

人参皂苷 Re 对球囊损伤大鼠血管内膜增殖及 TGF- β 1/Smads 信号通路的影响

高晨盈, 王俊逸, 罗云梅, 高 杨*

遵义医学院 基础药理省部共建教育部重点实验室, 贵州 遵义 563000

摘要: 目的 探讨人参皂苷 Re (GS-Re) 对球囊损伤后大鼠颈动脉内膜增殖及 TGF- β 1/Smads 信号通路的影响。方法 50 只清洁级 SD 大鼠随机分为 5 组: 假手术组, 模型组, GS-Re 低、中、高剂量 (12.5、25.0、50.0 mg/kg) 组。除假手术组外, 其余组大鼠均采用 2F 球囊导管建立颈动脉球囊损伤模型, 造模后次日开始 ig 给药, 连续给药 14 d 后取损伤段颈动脉, 行 HE 染色, 观察血管形态学改变, 用 Leica 光学显微镜测定血管腔面积 (LA)、内膜面积 (IA)、中膜面积 (MA), 并计算 IA/MA。利用 Real time RT-PCR 法、免疫组织化学法分别检测转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)、Smad2、Smad3 的 mRNA 表达及蛋白水平的变化。结果 与假手术组比较, 模型组血管腔变窄 ($P < 0.01$); 与模型组比较, GS-Re 中、高剂量组血管内膜增生减轻 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与假手术组比较, 模型组血管壁 TGF- β 1、Smad2、Smad3 mRNA 水平及其蛋白表达均增高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, GS-Re 中、高剂量组血管壁 TGF- β 1、Smad2、Smad3 mRNA 水平下调, 蛋白表达量也降低 ($P < 0.05$)。此外, GS-Re 低剂量组血管壁 TGF- β 1 mRNA 水平及 p-Smad2 蛋白的表达也下调 ($P < 0.01$)。结论 GS-Re 可通过抑制 TGF- β 1/Smads 通路发挥抑制血管内膜增殖的作用。

关键词: 人参皂苷 Re; 球囊损伤; 内膜增殖; 转化生长因子 β 1; Smad2/3

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2017)01 - 0143 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.01.020

Effects of ginsenoside Re on vascular intimal proliferation in balloon-injured rats via regulation of TGF- β 1/Smads signaling pathway

GAO Chen-ying, WANG Jun-yi, LUO Yun-mei, GAO Yang

Department of Key Laboratory of Basic Pharmacology of ministry of education, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effects of ginsenoside Re on intimal hyperplasia in balloon-injured rats and further explore the role of TGF- β 1/Smads signaling pathway in this protection. **Methods** Fifty SD rats were randomly divided into five groups, including Sham operation group, model group, ginsenoside Re low, medium, and high-dose groups. The injured model of carotid artery intima was established by 2F balloon catheters in each group except the sham operation group. One day after model was established, animals were daily ig administered with distilled water in model group, Sham operation group, and ginsenoside Re (12.5 mg/kg, 25 mg/kg and 50 mg/kg) groups. Two weeks later, animals were sacrificed and the injured artery was taken for HE staining. The histopathological changes were observed and the lumen area, intima area, and media area as well as the ratio of intimal area/media area were detected. The expression of transforming growth factors β 1 (TGF- β 1), SMAD family member 2 (Smad 2) and Smad family member 3 (Smad 3) were measured by real time RT-PCR and immunohistochemistry. **Results** Compared with the Sham operation group, the vessel cavity in the model group was narrower ($P < 0.01$); Compared with the model group, the medium and high dose of ginsenoside Re obviously alleviated vascular intimal hyperplasia ($P < 0.05$). Compared with the Sham operation group, the mRNA and protein expressions levels of TGF- β 1, Smad 2, and Smad 3 in model group were higher ($P < 0.01$), which were obviously decreased in the medium and high-dose ginsenoside Re ($P < 0.05$). **Conclusion** Ginsenoside Re could alleviate the vascular neointimal hyperplasia through suppressing the TGF- β 1/Smads signaling pathway.

