

· 论 著 ·

间充质干细胞外泌体通过抑制氧化应激与炎症减轻放射性肺损伤

左 鑫¹, 曹方潇², 蔡晓翼², 杜 丽², 程晓晨², 卢育新², 肖凤君², 孙中生³

(1. 天津大学生命科学学院, 天津 300072; 2. 军事医学研究院, 北京 100850;

3. 中国科学院动物研究所, 北京 100101)

摘要:目的 探讨间充质干细胞外泌体(MSC-Exo)对放射性肺损伤(RILI)的保护作用及潜在机制。方法 ① 采用超速离心法从人脐带 MSC 培养上清中分离 MSC-Exo,透射电镜、纳米颗粒追踪分析检测 MSC-Exo 形态和粒径,Western 印迹法检测 MSC-Exo 表面标志蛋白[热休克蛋白 70(HSP70)、肿瘤易感基因 101(TSG101)、分化簇 9(CD9)和钙连蛋白(Calnexin)]表达。② 体内实验:将 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、照射组和 MSC-Exo 组,除对照组外,其余各组小鼠接受单次 20 Gy γ 射线全胸照射,照射+MSC-Exo 组小鼠在照射后第 0、3、7、10 和 14 天通过尾静脉注射 MSC-Exo(1×10^{12} particles $\cdot$ kg⁻¹);照射后第 7、28 和 140 天,通过 HE 和 Masson 染色观察肺组织病理变化;照射后第 7 和 28 天,ELISA 检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-18 和 γ 干扰素(IFN- γ)水平;照射后第 7 天,免疫荧光染色检测小鼠肺组织 F4/80⁺ 和 IL-1 β 水平,试剂盒检测超氧化物歧化酶(SOD)活性、还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)水平,RT-qPCR 检测小鼠肺组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-4 和 IL-10 mRNA 水平,Western 印迹法检测核因子 κ B p65 亚基(NF- κ B p65)蛋白磷酸化水平;照射后第 140 天,免疫荧光染色检测小鼠肺组织上皮钙黏蛋白(E-cadherin)和波形蛋白(Vimentin)水平,RT-qPCR 检测 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和 I 型胶原蛋白 α 1 链(Col1a1)mRNA 水平。③ 体外实验:将小鼠肺上皮细胞(MLE-12)分为对照组、照射组和照射+MSC-Exo 组,除对照组外,其余各组接受单次 10 Gy γ 射线照射,照射+MSC-Exo 组在照射后给予 MSC-Exo(5×10^{12} particles $\cdot$ L⁻¹)治疗;加入外泌体 24 h 后,CCK-8 法检测细胞存活率,显微镜观察细胞线粒体形态和分布,试剂盒检测 SOD 活性、GSH 和 MDA 水平,RT-qPCR 检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-4 和 IL-10 mRNA 水平,Western 印迹法检测细胞中 NF- κ B p65 蛋白磷酸化水平。结果 ① 分离获得的 MSC-Exo 呈中央微凹的圆形或卵圆形,直径在 70 ~ 150 nm,表达 HSP70、TSG101 和 CD9、不表达 Calnexin。② 与对照组相比,照射组小鼠肺组织出现病理损伤和胶原沉积;BALF 中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-18 和 IL-1 β 水平显著升高;肺组织中 SOD 活性和 GSH 水平显著降低、MDA 水平显著升高,TNF- α 和 IL-1 β mRNA 水平显著上调,F4/80⁺ 巨噬细胞浸润显著增加,IL-1 β 水平升高,E-cadherin 水平降低,Vimentin 水平升高,NF- κ B p65 磷酸化水平显著升高, α -SMA、Col1a1 mRNA 水平上调。与照射组相比,MSC-Exo 显著改善肺组织病理改变、抑制胶原沉积;照射+MSC-Exo 组 BALF 中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-18 和 IL-1 β 水平显著降低;肺组织中 SOD 活性和 GSH 水平显著升高、MDA 水平显著降低,TNF- α 和 IL-1 β mRNA 水平显著下调,F4/80⁺ 巨噬细胞浸润程度显著减轻,IL-1 β 水平降低,E-cadherin 水平升高,Vimentin 水平降低,NF- κ B p65 磷酸化水平显著降低, α -SMA、Col1a1 mRNA 水平显著下调。③ 与对照组相比,照射组 MLE-12 细胞存活率显著下降,SOD 活性、GSH 水平显著降低,MDA 水平显著升高,TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达显著上调,同时 NF- κ B p65 磷酸化水平显著升高。与照射组相比,MSC-Exo 显著提高细胞存活率、增强 SOD 活性、增加 GSH 水平、降低 MDA 水平,抑制 TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达和 NF- κ B p65 磷酸化。结论 MSC-Exo 可能通过抑制 NF- κ B 通路过度激活,抑制氧化应激与炎症,减轻纤维化,从而发挥对 RILI 的保护作用。

关键词:放射性肺损伤;肺纤维化;间充质干细胞外泌体;肺上皮细胞;氧化应激;炎症

中图分类号:R967

文献标志码:A

文章编号:1000-3002-(2026)03-0219-12

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2026.08813

收稿日期: 2026-02-05 录用日期: 2026-03-16

作者简介: 左 鑫,硕士研究生,主要从事间充质干细胞外泌体保护放射性肺损伤研究,E-mail: zuoxin200107@163.com

通信作者: 肖凤君,E-mail: xiaofjun1105@163.com;孙中生,E-mail: sunzs@biols.ac.cn

放射性肺损伤(radiation-induced lung injury, RILI)是胸部恶性肿瘤(如肺癌和乳腺癌)放射治疗中最常见的剂量限制性不良反应^[1-2]。其病理进程呈典型的动态演变特征,早期表现为以肺部炎症和氧化应激为主的急性损伤,若未能有效控制则将进展为肺组织慢性损伤导致的放射性肺纤维化(radiation-induced pulmonary fibrosis, RIPF)^[3-4],导致患者不可逆的肺功能下降,严重影响生活质量和远期预后。目前,临床主要依赖糖皮质激素等抗炎药物进行干预,但其疗效有限且长期使用伴随显著不良反应,针对纤维化阶段更是缺乏有效疗法^[5-6]。因此,寻找能同时干预多个病理环节且安全有效的新型治疗策略,已成为该领域的核心需求。

近年来,间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)因其强大的旁分泌、免疫调节和组织修复功能,在多种纤维化疾病模型中展现出治疗潜力^[7-9]。但细胞移植存在的潜在风险(如致癌性和免疫排斥等)限制了其临床转化。MSC外泌体(MSC-derived exosome, MSC-Exo)是直径 70 ~ 150 nm 的囊泡,作为干细胞旁分泌的关键介质,其携带蛋白质、脂质和微小 RNA 等生物活性物质,具有抗炎、抗氧化和组织修复等功能^[10-11]。MSC-Exo 同时具有低免疫原性、高稳定性和易于储存与给药等优势,可为开发“无细胞”治疗产品提供新思路。研究表明,在支气管发育不良和哮喘等多种肺部疾病模型中,MSC-Exo 能通过抑制炎症反应、调控巨噬细胞极化和促进肺上皮修复来改善肺功能并减轻组织病理损伤^[10-12]。基于此,MSC-Exo 被视为干预 RILI 的潜在策略,但对于从急性炎症到慢性纤维化全病程的动态干预效果及具体作用机制,尚未被系统阐明。

因此,本研究评价 MSC-Exo 对 RILI 和 RIPF 的保护作用及可能机制,旨在为放射性肺病的临床防治提供兼具理论依据与转化前景的新策略。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂和主要仪器

MSC 从人脐带组织中分离培养获得(P3 代),细胞经表型鉴定,符合 MSC 的基本生物学特征;小鼠肺上皮细胞(MLE-12),购自浙江美森细胞科技有限公司。

CCK-8 试剂盒(货号 C0042)和 Mito Tracker Green 线粒体染料(货号 C1048),上海碧云天生物技术有限公司;DAPI 抗荧光猝灭封片剂(货号 T2195)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α ,

