

紫杉醇对 TNF- α 诱导的人脐静脉内皮细胞 Cat K 表达的影响

张良¹, 张翼¹, 唐秋红², 林楚伟³, 周胜华²

(1. 湖南省人民医院心内科, 湖南省长沙市 410005; 2. 中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011;
3. 长沙市中心医院心内科, 湖南省长沙市 410004)

[关键词] 紫杉醇; 组织蛋白酶 K; TNF- α ; NF- κ B

[摘要] **目的** 观察紫杉醇对 TNF- α 诱导的人脐静脉内皮细胞中 Cat K 及 NF- κ B 表达的影响, 探讨紫杉醇在防治内膜增生的作用机制。**方法** 采用 HUVEC 细胞株传代第 3~6 代的细胞作为研究对象。不同浓度的紫杉醇干预 1 h 再用 10 μ g/L TNF- α 刺激人脐静脉内皮细胞 24 h, 并用 RT-PCR 方法检测细胞中 Cat K mRNA、NF- κ B mRNA 的表达; 用 Western blot 方法检测细胞中的 Cat K 和 NF- κ B 蛋白的表达。**结果** 紫杉醇可以呈剂量依赖性地抑制 TNF- α 所致的 HUVEC 中 Cat K mRNA 和 Cat K 蛋白的表达; 紫杉醇可以呈剂量依赖性地抑制 TNF- α 所致的 HUVEC 中 Cat K 蛋白的表达, 紫杉醇可以呈剂量依赖性地抑制 TNF- α 所致的 HUVEC 中 NF- κ B 蛋白的表达。**结论** 紫杉醇可以呈剂量依赖性地抑制 TNF- α 所致的 HUVEC 中 Cat K 和 NF- κ B 的表达, 紫杉醇可能通过抑制 NF- κ B 使 Cat K 表达减少。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Paclitaxel on TNF- α Induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells Expression of Cat K

ZHANG Liang¹, ZHANG Yi¹, TANG Qiu-Hong², LIN Chu-Wei³, and ZHOU Sheng-Hua⁴

(1. Department of Cardiology, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha, Hunan 410005, China; 2. Department of Nephrology, The Second Hospital of Xiangya of Central South University, Changsha, Hunan 410011, China; 3. Department of Cardiology, Changsha Central Hospital, Changsha, Hunan 410004, China)

[KEY WORDS] Paclitaxel; Cathepsin K; TNF- α ; NF- κ B

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Paclitaxel on TNF- α induced human umbilical vein endothelial cells expression of Cat K and NF- κ B and explore the mechanism of paclitaxel inhibiting intimal hyperplasia. **Methods** HUVEC in the third to sixth generation were used in the present study. The cells were treated with different concentrations of paclitaxel for 1 hour and then with 10 μ g/L TNF- α were added into it for 24 hours, mRNA and protein level of Cathepsin K and NF- κ B were measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot respectively in these HUVEC. **Results** Paclitaxel could inhibit TNF- α induced Cathepsin K mRNA and Cathepsin K protein expression in a dose-dependent manner. There was no significant difference between 1 nmol/L paclitaxel group and TNF- α group; Paclitaxel could inhibit TNF- α induced Cathepsin K protein expression in a dose-dependent manner, comparing 1 nmol/L paclitaxel group and TNF- α group. Paclitaxel could inhibit TNF- α induced NF- κ B mRNA and NF- κ B protein expression in a dose-dependent manner. **Conclusion** Paclitaxel could decrease the expression of Cathepsin K and NF- κ B stimulated with TNF- α in a dose-dependent manner, paclitaxel may inhibit the activation of NF- κ B to reduce Cat K expression.

