

β-榄香烯对血管内皮细胞功能紊乱和血管平滑肌细胞异常增殖的影响

段兰兰^{1,2}, 董菁^{1,2}, 范香成^{1,2}, 朱俊艺^{1,2}, 张逸凡^{1,2}, 韩吉春^{1,2}, 尚靖^{1,2,3*}

(¹中国药科大学中药学院,南京 211198; ²中国药科大学江苏省中药评价与转化重点实验室,南京 211198; ³中国药科大学天然药物活性组分与药效国家重点实验室,南京 210009)

摘要 研究β-榄香烯是否能改善低剪切力(LSS)诱导的血管内皮细胞功能紊乱和氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移。分别采用平行板流动腔和ox-LDL建立血管内皮细胞(ECs)功能紊乱模型和血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖和迁移模型,并检测β-榄香烯对ECs功能紊乱和VSMCs增殖迁移的影响。DHE法检测ECs中ROS的活性,DAF-FM DA法检测ECs中NO的活性。Western blot法检测ECs中Akt和ERK的蛋白磷酸化水平。MTT法检测VSMCs的增殖。细胞划痕实验和Transwell实验检测VSMCs的迁移。RT-qPCR法检测VSMCs中MMP-2和MMP-9的基因表达。在ECs中,β-榄香烯可以显著降低LSS诱导的ROS的升高,显著升高LSS诱导的NO的降低,并且降低ERK的磷酸化,并升高Akt的磷酸化。在VSMCs中,β-榄香烯可以显著降低ox-LDL诱导的VSMCs的增殖和迁移,降低MMP-2和MMP-9的基因表达。β-榄香烯可以改善LSS诱导的ECs功能紊乱和ox-LDL诱导的VSMCs增殖和迁移。

关键词 β-榄香烯; 血管内皮细胞功能紊乱; 血管平滑肌细胞; 增殖; 迁移

中图分类号 R966 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)03-0333-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200311

引用本文 段兰兰,董菁,范香成,等.β-榄香烯对血管内皮细胞功能紊乱和血管平滑肌细胞异常增殖的影响[J].中国药科大学学报,2020,51(3):333–339.

Cite this article as: DUAN Lanlan, DONG Jing, FAN Xiangcheng, et al. β-Elemene improves endothelial cells dysfunction, and abnormal proliferation and migration of vascular smooth muscle cells[J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(3):333–339.

β-Elemene improves endothelial cells dysfunction, and abnormal proliferation and migration of vascular smooth muscle cells

DUAN Lanlan^{1,2}, DONG Jing^{1,2}, FAN Xiangcheng^{1,2}, ZHU Junyi^{1,2}, ZHANG Yifan^{1,2}, HAN Jichun^{1,2}, SHANG Jing^{1,2,3*}

¹School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; ²Jiangsu Key Laboratory of TCM Evaluation and Translational Research, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 211198; ³State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract This study aimed to investigate whether β-elemene could improve the dysfunction of vascular endothelial cells induced by low shear force (LSS), and the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL). Parallel plate flow chambers and ox-LDL were used to establish vascular endothelial cells (ECs) dysfunction model and vascular smooth muscle cell (VSMCs) proliferation and migration model, respectively, and the effects of β-elemene on ECs dysfunction and VSMCs proliferation and migration were examined. The activity of ROS in ECs was measured by DHE and the activity of NO in ECs was tested by DAF-FM DA. The protein phosphorylation of Akt and ERK in ECs were detected by Western blot. The proliferation of VSMCs was measured by MTT. The migration of VSMCs was examined by cell scratch test and Transwell assay. The gene expression of MMP-2 and MMP-9 in VSMCs was measured by RT-qPCR. In ECs, β-elemene could significantly reduce the LSS-induced increase in ROS, significantly increase the

LSS-induced decrease in NO, decrease the phosphorylation of ERK, and increase the phosphorylation of Akt. In VSMCs, β -elemene could significantly reduce the proliferation and migration of VSMCs induced by ox-LDL, and reduce the gene expression of MMP-2 and MMP-9. To conclude, β -elemene can improve the LSS-induced ECs dysfunction and ox-LDL-induced VSMCs proliferation and migration.

