军事医学·论著

线粒体预处理周细胞对脓毒症大鼠肺血管渗漏的保护作用

杜钟媛[1],刘奕言[2],包代琴[1],赵仪博[3],郭俊材[4],李雨轩[5],刘良明[2],李 涛[2],毛庆祥[1] 陆军军医大学大坪医院:[1]麻醉科,[2]野战外科研究部战伤休克与输血研究室,创伤与化学中毒全国重点实验室,重庆;[3]重庆理工大学药学与生物工程学院,重庆;[4]西南医科大学基础医学院,四川泸州;[5]南京医科大学第一临床医学院,江苏南京

[**摘要**] **目的** 探究线粒体预处理周细胞(pericytes,PC)对脓毒症大鼠肺血管渗漏的保护作用。**方法** ①采用盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture,CLP)构建大鼠脓毒症模型。将128只SPF级健康SD大鼠[雌雄各半,体质量(200±20)g]按随机数表法分为:假手术(Sham)组、脓毒症(Sep)组、周细胞治疗(PC)组、线粒体预处理周细胞治疗(Mito-PC)组;Sham组在假手术后立即经尾静脉注射0.5 mL生理盐水,Sep组在CLP术后立即经尾静脉注射0.5 mL生理盐水;PC组和Mito-PC组在CLP术后立即经尾静脉分别注射未处理的周细胞和按2×10^{-4} μg/个线粒体预处理12 h后的周细胞(10^6个/只)。采用流式细胞术观察各组大鼠肺脏周细胞定植率;利用伊文思蓝染色检测各组大鼠肺血管屏障功能;采用HE染色检测各组大鼠肺病理结构;取大鼠血清检测重要脏器功能,如心肌损伤标志物心肌肌钙蛋白T(cardiac troponin T,cTnT)和肾功能损伤标志物[尿素(carbamide,Urea),肌酐(creatinine,Crea)];同时检测血清炎症因子肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)和白介素-6(interleukin-6,IL-6)。②提取间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSC)来源线粒体,并通过电镜及流式细胞术进行线粒体形态及功能检测;提取初断乳SD大鼠视网膜原代周细胞并通过共聚焦显微镜进行纯度鉴定。线粒体预处理采用与周细胞共孵育的方式进行。细胞实验分为:正常对照(PC)组、线粒体预处理(Mito-PC)组、过氧化氢处理(PC+H_2O_2)组和线粒体预处理后联合过氧化氢处理(Mito-PC+H_2O_2)组,PC+H_2O_2组在更换无血清培养基12 h后加入0.5 μmol/L H_2O_2处理4 h,Mito-PC+H_2O_2组按2×10^{-4} μg/个线粒体预处理周细胞12 h后联合0.5 μmol/L H_2O_2处理4 h。观察线粒体预处理对周细胞抗氧化能力的影响。**结果** ①与Sham组大鼠相比,Sep组大鼠肺血管通透性显著增高,伊文思蓝大量外渗($P<0.05$);肺病理结构严重破坏并伴随大量炎性细胞浸润;血清中炎症因子TNF-α、IL-6显著升高($P<0.05$)、心肌损伤标志物cTnT和肾功能损伤标志物Urea、Crea显著升高($P<0.05$),且无大鼠存活超过72 h($P<0.05$);PC组大鼠肺血管屏障功能、肺病理结构以及器官功能仅部分改善($P<0.05$);与未处理周细胞相比,线粒体预处理周细胞对肺血管内皮屏障的保护作用显著增强($P<0.05$),肺病理结构及重要脏器功能显著改善($P<0.05$),炎症反应显著降低,大鼠72 h存活率显著升高($P<0.05$)。②线粒体预处理后周细胞磷酸戊糖途径显著增强,NADPH介导的抗氧化能力显著提高,与PC+H_2O_2组相比,Mito-PC+H_2O_2组周细胞细胞活性显著改善($P<0.05$),与PC组相比,Mito-PC组周细胞G6PD活性升高及$NADP^+$/NADPH比值水平下降($P<0.05$)。**结论** 周细胞在肺组织中的定植能够减轻脓毒症大鼠的肺血管渗漏,而线粒体预处理后周细胞中磷酸戊糖途径及细胞抗氧化能力增强可能是其疗效更佳的生化机制。

[**关键词**] 脓毒症;肺血管渗漏;周细胞移植;线粒体预处理

[**中图法分类号**] R322.12;R329.24;R631.1 [**文献标志码**] A

[**基金项目**] 国家自然科学基金重点项目(82330079)

[**通信作者**] 毛庆祥,E-mail:qxmao@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2025,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:杜钟媛,刘奕言,包代琴,等. 线粒体预处理周细胞对脓毒症大鼠肺血管渗漏的保护作用[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(23):2881-2892. DOI:10.16016/j.2097-0927.202507052.

Citation:DU Z Y,LIU Y Y,BAO D Q,*et al*. Mitochondrial preconditioning of pericytes attenuates pulmonary vascular leakage in sepsis-induced rats[J]. J Army Med Univ,2025,47(23):2881-2892. DOI:10.16016/j.2097-0927.202507052.

Mitochondrial preconditioning of pericytes attenuates pulmonary vascular leakage in sepsis-induced rats

DU Zhongyuan[1], LIU Yiyan[2], BAO Daiqin[1], ZHAO Yibo[3], GUO Juncai[4], LI Yuxuan[5], LIU Liangming[2], LI Tao[2], MAO Qingxiang[1] [1]Department of Anesthesiology, [2]National Key Laboratory of Trauma and Chemical Poisoning, Department of War Trauma, Shock and Blood Transfusion, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing; [3]School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing; [4]School of Basic Medical Sciences, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan; [5]The First School of Clinical Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, China

[**Abstract**] Objective To investigate the protective effects of mitochondrial preconditioning in pericytes (PC) against pulmonary vascular leakage in septic rats. Methods ① 128 specific-pathogen-free SD rats (equal gender, 200±20 g) were randomized into: Sham group (postoperative tail vein injection of 0.5 mL saline), Sepsis (Sep) group (CLP+saline), PC group (CLP+untreated PC: 10^6 cells/rat), and Mito-PC group (CLP+PC preconditioned with 2 μg mitochondria/10^4 cells for 12 h). Assessments included: PC lung colonization (flow cytometry), pulmonary barrier function (Evans blue assay), lung histopathology (HE staining), serum organ injury markers [cTnT (cardiac), urea/creatinine (renal)], and inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6). ② MSC-derived mitochondria were validated by electron microscopy/flow cytometry; primary retinal PCs from weaned SD rats were purity-verified (confocal microscopy). In vitro groups: Control (PC), Mito-PC, PC+H_2O_2 (0.5 μmol/L, 4 h), and Mito-PC+H_2O_2. Antioxidant capacity was assessed *via* pentose phosphate pathway (PPP) activity, NADPH levels, G6PD activity, and $NADP^+$/NADPH ratio. Results ① Compared with Sham, Sep group showed significant increase in pulmonary leakage (Evans blue $P<0.05$), severe lung injury, elevated serum markers (TNF-α, IL-6, cTnT, urea, creatinine all $P<0.05$), 0% 72 h survival. PC group showed partial improvement ($P<0.05$). Mito-PC group demonstrated significant reduction in vascular leakage ($P<0.05$ *vs* PC group), improved histopathology and organ function ($P<0.05$), attenuated inflammation ($P<0.05$), higher 72 h survival rate ($P<0.05$). ② Mitochondrial preconditioning significantly enhanced PPP activation and NADPH-mediated antioxidative capacity, Mito-PC+H_2O_2 *vs* PC+H_2O_2 showed improved cell viability ($P<0.05$), Mito-PC *vs* PC showed increased G6PD activity ($P<0.05$), decreased $NADP^+$/NADPH ratio ($P<0.05$). Conclusion Mitochondrial preconditioning potentiates pericyte-mediated protection against sepsis-induced pulmonary vascular leakage through enhanced pentose phosphate pathway activity. Mitochondrial preconditioning potentiates pericyte-mediated protection against sepsis-induced pulmonary vascular leakage through enhanced pentose phosphate pathway activity.

