

# 间充质干细胞对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠铁死亡的影响

刘海霞,皇甫莎莎,桑晓玉,崔东清,毕建忠,王萍

(山东大学第二医院神经内科,山东 济南 250033)

**摘要:**目的 探讨间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)治疗对实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)小鼠铁死亡状况及关键调控蛋白表达的影响。方法 记录每日小鼠体质量和行为表现,切片染色观察小鼠脊髓中炎症及脱髓鞘情况。通过检测还原型谷胱甘肽还原酶(reduced glutathione, GSH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)及总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)观察小鼠组织中铁死亡状况,并检测转铁蛋白受体-1(transferrin receptor 1, TFR1)、酰基辅酶A合酶-4(acyl-CoA synthetase long-chain family 4, ACSL4)、谷胱甘肽过氧化物酶-4(glutathione peroxidase 4, GPX4)及铁死亡抑制蛋白1(ferroptosis suppressor protein, FSP1)等调控蛋白的表达。结果 MSCs可以有效改善EAE小鼠体质量下降和症状表现。病理水平上,MSCs注射可以改善小鼠脊髓中炎症细胞浸润及脱髓鞘。MSCs注射后,EAE小鼠脊髓和脑GSH含量升高( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ )、脊髓T-SOD活力升高( $P<0.01$ ),脑中MDA含量下降( $P<0.05$ )。MSCs治疗可以降低EAE小鼠脊髓和脑中TFR1( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )、ACSL4蛋白表达( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ ),提高脊髓和脑中FSP1蛋白表达( $P$ 均 $<0.05$ )和脑中GPX4蛋白表达( $P<0.05$ )。结论 MSCs通过调节铁代谢、脂代谢和促进活性氧清除来抑制EAE小鼠中铁死亡,发挥治疗作用。

**关键词:**多发性硬化;实验性自身免疫性脑脊髓炎;间充质干细胞;铁死亡;铁代谢

中图分类号:R741 文献标志码:A

## Effects of mesenchymal stem cells on ferroptosis in experimental autoimmune encephalomyelitis mice

LIU Haixia, HUANGFU Shasha, SANG Xiaoyu, CUI Dongqing, BI Jianzhong, WANG Ping

(Department of Neurology, The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, Shandong, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of mesenchymal stem cells (MSCs) treatment on ferroptosis and expressions of key regulatory proteins in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice. **Methods** The body weights and symptom scores of mice were evaluated daily. To assess conditions of inflammation and myelination in spinal cord, the sections were respectively stained. The contents of reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and total superoxide dismutase (T-SOD) were tested to detect ferroptosis. The protein expressions of transferrin receptor 1 (TFR1), acyl-CoA synthetase long-chain family 4 (ACSL4), glutathione peroxidase 4 (GPX4) and ferroptosis suppressor protein 1 (FSP1) were detected with Western blotting. **Results** MSCs treatment alleviated weight loss and symptoms of EAE mice. Pathologically, MSCs improved infiltration of inflammatory cells and remyelination of mice. MSCs upregulated the contents of GSH in spinal cord and brain ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), as well as T-SOD in spinal cord ( $P<0.01$ ), and downregulated MDA concentration in brain ( $P<0.05$ ). Besides, MSCs reduced the protein expressions of TFR1 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and ACSL4 ( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ ), increased the protein expressions of FSP1 (both  $P<0.05$ ) in

spinal cord and brain. Also, the protein expression of GPX4 in brain was promoted after MSCs treatment ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** MSCs play a therapeutic role in inhibiting ferroptosis in EAE mice by regulating iron metabolism, lipid metabolism and promoting reactive oxygen species clearance.

**Key words:** Multiple sclerosis; Experimental autoimmune encephalomyelitis; Mesenchymal stem cells; Ferroptosis; Iron metabolism

多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)是继创伤之后,造成年轻人永久残疾的第二大病因<sup>[1]</sup>。流行病学调查显示,2020年全球约有280万青年人患病,造成了沉重的社会负担。然而,当前的主要治疗策略——疾病修饰治疗效果并不理想,无法有效阻止MS的症状发展<sup>[2]</sup>。近年来,以间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)为代表的细胞疗法因其独特的免疫调节和神经保护作用成为治愈MS的最有希望的方法<sup>[3]</sup>。

铁死亡是一种脂质过氧化介导的细胞死亡形式,由铁过量和谷胱甘肽抗氧化剂途径缺陷引发<sup>[4]</sup>。作为一种新型细胞程序性细胞死亡方式,铁死亡在MS疾病机制中的作用也引起了广泛关注。然而,MSCs治疗对MS中铁死亡的调控作用仍不清楚。因此,本研究拟利用实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)小鼠模型,探讨MSCs对MS中铁死亡状况及关键调控蛋白表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞

人脐带血MSCs由山东万能干细胞生物技术有限公司(中国淄博)提供。

#### 1.1.2 动物

自北京华阜康生物科技股份有限公司购得6~8周雌性C57BL/6小鼠18只,体质量18~20g,饲养于山东大学第二医院动物实验中心。适应化饲养1周后,将小鼠随机分为3组,分别为对照组、EAE组和MSC组,每组6只。在EAE小鼠出现症状后,尾静脉注射0.1 mL含 $1 \times 10^6$ 个MSCs的细胞悬液或PBS溶液,于免疫后的第21天处死小鼠获取样本。实验鼠及实验方法均通过山东大学第二医院科研伦理委员会审查批准(KYLL2024365)。

