

• 论 著 •

槲皮素对痛风模型大鼠血清 NETs 和淋巴细胞水平的影响^{*}

铁 宁¹, 李 刚², 白丽杰¹, 王 静¹, 赵 静¹, 王 勇^{1△}

1. 内蒙古医科大学附属医院风湿免疫科, 内蒙古呼和浩特 010059;

2. 内蒙古医科大学药学院, 内蒙古呼和浩特 010059

摘 要:目的 分析槲皮素对痛风模型大鼠血清中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)和淋巴细胞水平的影响。

方法 将 30 只大鼠采用随机数字表法分为对照组、模型组、槲皮素组, 每组 10 只。对模型组和槲皮素组大鼠进行造模, 造模成功后槲皮素组大鼠给予 200 mg/kg 槲皮素灌胃, 对照组及模型组同期灌胃等体积的蒸馏水。给药前后依照炎症指数评定准则和 Goderre 功能障碍指数对大鼠急性炎症状况进行评估; 使用足容积测量仪检测足趾肿胀度; 给药第 1 天和第 7 天分析血清中淋巴细胞和游离 DNA/中性粒细胞胞外诱捕网(cf-DNA/NETs)水平。**结果** 槲皮素干预 1 周后, 槲皮素组大鼠功能障碍指数、炎症指数和足趾肿胀度均明显低于模型组, 且差异有统计学意义($P<0.05$); 给药后 3 组大鼠血清中淋巴细胞、cf-DNA/NETs 水平差异有统计学意义($P<0.05$), 其中模型组最高, 对照组最低, 且两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 槲皮素干预痛风模型大鼠后可有效降低血清 NETs 和淋巴细胞水平。

关键词:槲皮素; 痛风; 中性粒细胞胞外诱捕网; 淋巴细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.08.024

中图法分类号:R593.2

文章编号:1673-4130(2021)08-0996-04

文献标志码:A

Effect of quercetin on serum NETs and lymphocyte levels in gout model rats^{*}

TIE Ning¹, LI Gang², BAI Lijie¹, WANG Jing¹, ZHAO Jing¹, WANG Yong^{1△}

1. Department of Rheumatology and Immunology, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010059, China; 2. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010059, China

Abstract: Objective To analyze the effect of quercetin on serum neutrophil extracellular traps (NETs) and lymphocyte levels in gout model rats. **Methods** Thirty rats were divided into control group, model group and quercetin group by random number table method, 10 rats in each group. Rats in model group and quercetin group were modeled. After successful modeling, the rats in the quercetin group were given 200 mg/kg quercetin by gavage, and the rats in the control group and the model group were given the same volume of distilled water by gavage at the same time. Acute inflammation of rats was evaluated before and after intervention according to the inflammatory index evaluation criteria and Goderre dysfunction index. The degree of toe swelling was measured with a foot volume meter. Serum lymphocyte and cf-DNA/NETs levels were analyzed on the 1st and 7th day of administration. **Results** After one week of quercetin intervention, the disability index, inflammation index and toe swelling of the quercetin group were significantly lower than the model group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). After administration, there were significant differences in lymphocytes and cf-DNA/NETs between the three groups of rats ($P<0.05$), with the model group being the highest and the control group being the lowest, and the differences between the three groups were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Quercetin could effectively reduce the level of serum NETs and lymphocytes after intervention in gout model rats.

Key words: quercetin; gout model; neutrophil extracellular traps; lymphocytes

^{*} 基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目[2017MS(LH)0839; 2018MS08097]。

作者简介: 铁宁, 女, 副主任医师, 主要从事风湿免疫疾病方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: wyxjxy@126.com。

本文引用格式: 铁宁, 李刚, 白丽杰, 等. 槲皮素对痛风模型大鼠血清 NETs 和淋巴细胞水平的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(8):

