

· 论著 ·

槲皮素对人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞炎症因子和基质金属蛋白酶的表达的影响

贾庆运^{1,2,3,4} 王拥军^{1,2,4,5} 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.山东省日照市中医医院,山东 日照 276800

4.筋骨理论与治法教育部重点实验室,上海 200120

5.上海中医药大学康复医学院,上海 200120

中图分类号: R684.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 06-0738-04

摘要: **目的** 探讨槲皮素对类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞(MH7A)炎症因子和基质金属蛋白酶的表达的影响及可能机制。**方法** 选用类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞(MH7A)为研究对象,TNF- α 诱导MH7A细胞,用不同浓度的槲皮素干预,RT-PCR法检测对IL-1 β 、IL-6、IL-8、MMP-1、MMP-3、MMP-13的变化影响,Western blot法检测对NF- κ B的影响。**结果** 槲皮素浓度依赖性地降低TNF- α 诱导的MH7A细胞IL-1 β 、IL-6、IL-8、MMP-1、MMP-3、MMP-13的表达,对TNF- α 诱导的MH7A细胞NF- κ B的磷酸化有明显的抑制作用。**结论** 槲皮素可有效地减轻类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞炎症因子及基质金属蛋白酶的表达,其机制可能和抑制NF- κ B的表达相关,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;类风湿性关节炎;MH7A细胞;炎症因子;基质金属蛋白酶

Effect of quercetin on the expression of inflammatory factors and matrix metalloproteinases in fibroblast-like synoviocytes of human rheumatoid arthritisJIA Qingyun^{1,2,3,4}, WANG Yongjun^{1,2,4,5}, LIANG Qianqian^{1,2,4}, SHI Qi^{1,2,4*}

1.Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032

2.Institute of Spine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032

3.Shandong Rizhao Traditional Chinese Medicine Hospital, Rizhao 276800

4.Key Laboratory of Physique Theory and Therapy, Shanghai 200120

5.School of Rehabilitation Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200120, China

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

Abstract: **Objective** To investigate the effect of quercetin on the expression of inflammatory factors and matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and its possible mechanism. **Methods** Human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (MH7A) were the research object, and MH7A were induced by TNF- α , with different concentrations of quercetin. RT-PCR method was used to detect the changes of IL-1, IL-6, IL-8, MMP-1, MMP-3 and MMP-13. NF-kappa B signaling was detected by Western blot. **Results** Quercetin concentration dependently reduced the expression of IL-1 beta, IL-6, IL-8, MMP-1, MMP-3 and MMP-13 in MH7A cells induced by TNF- α , and significantly inhibited the phosphorylation of NF- κ B induced by TNF- α in MH7A cells. **Conclusion** Quercetin can effectively reduce the expression of inflammatory factors and matrix metalloproteinases in fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis, and its mechanism may be related to the inhibition of NF- κ B expression. Quercetin is a potentially effective drug for the treatment of rheumatoid arthritis.

Key words: quercetin; rheumatoid arthritis; MH7A cells; inflammatory factors; matrix metalloproteinases

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

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是以对称性多关节滑膜炎为主要表现的慢性、进行性、系统性自身免疫疾病^[1]。RA 的主要病理特征为滑膜细胞的增生、炎性细胞的浸润,血管翳形成以及由此引发的关节软骨、骨的破坏,因此,控制 RA 滑膜细胞炎症因子及基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 分泌是治疗 RA 的关键^[2-3]。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,槲皮素对缓解膝关节骨性关节炎、类风湿性关节、运动后机体疼痛具有良好的作用^[4-8]。因此,本研究通过观察槲皮素对类风湿性关节炎滑膜细胞的影响,探讨槲皮素治疗类风湿性关节炎的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞:类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞 (MH7A) 由中国科学院深圳先进技术研究院张鹏研究员课题组所赠与,细胞来源日本理化研究所细胞 (Tsukuba, Japan)。

