

· 药理 ·

蓬子菜总黄酮对氧化损伤人脐静脉内皮细胞 NF- κ B/I κ B 信号途径的影响

张紫阳¹, 马英丽², 董晶¹, 李瑞¹, 董均明¹, 朱玉良¹, 马玲^{1*}

(1. 哈尔滨医科大学 流行病学教研室, 哈尔滨 150081; 2. 黑龙江中医药大学 药学院, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:研究蓬子菜总黄酮(FGV)对过氧化氢(H₂O₂)损伤的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)保护作用的机制。方法:采用体外培养的HUVECs,取对数生长期的细胞调整细胞密度为7.5×10⁴/mL,置培养箱中培养至细胞达80%融合时,将细胞随机分为5组:空白组、模型组(仅加入浓度为100 μmol·L⁻¹的H₂O₂培养4h),FGV保护组(质量浓度分别为12.5,25,50 mg·L⁻¹的FGV培养24h,之后加入浓度为100 μmol·L⁻¹的H₂O₂培养4h),每组设4个复孔。采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法检测细胞增殖抑制率;荧光分光光度法测定超氧化物歧化酶(SOD)的活性以及丙二醛(MDA)的含量;酶联免疫分析方法(ELISA)检测血栓调节蛋白(TM)和血管内皮细胞生长因子(VEGF)的分泌水平。逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测核因子- κ B(NF- κ B)/NF- κ B抑制因子(I κ B)mRNA表达。结果:模型组细胞MDA,TM,VEGF分泌水平以及NF- κ B mRNA表达均显著升高($P < 0.01$),SOD活性显著降低($P < 0.01$);FGV保护组可显著降低模型细胞增殖抑制率,MDA,TM,VEGF分泌水平以及NF- κ B mRNA表达($P < 0.05$, $P < 0.01$),提高SOD活性($P < 0.01$)。结论:FGV具有明显的抗氧化损伤及保护HUVECs的作用,其机制可通过对NF- κ B/I κ B信号途径的调节。

[关键词] 蓬子菜总黄酮;人脐静脉内皮细胞;过氧化氢;抗氧化;核因子- κ B/核因子- κ B抑制因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0107-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015010107

Effects of Total Flavones of *Galium verum* on NF- κ B/I κ B Signal Pathway in Human Umbilical Vein Endothelial Cells Injured by Hydrogen Dioxide ZHANG Zi-yang¹, MA Ying-li², DONG Jing¹, LI Rui¹, DONG Jun-ming¹, ZHU Yu-liang¹, MA Ling^{1*} (1. Department of Epidemiology of Haerbin Medical University, Haerbin 150081, China; 2. Pharmaceutical College of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Haerbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of total flavones of *Galium verum* (FGV) on protecting in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) injured by hydrogen dioxide (H₂O₂). **Method:** HUVECs were cultured *in vitro*. An H₂O₂ injured model was established, FGV at dose of 12.5, 25, 50 mg·L⁻¹ was cultured with the cells for 24 h before the model establishment. HUVECs were randomly divided into five groups: normal control group, model group, and FGV group (12.5, 25, 50 mg·L⁻¹). Cell viability was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The activity of superoxide dismutase (SOD) and the secretion levels of malondialdehyde (MDA) were determined by spectrophotometry. The secretion levels of thrombomodulin (TM) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were determined using ELISA. The expression levels of NF-kappa B (NF- κ B) mRNA and NF-kappa B inhibitor (I κ B) mRNA were measured by RT-PCR. **Result:** The content of MDA, TM, VEGF and NF- κ B mRNA were markedly increased in model group ($P < 0.01$). Compared to model group, FGV group could reduce the proliferation inhibition of HUVECs, depress the content of MDA, improve the activity of SOD, decrease the secretion levels of TM and VEGF, down-regulated the expression of NF- κ B mRNA ($P < 0.05$,

[收稿日期] 20140715(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274034)

[第一作者] 张紫阳, 硕士, 从事中药作用机制研究, Tel:18645054037, E-mail:784692533@qq.com

[通讯作者] * 马玲, 博士, 教授, 从事中药抗肿瘤作用机制研究, Tel:13654657092, E-mail:malinghai@126.com

$P < 0.01$). **Conclusion:** FGV has a protective effect on the HUVECs impairment induced by H_2O_2 , and the potential mechanism of action may be associated with down-regulating the expression of NF- κ B mRNA.