Key words β -elemene; endothelial cells dysfunction; vascular smooth muscle cells; proliferation; migration

心血管疾病是目前我国引起死亡的主要疾病之一。随着生活水平和生活习惯的改变,我国的心血管疾病发病率也逐年升高,严重威胁着我国人民的健康。动脉粥样硬化是心血管疾病中最为常见的类型之一,也是引发心血管疾病患者死亡的主要原因之一^[1]。因此,寻找一种安全、有效、低毒的治疗动脉粥样硬化药物十分必要。

氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)是动脉粥样硬化的独立危险因素,能够促进血管平滑肌细胞(VSMCs)迁移和增殖、促进泡沫细胞和血栓的形成,最后导致了动脉粥样硬化的发生^[2-3]。一些临床研究发现,动脉粥样硬化患者的斑块多发生于血管弯曲处内侧或血管分叉处外侧,这一发现说明血流动力学可能也参与了动脉粥样硬化的发生^[4]。目前很多研究发现低剪切力(LSS)可以损伤血管内皮细胞(ECs),诱导ECs产生大量的ROS,诱发ECs功能紊乱,促进动脉粥样硬化的发生和发展^[5-6]。

β -榄香烯是从姜科植物温郁金中提取的抗肿瘤有效成分,具有很好的抗肿瘤作用^[7-8]。本课题组前期的研究发现, β -榄香烯可以减轻高脂饲料诱导的ApoE^(-/-)小鼠动脉粥样硬化症状^[9-10],但是具体的作用机制并不清楚。本研究主要通过建立LSS诱导的ECs功能紊乱和ox-LDL诱导的VSMCs增殖迁移模型,研究 β -榄香烯对ECs功能紊乱和VSMCs增殖迁移的影响,为 β -榄香烯治疗动脉粥样硬化提供理论基础。

1 材 料

1.1 试 剂

β -榄香烯[含量99%,石药集团远大(大连)制药有限公司];噻唑蓝(MTT,美国Sigma公司);DMEM培养基、RPMI 1640培养基(美国Gibco公司);Akt抗体、p-Akt抗体、ERK抗体、p-ERK抗体、 β -actin抗体、二氢乙啶、3-氨基,4-氨基甲基-2',7'-二荧光素、二乙酸酯(美国Abcam公司);其他试剂

均为市售分析纯。

1.2 仪 器

LEGEND Micro 21R型离心机(美国Thermo Scientific公司);BS210S电子天平(德国Sartorius公司);荧光倒置显微镜(日本Olympus公司);iCycler iQ5(美国Bio-Rad公司);核酸定量仪(美国Amersham Biosciences公司);Veriti 96逆转录仪器(美国ABI公司);Tanon 5200多倍镜(中国山海塔农科技公司)。

1.3 细 胞

大鼠胸大动脉平滑肌细胞株(A7r5)和人脐静脉内皮细胞株(EA. hy926即ECs)均来源于ATCC公司。

2 方 法

2.1 细胞培养

取生长状态良好的A7r5细胞,使用含10%胎牛血清、链霉素(100 μ g/L)、庆大霉素(100 μ g/L)的DMEM培养液(pH 7.5),在37℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱中培养,取对数生长期细胞进行各项实验。

取生长状态良好的ECs,使用含10%胎牛血清、链霉素(100 μ g/L)、庆大霉素(100 μ g/L)的RPMI 1640培养液(pH 7.5),在37℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱中培养,取对数生长期细胞进行各项实验。

2.2 剪切力诱导内皮细胞功能紊乱

采用平行板流动腔建立ECs功能紊乱模型,造模方法与文献一致^[6],大体操作如下:将ECs爬片贴壁后置于可体外模拟LSS的平行板流动腔中,施加剪切力0.2 Pa于贴壁的细胞,作用30 min即可。

2.3 二氢乙啶法检测ECs中ROS活性

取处于对数生长期的细胞,细胞的密度按照每毫升5×10⁵个细胞接种于含有盖玻片的6孔培养板中,于37℃、5% CO₂培养箱中培养。将实验分为5组:正常组、模型组和3个不同浓度的 β -榄