TNF- α)ELISA 检测试剂盒(货号 EK282)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)ELISA 检测试剂盒(货号 EK201B)、IL-18 ELISA 检测试剂盒(货号 EK218)和 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)ELISA 检测试剂盒(货号 EK280),杭州联科生物科技股份有限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量检测试剂盒(货号 BC0025)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒(货号 BC5165)和还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)含量检测试剂盒(货号 BC1175),北京索莱宝科技有限公司;核因子 κ B p65 亚基(nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65)抗体(货号 8242)和磷酸化 NF- κ B p65(phosphorylated NF- κ B p65, p-NF- κ B p65)抗体(货号 3033),美国 Cell Signaling Technology 公司;cDNA 反转录试剂盒(货号 AT311-03)和 qPCR supermix 试剂盒(货号 AQ602-02),北京全式金生物技术有限公司;热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)抗体(货号 ab194360)、肿瘤易感基因 101(tumor susceptibility gene 101, TSG101)抗体(货号 ab133586)、分化簇 9(cluster of differentiation 9, CD9)抗体(货号 ab236630)和钙连蛋白(Calnexin)抗体(货号 ab133615),英国 Abcam 公司;F4/80 抗体(货号 GB113373)、IL-1 β 抗体(货号 GB12115)、上皮钙黏蛋白(Epithelial cadherin, E-cadherin)抗体(货号 GB12083)和波形蛋白(Vimentin)抗体(货号 GB111308),武汉塞维尔生物科技有限公司。Spectra Max M5 酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;DMIL 倒置荧光显微镜,德国 Leica 公司;eBlot L1 快速湿转仪,南京金斯瑞生物科技有限公司;XPN-80 超速离心机,美国 BECKMAN 公司;T100 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;ABI QuantStudio 3 qPCR 仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;HT 7800 透射电镜,日本日立公司;PMX 110 纳米颗粒跟踪分析仪,德国 Particle Metrix 公司;CLSM 880 共聚焦显微镜,德国 Carl Zeiss AG 公司。

1.2 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠,雄性,体重 18 ~ 20 g,6 ~ 8 周龄,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2024-0001。小鼠饲养于标准条件:温度 24 ~ 26 °C,相对湿度 50% ~ 60%,12 h 明暗交替,自由摄食饮水。动物实验方案经军事医学研究院实验动物管理与使用委员会批准(审查编号: IACUC-DWZX-2025-645)。

1.3 MSC-Exo 制备

采用超速离心法^[13]从 P3 代 MSC 细胞培养上清中分离制备 MSC-Exo 悬液。

1.4 MSC-Exo 鉴定

1.4.1 透射电镜观察 MSC-Exo 形态结构

吸取适量 1.3 制备的 MSC-Exo 悬液,滴在碳支持膜上使其浸润。滴加磷钨酸溶液使其浸润负染,待自然干燥后,用透射电镜对碳膜上的 MSC-Exo 进行观察、拍照。

1.4.2 纳米颗粒追踪分析仪检测 MSC-Exo 颗粒数和平均粒径

将 1.3 制备的 MSC-Exo 用超纯水稀释至仪器检测范围后,用注射器注入纳米颗粒追踪分析仪的样品池中,测定颗粒数及平均粒径。

1.4.3 Western 印迹法检测 MSC-Exo 表面标志蛋白

取 MSC 和 MSC-Exo 样品,加入 RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂)冰上裂解,12 000 × *g*, 4 °C 离心 10 min,取上清。取等量蛋白与 4× 上样缓冲液混匀,100 °C 变性 10 min。蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后转移至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗[HSP70、TSG101、CD9 和 Calnexin(均 1:1 000)]4 °C 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次后加入 HRP 标记二抗,室温孵育 1 h。再次洗膜后加入显影液显影成像。

1.5 体内实验

1.5.1 动物分组和处理

C57BL/6J 小鼠适应性饲养 1 周后,随机分为对照组、照射组和照射+MSC-Exo 组,每组 25 只。除对照组外,其余小鼠用 1% 戊巴比妥钠麻醉,固定在照射板上,全胸暴露于单剂量 20 Gy γ 射线(其余部位用铅砖屏蔽)。照射+MSC-Exo 组小鼠在照射后 2 h 内尾静脉注射外泌体(1×10^{12} particles·kg⁻¹,溶于 200 μ L 生理盐水),对照组和照射组注射等体积生理盐水,于第 3、7、10 和 14 天各给 MSC-Exo

1 次。在照射后第 7 和 28 天收集小鼠支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),第 7、28 和 140 天收集小鼠肺组织供后续实验(图 1)。

1.5.2 HE 和 Masson 染色观察小鼠肺组织病理学变化

小鼠分组和处理同 1.5.1,在照射后第 7、28 和 140 天收集小鼠肺组织($n = 3$),用 4% 多聚甲醛固定,由北京冬月科技有限公司进行组织切片和染色。

1.5.3 ELISA 检测小鼠 BALF 中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-18 和 IFN- γ 水平

小鼠分组和处理同 1.5.1,取照射后第 7 和 28 天的小鼠($n = 5$),将去尖注射器经小鼠环状软骨插入气管,固定气管-针栓连接处,轻轻推入 PBS 灌洗,回收液体于 1.5 mL EP 管,置于冰上。每只小鼠灌洗 3 次,直至回收 BALF 总量 ≥ 1 mL。BALF 于 4 °C,500 × *g* 离心 10 min,取上清保存于 -80 °C。按 ELISA 试剂盒说明书检测小鼠 BALF 中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-18 和 IFN- γ 水平。

1.5.4 试剂盒检测小鼠肺组织中 MDA 和 GSH 水平及 SOD 活性

小鼠分组和处理同 1.5.1,在照射后第 7 天收集小鼠肺组织($n = 3$)。RIPA 裂解液裂解 0.1 g 肺组织,按试剂盒说明书测定小鼠肺组织 MDA 和 GSH 水平及 SOD 活性。

1.5.5 RT-qPCR 检测小鼠肺组织 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、IL-4、 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链(collagen type I α 1 chain, *Col1a1*) mRNA 水平

小鼠分组和处理同 1.5.1,在照射后第 7 和 140 天收集小鼠肺组织($n = 3$),使用 Trizol 提取肺组织总 RNA,逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应条件:94 °C 30 s;94 °C 5 s;60 °C 15 s;72 °C 10 s,共 40 个循环。以 *GAPDH* 为内参,用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算第 7 天肺组织中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、

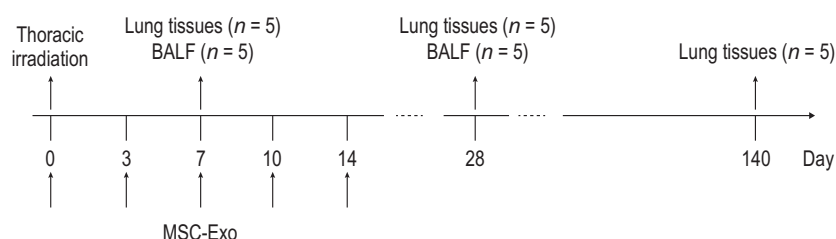


Fig.1 Experimental procedures. Mice were randomly divided into control, irradiation (IR), and IR+mesenchymal stem cell-derived exosome (IR+MSC-Exo) groups ($n = 25$). Mice in IR and IR+MSC-Exo groups received a single dose of 20 Gy whole-thorax γ -ray IR on day 0 to establish a radiation-induced lung injury (RILI) model. The IR+MSC-Exo group was administered with MSC-Exo (1×10^{12} particles·kg⁻¹, dissolved in 200 μ L normal saline) via tail vein injection within 2 h, and on day 3, 7, 10, and 14 post-IR. Mice in control and IR groups received an equivalent volume of normal saline at the same time points. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected on day 7 and 28 post-IR ($n = 5$), and lung tissues were collected on day 7, 28, and 140 post-IR ($n = 5$).

IL-4 及第 140 天肺组织中 α -SMA 和 *Col1a1* mRNA 相对表达水平,引物由北京六合华大基因科技有限公司合成,具体序列见表 1。

Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR

Gene	Sequence (5'-3')
<i>GAPDH</i>	F: ACCCTTAAGAGGGATGCTGC R: CCCAATACGGCCAAATCCGT
<i>IL-1β</i>	F: GAAATGCCACCTTTTGACAGTG R: TGGATGCTCTCATCAGGACAG
<i>TNF-α</i>	F: CTGAAGCTTCGGGGTGATCGG R: GGCTTGCTACTCGAATTTTGAGA
<i>IL-10</i>	F: CTTACTGACTGGCATGAGGATCA R: GCAGCTCTAGGAGCATGTGG
<i>IL-4</i>	F: GGTCTCAACCCCCAGCTAGT R: GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT
α -SMA	F: GACGCTGAAGTATCCGATAGAACACG R: CACCATCTCCAGAGTCCAGCACAAAT
<i>Col1a1</i>	F: CGATGGATTCCCGTTTCGAGT R: GAGGCCTCGGTGGACATTAG

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *IL-1 β* : interleukin-1 β ; *TNF- α* : tumor necrosis factor- α ; α -SMA: α -smooth muscle actin; *Col1a1*: collagen type I alpha 1 chain.

