

【DOI】 10.3969 / j.issn.1671-6450.2025.08.018

论著 · 基础

黄芪甲苷预处理脐带间充质干细胞源性外泌体干预 Nrf2/GPX4 通路调控软骨细胞铁死亡的机制研究

张文豪, 易林, 向文远, 方锐, 梁治权



基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82360934); 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2023D01C145); 新疆维吾尔自治区重大科技专项项目(2023A03007-3); 新疆维吾尔自治区青年托举人才项目(2023TSYCQNTY0050); 新疆维吾尔自治区重点研发专项(2021B03006-2); 新疆维吾尔自治区科技创新领军人才—高层次领军人才项目(2022TSYCLJ0007)

作者单位: 830000 乌鲁木齐, 新疆医科大学第四临床医学院(张文豪、易林、方锐); 新疆医科大学附属医院(向文远、方锐); 新疆维吾尔自治区中医药研究院(向文远、方锐、梁治权)

通信作者: 方锐, E-mail: xjfrdoctor@163.com

【摘要】目的 探讨黄芪甲苷预处理脐带间充质干细胞源性外泌体(hUCMSCs-Exos)对软骨细胞铁死亡的影响。**方法** 2024年1—12月于新疆医科大学动物实验中心进行实验。应用黄芪甲苷(AS-IV)对hUCMSCs预处理后提取hUCMSCs-Exos,采用透射电子显微镜(TEM)和纳米粒子跟踪分析仪(NTA)对其形态和尺寸分布进行鉴定。大鼠软骨细胞根据不同的干预方式,分组为对照组(正常软骨细胞培养)、模型组(IL-1 β 干预组)、外泌体组(IL-1 β +hUCMSCs-Exos干预)、黄芪甲苷联合外泌体组(IL-1 β +AS-IV干预hUCMSCs-Exos),电镜观察各组细胞内线粒体的形态变化。通过离心收集细胞,提取细胞样本中的谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、活性氧(ROS),并进行定量分析。RT-qPCR和蛋白质印迹法分别检测软骨细胞中Nrf2/GPX4的mRNA和蛋白表达水平。**结果** AS-IV预处理后的外泌体与未预处理囊泡结构、直径相似。与对照组比较,模型组线粒体明显萎缩、膜破裂;与模型组比较,外泌体组和黄芪甲苷联合外泌体组线粒体形态有所改善,且黄芪甲苷联合外泌体组改善更为显著。与对照组比较,模型组GSH含量下降,MDA、ROS含量升高($P<0.01$);与模型组比较,外泌体组、黄芪甲苷联合外泌体组GSH含量依次升高,MDA、ROS依次降低($P<0.01$),且黄芪甲苷联合外泌体组GSH含量高于外泌体组,MDA、ROS含量低于外泌体组($P<0.01$)。与对照组比较,模型组软骨细胞中Nrf2/GPX4 mRNA及蛋白表达水平均降低($P<0.01$);与模型组比较,外泌体组、黄芪甲苷联合外泌体组软骨细胞Nrf2/GPX4 mRNA及蛋白表达水平依次升高($P<0.01$);黄芪甲苷联合外泌体组软骨细胞中Nrf2/GPX4 mRNA及蛋白表达高于外泌体组($P<0.05$)。**结论** AS-IV干预hUCMSCs-Exos对软骨细胞铁死亡的调控作用可能与其上调Nrf2/GPX4信号通路的表达有关,进而抑制软骨细胞铁死亡反应,减少软骨细胞的损伤。

【关键词】 膝骨关节炎;黄芪甲苷;脐带间充质干细胞;外泌体;铁死亡;Nrf2/GPX4通路;作用机制

【中图分类号】 R684.3

【文献标识码】 A

Astragaloside IV pretreatment of umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes intervenes in Nrf2/GPX4 pathway regulation of chondrocytes research on the mechanism of iron death Zhang Wenhao*, Yi Lin, Xiang Wenyan, Fang Rui, Liang Zhiqian. * Fourth Clinical Medical College, Xinjiang Medical University, Xinjiang, Urumqi 830000, China
Funding program: National Natural Science Foundation of China (82360934); Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2023D01C145); Xinjiang Uygur Autonomous Region Major Science and Technology Special Project (2023A03007-3); Xinjiang Uygur Autonomous Region Youth Support Talent Project (2023TSYCQNTY0050); Xinjiang Uygur Autonomous Region Key R&D Special Project (2021B03006-2); Xinjiang Uygur Autonomous Region Science and Technology Innovation Leading Talent—High-Level Leading Talent Project (2022TSYCLJ0007)