香烯(0.1、1、10 mg/L)组。正常培养24 h后,换用无血清培养基继续培养12 h,使细胞同步化。给药组分别用含有不同浓度的 β -榄香烯(0.1、1、10 mg/L)的无血清培养基预培养24 h,其余组只用无血清培养基培养相同时间,去除培养液,用PBS洗2次,加入DHE于37 °C培养箱中避光孵育20 min。用PBS洗3次,并将盖玻片置于荧光显微镜下拍照。

2.4 3-氨基-4-氨基甲基-2',7'-二荧光素,二乙酸酯法检测ECs中NO活性

具体细胞给药操作步骤同“2.3”项,用PBS洗过后加入DAF-FM DA于37 °C培养箱中避光孵育20 min。用PBS洗3次,并将盖玻片置于荧光显微镜下拍照。

2.5 Western blot法检测检测ECs中Akt和ERK的蛋白磷酸化水平

具体细胞给药操作步骤同“2.3”项,PBS洗过后加入蛋白裂解液50 μL置于冰上静置20 min后用细胞刮刀将细胞刮下并转移至1.5 mL离心管内,于离心机内4 °C,1 350 r/min,离心5 min后收集上清液即为蛋白悬浮液。通过在10%聚丙烯酰胺凝胶上的SDS-PAGE分离ECs的裂解物,并将蛋白转移到PVDF膜上。用5%脱脂牛奶在室温下封闭1 h,然后与一抗(Akt抗体、p-Akt抗体、ERK抗体、p-ERK抗体、 β -actin抗体)(所有抗体以1:1 000稀释度使用)在4 °C下反应18 h,然后与相应的次级辣根过氧化物酶结合抗体反应(所有抗体以1:1 000稀释)在室温下放置2 h。利用ECL检测系统对蛋白质进行可视化检测。用Tanon 5200多倍镜进行光密度分析扫描信号。本文报道的Western blot检测结果代表了重复3次的结果。

2.6 MTT法检测不同浓度ox-LDL对A7r5细胞活力的影响

选取处于对数生长期的A7r5细胞,用0.25%的胰酶进行消化,按照每毫升 $2\times10^4\sim4\times10^4$ 个细胞的密度制成细胞悬液,并将细胞接种于96孔板中(每孔180 μL),置于37 °C、5% CO₂恒温培养箱中培养24 h。弃去培养基,用PBS清洗2次,换上含有不同浓度的ox-LDL(0, 20, 40, 60, 80, 100, 200 mg/L),置于37 °C、5% CO₂恒温培养箱中培养24 h后,每孔加入5 mg/mL MTT溶液20 μL,继续培养4 h后,吸弃培养基,加入DMSO 200 μL,摇床振荡10 min,用酶标仪测定波长570 nm处吸收度,计算

细胞活力,以选出ox-LDL的适合浓度。

2.7 MTT法检测 β -榄香烯对A7r5细胞增殖的影响

按“2.6”项方法筛选出适合浓度的ox-LDL(80 mg/L)建造A7r5细胞增殖迁移模型。将实验分为5组:正常组、模型组和3个不同浓度的 β -榄香烯(0.1、1、10 mg/L)组。通过MTT法检测 β -榄香烯对A7r5细胞增殖的影响,操作步骤与“2.6”项方法一致。

2.8 细胞划痕法检测A7r5细胞迁移

选取处于对数生长期的A7r5细胞接种于培养皿中,将实验分为5组:正常组、模型组和3个不同浓度的 β -榄香烯(0.1、1、10 mg/L)组。当细胞的生长覆盖面积约90%时,在培养皿底部做一直线标记,用无菌枪头沿着标记作划痕,PBS漂洗后加入含有1%胎牛血清的DMEM培养基(含有对应组别的药物)继续培养,并分别在0和24 h进行拍照,并用Image-Pro Plus软件进行分析,以划痕闭合比率来评估细胞迁移程度。

