

转染 OPN-002-siRNA 对大鼠颈动脉球囊损伤后内膜增生和 OPN、TGF- β 1、PCNA 表达的影响

徐健¹, 冯丰¹, 刘闰男², 王泰然³, 张希⁴, 都晓沫¹

(1. 沈阳市第一人民医院心血管内科, 辽宁省沈阳市 110041; 2. 中国医科大学附属第一医院心血管内科, 辽宁省沈阳市 110001; 3. 河北邯郸市中心医院心血管内科, 河北省邯郸市 056001; 4. 沈阳医学院附属第二医院心血管内科, 辽宁省沈阳市 110036)

[关键词] OPN-002-siRNA; 血管损伤; 内膜增生; 骨桥蛋白; 转化生长因子 β 1; 增殖细胞核抗原; 转染; 大鼠

[摘要] **目的** 观察经动脉外膜转染 OPN-002-siRNA 对大鼠颈动脉球囊损伤后内膜增生和骨桥蛋白(OPN)、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)及增殖细胞核抗原(PCNA)表达的影响。**方法** 通过前期细胞实验筛选出最敏感的 OPN-002-siRNA 序列作为动物实验转染基因。72 只 Wistar 大鼠, 随机分为假手术组、球囊损伤组、OPN-SCR-siRNA 转染组和 OPN-002-siRNA 转染组。用免疫荧光、HE 染色、real-time RT-PCR 和 Western blot 观察大鼠颈动脉球囊损伤后内膜增生情况和 OPN、TGF- β 1 及 PCNA 的表达变化, 以及 OPN-002-siRNA 对它们的影响。**结果** (1) 球囊损伤术后 3 天未见明显的新生内膜, 7 天内膜开始增厚, 14 天内膜增厚显著。(2) OPN、TGF- β 1 mRNA 和蛋白水平于术后 3、7、14 天时持续升高, 而 PCNA mRNA 和蛋白水平均于术后 3 天开始升高, 7 天达高峰, 14 天时下降。(3) 与球囊损伤组、OPN-SCR-siRNA 转染组比较, OPN-002-siRNA 转染组在各个时间点新生内膜厚度明显减轻($P < 0.001$), OPN、TGF- β 1、PCNA mRNA 和蛋白表达显著减少($P < 0.001$)。**结论** OPN-002-siRNA 可能通过特异性抑制 OPN、TGF- β 1、PCNA 的表达, 从而减轻血管损伤后的内膜增生。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of OPN-002-siRNA Transfection on Intimal Hyperplasia and OPN, TGF- β 1, PCNA Expression after Carotid Balloon Injury in Rat

XU Jian¹, FENG Feng¹, LIU Gui-Nan², WANG Tai-Ran³, ZHANG Xi⁴, and DU Xiao-Mo¹

(1. Department of Cardiology, The First People's Hospital of Shenyang, Shenyang, Liaoning 110041, China; 2. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China; 3. Department of Cardiology, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056001, China; 4. Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital, Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning 110036, China)

[KEY WORDS] OPN-002-siRNA; Blood Vessel Injury; Intimal Hyperplasia; Osteopontin; Transforming Growth Factor- β 1; Proliferating Cell Nuclear Antigen; Transfection; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of OPN-002-siRNA transfection on intimal hyperplasia and osteopontin (OPN), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression after carotid balloon injury in rat. **Methods** Through preliminary experiment, OPN mRNA in cultured vascular smooth muscle cells was tested by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR), and OPN-002-siRNA was determined as the most sensitive sequence and used as transfected siRNA in the subsequent animal experiments. Seventy-two rats were randomly divided into four groups: sham group, balloon injury group, OPN-scramble-siRNA (OPN-SCR-siRNA) group and OPN-002-siRNA group. Changes of intimal hyperplasia and OPN, TGF- β 1, PCNA expressions were detected by immunofluorescence, hematoxylin-eosin (HE) staining, real-time RT-PCR and Western blot, and also the

[收稿日期] 2015-01-23

[修回日期] 2015-05-04

[基金项目] 沈阳市科技局立项项目(F13-220-9-32)

