

黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 对 PC12 细胞铁死亡的影响

刘恩旭^{1,2}, 聂颖^{1,2}, 段嘉豪^{1,2}, 孙飞^{1,2}, 孙钰^{1,2}, 杨少锋^{1,2*}, 杨雷^{1,2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

摘要: **目的** 探讨黄芪甲苷联合骨髓间充质干细胞外泌体 (bone marrow mesenchymal stem cells exosomes, BMSCs-Exos) 对脊髓损伤细胞模型 PC12 细胞铁死亡的影响。**方法** 采用过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 诱导 PC12 细胞构建脊髓损伤细胞模型, 使用黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 进行干预。采用激光扫描共聚焦显微镜观察细胞对外泌体的摄取情况; 流式细胞术检测细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平; 试剂盒测定丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、亚铁离子 (ferrous ion, Fe²⁺) 和谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 水平; JC-1 荧光染色检测线粒体膜电位与透射电镜观察线粒体形态; 运用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测铁死亡相关因子 GPX4、铁蛋白重链 1 (ferritin heavy chain 1, FTH1) 和铁转运蛋白 (ferroportin, FPN) 的表达情况。**结果** H₂O₂ 处理增加了细胞内 ROS、MDA 和 Fe²⁺ 水平 ($P < 0.05$), 降低了 GSH、GPX4、FTH1 和线粒体膜电位 ($P < 0.05$), 诱发线粒体形态改变和铁死亡特征。BMSCs-Exos 和黄芪甲苷单独及联合干预均显著降低细胞内 ROS、MDA 和 Fe²⁺ 水平 ($P < 0.05$), 提升 FPN、GSH、GPX4 和线粒体膜电位 ($P < 0.05$), 改善线粒体形态、调节铁代谢及增强抗氧化能力。其中黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 处理效果更显著 ($P < 0.05$)。**结论** 黄芪甲苷和 BMSCs-Exos 均能有效抑制脊髓损伤细胞模型中的细胞铁死亡, 并显示出显著的神经保护作用。黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 不仅具有治疗脊髓损伤的潜力, 还可能在涉及氧化应激和铁死亡的其他神经疾病和损伤中发挥治疗作用。

关键词: 黄芪甲苷; BMSCs-Exos; 脊髓损伤; 铁死亡; 氧化应激

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)23-8056-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.23.013

Effects of astragaloside IV combined with BMSCs-Exos on ferroptosis in PC12 cells

LIU Enxu^{1,2}, NIE Ying^{1,2}, DUAN Jiahao^{1,2}, SUN Fei^{1,2}, SUN Yu^{1,2}, YANG Shaofeng^{1,2}, YANG Lei^{1,2}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

Abstract: Objective To explore the effects of astragaloside IV combined with bone marrow mesenchymal stem cells exosomes (BMSCs-Exos) on ferroptosis in PC12 cell model of spinal cord injury. **Methods** Hydrogen peroxide (H₂O₂) was used to induce PC12 cells to construct an spinal cord injury cell model, with interventions by astragaloside IV combined with BMSCs-Exos. Laser scanning confocal microscopy was employed to observe the uptake of exosomes by the cells. Flow cytometry was used to detect intracellular reactive oxygen species (ROS) levels. Kits were utilized to measure levels of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), ferrous ion (Fe²⁺), and glutathione peroxidase 4 (GPX4). JC-1 fluorescence staining was applied to detect mitochondrial membrane potential, and transmission electron microscopy was used to observe mitochondrial morphology. The expression levels of ferroptosis-related factors, including GPX4, ferritin heavy chain 1 (FTH1), and ferroportin (FPN), were analyzed using qRT-PCR and Western blotting. **Results** H₂O₂ treatment increased the levels of ROS, MDA, and Fe²⁺ ($P < 0.05$), while decreasing GSH, GPX4, FTH1, and mitochondrial membrane potential ($P < 0.05$), leading to mitochondrial morphological changes and characteristics of ferroptosis. Both

收稿日期: 2024-07-23

基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目 (2023JJ30472); 湖南省教育厅重点课题 (22A0261); 湖南省卫生健康委科研项目 (B202304078103); 湖南省中医药管理局课题 (B2023028)

作者简介: 刘恩旭, 博士研究生, 研究方向为脊柱脊髓相关疾病研究。E-mail: lexdoctor@163.com

*通信作者: 杨少锋, 医学博士, 博士生导师, 从事脊柱脊髓相关疾病研究。E-mail: 48797696@qq.com

杨雷, 医学博士, 主治医师, 从事脊柱脊髓相关疾病研究。E-mail: zyfyanglei1@163.com

BMSCs-Exos and astragaloside IV, individually and in combination, significantly reduced ROS, MDA, and Fe^{2+} levels ($P < 0.05$), increased FPN, GSH, GPX4, and mitochondrial membrane potential ($P < 0.05$), improved mitochondrial morphology, regulated iron metabolism, and enhanced antioxidant capacity. The combined treatment of astragaloside IV and BMSCs-Exos showed a more significant effect ($P < 0.05$). **Conclusion** Astragaloside IV and BMSCs-Exos can effectively inhibit ferroptosis in the spinal cord injury cell model and demonstrate significant neuroprotective effects. The combination of astragaloside IV and BMSCs-Exos not only holds potential for the treatment of spinal cord injury but may also exhibit similar therapeutic effects in other neurological diseases and injuries involving oxidative stress and ferroptosis.

Key words: astragaloside IV; BMSCs-Exos; spinal cord injury; ferroptosis; oxidative stress

脊髓损伤是一种对脊髓结构和功能造成暂时或永久性严重损伤的疾病^[1], 流行病学调查显示, 在美国每年每百万人中有 54 例脊髓损伤病例^[2], 且年轻人发病率较高^[3]。脊髓损伤后果较为严重, 通常会导致损伤部位以下的运动和感觉功能部分或完全丧失, 包括慢性疼痛、瘫痪和自主神经功能紊乱等, 并引发泌尿系统感染、压疮和呼吸疾病等二次并发症^[4]。目前, 脊髓损伤患者的治疗方法有限, 主要集中在症状管理和预防二次并发症, 然而其治疗成本较高、治愈率低。因此, 脊髓损伤的预防和治疗是一个具有挑战性的全球性医学和社会问题。

铁死亡是一种调节性细胞死亡 (regulated cell death, RCD) 模式, 在形态、生物化学和遗传学上有别于其他形式的细胞死亡, 具有铁过载、线粒体功能障碍及脂质过氧化的显著特征^[5]。研究表明, 铁死亡在脊髓损伤中起到关键作用, 受损部位会出现铁过量积累和脂质过氧化现象, 进而加剧神经细胞损伤和神经功能障碍, 并且铁死亡在脊髓损伤的急性期和慢性期均可见, 与炎症反应和氧化应激密切相关^[6]。

在中医学中, 脊髓损伤属于“痿证”“体惰”范畴, 病因多为因久卧伤气, 致使气虚无力推动血行, 进而筋骨痿软, 故在临床治疗中强调益气活血为主^[7]。黄芪有“补药之长”之称, 具有补气升阳、托毒生肌、消肿活血等功效^[8]。黄芪甲苷作为黄芪的主要活性成分, 具有抗氧化、抗细胞凋亡与抗炎等特性, 能够有效减轻神经损伤^[9-10]。外泌体是一类由细胞分泌的外囊泡, 能够携带蛋白质、脂质、RNA 等多种生物活性分子, 能够通过与靶细胞的融合或内吞作用传递信息进而影响靶细胞的功能。近年来研究发现, 骨髓间充质干细胞外泌体 (bone marrow mesenchymal stem cell exosomes, BMSCs-Exos) 在治疗脊髓损伤方面, 具有显著的效果^[11], 并且 BMSCs-Exos 可以通过抗氧化应激、调节铁稳态等多种机制调节铁死亡, 从而保护细胞和促进组织修复^[12]。

