

· 综述 ·

单细胞转录组学技术及其在脂肪组织研究中的应用

孟庆楠 李小英 熊雪莲

复旦大学附属中山医院内分泌科, 上海 200032

通信作者: 熊雪莲, Email: xiong.xuelian@zs-hospital.sh.cn

【摘要】 脂肪组织的细胞成分具有高度异质性。不同细胞以及不同细胞亚类之间生物学特性具有明显差异。单细胞转录组测序是近几年发展起来的在单细胞水平对转录组进行分析的新型技术。该技术在单个细胞的精度提供转录组信息, 是细胞成分异质性高的组织器官生物功能探索的重要工具。在脂肪组织研究领域, 单细胞转录组测序已经应用于描绘细胞图谱、鉴定关键细胞亚类、追踪细胞分化轨迹等方面。

【关键词】 RNA 测序; 单细胞分析; 转录组; 脂肪组织

基金项目: 国家自然科学基金 (81970740)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121383-20201109-11018

Single-cell RNA-sequencing in adipose tissue research Meng Qingnan, Li Xiaoying, Xiong Xuelian.

Department of Endocrinology and Metabolism, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Corresponding author: Xiong Xuelian, Email: xiong.xuelian@zs-hospital.sh.cn

【Abstract】 The adipose tissue is composed of heterogeneous cell types that exhibit distinct properties. The advance of single-cell RNA sequencing has provided a powerful tool for unraveling the complexity of different cell with unprecedented resolution. Single-cell RNA sequencing has shed new light on adipose tissue research including generation of cell atlas, identification of subtypes and reconstruction of cellular differentiation trajectories.

【Keywords】 RNA-seq; Single-cell analysis; Transcriptome; Adipose tissue

Fund program: Natural Science Foundation of China (81970740)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121383-20201109-11018

脂肪组织是参与能量代谢的重要组织, 根据细胞构成和生物学功能不同, 其主要分为白色脂肪组织和棕色脂肪组织。前者功能为能量储存, 同时有激素分泌、免疫等功能; 后者主要功能则为产热。根据分布部位不同, 白色脂肪组织可进一步分为内脏脂肪组织和皮下脂肪组织^[1]。

脂肪组织的细胞成分具有高度异质性, 包括脂肪细胞和非脂肪细胞, 后者又称基质血管成分 (SVF), 其包括免疫细胞、前脂肪细胞、内皮细胞、周细胞等类别^[1]。传统的基因表达检测技术, 如微阵列、非单细胞转录组测序等, 测得的是细胞群体的总体基因表达特征, 不能提供细胞来源的信息, 且罕见的细胞群体易被忽略。荧光激活细胞分选仪 (FACS) 尽管能够探究组织中细胞的异质性, 但存在一定的局限性, 近年来单细胞转录组测序 (scRNA-seq) 技术的出现, 实现了在单个细胞精度

获得组织中各细胞的转录组信息, 为深入研究包括脂肪组织在内的细胞成分高度异质性的器官和组织带来了可能。

1 单细胞转录组学技术介绍

单细胞转录组测序技术依次包含以下步骤: 单细胞采集、裂解、逆转录、互补脱氧核糖核酸 DNA (cDNA) 扩增、文库构建、测序, 以及数据分析 (图 1)。其中单细胞采集和 cDNA 扩增最为重要, 这两步是决定测序通量、成本、精确度和灵敏度的关键因素。cDNA 扩增前, 采用条码法对各单细胞来源的 cDNA 利用一段外源性寡核苷酸序列进行标记, 可以大大提高测序的通量并减少时间花费。

1.1 单细胞采集 常用的单细胞采集方法有显微操作法、梯度稀释法、激光捕获显微切割法 (LCM)、细胞分选法和微流控技术。上述方法各有优劣, 应用时需根据具体情况选择。

