DOI:10.12441/spyswjs.20260528001 [文章编号] 1673-1689(2026)06-0101-12

莱茵衣藻细胞外囊泡对小鼠运动性疲劳的缓解作用

赵 军[1] 田 芳[2*] 葛 彬[2]

(1. 金陵科技学院体育部,江苏 南京 211169; 2. 南京医科大学体育部,江苏 南京 211166)

摘要:【目的】探究莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)细胞外囊泡(CLEVs)的抗氧化活性及其对小鼠运动性疲劳的缓解作用,为微藻来源细胞外囊泡在运动营养领域的应用提供参考。**【方法】**采用超速离心法分离CLEVs,并通过体外和体内试验评价其抗氧化及抗疲劳作用。**【结果】**CLEVs呈典型杯状或碗状形态,平均粒径为(88.35±0.36) nm。CLEVs可有效清除DPPH和$ABTS^+$自由基,且其体外抗氧化活性具有剂量依赖性。在H_2O_2诱导的氧化损伤模型中,CLEVs可提高超氧化物歧化酶(SOD)和还原型谷胱甘肽(GSH)水平,降低丙二醛(MDA)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)及乳酸(LA)水平,增加糖原储备。动物试验表明,CLEVs可显著延长负重游泳力竭时间,并通过上调*Nrf2*、下调*Keap1*的表达增强抗氧化防御。**【结论】**CLEVs可通过改善氧化应激、促进能量代谢和激活Nrf2/Keap1信号通路缓解运动性疲劳,在运动营养及抗疲劳产品开发中具有应用潜力。

关键词:微藻;莱茵衣藻;细胞外囊泡;抗氧化;抗运动性疲劳

Alleviating Effect of *Chlamydomonas reinhardtii*-derived Extracellular Vesicles on Exercise Fatigue in Mice

ZHAO Jun[1] *TIAN Fang*[2*] *GE Bin*[2]

(1. Department of Physical Education, Jinling Institute of Technology, Nanjing 211169, China; 2. Department of Physical Education, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

Abstract: [**Objective**] This study explored the antioxidant activity and exercise fatigue-alleviating effect of *Chlamydomonas reinhardtii*-derived extracellular vesicles (CLEVs), aiming to provide a reference for the application of microalgae-derived extracellular vesicles in the field of sports nutrition. [**Method**] CLEVs were isolated by ultracentrifugation, and their antioxidant and anti-fatigue effects were evaluated through *in vitro* and *in vivo* experiments. [**Result**] CLEVs exhibited typical cup- or bowl-shaped morphology with an average particle size of (88.35±0.36) nm. CLEVs demonstrated concentration-dependent antioxidant activity *in vitro* and effectively scavenged DPPH and $ABTS^+$ free radicals. In the H_2O_2-induced oxidative damage model, CLEVs increased the levels of superoxide dismutase (SOD) and reduced glutathione (GSH), decreased the levels of malondialdehyde (MDA), lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), and lactic acid (LA), and promoted glycogen storage. Animal experiments showed that CLEVs significantly prolonged the load swimming time to exhaustion and enhanced the antioxidant defense by upregulating the expression of *Nrf2* and downregulating the expression of *Keap1*. [**Conclusion**] CLEVs could alleviate exercise fatigue by ameliorating oxidative stress, promoting energy metabolism, and activating the Nrf2/Keap1 signaling pathway, demonstrating potential application in sports nutrition and the development of anti-fatigue products.

Keywords: microalgae; *Chlamydomonas reinhardtii*; extracellular vesicle; antioxidant; anti-exercise fatigue

---

基金项目:教育部产学合作协同育人项目(230800874254749)。

通信作者:田芳(1980—),女,学士,助理研究员,主要从事体育人文社会学研究。E-mail:Tianfang7101@163.com

收稿日期:2026-05-28 **修回日期:**2026-06-08

随着休闲体育和健身文化的普及，运动性疲劳及其干预策略受到广泛关注[1]。骨骼肌是机体运动和能量代谢的重要组织，其功能状态直接影响运动表现[2]。过度运动产生的大量活性氧（ROS）可诱发氧化应激并导致线粒体功能受损和能量代谢紊乱，是运动性疲劳的重要诱因[3]。因此，缓解氧化应激被认为是缓解运动性疲劳的重要策略[4-5]。

近年来，天然来源的细胞外囊泡因具有良好的生物相容性、低免疫原性和天然靶向性而受到广泛关注，其富含多种生物活性成分，在氧化应激调控方面具有潜在应用价值[6-7]。其中，微藻来源的细胞外囊泡因具有较强的生物活性，展现出良好的研究与应用价值[8]。

莱茵衣藻是一种已获批准的新型食品原料，富含多种营养成分，具有较高的开发利用价值[9]。目前，关于莱茵衣藻的研究主要集中于多糖的提取和功能评价[10]。然而，有关莱茵衣藻来源的细胞外囊泡在缓解氧化应激及抗运动性疲劳方面的作用尚缺乏系统研究。

因此，作者旨在从莱茵衣藻中分离纯化细胞外囊泡，系统评价其理化性质及体外抗氧化活性，并利用H_2O_2诱导的小鼠成肌细胞系C2C12细胞氧化应激模型，探究CLEVs对细胞内抗氧化防御系统、能量代谢及细胞膜完整性的影响。同时，通过建立小鼠负重游泳疲劳模型评价其改善运动耐力的效果，并结合实时定量逆转录聚合酶链式反应（RT-qPCR）检测Nrf2/Keap1信号通路相关基因的表达，以阐明其抗运动性疲劳的潜在机制，为开发基于CLEVs的新型运动营养补充剂和功能食品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

莱茵衣藻粉：青岛科海生物有限公司；PBS缓冲液、BCA蛋白质检测试剂盒、糖原（Gly）检测试剂盒、磷钨酸负染色液：北京索莱宝科技有限公司；果胶酶、1，1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）、2，2’-偶氮基二酸（3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸）（ABTS）、3，3’-二辛癸基氧杂羰花青高氯酸盐（DIO）：上海麦克林生化科技股份有限公司；超滤离心管（截留相对分子质量10 000的物质）：美国Merck Millipore公司；C2C12成肌细胞系（ATCC：CRL-1772）、C2C12完全培养基：上海中乔新舟生物技术有限公司；质量分数30%的H_2O_2：天津市大茂化学试剂厂；LA、LDH、SOD、MDA、CK、GSH、氧化型谷胱甘肽（GSSG）的检测试剂盒：南京建成生物工程研究所；细胞增殖与细胞毒性（CCK-8）检测试剂盒、RIPA裂解液：上海碧云天生物技术股份有限公司；马血清、DMEM培养基：美国赛默飞世尔科技公司；牛磺酸：上海阿拉丁生化科技股份有限公司；TransZol-Up、染料法荧光定量PCR预混液、cDNA逆转录试剂盒：北京全式金生物技术有限公司；7周龄的雄性C57BL/6J小鼠（19~23 g）：南京医科大学实验动物中心。

1.2 仪器与设备

超速离心机：CP100NX型，日本Hitachi公司；透射电子显微镜（TEM）：JEM-2100型，日本电子株式会社；离心机：TD3型，湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；恒温恒湿培养箱：HWS-250B型，天津泰斯特仪器有限公司；激光粒度电位分析仪：DT-1202型，美国分散科技仪器公司；酶标仪：A51119500C型，赛默飞世尔（中国）科技有限公司；荧光实时PCR系统：QuantStudio 6型，赛默飞世尔（中国）科技有限公司；超微量分光光度计：NanoDrop 2000c型，赛默飞世尔（中国）科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 CLEVs的制备

