·论著·

姜黄素通过p53信号通路抑制铁死亡减轻骨关节炎的作用机制

胡建华[1],郑欢欢[2],郭文炜[1],匡萃琳[1],彭爱凤[1],段海英[1]
(吉安市中心人民医院 1.骨科;2.营养科,江西 吉安 343000)

摘要 目的 探讨姜黄素(CUR)能否减轻骨关节炎(OA)的软骨细胞炎症和软骨降解及其潜在机制。**方法** 建立OA大鼠模型,将40只大鼠分为假手术组、OA组、CUR+OA组、去铁胺(DFO)+OA组,每组10只。将5日龄SD大鼠的软骨细胞分为对照组、白细胞介素-1β(IL-1β)组、CUR+IL-1β组、DFO+IL-β组。采用CCK-8法分析不同浓度CUR单独处理或与IL-1β联合处理对软骨细胞活力的影响。采用甲苯胺蓝和阿尔新蓝染色观察IL-1β诱导的软骨细胞形态学变化,采用Western blotting检测炎症反应相关蛋白COX-2和iNOS,细胞外基质降解相关蛋白COL2A和MMP13,以及铁死亡中p53、SLC7A11和GPX4蛋白的表达。采用JC-1染色检测线粒体膜电位。透射电镜下观察线粒体形态。采用试剂盒检测软骨细胞内谷胱甘肽、丙二醛和细胞内铁含量。取软骨组织进行番红O-固绿/HE染色,采用免疫组织化学染色检测COL2A和SLC7A11的表达。**结果** CUR和DFO显著减轻了IL-1β诱导的炎症、软骨降解和铁死亡。CUR和DFO均可减轻软骨细胞线粒体形态和功能的改变。此外,CUR逆转了IL-1β诱导的软骨细胞中Ⅱ型胶原、p53、SLC7A11、GPX4水平下降以及MMP13、iNOS和COX-2表达增加。在体内,关节内注射CUR显著改善了OA大鼠模型的软骨损伤,且CUR+OA组和DFO+OA组CO2A和SLC7A11阳性细胞显著增加。**结论** CUR通过p53信号通路抑制铁死亡以改善OA软骨降解。

关键词 姜黄素;p53信号通路;铁死亡;骨关节炎;软骨细胞
中图分类号 R684.3 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2025)09-0832-06
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20250912.1641.024
DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2025.09.012

Mechanism of curcumin inhibiting ferroptosis and alleviating osteoarthritis through p53 signaling pathway

HU Jianhua[1],ZHENG Huanhuan[2],GUO Wenwei[1],KUANG Cuilin[1],PENG Aifeng[1],DUAN Haiying[1]
(1. Department of Orthopaedics,Ji'an Central People's Hospital,Ji'an 343000,China;2. Department of Nutritional,Ji'an Central People's Hospital,Ji'an 343000,China)

Abstract Objective To investigate whether curcumin (CUR) can reduce chondrocyte inflammation and cartilage degradation in osteoarthritis (OA) and the underlying mechanisms. **Methods** A rat model of OA was established. Rats were randomly divided into a Sham, OA, CUR+OA, and deferoxamine (DFO)+OA groups with 10 mice in each group. Chondrocytes from 5-day-old SD rats were divided into the control, interleukin-1β (IL-1β), CUR+IL-1β, and DFO+IL-1β groups. A CCK-8 assay was performed to assess the effects of CUR on cell viability alone or combined with IL-1β. Toluidine blue staining and alcian blue staining were used to observe the morphological changes of IL-1β-induced chondrocytes. The expression of inflammatory response-related proteins (COX-2 and iNOS), extracellular matrix degradation-related proteins (COL2A and MMP13), and p53, SLC7A11, and GPX4 proteins during ferroptosis were detected by Western blotting. The mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 staining. Mitochondrial morphology was observed using transmission electron microscopy. Safranine O-fast green/HE staining was performed on cartilage tissues. Immunohistochemical staining was performed to detect COL2A and SLC7A11 expression levels. **Results** CUR and DFO were found to reduce IL-1β-induced inflammation, cartilage degradation, and ferroptosis, and restore mitochondrial function in chondrocytes. CUR also reversed IL-1β-induced changes in collagen Ⅱ, p53, SLC7A11, GPX4, MMP13, iNOS, and COX-2 levels. In vivo, intra-articular injection of CUR significantly improved cartilage injury in the OA rat model, and the percentages of COL2A- and SLC7A11-positive cells significantly increased in the CUR+OA and DFO+OA groups. **Conclusion** CUR inhibits ferroptosis and ameliorates cartilage degeneration in OA through p53 signaling pathway.

