

网络出版时间:2023-11-30 11:15:10 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231129.1027.017

丹黄散激活 PINK 1/Parkin 信号通路 对高糖诱导的血管内皮细胞损伤的影响

范 焱¹, 张春玲², 赵 伟³, 陈 露³, 邸铁涛⁴, 周世勇⁵, 魏良纲⁶, 张 艳¹, 董源源¹

摘要 目的 基于 PINK 1/Parkin 信号通路探究丹黄散对高糖诱导的血管内皮细胞损伤的作用,并探讨其具体的作用机制。方法 将人脐静脉血管内皮细胞进行体外培养,随机分为对照组、生长因子组、丹黄散组、高糖组、高糖+生长因子组、高糖+丹黄散组,每组 3 例,干预 48 h;细胞划痕实验检测细胞转移率,Transwell 实验检测细胞侵袭率;免疫荧光法测定抗凋亡蛋白 Bcl-2、Beclin-1、促凋亡蛋白 Bax 的表达水平;Western blot 技术测定假定激酶(PINK 1)、帕金森病蛋白(Parkin)、微管相关蛋白轻链 3 II(LC 3-II)的蛋白表达水平。结果 细胞划痕实验、Transwell 实验结果显示,在正常环境下及高糖处理后,丹黄散均可降低细胞的细胞转移率和侵袭率($P < 0.05$);荧光免疫法结果显示,在正常环境下及高糖处理后,丹黄散均可上调细胞中的 Bcl-2、Beclin-1 蛋白表达水平($P < 0.05$);Western blot 结果显示,在正常环境下及高糖处理后,丹黄散均可下调 Bax 的蛋白表达水平($P < 0.05$),升高细胞中的 PINK 1、Parkin 和 LC 3-II 蛋白表达水平($P < 0.05$),且丹黄散效果均明显优于空白血清和生长因子($P < 0.05$)。结论 丹黄散可通过激活 PINK 1/Parkin 通路,减缓高糖诱导的血管内皮细胞损伤,其机制可能与丹黄散促进线粒体自噬进而增强损伤修复有关。

关键词 丹黄散;PINK 1/Parkin 信号通路;血管内皮细胞;线粒体自噬;糖尿病溃疡

中图分类号 R 285

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)12-2101-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.017

糖尿病溃疡(diabetic ulcers, DUs)作为一种慢性、难愈性疾病,是糖尿病的常见并发症之一。DUs 的发病机制复杂,传统治疗方法伤口愈合缓慢、治疗时间长、治疗成本高,给患者带来痛苦^[1]。寻找有

效可行的干预靶标,成为相关领域的研究热点和难点。血管内皮细胞长期暴露与高糖环境下,易出现炎症损伤,从而导致血管病变^[2]。线粒体自噬通过自噬方式靶向选择性清除功能受损的线粒体,从而维持线粒体功能网络动态平衡。研究^[3]表明,线粒体自噬水平降低,且与其它机制的交互作用是 DUs 难愈合的关键原因之一。磷酸酯酶与张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)诱导假定激酶(PTEN induced putative kinase, PINK)1/帕金森病蛋白(Parkin)通路通过调控自噬可识别并清除受损的线粒体,是目前较公认的自噬途径,被广泛用来评估自噬水平^[4]。丹黄散是由丹参、大黄、当归、没药、沉香、松香几味药物组成的复方散剂,具有活血化瘀、祛腐生肌、利湿解毒之功效。前期研究^[5]显示,丹黄散具有促进糖尿病大鼠溃疡愈合的效果,可促进创面肉芽组织生长,然而其作用机制尚未明确。该研究以 PINK 1/Parkin 通路介导的线粒体自噬为靶向,探究丹黄散对高糖诱导的血管内皮细胞损伤的影响,并探讨其是否能通过 PINK 1/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬,维持创面细胞线粒体正常结构与功能,促进 DUs 创面愈合。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 人脐静脉血管内皮细胞(货号:DFSC-EC-01)购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.1.2 实验药物 丹黄散为贵州中医药大学第二附属医院院内制剂(黔药制字 Z 03 100 240)。方中药物大黄、丹参、当归、沉香、松香、没药均由院内药剂科按照 2020 年版《中国药典》标准进行采购,按照比例混合经 30 B 粉碎机物理粉碎后充分混匀,取得的中药粉末以能过 120 目筛为宜,用 60 Co- γ 辐照灭菌处理,用无菌水调和。重组人表皮生长因子凝胶(以下简称生长因子),国药准字 S 20020123,购自桂林华诺威基因药业有限责任公司,规格为 10 g/支。