CLEVs的制备参考Li等[11]的方法并稍加修改。将40 g莱茵衣藻粉、200 mL PBS缓冲液和5 g果胶酶混合，在37 ℃以300 r/min搅拌12 h，之后以5 000 r/min离心15 min，收集上清液，再以10 000 r/min离心15 min，将收集的上清液依次经0.45、0.22 μm水系滤膜过滤，之后以40 000 r/min离心1 h，所有离心过程均在4 ℃下进行。使用3 mL无菌PBS缓冲液重悬沉淀。重悬液通过0.22 μm水系滤膜以获得纯化的CLEVs。按照BCA蛋白质检测试剂盒说明对CLEVs进行定量，并将其储存在−80 ℃下备用。

1.3.2 CLEVs的表征

将10 μL CLEVs悬浮液（1 mg/mL）在铜网上静置5 min，去除多余液体，使铜网在空气中晾干。用磷钨酸负染液负染色5 min，去除多余液体，将铜网在空气中晾干，之后在TEM下进行成像[12]。

使用激光粒度电位分析仪测定CLEVs悬浮液中颗粒的尺寸分布和多分散性指数（PDI）。

1.3.3　DPPH自由基清除率测定

参照Yu等[13]的方法配制DPPH工作液。设置CLEVs质量浓度梯度为5、10、20、40、80 μg/mL。取各质量浓度的CLEVs 120 μL，加入120 μL 0.2 mmol/L的DPPH工作液，避光反应30 min，用同体积的PBS缓冲液分别替代CLEVs和DPPH工作液，在517 nm处测定吸光度。每组设3次平行试验。按式（1）计算DPPH自由基清除率。

$$Y=(1-\frac{A_1-A_2}{A_0})\times 100\% \quad (1)$$

式中：

Y——DPPH自由基清除率，%；

A_0——加入PBS缓冲液和DPPH溶液后的吸光度；

A_1——加入样品和DPPH溶液后的吸光度；

A_2——加入样品和PBS缓冲液后的吸光度。

1.3.4　$ABTS^+$自由基清除率测定

参照Yu等[13]的方法配制ABTS工作液。设置CLEVs质量浓度梯度为5、10、20、40、80 μg/mL。取各质量浓度CLEVs 30 μL与190 μL ABTS工作液混合，避光孵育30 min，用同体积的PBS缓冲液分别替代CLEVs和ABTS工作液，在734 nm处测定吸光度。按式（2）计算$ABTS^+$自由基清除率。

$$S=(1-\frac{A_3-A_4}{A_5})\times 100\% \quad (2)$$

式中：

S——$ABTS^+$自由基清除率，%；

A_3——加入PBS缓冲液和ABTS溶液后的吸光度；

A_4——加入样品和ABTS溶液后的吸光度；

A_5——加入样品和PBS缓冲液后的吸光度。

1.3.5　细胞活力检测

将C2C12细胞以1×10^4个/孔的密度接种于96孔细胞培养板中，在37 ℃、CO_2体积分数5%的培养箱中培养24 h。随后加入含有体积分数2%马血清的DMEM培养基以诱导C2C12细胞分化，诱导时间4 d。分化完成后，分别用含有0、25、50、100、200 μg/mL CLEVs的无血清DMEM培养基孵育细胞24 h，使用CCK-8细胞活力测定试剂盒检测不同质量浓度样品对细胞活力的影响[14]。此外，分别使用含有0、100、200、300、400、500 μmol/L H_2O_2的无血清培养基孵育细胞12 h，使用CCK-8细胞活力测定试剂盒检测不同质量浓度样品对细胞活力的影响，以确定细胞氧化损伤模型组中H_2O_2的浓度。

1.3.6　细胞对CLEVs的摄取试验

将C2C12细胞以1×10^6个/孔的密度接种于6孔细胞培养板中，按1.3.5的方法诱导C2C12细胞分化。随后分别在无血清培养基（对照组）、含等量游离DIO染料的无血清培养基（DIO组）和含有DIO染料标记的CLEVs（50 μg/mL）的无血清培养基（DIO-CLEVs组）中避光孵育5 h。其中，DIO染料标记的CLEVs制备方式如下：将DIO染料加入CLEVs悬液中，使DIO终浓度为5 μmol/L，避光孵育30 min，随后使用超滤离心管除去游离的DIO染料。孵育结束后用无菌PBS缓冲液清洗细胞2次，4 ℃下每孔加入300 μL RIPA裂解液，反应5 min。随后加入300 μL无菌PBS缓冲液混匀，转移至96孔黑色透底板，于酶标仪的荧光模式（激发波长484 nm，发射波长501 nm）下测定荧光强度。同时通过BCA蛋白质检测试剂盒测定裂解液中蛋白质质量浓度。按式（3）计算归一化细胞相对摄取量。

$$Q=(F_1-F_2)/\rho \quad (3)$$

式中：

Q——归一化细胞相对摄取量，mL/mg；

F_1——样品组相对荧光强度；

F_2——空白组相对荧光强度；

ρ——细胞蛋白质质量浓度，mg/mL。

1.3.7　运动性疲劳相关生化指标测定

将C2C12细胞以1×10^6个/孔的密度接种于6孔细胞培养板中，分别设置正常组、样品组、模型组、样品干预组。正常组为无血清培养基，样品组为含有50 μg/mL CLEVs的无血清培养基，模型组为含有300 μmol/L H_2O_2的无血清培养基，样品干预组为含有50 μg/mL CLEVs和300 μmol/L H_2O_2的无血清培养基。按1.3.5的方法诱导C2C12细胞分化并孵育12 h，弃去培养基。用无菌PBS缓冲液清洗细胞2次，每孔加入300 μL RIPA裂解液，4 ℃下反应5 min。使用BCA蛋白质检测试剂盒测定细胞裂解液中蛋白质质量浓度。按试剂盒说明书对细胞裂解液中的LA、LDH、SOD、MDA、CK、Gly、GSH、GSSG进行检测。

1.3.8 动物分组及负重游泳力竭测试

所有动物试验均在南京医科大学动物研究中心完成，所有试验方案均获得南京医科大学机构动物护理与使用委员会的批准（动物伦理批准号：IACUC-2506054）。小鼠饲养于SPF级动物房，温度（23±3）℃、相对湿度30%~70%，采用12 h明/暗循环饲养，自由摄食和饮水。适应性喂养1周后，将小鼠随机分为6组（每组12只），分别为空白对照组（Con组）、模型组（Mod组）、低剂量组（LD组，每日灌胃10 mg/kg CLEVs，以小鼠体质量计）、中剂量组（MD组，每日灌胃25 mg/kg CLEVs，以小鼠体质量计）、高剂量组（HD组，每日灌胃50 mg/kg CLEVs，以小鼠体质量计）以及阳性对照组（PD组，每日灌胃50 mg/kg牛磺酸，以小鼠体质量计）。除Con组外，其他组每3 d进行1次30 min的游泳训练，总计4周，记录各组小鼠体质量。4周后将每组小鼠随机分成A、B两部分进行后续试验。