#### 1.1.3 主要试剂

完全弗氏佐剂、百日咳毒素及化学发光HRP底物购自美国Sigma-Aldrich公司;h37Ra结核分枝杆菌菌素购自美国Difco公司;MOG35-55购自吉尔

生化(上海)有限公司;苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosinstaining, HE)试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司;克劳蓝染色试剂盒购自武汉赛维尔生物科技有限公司;还原型谷胱甘肽比色法测试盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司;总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)测定试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测试盒购自南京建成生物工程研究所;铁蛋白受体-1(transferrin receptor 1, TFR1)抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;谷胱甘肽过氧化物酶-4(glutathione peroxidase 4, GPX4)、铁死亡抑制蛋白1(ferroptosis suppressor protein 1, FSP1)及酰基辅酶A合酶-4(acyl-CoA synthetase long-chain family 4, ACSL4)抗体购自美国Abcam公司;预染蛋白Marker购自美国Thermo公司;辣根酶标记山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

#### 1.1.4 主要仪器

石蜡切片机(Leica公司,德国);数字切片扫描仪(滨松,日本);酶标仪(Thermo公司,美国);电泳仪(BIORAD公司,美国);全自动化学发光成像分析系统(天能,中国上海)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 EAE小鼠模型构建

小鼠适应化饲养1~2周后,皮下注射完全弗氏佐剂(含4 mg/mL的h37Ra结核分枝杆菌菌素)与MOG35-55(3 mg/mL)溶液的等比混合乳剂,并于第0天和第2天腹腔注射500 ng百日咳毒素溶液(1  $\mu$ g/mL),建立EAE小鼠模型。

#### 1.2.2 HE染色

小鼠取材固定后进行石蜡切片,梯度乙醇脱蜡水化。苏木素染液染色3~10 min,冲洗5~10 s。浸入分化液中1~5 s,冲洗20~30 s。伊红染色30 s,冲洗1~5 s。脱水透明,中性树胶封固后观察。

#### 1.2.3 LFB染色

小鼠取材固定后进行石蜡切片,梯度乙醇脱蜡水化。髓鞘染液A 65  $^{\circ}$ C烘箱中预热30 min后,将组织切片放置其中4 h,拿出后冷却冲洗。将切片迅速交替在髓鞘染液B中分化5 s、髓鞘染液C中分化10 s。待髓鞘背景近无色,水洗。脱水透明,中性树胶封固后观察。

### 1.2.4 还原型谷胱甘肽还原酶(reduced glutathione, GSH)检测

取组织样本,制成匀浆(介质为生理盐水)后,离心取上清,并用BCA法测定上清蛋白浓度,按需稀释。将上清液与酸试剂等比混匀离心,取上清。向各孔中分别加入100 μL酸试剂溶液、GSH标准溶液、上清液,设定其为测定空白、测定、标准孔。所有孔中加入25 μL二硫代二硝基苯甲酸[5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid),DTNB]溶液、100 μL磷酸盐溶液。酶标仪振板1 min,静置5 min,测定405 nm处OD值。按照公式计算GSH含量。

### 1.2.5 T-SOD检测

如前所述,制备组织匀浆、测定蛋白浓度,并按需稀释。按照说明书配制溶液,混合后,分别加入蒸馏水和样品,设定为对照管和测定管。用旋涡混匀,置37℃恒温水浴40 min。加入显色剂,混匀,室温放置10 min。酶标仪测定其在550 nm处吸光度。按照公式计算T-SOD活力。

### 1.2.6 MDA检测

如前所述,制备组织匀浆、测定蛋白浓度,并按需稀释。按照说明书配制工作液,分别向其中加入无水乙醇、标准品、测试样品,设定为空白管、标准管、测定管和对照管。涡旋混匀后,离心管盖上扎一小孔,95℃水浴40 min,取出,流水冷却。离心10 min,取上清。酶标仪测定其在532 nm处吸光度。按照公式计算MDA含量。

### 1.2.7 蛋白质提取及蛋白免疫印迹

取小鼠组织样品,加入RIPA裂解液提取总蛋白。BCA法测定蛋白含量,加入蛋白缓冲液,95℃金属浴5 min。加样、电泳、湿法转膜(200 mA,2 h),5%脱脂奶粉室温封闭1.5 h。然后加入TFR1、

