

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

照 12 h 黑暗交替饲养。

1.1.2 人膝关节软骨组织样本 2019 年—2021 年临床收集正常人(5 例)和 OA 患者(5 例)置换下来的膝关节软骨组织标本,排除因有膝关节感染性疾病、类风湿性关节炎等其他疾病进行膝关节置换的软骨标本。本研究通过安徽理工大学生物医学研究伦理委员会审核(伦理批号:2021020)。

1.1.3 药品和试剂 Cur(美国 Sigma-Aldrich 公司,货号:08511);Erastin(美国 Selleck 生物科技有限公司,货号:S7242);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 Invitrogen 生命技术有限公司,货号:C0235);DMEM 高糖培养基(以色列 BI 生物科技有限公司,货号:06-1055-57-1ACS);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒(瑞士 Hoffmann-La Roche 有限责任公司,货号:11644793001);噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)(上海碧云天生物技术有限公司,货号:ST1537);BODIPY 581/591 C11 荧光探针(美国 Invitrogen 生命技术有限公司,货号:D3861);总谷胱甘肽(glutathione, GSH)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号:S0052);抗 SLC7A11 抗体(英国 abcam 公司,货号:ab307601);抗 GPX4 抗体(英国 abcam 公司,货号:ab125066);抗 Prdx6 抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,货号:DF6765);抗 β -actin 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号:TA-09);抗 ACSL4 抗体(美国 Santa Cruze 公司,货号:sc-365230);抗 FTH 抗体(美国 Santa Cruze 公司,货号:sc-376594)。

1.1.4 仪器 电泳仪(型号:EPS 600,上海天能电子有限公司);CO₂ 培养箱(型号:371Steri-Cycle,美国 Thermo Fisher 科技公司);酶标仪(型号:800TS,美国 ThermoFisher 科技公司);流式细胞仪(型号:CytoFLEX,美国 Thermo Fisher 科技公司);倒置荧光显微镜(型号:AxioVert. A1,德国 Carl Zeiss 股份公司);超低温冰箱(型号:DW-86L626,青岛海尔股份有限公司);化学发光分析仪(型号:FINEDO X6,上海天能电子有限公司);离心机(型号:No. 5417R,德国 Eppendorf 股份公司)。

1.2 方法

1.2.1 膝关节软骨组织染色

1.2.1.1 OA 大鼠模型的建立及组织切片 20 只 SD 大鼠随机分为 2 组:正常大鼠组、OA 大鼠模型组。采用左膝前交叉韧带切除+内侧半月板摘除术建立左膝 OA 模型。取材后膝关节组织样本经 4% 多聚甲醛固定,10% EDTA 溶液脱钙后进行组织

浸蜡、包埋、切片。人膝关节软骨组织切片同大鼠。

1.2.1.2 Safranin O/Fast Green 染色 大鼠膝关节切片脱蜡水化后,按常规方法进行 Safranin O/Fast Green 染色,倒置荧光显微镜拍照保存。

1.2.1.3 HE 染色 大鼠膝关节切片脱蜡水化后,按常规方法进行 HE 染色,倒置荧光显微镜拍照保存。

1.2.1.4 免疫组织化学染色 大鼠和人软骨组织切片脱蜡水化后孵育 Prdx6 和 GPX4 蛋白一抗(1:50)过夜,37 ℃ 孵育二抗(1:150) 30 min, DBA 显色 3 min,苏木精溶液复染 2 min,脱水封片后显微镜下观察。

1.2.2 C28/I2 软骨细胞系培养和传代 C28/I2 软骨细胞系用含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基,在含有 5% CO₂,温度为 37 ℃ 的条件下培养,观察细胞贴壁情况至达到对数增长期,用 0.25% 胰酶进行消化传代分组,分为:Control 组、Erastin 组、Cur 组、Erastin + Cur 组。

1.2.3 MTT 法检测细胞活力 按 1.2.2 项中分组情况,在 96 孔板中用 2.5 μ mol/L Erastin 和不同浓度 Cur(0、0.312、0.625、1.25、2.5、5、10、20 和 40 μ mol/L)分别处理 Erastin 组、Cur 组和 Erastin + Cur 组的 C28/I2 软骨细胞系 8 h,显微镜下观察细胞死亡数量至 50% 时,每孔加入 MTT 检测液,孵育 4 h 后加入二甲基亚砷溶解,酶标仪选定波长 490 nm 和 570 nm,测定吸光度值计算细胞活力,确定最宜 Cur 加药浓度为 20 μ mol/L。