[**Key words**] total flavones of *Galium verum*; human umbilical vein endothelial cells; hydrogen dioxide; antioxidant; NF-kappa B/NF-kappa B inhibitor

血管内皮细胞具有调节血管平滑肌张力、抗血栓形成、抗炎的生理功能,其功能障碍被认为是多种心血管病变发生的始动因素。血管内皮损伤与血栓形成有着密切联系,血栓可以导致某些致命的疾病,如心肌梗死、脑梗死以及动脉粥样硬化等^[1]。氧化应激反应是人体血管内皮细胞受损的一个重要因素。越来越多的研究证实,从中药和天然植物中提取的黄酮类化合物具有明显的抗氧化、清除自由基的作用,并以其作用多靶点、整体调节、安全无毒等特点被人们所重视,已成为当今研究的热点,在心血管系统疾病的防治中具有广阔的应用前景。临床上已经应用黄酮类药物对心、脑血管疾病和周围血管病的治疗,并取得了令人满意的效果^[2-4]。本研究在体外细胞培养条件下,建立细胞氧化应激模型,研究蓬子菜总黄酮对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)抗氧化损伤及保护作用的机制。

1 材料

1.1 药物 蓬子菜 *Galium verum* 总黄酮(FGV),纯度为 75%,由黑龙江中医药大学馈赠,批号 20130115。

1.2 试剂 新生牛血清、RPMI-1640 培养基(Hyclone 公司),青霉素、链霉素(哈尔滨制药六厂,批号 20131011),MTT 试剂(Sigma 公司),血栓调节蛋白(TM)和血管内皮细胞生长因子(VEGF)检测试剂盒(美国 R&D 公司,批号 JM21449E, JM20098E),SOD 和 MDA 检测试剂盒(南京建成生物公司,批号 20141212A001-1, 20131210A003-2),逆转录 PCR 试剂盒(日本 Takara 公司,批号 RR014A),引物合成于生工生物公司(批号 HC_318928),琼脂糖(法国 Biowest 公司)。

1.3 细胞 HUVECs(南京凯基生物技术有限公司)。

1.4 仪器 HF90 CO_2 恒温培养箱(香港 Heal Force 公司),CKX41 倒置显微镜及 BX43 荧光显微镜(日本 Olympus 公司),Synergy2 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司),PCR System 9700 仪(美国 ABI 公司),722 可见分光光度计(上海佑科仪器有限公司),Nano Drop 2000c 微量紫外分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司),5415R 低温高速离心机(德

国 Eppendorf 公司),DK-8D 电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司),EC3 凝胶成像系统(美国 UVP 公司)。

2 方法

2.1 培养 HUVECs HUVECs 在含有 10% 新生牛血清的 1640 培养基中,并放置在 $37\text{ }^\circ\text{C}$,5% CO_2 培养箱中培养。当 HUVECs 密度达 80% ~ 90% 时,弃掉培养液,用 PBS 洗涤两遍,然后加入 2 mL 消化液(0.02% EDTA 和 0.25% 胰酶),放置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中消化 1 min。经倒置显微镜观察,细胞变圆、收缩、细胞间隙增大时,弃去消化液,加入 2 mL 培养基终止消化,轻轻吹打细胞贴壁面,制成单细胞悬液,继续培养。

2.2 建立 H_2O_2 氧化损伤模型 将不同浓度的 H_2O_2 (100,200,400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 加入到 HUVECs 培养基中,经过不同时间的培养(4,6,8 h),进行损伤造模。最终选定 H_2O_2 氧化损伤浓度为 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,作用时间为 4 h。