PC12 细胞是一种源自大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤的细胞系, 尽管其并非脊髓神经元, 但在神经生物学研究中广泛应用, 尤其在体外实验中常使用 H_2O_2 处理 PC12 细胞来模拟氧化应激引发的神经细胞损伤模型^[13]。虽然 H_2O_2 诱导的氧化应激并不具备脊髓损伤的特异性, 但它能够有效地模拟脊髓损伤中的氧化应激和铁死亡过程。因此, 本研究旨在通过使用 PC12 细胞模型, 探讨黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 在抑制铁死亡和减轻氧化应激损伤方面的协同作用。本研究为脊髓损伤的治疗提供了新的思路, 也为包括脊髓损伤在内的其他神经损伤和疾病的治疗开辟新的途径。

1 材料

1.1 细胞株与动物

大鼠 PC12 细胞 (批号 20230203) 由上海赛佰慷生物科技有限公司提供。

SPF 级 SD 大鼠 8 只, 4 周龄, 雌雄各半, 体重 (100±10) g, 用于提取 BMSCs。动物购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SYXK (湘) 2021-0074, 饲养于湖南中医药大学动物实验中心, 本实验研究符合湖南中医药大学实验动物伦理委员会规定 (伦理号 ZYFY20221111-44)。

1.2 药品与试剂

磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS, 批号 WHB823U281) 购自武汉普诺赛公司; 4%组织细胞固定液 (paraformaldehyde, PFA, 批号 14F20230219)、青霉素/链霉素 (批号 09C230219)、DMEM 培养基 (批号 01A230516)、多聚甲醛-戊二醛混合固定液 (批号 15C20220621)、茜素红染色液 (批号 O7R20230101)、阿利新蓝染色液 (批号 06W20230209)、成脂油红 O 染色液 (批号 15B20230524)、GPX4 抗体 (批号 12F20221205)、FTH1 抗体 (批号 1DW20230125)、FPN 抗体 (批号 8GR20220430)、GAPDH 抗体 (批号

05KT20220901)、HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(批号 O1W0221107)、HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号 05C20221211)均购自长沙 Abiowell 生物科技有限公司;胎牛血清(批号 23EG100816)购自香港 Evacell 公司;TRIzol 试剂(批号 03877)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;环氧树脂(批号 T24459)购自上海源叶生物科技有限公司。RT-qPCR 逆转录试剂盒(批号 601924117020)、2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA, 批号 080823240313)、线粒体膜电位检测试剂盒 JC-1(批号 092723240116)均购自上海碧云天生物技术有限公司。黄芪甲苷(质量分数 $\geq 98.0\%$, 批号 9VX21580001)、脂质染料 PKH26(lipophilic dye PKH26, PKH26)试剂盒(批号 410E513876)、3%磷酸钨酸钠(批号 88GD0362247)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI, 批号 0631GFX0518)均购自美国 Sigma 公司。Fer-1(批号 A437141337769)购自上海 MedChemExpress 公司。MDA 含量检测试剂盒(批号 WE08J9R23719)、GSH 检测试剂盒(批号 WE1125K1505)、 Fe^{2+} 检测试剂盒(批号 WE23RT015618)和 GPX4 检测试剂盒(批号 WE23RS02UL24)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)酶联免疫吸附测定试剂盒(批号 WE315U51478)、IL-6 酶联免疫吸附测定试剂盒(批号 WE0045RF1378)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)酶联免疫吸附测定试剂盒(批号 WE14VB772105)均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;分化簇 9 抗原(cluster of differentiation 9, CD9)抗体(批号 GR3356785-3)、CD29 抗体(批号 GR3356854-2)、CD90 抗体(批号 GR3356796-2)、CD44 抗体(批号 GR3356552-1)、CD34 抗体(批号 GR3356782-4)、CD45(批号 GR3356788-2)、CD63 抗体(批号 GR3356331-2)、肿瘤易感基因 101(tumor susceptibility gene 101, TSG101)抗体(批号 GR4322566-2)、钙连蛋白(calnexin)抗体(批号 GR5567855-3)均购自英国 Abcam 公司;acodylate 缓冲液(批号 0215001158)购自美国 Poly Scientific R&D 公司。

1.3 仪器

XE-100 型超高速离心机(美国 Beckman 公司);FACSymphony™ 型流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司);Nanosight LM10 型系统(美国 Nanosight Ltd 公司);H7650 型透射电镜(日本日立

公司);Olympus FV3000 型共聚焦显微镜(日本奥林巴斯公司);FLX800 型多功能荧光成像仪(美国 BioTek 公司);1681130B 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 BMSCs 的分离、培养及鉴定

采用文献方法^[14]获取原代大鼠 BMSCs,将大鼠脱颈处死后,放入 75%乙醇中浸泡 10 min,将大鼠置于超净工作台上,使用生理盐水在无菌的条件下冲洗股骨和胫骨髓腔,收集骨髓细胞悬液并对悬液进行充分吹打,稀释至 40 mL 的培养基中,然后将骨髓细胞悬液接种到 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素)的培养瓶中,在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,3 d 后换液,第 3 代细胞用于实验。采用流式细胞术检测 BMSCs 表面阳性标志物 CD29、CD90、CD44 和阴性标志物 CD45、CD34。于电子显微镜下观察 BMSCs,进行形态学鉴定;采用茜素红染色、油红 O 染色和阿利新蓝染色评价成骨、成脂和软骨分化能力,用于 BMSCs 鉴定。

2.2 BMSCs-Exos 的分离及鉴定

根据文献方法^[15],首先收集细胞培养上清液,进行低速离心去除死细胞和较大的细胞碎片,经 0.22 μm 滤膜去除更小的细胞碎片。然后将滤过后的上清液 4 ℃、110 000 $\times g$ 超速离心 75 min,小心弃去上清液,保留沉淀物。将沉淀物用 PBS 重悬,再次 4 ℃、110 000 $\times g$ 超速离心 75 min,弃去上清液,将沉淀物(即外泌体)重悬于适量的 PBS 中,于 -80 ℃ 保存备用。采用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察外泌体的形态;采用纳米颗粒追踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)检测外泌体的粒径分布和浓度;Western blotting 检测外泌体标志蛋白 CD63、CD9 和 TSG101 以及 calnexin 的表达,旨在确认外泌体的存在、评估其纯度。

2.3 PC12 细胞对外泌体的摄取检测

根据 PKH26 试剂盒说明书进行外泌体细胞摄取实验。使用无血清培养基将外泌体重悬,并用 PKH26 染料在室温下孵育 5 min,加入等体积的 PBS 终止反应。4 ℃、110 000 $\times g$ 超速离心 60 min 去除未结合的染料,并将清洗后的外泌体重悬于 PBS 中。将 PC12 细胞培养至生长密度 70%~80%,用无血清培养基清洗 2 次后,将 PKH26 标记的外泌体