Keywords curcumin; p53 signaling pathway; ferroptosis; osteoarthritis; chondrocyte

骨关节炎(osteoarthritis,OA)以关节退行性病变为特征[1]。目前普遍认为软骨退变是OA最明显、最典型的病理改变,但其发病机制尚未完全清楚。OA的进展与炎症相关,其中以滑膜炎为代表。白细胞介素(interleukin,IL)-1β、肿瘤坏死因子α(tumor

基金项目: 江西省卫生健康委科技计划(SKJP220228245);吉安市指导性科技计划(20233-043354)
作者简介: 胡建华(1989-),男,主治医师,硕士.
通信作者: 郑欢欢,E-mail:18370626368@163.com
收稿日期: 2024-09-04
网络出版时间: 2025-09-15 18:53:06

necrosis factor α，TNF-α）、IL-6等炎症介质在滑膜炎症过程中合成[2]。研究[3]报道，IL-1β可显著诱导软骨细胞中铁死亡蛋白上调，而抑制铁死亡蛋白可促进OA病理进展过程中软骨细胞的存活和软骨基质的合成。因此，软骨细胞铁死亡被视为OA的治疗靶点。姜黄素（curcumin，CUR）是从姜黄根茎中提取的多酚类色素，已被广泛用于中医药中，以缓解患者的炎症和改善退行性病变[4]。此外，CUR对OA的作用主要表现为促进胶原合成和阻碍炎性细胞因子分解[5]。尽管研究取得了进展，但CUR治疗OA的机制仍不清楚。因此，本研究探讨了CUR能否减轻OA的软骨细胞炎症和软骨降解及其潜在机制，以期为临床治疗提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

CUR，购自上海源叶生物科技有限公司；去铁胺（deferoxamine，DFO），购自美国Sigma公司；CCK-8试剂盒，购自美国BOSTER公司；诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）、谷胱甘肽过氧化物酶4（glutathione peroxidase 4，GPX4），购自美国MedChemExpress公司；环氧化酶-2（cyclooxygenase-2，COX-2）、Ⅱ型胶原蛋白α链（collagen type Ⅱ α，COL2A），购自德国Merck公司；基质金属蛋白酶13（matrix metalloproteinase 13，MMP13）、p53、溶质转运蛋白家族7成员11（solute carrier family 7 member 11，SLC7A11），购自英国abcam公司；二抗，购自武汉赛维尔生物科技有限公司；铁比色测定试剂盒，购自北京普利莱基因技术有限公司。

1.2　实验动物分组和OA模型建立

40只SD大鼠（8周龄，雄性，180~220 g），购自常州卡文斯实验动物有限公司。将大鼠随机分为假手术组、OA组、CUR+OA组、DFO+OA组，每组10只。OA组、CUR+OA组、DFO+OA组大鼠通过右膝前交叉韧带处理和内侧半月板失稳法建立OA模型[6]；假手术组大鼠打开右膝关节囊暴露关节腔后，用器械轻触韧带或半月板（不造成结构性破坏），保持操作时间与真实手术一致。CUR组和DFO组大鼠术后关节腔内分别注射20 μmol/L CUR和10 μmol/L DFO，1次/周；OA组和假手术组大鼠术后关节腔内注射等体积生理盐水。大鼠术后均进行1 h的滚跑训练，3次/周。术后8周处死所有大鼠。本研究获得我院医学伦理委员会批准（JGSU2022-0152）。

1.3　细胞培养和分组

软骨细胞获自5日龄SD大鼠[7]。从50只5日龄乳鼠膝关节软骨组织提取原代软骨细胞进行初代培养，每只鼠约获得0.5×10^5~1×10^5个细胞。细胞培养于37 ℃、5%CO_2条件下，将细胞分为对照组、IL-1β组、CUR+IL-1β组、DFO+IL-1β组，分别在细胞中加入溶剂混合液、IL-1β、CUR和IL-1β、铁死亡蛋白抑制剂DFO和IL-1β。