2.3 测定 HUVECs 增殖抑制率 取对数生长期的细胞调整细胞密度为 $7.5 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 96 孔板中,置培养箱中培养至细胞达 80% 融合时,本实验均将细胞随机分为 5 组:空白组、模型组(仅加入浓度为 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 培养 4 h),FGV 保护组(质量浓度分别为 12.5,25,50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 FGV 培养 24 h,之后加入浓度为 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 培养 4 h)。用 MTT 法检测细胞的增殖抑制率。MTT 法按以下步骤进行:将 96 孔培养皿中上清液弃掉,每孔加入 20 μL MTT($5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 4 h,弃上清,每孔加入 200 μL DMSO, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 摇床震荡 10 min,使用全自动酶标仪于 490 nm 处测定其吸光度(A),按下式计算细胞增殖抑制率:

$$\text{细胞增殖抑制率} = (1 - \text{实验组 } A / \text{对照组 } A) \times 100\%$$

2.4 测定内皮细胞培养液中 SOD 活性和 MDA 分泌水平 同实验 2.3 处理细胞后,取各组细胞上清液作为待测样本,按照 SOD 和 MDA 试剂盒说明书,利用荧光分光光度计分别检测 SOD 的活力和 MDA 的分泌水平。

2.5 检测 TM 和 VEGF 水平 同实验 2.3 处理细胞后,取各组细胞上清液作为待测样本,按试剂盒说

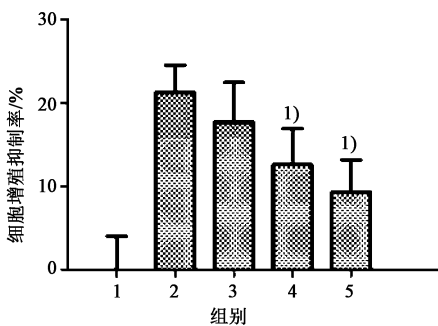
说明书检测 TM, VEGF 的分泌水平。

2.6 检测 NF- κ B/I κ B mRNA 表达 同实验 2.3 细胞处理, 收集各组细胞, 提取各组细胞总 RNA, 鉴定 RNA 完整性及纯度, 利用 RT-PCR 法检测 NF- κ B/I κ B mRNA 表达。按照 Takara 公司逆转录试剂盒合成 cDNA 第一链, PCR 扩增基因。NF- κ B 上游引物 5'-TCGTTTCCGTTATGTATGT-3', NF- κ B 下游引物 5'-CCTTGGGTCCAGCAGTTA-3', 扩增片段为 227 bp; I κ B 上游引物 5'-TCACCAACCAGCCAGAAAT-3', 下游引物 5'-CATCAGCACCCAAGCACAC-3', 扩增片段为 267 bp; GAPDH 上游引物 5'-TGTCGCTGTTGAAGTCAGAG-3', 下游引物 5'-TCACCATCTTCCAGGAGCGAG-3', 扩增片段为 649 bp。反应参数为: 95 °C 预变性 4 min, 95 °C 变性 30 s, NF- κ B 和 GAPDH 54.8 °C 退火 30 s (I κ B 64 °C 退火 30 s), 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统拍摄照片, 并对各目的 DNA 条带扫描, 以 GAPDH 为内参, 分析各基因相对表达水平。

2.7 统计学处理 统计处理采用 SPSS 17.0 统计软件, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行方差分析, 组间两两比较采用 SNK 法, $P < 0.05$ 为有统计意义。

3 结果

3.1 对 H₂O₂ 损伤的 HUVECs 增殖作用的影响 FGV 具有明显的保护细胞的作用, 与模型组比较, FGV 组 (25, 50 mg·L⁻¹) 细胞增殖抑制率显著降低 ($P < 0.05$)。见图 1。



1. 空白组; 2. 模型组; 3. FGV 12.5 mg·L⁻¹ 组; 4. FGV 25 mg·L⁻¹ 组; 5. FGV 50 mg·L⁻¹ 组 (图 2~3 同)

图 1 FGV 对 H₂O₂ 损伤的 HUVECs 增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 1 The inhibition effect of FGV in HUVECs injured by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.2 对 H₂O₂ 损伤的 HUVECs 中 SOD 和 MDA 水平的影响 H₂O₂ 显著降低了 SOD 的活性, 升高了

