

槲皮素通过激活自噬对LPS诱导的软骨细胞基质代谢及炎症的影响

徐斌¹, 李盛华^{2*}, 周明旺^{2*}, 王晓萍², 王雷¹, 张纪平¹

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃省中医院, 兰州 730050)

[摘要] 目的:从细胞自噬角度探讨槲皮素调控膝骨关节炎(KOA)软骨细胞外基质代谢及炎症反应的作用机制。方法:提取软骨细胞、传代培养,及用Ⅱ型胶原蛋白(Collagen Ⅱ)免疫荧光染色鉴定原代细胞;将脂多糖(LPS)诱导的软骨细胞分为空白组(不做任何处理)、模型组(10 mg·L⁻¹ LPS处理48 h)、槲皮素低、中、高剂量组(10 mg·L⁻¹ LPS处理48 h+50、100、150 mmol·L⁻¹槲皮素处理24 h)。细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测LPS(2.5、5、7.5、10、12.5 mg·L⁻¹)对软骨细胞不同时间(24、48、72 h)增殖的抑制作用;槲皮素(50、100、150、200 mmol·L⁻¹)对LPS诱导的软骨细胞不同时间(12、24、48 h)增殖的影响;蛋白免疫印迹法(Western blot, WB)检测微管相关蛋白1轻链3Ⅱ(LC3Ⅱ)和泛素结合蛋白p62(p62)蛋白表达。用3-甲基腺嘌呤(3-MA)干预LPS诱导的软骨细胞,分为空白组(不做任何处理)、模型组(10 mg·L⁻¹ LPS)、槲皮素组(模型组+100 mmol·L⁻¹槲皮素)、3-MA组(模型组+100 μmol·L⁻¹ 3-MA)、3-MA+槲皮素组(模型组+100 μmol·L⁻¹ 3-MA+100 mmol·L⁻¹槲皮素),先用LPS处理48 h后,3-MA处理2 h,再用槲皮素干预24 h。酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量;WB检测基质金属蛋白酶-13(MMP-13)、金属蛋白酶组织抑制因子1(TIMP1)蛋白表达。结果:Collagen Ⅱ免疫荧光鉴定结果显示,所提取的细胞符合软骨细胞特征;CCK-8法筛选LPS最佳造模质量浓度为10 mg·L⁻¹、48 h,槲皮素最佳浓度为100 mmol·L⁻¹、24 h;WB结果显示,与空白组比较,模型组LC3Ⅱ表达显著降低($P<0.01$),p62表达显著升高($P<0.01$),与模型组比较,槲皮素低、中、高剂量组LC3Ⅱ表达显著升高($P<0.01$),其槲皮素中剂量组最显著,p62表达显著降低($P<0.01$),其槲皮素中剂量组最显著;与空白组比较,模型组MMP-13表达明显升高($P<0.05$),TIMP1表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,槲皮素组、3-MA+槲皮素组MMP-13表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),其中槲皮素组最显著,TIMP1表达显著升高($P<0.01$),其中槲皮素组最显著。倒置显微镜下观察软骨细胞形态学改变结果显示,槲皮素可恢复受损的软骨细胞形态;CCK-8检测各组细胞增殖结果显示,与空白组比较,模型组软骨细胞增殖明显被抑制($P<0.01$);与模型组比较,槲皮素组、3-MA+槲皮素组软骨细胞增殖显著升高($P<0.01$),其中槲皮素组最显著;ELISA检测结果显示,与空白组比较,模型组IL-1β、TNF-α含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,槲皮素组、3-MA+槲皮素组IL-1β、TNF-α含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),其中槲皮素组降低最显著。结论:槲皮素可促进LPS诱导的软骨细胞增殖,调控软骨细胞外基质合成与代谢平衡,抑制炎症反应,恢复软骨细胞功能,其机制可能与槲皮素激活细胞自噬有关。

[关键词] 槲皮素; 自噬; 软骨细胞; 脂多糖; 膝骨关节炎

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)14-0092-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221089

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220330.1146.002.html>

[网络出版日期] 2022-03-31 10:38

Effect of Quercetin on LPS-induced Chondrocyte Matrix Metabolism and Inflammation by Activating Autophagy

XU Bin¹, LI Shenghua^{2*}, ZHOU Mingwang^{2*}, WANG Xiaoping², WANG Lei¹, ZHANG Jiping¹

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

[收稿日期] 2021-12-29

[基金项目] 中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)岐黄学者项目(国中医药人教函[2018]284号);甘肃省科技计划项目(18JR2FA009)