组织蛋白酶 K (cathepsin K, Cat K) 是组织蛋白酶家族中的重要成员, 能降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 促进血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 迁移, 在人动脉硬化斑块中可见 Cat K 的蛋白及基因表达水平增高^[1,2]; 普罗布考可

减少动脉硬化兔模型中的动脉斑块中 Cat S、Cat K 的表达来改善血管的重构^[3], 有研究表明, 冠心病患者血清中组织蛋白酶 K 水平升高, 并且组织蛋白酶 K 可能是冠心病有用的生物标志物^[4-5]。目前, 紫杉醇在再狭窄方面的基础研究多是关于紫杉醇对血管平

滑肌细胞增生抑制作用与机制,而完整内膜在防止血栓形成和再狭窄发生中起重要作用^[6],目前国内外对紫杉醇对组织蛋白酶研究很少,本研究观察紫杉醇对 TNF- α 诱导人脐静脉内皮细胞中 Cat K 表达的影响,探讨紫杉醇在防治内膜增生的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购自中科院上海细胞库,人 TNF- α (PeProteche公司),DMEM 培养基、胎牛血清购自上海 Gibco 公司,逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司,Trizol-reagent (Invitrogen 公司),琼脂糖 SABC 公司,PCR maker (天根公司),PCR 引物上海英骏生物公司,Cathepsin K 抗体、NF- κ B 抗体(Abcam 公司),紫杉醇(Sigma 公司),细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(Beyotime 公司)。

1.2 HUVEC

培养 HUVEC 用加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养。将培养瓶放入 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中,每隔 2~3 天换液一次,待细胞生长至融合状态时传代,取传至 3~4 代细胞进行实验。

1.3 不同浓度紫杉醇的配制

紫杉醇在 DMSO 中完全溶解后,用 DMEM 培养基稀释成 1 mmol/L 储存液,过滤除菌,保存备用。临用前再用 DMEM 培养基依次稀释为 1 nmol/L,10 nmol/L,100 nmol/L,1 μ mol/L。各药物中 DMSO 浓度均小于 0.05%。

1.4 实验分组

实验分为以下 6 组:(1)正常对照组:予 DMEM 培养 24 h;(2)TNF- α 组:予 10 μ g/L TNF- α 刺激 24 h;(3)1 nmol/L 紫杉醇组:予 1 nmol/L 紫杉醇作用 1 h 后加入 10 μ g/L TNF- α 刺激 24 h;(4)10 nmol/L 紫杉醇组:予 10 nmol/L 紫杉醇作用 1 h 后加入 10 μ g/L TNF- α 刺激 24 h;(5)100 nmol/L 紫杉醇组:予 100 nmol/L 紫杉醇作用 1 h 后加入 10 μ g/L TNF- α 刺激 24 h;(6)1 μ mol/L 紫杉醇组:予 1 μ mol/L 紫杉醇作用 1 h 后加入 10 μ g/L TNF- α 刺激 24 h。每组均设复孔,每组重复 3 次。

1.5 RT-PCR 检测 HUVEC 中 Cat K 和 NF- κ B mRNA 的表达

将收集的 HUVEC 用 Trizol 方法提取总 RNA。取 5 μ L RNA 用逆转录试剂盒逆转录为 cDNA。取 5 μ L cDNA 模板行 PCR。根据 Genbank 的基因序列,采用 primer 5 软件设计引物。引物由上海英骏生物

公司合成。Cat K 上游引物序列为:5'-ACTGGACT-CAAAGTACCCCT-3',下游引物序列为 5'-GCCATCAT-TCTCAGACACAG-3',长度为 258 bp;NF- κ B 上游引物序列为:5'-AGTAAAGCCCCCAATGCATC-3',下游引物序列为:5'-CCGAAGCTGGACAAACACAG-3',长度为 279 bp;选择 β -actin 作为半定量内对照引物,上游引物序列为:5'-ACACAGTGCTGTCTGGCG-3',下游引物序列为 5'-ATTTGCGGTGGACGATGG-3',长度为 234 bp。扩增条件为:95℃ 5 min 预变性后,94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 40 s,共 38 个循环。最后 72℃ 延伸 10 min。取 PCR 扩增产物 5 μ L 点样于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,溴化乙啶(EB)染色,紫外分光光度计观察电泳结果。