2023-09-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81960805)

作者单位:¹ 贵州中医药大学护理学院,贵阳 550002

贵州中医药大学第二附属医院² 营养科、³ 内分泌科、⁴ 创伤骨科、⁵ 普外科,贵阳 550003

⁶ 重庆市中医院风湿科,重庆 400021

作者简介:范 焱,女,硕士研究生;

张春玲,女,教授,主任护师,硕士生导师,责任作者, E-mail:1277319952@qq.com

1.1.3 主要试剂和仪器 葡萄糖(货号:H42021168)购自湖北科伦药业有限公司;山羊血清封闭液(货号:SL038)购自北京 Solarbio 公司;胎牛血清(货号:12483020)购自美国 Gibco-BRL 公司;Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG(货号:ZF-0511)、辣根酶标记山羊抗兔 IgG(货号:ZB-2301)、荧光封片剂(含 DAPI)(货号:ZLI-9557)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Anti-PINK 1 抗体(货号:DF7742),Anti-LC 3-II(货号:AF4650),购自美国 Affinity 公司;Anti-Parkin 抗体(货号:66674-1-Ig)、Anti-Bcl2 抗体(货号:68103-1-Ig)、anti-Beclin1 抗体(货号:11306-1-Ap)、Anti-Bax 抗体(货号:60267-1-Ig)、 β -actin(货号:81115-1-RR)均购自武汉三鹰公司;BCA 蛋白定量试剂盒(货号:33267)购自珠海贝索生物技术有限公司;Transwell 上小室(货号:3422)购自美国康宁公司;结晶紫(货号:C196471)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;30 B 粉碎机(型号:GMP30B)购自常州市久川干燥设备有限公司;显微镜(型号:BX53)、倒置荧光显微镜(型号:IX51)均购自日本 OlymPus 公司;移液枪购自德国 EPPendorf 公司;免疫组化笔(型号:ZLI-9305)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;二氧化碳细胞培养箱(型号:HF90)购自上海力申科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 将人脐静脉血管内皮细胞在 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中进行培养,每 2~3 d 传代 1 次,使用第 3 代细胞展开实验。探索丹黄散对血管内皮细胞作用效果。将实验分组为:对照组、生长因子组、丹黄散组、高糖组、高糖+生长因子组、高糖+丹黄散组,每组 3 例。对照组加入 10% 空白血清,在对照组基础上,生长因子组加入生长因子,丹黄散组加入 10% 丹黄散,高糖组加入 30 mmol/L 葡萄糖,高糖+生长因子组加入 30 mmol/L 葡萄糖和生长因子,高糖+丹黄散组加入 30 mmol/L 葡萄糖和 10% 丹黄散。

1.2.2 细胞划痕实验检测细胞转移率 将 6 组细胞分别置于 6 孔板中,培养 24 h,待细胞融合到 90% 后,用移液枪垂直于细胞培养盘底部缓慢划痕;PBS 清洗 3 次,在细胞培养箱中继续培养,在倒置荧光显微镜下分别于 0、48 h 观察并记录划痕距离,计算细胞转移率。细胞转移率 = (0 h 划痕距离 - 48 h 划痕距离) / 0 h 划痕距离 × 100%。

1.2.3 Transwell 实验检测细胞侵袭 取 6 组细胞

悬液接种到铺有基质胶的 Transwell 上室,放入培养箱中继续培养 48 h,4% 多聚甲醛固定 30 min,0.1% 结晶紫染色 10 min,PBS 清洗 3 次,倒置显微镜下随机选取 5 个视野,记录侵袭细胞数。细胞侵袭率 = 侵袭细胞数 / 细胞总数 × 100%。