加入细胞培养基中培养 24 h^[16], 细胞用 4% 的 PFA 固定 30 min 后, 使用 DAPI 染色固定 10 min, 采用共聚焦显微镜观察外泌体在细胞中的分布和摄取情况。

2.4 细胞分组及给药

根据文献方法构建 PC12 细胞模拟体内脊髓损伤模型^[17-18], 将 H₂O₂ (200 μmol/L) 添加至 DMEM 培养基中, 处理 PC12 细胞 24 h。使用铁死亡抑制剂 Fer-1 (1 μmol/L) 处理 24 h 用于构建阳性对照组^[19]。根据本课题组前期实验及文献方法^[20-21], 将细胞分为对照组、模型组、Fer-1 (1 μmol/L) 组、黄芪甲苷 (0.1 μmol/L) 组、BMSCs-Exos (100 μg/mL) 组、黄芪甲苷 (0.1 μmol/L) + BMSCs-Exos (100 μg/mL) 组。各给药组细胞给予相应药物干预 24 h, 对照组、模型组细胞给予正常培养基。

2.5 ELISA 法检测细胞炎症因子水平

收集各组细胞上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 检测 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 等炎症因子水平。

2.6 流式细胞术及相关生物标志物检测细胞内 ROS 和氧化应激水平

取对数生长期的 PC12 细胞, 细胞分组同“2.4”项, 各组细胞分别进行药物干预处理后, 使用无血清培养基清洗细胞 2 次, 将 DCFH-DA (50 μmol/L) 加入细胞中, 37 °C 孵育 20 min, 孵育期间, 每 5 min 轻摇培养皿 1 次, 以确保染料均匀分布和充分渗透。孵育结束后, 使用 PBS 清洗细胞 3 次, 去除未结合的染料, 通过流式细胞仪检测细胞荧光强度。为进一步评估细胞内的氧化应激水平和铁死亡程度, 根据各试剂盒说明书检测 MDA、GSH、Fe²⁺ 及 GPX4 水平。

2.7 JC-1 检测线粒体膜电位

采用 JC-1 检测线粒体膜电位以评估线粒体功能和细胞凋亡情况。根据试剂盒说明书进行操作。PC12 细胞密度达到 70%~80% 时, 收集细胞并加入 JC-1 染色工作液, 轻柔吹打数次后, 于细胞培养箱中培养 20 min 后, 4 °C 离心, 弃上清, 加入 1 mL JC-1 染色缓冲液重悬细胞, 再次 4 °C 离心, 弃上清。重复上一步骤后, 用 200 μL 的 JC-1 染色缓冲液重悬细胞, 30 min 内检测样本荧光强度。

2.8 透射电子显微镜观察线粒体形态

将 PC12 细胞在含有 2.5% 戊二醛和 2% 多聚甲醛的 0.1 mol/L cacodylate 缓冲液中固定 1~2 h, 随后用 0.1 mol/L cacodylate 缓冲液多次清洗细胞, 再

将细胞固定于 1% 锇酸中 1 h。分别采用 30%、50%、70%、90%、100% 乙醇溶液脱水 10 min。用 Epon 812 环氧树脂对细胞进行预包埋, 切片后用 2% 的醋酸铀和 0.2% 的柠檬酸铅染色, 于透射电子显微镜下观察线粒体形态。

2.9 RT-qPCR 检测相关基因表达

参照 RNA 提取试剂盒说明书提取各组细胞总 RNA, 进行 PCR 扩增定量, 以 GAPDH 为内参, 采用 2^{-ΔΔCt} 法比较分析各基因表达。基因引物根据在 NCBI 上搜索目的基因的序列, 运用 Primer 5 软件设计引物, 由上海生工生物工程股份有限公司合成引物, 具体引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
GPX4	F: AATTCGCAGCCAAGGACATCG R: ATTCGTAAACCACACTCGGCGTA
FTH1	F: ATCAACCGCCAGATCAACCT R: TCTCCAGTCATCACGGTCA
FPN	F: GCTTTGCTGTTCTTTGCCTTAGT R: GTGTGAGGAACCGGAGATAGC
GAPDH	F: ACAGCAACAGGGTGGTGGAC R: TTTGAGGGTGCAGCGAACTT

2.10 Western blotting 检测铁死亡相关蛋白表达

采用 RIPA 裂解液在冰上裂解细胞, 提取各组细胞总蛋白, 采用 BCA 检测试剂盒检测蛋白浓度, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 采用 5% 的脱脂牛奶进行封闭, 一抗 4 °C 孵育过夜, PBST 洗涤 3 次。在室温下二抗孵育 1.5 h, PBST 洗涤 3 次, 采用 ECL 显色曝光, 利用 Image-J 软件定量分析。

2.11 统计学分析

采用 GraphPad 8.0 软件进行统计学分析, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 Tukey's 检验。

3 结果

3.1 BMSCs 的鉴定

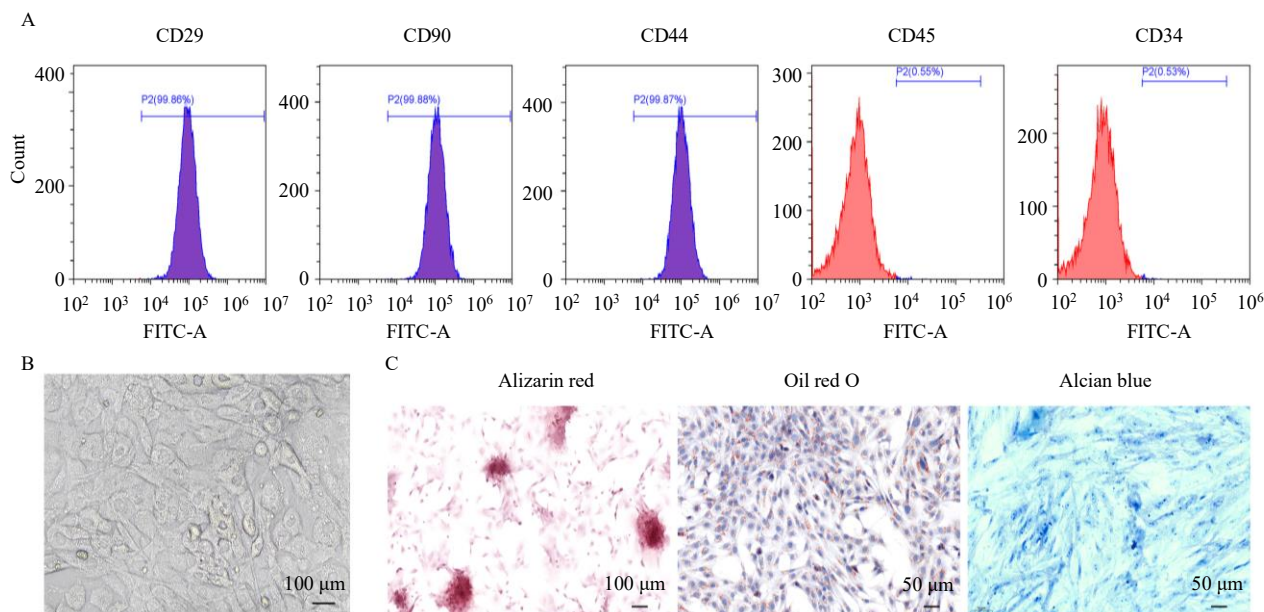
流式细胞术检测 BMSCs 表面标记物结果显示, CD29、CD90、CD44 呈阳性高表达, 而 CD45、CD34 不表达 (图 1-A); 通过电子显微镜下观察, 镜下细胞展现了 BMSCs 的典型特征, 呈纺锤形和星形细胞形态、以单层排列贴壁生长, 具有结构清晰的细胞质和细胞核 (图 1-B); BMSCs 在成骨、成脂和成软骨诱导培养基中培养后, 茜素红染色、油红 O 染