1.4　细胞实验

1.4.1　CCK-8实验：采用CCK-8法测定细胞活力。将大鼠软骨细胞以1×10^4/孔的密度接种到96孔板。用不同浓度的CUR（0、1、5、10、20、30和40 μmol/L）单独处理或与IL-1β（10 ng/mL）联合处理24 h后加入CCK-8试剂，测定450 nm处的吸光度。

1.4.2　甲苯胺蓝和阿尔新蓝染色：甲苯胺蓝常被用于鉴定软骨细胞。阿尔新蓝是酸性黏液最特异的染料。2种染色均使用24孔板进行。用4%多聚甲醛固定细胞，PBS洗涤3次后，在室温下与染料孵育6 h。用PBS冲洗3次，在Evos FL Auto倒置显微镜（美国ThermoFisher Scientific公司）下观察。

1.4.3　线粒体膜电位检测和透射电子显微镜检查：

1.4.3.1　线粒体膜电位检测　进行JC-1染色，37 ℃孵育20 min，检测线粒体膜电位变化。

1.4.3.2　透射电子显微镜检查　经1%四氧化锇和2%醋酸铀固定染色，梯度脱水后与树脂混合、包埋，超薄切片经醋酸铀-柠檬酸铅双染色，TECNAI G20透射电镜（美国ThermoFisher Scientific公司）下观察线粒体超微结构。

1.4.4　铁死亡相关指标检测：

1.4.4.1　GPX4检测　将软骨细胞接种到24孔板，采用免疫荧光检测GPX4蛋白水平，在Evos FL Auto荧光显微镜（美国ThermoFisher Scientific公司）下观察，评估细胞抗脂质过氧化能力。

1.4.4.2　活性氧（reactive oxygen species，ROS）检测　细胞与10 μmol/L DCFH-DA于37 ℃共孵育20 min，在Evos FL Auto荧光显微镜下检测绿色荧光强度。

1.4.4.3　线粒体铁染色　Mito-FerroGreen探针于37 ℃孵育15~45 min，在Evos FL Auto荧光显微镜下观察。

1.4.4.4　脂质ROS检测　细胞与5 μmol/L C11 BODIPY

于37 ℃孵育1 h，PBS洗涤后，在Evos FL Auto荧光显微镜下观察，计算红绿荧光比值，评估脂质过氧化程度。

1.4.5　细胞内铁测定：用裂解缓冲液（200 μL/孔）裂解细胞，然后加入铁离子检测试剂30 μL，混匀，室温孵育30 min，置于96孔板中，测定550 nm处的吸光度。

1.4.6　谷胱甘肽（glutathione，GSH）和丙二醛（malondialdehyde，MDA）测定：按照微量还原型GSH检测试剂盒和MDA检测试剂盒说明，细胞用PBS洗涤2次，加入1 mL RIPA进行超声处理，离心10 min，收集上清液，波长为412 nm，在酶标仪下加入试剂，检测细胞中还原型GSH和MDA的含量。

1.5　动物实验

1.5.1　组织学染色：将膝关节冠状面切成5 μm厚的切片，进行HE和番红O–固绿染色。使用COL2A和SLC7A11的抗体进免疫组织化学染色。

1.5.2　Western blotting：收集动物实验中大鼠软骨组织以及细胞实验中培养的软骨细胞，提取蛋白，将蛋白质样品在凝胶上分离，转移到PVDF膜上。将膜在室温下封闭1 h，然后与1 ∶ 1 000稀释的iNOS、COX-2、MMP13、p53、SLC7A11和GPX4一抗在4 ℃孵育过夜。洗膜后，与相应的二抗（1 ∶ 5 000稀释）孵育1 h。使用增强型ECL试剂盒对蛋白条带进行可视化。