[**Key words**] sepsis; pulmonary vascular leakage; pericytes transplantation; mitochondrial precondition

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (82330079). Corresponding author: MAO Qingxiang, E-mail: qxmao@tmmu.edu.cn

脓毒症是感染后免疫功能失调引起的危及生命的器官功能障碍,其特征是病原体诱导的过度炎症及炎症后的免疫抑制[1-2]。近期全球疾病负担数据(Global Burden of Disease, GBD)指出,全球每年有近5 000万例脓毒症病例,三分之一的脓毒症患者无法存活至第30天[3]。血管功能障碍是脓毒症后多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的始动因素[4]。针对脓毒症引发的血管功能障碍,目前临床常规治疗主要依赖血管收缩药物(如去甲肾上腺素)以维持血流动力学稳定,然而这类药物在改善血管低反应性的同时,会加剧内皮细胞损伤和炎症反应,进一步加重血管渗漏[5-6]。因此,寻找针对脓毒症所致血管功能障碍的有效治疗措施,对脓毒症的治疗具有重要意义。

周细胞是一群位于微血管系统(特别是毛细血管)基底膜外侧的具有干性的多功能壁饰细胞,与内

皮细胞紧密相连,在调节血管功能中起关键作用[7]。既往认为周细胞有血管支持作用,近年来周细胞还被发现具有免疫调节、促血管再生等重要作用[8-9]。本实验室前期研究还发现外源性输注周细胞可部分改善脓毒症大鼠血管功能障碍,但其定植率较低,疗效有限[10]。因此,寻找提高周细胞定植率,进而提高外源性输注周细胞疗效的方法至关重要。

LIAO等[11]发现用低剂量的还原型谷胱甘肽或褪黑激素预处理脂肪组织来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cell,MSC),可以增强MSC抗活性氧(reactive oxygen species,ROS)诱导的氧化应激能力,提高输注的MSC在肝纤维化小鼠体内的血管生成能力。YANG等[12]指出低氧预处理可以上调MSC表面基质细胞衍生因子-1受体的表达,增强MSC运动能力,进而提高MSC在损伤部位的定植。上述文献表明干细胞预处理可以提高干细胞细胞活性和运动能力,促进其在损伤部位定植,增强疗效。线粒体移植是将健康的线粒体转移到线粒体功能失调的细胞或组织中[13]。研究表明,在自然状态下MSC可以通过隧道纳米管结构向内皮细胞传递线粒体[14]。LIN等[14]提取MSC来源线粒体与内皮细胞共同移植植入小鼠体内,发现与MSC来源线粒体共移植的内皮细胞展现出更高的血管生成能力。线粒体预处理周细胞能否同样提供周细胞定植率,增强周细胞疗效,目前尚不清楚。据此,本研究采用脓毒症大鼠模型,探究线粒体预处理增强周细胞疗效的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)酶联免疫吸附测定试剂盒、白介素-6(interleukin-6,IL-6)ELISA试剂盒、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD)比色法检测试剂盒、ATP含量化学发光法测试盒购自中国Elabscience公司;JC-1试剂、增强型$NADP^+$/NADPH检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自中国碧云天公司;伊文思蓝(evans blue,EB)购自美国sigma公司;细胞凋亡诱导剂(CCCP)、Ⅰ型胶原酶购自中国索莱宝科技有限公司;山羊抗兔一抗、山羊抗兔二抗购自美国LI-COR公司;周细胞专用培养基购自美国Science cell公司;F12培养基、胰蛋白酶购自美国Hyclone公司;免疫荧光抗体:血小板衍生生长因子β(platelet-derived growth factor receptor beta,PDGFR-β)、神经胶质抗原2(neuron-glia antigen 2,NG2)、血小板-内皮细胞黏附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule-1,CD31)、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)购自中国爱博泰克生物科技有限公司;流式细胞术抗体:CD45抗体、CD31抗体购自BD公司;PFGFR-β抗体购自美国SantaCruz公司;Mitotracker染料购自南京浦海景珊生物技术有限公司。

1.2 实验动物与模型建立

128只SPF级健康SD大鼠[雌雄各半,体质量(200±20)g]由陆军特色医学中心实验动物中心提供,自由饮食,实验前禁食12 h。本研究经陆军特色医学中心实验动物管理委员会批准(AMUWEC20237152),动物处置过程符合伦理要求。将128只SD大鼠按随机数字表法分为:假手术组(Sham)组、脓毒症(Sep)组、周细胞治疗(PC)组、线粒体预处理后周细胞治疗(Mito-PC)组。其中,Sep组、PC组和Mito-PC组通过盲肠穿孔结扎术(cecal ligation and perforation,CLP)制备大鼠脓毒症模型[9],假手术组(仅开腹后轻柔翻动盲肠,不进行结扎和穿孔,其余操作与Sep组一致)。模型复制后PC组经尾静脉注射未处理的周细胞(10^6个/只),Mito-PC组经尾静脉注射按2×10^{-4} μg/个线粒体预处理12 h的周细胞(10^6个/只),Sham组和Sep组经尾静脉给予0.5 mL等体积生理盐水作为对照。

伊文思蓝染色检测大鼠肺血管屏障功能(n=8)[10]。取大鼠血清,利用ELISA试剂盒检测TNF-α、IL-6,同时将血清送大坪医院检验科进行心肌肌钙蛋白T(cardiac troponin T,cTnT),尿素(carbamide,Urea)和肌酐(creatinine,Crea)水平检测;用0.3%戊巴比妥钠麻醉处死后取大鼠左下肺叶进行HE染色,取大鼠右下肺叶通过流式细胞术检测周细胞肺组织定植率(n=8);观察各组大鼠72 h存活情况(n=16)。观察时间与取材时间见图1。

1.3 方法

1.3.1 周细胞的提取与鉴定 据本课题组前期研究方法提取视网膜周细胞[15],放入培养箱中培养2 d后换液。待约3 d后细胞成团,用胰蛋白酶消化后收集细胞,转移到2个T25培养瓶中,即为PC1;将PC1放回孵箱继续培养,后续每代待细胞融合度约90%,用胰蛋白酶收集细胞后按1瓶细胞分3瓶的比例传代。取第3~6代周细胞(即PC3~PC6)用于后续实验。

免疫荧光鉴定原代周细胞:取适量第3~6代周细胞接种于激光共聚焦培养皿,待细胞融合度达70%~80%后取出;冷PBS冲洗2次,加入1 mL 4%多聚甲醛固定10~15 min;冷PBS冲洗3次,加入0.5 mL 0.3%TritonX-100溶液破膜2 min;PBS冲洗3次,加入0.5 mL封闭用羊血清封闭液,室温封闭40~60 min;

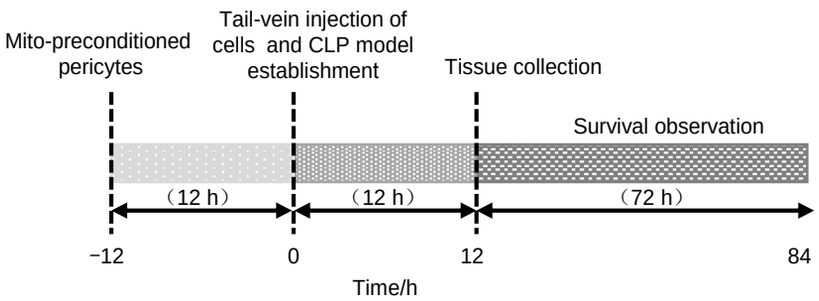


图1 细胞和动物操作观察与取材时间轴示意图

Figure 1 Schematic diagram of the timeline for cell and animal operations, observation, and sampling

PBS冲洗3次,分别孵育周细胞标志物的一抗NG-2、α-SMA、PDGFR-β及血管内皮细胞标志物的一抗CD31(1∶200~1∶500),4 ℃过夜;次日,荧光二抗(1∶200)室温避光孵育1 h;DAPI染核后观察。

