

· 论 著 ·

槲皮素对小鼠胶原诱导性关节炎的影响

贾庆运^{1,2,4} 王拥军^{1,2,3,4} 梁倩倩^{1,2,4} 施杞^{1,2,4*}

1. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032
2. 上海中医药大学脊柱病研究所, 上海 200032
3. 上海中医药大学康复医学院, 上海 200120
4. 筋骨理论与治法教育部重点实验室, 上海 200120

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018) 09-1175-05

摘要: **目的** 探讨槲皮素对Ⅱ型胶原诱导性关节炎(CIA)小鼠关节炎的影响。**方法** 6-7 周龄的 DBA/1 J 小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, 对照组, 模型组, 甲氨喋呤组, 槲皮素组。除对照组外, 其余小鼠给予牛Ⅱ型胶原 + 完全弗氏佐剂进行 CIA 小鼠第一次免疫, 第 21 天给予牛Ⅱ型胶原 + 不完全弗氏佐剂进行加强免疫, 次日各组开始给药 30 天, 观察小鼠体重、关节炎指数、足掌厚度、关节病理变化指标。**结果** 与模型组相比, 槲皮素可显著改善 CIA 小鼠关节炎指数、足掌肿胀, 对 CIA 小鼠体重无明显影响, 可显著改善 CIA 小鼠踝关节的病理表现, 减轻踝关节的骨破坏。**结论** 槲皮素可有效的减轻 CIA 小鼠关节滑膜炎, 减轻关节骨破坏, 槲皮素是治疗类风湿性关节炎的潜在有效药物。

关键词: 槲皮素; 类风湿关节炎; CIA 小鼠; 炎症

Effect of quercetin on collagen-induced rheumatoid arthritis in mice

JIA Qingyun^{1,2,4}, WANG Yongjun^{1,2,3,4}, LIANG Qianqian^{1,2,4}, SHI Qi^{1,2,4*}

1. Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China
2. Institute of Spine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China
3. School of Rehabilitation Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200120, China
4. Key Laboratory of Physique Theory and therapy, Shanghai 200120, China

* Corresponding author: SHI Qi, Email: shiqish@hotmail.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of quercetin on joint inflammation in type II collagen-induced arthritis (CIA) in mice. **Methods** DBA/1 J mice aged 6-7 weeks were randomly divided into 4 groups, control group, model group, methotrexate group, and quercetin group, with 10 mice in each group. Except the mice in the control group, mice in other groups received the first immunization of bovine type II collagen and complete Freund's adjuvant. The bovine type II collagen and incomplete Freund's adjuvant was boosted on the 21st day. The mice in each group received corresponding drugs from the next day and lasted for 30 days. The body weight, arthritis index, paw thickness, and pathological changes of the joint were observed. **Results** Compared with the model group, quercetin significantly relieved the arthritis index and paw swelling of CIA mice, but had no significant effect on body weight of CIA mice. It significantly relieved the pathological performance of ankle joints in CIA mice and reduced the bone destruction of the ankle joints. **Conclusion** Quercetin effectively reduces synovial inflammation in CIA mice and reduces bone destruction. Quercetin is a potential drug for rheumatoid arthritis.

Key words: quercetin; rheumatoid arthritis; CIA mice; inflammation

胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 是最常用的类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的动物模型, 其在临床症状和病理表

现方面与类风湿性关节炎极为相似或相同 (诸如关节滑膜增生、关节畸形和软骨破坏等), 因此, CIA 是研究 RA 较为理想和常用的动物模型^[1, 2]。槲皮素 (Quercetin) 是一种广泛存在于自然界的黄酮类化合物, 具有抗炎、抗氧化、抗凋亡、清除氧自由基以及免疫调节等活性。临床研究表明, 槲皮素对缓

基金项目: 国家自然科学基金重大国际合作项目 (81220108027); 国家自然科学基金重点项目 (81330085)