1.2.4 免疫荧光试验检测抗凋亡蛋白 Bcl-2、Beclin-1、促凋亡蛋白 Bax 的蛋白表达情况 取 6 组细胞进行爬片,PBS 浸洗、室温、封闭后,加入 3% BSA 稀释的一抗 Anti-Bcl-2(1:100)、anti-Beclin1(1:100)、Anti-Bax(1:100),4℃ 湿盒内孵育过夜,PBS 浸洗 3 次,滴加稀释好的荧光二抗(Alexa Fluor® 488 标记山羊抗兔 IgG,1:100),37℃ 湿盒孵育 1 h,PBS 漂洗 3 次,DAPI 核染 5 min,去离子水漂洗,封片,在荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.5 Western blot 技术检测 PINK 1、Parkin、LC 3-II 蛋白表达情况 取各组处于对数生长期的细胞,PBS 清洗 2 次,加入细胞裂解液,离心后取上清液,BCA 法测定总蛋白浓度,蛋白变性、上样、电泳、转膜,加入一抗 Anti-PINK 1(1:1000)、Anti-Parkin(1:1000)、Anti-LC 3-II(1:1000)、 β -actin(1:1000),4℃ 孵育过夜,次日复温,加二抗(辣根酶标记山羊抗兔 IgG,1:5000),37℃ 孵育 1 h,TBS 洗膜 3 次,ECL 暗室曝光显影。以 β -actin 为内参,采用 ImageJ 图像分析软件进行灰度值分析。灰度值 = 目的条带/ β -actin。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 26.0 对数据进行分析处理,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组组间比较则用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 6 组细胞转移率、侵袭率的情况 方差分析发现,6 组细胞的转移率、侵袭率差异具有统计学意义($F = 31.077, 108.281; P < 0.001$)。两两比较结果显示,与对照组、生长因子组相比,丹黄散组细胞转移率、侵袭率降低($t = 7.708, 4.396, 25.118, 9.320$; 均 $P < 0.05$);与高糖组、高糖+生长因子组相比,高糖+丹黄散组细胞转移率、侵袭率降低($t = 9.120, 3.828, 11.678, 8.374$; 均 $P < 0.05$)。见表 1、图 1。说明丹黄散降低能够降低高糖诱导细胞的细胞转移率、侵袭率。

2.2 6 组细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2、Beclin-1、促凋亡蛋白 Bax 的蛋白表达情况 方差分析显示,6 组细胞的 Bcl-2、Beclin-1、Bax 蛋白表达差异具有统计学

表 1 6 组细胞增殖转移率、侵袭率的比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	转移率(%)	侵袭率(%)
对照	55.75 ± 6.61	40.70 ± 1.00
生长因子	37.37 ± 2.62 [*]	27.00 ± 1.37 [*]
丹黄散	25.08 ± 1.95 ^{* &}	16.80 ± 1.31 ^{* &}
高糖	57.48 ± 3.51	43.97 ± 2.97
高糖 + 生长因子	44.61 ± 4.44 ^ˆ	35.20 ± 1.30 ^ˆ
高糖 + 丹黄散	32.54 ± 3.18 [#]	24.93 ± 1.68 [#]
F 值	31.077	108.281
P 值	<0.001	<0.001

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与生长因子组比较: [&] $P < 0.05$; 与高糖组比较: ^ˆ $P < 0.05$; 与高糖 + 生长因子组比较: [#] $P < 0.05$