Corresponding author: Fang Rui, E-mail: xjfrdoctor@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the impact of Astragaloside IV (AS-IV) pretreatment of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes (hUCMSCs-Exos) on ferroptosis in chondrocytes. **Methods** Experiments were conducted at the Animal Experimental center of Xinjiang Medical University from January 2024 to December 2024, hUCMSCs were pretreated with AS-IV, followed by the extraction of hUCMSCs-Exos, which were characterized for morphology and size distribution using transmission electron microscopy (TEM) and nanoparticle tracking analysis (NTA). Rat chondrocytes were

divided into four groups based on intervention methods: control group (normal chondrocyte culture), model group (IL-1 β intervention), exosome group (IL-1 β + hUCMSCs-Exos intervention), and AS-IV combined exosome group (IL-1 β + AS-IV pretreated hUCMSCs-Exos). Mitochondrial morphology in each group was observed using electron microscopy. Cells were collected by centrifugation, and glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), and reactive oxygen species (ROS) were extracted and quantitatively analyzed. mRNA and protein expression levels of Nrf2 and GPX4 in chondrocytes were detected using RT-qPCR and Western blotting, respectively. **Results** Exosomes pretreated with AS-IV exhibited similar vesicular structures and diameters compared to untreated exosomes. Compared to the control group, the model group showed significant mitochondrial atrophy and membrane rupture. Both the exosome group and the AS-IV combined exosome group demonstrated improved mitochondrial morphology compared to the model group, with the AS-IV combined exosome group showing more pronounced improvements. The model group exhibited decreased GSH content and increased MDA and ROS levels compared to the control group ($tP=34.851/<0.001$). The exosome group and AS-IV combined exosome group showed sequentially decreased GSH content and increased MDA and ROS levels compared to the model group ($F/P=6.977/<0.001$; $17.249/<0.001$), with the AS-IV combined exosome group having higher GSH content and lower MDA and ROS levels than the exosome group ($tP=7.744/<0.001$). The model group showed reduced mRNA and protein expression levels of Nrf2 and GPX4 in chondrocytes compared to the control group ($tP=18.871/<0.001$). The exosome group and AS-IV combined exosome group exhibited sequentially increased mRNA and protein expression levels of Nrf2 and GPX4 compared to the model group ($F/P=8.390/<0.001$; $4.143/<0.05$), with the AS-IV combined exosome group showing higher expression levels than the exosome group ($tP=6.912/<0.05$). **Conclusion** The regulatory effects of AS-IV pretreated hUCMSCs-Exos on ferroptosis in chondrocytes may be associated with the upregulation of the Nrf2/GPX4 signaling pathway, thereby inhibiting ferroptotic responses and reducing chondrocyte damage.

【Key words】 Knee osteoarthritis; Astragaloside IV; Umbilical mesenchymal stem cells; Exosomes; Ferroptosis; Nrf2/GPX4 pathway; Mechanism

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种慢性退行性关节病,以关节软骨退化、骨赘形成、软骨下骨重构、滑膜炎为特征^[1]。KOA 是一种全球性疾病,影响着全球约 3 亿人,其中髋关节和膝关节骨关节炎是最常见的类型^[2-5]。目前的医疗手段只能在一定程度上缓解症状并延缓病情进展,KOA 的发病机制亦尚不明确^[6-7]。间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSCs) 在 KOA 的治疗中具有优势^[8-9]。MSCs 通过分泌多种因子来调节受损组织的环境,外泌体在此过程中起着至关重要的作用^[10-11]。脐带间充质干细胞源性外泌体 (human umbilical cord mesenchymal stem cells-Exosomes, hUCMSCs-Exos) 可调节微环境和炎症反应,并促进受损组织 (包括软骨和骨) 的再生^[12]。前期研究发现补肾痹通方联合骨髓间充质干细胞可有效保护损伤软骨细胞,可通过上调 SOX9 和下调 MMP-13 抑制炎症反应^[13]。

铁死亡是由铁依赖性脂质氢过氧化物积累到致死水平而发生,是一种受调控的细胞死亡形式^[14]。核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 通过结合抗氧化反应元件直接上调谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 表达, Nrf2/GPX4 通路是铁死亡发生的核心机制之一。黄芪甲苷 (astragaloside IV, AS-IV) 是从中药黄芪中提取的一种天然皂苷,可应用于骨关节炎,其可能通过减轻炎症反

应损伤,抑制软骨细胞凋亡退化发挥作用,但 AS-IV 水溶性差,生物利用度较低^[15-16]。本研究通过 AS-IV 预处理 hUCMSCs-Exos,以期论证 hUCMSCs-Exos 通过 Nrf2/GPX4 通路对软骨细胞铁死亡的调控,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 细胞:人脐带间充质干细胞 (hUCMSC) (赛百慷, HUM-iCell-e009)、大鼠软骨细胞 (SAIOS, 赛百慷公司 PC-078R)。(2) 药品与试剂:胰蛋白酶 (25200056)、 α -MEM 完全培养基 (A1049001)、TRIzol 试剂 (15596026)、胎牛血清 (10437028)、DMEM 培养基 (10566016) 均购自 Thermo Fisher Scientific 公司;重组大鼠 IL-1 β (NeoBioscience, ERC007QT.96.2); CCK-8 试剂盒 (APEX-BIO, K1018); SIRT3 抗体 (Abcam, ab217319)、FOXO3 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, sc-48348)、Bax 抗体 (Cell Signaling Technology, 2772S);谷胱甘肽 (GSH) 检测试剂盒 (碧云天生物, S0052)、活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (碧云天生物, S0033)、丙二醛 (MDA) 检测试剂盒 (碧云天生物, S0131);Nrf2 抗体 (Proteintech, 16396-1-AP)、GPX4 抗体 (Abcam, ab125066)。(3) 仪器设备:离心机、恒温细胞培养箱、透射电子显微镜、纳米粒子跟踪分析仪、紫外分光光度计。