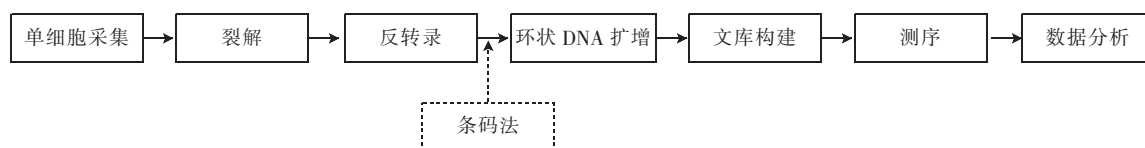


图 1 单细胞转录组测序流程

显微操作法即人工在显微镜下挑选单个细胞。这种方法可准确捕获形态完整的细胞,尤其适合稀有的细胞,但效率低下,不适合规模化应用^[2]。

梯度稀释法先计算初始细胞悬液的浓度,再逐步稀释悬液,最终使单位体积悬液中理论上只有单个细胞。该方法简单、不易损伤细胞、成本低,但根据泊松分布原理,获得的悬液中只有约 1/3 含有的是单细胞,因此可利用率低^[2]。

激光捕获显微切割法需要将组织或细胞固定染色以及切割。该方法实现了从组织样本中采集单细胞,且快速、准确,重复性好;缺点是固定和染色步骤可能对核酸造成损害^[3]。

细胞分选法包括荧光激活细胞分选术和磁激活细胞分选法(MACS)。FACS 根据荧光标记的抗体结合细胞表面的特异性分子标志或细胞自身的光散射特性来分选细胞,具有高通量、高灵敏度、高准确性的优势;但需要大量的细胞,不适用于微量样本,且细胞经过高速液流时,活性和状态会受到一定影响^[4]。MACS 中,磁珠标记的细胞通过一个带有磁场的分选柱,此时被磁性标记的细胞滞留在柱中,而未被标记的则流出,从而实现两类细胞的分离。相较于 FACS,MACS 对细胞活性的影响小,操作简单;但分选纯度较低,且不能进行多参数分选^[5]。

微流控技术在微米级的流控通道内分离和捕获细胞。其中微流控芯片把单细胞分离、反转录和 cDNA 文库构建等步骤集合到一块芯片上,大大提高了通量,并实现了高度自动化,从而提高效率、减少操作误差,且试剂用量少。但该方法对细胞活性和细胞量的要求较高,且设备昂贵^[6]。

1.2 条码法 条码法的核心是在单细胞的 RNA 上加一段条码序列,使每个细胞的条码序列各不相同,随后将单细胞混合进行建库和测序(细胞的原 RNA 与条码序列同时测序),测序后根据条码序列来区分不同单细胞的数据。由于可以混合建库和测序,该方法将数百个单细胞的建库简化成一个步骤,从而提高了效率^[7]。

1.3 cDNA 扩增 根据扩增所用的酶,cDNA 扩增可分为聚合酶链反应(PCR)扩增法、体外转录扩增

法和 Phi29 聚合酶扩增法。其中 PCR 扩增法根据第二链 cDNA 合成的方法,又可分为末端加尾法、模板转换法和随机引物法。

末端加尾法在反转录合成第一链 cDNA 后,使用末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)在第一链 cDNA 的 3' 端加上一串脱氧核糖核酸,即 polyA 或 polyG 引物,随后用与第一链引物互补的引物合成第二链 cDNA。模板转换法在合成第一链 cDNA 时,由于反转录酶的末端转移酶活性,会在 cDNA 3' 端添加几个非模板核苷酸,下一步加入的引物带有与这几个核苷酸互补的碱基,因此会与第一链 cDNA 杂交,从而把模板转换成第一链 cDNA。相较于末端加尾法,模板转换法的优势在于能相对富集 mRNA 5' 端序列,但灵敏度没有前者高。随机引物法使用序列随机的寡核苷酸引物引导合成第二链 cDNA。PCR 法的共同优点是可以延长反转录和扩增时间,得到较长的 cDNA^[8]。