2.9 Transwell法检测A7r5细胞迁移

选取处于对数生长期的A7r5细胞,实验前换用无血清的DMEM培养基进行饥饿培养24 h。用胰酶消化细胞,终止消化后离心弃去培养液,用无血清的DMEM重悬。取细胞悬液200 μL分别加入5个Transwell小室中,分别标记:正常组、模型组和3个不同质量浓度的 β -榄香烯(0.1、1、10 mg/L)组,调整细胞密度为每孔 3×10^4 个细胞,下室中 β -榄香烯组分别加入含药物血清培养基(质量浓度为0.1、1、10 mg/L),其余组别只加入血清培养基。正常培养24 h,将小室取出,弃去小室中的培养液,用PBS洗1~2遍后倒扣风干。将风干的小室放入已加入4%多聚甲醛600 μL的孔板中,对小室底部背面穿过的细胞进行固定30 min。取出固定好的小室,风干后放入结晶紫染液中染色20 min。将染完色的小室用PBS洗3遍,然后用棉签擦尽小室内部未迁移的细胞,在倒置显微镜下观察,拍照计数。

2.10 RT-qPCR法检测A7r5细胞中MMP-2和MMP-9的基因表达

引物设计与合成:MMP-2引物(上游5'-GCT TCC AGG GCA CCT CTT ACA-3';下游5'-ACC TTC TGA ATT TCC ACC CAC AG-3');MMP-9引物(上游5'-CCA TGT CAC TTT CCC TTC ACC TT-3';

下游5'-GCC ATG CTC CGT GTA GAG ATT C-3'),引物由Primer3 software设计与合成。

细胞总RNA的提取:取培养24 h后的正常组、模型组和3个不同质量浓度的 β -榄香烯(0.1、1、10 mg/L)组的A7r5细胞,分别制成细胞悬液转移至离心管中离心,弃上清液后按照RNA提取说明书的方法采用Trizol溶液提取细胞总RNA。

RNA的逆转录反应:按照说明书配制RT反应液(5×反转录试剂2 μL,总RNA,用无核酸酶水补足至10 μL),置于逆转录仪中反转录成cDNA。

荧光定量PCR检测:以上述反转录cDNA为模板,应用荧光定量PCR检测细胞中MMP-2和MMP-9的基因表达。25 μL反应体系:SYBR Premix Ex Taq II 12.5 μL,上下游引物各1 μL,模板2 μL,灭菌双蒸水补足至25 μL。扩增条件为预变性95 °C 30 s,变性95 °C 5 s,退火60 °C 30 s,以上两步扩增循环。每个循环结束后收集荧光信号,反应结束

后确认扩增曲线和融解曲线。

2.11 数据处理和统计学分析

统计学处理应用SPSS 10.0软件进行统计学处理,Origin 8.0处理图片,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验,多组均数比较采用方差分析,当 $P < 0.05$ 时,则表示具有显著性差异。

3 结果

3.1 β -榄香烯改善LSS诱导的ECs功能紊乱

通过检测ECs中ROS和NO的活性来评估 β -榄香烯对LSS诱导的ECs功能紊乱的改善作用。结果如图1所示,ECs经过30 min的LSS处理后,ROS的活性显著升高,而NO的活性却显著性降低。 β -榄香烯治疗可以显著降低LSS诱导的ROS升高,升高LSS诱导的NO降低,并具有一定的剂量依赖性。这些结果均表明, β -榄香烯可以改善LSS诱导的ECs功能紊乱。