[作者简介] 徐健, 博士, 主任医师, 研究方向为冠心病及再狭窄的防治, E-mail 为 xujianxj3556@sina.com。冯丰, 硕士, 主任医师, 研究方向为冠心病介入及再狭窄的防治, E-mail 为 kjk@163.com。刘闰男, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病及再狭窄的防治, E-mail 为 guanliu@hotmail.com。

effect of OPN-002-siRNA was studied on them. **Results** (1) There was no apparent neointima on the 3rd day after balloon injury. Intima began to thicken on the 7th day after injury, and intimal thickening was significant on the 14th day. (2) The expression of OPN, TGF- β 1 mRNA and protein started to increase on the 3rd day and persisted until the 14th day. The expression of PCNA mRNA and protein started to increase on the 3rd day, peaked on the 7th day, decreased on the 14th day. (3) Compared with balloon injury group and OPN-SCR-siRNA group, the neointima thickness decreased significantly on each time point in OPN-002-siRNA group ($P < 0.001$), and both mRNA and protein expression of OPN, TGF- β 1 and PCNA reduced significantly on each time point in OPN-002-siRNA group ($P < 0.001$). **Conclusion** OPN-002-siRNA can inhibit intima hyperplasia after artery injury by decreasing the expression of OPN, TGF- β 1 and PCNA.

经皮冠状动脉介入术(percutaneous coronary intervention, PCI)普遍用于治疗冠心病,然而术后再狭窄(restenosis, RS)的发生严重影响了它的远期疗效。PCI术后RS的形成是一个复杂的病理生理过程,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的迁移、过度增殖和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)大量合成是导致血管内膜增厚、管腔狭窄的主要原因。虽然药物涂层支架已明显降低了RS的发生,但仍有约8%的PCI患者发生RS^[1]。使用抗增殖药物(雷帕霉素及紫衫醇)的包被支架在抑制增殖的同时也削弱内皮化,导致晚期及极晚期支架血栓的形成^[2-3]。因此,需要改善PCI的治疗结果,基因治疗可能成为一种很有发展前景的预防再狭窄及晚期血栓的方法^[4-6]。

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)作为ECM中一种重要的功能性蛋白,在大鼠血管损伤的新生内膜中其表达快速、显著增加,发挥调节VSMC增殖和迁移的作用,被认为是VSMC表型转化的标志基因^[7]。本研究拟通过转染OPN-002-siRNA对大鼠颈总动脉球囊损伤后OPN、细胞增殖相关基因转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)表达的影响,探讨OPN-002-siRNA在预防再狭窄方面的作用。

1 材料与方 法

1.1 合成并筛选 OPN-siRNA

设计并合成3对可能有效的OPN-siRNA,同时合成1对针对荧光素酶的DNA序列,转录成OPN-scramble-siRNA(OPN-SCR-siRNA),其5'端用Cy3标记,以便于检验转染效果。并通过笔者之前的研究^[8]应用实时反转录聚合酶链反应(real-time reverse transcription polymerase chain reaction, real-time RT-PCR)检测OPN mRNA的表达水平,选择其中最

敏感的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)序列“OPN-002-siRNA”作为转染基因,进行动物实验。正义链:5'-GGAUGAAUCUGACGAAUCUdTdT-3';反义链:3'-dTdTCCUACUUAGACUGCUUAGA-5'。

1.2 动物模型制作

选用中国医科大学实验动物中心提供的72只健康Wistar雄性大白鼠,体质量350~400 g。10%水合氯醛(300 mg/kg)麻醉后,颈正中切开,钝性分离左颈总动脉,用血管夹临时阻断左颈总动脉近心、远心端血流,用1.5 mm球囊导管(购自美国Metronic公司)从颈外动脉插入左颈总动脉内,注入生理盐水,反复全程抽拉球囊,重复3次,制成左颈总动脉内膜损伤。术后结扎颈外动脉,恢复血流,缝合颈部切口。

1.3 实验分组及处理

动物随机分为4组,每组18只。(1)假手术组:分离出左颈总动脉后,不行颈动脉球囊拉伤处理;(2)球囊损伤组:球囊拉伤颈动脉后,损伤血管周围释放200 μ L的30%聚醚胶(pluronic gel)溶液;(3)OPN-SCR-siRNA转染组:球囊拉伤颈动脉后,损伤血管周围释放200 μ L转染复合物(含OPN-SCR-siRNA 15 μ g的30%聚醚胶溶液);(4)OPN-002-siRNA转染组:球囊拉伤颈动脉后,损伤血管周围释放200 μ L转染复合物(含OPN-002-siRNA 15 μ g的30%聚醚胶溶液)^[9]。分别于术后不同的实验终点分批处死动物,每组每批6只。取出左颈总动脉,分别置于4%多聚甲醛和液氮中,用于HE染色、real-time RT-PCR及Western blot检测。