体外转录扩增法在合成第一链 cDNA 时引入 RNA 聚合酶启动子序列,再通过体外转录反应进行 cDNA 扩增。相比于 PCR 法,体外转录扩增法的优势是线性扩增,从而减少了 PCR 指数扩增带来的偏差;但扩增出的片段较短,大部分不是全长 cDNA^[9]。

Phi29 聚合酶扩增法利用了 Phi29 聚合酶的链置换和连续合成性质,在逆转录后将 cDNA 环化,再用 Phi29 聚合酶对 cDNA 进行连续滚环扩增。该方法为常温下扩增,因此相较于 PCR,避免了高温时 DNA 降解对扩增产物质量的影响;但扩增的均匀性较低^[8]。

2 单细胞转录组测序在脂肪组织研究中的应用

2.1 绘制脂肪组织细胞图谱

2.1.1 动物脂肪组织细胞图谱 Cho 等^[10]对健康小鼠内脏脂肪组织中的脂肪祖细胞(APC)进行单细胞转录组测序,再用层次聚类算法把 APC 分为 2 大群:一群较原始的脂肪干细胞(ASC),以及一群较为定向的前脂肪细胞(PA);ASC 和 PA 又各分为 3 小群和 2 小群,各小群的成熟程度不同。另外,该研究比较了自己的数据与其他脂肪组织研究的单细胞

RNA 测序(scRNA-seq)数据,发现在以往研究鉴定出的细胞群中,均能找到与 ASC、PA 相似的群体,说明单细胞转录组测序的结果具有稳定性。

Jaitin 等^[11]对肥胖和健康小鼠内脏脂肪组织中的免疫细胞进行单细胞转录组测序,发现肥胖能使脂肪组织免疫细胞的构成发生改变:主要是巨噬细胞占比增加,调节性 T 细胞和 2 型固有淋巴样细胞占比减少,这也印证了以往的研究结果。

2.1.2 人类脂肪组织细胞图谱 Acosta 等^[12]首次对人类脂肪组织的 SVF 进行单细胞转录组测序,并通过聚类分析把白色脂肪组织中的 SVF 细胞分成 4 群:M1 型脂肪组织巨噬细胞(ATM),M2 型 ATM,中间型 ATM,以及一类 ASC。尽管拟时序分析显示,ASC 群体内有处于不同分化阶段的细胞,但是细胞间基因表达的差异很小,因此无法区分出不同的细胞亚群。该研究不仅首次描绘了人类脂肪组织中 SVF 的细胞图谱,还提示健康人脂肪细胞可能有共同的来源。

2.2 鉴定关键细胞亚类,发现新细胞标志物

2.2.1 免疫细胞 既往的研究发现,肥胖能引起内脏脂肪组织中的炎症反应来导致代谢性疾病^[13],但对其中具体的分子和功能改变却了解甚少。Jaitin 等^[11]对肥胖和健康的人类和小鼠内脏脂肪组织中的免疫细胞进行单细胞转录组测序,发现肥胖状态下,内脏脂肪组织产生了一类新的巨噬细胞,此类细胞高表达脂质摄取和代谢相关基因,因此称为脂质相关巨噬细胞(LAM)。通过分析差异表达基因,发现 Trem2 是 LAM 的特异性表面分子;并利用 Trem2 敲除的小鼠模型,进一步说明了 Trem2 是 LAM 发挥代谢保护作用的关键效应分子。

以往发现,热量限制有改善糖耐量等代谢方面的益处。Weinstock 等^[14]取正常、肥胖、肥胖后热量限制 3 种状态的小鼠内脏脂肪组织,分别对其中的免疫细胞进行单细胞转录组测序,鉴定出一种可能对代谢有改善作用的细胞。这群细胞高表达吞噬作用相关基因,因此可能通过清除死细胞和多余的脂质,限制内脏脂肪组织中的炎症,来介导热量限制对代谢的改善作用。

2.2.2 脂肪细胞 Song 等^[15]对小鼠棕色脂肪组织中的原代脂肪细胞进行单细胞转录组测序,发现除了经典的高产热活性棕色脂肪细胞,还存在一类低产热活性的棕色脂肪细胞。相较于前者,后者低表达产热和脂肪分解基因,高表达脂肪酸摄取基因。