GPX4、FSP1和ACSL4抗体,4℃过夜孵育。第2天,TBST漂洗后,二抗孵育1 h,再次漂洗。使用ECL化学发光显色,Image J软件分析蛋白灰度值。

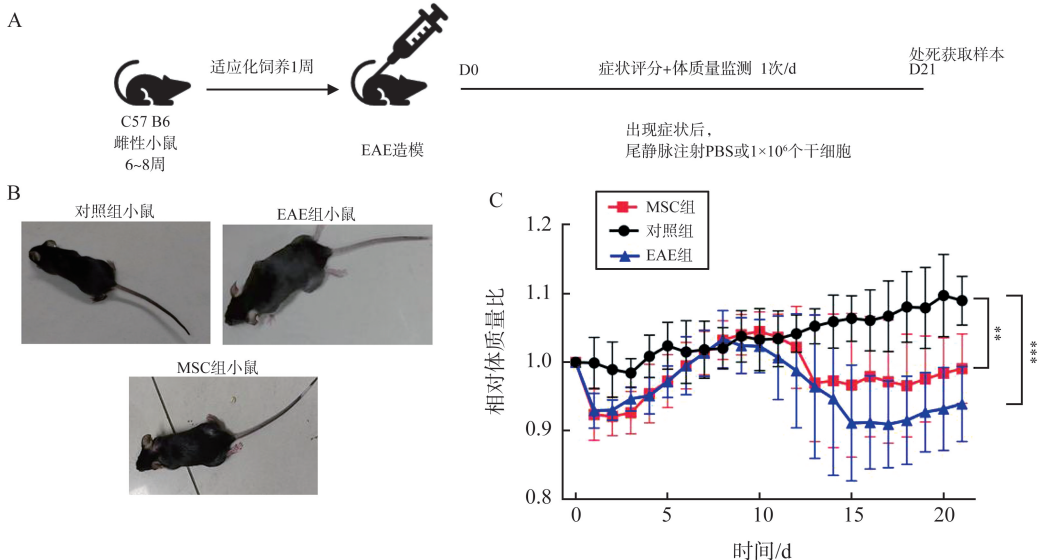
### 1.3 统计学处理

使用SPSS 27.0和Prism 9.0软件。首先利用Shapiro-Wilk(S-W)方法对数据进行正态性检验,若服从正态分布者,以 $\bar{x}\pm s$ 表示;若不服从正态分布,以中位数和四分位数间距表示。若数据满足正态性和方差齐性条件,两组间差异比较采用两独立样本t检验,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用Bonferroni方法;否则,两组间比较采用Mann-Whitney检验,多组间比较采用Kruskal-Wallis检验,进一步两两比较采用Bonferroni法。 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MSCs对EAE小鼠体质量及临床症状的影响

疾病高峰期,EAE组小鼠的肢体瘫痪表现较MSC组更为严重。MSCs治疗可以逆转小鼠在疾病高峰期的体质量下降,但与EAE组小鼠差异无统计学意义( $P>0.05$ )。且在观察终末时,EAE组和MSC组小鼠体质量仍低于对照组( $P_{\text{EAE组 vs 对照组}}<0.001, P_{\text{MSC组 vs 对照组}}<0.01$ )。MSCs治疗可以有效缓解EAE小鼠在疾病高峰期的疾病症状,差异有统计学意义( $P<0.01$ );然而,随着EAE小鼠自然病程的发展,观察期末时EAE组和MSC组的差异无统计学意义。从整个观察周期来看,MSCs治疗有效降低了EAE小鼠的累计症状评分[(7.92±2.42)vs(14.83±5.09)],差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见图1。



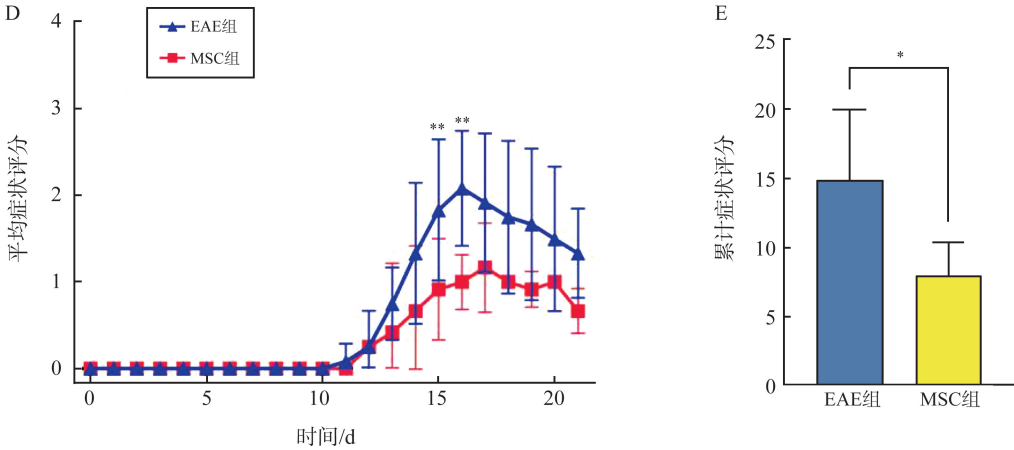


图1 MSCs对EAE小鼠体质量及临床症状的影响(\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ )

A: EAE组及MSC组小鼠处理方式示意图; B: 疾病高峰期, EAE小鼠较MSC组小鼠呈现更严重的肢体瘫痪; C: 每日体质量与免疫第0天的体质量比; D: EAE组及MSC组平均症状评分; E: EAE组及MSC组小鼠累计症状评分。

Figure 1 Effects of MSCs on body weight and clinical symptoms of EAE mice (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ )

A: Schematic representation of the treatment methods of mice in EAE and MSCs groups; B: At the peak of disease, EAE mice showed severer paralysis than those in MSC group; C: The ratio of daily body weight to the weight on day 0; D: The mean clinical scores of mice in EAE and MSC groups; E: The accumulation clinical scores of mice in EAE and MSC groups.