1.2.4 LDH 法检测细胞毒性 按 1.2.2 项中分组情况,在 24 孔板中用 2.5 μ mol/L Erastin 和 20 μ mol/L Cur 处理 Erastin 组、Cur 组和 Erastin + Cur 组 C28/I2 软骨细胞系 8 h,依据罗氏 LDH 试剂盒使用说明书,使用酶标仪测定波长在 492 nm 和 620 nm 处的吸光度,确定 LDH 的释放值。

1.2.5 流式细胞术检测脂质 ROS 按 1.2.2 项中分组情况,在 6 孔板中用 2.5 μ mol/L Erastin 和 20 μ mol/L Cur 处理 Erastin 组、Cur 组和 Erastin + Cur 组 C28/I2 软骨细胞系 8 h。用 2 μ mol/L BODIPY 581/591C11 探针染色 30 min,胰酶消化并于 1 500 r/min,4 ℃ 离心 5 min 收集细胞沉淀,通过流式细胞仪进行分析,数据用 FlowJo 软件分析。

1.2.6 总 GSH 试剂盒检测 GSH 含量 按 1.2.2 项中分组情况,在 6 孔板中用 2.5 μ mol/L Erastin 和 20 μ mol/L Cur 处理 Erastin 组、Cur 组和 Erastin + Cur 组 C28/I2 软骨细胞系 8 h。胰酶消化并 1 500

r/min, 4 °C, 离心 5 min 收集细胞沉淀, 实验按碧云天生物的试剂盒使用说明进行。

1.2.7 Western blot 检测 ACSL4、SLC7A11、Prdx6、FTH、GPX4 蛋白表达 按 1.2.2 项中分组情况, 在 6 孔板中用 2.5 μmol/L Erastin 和 20 μmol/L Cur 处理 Erastin 组、Cur 组和 Erastin + Cur 组 C28/I2 软骨细胞系 8 h。用 RIPA 蛋白裂解液提取软骨细胞总蛋白, 根据不同的蛋白分子量在合适的 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳 (分离胶 80 V 30 min, 浓缩胶 120 V 60 min)。再转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上用 5% 脱脂牛奶封闭, 置于抗 ACSL4 (1 : 500)、抗 SLC7A11 (1 : 1 000)、抗 FTH (1 : 500)、抗 GPX4 (1 : 500)、抗 Prdx6 (1 : 1 000) 一抗孵育过夜, 用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔/鼠 IgG 二抗 (1 : 500) 孵育 1 h, 配制 ECL 混合显影液平铺在膜表面, 化学发光分析仪中显影。使用 ImageJ 软件对 Western blot 条带进行量化。

1.2.8 Cur 分子与 Prdx6 蛋白的分子对接 利用分子对接技术 Biovia Discovery Studio2016 评价 Cur 分子与 Prdx6 蛋白的对接, 并展示 Cur 分子与 Prdx6 蛋白相互作用的二维结构。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8 进行统计分析。实验数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间差异进行单因素方差分析 (ANOVA), 两组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OA 大鼠关节软骨病理染色和 Western blot