1.3.2 线粒体提取与功能鉴定 使用细胞线粒体分离试剂盒(中国碧云天公司)从MSC细胞中分离线粒体。用胰蛋白酶收集2×10^7~5×10^7个MSC细胞,用冷PBS洗涤2次后加入2~3 mL线粒体分离试剂,重悬细胞。冰浴放置10 min后用超声波细胞破碎仪破碎细胞。以4 ℃、600×*g*离心10 min后,将上清液转移到新EP管中,并以4 ℃、11 000×*g*离心10 min,得到沉淀即为线粒体。除立即使用外,加入200 μL线粒体储存液重悬,放于−80 ℃保存。用于与周细胞共孵育的线粒体,将线粒体与无血清F12培养基混合后通过过滤器过滤。

JC-1荧光染色检测线粒体膜电位去极化:向纯化的线粒体中加入PBS溶液洗涤2次并收集沉淀。CCCP组取1 mL线粒体储存液混匀,按照1∶500的体积比加入CCCP溶液,37 ℃恒温培养箱中孵育15 min后,以11 000×*g*离心5 min。弃去上清,沉淀进行JC-1染色。JC-1染色:取1 mL线粒体储存液并加入1 μL JC-1溶液(预热至37 ℃),混匀后于37 ℃恒温培养箱中孵育20 min,以4 ℃、11 000×*g*离心5 min,收集沉淀,清洗2次并重新悬浮线粒体。通过流式细胞仪检测线粒体膜电位去极化的情况(Ex=488 nm;Em=530 nm),用红光强度与绿光强度的比值(JC-1 ratio)表示线粒体膜电位。

1.3.3 检测肺血管对EB透过率 各组大鼠经尾静脉注射EB(12 mg/200 g),30 min后打开胸腔经右心房注射生理盐水灌肺至肺组织基本不见血色,取下全肺。镊子和眼科剪分离去除多余组织后,用冷PBS漂洗表面血液,滤纸吸干组织表面水分,置于无影灯下拍照。肺组织研磨后加入1 mL甲酰胺,置于60 ℃水浴箱水浴48 h后,以4 ℃、8 000×*g*离心10 min,取上清再次4 ℃、16 000×*g*离心10 min,取上清液在620 nm波长测定吸光度[*OD*(620)]值。使用Excel软件生成标准曲线,根据标准曲线回归方程求得的样品EB含量,并用BCA测得的蛋白浓度进行标定。

1.3.4 激光共聚焦显微镜观察线粒体进入周细胞

取适量第3~6代周细胞接种于激光共聚焦培养皿,待细胞融合度达70%~80%后取出。通过以下两种方式标记MSC来源线粒体后,分别在线粒体处理周细胞4 h和12 h后采用激光共聚焦显微镜进行观察。方法1:用Mitotracker染料标记MSC中的线粒体,而后提取线粒体预处理周细胞。方法2:使用细胞线粒体分离试剂盒从MSC细胞中分离线粒体后,用Mitotracker染料标记线粒体。

1.3.5 CCK-8法检测细胞活性 细胞加入96孔培养板(1×10^4个/孔)。将培养板放入37 ℃恒温培养36 h后,弃去原有培养基。按0 μg/个细胞、0.5×10^{-4} μg/个细胞、1×10^{-4} μg/个细胞、2×10^{-4} μg/个细胞、4×10^{-4} μg/个细胞、8×10^{-4} μg/个细胞的分组每孔加入不同数量线粒体共孵育,并用无血清培养基补齐至100 μL,设置时间梯度为4、12、24 h。弃去培养基,每孔加入含10 μL CCK-8试剂的无血清培养基100 μL,避光孵育1~2 h。分别在480 nm处测得吸光度[*OD*(480)]值进行分析。

线粒体预处理后联合过氧化氢处理:按2×10^{-4} μg/个剂量的线粒体预处理周细胞12 h后,加入0.5 μmol/L H_2O_2处理4 h。弃去培养基,每孔加入含10 μL CCK8试剂的无血清培养基100 μL,避光孵育1~2 h。分别在480 nm处测得吸光度[*OD*(480)]值进行分析。

1.3.6 ATP含量、G6PD活性及$NADP^+$/NADPH比值检测 将周细胞接种于12孔板,细胞生长至70%左右进行加药处理,分为:正常对照(PC)组;过氧化氢处理(PC+H_2O_2)组:加入0.5 μmol/L H_2O_2处理4 h;线粒体预处理后联合过氧化氢处理(Mito-PC+H_2O_2)组:按2×10^{-4} μg/个线粒体预处理周细胞12 h后,加入0.5 μmol/L H_2O_2处理4 h。根据ATP含量化学发光法

测试盒、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶比色法测试盒、增强型NADP$^+$/NADPH检测试剂盒(E-BC-F002、E-BC-K056-M、S0180S)的说明书测定周细胞中ATP含量、G6PD活性及NADP$^+$/NADPH比值。并用BCA测得的蛋白浓度进行标定。

1.3.7　流式细胞术　　在进行细胞尾静脉注射前,使用细胞膜染料(1∶1 000)对PC、Mito-PC进行20 min染色,标记为绿色(FITC)。大鼠CLP术后12 h,用3%戊巴比妥钠进行腹腔麻醉后立即断颈处死,打开大鼠胸腔摘取右肺下叶,冷PBS清洗,泡于预冷的无血清RPMI 1640培养基中。将肺叶转移至1 mL肺组织消化液Ⅰ中,用眼科剪将肺组织剪碎后加入研磨用钢珠,放入预冷的组织研磨仪中研磨5 min。研磨后每管加入4~5 mL消化液,放入37 ℃恒温涡旋水浴锅消化30~40 min。70 μm过滤器过滤,将过滤后液体500×g离心5 min,收集沉淀。加入10 mL红细胞裂解液吹打沉淀并混匀后室温避光裂解20 min,500×g 5 min离心液体。弃去上清,加入500 μL Stain Buffer液体重悬细胞。将细胞悬液按200~300 μL每管分装到EP管中备后续流式抗体染色。内皮细胞标志性抗体染色:CD31(通道:PE,1∶20),免疫细胞标志性抗体染色:CD45(通道:APC-Cy7,1∶20),4 ℃避光染色20 min后,500×g离心5 min,弃去上清,每管加入300 μL Stain Buffer液体重悬细胞沉淀,上机检测。

1.4　统计学分析

用GraphPad Prism 10.1.2软件进行统计学处理,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示。两组间比较采用独立样本t检验。多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用LSD-t检验。存活率单独采用Kaplan-Meier生存分析方法。P<0.05表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　大鼠视网膜周细胞的鉴定

PDGFR-β、NG2和α-SMA是周细胞的标志性蛋白,CD31是内皮细胞的标志性蛋白。采用免疫荧光技术对提取的原代周细胞进行鉴定,结果显示,PDGFR-β、NG2和α-SMA表达呈阳性,CD31表达呈阴性(图2)。表明此方法下提取出周细胞纯度很高。

2.2　MSC来源线粒体形态及功能鉴定

采用透射电镜对提取出的MSC来源线粒体进行观察,结果显示:线粒体整体超微结构保持完整,其标志性双层膜系统(外膜与内膜)呈连续闭合状态,内膜向内折叠形成的嵴膜结构排列有序,嵴间隙与基质腔界限清晰,为功能完整的特征(图3A)。