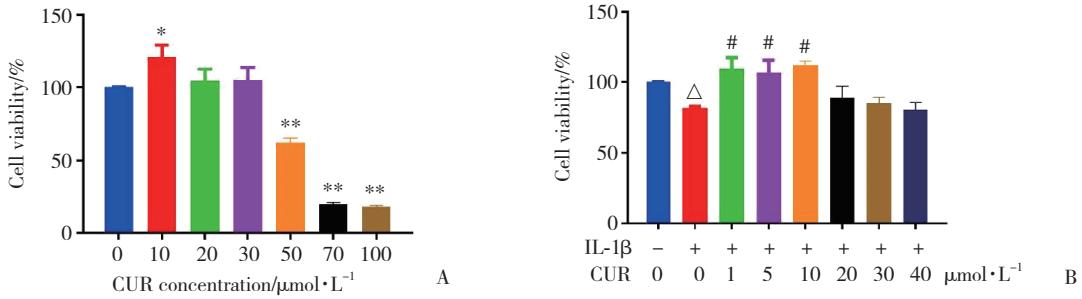
1.6　统计学分析

采用GraphPad Prism8.0处理数据。计量资料以$\bar{x} \pm s$表示，2组间比较采用Student's t检验，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用Tukey法。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　CUR对细胞活力的影响

CCK-8实验结果（图1A）显示，10、20、30 μmol/L CUR对大鼠软骨细胞无毒性，10 μmol/L CUR作用下细胞活力增加。在IL-1β刺激下，10 μmol/L CUR显著恢复细胞活性（图1B）。故后续实验选用10 μmol/L CUR。



A，the viability of cells treated with the different concentrations of CUR；B，the viability of cells treated with the different concentrations of CUR in the presence or absence of IL-1β（10 ng/mL）. * $P<0.05$ vs. 0 μmol/L CUR group；** $P<0.001$ vs. 0 μmol/L CUR group；△ $P<0.05$ vs. control group；# $P<0.05$ vs. IL-1β group.