[第一作者] 徐斌,在读博士,从事骨与关节疾病基础及临床研究,E-mail:xb2020123456@163.com

[通信作者] *李盛华,主任医师,博士生导师,从事骨与关节疾病基础及临床研究,E-mail:lshxb123@126.com;

*周明旺,博士,主任医师,从事骨与关节疾病基础及临床研究,E-mail:zmw2006@126.com

2. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of quercetin in regulating chondrocyte extracellular matrix metabolism and inflammatory response in knee osteoarthritis (KOA) from the perspective of autophagy. **Method:** Chondrocytes were extracted and cultured, and the primary cells were identified by immunofluorescence staining with collagen II. The chondrocytes induced by lipopolysaccharide (LPS) were divided into a control group (without any treatment), a model group (10 mg·L⁻¹ LPS treatment for 48 h), and low-, medium-, and high-dose quercetin group (10 mg·L⁻¹ LPS treatment for 48 h combined with 50, 100, and 150 mmol·L⁻¹ quercetin for 24 h). The inhibitory effects of LPS (2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 mg·L⁻¹) on the proliferation of chondrocytes for different periods (24, 48, 72 h) were detected by cell counting kit-8 (CCK-8). The effects of quercetin (50, 100, 150, 200 mmol·L⁻¹) on the LPS-induced proliferation of chondrocytes for different periods (12, 24, and 48 h) were investigated. The expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 II (LC3 II) and ubiquitin-binding protein p62 was detected by Western blot. LPS-induced chondrocytes were treated with 3-methyladenine (3-MA). The resultant cells were divided into a control group (without any treatment), a model group (10 mg·L⁻¹ LPS), a quercetin group (model group + 100 mmol·L⁻¹ quercetin), a 3-MA group (model group + 100 μmol·L⁻¹ 3-MA), and a 3-MA + quercetin group (model group + 100 μmol·L⁻¹ 3-MA + 100 mmol·L⁻¹ quercetin, specifically, LPS for 48 h, 3-MA for 2 h, and then quercetin for 24 h). The content of interleukin (IL)-1β and tumor necrosis factor (TNF)-α was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protein expression of matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) was detected by Western blot. **Result:** Collagen II immunofluorescence staining showed that the extracted cells were consistent with the characteristics of chondrocytes. As revealed by CCK-8, the optimum concentration of LPS was 10 mg·L⁻¹ with an action time of 48 h, and the optimum concentration of quercetin was 100 mmol·L⁻¹ with an action time of 24 h. Western blot results showed that compared with the control group, the model group showed decreased expression of LC3 II ($P<0.01$) and increased expression of p62 ($P<0.01$). The expression of LC3 II in the quercetin groups was higher than that in the control group ($P<0.01$), especially in the medium-dose quercetin group. The p62 expression in the quercetin groups was lower than that in the control group ($P<0.01$), especially in the medium-dose quercetin group. Compared with the control group, the model group showed increased expression of MMP-13 ($P<0.05$) and decreased expression of TIMP1 ($P<0.01$). Compared with the model group, the quercetin groups and the 3-MA + quercetin group showed decreased expression of MMP-13 ($P<0.05$, $P<0.01$), especially the quercetin groups, and increased expression of TIMP1 ($P<0.01$), especially the quercetin groups. Morphological changes in chondrocytes under the inverted microscope showed that quercetin could restore the morphology of damaged chondrocytes. CCK-8 showed that compared with the control group, the model group showed inhibited chondrocyte proliferation ($P<0.01$), and compared with the model group, the quercetin groups and the 3-MA + quercetin group showed promoted chondrocyte proliferation ($P<0.01$), especially the quercetin groups. ELISA results showed that IL-1β and TNF-α levels in the model group were higher than those in the control group ($P<0.01$), and the levels of IL-1β and TNF-α in the quercetin groups and the 3-MA + quercetin group were lower than those in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$), and the decrease in the quercetin groups was the most significant. **Conclusion:** Quercetin can promote LPS-induced chondrocyte proliferation, regulate chondrocyte extracellular matrix synthesis and metabolic balance, inhibit the inflammatory response, and restore chondrocyte function. The mechanism may be related to the activation of autophagy by quercetin.