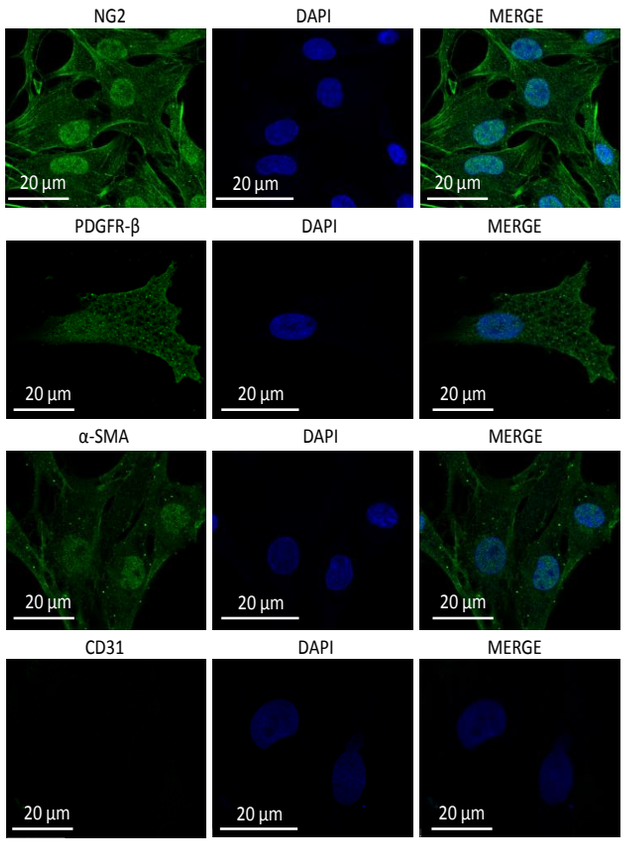


图2　免疫荧光检测周细胞表面标志物表达

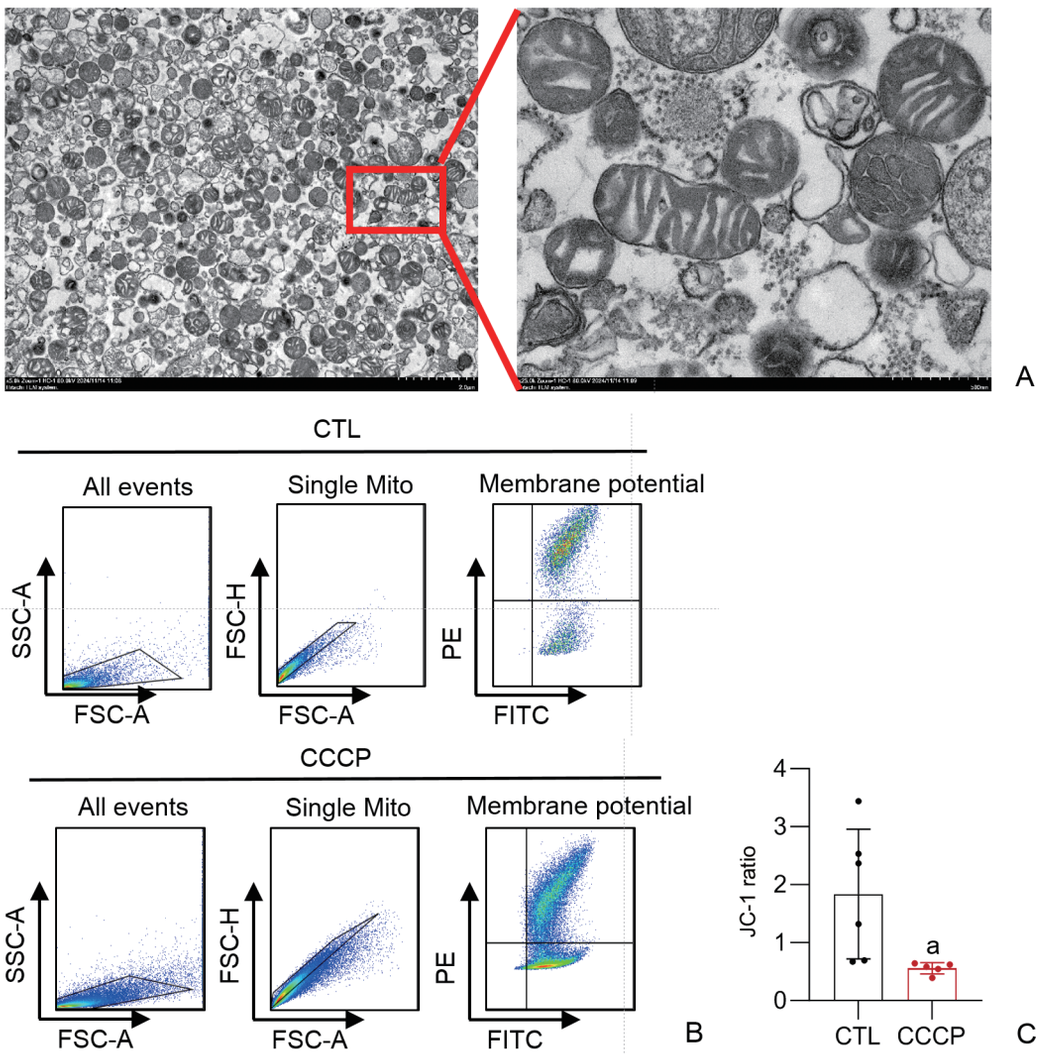
Figure 2　Expression of pericyte surface markers detected by immunofluorescence

采用流式细胞术检测线粒体膜电位,结果显示:与空白组(CTL组)相比,CCCP组线粒体膜电位降低50%(P<0.05,图3B、C),表明提取出的MSC来源线粒体为有功能的线粒体。

2.3　线粒体预处理对周细胞代谢模式的影响

通过两种方式(即"1.3.4"部分所述方法1与方法2)对外源性线粒体进行荧光标记后,利用激光共聚焦显微镜观察线粒体预处理周细胞4 h和12 h后外源性线粒体进入周细胞的情况。结果表明,共孵育4 h时周细胞中可检测到较弱的线粒体的荧光信号,而共孵育12 h后,在受体周细胞中几乎检测不到线粒体的荧光信号(图4A)。表明外源性线粒体可以进入周细胞,但与线粒体共孵育12 h后的周细胞中几乎不存在外源性线粒体。

利用CCK-8实验检测不同浓度线粒体与周细胞孵育不同时间后的细胞活性改变。结果显示:2×10^{-4} μg/个线粒体预处理周细胞12 h时,周细胞相对细胞活力升高最显著(P<0.05,图4B),与对照组细胞相比,相对



a:P<0.05, compared with the CTL

A: Observation of mitochondrial morphology by electron microscopy; B: Detection of the function of isolated mitochondria by flow cytometry; C: Statistical graph of relative fluorescence intensity of membrane potential (n=6)

图3 电镜和流式检测提取MSC来源线粒体功能

Figure 3 Detection of the function of mitochondria derived from MSCs by electron microscopy and flow cytometry

细胞活力上升了12.6%。采用ELISA试剂盒检测PC与Mito-PC中ATP含量的差距,结果发现:2×10^{-4} μg/个线粒体预处理12 h后的周细胞中ATP含量明显增加(P<0.05,图4C)。因此后续实验均按照2×10^{-4} μg/个线粒体预处理12 h条件下开展。

采用CCK-8实验检测用2×10^{-4} μg/个线粒体预处理后联合0.5 μmol/L H_2O_2溶液刺激的周细胞相对细胞活力,实验结果表明:在0.5 μmol/L H_2O_2溶液的刺激下,与PC+H_2O_2组相比,Mito-PC+H_2O_2组周细胞的相对细胞活力显著恢复(P<0.05,图4D),表明2×10^{-4} μg/个线粒体预处理后的周细胞抗氧化应激能力明显增强。