1.2 实验方法 2024 年 1—12 月于新疆医科大学动物实验中心进行实验。

1.2.1 hUCMSCs 培养:将复苏的 hUCMSC 接种于培养瓶中,使用添加了 10% 胎牛血清的 α -MEM 完全培养基进行培养。当细胞融合度达到 80% 时,采用 0.125% 胰蛋白酶在室温下进行消化并进行传代。将培养至第三代的 hUCMSC 接种于新的培养瓶中。将第三代的 hUCMSC 细胞悬液转移至 15 ml 的离心管中以 1 000 r/min 的速度离心 5 min,离心半径 10~15 cm,倒掉含有胰酶的完全培养基。细胞以 1:3 的比例进行传代,使用相同稀释倍数的培养基对细胞进行重悬,并轻轻吹打使其均匀。将重悬液滴入培养皿或孔板中,然后充分摇匀,最后将细胞放入 37℃ 湿度适宜、含 5% CO₂ 的恒温细胞培养箱中培养。

1.2.2 AS-IV 对 hUCMSCs-Exos 预处理:首先进行不同浓度 AS-IV 培养基的配制,浓度设定为 0、10、30、50、70、90、100 mg/L 的 AS-IV 培养液,精确量取 0、10、30、50、70、90、100 μ l AS-IV 培养液与 50 ml DMEM/F12 1:1 培养基(无血清培养基)进行配制,在细胞达到 60%~80% 的融合度时,移除旧的培养基,并使用磷酸盐缓冲溶液(PBS)对细胞层进行温和冲洗,以去除残留的血清成分和细胞代谢产物。加入适量的 AS-IV 培养基,将细胞置于适宜的培养条件下(如温度、湿度和气体环境)培养 24~48 h。培养结束后,根据 CCK-8 试剂说明书,细胞培养箱内孵育。孵育结束后,使用 450 nm 波长的光测定各孔的 OD 值,以评估细胞的增殖情况。

1.2.3 hUCMSCs-Exos 提取:根据 1.2.2 选取最合适浓度后,AS-IV 干预后的 hUCMSC 在光学显微镜下展现出 50%~60% 的融合度时,首先移除常规培养基,随后利用 PBS 缓冲液对培养皿实施 3 次全面冲洗,以确保完全培养基被彻底清除。采用去除外泌体的完全培养基对细胞进行培养,该培养基由去除外泌体的胎牛血清、1% 青霉素—链霉素溶液,在 DMEM 基础培养基中配制而成。在细胞持续分泌外泌体达到 48 h 后,收集其上清液备用。将细胞上清液在 400 g 的条件下离心 15 min,以去除其中的细胞成分。将上清液在 2 500 g 的条件下再次离心 15 min,在 10 000 g 的条件下离心 30 min,最后将上清液在 120 000 g 的条件下超速离心 2~3 h。离心完成后,将沉淀物在无菌离心管中用无菌 PBS 缓冲液 100 μ l 进行重悬,获得 AS-IV 干预后的 hUCMSCs-Exos。

1.2.4 实验分组:根据不同的干预方式,将大鼠软骨细胞分为对照组(正常软骨细胞培养)、模型组(IL-1 β

干预组)、外泌体组(IL-1 β +hUCMSCs-Exos 干预)、黄芪甲苷联合外泌体组(IL-1 β +AS-IV 预干预 hUCMSCs-Exos)。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 hUCMSCs-Exos 的电镜观测及纳米颗粒追踪分析测定:hUCMSCs-Exos 样品滴加于密封膜之上,随后用铜网轻轻覆盖以确保样品均匀分布。将整个装置转移至含有 4% 多聚甲醛的固定液中,利用透射电子显微镜(TEM)观察并选取合适的视野,镀膜完成后,根据实际需求调整加速电压和工作距离并采集图像,利用纳米颗粒追踪分析(NTA)对 hUCMSCs-Exos 的尺寸分布进行详细评估。

1.3.2 铁死亡模型构建及电镜观测线粒体:使用 IL-1 β 10 μ g/L 与软骨细胞培养 24 h,建立铁死亡模型。取浓度为 1×10^5 个/孔的软骨细胞,经过 24 h 的共培养后,将细胞转移到无菌载片上。弃去各组的细胞培养基,并用 PBS 液对细胞进行 2~3 次冲洗,使用 4% 多聚甲醛溶液固定 12 h。第 2 天,利用电镜观察细胞内线粒体的形态。

1.3.3 GSH、MDA、ROS 含量测定:上述细胞干预完毕后,弃去各组的细胞培养基,并用 PBS 液对细胞进行 2~3 次冲洗。接着,通过离心操作收集细胞,并小心地吸去上清液,以确保细胞沉淀的完整性。按照谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、活性氧(ROS)试剂盒的说明书,使用液氮进行反复冻融,提取细胞样本后进行 GSH、MDA、ROS 的测定,并进行定量分析,评估实验各组铁死亡情况。