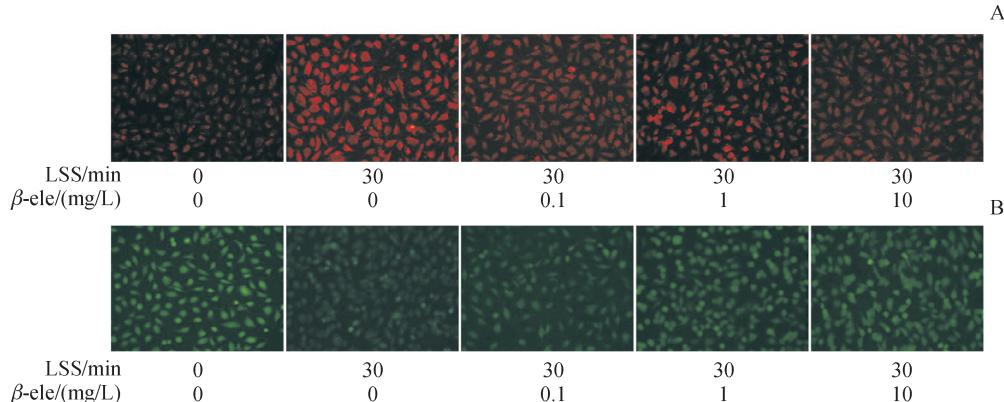


Figure 1 Effects of β -elemene (β -ele) on ROS and NO activities in endothelial cells (ECs) induced by low shear stress (LSS) ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: Inhibitory effect of different concentrations of β -elemene on NO activity in ECs induced by LSS; B: Promoting effect of different concentrations of β -elemene on ROS activity in ECs induced by LSS

3.2 β -榄香烯对ECs中Akt和ERK的蛋白磷酸化水平的影响

通过Western blot法检测检测ECs中Akt和ERK的蛋白磷酸化水平的变化。结果如图2所示,在ECs中, β -榄香烯可以显著降低LSS所诱导的ERK的磷酸化升高,并可以显著升高LSS所诱导的Akt的磷酸化降低。

3.3 β -榄香烯抑制ox-LDL诱导的A7r5细胞增殖

为了确定适合浓度的ox-LDL建造VSMCs增殖迁移模型,本研究使用MTT法检测了不同浓度的ox-LDL对A7r5细胞增殖和迁移的影响。结果如图3-A所示,80 mg/L ox-LDL可以显著增加A7r5

细胞发生增殖。因此,本研究选择了80 mg/L的ox-LDL建造VSMCs增殖迁移模型。使用MTT法检测 β -榄香烯对ox-LDL诱导的A7r5细胞增殖的影响。结果发现, β -榄香烯可以显著降低ox-LDL诱导的A7r5细胞增殖,并具有一定的剂量依赖性(图3-B)。

3.4 β -榄香烯抑制ox-LDL诱导的A7r5细胞迁移

通过细胞划痕实验和Transwell法检测A7r5细胞迁移。结果如图4所示,ox-LDL可以诱导A7r5细胞发生明显的迁移现象, β -榄香烯治疗可以显著抑制ox-LDL诱导的A7r5细胞迁移,并具有一定的剂量依赖性。

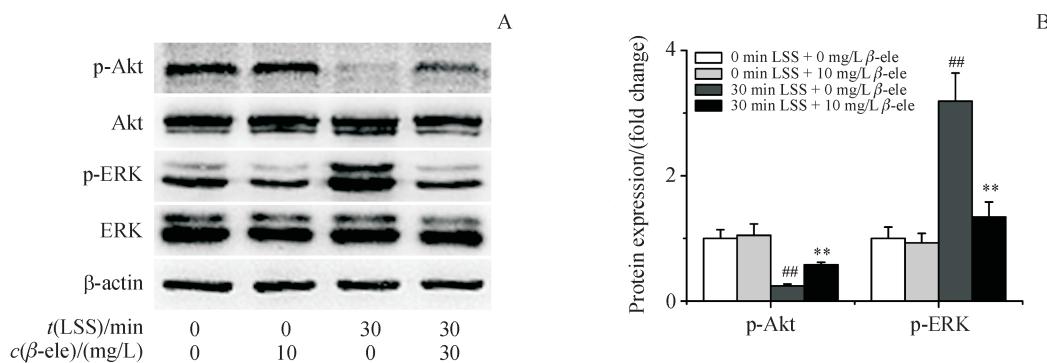


Figure 2 Effects of β -elemene on protein phosphorylation levels of Akt and ERK ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: Effect of β -elemene on the protein phosphorylation level of Akt and ERK in ECs induced by LSS; B: Gray-scale scanning of the protein phosphorylation level of Akt and ERK in ECs. ## $P < 0.01$ vs 0 min LSS + 0 mg/L β -ele; ** $P < 0.01$ vs 30 min LSS + 0 mg/L β -ele