参照文献[15]所述方法，末次灌胃30 min后，各组A部分小鼠进行负重游泳力竭测试。将尾部固定铅坠（相当于其体质量的5%）的小鼠放入水深30 cm、水温恒定为25 ℃的游泳池中。测试期间，持续循环池水以防止小鼠漂浮或静止不动。从测试开始记录游泳时间，直至小鼠沉入水中后10 s内未能浮出水面呼吸，将该时间记为游泳力竭时间。

1.3.9 生化指标和RT-qPCR检测

各组B部分小鼠在最后1次游泳训练30 min后进行安乐死处理。采集血液样品，于4 ℃、3 000 r/min离心10 min，收集血清备用。按照试剂盒说明书测定血清中SOD、MDA活力及LA、CK水平并记录脏器质量。收集小鼠腓肠肌，参照Zhou等[16]的方法进行RT-qPCR检测。腓肠肌组织经无菌、无酶PBS缓冲液清洗后于液氮中研磨，采用TransZol-Up提取总RNA，使用超微量分光光度计检测RNA的纯度及浓度。取2.0 μg总RNA作为模板，采用cDNA逆转录试剂盒合成cDNA。随后使用染料法荧光定量PCR预混液在实时PCR系统上进行RT-qPCR检测，总反应体积为20 μL，引物序列见表1。以*β-actin*基因为内参，采用$2^{-\Delta\Delta C_t}$法[17]计算目的基因的相对表达水平。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	方向	引物序列（5′—3′）
Keap1	反向	GTGTCCATTGAGGGTATCCACC
	正向	GCTCAGCGAAGTTGGCGAT
Nrf2	反向	TCCAGTCAGAAACCAGTGGAT
	正向	GAATGTCTGCGCCAAAAGCTG
HO-1	反向	CCCTGGAGGAGGAGATTGAG
	正向	TGTTGGGGAAGAAGAAG
NQO1	反向	GAAGAGCACTGATCGTGGC
	正向	GGATACTGAAAGTTCGCAGGG
β-actin	反向	AGGTTCATGAGGTAGTCTGTC
	正向	GTGAAAAGATGACCCAGATCATGT

1.4 数据分析

所有试验均重复3次，数据以平均值±标准差表示。采用Origin 2022处理数据并绘图。通过SPSS 16.0进行单因素方差分析。

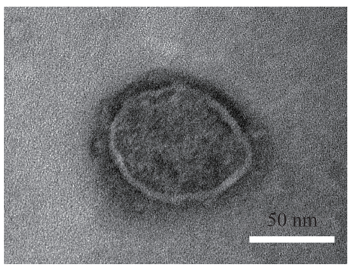
2 结果与讨论

2.1 CLEVs的形貌表征

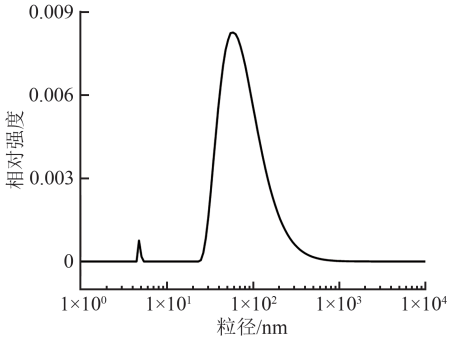
采用超速离心法从莱茵衣藻中分离获得CLEVs。如图1所示，CLEVs呈典型的杯状或碗状形态，该形态为囊泡在制样干燥过程中的常见特征，提示其具有完整的脂质双分子层结构[18]。CLEVs平均粒径为（88.35±0.36）nm，PDI为0.42 ±0.03。该粒径与藻类及植物来源细胞外囊泡的典型特征一致[19]。综上，超速离心法可有效获得结构完整、粒径分布适中的CLEVs。

2.2 CLEVs的体外抗氧化活性

如图2~3所示，5 μg/mL CLEVs的DPPH自由基清除率为（26.73±0.91）%，80 μg/mL时达到（97.85±1.60）%，表明其具备较强的供氢或电子转移能力。CLEVs质量浓度为5 μg/mL时，$ABTS^{+}$自由基清除率为（21.30±0.79）%，在80 μg/mL时达到（96.35±1.10）%，进一步证实其具有广泛的自由基中和潜力[20]。值得注意的是，CLEVs质量浓度为5~40 μg/mL时，自由基清除率提升最为明显，表明该范围可能是其体外抗氧化活性快速发挥作用的阶段。当质量浓度进一步升高至80 μg/mL时，自由基清除率增长趋缓，这可能是由于自由基清除反应趋于饱和，导致其体外抗氧化活性增幅减缓[21]。上述结果表明，CLEVs可能通过供氢或电子转移机制发挥抗氧化作用，并具有良好的量效关系，为其后续在氧化应激模型中的应用提供了依据。



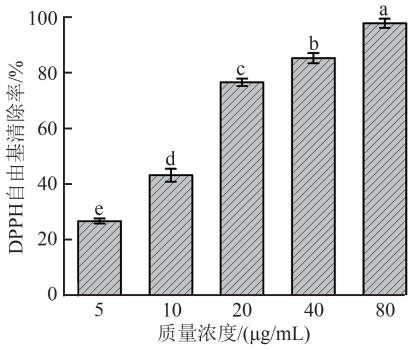
(a) CLEVs的TEM图



(b) 粒径分布

图1　CLEVs的TEM图和粒径分布

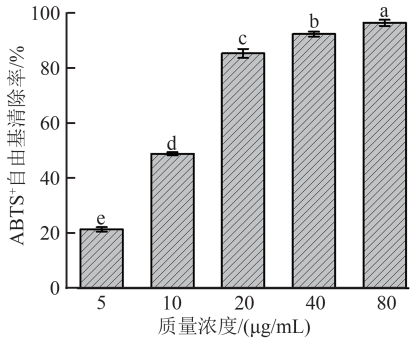
Fig. 1　TEM image and particle size distribution of CLEVs



不同小写字母表示各组之间存在显著差异（P<0.05）。

图2　不同质量浓度CLEVs的DPPH自由基清除率

Fig. 2　DPPH free radical scavenging rates of CLEVs at different mass concentrations



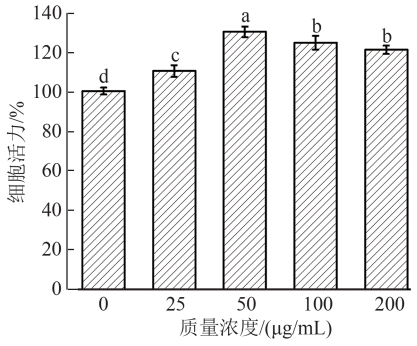
不同小写字母表示各组之间存在显著差异（P<0.05）。

图3　不同质量浓度CLEVs的$ABTS^+$自由基清除率

Fig. 3　$ABTS^+$ free radical scavenging rates of CLEVs at different mass concentrations

2.3　细胞活力与归一化细胞相对摄取量分析结果

细胞活力是评估化合物生物相容性和促增殖作用的重要指标[22]。为此，采用CCK-8法评估了CLEVs对C2C12细胞活力的影响。如图4所示，采用0~200 μg/mL CLEVs处理24 h后，未表现出细胞毒性，细胞活力整体呈先升高后趋于平稳的趋势。其中，50 μg/mL处理组细胞活力最高，为（130.65±2.65）%，显著高于对照组的（100.57±1.75）%，提示其具有较强的促增殖作用。随着CLEVs质量浓度进一步升高，C2C12细胞活力略有下降但仍高于对照组，表明CLEVs对C2C12细胞的促增殖作用具有一定的剂量依赖性[23]。基于上述结果，选择质量浓度50 μg/mL的CLEVs进行后续研究。



