

蒲公英甾醇对 Erastin 诱导的软骨细胞铁死亡的保护作用及机制

周富丽^{1,2}, 王浩^{1,2}, 朱仁弟^{1,2}, 赵英杰^{1,2}, 杨雅茹^{1,2}, 周仁鹏^{1,2}, 胡伟^{1,2}, 鲁超^{1,3}

摘要 目的 探究蒲公英甾醇(TAR)对 Erastin 诱导的 C28/I2 软骨细胞铁死亡的作用。方法 用 Erastin 诱导 C28/I2 软骨细胞系构建体外软骨细胞铁死亡模型,实验分为 Control 组、Erastin 组、TAR 组、TAR + Erastin 组。CCK-8 法检测细胞活力;乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒和 Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒检测细胞毒性;流式细胞术检测脂质活性氧(ROS)含量;谷胱甘肽(GSH)试剂盒检测细胞内 GSH 含量;JC-1 染色和 RH123 染色检测线粒体膜电位;Western blot 法检测铁死亡关键指标酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4(ACSL4)和谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)蛋白表达变化。结果 TAR 可以恢复 Erastin 处理导致的 C28/I2 软骨细胞细胞活力降低以及减少 Erastin 诱导的细胞毒性($P < 0.01$);与 Control 组比较,Erastin 处理后细胞内脂质 ROS 水平升高($P < 0.01$),GSH 含量降低($P < 0.01$),而 TAR 可以减少脂质 ROS 产生($P < 0.01$),增加 GSH 含量($P < 0.01$);TAR 可以恢复铁死亡的 C28/I2 软骨细胞线粒体膜电位,减少 ACSL4 蛋白的表达($P < 0.01$),增加 GPX4 蛋白的表达($P < 0.01$);此外,TAR 可以恢复 IL-1 β 刺激导致的软骨细胞活力降低。结论 TAR 可以抑制 Erastin 诱导的 C28/I2 软骨细胞铁死亡,这一过程可能与调控 ACSL4、GPX4 蛋白表达有关。

关键词 蒲公英甾醇;软骨细胞;铁死亡;骨关节炎

中图分类号 R 966

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)06-1053-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.022

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种慢性退行性关节疾病,涉及软骨及周围相关组织病变^[1]。软骨细胞是关节软骨中唯一的细胞类型,与 OA 的发病

机制和发展密切相关。铁死亡是一种铁依赖的,以脂质过氧化、线粒体皱缩为主要特征的新型程序性细胞死亡方式^[2-3]。近年来研究^[4-5]显示,软骨细胞铁死亡会促进 OA 发展,因此,抑制软骨细胞铁死亡可能是 OA 防治的一种新的策略。蒲公英甾醇(taraxasterol, TAR)是一种从蒲公英中分离出的五环三萜类化合物,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用。TAR 以剂量依赖性方式抑制脂多糖诱导的 RAW246.7 小鼠单核巨噬细胞中炎症因子的产生^[6]。TAR 可通过调控鸡原代肝细胞 Keap1/Nrf2 信号通路提高其抗氧化能力,从而对黄曲霉毒素 B1 诱导的鸡原代肝细胞氧化损伤起到保护作用^[7]。研究^[8-9]发现,TAR 可抑制白细胞介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)诱导的人软骨细胞中基质金属蛋白酶-13 和环氧合酶-2 的产生,并减轻 OA 大鼠关节软骨组织的病理学改变,提示 TAR 对 OA 具有一定的保护作用。但 TAR 是否通过抑制软骨细胞铁死亡来发挥对 OA 的保护作用,尚未见报道。因此,本研究利用铁死亡诱导剂 Erastin 建立人正常软骨细胞(C28/I2)铁死亡模型,探讨 TAR 对软骨细胞铁死亡的影响及机制,从而为临床防治 OA 提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人正常软骨细胞系(C28/I2)购自 ATCC 细胞库。

1.1.2 试剂 TAR(成都彼斯特生物科技有限公司,货号:1059-14-9,纯度 $\geq 98\%$);Erastin(美国 Selleck 公司,货号:S724);DMEM 培养基、胎牛血清(上海达希特尔生物科技有限公司,货号:C3113-0500、2251344);胰酶、RIAP 裂解液、JC-1 试剂盒、Calcein/PI 试剂盒、CCK-8 试剂盒、谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒、Rhodamine 123(上海碧云天生物技术有限公司,货号:C0201、P0013B、C2003S、C2015S、C0038、S0052、C2007);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(瑞士 Hoffmann La-Roche 公司,货号:04744934001);BODIPY 581/591

2024-03-02 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:2208085MH215);安徽省中医药传承创新科研项目(编号:2020cczd05);安徽省重点研究与开发计划项目(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 232007

作者简介:周富丽,女,硕士研究生;