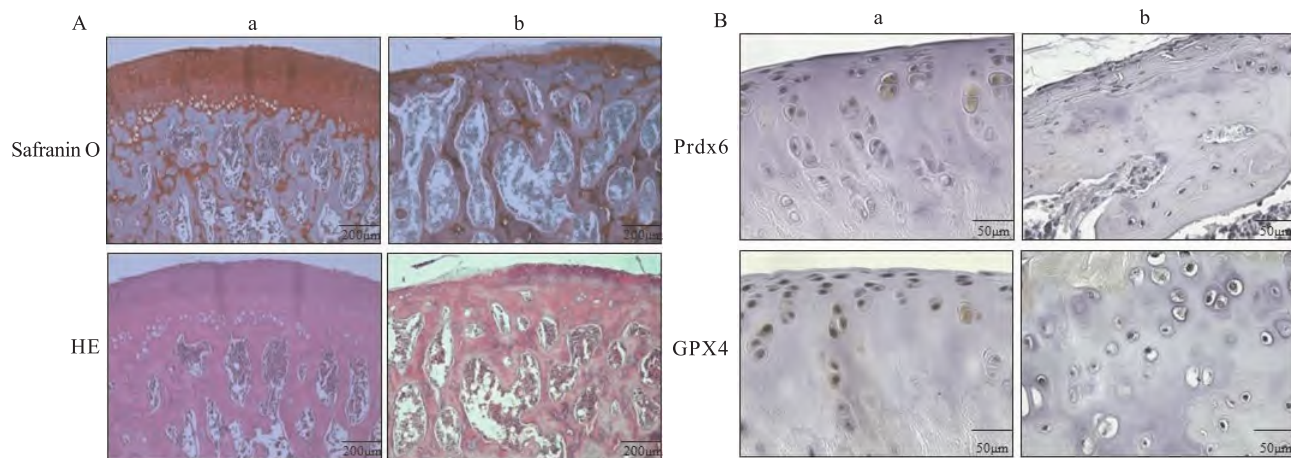


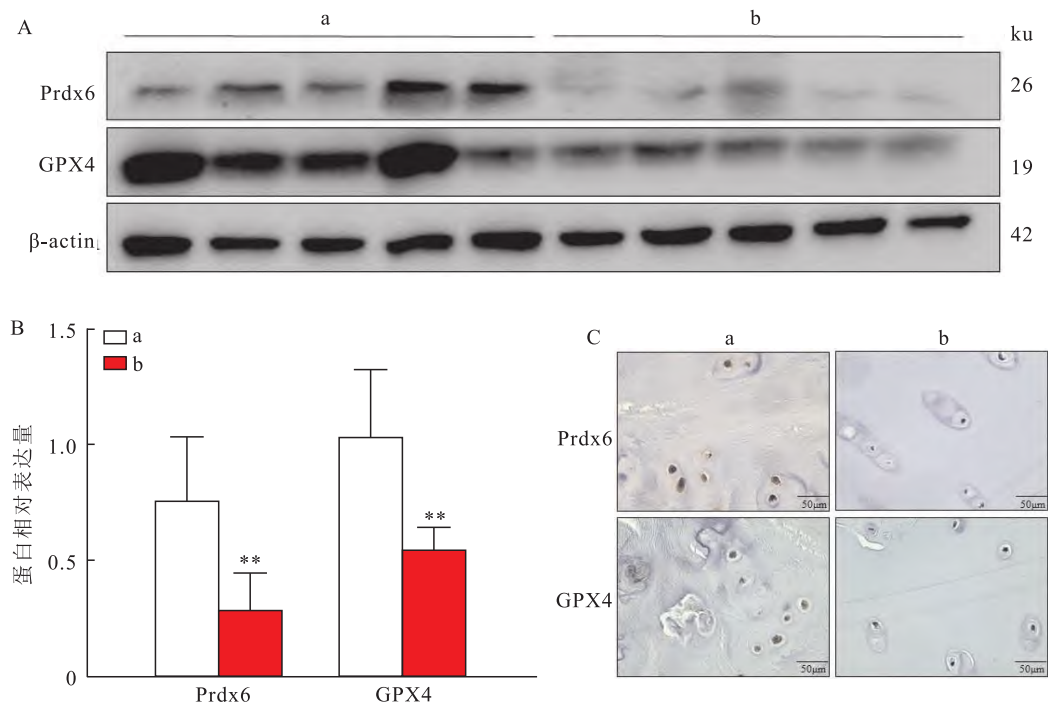
图1 OA大鼠关节软骨组织中病理改变和 Prdx6、GPX4 蛋白的表达情况

A: 光学显微镜下大鼠膝关节病理染色 ×100; B: 免疫组化法检测 Prdx6、GPX4 蛋白在 OA 软骨组织和正常软骨组织中的表达 ×200; a: 正常大鼠组; b: OA 大鼠模型组