[Keywords] quercetin; autophagy; chondrocytes; lipopolysaccharide; knee osteoarthritis

膝骨关节炎(KOA)与炎症及软骨细胞外基质合成与分解代谢失衡密切相关^[1-2]。软骨细胞自噬

活力的降低,使清除自身衰老、受损的细胞器及炎症因子等的能力下降,致软骨细胞功能受损及发生凋亡,进而发生炎症反应和细胞外基质(ECM)合成与分解代谢紊乱使软骨发生退变,最终导致KOA的发生发展^[3-5]。KOA临床多以疼痛、僵硬、功能障碍及肿胀为主要表现^[6]。目前治疗早中期KOA主要以对症治疗为主,包括药物治疗、物理疗法、功能锻炼等综合治疗措施,但这些治疗措施的效果存在争议,且非甾体类抗炎药物对人体不良反应较大,且只能缓解一时疼痛,无法阻止KOA的进展;KOA发展到晚期只能通过关节置换等手术治疗,但患者面临高昂的医疗费用、并发症比较多且严重、功能恢复不佳、人工关节寿命有限等诸多问题^[7-8]。中医药在该病治疗方面积累了十分丰富的经验,许多医家运用中药治疗KOA均取得了满意的疗效,且不良反应小,经济实惠^[9-12]。槲皮素属于天然黄酮类物质,具有抗炎、抗氧化等作用^[13-15],有研究表明,槲皮素具有抑制软骨细胞炎症反应和软骨细胞外基质降解的作用^[16-17],但其作用机制尚需深入研究。故本研究试图从软骨细胞自噬角度揭示槲皮素调控KOA软骨细胞ECM代谢及炎症的分子机制。

1 材料

1.1 细胞^[18] 原代细胞全部来自甘肃省中医院骨科行膝关节置换术的KOA患者的胫骨平台及股骨下端关节面,人工提取培养。提供软骨的患者共10人,其中男5人,女5人,年龄跨度在55~75岁。实验全程严格遵循甘肃省中医院伦理学规定(伦理号2020-135-01)并取得患者知情同意。

1.2 药品与试剂 槲皮素(美国Sigma公司,批号SLCC9071,纯度 $\geq 95\%$);脂多糖(LPS,北京索莱宝科技有限公司,批号L8880,纯度99%);3-甲基腺嘌呤(3-MA,北京索莱宝科技有限公司,批号IM0190,纯度97%);微管相关蛋白1轻链3 II(LC3 II)、泛素结合蛋白p62(p62)、基质金属蛋白酶-13(MMP-13)抗体、II型胶原蛋白(Collagen II)(美国Gene Tex公司,批号分别为GTX100829、GTX100685、GTX100665、GTX127375);金属蛋白酶组织抑制因子1(TIMPI)抗体、山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G-AF488、山羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(美国Immunoway公司,批号分别为YT4658、RS3211、S0001);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公司,批号分别为NN-0122H2、JS1beta-48);细胞增殖与活性检测试剂

盒(CCK-8,中国上海翊圣生物科技有限公司,批号40203ES0)。

1.3 仪器 JY600型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);Gen5型酶标仪(美国BioTek公司);ECLIPSE Ts2型荧光倒置显微镜(日本尼康公司);Centrifuge 5418 R型台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);ND5000型微量紫外可见光分光光度计(北京百泰克生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 人关节软骨细胞的提取、培养及传代 将术中取出的关节软骨收集在含磷酸盐缓冲液(PBS)的标本袋中,根据文献^[19]方法提取人关节软骨细胞加入低糖DMEM培养基(含10%胎牛血清,青霉素 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,链霉素 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$),接种于25 mL细胞培养瓶中,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中,当原代细胞覆盖瓶底80%以上时,进行传代。

2.2 细胞鉴定 取生长状态良好的原代细胞,按 1×10^4 个细胞/孔接种于24孔板中,固定后,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗3次,每次5 min;用0.2% TritonX-100打孔30 min,再用PBS清洗3次,每次5 min;然后用5% BSA封闭1 h;Collagen II抗体(1:500), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;次日用PBS清洗3次,每次5 min,加入荧光二抗(1:500),室温避光孵育1 h;弃掉二抗,清洗后,滴入抗荧光淬灭剂,封片5 min,镜检。软骨细胞纯度=Collagen II阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

2.3 槲皮素、LPS浓度筛选 取生长状态良好的3代软骨细胞^[18],按 1×10^5 个细胞/孔种板,参照文献^[20]进行,待细胞贴壁后分别向每孔加入LPS 2.5、5、7.5、10、12.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,每组设3个复孔,分别处理24、48、72 h后,向每孔加入CCK-8液 $10\text{ }\mu\text{L}$,用酶标仪于450 nm波长检测吸光度 A ,确定LPS最佳造模浓度和时间。根据LPS测定的合适浓度造模后,分别向每孔加入槲皮素50、100、150、200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,每组设3个复孔及设对照、模型组,分别干预12、24、48 h,后续步骤同上,实验重复3次。