环境温度变化时,两类棕色脂肪细胞能相互转化,从而改变整个棕色脂肪组织的产热能力。

Rajbhandari 等^[16]分别对脂肪细胞白细胞介素 10 受体 α 亚型(IL10R α)敲除和对照组小鼠进行产热刺激,发现 IL10R α 敲除的小鼠产热增加。再对皮下脂肪组织的脂肪细胞进行单细胞核转录组测序(SNAP-seq),发现一类细胞在产热刺激时占比增加。这类细胞高表达产热相关基因,且在 IL10R α 敲除组中的比例高于对照组。另外,通过对非脂肪成分进行 scRNA-seq,发现淋巴细胞是产热刺激时 IL10 的主要来源。因此假设:产热刺激使淋巴细胞产生 IL10,作用于一种脂肪细胞上的 IL10 受体,从而抑制产热作用;并用淋巴细胞缺失的小鼠验证了此假设。该研究利用单细胞(核)转录组测序,揭示了脂肪组织中淋巴细胞和脂肪细胞的相互作用。

2.2.3 非免疫细胞的基质血管成分 Hepler 等^[17]用表面标志血小板源性生长因子 β 链(PDGFR β)筛选出小鼠内脏脂肪组织中的血管旁细胞,并进行单细胞转录组测序。以往的研究显示,高脂饮食后,内脏脂肪组织中的血管旁细胞会产生白色脂肪细胞^[18]。而该研究发现,血管旁细胞中除了经典的脂肪前体细胞,还有一类纤维炎症祖细胞(FIP),FIP 缺乏脂肪形成的功能,但有促炎和纤维形成功能,且能抑制脂肪前体细胞的脂肪形成作用。上述发现揭示了血管旁细胞的异质性,以及血管旁细胞内部对脂肪形成的调控机制。

Schwalie 等^[19]对小鼠皮下脂肪组织中的脂肪干细胞和祖细胞进行单细胞转录组测序,鉴定出一群新的细胞,这群细胞通过旁分泌作用抑制脂肪形成,因此命名为脂肪形成调节细胞。

血管旁脂肪组织有调节血管稳态、促进血管重构的作用。以往认为,发挥这些作用主要是脂肪细胞分泌的细胞因子。Gu 等^[20]对血管旁脂肪组织来源的间充质干细胞(PV-ADSC)进行单细胞转录组测序,发现了一群高表达平滑肌分化信号通路的 PV-ADSC,说明了除脂肪细胞外,PV-ADSC 在血管重构中也发挥重要作用。

2.3 追踪细胞分化轨迹 细胞不同状态转变往往通过转录组学改变实现,但这些状态都是瞬时的。拟时序分析则通过算法来学习每个细胞状态转变过程中基因表达的变化,构建细胞发育轨迹,从而不需要提取瞬态细胞也可以查看细胞状态。

Merrick 等^[21]对皮下脂肪组织中的脂肪祖细胞

进行单细胞转录组测序及拟时序分析,得到其发育轨迹:DPP4(+)多能祖细胞首先分化成ICAM1(+)或CD142(+)前脂肪细胞,后两者再进一步分化成成熟的脂肪细胞。Sharma等^[22]为了探究netrin-1分子对ATM以及代谢的影响,构建了在单核-巨噬细胞中特异性敲除netrin-1的小鼠,并对其内脏脂肪组织中的免疫细胞进行单细胞转录组测序。拟时序分析结果显示,特异性敲除netrin-1改变了巨噬细胞的发育轨迹,激活了多数巨噬细胞内的脂质处理程序。

3 传统组学技术对脂肪组织的研究

过去数十年,组学技术对于认识脂肪组织产生了巨大的推动。对处于健康、肥胖、代谢性疾病等状态,或热量限制等干预下的脂肪组织进行分析,得到了相应的蛋白表达谱,并通过对比不同状态/干预条件下的差异表达蛋白,发现了一系列可能对代谢有重要作用的蛋白。