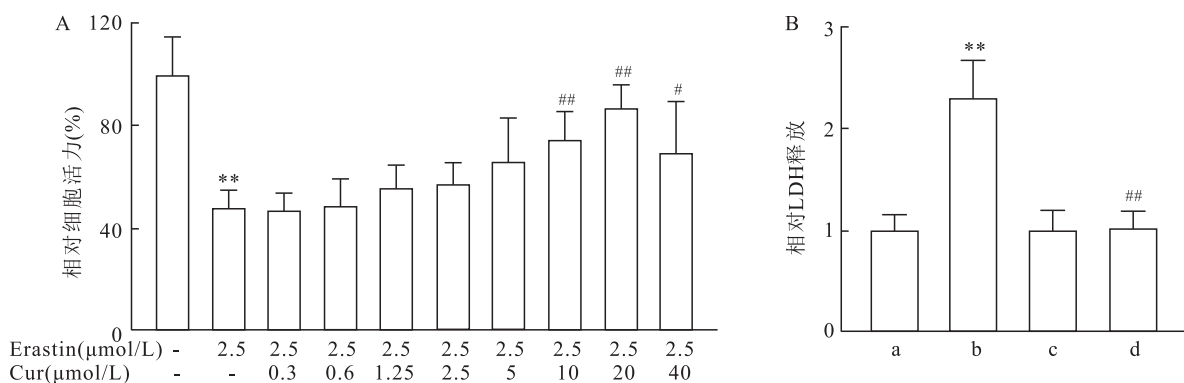
法检测结果 正常大鼠和 OA 大鼠 Safranin O/Fast Green 病理染色结果显示, 正常大鼠关节软骨表面完整、平滑, 软骨细胞排列正常、数量正常、核染正常, 软骨基质着色鲜红; OA 大鼠模型关节面糜烂、缺损、变形, 软骨结构消失, 软骨层进行性丧失或者损坏, 软骨细胞数量减少、排列紊乱、有簇集现象, 软骨基质着色变浅。HE 病理染色结果显示正常大鼠膝关节软骨表面光滑连续、无损伤, 而 OA 大鼠模型关节软骨的形态学出现明显的改变, 关节软骨表面不连续, 软骨基质损伤、断裂, 软骨组织被侵蚀, 关节表面轮廓发生典型的病理改变 (图 1A)。免疫组织化学染色观察 Prdx6 和铁死亡标志物 GPX4 蛋白在 OA 大鼠模型中的表达, 结果显示 OA 大鼠模型关节软骨中 Prdx6 和 GPX4 蛋白黄染变淡 (图 1B)。以上结果说明 OA 发病进程中存在铁死亡。

2.2 Prdx6 和铁死亡标志物 GPX4 蛋白在 OA 患者关节软骨中的表达情况 Western blot 检测结果显示与正常人相比, OA 患者中 Prdx6 ($t = 3.38, P < 0.01$) 和 GPX4 ($t = 3.66, P < 0.01$) 蛋白表达明显降低 (图 2A、B)。免疫组织化学染色观察 Prdx6 和铁死亡标志物 GPX4 蛋白在 OA 患者中的表达, 结果显示 OA 患者关节软骨中 Prdx6 和 GPX4 蛋白黄染变淡 (图 2B)。以上结果进一步表明 OA 发病进程中存在铁死亡, 且 Prdx6 蛋白表达的降低可能与铁死亡有关。

2.3 Cur 对 Erastin 诱导的 C28/I2 软骨细胞系铁死亡细胞活力和细胞毒性的影响 Erastin 和不同浓度 Cur 处理 C28/I2 软骨细胞系 8 h, 通过 MTT 法检测细胞活力, 结果显示, 与 Erastin 组比较, Cur 能

图2 OA患者软骨组织中Prdx6和GPX4的表达情况($n=5$)

A,B: Western blot 法检测 Prdx6、GPX4 蛋白在正常人和 OA 患者软骨组织中的表达; C: 免疫组化法检测 Prdx6、GPX4 蛋白在 OA 软骨组织和正常软骨组织中的表达 $\times 200$; a: 正常人组; b: OA 患者组; 与正常人组比较: ** $P < 0.01$

图3 Cur对Erastin诱导的软骨细胞铁死亡细胞活力($n=6$)和细胞毒性($n=4$)的影响

A: MTT 法检测细胞活力; B: LDH 法检测细胞毒性; a: Control 组; b: Erastin 组; c: Cur 组; d: Erastin + Cur 组; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Erastin 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

浓度依赖性抑制 Erastin 诱导的关节软骨细胞活力的降低, 提高细胞活力, 且在 Cur 浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$ 时保护效果显著 ($t = 9.00, P < 0.01$) (图 3A)。LDH 法检测细胞毒性, 结果显示 (图 3B) Erastin 组关节软骨细胞中 LDH 释放增加 ($t = 6.78, P < 0.01$), 表明 Erastin 增加了关节软骨细胞的毒性, 而用 $20 \mu\text{mol/L}$ Cur 处理后可以明显降低软骨细胞 LDH 的释放 ($t = 6.55, P < 0.01$), 表明 Cur 可以降低 Erastin 所致的软骨细胞毒性。