色和阿利新蓝染色结果均呈阳性（图 1-C）。

3.2 BMSCs-Exos 鉴定

BMSCs-Exos 具备典型的外泌体形态和结构特征，形态呈现圆形或椭圆形，表面光滑，边界清晰（图 2-A）；NTA 粒径分析结果显示，BMSCs-Exos 主要集中在 92 nm 处，符合典型外泌体的粒径范围^[13]。次要峰值在 127 nm 和 162 nm 处，表

明样品中存在一些大小略有差异的外泌体群体，而 253 nm 和 335 nm 可能为外泌体聚集或微泡（图 2-B）；Western blotting 检测结果表明，与 BMSCs 组比较，BMSCs-Exos 中 CD9、CD63、TSG101 均显著呈现高表达，但不表达 Calnexin（图 2-C）。以上数据表明提取的 BMSCs-Exos 具有较高的纯度和一致性。

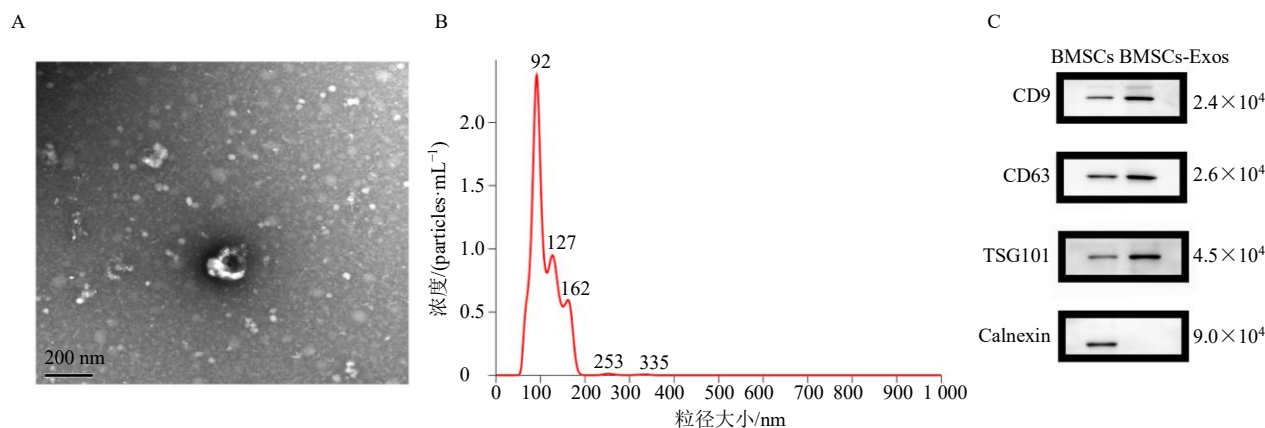


A-流式细胞术鉴定 BMSCs 表面抗原标志物的表达情况；B-BMSCs 在电子显微镜下形态；C-BMSCs 分化的鉴定。

A-flow cytometry identification of surface antigen markers on BMSCs; B-morphology of BMSCs under an electron microscope; C-identification of differentiation of BMSCs.

图 1 BMSCs 鉴定结果

Fig. 1 Identification results of BMSCs



A-TEM 观察 BMSCs-Exos 形态；B-NTA 粒径检测 BMSCs-Exos 粒径大小；C-Western blotting 检测 CD9、CD63、TSG101 以及 Calnexin 的表达。

A-TEM observation of morphology of BMSCs-Exos; B-NTA particle size analysis of BMSCs-Exos; C-Western blotting analysis of CD9, CD63, TSG101, and Calnexin expression.

图 2 BMSCs-Exos 鉴定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Identification results of BMSCs-Exos ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 PC12 细胞对外泌体的摄取

通过检测 PC12 细胞对 PKH26 标记定位的 BMSCs-Exos 摄取情况发现, BMSCs-Exos 组的红色荧光信号强烈且分布于细胞内, 而 PBS 组未观察到红色荧光信号 (图 3)。

3.4 黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 对炎症因子水平影响

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达显著增加 ($P<0.05$); 与模型组比较, 使用 BMSCs-Exos、黄芪甲苷或 Fer-1 处理细胞后, 各组细胞炎症因子的表达显著降低 ($P<0.05$)。与单独使用 BMSCs-Exos、黄芪甲苷或 Fer-1 比较, 黄

芪甲苷与 BMSCs-Exos 联合处理细胞后, 细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达显著下调 ($P<0.05$)。

3.5 黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 对脊髓损伤细胞模型 PC12 细胞 ROS 水平表达情况

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组细胞中 ROS 表达水平显著增加 ($P<0.05$); 与模型组比较, BMSCs-Exos、黄芪甲苷与 Fer-1 单独处理均显著降低细胞中 ROS 表达 ($P<0.05$), 说明其具有显著的抗氧化作用; 与单独使用 BMSCs-Exos、黄芪甲苷或 Fer-1 比较, 黄芪甲苷与 BMSCs-Exos 联合处理降低了细胞内 ROS 表达 ($P<0.05$), 表明联合使用时效果最佳。

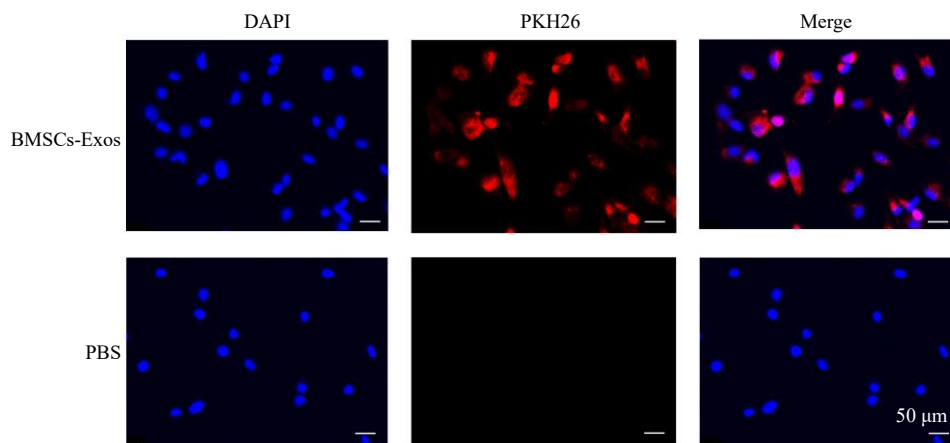


图 3 荧光显微镜 PC12 细胞对外泌体的摄取

Fig. 3 Fluorescence microscopy showing uptake of exosomes by PC12 cells

表 2 各组细胞培养上清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Expression of IL-1 β 、IL-6 and TNF- α in cell culture supernatant of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	75.12 $\pm$ 10.45	132.30 $\pm$ 16.25	101.56 $\pm$ 11.34
模型	—	245.34 $\pm$ 14.57*	715.45 $\pm$ 38.57*	370.45 $\pm$ 19.76*
Fer-1	1.0 μ mol·L ⁻¹	140.23 $\pm$ 12.67 [#]	455.23 $\pm$ 28.45 [#]	205.67 $\pm$ 13.89 [#]
黄芪甲苷	0.1 μ mol·L ⁻¹	150.45 $\pm$ 13.78 [#]	470.34 $\pm$ 29.34 [#]	210.56 $\pm$ 14.23 [#]
BMSCs-Exos	100 μ g·mL ⁻¹	142.34 $\pm$ 12.56 [#]	460.78 $\pm$ 28.12 [#]	208.34 $\pm$ 13.67 [#]
黄芪甲苷+BMSCs-Exos	0.1 μ mol·L ⁻¹ +100 μ g·mL ⁻¹	110.56 $\pm$ 11.23 ^{#$\Delta$$\Delta$$\Delta$}	230.45 $\pm$ 19.78 ^{#$\Delta$$\Delta$$\Delta$}	160.34 $\pm$ 12.56 ^{#$\Delta$$\Delta$$\Delta$}