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

C11 荧光探针(美国 Invitrogen 公司,货号:D3861);小鼠抗 β -actin 单克隆抗体、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H + L)、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (H + L)(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号:TA09、ZB-2301、ZB-2305);鼠抗酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4(recombinant acyl coenzyme A synthetase long chain family, member 4, ACSL4)单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,货号:SC-365230);兔抗谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)单克隆抗体(英国 Abcam 公司,货号:ab125066);ECL 发光液(江苏亲科生物有限公司,货号:KF8003)。

1.1.3 设备与仪器 细胞培养超净工作台(苏州净化设备有限公司,型号:eMMY SW-CJ-2D);CO₂ 培养箱、流式细胞仪、酶标仪(美国赛默飞科技有限公司,型号:371 CytoFLEX、A00-1-1102、800TS);电泳仪、化学发光成像仪(上海天能电子有限公司,型号:EPS600、FINEDOX6);低温离心机(德国艾本德股份公司,型号:5417R);超低温冰箱(青岛海尔股份有限公司,型号:DW-88L626)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组处理 C28/I2 细胞用含有 10% 胎牛血清和 1% 青 - 链霉素双抗的高糖培养基,在 5% CO₂、37 °C 环境中培养。2 d 更换 1 次培养基,当细胞达到 70% ~ 80% 汇合度时,将其用 0.25% 胰酶消化后用于后续实验。为了研究 Erastin 对软骨细胞活力的影响,将细胞分为 Control 组和 Erastin 组(0.25、0.5、1、2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$);为了研究 TAR 对软骨细胞活力的影响,将细胞分为 Control 组和 TAR 组(2.5、5、10、15、20、30、40、60、80 $\mu\text{g/ml}$);为了研究 TAR 对 Erastin 诱导的 C28/I2 软骨细胞铁死亡的作用,将细胞分为 Control 组、Erastin 组(2 $\mu\text{mol/L}$)和 Erastin + TAR 组(2 $\mu\text{mol/L}$ Erastin + 2.5、5、10、15、20、30、40、60、80 $\mu\text{g/ml}$ TAR),确定 TAR 最宜给药浓度,后续将细胞分为 Control 组、Erastin 组(2 $\mu\text{mol/L}$)、TAR 组(15 $\mu\text{g/ml}$)、TAR + Erastin 组(2 $\mu\text{mol/L}$ Erastin + 15 $\mu\text{g/ml}$ TAR);为了进一步研究炎症状态下 TAR 对软骨细胞铁死亡的作用,将细胞分为 Control 组、IL-1 β 组(20 ng/ml)、IL-1 β + Erastin 组(20 ng/ml IL-1 β + 2 $\mu\text{mol/L}$ Erastin)、IL-1 β + TAR 组(20 ng/ml IL-1 β + 15 $\mu\text{g/ml}$ TAR)、IL-1 β + Erastin + TAR 组(20 ng/ml IL-1 β + 2 $\mu\text{mol/L}$ Erastin + 15 $\mu\text{g/ml}$ TAR)。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞活力 细胞铺至 96 孔板中过夜,按照细胞分组加入相应药物处理细胞 24 h

后,每孔加入 CCK-8 溶液 10 μl ,在 37 °C 培养箱继续避光孵育 1 h,用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度,计算细胞活力值。

1.2.3 LDH 法检测细胞毒性 细胞铺至 24 孔板中过夜,按照 Control 组、Erastin 组、TAR 组和 TAR + Erastin 组分组情况处理细胞 24 h。然后将 50 μl 上清液转移到 96 孔板中。加入 5% Triton X-100 孵育 30 min,然后将 50 μl 上清液再次转移到 96 孔板中。根据 LDH 试剂盒加入相应的检测试剂,用酶标仪检测 492 nm 和 620 nm 处的吸光度。

1.2.4 Calcein/PI 试剂盒检测细胞活性与细胞毒性 细胞铺至 12 孔板中过夜,按照 Control 组、Erastin 组、TAR 组和 TAR + Erastin 组分组情况处理细胞 24 h。PBS 洗涤细胞 1 次,用 Calcein/PI 检测工作液对细胞进行染色,37 °C 孵育 30 min。然后用 PBS 洗涤 2 次,荧光显微镜观察并获得图像。

1.2.5 流式细胞术检测脂质活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量 细胞铺至 6 孔板中过夜,按照 Control 组、Erastin 组、TAR 组和 TAR + Erastin 组分组情况处理细胞 24 h。PBS 洗涤细胞 1 次,加入 2 $\mu\text{mol/L}$ BODIPY 581/591 C11 荧光探针在 37 °C 下孵育 30 min。收集细胞并用流式细胞仪进行分析。数据用 Flow Jo 软件处理。

