论著·基础医学

穗花杉双黄酮通过靶向NF-κB-MMP2/9轴抑制血管平滑肌细胞表型转换减缓腹主动脉瘤进展

林 鑫,谢汶纹,丁 伟,余骏逸,曾春雨 陆军军医大学(第三军医大学)大坪医院心内科,重庆

[摘要] **目的** 探究穗花杉双黄酮(amentoflavone,AMF)影响腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm,AAA)发生发展的作用及机制,为其防治提供新的候选药物与理论依据。**方法** ①动物实验。以血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ,Ang Ⅱ)诱导构建AAA小鼠模型:将6~8周龄ApoE$^{-/-}$雄性小鼠按随机数字表法分为6组(n=10):生理盐水+DMSO组(皮下泵入生理盐水)、生理盐水+AMF组、Ang Ⅱ+DMSO组[皮下泵入Ang Ⅱ 1 000 ng/(kg·min)]、Ang Ⅱ+AMF组(AMF浓度为10、20、50 mg/kg)。建模后的第2天腹腔注射AMF(10、20、50 mg/kg)或其溶剂DMSO 100 μL,每2天1次,建模周期为28 d,建模终点根据AAA成瘤率选择最优浓度20 mg/kg用于后续实验。再以弹性蛋白酶外膜孵育诱导构建AAA小鼠模型:将6~8周龄C57BL/6J雄性小鼠按随机数字表法分为4组(n=6):假手术+DMSO组、假手术+AMF组(主动脉外膜孵育高温失活的弹性蛋白酶20 min)、弹性蛋白酶+DMSO组、弹性蛋白酶+AMF组(主动脉外膜孵育弹性蛋白酶20 min),建模周期为14 d,AMF或DMSO的注射方式和时间同Ang Ⅱ模型。建模期内记录小鼠生存情况;建模终点以血管超声检测腹主动脉扩张程度,采用HE、VVG染色检测腹主动脉弹性纤维的降解程度。RT-qPCR和Western blotting检测基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2,MMP2)和MMP9的表达水平。②网络药理学分析。从Genecards数据库检索、选取标注为与AAA相关的前2 000个基因,构成AAA靶点集合。为预测可能作用于AAA的物质,采用Galaxy WEB、SuperPRED和SwissTargetPrediction这3个在线工具预测AMF的潜在靶点,获得399个AMF相关靶点构成靶点集合。将AAA和AMF靶点集取交集,重叠部分为共同靶点,输入STRING数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction,PPI)网络,将PPI网络数据导入Cytoscape进行网络可视化和图形优化。③细胞实验。提取成年雄性SD大鼠的原代腹主动脉血管平滑肌细胞(rat aortic vascular smooth muscle cell,RAVSMC)行体外培养,用血小板衍生生长因子BB(platelet-derived growth factor BB,PDGFBB)诱导细胞发生表型转换,将细胞随机分为4组(n=4):DMSO+CTL组、DMSO+PDGFBB组、AMF+CTL组(浓度为20 μmol/L)、AMF+PDGFBB(浓度为25 ng/mL)组。RT-qPCR和Western blotting检测Calponin、αSMA、MMP2、MMP9的表达水平,Western blotting检测NF-κB信号通路分子(IκBα和P-IκBα)的蛋白水平,免疫荧光染色检测p65的入核情况,CCK-8实验检测RAVSMC的增殖水平,划痕实验和Transwell细胞小室实验检测RAVSMC的迁移能力。通路逆转实验,将细胞随机分为4组(n=4):DMSO+CTL组、DMSO+PDGFBB组、AMF+PDGFBB组(处理同前)、AMF+PDGFBB+TNF-α(浓度为20 ng/mL)组,RT-qPCR和Western blotting检测Calponin、αSMA、MMP2、MMP9的表达水平。**结果** ①AMF能显著提高Ang Ⅱ诱导的AAA模型小鼠的生存率(P<0.05)、降低AAA的发病率、减小腹主动脉的扩张程度(P<0.01)、减弱中膜弹性纤维的断裂降解(P<0.001),抑制AAA组织中MMP2(P<0.01)、MMP9(P<0.05)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82470506)

[通信作者] 曾春雨,E-mail:zengchunyu@tmmu.edu.cn
余骏逸,E-mail:yujunyi@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2026,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:林鑫,谢汶纹,丁伟,等. 穗花杉双黄酮通过靶向NF-κB-MMP2/9轴抑制血管平滑肌细胞表型转换减缓腹主动脉瘤进展[J]. 陆军军医大学学报,2026,48(10):1353-1367. DOI:10.16016/j.2097-0927.202604083.