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与 BMSCs-Exos 组比较: ^{Δ} $P<0.05$; 与黄芪甲苷组比较: ^{Δ} $P<0.05$; 与 Fer-1 组比较: ^{Δ} $P<0.05$, 下同。

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; ^{Δ} $P<0.05$ vs BMSCs-Exos group; ^{Δ} $P<0.05$ vs astragaloside IV group; ^{Δ} $P<0.05$ vs Fer-1 group, same as below.

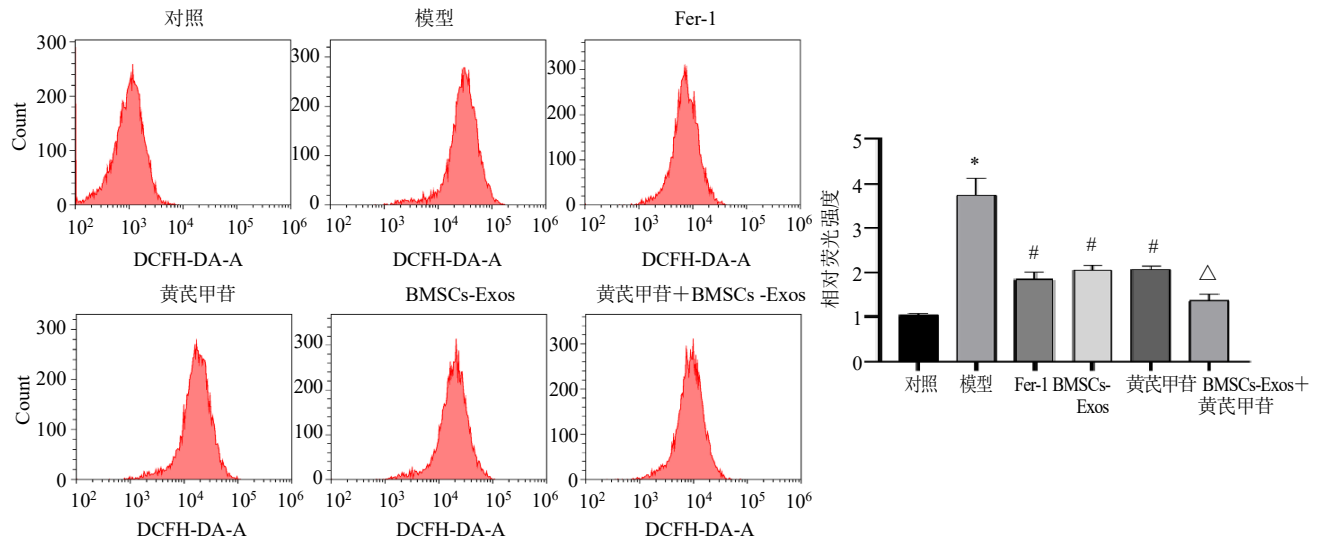
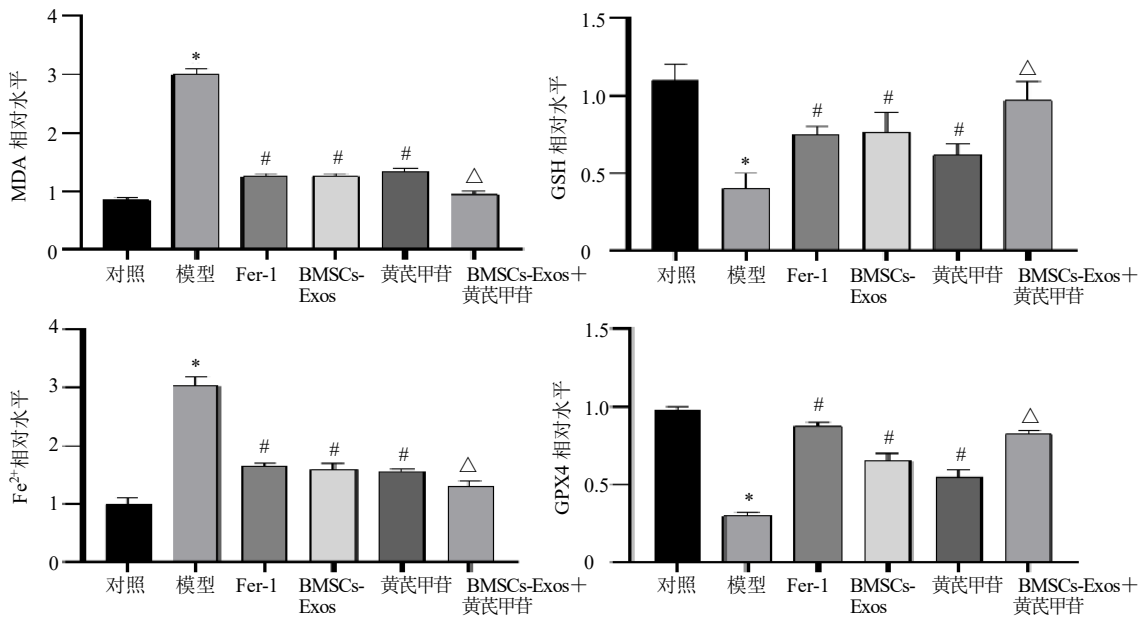
3.6 黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 对脊髓损伤细胞模型氧化应激的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 细胞经过 H₂O₂ 处理后, MDA 和 Fe²⁺水平显著增加 ($P<0.05$), 而 GSH 和 GPX4 水平显著降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, BMSCs-Exos 或黄芪甲苷显示了类似的效果, 抑制了 H₂O₂ 引起的 MDA 和 Fe²⁺水平升高, 恢复了 GSH 和

GPX4 水平, 其效果与 Fer-1 处理相似 ($P<0.05$); 与单独使用 BMSCs-Exos、黄芪甲苷或 Fer-1 比较, 黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 表现出显著的效果 ($P<0.05$)。

3.7 黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 对脊髓损伤细胞模型线粒体膜电位与线粒体形态影响

如图 6 所示, 对照组细胞发出红色荧光, 而在线粒体膜电位降低时细胞则会发出绿色荧光。与对照组

图 4 流式细胞术检测各组 ROS 水平表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Flow cytometry analysis of ROS levels in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 5 试剂盒检测 MDA、GSH、Fe²⁺、GPX4 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 5 Kit-based detection of MDA, GSH, Fe²⁺, and GPX4 levels ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