MDA 的分泌水平 ($P < 0.01$); 观察 FGV 各剂量组的情况, 随着 FGV 的浓度增高, SOD 的活性也逐步升高, 而 MDA 的分泌水平降低, 呈浓度依赖关系, 除低质量浓度 FGV 组 MDA 外, 其他各组与模型组比差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 FGV 对 H₂O₂ 损伤的 HUVECs 分泌 SOD/MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Effect of FGV on the content of SOD/MDA in HUVECs injured by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	SOD /U·mL ⁻¹	MDA / μ mol·L ⁻¹
空白	-	9.76 \pm 0.81 ¹⁾	1.64 \pm 0.19 ¹⁾
模型	-	5.18 \pm 0.31 ¹⁾	5.75 \pm 0.68 ¹⁾
FGV	12.5	6.34 \pm 0.23 ¹⁾	5.14 \pm 0.53
	25	6.75 \pm 0.25 ¹⁾	3.83 \pm 0.35 ¹⁾
	50	6.96 \pm 0.23 ¹⁾	2.64 \pm 0.47 ¹⁾

注: 与模型组相比¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对 H₂O₂ 损伤的 HUVECs 中 TM 和 VEGF 蛋白分泌的影响 H₂O₂ 损伤显著提高 TM 与 VEGF 的分泌水平, $P < 0.01$; 观察 FGV 各剂量组随着 FGV 浓度增高, TM 与 VEGF 的分泌水平逐渐下降, 除低质量浓度 FGV 组 TM 外, 其余各组与模型组比差异都有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 FGV 对 H₂O₂ 损伤的 HUVECs 分泌 TM, VEGF 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Effect of FGV on the content of TM, VEGF in HUVECs injured by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	TM / μ g·L ⁻¹	VEGF /ng·L ⁻¹
空白	-	1.62 \pm 0.36 ²⁾	72.47 \pm 10.94 ²⁾
模型	-	8.08 \pm 0.30	114.58 \pm 6.38
FGV	12.5	6.59 \pm 0.60	92.47 \pm 6.83 ¹⁾
	25	5.73 \pm 0.26 ²⁾	94.42 \pm 1.94 ¹⁾
	50	1.35 \pm 0.08 ²⁾	81.41 \pm 0.73 ²⁾

注: 与模型组相比¹⁾ $P < 0.05, ^{2)} P < 0.01$ 。

3.4 对 H₂O₂ 损伤的 HUVECs 中 NF- κ B, I κ B mRNA 相对表达量的影响 H₂O₂ 损伤显著提高 NF- κ B mRNA 的相对表达量 ($P < 0.01$); FGV 保护组, 随着药物浓度上升 NF- κ B mRNA 的表达量逐步下降, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。无论在模型组还是 FGV 保护组, I κ B mRNA 的相对表达量均没有明显变化。见图 2, 3。

4 讨论

氧化应激具有可改变血管内皮细胞合成或释放

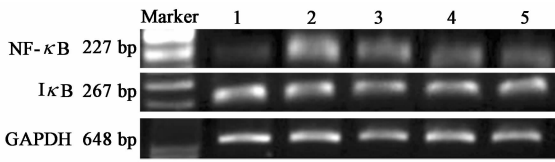


图 2 FGV 对 H₂O₂ 损伤的 HUVECs 中 NF-κB, IκB mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effect of FGV on the expression of NF-κB, IκB mRNA in HUVECs injured by H₂O₂

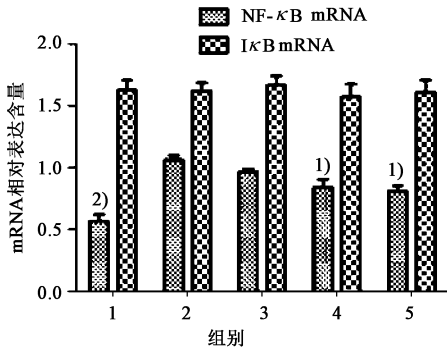


图 3 FGV 对 H₂O₂ 损伤的 HUVECs 中 NF-κB, IκB mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 3 Effect of FGV on the expression of NF-κB, IκB mRNA in HUVECs injured by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

多种重要的血管活性物质的功能,被认为是心、脑血管疾病以及多种血管性疾病重要的致病因素之一^[5]。研究表明,多种天然植物和中草药中含有黄酮类化合物,其中蓬子菜是自然界中一类含有 2-苯基色原酮(flavone)结构的植物,其主要成分为黄酮类化合物(flavonoids),具有很好的抗氧化以及清除氧自由基等多种活性,近年来在抗肿瘤、抗炎、抗心脑血管疾病及保肝的研究中备受关注^[6-7]。