2.4 分组与干预

2.4.1 探讨槲皮素对软骨细胞自噬的影响 将软骨细胞分为空白组、模型组、槲皮素低、中、高剂量组。空白组不做任何处理;模型组 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS处理48 h;槲皮素低、中、高剂量组先用 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS处理48 h,再用50、100、150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度槲皮素处理24 h。

2.4.2 探讨槲皮素对LPS诱导的软骨细胞外基质降解及炎症与自噬的相关性 将软骨细胞分为空

白组、模型组、槲皮素组、3-MA组、3-MA+槲皮素组。不做任何处理的细胞作为空白组;模型组加入 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS处理48 h;在模型组基础上,槲皮素组加入 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 槲皮素;3-MA组加入3-MA $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ [21];3-MA+槲皮素组加入 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 槲皮素和3-MA $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,先用 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS处理48 h后,3-MA预处理2 h[21],再用槲皮素干预24 h。

2.5 指标检测

2.5.1 槲皮素对软骨细胞增殖的影响 按 1×10^5 个细胞/孔种板,按照2.4.1项方法进行分组和干预后,向每孔加入CCK-8 $10\text{ }\mu\text{L}$,用酶标仪于450 nm波长检测A。细胞存活率=实验组A/空白组A $\times 100\%$ 。

2.5.2 ELISA法检测软骨细胞上清中IL-1 β 和TNF- α 水平 选取生长状态良好的软骨细胞,按照2.4.2项方法进行分组和干预后,参考文献[22]中的实验步骤,检测细胞上清中IL-1 β 和TNF- α 水平。

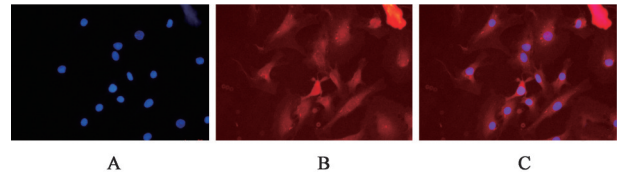
2.5.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达水平 选取生长状态良好的软骨细胞,按 1.0×10^5 个细胞/孔,接种于6孔培养板中,设置3个复孔。按2.4.2项方法处理后,按照文献[23]方法操作,去除完全培养基,加入高效RIPA裂解液提取总蛋白,用超微量分光光度计检测蛋白浓度后,蛋白变性后,放入 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用,取蛋白样品进行SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,采用脱脂奶粉室温封闭1 h,分别加LC3 II、p62、MMP-13、TIMP1和 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(1:1 000)一抗 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。HRP标记山羊抗兔二抗(1:1万)室温孵育30 min。化学发光显影后采用Image Lab计算目的条带与内参条带灰度值比较,即目的蛋白的相对表达量,测定LC3、p62、MMP-13、TIMP1蛋白的表达情况。

2.6 统计学处理 采用SPSS 24.0软件处理数据,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 软骨细胞鉴定 Collagen II免疫荧光染色结果,细胞胞浆及胞膜见清晰红色荧光,细胞核可见DAPI(蓝色)复染,表明培养的细胞表达特征性Collagen II,并主要分布于胞浆和胞膜上,且 $>95\%$ 的细胞为Collagen II阳性表达细胞,证明所提取的细胞为软骨细胞,见图1。

3.2 LPS及槲皮素最佳浓度和干预时间的筛选 经检测,LPS各浓度梯度,随时间变化细胞活性不断降低,当LPS质量浓度 $\geq 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、时间 $\geq 48\text{ h}$ 时



注:A. DAPI;B. Collagen II;C. Merge

图1 软骨细胞Collagen II免疫荧光染色(免疫荧光, $\times 100$)

Fig. 1 Collagen II immunofluorescence staining of chondrocytes (IF, $\times 100$)

细胞活性明显降低($P<0.05$)。考虑到LPS对细胞的毒性作用,故选LPS质量浓度 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、48 h进行后续实验,见表1。用 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度的LPS干预软骨细胞48 h后,给予不同浓度的槲皮素干预后,与空白组比较,模型组在12、24、48 h细胞增殖率均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,在12 h时各浓度组细胞增殖差异无统计学意义,在24 h时各浓度组细胞增殖率明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),其中槲皮素浓度为 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时最显著,在48 h时 100 、 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组细胞增殖明显($P<0.05$, $P<0.01$),其中槲皮素浓度为 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时差异最显著, 50 、 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组与模型组比较细胞增殖比差异无统计学意义,综上研究数据选槲皮素浓度 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、24 h进行后续实验,见表2。