1.3.4 RT-qPCR 检测软骨细胞中 Nrf2、GPX4 的 mRNA 表达:取各组软骨细胞,加入胰蛋白酶进行预处理,以促进细胞的消化和分离。使用 TRIzol 法提取细胞内总 RNA,使用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度。将提取的 RNA 逆转录为 cDNA,以便进行 PCR 扩增。预变性:95℃ 10 min,变性:95℃ 15 s,退火:60℃ 30 s,延伸:72℃ 1 min,共计 40 个循环。Nrf2 引物序列:上游引物 5'-GAGGATGACTGACACCTGGA-3',下游引物 5'-CCTGCCACAGGTTTCATGTG-3';GPX4 引物序列:上游引物 5'-ATGCTGCTGGTGTGCTG-3',下游引物 5'-TTATCTTGGGCCCGTCTC-3'。使用 GAPDH 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 Nrf2、GPX4 mRNA 相对表达量。

1.3.5 蛋白质印迹检测软骨细胞中 Nrf2、GPX4 蛋白水平:收集各组软骨细胞样品,按照试剂盒说明提取总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度,将提取的蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,以分离不同分子量的蛋白。

完成电泳后,将蛋白转移至 PVDF 膜上,使用 5% 脱脂奶粉封闭液在室温下封闭 1 h,以减少非特异性结合。Nrf2(1:1 500)、GPX4(1:2 000)加入,4℃ 震荡过夜待用。加入 IgG 二抗在室温下孵育 1 h。洗膜后用配置 ECL 化学发光液显影,并通过化学发光凝胶成像系统曝光与拍照记录。利用 Image J 软件分析条带的灰度值,以目的蛋白与 β -actin 的灰度值比来表示蛋白质的相对表达水平。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件统计分析数据,GraphPad Prism 9.0 软件作图。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hUCMSCs-Exos 的提取与鉴定 通过超速离心提取 hUCMSCs-Exos 并经 TEM 观察显示,其特征为杯状或半球形,与外泌体的典型形态相似。通过 NTA 观察发现,hUCMSCs-Exos 直径为 80~200 nm,其峰值分别为 114 nm 和 109 nm,这一结果符合外泌体常规粒径范围 30~200 nm 标准,说明 hUCMSCs-Exos 提取成功,AS-IV 预处理后的外泌体与未预处理囊泡结构相似,直径相似,见图 1、2。

2.2 各组软骨细胞线粒体电镜测定比较 对照组线粒体结构正常且清晰,与对照组比较,模型组线粒体明显萎缩、膜破裂,线粒体嵴减少或消失;与模型组比较,外泌体组、黄芪甲苷联合外泌体组线粒体萎缩变小、线粒体脊减少,线粒体膜轻微溶解破裂;与外泌体组比较,黄芪甲苷联合外泌体组线粒体萎缩较少、线粒体脊减少不明显,线粒体膜溶解破裂较少,见图 3。

2.3 各组软骨细胞 GSH、MDA、ROS 含量测定比较 与对照组比较,模型组 GSH 含量下降,MDA、ROS 含量

升高($P < 0.01$);与模型组比较,外泌体组、黄芪甲苷联合外泌体组 GSH 含量依次升高,MDA、ROS 依次降低($P < 0.01$);与外泌体组比较,黄芪甲苷联合外泌体组 GSH 含量升高,MDA、ROS 含量降低($P < 0.01$),见表 1。

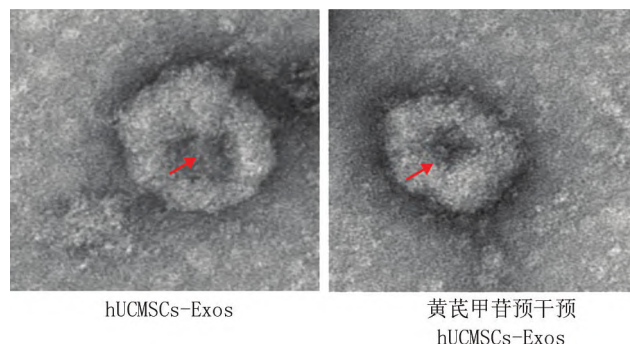
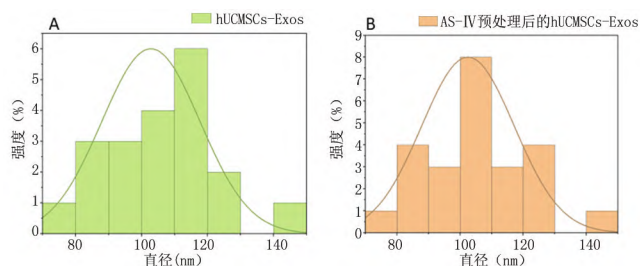


图 1 hUCMSCs-Exos 和黄芪甲苷干预 hUCMSCs-Exos 形态鉴定($\times 4\ 000$)

Fig.1 Morphological identification of hUCMSCs Exos and Astragaloside IV pre intervention in hUCMSCs Exos