1.6 Western blot 检测 HUVEC 中 Cat K 和 NF- κ B 的表达

用 PBS 清洗诱导分化成熟的各组 HUVEC 2 次,收集细胞并分瓶,按 1 mL 裂解液加 10 μ L PMSF (100 mmol/L),摇匀置于冰上。每 EP 管细胞加 100 μ L 含 PMSF 的裂解液裂解,将离心后的上清和还原型 5 \times SDS 上样缓冲液以 4:1 比例以每管总 25 μ L 体积分装转移至 0.2 mL 小的 EP 管,以 100℃ 加热 10 min 使蛋白质变性,变性蛋白质放于 -80℃ 保存。蛋白上样量为每孔 30 μ g,10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,湿转法转移到 PVDF 膜上,10% 胶用 200 mA 转移 80 min 左右。含 5% BSA 的 TBST 室温下封闭 1~2 h,一抗(Cat K、NF- κ B,1:1000 稀释),4℃ 过夜,TBST 洗膜 10 min \times 3 次,二抗(1:5000 稀释)室温 1 h,TBST 洗膜 10 min \times 3 次,ECL 化学发光法显色、曝光。Quantity one 图像分析。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件包进行统计学处理。所有资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有数据进行正态性分布检验,符合正态性分布的多组样本间均数比较采用单因素方差分析,以双侧 $P < 0.05$ 作为显著性差异标准。

2 结果

2.1 不同浓度紫杉醇对 TNF- α 诱导 HUVEC 中 Cat K mRNA 表达的影响

正常对照组 HUVEC 基本未见明显 Cat K mRNA 表达;TNF- α 干预组 Cat K mRNA 较正常对照组明显增多;紫杉醇可以呈剂量依赖性地抑制 TNF- α 所致的 HUVEC 中 Cat K mRNA 的表达(均 $P < 0.05$;图 1 和表 1)。

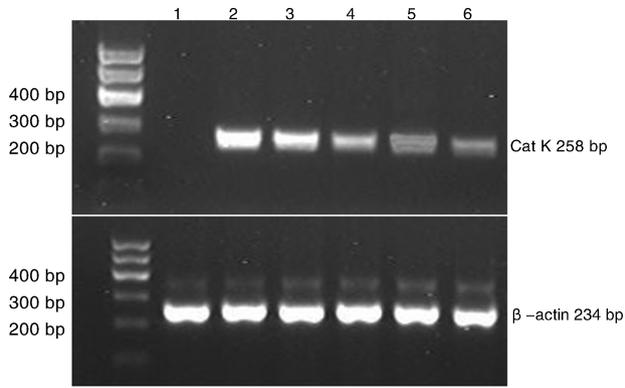


图 1. 不同浓度紫杉醇对 TNF- α 诱导 HUVEC 中 Cat K mRNA 表达的影响 上图为 Cat K 和 β -actin mRNA 在 HUVEC 表达的电泳图;下图为 Cat K mRNA 表达的半定量分析图。各组之间两两相互比较,均 $P < 0.05$ 。1 为正常对照组,2 为 10 $\mu\text{g/L}$ TNF- α 干预组,3 为 1 nmol/L 紫杉醇干预组,4 为 10 nmol/L 紫杉醇干预组,5 为 100 nmol/L 紫杉醇干预组,6 为 1 $\mu\text{mol/L}$ 紫杉醇干预组。

Figure 1. Effects of different concentrations of paclitaxel on TNF- α induced HUVEC expression of Cat K mRNA

表 1. 不同浓度紫杉醇对 TNF- α 诱导 HUVEC 中 Cat K mRNA 表达的影响

Table 1. Effects of different concentrations of paclitaxel on TNF- α induced HUVEC expression of Cat K mRNA

分 组	IOD
对照组	0.006 \pm 0.003
TNF- α	1.02 \pm 0.07
1 nmol/L	0.85 \pm 0.06
10 nmol/L	0.68 \pm 0.04
100 nmol/L	0.59 \pm 0.02
1 $\mu\text{mol/L}$	0.49 \pm 0.03