表1 LPS浓度筛选($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 1 Screening of LPS concentration ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	A		
		24 h	48 h	72 h
空白组		0.43 ± 0.04	0.58 ± 0.05	0.78 ± 0.08
LPS组	2.5	0.44 ± 0.06	0.58 ± 0.01	0.80 ± 0.03
	5	0.40 ± 0.05	0.53 ± 0.04	0.72 ± 0.04
	7.5	0.42 ± 0.03	0.52 ± 0.03	$0.59\pm 0.03^{1)}$
	10	0.39 ± 0.03	$0.35\pm 0.05^{1)}$	$0.52\pm 0.03^{1)}$
	12.5	0.38 ± 0.03	$0.34\pm 0.04^{1)}$	$0.41\pm 0.03^{1)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$

3.3 槲皮素对LPS诱导的软骨细胞自噬的影响

以槲皮素最佳浓度 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为标准,设为槲皮素中剂量组,再用 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的槲皮素为槲皮素低剂量组, $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的槲皮素设为槲皮素高剂量组,均处理24 h后,Western blot检测各组自噬相关蛋白表达情况,结果显示,与空白组比较,模型组LC3 II蛋白表达显著降低($P<0.01$),p62蛋白表达显著升高($P<0.01$),说明LPS可抑制细胞自噬;与模型组比较,槲皮素低中剂量组、槲皮素高

表2 槲皮素浓度筛选 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

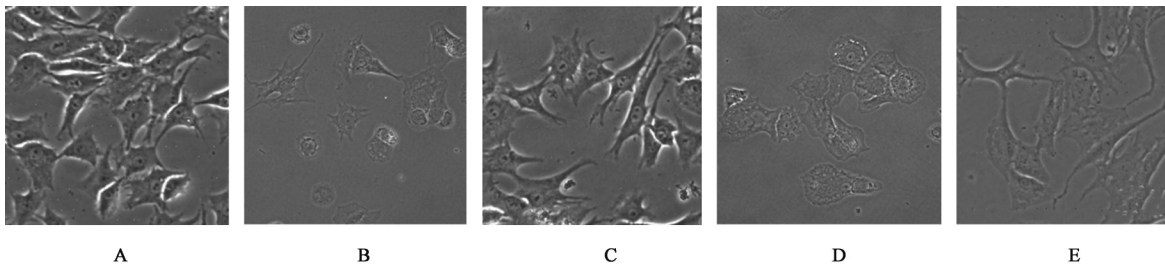
Table 2 Screening of quercetin concentration ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度 /mmol·L ⁻¹	A		
		12 h	24 h	48 h
空白组		0.79±0.04	0.91±0.04	0.93±0.02
模型组		0.54±0.02 ²⁾	0.61±0.04 ¹⁾	0.63±0.04 ¹⁾
槲皮素组	50	0.56±0.02	0.65±0.03 ³⁾	0.67±0.01
	100	0.60±0.04	0.92±0.03 ⁴⁾	0.94±0.04 ⁴⁾
	150	0.58±0.05	0.74±0.02 ³⁾	0.76±0.02 ³⁾
	200	0.59±0.03	0.69±0.03 ³⁾	0.68±0.01

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表3-表6同)

剂量组 LC3 II 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$),其槲皮素中剂量组升高最显著,而 p62 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$),其槲皮素中剂量组降低最显著。综上研究数据表明,槲皮素可激活自噬,且槲皮素中剂量组最显著,见表3、图2,与细胞增殖趋势一致。见表2。

3.4 槲皮素对 LPS 诱导的软骨细胞形态学改变及增殖的影响 倒置显微镜下观察各组软骨细胞形态学改变结果示,空白组软骨细胞形态呈“铺路石状”,贴壁生长,胞质饱满,模型组软骨细胞,数量明显减少,变圆、变小,细胞间隙增宽;与模型组比较,槲皮素组、3-MA+槲皮素组细胞数量明显增多,其中槲皮素组细胞数量增加最显著,且细胞形态开始接近空白组。见图3。检测各组细胞增殖情况结果表明,与空白组比较,模型组软骨细胞增殖显著被



注:A.空白组;B.模型组;C.槲皮素组;D.3-MA组;E.3-MA+槲皮素组(图4同)

图3 各组软骨细胞形态学改变(倒置显微镜,×60)

Fig. 3 Morphological changes of chondrocytes in each group (invert microscope, ×60)