1.1.2 试剂及药物:槲皮素购成都普菲德生物技术有限公司 (纯度 >98%), 1640 培养基 (HyClone), 胎牛血清 (fetal bovineserum, FBS) (Gibco), TNF- α (Pepro TECH), CCK-8 试剂盒 (Dojindo), PCR 引物 (华大基因), RNA 提取试剂盒 (Qiagen), RNA 逆转录试剂盒 (TAKARA 公司), 电泳液、转膜液 (碧云天)。

1.1.3 仪器:超净台、荧光定量 PCR 仪、酶标仪、细胞培养箱、显微镜等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:MH7A 细胞培养于含有 10% FBS 的 1640 培养基中, 37 °C、5% CO₂、湿度为 100% 的恒温培养箱中培养, 每 3 d 传代, 实验选择对数生长长期的细胞进行。

1.2.2 实验方法:(1) CCK-8 法检测药物对细胞毒性。CCK-8 法检测药物对细胞的毒性, MH7A 细胞按照 4×10^4 密度接种于 96 孔板, 不同浓度的槲皮素处理细胞 0、24、48、72 h, 每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 试剂, 将 96 孔板放置于 37 °C、5% CO₂、湿度为 100% 的恒温培养箱中培养 1.5 h, 酶标仪 450 nm、630 nm 处测定其吸光度。(2) RT-PCR 法检测炎症因子。将 MH7A 细胞系以 1×10^6 密度接种于含有 2 mL 的 1640 完全培养基的 6 孔板中, 将 6 孔板放置于 37 °C、5% CO₂、湿度为 100% 的恒温培养箱中培养 24 h 后, 50、100 nmol/L 的槲皮素预处理 MH7A 细胞 2 h, 加入 TNF- α (10 ng/mL) 刺激 MH7A 细胞 24 h, Trizol 法提取细胞总 RNA, Takara 试剂盒反转成 cDNA, RT-PCR 法检测 IL-1 β 、IL-6、IL-8、MMP-1、MMP-3、MMP-13 的表达。引物序列见表 1。(3) Western blot 法检测对 NF- κ B 的影响。将 MH7A 细胞系以 1×10^6 密度接种于含有 2 mL 的 1640 完全培养基的 6 孔板中, 将 6 孔板放置于 37 °C、5% CO₂、湿度为 100% 的恒温培养箱中培养 48 h 后, 50、100 nmol/L 的槲皮素预处理 MH7A 细胞 2 h, 加入 TNF- α (10 ng/mL) 刺激 MH7A 细胞 30 min, 细胞蛋白裂解液 (RIPA) 提取总蛋白, BCA 法测蛋白含量, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 转移至 PVDF 膜上, 5% BSA 封闭 2 h, 加入一抗室温孵育 2 h, 洗膜 15 min, 二抗室温孵育 1.5 h, 洗膜 15 min, HRP 化学发光显色、拍照。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	上游引物	下游引物
IL-1 β	CCTGTCCTGCGTGTGAA AGA	GGGAAGTGGGAGACTCAAA
IL-6	CCTGACCCAACCAAAATGC	ATCTGAGGTGCCCATGCTAC
IL-8	GCTCCAGTTCCTCCCAAGGAC	TTCCTTCGGCTCCAGACAGA
MMP-1	CTCAATTTCACCTCTGTTTCTG	CATCTCTGTCGGCAAATTCGT
MMP-3	GGCTTCAGTACCTTCCCAGG	GCAGCAACCAGGAATAGGTT
MMP-13	CAAGATGCGGGGTTCTCTGAT	AATGCCATCGTGAAGTCTGGT
GAPDH	GGA CTCCTACTGGCCTCTT	AGGCTCTGTCATCTCTCAT

1.3 统计学分析

统计结果采用均数 $\pm$ 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, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素对 MH7A 细胞毒性的影响

用含槲皮素浓度分别为 0、25、50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$ 、0.2% DMSO 的 1640 完全培养基培养 MH7A 细胞 24、48、72 h 后,用 CCK-8 法测定其对细胞毒性的影响。结果显示(图 1),槲皮素浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 以下时,实验组之间以及跟 DMSO 组相比,无明显细胞毒性。因此,笔者认为槲皮素在 100 $\mu\text{mol/L}$ 以下时,对 MH7A 细胞系无显著细胞毒性作用。

