

# Anti-Inflammatory Effect of Omentin on LPS Induced Vascular Smooth Muscle Cells and Its Mechanism

Ying Lei Shuijiang Song\*

Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital Zhejiang University School of Medicine, Quzhou, Zhejiang, 324000, China

## Abstract

**Objective:** To study the effect of Omentin on the inflammation of vascular smooth muscle cells. **Methods:** Vascular smooth muscle cells (SMCs) were induced by lipopolysaccharide (LPS). CCK-8 method was used to screen the effective concentration and time of LPS and Omentin. The contents of inflammatory factors (IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$ ) secreted by the cells were measured by ELISA. The protein expression levels of TLR4 and NF-KB p65 were detected by Western blotting and RT-PCR. **Results:** The optimal concentration of lipopolysaccharide was 20ng/ml for 24h, and the optimal concentration of omentin was 20 $\mu$ g/ml. The results of Western blotting and RT-PCR showed that omentin could regulate the protein and mRNA expression of TLR4 and NF-KB p65, and significantly reduce the protein expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Omentin can inhibit the inflammation of vascular smooth muscle cells induced by LPS, which may be mediated by TLR4 / NF - K B signaling pathway.

## Keywords

blood specimen; test result; causes; countermeasures

# 网膜素对脂多糖诱导的血管平滑肌细胞炎症抑制及作用机制研究

雷颖 宋水江\*

浙江大学医学院附属第二医院神经内科, 中国·浙江 衢州 324000

## 摘要

**目的:** 研究网膜素对血管平滑肌细胞炎症抑制作用的影响。**方法:** 采用脂多糖诱导血管平滑肌细胞建立炎症模型; 采用 CCK-8 法筛选脂多糖和网膜素作用的有效浓度和作用时间; Elisa 法测定细胞分泌的 IL-6, IL-8 和 TNF- $\alpha$  的炎症因子含量; 通过 Western blotting 法和 RT-PCR 法检测 TLR4 和 NF-KB p65 的蛋白表达水平。**结果:** 采用 CCK-8 法筛选出脂多糖最佳诱导浓度为浓度为 20ng/ml, 作用时间为 24h; 网膜素抗炎最佳干预浓度为 20 $\mu$ g/ml。Elisa 法测定网膜素能显著降低细胞分泌的 IL-6, IL-8 和 TNF- $\alpha$  的含量 ( $P < 0.05$ ), Western blotting 和 RT-PCR 法测定结果显示, 网膜素对 TLR4 和 NF-KB p65 的蛋白和 mRNA 表达的具有调控作用, 能显著降低蛋白表达的量 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 网膜素能抑制脂多糖诱导的血管平滑肌细胞炎症, 可能通过 TLR4/NF-KB 通路产生抗炎作用。

## 关键词

血标本; 检验结果; 原因; 对策

## 1 引言

炎症是一种很常见的病理学过程, 是机体对有害病原和刺激的一种主动防御机制, 分为急性炎症和慢性炎症, 能够通过自发反应维持自身的稳态<sup>[1]</sup>。许多炎症因子通过内源性物质的介导, 导致许多疾病的发生, 包括心血管疾病、关节

炎、癌症和糖尿病等<sup>[2]</sup>。网膜素是近年来发现的一种细胞因子, 来源于脂肪组织, 由脂肪细胞分泌, 对人体健康有重要意义, 网膜素分为 Omentin-1 和 Omentin-2<sup>[3]</sup>。研究表明, 网膜素在肥胖、胰岛素抵抗、心血管疾病中表达显著降低, 这些疾病均涉及到炎症的病理过程, 对炎症的抑制作用具有重要意义<sup>[4]</sup>。本研究拟利用脂多糖 (LPS) 建立血管平滑肌 (SMCs) 的炎症模型, 探索网膜素对炎症的反应, 为进一步研究网膜素在心血管疾病的作用提供实验支撑。

**【作者简介】**雷颖 (1992-), 女, 中国浙江衢州人, 主治医师, 研究生学历, 主治医师, 从事神经病研究。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 细胞

血管平滑肌细胞, 由上海通派生物科技有限公司提供。

#### 2.1.2 主要试剂

DMEM, RPIM-1640 (Gibco, 美国), 重组人网膜素 (prospec, CYT-301); 脂多糖 (sigma, 美国); DMEM、胎牛血清 (Thermo Fisher, 美国); DMSO (天津永大化学试剂有限公司); CCK-8 试剂盒 (Beyotime, b2001); HRP 标记羊抗兔 (Affinity, BM1985); IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  试剂盒 (伊莱瑞特, CM9765); TLR4、P65 抗体 (Abcam, ab3323, ab5543); RNAiso Plus, sybr-2, Primerscript Kit (Vazyme, Q113-2)。

