



白 鹰, 博士, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 大连市高端人才, 辽宁省临床重点专科和大连市一级医学重点学科带头人。兼任中国免疫学会神经免疫分会委员, 中国卒中学会免疫分会委员, 辽宁省医学会神经病学分会神经免疫学组委员, 辽宁省细胞生物学学会神经免疫专业委员会副主任委员, 大连市医学会神经病学分会副主任委员, 大连市卒中学会副会长。从事神经内科临床、教学和科研工作36年, 主要致力于脑血管病、神经免疫性疾病临床诊治和基础研究。主持国家自然科学基金1项, 主持和参与国家级、省部级和市级科研项目20余项, 获大连市科技进步奖三等奖4项, 发表论文80余篇, 其中SCI收录20余篇。

外泌体通过 NRF2/SLC7A11/GPX4 通路调控铁死亡治疗小鼠缺血性脑卒中

徐英韬, 王蒙蒙, 林 平, 迟海涛, 王 怡, 白 鹰

(大连大学附属新华医院神经内科, 大连 116023)



[摘要] **目的** 通过电凝法阻断小鼠大脑中动脉构建中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型, 研究人羊膜间充质干细胞 (human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs) 来源的外泌体 (exosome, EXO) 改善缺血性脑卒中及调控神经细胞铁死亡 (ferroptosis) 损伤的作用机制。**方法** 将32只6~8周龄SPF级雄性C57BL/6J小鼠随机分为假手术组 (Sham)、模型组 (MCAO)、模型+生理盐水组 (MCAO+NaCl)、模型+外泌体组 (MCAO+EXO), 每组8只。使用电凝法建立小鼠大脑MCAO模型, Sham组暴露大脑中动脉但不实施电凝; 在电凝造模24 h前, 向MCAO+EXO组小鼠尾静脉注射100 μ L来自hAMSCs培养上清液的外泌体 (9.5×10^{11} 个/mL), 向MCAO+NaCl组小鼠尾静脉注射同体积生理盐水。造模24 h后, 采用Longa神经功能缺损评分法评价各组小鼠的运动神经功能损害程度; 通过2,3,5-三苯基氯化四氮唑染色法评估各组小鼠脑梗死体积占比差异; 通过HE染色法评估各组小鼠缺血部位脑组织中神经细胞形态学差异。通过微量比色法评估各组小鼠脑梗死区及其周围组织中亚铁离子 (Fe^{2+})、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、总谷胱甘肽 (total glutathione, total GSH)、氧化型谷胱甘肽 (oxidized glutathione, GSSG) 和还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 的含量差异。通过实时荧光定量PCR法检测各组小鼠脑梗死区及其周围组织中铁死亡相关因子包括核因子-红细胞系2相关因子2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, NRF2)、溶质载体家族7成员11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 的mRNA表达水平。通过蛋白质印迹法检测各组小鼠脑梗死区及其周围组织中NRF2、SLC7A11和GPX4蛋白表达水平。**结果** 相较于MCAO组, MCAO+EXO组的Longa评分显著降低 ($P < 0.01$)。MCAO组小鼠脑组织出现明显梗死灶, MCAO+EXO组相较MCAO组的脑梗死体积占比显著减少 ($P < 0.001$)。与Sham组相比, MCAO组出现神经细胞空泡变性, 细胞核固缩、碎裂, 细胞核结构不清晰, 神经细胞排列杂乱。相较于MCAO组, MCAO+EXO组小鼠的神经细胞结构较为完整, 细胞核大而规整, 位于细胞中央。MCAO组小鼠的脑梗死区及周围组织中 Fe^{2+} 和MDA含量较Sham组显著增加 ($P < 0.001$), MCAO+EXO组的 Fe^{2+} 和MDA含量较MCAO组显著减少 ($P < 0.01$)。相较于Sham组, MCAO模型组小鼠的total GSH、GSSG、GSH含量均显著减少 ($P < 0.01$); 相较于MCAO组, MCAO+EXO组小鼠的total GSH、GSH含量显著增加 ($P < 0.001$), GSSG含量无显著变化 ($P > 0.05$)。相较于Sham组, MCAO组小鼠的NRF2、SLC7A11、GPX4 mRNA和蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.001$); 相较于MCAO组, MCAO+EXO组的NRF2、SLC7A11、GPX4 mRNA及蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$)。**结论** 在小鼠MCAO模型中, 尾静脉注射hAMSCs来源的外泌体可以改善小鼠运动功能, 减少梗死面积, 保护神经细胞形态, 降低神经损伤程度。外泌体可能通过激活NRF2/SLC7A11/GPX4通路, 减少MCAO模型小鼠的脑神经细胞铁死亡而发挥保护作用。

[关键词] 缺血性脑卒中; 大脑中动脉闭塞; 铁死亡; 外泌体; NRF2/SLC7A11/GPX4通路; C57BL/6J小鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2026)01-0020-12

[基金项目] 大连市科技创新基金项目“miR-451/Phd3/p53轴抑制缺血性脑卒中中铁死亡作用机制及外泌体装载miR-451神经保护治疗研究”(2022JJ13SN063)

[第一作者] 徐英韬(1997—),男,硕士,住院医师,研究方向:缺血性脑卒中与神经保护。E-mail: 951072549@qq.com

[通信作者] 白 鹰(1965—),女,博士,教授,主任医师,研究方向:缺血性脑卒中与神经保护。E-mail: 1029981825@qq.com。ORCID: 0009-0008-1965-8801

Exosomes Treat Ischemic Stroke by Regulation of Ferroptosis Through the NRF2/SLC7A11/GPX4 Pathway in Mice

XU Yingtao, WANG Mengmeng, LIN Ping, CHI Haitao, WANG Yi, BAI Ying

(Department of Neurology, Xinhua Hospital Affiliated to Dalian University, Dalian 116023, China)

Correspondence to: BAI Ying (ORCID: 0009-0008-1965-8801), E-mail: 1029981825@qq.com

[ABSTRACT] Objective A middle cerebral artery occlusion (MCAO) mouse model is established by electrocoagulation of the middle cerebral artery. The study examines the mechanism by which exosomes (EXO) derived from human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSCs) improve ischemic stroke and regulate neural ferroptosis-related injury. **Methods** Thirty-two SPF-grade male C57BL/6J mice aged 6 - 8 weeks were randomly divided into four groups ($n=8$ per group): sham group (Sham), model group (MCAO), MCAO plus normal saline group (MCAO+NaCl), and MCAO plus exosome group (MCAO+EXO). The mouse MCAO model was established by electrocoagulation of the middle cerebral artery. Mice in the Sham group underwent exposure of the middle cerebral artery without electrocoagulation. Twenty-four hours before MCAO induction, mice in the MCAO+EXO group received a tail vein injection of 100 μL of exosomes derived from the culture supernatant of hAMSCs at a concentration of 9.5×10^{11} particles/mL. Mice in the MCAO+NaCl group were injected with an equal volume of normal saline via the tail vein. Twenty-four hours after model establishment, neurological deficits were evaluated using the Longa neurological deficit scoring system. Cerebral infarct volume was assessed by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. Hematoxylin and eosin (HE) staining was performed to evaluate morphological changes of neurons in the ischemic brain regions. The contents of ferrous iron (Fe^{2+}), malondialdehyde (MDA), total glutathione (total GSH), oxidized glutathione (GSSG), and reduced glutathione (GSH) in the infarct core and peri-infarct regions were determined using microcolorimetric assays to evaluate differences among groups. The mRNA expression levels of ferroptosis-related factors, including nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), and glutathione peroxidase 4 (GPX4) in the infarct core and peri-infarct regions were measured by real-time quantitative PCR. Protein expression levels of NRF2, SLC7A11, and GPX4 in the infarct and peri-infarct regions of each group were analyzed by Western blotting. **Results** Compared with the MCAO group, the Longa neurological deficit score was significantly reduced in the MCAO+EXO group ($P<0.01$). Prominent cerebral infarction was observed in the MCAO group, whereas the infarct volume ratio was markedly decreased in the MCAO+EXO group compared with the MCAO group ($P<0.001$). Histopathological analysis revealed that mice in the MCAO group exhibited obvious neuronal damage, including cytoplasmic vacuolar degeneration, nuclear pyknosis and fragmentation, unclear nuclear structure, and disorganized neuronal arrangement, compared with the Sham group. In contrast, neurons in the MCAO+EXO group showed relatively preserved morphology, with intact cellular structures and large, regular nuclei located centrally within the cells. Biochemical analysis demonstrated that Fe^{2+} and MDA levels in the infarct core and peri-infarct regions were significantly increased in the MCAO group compared with the Sham group ($P<0.001$). These levels were significantly reduced in the MCAO+EXO group compared with the MCAO group ($P<0.01$). In addition, total glutathione (total GSH), oxidized glutathione (GSSG), and reduced glutathione (GSH) levels were markedly decreased in the MCAO group relative to the Sham group ($P<0.01$). Compared with the MCAO group, the MCAO+EXO group exhibited significantly increased levels of total GSH and GSH ($P<0.001$), while no significant change was observed in GSSG levels ($P>0.05$). Furthermore, both mRNA and protein expression levels of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), and glutathione peroxidase 4 (GPX4) were significantly downregulated in the MCAO group compared with the Sham group ($P<0.01$, $P<0.001$). In contrast, both mRNA and protein expression levels of NRF2, SLC7A11, and GPX4 were significantly upregulated in the MCAO+EXO group compared with the MCAO group ($P<0.05$). **Conclusion** In the mouse MCAO model, tail vein injection of exosomes derived from hAMSCs can improve motor function, reduce infarct area, protect neuronal cell morphology, and reduce the degree of nerve injury.