1.5.6 Western 印迹法检测小鼠肺组织中 NF- κ B p65 蛋白磷酸化水平

小鼠分组和处理同 1.5.1,取照射后第 7 天的 小鼠肺组织($n=3$),加入 RIPA 裂解液,用组织研磨 仪充分匀浆提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。取 等量蛋白与上样缓冲液混合,100 °C 变性 10 min 后 进行 SDS-PAGE 电泳,并转移至 PVDF 膜。膜用 5% 脱脂奶粉于室温封闭 1 h,随后加入一抗 [p-NF- κ B p65 和 NF- κ B p65(1:1 000)]4 °C 孵育 过夜。TBST 洗膜 3 次后加入相应 HRP 标记二抗, 室温孵育 1 h。再次洗膜后加入显影液显影成像, 以 GAPDH 为内参,ImageJ 软件计算蛋白条带积分 吸光度,以 p-NF- κ B p65 与总 NF- κ B p65 的积分吸 光度比值表示 NF- κ B p65 蛋白磷酸化水平。

1.5.7 免疫荧光染色检测小鼠肺组织 F4/80、IL-1 β 、E-cadherin 及 Vimentin 表达

取 1.5.2 石蜡切片(照射后第 7 和 140 天)($n=3$), 经梯度乙醇脱水后,浸没于 0.01 mol·L⁻¹枸橼酸盐 缓冲液中,采用热诱导法进行抗原修复。冷却至室 温后,切片加血清封闭,室温孵育 1 h。甩去封闭血 清,分别滴加一抗[F4/80(1:200)、IL-1 β (1:200)、 E-cadherin(1:500)和 Vimentin(1:500)],4 °C 孵

育过夜。次日,PBS 洗涤 3 次,滴加相应荧光标记二 抗,室温避光孵育 1 h。PBS 洗涤后,滴加含 DAPI 的 抗荧光淬灭封片剂封片。采用共聚焦显微镜观察并 拍照,利用 ImageJ 软件定量分析第 7 天小鼠肺组织 F4/80 和 IL-1 β 及第 140 天小鼠肺组织 E-cadherin 和 Vimentin 的平均荧光强度。

1.6 体外实验

1.6.1 CCK-8 法检测 MLE-12 存活率

将 MLE-12 接种于 96 孔板(每孔 1×10^4 个),分 为对照组、照射组和照射+MSC-Exo 组,每组 3 复孔。除对照组外,其余各组照射 10 Gy γ 射线, 照射+MSC-Exo 组在照射后将外泌体加入培养基 中(5×10^{12} particles·L⁻¹),对照组和照射组加入等 体积 PBS。加入外泌体 24 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液。孵育 2 h,酶标仪检测各孔吸光度 ($A_{450\text{ nm}}$)值,计算细胞存活率。

1.6.2 试剂盒检测 MLE-12 线粒体形态和分布

将 MLE-12 接种于共聚焦培养皿(每孔 2×10^5 个), 每组 3 复孔,细胞分组和处理同 1.6.1。加入外泌体 24 h 后,弃去培养基,按照说明书每孔加入 1 mL MitoTracker Green 工作液,37 °C 避光孵育 30 min。 弃染液,加入 4% 多聚甲醛固定。PBS 洗涤后用含 DAPI 的抗荧光淬灭剂密封。在共聚焦显微镜下观 察 MLE-12 线粒体形态和分布。

1.6.3 试剂盒检测 MLE-12 中 MDA 和 GSH 水平及 SOD 活性

将 MLE-12 接种于 6 孔板(每孔 2×10^5 个),每 组 3 复孔,细胞分组和处理同 1.6.1,加入外泌体 24 h 后,收集细胞,按试剂盒说明书检测细胞 MDA 和 GSH 水平及 SOD 活性。

1.6.4 RT-qPCR 检测 MLE-12 中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10 和 IL-4 mRNA 表达水平

将 MLE-12 接种于 6 孔板,每组 3 复孔,细胞数 量、分组和处理同 1.6.3,加入外泌体 24 h 后,使用 Trizol 提取细胞总 RNA,逆转录和 PCR 扩增同 1.5.5。以 GAPDH 为内参,用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算细胞中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10 和 IL-4 mRNA 相对表达水平, 引物序列见表 1。

1.6.5 Western 印迹法检测 MLE-12 中 NF- κ B p65 蛋白磷酸化水平

将 MLE-12 接种于 6 孔板,每组 3 复孔,细胞数 量、分组和处理同 1.6.3,加入外泌体 24 h 后,收集 细胞,采用 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 法测定蛋 白浓度。后续操作同 1.5.6。

1.7 统计学分析

实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Graphpad Prism 8 软件进行统计分析并作图。两组间比较采用独立样本 *t* 检验;多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSC-Exo 的鉴定

透射电镜结果显示,制备的 MSC-Exo 呈中央微凹的圆形或卵圆形,直径在 70 ~ 150 nm(图 2A),颗粒分布约 100 nm(图 2B)。Western 印迹法结果显示, MSC-Exo 样品中可检测到典型外泌体标志蛋白 HSP70、TSG101 和 CD9 的特异性条带,条带清晰、表达稳定,且不表达 Calnexin(图 2C)。上述结果表明成功分离获得了符合外泌体特征的 MSC-Exo,可用于后续功能实验。

2.2 MSC-Exo 对 RILI 小鼠的保护作用

2.2.1 MSC-Exo 减轻 RILI 小鼠肺组织病理损伤

HE 结果显示,与对照组相比,照射后第 7、28 和 140 天,相同时间点照射组小鼠肺组织出现炎性浸润且肺泡壁增厚;与照射组相比,照射+MSC-Exo 组上述肺组织病理损伤显著缓解(图 3A)。Masson 染色结果显示,与对照组相比,照射后第 28 和 140 天,相同时间点照射组小鼠肺组织出现胶原沉积,而照射+MSC-Exo 组肺组织胶原沉积明显缓解(图 3B)。

2.2.2 MSC-Exo 减轻 RILI 小鼠肺组织氧化损伤

与对照组相比,照射组小鼠肺组织中 SOD 活性和 GSH 水平显著降低,MDA 水平显著升高;与照射组相比,照射+MSC-Exo 组小鼠肺组织中 SOD 活性和 GSH 水平显著升高,MDA 水平显著降低(图 4)。

2.2.3 MSC-Exo 抑制 RILI 小鼠肺组织炎症反应

与对照组相比,照射组小鼠 BALF 中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-18 和 IL-1 β 水平显著升高(照射后第 7 和

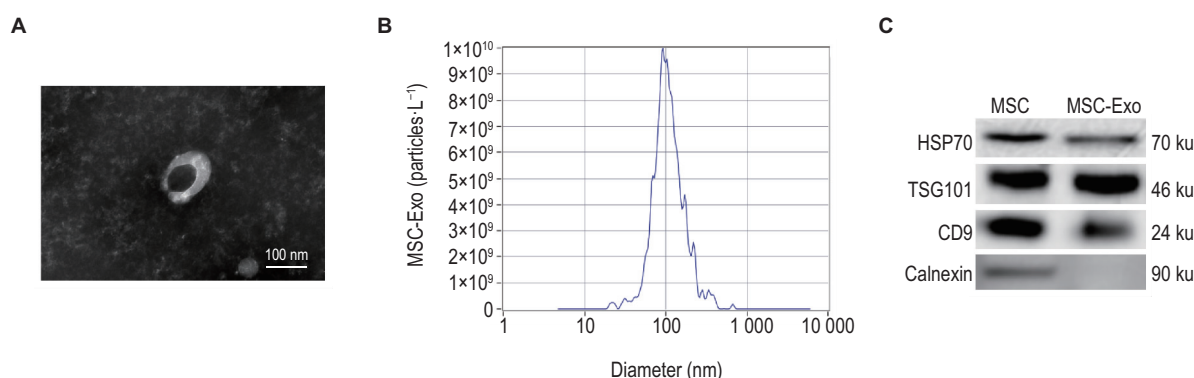


Fig.2 Characterization of MSC-Exo. A: representative transmission electron microscopy image of MSC-Exo showing typical cup-shaped morphology; B: nanoparticle tracking analysis showing the size distribution of MSC-Exo; C: Western blotting analysis of Calnexin and exosome marker proteins, including heat shock protein 70 (HSP70), tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and cluster of differentiation 9 (CD9).