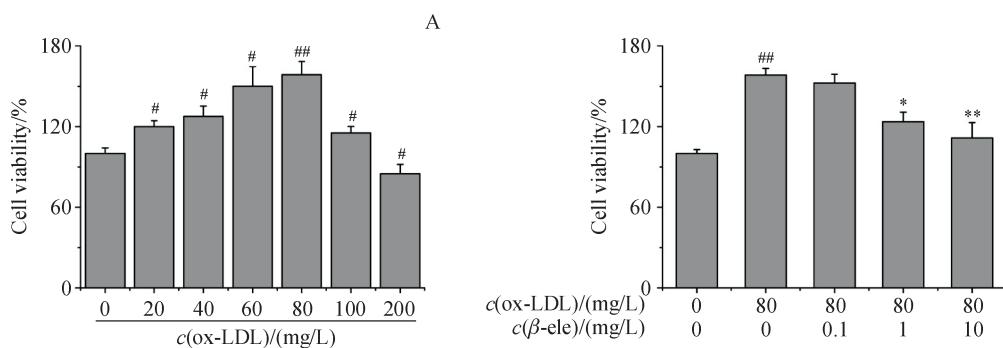


Figure 3 β -elemene inhibits the proliferation of A7r5 cells induced by ox-LDL ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: Viability of A7r5 cells upon exposure to different concentrations of ox-LDL for 24 h; B: β -elemene inhibits the proliferation of A7r5 cells induced by ox-LDL at 80 mg/L. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs treatment with 0 mg/L ox-LDL; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs treatment with 80 mg/L ox-LDL

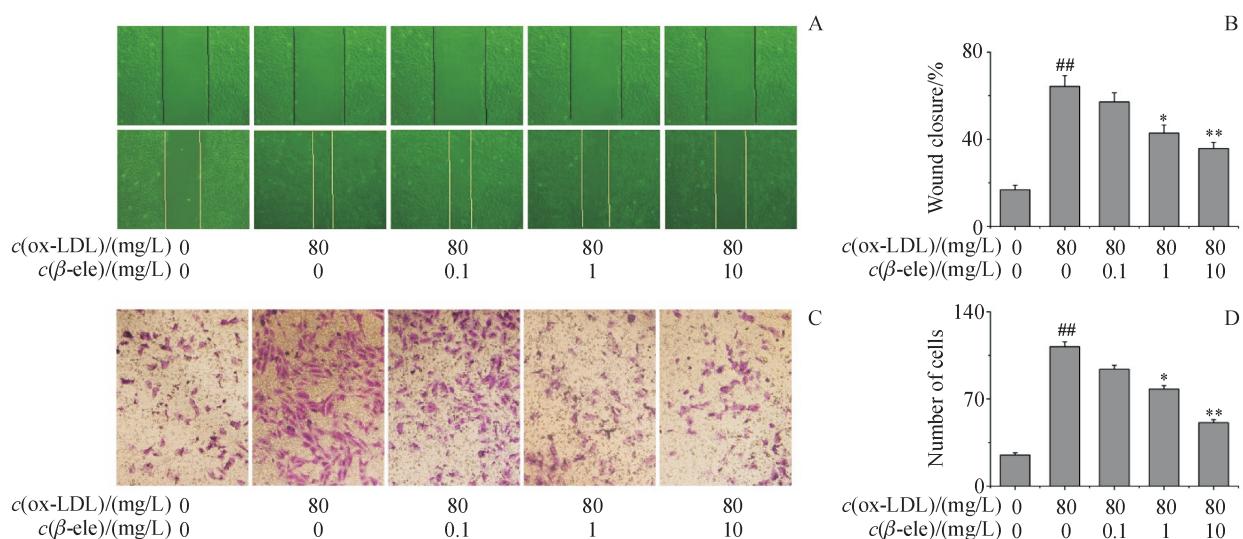


Figure 4 β -elemene inhibits A7r5 cell migration induced by ox-LDL ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: A7r5 cell migration was assessed by wound healing assay; B: Quantitative data as the percentage of A7r5 cell migrating into the wound with respect to the cell-free area at the time 0 h; C: Transwell assay was performed to determine the migration of A7r5 cell; D: Quantitative data of A7r5 cell migration. ## $P < 0.01$ vs treatment with 0 mg/L ox-LDL; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs treatment with 80 mg/L ox-LDL