Exosomes may exert a protective effect by activating the NRF2/SLC7A11/GPX4 pathway and reducing ferroptosis in neuronal cells of MCAO model mice.

[Key words] Ischemic stroke; Middle cerebral artery occlusion; Ferroptosis; Exosomes; NRF2/SLC7A11/GPX4 pathway; C57BL/6J Mice

脑卒中是脑血管病变导致神经功能障碍的疾病总称。我国脑卒中发病率居全球首位，是成年人致残的第一位病因^[1]。其中，约87%的患者属于缺血性脑卒中^[2]。临床上即使通过静脉溶栓和血管内治疗等干预，患者的神经功能恢复和日常生活能力仍不理想，因此需要寻找新的更有效的治疗方式。缺血性脑卒中包含多种病理生理损伤，如神经细胞缺血缺氧应激、神经兴奋性毒性、炎症反应、氧化应激等^[3]。有研究表明，铁死亡也是缺血性脑卒中的一种关键病理损伤^[4]。铁死亡发生后，细胞膜胱氨酸-谷氨酸反向转运体（system Xc⁻）功能受损^[5]，细胞外胱氨酸无法转移至细胞内合成谷胱甘肽（glutathione, GSH），而GSH的缺少阻滞细胞内脂质氢过氧化物（lipid hydroperoxide, L-OOH）向脂质醇（lipid alcohol, L-OH）还原，导致过量L-OOH堆积，从而干扰Fe²⁺向细胞外转移，最终Fe²⁺的细胞内毒性过载引发神经细胞铁死亡^[6]。

外泌体是一种特殊的细胞外囊泡，直径约30~150 nm，广泛分布于体液，内含蛋白质、脂质、DNA、RNA等物质，其膜为脂质双层结构，表面分布特定的外泌体标志蛋白，如CD9、CD63、CD81，可作为靶向标志物。外泌体作为一种天然的细胞外囊泡，可作为物质运输载体穿过血脑屏障，实现神经细胞间的物质和信息交流。近年来，外泌体在神经保护、脑卒中及再灌注损伤修复等研究中受到广泛关注^[7]。外泌体可来源于多种细胞类型，包括间充质干细胞（mesenchymal stem cells, MSCs）、神经干细胞、免疫细胞及诱导性多能干细胞（induced pluripotent stem cells, iPSCs）等。其中，人羊膜间充质干细胞（human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs）来源的外泌体具有获取方便、免疫原性低、分泌量高和神经保护能力较强的特点^[8]。有研究指出，来源于脑微血管内皮细胞的外泌体可以在缺血再灌注模型中显著抑制神经元凋亡，并延长突触长度，提升突触调控蛋白表达，显示出对神经元的保护和突触重塑作用^[9]。另外，有研究使用人脐静脉内皮细胞来源的外泌体证明，外泌体能够减少细胞炎症因子表达，改善细胞存活，缓解缺血再灌注所致炎症损伤^[10]。近来研究发现，从MSCs获得的外泌体可提高细胞内铁死亡抑

制蛋白1（ferroptosis suppressor protein 1, FSP1）水平，降低活性氧（reactive oxygen species, ROS）、Fe²⁺的积累，抑制神经细胞铁死亡，改善小鼠急性脊髓损伤^[11]。另有研究发现，MSCs来源的外泌体及其内含的miRNA-194可通过抑制转录因子BTB与CNC同源体1（BTB and CNC homolog 1, BACH1），激活核因子-红细胞2相关因子2（nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, NRF2）/血红素加氧酶1（heme oxygenase-1, HO-1）信号通路，缓解神经细胞铁死亡^[12]。

外泌体在急性缺血性脑卒中的发生发展过程中是否通过抑制铁死亡发挥其神经保护效应，以及其分子机制如何，目前尚不完全明了。因此，本研究利用电凝法建立小鼠中动脉闭塞（middle cerebral artery occlusion, MCAO）模型，并向实验组小鼠尾静脉注射外泌体，然后通过Longa神经功能缺损评分、2,3,5-三苯基氯化四氮唑（2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC）染色、HE染色等方法探究外泌体对MCAO小鼠脑梗死及神经细胞的缓解与保护效应；通过检测脑梗死组织中亚铁离子（Fe²⁺）、丙二醛（malondialdehyde, MDA）、总谷胱甘肽（total glutathione, total GSH）、氧化型谷胱甘肽（oxidized glutathione, GSSG）和GSH（即还原型谷胱甘肽），以及铁死亡相关因子包括NRF2、溶质载体家族7成员11（solute carrier family 7 member 11, SLC7A11）和谷胱甘肽过氧化物酶4（glutathione peroxidase 4, GPX4）的表达水平，探究MCAO小鼠脑梗死区域的铁死亡发生情况，以及外泌体对铁死亡调控的分子机制，以期对脑卒中、外泌体和铁死亡相关研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~8周龄SPF级雄性C57BL/6J小鼠32只，体重为20~25 g，购自辽宁长生生物技术股份有限公司[SCXK（辽）2020-0001]，质量合格证编号为210726240101571568、210726240100686636。所有动物于大连医科大学[SYXK（辽）2024-0002]屏障环境内，12 h光照/12 h黑暗环境中适应性饲养1周，相对湿度为55%~60%，温度为（24±2）℃，其间持续

提供清洁饮水和饲料,保持垫料清洁干燥。所有实验均经过大连大学附属新华医院伦理审查委员会审核批准(批号2023-118-01)。

1.2 细胞、试剂和仪器

hAMSCs购自北京恩泽康泰生物科技有限公司;外泌体提取试剂盒(BB-3902)购自上海贝博生物科技有限公司;麻醉用三溴乙醇(M2940)购自南京爱贝生物科技有限公司;TTC染液(G3005)购自北京索莱宝科技有限公司; Fe^{2+} (S1070S)、MDA(S0131S)和GSH测定试剂盒(S0053),TRIzol试剂(R0016),反转录试剂盒(D7168M),荧光染料TB Green(D7503),裂解缓冲液(P0013B),磷酸酶抑制剂(P1045),苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)(ST505),以及BCA蛋白定量试剂盒(P0010)均购自上海碧云天生物技术股份有限公司;PCR用*NRF2*、*SLC7A11*、*GPX4*和*GAPDH*基因引物均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;蛋白质印迹用凝胶试剂盒(KGC4401)、通用型抗体稀释液(KGC4310)、增强型化学发光显色试剂(KGC4601-100)均购自江苏凯基生物技术股份有限公司;蛋白质印迹用*NRF2*(SYP-M2004)、*SLC7A11*(SYP-R1241)、*GPX4*(YP-mAb-07891)、*GAPDH*抗体(SYP-M0946)和辣根过氧化物酶偶联山羊抗兔二抗(YPE800105)均购自深圳市优品生物科技有限公司。

纳米粒度仪(ViewSizer 3000)购自班奈自动化仪表(上海)有限公司;透射电子显微镜(Talos L120C TEM)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;高频手术镊(SJ-1)购自上海玉研科学仪器有限公司;实时荧光定量PCR仪(FQD-96A)购自杭州博日科技股份有限公司;鼓风干燥箱(GZX-9030MBE)购自上海博迅实业有限公司;台式低速离心机(Z206A)购自德国Hermle公司;10 μL 微量进样器购自哈美顿(上海)实验器材有限公司;制冰机(FM-120EE)购自日本Hoshizaki公司;双蒸水仪(A4000D/220)购自英国Techne公司;高压灭菌锅(ES-315)购自Tomy Digital Biology公司;-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱(EW86L628)购自青岛海尔集团;牙科磨头(2.35 mm#3)购自广州必富医疗器械有限公司。