2.4 Cur 对 Erastin 诱导的 C28/I2 软骨细胞系铁

死亡脂质 ROS 产生和 GSH 含量的影响 流式细胞术量化比较 FITC-A + 脂质过氧化细胞最大百分比, 结果显示 (图 4A、B) Erastin 处理后软骨细胞脂质 ROS 明显增加 ($t = 9.64, P < 0.01$), 而 Cur 处理后能明显降低脂质 ROS 的水平 ($t = 4.76, P < 0.01$)。GSH 结果显示 (图 4C) Erastin 处理后软骨细胞内 GSH 含量明显降低 ($t = 115.20, P < 0.01$), 而 Cur 处理后软骨细胞内 GSH 含量明显提高 ($t = 98.66, P < 0.01$)。

2.5 Cur 对 Erastin 诱导的 C28/I2 软骨细胞系

Prdx6 和铁死亡相关蛋白表达的影响 Western blot 检测结果显示在 Erastin 诱导的软骨细胞铁死亡过程中, Cur 处理可以降低软骨细胞 ACSL4 ($t = 11.87, P < 0.01$) 蛋白表达, 上调 SLC7A11 ($t = 5.19, P < 0.01$)、Prdx6 ($t = 3.77, P < 0.05$)、FTH ($t = 4.11, P < 0.05$)、GPX4 ($t = 8.06, P < 0.01$) 蛋白表达。说明 Cur 可能通过上调 Prdx6 蛋白表达抑制 C28/I2 软骨细胞系铁死亡。见图 5。

2.6 Cur 分子与 Prdx6 蛋白的分子对接情况 通过分子对接技术探究 Cur 分子与 Prdx6 蛋白的结合

情况, 结果显示 Cur 分子可以与 Prdx6 蛋白结合, 二者之间存在相互作用力: 范德华力; Cur 分子与 Prdx6 蛋白 163 位 VAL 缬氨酸残基有 Pi-Sigma 键结合, 与 LYS144、LEU167、ALA171 氨基酸残基有 Pi-Alkyl 键结合。见图 6。