研究表明黄酮类化合物可以与活性氧形成比较稳定的化合物,以使活性氧更加稳定,达到清除自由基的作用^[8]。SOD 是机体一种十分重要的酶,在细胞抗氧化系统中扮演重要角色,可以清除细胞内的活性氧物质,在维持细胞氧化与抗氧化平衡中起着重要的作用^[9]。MDA 是细胞脂质过氧化最重要的氧化产物之一,也是评价细胞氧化损伤严重程度的重要生物标志物^[10]。笔者在实验中观察到,加入外源性 H₂O₂ 能使 HUVECs 发生膜脂质过氧化反应,使 MDA 分泌增加,SOD 活性降低,证实细胞脂质过氧化作用增强而抗氧化能力降低^[11]。实验中将 FGV 保护组与 H₂O₂ 模型组比较发现,随着药物浓度的升高 SOD 活性逐步增加,而 MDA 的分泌减少。证明 FGV 对于活性氧的损伤具有很好的保护作用。

TM 是 HUVECs 膜表面一种糖蛋白,作为凝血酶活化蛋白细胞所必须的辅助因子,可以有效的与凝血酶结合,使其减弱了活化纤维蛋白原的能力,从而抑制血栓形成,防止凝血,维持血液非凝状态^[12]。许多研究表明,当内皮细胞受到损伤时,细胞膜上的 TM 被裂解成可溶性片段释放进入血液,因此,可溶性 TM 水平就会升高而与凝血酶原的亲合力就会降低^[13]。在正常生理状态下,TM 的浓度很低,笔者的实验证实,模型组 TM 浓度显著升高,而在 FGV 保护组,随着药物的浓度的增加,使 TM 分泌水平逐步下降。因此,进一步证明了 FGV 有抵抗 H₂O₂ 对 HUVECs 的损伤作用。VEGF 是血管生成过程中最重要的调节因子之一^[14]。VEGF 是血管早期形成的关键因子,对血管增殖、迁移、变异等有重要作用^[15]。为了证明 FGV 对血管调节因子的作用,笔者对模型组和保护组分别进行观察。实验结果表明 FGV 保护组明显减少 VEGF 的分泌水平。

NF-κB 是机体重要的细胞转录调节因子之一,能调节多种与炎症反应相关的细胞因子、炎症介质、黏附分子、蛋白酶类的基因转录进程以及相关免疫基因表达,与细胞增生、转化和凋亡等重要的病理生理过程密切相关^[16]。Cominacini L 等人研究证实 NF-κB 的激活是动脉粥样硬化的始动机制^[17]。NF-κB/IκB 途径也被认为是炎症信号传导的关键。NF-κB 在机体中的活化形式为二聚体,其中由 NF-κB 家族成员间形成的 p50/p65 异源二聚体最为丰富,几乎存在于所有的细胞中。IκB 是 NF-κB 的内源性抑制蛋白,通过多种途径抑制 NF-κB 的功能,常与 NF-κB 以三聚体形式存在于细胞胞浆中并处于非活化状态,使其不具有调节基因转录的能力。当细胞受到各种刺激后,信号经由不同的方式激活 IκB 激酶(IKK),IKK 进一步将 IκB 磷酸化,于是受其抑制的 NF-κB 得以释放,与 IκB 解离,转入核内与靶基因 κB 位点发生特异性结合增强其表达,从而促进相关基因的转录以及炎症因子的表达^[18-19]。本研究发现,模型组中 NF-κB mRNA 的表达上调,而在保护组中,FGV 能显著抑制 H₂O₂ 诱导的 HUVECs 中 NF-κB mRNA 的表达,而 IκB mRNA 的表达没有明显的改变。提示 FGV 的抗氧化作用可通过降低 NF-κB mRNA 的表达,抑制 NF-κB/IκB 通路活化实现的。

综上所述,笔者的实验研究结果表明,FGV 对于 HUVECs 有明显的保护作用,其抗氧化损伤的作用机制与调节 NF-κB/IκB 信号途径相关。

[参考文献]