1.3 外泌体提取及鉴定

hAMSCs用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养液培养至第5代^[13]。收集500 mL hAMSCs培养上清液,于2~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。样品在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,依次以3 000 $\times g$ 和

10 000 $\times g$ 速度离心15 min和20 min,分别去除细胞及细胞碎片,每次离心后收集上清液。将获得的上清液转移至外泌体纯化离心管的C(大)内管中,4 000 $\times g$ 离心10~15 min,浓缩至约5~10 mL;加入200 μL 外泌体提取液A,再次以4 000 $\times g$ 离心10~15 min,保留5~10 mL浓缩液。吸取该浓缩液并转移至外泌体纯化离心管的D(小)内管中,加入5 mL外泌体提取液B,于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下11 000~13 000 $\times g$ 离心10~15 min,收集10 mL洗脱液备用。取200 μL 外泌体洗脱液,用透射电子显微镜观察,并使用纳米粒度仪进行粒径分析,即检测洗脱液中外泌体的粒径大小,然后将提取的外泌体置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.4 动物分组与模型制备

采用随机数字表法将小鼠随机分为4组:假手术组(Sham)、模型组(MCAO)、模型+生理盐水组(MCAO+NaCl)、模型+外泌体组(MCAO+EXO),每组8只。MCAO+EXO组小鼠经尾静脉注射100 μL 提取的外泌体(密度为 9.5×10^{11} 个/mL),MCAO+NaCl组小鼠经尾静脉注射100 μL 生理盐水(即0.9%NaCl溶液)。24 h后,将小鼠以10 $\mu\text{L/g}$ 体重的剂量腹腔注射2.5%三溴乙醇麻醉,放在手术台上,右侧卧位,用胶带固定四肢,然后将手术台置于体视显微镜下行造模操作。Sham组小鼠只暴露大脑中动脉,不电凝血管,其余各组小鼠使用高频手术镊以8 W功率电凝大脑中动脉。

参考已报道的电凝法^[14]构建MCAO模型。用手术剪刀沿小鼠左眼外眦与左耳外耳道连线靠近眼睛处做一垂直切口,切口长度以充分暴露颞肌为宜(约2~3 cm)。用高频手术镊以15 W功率电凝颞肌以暴露颅骨,用牙科磨头打磨大脑中动脉所在位置的头骨,直至大脑中动脉透亮可见,用眼科镊揭去最后一层骨膜以充分暴露大脑中动脉,然后用高频手术镊以8 W功率电凝大脑中动脉。大脑中动脉起自颈内动脉,沿侧脑裂向颞叶表面延伸,主干及分支呈红色血管条纹清晰可见。随着持续电凝,大脑中动脉逐渐被阻断,血流供应消失。术后对小鼠缝合手术切口,并将其置于头部向下约30 $^{\circ}$ 的体位,单独饲养于独立笼中,留作观察。

1.5 Longa神经功能缺损评分及脑组织取材

小鼠造模24 h后行Longa神经功能缺损评分^[15],评分依据如下:0分,没有神经功能缺损(活动无异常);1分,轻微神经功能损伤,即拎起小鼠尾巴使其离开地面后,其右前爪无法伸直;2分,中度神经功能

损伤，即小鼠向前运动时向右侧转圈；3分，严重神经功能损伤，即小鼠向前运动时向右侧倾倒；4分，无法自主运动或失去意识。以颈椎脱臼法安乐死小鼠，再行心脏灌注30 mL生理盐水，取出小鼠完整大脑。随后用洁净刀片切取梗死区域及其周围组织，梗死区域体积约占80%，并置于-80℃冰箱中保存。用于HE染色的脑组织置于4%多聚甲醛溶液中固定保存。

1.6 TTC染色评估小鼠脑组织中梗死体积

小鼠脑组织取材后存放于-80℃冰箱定型30 min后取出，用手术刀将脑组织沿冠状位方向切成约2 mm厚的薄片，将脑组织切片放入2% TTC染液中，30℃孵育30 min，每隔5 min摇晃一次，使染色均匀。将染色后的脑组织切片按照层次顺序依次排列成一行，拍照记录并保存。使用ImageJ软件统计脑组织（正常呈红色）总面积和梗死区域（呈白色）的面积，并计算梗死体积占比。梗死体积占比=（白色梗死区域的面积/脑组织总面积）×100%^[16]。

1.7 HE染色观察神经细胞形态

小鼠脑组织置于4%多聚甲醛溶液中固定72 h，PBS冲洗3次以去除残余甲醛后，经梯度乙醇溶液（75%、85%、95%、无水乙醇，各5 min）脱水，并于二甲苯中透明（10 min×2次）。随后在60℃条件下依次置于二甲苯：石蜡等比混合液中浸蜡1 h，再于纯石蜡中浸蜡1 h（2次），完成后进行石蜡包埋并制备厚度为5 μm的切片，贴附于载玻片上备用。切片在60℃恒温箱中烤片1 h后，经二甲苯脱蜡（10 min×2次）及梯度乙醇溶液（无水乙醇、95%、85%、75%，各5 min）复水，蒸馏水水化3 min。随后滴加苏木精染液染色2 min，流水冲洗后用1%盐酸乙醇分化1 s，再经梯度乙醇溶液脱水；接着置于伊红染液中染色

1 min，经95%乙醇溶液和无水乙醇脱水，二甲苯透明（10 min×2次），最后用中性树胶封固。封固后的切片在光学显微镜下观察并拍摄图像，在×40、×100两种放大倍率视野下观察脑组织病理学变化，主要包括是否存在胞体空泡样变性、细胞核固缩或碎裂、核结构清晰度，以及神经元排列的完整性和有序性。

1.8 微量比色法检测脑组织中Fe²⁺、MDA、total GSH、GSSG和GSH含量

造模24 h后，取200 mg小鼠脑组织（梗死区域约占80%）于1.5 mL EP管中。向每100 mg脑组织加入900 μL预冷的裂解缓冲液，在冰浴上使用研磨棒匀浆20~30 s，直至组织完全匀浆，随后在4℃条件下10 000×g离心10 min，收集上清液。用测定试剂盒对小鼠脑组织中Fe²⁺、MDA、total GSH、GSSG含量进行测量，即在520 nm波长处测定样本中Fe²⁺的吸光度值，在532 nm波长处测定样本中MDA的吸光度值，在412 nm波长处测定样本中total GSH和GSSG的吸光度值，然后按照说明书中提供的公式计算各分子含量。GSH的含量为total GSH含量与GSSG含量的差值。

1.9 实时荧光定量PCR测定NRF2、SLC7A11和GPX4 mRNA相对表达水平

取适量小鼠脑梗死区及周围组织，使用TRIzol试剂提取组织总RNA，使用反转录试剂盒合成cDNA，使用无酶水配成终质量浓度为5 ng/μL。实时荧光定量PCR反应体系共10 μL，包括2×TB Green 5 μL、正反向引物各0.5 μL、cDNA 4 μL。反应条件：95℃预变性30 s；95℃变性5 s，60℃退火30 s，共40个循环。以GAPDH作为内参基因，采用2^{-ΔΔCt}法计算NRF2、SLC7A11、GPX4基因的mRNA相对表达量。实时荧光定量PCR引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

Table1 Sequence of primers used in PCR

引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Sequence (5'→3')	产物大小/bp Product size/bp
GAPDH	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG; R: GGGGTCGTTGATGGCAACA	165
NRF2	F: CTTTAGTCAGCGACAGAAGGAC; R: AGGCATCTTGTGGAATGTG	219
SLC7A11	F: CACCGGGGTCGGTTTTCTTA; R: GGCAGATGGCCAAGCTTTTG	200
GPX4	F: CTATGGTCCCATGGAGGAGC; R: AGGCAGACCTTCATGAGTGC	185

注：GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶；NRF2，核因子-红细胞系2相关因子2；SLC7A11，溶质载体家族7成员11；GPX4，谷胱甘肽过氧化物酶4；F，正向引物；R，反向引物。

Note: GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; NRF2, nuclear factor-erythroid 2-related factor 2; SLC7A11, solute carrier family 7 member 11; GPX4, glutathione peroxidase 4; F, forward primer; R, reverse primer.