1.2.6 GSH 试剂盒检测 GSH 含量 细胞铺至 6 孔板中过夜,按照 Control 组、Erastin 组、TAR 组和 TAR + Erastin 组分组情况处理细胞 24 h。PBS 洗涤细胞 1 次,用胰酶消化离心收集细胞,弃上清液加入细胞沉淀 3 倍量的蛋白去除试剂 S 溶液。然后利用液氮和 37 °C 水浴对样品进行 2 次快速冻融。4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液用于总 GSH 含量测定,412 nm 处测量吸光度。检测试剂配制按试剂盒说明书进行。

1.2.7 JC-1 染色和 RH123 染色检测线粒体膜电位 细胞铺至 12 孔板中过夜,按照 Control 组、Erastin 组、TAR 组和 TAR + Erastin 组分组情况处理细胞 24 h。PBS 洗涤细胞 1 次,用 RH123 染料或 JC-1 染料对细胞进行线粒体膜染色,37 °C 孵育 30 min。然后用 PBS 洗涤 2 次,荧光显微镜观察并获得图像。

1.2.8 Western blot 检测蛋白表达水平 细胞铺至 6 孔板中过夜,按照 Control 组、Erastin 组、TAR 组和 TAR + Erastin 组分组情况处理细胞 24 h。PBS 洗涤细胞 1 次,加入 RIPA 裂解液在冰上裂解,加 5 \times SDS 上样缓冲液,100 °C 变性 10 min。蛋白经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛

奶封闭 2 h, 与特异性一抗 (ACSL4 1 : 500, GPX4 1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜, 二抗 (1 : 5 000) 孵育 1 h, 蛋白条带用 ECL 溶液显色, 化学发光成像仪显影。使用 ImageJ 软件对条带进行量化分析。

1.3 统计学处理 采用 Graph Pad Prism 8.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 C28/I2 软骨细胞铁死亡模型构建 用铁死亡诱导剂 Erastin 构建人正常软骨细胞 (C28/I2 细胞) 铁死亡的体外模型。CCK-8 结果显示 (图 1), Erastin 以浓度依赖性方式降低细胞活力 ($F = 69.85, P < 0.01$)。为保证有足够活力的细胞进行后续实验, 确定 2 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 Erastin 作为诱导 C28/I2 软骨细胞铁死亡的条件。

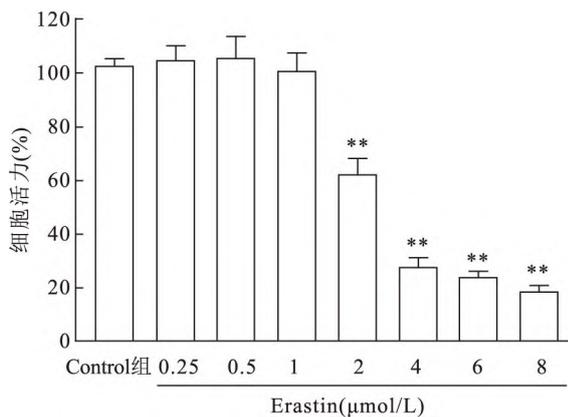


图1 不同浓度 Erastin 对 C28/I2 软骨细胞细胞活力的影响
与 Control 组比较: ** $P < 0.01$

2.2 TAR 对 Erastin 诱导的 C28/I2 软骨细胞细胞

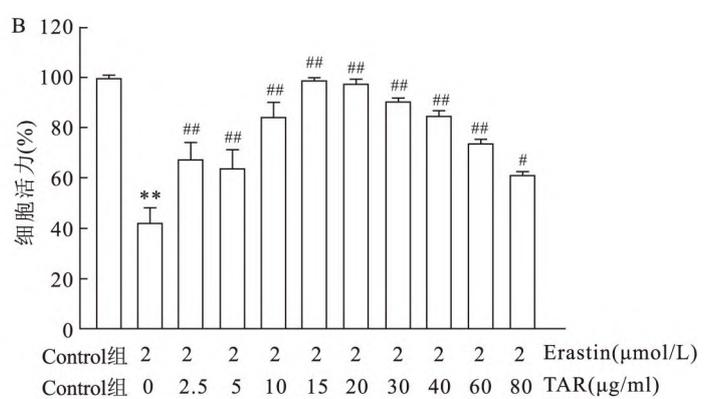
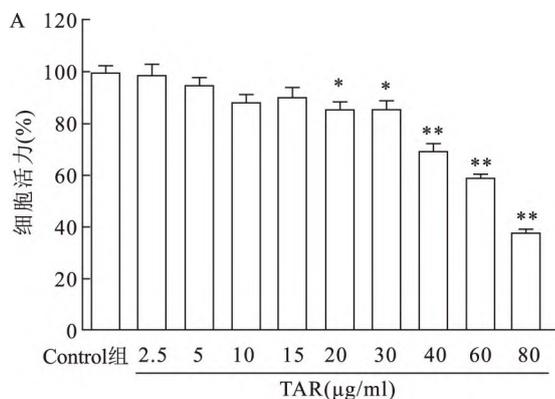