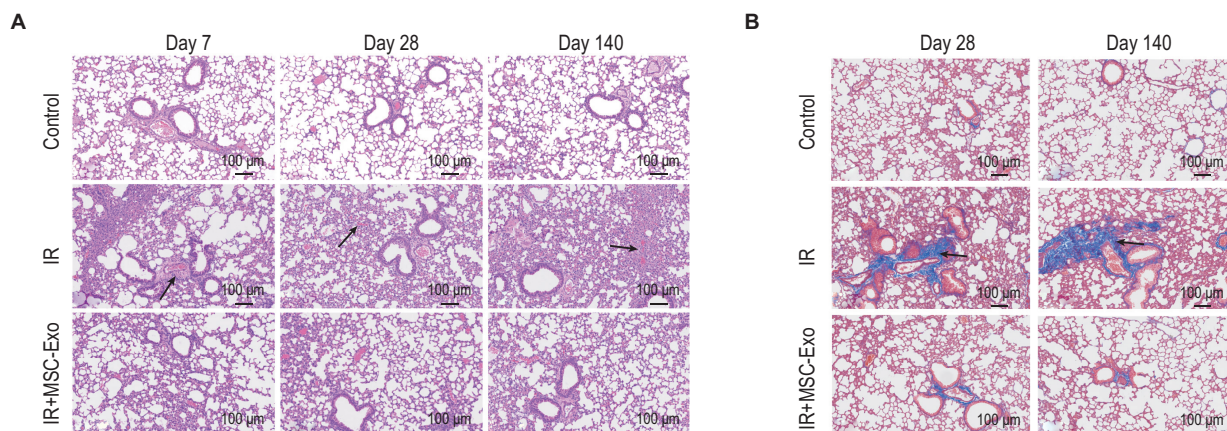


Fig.3 Effect of MSC-Exo on histopathological changes in RILI mice. See Fig.1 for the mouse treatment. A: HE staining showing lung tissue morphology on day 7, 28 and 140 post-IR. The arrows indicate inflammatory cell infiltration, alveolar structure disruption, and collapse; B: Masson staining showing collagen deposition and fibrosis on day 28 and 140 post-IR. The arrows indicate collagen deposition.

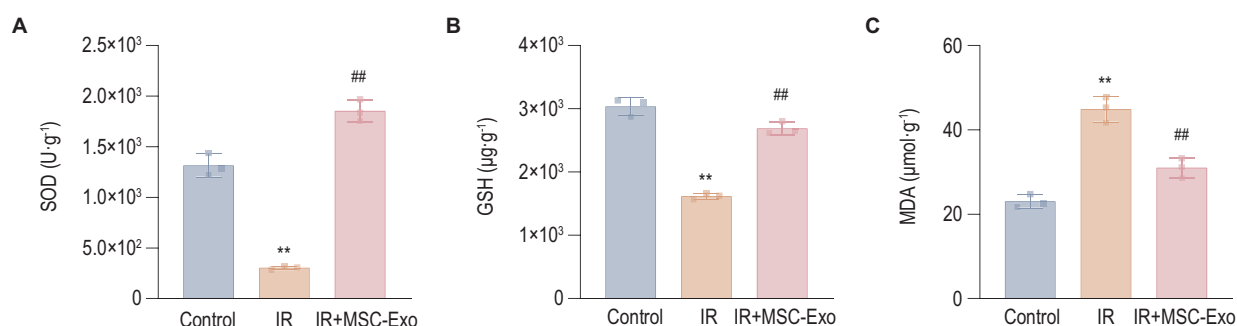


Fig.4 Effect of MSC-Exo on oxidative stress markers in RILI mice. See Fig.1 for the mouse treatment. Lung tissues were collected on day 7 post-IR. Superoxide dismutase (SOD) activity (A), reduced glutathione (GSH) level (B), and malondialdehyde (MDA) level (C) in lung tissues were detected by kit. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. ** $P < 0.01$, compared with control group; ## $P < 0.01$, compared with IR group.

28 天);与照射组相比,照射+MSC-Exo 组小鼠 BALF 中上述炎症因子水平显著降低(图 5A-D)。RT-qPCR 检测结果显示,与对照组相比,照射组小鼠肺组织中 *TNF-α* 和 *IL-1β* mRNA 水平显著升高;与照射组相比,照射+MSC-Exo 组小鼠肺组织中 *TNF-α* 和 *IL-1β* mRNA 水平显著降低,*IL-4* 和 *IL-10* mRNA 水平显著升高(图 5E-H)。免疫荧光结果显示,与对照组相比,照射组肺组织中 F4/80⁺巨噬细胞