1.10 蛋白质印迹法测定 NRF2、SLC7A11 和 GPX4 蛋白质相对表达水平

将各组小鼠脑梗死区及其周围组织取出,用预冷的 PBS 漂洗 2~3 次后,每 100 mg 组织加入 1 mL 预冷的裂解缓冲液、10 μ L 磷酸酶抑制剂和 10 μ L PMSF,在冰上充分匀浆裂解。然后于 4 $^{\circ}$ C 条件下 14 000 $\times g$ 离心 10 min,取上清液。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定上清液中蛋白浓度,并用裂解液将各组蛋白调整至 5 μ g/ μ L。取 50 μ g 蛋白样品,加入 1/4 体积的 5 $\times$ 上样缓冲液,混匀后于 100 $^{\circ}$ C 水浴中煮沸 5 min 进行变性。蛋白样品经 10% SDS-PAGE 分离,电泳条件为 80 V 40 min 后调整至 120 V 50 min,直至染料到达胶底部。

电泳结束后,采用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上 (200 mA, 60 min)。转膜完成后,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,随后于 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育一抗过夜。一抗包括抗 NRF2 抗体、抗 SLC7A11 抗体、抗 GPX4 抗体及抗 GAPDH 抗体,均按 1:1 000 稀释。一抗孵育结束后,用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;随后加入山羊抗

兔 IgG 二抗 (1:20 000 稀释),室温孵育 2 h。洗膜后滴加增强型化学发光显影液,在凝胶成像系统暗室条件下进行显影检测。采用 ImageJ 软件对目的蛋白条带的灰度值进行分析,并以 GAPDH 作为内参进行归一化处理。

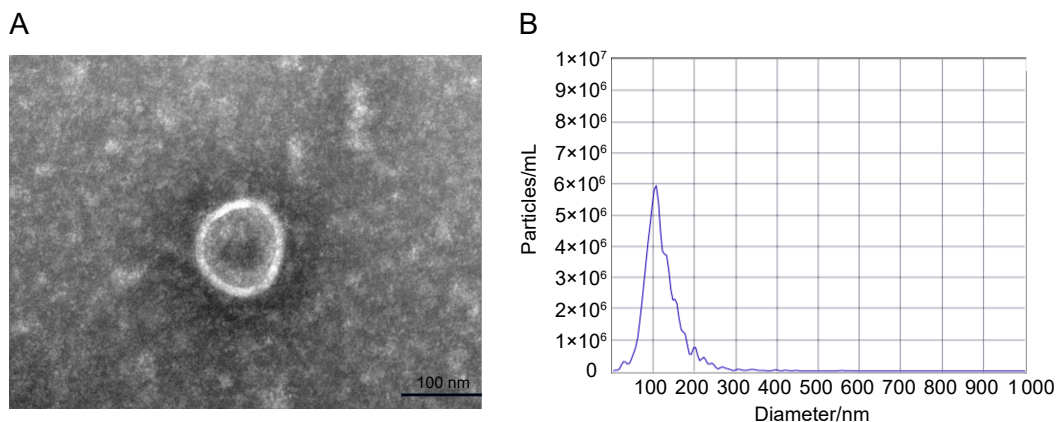
1.11 统计学方法

使用 GraphPad Prism 9.1 软件对实验结果数据进行分析并绘图。数据服从正态分布时,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。服从正态分布且方差齐性的多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 外泌体提取成功且纯度较高

透射电子显微镜下观察可见, hAMSCs 悬液中有大量呈球状的外泌体 (图 1A)。通过粒径分析显示,外泌体直径约 100 nm,且粒径分布集中、杂峰较少。结果提示,外泌体纯度较高,异质性较低 (图 1B)。



注: A, 电镜观测下的外泌体直径约 100 nm, 呈球状 (比例尺为 100 nm); B, 外泌体悬液的粒径分析。

Note: A, Exosome observed under electron microscopy has a diameter of approximately 100 nm and is spherical in shape (the scale bar is 100 nm); B, Particle size analysis of exosome suspension.

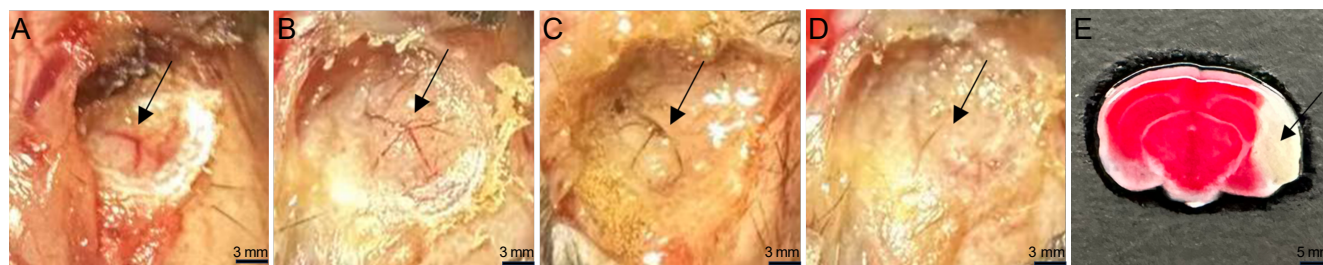
图1 外泌体的电镜观测和粒径分析

Figure 1 Electron microscopic observation and particle size analysis of exosomes

2.2 小鼠 MCAO 模型建立成功且外泌体干预后神经功能缺损减轻

采用电凝法构建 MCAO 小鼠模型 (图 2A~D) 后,脑切片 TTC 染色结果 (图 2E 和图 3B) 显示, MCAO 模型小鼠脑组织中出现明显的白色梗死区域,而 Sham 组未见明显梗死灶,表明通过电凝法成功构建了小鼠 MCAO 模型。为评估 MCAO 模型小鼠的神经功能损伤程度,采用 Longa 神经功能缺损评分法进行行为学评价

(图 3A)。Longa 评分显示: Sham 组得分为 0, MCAO 组小鼠得分为 2.80 ± 0.45 ,说明 MCAO 小鼠的神经功能出现了显著损伤; MCAO+NaCl 组得分 (2.60 ± 0.54) 与 MCAO 组相比的差异无统计学意义 ($P>0.05$),表明外泌体溶剂未干扰实验结果; MCAO+EXO 组 Longa 评分 (1.60 ± 0.54) 显著低于 MCAO 组 ($P<0.01$),表明 hAMSCs 来源的外泌体干预可显著改善 MCAO 模型小鼠的神经功能缺损情况。



注：A，黑色箭头所指为大脑中动脉（MCA），呈Y字型；B，短时间电凝（约2~3 s），血流开始减少；C，继续电凝（累计约5~6 s），血流基本中断；D，充分电凝（累计约8~10 s），血管完全闭塞；E，中动脉闭塞（MCAO）模型组脑切片的2,3,5-三苯基氯化四氮唑（TTC）染色结果，黑色箭头所指白色区域即为梗死区域。A~D图比例尺为3 mm；E图比例尺为5 mm。

Note: A, The black arrow indicates the middle cerebral artery (MCA), which is Y-shaped; B, short-duration electrocoagulation (approximately 2-3 s), during which blood flow begins to decrease; C, continued electrocoagulation (cumulative approximately 5-6 s), with blood flow largely interrupted; D, sufficient electrocoagulation (cumulative approximately 8-10 s), resulting in complete vascular occlusion; E, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining results of brain sections in the middle cerebral artery occlusion (MCAO) model group, the white area indicated by the black arrow is the infarcted area. The scale bar in A-D indicates 3 mm; The scale bar in E indicates 5 mm.

图2 MCAO小鼠模型建立过程中MCA血流变化和脑梗死区TTC染色表现

Figure 2 MCA blood flow changes during MCAO model establishment and TTC staining of the cerebral infarction area

2.3 外泌体对MCAO模型小鼠脑梗死体积的影响

对小鼠脑组织（图3B）中梗死体积占比进行定量分析，结果显示：相比于Sham组无梗死区占比 $[(0.00 \pm 0.00)\%]$ ，MCAO组的梗死体积占比 $[(28.44 \pm 2.10)\%]$ 显著上升（ $P < 0.001$ ），说明MCAO模型构建成功；相较于MCAO组，MCAO+EXO组的梗死体积占比 $[(14.50 \pm 2.93)\%]$ 显著下降（ $P < 0.001$ ，图3C）。

2.4 外泌体对MCAO模型小鼠神经细胞形态的影响

将小鼠脑组织石蜡切片进行HE染色，在 $\times 40$ 视野下可见：与MCAO组相比，MCAO+EXO组脑组织神经元细胞形态规则，排列较为紧密，间质水肿轻微，提示外泌体干预后神经损伤程度减轻，损伤范围缩小，具有保护作用。在 $\times 100$ 视野下可见，与Sham组相比，MCAO组和MCAO+NaCl组小鼠出现神经细胞空泡变性且排列不整齐，而MCAO+EXO组小鼠神经细胞结构较完整，神经元排列较紧密整齐，结构正常的神经元数量增加，表明hAMSCs来源的外泌体干预可显著改善MCAO模型小鼠脑组织的病理学损伤情况，减轻神经元结构破坏（图4）。