图1　CUR对细胞活力的影响

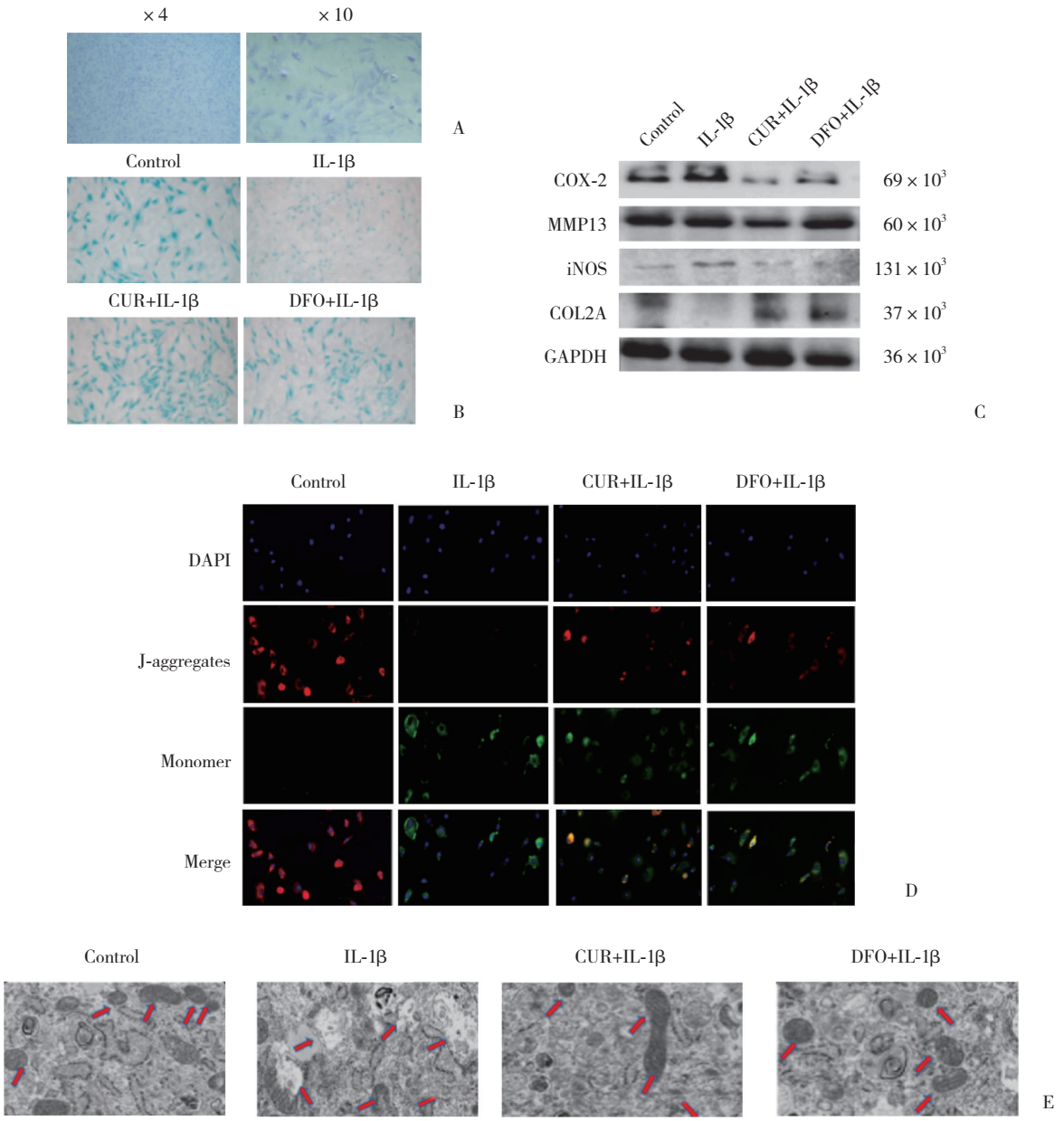
Fig.1　Effect of CUR on cell viability

2.2　CUR和DFO均可恢复IL-1β诱导的软骨细胞炎症反应和细胞外基质降解，并改善IL-1β诱导的铁死亡中线粒体损伤

通过甲苯胺蓝染色确认软骨细胞表型（图2A）。阿尔新蓝染色结果（图2B）显示，IL-1β诱导黏多糖降解，而CUR和DFO可将其逆转。IL-1β上调炎性细胞因子iNOS、COX-2以及MMP13，促进COL2A降解，CUR和DFO均能抑制这些变化（图2C）。IL-1β组红色/绿色荧光比值降低，线粒体损伤增加，并导致线粒体皱缩、外膜破裂和嵴结构减少（图2D~2E）。CUR和DFO可部分逆转这些损伤，恢复线粒体形态和功能（图2D）。结果表明，二者可能通过保护线粒体完整性，减轻IL-1β诱导的软骨细胞损伤（图2E）。

2.3　CUR和DFO改善细胞内铁和ROS水平升高并减轻IL-1β诱导的GPX4抑制

IL-1β诱导细胞内铁水平升高，促进ROS和脂质ROS产生，抑制GPX4表达。与对照组相比，IL-1β组中绿色荧光强度显著增强，CUR和DFO组中这一现象逆转。表明CUR和DFO改善了细胞内铁和ROS水平升高，减轻了IL-1β诱导的GPX4抑制。见表1。



A, toluidine blue staining (×4, ×10); B, alcian blue staining (×10); C, Western blotting results; D, JC-1 staining results (×20); E, transmission electron microscopy (×20).

图2　CUR和DFO均可恢复IL-1β诱导的软骨细胞炎症反应和细胞外基质降解并改善IL-1β诱导的铁死亡中线粒体损伤

Fig.2　CUR and DFO can restore the inflammatory response and extracellular matrix degradation of chondrocytes induced by IL-1β, and also improve mitochondrial damage in ferroptosis induced by IL-1β

表1　各组细胞中GPX4、ROS、铁、脂质ROS的荧光强度以及软骨细胞铁死亡相关指标水平

Tab.1　The fluorescence intensities of GPX4, ROS, iron, and lipid ROS in each group of cells as well as the quantitative analysis of related indicators of ferroptosis in chondrocytes

Group	Fluorescence intensity				GSH level (μg/mg)	MDA level (μmol/mg)	Iron level (μmol/L)
	GPX4	ROS	Iron	Lipid ROS			
Control	0.92 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.01	52.23 ± 5.01	2.39 ± 0.23	10.87 ± 0.43
IL-1β	0.11 ± 0.01[1)]	0.78 ± 0.03[1)]	0.83 ± 0.04[1)]	0.83 ± 0.03[1)]	24.23 ± 3.04[1)]	3.64 ± 0.31[1)]	25.33 ± 0.38[1)]
CUR+IL-1β	0.32 ± 0.02[2)]	0.37 ± 0.02[2)]	0.14 ± 0.02[2)]	0.38 ± 0.04[2)]	34.27 ± 4.12[2)]	2.44 ± 0.19[2)]	17.14 ± 0.41[2)]
DFO+IL-1β	0.33 ± 0.02[2)]	0.48 ± 0.03[2)]	0.16 ± 0.02[2)]	0.24 ± 0.02[2)]	33.11 ± 3.46[2)]	2.52 ± 0.26[2)]	17.01 ± 0.37[2)]