不同小写字母表示各组之间存在显著差异（P<0.05）。

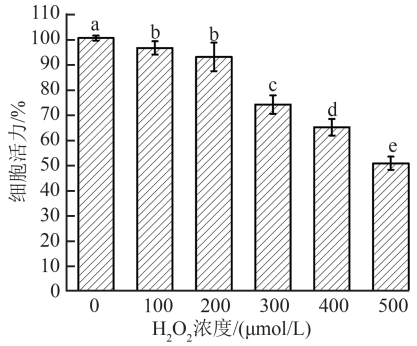
图4　不同质量浓度CLEVs对C2C12细胞活力的影响

Fig. 4　Effects of different mass concentrations of CLEVs on C2C12 cell viability

此外，为构建H_2O_2诱导的氧化损伤模型，对不同浓度H_2O_2（0~500 μmol/L）处理12 h后的C2C12细胞活力进行检测。如图5所示，H_2O_2对细胞的损伤具有剂量依赖性，当H_2O_2浓度达到300 μmol/L时，细胞活力下降至（74.20±5.66）%。细胞活力低于80%，提示已产生明显细胞损伤[24]。因此，选择300 μmol/L的H_2O_2构建C2C12细胞氧化损伤模型。

为验证CLEVs能否被C2C12细胞有效内化，通过DIO荧光标记结合酶标仪定量分析其细胞内化情况。如图6所示，DIO-CLEVs组的归一化细胞相对摄取量高达（0.565 9±0.031 5）mL/mg，为DIO组的7.6倍。这可能是由于CLEVs并非单纯通过携带染料吸附于细胞表面，而是以完整囊泡形式通过胞吞等主动转运机制进入细胞[25]。其较高摄取效

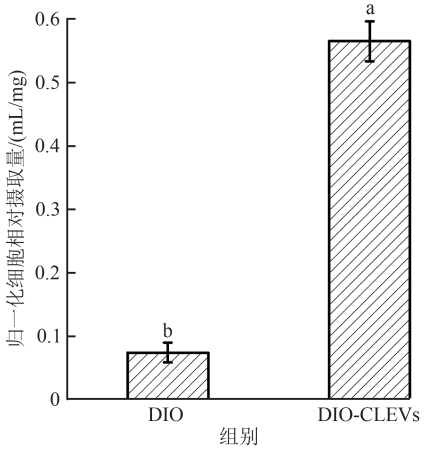
率可能与纳米级粒径及天然膜结构有关，有助于其与细胞膜相互作用并促进内化过程[26]。综上，CLEVs可被C2C12细胞有效内化，为其在细胞内发挥抗氧化等生物学功能提供了有利条件。



不同小写字母表示各组之间存在显著差异（P<0.05）。

图 5 不同浓度 H_2O_2 对 C2C12 细胞活力的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of H_2O_2 on C2C12 cell viability



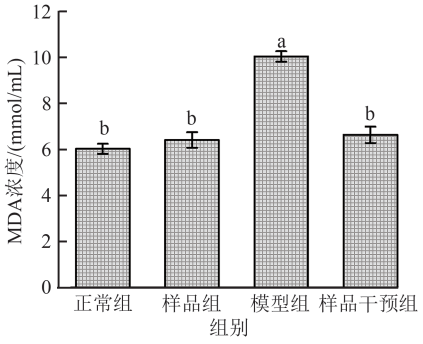
不同小写字母表示各组之间存在显著差异（P<0.05）。

图 6 C2C12 细胞对 CLEVs 的归一化细胞相对摄取量

Fig. 6 Normalized relative cellular uptake of CLEVs by C2C12 cells

2.4 C2C12 细胞氧化损伤模型的生化指标分析

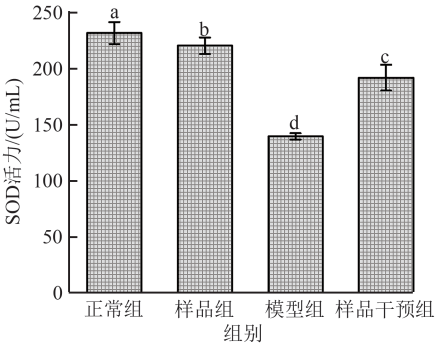
氧化应激是发生运动性疲劳的重要诱因[27]，SOD 和 MDA 是评估氧化应激水平的重要指标。GSH/GSSG 体系作为表征细胞氧化还原状态的核心标志物，其变化可直接反映细胞抗氧化能力[28]。为评估 CLEVs 对 H_2O_2 诱导的 C2C12 细胞氧化应激及运动性疲劳损伤的缓解作用，测定了 MDA、GSH、GSSG 水平和 SOD 活力。如图 7~8 所示，H_2O_2 刺激导致模型组 MDA 浓度升高至（10.04±0.23）mmol/mL，同时 SOD 活力下降至（139.71±2.82）U/mL，表明细胞发生明显的脂质过氧化并伴随抗氧化防御系统受损[29]。经 CLEVs 干预后，MDA 浓度降低至（6.63±0.35）mmol/mL，SOD 活力恢复至（192.14±11.58）U/mL，表明 CLEVs 能有效抑制脂质过氧化并增强细胞内源性抗氧化酶活力。



不同小写字母表示各组之间存在显著差异（P<0.05）。

图 7 不同处理组对细胞中 MDA 浓度的影响

Fig. 7 Effects of different treatments on MDA concentration in C2C12 cells

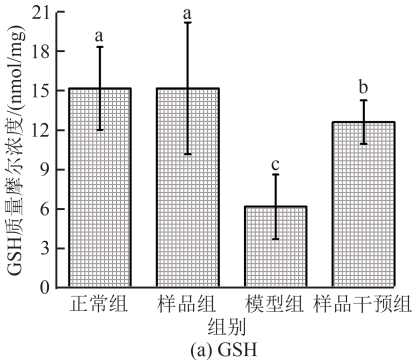


不同小写字母表示各组之间存在显著差异（P<0.05）。

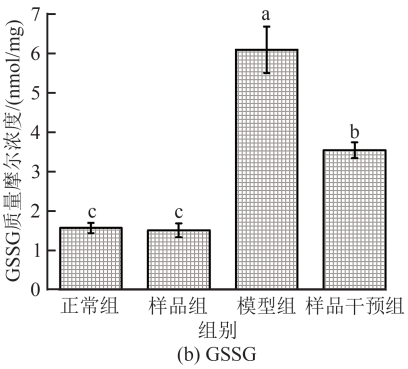
图 8 不同处理组对细胞中 SOD 活力的影响

Fig. 8 Effects of different treatments on SOD activity in C2C12 cells

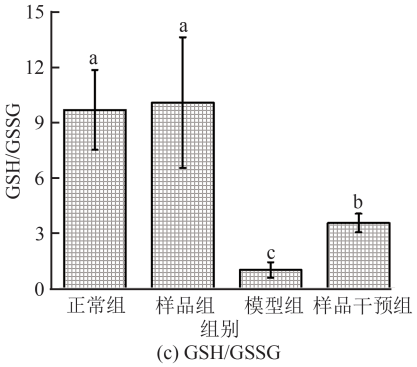
如图 9 所示，正常组、样品组、模型组和样品干预组中 GSH 质量摩尔浓度分别为（15.16±3.15）、（15.17±5.01）、（6.15±0.59）、（12.59±0.20）nmol/mg。与正常组相比，H_2O_2 处理显著降低了 GSH 质量摩尔浓度，表明细胞内 GSH 被大量消耗，氧化应激水平升高。CLEVs 干预后，GSH 明显回升，表明其可有效缓解 GSH 损耗。与模型组相比，CLEVs 处理后的 GSSG 质量摩尔浓度明显降低。模型组的 GSH/GSSG 值（1.01±0.42）显著低于正常组（9.71±2.17），而经 CLEVs 干预后，该比值升高至 3.56±0.51，表明 CLEVs 有助于重建细胞的 GSH 储备，维持氧化还原平衡。