## 2.2 MSCs对EAE小鼠脊髓中炎症浸润和脱髓鞘的影响

组织病理水平上, EAE小鼠脊髓中存在大量炎

症细胞浸润, 而MSCs治疗可以缓解炎症细胞的聚集。通过LFB染色, 与EAE组相比, MSC组的脱髓鞘面积更小, 严重程度更轻。见图2。

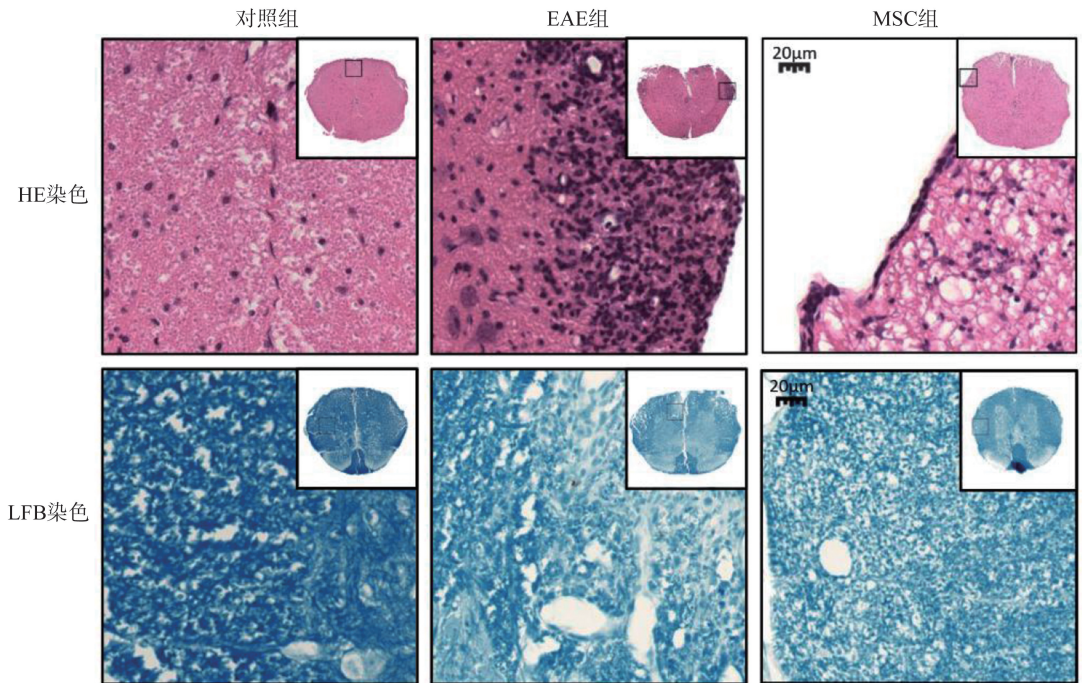


图2 MSCs对EAE小鼠脊髓中炎症浸润和脱髓鞘的影响( $\times 40$ , 标尺=20  $\mu\text{m}$ )

Figure 2 Effects of MSCs on inflammation and myelination in spinal cord of EAE mice ( $\times 40$ , bar scale = 20  $\mu\text{m}$ )

## 2.3 MSCs对EAE小鼠脊髓中铁代谢情况的影响

MSCs可以显著提高EAE小鼠脊髓中GSH含量( $P<0.01$ )、T-SOD活力( $P<0.01$ ), 差异均有统计学意义。MSC组MDA含量虽较EAE组有下降趋势, 但差异无统计学意义。见表1。

## 2.4 MSCs对EAE小鼠脑中Fe代谢情况的影响

MSCs可以显著降低EAE小鼠脑中MDA含量( $P<0.05$ ), 提高GSH含量( $P<0.05$ ), 差异有统计学意义。MSC组T-SOD含量虽较EAE组有提高趋势, 但差异无统计学意义。见表1。

表1 脊髓及脑 GSH,MDA 及 T-SOD 表达水平(n=3)  
Table 1 Expression levels of GSH, MDA and T-SOD in spinal cord and brain(n=3)

指标	GSH/( $\mu\text{mol/g}$ )	MDA/( $\text{nmol/mg}$ )	T-SOD/( $\text{U/mg}$ )
<b>脊髓</b>			
EAE 组	1.57±0.20	7.03±1.05	24.34±3.55
对照组	4.88±0.37 <sup>***</sup>	1.75±0.39	60.17±5.13 <sup>***</sup>
MSC 组	3.48±0.46 <sup>**</sup>	1.81±0.10	44.36±3.94 <sup>**</sup>
<b>脑</b>			
EAE 组	3.72±0.90	16.53±2.71	34.75±5.05
对照组	6.47±0.19 <sup>**</sup>	7.16±1.11 <sup>**</sup>	73.93±10.95 <sup>*</sup>
MSC 组	6.37±0.90 <sup>*</sup>	8.84±2.30 <sup>*</sup>	60.13±1.19

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs EAE 组。

### 2.5 MSCs 对 EAE 小鼠脊髓中铁死亡相关蛋白表达量的影响

与 EAE 组相比, MSC 组的 TFR1、ACSL4 蛋白表达量均显著下降( $P$  均 $<0.05$ ), FSP1 蛋白表达量显著上升( $P<0.05$ ), 差异均有统计学意义。MSC

组 GPX4 表达虽较 EAE 组升高, 但差异无统计学意义。与对照组相比, MSC 组中小鼠脊髓 FSP1 ( $P<0.05$ )、ACSL4 ( $P<0.001$ ) 蛋白的表达量升高, 差异有统计学意义。见表 2、图 3。

表2 脊髓及脑中 TFR1、ACSL4、GPX4 和 FSP1 蛋白相对表达量(n=3)  
Table 2 Relative protein expressions of TFR1, ACSL4, GPX4 and FSP1 in spinal cord and brain(n=3)

项目	TFR1	ACSL4	GPX4	FSP1
<b>脊髓</b>				
EAE 组	1.08±0.11	1.03±0.15	1.04±0.07	0.67±0.14
对照组	0.63±0.07 <sup>***</sup>	0.11±0.06 <sup>***</sup>	1.45±0.20 <sup>*</sup>	1.48±0.18 <sup>***</sup>
MSC 组	0.80±0.03 <sup>*</sup>	0.73±0.03 <sup>####</sup>	1.42±0.15	1.04±0.02 <sup>**#</sup>
<b>脑</b>				
EAE 组	0.96±0.06	1.30±0.05	0.84±0.22	0.56±0.02
对照组	0.63±0.02 <sup>***</sup>	0.77±0.02 <sup>***</sup>	1.18±0.05 <sup>***</sup>	1.09±0.09 <sup>***</sup>
MSC 组	0.77±0.03 <sup>**#</sup>	0.96±0.47 <sup>####</sup>	0.96±0.04 <sup>###</sup>	0.82±0.11 <sup>**#</sup>