Citation:LIN X,XIE W W,DING W,*et al*. Amentoflavone attenuates abdominal aortic aneurysm progression by suppressing vascular smooth muscle cell phenotypic switching *via* targeting NF-κB - MMP-2/9 axis[J]. J Army Med Univ,2026,48(10):1353-1367. DOI:10.16016/j.2097-0927.202604083.

的表达。AMF能够显著减小弹性蛋白酶诱导的AAA模型小鼠腹主动脉的扩张程度(P<0.001),减弱中膜弹性纤维的断裂降解(P<0.001),抑制AAA组织中MMP2(P<0.001)、MMP9(P<0.05)的表达。②网络药理学PPI分析表明,MMP2和MMP9处于治疗靶点网络的核心位置。③RT-qPCR显示AMF(20 μmol/L)处理显著抑制了由PDGFBB(25 ng/mL)诱导的RAVSMC的MMP2(P<0.05)、MMP9(P<0.01)mRNA水平升高,提高了Calponin(P<0.001)、αSMA(P<0.05)mRNA水平;Western blotting显示AMF抑制了由PDGFBB诱导的MMP2(P<0.001)、MMP9(P<0.001)蛋白水平升高,以及Calponin(P<0.01)、αSMA(P<0.001)蛋白水平的下降;CCK-8实验显示AMF显著抑制了由PDGFBB诱导的细胞过度增殖(P<0.001);划痕实验和Transwell细胞小室实验显示AMF显著抑制了由PDGFBB诱导的细胞迁移能力(P<0.001)。TRRUST转录因子网络分析提示RELA(p65)是排名首位的转录因子;Western blotting显示AMF明显降低IκBα的磷酸化水平(P<0.001);免疫荧光染色结果提示AMF处理有效地降低p65的入核水平,从而抑制NF-κB信号通路。通路逆转实验中,RT-qPCR显示TNF-α(20 ng/mL)处理抑制了AMF诱导的MMP2(P=0.087)、MMP9(P<0.05)mRNA水平的下降,以及Calponin(P<0.05)、αSMA(P<0.05)mRNA水平的上升;Western blotting显示TNF-α抑制了AMF诱导的MMP2(P<0.001)、MMP9(P<0.001)蛋白水平的下降,以及Calponin(P<0.05)、αSMA(P=0.063)蛋白水平的上升。**结论** AMF通过靶向NF-κB-MMP2/9轴来减缓AAA的发展,体现了其作为防治AAA新型药物的潜力。

[**关键词**] 腹主动脉瘤;血管平滑肌细胞;穗花杉双黄酮;基质金属蛋白酶;NF-κB信号
[**中图法分类号**] R285.5;R322.12;R543.13 [**文献标志码**] A

Amentoflavone attenuates abdominal aortic aneurysm progression by suppressing vascular smooth muscle cell phenotypic switching *via* targeting NF-κB-MMP2/9 axis

LIN Xin, XIE Wenwen, DING Wei, YU Junyi, ZENG Chunyu Department of Cardiology, Daping Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role and mechanism of amentoflavone (AMF) in abdominal aortic aneurysm (AAA) pathogenesis, providing novel therapeutic candidates and theoretical foundations. **Methods** ①Animal studies: AAA models were induced by angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ) in 6 to 8-week-old male ApoE$^{-/-}$ mice randomized (n=10/group) into saline+DMSO, saline+AMF, Ang Ⅱ+DMSO (1 000 ng·kg^{-1}·min^{-1}), and Ang Ⅱ+AMF (10, 20, 50 mg/kg) groups. AMF or DMSO (100 μL) was intraperitoneally administered every 48 h from day 2 for 28 d; 20 mg/kg AMF (optimal dose by AAA incidence) was selected for subsequent experiments. Alternatively, AAA was induced by periaortic elastase incubation in C57BL/6J mice randomized (n=6) into sham+DMSO, sham+AMF (heat-inactivated elastase), elastase+DMSO, and elastase+AMF groups for 14 d with identical AMF/DMSO protocols. Survival was monitored; AAA dilation was assessed by ultrasonography; elastic fiber degradation was evaluated *via* HE and VVG staining; MMP2/MMP9 expression was quantified by RT-qPCR/Western blotting. ②Network pharmacology: AAA-related targets (top 2 000 genes from Genecards) and AMF targets (predicted *via* Galaxy WEB/SuperPred/SwissTargetPrediction) were intersected; protein-protein interaction (PPI) networks were constructed using STRING and visualized in Cytoscape. ③Cellular experiments: Primary rat aortic vascular smooth muscle cells (RAVSMCs) were treated with: DMSO+CTL, DMSO+PDGFBB (25 ng/mL), AMF+CTL (20 μmol/L), or AMF+PDGFBB. Calponin, αSMA, MMP2, MMP9, IκBα, and phospho-IκBα levels were assessed; NF-κB activation was evaluated *via* p65 nuclear translocation; proliferation (CCK-8) and migration (scratch/Transwell) were measured. Pathway rescue: TNF-α (20 ng/mL) was co-administered with AMF+PDGFBB to assess target reversibility. **Results** ① AMF significantly improved the survival rate of Ang Ⅱ-induced AAA model mice (P<0.05), decreased the incidence of AAA, reduced the degree of abdominal aortic dilation (P<0.01), attenuated elastic