2.5 外泌体对梗死区脑组织中 Fe^{2+} 、MDA和GSH含量的影响

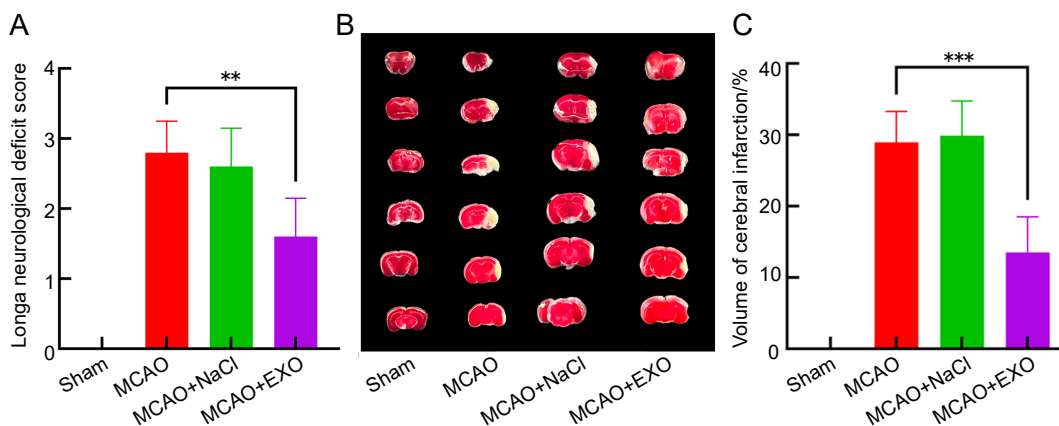
微量比色法检测结果显示：与Sham组小鼠梗死区及其周围脑组织中 Fe^{2+} 含量 $[(0.022 \pm 0.001) \mu\text{mol/g}]$ 相比，MCAO组 Fe^{2+} 含量 $[(0.034 \pm 0.001) \mu\text{mol/g}]$ 显著增

加（ $P < 0.0001$ ）；相较于MCAO组，MCAO+EXO组 Fe^{2+} 含量 $[(0.028 \pm 0.001) \mu\text{mol/g}]$ 显著减少（ $P < 0.01$ ，图5A）。与Sham组小鼠脑组织中MDA含量 $[(4.00 \pm 0.21) \text{nmol/gprot}]$ 相比，MCAO组MDA含量 $[(5.85 \pm 0.32) \text{nmol/gprot}]$ 显著增加（ $P < 0.0001$ ）；相较于MCAO组，MCAO+EXO组MDA含量 $[(4.81 \pm 0.39) \text{nmol/gprot}]$ 显著减少（ $P < 0.01$ ，图5B）。以上结果说明，外泌体可减少MCAO模型小鼠脑组织中 Fe^{2+} 和MDA含量。

相较于Sham组脑组织中total GSH $[(10.62 \pm 0.41) \text{mmol/L}]$ 、GSSG $[(2.00 \pm 0.11) \text{mmol/L}]$ 和GSH含量 $[(7.90 \pm 0.31) \text{mmol/L}]$ ，MCAO组total GSH含量 $[(6.40 \pm 0.10) \text{mmol/L}]$ 、GSSG $[(2.41 \pm 0.12) \text{mmol/L}]$ 和GSH含量 $[(4.02 \pm 0.08) \text{mmol/L}]$ 显著减少（ $P < 0.0001$ ， $P < 0.01$ ，图5C~E）；相较于MCAO组，MCAO+EXO组total GSH含量 $[(7.40 \pm 0.25) \text{mmol/L}]$ 和GSH含量 $[(5.73 \pm 0.38) \text{mmol/L}]$ 显著增加（ $P < 0.001$ ，图5C、E），而GSSG含量无显著差异（ $P > 0.05$ ，图5D）。以上结果表明，外泌体可提升MCAO模型小鼠脑组织中total GSH和GSH水平。

2.6 外泌体对梗死区脑组织中NRF2、SLC7A11、GPX4 mRNA和蛋白表达量的影响

实时荧光定量PCR检测各组小鼠梗死区及其周围脑组织中铁死亡相关抑制分子NRF2、SLC7A11、GPX4的mRNA转录水平，结果显示：相较于Sham组的NRF2、SLC7A11和GPX4 mRNA相对水平（分别为 0.92 ± 0.18 、 1.17 ± 0.04 和 1.04 ± 0.14 ），MCAO组的



注：A，各组小鼠神经功能Longa评分；B，各组小鼠脑切片的2,3,5-三苯基氯化四氮唑（TTC）染色结果，每列6张切片为1只小鼠的完整大脑，正常脑组织为红色，梗死区域脑组织为白色；C，各组小鼠脑梗死体积占比。假手术组（Sham）只暴露大脑中动脉，不电凝血管；模型组（MCAO）使用高频手术镊以8 W功率电凝大脑中动脉；模型+生理盐水组（MCAO+NaCl）先通过尾静脉注射100 μ L生理盐水，然后进行电凝法造模；模型+外泌体组（MCAO+EXO）先通过尾静脉注射100 μ L来自人羊膜间充质干细胞（hAMSCs）培养上清液的外泌体（ 9.5×10^{11} 个/mL），然后进行电凝法造模。每组小鼠各8只，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

Note: A, Neurological Longa scores of each group of mice; B, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining results of brain sections in each group of mice, each column contains six slices representing the complete brain of one mouse, normal brain tissue was red, while brain tissue in the infarcted area was white; C, The percentages of brain infarction volume in each group of mice. The sham operation group (Sham) only exposed the middle cerebral artery without electrocoagulation of the vessel; the model group (MCAO) used high-frequency surgical forceps to electrocoagulate the middle cerebral artery at a power of 8 W; the model + normal saline group (MCAO+NaCl) first injected 100 μ L of normal saline through the tail vein, and then performed electrocoagulation modeling; the model + exosome group (MCAO+EXO) first injected 100 μ L of exosomes (9.5×10^{11} particles per mL) from the culture supernatant of human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSCs) through the tail vein, and then performed electrocoagulation modeling. There were eight mice in each group. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图3 各组小鼠神经功能缺损评分及脑梗死体积占比分析

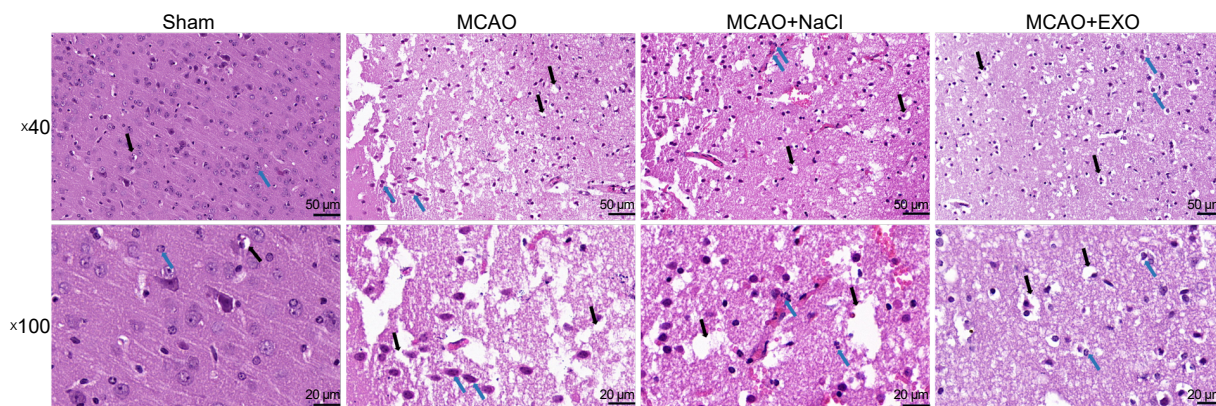
Figure 3 Analysis of neurological deficit scores and the percentages of cerebral infarction volume in each group of mice

NRF2、SLC7A11和GPX4 mRNA相对水平（分别为 0.30 ± 0.04 、 0.33 ± 0.04 和 0.36 ± 0.15 ）均显著降低（ $P < 0.01$ ）；相较于MCAO组，MCAO+EXO组的NRF2、SLC7A11和GPX4 mRNA相对水平（分别为 0.77 ± 0.10 、 0.67 ± 0.09 和 0.84 ± 0.11 ）显著升高（ $P < 0.05$ ，图6A~C）。以上结果表明，外泌体可促进MCAO模型小鼠铁死亡抑制分子NRF2、SLC7A11、GPX4的mRNA转录。