痛风是一种常见的关节炎,男性发病率高 于女性,且各年龄段均可能出现痛风^[1]。痛风常在夜间发作,受累关节疼痛进行性加剧,呈撕裂样、刀割样或咬噬样,难以忍受。关节可表现为红肿灼热、皮肤紧绷、触痛明显、功能受限,疼痛感持续几天至几周不等,缓慢减轻至消失^[2]。发病关节会导致活动及功能受限,影响日常生活,因此,对痛风的发生、发展机制进行深入研究,并探讨药物治疗的临床疗效和药理作用机制,具有十分重要的意义^[3]。有研究指出,在痛风急性发作期患者关节腔内多出现单钠尿酸盐晶体沉积,诱导多形核中性粒细胞聚集,且当炎症反应加重后,产生大量活性氧,诱导中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)形成,降解趋化因子及细胞因子,抑制炎症反应,有助于急性痛风性关节炎的恢复^[4-5]。槲皮素又名栲精,在槐树、苹果、茶树、银杏、西红柿、丹皮等植物中广泛存在,具有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、抗菌、祛痰止咳、免疫调节、神经保护及抗血栓等药理作用^[6-7]。近年来,有关槲皮素对血清 NETs 和淋巴细胞水平影响的报道较少。因此,本研究拟构建痛风动物模型,分析槲皮素对痛风动物模型血清 NETs 和淋巴细胞水平的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究所使用的 30 只 6 周龄 Wistar 雄性大鼠均购自南京青龙山实验动物繁育场,体质量 180~210 g,平均(190.32±13.29)g。常规适应性饲养 1 周,5 只 1 笼,分笼饲养,维持室温 22~26℃,湿度 55%~65%,正常昼夜循环,维持 12 h 光照,大鼠灌胃、换水、添加饲料等均由专人进行。

1.2 方法 将所有大鼠依照体质量编号,并采用随机数表法分为 3 组,即对照组、模型组、槲皮素组,每组 10 只。模型组和槲皮素组进行造模,取仰卧位在解剖板上固定,右后肢小腿踝关节进行常规消毒,选取踝关节外侧作为 6 号注射针穿刺点,针口和胫骨为 45°夹角倾向上刺入踝关节腔内,注射 250 mg/mL 尿酸钠溶液 0.2 mL,踝关节对侧鼓起则注射成功。对照组注入等体积的生理盐水。造模成功后槲皮素组大鼠每天早上 9:00 给予 200 mg/kg 的槲皮素灌胃,持续给药 1 周,对照组及模型组同期灌胃等体积的蒸馏水。

1.3 观察指标 给药前和第 7 天给药后依照炎症指数评定准则^[8]和 Goderre 功能障碍指数^[9]对大鼠急性炎症状况进行评估,使用足容积测量仪检测足趾肿胀度,炎症指数分级如下:0 级,正常;1 级,左后足皮肤有红斑、关节稍微肿胀;2 级,左后足显著红肿,关节部位骨性标志消失;3 级,左后足关节肢体发生肿胀。Goderre 功能障碍指数分级如下:0 级,步态正常,四足着地均匀;1 级,轻微跛行,左后足足趾未展开,着地

减轻;2 级,跛行显著,左后足趾背着地、屈起;3 级:三足步态,左后足完全离地。给药第 1 天和第 6 天眼底取血,离心收集血清,使用全自动生化分析仪分析血清中淋巴细胞水平,后取 100 μL 血清加入 100 μL Pi-coGreen 荧光染料,避光孵育 300 s,使用荧光染色法检测血清中游离 DNA/中性粒细胞胞外诱捕网(cf-DNA/NETs)水平,采用荧光酶标仪检测荧光值,后绘制标准曲线计算 cf-DNA/NETs 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行统计学分析。正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。计数资料采用百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型组、槲皮素组大鼠功能障碍指数、炎症指数和足趾肿胀度的比较 本研究结果显示,采用槲皮素干预前模型组和槲皮素组大鼠功能障碍指数、炎症指数和足趾肿胀度差异无统计学意义($P > 0.05$);给药后,槲皮素组大鼠功能障碍指数、炎症指数和足趾肿胀度均明显低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 模型组和槲皮素组大鼠功能障碍指数、炎症指数和足趾肿胀度的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	时间	功能障碍指数 (分)	炎症指数 (分)	足趾肿胀度 (mL)
模型组	10	给药前	1.86±0.32	2.02±0.14	0.31±0.05
		给药后	0.32±0.05	1.28±0.13	0.19±0.04
槲皮素组	10	给药前	1.89±0.25	2.03±0.18	0.32±0.07
		给药后	0.02±0.01*	0.31±0.09*	0.04±0.01*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 3 组大鼠血清中淋巴细胞水平的比较 本研究结果显示,给药前,槲皮素组和模型组大鼠血清中淋巴细胞水平差异无统计学意义($P > 0.05$),但模型组和槲皮素组大鼠血清中淋巴细胞水平均明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);进一步分析发现,给药后 3 组大鼠血清中淋巴细胞水平差异有统计学意义($P < 0.05$),其中模型组最高,对照组最低,且两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 3 组大鼠血清中淋巴细胞水平检测结果比较($\times 10^9/L, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	给药前	给药后
对照组	10	53.68±6.38	54.06±4.98
模型组	10	75.96±5.97 [△]	71.25±7.03 [△]
槲皮素组	10	76.02±7.36 [△]	60.15±6.68 ^{△*}