(a) GSH



(b) GSSG



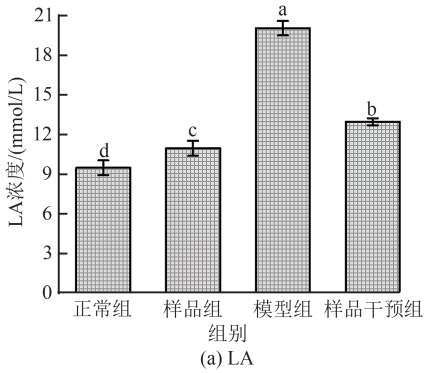
(c) GSH/GSSG

不同小写字母表示各组之间存在显著差异（P<0.05）。

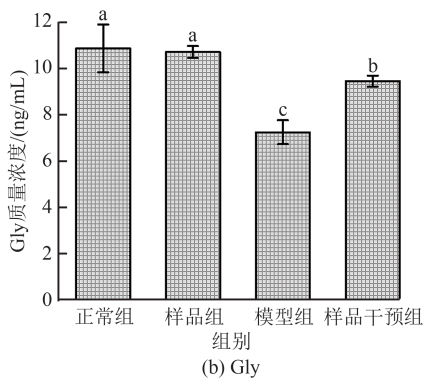
图 9　不同处理组中 GSH、GSSG 质量摩尔浓度和 GSH/GSSG 对比

Fig. 9　Comparison of GSH and GSSG molal concentrations and GSH/GSSG ratios among different treatment groups

LA 与 Gly 是反映细胞能量代谢状态与疲劳程度的重要指标[30]。如图 10 所示，与正常组相比，模型组 LA 浓度显著升高至（20.02±0.55）mmol/L，而 Gly 质量浓度降低至（7.23±0.52）ng/mL，提示细胞糖酵解增强并伴随能量储备下降，呈现典型的运动性疲劳样代谢特征。经 CLEVs 干预后，LA 浓度降至（12.95±0.27）mmol/L，Gly 质量浓度升至（9.44±0.24）ng/mL。表明 CLEVs 可在一定程度上改善糖代谢紊乱并减少能量消耗，从而减轻与氧化应激相关的疲劳样代谢特征。



(a) LA



(b) Gly

不同小写字母表示各组之间存在显著差异（P<0.05）。

图 10　不同处理组对 LA 浓度和 Gly 质量浓度的影响

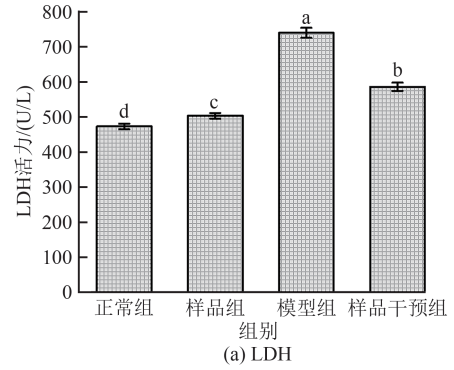
Fig. 10　Effects of different treatments on LA concentration and Gly mass concentration

LDH 和 CK 是反映细胞膜完整性及肌肉损伤的重要指标，其释放水平可用于评价氧化应激诱导的细胞膜通透性变化程度及细胞损伤程度[31]。如图 11 所示，与正常组相比，模型组 LDH 和 CK 活力显著升高，分别达到（738.95±14.15）U/L 和（1 029.12±33.89）U/L，表明 H_2O_2 诱导的氧化应激导致细胞膜损伤及肌肉中相关酶泄漏。CLEVs 干预后，LDH 与 CK 活力分别降至（585.20±11.93）U/L 和（605.45±11.67）U/L，表明其可有效减轻 H_2O_2 诱导的细胞膜通透性增加及相关酶泄漏，从而缓解与氧化应激相关的疲劳样损伤。

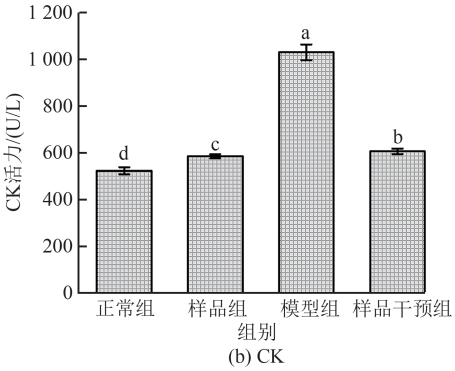
综上，CLEVs 可通过增强抗氧化防御、维持谷胱甘肽稳态、改善能量代谢及保护细胞膜完整性等多途径协同作用，缓解 H_2O_2 诱导的 C2C12 细胞氧化应激及运动性疲劳损伤，表明其在骨骼肌细胞运动性疲劳干预中具有潜在应用价值。