图2 TAR 对 Erastin 诱导的 C28/I2 软骨细胞细胞活力的影响

A: CCK-8 法检测 TAR 单独给药处理的细胞活力; B: CCK-8 法检测 TAR 和 Erastin 联合给药处理的细胞活力; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Erastin 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

活力的影响 用不同浓度的 TAR 处理 C28/I2 细胞 24 h, 通过 CCK-8 检测细胞活力, 发现 0 ~ 15 $\mu\text{g/ml}$ 的 TAR 对细胞活力几乎无影响 (图 2A)。用 Erastin 和不同浓度的 TAR 处理 C28/I2 细胞 24 h, 通过 CCK-8 检测细胞活力, 结果显示 Erastin 组细胞活力明显降低, 而不同浓度的 TAR 能够不同程度恢复 Erastin 导致的 C28/I2 细胞活力的降低 ($P < 0.05$), 且浓度为 15 $\mu\text{g/ml}$ 的 TAR 保护效果最好 (图 2B)。根据以上实验结果, 选用 15 $\mu\text{g/ml}$ TAR 进行后续实验。

2.3 TAR 对 Erastin 诱导的 C28/I2 软骨细胞细胞毒性的影响 LDH 结果显示 (图 3A), 与 Control 组比较, Erastin 处理会导致细胞毒性增加 ($P < 0.01$), 而 TAR 可以降低 Erastin 导致的细胞毒性 ($P < 0.01$)。此外, Calcein/PI 染色结果显示 (图 3B), Erastin 处理后软骨细胞死亡明显增加, TAR 可以明显减少 Erastin 诱导的软骨细胞死亡。

2.4 TAR 对 Erastin 诱导的 C28/I2 软骨细胞线粒体膜电位的影响 线粒体膜电位降低是铁死亡发生的标志之一。本研究通过 RH123 染色 (图 4A) 和 JC-1 染色 (图 4B) 检测线粒体膜电位。结果显示, 与 Control 组比较, Erastin 处理后细胞线粒体膜电位明显下降, 而 TAR 可以恢复线粒体膜电位, 提示 TAR 可以减少软骨细胞铁死亡。

2.5 TAR 对 Erastin 诱导的 C28/I2 软骨细胞脂质 ROS 产生和 GSH 含量的影响 流式结果显示 (图 5A、B), 与 Control 组比较, Erastin 处理后细胞内脂质 ROS 水平明显升高 ($P < 0.01$), 而 TAR 处理可以明显降低细胞内脂质 ROS 水平 ($P < 0.01$)。GSH 结果显示 (图 5C), 与 Control 组比较, Erastin 处理明显降低细胞内 GSH 含量 ($P < 0.01$), 而 TAR 处理后

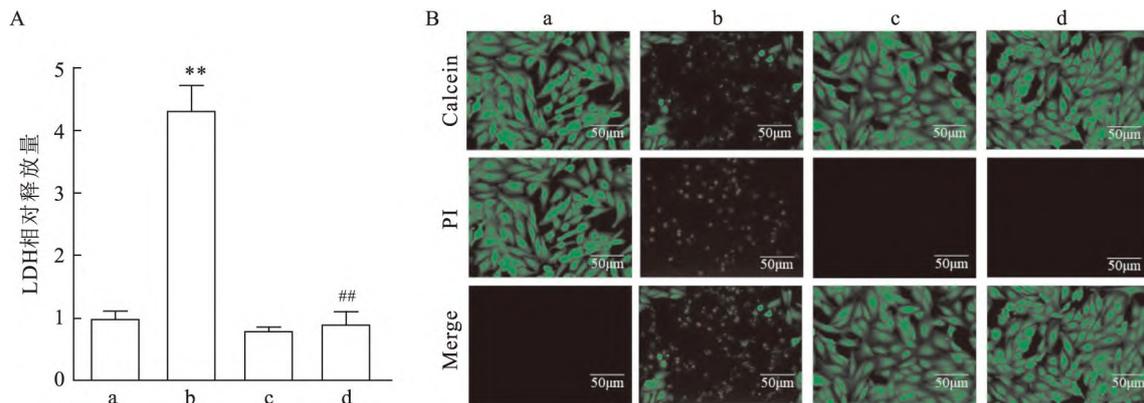


图3 TAR对Erastin诱导的C28/I2软骨细胞细胞毒性的影响 ×200

A:LDH法检测TAR和Erastin给药处理的细胞毒性;B:Calcein/PI染色检测TAR和Erastin给药处理的细胞死活和毒性;a:Control组;b:Erastin组;c:TAR组;d:TAR + Erastin组;与Control组比较:** $P < 0.01$;与Erastin组比较:## $P < 0.01$