Key words: ginsenoside Re; ballon injury; intimal hyperplasia; transforming growth factors β 1; Smad2/3

收稿日期: 2016-08-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81360494); 贵州省科学技术基金 (黔科合 J 字 LKZ [2010] 31 号); 贵州省教育厅自然科学研究项目 (黔教合 KY (2012) 080 号)

作者简介: 高晨盈 (1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理学。E-mail: 841003194@qq.com

*通信作者 高 杨 Tel: (0851)28609493 E-mail: 46523533@qq.com

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 导致病变动脉管腔逐渐狭窄而出现心肌缺血甚至心肌梗死, 严重威胁人类生命健康。目前经皮冠状动脉介入 (percutaneous coronary intervention, PCI) 技术广泛应用于临床治疗冠心病, 但术后均会发生不同程度的再狭窄 (restenosis, RS), 远期疗效不佳^[1]。现已明确, 血管内膜增殖是 AS 及 PCI 术后 RS 的主要病变基础^[2]。在血管急性损伤的早期阶段, 因受到炎症因子刺激和血栓形成的影响, 会引起转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、血小板源性生长因子 (PDGF) 等释放。Smad (small mother against decapentaplegic) 蛋白是 TGF- β 1 信号通路中重要的细胞内作用底物, TGF- β 1/Smads 信号通路在细胞的分化、生长、增殖、凋亡、迁移, 免疫应答, 以及炎症反应中均发挥着重要作用^[3]。且大量研究表明, TGF- β 1 与动脉粥样硬化斑块的形成、PCI 术后血管 RS 以及血管壁损伤后修复有关, 这些生物学效应与 TGF- β 1/Smads 通路关系密切^[4]。人参皂苷 Re (ginsenoside Re, GS-Re) 是人参皂苷的一个重要活性成分, 主要存在于人参叶、浆果和根中, 前期研究发现 GS-Re 对球囊损伤所致血管内膜增殖具有抑制作用^[5], 本实验进一步探讨其抗血管内膜增殖过程中对 TGF- β 1/Smads 信号通路的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂

GS-Re (北京奥明兴业科技有限责任公司, 质量分数 95%, 20141001); RNA 逆转录试剂盒 (宝生物工程大连有限公司); 兔抗大鼠 TGF- β 1、兔抗大鼠 p-Smad2、兔抗大鼠 p-Smad3 (北京博奥森生物技术有限公司); sp 法试剂盒 (北京中杉金桥公司); TGF- β 1、Smad2、Smad3 引物 (上海捷瑞生物工程有限公司)。

1.2 仪器

Fogarty 导管 (美国 Edwards lifescience 公司); Leica 光学显微镜及照相系统 (德国 Leica Microsystems 公司); Bio-Rad CFX96 Real-time RT-PCR 扩增仪和 Bio-Rad iMark 通用酶标仪均购于美国 Bio-rad 公司。

1.3 动物

清洁级雄性 SD 大鼠, 体质量 300~350 g, 由中国人民解放军第四军医大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (军) 2012-0007。

2 方法

2.1 模型制备

参照文献报道方法^[6]制备大鼠颈总动脉球囊损伤模型。术前禁食 12 h, ip 7% 水合氯醛 350 mg/kg 麻醉动物。颈部正中切口, 在气管左侧分离出左颈总动脉, 在左胸锁乳突肌乳突端寻找左颈外、颈内动脉分叉处, 靠近分叉处分离颈外动脉, 双结结扎颈外动脉远心端。夹闭颈总动脉近心端和颈内动脉, 用显微外科剪在颈外动脉远心端 1/3 处 45 度剪开一小口, 自此逆行将 Fogarty 导管从切口插入至颈总动脉约 3~4 cm, 以生理盐水 0.05~0.10 mL 充盈球囊缓慢往回抽拉, 来回 3 次剥脱内膜, 将 Fogarty 导管取出, 用细线结扎颈外动脉近心端, 松开动脉夹, 恢复血流, 缝合切口。并皮下注射 4×10^4 U 注射用青霉素钠预防感染。造模后即刻随机取 1 只大鼠自股静脉注入 0.5% (2 mL/kg) 的伊文思蓝染液, 1 h 后取颈总动脉观察, 正常血管面不染色, 内皮损伤后的血管腔染蓝色。