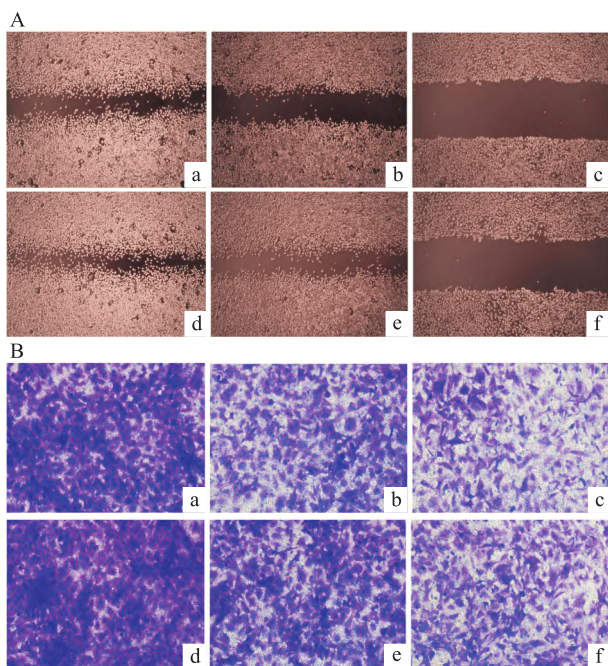
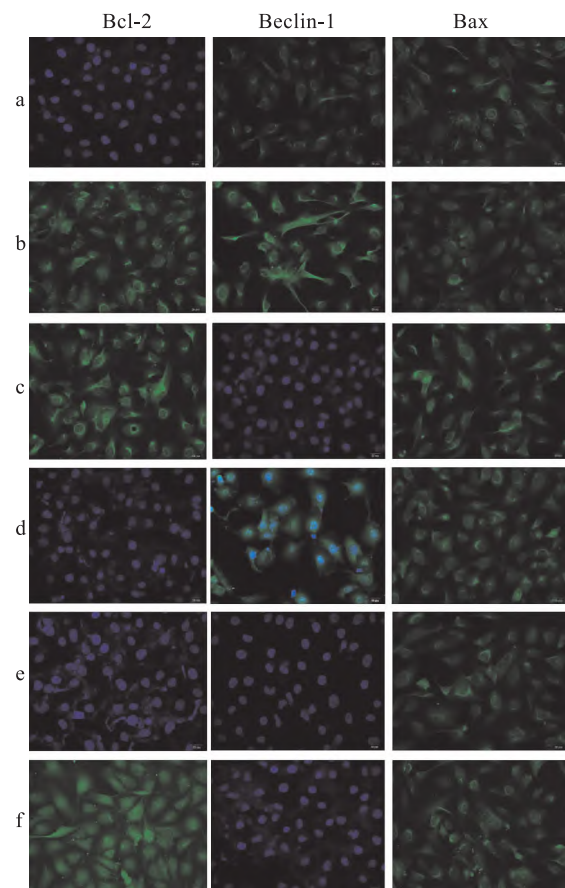


图 1 6 组细胞增殖的划痕距离和侵袭能力的比较

A: 细胞划痕实验检测 6 组细胞的转移能力 $\times 40$; B: Transwell 实验检测 6 组细胞的细胞侵袭能力, 结晶紫染色 $\times 200$; a: 对照组; b: 生长因子组; c: 丹黄散组; d: 高糖组; e: 高糖 + 生长因子组; f: 高糖 + 丹黄散组

意义 ($F = 17.564, 19.956, 40.108$, 均 $P < 0.05$)。两两比较结果显示, 与对照组、生长因子组相比, 丹

黄散组 Bcl-2 和 Beclin-1 的蛋白水平升高 ($t = -6.161, -6.095, -5.804, -3.885; P < 0.05$), Bax 的蛋白水平降低 ($t = 10.823, 5.473; P < 0.05$)。与高糖处理后的高糖组、高糖 + 生长因子组相比, 高糖 + 丹黄散组细胞 Bcl-2 和 Beclin-1 的蛋白水平仍升高 ($t = -6.722, -3.330, -7.195, -3.921; P < 0.05$), Bax 的蛋白水平仍降低 ($t = 8.125, 7.899; P < 0.05$)。见表 2、图 2。说明丹黄散可上调 Bcl-2 和 Beclin-1 的蛋白水平, 下调 Bax 的蛋白水平。