* 通信作者: 施杞, Email: shiqish@hotmail.com

解膝关节骨性关节炎、类风湿性关节炎、运动后机体疼痛具有良好的作用^[3-7]。本研究以胶原诱导性关节炎小鼠为 RA 模型,通过观察槲皮素对 CIA 小鼠的改善情况,进一步为临床应用本方提供新的实验的依据。

1 试验材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 DBA/1 J 小鼠,40 只,6~7 周龄,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于上海中医药大学实验动物中心。

1.2 试剂及药物

槲皮素(Quercetin)购成都普菲德生物技术有限公司纯度>98%(批号:JOT-10049),牛Ⅱ型胶原(Bovine type II collagen)(Chondrex Inc),完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant)(Chondrex Inc),不完全弗氏佐剂(incomplete Freund's adjuvant)(Chondrex Inc),甲氨蝶呤(上海东方药品科技实业有限公司)。

1.3 仪器

电子天平,游标卡尺,OLYMPUS BX50 显微镜,制冰机等。

2 方法

2.1 药物制备

槲皮素 200 mg 溶于 40 mL 的 5% CMC-Na 制成混悬液,浓度 50 mg/mL 甲氨蝶呤 3 mg 溶解于 30 mL 生理盐水中,制成甲氨蝶呤溶液,浓度为 0.1 mg/mL。查阅相关文献确定槲皮素小鼠给药浓度为 50 mg/kg·d 灌胃,甲氨蝶呤给药浓度为 0.5 mg/kg,每 3 天 1 次腹腔注射。

2.2 CIA 小鼠模型的建立

6~7 周龄 40 只的 DBA/1 J 小鼠适应性喂养 1 周,运用 SPSS 软件进行随机分为对照组、模型组、甲氨蝶呤组和槲皮素组,每组 10 只,除 10 只正常对照组外,其余 30 只小鼠进行 CIA 造模。将 10 mg 牛Ⅱ型胶原溶于 0.01 mmol/L 的醋酸溶液 5 mL,4℃ 摇床过夜,取 5 mL 含 2 mg/mL 的完全弗氏佐剂等体积混合,20 mL 注射器连接装置 4℃ 来回抽吸 2000 次充分乳化,制得抗原乳剂,并置 4℃ 冰箱保存备用。首次免疫于小鼠尾根部皮下注射Ⅱ型胶原乳剂 0.1 mL,造模第 21 天取 0.1 mL Ⅱ型胶原和不完全弗氏佐剂混合的乳剂进行加强免疫 1 次;正常组同法注射等体积生理盐水。

2.3 动物分组给药

二次免疫后第 1 天开始给药,槲皮素组给予 0.2 mL 混悬液灌胃,甲氨蝶呤组给予 0.1 mL 甲氨蝶呤溶液腹腔注射,每 3 天 1 次,正常对照组和模型组给予 0.2 mL 生理盐水灌胃,各组连续给药 30 天。

2.4 指标检测

体重:小鼠于造模第 0、5、10、15、20、35、40、45、50 天测体重。关节炎指数:小鼠给药后第 0、5、10、15、20、25、30 天给予关节炎指数评分,评分标准^[8,9] 0 分:没有明显的关节红肿;1 分:踝关节或趾关节轻度红肿;2 分:从趾关节到踝关节轻度红肿;3 分:从趾关节到踝关节中度红肿;4 分:严重的踝关节到整个足掌的红肿,每只小鼠最高评分 16 分。足掌厚度:小鼠给药后第 0、5、10、15、20、25、30 天给予选取肿胀的足掌给予测肿胀的厚度,用游标卡尺选取肿胀最甚处测量,单位为 mm。受累足掌数:小鼠给药后第 0、5、10、15、20、25、30 天给予记录小鼠受累足掌数,每只小鼠最高评分 4 分。病理学评分:给药第 30 天后给予小鼠处死,取小鼠踝关节多聚甲醛固定,24 h 后给予 EDTA 脱钙、石蜡包埋、切片、HE 病理学染色。显微镜下观察各组小鼠关节滑膜增生、炎性细胞浸润、血管翳形成、软骨和骨侵蚀方面行病理学评分,按正常和轻、中、重度异常分别计 0~3 分,评分标准^[10] 0 分:正常滑膜组织;1 分:滑膜增生,炎性细胞浸润;2 分:血管翳形成,软骨侵蚀;3 分:软骨破坏伴软骨下骨侵蚀。