2.2 分组与给药

50 只 SD 大鼠随机分为 5 组, 即假手术组, 模型组, GS-Re 低、中、高剂量 (12.5、25、50 mg/kg) 组。假手术组大鼠只进行颈总动脉的分离, 不行球囊损伤术, 其他组大鼠行球囊损伤术, 其余操作相同。术后第 2 天 GS-Re 各组大鼠 ig 给予 GS-Re, 假手术组和模型组大鼠 ig 给予相同体积的蒸馏水, 每天 1 次, 连续给药 14 d, 末次给药 24 h 后 ip 7% 水合氯醛 (350 mg/kg) 麻醉大鼠, 然后迅速取出左颈总动脉, 用生理盐水洗净后分成 3 段, 中间部分置于 4% 甲醛溶液固定 24 h 后石蜡包埋, 余下组织于 -80 °C 冰箱保存。

2.3 HE 染色观察动脉内膜损伤情况

将石蜡包埋的标本进行 HE 染色, 在 Leica 光学显微镜下进行形态学观察并拍照。利用 cellSens Standard 专业分析软件测量血管腔面积 (LA)、内弹力板围绕面积 (IELA)、外弹力板围绕面积 (EELA), 计算内膜面积 (IA) 和中膜面积 (MA), 其中 $IA = IELA - LA$, $MA = EELA - IELA$, 每个样本切片 3 张, 分别测量后取平均值, 并计算 IA/MA。

2.4 Real-time RT-PCR 检测动脉 TGF- β 1、Smad2、Smad3 mRNA 的表达

2.4.1 Trizol 法提取颈总动脉 mRNA 取冷冻标本置于预先加入 Trizol 液 0.5 mL 的 1.5 mL EP 管中, 电动研磨棒充分匀浆至组织完全裂解, 加入氯仿 0.1

mL, 4 °C, 15 278×g 离心 15 min, 取上清, 加入与上清液等体积的异丙醇, 摇匀, 静置 2 h, 4 °C, 15 278×g 离心 15 min, 弃上清, 控干, 加 75%乙醇进行洗涤, 4 °C, 5 968×g 离心 5 min, 弃上清, 控干, 加入适量 DEPC 水溶解, 最后测吸光度值。

2.4.2 逆转录反应 按照逆转录试剂盒的说明书进行。10 μL 逆转录反应体系, 包括 5×PrimeScribe TM Buffer 2.0 μL, PrimeScribe TMRT Enzyme Mix 1 0.5 μL, Oligod T Primer (50 μmol/L) 0.5 μL, Random6 mers (100 μmol/L) 0.5 μL 和 mRNA 6.5

μL; 反应条件为 37 °C、15 min, 85 °C、5 s, 得到的 cDNA 备用。

2.4.3 Real-time RT-PCR 实验 将 iQ SYBR Green Supermix 7.5 μL、DEPC 水 4 μL、正向和反向引物共 0.5 μL 混匀后, 取 8 μL 与逆转录产物 cDNA 2 μL 构成 10 μL 反应体系; 反应条件为 95 °C、3 min, 95 °C、10 s, 60 °C、45 s; 循环 40 次。以 C_t 值为统计参数, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示基因表达量, 以目的基因的表达量/内参基因的表达量为目的基因相对表达量。从基因库 (GeneBank) 查出相关引物序列。相关基因序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences for primers

基因	基因号		引物序列
β-actin	NM_031144.2	正向	5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'
		反向	5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'
TGF-β1	NM_021578.2	正向	5'-CATTGCTGTCCCGTGCAGA-3'
		反向	5'-AGGTAACGCCAGGAATTGTTGCTA-3'
Smad2	NM_019191.1	正向	5'-TTACAGATCCATCGAACTCGGAGA-3'
		反向	5'-CACTTAGGCACTCGGCAAAACAC-3'
Smad3	NM_013095.2	正向	5'-CCAGATGAACCACAGCATGGA-3'
		反向	5'-CTACTGTCATGGACGGCTGTGAA-3'