浸润增加,IL-1β 荧光信号显著增强;与照射组相比,照射+MSC-Exo 组 F4/80⁺细胞密度显著降低,IL-1β 荧光强度显著减弱(图 5I)。

2.3 MSC-Exo 对放射损伤的 MLE-12 细胞的保护作用

2.3.1 MSC-Exo 提高放射诱导后 MLE-12 细胞的存活率

与对照组相比,照射组 MLE-12 细胞存活率显

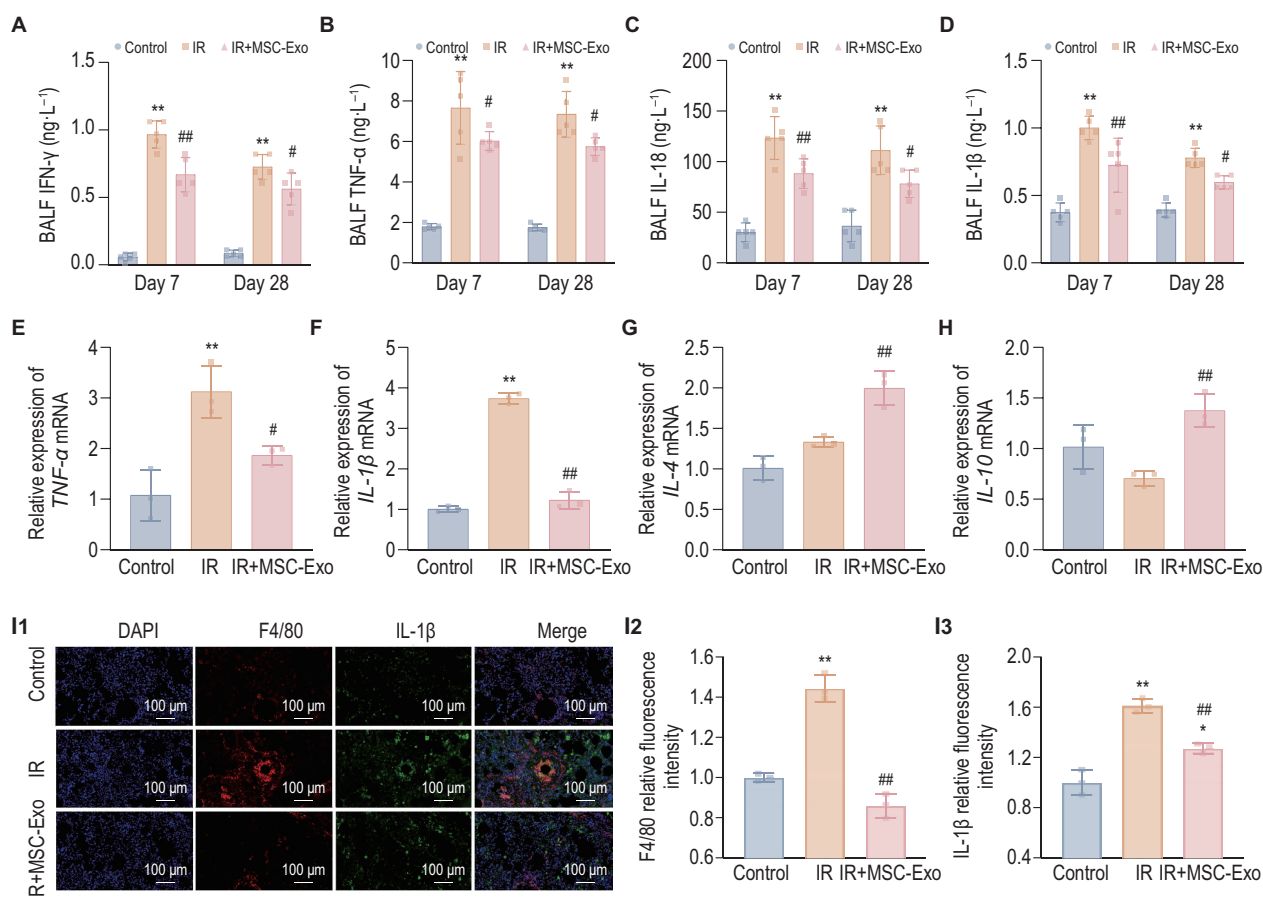


Fig.5 Effect of MSC-Exo on pulmonary inflammatory cytokine levels in RILI mice. See Fig.1 for the mouse treatment. Samples were collected on day 7 and 28 post-IR for BALF, and on day 7 for lung tissues. Levels of interferon-γ (IFN-γ) (A), TNF-α(B), IL-18 (C), and IL-1β(D) in BALF were determined by ELISA ($n = 5$). Relative mRNA expression levels of *TNF-α* (E), *IL-1β* (F), *IL-4* (G), and *IL-10* (H) in lung tissues, as analyzed by RT-qPCR ($n = 3$). I1: representative immunofluorescence images of lung tissue sections stained for F4/80 and IL-1β; I2 and I3 were semi-quantitative analysis of I1. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with IR group.

著降低;与照射组相比,照射+MSC-Exo 组 MLE-12 细胞存活率显著升高(图 6)。

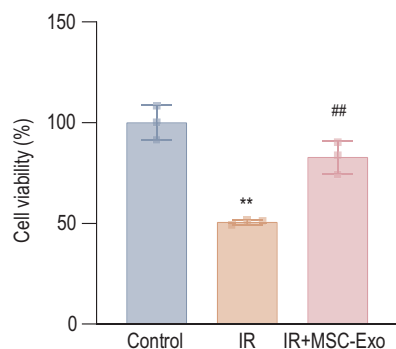


Fig.6 Effect of MSC-Exo on cell viability of MLE-12 cells after irradiation. MLE-12 cells were seeded in 96-well plates and randomly divided into control, IR (10 Gy γ -rays), and IR+MSC-Exo groups. Cells in IR+MSC-Exo group were incubated with MSC-Exo (5×10^{12} particles $\cdot$ L $^{-1}$) for 24 h post-IR, while control and IR groups received an equal volume of PBS. Cell viability was assessed 24 h post-IR by CCK-8. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. ** $P < 0.01$, compared with control group; ## $P < 0.01$, compared with IR group.

2.3.2 MSC-Exo 改善放射诱导的 MLE-12 线粒体损伤

照射后 MLE-12 细胞的细胞核固缩,线粒体出

现聚集和皱缩现象。MSC-Exo 处理能改善上述线粒体异常情况(图 7A)。

2.3.3 MSC-Exo 减轻放射诱导的 MLE-12 氧化损伤

与对照组相比,照射组 MLE-12 细胞中 SOD 活性和 GSH 含量显著降低,MDA 含量显著升高;与照射组相比,照射+MSC-Exo 组细胞中 SOD 活性和 GSH 含量显著升高,MDA 含量显著降低(图 7B-D)。

2.3.4 MSC-Exo 降低放射诱导的 MLE-12 炎症水平

与对照组相比,照射组 MLE-12 细胞中促炎因子 *TNF- α* 和 *IL-1 β* mRNA 水平显著升高;与照射组相比,照射+MSC-Exo 组细胞中 *TNF- α* 和 *IL-1 β* mRNA 水平显著降低,抗炎因子 *IL-4* mRNA 水平显著降低,*IL-10* mRNA 水平显著升高(图 8)。

2.4 MSC-Exo 调控炎症反应并抑制上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 及纤维化进程

Western 印迹法结果显示,与对照组相比,照射组小鼠肺组织中 NF- κ B p65 蛋白磷酸化水平显著升高;与照射组相比,照射+MSC-Exo 组小鼠肺组织中 NF- κ B p65 的磷酸化表达被显著抑制(图 9A)。在

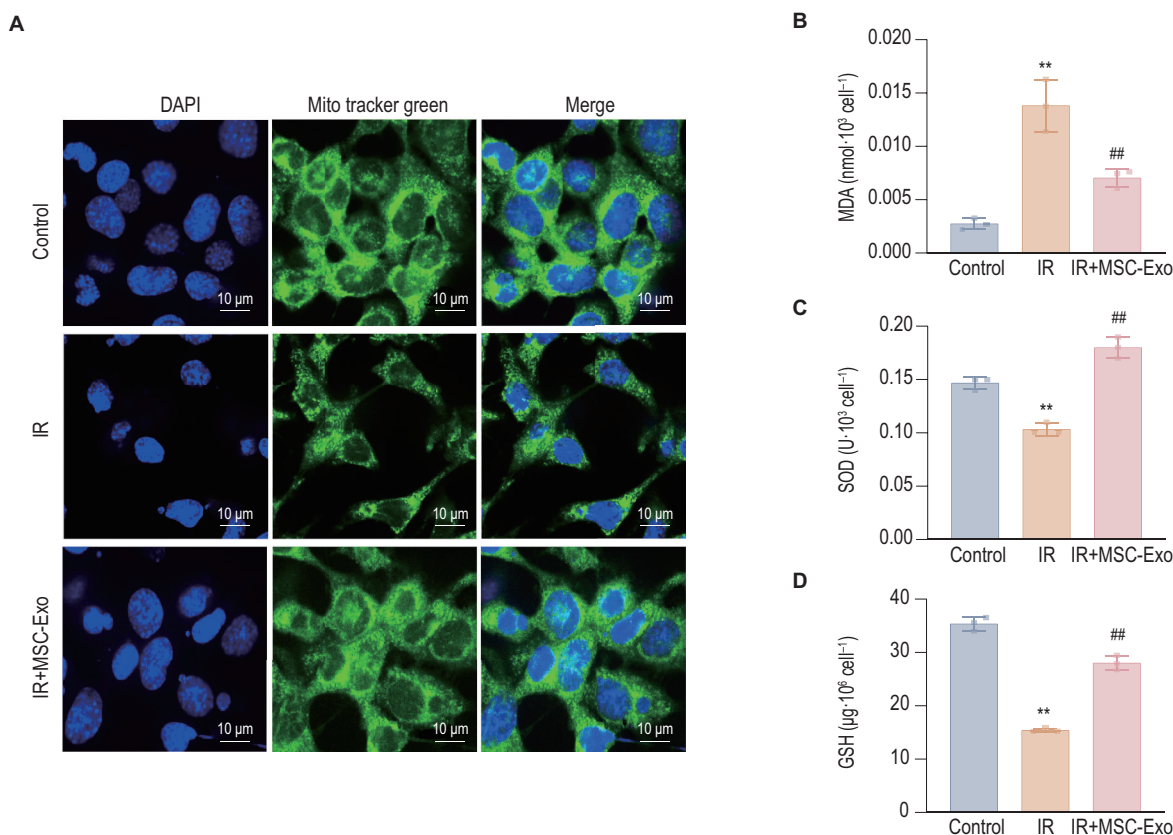


Fig.7 MSC-Exo alleviated irradiation-induced oxidative stress in irradiated MLE-12 cells. See Fig.6 for the cell treatment. Samples were collected at 24 h post-IR. A: representative images of mitochondrial morphology observed by fluorescence microscopy after Mito Tracker Green staining. After 24 h post-IR, MDA level (B), SOD activity (C), and GSH level (D) were detected by kit. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. ** $P < 0.01$, compared with control group; ## $P < 0.01$, compared with IR group.