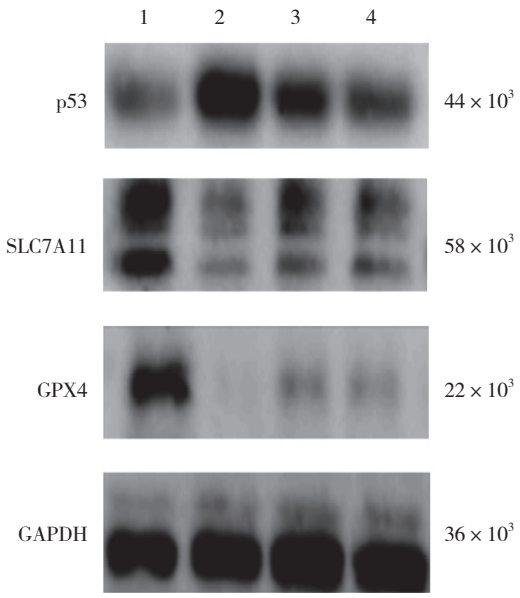
1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. IL-1β group.

2.4　CUR和DFO通过p53/SLC7A11/GPX4信号通路减轻软骨细胞铁死亡

在IL-1β诱导的软骨细胞裂解物中，GSH表达水平降低，细胞内铁和MDA水平升高（表1），与免疫荧光检测结果一致。CUR和DFO逆转并减轻了IL-1β诱导的软骨细胞铁死亡（图3）。

2.5　CUR和DFO减轻OA大鼠软骨降解

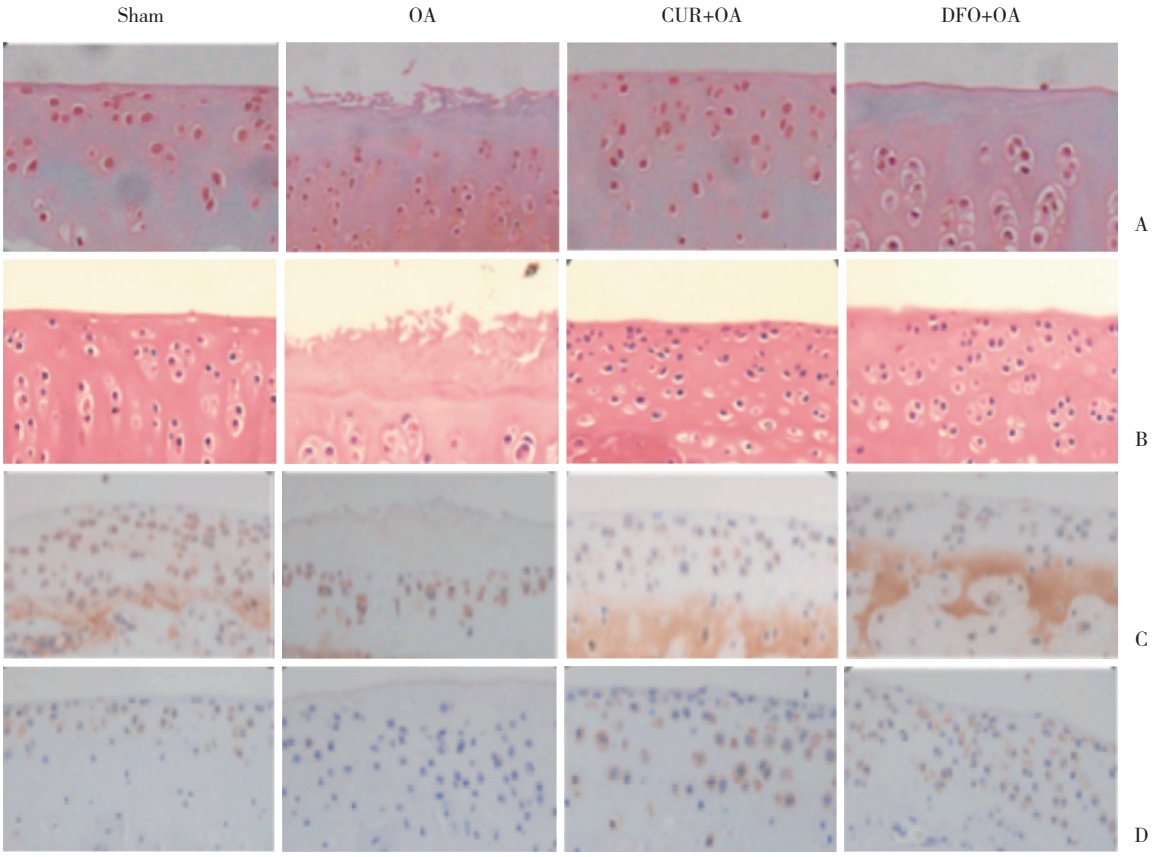
通过HE和番红O–固绿染色观察组织形态学差异。与假手术组大鼠相比，OA组大鼠出现明显的软骨损伤，包括表面侵蚀、软骨细胞序列紊乱和蛋白多糖损失。CUR+OA组和DFO+OA组大鼠的软骨损伤明显减轻（图4A、4B）。免疫组织化学染色结果（图4C、4D）显示，与假手术组相比，OA组大鼠关节软骨中COL2A和SLC7A11阳性表达显著减少，而CUR+OA组和DFO+OA组大鼠关节软骨中COL2A和SLC7A11阳性表达显著增加。与细胞实验结果一致，在OA大鼠模型中，CUR和DFO通过抑制铁死亡，表现出对软骨退化的保护作用。