2.5 免疫组织化学法检测 TGF-β1、p-Smad2、p-Smad3 蛋白表达

将石蜡切片脱蜡至水, 0.3% triton X-100 破膜 20 min, 0.01% 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 6 min×2 次, 每次间隔补足液体, 防止干片, 用微波炉进行热抗原修复, PBS 冲洗 (3 次×5 min), 3% H₂O₂ 避光室温孵育 15 min, 灭活内源性过氧化物酶, PBS 冲洗 (3×5 min)。参照 sp 法免疫组化检测试剂盒说明书操作, 滴加试剂 A 常温孵育 15 min, 弃去滴加一抗 (TGF-β1、p-Smad2、p-Smad3) 37 °C 孵育 3 h, 阴性对照用 PBS 代替一抗, PBS 冲洗 (3 次×5 min), 滴加试剂 B, 37 °C 孵育 15 min, PBS 冲洗 (3 次×5 min), 滴加试剂 C, 37 °C 孵育 15 min, PBS 冲洗 (3 次×5 min), DAB 显色、苏木精复染、分化、脱水、封片, 每张切片选择 5 个高倍视野 (×400), 分别计数血管内膜和中膜的正常细胞和 p-Smad2、p-Smad3 阳性细胞 (细胞核内含棕黄和 (或) 褐色颗粒的细胞) 数量, 计算 p-Smad2、p-Smad3 的阳性细胞率 (阳性细胞数/细胞总数); 采用 Image-Pro Plus 图像分析软件测量 TGF-β1 的积分光密度值及血管内膜和中膜总面积, 以积分光密度值与总面积的比值为 TGF-β1 的阳性表达量。每组 5

只大鼠。

2.6 统计学处理

定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 18.0 软件进行录入和单因素方差分析, 进一步两两差异比较采用 SNK 法。

3 结果

3.1 颈总动脉内膜形态改变

由 HE 染色结果 (图 1) 可见, 假手术组内膜光滑, 无增厚现象; 与假手术组比较, 模型组血管内膜明显增厚, 管腔狭窄, IA 及 IA/MA 分别增加 22.24 倍和 14.95 倍 ($P < 0.01$); 与模型组比较, GS-Re 中、高剂量组内膜厚度降低, 使管腔面积增大, 中剂量组 IA 及 IA/MA 均轻度下降 ($P < 0.05$)。GS-Re 高剂量组 IA 及 IA/MA 分别下降 61.19% 和 46.54% ($P < 0.01$), 见表 2。

3.2 颈总动脉 TGF-β1、Smad2、Smad3 mRNA 的表达

与假手术组比较, 模型组颈总动脉 TGF-β1、Smad2、Smad3 mRNA 的表达分别升高 3.47、3.72、4.88 倍 ($P < 0.01$)。与模型组比较, GS-Re 中、高剂量组颈总动脉 TGF-β1、Smad2、Smad3 mRNA 的表达均有下调 ($P < 0.01$), 见表 3。

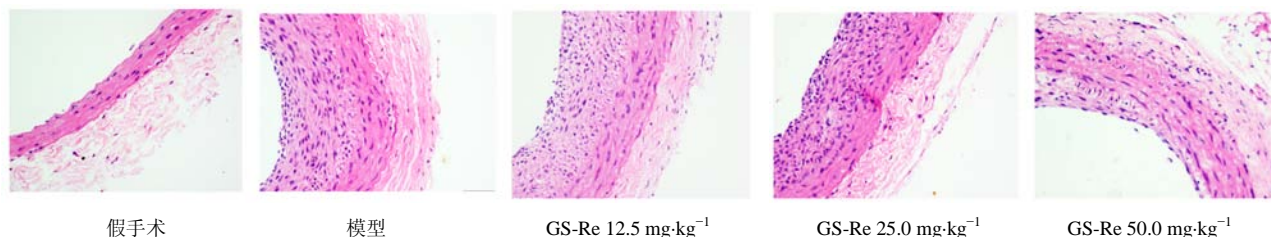


图 1 GS-Re 对球囊损伤大鼠颈动脉形态学的影响

Fig. 1 Effect of Ginsenosides Re on morphologic change of carotid artery in rats after balloon injury