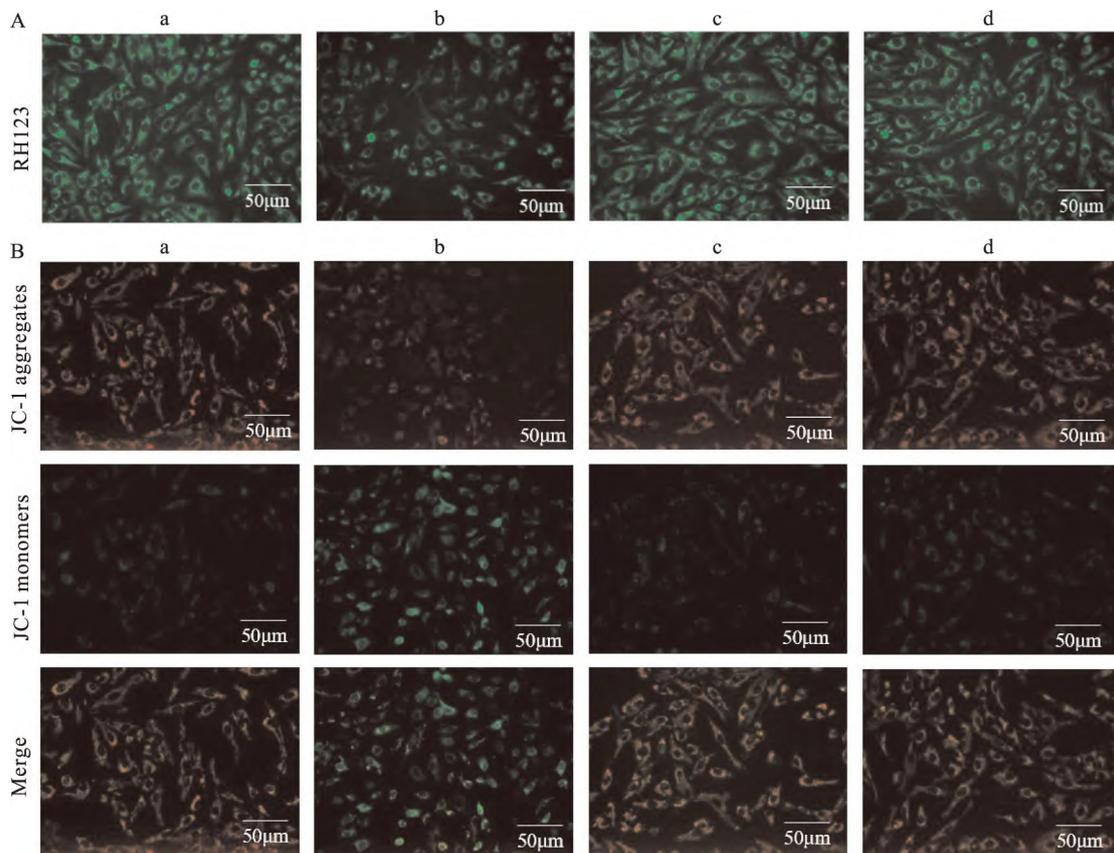


图4 TAR对Erastin诱导的C28/I2软骨细胞线粒体膜电位的影响 ×200

A:TAR和Erastin给药处理的软骨细胞RH123染色;B:TAR和Erastin给药处理的软骨细胞JC-1染色;a:Control组;b:Erastin组;c:TAR组;d:TAR + Erastin组

可以明显恢复C28/I2软骨细胞内的GSH含量($P < 0.01$)。结果提示,TAR可以抑制软骨细胞铁死亡,恢复细胞氧化还原平衡。

2.6 TAR对Erastin诱导的C28/I2软骨细胞铁死亡相关蛋白表达的影响

Western blot法检测铁死

亡标志蛋白ACSL4和GPX4的表达水平。结果显示,Erastin处理后ACSL4的表达增加($P < 0.05$),GPX4的表达降低($P < 0.05$),TAR处理后可以降低ACSL4的表达($P < 0.01$),增加GPX4的表达($P < 0.01$)。见图6。