比较, 模型组细胞呈现出绿色荧光, 表明明显降低了线粒体膜电位, 提示线粒体功能受损, 细胞凋亡增加; 与模型组比较, 黄芪甲苷、BMSCs-Exos 以及 Fer-1 单独处理后, 减轻了 H₂O₂ 引起的线粒体损伤和细胞凋亡 ($P < 0.05$); 黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 处理组细胞显示出显著的红色荧光, 线粒体膜电位恢复较好, 表明联合处理组在减轻 H₂O₂ 引起的线粒体损伤和细胞凋亡方面具有更加显著的效果 ($P < 0.05$)。

如图 7 所示, H₂O₂ 处理组出现线粒体皱缩、

线粒体膜增厚以及线粒体嵴结构模糊或断裂等铁死亡特征的改变; BMSCs-Exos 或黄芪甲苷单独处理与 Fer-1 处理结果相似, 线粒体形态明显改善, 线粒体肿胀减少, 线粒体嵴结构较为清晰完整, 表明在一定程度上减轻了 H₂O₂ 引起的线粒体损伤; 比较, 模型组细胞呈现出绿色荧光, 表明明显降低了线粒体膜电位, 提示线粒体功能受损, 细胞凋亡增加; 与模型组比较, 黄芪甲苷、BMSCs-Exos 以及 Fer-1 单独处理后, 减轻了 H₂O₂ 引起的线粒体损伤和

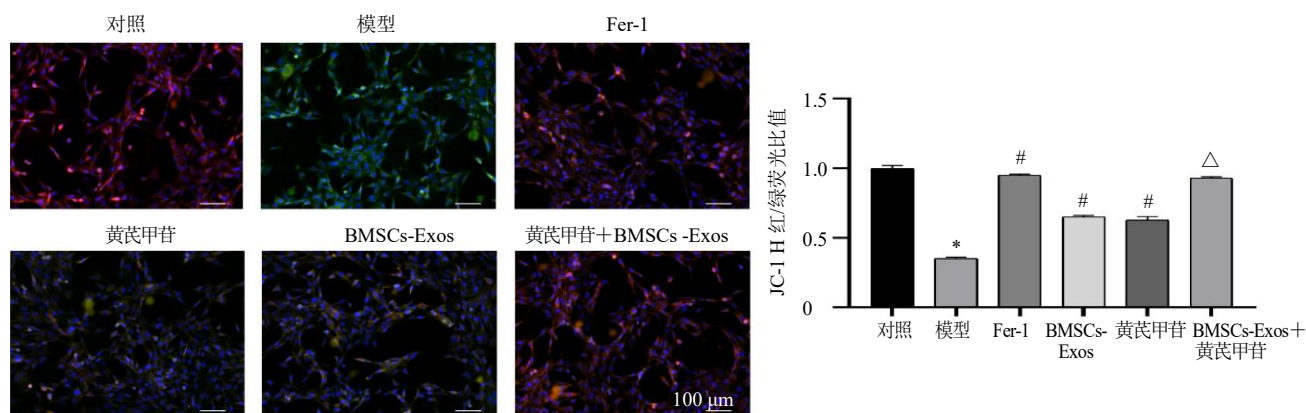
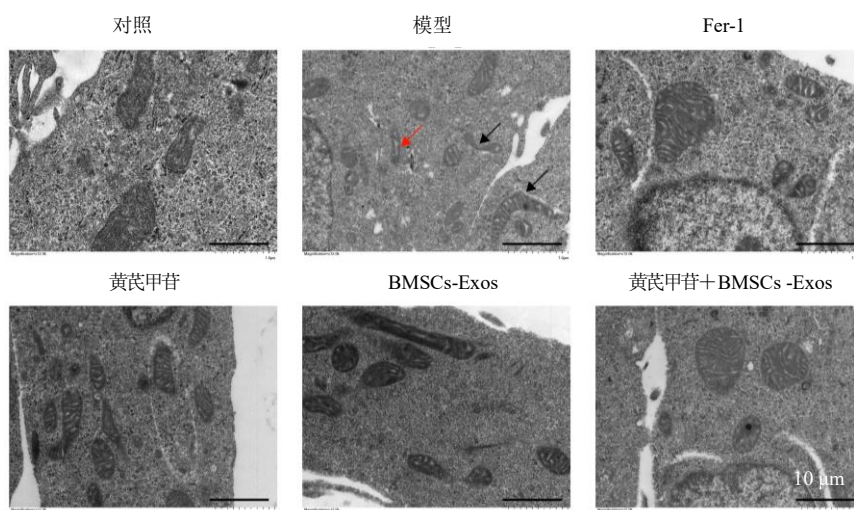


图 6 JC-1 荧光染色检测线粒体膜电位 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 JC-1 fluorescence staining to detect mitochondrial membrane potential ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



黑色箭头表示线粒体皱缩, 红色箭头表示线粒体膜增厚以及线粒体嵴结构模糊或断裂。

Black arrows indicate mitochondrial cristae shrinkage, while red arrows indicate mitochondrial membrane thickening and the blurring or disruption of mitochondrial cristae structures.

图 7 透射电镜观察线粒体形态变化 (×12 000)

Fig. 7 TEM observation of mitochondrial morphology changes (× 12 000)

细胞凋亡 ($P < 0.05$); 黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 处理组细胞显示出显著的红色荧光, 线粒体膜电位恢复较好, 表明联合处理组在减轻 H_2O_2 引起的线粒体损伤和细胞凋亡方面具有更加显著的效果 ($P < 0.05$)。

如图 7 所示, H_2O_2 处理组出现线粒体皱缩、线粒体膜增厚以及线粒体嵴结构模糊或断裂等铁死亡特征的改变; BMSCs-Exos 或黄芪甲苷单独处理与 Fer-1 处理结果相似, 线粒体形态明显改善, 线粒体肿胀减少, 线粒体嵴结构较为清晰完整, 表明在一定程度上减轻了 H_2O_2 引起的线粒体损伤; 黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 处理组线粒体形态恢复效果最明显, 线粒体嵴结构清晰、肿胀最

少及线粒体膜完整。

3.8 黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 对脊髓损伤细胞模型 PC12 细胞 GPX4、FTH1 和 FPN 表达水平影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 *GPX4*、*FTH1* 和 *FPN* 的 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$), 与模型组比较, Fer-1、黄芪甲苷和 BMSCs-Exos 单独处理均能显著上调 *GPX4*、*FTH1* 和 *FPN* 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 组与 BMSCs-Exos 组相比, 对 *GPX4*、*FTH1* 和 *FPN* 的 mRNA 表达进一步上调 ($P < 0.05$)。