图 2 6 组细胞 Bcl-2、Beclin-1、Bax 蛋白表达的免疫荧光图 $\times 200$

a: 对照组; b: 生长因子组; c: 丹黄散组; d: 高糖组; e: 高糖 + 生长因子组; f: 高糖 + 丹黄散组

表 2 免疫荧光试验检测 6 组细胞 Bcl-2、Beclin-1、Bax 蛋白的表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	Bcl-2	Beclin-1	Bax
对照	19.22 ± 3.23	17.32 ± 2.23	29.51 ± 2.64
生长因子	22.08 ± 2.38	22.14 ± 2.41	19.52 ± 2.47
丹黄散	31.54 ± 1.25 ^{* &}	32.52 ± 3.95 ^{* &}	10.22 ± 1.60 ^{* &}
高糖	10.27 ± 0.74	12.15 ± 1.09	30.06 ± 3.44
高糖 + 生长因子	15.79 ± 3.16 ^ˆ	20.80 ± 1.00 ^ˆ	21.19 ± 1.07 ^ˆ
高糖 + 丹黄散	25.32 ± 3.82 [#]	31.06 ± 4.42 [#]	12.08 ± 1.69 [#]
F 值	17.564	19.956	40.108
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与生长因子组比较: [&] $P < 0.05$; 与高糖组比较: ^ˆ $P < 0.05$; 与高糖 + 生长因子组比较: [#] $P < 0.05$

表3 Western blot 检测6组细胞 PINK 1、Parkin、LC 3-II 蛋白的表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	PINK 1	Parkin	LC 3-II
对照	0.10 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.10 ± 0.01
生长因子	0.23 ± 0.02 [*]	0.24 ± 0.02 [*]	0.19 ± 0.02 [*]
丹黄散	0.48 ± 0.04 ^{* &}	0.66 ± 0.06 ^{* &}	0.31 ± 0.03 ^{* &}
高糖	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.07 ± 0.01
高糖 + 生长因子	0.18 ± 0.02 [^]	0.20 ± 0.03 [^]	0.14 ± 0.02 [^]
高糖 + 丹黄散	0.26 ± 0.01 [#]	0.53 ± 0.06 [#]	0.27 ± 0.03 [#]
F 值	128.504	101.518	66.948
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

与对照组比较:^{*} $P < 0.05$; 与生长因子组比较:[&] $P < 0.05$; 与高糖组比较:[^] $P < 0.05$; 与高糖 + 生长因子组比较:[#] $P < 0.05$

2.3 Western blot 检测6组细胞 PINK 1、Parkin、LC 3-II 蛋白表达情况 方差分析发现,6组细胞的 PINK 1、Parkin、LC 3-II 蛋白表达差异具有统计学意义($F = 128.504, 101.518, 66.948$, 均 $P < 0.001$)。两两比较结果显示,与对照组、生长因子组相比,丹黄散组的 PINK 1、Parkin、LC 3-II 蛋白表达明显增高($t = -14.717, -9.682, -12.135, -11.502, -11.501, -5.765$; 均 $P < 0.05$); 与高糖组、高糖 + 生长因子组相比,高糖 + 丹黄散组细胞 PINK 1、Parkin、LC 3-II 蛋白表达仍升高($t = -22.045, -6.197, -12.244, -7.521, -10.954, -6.245$; 均 $P < 0.05$)。见表3、图3。说明丹黄散可明显提升高糖处理细胞的 PINK 1、Parkin、LC 3-II 蛋白表达水平。

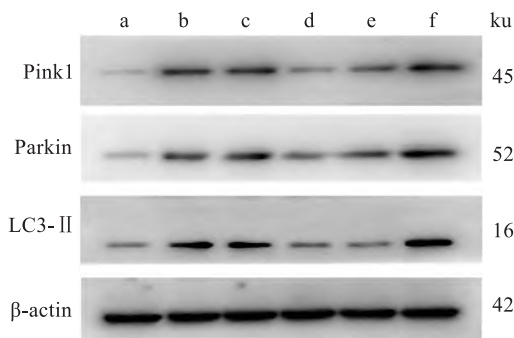


图3 Western blot 检测6组细胞 PINK 1、Parkin、LC 3-II 蛋白的表达水平

a: 对照组; b: 生长因子组; c: 丹黄散组; d: 高糖组; e: 高糖 + 生长因子组; f: 高糖 + 丹黄散组

3 讨论

DUs 与周围血管损伤密切相关,研究^[6]发现,DUs 的难愈性与肉芽组织的微血管再生能力降低以及血管生成不良导致的营养供应减少密切相关,促进创面局部血管生成能够在一定程度上改善糖尿病溃疡的愈合障碍。长期高血糖水平和内皮细胞功能