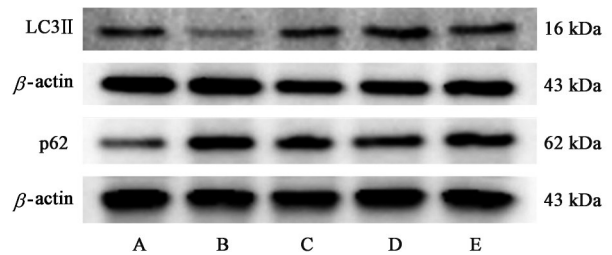
3.5 槲皮素对 LPS 诱导的软骨细胞炎症的影响 与空白组比较,模型组 IL-1 β 、TNF- α 含量显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,槲皮素组、3-MA+槲皮素组 IL-1 β 、TNF- α 含量明显降低 ($P<0.05, P<0.01$),其中槲皮素组降低最显著,3-MA 组与模型组比较差异无明显统计学意义。见表5。

3.6 槲皮素对 LPS 诱导的软骨细胞外基质代谢的

表3 槲皮素对 LPS 诱导的软骨细胞自噬相关蛋白 LC3 II 和 p62 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of quercetin on expression of LPS-induced autophagy related proteins LC3 II and p62 in chondrocytes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度 /mmol·L ⁻¹	LC3 II / β -actin	p62/ β -actin
空白组		1.77±0.03	0.31±0.02
模型组		0.25±0.06 ²⁾	1.23±0.03 ²⁾
槲皮素低剂量组	50	2.13±0.07 ⁴⁾	0.63±0.03 ⁴⁾
槲皮素中剂量组	100	2.81±0.03 ⁴⁾	0.60±0.02 ⁴⁾
槲皮素高剂量组	150	2.58±0.02 ⁴⁾	0.74±0.03 ⁴⁾



注:A.空白组;B.模型组;C.槲皮素低剂量组;D.槲皮素中剂量组;E.槲皮素高剂量组

图2 各组软骨细胞自噬相关蛋白 LC3 II 和 p62 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of LPS-induced autophagy related proteins LC3 II and p62 protein expression in chondrocytes

抑制 ($P<0.01$);与模型组比较,槲皮素组、3-MA+槲皮素组软骨细胞增殖率均显著升高 ($P<0.01$),其中槲皮素组增殖最显著,3-MA 组与模型组比较差异无统计学意义。见表4。

影响 与空白组比较,模型组 MMP-13 蛋白表达明显升高 ($P<0.05$),TIMP1 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,槲皮素组、3-MA+槲皮素组 MMP-13 表达明显降低 ($P<0.05, P<0.01$),其中槲皮素组降低最显著,TIMP1 表达显著升高 ($P<0.01$),其中槲皮素组升高最显著,3-MA 组差异无统计学意义。见表6、图4。

表 4 槲皮素对软骨细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of quercetin on chondrocyte proliferation ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/mm \cdot L $^{-1}$	A
空白组		0.94 \pm 0.02
模型组		0.55 \pm 0.03 ²⁾
槲皮素组	100	0.86 \pm 0.02 ⁴⁾
3-MA 组	0.1	0.56 \pm 0.02
3-MA+槲皮素组	0.1+100	0.71 \pm 0.02 ⁴⁾

表 5 槲皮素对 LPS 诱导的软骨细胞炎症的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 5 Effect of quercetin on LPS-induced chondrocyte inflammation ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	浓度/mm \cdot L $^{-1}$	IL-1 β	TNF- α
空白组		1.40 \pm 0.05	97.05 \pm 0.65
模型组		8.56 \pm 0.59 ²⁾	194.71 \pm 7.08 ²⁾
槲皮素组	100	3.93 \pm 0.15 ⁴⁾	155.89 \pm 3.54 ⁴⁾
3-MA 组	0.1	7.74 \pm 0.14	185.54 \pm 2.07
3-MA+槲皮素组	0.1+100	4.73 \pm 0.23 ⁴⁾	181.29 \pm 1.03 ³⁾

表 6 槲皮素对 LPS 诱导的软骨细胞 MMP-13、TIMP1 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of quercetin on LPS-induced expression of MMP-13 and TIMP1 in chondrocytes ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/mm \cdot L $^{-1}$	MMP-13/ β -actin	TIMP1/ β -actin
空白组		0.74 \pm 0.03	0.69 \pm 0.05
模型组		1.01 \pm 0.05 ¹⁾	0.36 \pm 0.02 ²⁾
槲皮素组	100	0.48 \pm 0.08 ⁴⁾	0.94 \pm 0.07 ⁴⁾
3-MA 组	0.1	1.03 \pm 0.07	0.31 \pm 0.03
3-MA+槲皮素组	0.1+100	0.78 \pm 0.04 ³⁾	0.16 \pm 0.02 ⁴⁾