均 $P < 0.05$, 各组之间相互比较。

2.2 不同浓度紫杉醇对 TNF- α 诱导 HUVEC 中 Cat K 蛋白表达的影响

正常对照组 HUVEC 基本未见 Cat K 表达。TNF- α 干预组 Cat K 较正常对照组明显增多;紫杉醇可以呈剂量依赖性地抑制 TNF- α 所致的 HUVEC 中 Cat K 的表达(P 均 < 0.05 ;图 2 和表 2)。

2.3 不同浓度紫杉醇对 TNF- α 诱导 HUVEC 中 NF- κ B mRNA 表达的影响

正常对照组 HUVEC 可见 NF- κ B mRNA 表达;TNF- α 干预组 NF- κ B mRNA 较正常对照组明显增多;紫杉醇可以呈剂量依赖性地抑制 TNF- α 所致的 HUVEC 中 NF- κ B mRNA 的表达(均 $P < 0.05$;图 3 和表 3)。

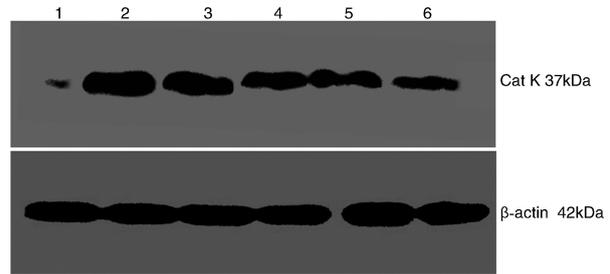


图 2. 不同浓度紫杉醇对 TNF- α 诱导 HUVEC 中 Cat K 表达的影响 上图为 Cat K 和 β -actin 在 HUVEC 表达的 WB 图;下图为 Cat K 表达的半定量分析图。各组之间两两相互比较,均 $P < 0.05$ 。1 为正常对照组,2 为 10 $\mu\text{g/L}$ TNF- α 干预组,3 为 1 nmol/L 紫杉醇干预组,4 为 10 nmol/L 紫杉醇干预组,5 为 100 nmol/L 紫杉醇干预组,6 为 1 $\mu\text{mol/L}$ 紫杉醇干预组。

Figure 2. Effects of different concentrations of paclitaxel on TNF- α induced HUVEC expression of Cat K

表 2. 不同浓度紫杉醇对 TNF- α 诱导 HUVEC 中 Cat K 表达的影响

Table 2. Effects of different concentrations of paclitaxel on TNF- α induced HUVEC expression of Cat K

分 组	IOD
对照组	0.004 \pm 0.003
TNF- α	1.08 \pm 0.07
1 nmol/L	0.87 \pm 0.03
10 nmol/L	0.77 \pm 0.05
100 nmol/L	0.66 \pm 0.07
1 $\mu\text{mol/L}$	0.52 \pm 0.04

各组之间相互比较,均 $P < 0.05$ 。

表 3. 不同浓度紫杉醇对 TNF- α 诱导 HUVEC 中 NF- κ B mRNA 表达的影响

Table 3. Effects of different concentrations of paclitaxel on TNF- α induced HUVEC expression of NF- κ B mRNA

分 组	IOD
对照组	0.24 \pm 0.03
TNF- α	0.98 \pm 0.07
1 nmol/L	0.86 \pm 0.06
10 nmol/L	0.66 \pm 0.04
100 nmol/L	0.54 \pm 0.03
1 $\mu\text{mol/L}$	0.42 \pm 0.04

均 $P < 0.05$, 各组之间相互比较。

2.4 不同浓度紫杉醇对 TNF- α 诱导 HUVEC 中 NF- κ B 蛋白表达的影响

正常对照组 HUVEC 可见少量 NF- κ B 表达。TNF- α 干预组 NF- κ B 较正常对照组明显增多;紫杉醇可以呈剂量依赖性地抑制 TNF- α 所致的 HUVEC