障碍是造成周围血管损伤和血管新生困难导致的DUs 创面愈合困难的重要原因^[7]。因此,在严格控制血糖的同时对血管内皮细胞进行有效保护是预防和治疗DUs 的关键。研究^[8]发现,高糖会加重细胞氧化应激反应,增加细胞迁移能力和局部侵袭能力。有效抑制高糖状态下的细胞迁移对于阻止疾病进展至关重要。

线粒体自噬对维持细胞内环境稳定起着重要作用,是细胞内一种适应性保护机制,激活血管内皮细胞内线粒体自噬水平可降低细胞凋亡,促进其分化、增殖和迁移^[9]。磷酸酯酶与 PTEN 诱导 PINK1/Parkin 信号通路是调控线粒体自噬的重要途径,Parkin 是一种 E3 泛素连接酶,能够调控蛋白降解及信号转导,促进自噬体吞噬线粒体,PINK 1 具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性,作为线粒体膜电位变化感受器,在生理状态下,PINK 1 导入线粒体基质被泛素蛋白酶体系统降解,并与 Parkin 相互作用抑制其向线粒体的转运,维持自噬正常水平^[10]。Xi et al^[11]研究发现,黄芩素可通过上调 PINK 1/Parkin 信号通路调节线粒体自噬,有效保护高糖损伤的血管内皮细胞;上调糖尿病小鼠血管壁 PINK 1 和 Parkin 蛋白可诱导线粒体自噬,保护线粒体完整性,减缓血管内皮损伤。由此可见,PINK 1 可以通过 PINK 1/Parkin 信号通路保护血管内皮细胞。PINK 1 充当线粒体自噬的“监测者”触发线粒体自噬的起始信号,Parkin 作为线粒体自噬信号的“增强子”介导底物泛素化,与 Beclin-1 和微管相关蛋白轻链 3-II (LC 3-II) 结合后形成自噬小体,降解受损线粒体。细胞凋亡途径主要依赖线粒体并受线粒体蛋白(Bcl-2 家族蛋白)的调节,细胞凋亡时会伴随 Bax 结合线粒体复合物,抗凋亡蛋白 Bcl-2 可有效抑制线粒体上的促凋亡蛋白复合体形成^[12]。

“祛腐生肌”是难愈性创面的主要治疗方法之一,丹黄散秉承“祛腐生肌”理念,集祛腐与生肌作

用于一体。研究^[13]表明丹黄散能够促进糖尿病大鼠溃疡创面毛细血管新生,加速伤口愈合。本研究发现丹黄散对高糖诱导的血管内皮具有一定保护作用,可降低细胞侵袭与转移,并激活 PINK 1/Parkin 信号通路,上调 Beclin-1、LC 3-II、Bcl-2 蛋白表达,下调 Bax 的表达,提高线粒体自噬水平。本研究选择的信号通路有大量的上游和下游调控因子,未来工作中可以进行更深层次的研究。