蛋白质印迹法检测小鼠脑梗死区及周围脑组织内NRF2、SLC7A11和GPX4蛋白表达水平，结果显示：MCAO组NRF2、SLC7A11和GPX4的蛋白相对表达量（分别为 0.73 ± 0.05 、 0.63 ± 0.01 和 0.60 ± 0.04 ）较Sham组（分别为 0.99 ± 0.01 、 0.90 ± 0.01 和 0.97 ± 0.04 ）显著降低（ $P < 0.001$ ）；MCAO+EXO组NRF2、SLC7A11和GPX4的蛋白相对表达量（分别为 0.85 ± 0.05 、 0.76 ± 0.05 和 0.76 ± 0.01 ）较MCAO组显著升高（ $P < 0.05$ ，图6D~G）。这与实时荧光定量PCR结果一致，说明外泌体可在mRNA、蛋白质两个层面，促进MCAO小鼠铁死亡相关抑制分子NRF2、SLC7A11和GPX4的表达，从而抑制神经细胞铁死亡。

3 讨论

脑卒中引发的神经损伤涉及多种机制，如细胞兴奋性毒性、氧化应激、细胞凋亡、神经炎症、血脑屏障损伤等^[17]。此外，铁死亡在近年来越来越受到研究者的重视。铁死亡是细胞程序性死亡的一种独特形式，其特征表现为脂质过氧化和ROS在细胞内蓄积。与3种主要类型的细胞程序性死亡（凋亡、坏死性凋亡和焦亡）不同，铁死亡没有特异性调节基因或蛋白质，而是由多种信号通路互相作用的综合结果^[18]。研究发现，外泌体可通过内含物调控细胞铁死亡，脂肪干细胞来源的外泌体可通过激活KEAP1/NRF2/GPX4通路减轻肺微血管内皮细胞的铁死亡^[19]；MSCs来源的外泌体可通过增强SLC7A11的稳定性，减少肝细胞铁死亡^[20]。本研究通过Longa神经功能评分和TTC染色评估发现，hAMSCs来源的外泌体显著改善MCAO小鼠神经功能，并减少脑梗死面积，提示外泌体对神经细胞损伤具有保护作用，可以改善小鼠神经功能。为探究外泌体保护神经细胞的作用机制，本研究检测了铁死

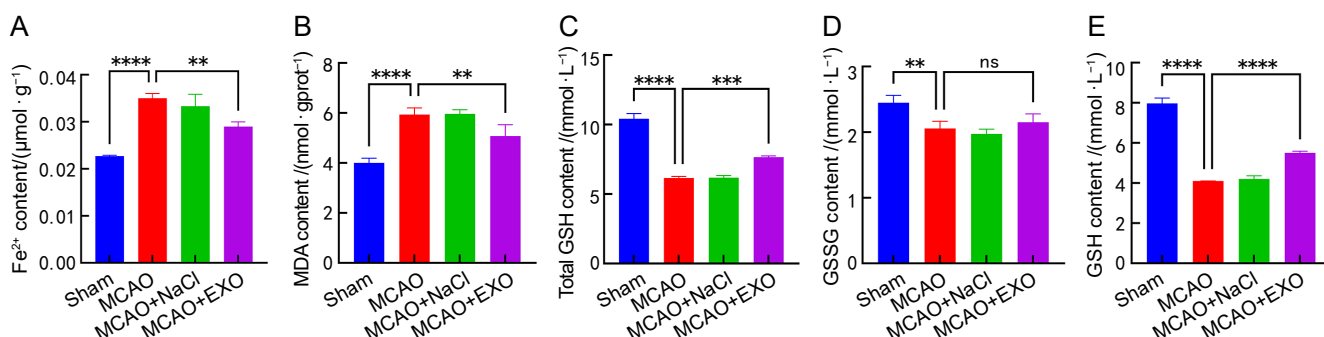


注：假手术组（Sham）只暴露大脑中动脉，不电凝血管；模型组（MCAO）使用高频手术镊以8 W功率电凝大脑中动脉；模型+生理盐水组（MCAO+NaCl）先通过尾静脉注射100 μ L生理盐水，然后进行电凝法造模；模型+外泌体组（MCAO+EXO）先通过尾静脉注射100 μ L来自人羊膜间充质干细胞（hAMSCs）培养上清液的外泌体（ 9.5×10^{11} 个/mL），然后进行电凝法造模。图中第1行 $\times 40$ 视野比例尺为50 μ m，第2行 $\times 100$ 视野比例尺为20 μ m。黑色箭头所指为细胞质空泡变性区域，蓝色箭头所指为细胞核固缩、碎裂区域。

Note: The sham operation group (Sham) only exposed the middle cerebral artery without electrocoagulation of the vessel; the model group (MCAO) used high-frequency surgical forceps to electrocoagulate the middle cerebral artery at a power of 8 W; the model + normal saline group (MCAO+NaCl) first injected 100 μ L of normal saline through the tail vein, and then performed electrocoagulation modeling; the model + exosome group (MCAO+EXO) first injected 100 μ L of exosomes (9.5×10^{11} particles per mL) from the culture supernatant of human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSCs) through the tail vein, and then performed electrocoagulation modeling. The scale bar of the $\times 40$ field of view in the first row of the figure is 50 μ m, and the scale bar of the $\times 100$ field of view in the second row is 20 μ m. The area indicated by the black arrow is the region of cytoplasmic vacuolar degeneration, and the area indicated by the blue arrow is the region of nuclear pyknosis and fragmentation.

图4 各组小鼠脑组织切片HE染色观察神经细胞形态

Figure 4 HE staining of brain tissue sections from each group of mice to observe neuronal morphology

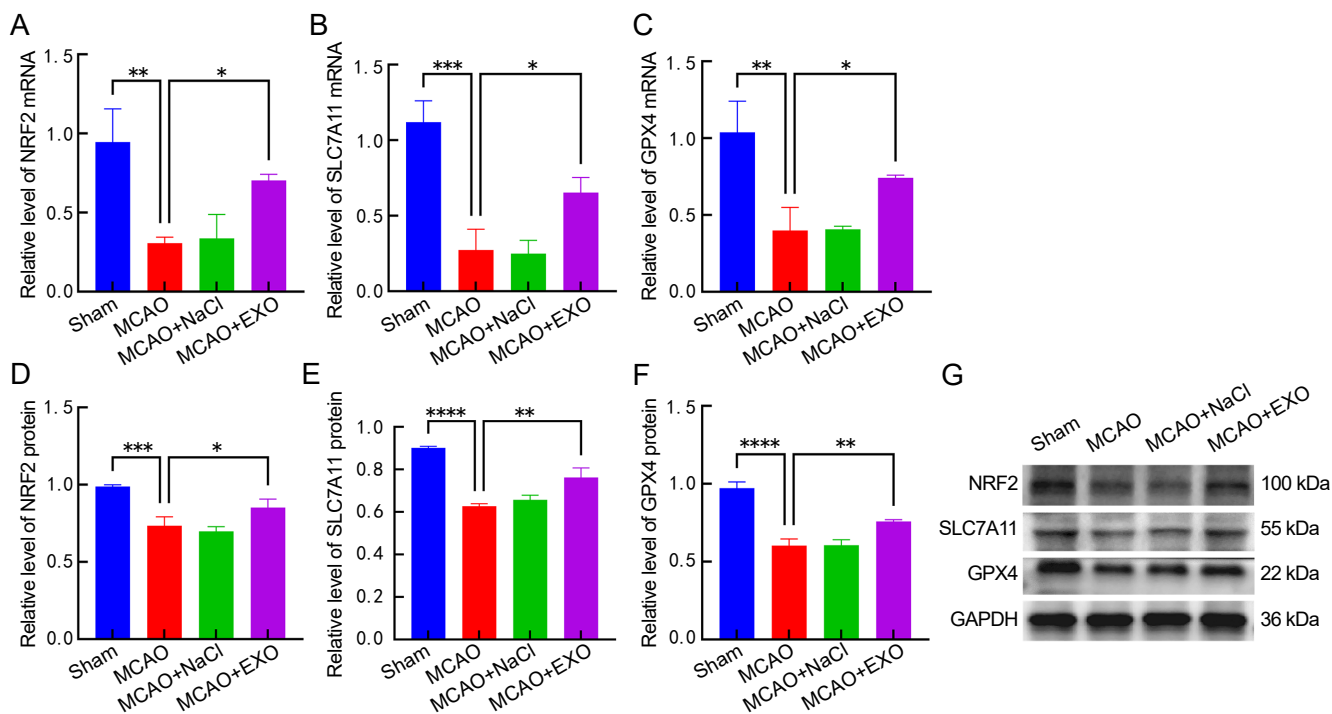


注：A~E，各组小鼠脑组织中亚铁离子（ Fe^{2+} ）、丙二醛（MDA）、总谷胱甘肽（total GSH）、氧化型谷胱甘肽（GSSG）和还原型谷胱甘肽（GSH，即total GSH和GSSG含量的差值）含量分析。假手术组（Sham）只暴露大脑中动脉，不电凝血管；模型组（MCAO）使用高频手术镊以8 W功率电凝大脑中动脉；模型+生理盐水组（MCAO+NaCl）先通过尾静脉注射100 μ L生理盐水，然后进行电凝法造模；模型+外泌体组（MCAO+EXO）先通过尾静脉注射100 μ L来自人羊膜间充质干细胞（hAMSCs）培养上清液的外泌体（ 9.5×10^{11} 个/mL），然后进行电凝法造模。每组小鼠各8只， $^{ns}P > 0.05$ ， $^{**}P < 0.01$ ， $^{***}P < 0.001$ ， $^{****}P < 0.0001$ 。