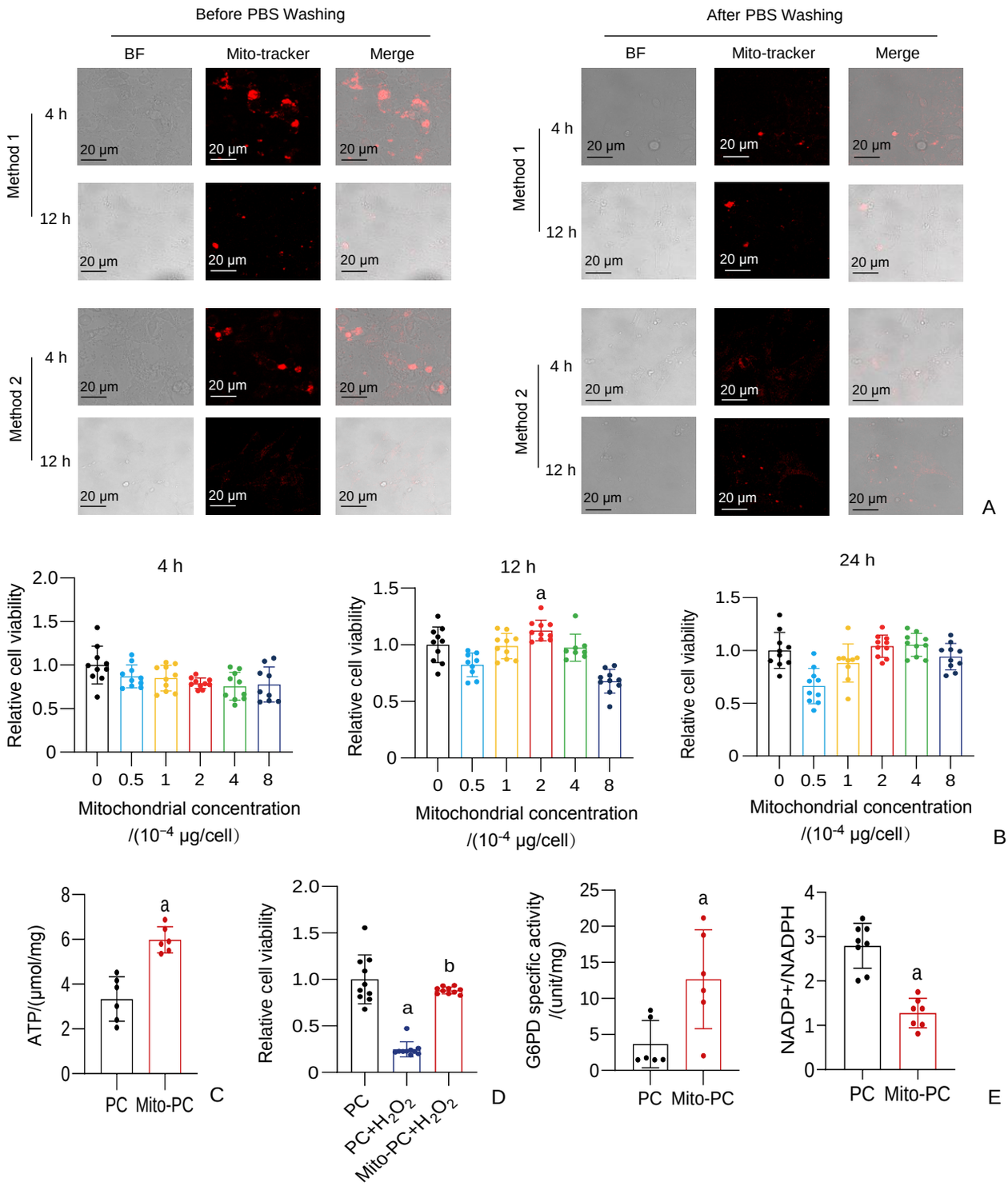
进一步利用ELISA试剂盒检测PC与Mito-PC中G6PD活性、$NADP^+$/NADPH比值。结果显示:与PC组相比,Mito-PC组周细胞中G6PD活性升高3.46倍,$NADP^+$/NADPH比值下降54.4%(P<0.05,图4E),表明2×10^{-4} μg/个线粒体预处理可以增强周细胞内磷酸戊糖途径。

2.4 线粒体预处理对周细胞穿膜定植能力的影响

采用流式细胞术检测肺组织中外源性周细胞定植的数量,结果显示:与PC组肺组织定植的周细胞相比,Mito-PC组大鼠肺组织中外源性周细胞在肺组织单细胞悬液中比例显著升高(P<0.05,图5)。

2.5 线粒体预处理周细胞对脓毒症大鼠肺血管渗漏的影响

进一步评估Mito-PC在脓毒症大鼠模型中对肺血管内皮屏障的保护作用。观察伊文思蓝注射后,各组

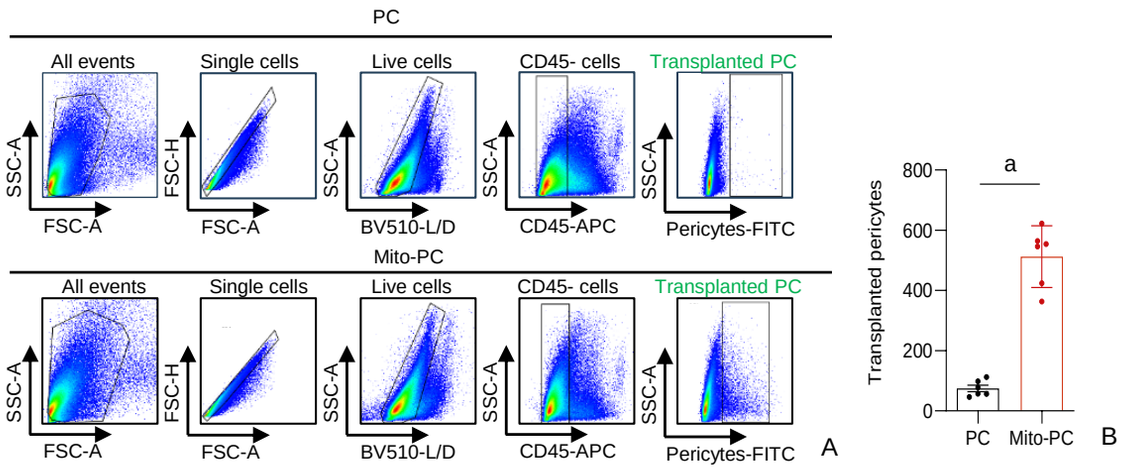


a: $P<0.05$, compared with the 0 μg/cell group or the PC group; b: $P<0.05$, compared with the PC+H_2O_2 group

A: Confocal microscopy observation results of mitochondria co-incubated with pericytes for 4 and 12 h under two staining protocols; B: Effects of mitochondria at different concentrations on pericyte viability after preconditioning for 4, 12, and 24 h (n=10); C: Effects of preconditioning with 2×10^{-4} μg/cell for 12 h on ATP production in pericytes (n=6); D: Effects of preconditioning with 2×10^{-4} μg/cell for 12 h on the resistance of pericytes to H_2O_2-induced oxidative stress; E: Effects of preconditioning with 2×10^{-4} μg/cell for 12 h on G6PD activity and $NADP^+$/NADPH ratio in pericytes (n=8)

图4 线粒体预处理对周细胞代谢模式的影响

Figure 4 Effects of mitochondrial preconditioning on pericyte metabolic patterns



a: $P<0.05$

A: Detection of pulmonary pericyte colonization in each group by flow cytometry; B: Statistical graph of the number of transplanted PCs (n=6)

图5 流式细胞术检测周细胞的定植数量

Figure 5 Detection of pericyte colonization number by flow cytometry

大鼠肺组织发现:正常组大鼠肺组织表面光滑,几乎无蓝色斑点;Sep组大鼠肺血管发生严重渗漏($P<0.05$),肺组织表面呈明显深蓝色;与Sep组大鼠相比,PC组大鼠肺部伊文思蓝外渗减轻,肺组织表面呈浅蓝色;而与PC组大鼠相比,Mito-PC组大鼠肺组织表面蓝色斑点进一步减少($P<0.05$,图6A、B)。