表 2 GS-Re 对球囊损伤大鼠血管内膜 LA、IA、MA 和 IA/MA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of ginsenoside Re on LA, IA, MA, and IA/MA of carotid artery in rats after balloon injury ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	LA/ μm^2	IA/ μm^2	MA/ μm^2	IA/MA
假手术	—	399 772.99 ± 25 796.14	15 954.85 ± 2 071.64	164 103.69 ± 9 467.21	0.10 ± 0.01
模型	—	112 075.48 ± 28 019.40**	350 425.66 ± 60 367.78**	219 889.76 ± 11 220.79	1.65 ± 0.23**
GS-Re	12.5	134 167.71 ± 12 883.18	273 774.63 ± 21 680.56	200 099.47 ± 14 859.43	1.39 ± 0.13
	25.0	213 352.31 ± 24 257.35 [#]	198 405.75 ± 36 115.85 [#]	205 394.90 ± 7 300.92	0.98 ± 0.20 [#]
	50.0	206 832.71 ± 44 257.71 [#]	140 823.68 ± 42 635.48 ^{##}	177 386.68 ± 9 410.88	0.78 ± 0.23 ^{##}

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$, 下表同

** $P < 0.01$ vs Sham group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group, same as below tables

表 3 GS-Re 对球囊损伤大鼠颈总动脉 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of ginsenoside Re on mRNA expression of TGF- β 1, Smad2, and Smad3 of carotid artery in rats after balloon injury ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TGF- β 1	Smad2	Smad3
假手术	—	0.39 ± 0.14	0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.03
模型	—	1.90 ± 0.18**	0.36 ± 0.01**	0.32 ± 0.03**
GS-Re	12.5	1.17 ± 0.19 ^{##}	0.25 ± 0.04	0.24 ± 0.04
	25.0	1.08 ± 0.11 ^{##}	0.21 ± 0.02 ^{##}	0.19 ± 0.02 ^{##}
	50.0	0.86 ± 0.22 ^{##}	0.11 ± 0.02 ^{##}	0.12 ± 0.02 ^{##}

3.3 颈总动脉 TGF- β 1、p-Smad2、p-Smad3 蛋白表达

TGF- β 1 主要表达于细胞浆, 可见成片棕褐色区域; p-Smad2 主要表达于细胞核, 有棕黄和(或)褐色颗粒的细胞为 p-Smad2 阳性表达细胞; p-Smad3 主要表达于细胞核和细胞浆。结果显示, 模型组血管内膜及中膜均有 TGF- β 1、p-Smad2、p-Smad3 阳性表达细胞, 且表达主要集中在新生内膜, 在模型组 TGF- β 1 及其下游蛋白 p-Smad2、p-Smad3 的蛋白表达趋势一致, 均较假手术组显著增加 ($P < 0.01$), 而 GS-Re 中、高剂量组与模型组相比, TGF- β 1、p-Smad2、p-Smad3 蛋白表达均明显减少 ($P < 0.01$)。结果见图 2 和 3。

4 讨论

PCI 是目前临床治疗 AS 的主要手段之一, 但

术后会发生不同程度的 RS。本实验采用经典的球囊损伤模型模拟血管再狭窄, HE 染色结果显示, 血管内膜增殖模型制作成功, GS-Re 中、高剂量组血管增殖明显减轻, 提示 GS-Re 对球囊损伤大鼠血管平滑肌增殖具有抑制作用, 可减轻血管内膜增殖, 这与之前的研究结果一致^[5]。

TGF- β 家族在细胞生长、分化、迁移、凋亡, 炎症, 血管损伤中的调控作用早有文献报道^[7-8]。过多的 TGF- β 活化能够促进多种疾病的产生和发展, 包括癌症、血管疾病及多种器官的渐进性纤维化等。

Smad 家族是最早被证实的 TGF- β 1 下游因子, 目前, 在哺乳动物分离鉴定出的 Smad 蛋白有 9 种, 分别用 Smad1~9 表示, 其中 Smad2、Smad3 可被 TGF- β 1 激活, 作为 TGF- β 1 受体 (T β RI) 激酶的直接底物, 活化后与通用介体型 Smad4 形成复合物转