3.5 β -榄香烯对 MMP-2 和 MMP-9 基因表达的影响

为了进一步研究 β -榄香烯对 ox-LDL 诱导的 A7r5 细胞迁移影响,本研究使用 RT-qPCR 法检测了 β -榄香烯对迁移相关的基因(主要是 MMP-2 和

MMP-9)表达影响。结果如图 5 所示,ox-LDL 显著升高 A7r5 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的基因表达。 β -榄香烯治疗可以显著降低 MMP-2 和 MMP-9 的基因表达,并具有一定的剂量依赖性。

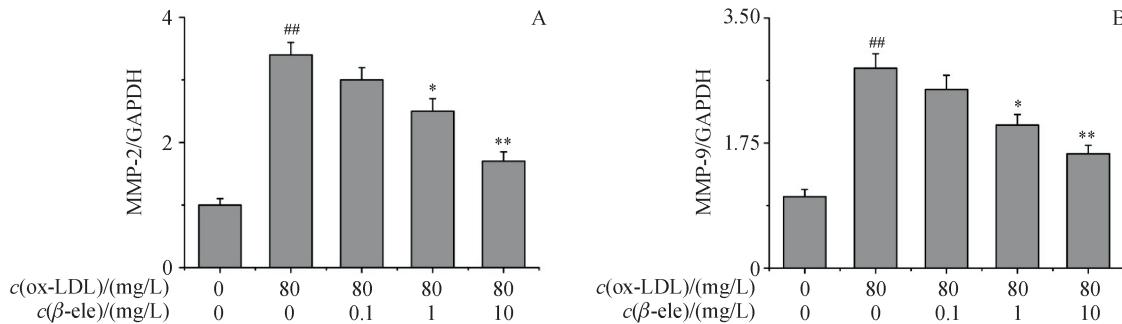


Figure 5 Effects of β -elemene on the mRNA levels of MMP-2 and MMP-9 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: β -elemene significantly reduced MMP-2 gene expression in A7r5 cells induced by ox-LDL; B: β -elemene significantly reduced MMP-9 gene expression in A7r5 cells induced by ox-LDL. $^{##}P < 0.01$ vs treatment with 0 mg/L ox-LDL; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs treatment with 80 mg/L ox-LDL

4 讨论

剪切力是指血液流动时与血管壁内膜面的摩擦力,目前研究已经证实了剪切力参与了动脉粥样硬化的发生^[11]。病理研究证实,动脉粥样硬化病变发生的部位为低剪切力处^[12]。大量的体内体外的实验研究也发现,低剪切力会诱导 ERK 磷酸化和 Akt 去磷酸化,使血管内皮细胞的 ROS 活性升高和 NO 活性降低,从而造成内皮细胞功能紊乱,最终促进了动脉粥样硬化的发生^[13]。本研究采用平行板流动腔在体外模拟低剪切力诱导血管内皮细胞功能紊乱模型。结果发现,低剪切力确实可以诱导 ECs 的 ROS 活性升高和 NO 活性降低,以及诱导 ERK 磷酸化的升高,Akt 的磷酸化的降低。 β -榄香烯治疗可以显著降低 ROS 活性,并升高 NO 活性;降低 ERK 的磷酸化,并升高 Akt 的磷酸化。这一结果说明, β -榄香烯可以改善低剪切力诱导的内皮细胞功能紊乱。

血管平滑肌细胞增殖和迁移也在动脉粥样硬化发病中起着重要的作用^[14-15]。Ox-LDL 过量时,它携带的胆固醇堆积在动脉壁上形成了斑块,引起动脉粥样硬化的发生^[16-17]。本研究使用 ox-LDL 诱导血管平滑肌细胞^[18]增殖和迁移模型,并检测 β -榄香烯对血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响。结果发现,ox-LDL 可以诱导血管平滑肌细胞发生

显著的迁移和增殖现象,通过 β -榄香烯治疗可以显著抑制 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移。本研究也对与血管平滑肌细胞增殖和迁移相关的基因(MMP-2 和 MMP-9)进行检测,结果发现,ox-LDL 可以显著升高血管平滑肌细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的基因表达,而 β -榄香烯可以显著抑制 MMP-2 和 MMP-9 的基因表达。这一结果说明, β -榄香烯可以抑制 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移。