1.4 在体 OPN-siRNA 转染

球囊拉伤后,结扎颈外动脉,将200 μ L转染复合物(含有Cy3标记的OPN-SCR-siRNA 15 μ g的30%聚醚胶溶液)注射至损伤的血管周围,缝合颈部创口。转染3天后,即取大鼠损伤段局部血管,放入液氮罐中,制成冰冻切片(片厚5 μ m),避光,置于荧光显微镜下观察。

1.5 血管病理形态学检测

病变血管标本经石蜡包埋后,从每段血管的横截面随机切下 3 张切片后,利用 HE 染色在光学显微镜下观察其内膜增生情况,并利用计算机图像分析系统,检测血管内膜、中膜厚度的改变,计算内膜/中膜(I/M)的面积比。

1.6 real-time RT-PCR 检测

采用 Trizol 一步法提取颈总动脉的总 RNA。取各组总 RNA 3 μ L 逆转录合成 cDNA,逆转录反应根据逆转录试剂盒操作说明进行,反应总体积为 20 μ L,反应条件为 37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s,4 $^{\circ}$ C 7 min。应用 ABI 7500 扩增仪进行 PCR 扩增反应,20 μ L 反应体系组成如下:带有预先混合 SYBR 染料的 DNA 聚合酶 Ex Taq II (2 \times) 10 μ L,PCR 正向引物 (10 μ mol/L) 0.8 μ L,PCR 反向引物 (10 μ mol/L) 0.8 μ L,荧光定量参比染料 II 0.4 μ L,cDNA 模板 2 μ L,蒸馏水 6 μ L。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 活化 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,然后 60 $^{\circ}$ C 退火和延展 30 s,共 40 个循环。以 β -肌动蛋白 (β -actin) 作为内参。按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对于对照基因的表达量^[10]。实验重复 3 次,取均值。real-time RT-PCR 引物序列和扩增产物长度见表 1。

表 1. real-time RT-PCR 引物序列和扩增产物长度

Table 1. Primer sequence and amplification product length

引物名称	引物序列	扩增片段长度
OPN	上游引物:5'-GCAGGACTGAAGGAGC-3'	145 bp
	下游引物:5'-GAGACAGGAGGCAAGG-3'	
TGF- β 1	上游引物:5'-GGTGGACCGCAACAACG-3'	327 bp
	下游引物:5'-TGAGCACTGAAGCGAAAGC-3'	
PCNA	上游引物:5'-TCGCAACTCCGCCACCA-3'	120 bp
	下游引物:5'-ACGCCGCCGAACCTGAT-3'	
β -actin	上游引物:5'-CGTGCGTGACATTAAGAG-3'	132 bp
	下游引物:5'-TTGCCGATAGTGATGACCT-3'	

1.7 Western blot 检测

提取各组动脉总蛋白后,将蛋白浓度调至同一水平,每孔加样 80 μ g,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,脱脂奶粉封闭 2 h,分别加入一抗 OPN (1:400)、TGF- β 1 (1:400) 和 PCNA (1:400),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗膜 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗孵育,显色 2~5 min,凝胶成像分析系统测定条带的平均积分光密度值。

1.8 统计学处理

全部数据均采用 SPSS 13.0 软件进行统计处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 在体 OPN-siRNA 转染效果观察

转染 Cy3 标记的 OPN-SCR-siRNA 3 天后,将转染局部血管制成 5 μ m 厚的冰冻切片,置于荧光显微镜下,用 550 nm 光激发,可以发现,残存血管外膜、中膜及内膜下均有红色荧光分布,以中膜最为明显,证明转染成功(图 1)。

2.2 血管病理形态学检测结果

假手术组的血管内膜光滑、完整,无内膜增生。大鼠颈动脉球囊损伤后 3 天,可见内皮剥脱,说明球囊损伤动脉模型成功。球囊损伤组、OPN-SCR-siRNA 转染组 7 天可见内膜增生,管腔狭窄,14 天内膜明显增生,管腔重度狭窄。OPN-002-siRNA 转染组与同一时间点的球囊损伤组、OPN-SCR-siRNA 转染组相比,内膜增生受到显著抑制,管腔增大,差异有统计学意义($P < 0.001$;图 2、表 2)。