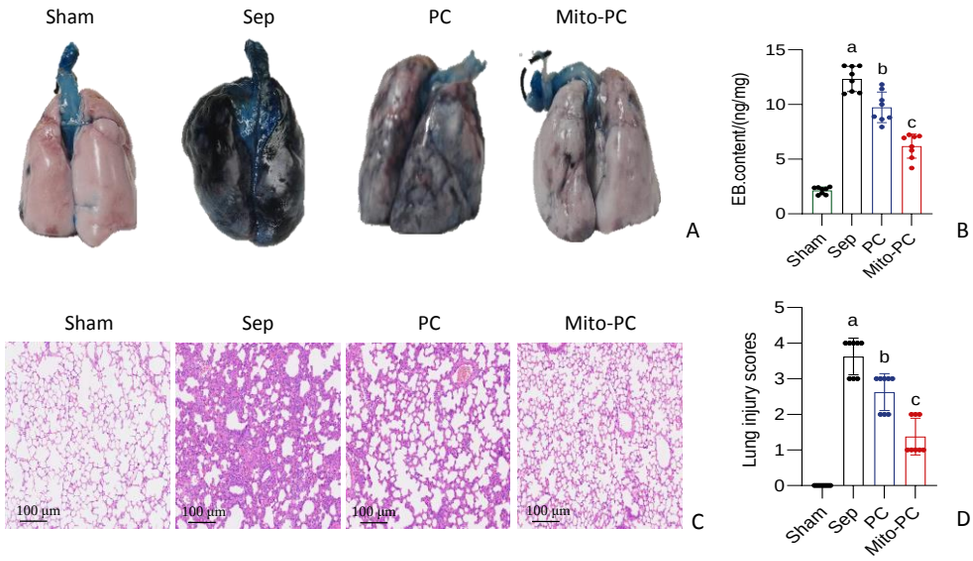
各组大鼠肺组织病理切片结果观察可见:与正常大鼠相比,脓毒症后大鼠肺部组织结构呈严重破坏状态,肺泡结构严重紊乱,肺泡壁水肿明显,肺泡间隔显著增厚,且炎性细胞浸润大量存在,炎症评分明显增高($P<0.05$);单纯PC治疗后可观察到肺组织结构部分改善,炎症评分明显降低($P<0.05$),但仍可发现部分肺泡结构紊乱、肺泡间隔增厚及少量炎性细胞浸润的现象;而Mito-PC组大鼠肺组织结构较为完整,肺泡破裂情况进一步减少,肺泡壁水肿进一步减少,厚度降低,炎性细胞浸润显著减少,炎症评分也显著降低($P<0.05$,图6C、D)。上述结果表明,与单纯PC治疗相比,Mito-PC治疗对脓毒症大鼠肺血管渗漏的减轻效果更为显著。

2.6 线粒体预处理周细胞对脓毒症大鼠血清炎症因子、重要器官功能和存活率的影响

ELISA检测大鼠血清炎症因子的结果显示:脓毒症大鼠血清TNF-α和IL-6含量明显增多($P<0.05$)。与Sep组大鼠相比,PC治疗后的大鼠血清中TNF-α和IL-6水平下降($P<0.05$);而Mito-PC治疗后大鼠血清中TNF-α和IL-6水平显著下降($P<0.05$)。即Mito-PC治疗后的大鼠与PC组大鼠相比,血清炎症反应进一步减轻,血清TNF-α和IL-6水平下降显著($P<0.05$,图7A)。

大鼠血清心肌损伤标志物、肾功能标志物检测结果显示:脓毒症大鼠血清cTnT、Urea和Crea含量明显增多($P<0.05$)。与脓毒症组大鼠相比,PC治疗后的大鼠血清cTnT、Urea和Crea水平显著下降($P<0.05$);而Mito-PC治疗后大鼠血清中cTnT、Urea和Crea含量进一步减少($P<0.05$)。可以得出,与单纯PC相比,Mito-PC治疗后的大鼠心脏与肾脏功能得到进一步改善($P<0.05$,图7B、C)。

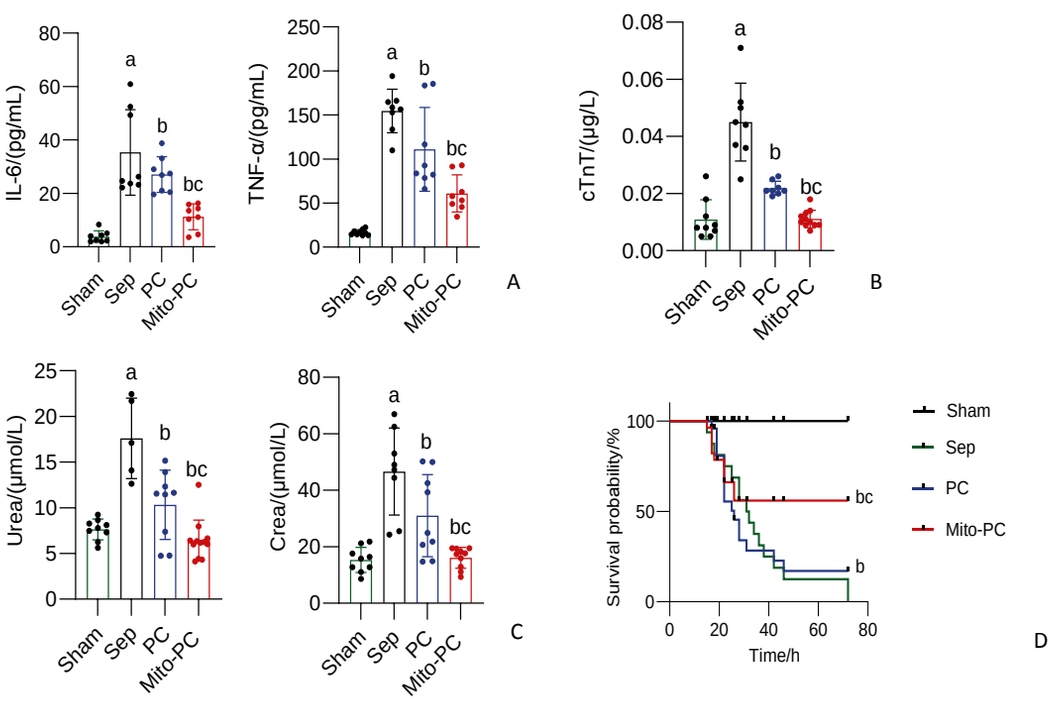
脓毒症大鼠在CLP术后24 h内存活率明显下降,且72 h后无存活个体被观察到。与脓毒症组大鼠相比,单纯PC治疗后,大鼠存活时间延长,其中72 h后仍存活数量为3只($P<0.05$);而线粒体预处理的周细胞治疗后脓毒症大鼠72 h存活率增加($P<0.05$,图7D)。对比单纯PC治疗组与线粒体预处理的周细胞治疗组大鼠的存活率,结果发现,Mito-PC组大鼠72 h存活率与PC组大鼠存活率相比显著提高($P<0.05$,图7D)。上述结果表明,经大鼠尾静脉输注线粒体预处理后的周细胞可显著抑制脓毒症后大鼠体内炎症因子的产生,改善脓毒症后大鼠体内重要脏器功能,提高脓毒症大鼠存活率。



a: P<0.05, compared with the Sham; b: P<0.05, compared with the Sep; c: P<0.05, compared with the PC
A: Lung EB staining of rats in each group; B: Statistical graph of lung tissue EB content; C: Changes in lung pathological structure of rats in each group; D: Statistical graph of lung tissue inflammation score (n=8)

图6 PC与Mito-PC对脓毒症大鼠肺血管的作用

Figure 6 Effects of PC and Mito-PC on pulmonary blood vessels in septic rats



a: P<0.05, compared with the Sham; b: P<0.05, compared with the Sep; c: P<0.05, compared with the PC
A: Serum levels of IL-6 and TNF-α in rats from each group were measured by ELISA (n=8); B: Serum cTnT levels in rats from each group were submitted to the clinical laboratory for testing (n=8); C: Serum Urea and Crea levels in rats from each group were submitted to the clinical laboratory for testing (n=8); D: 72 h survival rate of rats in each group (n=16)

图7 线粒体预处理周细胞对脓毒症大鼠血清炎症因子、器官功能和存活率的影响

Figure 7 Effects of mitochondria-preconditioned pericytes on serum inflammatory factors, organ function and survival rate in septic rats