#### 2.1.3 主要仪器设备

微型高速离心机 (Eppendorf, 5467); 多功能酶标仪 (Molecular Devices, Flexstation3); 电泳仪 (Bio-Rad, 1652100); 显微镜 (奥林巴斯, BX53); RT-PCR 仪 (ABI, UV5B10)。

### 2.2 方法

#### 2.2.1 CCK-8 法筛选 LPS 诱导 SMCs 的最佳浓度和作用时间

取对数期生长的 SMCs 接种于 96 孔板中, 细胞数为 104 个/孔, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% 的二氧化碳培养箱, 孵育 12h, 待细胞贴壁后, 设置对照组 (加不含 LPS 的培养基) 和 LPS 诱导组 (浓度为 0, 10, 20, 40, 80, 160ng/ml), 作用时间分别为 12h, 24h, 48h。每组设置 3 个复孔, 每孔加入 10 $\mu$ L CCK-8, 孵育 4h 后, 使用酶标仪检测 450nm 处的吸光度 (OD) 值。其中:

$$\text{细胞存活率 (\%)} = \frac{(\text{实验组的OD值} - \text{空白组的OD值})}{(\text{对照组的OD值} - \text{空白组的OD值})} \times 100\%$$

#### 2.2.2 筛选网膜素炎症抑制作用的最佳浓度

细胞培养方法同“2.2.1”步骤, 采用上述筛选结果, 设置网膜素浓度为 0、5、10、20、40、80 $\mu$ g/ml。采用 6 孔板培养细胞, 设置空白组, Elisa 法测定 IL-1 $\beta$  的吸光度值。同时每组设置 3 个复孔, 每孔加入 10 $\mu$ L CCK-8, 孵育 4h 后, 使用酶标仪检测 450nm 处的吸光度 (OD) 值, 筛选出网膜

素最佳的炎症抑制浓度。

#### 2.2.3 网膜素对 LPS 诱导 SMCs 中炎症因子的影响

按“2.2.1”步骤得出的结果, 采用 6 孔板培养 SMCs, 取细胞上清液, 按照试剂盒说明书操作, 设置实验组 (加入 LPS 和网膜素干预) 测定 IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  的含量, 同时设置空白组 (不加 LPS 和网膜素), 和模型组 (加 LPS, 不加网膜素), 每组设置 3 个复孔。

#### 2.2.4 Western blotting 法检测网膜素对 LPS 诱导 SMCs 中炎症通路的影响

采用 6 孔板培养干预后, 吸取培养基, 加入细胞裂解液, 提取胞浆和胞核蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳, 完成后加入一抗 (TLR4, NF-KB p65), 孵育过夜, 加入二抗孵育 2h, 显影。

#### 2.2.5 网膜素对 LPS 诱导 SMCs 炎症反应中 mRNA 表达的影响

采用“2.2.4”步骤中细胞培养方法, 参照试剂盒要求提取总 RNA, 纯度检测合格后使用引物<sup>[5]</sup>进行 PCR 扩增, 荧光定量检测 TLR4 和 NF-KB p50 的 mRNA 的表达。

### 2.3 数据分析

采用 SPSS 22.0, 单因素方差分析。\*P < 0.05 表示差异显著, \*\*P < 0.01 表示差异极为显著。

## 3 结果

### 3.1 LPS 诱导 SMCs 的最佳浓度和作用时间

表 1 实验结果表明, 细胞存活率随 LPS 作用浓度的增加而降低, 作用浓度越大, 细胞毒性越强。作用浓度为 20ng/ml 时, 作用时间为 48h 时细胞存活率明显降低, 对细胞毒性作用显著 (P < 0.01)。浓度大于 20ng/ml 时, 均呈现明显的细胞毒性。因而选择脂多糖作用浓度为 20ng/ml, 作用时间为 24h 开展后续实验。

表 1 脂多糖诱导 SMCs 细胞作用浓度和作用时间 ( $\bar{x} \pm S$ , n=3)

浓度 (ng/ml)	12h	24h	48h
0	98.66 $\pm$ 0.55	97.55 $\pm$ 0.82	98.03 $\pm$ 1.35
10	96.31 $\pm$ 1.32	95.89 $\pm$ 0.56	95.32 $\pm$ 1.78
20	93.11 $\pm$ 1.05	94.12 $\pm$ 0.68	79.32 $\pm$ 0.88**
40	94.21 $\pm$ 0.96	73.21 $\pm$ 1.55**	55.32 $\pm$ 1.86**
80	66.57 $\pm$ 2.12**	55.21 $\pm$ 1.34**	32.81 $\pm$ 0.87**
160	43.21 $\pm$ 0.63**	32.16 $\pm$ 0.99**	16.23 $\pm$ 0.53**