中 NF- κ B 的表达 (P 均 < 0.05 ; 图 4 和表 4)。

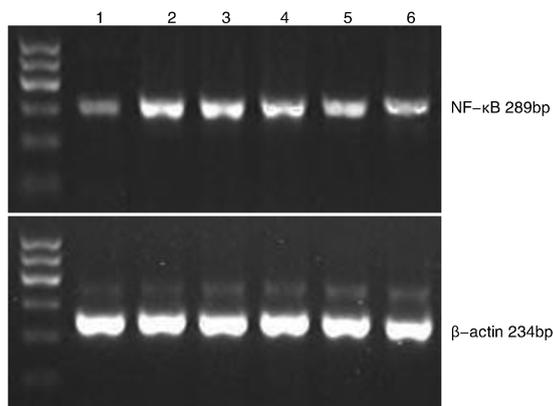


图 3. 不同浓度紫杉醇对 TNF- α 诱导 HUVEC 中 NF- κ B mRNA 表达的影响 上图为 NF- κ B 和 β -actin mRNA 在 HUVEC 表达的电泳图; 下图为 Cat K mRNA 表达的半定量分析图。各组之间两两相互比较, 均 $P < 0.05$ 。1 为正常对照组, 2 为 10 μ g/L TNF- α 干预组, 3 为 1 nmol/L 紫杉醇干预组, 4 为 10 nmol/L 紫杉醇干预组, 5 为 100 nmol/L 紫杉醇干预组, 6 为 1 μ mol/L 紫杉醇干预组。

Figure 3. Effects of different concentrations of paclitaxel on TNF- α induced HUVEC expression of NF- κ B mRNA

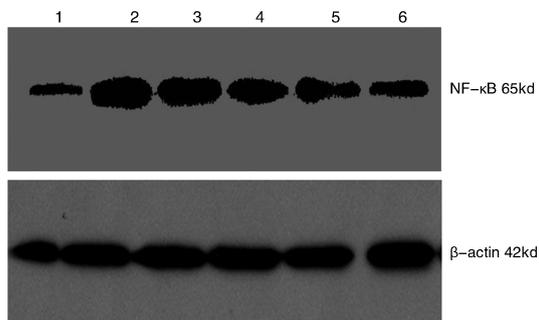


图 4. 不同浓度紫杉醇对 TNF- α 诱导 HUVEC 中 NF- κ B 表达的影响 上图为 NF- κ B 和 β -actin 在 HUVEC 表达的 WB 图。下图为 NF- κ B 表达的半定量分析图。各组之间两两相互比较, 均 $P < 0.05$ 。1 为正常对照组, 2 为 10 μ g/L TNF- α 干预组, 3 为 1 nmol/L 紫杉醇干预组, 4 为 10 nmol/L 紫杉醇干预组, 5 为 100 nmol/L 紫杉醇干预组, 6 为 1 μ mol/L 紫杉醇干预组。

Figure 4. Effects of different concentrations of paclitaxel on TNF- α induced HUVEC expression of NF- κ B

3 讨论

有研究表明, 新生内膜形成是动脉粥样硬化、再狭窄等血管病理改变时的重要特征之一^[7]。在血管成形术后再狭窄的过程中, VSMC 从中膜向内

达的影响

Table 4. Effects of different concentrations of paclitaxel on TNF- α induced HUVEC expression of NF- κ B

分 组	IOD
对照组	0.23 \pm 0.03
TNF- α	0.93 \pm 0.04
1 nmol/L	0.84 \pm 0.07
10 nmol/L	0.70 \pm 0.06
100 nmol/L	0.62 \pm 0.06
1 μ mol/L	0.43 \pm 0.05