3 讨论

OA 因其病因和发病机制的复杂性, 目前临床上针对 OA 的预防和根治尚无有效的治疗药物和治疗方法, 因此 OA 发生发展的分子机制亟待深入探

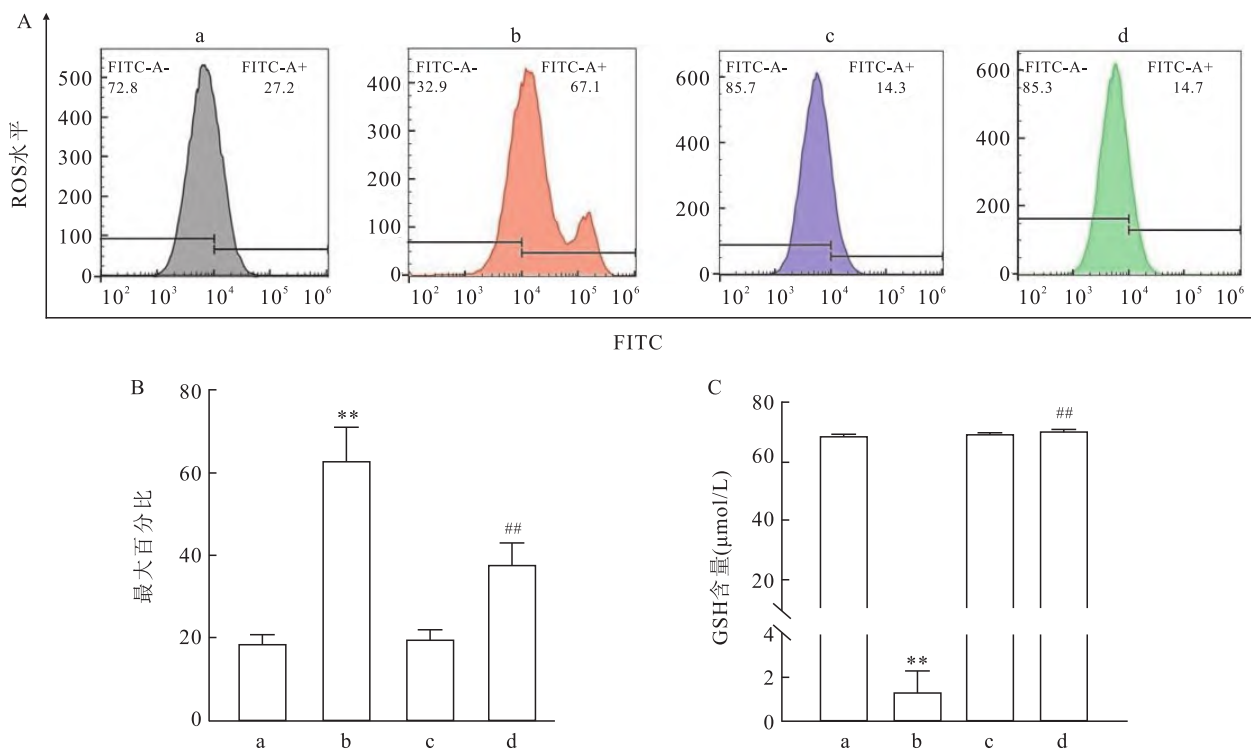


图 4 Cur 对 Erastin 诱导的软骨细胞脂质 ROS 水平和 GSH 含量的影响 ($n = 3$)

A: 流式细胞术检测细胞脂质 ROS 的产生; B: 总 GSH 检测试剂盒检测细胞 GSH 含量; a: Control 组; b: Erastin 组; c: Cur 组; d: Erastin + Cur 组; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Erastin 组比较: ## $P < 0.01$

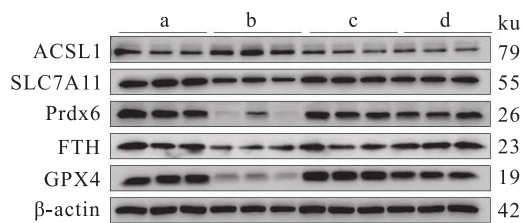
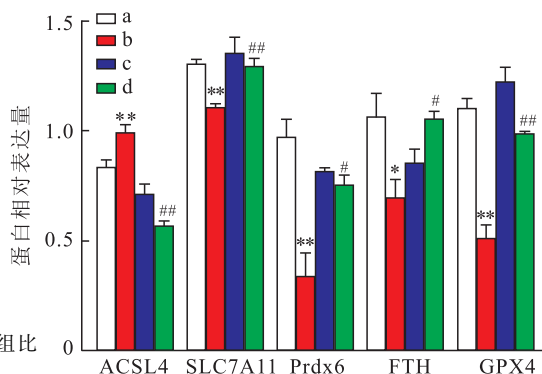


图 5 Cur 对 Erastin 诱导的软骨细胞铁死亡 Prdx6 和铁死亡蛋白表达的影响 ($n = 3$)

a: Control 组; b: Erastin 组; c: Cur 组; d: Erastin + Cur 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Erastin 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$