1，control group；2，IL-1β group；3，CUR+IL-1β group；4，DFO+IL-1β group.

图3　CUR和DFO对软骨细胞中p53/SLC7A11/GPX4信号通路蛋白表达的影响

Fig.3　Effects of CUR and DFO on protein expression of the p53/SLC7A11/GPX4 signaling pathway in chondrocytes



A，safranin-fixed green staining（×10）；B，HE staining（×10）；C，immunohistochemical staining of COL2A（×20）；D，immunohistochemical staining of SLC7A11（×20）.

图4　CUR在OA大鼠模型中减轻软骨损伤

Fig.4　CUR alleviates cartilage injury in the rat model of OA

3　讨论

关节软骨自我修复能力极差，其退化是OA发展的关键因素。研究发现，CUR可通过上调Prdx6蛋白表达抑制软骨细胞铁死亡。因此，本研究探究了CUR是否通过铁死亡途径发挥OA保护作用。

人们普遍认为，OA的进展与炎症密切相关。OA中的炎症标志物iNOS和COX-2能增加一氧化氮和前列腺素的释放，可促进分解代谢酶，导致OA中软骨稳态失衡[8]。IL-1β作为一种代表性炎性细胞因子，在OA中显著升高，被广泛用作体外OA的诱导剂[9]。因此，本研究采用IL-1β诱导OA病理模型。研究发现，IL-1β诱导COX-2、iNOS和MMP13的产生，减少COL2A的产生。此外，IL-1β促进软骨细胞铁死亡，能够抑制SLC7A11和GPX4，诱导p53过度表达，引起细胞内脂质ROS和ROS积累，增加MDA的产生。这些结果表明，IL-1β诱导的软骨细胞发生了铁死亡，而这些效应可以被CUR逆转。此外，铁死亡抑制剂DFO表现出与CUR相同的作用。表明CUR有助于减轻OA软骨退化，这可能与铁死亡有关。

铁死亡是一种与脂质过氧化有关的铁依赖性细胞死亡。在OA中，关节中存在过量的铁，可诱导氧化应激损伤，导致软骨退变[10]。最近的临床组织分析研究[11]显示，GPX4在OA软骨中的表达显著降低，这表明抑制铁死亡有助于OA的进展。