已有的研究还通过微阵列、转录组测序等技术,对脂肪组织的转录组进行探究,揭示了不同部位脂肪组织转录组的差异^[23],或肥胖等病理状态对脂肪组织转录组的影响^[24]。Alvarez-Dominguez等^[25]对小鼠的棕色脂肪组织进行转录组测序,鉴定出调控棕色脂肪细胞发育的关键长链非编码RNA(lncRNA),从而提供了治疗肥胖的潜在靶点。

然而,上述研究均为对整块脂肪组织进行分析。由于脂肪组织的细胞具有高度异质性,因此这些技术存在共同的局限性,即无法探究脂肪组织中不同细胞亚群的成分变化,以及相应的病理生理意义。

4 总结与展望

单细胞转录组学技术的出现,大大减少了对脂肪组织研究的偏倚。利用该技术不仅可以描绘脂肪组织细胞构成,还能发现调控代谢的关键细胞及分子,以及追踪细胞分化轨迹,从而了解发病过程中细胞状态的连续改变过程。

同时,该技术在脂肪组织中的应用也存在诸多挑战:对于成熟的脂肪细胞,由于其体积大、易被破坏,从组织中分离和检测有较大难度,目前的研究主要通过对原代脂肪细胞进行单细胞转录组测序^[15],或利用单细胞核测序技术来克服这一难题^[16]。其次,通常的单细胞转录组测序技术不能提供其位置信息。另外,单一的单细胞转录组测序无法获得蛋白质表达及其转录后修饰等信息,而多组学的应用,例如单细胞转录组与蛋白组学的结合,则能获得对脂肪组织细胞更全面的认识。未来如果在上述方面

继续取得进展,单细胞转录组学技术在脂肪组织研究中的应用将会有更大突破。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Tran TT, Kahn CR. Transplantation of adipose tissue and stem cells; role in metabolism and disease [J]. Nat Rev Endocrinol, 2010, 6(4):195-213. DOI:10.1038/nrendo.2010.20.
- [2] Gross A, Schoendube J, Zimmermann S, et al. Technologies for single-cell isolation [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(8):16897-919. DOI:10.3390/ijms160816897.
- [3] Schütze K, Lahr G. Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells [J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(8):737-742. DOI:10.1038/nbt0898-737.
- [4] Shapiro E, Biezuner T, Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science [J]. Nat Rev Genet, 2013, 14(9):618-630. DOI:10.1038/nrg3542.
- [5] Galbraith DW, Elumalai R, Gong FC. Integrative flow cytometric and microarray approaches for use in transcriptional profiling [J]. Methods Mol Biol, 2004, 263:259-280. DOI:10.1385/1-59259-773-4:259.
- [6] Marcy Y, Ishoev T, Lasken RS, et al. Nanoliter reactors improve multiple displacement amplification of genomes from single cells [J]. PLoS Genet, 2007, 3(9):1702-1708. DOI:10.1371/journal.pgen.0030155.
- [7] Kerschull JM, Zador AM. Cellular barcoding: lineage tracing, screening and beyond [J]. Nat Methods, 2018, 15(11):871-879. DOI:10.1038/s41592-018-0185-x.
- [8] Pan X, Durrett RE, Zhu H, et al. Two methods for full-length RNA sequencing for low quantities of cells and single cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(2):594-599. DOI:10.1073/pnas.1217322109.
- [9] Hashimshony T, Wagner F, Sher N, et al. CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification [J]. Cell Rep, 2012, 2(3):666-673. DOI:10.1016/j.celrep.2012.08.003.
- [10] Cho DS, Lee B, Doles JD. Refining the adipose progenitor cell landscape in healthy and obese visceral adipose tissue using single-cell gene expression profiling [J]. Life Sci Alliance, 2019, 2(6):e201900561. DOI:10.26508/lsa.201900561.
- [11] Jaitin DA, Adlung L, Thaiss CA, et al. Lipid-Associated Macrophages Control Metabolic Homeostasis in a Trem2-Dependent Manner [J]. Cell, 2019, 178(3):686-698. e14. DOI:10.1016/j.cell.2019.05.054.
- [12] Acosta JR, Joost S, Karlsson K, et al. Single cell transcriptomics suggest that human adipocyte progenitor cells constitute a homogeneous cell population [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1):250. DOI:10.1186/s13287-017-0701-4.
- [13] 吴珺, 陆爱东, 张乐萍, 等. 儿童核心结合因子相关性急性髓系白血病疗效及预后因素分析 [J]. 中华血液学杂志, 2019, 40(1):52-57. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.01.010.