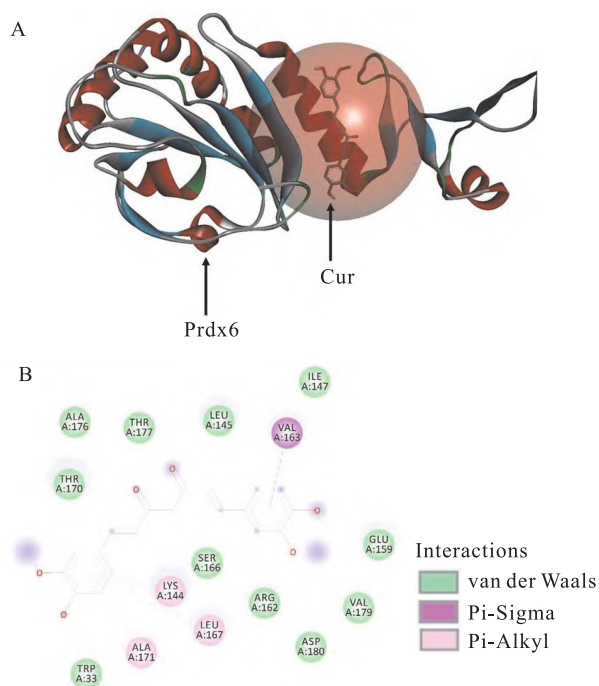


图6 Cur分子与Prdx6蛋白分子对接图

A: Cur分子与Prdx6蛋白对接三维结构图; B: Cur分子与Prdx6蛋白相互作用的二维结构图

究。软骨细胞作为关节软骨中唯一的细胞类型,参与软骨基质的合成^[8]。生理情况下,软骨细胞的分化与死亡及软骨基质的合成和分解维持动态平衡。而在OA的发病进程中,这种平衡被打破,关节组织部位大量的炎症、氧化应激等因素诱发软骨细胞过度死亡,进而引起关节功能的丧失。OA发病进程中存在凋亡、自噬、坏死等类型的细胞死亡方式,然而靶向抑制这些类型的细胞死亡并不能有效抑制软骨损伤,提示OA病程中可能存在其他类型的细胞死亡方式。因此,对软骨细胞死亡方式及其调控机制的研究将有助于OA的防治。

本研究表明OA患者和OA大鼠发病进程存在铁死亡,Prdx6蛋白表达的降低可能与铁死亡有关。研究^[9]报道Cur通过抑制NF- κ B信号通路抑制软骨细胞凋亡从而发挥软骨保护作用,且Cur在一些癌细胞铁死亡中也发挥作用,但其在软骨细胞铁死亡中的作用未见报道。临床研究^[10]表明OA患者血清中脂质ROS较正常人明显增加,并伴有GSH水平的降低。本研究表明Cur处理减少了脂质ROS的产生,提高了软骨细胞内GSH含量。铁死亡的发生依赖于脂质ROS的累积及其介导的脂质过氧化反应^[11],因此通过调控细胞内ROS的水平及其下

游信号级联效应,能够干预细胞铁死亡的发生。

此外,本研究结果显示Cur处理后ACSL4蛋白表达降低,Prdx6、SLC7A11、FTH、GPX4蛋白表达增加。GPX4能够利用GSH将过氧化的脂质还原为无毒性的脂醇,抑制ACSL4可减少多不饱和脂肪酸整合到磷脂上,且SLC7A11作为组成System xc⁻的两个亚基之一,可以促进胱氨酸合成GSH^[12]进而抑制软骨细胞铁死亡。Prdx6作为一种过氧化还原蛋白,它不仅结构独特,而且具有谷胱甘肽过氧化物酶活性和钙非依赖性磷脂酶活性,其活性调控受到亚细胞定位、底物结合及翻译后修饰等因素影响。通过不同活性功能参与多种疾病的发生与发展,在肿瘤、炎性疾病及缺血性脑卒中等疾病中具有重要作用。研究^[13]结果显示在肿瘤细胞铁死亡过程中,Prdx6能够发挥清除脂质ROS的功能,是一个新的肿瘤细胞铁死亡的负性调控因子。本研究结果显示Cur和Prdx6之间存在较强的相互作用,结合Cur对软骨细胞铁死亡的抑制作用,表明Cur可能通过上调铁死亡过程中Prdx6蛋白表达抑制软骨细胞铁死亡。

综上所述,本研究表明Cur可能通过上调铁死亡过程中Prdx6蛋白的表达,促进Prdx6清除脂质ROS,进而抑制Erastin诱导的软骨细胞铁死亡。后续还需以Prdx6为靶点探讨其在Cur抑制软骨细胞铁死亡发生发展中的作用及其可能的分子机制,为OA的防治提供新思路。

参考文献

- [1] Mandl L A. Osteoarthritis year in review 2018: clinical[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2019, 27(3): 359-64.
- [2] Ding J, Chen Y, Zhao Y J, et al. Acid-sensitive ion channel 1a mediates osteoarthritis chondrocyte senescence by promoting Lamin B1 degradation[J]. Biochem Pharmacol, 2022, 202: 115107.
- [3] Zhou R, Chen Y, Li S F, et al. TRPM7 channel inhibition attenuates rheumatoid arthritis articular chondrocyte ferroptosis by suppression of the PKC α -NOX4 axis[J]. Redox Biol, 2022, 55: 102411.
- [4] Jamali N, Adib-Hajbaghery M, Soleimani A. The effect of curcumin ointment on knee pain in older adults with osteoarthritis: a randomized placebo trial[J]. BMC Complement Med Ther, 2020, 20(1): 305.
- [5] 代万武, 黄祖权, 张波, 等. 姜黄素在治疗骨性关节炎过程中对关节软骨和滑膜细胞的作用机制[J]. 中国当代医药, 2021, 28(11): 26-31.
- [6] Crivelli B, Bari E, Perteghella S, et al. Silk fibroin nanoparticles for celecoxib and curcumin delivery: ROS-scavenging and anti-inflammatory activities in an *in vitro* model of osteoarthritis[J]. Eur