均 $P < 0.05$, 各组之间相互比较。

膜迁移是导致新生内膜形成和增厚的一个重要因素。VSMC 在迁移过程中需要利用组织蛋白酶等蛋白水解酶溶解 ECM, 实现细胞迁移^[8-9]。

组织蛋白酶是指一类在酸性环境中被活化的溶酶体蛋白酶, 属木瓜蛋白酶。人组织蛋白酶主要分为 B、C、D、F、H、K、L、O、S、V、W 和 X 等十二种亚型, 大部分是半胱氨酸蛋白酶, 其余是天冬氨酸或丝氨酸蛋白酶。组织蛋白酶定位于溶酶体和包涵体, 功能为降解不需要的细胞内基质或内吞蛋白^[10-12]。Cat K 是半胱氨酸蛋白酶超家族中的重要成员, 能降解弹力纤维和 I、III 和 IV 型胶原纤维^[13]。Cat K 可以促进 ECM 的降解, 与 VSMC 迁移密切相关^[9]。

TNF- α 是一个多效的促炎症因子, 具有促进动脉粥样硬化形成的特点。TNF- α 由单核细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞等多种细胞表达, 可以调节其它炎症因子和细胞因子的表达^[14]。TNF- α 可通过 NF- κ B 和 PPAR- γ 机制促进低密度脂蛋白跨人脐静脉内皮细胞转运, 促进动脉粥样硬化发生^[15]。在大鼠颈动脉球囊损伤后, TNF- α 抑制物苦参提取物能明显减少损伤血管内膜的 TNF- α 的表达及血管内膜增生^[16]; TNF- α 的抑制剂可能会抑制内皮功能障碍的进展, 减慢动脉粥样硬化进程^[17]。正常情况下血管内皮细胞和平滑肌细胞并没有明显 Cat K 表达, 但是予 TNF- α 等炎症因子刺激后 Cat K 可以明显表达, 本研究结果与一些相关研究结果相似^[9, 18]。

NF- κ B 是参与炎症反应的重要转录因子, 是多种信号通路的共同转录因子。目前有研究提示, 牛樟芝可以通过抑制 LOX-1, P38MAPK 和 NF- κ B 的表达减轻主动脉血管内皮脂质损伤, 更好地防治血管内皮细胞氧化脂质的伤害^[19]。本研究中紫杉醇可抑制 TNF- α 诱导的 HUVEC 中 Cat K 表达, 减少 HUVEC 中 NF- κ B 的表达, 并且随着紫杉醇浓度的增高, 其抑制作用越来越强。10 nmol/L 紫杉醇就可

较明显抑制 HUVEC 中 Cat K 和 NF- κ B 的表达。研究结果提示,紫杉醇可能通过抑制 NF- κ B 的信号通路来减少 Cat K 的表达。

紫杉醇是从紫杉树皮中提取得到的,它还具有抗肿瘤血管形成和诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[20]。能特异性地与细胞中微管和 β -微管蛋白结合,促进微管形成,拮抗 β -微管蛋白的解聚,使大量微管非正常地聚合,从而改变细胞骨架的平衡状态,产生结构的畸变,导致其失去正常的功能。造成细胞发育停止于 G₀/G₁ 期和 G₁/M 期,细胞的有丝分裂阻止于丝状分裂期,从而抑制血管平滑肌细胞的分裂、增殖,减少再狭窄的发生。有研究发现棉酚,一种有抗癌和抗炎效应潜力的棉花提取物,棉酚通过抑制 NF- κ B 活性的降低肿瘤坏死因子 α 诱导的细胞间粘附分子 1 的表达,此外 TNF- α 诱导的 NF- κ B 活化在棉酚的作用下受到抑制。棉酚没有直接抑制 NF- κ B 的结合的 DNA,而是通过磷酸化 I κ B 的降解和抑制 p65 和 p50 的核易位^[21]。有研究证实,在体内联合使用紫杉醇与组织蛋白酶抑制剂显著增强针对原发性和转移性肿瘤的功效^[22]。在本研究中,紫杉醇可能通过抑制内皮细胞中 Cat K 的表达减少血管平滑肌细胞和内皮细胞的迁移,这种作用可能是通过抑制 NF- κ B 信号转导来实现的,本研究为紫杉醇应用于防治支架内再狭窄提供了实验依据。

[参考文献]

[1] Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, et al. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells[J]. Clin Invest, 1998, 102(3): 576-583.