3 讨论

脓毒症是一种由感染引起全身炎症反应综合征,常见于严重创伤或感染性疾病的患者。血管功能障碍是导致脓毒症后多器官衰竭甚至死亡的始动因素,血管功能障碍表现为以难治性低血压为特征的血管舒缩功能障碍及以血管渗漏为特征的血管屏障功能障碍[16-17]。现有治疗手段对血管功能障碍的疗效不尽如人意,因此,寻找血管功能障碍的针对性治疗措施,对提升脓毒症等急危重症的治疗效果和临床预后具有重要价值。

周细胞是一种包绕在毛细血管周围的多能壁饰细胞,周细胞参与血管发育、成熟、重塑等多环节,对血管功能的维持至关重要[18]。本课题组前期数据表明,脓毒症大鼠肺血管周细胞大量脱落,并伴随严重的肺血管渗漏;外源性输注的周细胞,通过直接覆盖和旁分泌作用部分改善脓毒症大鼠血管功能障碍及动物存活,但其效果有限,究其原因是外源性输注的周细胞定植率很低[8-9]。因此如何有效提高周细胞的定植率,进而增强周细胞对脓毒症大鼠血管功能障碍的保护作用,对脓毒症的治疗至关重要。

线粒体移植是指通过向受损细胞或组织递送健康线粒体,以替换或恢复受损线粒体功能的创新治疗策略。LIN等[14]发现在小鼠体内,与单纯移植内皮细胞相比,MSC与内皮细胞共同移植可以显著提升内皮细胞的移植成功率。已有研究表明,在自然状态下MSC可以通过隧道纳米管结构向内皮细胞传递线粒体。据此,LIN等[14]从MSC内分离提取线粒体并将分离所得线粒体与内皮细胞共同移植,结果表明,与MSC来源线粒体共移植的内皮细胞存活率更高。MSC来源线粒体预处理周细胞,能否提高周细胞在大鼠体内的血管生成能力,进而改善周细胞的治疗效果,目前尚不清楚。

3.1 MSC来源线粒体预处理显著增强周细胞定植与治疗效果

LIN等[14]对MSC来源线粒体增强内皮细胞存活机制进行研究发现,内皮细胞内几乎不存在MSC来源线粒体的DNA(仅占内皮细胞线粒体总量的1.7%),MSC来源线粒体是通过调控内皮细胞中PINK1-Parkin通路介导的线粒体自噬增强内皮细胞存活,进而促进缺血组织内血管的生成,显著改善小鼠缺血部位血供。这提示,MSC来源线粒体与靶细胞共孵育后几乎不与靶细胞自身线粒体发生融合,而是通过激活了靶细胞内特定的信号通路进而调控靶细胞功能。

本研究结果表明,线粒体处理周细胞12 h后,周细胞内几乎检测不到MSC来源线粒体;但与单纯的周细胞治疗相比,线粒体预处理周细胞在脓毒症大鼠肺组织中的定植率显著增加。外源性输注线粒体预处理周细胞对脓毒症大鼠急性肺损伤和肺血管屏障功能的保护作用显著提升:脓毒症大鼠肺血管对伊文思蓝的渗漏明显减少,肺组织病理结构显著改善,炎性细胞浸润现象显著减轻。同时,与单纯周细胞治疗组相比,线粒体预处理周细胞治疗组大鼠全身炎症反应明显减轻,重要脏器功能损伤指标显著下降,大鼠存活时间也显著延长。综上所述,MSC来源线粒体预处理周细胞,显著提高了周细胞在脓毒症大鼠体内的定植率,进而显著提高了周细胞治疗效果。

3.2 MSC来源线粒体预处理增强周细胞抗氧化应激能力

目前,影响干细胞移植定植率的主要因素有:①宿主体内环境,包括氧化应激水平、免疫监控水平、血流动力学等;②外源性输注干细胞的数量、活性、代谢状态以及干细胞的分化水平、表面趋化因子与黏附分子表达水平等;③输注干细胞的方式,如通过纳米材料等靶向技术实现干细胞向病灶的精准递送,可增加干细胞在体内的定植率[10,19-21]。

ZIPSER等[22]研究发现脊髓损伤后机体内存在炎症、缺血、胶质瘢痕等恶劣环境,这种环境会导致移植细胞的存活率低,而维持细胞活性是外源性细胞实现迁移、分化和定植的基础。YANG等[23]开发了一种可以包裹MSC的新型微胶囊,微胶囊中的MSC表现出更高的细胞活性,将该微胶囊包裹的MSC注射到小鼠骨缺损处可显著促进骨的再生,加速骨骼修复,效果明显优于单纯的MSC移植。CHEN等[24]通过在MSC内过表达Nrf2和DKK1以增强MSC的细胞活性,减少H_2O_2刺激后MSC内ROS的产生,提高了外源性输注的MSC在慢加急性肝衰竭小鼠肝脏中的定植数量,促进慢加急性肝衰竭小鼠的肝脏再生。NADPH主要由磷酸戊糖途径产生,是细胞内主要的还原剂之一。WANG等[25]研究发现在细胞内过表达线粒体铁蛋白促进了氧和葡萄糖剥夺再灌注后细胞中G6PD的激活和NADPH的产生,表明线粒体铁蛋白可以通过增强细胞磷酸戊糖途径,进而提高细胞抗氧化应激能力。综上,增强外源性干细胞的细胞活性和抗氧化应激能力,能够有效提高干细胞在宿主体内的定植率,进而

增强外源性输注干细胞的治疗效果。

MSC来源线粒体是否通过增强周细胞抗氧化应激能力,进而提高外源性输注的周细胞在脓毒症大鼠体内的定植率,目前尚不清楚。实验室前期研究发现,使用右美托咪定预处理周细胞可以通过降低LPS诱导后周细胞内的ROS水平,增强周细胞的抗氧化应激能力,进而提高周细胞在脓毒症小鼠肺组织中的定植数量,增强外源性周细胞的治疗效果[25]。本研究对线粒体预处理周细胞的细胞活性及抗氧化应激能力进行了观察。结果发现,线粒体预处理显著提升了周细胞活性及对H_2O_2诱导氧化应激的抵抗能力。综上所述,MSC来源线粒体通过调控周细胞磷酸戊糖途径,增强周细胞活性及抗氧化应激能力,进而提升外源性输注周细胞在脓毒症大鼠体内的定植率,增加治疗效果。

3.3 线粒体调控周细胞代谢通路的潜在机制

尽管本研究观察到MSC来源线粒体可增强周细胞磷酸戊糖途径,进而提高周细胞的G6PD活性和NADPH水平,但其具体调控机制尚不明确。已有文献提示线粒体-核逆向信号,包括AMPK/SIRT1通路等,可以调控细胞中代谢相关基因表达。ZHAO等[26]发现线粒体在应激状态下可以激活AMPK,激活后的AMPK会靶向与hnRNPH1结合,促进hnRNPH1发生磷酸化并在细胞核中发生积累,最终通过激活DRP1等线粒体动力相关基因表达,进而调控细胞代谢。同时,FANG等[27]实验发现补充TCA中间产物琥珀酸可以增强磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway,PPP)通量,并且增强NAD^+补救合成的关键酶NAMPT也可以通过激活G6PD活性进而提升PPP通量。MSC来源线粒体能否通过上述机制调控周细胞代谢模式,目前尚不清楚,未来,本实验将通过多组学和干预信号通路等实验,进一步阐述相关机制。

本实验仅在盲肠结扎穿孔术后12 h,使用流式细胞术检测肺脏周细胞定植率,无法反映周细胞在体内的动态分布和长期存活情况,后续研究还需长期追踪周细胞在脓毒症大鼠体内的动态分布与存活周期,以全面评估其生物学行为;同时,本研究在动物实验中,为验证疗效原理,采用了预防性干预策略。这与在临床实践中实际的临床场景存在差异,存在高估治疗方案实际效果的可能。未来研究将在脓毒症确立后再给予治疗,以更贴近临床实际。此外,本实验的结果仅在大鼠水平提示线粒体预处理周细胞能增强周细胞抗氧化应激能力,提高周细胞定植率进而增强外源性输注周细胞对脓毒症大鼠肺血管渗漏的治疗效果,但在大型动物和人类体内是否有同样的作用还需进一步研究;另外,线粒体预处理周细胞后是否会对周细胞旁分泌功能产生影响,还需进一步研究。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] YE M Z, ZHAO Y, WANG Y Y, *et al*. NAD(H)-loaded nanoparticles for efficient sepsis therapy *via* modulating immune and vascular homeostasis[J]. Nat Nanotechnol, 2022, 17(8): 880-890. DOI:10.1038/s41565-022-01137-w.