Note: A-E, Contents of Fe^{2+} , malondialdehyde (MDA), total glutathione (total GSH), oxidized glutathione (GSSG), and reduced glutathione (GSH) in the brains of mice from each group. Reduced GSH was calculated as the difference between the contents of total GSH and GSSG. The sham operation group (Sham) only exposed the middle cerebral artery without electrocoagulation of the vessel; the model group (MCAO) used high-frequency surgical forceps to electrocoagulate the middle cerebral artery at a power of 8 W; the model + normal saline group (MCAO+NaCl) first injected 100 μ L of normal saline through the tail vein, and then performed electrocoagulation modeling; the model + exosome group (MCAO+EXO) first injected 100 μ L of exosomes (9.5×10^{11} particles per mL) from the culture supernatant of human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSCs) through the tail vein, and then performed electrocoagulation modeling. There were eight mice in each group. $^{ns}P > 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$.

图5 各组小鼠脑组织中 Fe^{2+} 、MDA、total GSH、GSSG和GSH含量的微量比色法分析结果

Figure 5 Microcolorimetric assays of Fe^{2+} , MDA, total GSH, GSSG and GSH contents in the brains of each group of mice



注：A-C，各组小鼠脑组织中核因子-红细胞系2相关因子2（NRF2）、溶质载体家族7成员11（SLC7A11）和谷胱甘肽过氧化物酶4（GPX4）的mRNA转录水平分析；D-F，各组小鼠脑组织中NRF2、SLC7A11和GPX4蛋白相对表达量分析；G，各组小鼠脑组织中NRF2、SLC7A11、GPX4和GAPDH的蛋白印迹结果图。假手术组（Sham）只暴露大脑中动脉，不电凝血管；模型组（MCAO）使用高频手术镊以8 W功率电凝大脑中动脉；模型+生理盐水组（MCAO+NaCl）先通过尾静脉注射100 μ L生理盐水，然后进行电凝法造模；模型+外泌体组（MCAO+EXO）先通过尾静脉注射100 μ L来自人羊膜间充质干细胞（hAMSCs）培养上清液的外泌体（ 9.5×10^{11} 个/mL），然后进行电凝法造模。每组小鼠各8只，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，**** $P < 0.0001$ 。

Note: A-C, mRNA transcription levels of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (NRF2), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), and glutathione peroxidase 4 (GPX4) in the brains of mice from each group. D-F, Relative protein expression levels of NRF2, SLC7A11, and GPX4 in the brains of mice from each group. G, Western blotting images of NRF2, SLC7A11, GPX4, and GAPDH. The sham operation group (Sham) only exposed the middle cerebral artery without electrocoagulation of the vessel; the model group (MCAO) used high-frequency surgical forceps to electrocoagulate the middle cerebral artery at a power of 8 W; the model + normal saline group (MCAO+NaCl) first injected 100 μ L of normal saline through the tail vein, and then performed electrocoagulation modeling; the model + exosome group (MCAO+EXO) first injected 100 μ L of exosomes (9.5×10^{11} particles per mL) from the culture supernatant of human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSCs) through the tail vein, and then performed electrocoagulation modeling. There were eight mice in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

图6 各组小鼠脑组织中NRF2、SLC7A11、GPX4 mRNA及蛋白表达检测分析结果

Figure 6 Detection and analysis of mRNA and protein expression of NRF2, SLC7A11 and GPX4 in the brains of each group of mice

亡相关指标 Fe^{2+} 、MDA、total GSH、GSSG、GSH的含量，结果发现MCAO+EXO组小鼠的上述指标相较MCAO模型小鼠都发生了显著改善。进一步的分子机制研究提示，NRF2/SLC7A11/GPX4抗氧化通路的激活可能是外泌体发挥神经保护效应的重要原因。

外泌体是一类直径约30~150 nm的细胞外囊泡，可来源于多种细胞类型，如MSCs、神经干细胞、免疫细胞及iPSCs等。常用的外泌体分离方法包括超速离心、密度梯度离心、聚合物沉淀法、尺寸排阻过滤及免疫亲和法等。本研究在细胞来源和分离策略上具有独到之处：选择hAMSCs不仅具备神经保护潜力、低

免疫原性和伦理可行性，也特别适合脑缺血或神经损伤研究；而外泌体分离采用了多步组合策略，包括初步离心和过滤、切向流过滤浓缩、快速外泌体/细胞外囊泡纯化柱尺寸排阻纯化以及0.22 μ m洗脱，不仅兼顾了产量和纯度，也保证了外泌体的结构完整性，比传统方法更适合大规模制备和临床应用。同时，对于MCAO模型的构建，相较于传统的线栓法^[21]，本研究采用了操作更便捷的电凝法，全程在显微镜下操作，确保仅凝闭大脑中动脉干，不影响颈内动脉其他分支，保证局灶性缺血而非大面积梗死。此法更适合中动脉较细的小鼠等模式动物，后续通过Longa评分及TTC染

色进一步证实了该法的有效性。

Longa 神经功能缺损评分可用于 MCAO 模型建立后小鼠神经功能损伤程度的评价。本研究发现 MCAO+EXO 组小鼠的 Longa 评分显著低于 MCAO 组小鼠,提示 MCAO+EXO 组小鼠的运动能力在外泌体干预后得到显著改善。

TTC 染色可测定脑组织梗死体积。本研究发现 MCAO+EXO 组小鼠脑梗死体积占比显著低于 MCAO 组,表明外泌体可抑制脑神经细胞死亡,减少脑缺血梗死体积。但实验中有少许 MCAO+EXO 组小鼠的 Longa 评分和 TTC 染色梗死体积与 MCAO 组小鼠相比差异较小,这可能与 MCAO 造模手术操作的微小差异、外泌体在脑组织中的分布和吸收效率差异、缺血严重程度的轻微差异等因素有关。后续研究需尽可能扩大样本量,以避免上述因素对实验结果分析的干扰。

本研究通过 HE 染色观察了脑缺血梗死区神经细胞的形态,结果发现:相较于 MCAO 组小鼠, MCAO+EXO 组小鼠神经细胞结构更为完整,细胞核大而规整且位于细胞中央,神经元排列紧密、整齐,正常结构的神经元数量增加。神经细胞形态结果表明,外泌体干预可减少 MCAO 模型小鼠的神经细胞损伤。

Fe^{2+} 、MDA、total GSH、GSSG 和 GSH 是监测铁死亡的常用指标。本研究发现, MCAO+EXO 组小鼠的 total GSH 含量相较于 MCAO 组小鼠显著升高,推测主要原因是细胞内 total GSH 合成增多。MCAO+EXO 组小鼠神经细胞内 GSSG 水平较 MCAO 组无显著差异,可能原因是外泌体干预加速了 GSSG 还原以抵抗氧化应激损伤。MCAO+EXO 组小鼠脑组织中 Fe^{2+} 和 MDA 含量显著低于 MCAO 组,表明外泌体可抑制脑梗引发的神经细胞铁死亡过程。

NRF2 是细胞内重要的抗氧化转录因子。NRF2 通过与抗氧化反应元件结合,调控多种抗氧化基因如 NAD(P)H: 醌氧化还原酶 1、谷胱甘肽合成酶催化亚基/调节亚基和硫氧还蛋白还原酶 1 的转录,在缺血性脑损伤中对抗氧化应激发挥重要作用^[22]。NRF2 激活后可防止神经元线粒体去极化、ATP 耗竭和呼吸功能受损,保护个体免受脑缺血损伤^[23]。SLC7A11 是 Xc^- 的重要组成部分,负责将细胞外胱氨酸转移至细胞内,促进半胱氨酸及后续 GSH 的合成。GPX4 以 GSH 为辅因子,可催化细胞内 L-OOH 还原为 L-OH,是细胞内重要的抗氧化酶。在发生缺血性脑卒中时,神经细胞中 SLC7A11、GPX4 表达上调,可防止细胞内 ROS 积累并抑制铁死亡,从而减少脑缺血性损伤^[24-25]。本研究