注:A.hUCMSCs-Exos;B.AS-IV 预处理后的 hUCMSCs-Exos。

图 2 NTA 观察 2 组 hUCMSCs-Exos 的直径

Fig.2 NTA observation of the diameters of two groups of hUCMSCs Exos

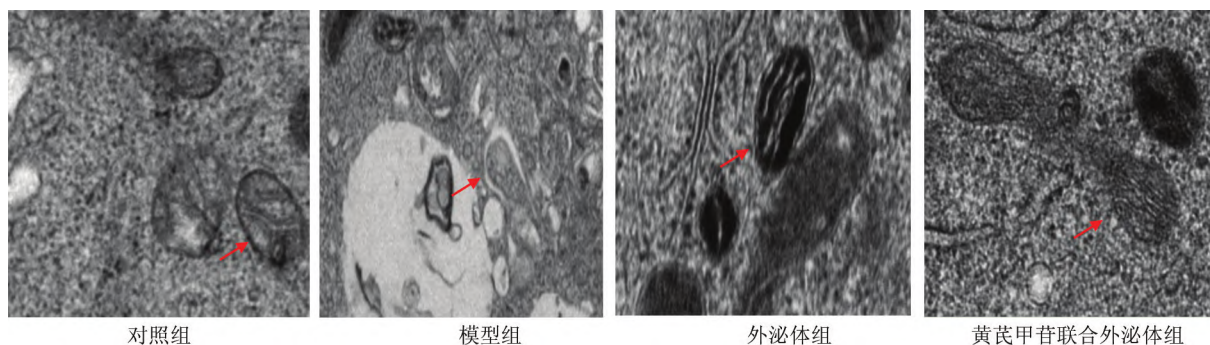


图 3 各组软骨细胞外泌体中线粒体情况比较($\times 5\ 000$)

Fig.3 Comparison of mitochondrial status in extracellular vesicles of chondrocytes in different groups

表 1 各组软骨细胞 GSH、MDA、ROS 表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Comparison of GSH, MDA, and ROS expression in chondrocytes of different groups

组别	n	GSH (mmol/L)	MDA (μmol/L)	ROS (%)
对照组	3	20.69±0.60	2.12±0.22	1.16±0.13
模型组	3	4.89±0.50 ^a	5.51±0.50 ^a	3.13±0.20 ^a
外泌体组	3	9.49±1.20 ^b	3.15±0.29 ^b	2.75±0.08 ^b
黄芪甲苷联合外泌体组	3	15.81±0.97 ^{bc}	2.82±0.03 ^{bc}	2.04±0.08 ^{bc}
F/P 值		34.851/<0.001	10.659/<0.001	14.024/<0.001

注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与外泌体组比较,^c $P<0.01$ 。

2.4 各组软骨细胞中 Nrf2、GPX4 mRNA 表达比较
与对照组比较,模型组 Nrf2、GPX4 mRNA 表达水平均降低($P<0.01$);与模型组比较,外泌体组、黄芪甲苷联合外泌体组软骨细胞 Nrf2、GPX4 mRNA 表达水平依次升高($P<0.05$);与外泌体组比较,黄芪甲苷联合外泌体组 Nrf2、GPX4 mRNA 表达升高($P<0.05$),见表 2。

表 2 各组软骨细胞 Nrf2、GPX4 的 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Comparison of mRNA relative expression levels of Nrf2 and GPX4 in chondrocytes of different groups

组别	n	Nrf2	GPX4
对照组	3	0.93±0.04	0.89±0.03
模型组	3	0.37±0.04 ^a	0.32±0.04 ^a
外泌体组	3	0.48±0.02 ^b	0.59±0.03 ^b
黄芪甲苷联合外泌体组	3	0.67±0.05 ^{bc}	0.68±0.04 ^{bc}
F/P 值		18.871/<0.001	21.500/<0.001

注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与外泌体组比较,^c $P<0.05$ 。

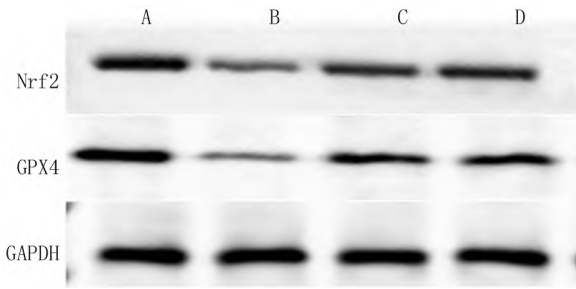
2.5 各组软骨细胞中 Nrf2、GPX4 蛋白水平比较
与对照组比较,模型组软骨细胞 Nrf2、GPX4 蛋白水平均降低($P<0.01$);与模型组比较,外泌体组、黄芪甲苷联合外泌体组软骨细胞 Nrf2、GPX4 蛋白水平依次升高($P<0.01$);与外泌体组比较,黄芪甲苷联合外泌体组 Nrf2、GPX4 蛋白水平升高($P<0.01$),见表 3、图 4。

表 3 各组软骨细胞中 Nrf2、GPX4 蛋白水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Comparison of Nrf2 and GPX4 protein levels in chondrocytes of different groups

组别	n	Nrf2	GPX4
对照组	3	1.06±0.04	0.98±0.05
模型组	3	0.60±0.04 ^a	0.39±0.04 ^a
外泌体组	3	0.76±0.03 ^b	0.75±0.03 ^b
黄芪甲苷联合外泌体组	3	0.95±0.03 ^{bc}	0.87±0.02 ^{bc}
F/P 值		13.467/<0.001	16.412/<0.001