[2] SHANKAR-HARI M, CALANDRA T, SOARES M P, *et al*. Reframing sepsis immunobiology for translation: towards informative subtyping and targeted immunomodulatory therapies[J]. Lancet Respir Med, 2024, 12(4): 323-336. DOI:10.1016/S2213-2600(23)00468-X.

[3] VAN DER POLL T, SHANKAR-HARI M, WIERSINGA W J. The immunology of sepsis[J]. Immunity, 2021, 54(11): 2450-2464. DOI:10.1016/j.immuni.2021.10.012.

[4] LOPES-PIRES M E, FRADE-GUANAES J O, QUINLAN G J. Clotting dysfunction in sepsis: a role for ROS and potential for therapeutic intervention[J]. Antioxidants, 2022, 11(1): 88. DOI:10.3390/antiox11010088.

[5] LI J X, TAN M M, YANG T, *et al*. The paracrine isthmin1 transcriptionally regulated by C/EBPβ exacerbates pulmonary vascular leakage in murine sepsis[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2024, 326(1): C304-C316. DOI: 10.1152/ajpcell.00431.2023.

[6] MCMULLAN R R, MCAULEY D F, O'KANE C M, *et al*. Vascular leak in sepsis: physiological basis and potential therapeutic advances[J]. Crit Care, 2024, 28(1): 97. DOI: 10.1186/s13054-024-04875-6.

[7] ARMULIK A, GENOVÉ G, BETSHOLTZ C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises[J]. Dev Cell, 2011, 21(2): 193-215. DOI:10.1016/j.devcel.2011.07.001.

[8] ZHANG Z S, ZHOU H N, HE S S, *et al*. Research advances in pericyte function and their roles in diseases[J]. Chin J Traumatol, 2020, 23(2): 89-95. DOI: 10.1016/j.cjtee.2020.02.006.

[9] LIU Y Y, BAO D Q, SHE H, *et al*. Role of Hippo/ACSL4 axis in ferroptosis-induced pericyte loss and vascular dysfunction in sepsis[J]. Redox Biol, 2024, 78: 103353. DOI:10.1016/j.redox.2024.103353.

[10] 罗茜, 张紫森, 杨傲, 等. 右美托咪定预处理周细胞增强细胞治疗对脓毒症小鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 陆军

军医大学学报, 2025, 47(2): 101-111. DOI:10.16016/j.2097-0927.202407011.
LUO X, ZHANG Z S, YANG A, *et al*. Dexmedetomidine pretreatment enhances protective effect efficacy of pericytes agaist acute lung injury in septic mice[J]. J Army Med Univ, 2025, 47(2): 101-111. DOI:10.16016/j.2097-0927.202407011.

[11] LIAO N S, SHI Y J, WANG Y C, *et al*. Antioxidant preconditioning improves therapeutic outcomes of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells through enhancing intrahepatic engraftment efficiency in a mouse liver fibrosis model[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 237. DOI: 10.1186/s13287-020-01763-y.

[12] YANG Y M, LEE E H, YANG Z. Hypoxia-conditioned mesenchymal stem cells in tissue regeneration application [J]. Tissue Eng Part B Rev, 2022, 28(5): 966-977. DOI: 10.1089/ten.teb.2021.0145.

[13] ZHANG T G, MIAO C Y. Mitochondrial transplantation as a promising therapy for mitochondrial diseases [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13(3): 1028-1035. DOI: 10.1016/j.apsb.2022.10.008.

[14] LIN R Z, IM G B, LUO A C, *et al*. Mitochondrial transfer mediates endothelial cell engraftment through mitophagy[J]. Nature, 2024, 629(8012): 660-668. DOI:10.1038/s41586-024-07340-0.

[15] 刘奕言.周细胞铁死亡在脓毒症肺血管渗漏中的作用及机制[D].重庆:中国人民解放军陆军军医大学, 2023. DOI:10.27001/d.cnki.gtjyu.2023.000296.
LIU Y Y. The role and mechanism of pericyte ferroptosis in pulmonary vascular permeability following sepsis [D]. Chongqing: Army Medical University, 2023. DOI: 10.27001/d.cnki.gtjyu.2023.000296.

[16] SEUL K, YOO S, JI J, *et al*. Allogenic mitochondria transfer improves cardiac function in iPS-cell-differentiated cardiomyocytes of a patient with Barth syndrome[J]. Exp Mol Med, 2025, 57(6): 1260-1271. DOI:10.1038/s12276-025-01472-7.

[17] YANG K, FAN M, WANG X H, *et al*. Lactate induces vascular permeability *via* disruption of VE-cadherin in endothelial cells during sepsis[J]. Sci Adv, 2022, 8(17): eabm8965. DOI:10.1126/sciadv.abm8965.

[18] DABRAVOLSKI S A, ANDREEVA E R, EREMIN I I, *et al*. The role of pericytes in regulation of innate and adaptive immunity [J]. Biomedicines, 2023, 11(2): 600. DOI: 10.3390/biomedicines11020600.

[19] SONG C J, SONG C J, TONG F. Autophagy induction is a survival response against oxidative stress in bone marrow-derived mesenchymal stromal cells[J]. Cytotherapy, 2014, 16(10): 1361-1370. DOI:10.1016/j.jcyt.2014.04.006.

[20] AGUADÉ -GORGORIÓ J, JAMI-ALAHMADI Y, CALVANESE V, *et al*. MYCT1 controls environmental sensing in human haematopoietic stem cells[J]. Nature, 2024, 630(8016): 412-420. DOI: 10.1038/s41586-024-07478-x.

[21] SCHUNK S J, TRIEM S, SCHMIT D, *et al*. Interleukin-1α is a central regulator of leukocyte-endothelial adhesion in myocardial infarction and in chronic kidney disease [J]. Circulation, 2021, 144(11): 893-908. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.053547.

[22] ZIPSER C M, CRAGG J J, GUEST J D, *et al*. Cell-based and stem-cell-based treatments for spinal cord injury: evidence from clinical trials[J]. Lancet Neurol, 2022, 21(7): 659-670. DOI:10.1016/S1474-4422(21)00464-6.

[23] YANG L, LIU Y X, SUN L Y, *et al*. Biomass microcapsules with stem cell encapsulation for bone repair [J]. Nano Micro Lett, 2021, 14(1): 4. DOI: 10.1007/s40820-021-00747-8.

[24] CHEN F, CHE Z D, LIU Y X, *et al*. Invigorating human MSCs for transplantation therapy *via* Nrf2/DKK1 co-stimulation in an acute-on-chronic liver failure mouse model [J]. Gastroenterol Rep, 2024, 12: goae016. DOI:10.1093/gastro/goae016.

[25] WANG P N, CUI Y M, LIU Y Y, *et al*. Mitochondrial ferritin alleviates apoptosis by enhancing mitochondrial bioenergetics and stimulating glucose metabolism in cerebral ischemia reperfusion[J]. Redox Biol, 2022, 57: 102475. DOI:10.1016/j.redox.2022.102475.

[26] ZHAO L L, ZOU X T, DENG J Q, *et al*. hnRNPH1 maintains mitochondrial homeostasis by establishing NRF1/DRP1 retrograde signaling under mitochondrial stress[J]. Cell Death Differ, 2025, 32(1): 118-133. DOI: 10.1038/s41418-024-01331-4.

[27] FANG J K, HOU P B, LIU S S, *et al*. NAD^+ salvage governs the immunosuppressive capacity of mesenchymal stem cells[J]. Cell Mol Immunol, 2023, 20(10): 1171-1185. DOI:10.1038/s41423.

(收稿:2025-07-17;修回:2025-11-22)
(编辑 刘秋池)