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs EAE 组; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$  vs 对照组。

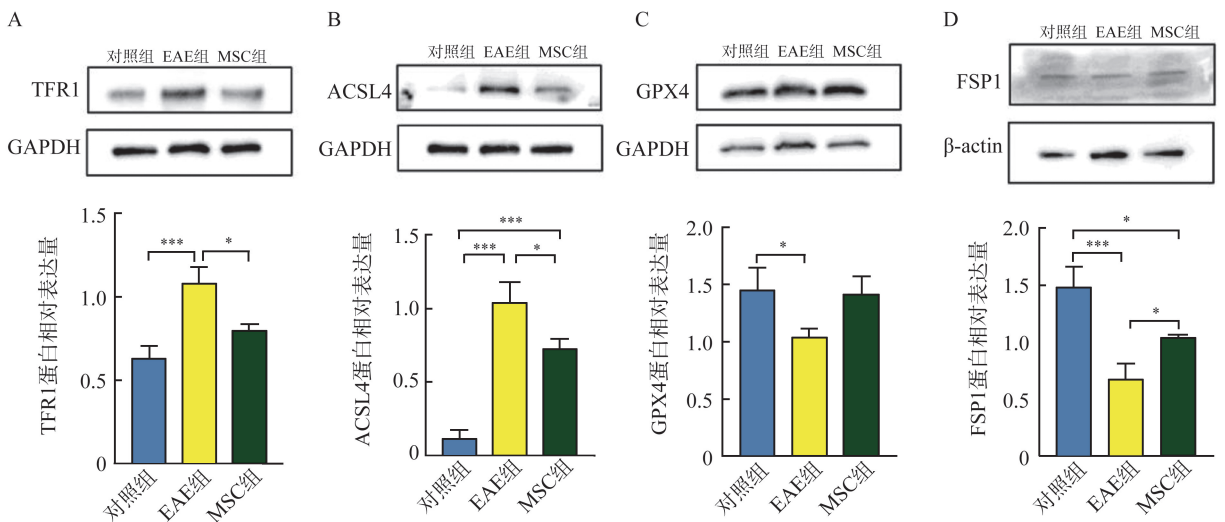


图3 MSCs 对 EAE 小鼠脊髓中铁死亡相关蛋白表达量的影响(\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ )

A: 小鼠脊髓中 TFR1 蛋白相对表达量; B: 小鼠脊髓中 ACSL4 蛋白相对表达量; C: 小鼠脊髓中 GPX4 蛋白相对表达量; D: 小鼠脊髓中 FSP1 蛋白相对表达量。

Figure 3 Effects of MSCs on ferroptosis-related proteins expression in spinal cord of EAE mice (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ )

A: The relative protein expression of TFR1 in spinal cord of mice; B: The relative protein expression of ACSL4 in spinal cord of mice; C: The relative protein expression of GPX4 in spinal cord of mice; D: The relative protein expression of FSP1 in spinal cord of mice.

## 2.6 MSCs 对 EAE 小鼠脑中铁死亡相关蛋白表达量的影响

与 EAE 组相比, MSC 治疗可以有效降低 EAE 小鼠脑中 TFR1 ( $P < 0.01$ )、ACSL4 蛋白表达量 ( $P < 0.001$ ), 提高 GPX4 ( $P < 0.05$ ) 及 FSP1 蛋白 ( $P <$

0.05) 表达量, 差异有统计学意义。与对照组相比, MSC 组小鼠脑中 TFR1 ( $P < 0.05$ )、ACSL4 ( $P < 0.01$ )、GPX4 ( $P < 0.01$ ) 及 FSP1 ( $P < 0.05$ ) 表达量差异均有统计学意义。见表 2、图 4。

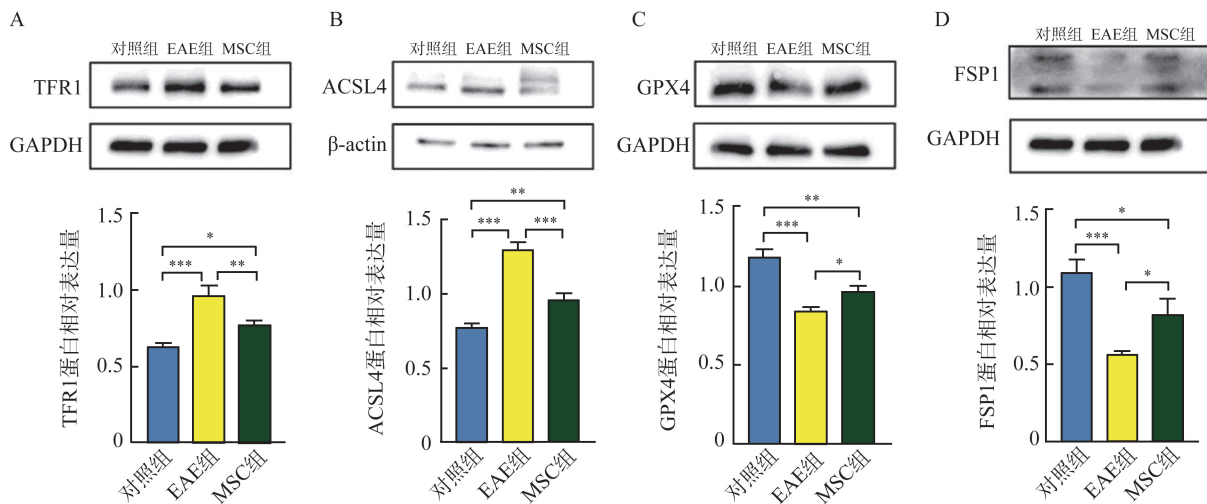


图 4 MSCs 对 EAE 小鼠脑中铁死亡相关蛋白表达量的影响 ( $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ )

A: 小鼠脑中 TFR1 蛋白相对表达量; B: 小鼠脑中 ACSL4 蛋白相对表达量; C: 小鼠脑中 GPX4 蛋白相对表达量; D: 小鼠脑中 FSP1 蛋白相对表达量。

Figure 4 Effect of MSCs on the expression of ferroptosis-related proteins in the brain of EAE mice ( $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ )

A: Relative protein expression of TFR1 in brain tissue of mice; B: Relative protein expression of ACSL4 in brain tissue of mice; C: Relative protein expression of GPX4 in brain tissue of mice; D: Relative protein expression of FSP1 in brain tissue of mice.

## 3 讨论

MS 是一种以神经炎症和神经变性为特征的中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 慢性自身免疫性疾病<sup>[5]</sup>。作为一种经典的动物模型, EAE 可有效模拟 MS 的病理特征, 广泛应用于对 MS 进行发病机制和疗效评价的研究。在 EAE 小鼠中诱导铁过载会触发 MDA 产生, 导致更严重的病程<sup>[6]</sup>。反之, 低铁饮食的小鼠没有发生 EAE<sup>[7]</sup>。多项研究表明, EAE 小鼠中铁死亡非常活跃<sup>[8]</sup>, 铁功能障碍是疾病发展的关键<sup>[9]</sup>。然而, MSCs 对 MS 中铁死亡调控机制报道很少。因此, 本文研究了 MSCs 对 MS 中铁死亡状况及其关键调控蛋白表达的影响。

体质量变化和症状评分是 EAE 小鼠疾病外在表现的重要指标, 而 CNS 炎症浸润和脱髓鞘则是 MS 主要病理特点<sup>[10]</sup>。根据体质量和症状评分、HE 和 LFB 染色, MSCs 在疾病表现和病理层面均可有效治疗 EAE 小鼠, 这与既往的报道结果相一致<sup>[11-12]</sup>。

铁死亡的特征是铁驱动的脂质过氧化, 并伴随氧化应激和有害活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生<sup>[13]</sup>。多不饱和脂肪酸在受到氧自由基

的攻击后, 发生脂质过氧化, 分解生成各种细胞毒性的脂质过氧化物, 如 MDA。因此, MDA 的含量可反映机体内脂质过氧化的程度和细胞受自由基攻击的严重程度。而 GSH 和 SOD 均为重要的抗氧化剂, 可以控制胞内脂质过氧化物和 ROS 的水平, 参与抑制铁死亡。本研究发现, MSCs 治疗后, 小鼠脑中 MDA 的含量下降, 表明 MSCs 治疗可以减轻 EAE 小鼠体内脂质过氧化程度, 继而减少铁死亡发生。MSC 组小鼠脊髓和脑中 GSH 含量及脑中 SOD 活力升高, 说明 MSCs 治疗提高了机体清除氧自由基的能力, 减轻细胞氧化应激损伤, 间接抑制铁死亡。因此, MSCs 治疗可以减轻 EAE 小鼠体内脂质过氧化程度, 继而减少铁死亡发生。

铁死亡的发病机制主要为三部分: 脂代谢机制, 活性氧的生成与清除, 铁代谢的调节<sup>[14]</sup>。为了进一步探究 MSCs 对铁死亡的调控作用, 本研究测试了上述机制中几个关键蛋白表达情况。其中, ACSL4 和 GPX4 在脂代谢途径中起到关键作用。ACSL4 可以催化磷脂过氧化反应, 将花生四烯酸转化为不饱和脂肪酸磷脂, 进而发生脂质过氧化, 促进铁死亡<sup>[15]</sup>。而 GPX4 是一种 GSH 依赖酶, 通过催化脂氢氧化物还原为脂醇<sup>[16]</sup>, 清除脂质过氧化物, 从而

预防铁死亡<sup>[17]</sup>。既往研究表明,GPX4 在 MS 的发病中起到重要作用。无论是在 MS 患者灰质还是 EAE 小鼠脊髓中,GPX4 的所有亚型 mRNA 水平和蛋白水平均下降<sup>[18]</sup>。并且,MSCs 来源 RNA-367-3p 外泌体移植通过提高 GPX4 表达,缓解小胶质细胞的铁死亡,减轻了 EAE 的严重程度<sup>[19]</sup>。本研究中,MSCs 注射治疗降低了 EAE 小鼠组织中 ACSL4 表达水平,提高了脑中 GPX4 表达量。并且,在 MSCs 细胞治疗的 2 型糖尿病<sup>[20]</sup>、炎症性肠病<sup>[21]</sup> 以及 CPR 后的心脑损伤小鼠<sup>[22]</sup>中也观察到了这种变化。因此,MSCs 可以从抑制磷脂过氧化反应、促进过氧化物的清除两方面来减轻膜内脂质过氧化水平,抑制铁死亡过程。