- [1] 刘海云,崔艳茹,伍庆华,等. 菟丝子总黄酮对过氧化氢损伤的血管内皮细胞的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(18):215-218.
- [2] 孙静,程嘉艺,滕丹,等. 槲皮素对 H₂O₂ 致内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):174-176.
- [3] Azidah Ugusman, Zaiton Zakaria, Chua Kien Hui, et al. Piper Sarmmentosum increases nitric oxide production in oxidative stress; a study on human umbilical vein endothelial cells[J]. Clinics, 2010, 65(7):709-714.
- [4] 赵钢,吕勃川,孙秋. 蓬子菜水溶液对股动脉硬化闭塞症家兔模型血清 C-反应蛋白的影响[J]. 中医药学报,2010,38(1):20-22.
- [5] Hong-Tao Liu, Wen-Ming Li, Gang Xu, et al. Chitosan oligosaccharides attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in human umbilical vein endothelial cells [J]. Pharmacological Research,2009, 59:167-175.
- [6] 张景欣,王宽宇,孟祥河. 蓬子菜注射液抑制大鼠足肿胀作用的研究[J]. 工企医刊,2012,15(3):32-33.
- [7] 崔明宇,冀有良,苏连杰,等. 蓬子菜的化学成分与药理作用[J]. 国外医药:植物药分册,2008, 23(3):112-114.
- [8] Abdul Hamid Hafizah, Zakaria Zaiton, Amom Zulkhain, et al. Piper sarmmentosum as an antioxidant on oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells induced by hydrogen peroxide [J]. Biomed & Biotechnol, 2010, 11(5):357-365.
- [9] 王宇霆,周海燕,吕小翠. 白藜芦醇对过氧化氢氧化应激损伤人脐静脉血管内皮细胞的保护作用[J]. 中华医学杂志,2013,93(15):1174-1177.
- [10] Guo Hualei, Chen Yanling, Liao Lizhen. Resveratrol protects HUVECs from oxidized-LDL induced oxidative damage by autophagy upregulation via the AMPK/SIRT1 pathway[J]. Cardiovasc Drugs, 2013, 27:189-198.
- [11] 蒋兴亮,刘素兰,易婷婷. 高同型半胱氨酸血症患者氧化应激指标的研究[J]. 检验医学,2014, 29(2):125-129.
- [12] 叶攀,陈司海,王欢,等. 去天冬氨酸血管紧张素-I 对人脐静脉内皮细胞的保护作用[J]. 岭南心血管病杂志, 2010,16(1):48-54.
- [13] 王胜男,叶攀,敖杰男. 丹参素对过氧化氢所致人脐静脉内层细胞损伤的保护作用研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(1):66-69.
- [14] Liu Ge, Liu Ming, Wei Jianteng, et al. CS5931, a novel polypeptide in ciona savignyi, represses angiogenesis via inhibiting vascular endothelial growth factor (VEGF) and Matrix Metalloproteinases (MMPs) [J]. Marine Drugs, 2014, 12:1530-1544.
- [15] Yan Bai, Yue Leng, Guangfu Yin, et al. Effects of combinations of BMP-2 with FGF-2 and/or VEGF on HUVECs angiogenesis *in vitro* and CAM angiogenesis *in vivo* [J]. Cell Tissue Res, 2014, 356(1):109-121.
- [16] 谢磊,刘应柯,宫璀璨,等. 脂脉宁对 H₂O₂ 诱导 VEC-304 细胞表达 NF- κ B 及 HSP-70 的影响[J]. 实用医药杂志,2009,26(8):48-52.
- [17] Cominacini L, Pasini A F, Garbin U. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappa through an increased production of intracellular reactive oxygen species [J]. J Bio Chem, 2000, 275(17):12633-12638.
- [18] Hye Yeon Cho, Chung Mu Park, Mi Jeong Kim, et al. Comparative effect of genistein and daidzein on the expression of MCP-1, eNOS, and cell adhesion molecules in TNF- α -stimulated HUVECs [J]. Nutr Res Pract, 2011, 5(5):381.
- [19] Avraham Yaron, Hedva Gonen, Irit Alkalay, et al. Inhibition of NF- κ B cellular function via specific targeting of the I κ B-ubiquitin ligase [J]. EMBO J, 1997, 16(21):6486-6494.

[责任编辑 聂淑琴]