参考文献

- [1] 方颖,曹东升,谢娟,等. 富血小板凝胶在兔糖尿病溃疡模型中的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2019,54(11):1831-4.
- [2] Hoogwerf B J. Type of diabetes mellitus: does it matter to the clinician? [J]. Cleve Clin J Med, 2020,87(2):100-8.
- [3] Chen S, Zhu Y, Xu Q, et al. Photocatalytic glucose depletion and hydrogen generation for diabetic wound healing[J]. Nat Commun, 2022,13(1):5684.
- [4] 王佳楠,黄春霞,胡宪文. 七氟烷后处理对原代海马神经元氧糖剥夺/复氧损伤及自噬的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2022,57(5):673-8.
- [5] 邱铁涛,张春玲,陈露,等. 丹黄散对糖尿病大鼠溃疡创面愈合的影响机制[J]. 贵州医科大学学报,2019,44(7):798-803.
- [6] 刘涛,魏晓涛,何志军,等. 血管新生在糖尿病溃疡中的作用及中药干预研究进展[J]. 中国中药杂志,2023,48(7):1731-8.
- [7] 袁娜,韩睿,樊效菊,等. 不同浓度基质细胞衍生因子1对糖尿病大鼠皮肤溃疡创面愈合影响的研究[J]. 中国糖尿病杂志,2020,28(8):619-24.
- [8] 郑磊,张国明,陈妙虹,等. AG3340 对高糖诱导人视网膜色素上皮细胞迁移和侵袭的影响[J]. 国际眼科杂志,2022,22(8):1252-6.
- [9] Xiang J, Zhang C, Di T, et al. Salvianolic acid B alleviates diabetic endothelial and mitochondrial dysfunction by down-regulating apoptosis and mitophagy of endothelial cells[J]. Bioengineered, 2022,13(2):3486-502.
- [10] 张旭. 基于 PINK1/Parkin 信号通路研究加味大柴胡汤调节线粒体自噬改善胰岛素抵抗肥胖的作用机制[D]. 成都:成都中医药大学,2020.
- [11] Xi J, Rong Y, Zhao Z, et al. Scutellarin ameliorates high glucose-induced vascular endothelial cells injury by activating PINK1/Parkin-mediated mitophagy [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 271: 113855.
- [12] 冯健愉,朱玉山,陈佳,等. Bcl-2 家族蛋白的生理功能及结构基础[J]. 中国细胞生物学学报, 2019,41(8):1477-89.
- [13] 黄小玲,冯大瓶,赵巧,等. 基于 Akt/mTOR 信号通路探讨丹黄散在糖尿病大鼠皮肤创面愈合中的作用机制[J]. 现代中西医结合杂志,2020,29(24):2644-8.

Effect of Danhuangsansan on high glucose-induced vascular endothelial cells injury by activating PINK 1/Parkin signaling pathway

Fan Yi¹, Zhang Chunling², Zhao Wei³, Chen Lu³, Di Tietao⁴,
Zhou Shiyong⁵, Wei Lianggang⁶, Zhang Yan¹, Dong Yuanyuan¹

(¹College of Nursing, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002;

²Dept of Nutrition, ³Dept of Endocrinology, ⁴Dept of Trauma Orthopedics, ⁵Dept of General Surgery
The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003;

⁶Dept of Rheumatology, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021)

Abstract Objective To investigate the effect of Danhuangsansan on high glucose-induced vascular endothelial cell injury based on PINK 1/Parkin signaling pathway, and to explore its specific mechanism. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells were cultured *in vitro* and randomly divided into control group, growth factor group, Danhuangsansan group, high glucose group, high glucose + growth factor group, high glucose + Danhuangsansan group, with 3 cases in each group, treated for 48 hours. Cell scratch test was used to detect cell migration rate, and Transwell test was used to detect cell invasion rate. Immunofluorescence was used to detect the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2, Beclin-1 and pro-apoptotic protein Bax. Western blot was used to detect the protein expression levels of PINK 1, Parkin and LC 3-II. **Results** Cell scratch test and Transwell test showed that under normal environment and high glucose treatment, Danhuangsansan could reduce the cell migration and invasion rate ($P < 0.05$). Immunofluorescence assay showed that under normal environment and high glucose treatment, Danhuangsansan up-regulated the expression levels of Bcl-2 and Beclin-1 protein in cells ($P < 0.05$). Western blot results showed that under normal environment and high glucose treatment, Danhuangsansan increased the protein expression