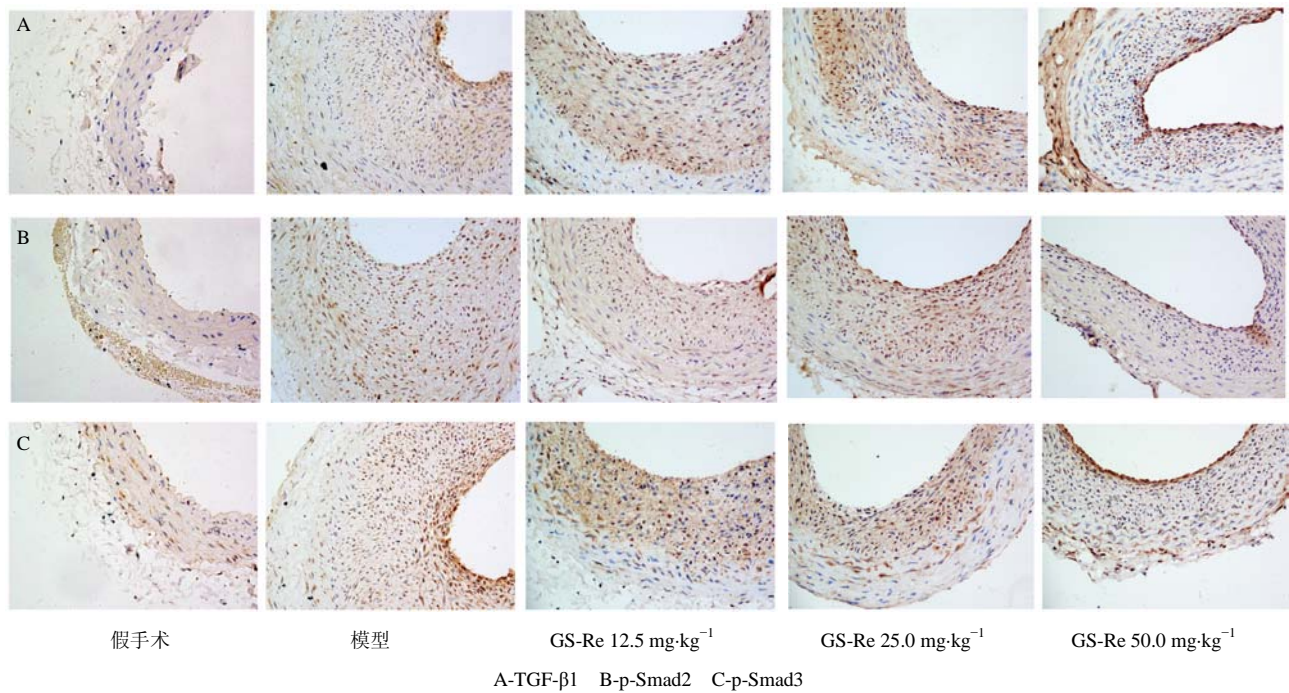


图 2 免疫组化检测球囊损伤大鼠颈总动脉 TGF-β1、p-Smad2、p-Smad3 蛋白表达

Fig. 2 Protein expression of TGF-β1, p-Smad2, and p-Smad3 of carotid artery in rats after balloon injury by immunohistochemistry

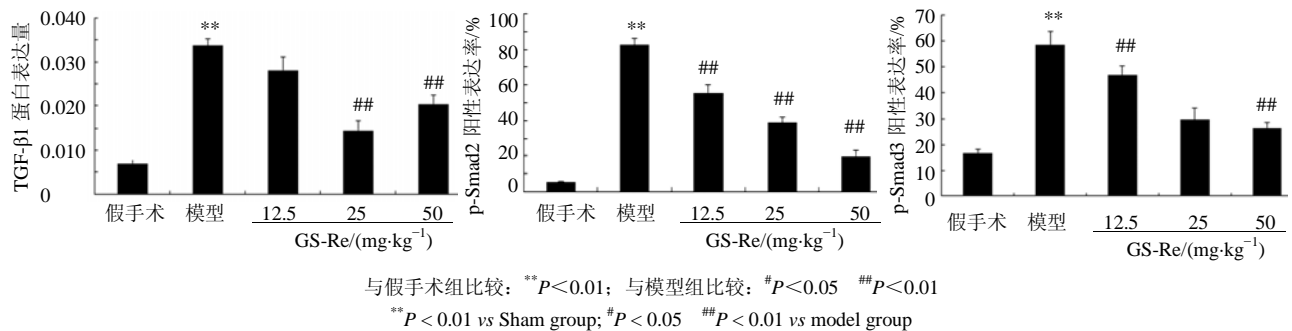


图 3 GS-Re 对球囊损伤大鼠颈总动脉 TGF-β1、p-Smad2、p-Smad3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effect of ginsenosides Re on protein expression of TGF-β1, p-Smad2, and p-Smad3 of carotid artery in rats after balloon injury ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