2.5 统计学方法

统计结果采用均数±标准差进行描述,应用 SPSS 17.0 统计软件,进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 槲皮素对 CIA 小鼠体重的影响

与正常对照组相比,各造模组小鼠体重均有不同程度的降低,治疗后各组体重均较模型组降低减少,各组间体重差异无统计学意义($P > 0.05$)。(图 1)

3.2 槲皮素对 CIA 小鼠关节炎指数的影响

二次免疫后第 2 天开始,模型组小鼠开始炎症反应期,前后足踝关节开始红肿,关节炎指数明显增加,治疗 30 天后,与模型组相比槲皮素组和甲氨蝶呤组显著降低小鼠关节炎指数,差异有统计学意义(槲皮素组与模型组比较 $^*P < 0.05$,甲氨蝶呤组与模型组比较 $^*P < 0.05$)。(图 2)

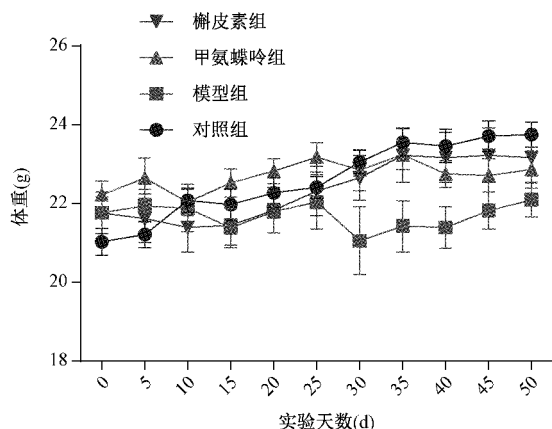


图 1 槲皮素对 CIA 小鼠体重的影响

Fig. 1 Effect of quercetin on body weight in CIA mice

3.3 槲皮素对 CIA 小鼠足掌肿胀厚度的影响

造模 20 天后,与对照组相比各模型组小鼠出现不同程度足掌肿胀,治疗后 30 天后,与模型组相比槲皮素组和甲氨蝶呤组显著降低小鼠足掌的肿胀厚度,差异有统计学意义(槲皮素组与模型组比较 $*P < 0.05$,甲氨蝶呤组与模型组比较 $^{\#}P < 0.05$)。(图 3)

3.4 槲皮素对 CIA 小鼠踝关节病理学形态及病理学评分的影响

治疗后 30 天后,小鼠踝关节常规取材、脱水、包埋、切片、HE 染色,正常组小鼠的踝关节病理切片显示关节间隙正常清晰,软骨表面光滑,无明显的滑

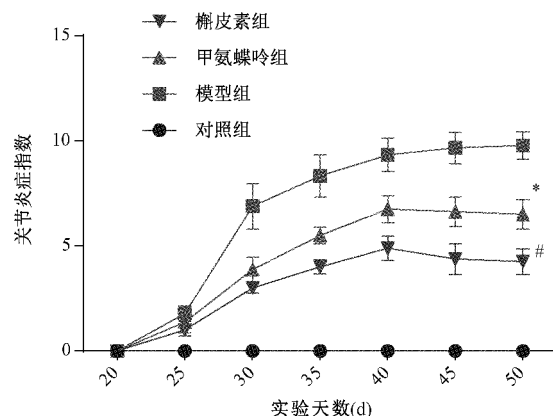


图 2 槲皮素对 CIA 小鼠关节炎指数影响

Fig. 2 Effect of quercetin on the arthritis index in CIA mice

膜增生及炎症细胞的浸润,模型组小鼠踝关节显示大量炎症细胞的浸润和滑膜的增生、关节软骨和骨的破坏,与模型组相比槲皮素组和甲氨蝶呤组踝关节炎炎症细胞的浸润和滑膜增生、关节软骨和骨的破坏明显减轻,病理评分明显降低,与模型组相比差异有统计学意义(槲皮素组与模型组比较 $*P < 0.05$,甲氨蝶呤组与模型组比较 $^{\#}P < 0.05$)。(图 4)