GSH可被GPX4用于减少脂质过氧化物，从而抑制铁死亡。半胱氨酸/谷氨酸膜逆向转运体SLC7A11和GPX4是公认的铁死亡生物标志物。p53是作用于SLC7A11的众多上游调控基因之一。p53/SLC7A11/GPX4已被证明是铁死亡的经典信号通路[12]。考虑到CUR直接抑制OA软骨细胞中的铁死亡后导致GSH增加，本研究推测p53/SLC7A11/GPX4信号通路可能参与其中。Western blotting结果验证了该假设。在IL-1β诱导的软骨细胞中，CUR和DFO均能独立地逆转SLC7A11和GPX4的抑制作用，减弱p53的诱导。此外，本研究还发现，CUR和DFO明显减轻了OA大鼠模型中IL-1β诱导的COL2A和SLC7A11抑制。与DFO相比，CUR在改善OA软骨损伤方面表现出更强的作用，这种差异可能因为二者对铁死亡的抑制形式不同。

综上所述，本研究证实了CUR在OA中的抗炎和抗软骨降解特性，进一步证明了CUR通过p53/SLC7A11/GPX4信号通路调控铁死亡。本研究有助于了解CUR的治疗效果，为今后OA的治疗提供了新的思路。

参考文献：

[1] 涂仕娟，杨红亚，李桃，等. 吴茱萸碱调节Shh/Gli1信号通路对膝骨关节炎大鼠软骨损伤的影响[J]. 中国医科大学学报，2024，53(9)：827-833. DOI：10.12007/j.issn.02 58-4646.2024.09.011.

[2] TONG L，YU H，HUANG X，et al. Current understanding of osteoarthritis pathogenesis and relevant new approaches[J]. Bone Res，2022，10(1)：60. DOI：10.1038/s41413-022-00226-9.

[3] CHEN Z，JIANG J，FU N，et al. Targetting ferroptosis for blood cell-related diseases[J]. J Drug Target，2022，30(3)：244-258. DOI：10.1080/1061186X.2021.1971237.

[4] BANNURU RR，OSANI MC，AL-EID F，et al. Efficacy of curcumin and Boswellia for knee osteoarthritis：systematic review and meta-analysis[J]. Semin Arthritis Rheum，2018，48(3)：416-429. DOI：10.1016/j.semarthrit.2018.03.001.

[5] ZHANG R，ZHANG Q，ZOU Z，et al. Curcumin supplementation enhances bone marrow mesenchymal stem cells to promote the anabolism of articular chondrocytes and cartilage repair[J]. Cell Transplant，2021，30：963689721993776. DOI：10.1177/0963689721993776.

[6] PHILPOTT HT，O'BRIEN M，MCDOUGALL JJ. Attenuation of early phase inflammation by cannabidiol prevents pain and nerve damage in rat osteoarthritis[J]. Pain，2017，158(12)：2442-2451. DOI：10.1097/j.pain.0000000000001052.

[7] STEGEN S，RINALDI G，LOOPMANS S，et al. Glutamine metabolism controls chondrocyte identity and function[J]. Dev Cell，2020，53(5)：530-544.e8. DOI：10.1016/j.devcel.2020.05.001.

[8] D'ADAMO S，CETRULLO S，GUIDOTTI S，et al. Spermidine rescues the deregulated autophagic response to oxidative stress of osteoarthritic chondrocytes[J]. Free Radic Biol Med，2020，153：159-172. DOI：10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.029.

[9] PENG YJ，LU JW，LEE CH，et al. Cardamonin attenuates inflammation and oxidative stress in interleukin-1β-stimulated osteoarthritis chondrocyte through the Nrf2 pathway[J]. Antioxidants (Basel)，2021，10(6)：862. DOI：10.3390/antiox10060862.

[10] SIMÃO M，LEONOR CANCELA M. Musculoskeletal complications associated with pathological iron toxicity and its molecular mechanisms[J]. Biochem Soc Trans，2021，49(2)：747-759. DOI：10.1042/BST20200672.

[11] MIAO Y，CHEN Y，XUE F，et al. Contribution of ferroptosis and GPX4's dual functions to osteoarthritis progression[J]. EBioMedicine，2022，76：103847. DOI：10.1016/j.ebiom.2022.103847.

[12] KOPPULA P，ZHUANG L，GAN B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer：ferroptosis，nutrient dependency，and cancer therapy[J]. Protein Cell，2021，12(8)：599-620. DOI：10.1007/s13238-020-00789-5.

（编辑　陈　姜）