注:与对照组比较,[△] $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.05$ 。

2.3 3 组大鼠血清中 cf-DNA/NETs 水平的比较

本研究结果显示,给药前,槲皮素组和模型组大鼠血清中 cf-DNA/NETs 水平差异无统计学意义($P>0.05$),但模型组和槲皮素组大鼠血清中 cf-DNA/NETs 水平均明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);进一步分析发现,给药后 3 组大鼠血清中 cf-DNA/NETs 水平差异有统计学意义($P<0.05$),其中模型组最高,对照组最低,且两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 3 3 组大鼠血清中 cf-DNA/NETs 水平的比较
(ng/mL, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药前	给药后
对照组	10	152.34±15.20	150.19±10.62
模型组	10	897.69±79.94 [△]	843.52±81.25 [△]
槲皮素组	10	903.53±86.67 [△]	503.18±73.25 ^{△*}

注:与对照组比较,[△] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$ 。

3 讨 论

槲皮素分布广泛,属于黄酮醇类化合物,具有多种生物活性。有研究指出,槲皮素具有对抗自由基作用,可捕获自由基预防脂质过氧化反应,抑制肿瘤,并还具有较强的抗炎、抗菌、预防糖尿病、抗过敏等较强的生物活性^[10]。此外,槲皮素还具有辅助治疗高血压及冠心病的作用,且槲皮素毒性低,具有较大研究价值。有学者指出,采用槲皮素对痛风性关节炎模型大鼠进行干预后,具有显著的抗氧化、抗炎活性,但其作用机制尚不清楚^[11]。有研究指出,将尿酸钠晶体注入大鼠关节腔内可用于建立急性痛风性关节炎病变模型,其临床表现与病理表现相似^[12]。采用该方案造模后关节腔内出现中性粒细胞,在滑膜和关节积液中,细胞吞噬尿酸单钠结晶,扩大炎症反应和释放趋化介质,同时关节滑膜肥厚和增生,关节液量增加。该造模方案快速、操作简单、成功率高,被视为经典的急性痛风性关节炎造模方法,因此,本研究采用该方案进行造模。

痛风为慢性且复杂的炎症反应,与机体免疫系统密切相关,其中天然免疫和适应性免疫在机体持续炎症阶段起到十分重要的主导作用。有研究指出,痛风发病初期,天然免疫激活单核细胞进入炎症组织,将尿酸钠晶体吞噬,促进淋巴细胞聚集,合成并分泌大量白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 等炎症因子^[13]。本研究结果显示,槲皮素干预 7 d 后,槲皮素组大鼠功能障碍、炎症指数和足趾肿胀度均明显低于模型组,且槲皮素组大鼠体内淋巴细胞水平显著降低。说明槲皮素能够显著减轻痛风模型大鼠的关节腔内炎症反应,减少关节液容积。