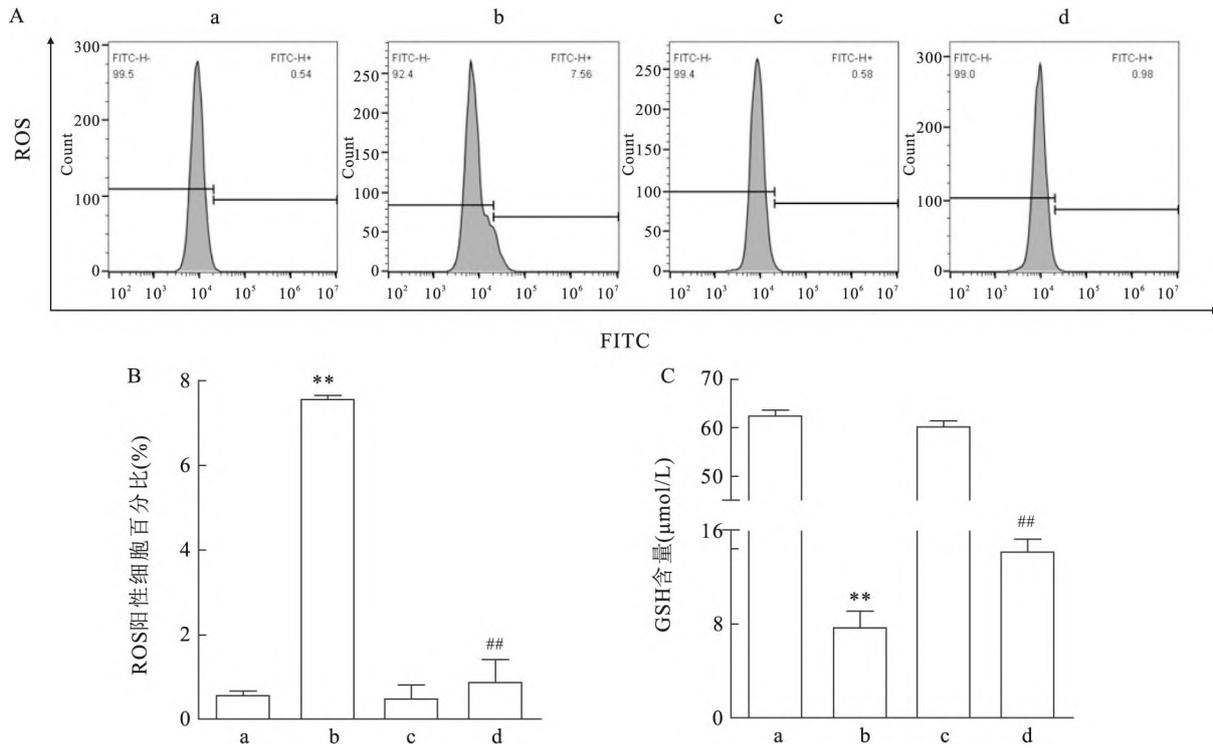


图5 TAR对Erastin诱导的C28/I2软骨细胞脂质ROS产生和GSH含量的影响

A:流式细胞术定量分析;B:TAR和Erastin给药处理的各组细胞内ROS阳性细胞比例;C:GSH试剂盒检测TAR和Erastin给药处理的细胞GSH含量;a:Control组;b:Erastin组;c:TAR组;d:TAR+Erastin组;与Control组比较:** $P < 0.01$;与Erastin组比较:## $P < 0.01$

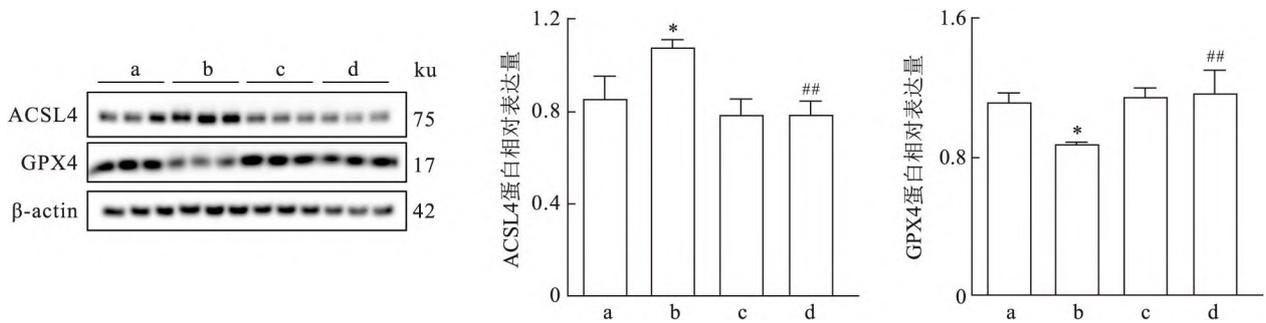


图6 Western blot法检测TAR对Erastin诱导的C28/I2软骨细胞铁死亡蛋白表达的影响

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

2.7 TAR对IL-1β诱导的OA细胞的保护作用

CCK-8结果显示,与Control组比较,IL-1β组细胞活力显著降低($P < 0.001$),而TAR处理可以减少IL-1β诱导的细胞活力降低($P < 0.01$)。此外,TAR还可以恢复炎症状态下Erastin诱导的软骨细胞活力降低($P < 0.01$)。见图7。以上结果表明TAR对OA软骨细胞铁死亡有一定的保护作用。