注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与外泌体组比较,^c $P<0.01$ 。



注:A.对照组;B.模型组;C.外泌体组;D.黄芪甲苷联合外泌体组

图 4 各组软骨细胞中 Nrf2、GPX4 蛋白水平比较

Fig.4 Comparison of Nrf2 and GPX4 protein levels in chondrocytes of different groups

3 讨论

骨关节炎是一种退行性疾病,通常影响负重关节和活性性较高的关节,如颈椎和腰椎、膝关节、髋关节等^[17]。膝关节骨关节炎在临床中最为常见,尤其是在老年患者中,女性的发病率高于男性^[18]。骨关节炎的临床症状包括疼痛、僵硬和受影响关节的肿胀。相关研究表明,其与软骨代谢失衡、软骨下骨硬化和滑膜炎密切相关。OA 中修复和再生的潜在机制可能与细胞数量、软骨细胞代谢、细胞能量平衡、免疫调节等有关^[19]。

在各种 MSC 中,脐带来源的 MSC 因其非侵入性获取和强大的再生能力而备受关注。尽管 hUCMSCs 在治疗 OA 方面表现出相对安全和有效的优势,但其在体内的生长和分化缺乏控制,难以实现临床标准化转化,这限制了对 OA 严重程度、病程与 hUCMSCs 治疗效果之间相关性的了解。越来越多的研究表明, MSC 的治疗作用主要来源于旁分泌作用。研究发现, hUCMSCs-Exo 中富含 Let-7a-5p,其对 CVB3 诱导的铁死亡的抑制作用显著。Let-7a-5p 通过靶向 SMAD2 mRNA,调节 SMAD2 和 ZFP36 的表达。沉默 SMAD2 或过表达 ZFP36 均能抑制铁死亡相关指标的表达^[20]。李国婷等^[21]研究发现, AS-IV 通过调控 SLC7A11/GPX4 通路抑制铁死亡,从而减弱 VSMCs 的增殖能力,可能有助于治疗动脉粥样硬化。但 AS-IV 水溶性差,生物利用度较低,如何通过 AS-IV 干预 hUCMSCs 以及 hUCMSCs-Exo,从而最大化地发挥其特性是本研究的重点。

铁死亡为一种独特的细胞死亡形式,其核心在于脂质过氧化物的积累。这一过程不仅伴随着细胞形态的显著变化,如线粒体的明显皱缩、膜密度的显著增加以及线粒体嵴数量的减少乃至完全消失,还在生化层面展现出鲜明的特征。这些特征包括细胞内 ROS 的

大量堆积,以及毒性脂质过氧化产物 MDA 的持续产生^[22-23]。这些形态学与生化上的变化共同构成了铁死亡机制的独特面貌。铁死亡是一种高度依赖于铁离子介导的程序性细胞死亡机制,该过程在生物学上具有显著意义,能够显著促进 KOA 逐步恶化,进而发展为重度 KOA。铁死亡的特征性表现涵盖了一系列特有的形态学改变,诸如线粒体的结构异常与功能障碍,以及一系列生化特征的显著变化,这些变化包括但不限于活性氧簇的异常聚集、铁离子(尤其是 Fe^{2+}) 在细胞内的过度蓄积,以及由此触发的脂质过氧化反应的显著增强^[24-25]。在生物体内,铁元素主要以 Fe^{3+} 的氧化态形式存在,通过特定的转铁蛋白介导的转运机制进入细胞内部,并在一系列还原酶的作用下被还原为更具反应活性的 Fe^{2+} 形式^[26-27]。这一还原过程为铁催化的脂质过氧化反应提供了必要的催化中心,从而进一步推动了铁死亡过程的发生与发展。

Nrf2 作为核心抗氧化转录因子,通过激活下游 GPX4 的表达,直接清除脂质过氧化物(LPO),抑制铁死亡发生;在骨关节炎中,IL-1 β 等促炎因子导致 Nrf2/GPX4 通路失活,引发软骨细胞铁蓄积、线粒体损伤及细胞膜脂质过氧化,加速软骨退变,靶向激活 Nrf2/GPX4 轴可恢复氧化还原稳态,为延缓骨关节炎进展提供关键治疗靶点^[28-31]。

本研究显示,甘露清瘟方可通过改善大鼠体内炎症反应及氧化应激,保护 LPS 诱导的急性肺损伤,其作用机制可能与激活 Nrf2/GPX4 信号通路有关^[32]。另一研究发现膝痹宁 II 方在体外可能通过激活 Nrf2/GPX4 信号通路发挥抗氧化作用,实现抑制 KOA 小鼠 PMCs 铁死亡的作用^[33]。黄芪甲苷是中药黄芪的主要活性成分之一,属于皂苷类化合物,具有抗炎、抗氧化、抗凋亡及免疫调节等多种药理作用^[34]。近年来研究发现,黄芪甲苷在抑制软骨细胞铁死亡中显示出潜在价值,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^[35]。本研究发现黄芪甲苷干预外泌体可促进 Nrf2/GPX4 蛋白及 mRNA 表达水平升高,从而抑制软骨细胞铁死亡。