4 讨论

槲皮素是人类饮食中最主要的生物类黄酮类化合物,广泛存在于植物的花、叶、果实中^[11, 12]。槲皮素具有抗炎、抗氧化、免疫调节等作用^[13-17],相关研

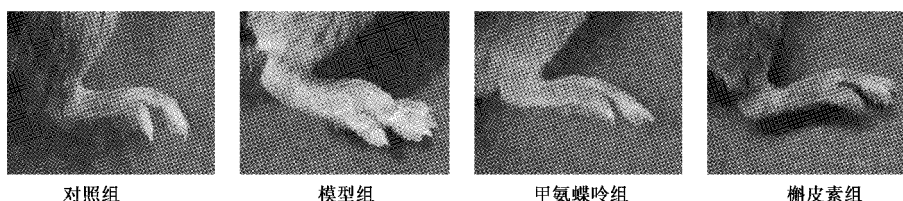
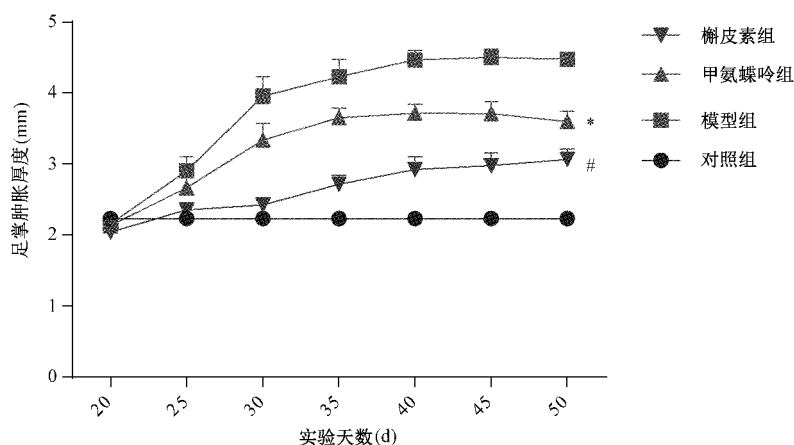