如图 9 所示, Western blotting 检测铁死亡相关蛋白 GPX4、FTH1 和 FPN 的表达结果表明,

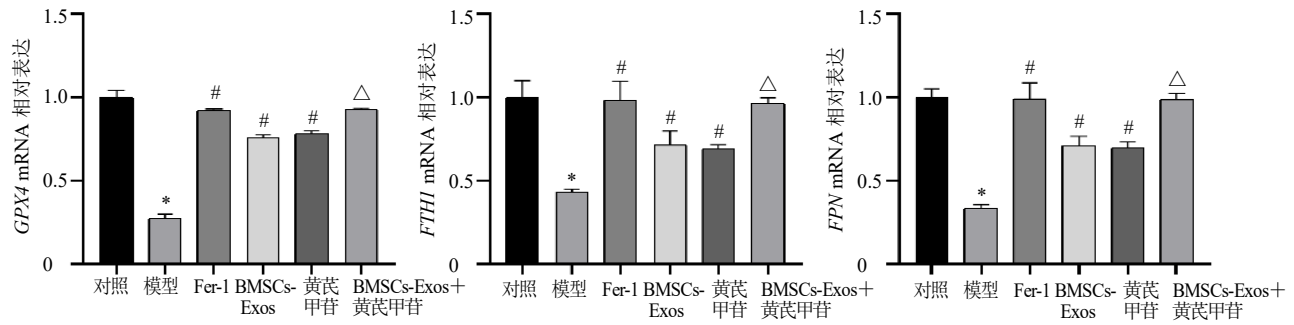


图 8 qRT-PCR 检测 GPX4、FTH1 和 FPN mRNA 的表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Expression levels of GPX4, FTH1 and FPN mRNA detected by qRT-PCR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

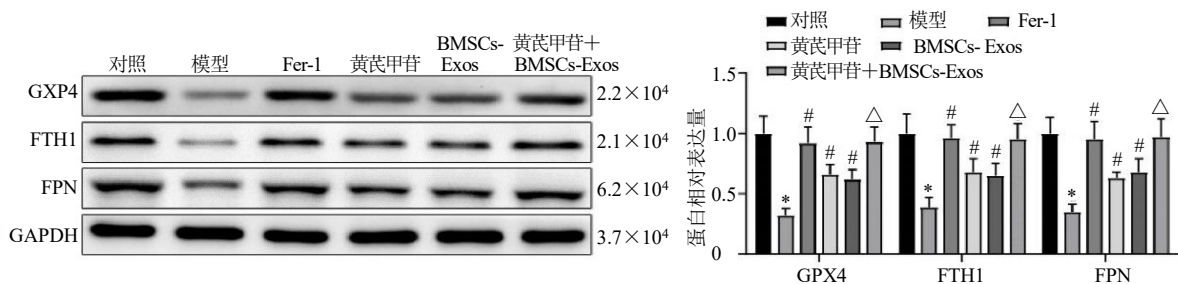


图 9 Western blotting 检测铁死亡相关蛋白 GPX4、FTH1 和 FPN 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Western blotting analysis of ferroptosis-related proteins GPX4, FTH1, and FPN expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

H₂O₂ 引起 PC12 细胞中 GPX4、FTH1 和 FPN 的表达降低, 而 Fer-1、黄芪甲苷和 BMSCs-Exos 单独处理或联合处理均能显著恢复这些蛋白的表达, 且联合处理效果最佳 ($P < 0.05$)。以上结果表明, 黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 处理在 H₂O₂ 引起的 PC12 细胞铁死亡中具有显著的保护作用, 通过减少 ROS 水平、恢复线粒体膜电位、改善线粒体形态以及恢复铁死亡相关蛋白的表达, 显著抑制了铁死亡过程。

4 讨论

脊髓损伤可分为原发性和继发性损伤, 其中原发性损伤多由物理损伤导致的骨折或脱位, 造成受伤局部血肿、缺血、电解质紊乱或血-脊髓屏障 (blood-spinal cord barrier, BSCB) 被破坏, 这些变化引发 ROS 的产生和释放, 造成局部组织氧化损伤以及神经元和神经细胞凋亡和坏死, 从而推动继发性损伤发生^[22]。脊髓的正常功能依赖于多种细胞类型的协同作用, 其中神经元是脊髓功能实现的重要载体, 神经元细胞的功能损伤和形变破裂会导致患者运动、感觉及自主神经功能障碍^[23]。研究发现, 脊髓损伤的发生发展与神经元细胞铁死亡密切相关^[24]。

脊髓损伤发生后, 机体会出现多种与铁死亡相关的变化, 如铁代谢障碍、磷脂过氧化增加和 GSH 合成中断。因此, 在脊髓损伤治疗中, 调控这些铁死亡相关过程至关重要。

近年来, 越来越多的研究发现, 间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 来源的外泌体对脊髓损伤神经元铁死亡的调控具有巨大潜力^[25]。与其他来源外泌体相比, MSCs 源性外泌体 (mesenchymal stem cell exosomes, MSCs-Exos) 具有独特优势。MSCs-Exos 能够穿过 BSCB 抵达脊髓损伤部位, 抑制炎症反应、改善 BSCB 和细胞抗氧化能力、参与调控铁代谢及抑制瘢痕形成和促进轴突再生, 具有较高的脊髓损伤修复能力。中医将治疗脊髓损伤的核心理论归结为扶正祛邪, 补益气血, 通利脉络的原则^[26]。黄芪甲苷作为黄芪的主要活性成分, 具有抗炎、抗氧化损伤、抗纤维化及调节能量代谢等药理功效^[27], 能够通过调理气血、改善微循环、扶正祛邪等途径促进脊髓损伤的康复。并且, 黄芪甲苷可通过调控细胞凋亡、焦亡以及坏死等多种 RCD 方式, 发挥保护脊髓神经、减轻继发性病理损伤和促进功能恢复的作用^[28-29]。

本研究聚焦于脊髓损伤过程中脊髓神经细胞继发性损伤的主要机制,即由脊髓损伤后局部组织氧化损伤产生引起的神经元细胞铁死亡,揭示了黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 对脊髓损伤后继发性损伤中细胞铁死亡的影响。结果证实, BMSCs 来源丰富易获取, BMSCs-Exos 可以被 PC12 细胞摄取,可以作为干细胞外泌体治疗脊髓损伤的理想细胞; H_2O_2 成功诱导 PC12 细胞,建立了氧化应激损伤模型,显著增加了 ROS 的表达水平,促进了炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的释放,而黄芪甲苷或 BMSCs-Exos 单独处理后能够明显降低 ROS 的表达、降低 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 炎症因子的释放,表明黄芪甲苷和 BMSCs-Exos 均能起到抵抗氧化应激损伤,发挥抗炎的作用,其中黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 使用效果更佳。线粒体的形态及膜电位变化可以有效地作为细胞存活状态的评估指标,当细胞发生铁死亡时,线粒体在形态上相较于正常细胞线粒体体积显著缩小、嵴结构减少、膜密度增加,甚至可能出现外膜破裂现象,与此同时线粒体膜电位显著下降,这通常与 ROS 的过度生成和脂质过氧化有关^[25]。本研究发现,细胞经 H_2O_2 处理后出现线粒体皱缩、线粒体膜增厚以及线粒体嵴结构模糊或断裂等铁死亡特征的改变,并且明显降低了线粒体膜电位,经过黄芪甲苷或 BMSCs-Exos 单独处理后,线粒体形态得到明显改善,线粒体膜电位增加,而联合处理组效果更加明显,表明黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 处理能够有效保护线粒体功能,减轻氧化应激和铁死亡对细胞的损伤。铁死亡的发生从本质上是由氧化系统(如 Fe^{2+} 和 ROS)与抗氧化系统(如 GPX4 和 GSH)之间的平衡决定的,在正常生理条件下,这两种系统在细胞内保持动态平衡,从而维持正常的细胞功能。并且, FTH1 和 FPN 在细胞铁死亡中起到关键的调节作用, FTH1 通过储存铁离子来减少游离铁的毒性,而 FPN 则通过将铁离子排出细胞来维持铁稳态^[30-31]。MDA 是脂质过氧化的产物,其水平升高是铁死亡的标志,反映了细胞内脂质过氧化程度和氧化应激状态的严重性^[31]。本次研究表明,细胞经过 H_2O_2 处理,降低了 GSH、GPX4 和 FTH1 表达,增加了 MDA、 Fe^{2+} 和 FPN 的表达,黄芪甲苷或 BMSCs-Exos 单独处理后有效抑制了这些变化,而黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 处理后进一步有效地恢复抗氧化系统的功能,降低脂质过氧化产物的水平,减少 Fe^{2+} 的积累,从而抑制细胞铁死亡过程。