在 mRNA、蛋白两个水平上同时发现, MCAO+EXO 组的 NRF2、SLC7A11、GPX4 表达水平均显著高于 MCAO 组,表明外泌体可通过激活 NRF2/SLC7A11/GPX4 通路,减少 MCAO 模型小鼠脑神经细胞铁死亡。

本研究尚有不足,如未揭示不同细胞来源外泌体、不同给药方式(如鼻腔给药、侧脑室注射给药、腹腔给药)等因素对外泌体抑制神经细胞损伤疗效的影响及其机制,未明确外泌体抑制神经细胞铁死亡的具体有效成分(如 microRNA),这些均有待后续深入研究。

综上所述,本研究证实了在小鼠 MCAO 模型中,尾静脉注射 hAMSCs 来源的外泌体可改善小鼠运动功能,减少脑梗死面积,维护神经细胞形态,降低神经损伤程度;初步的机制研究提示,外泌体可通过激活 NRF2/SLC7A11/GPX4 通路,减少 MCAO 模型小鼠的神经细胞铁死亡。本研究结果可能为今后缺血性脑卒中的临床治疗提供理论参考。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的动物实验均已通过大连大学附属新华医院伦理审查委员会审查批准(批号:2023-118-01)。所有实验过程遵照中国实验动物相关法律条例要求进行,包括《实验动物管理条例》、《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018)等。

All animal experiments in this study were reviewed and approved by the Ethics Committee of Xinhua Hospital Affiliated to Dalian University (Approval No. 2023-118-01). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to laboratory animals, including the *Regulations on the Administration of Laboratory Animals*, *Guidelines for Ethical Review of Laboratory Animal Welfare* (GB/T 35892—2018), and so on.

[作者贡献 Author Contribution]

徐英韬负责动物实验、初稿撰写及论文修改;
王蒙蒙负责实验数据检测;
林平负责实验数据分析;
迟海涛负责实验设计;
王怡负责实验监督与指导;
白鹰负责项目管理及论文最终修订。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] ZHU Z B, SHI M Y, YU Q, et al. Burden and risk factors of stroke worldwide and in China: An analysis from the Global Burden of Disease Study 2021[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2025, 138 (20):2588-2595. DOI: 10.1097/CM9.0000000000003778.
- [2] GREEN T L, MCNAIR N D, HINKLE J L, et al. Care of the

- patient with acute ischemic stroke (posthyperacute and prehospital discharge): update to 2009 comprehensive nursing care scientific statement: a scientific statement from the American heart association[J]. *Stroke*, 2021, 52(5): e179-e197. DOI:10.1161/STR.0000000000000357.
- [3] QIN C, YANG S, CHU Y H, et al. Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1):215. DOI:10.1038/s41392-022-01064-1.
- [4] TUO Q Z, LEI P. Ferroptosis in ischemic stroke: Animal models and mechanisms[J]. *Zool Res*, 2024, 45(6): 1235-1248. DOI:10.24272/j.issn.2095-8137.2024.239.
- [5] ZHANG Y F, LU X Y, TAI B, et al. Ferroptosis and its multifaceted roles in cerebral stroke[J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15:615372. DOI: 10.3389/fncel.2021.615372.
- [6] JIANG X J, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4):266-282. DOI:10.1038/s41580-020-00324-8.
- [7] YANG Y P, NICOL C J B, CHIANG M C. A review of the neuroprotective properties of exosomes derived from stem cells and exosome-coated nanoparticles for treating neurodegenerative diseases and stroke[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(8):3915. DOI: 10.3390/ijms26083915.
- [8] SONG Y, ZHANG T, SHI P, et al. Exosomes derived from human amniotic mesenchymal stem cells promotes angiogenesis in hUVECs by delivering novel miRNA N-194[J]. *Mol Med*, 2025, 31:173. DOI:10.1186/s10020-025-01192-8.
- [9] SUN J, YUAN Q, GUO L, et al. Brain microvascular endothelial cell-derived exosomes protect neurons from ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15(10):1287. DOI:10.3390/ph15101287.
- [10] QIN J, ZHOU L, YU L, et al. Exosomes derived from HUVECs alleviate ischemia-reperfusion induced inflammation in neural cells by upregulating KLF14 expression[J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1365928. DOI: 10.3389/fphar. 2024. 1365928.
- [11] CHEN Y X, LI B F, QUAN J, et al. Inhibition of ferroptosis by mesenchymal stem cell-derived exosomes in acute spinal cord injury: role of Nrf2/GCH1/BH4 axis[J]. *Neurospine*, 2024, 21(2):642-655. DOI:10.14245/ns.2448038.019.
- [12] LI X, ZHANG X, LIU Y J, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells ameliorate oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal injury via transferring microRNA-194 and targeting Bach1[J]. *Tissue Cell*, 2021, 73:101651. DOI:10.1016/j.tice.2021.101651.
- [13] HUO S Z, SHI P, PANG X N. Culture and identification of human amniotic mesenchymal stem cells[J]. *Chin Med Sci J*, 25(4):211-214. DOI: 10.1016/s1001-9294(11)60004-7.
- [14] WANG M M, BAI Y, CHI H T, et al. miR-451 protects against ischemic stroke by targeting Phd3[J]. *Exp Neurol*, 2021, 343: 113777. DOI:10.1016/j.expneurol.2021.113777.
- [15] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91. DOI: 10.1161/01.str.20.1.84.
- [16] SWANSON R A, MORTON M T, TSAO-WU G, et al. A semiautomated method for measuring brain infarct volume [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1990, 10(2): 290-293. DOI: 10.1038/jcbfm.1990.47.
- [17] LI C, LUO Y P, LI S G, et al. Mechanistic insights of neuronal death and neuroprotective therapeutic approaches in stroke [J]. *Neural Regen Res*, 2025, 21(3):869-886. DOI:10.4103/NRR. NRR-D-24-01324.
- [18] TANG D L, 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.
- [19] SHEN K, WANG X J, WANG Y W, 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.
- [20] LIN F Y, CHEN W Y, ZHOU J H, et al. Mesenchymal stem cells protect against ferroptosis via exosome-mediated stabilization of SLC7A11 in acute liver injury[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(3):271. DOI:10.1038/s41419-022-04708-w.
- [21] 邢凤英, 周颖, 马政文, 等. 线栓法大鼠大脑中动脉缺血模型的评价方法初探[J]. *实验动物与比较医学*, 2013, 33(5): 339-346. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2013.05.003.
- XING F Y, ZHOU Y, MA Z W, et al. Preliminary study for evaluation system of rat permanent cerebral artery occlusion model by intraluminal suture method[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2013, 33(5): 339-346. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2013. 05.003.
- [22] SUN Y, YANG X, XU L, et al. The role of Nrf2 in relieving cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Curr Neuroparmacol*, 2023, 21(6): 1405-1420. DOI: 10.2174/1570159X2166622112910 0308.
- [23] VILLAVICENCIO-TEJO F, OLESEN M A, ARÁNGUIZ A, et al. Activation of the Nrf2 pathway prevents mitochondrial dysfunction induced by caspase-3 cleaved Tau: implications for Alzheimer's disease[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(3):515. DOI: 10.3390/antiox11030515.
- [24] LIU H, ZHANG T A, ZHANG W Y, et al. Rhein attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury via inhibition of ferroptosis through NRF2/SLC7A11/GPX4 pathway[J]. *Exp Neurol*, 2023, 369:114541. DOI:10.1016/j.expneurol.2023.114541.
- [25] FU C, WU Y F, LIU S J, et al. Rehmannioside A improves cognitive impairment and alleviates ferroptosis via activating PI3K/AKT/Nrf2 and SLC7A11/GPX4 signaling pathway after ischemia[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 289:115021. DOI:10.1016/j.jep.2022.115021.
- (收稿日期: 2025-03-04 修回日期: 2025-06-13)
(本文编辑: 张俊彦, 陈毅)
- [引用本文]**
徐英韬, 王蒙蒙, 林平, 等. 外泌体通过 NRF2/SLC7A11/GPX4 通路调控铁死亡治疗小鼠缺血性脑卒中[J]. *实验动物与比较医学*, 2026, 46(1): 20-31. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2025.034.
- XU Y T, WANG M M, LIN P, et al. Exosomes treat ischemic stroke by regulation of ferroptosis through the NRF2/SLC7A11/GPX4 pathway in mice[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2026, 46(1): 20-31. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2025.034.