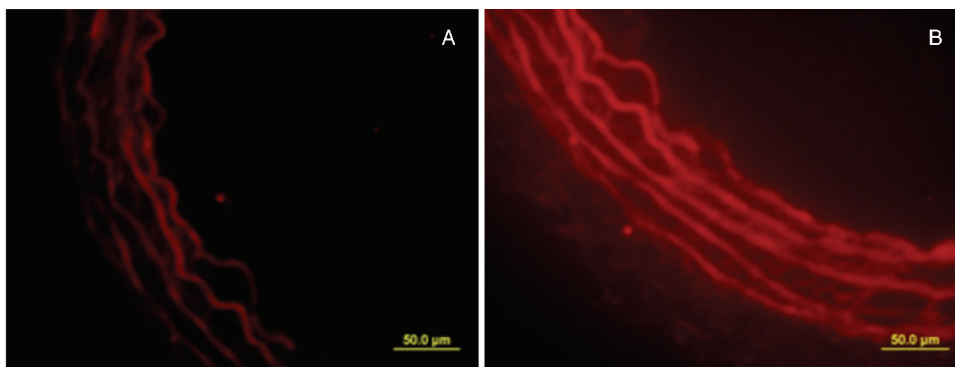


图 1. 在体 OPN-siRNA 转染效果(400 \times) A 为转染无 Cy3 标记的 OPN-SCR-siRNA 3 天后的免疫荧光显像,B 为转染 Cy3 标记的 OPN-SCR-siRNA 3 天后的免疫荧光显像。

Figure 1. The transfection of OPN-siRNA in vivo(400 \times)

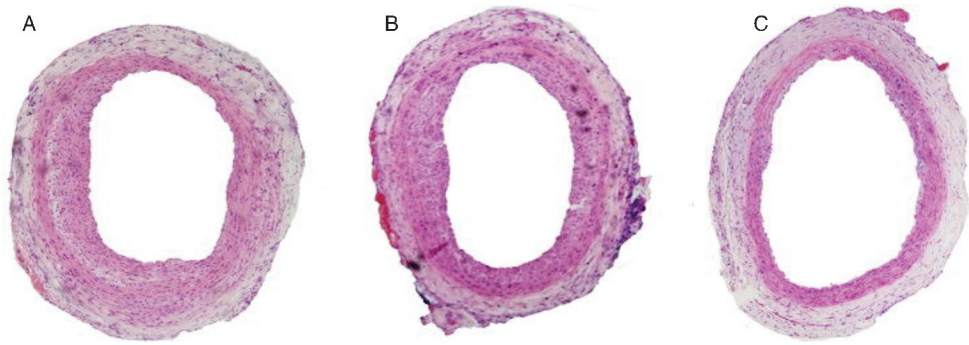


图 2. 颈总动脉 HE 染色结果(400 ×) 血管损伤后 14 天。A 为球囊损伤组, B 为 OPN-SCR-siRNA 转染组, C 为 OPN-002-siRNA 转染组。

Figure 2. Haemateine-eosin staining of carotid artery wall(400 ×)

表 2. 4 组血管内膜、中膜面积和 I/M 的比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2. Comparison of blood vessel intima, medium membrane area and I/M in the four groups($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分 组	指 标	术后 7 天	术后 14 天
假手术组	新生内膜面积(mm ²)	0	0
	中膜面积(mm ²)	0.1315 ± 0.0127	0.1325 ± 0.0127
球囊损伤组	新生内膜面积(mm ²)	0.0985 ± 0.0060 ^a	0.1327 ± 0.0152 ^a
	中膜面积(mm ²)	0.1333 ± 0.0062	0.1317 ± 0.0081
	I/M	0.7405 ± 0.0300 ^a	1.0090 ± 0.1165 ^a
OPN-SCR-siRNA 转染组	新生内膜面积(mm ²)	0.0958 ± 0.0057 ^a	0.1287 ± 0.0098 ^a
	中膜面积(mm ²)	0.1290 ± 0.0057	0.1320 ± 0.0059
	I/M	0.7443 ± 0.0574 ^a	0.9780 ± 0.1074 ^a
OPN-002-siRNA 转染组	新生内膜面积(mm ²)	0.0410 ± 0.0048 ^b	0.0652 ± 0.0099 ^b
	中膜面积(mm ²)	0.1303 ± 0.0042	0.1250 ± 0.0155
	I/M	0.3144 ± 0.0335 ^b	0.5210 ± 0.0427 ^b

a 为 $P < 0.001$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.001$, 与球囊损伤组、OPN-SCR-siRNA 转染组比较。