综上,本研究阐明了黄芪甲苷联合 BMSCs-Exos 能够有效改善氧化应激引起的细胞线粒体损伤,显著抑制细胞铁死亡,并且可能对其他涉及氧化应激和铁死亡机制的神经疾病和损伤中发挥神经保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Xia Y L, Zhu J S, Yang R H, *et al.* Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injury: Mechanisms, current advances and future challenges [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1141601.
- [2] Chuang C H, Chen C H, Bai C H, *et al.* Risk factors associated with newly psychiatric disorder in spinal cord injury: A retrospective cohort study [J]. *J Clin Nurs*, 2018, 27(5/6): e1038-e1047.
- [3] Ge L, Arul K, Mesfin A. Spinal cord injury from spinal tumors: Prevalence, management, and outcomes [J]. *World Neurosurg*, 2019, 122: e1551-e1556.
- [4] Widerström-Noga E. Neuropathic pain and spinal cord injury: Management, phenotypes, and biomarkers [J]. *Drugs*, 2023, 83(11): 1001-1025.
- [5] Li J, Cao F, Yin H L, *et al.* Ferroptosis: Past, present and future [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 88.
- [6] Xie Y, Hou W, Song X, *et al.* Ferroptosis: Process and function [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(3): 369-379.
- [7] 漆国栋, 漆伟, 刘才英, 等. 基于网络药理学和分子对接技术研究黄芪-川芎治疗脊髓损伤的作用机制 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2022, 22(7): 805-810.
- [8] 张杰昌, 安彩莲, 范永建, 等. 黄芪治疗脊髓损伤的机制研究进展 [J]. *老年医学与保健*, 2023, 29(4): 865-869.
- [9] 张艳丽, 万凤, 田沫, 等. 黄芪甲苷上调 HIF-1 α 表达促进氧糖剥夺/再灌注胚鼠海马神经干细胞增殖和分化的作用 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(7): 3358-3362.
- [10] Li L, Gan H Y, Jin H Q, *et al.* Astragaloside IV promotes microglia/macrophages M2 polarization and enhances neurogenesis and angiogenesis through PPAR γ pathway after cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 92: 107335.
- [11] Sun Y, Liu Q B, Qin Y M, *et al.* Exosomes derived from CD271⁺ CD56⁺ bone marrow mesenchymal stem cell subpopulation identified by single-cell RNA sequencing promote axon regeneration after spinal cord injury [J]. *Theranostics*, 2024, 14(2): 510-527.
- [12] Chen W K, Li Z G, Yu N C, *et al.* Bone-targeting exosome nanoparticles activate Keap1/Nrf2/GPX4 signaling pathway to induce ferroptosis in osteosarcoma cells [J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 355.

- [13] 谷成旭, 张乃丽, 孟永春, 等. 脂肪间充质干细胞外泌体可减轻过氧化氢诱导 PC12 细胞的凋亡 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(19): 2988-2995.
- [14] Li X Y, Zhang Y, Qi G X. Evaluation of isolation methods and culture conditions for rat bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Cytotechnology*, 2013, 65(3): 323-334.
- [15] 孙逸梅, 毛诗慧, 李琳, 等. 骨髓间充质干细胞源性外泌体促进小胶质细胞/巨噬细胞 M2 极化抑制急性期脑缺血大鼠炎症反应 [J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(5): 599-606.
- [16] Rai A, Fang H Y, Fatmou M, *et al.* A protocol for isolation, purification, characterization, and functional dissection of exosomes [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2261: 105-149.
- [17] Ma Z J, Lu Y B, Yang F G, *et al.* Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect on spinal cord injury by suppressing oxidative stress and inflammation via modulating the Nrf2/HO-1 and TLR4/NF- κ B pathways [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 397: 115014.
- [18] He X, Zhang J N, Guo Y S, *et al.* LncRNA MIAT promotes spinal cord injury recovery in rats by regulating RBFOX2-mediated alternative splicing of MCL-1 [J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(8): 4854-4868.
- [19] Wu C H, Zhao W W, Yu J, *et al.* Induction of ferroptosis and mitochondrial dysfunction by oxidative stress in PC12 cells [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 574.
- [20] Liu X L, Zhang M M, Liu H N, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate cerebral ischemia-reperfusion injury-induced neuroinflammation and pyroptosis by modulating microglia M1/M2 phenotypes [J]. *Exp Neurol*, 2021, 341: 113700.
- [21] Zhou Y F, Li L, Mao C H, *et al.* Astragaloside IV ameliorates spinal cord injury through controlling ferroptosis in H₂O₂-damaged PC12 cells *in vitro* [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(21): 1176.
- [22] Quadri S A, Farooqui M, Ikram A, *et al.* Recent update on basic mechanisms of spinal cord injury [J]. *Neurosurg Rev*, 2020, 43(2): 425-441.
- [23] O'Shea T M, Burda J E, Sofroniew M V. Cell biology of spinal cord injury and repair [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(9): 3259-3270.
- [24] Chen Y X, Liu S X, Li J J, *et al.* The latest view on the mechanism of ferroptosis and its research progress in spinal cord injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 6375938.
- [25] 刘宇, 刘新晖, 殷建. 间充质干细胞来源的外泌体对脊髓损伤中神经元铁死亡调控的研究进展 [J]. 生物骨科材料与临床研究, 2024, 21(3): 64-68.
- [26] 魏延冕, 周玫彤. 脊髓损伤的中医现代化治疗研究进展 [J]. 中国当代医药, 2024, 31(13): 175-179.
- [27] Wang F G, Zhao Y, Chen S X, *et al.* Astragaloside IV alleviates ammonia-induced apoptosis and oxidative stress in bovine mammary epithelial cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(3): 600.
- [28] Zhang Y, Zhang Y, Jin X F, *et al.* The role of astragaloside IV against cerebral ischemia/reperfusion injury: Suppression of apoptosis via promotion of P62-LC3-autophagy [J]. *Molecules*, 2019, 24(9): 1838.
- [29] 刘铭, 张雷, 冯建宏, 等. 黄芪甲苷对脊髓损伤及脊髓胶质细胞凋亡的影响 [J]. 中南医学科学杂志, 2023, 51(4): 507-511.
- [30] Ward D M, Cloonan S M. Mitochondrial iron in human health and disease [J]. *Annu Rev Physiol*, 2019, 81: 453-482.
- [31] Arosio P, Elia L, Poli M. Ferritin, cellular iron storage and regulation [J]. *IUBMB Life*, 2017, 69(6): 414-422.
- [32] Gaschler M M, Stockwell B R. Lipid peroxidation in cell death [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(3): 419-425.

[责任编辑 罗 曦]