图 3 槲皮素对 CIA 小鼠足掌肿胀厚度的影响

Fig. 3 Effect of quercetin on paw swelling of CIA mice

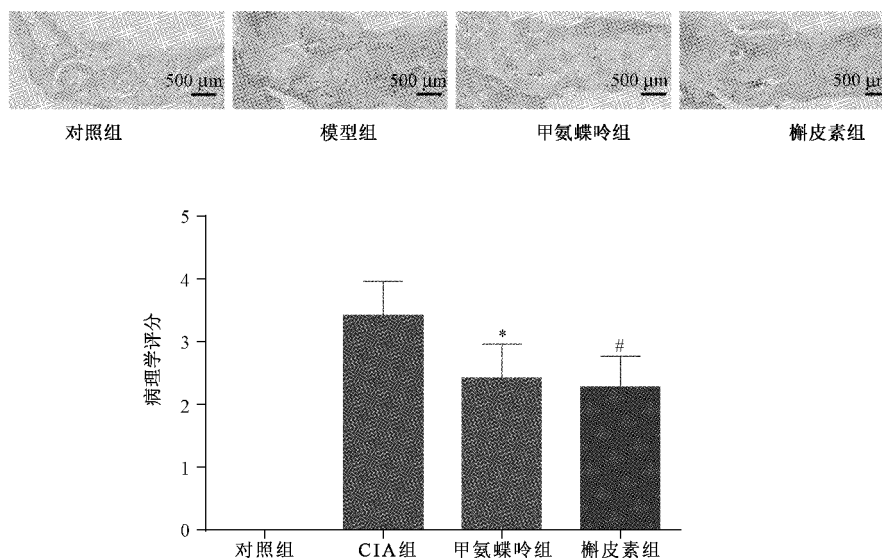


图 4 槲皮素对 CIA 小鼠踝关节病理学形态及病理学评分的影响

Fig. 4 Effect of quercetin on pathological morphology and pathological score

研究表明槲皮素可有效减轻免疫细胞炎症因子的分泌的作用^[18-21],这种抑制作用可能和槲皮素因抑制核转录因子 NF- κ B 的生物活性相关^[22]。相关临床观察性研究表明,槲皮素对疼痛类疾病的缓解具有良好的作用,对于骨性关节炎、类风湿性关节炎的疼痛的缓解同样效果良好^[4, 5, 23-30]。

胶原诱导性关节炎小鼠模型 (CIA 模型) 是目前应用较广泛和成熟的动物实验模型,其在外在体征、发病机制、病理改变及实验室指标等方面与人类类风湿性关节炎 (RA) 相似,是目前最适合用于研究人类 RA 的动物模型。本研究通过 CIA 小鼠模型模拟 RA 疾病的发生发展过程,观察槲皮素对于 CIA 小鼠模型的作用,结果显示槲皮素可有效的减轻 CIA 小鼠的关节炎症,减轻关节炎指数、足掌的肿胀厚度,同时可有效的减轻 CIA 小鼠关节的病理表现,减轻关节滑膜的增生、炎性细胞浸润、血管翳形成、软骨和骨侵蚀。

综上所述,槲皮素可有效的减轻 CIA 小鼠的肿胀厚度,降低关节炎指数,减轻关节的破坏从而发挥其抗炎作用,槲皮素是治疗类风湿性关节炎的潜在有效药物。

【参 考 文 献】

[1] Cho YG, Cho ML, Min SY, et al. Type ii collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis [J]. *Autoimmun Rev*, 2007, 7(1): 65-70.
[2] Hegen M, Keith JC, Jr., Collins M, et al. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid

arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67(11): 1505-15.
[3] Pasley J, Singhal A, Bigelman K, et al. Short-duration quercetin supplementation does not decrease pain intensity associated with high-intensity cycling in untrained men [J]. *Journal of Pain*, 2009, 10(4): S38.
[4] Kanzaki N, Ono Y, Shibata H, et al. Glucosamine-containing supplement improves locomotor functions in subjects with knee pain: A randomized, double-blind, placebo-controlled study [J]. *Clin Interv Aging*, 2015, 10: 1743-53.
[5] Kanzaki N, Otsuka Y, Izumo T, et al. Glucosamine-containing supplement improves locomotor functions in subjects with knee pain - a pilot study of gait analysis [J]. *Clin Interv Aging*, 2016, 11: 835-41.
[6] Serban MC, Sahebkar A, Zanchetti A, et al. Effects of quercetin on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(7).
[7] Javadi F, Ahmadzadeh A, Eghtesadi S, et al. The effect of quercetin on inflammatory factors and clinical symptoms in women with rheumatoid arthritis: A double-blind, randomized controlled trial [J]. *J Am Coll Nutr*, 2017, 36(1): 9-15.
[8] Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(5): 1269-75.
[9] Rosloniec EF, Cremer M, Kang AH, et al. Collagen-induced arthritis [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2010, 15(5): 1-25.
[10] Williams R O. Collagen-induced arthritis in mice [J]. *Methods Mol Med*, 2007, 136: 191-9.
[11] Garcia-Mateos R, Aguilar-Santelises L, Soto-Hernandez M, et al. Flavonoids and antioxidant activity of flowers of mexican crataegus spp [J]. *Nat Prod Res*, 2013, 27(9): 834-6.
[12] Harnly J M, Doherty R F, Beecher C R, et al. Flavonoid content of u. S. Fruits, vegetables, and nuts [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(26): 9966-77.