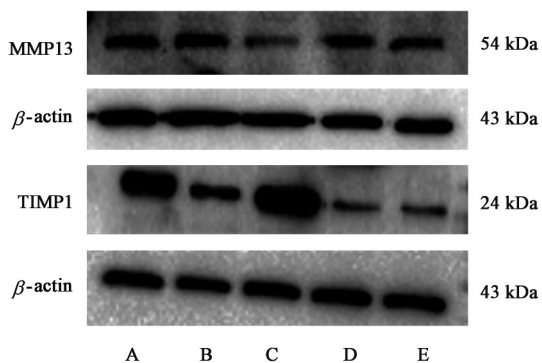


图 4 各组软骨细胞基质 MMP-13、TIMP1 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of MMP-13 and TIMP1 protein expression in chondrocytes

4 讨论

在 KOA 发生过程中,软骨细胞自噬活力降低,

清除自身衰老、受损的细胞器及炎症因子等能力下降,致细胞发生炎症反应,促进软骨细胞受损及凋亡^[24]。故本研究提出槲皮素是否通过激活自噬抑制 KOA 软骨细胞的炎症反应及调控软骨细胞外基质合成与代谢失衡状态的假设。自噬活性标志蛋白 LC3、p62 的表达水平可反映自噬活性的变化情况^[25],本研究提取人关节软骨细胞通过 LPS 诱导制备 KOA 微环境细胞模型,观察槲皮素对 LPS 诱导的软骨细胞的影响。本研究发现,经 LPS 处理的软骨细胞存活率显著下降,模型组 IL-1 β 、TNF- α 含量较空白组显著升高,说明 KOA 软骨细胞模型成功建立。给予槲皮素干预软骨细胞后,研究发现槲皮素可促进自噬活性标志蛋白 LC3 II 的表达,同时可抑制自噬底物受体蛋白 p62 的过度表达,其中槲皮素中剂量组激活细胞自噬最显著。

炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 起到重要的呈递作用,刺激软骨细胞产生软骨基质 MMPs 促进关节内软骨基质合成与代谢紊乱,进而促进软骨退变,最终引发 KOA^[1],TIMP1 起抗基质分解的作用,同活化的 MMPs 等比结合,从而阻止 MMPs 的过量表达,进而刺激软骨细胞增殖,使软骨细胞外基质代谢转化维持一个正常状态^[26]。为探讨槲皮素抑制炎症反应和抑制软骨细胞外基质过度降解的作用是否与激活软骨细胞自噬相关,故引入自噬抑制剂 3-MA 处理 LPS 诱导的软骨细胞。研究结果发现,槲皮素可恢复 LPS 损伤的软骨细胞形态及促进软骨细胞增殖,并且槲皮素可抑制 LPS 诱导的软骨细胞表达 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13,显著升高 TIMP1 表达,而 3-MA 与槲皮素共处理组较模型组细胞形态变化及增殖,IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13、TIMP1 的表达较模型组有明显改善,但无槲皮素组改善明显,说明 3-MA 可部分抑制槲皮素对上述指标的改善,说明槲皮素可促进 LPS 诱导的软骨细胞增殖,调控软骨细胞外基质合成与代谢平衡,抑制炎症反应,恢复软骨细胞功能,其机制可能与槲皮素激活细胞自噬有关。但槲皮素尚通过其他途径起作用,需进一步研究。

综上所述,本研究首次在人关节软骨细胞类 KOA 模型中,通过使用自噬抑制剂 3-MA,明确了自噬在槲皮素缓解软骨细胞损伤中的关键作用。本研究表明,槲皮素通过激活细胞自噬,可促进 LPS 诱导的软骨细胞增殖,调控软骨细胞外基质合成与代谢平衡,抑制炎症反应,恢复软骨细胞功能,自噬抑制剂 3-MA 可抑制槲皮素抗炎及平衡 ECM 合成与代谢平衡的作用,是槲皮素治疗 KOA 的作用机制

之一,这对于今后深入研究KOA打下坚实的基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 贺娟娟,颜春鲁,安方玉,等. 炎症因子与炎症因子相关信号通路在膝骨关节炎中的调控机制研究进展[J]. 中国临床药理学杂志,2019,35(12):1308-1311.

[2] FAVERO M, BELLUZZI E, TRISOLINO G, et al. Inflammatory molecules produced by meniscus and synovium in early and end-stage osteoarthritis: A coculture study [J]. J Cell Physiol, 2019, 234 (7) : 11176-11187.

[3] VINATIER C, DOMÍNGUEZ E, GUICHEUX J, et al. Role of the inflammation-autophagy-senescence integrative network in osteoarthritis[J]. Front Physiol, 2018,9:706.