- [14] Weinstock A, Brown EJ, Garabedian ML, et al. Single-Cell RNA Sequencing of Visceral Adipose Tissue Leukocytes Reveals that Caloric Restriction Following Obesity Promotes the Accumulation of a Distinct Macrophage Population with Features of Phagocytic Cells [J]. *Immunometabolism*, 2019, 1: e190008. DOI: 10. 20900/immunometab20190008.
- [15] Song A, Dai W, Jang MJ, et al. Low-and high-thermogenic brown adipocyte subpopulations coexist in murine adipose tissue [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(1): 247-257. DOI: 10. 1172/JCI129167.
- [16] Rajbhandari P, Arneson D, Hart SK, et al. Single cell analysis reveals immune cell-adipocyte crosstalk regulating the transcription of thermogenic adipocytes [J]. *Elife*, 2019, 8: e49501. DOI: 10. 7554/eLife. 49501.
- [17] Hepler C, Shan B, Zhang Q, et al. Identification of functionally distinct fibro-inflammatory and adipogenic stromal subpopulations in visceral adipose tissue of adult mice [J]. *Elife*, 2018, 7: e39636. DOI: 10. 7554/eLife. 39636.
- [18] Vishvanath L, MacPherson KA, Hepler C, et al. Pdgfr β ⁺ mural preadipocytes contribute to adipocyte hyperplasia induced by high-fat-diet feeding and prolonged cold exposure in adult mice [J]. *Cell Metab*, 2016, 23(2): 350-359. DOI: 10. 1016/j. cmet. 2015. 10. 018.
- [19] Schwalie PC, Dong H, Zachara M, et al. A stromal cell population that inhibits adipogenesis in mammalian fat depots [J]. *Nature*, 2018, 559(7712): 103-108. DOI: 10. 1038/s41586-018-0226-8.
- [20] Gu W, Nowak WN, Xie Y, et al. Single-Cell RNA-Sequencing and Metabolomics Analyses Reveal the Contribution of Perivascular Adipose Tissue Stem Cells to Vascular Remodeling [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(10): 2049-2066. DOI: 10. 1161/ATVBAHA. 119. 312732.
- [21] Merrick D, Sakers A, Irgebay Z, et al. Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue [J]. *Science*, 2019, 364(6438): eaav2501. DOI: 10. 1126/science. aav2501.
- [22] Sharma M, Schlegel M, Brown EJ, et al. Netrin-1 alters adipose tissue macrophage fate and function in obesity [J]. *Immunometabolism*, 2019, 1(2): e190010. DOI: 10. 20900/immunometab20190010.
- [23] Macotela Y, Emanuelli B, Mori MA, et al. Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots [J]. *Diabetes*, 2012, 61(7): 1691-1699. DOI: 10. 2337/db11-1753.
- [24] Patel RS, Carter G, El Bassit G, et al. Adipose-derived stem cells from lean and obese humans show depot specific differences in their stem cell markers, exosome contents and senescence: role of protein kinase C delta (PKC δ) in adipose stem cell niche [J]. *Stem Cell Investig*, 2016, 3: 2. DOI: 10. 3978/j. issn. 2306-9759. 2016. 01. 02.
- [25] Alvarez-Dominguez JR, Bai Z, Xu D, et al. De novo reconstruction of adipose tissue transcriptomes reveals long non-coding RNA regulators of brown adipocyte development [J]. *Cell Metab*, 2015, 21(5): 764-776. DOI: 10. 1016/j. cmet. 2015. 04. 003.