总之, β -榄香烯可以改善 LSS 诱导的内皮细胞功能紊乱和 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞增殖与迁移。这些结果表明, β -榄香烯的抗动脉粥样硬化作用可能与其在内皮细胞和血管平滑肌细胞上的作用相关。

参考文献

- [1] Yang XL, Li JX, Hu DS, et al. Predicting the 10-year risks of atherosclerotic cardiovascular disease in Chinese population: the China-Par project (prediction for ASCVD risk in China) [J]. Circulation, 2016, 134(19): 1430–1440.
- [2] Wu JH, Li YN, Zhou YF, et al. Semaphorin-3E attenuates neointimal formation via suppressing VSMCs migration and proliferation [J]. Cardiovasc Res, 2017, 113(14): 1763–1775.
- [3] Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis [J]. Acta Med Indones, 2007, 39(2): 86–93.

- [4] Liu QY, Chen M. Research progress on role of shear stress in carotid atherosclerosis [J]. *Oncoradiology (肿瘤影像学)*, 2014, **23**(1): 68–72.
- [5] Mahmoud MM, Kim HR, Xing RY, et al. TWIST1 integrates endothelial responses to flow in vascular dysfunction and atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, **119**(3): 450–462.
- [6] Chao YL, Ye P, Zhu LL, et al. Low shear stress induces endothelial reactive oxygen species via the AT1R/Enos/NO pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2018, **233**(2): 1384–1395.
- [7] Guo TT, Huang WP, Hu CX, et al. Effects of β -elemene on invasion and migration of human breast cancer cells [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med (中国药理与临床)*, 2018, **34**(1): 76–80.
- [8] Jiang S, Yu G, Feng XL. Advances in antitumor status and mechanism of elemene [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med (辽宁中医药大学学报)*, 2018, **20**(4): 218–221.
- [9] Liu M, Chen XT, Ma J, et al. B-Elemene attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via restoring NO levels and alleviating oxidative stress [J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2017, **95**: 1789–1798.
- [10] Liu M, Mao LF, Daoud A, et al. B-elemene inhibits monocyte-endothelial cells interactions via reactive oxygen species/MAPK/NF- κ B signaling pathway *in vitro* [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, **766**: 37–45.
- [11] Kumar S, Williams D, Sur S, et al. Role of flow-sensitive microRNAs and long noncoding RNAs in vascular dysfunction and atherosclerosis [J]. *Vascul Pharmacol*, 2019, **114**: 76–92.
- [12] Gao WH, Cui HB. Correlation between distribution of coronary lesions and low shear stress [J]. *Med Recapitul (医学综述)*, 2013, **19**(21): 3871–3874.
- [13] Wu LY, Wang GX, Tang ST, et al. Protection of endothelial cells, inhibition of neointimal hyperplasia by β -elemene in an injured artery [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2011, **25**(3): 233–242.
- [14] Schlosser A, Pilecki B, Hemstra LE, et al. MFAP4 promotes vascular smooth muscle migration, proliferation and accelerates neointima formation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, **36**(1): 122–133.
- [15] Li WF, Zhi WB, Zhao JM, et al. Cinnamaldehyde protects VSMCs against ox-LDL-induced proliferation and migration through S arrest and inhibition of p38, JNK/MAPKs and NF- κ B [J]. *Vascul Pharmacol*, 2018, **108**: 57–66.
- [16] Chen XZ, Yuan YH, Wang Q, et al. Post-translational modification of adiponectin affects lipid accumulation, proliferation and migration of vascular smooth muscle cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, **43**(1): 172–181.
- [17] Li WF, Zhi WB, Liu F, et al. Attractylenolide I restores HO-1 expression and inhibits Ox-LDL-induced VSMCs proliferation, migration and inflammatory responses *in vitro* [J]. *Exp Cell Res*, 2017, **353**(1): 26–34.
- [18] Li JX, Luo W, Wang JY, et al. Influence of puerarin on endogenous NOS inhibitor of human umbilical vein endothelial cells cultured with oxidized low density lipoprotein [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2004, **35**(4): 353–356.