2.3 real-time RT-PCR 检测结果

在假手术组, OPN、TGF- β 1 mRNA 仅微弱表达, PCNA mRNA 不表达。血管球囊损伤后, OPN、TGF- β 1 mRNA 表达明显升高, 且随时间的延长持续升

高; PCNA mRNA 表达 7 天达高峰。经 OPN-002-siRNA 干预后, 同一时间点 OPN、TGF- β 1、PCNA mRNA 表达明显减少, 明显低于 OPN-SCR-siRNA 转染组及球囊损伤组 ($P < 0.001$; 图 3)。

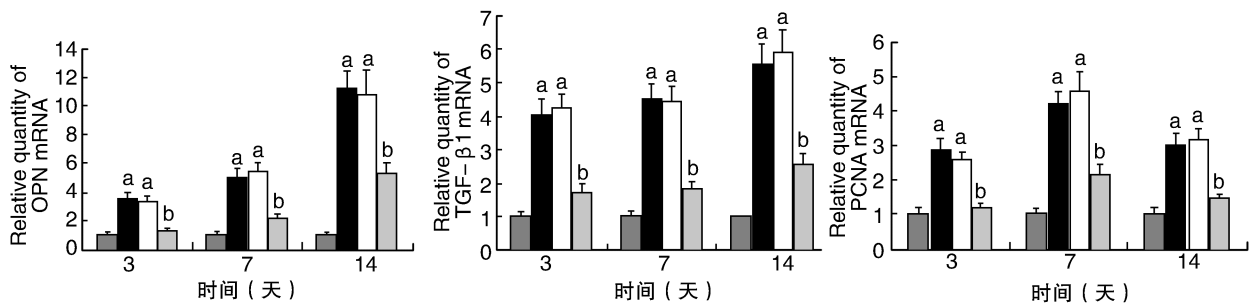
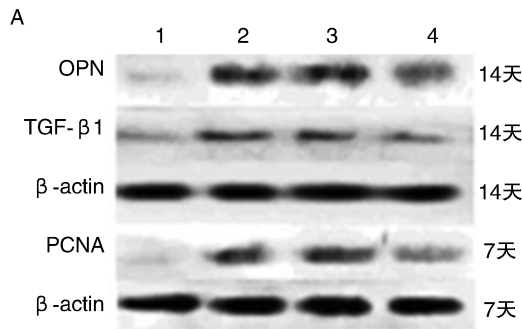


图 3. real-time RT-PCR 分析 4 组不同时间 OPN、TGF- β 1、PCNA mRNA 表达($n = 6$) 图中柱状体从左到右依次为假手术组、球囊损伤组、OPN-SCR-siRNA 转染组、OPN-002-siRNA 转染组。a 为 $P < 0.001$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.001$, 与球囊损伤组、OPN-SCR-siRNA 转染组比较。

Figure 3. The level of OPN, TGF- β 1 and PCNA mRNA expression analyzed by real-time RT-PCR at different time points in four groups($n = 6$)

2.4 Western blot 检测结果

在假手术组,有 OPN、TGF- β 1 微弱的蛋白条带,无 PCNA 蛋白条带;然而,血管球囊损伤 3、7、14 天后,OPN、TGF- β 1、PCNA 蛋白条带灰度逐渐增加,



OPN、TGF- β 1 在 14 天时最明显,PCNA 在 7 天时最明显。经 OPN-002-siRNA 干预后,与同一时间点的球囊损伤组、OPN-SCR-siRNA 转染组比较,OPN、TGF- β 1、PCNA 表达明显减少(图 4)。

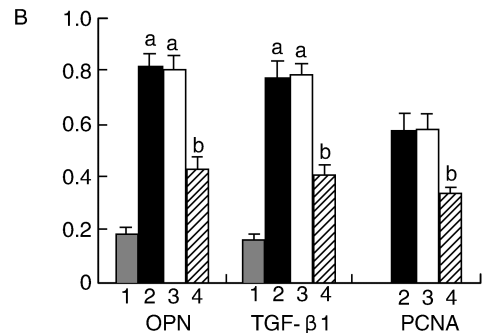


图 4. Western blot 分析 4 组 OPN、TGF- β 1、PCNA 蛋白表达 ($n=6$) A 为 Western blot 电泳图, B 为定量分析的柱状图。1 为假手术组, 2 为球囊损伤组, 3 为 OPN-SCR-siRNA 转染组, 4 为 OPN-002-siRNA 转染组。a 为 $P < 0.001$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.001$, 与球囊损伤组、OPN-SCR-siRNA 转染组比较。