[4] FENG L, FENG C, WANG C X, et al. Circulating microRNA let-7e is decreased in knee osteoarthritis, accompanied by elevated apoptosis and reduced autophagy [J]. Int J Mol Med, 2020, 45 (5) : 1464-1476.

[5] BAO J, CHEN Z, XU L, et al. Rapamycin protects chondrocytes against IL-18-induced apoptosis and ameliorates rat osteoarthritis[J]. Aging (Albany NY), 2020,12(6):5152-5167.

[6] 张亚奇,赵子义,秦灵灵,等. 骨伤1号方联合塞来昔布治疗寒湿痹阻证膝骨关节炎的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(2):93-97.

[7] 王柳,韩芮,谢俊雄,等. RhoA/ROCK 信号通路在骨性关节炎中的研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2020,26(5):331-336.

[8] 徐斌,周明旺,李盛华,等. JAK/STAT 信号通路在骨关节炎致病机制及治疗靶点的研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志,2022,28(2):125-129.

[9] 许奇,钱佳佳,许炜民,等. 温经通络汤对膝骨关节炎模型小鼠 VEGF/VEGFR2/ERK1/2 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(13):28-34.

[10] 赵杨,杨光,黄朋涛,等. 复方玄驹胶囊联合洛索洛芬钠治疗骨关节炎的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2022,37(1):126-131.

[11] 徐涛涛,郑凌歆,孙岩,等. 恒古骨伤愈合剂治疗膝骨性关节炎的临床疗效及安全性评价[J]. 中国中医骨伤科杂志,2022,30(2):8-12.

[12] 李兴,肖方骏,李震,等. 补肾活血方干预小鼠膝骨关节炎软骨修复的机制[J]. 中成药, 2022, 44(2) : 582-586.

[13] DE OLIVEIRA M R, NABAVI S M, BRAIDY N, et al. Quercetin and the mitochondria: A mechanistic

view[J]. Biotechnol Adv,2016,34(5):532-549.

[14] WANG D, SUN-WATERHOUSE D, LI F, et al. MicroRNAs as molecular targets of quercetin and its derivatives underlying their biological effects: A preclinical strategy[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2019, 59(14):2189-2201.

[15] LV S, WANG X, JIN S, et al. Quercetin mediates TSC2-RHEB-mTOR pathway to regulate chondrocytes autophagy in knee osteoarthritis[J]. Gene, 2022, 820: 146209.

[16] HU Y, GUI Z, ZHOU Y, et al. Quercetin alleviates rat osteoarthritis by inhibiting inflammation and apoptosis of chondrocytes, modulating synovial macrophages polarization to M2 macrophages [J]. Free Radic Biol Med,2019,145:146-160.

[17] 袁小亮,李林福,施伟梅,等. 槲皮素对关节软骨中 MMP-13、TIMP-1 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2016,27(2):283-285.

[18] 陈能. 补肾活血方对膝骨关节炎疼痛及致痛因子表达的影响[D]. 广州:广州中医药大学,2017.

[19] 魏钰,魏民. 人骨关节炎软骨细胞的体外分离与培养 [J]. 中国组织工程研究,2019,23(25):4056-4061.

[20] 王成,黄哲璟,王扬剑,等. 槲皮素通过上调微小 RNA-130a 抑制脂多糖诱导的小鼠软骨细胞损伤[J]. 中华实验外科杂志,2021,38(6):1123.

[21] 李翔,孟志超,焦阳,等. 跨膜蛋白 208 可影响人软骨细胞的自噬和线粒体功能[J]. 中国组织工程研究, 2019,23(23):3636-3642.

[22] 张力,李晓辰,廖太阳,等. 衰老表型肝细胞外泌体对脂多糖致炎软骨细胞的影响及白芍的干预效应[J]. 南京中医药大学学报,2021,37(5):702-708.

[23] 王乃刚,张廉君. 三七皂苷(血塞通)对脂多糖诱导的 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志,2021,37(18):2423-2426.

[24] ZHANG G, CAO J, YANG E, et al. Curcumin improves age-related and surgically induced osteoarthritis by promoting autophagy in mice [J]. Biosci Rep,2018,38(4)

[25] 陈倩,伊力亚斯·艾萨,雷秀英,等. 香草酸通过诱导自噬缓解 HepG2 细胞脂肪变性[J]. 中国临床药理学杂志,2021,37(19):2622-2626.

[26] DÖRR S, LECHTENBÖHMER N, RAU R, et al. Association of a specific haplotype across the genes MMP1 and MMP3 with radiographic joint destruction in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2004, 6 (3):R199-R207.

[责任编辑 周冰冰]