人体天然免疫系统中的中性粒细胞是重要的效

应细胞,在早期免疫应答阶段起到十分重要的作用。有学者研究发现,中性粒细胞活化后会释放出由蛋白和 DNA 构成的网状结构,该结构被称为 NETs^[14]。此外,NETs 为球状颗粒串并相互缠绕形成网状陷阱样结构,可限制多种病原微生物扩散,捕获病原微生物,是中性粒细胞杀菌的新途径。但过量 NETs 可诱导凝血功能障碍、内皮细胞损伤、炎症反应,对机体产生有害作用。本研究结果显示,模型组和槲皮素组大鼠血清中 cf-DNA/NETs 水平均明显高于对照组,给药后槲皮素组大鼠血清中 cf-DNA/NETs 明显降低,且槲皮素组大鼠血清中 cf-DNA/NETs 低于模型组。说明采用槲皮素对痛风模型大鼠干预后可有效降低血中 cf-DNA/NETs 水平,进而有效下调体内炎症反应程度^[15]。

综上所述,槲皮素干预痛风模型大鼠后可有效降低血清 NETs 和淋巴细胞水平。但本研究并未对基因水平的改变进行分析,有待进一步探讨。

参考文献

[1] PARK D J, SHAH F A, KOH P O. Quercetin attenuates neuronal cells damage in a middle cerebral artery occlusion animal model[J]. J Vet Med Sci, 2018, 80(4): 676-683.

[2] KIM J E, LEE M R, PARK J J, et al. Quercetin promotes gastrointestinal motility and mucin secretion in loperamide-induced constipation of SD rats through regulation of the mAChRs downstream signal[J]. Pharm Biol, 2018, 56(1): 309-317.

[3] 周丽雅, 柴晶美, 杨阿龙, 等. 上中下通用痛风汤对大鼠急性痛风性关节炎模型 TLR/MYD88 信号通路影响的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(5): 604-606.

[4] BHUTTO Z A, HE F, ZLOH M, et al. Use of quercetin in animal feed: effects on the P-gp expression and pharmacokinetics of orally administrated enrofloxacin in chicken[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 4400-4418.

[5] MAZHAR M, KABIR N, SIMJEE S U. Quercetin modulates Iron homeostasis and iNOS expression of splenic macrophages in a rat model of Iron deficiency anemia[J]. Chin J Nat Med, 2018, 16(8): 580-589.

[6] YANG Y, LIU X K, WU T, et al. Quercetin attenuates AZT-induced neuroinflammation in the CNS[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 6194-6211.

[7] 马纳, 李亚静, 范吉平. 槲皮素药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8): 221-224.

[8] 王旭, 余明明. 祛湿化痰解毒定痛汤联合关节镜手术对痛风性关节炎患者证候积分、炎症指标和膝关节功能的影响[J]. 陕西中医, 2019, 40(7): 916-918.

[9] 余方方, 夏传涛, 方华, 等. 关节功能障碍指数评价透明质酸钠治疗大骨节病的远期效果[J]. 中华地方病学杂志, 2014, 33(6): 685-688.

(下转第 1002 页)

和 apelin 高水平、血清 HO-1 低水平是增殖型 DR 的危险因素,血清 VEGF、apelin、HO-1 水平的检测有助于预测 DR 分型,但其机制有待进一步探索。

参考文献

[1] 杨娜,张化冰,李玉秀.《美国糖尿病学会 2019 年版糖尿病医学诊疗标准》更新与解读[J]. 协和医学杂志,2019,11(5):476-480.

[2] 李新亮. 血清胱抑素 C 与 2 型糖尿病周围神经病变的相关性探讨[J]. 国际检验医学杂志,2018,12(14):1779-1782.

[3] 苏萌,白惠玲,孔宝焕,等. 二甲双胍改善糖尿病视网膜病变机制研究进展[J]. 中国临床药理学杂志,2019,13(14):1530-1532.

[4] ATICI A, BARMAN H A B, SONSOZ M R S, et al. Serum apelin and asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels in patients with vasovagal syncope[J]. Eur Heart J, 2019, 2(1):123-125.

[5] SVEN W, TILLMANN T, KRISZTINA P, et al. Specific Reverse Transcription-PCR Quantification of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Splice Variants by Light Cycler Technology[J]. Clin Chem, 2019, 5(4):409-411.