- [13] Alam M M, Meerza D, Naseem I. Protective effect of quercetin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice [J]. Life Sci, 2014, 109 (1): 8-14.
- [14] McAnulty L S, Miller L E, Hosick P A, et al. Effect of resveratrol and quercetin supplementation on redox status and inflammation after exercise [J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2013, 38(7): 760-5.
- [15] Boots A W, Wilms L C, Swennen E L, et al. In vitro and ex vivo anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers [J]. Nutrition, 2008, 24(7-8): 703-10.
- [16] 蒋飞, 范红, 张永刚, 等. 槲皮素对 Ips 刺激肺上皮细胞核转录因子 $\text{nf-}\kappa\text{b}$ 表达的影响 [J]. 四川医学, 2007, (7): 687-688.
- [17] 曾红兵, 王成美. 槲皮素对力竭运动后体内脂质过氧化物和抗氧化酶的影响 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36 (10): 3985-3991.
- [18] Yu ES, Min HJ, An SY, et al. Regulatory mechanisms of il-2 and $\text{ifn}\gamma$ suppression by quercetin in t helper cells [J]. Biochem Pharmacol, 2008, 76(1): 70-8.
- [19] 许银凤, 叶云, 孙琴, 等. 槲皮素对 Ips 刺激的小胶质细胞炎症因子的下调作用 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, (3): 1173-1179.
- [20] 倪湾, 李敬双, 于洋. 洋葱槲皮素对脂多糖诱导的小鼠腹腔巨噬细胞炎症反应抑制作用 [J]. 食品工业科技, 2017, 38 (23): 284-288.
- [21] 刘俊. 槲皮素对兔骨关节炎模型关节液中 $\text{il-1}\beta$ 、 $\text{tnf}\alpha$ 水平的影响 [D]. 桂林医学院, 2017.
- [22] Nair MP, Mahajan S, Reynolds JL, et al. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor α) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the nf-kappa beta system [J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(3): 319-28.
- [23] Torella M, Del Deo F, Grimaldi A, et al. Efficacy of an orally administered combination of hyaluronic acid, chondroitin sulfate, curcumin and quercetin for the prevention of recurrent urinary tract infections in postmenopausal women [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2016, 207: 125-128.
- [24] Fang JH, Zhang SH, Yu XM, et al. Effects of quercetin and melatonin in pregnant and gestational diabetic women [J]. Latin American Journal of Pharmacy, 2016, 35(6): 1420-1425.
- [25] Butov D, Zaitseva S, Butova T. Efficacy and safety of quercetin and polyvinylpyrrolidone in treatment of patients with newly diagnosed destructive pulmonary tuberculosis in comparison with standard antimycobacterial therapy [J]. Int J Mycobacteriol, 2016, 5(1): S110-S111.
- [26] Amirchaghmaghi M, Delavarian Z, Iranshahi M, et al. A randomized placebo-controlled double blind clinical trial of quercetin for treatment of oral lichen planus [J]. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects, 2015, 9(1): 23-8.
- [27] O'Fallon KS, Kaushik D, Michniak-Kohn B, et al. Effects of quercetin supplementation on markers of muscle damage and inflammation after eccentric exercise [J]. Int J Sport Nutr Exerc Metab, 2012, 22(6): 430-7.
- [28] Kanzaki N, Saito K, Maeda A, et al. Effect of a dietary supplement containing glucosamine hydrochloride, chondroitin sulfate and quercetin glycosides on symptomatic knee osteoarthritis: A randomized, double-blind, placebo-controlled study [J]. J Sci Food Agric, 2012, 92(4): 862-9.
- [29] Kressler J, Millard-Stafford M, Warren GL. Quercetin and endurance exercise capacity: A systematic review and meta-analysis [J]. Med Sci Sports Exerc, 2011, 43(12): 2396-404.
- [30] Matsuno H, Nakamura H, Katayama K, et al. Effects of an oral administration of glucosamine-chondroitin-quercetin glucoside on the synovial fluid properties in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73 (2): 288-92.

(收稿日期: 2018-03-17; 修回日期: 2018-04-10)