[2] Sun J, Sukhova GK, Zhang J, et al. Cathepsin K deficiency reduces elastase perfusion-induced abdominal aortic aneurysms in mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(1): 15-23.

[3] Li TT, Xie Y, Guo Y, et al. Effect of probucol on vascular remodeling due to atherosclerosis in rabbits; an intravascular ultrasound study[J]. 2011, 124(12): 1 840-847.

[4] Xiang Li, Yuzi Li, Jiyong Jin, et al. Increased Serum Cathepsin K in Patients with Coronary Artery Disease[J]. Yonsei Med J, 2014, 55(4): 912-919.

[5] Cheng XW, Kikuchi R, Ishii H, et al. Circulating cathepsin K as a potential novel biomarker of coronary artery disease[J]. Atherosclerosis, 2013, 228(1): 211-216.

[6] Losordo DW, Isner JM, Diaz-Sandoval LJ. Endothelial recovery the next target in restenosis prevention [J]. Circulation, 2003, 107(21): 2 635-637.

[7] Kiernan TJ, Kiernan GD, Yan BD. Coronary artery restenosis: a paradigm of current treatment approaches[J]. Minerva Cardioangi-ol, 2009, 57(1): 77-94.

[8] Samokhin AO, Wong A, Saftig P, et al. Role of cathepsin K in structural Changes in brachiocephalic artery during progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice[J]. Atherosclerosis, 2008, 200(1): 58-68.

[9] Lutgens SP, Cleutjens KB, Daemen MJ, et al. Cathepsin cysteine proteases in cardiova-scular disease[J]. FASEB J, 2007, 21(12): 3 029-041.

[10] Turk B, Turk D, Turk V. Protease signalling: the cutting edge [J]. EMBO J, 2012, 31(7): 1 630-643.

[11] Cheng XW, Huang Z, Kuzuya M, et al. Cysteine protease cathepsins in atherosclerosis-based vascular disease and its complications [J]. Hypertension, 2011, 58(6): 978-986.

[12] Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, et al. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1 824(1): 68-88.

[13] Helse S, Syv ranta S, Lindstedt KA, et al. Increased expression of elastolytic cathepsins S, K, and V and their inhibitor cystatin C in stenotic aortic valves[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(8): 1 791-798.

[14] McKellar GE, McCarey DW, Sattar N, et al. Role for TNF in atherosclerosis Lessons from autoimmune disease[J]. Nat Rev Cardiol, 2009, 6(6): 410-417.

[15] Zhang Y, Yang X, Bian F, et al. TNF- α promotes early atherosclerosis by increasing transcytosis of LDL across endothelial cells: crosstalk between NF- κ B and PPAR- γ [J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 72: 85-94.

[16] Long G, Wang G, Ye L, Important role of TNF-alpha in inhibitory effects of Radix Sophorae Flavescentis extract on vascular restenosis in a rat carotid model of balloon dilatation injury[J]. Planta Med, 2009, 75(12): 1 293-299.

[17] Murdaca G, Spanò F, Cagnati P, et al. Free radicals and endothelial dysfunction: potential positive effects of TNF- α inhibitors [J]. Redox Rep, 2013, 18(3): 95-99.

[18] Lafarge JC, Naour N, Clément K, et al. Cathepsins and cystatin C in atherosclerosis and obesity[J]. Biochimie, 2010, 92(11): 1 580-586.

[19] Qi J, Tao Y, Zhang J, et al. Effect of Anrodia cinnamomea on gene expression related to aortal endothelial injury in rats with hyperlipidemia[J]. Zhong Guo Zhong Yao Za Zhi, 2014, 39(9): 1 670-674.

[20] Klauber N, Parangi S, Flynn E, et al. Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol[J]. Cancer Res, 1997, 57(1): 81-82.

[21] Moon DO, Choi YH, Moon SK, et al. Gossypol decreases tumor necrosis factor- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression via suppression of NF- κ B activity [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(4): 999-1 005.

[22] Shree T, Olson OC, Elie BT, et al. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer [J]. Genes Dev, 2011, 25(23): 2 465-479.