4 结 论

本研究通过构建 IL-1 β 诱导的软骨细胞铁死亡模型,系统探讨了 AS-IV 预处理 hUCMSCs-Exos 对软骨细胞铁死亡的调控作用及分子机制。AS-IV 预处理的 hUCMSCs-Exos 能够显著改善铁死亡引起的线粒体损伤,逆转氧化应激标志物(ROS、MDA)的异常升高,并恢复抗氧化物质 GSH 的水平。进一步机制研究表明,

AS-IV 预处理通过增强 hUCMSCs-Exos 的生物活性,显著上调软骨细胞中 Nrf2/GPX4 通路的 mRNA 及蛋白表达,从而抑制脂质过氧化反应,减少铁死亡的核心因素之一。综上,本研究证实 AS-IV 预处理的 hUCMSCs-Exos 可通过 Nrf2/GPX4 通路抑制软骨细胞铁死亡,为骨关节炎的病理机制提供了新见解,并为基于外泌体的精准治疗策略奠定了实验基础。未来研究需结合临床转化探索递送系统优化、长期安全性评估及多通路交互机制,以发挥中医药在 KOA 与再生医学中的价值。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

张文豪:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;易林、向文远:数据收集,分析实验数据,论文审核;方锐:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改

参考文献

- [1] Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, et al. Osteoarthritis[J]. *Lancet*, 2015, 386 (9991): 376-387. DOI: 10.1016/S0140-6736 (14) 60802-3.
- [2] Sharma L. Osteoarthritis of the knee[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384 (1): 51-59. DOI: 10.1056/NEJMcpl903768.
- [3] Fan X, Chen G, Wang S, et al. Applications of chitosan and its derivatives in the treatment of osteoarthritis[J]. *Aging Dis*, 2024, 3 (7): 1006-1009. DOI: 10.14336/AD.2024.1080.
- [4] Hohmann E, Keough N, Frank RM, et al. Microfragmented adipose tissue has no advantage over platelet-rich plasma and bone marrow aspirate injections for symptomatic knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis[J]. *Am J Sports Med*, 2025, 1 (4): 342-354. DOI: 10.1177/03635465241249940.
- [5] Ma T, Xu G, Gao T, et al. Engineered exosomes with ATF5-modified mRNA loaded in injectable thermogels alleviate osteoarthritis by targeting the mitochondrial unfolded protein response[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2024, 16 (17): 21383-21399. DOI: 10.1021/acsami.3c17209.
- [6] Giorgino R, Albano D, Fusco S, et al. Knee osteoarthritis: Epidemiology, pathogenesis, and mesenchymal stem cells: What else is new? An update[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (7): 6405. DOI: 10.3390/ijms24076405.
- [7] Ehioghae M, Vipra TK, Askins D, et al. Exploring orthopedic stem-cell approaches for osteoarthritis management: Current trends and future horizons[J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2024, 28 (1): 27-35. DOI: 10.1007/s11916-023-01191-6.
- [8] Ni Z, Zhou S, Li S, et al. Exosomes: Roles and therapeutic potential in osteoarthritis[J]. *Bone Res*, 2020, 8 (2): 139-156. DOI: 10.1038/s41413-020-0100-9.
- [9] Zhang S, Teo KYW, Chuah SJ, et al. MSC exosomes alleviate temporomandibular joint osteoarthritis by attenuating inflammation and restoring matrix homeostasis[J]. *Biomaterials*, 2019, 200: 35-47. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.02.006.
- [10] Hade MD, Suire CN, Suo Z, et al. Mesenchymal stem cell-derived ex-

