J]. *Respir Res*, 2013, 14(1):97. DOI: 10.1186/1465-9921-14-97.
- [34] Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis[J]. *Br J Anaesth*, 2011, 107(1): 57-64. DOI: 10.1093/bja/aer093.
- [35] Xian H, Liu Y, Rundberg Nilsson A, et al. Metformin inhibition of mitochondrial ATP and DNA synthesis abrogates NLRP3 inflammasome activation and pulmonary inflammation[J]. *Immunity*, 2021, 54(7): 1463-1477. e11. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.05.004.
- [36] Zhong Z, Liang S, Sanchez-Lopez E, et al. New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation[J]. *Nature*, 2018, 560(7717): 198-203. DOI: 10.1038/s41586-018-0372-z.
- [37] Xu Z, Shen J, Lin L, et al. Exposure to irregular microplastic shed from baby bottles activates the ROS/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway, causing intestinal inflammation[J]. *Environ Int*, 2023, 181: 108296. DOI: 10.1016/j.envint.2023.108296.
- [38] Shang-Guan K, Wang M, Htwe N, et al. Lipopolysaccharides trigger two successive bursts of reactive oxygen species at distinct cellular locations[J]. *Plant Physiol*, 2018, 176(3): 2543-2556. DOI: 10.1104/pp.17.01637.
- [39] Cai S, Zhao M, Zhou B, et al. Mitochondrial dysfunction in macrophages promotes inflammation and suppresses repair after myocardial infarction[J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(4)DOI: 10.1172/JCI159498.

(收稿日期: 2024-09-27)