移至细胞核内，从而调控靶基因转录^[9]。在粥样硬化斑块和血管再狭窄的部位，TGF-β 和 Smad 基因表达及活性明显增高并延续至细胞外基质形成的全过程^[10]。TGF-β1 通过 Smad 蛋白信号转导刺激血管平滑肌细胞的增殖、迁移及纤连蛋白的合成，导致细胞外基质沉积，加重血管内膜增殖的发生^[11-12]。在本实验中，TGF-β1 的基因及蛋白表达在球囊损伤模型组中均增加，其下游基因 Smad2、Smad3 及磷酸化蛋白水平也明显上调，采用的免疫组化染色方法，确定了 TGF-β1/Smads 信号通路蛋白主要表达于新生内膜处，印证了该通路对内膜增殖的促进作用。而与模型组相比，GS-Re 高、中剂

量可降低球囊损伤大鼠血管壁 TGF-β1 的表达，对 Smad2、Smad3 及其磷酸化水平也有下调作用，表明 GS-Re 可通过抑制 TGF-β1/Smads 通路发挥抑制血管平滑肌增殖的作用。

参考文献

[1] Pache J, Dibra A, Mehilli J, *et al.* Drug-eluting stents compared with thin-strut bare stents for the reduction of restenosis: A prospective, randomized trial [J]. *Acc Curr Rev*, 2005, 14(10): 33-34.
 [2] Yang L, Sakurai T, Kamiyoshi A, *et al.* Endogenous CGRP protects against neointimal hyperplasia following wire-induced vascular injury [J]. *J Mol Cell Cardiol*,

- 2013, 59(6): 55-66.
- [3] 李如君, 龚开政, 张振刚. Smad 蛋白在心血管疾病中作用的研究进展 [J]. 中华心血管病杂志, 2013, 41(6): 530-532.
- [4] 王嵩浩, 盛 净, 蔡文玮, 等. 反义 Smad3 转染阻断 TGF- β_1 信号转导对球囊损伤后大鼠血管内膜增生的影响 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2010, 30(5): 522-526.
- [5] 高 杨, 杨 洁, 安勇刚, 等. 人参皂苷 Re 对球囊损伤所致大鼠颈动脉新生内膜增生及 ERK 通路的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(18): 1589-1593.
- [6] 刘 彬, 程 伟. 大鼠新型颈总动脉球囊损伤后狭窄模型的建立及其动态病理学观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(5): 269-271.
- [7] Choi M E. Mechanism of transforming growth factor- β_1 signaling: Role of the mitogen-activated protein kinase [J]. *Kidney Inter Suppl*, 2000, 77(S77): S53-S58.
- [8] Kelly R J, Morris J C. Transforming growth factor-beta: a target for cancer therapy [J]. *J Immunotoxicol*, 2010, 7(1): 15-26.
- [9] Samarakoon R, Overstreet J M, Higgins S P, et al. TGF- β_1 →SMAD/p53/USF2→PAI-1 transcriptional axis in ureteral obstruction-induced renal fibrosis [J]. *Cell Tiss Res*, 2012, 347(1): 117-128.
- [10] 曾武涛, 陈伟燕, 冷秀玉, 等. 血管紧张素-(1-7)在减轻兔腹主动脉球囊损伤后血管壁胶原合成中的作用 [J]. 中华心血管病杂志, 2010, 38(6): 531-538.
- [11] Wang W D, Qi R M. Transforming growth factor- β /Smad3 signaling pathway in atherosclerosis [J]. *Chin J Arterioscl*, 2011, 19(10): 875-878.
- [12] Lu P, Wang S, Cai W, et al. Role of TGF- β_1 /Smad3 signaling pathway in secretion of type I and III collagen by vascular smooth muscle cells of rats undergoing balloon injury [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, doi: 10.1155/2012/965953.