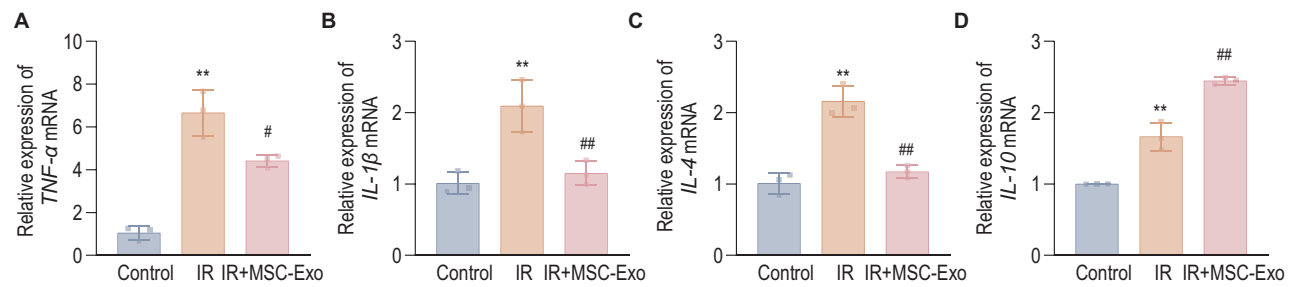


Fig.8 MSC-Exo modulated inflammatory response in irradiated MLE-12 cells. See Fig.6 for the cell treatment. Samples were collected at 24 h post-IR. Relative mRNA expression levels of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-4 (C), and IL-10 (D) in cells, as determined by RT-qPCR at 24 h post-IR. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. ** $P < 0.01$, compared with control group; * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with IR group.

MLE-12细胞中也观察到相似结果(图9B)。

免疫荧光染色结果显示,与对照组相比,照射组小鼠肺组织上皮标志物 E-cadherin 表达降低,

而间质标志物 Vimentin 表达升高;与照射组相比,照射+MSC-Exo 组 E-cadherin 表达升高, Vimentin 表达降低(图9C)。同时,RT-qPCR 检测结果显示,与

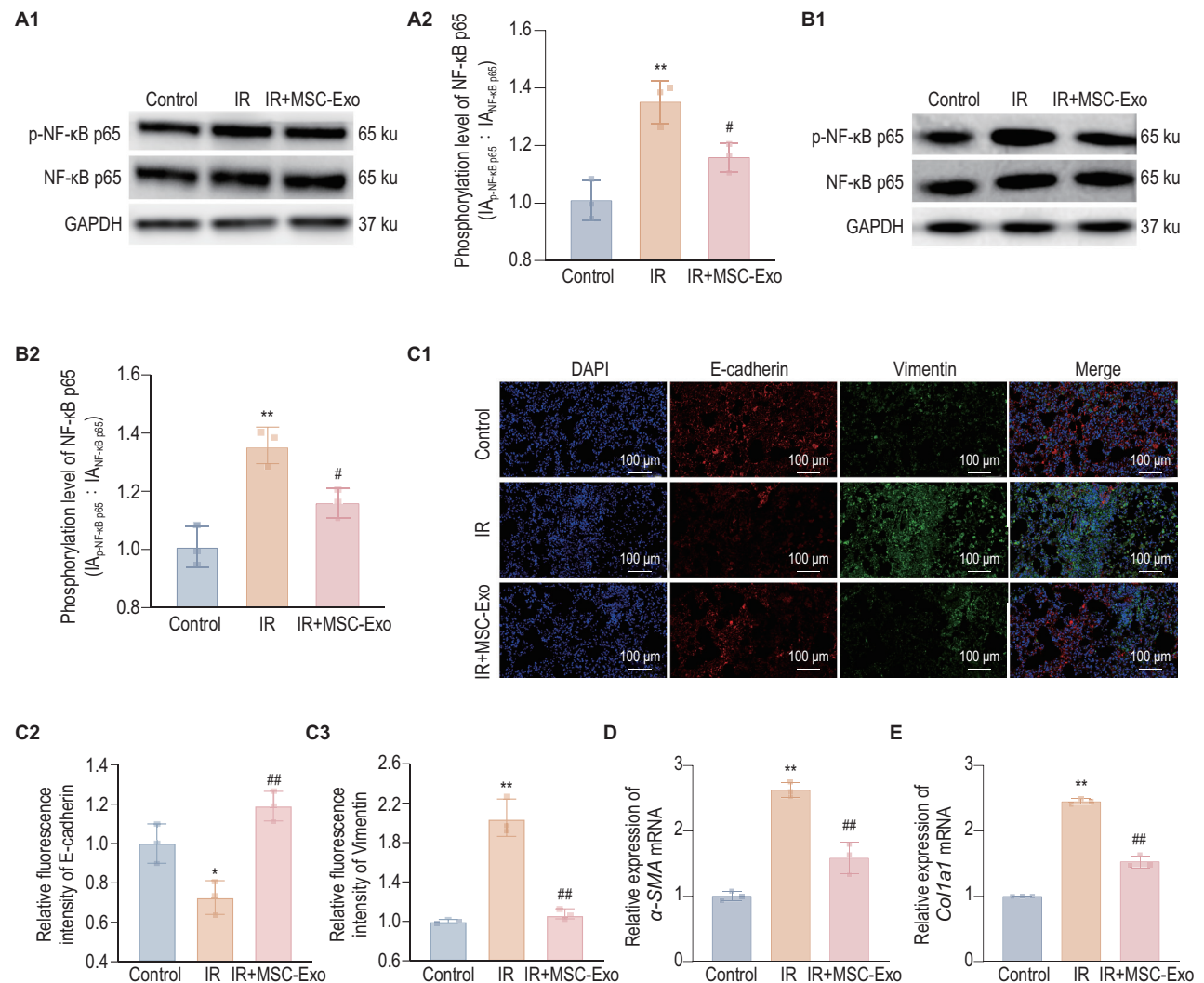


Fig.9 MSC-Exo modulated inflammation-epithelial-mesenchymal transition (EMT)-fibrosis cascade via nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65) pathway inhibition. See Fig.1 and Fig.6 for the mouse and cell treatment. Lung tissues were collected at 1 (A) and 20 (C-E) weeks post-IR, cells were collected at 24 h post-IR (B). Western blotting analysis of phosphorylated NF- κ B p65 (p-NF- κ B p65) and total NF- κ B p65 in lung tissues (A1) and in MLE-12 cells (B1). A2 and B2 were semi-quantitative results of A1 and B1. C1: representative immunofluorescence images of lung tissue sections stained for Epithelial cadherin (E-cadherin) and Vimentin, C2 and C3 were semi-quantitative analysis of C1. RT-qPCR analysis of α -SMA (D) and Col1a1 (E) mRNA expression in lung tissues. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control group; * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with IR group. IA: integrated absorbance.

对照组相比,照射组肺组织中纤维化相关基因 α -SMA 和 *Col1a1* mRNA 水平显著升高,与照射组相比,照射+MSC-Exo 组中 α -SMA 和 *Col1a1* mRNA 水平显著降低(图 9D、E)。

3 讨论

本研究结果显示, MSC-Exo 可显著减轻放射导致的肺部病理改变和纤维化程度,主要通过急性期抑制氧化应激、炎症反应,在后期干预纤维化进程,从而实现对 RILI 不同阶段的协同调控。

氧化应激是放射损伤的首要环节,放射产生的过量活性氧攻击生物膜,导致 MDA 堆积, SOD 活性和 GSH 水平降低^[14-15]。本研究中,经 MSC-Exo 治疗后,肺组织内 MDA 水平显著下降,而 SOD 活性和 GSH 水平均有所恢复。表明 MSC-Exo 能有效增强肺组织的抗氧化能力,减少活性氧累积,从源头上缓解 RILI。该结论在体外 MLE-12 细胞的放射性损伤模型中也得到了验证。炎症反应的级联放大是导致 RILI 向 RIPF 发展的原因之一^[16-17]。在本研究中, MSC-Exo 治疗后 BALF 中促炎因子水平显著降低;小鼠肺组织和 MLE-12 中多种炎症因子 mRNA 表达同步下调;肺组织 F4/80⁺巨噬细胞的浸润显著减少且 IL-1 β 蛋白表达显著下调。NF- κ B p65 的磷酸化是 NF- κ B 通路激活的关键标志^[18-19], NF- κ B 通路激活会驱动促炎因子表达,加剧放射导致的组织损伤^[11, 20]。Western 印迹法结果显示,照射后第 7 天小鼠肺组织中 NF- κ B p65 蛋白磷酸化水平显著升高,表明 NF- κ B 通路在 RILI 早期就处于激活状态,而 MSC-Exo 治疗可显著抑制其表达,在体外 MLE-12 细胞模型中也观察到类似结果。MSC-Exo 对 NF- κ B 通路的抑制作用不仅体现在炎症因子下调,还显著影响了 EMT 及纤维化进程^[21-22]。免疫荧光染色结果显示,照射组肺组织中上皮标志物 E-cadherin 表达降低,而间质标志物 Vimentin 表达升高,提示 EMT 被激活且 MSC-Exo 治疗可显著逆转这一变化。同时,照射组肺组织中 α -SMA 和 *Col1a1* mRNA 水平显著升高,而 MSC-Exo 处理后其水平明显降低,表明 MSC-Exo 不仅抑制了 EMT,还有效阻断了肌成纤维细胞的活化及胶原蛋白的过度沉积。上述结果提示, MSC-Exo 以早期干预氧化应激为起点,进而调控 RILI 向 RIPF 发展过程中的 NF- κ B 通路、炎症反应、EMT 及胶原沉积等多个病理环节,值得注意的是,本研究结果与近期一项研究相互印证^[8],该研究在大鼠模型中证实 MSC-