2.5　运动性疲劳模型小鼠的体质量及脏器质量分析

体质量和内脏质量是衡量补充剂成分安全性的重要指标。如图 12~13 所示，与 Con 组相比，Mod 组、LD 组、MD 组、HD 组及 PD 组小鼠体质量



(a) LDH

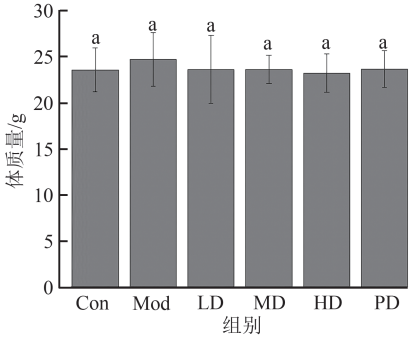


(b) CK

不同小写字母表示各组之间存在显著差异（P<0.05）。

图 11 不同处理组对细胞 LDH 活力和 CK 活力的影响

Fig. 11 Effects of different treatments on LDH and CK activities in C2C12 cells



相同小写字母表示各组之间无显著差异（P>0.05）。

图 12 不同处理组中小鼠体质量对比

Fig. 12 Comparison of body mass of mice among different treatment groups

均无显著差异。各组小鼠主要脏器质量与 Con 组相比亦无显著差异。上述结果表明，CLEVs 干预对小鼠生长发育未产生明显毒副作用。

2.6 运动性疲劳模型小鼠的负重游泳力竭时间分析

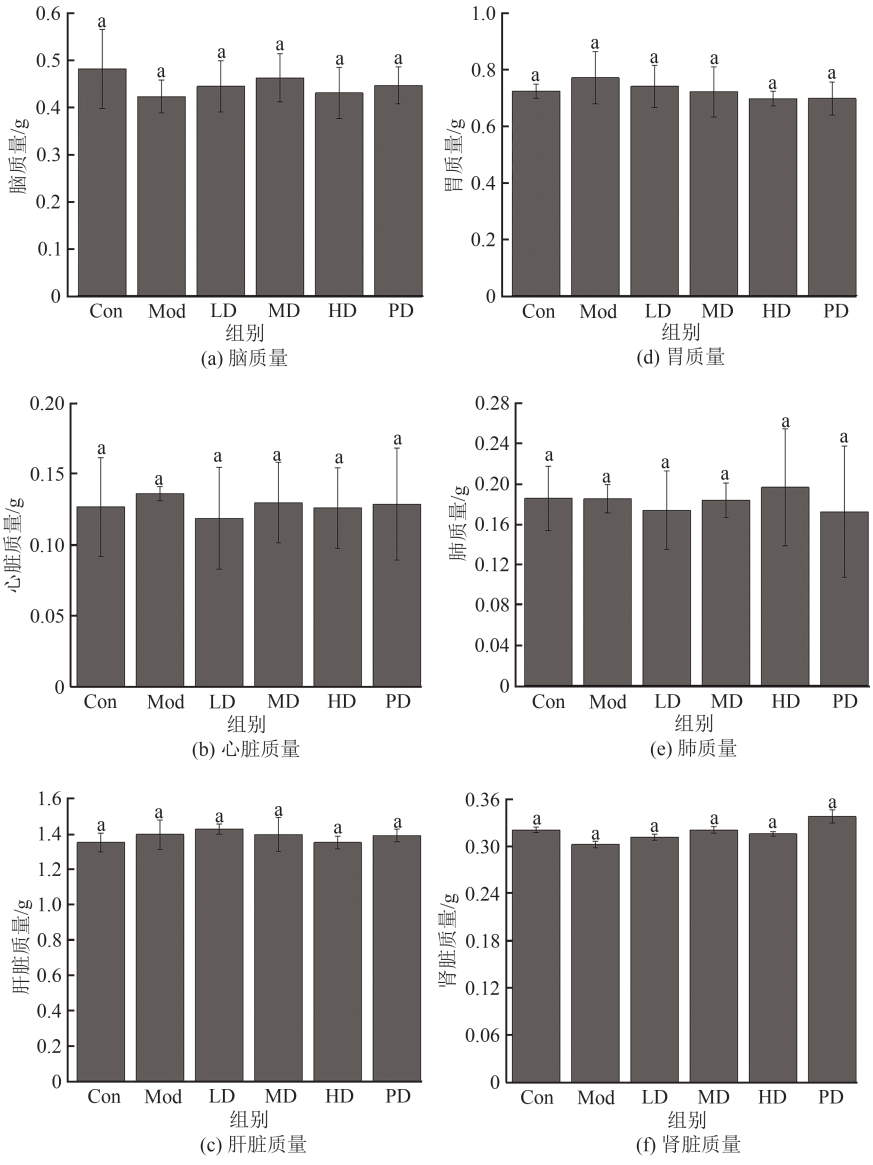
负重游泳力竭时间是评价机体运动耐力及抗疲劳能力的重要指标[32]。如图 14 所示，与 Mod 组相比，各 CLEVs 干预组及 PD 组小鼠的负重游泳力竭时间均有所延长。其中，LD 组、MD 组、HD 组和 PD 组的负重游泳力竭时间分别为（11.28±2.04）、（13.05±1.34）、（15.36±1.90）、（13.69±2.37）min，较 Mod 组分别提高了 21.03%、40.02%、64.81% 和 46.89%。随着 CLEVs 剂量的增加，负重游泳力竭时间呈递增趋势，其中 HD 组效果最为显著，表明 CLEVs 能够有效提高小鼠运动耐力，具有较好的抗运动性疲劳潜力。

2.7 CLEVs 对小鼠氧化应激及运动性疲劳相关指标的影响

为进一步评价 CLEVs 对小鼠运动性疲劳及氧化应激状态的影响，检测了小鼠血清中 SOD 活力、MDA 浓度、LA 浓度及 CK 活力。结果如图 15 所示，与 Con 组相比，Mod 组小鼠血清 SOD 活力显著下降，为（95.34±9.19）U/mL。而 MDA 浓度、LA 浓度及 CK 活力分别升高至（12.29±1.03）nmol/mL、（10.83±1.25）mmol/L 和（1 305.24±78.33）U/L，表明持续运动负荷诱导了明显的氧化应激、疲劳积累及肌肉损伤。CLEVs 干预组的 SOD 活力均呈不同程度的升高，而 MDA 浓度、LA 浓度及 CK 活力均明显下降。其中，HD 组改善效果最为显著，其 SOD 活力恢复至（169.55±10.01）U/mL，较 Mod 组提高 77.8%；MDA 浓度降至（5.22±0.73）nmol/mL，较 Mod 组降低 57.5%；LA 浓度降至（4.33±0.53）mmol/L，较 Mod 组降低 60.0%；CK 活力降至（521.64±21.23）U/L，较 Mod 组降低 60.0%。上述结果表明，CLEVs 能够有效提高机体抗氧化防御能力，减轻运动诱导的氧化应激和肌肉损伤，同时缓解乳酸积累等疲劳相关代谢异常，从而改善机体运动性疲劳状态。

2.8 CLEVs 对小鼠 Nrf2/Keap1 信号通路的影响

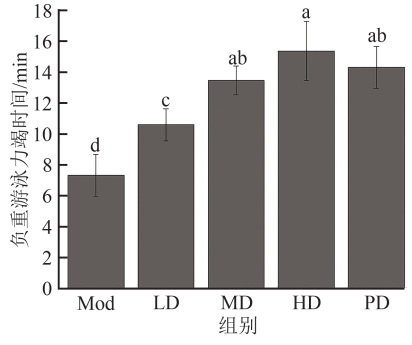
剧烈运动会诱导 ROS 的过量产生，导致氧化还原失衡并加速疲劳的发生。Nrf2/Keap1 信号通路是调控内源性抗氧化防御的关键通路，其中 Nrf2 可调控 HO-1、NQO1 等下游抗氧化酶中相关基因的表达，从而增强机体清除自由基的能力[33-34]。为探讨 CLEVs 的抗运动性疲劳作用机制，检测了小鼠腓肠肌中 Nrf2/Keap1 信号通路的相关基因表达水平。如图 16 所示，与 Con 组相比，Mod 组小鼠腓肠肌中 *Nrf2*、*HO-1*、*NQO1* 基因的 mRNA 表达水平明显下调，分别为 0.54±0.04、0.54±0.05、0.52±0.06，而 *Keap1* 基因的 mRNA 表达水平上调至 1.47±0.02，表明运动负荷会诱导氧化应激并抑制内源性抗氧化防