Figure 4. Western blot showing the expression of OPN, TGF- β 1 and PCNA protein in four groups ($n=6$)

3 讨论

经皮冠状动脉介入术后 RS 的形成是一个复杂的病理生理过程, VSMC 的迁移、增生和 ECM 大量合成是导致血管内膜增厚、管腔狭窄的主要原因。ECM 是血管内膜损伤后新生内膜的主要成分, 在 PCI 术后 RS 的发生中, ECM 含量大于 50%^[11], 因此, ECM 是血管重塑的主要元素, 也是形成 RS 的主要物质, 被认为是血管损伤重塑过程中重要的始动因素^[7]。很多参与 PCI 术后 RS 的细胞因子均能够刺激 VSMC 过度表达 OPN^[7,12]。同时发现, 利用抗 OPN 抗体可以抑制 VSMC 的表型转化、迁徙和增生^[13]。我们前期的研究^[14-15]也证明, 应用针对大鼠 OPN 的反义核苷酸可明显抑制 VSMC 的增殖, 表明以 OPN 为靶点在防治血管再狭窄发生方面具有重要作用。

RNA 干扰是由双链 siRNA 介导的内源性基因沉默的一种现象, 虽然这种现象是人体内的一种生理过程, 但在哺乳细胞内应用合理的 siRNA 可以对靶基因的表达有特异的敲除作用, 对染色体 DNA 序列的复制和转录过程不产生任何作用, 具备抑制基因表达的高效性和高度序列特异性^[16]。因此 siRNA 已被用于在体及离体情况下基因功能研究的工具, 而且 siRNA 技术被期望作为包括血管重建术后再狭窄的几种人类疾病治疗的有力手段。Wang 等^[17]证实, 经球囊损伤大鼠颈动脉外膜转染 ADAMTS-7-siRNA 可明显抑制球囊损伤后新生内膜的形成。

PCNA 作为 DNA 聚合酶 δ 的附属蛋白, 是 DNA 复制所必须, 其在细胞核中表达增加, 表明细胞进入 DNA 合成期或 DNA 合成前期。PCNA 的表达既是细胞增殖的机制, 又是反映细胞增殖状态的一项可靠指标, 因此被用于关于球囊损伤后血管再狭窄的临床及基础研究^[18-19]。TGF- β 1 促进 ECM 形成并抑制其分解, 促进 VSMC 增殖, 促进再狭窄的形成^[20]。TGF- β 1 在 RS 的发生和发展方面, 通过不同的机制都发挥了重要的作用^[21-23]。

我们的研究亦表明, 抑制 OPN 表达后, TGF- β 1 的 mRNA 和蛋白表达也都出现了显著下调。虽然骨桥蛋白曾经被证明是 TGF- β 1 的效应基因^[24], 但也有研究显示骨桥蛋白具有调节 TGF- β 1 的激活作用^[25-26], 因此 TGF- β 1 的作用发挥也有可能依赖于 OPN。我们同时发现, 抑制 OPN 的表达后, 血管新生内膜中 PCNA 的阳性细胞数也出现了明显的减少, 这些都支持 OPN 在 RS 的发生中扮演着主角作用。

总之, 我们成功地证明了经动脉外膜转染 OPN-siRNA 能够显著降低 OPN 及细胞增殖相关基因 TGF- β 1、PCNA 的表达, 减轻新生内膜的形成。该研究试图为临床治疗血管再狭窄提供一定的理论依据及实验基础, 但其作用机制有待继续深入研究。

[参考文献]

- [1] Aziz S, Morris JL, Perry RA. Late stent thrombosis associated with coronary aneurysm formation after sirolimus-eluting stent implantation[J]. J Invasive Cardiol, 2007, 19