### 3.2 网膜素对 LPS 诱导的 SMCs 细胞炎症抑制作用的最佳浓度

表 2 实验结果表明,网膜素作用浓度为 10 $\mu$ g/ml 时产生炎症抑制作用 ( $P < 0.05$ ),随着浓度增加,IL-1 $\beta$  值降低,炎症抑制作用增强。细胞存活率结果发现,浓度为 40 和 80 $\mu$ g/ml 时,细胞存活率明显降低 ( $P < 0.01$ ),细胞毒性作用强。结合 IL-1 $\beta$  值和细胞存活率,选择网膜素干预浓度为 20 $\mu$ g/ml 进行实验。

表 2 不同浓度的网膜素作用细胞 IL-1 $\beta$  值和细胞存活率 ( $\bar{X} \pm S, n=3$ )

浓度 ( $\mu$ g/ml)	IL-1 $\beta$ (pg/ml)	细胞存活率 (%)
0	412.04 $\pm$ 11.36	98.32 $\pm$ 1.53
5	426.77 $\pm$ 9.27	96.52 $\pm$ 2.36
10	386.28 $\pm$ 10.23*	93.37 $\pm$ 1.99
20	273.35 $\pm$ 9.41**	94.69 $\pm$ 3.54
40	153.29 $\pm$ 8.35**	78.59 $\pm$ 5.26**
80	99.54 $\pm$ 5.31**	43.56 $\pm$ 4.81**

### 3.3 网膜素对 LPS 诱导的 SMCs 细胞分泌 IL-6, IL-8 和 TNF- $\alpha$ 的含量测定

表 3 实验结果表明,各组细胞上清液中的 IL-6, IL-8 和 TNF- $\alpha$  含量变化明显。模型组的各炎症因子含量显著高于空白组 ( $P < 0.01$ ),表明 LPS 诱导细胞产生炎症模型。实验组加入网膜素后,作用 24h,炎症指标比模型组显著降低 ( $P < 0.01$ ),表明网膜素能显著降低细胞炎症因子的表达量,具有炎症抑制作用。

表 3 SMCs 细胞中分泌 IL-6, IL-8 和 TNF- $\alpha$  的含量 ( $\bar{X} \pm S, n=3$ )

组别	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)
空白组	85.3 $\pm$ 3.6	101.5 $\pm$ 8.9	98.5 $\pm$ 2.8
模型组	3356.8 $\pm$ 52.3**	2844.6 $\pm$ 21.7**	2932.2 $\pm$ 12.5**
实验组	1674.6 $\pm$ 33.5###	1386.3 $\pm$ 46.8###	1865.4 $\pm$ 13.6###

注:与空白组比较 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较 # $P < 0.05$ , ### $P < 0.01$ 。

### 3.4 网膜素对 LPS 诱导的 SMCs 细胞中炎症通路的影响

图 1 和表 4 中 Western blotting 结果表明,与空白组比较,模型组经 LPS 诱导后,TLR4 和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达量显著上调 ( $P < 0.01$ )。经网膜素干预后,TLR4 和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达量均显著下调 ( $P < 0.01$ ),表明网膜素的干预机

制可能通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路产生炎症抑制作用。

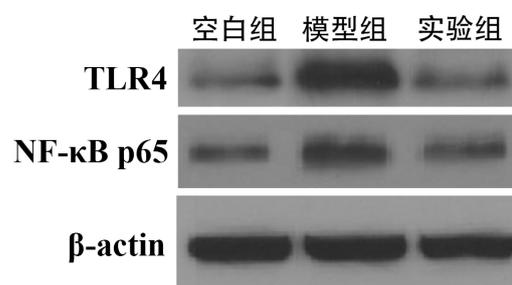


图 1 网膜素对 LPS 诱导的 SMCs 细胞中 TLR4 和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响

表 4 TLR4 和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的灰度值比 ( $\bar{X} \pm S, n=3$ )

组别	TLR4/ $\beta$ -actin	NF- $\kappa$ B p65/ $\beta$ -actin
空白组	0.186 $\pm$ 0.005	0.275 $\pm$ 0.012
模型组	0.834 $\pm$ 0.088**	0.638 $\pm$ 0.015**
实验组	0.215 $\pm$ 0.013###	0.317 $\pm$ 0.054###

注:与空白组比较 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较 # $P < 0.05$ , ### $P < 0.01$

### 3.5 网膜素对 LPS 诱导的 SMCs 细胞中 TLR4 和 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达影响

经过 PCR 扩增,以 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 计算相对 mRNA 的表达水平。表 5 结果显示,模型组中 TLR4 和 NF- $\kappa$ B p65 的 mRNA 转录水平显著高于空白组 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,实验组经网膜素干预后,TLR4 和 NF- $\kappa$ B p65 的 mRNA 转录水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。

表 5 细胞中 TLR4 和 NF- $\kappa$ B p65mRNA 转录水平的影响 ( $\bar{X} \pm S, n=3$ )