在活性氧清除方面,FSP1 利用 NADPH 催化抗氧化剂 CoQ10 的再生<sup>[23]</sup>,促进氧自由基的捕获,抑制铁死亡。作为一种铁死亡保护机制<sup>[24]</sup>,当 GPX4 在 EAE 急性期减少时,FSP1 常被观察到补偿性表达增加<sup>[25]</sup>。本研究结果表明,MSCs 治疗后,EAE 小鼠脊髓和脑中 FSP1 蛋白相对表达量提高,这一现象也出现在 MSCs 治疗后的糖尿病肾病小鼠中<sup>[26]</sup>。另外,MSCs 来源外泌体通过抑制 lncGm36569/miR-5627-5p/FSP1 轴减轻了急性脊髓损伤中神经细胞的铁死亡<sup>[27]</sup>。这些结果共同均表明,MSCs 的干预可以促进 CoQ10 清除活性氧,提高细胞抗氧化能力,预防铁死亡。

Fe<sup>2+</sup>与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应生成羟基自由基,是脂质过氧化非酶反应的开始<sup>[28]</sup>。而 TFR1 通过和铁蛋白、Fe<sup>2+</sup>相互作用参与铁的内吞,是铁转运进细胞内的主要蛋白质<sup>[29]</sup>,也被认为是铁死亡标志蛋白<sup>[30]</sup>。闫霖等<sup>[31]</sup>发现,MSCs 来源外泌体可通过降低 TFR1 表达,抑制铁死亡,从而减轻 H9c2 细胞缺氧/复氧后的损伤。本研究也检测到类似的改变,MSCs 治疗降低了 EAE 小鼠脊髓和脑中 TFR1 表达量,减少铁的胞内转运,从而降低了细胞对铁死亡诱导的敏感性。

小胶质细胞和巨噬细胞的 TFR1 高表达促进铁的胞内转运<sup>[32]</sup>,使其向促炎表型转变<sup>[24]</sup>。通过特异性降低小鼠脊髓 ACSL4 表达,可减少脂质代谢物累积,抑制 CNS 中 CD4<sup>+</sup> T 细胞的浸润<sup>[7]</sup>,表明 ACSL4 介导的铁死亡可通过促进 T 细胞的活化参与 MS 的神经变性过程。本研究中,MSCs 可能通过降低 TFR1、GPX4 表达,抑制铁死亡介导的炎症细胞激活,减轻 EAE 炎症。另外,由于 GSH 合成速率偏低及大量的铁储存<sup>[33]</sup>,少突胶质细胞 (oligodendrocytes, OLs) 对铁死亡高度敏感<sup>[34]</sup>。本研究结果表

明,MSCs 可以通过减少 ROS 生成,增加 GPX4 表达,减轻高峰期因脂质过氧化导致的 OLs 死亡和脱髓鞘<sup>[35]</sup>。

综上所述,MSCs 通过调节铁代谢、脂代谢和促进活性氧清除来抑制 EAE 小鼠中铁死亡,减轻 EAE 小鼠炎症浸润和髓鞘脱失,发挥治疗作用。

## 参考文献:

- [1] Kobelt G, Thompson A, Berg J, et al. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe [J]. *Mult Scler*, 2017, 23(8): 1123-1136.
- [2] Dangond F, Donnelly A, Hohlfeld R, et al. Facing the urgency of therapies for progressive MS—a Progressive MS Alliance proposal [J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17(3): 185-192.
- [3] Andrzejewska A, Dabrowska S, Lukomska B, et al. Mesenchymal stem cells for neurological disorders [J]. *Adv Sci*, 2021, 8(7): 2002944. doi:10.1002/adv.202002944.
- [4] Jhelum P, Zandee S, Ryan F, et al. Ferroptosis induces detrimental effects in chronic EAE and its implications for progressive MS [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2023, 11(1): 121. doi:10.1186/s40478-023-01617-7.
- [5] Charabati M, Wheeler MA, Weiner HL, et al. Multiple sclerosis: neuroimmune crosstalk and therapeutic targeting [J]. *Cell*, 2023, 186(7): 1309-1327.
- [6] Ćurko-Cofek B, Kezele TG, Marinić J, et al. Chronic iron overload induces gender-dependent changes in iron homeostasis, lipid peroxidation and clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Neurotoxicology*, 2016, 57: 1-12. doi:10.1016/j.neuro.2016.08.014.
- [7] Grant SM, Wiesinger JA, Beard JL, et al. Iron-deficient mice fail to develop autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Nutr*, 2003, 133(8): 2635-2638.
- [8] Luoqian JY, Yang WY, Ding XL, et al. Ferroptosis promotes T-cell activation-induced neurodegeneration in multiple sclerosis [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(8): 913-924.
- [9] Duarte-Silva E, Meuth SG, Peixoto CA. The role of iron metabolism in the pathogenesis and treatment of multiple sclerosis [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1137635. doi:10.3389/fimmu.2023.1137635.
- [10] Jakimovski D, Bittner S, Zivadinov R, et al. Multiple sclerosis [J]. *Lancet*, 2024, 403(10422): 183-202.
- [11] Lindsay SL, Moleđa AM, MacLellan LM, et al. Human olfactory mesenchymal stromal cell transplantation ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis revealing an inhibitory role for IL16 on myelination [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2022, 10(1): 12. doi:10.1186/s40478-022-01316-9.