- (4): E96-E98.
- [2] Sarno G, Lagerqvist B, Nilsson J, et al. Stent thrombosis in new-generation drug-eluting stents in patients with STEMI undergoing primary PCI: a report from SCAAR [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 64(1): 16-24.
- [3] Hannes MF, Florence G. Epigenetic regulation of vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation by histone deacetylase inhibition [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(4): 851-860.
- [4] Anne ML, Lahouaria H, Elise M, et al. Efficient transduction of vascular smooth muscle cells with a translational AAV2.5 vector: a new perspective for in-stent restenosis gene therapy [J]. *Gene Ther*, 2013, 20(9): 901-912.
- [5] Han W, Liu GN. EGR-1 decoy ODNs inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia of balloon-injured arteries in rat [J]. *Life Sci*, 2010, 86(7-8): 234-243.
- [6] 张希, 刘闰男, 王泰然, 等. 早期反应生长因子1特异脱氧核酶对大鼠颈动脉损伤后纤溶酶原激活物抑制剂1表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 6(20): 503-507.
- [7] Boström K. Osteopontin, a missing link in PDGF-induced smooth muscle cell migration [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 75(4): 634-635.
- [8] 徐健, 冯丰, 刘闰男. 骨桥蛋白特异性 siRNA 抑制大鼠球囊损伤动脉内膜的增生 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 11(33): 2 597-601.
- [9] Simons M, Edelman ER, DeKeyser JL, et al. Antisense c-myc oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation in vivo [J]. *Nature*, 1992, 359(6390): 67-70.
- [10] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [11] Farb A, Kolodgie FD, Hwang JY, et al. Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries [J]. *Circulation*, 2004, 110(8): 940-947.
- [12] Jalvy S, Renault MA, Leen LL, et al. Autocrine expression of osteopontin contributes to PDGF-mediated arterial smooth muscle cell migration [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 75(4): 738-747.
- [13] 韩梅, 张永刚, 温进坤. 抗骨桥蛋白抗体抑制血管内膜增生的实验研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(3): 477-480.
- [14] Liu QF, Yu HW, Liu GN. Egr-1 upregulates OPN through direct binding to its promoter and OPN upregulates Egr-1 via the ERK pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 332(1-2): 77-84.
- [15] Li H, Liu QF, Liu GN. OPN antisense-nucleotide inhibited rat vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *Chin Tissue Eng Clin Rehabil*, 2010, 14(20): 3 646-649.
- [16] Miyake T, Nakagami H, Morishita R. Nucleic acid drugs for preventing restenosis after coronary revascularization [J]. *Curr Top Med Chem*, 2012, 12(15): 1 613-620.
- [17] Wang L, Zheng J, Bai X, et al. ADAMTS-7 mediates vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in balloon-injured rat arteries [J]. *Circ Res*, 2009, 104(5): 688-698.
- [18] Borges BE, Appel MH, Cofré AR, et al. The flavo-oxidase QSOX1 supports vascular smooth muscle cell migration and proliferation: Evidence for a role in neointima growth [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(7): 1 334-346.
- [19] Stadius ML, Gown AM, Kernoff R, et al. Cell proliferation after balloon injury of iliac arteries in the cholesterol-fed New Zealand White rabbit [J]. *Atheroscler Thromb*, 2010, 14(5): 727-733.
- [20] Bobbi A. Transforming growth factor-betas and vascular disorders [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(8): 1 712-720.
- [21] Khan R, Agrotis A, Bobik A. Understanding the role of transforming growth factor- β 1 in intimal thickening after vascular injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 74(2): 223-234.
- [22] Ji J, Xu F, Li L, et al. Activation of adventitial fibroblasts in the early stage of the aortic transplant vasculopathy in rat [J]. *Transplantation*, 2010, 89(8): 945-953.
- [23] Gaurav KG, Kajari D, Michael GD, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 and intimal hyperplasia in porcine coronary arteries following coronary intervention [J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 91(1): 346-352.
- [24] He D, Wang S, Jia Z, et al. Calcium ions promote primary renal epithelial cell differentiation into cells with bone-associated phenotypes via transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in idiopathic hypercalciuria patients [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(3): 2 199-206.
- [25] Sun J, Feng A, Chen S, et al. Osteopontin splice variants expressed by breast tumors regulate monocyte activation via MCP-1 and TGF- β 1 [J]. *Cell Mol Immunol*, 2013, 10(2): 176-182.
- [26] Driver J, Weber CE, Callaci JJ, et al. Alcohol inhibits osteopontin-dependent transforming growth factor- β 1 expression in human mesenchymal stem cells [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(16): 9 959-973.