组别	TLR4 (2 <sup>-<math>\Delta\Delta</math>Ct</sup> )	NF- $\kappa$ B p65 (2 <sup>-<math>\Delta\Delta</math>Ct</sup> )
空白组	1.006 $\pm$ 0.005	1.005 $\pm$ 0.002
模型组	4.749 $\pm$ 0.058**	5.838 $\pm$ 0.015**
实验组	2.266 $\pm$ 0.051###	3.290 $\pm$ 0.027###

注:与空白组比较 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较 # $P < 0.05$ , ### $P < 0.01$

## 4 讨论

血管平滑肌细胞是维持体内张力和功能的主要细胞成分,可以合成和分泌细胞外基质成分和多种细胞因子,与心血管疾病如动脉粥样硬化等有非常重要的联系<sup>[6-8]</sup>。血管平滑肌细胞炎症反应是心血管损伤的基础病理反应,因而研究血管平滑肌细胞的炎症抑制作用对心血管疾病的治疗有非常重要的意义<sup>[9-10]</sup>。

本研究建立脂多糖诱导血管平滑肌细胞产生炎症,采用CCK-8法筛选出脂多糖最佳诱导浓度为浓度为20ng/ml,作用时间为24h;随后结合IL-1 $\beta$ 和细胞存活率,筛选出网膜素抗炎最佳干预浓度为20 $\mu$ g/ml。为了验证其对血管平滑肌细胞的炎症抑制作用,对细胞的上清液收集,采用Elisa法测定细胞分泌的IL-6, IL-8和TNF- $\alpha$ 含量。结果表明,网膜素干预后,均能显著抑制脂多糖诱导的血管平滑肌细胞炎症反应。为了进一步探究其炎症抑制的作用机制,采用Western blotting和RT-PCR法测定其TLR4和NF-KB p65的蛋白和mRNA表达的量,结果证实,网膜素可能通过TLR4/NF-KB通路产生炎症抑制作用。

网膜素是脂肪细胞内的一类非常重要的因子,对心血管疾病的治疗有积极的作用<sup>[11-12]</sup>。实验结果表明网膜素能显著抑制脂多糖诱导的血管平滑肌细胞的炎症反应,可能通过TLR4/NF-KB通路产生抗炎作用,为进一步利用网膜素治疗心血管疾病提供了实验基础。

## 参考文献

- [1] 李思铭,李金根,徐浩.从抑制炎症反应看中医药干预冠心病的新视角[J].中国中西医结合杂志,2019,39(04):486-490.
- [2] 王茨,迟伟群,姜晓峰.自身抗体及炎症因子与动脉粥样硬化相关性的研究进展[J].中国实验诊断学,2020,24(06):1052-1056.
- [3] 廖锐,倪卫,林德智.银杏酮酯滴丸联合阿托伐他汀对高血压伴颈动脉硬化患者血管内皮功能、血清网膜素-1和Hcy的影响[J].心血管康复医学杂志,2019,28(03):364-368.
- [4] Fatih Burak Efeoğlu, Ali Gökkaya, Furkan Erol Karabekmez, et.al. Effects of omentin on flap viability: an experimental research on rats[J]. Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery,2019,53(6):447-449.
- [5] 姬向波,赵冰洁,刘玉萍,等.褪黑素调节LPS诱导奶牛乳腺上皮细胞炎性因子的表达及其机制[J].动物医学进展,2020,41(07):99-102.
- [6] Basatemur G L, Helle F. Jørgensen, Clarke M C H, et al. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis[J]. Nature Reviews Cardiology, 2019, 16(12):1.
- [7] Millar Sophie A, John Stephen G, McIntyre Christopher W, et.al. An Investigation into the Role of Osteocalcin in Human Arterial Smooth Muscle Cell Calcification[J]. Frontiers in endocrinology,2020(11):22-27.
- [8] 戎成振,王洪巨,卢家忠.血浆网膜素-1水平和冠状动脉侧支循环的关系[J].蚌埠医学院学报,2019,44(05):590-592.
- [9] 胡艳红,杨静,修成奎,等.血管平滑肌细胞表型转化的诱导因素研究进展[J].山东医药,2019,59(36):96-100.
- [10] 王超,刘玉,安然,等.Roscovitine对TNF- $\alpha$ 诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖及细胞周期的影响[J].中国药理学通报,2019,35(03):376-381.
- [11] 杨泉,李丙蓉,唐利,等.糖尿病合并急性冠状动脉综合征与血浆网膜素水平的关系研究[J].重庆医学,2019,48(05):796-798+802.
- [12] 徐品丽,李文宝,冯大勇,等.不同梗死面积、神经功能缺损程度、预后的急性脑梗死患者血清Chemerin和Omentin-1水平对比观察[J].山东医药,2019,59(09):15-18.