相同小写字母表示各组之间无显著差异（$P>0.05$）。

图 13　不同处理组中小鼠脏器质量对比

Fig. 13　Comparison of organ mass of mice among different treatment groups

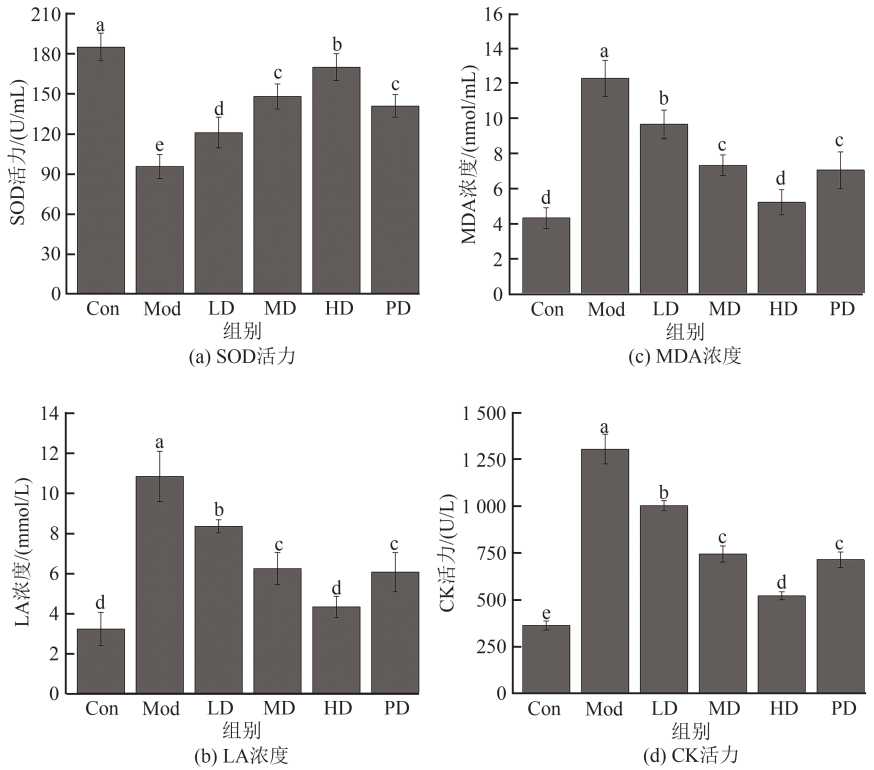


不同小写字母表示各组之间存在显著差异（$P<0.05$）。

图 14　不同处理组中小鼠负重游泳力竭时间对比

Fig. 14　Comparison of different treatments on the load swimming time to exhaustion in mice

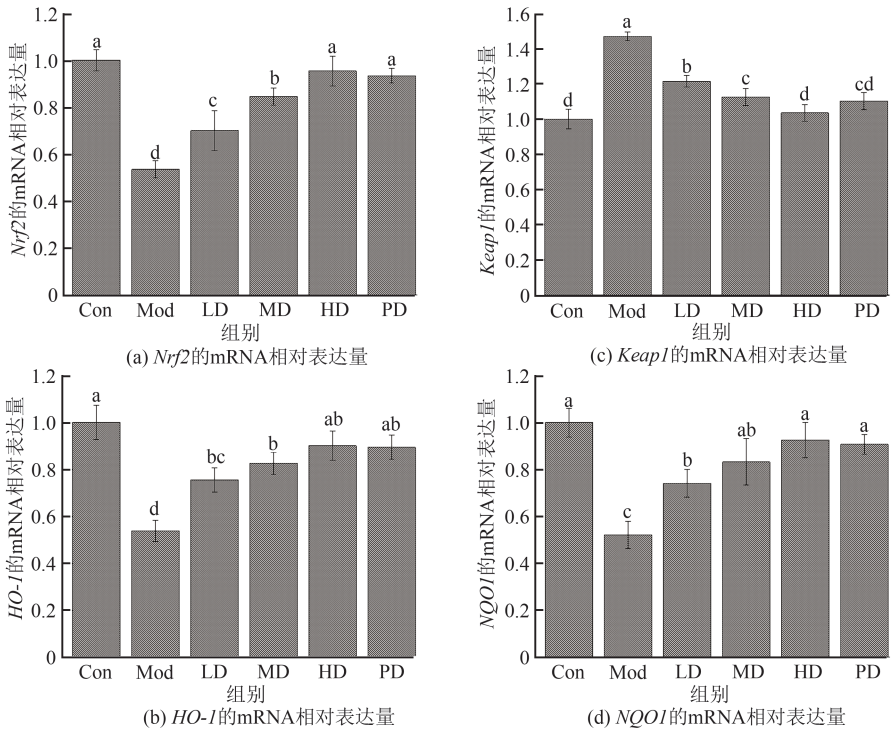
御系统发挥作用。经CLEVs干预后，各处理组中*Nrf2*、*HO-1*和*NQO1*基因的mRNA表达水平呈现不同程度上调，而*Keap1*基因的mRNA表达水平下降。其中，HD组变化最为明显，*Nrf2*、*HO-1*和*NQO1*基因的mRNA表达水平分别恢复至0.96±0.06、0.90±0.06、0.93±0.08，*Keap1*基因的mRNA表达水平下调至1.04±0.05，接近Con组水平。上述结果表明，CLEVs可能通过调控Nrf2/Keap1信号通路激活内源性抗氧化防御系统，从而缓解运动负荷诱导的氧化应激损伤并参与运动性疲劳调控过程，但其具体分子调控机制仍待深入阐明。



不同小写字母表示各组之间存在显著差异（$P<0.05$）。

图 15　不同处理组对小鼠血清中 SOD 活力、MDA 浓度、LA 浓度和 CK 活力的影响

Fig. 15　Effects of different treatments on serum SOD activity, MDA concentration, LA concentration, and CK activity in mice



不同小写字母表示各组之间存在显著差异（$P<0.05$）。

图 16　不同处理组小鼠腓肠肌中 Nrf2/Keap1 信号通路的相关基因表达水平

Fig. 16　Expression levels of Nrf2/Keap1 signaling pathway-related genes in the gastrocnemius muscle of mice from different treatment groups

3 结论

作者以CLEVs为研究对象，系统评价了其理化特性、抗氧化活性及抗运动性疲劳作用。通过超速离心法成功分离获得形态完整、粒径分布均一的CLEVs。CLEVs具有较强的体外抗氧化能力，当其质量浓度为80 μg/mL时，对DPPH和$ABTS^+$自由基清除率分别可达到(97.85±1.60)%、(96.35±1.10)%。在细胞水平上，CLEVs具有良好的生物相容性并可被C2C12细胞有效摄取，能够显著缓解H_2O_2诱导的氧化应激损伤，表现为提高SOD活力、维持GSH/GSSG平衡、降低MDA、LDH水平和CK活力，并改善LA积累及Gly损耗等疲劳相关代谢异常。此外，CLEVs可显著提高小鼠运动耐力，其中HD组负重游泳力竭时间达到(15.36±1.90) min，较模型组提高64.81%，且效果优于PD组。同时，各CLEVs处理组均未对小鼠体质量及主要脏器质量造成显著影响，表明其具有良好的生物安全性。血清生化指标分析表明，CLEVs能够提高SOD活力，降低MDA浓度、LA浓度及CK活力，从而缓解运动诱导的氧化应激损伤、疲劳相关代谢异常及肌肉损伤。此外，研究还表明，CLEVs干预后可显著上调*Nrf2*、*HO-1*和*NQO1*表达，并下调*Keap1*表达，从而增强机体抗氧化防御能力并减轻运动诱导的氧化应激损伤。综上，CLEVs在缓解氧化应激损伤和改善运动性疲劳方面表现出良好的生物活性，具有作为天然功能因子的开发潜力，为微藻来源细胞外囊泡在运动营养和功能食品领域的应用提供了理论依据。

参考文献

[1] Garthe I, Maughan R J. Athletes and supplements: prevalence and perspectives[J]. International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism, 2018, 28(2): 126-138.

[2] Qu Z H, Zhou S Y, Li P H, et al. Natural products and skeletal muscle health[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2021, 93: 108619.