- [12] de Freitas CL, Polonio CM, Brandão WN, et al. Human fallopian tube-derived mesenchymal stem cells inhibit experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing Th1/Th17 activation and migration to central nervous system[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2022, 18(2): 609-625.
- [13] Gavasso S, Kråkenes T, Olsen H, et al. The therapeutic mechanisms of mesenchymal stem cells in MS—a review focusing on neuroprotective properties [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(3): 1365. doi:10.3390/ijms25031365.
- [14] Stockwell BR. Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications[J]. *Cell*, 2022, 185(14): 2401-2421.
- [15] Chen JJ, Galluzzi L. Fighting resilient cancers with iron [J]. *Trends Cell Biol*, 2018, 28(2): 77-78.
- [16] 唐文诚, 何清, 李俊峰, 等. 川芎嗪通过抑制炎症反应和铁死亡减轻对乙酰氨基酚所致肝损伤[J]. *世界中医药*, 2023, 18(24): 3512-3517.
- TANG Wencheng, HE Qing, LI Junfeng, et al. Ligustrazine alleviates acetaminophen-induced liver injury by inhibiting inflammatory response and ferroptosis [J]. *World Chinese Medicine*, 2023, 18(24): 3512-3517.
- [17] Doll S, Freitas FP, Shah R, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor [J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 693-698.
- [18] Hu CL, Nydes M, Shanley KL, et al. Reduced expression of the ferroptosis inhibitor glutathione peroxidase-4 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Neurochem*, 2019, 148(3): 426-439.
- [19] Fan JY, Han YS, Sun HH, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-367-3p alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis via inhibition of microglial ferroptosis by targeting EZH2[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 162: 114593. doi:10.1016/j.biopha.2023.114593.
- [20] 朱月新. 人脐带间充质干细胞通过激活 Nrf2 调控铁死亡改善 2 型糖尿病肾病的机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2023.
- [21] Wang H, Sun Y, Xiao FJ, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate DSS-induced experimental colitis by modulating the gut microbiota and MUC-1 pathway[J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 2023-2039. doi:10.2147/JIR.S402592.
- [22] Xu JF, Zhang MH, Liu F, et al. Mesenchymal stem cells alleviate post-resuscitation cardiac and cerebral injuries by inhibiting cell pyroptosis and ferroptosis in a swine model of cardiac arrest [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 793829. doi:10.3389/fphar.2021.793829.
- [23] 姜懿洋, 刘帅, 张静涛, 等. 中医药通过诱导铁死亡治疗肺癌的研究进展[J]. *中医药学报*, 2024, 52(3): 100-108.
- JIANG Yiyang, LIU Shuai, ZHANG Jingtao, et al. Progress in the treatment of lung cancer by iron death induced by traditional Chinese medicine[J]. *Acta Chinese Medicine and Pharmacology*, 2024, 52(3): 100-108.
- [24] Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, et al. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(3): 985-997.
- [25] van San E, Debruyne AC, Veeckmans G, et al. Ferroptosis contributes to multiple sclerosis and its pharmacological targeting suppresses experimental disease progression[J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30(9): 2092-2103.
- [26] 黄美玲. 内质网应激 PERK 信号通路对糖尿病肾病模型铁死亡的影响及胎盘间充质干细胞的干预机制研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2023.
- [27] Shao CL, Chen Y, Yang TY, et al. Mesenchymal stem cell derived exosomes suppress neuronal cell ferroptosis via lncGm36569/miR-5627-5p/FSP1 axis in acute spinal cord injury [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2022, 18(3): 1127-1142.
- [28] Diggie CP. *In vitro* studies on the relationship between polyunsaturated fatty acids and cancer: tumour or tissue specific effects? [J]. *Prog Lipid Res*, 2002, 41(3): 240-253.
- [29] Andrews NC, Schmidt PJ. Iron homeostasis [J]. *Annu Rev Physiol*, 2007, 69: 69-85. doi:10.1146/annurev.physiol.69.031905.164337.
- [30] Feng HZ, Schorpp K, Jin J, et al. Transferrin receptor is a specific ferroptosis marker [J]. *Cell Rep*, 2020, 30(10): 3411-3423.
- [31] 闫霖, 陆珏秀, 罗颖, 等. BM-MSCs 来源外泌体介导铁死亡减轻大鼠心肌细胞系 H9c2 缺氧/复氧损伤 [J]. *基础医学与临床*, 2023, 43(5): 771-776.
- YAN Lin, LU Juexiu, LUO Ying, et al. Protective effect of BM-MSCs-derived exosome-mediated ferroptosis against anoxia-reoxygenation injury in rat cardiomyoblast cell line H9c2 [J]. *Basic and Clinical Medicine*, 2023, 43(5): 771-776.
- [32] Zarruk JG, Berard JL, Passos dos Santos R, et al. Expression of iron homeostasis proteins in the spinal cord in experimental autoimmune encephalomyelitis and their implications for iron accumulation [J]. *Neurobiol Dis*, 2015, 81: 93-107. doi:10.1016/j.nbd.2015.02.001.
- [33] Juurlink BH, Thorburne SK, Hertz L. Peroxide-scavenging deficit underlies oligodendrocyte susceptibility to oxidative stress [J]. *Glia*, 1998, 22(4): 371-378.
- [34] Qin DQ, Li D, Wang CJ, et al. Ferroptosis and central nervous system demyelinating diseases [J]. *J Neurochem*, 2023, 165(6): 759-771.
- [35] Li XY, Chu YJ, Ma R, et al. Ferroptosis as a mechanism of oligodendrocyte loss and demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Neuroimmunol*, 2022, 373: 577995. doi:10.1016/j.jneuroim.2022.577995.