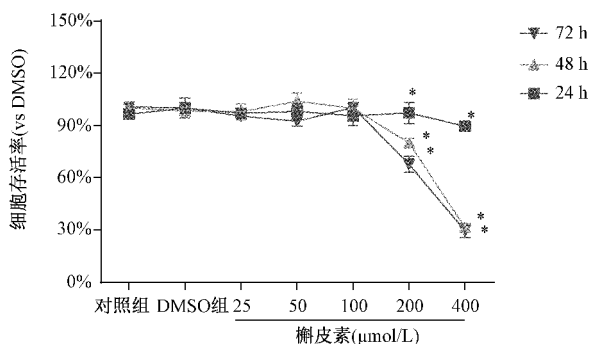


图 1 槲皮素对 MH7A 细胞毒性的影响

Fig.1 Effect of quercetin on cytotoxicity of MH7A

2.2 槲皮素对 TNF- α 诱导 MH7A 细胞炎症因子及 MMPs 的影响

MH7A 细胞系在经过 (50、100 $\mu\text{mol/L}$) 槲皮素预处理 2 h 后,使用 10 ng/mL 的 TNF- α 进行刺激 24 h,提取细胞 RNA,用 RT-PCR 法进行检测炎症因子及 MMPs 的变化。结果显示(图 2),槲皮素能够显著降低 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 MMP-1、MMP-3、MMP-13 表达,并呈剂量依赖的特点。

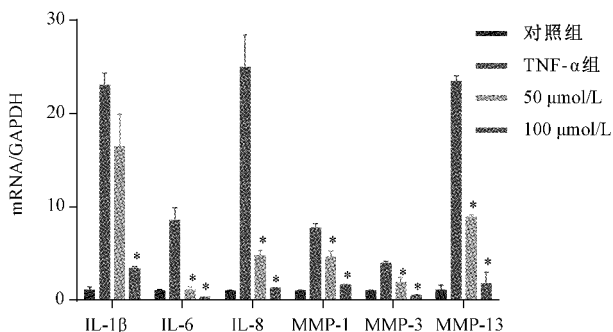


图 2 槲皮素对 MH7A 细胞炎症因子及 MMPs 的影响

Fig.2 Effects of quercetin on inflammatory factors and MMPs in MH7A cells

2.3 槲皮素对 TNF- α 诱导 MH7A 细胞 NF- κ B 的影响

MH7A 细胞系在经过 (50、100 $\mu\text{mol/L}$) 槲皮素预处理 2 h 后,使用 10 ng/mL 的 TNF- α 进行刺激 30 min,提取细胞总蛋白,用 Western blot 法进行检测磷酸化 NF- κ B p65 的变化。结果显示(图 3),槲皮素能够抑制 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞 NF- κ B p65 磷酸化表达,并呈剂量依赖的特点。

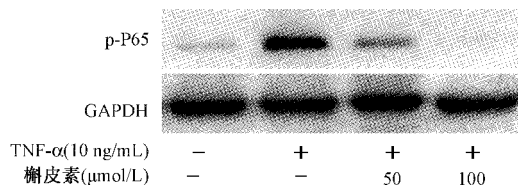


图 3 槲皮素对 MH7A 细胞 NF- κ B p65 磷酸化的影响

Fig.3 Effect of quercetin on phosphorylation of NF-kappa B p65 in MH7A cells

3 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^[9-10]。槲皮素具有抗炎、抗氧化、免疫调节等作用^[11-13],相关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^[14],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^[15]。相关临床研究表明,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^[5-6,16-23]。