[3] Reid M B. Reactive oxygen species as agents of fatigue [J]. Medicine and Science in Sports and Exercise, 2016, 48(11): 2239-2246.

[4] 赵晓鹏，董丹，谭博轩，等. 基于网络药理学及体内外实验验证荔枝核提取物预防运动诱导的肌肉损伤的作用机制[J]. 食品工业科技，2025，46(10)：371-382.
Zhao X P, Dong D, Tan B X, et al. Mechanism of litchi semen extract in preventing exercise-induced muscle damage based on network pharmacology and *in vivo* and *in vitro* experiments[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(10): 371-382. (in Chinese)

[5] Jia J J, Zeng X S, Li Y, et al. Ephedrine induced thioredoxin-1 expression through *β*-adrenergic receptor/cyclic AMP/protein kinase A/dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein signaling pathway[J]. Cellular Signalling, 2013, 25(5): 1194-1201.

[6] Kim M, Jang H, Kim W, et al. Therapeutic applications of plant-derived extracellular vesicles as antioxidants for oxidative stress-related diseases[J]. Antioxidants, 2023, 12(6): 1286.

[7] Zhang W W, Wang T Y, Xue Y Y, et al. Research progress of extracellular vesicles and exosomes derived from mesenchymal stem cells in the treatment of oxidative stress-related diseases[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1238789.

[8] Picciotto S, Santonicola P, Paterna A, et al. Extracellular vesicles from microalgae: uptake studies in human cells and *Caenorhabditis elegans*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 830189.

[9] Masi A, Leonelli F, Scognamiglio V, et al. *Chlamydomonas reinhardtii*: a factory of nutraceutical and food supplements for human health[J]. Molecules, 2023, 28(3): 1185.

[10] Cui X W, Guan C B, Wang H Q, et al. *Chlamydomonas reinhardtii* polysaccharides retard rice starch retrogradation by weakening hydrogen bond strength within starch double helices[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 296: 139570.

[11] Li J X, Li Y, Song X Y, et al. *Ulva lactuca* extracellular vesicles protect against high-fat diet-induced intestinal damage *via* Nrf2/Keap1/HO-1 activation[J]. Food & Function, 2026, 17(1): 176-189.

[12] Zhong X, Wang Y X, Song C, et al. Engineered liver-targeted probiotic nanovesicles overcome oral absorption barriers to cure alcoholic liver disease[J]. Chemical Engineering Journal, 2025, 522: 167270.

[13] Yu X T, Wang R Y, Lai B, et al. Effect of *Auricularia auricula* fermentation broth on the liver and stomach of mice with acute alcoholism[J]. Food & Function, 2021, 12(1): 191-202.

[14] Cai J M, Xing L J, Zhang W G, et al. Effect of yeast-derived peptides on skeletal muscle function and exercise-induced fatigue in C2C12 myotube cells and ICR mice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(42): 15522-15537.

[15] Ma X Y, Wang Y M, Hu Y D, et al. Chemical composition, antioxidant activity, anti-fatigue function and mechanism of pomegranate peel polyphenols on exercise-induced fatigue in mice[J]. Foods, 2026, 15(9):1576.

[16] Zhou Y P, Wu Q, Yu W, et al. Gastrodin ameliorates exercise-induced fatigue *via* modulating Nrf2 pathway and inhibiting inflammation in mice [J]. Food Bioscience, 2023, 51:102262.

[17] Chang Z H, Hong D, Ma X Y, et al. Lactoferrin-derived hydrophobic peptide YIYT alleviates osteoporosis *via* synergistic activation of Wnt/*β*-catenin and BMP/Smad pathways[J]. Food Bioscience, 2026, 79:108684.

[18] Liang F, Zheng Y X, Zhao C C, et al. Microalgae-derived extracellular vesicles synergize with herbal hydrogel for energy homeostasis in osteoarthritis treatment[J]. ACS Nano, 2025, 19(8):8040-8057.

[19] Hu H Q, Lu F, Zhang W T, et al. *Chlorella*-derived extracellular vesicle-based nanogels suppress cGAS-STING for treatment of radiation-induced lung injury[J]. Nature Communications, 2026, 17:1403.

[20] Musa K H, Abdullah A, Al H A. Determination of DPPH free radical scavenging activity: application of artificial neural networks[J]. Food Chemistry, 2016, 194:705-711.

[21] Kumagai R, Lu X, Kassab G S. Role of glycocalyx in flow-induced production of nitric oxide and reactive oxygen species[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2009, 47(5):600-607.

[22] Wang S, Barthes N P F, Urban S, et al. Structure-guided design of a KMT9 inhibitor prodrug with cellular activity [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2025, 68(13): 13295-13320.

[23] Tie S S, Su W T, Zhang X D, et al. pH-responsive core-shell microparticles prepared by a microfluidic chip for the encapsulation and controlled release of procyanidins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(5):1466-1477.

[24] Zhang W L, Shen Y L, Liu M, et al. Sub-10 nm water-dispersible *β*-$NaGdF_4$: *X*% Eu^{3+} nanoparticles with enhanced biocompatibility for *in vivo* X-ray luminescence computed tomography[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9(46):39985-39993.

[25] Murdica V, Giacomini E, Makieva S, et al. *In vitro* cultured human endometrial cells release extracellular vesicles that can be uptaken by spermatozoa [J]. Scientific Reports, 2020, 10:8856.

[26] Abdel B H M, Basset S R A. Endocytic pathways of optimized resveratrol cubosomes capturing into human hepatoma cells[J]. Biomedecine & Pharmacotherapie, 2017, 93:561-569.

[27] Peng Y F, Zhao L L, Hu K, et al. Anti-fatigue effects of *Lycium barbarum* polysaccharide and effervescent tablets by regulating oxidative stress and energy metabolism in rats[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(18):10920.

[28] Herzog K, Ijlst L, van Cruchten A G, et al. An UPLC-MS/MS assay to measure glutathione as marker for oxidative stress in cultured cells[J]. Metabolites, 2019, 9(3):45.

[29] Patel R S, Ghasemzadeh N, Eapen D J, et al. Novel biomarker of oxidative stress is associated with risk of death in patients with coronary artery disease [J]. Circulation, 2016, 133(4):361-369.

[30] Li C G, Zhu X J, Zhang J X, et al. Polysaccharides from apple pomace exhibit anti-fatigue activity through increasing glycogen content[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 60(1):283-291.

[31] Zhang H J, Fu Y, Zhang H, et al. Sophocarpine alleviates doxorubicin-induced heart injury by suppressing oxidative stress and apoptosis[J]. Scientific Reports, 2024, 14:428.

[32] Zeng H J, Cheng C H, Liu S M, et al. Liquid culture of *Pleurotus nebrodensis* mycelium with high yield and extraction and anti-fatigue activity of its polysaccharides [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 281:136434.

[33] Chen Y, Wang J J, Jing Z H, et al. Anti-fatigue and anti-oxidant effects of curcumin supplementation in exhaustive swimming mice *via* Nrf2/Keap1 signal pathway [J]. Current Research in Food Science, 2022, 5:1148-1157.

[34] Xiao R, Wei Y, Zhang Y P, et al. Trilobatin, a naturally occurring food additive, ameliorates exhaustive exercise-induced fatigue in mice: involvement of Nrf2/ARE/ferroptosis signaling pathway[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13:913367.