(收稿日期: 2020-11-09)

(上接第 20 页)

- [6] 范美娟, 邓美玉, 徐会, 等. 2 型糖尿病患者高尿酸血症流行状况与相关因素研究 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2018, 26(12): 1013-1016. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-6187. 2018. 12. 010.
- [7] Afkarian M, Zelnick LR, Hall YN, et al. Clinical manifestations of kidney disease among US adults with diabetes, 1988-2014 [J]. *JAMA*, 2016, 316(6): 602-610. DOI: 10. 1001/jama. 2016. 10924.
- [8] Meyers JL, Candrilli SD, Kovacs B. Type 2 diabetes mellitus and renal impairment in a large outpatient electronic medical records database: rates of diagnosis and antihyperglycemic medication dose adjustment [J]. *Postgrad Med*, 2011, 123(3): 133-143. DOI: 10. 3810/pgm. 2011. 05. 2291.
- [9] Latif H, Iqbal A, Rathore R, et al. Correlation between serum uric acid level and microalbuminuria in type-2 diabetic nephropathy [J]. *Pak J Med Sci*, 2017, 33(6): 1371-1375. DOI: 10. 12669/pjms. 336. 13224.
- [10] Yan D, Tu Y, Jiang F, et al. Uric Acid is independently associated with diabetic kidney disease: a cross-sectional study in a Chinese population [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129797. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0129797.
- [11] Nakagawa T, Tanabe K, Croker BP, et al. Endothelial dysfunction as a potential contributor in diabetic nephropathy [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(1): 36-44. DOI: 10. 1038/nrneph. 2010. 152.
- [12] 周宇, 柯甦捷, 刘礼斌. 血尿酸与糖尿病肾病 [J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2016, 36(3): 202-205. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1673-4157. 2016. 03. 15.
- [13] Sturm G, Kollerits B, Neyer U, et al. Uric acid as a risk factor for progression of non-diabetic chronic kidney disease? The Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study [J]. *Exp Gerontol*, 2008, 43(4): 347-352. DOI: 10. 1016/j. exger. 2008. 01. 006.
- [14] 张鹏燕, 李珊, 张丽侠, 等. 血尿酸水平与 2 型糖尿病慢性并发症的关系研究 [J]. *河南医学研究*, 2018, 27(15): 2705-2708. DOI: 10. 3969/j. issn. 1004-437X. 2018. 15. 006.
- [15] 陈霞, 谷雪梅, 方明. 血清尿酸/肌酐比值对 2 型糖尿病早期肾损伤的预测价值 [J]. *全科医学临床与教育*, 2018, 16(3): 320-322. DOI: 10. 13558/j. cnki. issn1672-3686. 2018. 03. 024.
- [16] Yang XL, So WY, Kong AP, et al. End-stage renal disease risk equations for Hong Kong Chinese patients with type 2 diabetes: Hong Kong Diabetes Registry [J]. *Diabetologia*, 2006, 49(10): 2299-2308. DOI: 10. 1007/s00125-006-0376-3.
- [17] Gu L, Huang L, Wu H, et al. Serum uric acid to creatinine ratio: A predictor of incident chronic kidney disease in type 2 diabetes mellitus patients with preserved kidney function [J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2017, 14(3): 221-225. DOI: 10. 1177/1479164116680318.
- [18] Kawamoto R, Ninomiya D, Kikuchi A, et al. Serum uric acid to creatinine ratio is a useful predictor of renal dysfunction among diabetic persons [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2019, 13(3): 1851-1856. DOI: 10. 1016/j. dsx. 2019. 04. 023.
- [19] Chunlei Y, Liubao G, Tao W, et al. The association between serum uric acid to creatinine ratio and renal disease progression in type 2 diabetic patients in Chinese communities [J]. *J Diabetes Complications*, 2019, 33(7): 473-476. DOI: 10. 1016/j. jdiacomp. 2018. 10. 013.

(收稿日期: 2020-10-24)