滑膜细胞在类风湿关节炎的发生发展中扮演着重要角色^[2]。滑膜细胞可释放多种炎症因子^[24-25](IL-1 β 、IL-6、IL-8),在 RA 的发病过程中起着关键作用,因此抑制滑膜细胞的炎症因子释放,可对 RA 的起到治疗作用。MMPs 是可降解细胞外基质的锌依赖性内肽酶,MMPs 可降解关节骨与软骨中的胶原、蛋白多糖及其他的机制大分子,促进血管翳对软骨的侵袭。滑膜细胞来源的 MMPs 是导致关节病理损伤的重要因素之一^[26-27],因此,抑制 MMPs 的产生,可有效减轻 RA 关节软骨及软骨下骨破坏,延缓骨质破坏的进程。本研究发现槲皮素可有效降低 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 MMP-1、MMP-3、MMP-13 的表达,同时槲皮素可有效降低 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞 NF- κ B p65 磷酸化表达,因此,推断槲皮素抑制 MH7A 细胞炎

症因子和 MMPs 的表达可能和抑制 NF- κ B p65 磷酸化表达相关。

综上所述,槲皮素可有效抑制 TNF- α 诱导 MH7A 细胞炎症因子、MMPs 的表达和 NF- κ B p65 磷酸化,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] Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2016, 388(10055): 2023-2038.
- [2] Bustamante MF, Garcia-Carbonell R, Whisenant KD, et al. Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(1): 110.
- [3] Neumann E, Lefèvre S, Zimmermann B, et al. Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts [J]. *Trends Mol Med*, 2010, 16(10): 458-468.
- [4] Cureton KJ, Tomporowski PD, Singhal A, et al. Short-duration quercetin supplementation does not decrease pain intensity associated with high-intensity cycling in untrained men [J]. *J Appl Physiol*, 2009, 107(4): 1095-1104.
- [5] 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: 1743-1753.
- [6] 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: 835-841.
- [7] 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): e002713.
- [8] 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.
- [9] García-Mateos R, Aguilar-Santelises L, Soto-Hernández M, et al. Flavonoids and antioxidant activity of flowers of Mexican *Crataegus* spp [J]. *Nat Prod Res*, 2013, 27(9): 834-836.
- [10] Harnly JM, Doherty RF, Beecher GR, et al. Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(26): 9966-9977.
- [11] Alam MM, 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.
- [12] McNulty LS, Miller LE, Hosick PA, et al. Effect of resveratrol and quercetin supplementation on redox status and inflammation after exercise [J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2013, 38(7): 760-765.
- [13] Boots AW, Wilms LC, Swennen EL, et al. In vitro and ex vivo anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers [J]. *Nutrition*, 2008, 24(7-8): 703-710.
- [14] Yu ES, Min HJ, An SY, et al. Regulatory mechanisms of IL-2 and IFN γ suppression by quercetin in T helper cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(1): 70-78.
- [15] Nair MP, Mahajan S, Reynolds JL, et al. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF-kappa beta system [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13(3): 319-328.
- [16] 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.
- [17] Fang JH, Zhang SH, Yu XM. Effects of quercetin and melatonin in pregnant and gestational diabetic women [J]. *Latin Am J Pharmacy*, 2016, 35(6): 1420-1425.
- [18] 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(Suppl 1): 110-111.
- [19] 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): 23-28.
- [20] 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): 430-437.
- [21] 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): 862-869.
- [22] 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): 2396-2404.
- [23] 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): 288-292.
- [24] Das T, Mukherjee S, Chaudhuri K. Effect of quercetin on *Vibrio cholerae* induced nuclear factor-kappaB activation and interleukin-8 expression in intestinal epithelial cells [J]. *Microbes Infect*, 2012, 14(9): 690-695.
- [25] Sung MS, Lee EG, Jeon HS, et al. Quercetin inhibits IL-1 β -induced proliferation and production of MMPs, COX-2, and PGE2 by rheumatoid synovial fibroblast [J]. *Inflammation*, 2012, 35(4): 1585-1594.
- [26] Vincenti MP, Coon CI, Brinckerhoff CE, Brinckerhoff. Nuclear factor kappaB/p50 activates an element in the distal matrix metalloproteinase 1 promoter in interleukin-1 β -stimulated synovial fibroblasts [J]. *Arthritis Rheum*, 1998, 41(11): 1987-1994.
- [27] Kontinen YT, Ainola M, Valleala H, et al. Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 1999, 58(11): 691-697.

(收稿日期: 2018-03-29; 修回日期: 2018-06-23)