- osomes; Applications in regenerative medicine[J].CELLS,2021,10(8):1959.DOI:10.3390/cells10081959.
- [11] Zou J, Yang W, Cui W, et al. Therapeutic potential and mechanisms of mesenchymal stem cell-derived exosomes as bioactive materials in tendon-bone healing [J]. J Nanobiotechnology, 2023, 21(1): 14. DOI:10.1186/s12951-023-01778-6.
- [12] Chang YH, Wu KC, Ding DC. Chondrogenic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells cultured with exosome-depleted fetal bovine serum in an osteoarthritis mouse model [J]. Biomedicine, 2022, 10(11): 2773. DOI: 10.3390/biomedicine10112773.
- [13] 易林, 向文远, 张文豪, 等. 补肾痹通方联合骨髓间充质干细胞对损伤软骨细胞的保护机制及 SOX9、MMP-13 表达的影响 [J]. 陕西中医, 2024, 45(6): 728-732, 739. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7369.2024.06.002.
- [14] Cheng S, Xu X, Wang R, et al. Chondroprotective effects of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes in osteoarthritis [J]. J Bioenerg Biomembr, 2024, 56(1): 31-44. DOI: 10.1007/s10863-023-09991-6.
- [15] Wang Y, Hu K, Liao C, et al. Exosomes-shuttled lncRNA SNHG7 by bone marrow mesenchymal stem cells alleviates osteoarthritis through targeting miR-485-5p/FSP1 axis-mediated chondrocytes ferroptosis and inflammation [J]. Tissue Eng Regen Med, 2024, 21(8): 1203-1216. DOI:10.1007/s13770-024-00668-8.
- [16] Zang Y, Wan J, Zhang Z, et al. An updated role of astragaloside IV in heart failure [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 126: 110012. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110012.
- [17] Chen M, Lu Y, Liu Y, et al. Injectable microgels with hybrid exosomes of chondrocyte-targeted FGF18 gene-editing and self-renewable lubrication for osteoarthritis therapy [J]. Adv Mater, 2024, 36(16): e2312559. DOI:10.1002/adma.202312559.
- [18] Yu H, Huang Y, Yang L. Research progress in the use of mesenchymal stem cells and their derived exosomes in the treatment of osteoarthritis [J]. Ageing Res Rev, 2022, 80: 101684. DOI: 10.1016/j.arr.2022.101684.
- [19] Abramoff B, Caldera FE. Osteoarthritis: Pathology, diagnosis, and treatment options [J]. Med Clin North Am, 2020, 104(2): 293-311. DOI:10.1016/j.mcna.2019.10.007.
- [20] Li X, Hu YN, Wu YT, et al. Exosomal let-7a-5p derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviates coxsackievirus B3-induced cardiomyocyte ferroptosis via the SMAD2/ZFP36 signal axis [J]. Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 2024, 25(5): 422-437. DOI:10.1631/jzus.B2300077.
- [21] 李国婷, 杨长超, 刘琳, 等. 黄芩甲苷通过 SLC7A11/GPX4 通路调控铁死亡抗血管平滑肌细胞增殖的作用机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(10): 159-167. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20250966.
- [22] Han S. Osteoarthritis year in review 2022: Biology [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2022, 30(12): 1575-1582. DOI: 10.1016/j.joca.2022.09.003.
- [23] Tang D, Chen X, Kang R, et al. Ferroptosis: Molecular mechanisms and health implications [J]. Cell Res, 2021, 31(2): 107-125. DOI: 10.1038/s41422-020-00441-1.
- [24] Mou Y, Wang J, Wu J, et al. Ferroptosis, a new form of cell death: Opportunities and challenges in cancer [J]. J Hematol Oncol, 2019, 12(1): 34. DOI:10.1186/s13045-019-0720-y.
- [25] Dixon SJ, Olzmann JA. The cell biology of ferroptosis [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2024, 25(6): 424-442. DOI: 10.1038/s41580-024-00703-5.
- [26] Wu X, Li Y, Zhang S, et al. Ferroptosis as a novel therapeutic target for cardiovascular disease [J]. Theranostics, 2021, 11(7): 3052-3059. DOI:10.7150/thno.54113.
- [27] Luo L, Huang F, Zhong S, et al. Astaxanthin attenuates ferroptosis via Keap1-Nrf2/HO-1 signaling pathways in LPS-induced acute lung injury [J]. Life sciences, 2022, 311(PA): 121091. DOI:10.1016/j.lfs.2022.121091.
- [28] Sun YY, Zhu HJ, Zhao RY, et al. Remote ischemic conditioning attenuates oxidative stress and inflammation via the Nrf2/HO-1 pathway in MCAO mice [J]. Redox Biol, 2023, 66: 102852. DOI: 10.1016/j.redox.2023.102852.
- [29] Yang R, Gao W, Wang Z, et al. Polyphyllin I induced ferroptosis to suppress the progression of hepatocellular carcinoma through activation of the mitochondrial dysfunction via Nrf2/HO-1/GPX4 axis [J]. Phytomedicine, 2024, 122: 155135. DOI:10.1016/j.phymed.2023.155135.
- [30] 梁治权, 孟庆才, 李祥生, 等. 血清 PDGF、FGF-2 水平与膝关节炎病情严重程度的相关性 [J]. 疑难病杂志, 2023, 22(9): 972-976. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2023.09.015.
- [31] 陶盼, 刘凡, 李智斌. 基于炎症因子探讨膝关节炎的中医药研究进展 [J]. 河北中医, 2024, 46(8): 1403-1408. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2619.2024.08.040.
- [32] 李江涛, 李争, 李翔鹏, 等. 基于 Nrf2/GPX4 铁死亡途径探讨甘露清瘟方对急性肺损伤大鼠的保护作用 [J]. 中成药, 2025, 47(2): 596-600. DOI:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.02.039.
- [33] 廖太阳, 马振源, 邢润麟, 等. 膝痹宁 II 方对膝关节炎软骨细胞铁死亡及 Nrf2/GPX4 信号通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(10): 5182-5188.
- [34] 刘文, 章尹岗, 别志霞, 等. 黄芩甲苷对肥胖糖尿病大鼠肾脏氧化应激、Nrf2 蛋白表达和胰岛 β 细胞的影响 [J]. 疑难病杂志, 2019, 18(1): 67-71. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2019.01.016.
- [35] 刘恩旭, 聂颖, 段嘉豪, 等. 黄芩甲苷联合 BMSCs-Exos 对 PC12 细胞铁死亡的影响 [J]. 中草药, 2024, 55(23): 8056-8066. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.23.013.

(收稿日期:2025-01-20)