3 讨论

OA是一种常见的关节软骨退行性疾病,目前

尚无有效的治疗方法。近年来研究^[10]表明,软骨细胞铁死亡与OA的发生密切相关,抑制软骨细胞铁死亡可以减轻软骨细胞的破坏。因此积极寻找OA软骨细胞铁死亡的发生机制以及抑制软骨细胞铁死亡的药物至关重要。TAR是一种五环三萜类化合物,具有抗炎、抗氧化应激等多种药理作用,在多种疾病中发挥作用。虽然之前有文献报道TAR对大鼠骨关节炎的作用,但是TAR在OA中的作用机制尚不清楚,因此,本研究在铁死亡层面研究了TAR对C28/I2软骨细胞的作用。

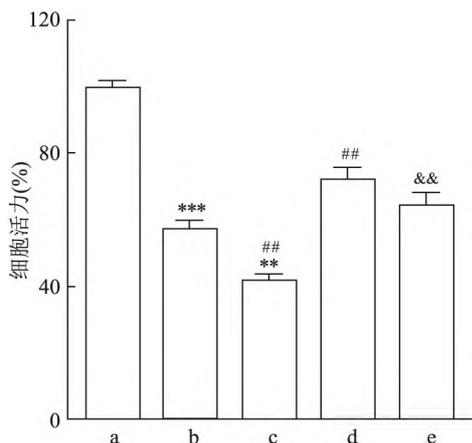


图7 TAR对IL-1 β 联合Erastin诱导的软骨细胞细胞活力的影响

CCK-8法检测IL-1 β 、TAR和Erastin给药处理的细胞活力;a: Control组;b:IL-1 β 组;c:IL-1 β +Erastin组;d:IL-1 β +TAR组;e:IL-1 β +Erastin+TAR组;与Control组比较:** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与IL-1 β 组比较:## $P < 0.01$;与IL-1 β +Erastin组比较:&& $P < 0.01$

本研究用Erastin构建了体外软骨细胞铁死亡模型,发现在一定浓度范围内TAR处理后可以明显恢复Erastin导致的细胞活力降低,减少Erastin诱导产生的细胞毒性,并且单独使用TAR对软骨细胞活力几乎无影响,这表明TAR对软骨细胞铁死亡有一定的保护作用。线粒体膜电位降低是铁死亡的标志之一,本研究显示Erastin诱导后线粒体膜电位下降,而TAR处理后可以恢复膜电位。铁死亡的发生依赖于脂质ROS的积累,本研究结果显示,TAR处理后可以减少脂质ROS的产生,表明TAR可以减少软骨细胞铁死亡。GPX4被认为是预防铁死亡的主要酶,GPX4以GSH为还原剂可以将有毒的脂质氢过氧化物转化为无毒的脂质醇,维持细胞内氧化还原稳态^[11]。本研究结果显示,Erastin处理后细胞内GSH含量降低,GPX4蛋白表达下调,而TAR处理后,GSH含量升高,GPX4蛋白表达上调,提示TAR可以减轻软骨细胞铁死亡。含不饱和脂肪酸长链磷脂的脂质过氧化在铁死亡中起着重要作用,这一过程由特定的酶激活驱动,包括ACSL4和脂氧合酶。ACSL4是生产不饱和脂肪酸磷脂所必需的,而脂氧合酶将不饱和脂肪酸磷脂氧化为相应的氢过氧化物,即脂质过氧化物^[12]。因此抑制ACSL4的表达可以减少细胞铁死亡。本研究结果显示TAR可以减少Erastin诱导产生的ACSL4蛋白表达增加,这提示TAR可以抑制软骨铁死亡。有文献^[13]报道,冬虫夏草通过SLC7A11/GPX4/ACSL4

通路抑制细胞铁死亡,对放射性直肠炎起到治疗作用。 α -生育酚通过GPX4/ACSL4信号通路抑制HT22细胞铁死亡,促进神经元细胞存活和运动功能的恢复^[14]。本研究结果显示Erastin组ACSL4蛋白表达上调,GPX4蛋白表达下调,而TAR处理后,ACSL4的表达下调,GPX4表达上调,由此推测,TAR可能通过激活ACSL4/GPX4轴来抑制Erastin诱导的软骨细胞铁死亡。此外,本研究用IL-1 β 诱导软骨细胞构建体外OA模型,结果显示TAR可以恢复IL-1 β 刺激导致的软骨细胞活力降低,提示TAR对OA具有一定的保护作用。此外本研究在IL-1 β 的基础上用Erastin处理模拟OA软骨细胞铁死亡,结果发现TAR可以恢复炎症状态下的铁死亡。以上结果表明TAR对OA软骨细胞铁死亡具有保护作用。

综上所述,本研究证明TAR可以抑制Erastin诱导的软骨细胞铁死亡,并对软骨细胞具有保护作用,这为OA的治疗提供了新的策略。后续将继续研究TAR抑制软骨细胞铁死亡的具体机制以及构建大鼠OA模型,在体内验证TAR的软骨保护作用。