- J Pharm Biopharm,2019,137:37–45.
- [7] Paluchova V, Cajka T, Durand T, et al. The role of peroxiredoxin 6 in biosynthesis of FAHFs[J]. *Free Radic Biol Med*,2022,193(Pt 2):787–94.
- [8] Harasymowicz N S, Dicks A, Wu C L, et al. Physiologic and pathologic effects of dietary free fatty acids on cells of the joint[J]. *Ann N Y Acad Sci*,2019,1440(1):36–53.
- [9] Chen T V Y, Zhou R V P, Chen Y, et al. Curcumin ameliorates IL-1 β -induced apoptosis by activating autophagy and inhibiting the NF- κ B signaling pathway in rat primary articular chondrocytes[J]. *Cell Biol Int*,2021,45(5):976–88.
- [10] Kotani K, Sakane N, Kamimoto M, et al. Levels of reactive oxygen metabolites in patients with knee osteoarthritis[J]. *Australas J Ageing*,2011,30(4):231–3.
- [11] Koike N, Kota R, Naito Y, et al. 2-Nitroimidazoles induce mitochondrial stress and ferroptosis in glioma stem cells residing in a hypoxic niche[J]. *Commun Biol*,2020,3(1):450.
- [12] Chen X, Kang R, Kroemer G, et al. Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*,2021,18(5):280–96.
- [13] Lu B, Chen X B, Hong Y C, et al. Identification of Prdx6 as a regulator of ferroptosis[J]. *Acta Pharmacol Sin*,2019,40(10):1334–42.

Curcumin may inhibit chondrocytes ferroptosis by upregulating the Prdx6 expression level

Chen Fan^{1,2}, Zhou Fuli^{1,2}, Chen Yong², Fu Wanjin², Zhou Renpeng², Hu Wei², Lu Chao^{1,3}

(¹*School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

²*Dept of Clinical Pharmacology, The Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;*

³*Dept of Clinical Pharmacology, The First Affiliated Hospital, Anhui University of Science & Technology, Huainan 232001)*

Abstract *Objective* To investigate the role and possible mechanism of curcumin (Cur) regulating Peroxiredoxin-6 (Prdx6) expression in inhibiting Erastin-induced ferroptosis in C28/I2 chondrocytes. *Methods* Safranin O/Fast Green and hematoxylin-eosin (HE) staining were performed to observe the pathological changes in the knee joint of rats with osteoarthritis (OA). The expression levels of Prdx6 and GPX4 proteins in cartilage tissues with OA were detected by immunohistochemistry and Western blot. C28/I2 chondrocytes were treated with different concentrations of Cur, cell viability was detected by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay and cytotoxicity was measured by lactic dehydrogenase (LDH) assay. The production of lipid reactive oxygen species (ROS) in chondrocytes was detected by flow cytometry, and the total glutathione (GSH) assay kit was used to detect the GSH level in chondrocytes. Western blot was performed to detect the expression level of Prdx6 and ferroptosis-related proteins in chondrocytes. The interaction between the Cur molecule and Prdx6 was analyzed through the molecular docking technique. *Results* During the OA progression, OA rats and OA patients showed pathological changes such as damage to the cartilage and a decrease in the number of chondrocytes. The expression levels of Prdx6 and GPX4 were reduced in the cartilage tissues of OA patients compared with healthy people. Further study revealed that the treatment of Erastin-induced ferroptosis in C28/I2 chondrocytes in a mouse model with 20 μ mol/L of Cur could improve cell viability, decrease cytotoxicity, inhibit lipid ROS production, and increase the level of intracellular GSH. Western blot results showed decreased expression of Prdx6, SLC7A11, FTH, and GPX4 and increased expression of ACSL4. In addition, Cur molecules interacted with Prdx6 protein by van der Waals forces and π bond. *Conclusion* Cur may inhibit Erastin-induced ferroptosis in C28/I2 chondrocytes by upregulating the Prdx6 expression level.

Key words ferroptosis; osteoarthritis; curcumin; chondrocyte; peroxiredoxin-6; molecular docking