Exo 通过蛋白激酶 B/NF- κ B 通路缓解 RIPF,与本研究的小鼠模型形成物种互补。不同的是,本研究将动物实验取材时间前移至第 7 天并延长至第 140 天,更全面地捕捉了从急性氧化应激到慢性纤维化的完整进程。本研究采用人脐带 MSC-Exo 治疗 C57BL/6J 小鼠 RILI 模型,并在小鼠 MLE-12 细胞中进行机制验证,该跨物种实验设计在本领域具有广泛认可。首先,已有大量研究证实,人源 MSC-Exo 在免疫健全小鼠模型中具有良好的安全性与治疗效果^[23-24]。其次,外泌体本身不表达主要组织相容性复合体 II 类分子,因此在异种应用中不易引发强烈的免疫排斥反应,相较于细胞移植具有显著的免疫兼容性优势^[25]。

本研究结果显示,治疗组各项指标呈现向对照组靠拢的趋势,从侧面支持了 MSC-Exo 在本研究剂量下的安全性。当然,更严谨的安全性评估仍需设立 MSC-Exo 对照组,通过系统的毒性病理学评价全面评估 MSC-Exo 在健康状态下的生物学效应。

综上所述,本研究表明 MSC-Exo 通过缓解辐射引起的肺组织的氧化应激与炎症,减轻肺组织损伤和肺纤维化程度。然而本研究主要基于表达水平,后续研究需围绕关键分子通路的功能验证展开。此外,近年来工程化外泌体的发展为 MSC-Exo 在 RILI 中的应用提供了新方向,通过优化外泌体的靶向性(如表面修饰肺上皮细胞特异性配体)与功能内容物(如富集抗炎、抗纤维化微小 RNA)可显著增强其治疗效果^[26-27],探索新型给药方式(如雾化吸入和脂质体辅助递送)^[28]也是未来研究的重要方向。因此开发具有靶向性与功能协同增强的工程化 MSC-Exo,有望成为 RILI 和 RIPF 的精准、无细胞治疗新策略。

作者贡献:左鑫负责实验设计、实验实施、数据分析和文章撰写;曹方潇和蔡晓翼负责实验实施和查阅文献;杜丽、程晓晨和卢育新负责实验指导和文章修改;肖凤君和孙中生负责提供研究经费、把握整体实验方向和论文修改。

利益冲突:所有作者声明本文无任何利益冲突。

参考文献:

- [1] 杨宏山,李俊,贾晓艳,等.胸部恶性肿瘤患者外周血 IL-6、IL-10、TGF- β 1 水平与放射性肺损伤的相关性研究[J].临床肺科杂志(*Journal of Clinical Pulmonary Medicine*), 2023, 28(1): 93-97.
- [2] 张飞,胡宪强,卢锋,等.胸部肿瘤放射治疗中放射性肺损伤与剂量区域体积相关性研究[J].中国临床医生杂志(*Chinese Journal for Clinicians*), 2021, 49(12): 1460-1464.

- [3] Hanania AN, Mainwaring W, Ghebre YT, *et al.* Radiation-induced lung injury: assessment and management[J]. *Chest*, 2019, 156(1): 150-162.
- [4] Wang Y, Zhang JH, Shao CL. Cytological changes in radiation-induced lung injury[J/OL]. *Life Sci*, 2024, 358: 123188 (2024-10-29) [2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39481833/>. DOI: 10.1016/j.lfs.2024.123188.
- [5] Sgalla G, Iovene B, Calvello M, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management[J/OL]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 32 (2018-02-22) [2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29471816/>. DOI: 10.1186/s12931-018-0730-2.
- [6] Sugino K, Ono H, Saito M, *et al.* Tolerability and efficacy of switching anti-fibrotic treatment from nintedanib to pirfenidone for idiopathic pulmonary fibrosis[J/OL]. *PLoS One*, 2024, 19(6): e0305429 (2024-06-13) [2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38870246/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0305429.
- [7] Feng XF, Feng B, Zhou JH, *et al.* Mesenchymal stem cells alleviate mouse liver fibrosis by inhibiting pathogenic function of intrahepatic B cells[J]. *Hepatology*, 2025, 81(4): 1211-1227.
- [8] Wang LL, Ouyang MY, Yang ZE, *et al.* Mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate radiation induced pulmonary fibrosis by inhibiting the protein kinase B / nuclear factor kappa B pathway[J / OL]. *World J Stem Cells*, 2025, 17(6): 106488 (2025-05-26) [2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40585959/>. DOI: 10.4252/wjsc.v17.i6.106488.
- [9] Zhu WW, Sun L, Zhao PC, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor facilitates the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells derived exosomes in acute myocardial infarction through upregulating miR-133a-3p[J/OL]. *J Nanobiotechnol*, 2021, 19(1): 61 (2021-02-27) [2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33639970/>. DOI: 10.1186/s12951-021-00808-5.
- [10] Dong B, Wang C, Zhang J, *et al.* Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells attenuate the inflammation of severe steroid-resistant asthma by reshaping macrophage polarization[J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 204 (2021-03-24) [2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33761997/>. DOI: 10.1186/s13287-021-02244-6.
- [11] Gao X, Niu SY, Li LL, *et al.* Hydrogen therapy promotes macrophage polarization to the M2 subtype in radiation lung injury by inhibiting the NF- κ B signaling pathway[J / OL]. *Heliyon*, 2024, 10(10): e30902 (2024-03-30) [2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38826750/>. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e30902.
- [12] Willis GR, Fernandez-Gonzalez A, Anastas J, *et al.* Mesenchymal stromal cell exosomes ameliorate experimental bronchopulmonary dysplasia and restore lung function through macrophage immunomodulation[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 197(1): 104-116.
- [13] 易静, 陶宁, 吕琳, 等. 骨髓干细胞来源胞外囊泡通过调节 miR-100-5p 抑制 γ 射线所致小鼠骨髓细胞 FDC-P1 凋亡[J]. 中国药理学与毒理学杂志 (*Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*), 2022, 36(5): 355-363.
- [14] He YM, Li D, Ye HP, *et al.* Oxidative stress-induced CDO1 glutathionylation regulates cysteine metabolism and sustains redox homeostasis under ionizing radiation[J/OL]. *Redox Biol*, 2025, 83: 103656 (2025-04-30) [2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40347691/>. DOI: 10.1016/j.redox.2025.103656.
- [15] Wu YX, Ge LL, He S, *et al.* Macrophage-specific deletion of HO-1 aggravates radiation-induced lung injury through an PP2A-dependent manner[J / OL]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 166: 115548 (2025-09-15) [2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40957171/>. DOI: 10.1016/j.intimp.2025.115548.
- [16] Luo H, Liu XM, Liu H, *et al.* ACT001 ameliorates ionizing radiation-induced lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome pathway[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 163: 114808 (2023-05-03) [2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37146417/>. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114808.
- [17] Li MJ, Tian Y, Wang XT, *et al.* Exosomes derived from adipose-derived stem cells alleviate acute radiation-induced dermatitis through up-regulating hyaluronic acid synthase 1 expression[J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2025, 16(1): 253 (2025-05-20) [2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40394699/>. DOI: 10.1186/s13287-025-04276-8.
- [18] 吴艳艳, 王宇斐, 陈敏, 等. 杜鹃素对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的保护作用及机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志 (*Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*), 2025, 39(1): 36-45.
- [19] 苏贵新, 黄雨龙, 李长伟, 等. 柴陷花参汤通过 TLR4 / NF- κ B 通路改善脂多糖诱导的急性肺损伤[J]. 中国药理学与毒理学杂志 (*Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*), 2025, 39(9): 651-661.
- [20] Xiao K, He WX, Guan W, *et al.* Mesenchymal stem cells reverse EMT process through blocking the activation of NF- κ B and Hedgehog pathways in LPS-