参考文献

- [1] Kang D, Lee J, Jung J, et al. Selenophosphate synthetase 1 deficiency exacerbates osteoarthritis by dysregulating redox homeostasis [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 779.
- [2] Zhou R P, Chen Y, Wei X, et al. Novel insights into ferroptosis: Implications for age-related diseases [J]. Theranostics, 2020, 10(26): 11976-97.
- [3] Li J, Cao F, Yin H L, et al. Ferroptosis: past, present and future [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 88.
- [4] Miao Y, Chen Y, Xue F, et al. Contribution of ferroptosis and GPX4's dual functions to osteoarthritis progression [J]. EBio Medicine, 2022, 76: 103847.
- [5] Yao X, Sun K, Yu S, et al. Chondrocyte ferroptosis contribute to the progression of osteoarthritis [J]. J Orthop Translat, 2021, 27: 33-43.
- [6] Zhang X, Xiong H, Liu L. Effects of taraxasterol on inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 141(1): 206-11.
- [7] 鲁萍,王萌,桑锐,等.蒲公英甾醇对AFB₁所致鸡原代肝细胞氧化损伤的保护作用[J].中国畜牧兽医, 2023, 50(9): 3541-9.
- [8] Piao T, Ma Z, Li X, et al. Taraxasterol inhibits IL-1 β -induced inflammatory response in human osteoarthritic chondrocytes [J]. Eur J Pharmacol, 2015, 756: 38-42.

- [9] 谢子康,史铭钰,蒋 阳,等. 蒲公英甾醇治疗大鼠膝关节骨关节炎的作用机制初步探索[J]. 实用骨科杂志,2022,28(5):416-21.
- [10] Guo Z, Lin J, Sun K, et al. Deferoxamine alleviates osteoarthritis by inhibiting chondrocyte ferroptosis and activating the Nrf2 pathway [J]. *Front Pharmacol*,2022,13:791376.
- [11] Stockwell B R, Friedmann Angeli J P, Bayir H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. *Cell*,2017,171(2):273-85.
- [12] Doll S, Proneth B, Tyurina Y Y, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition [J]. *Nat Chem Biol*,2017,13(1):91-8.
- [13] 窦 婷,杨静雯,杨 昊,等. 冬虫夏草介导 SLC7A11/GPX4/ACSL4 轴抑制铁死亡抵抗放射性直肠炎研究[J]. 药物评价研究,2023,46(9):1882-8.
- [14] 卢子昂. α -生育酚通过 GPX4/ACSL4 信号通路抑制铁死亡、促进脊髓损伤神经功能恢复的实验研究[D]. 济宁: 济宁医学院,2023.

The protective effect and mechanism of Taraxasterol on Erastin induced ferroptosis in chondrocytes

Zhou Fuli^{1,2}, Wang Hao^{1,2}, Zhu Rendu^{1,2}, Zhao Yingjie^{1,2}, Yang Yaru^{1,2}, Zhou Renpeng^{1,2}, Hu Wei^{1,2}, Lu Chao^{1,3}
(¹School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Clinical Pharmacology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601; ³Dept of Clinical Pharmacology, The First Affiliated Hospital, Anhui University of Science & Technology, Huainan 232007)

Abstract Objective To investigate the role of Taraxasterol (TAR) on ferroptosis in chondrocytes induced by Erastin. **Methods** The C28/I2 chondrocyte line was treated with Erastin to construct the ferroptosis model of chondrocytes in vitro and the experiments were divided into Control, Erastin, TAR, and TAR + Erastin groups. Cell viability was detected by the CCK-8 assay. Cytotoxicity was detected by the lactate dehydrogenase (LDH) kit and the Calcein/PI cytokinesis kit. Flow cytometry was used to detect lipid reactive oxygen species (ROS). The intracellular glutathione (GSH) content was detected by GSH kit. Mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 staining and RH123 staining. ACSL4 and GPX4 protein expression and the key indicators of ferroptosis were detected by Western blot. **Results** TAR restored the decreased cell viability of C28/I2 chondrocytes induced by Erastin treatment as well as reduced Erastin-induced cytotoxicity ($P < 0.01$). Compared with the control group, the level of intracellular lipid ROS increased ($P < 0.01$) and the content of GSH decreased ($P < 0.01$) after treatment with Erastin, while TAR could reduce the production of lipid ROS ($P < 0.01$) and increase the content of GSH ($P < 0.01$). TAR restored mitochondrial membrane potential in C28/I2 chondrocytes ferroptosis, decreased ACSL4 protein expression ($P < 0.01$) and increased GPX4 protein expression ($P < 0.01$). In addition, TAR restored the reduced cell viability caused by IL-1 β treatment. **Conclusion** TAR can inhibit Erastin induced ferroptosis in C28/I2 chondrocytes, which may be related to the regulation of ACSL4 and GPX4 protein expression.

Key words taraxasterol; chondrocytes; ferroptosis; osteoarthritis