[6] VIJAYAN V, WAGENER F A D T G, IMMENSCHUH S. The macrophage heme-heme oxygenase-1 system and its role in inflammation[J]. Biochem Pharmacol, 2018, 153(9):2103-2105.

[7] 陈建志, 冼文光, 符小林, 等. 2 型糖尿病患者血清中血管内皮生长因子、apelin 及血红素氧合酶-1 水平变化及其与糖尿病视网膜病变的相关性研究[J]. 中华眼底病杂志, 2019, 35(2):145-149.

[8] 李莉芳, 肖建华. Apelin/APJ 系统在心血管疾病中的生理

与病理作用[J]. 中南医学科学杂志, 2019, 47(5):452-457.

[9] 赵伟, 朱向东, 李瑾, 等. HO-1、LXA4、Apelin 在糖尿病大鼠血清和视网膜中的表达特点[J]. 解剖学研究, 2019, 2(1):52-56.

[10] SOUALMIA H, MIDANI F, HADJ-FRADJ S, et al. The A445C Variant in Apelin Receptor and Diabetic Retinopathy in Tunisian Patients[J]. Clin Lab, 2017, 63(2):379-382.

[11] 俞忠娜, 董燕儿. microRNA 抑制卵巢癌细胞 VEGF 表达及其对肿瘤细胞增殖的影响[J]. 中华内分泌外科杂志, 2019, 13(3):233-236.

[12] YANG Q, ZHANG Y, WANG X, et al. Associations between ten VEGF gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetic retinopathy, proliferative diabetic retinopathy and nonproliferative diabetic retinopathy: a systematic review and meta-analysis[J]. Oncotarget, 2018, 5(8):562-564.

[13] 杨柳, 曹欢, 孙东, 等. 血红素加氧酶-1 基因修饰的骨髓间充质干细胞对大鼠减体积肝移植的影响及机制[J]. 中华肝胆外科杂志, 2019, 25(5):371-375.

[14] EL-ASRAR A M A, MOHAMMAD G, ALLEGAERT E, et al. Matrix metalloproteinase-14 is a biomarker of angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy [J]. Mol Vis, 2018, 24(8):394-406.

[15] MITTAL R, KUMAR A, SINGH D P, et al. Ameliorative potential of rutin in combination with nimesulide in STZ model of diabetic neuropathy: targeting Nrf2/HO-1/NF-kB and COX signalling pathway[J]. Inflammopharmacology, 2018, 26(3):755-768.

(收稿日期:2020-09-12 修回日期:2020-12-18)

(上接第 998 页)

[10] AITHAL G C, NAYAK U Y, MEHTA C, et al. Localized in situ nanoemulgel drug delivery system of quercetin for periodontitis: development and computational simulations [J]. Molecules, 2018, 23(6):1363-1376.

[11] HYUN H B, JY M, CHO S K. Quercetin suppresses CYR61-Mediated multidrug resistance in human gastric adenocarcinoma AGS cells[J]. Molecules, 2018, 23(2):209-314.

[12] 魏潇, 倪江东, 宋德业, 等. 加味四妙散对尿酸钠诱导急性痛风性关节炎大鼠的疗效机制研究[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(7):67-70.

[13] JAHAN S, ABID A, KHALID S, et al. Therapeutic potentials of Quercetin in management of polycystic ovarian

syndrome using Letrozole induced rat model: a histological and a biochemical study[J]. J Ovarian Res, 2018, 11(1):26-42.

[14] LING Y, WANG R, WANG H M, et al. Formulation and characterization of chitosan hydrochloride and carboxymethyl chitosan encapsulated quercetin nanoparticles for controlled applications in foods system and simulated gastrointestinal condition[J]. Food Hydrocoll, 2018, 84(11):450-457.

[15] 谢凯莉, 李昭华, 董先智, 等. 槲皮素抑制黄嘌呤氧化酶活性的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(9):2223-2225.

(收稿日期:2020-09-23 修回日期:2020-12-26)