- induced acute lung injury[J / OL]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10): 863 (2020-10-15) [2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33060560/>. DOI: 10.1038/s41419-020-03034-3.
- [21] Zhang HM, Zang CY, Zhao W, *et al*. Exosome derived from mesenchymal stem cells alleviates hypertrophic scar by inhibiting the fibroblasts via TNFSF-13/HSPG2 signaling pathway[J]. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18: 7047-7063.
- [22] Shi XF, Tuo YJ, Liao ZY, *et al*. Functions and mechanisms of UC-MSC-derived exosomal miR-486-5p in pulmonary fibrosis[J/OL]. *Front Oncol*, 2025, 15: 1542008 (2025-07-07) [2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40692863/>. DOI: 10.3389/fonc.2025.1542008.
- [23] Siriphanit R, Thanasarnaksorn W, Boonpethkaew S, *et al*. Exosome-based therapy: a comparative study of adipose-and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes in psoriatic mouse model[J/OL]. *Exp Dermatol*, 2025, 34(11): e70176 (2025-11-11) [2026-02-05]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/exd.70176>.
- [24] Zhao LY, Tang YW, Wu BB, *et al*. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes prevent and alleviate experimental pulmonary fibrosis by modulating the cytoskeleton of macrophages[J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2025, 16(1): 533 (2025-09-29) [2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41024236/>. DOI: 10.1186/s13287-025-04646-2.
- [25] Zheng QY, Zhang SJ, Guo WZ, *et al*. The unique immunomodulatory properties of MSC-derived exosomes in organ transplantation[J/OL]. *Front Immunol*, 2021, 12: 659621 (2021-04-06) [2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33889158/>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.659621.
- [26] Wang YJ, Huang JY, An YL, *et al*. Magnetic engineered bone mesenchymal stem cells-derived exosomes for targeted acute lung injury therapy[J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2025, 16(1): 539 (2025-10-01) [2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41035003/>. DOI: 10.1186/s13287-025-04598-7.
- [27] Zhang WY, Wen L, Du L, *et al*. S-RBD-modified and miR-486-5p-engineered exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress ferroptosis and alleviate radiation-induced lung injury and long-term pulmonary fibrosis[J/OL]. *J Nanobiotechnol*, 2024, 22(1): 662 (2024-10-26) [2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39462403/>. DOI: 10.1186/s12951-024-02830-9.
- [28] Li M, Huang HP, Wei XF, *et al*. Clinical investigation on nebulized human umbilical cord MSC-derived extracellular vesicles for pulmonary fibrosis treatment[J / OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1): 179 (2025-06-04) [2026-02-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40461474/>. DOI: 10.1038/s41392-025-02262-3.

Mesenchymal stem cell-derived exosomes alleviate radiation-induced lung injury by suppressing oxidative stress and inflammation

ZUO Xin¹, CAO Fangxiao², CAI Xiaoyi², DU Li², CHENG Xiaochen², LU Yuxin²,
XIAO Fengjun², SUN Zhongsheng³

(1. School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 3. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: OBJECTIVE To investigate the protective effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes (MSC-Exo) against radiation-induced lung injury (RILI) and the underlying mechanisms. **METHODS** ① MSC-Exo were isolated from the culture supernatant of human umbilical cord mesenchymal stem cells via ultracentrifugation and characterized by transmission electron microscopy and nanoparticle tracking analysis. Western blotting was used to detect the expressions of exosomal markers (heat shock protein 70, tumor susceptibility gene 101, and cluster of differentiation 9 and Calnexin). ② *In vivo*: Male C57BL/6J

mice were randomly divided into control, irradiation (IR), and IR+MSC-Exo groups. Mice in the IR and IR+MSC-Exo groups received a single dose of 20 Gy γ -ray whole-thorax irradiation. The IR+MSC-Exo group was administrated with MSC-Exo (1×10^{12} particles $\cdot$ kg $^{-1}$) via tail vein injection on 0, 3, 7, 10, 14 days after irradiation. Lung tissues were collected on 7, 28, and 140 days post-irradiation for histopathological examination by hematoxylin-eosin and Masson's trichrome staining. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected on 7 and 28 days to measure the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-18, and interferon- γ (IFN- γ) by ELISA. On 7 days post irradiation, F4/80 and IL-1 β were detected by immunofluorescence staining while the superoxide dismutase (SOD) activity, reduced glutathione (GSH) content, and malondialdehyde (MDA) level were measured using commercial kits. mRNA expressions of *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-4* and *IL-10* were determined by RT-qPCR while the phosphorylation of nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65) was analyzed by Western blotting. On 140 days post-irradiation, E-cadherin and Vimentin were detected by immunofluorescence staining, mRNA expressions of α smooth muscle actin (α -SMA) and collagen type I alpha 1 chain (*Col1a1*) were detected by RT-qPCR.

③ *In vitro*: Mouse lung epithelial (MLE-12) cells were divided into control, IR, and IR+MSC Exo groups. Cells in the IR and IR+MSC Exo groups were exposed to a single dose of 10 Gy γ -ray irradiation. The IR+MSC Exo group was treated with MSC Exos (5×10^{12} particles $\cdot$ L $^{-1}$) after irradiation. At 24 h after treatment, the SOD activity, GSH content, and MDA level were measured. Cell viability was assessed by CCK-8 assay, mRNA levels of *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-4* and *IL-10* were detected by RT-qPCR, and NF- κ B p65 phosphorylation was analyzed by Western blotting.

RESULTS ① The isolated MSC-Exo appeared round or cup-shaped with a diameter of 70-150 nm, expressed HSP70, TSG101 and CD9, and were negative for calnexin. ② *In vivo*: Compared with the control group, pathological injury and collagen deposition were pronounced in lung tissues of irradiated mice, BALF levels of IFN- γ , TNF- α , IL-18 and IL-1 β increased, the SOD activity and GSH content decreased, but the MDA level elevated. The mRNA expressions of *TNF- α* and *IL-1 β* , the level of F4/80 $^{+}$ and IL-1 β were upregulated. The level of E-cadherin was decreased, the level of Vimentin was increased, the level of NF- κ B p65 phosphorylation, and the expressions of α -SMA and *Col1a1* were upregulated. Compared with the IR group, MSC-Exo treatment significantly ameliorated pulmonary pathological changes, suppressed collagen deposition, reduced BALF levels of IFN- γ , TNF- α , IL-18 and IL-1 β , restored the SOD activity and GSH content, lowered MDA levels, downregulated *TNF- α* and *IL-1 β* , alleviated F4/80 and IL-1 β level, increased E-cadherin level, decreased Vimentin level, inhibited NF- κ B p65 phosphorylation and EMT, and decreased α -SMA and *Col1a1* expressions. ③ *In vitro*: Compared with the control group, the IR group showed decreased cell viability, reduced SOD activity and GSH content, an elevated MDA level, upregulated *TNF- α* and *IL-1 β* mRNA, and increased NF- κ B p65 phosphorylation. MSC-Exo treatment significantly restored cell viability, elevated SOD activity and GSH content, reduced the MDA level, suppressed *TNF- α* and *IL-1 β* mRNA expressions, and inhibited NF- κ B p65 phosphorylation.

CONCLUSION MSC-Exo may exert protective effects against RILI by regulating NF- κ B p65 phosphorylation, preventing excessive activation of the NF- κ B pathway, inhibiting oxidative stress and inflammation and alleviating fibrosis.

Key words: radiation-induced lung injury; pulmonary fibrosis; mesenchymal stem cell-derived exosomes; lung epithelial cells; oxidative stress; inflammation

Corresponding authors: XIAO Fengjun, E-mail: xiaofjun1105@163.com; SUN Zhongsheng, E-mail: sunzs@biols.ac.cn

(Received: 2026-02-05 Accepted: 2026-03-16)

(本文编辑: 晁文华)