姜黄素可能通过上调 Prdx6 蛋白表达抑制软骨细胞铁死亡

陈 凡^{1,2},周富丽^{1,2},陈 勇²,付万进²,周仁鹏²,胡 伟²,鲁 超^{1,3}

摘要 目的 探究姜黄素(Cur)调控过氧化物酶6(Prdx6)蛋白表达在抑制C28/I2人正常软骨细胞系铁死亡中的作用及可能机制。方法 番红固绿和HE染色观察骨关节炎(OA)大鼠膝关节病理学改变。免疫组化和Western blot法分析检测Prdx6、GPX4蛋白在OA软骨组织中的表达。用不同浓度Cur处理C28/I2软骨细胞系,噻唑蓝(MTT)法检测细胞活力,乳酸脱氢酶(LDH)检测细胞毒性。流式细胞术检测软骨细胞中脂质活性氧(ROS)的产生,总谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒检测软骨细胞中GSH含量。Western blot法检测软骨细胞中Prdx6和铁死亡相关蛋白的表达。分子对接技术探究Cur分子与Prdx6蛋白之间的相互作用。结果 OA发病进程中,OA大鼠和OA患者出现软骨损伤、软骨细胞数量减少等病理学改变。与正常人相比,OA患者软骨组织中Prdx6、GPX4蛋白表达降低。进一步研究显示20 μmol/L Cur可以抑制铁死亡诱导剂(Erastin)诱导的C28/I2软骨细胞系铁死亡,提高细胞活力,降低细胞毒性,抑制脂质ROS的产生,提高细胞内GSH含量,并增加Prdx6、SLC7A11、FTH、GPX4蛋白表达,降低ACSL4蛋白表达。此外,Cur分子与Prdx6蛋白分子对接过程中存在范德华力和 π 键相互作用。结论 姜黄素可能通过上调Prdx6蛋白表达抑制Erastin诱导的C28/I2软骨细胞系铁死亡。

关键词 铁死亡;骨关节炎;姜黄素;软骨细胞;过氧化物酶6;分子对接

中图分类号 R 966

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)12-2106-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.018

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种以软骨损伤为主的常见关节疾病,其特征是关节软骨细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解、关节软骨退化和骨赘的形成^[1-2]。铁死亡是一种铁离子依赖的,以脂质活性氧(reactive oxygen species, ROS)累积,线粒体皱缩为主要标志的新型程序性细胞死亡方式,许多抑制或缓解脂质过氧化的药物均可抑制铁死亡^[3],从而能够有效干预疾病的发展,因此成为当前研究的热点。姜黄素(curcumin, Cur)具有抗氧化、抗菌以及与非甾体类抗炎药物类似的抗炎活性,已经广泛应用于OA的治疗中^[4]。Cur的抗氧化作用与多种信号通路有关^[5],研究报道^[6] Cur在调控过氧化物酶6(peroxiredoxin6, Prdx6)表达在抑制内质网应激和线粒体凋亡中发挥重要作用,但其在软骨细胞铁死亡中的作用及机制目前尚不清楚。Prdx6作为过氧化物还原酶家族的一员,是发挥抗氧化应激与维持细胞磷脂平衡的关键蛋白^[7]。因此,本研究旨在探讨Cur调控Prdx6蛋白表达在抑制软骨细胞铁死亡过程中的作用及可能的机制,为OA的防治提供新的靶点与策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及实验动物 C28/I2人正常软骨细胞系,由ATCC公司提供;SD大鼠20只,雄性,体重160~180 g,鼠龄6~8周,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,合格证号:SCXK(鲁)20190003。于温度(22±3)℃,湿度40%~70%条件下12 h光

2023-09-23 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:2208085MH215);安徽省重点研究与开发计划(编号:202204295107020035)

作者单位:¹安徽医科大学药学院,合肥 230032

²安徽医科大学第二附属医院药物临床试验研究中心,合肥 230601

³安徽理工大学第一附属医院药物临床试验研究中心,淮南 232001

作者简介:陈 凡,男,硕士研究生;

鲁 超,男,博士,研究员,硕士生导师,责任作者,E-mail: chaolu@ aust. edu. cn

levels of PINK 1, Parkin and LC 3-II in cells and down-regulated the expression levels of Bax protein ($P < 0.05$), and the effects of Danhuang powder were significantly better than those of blank serum and growth factor ($P < 0.05$). **Conclusion** Danhuangsan can alleviate high glucose-induced endothelial cell injury by activating PINK 1/Parkin pathway, and the mechanism may be related to promoting mitophagy and enhancing the repair of damage.

Key words Danhuangsan; PINK 1/Parkin pathway; vascular endothelial cells; mitophagy; diabetic ulcers