fiber fragmentation and degradation in the aortic media ($P<0.001$), and inhibited the expression of MMP2 ($P<0.01$) and MMP9 ($P<0.05$) in AAA tissues. AMF also markedly reduced the extent of abdominal aortic dilation ($P<0.001$), mitigated medial elastic fiber disruption ($P<0.001$), and suppressed MMP2 ($P<0.001$) and MMP9 ($P<0.05$) expression in the elastase-induced AAA model. ② PPI network analysis revealed that MMP2 and MMP9 occupied a core position within the therapeutic target network. ③ RT-qPCR analysis showed that AMF treatment (20 μmol/L) significantly reversed the PDGF BB (25 ng/mL)-induced increases in MMP2 ($P<0.05$) and MMP9 ($P<0.01$) mRNA levels and the decreases in Calponin ($P<0.001$) and αSMA ($P<0.05$) mRNA levels in RAVSMCs. Western blotting demonstrated that AMF attenuated the PDGF BB-induced upregulation of MMP2 ($P<0.001$) and MMP9 ($P<0.001$) proteins and the downregulation of Calponin ($P<0.01$) and αSMA ($P<0.001$) proteins. The CCK-8 assay indicated that AMF markedly suppressed PDGFBB-induced excessive proliferation ($P<0.001$), and wound healing and Transwell assays showed that AMF significantly inhibited PDGFBB-induced cell migration ($P<0.001$). TRRUST transcription factor network analysis identified RELA (p65) as the top-ranked transcription factor. Western blotting revealed that AMF substantially decreased the phosphorylation level of IκBα ($P<0.001$), and immunofluorescence staining demonstrated that AMF effectively reduced the nuclear translocation of p65, thereby inhibiting the NF-κB signaling pathway. In the pathway rescue experiment, RT-qPCR showed that TNF-α (20 ng/mL) treatment counteracted the AMF-induced decreases in MMP2 ($P=0.087$) and MMP9 ($P<0.05$) mRNA levels and the increases in calponin ($P<0.05$) and αSMA ($P<0.05$) mRNA levels. Western blotting confirmed that TNF-α reversed the AMF-mediated reduction in MMP2 ($P<0.001$) and MMP9 ($P<0.001$) protein expression and the elevation of Calponin ($P<0.05$) and αSMA ($P=0.063$) protein levels. **Conclusion** AMF attenuates AAA progression by targeting the NF-κB-MMP2/9 axis, demonstrating its potential as a novel AAA therapeutic agent.

[**Key words**] abdominal aortic aneurysm; vascular smooth muscle cells; amentoflavone; matrix metalloproteinase; NF-κB signaling

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82470506). Corresponding authors: ZENG Chunyu, E-mail: zengchunyu@tmmu.edu.cn; YU Junyi, E-mail: yujunyi@tmmu.edu.cn

腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm,AAA)是一种严重的血管病变,以腹主动脉局部的永久性扩张为特征,具有破裂和致死性出血的巨大风险[1]。临床上,AAA 在破裂前通常无症状,偶有轻微腹痛或背痛等非特异性症状。除开放手术修复和血管内支架植入等外科干预外,药物干预也可能发挥着重要的作用[2]。

AAA的发病机制涉及多种病理过程的复杂交互。在炎症和氧化应激等病理刺激下,作为维持血管生理功能重要组成部分的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell,VSMC)会从收缩表型转变为合成表型,这是AAA进展中的关键事件[3-6]。合成型VSMC不仅迁移和增殖能力增强,还分泌多种蛋白酶,这些酶会降解中膜的弹力蛋白和胶原,从而削弱主动脉壁并促使管腔扩张[7-8]。尽管对这些机制的认识不断深入,但向临床有效疗法的转化仍滞后,这凸显了寻找能够安全抑制AAA发展的新型药物的重要性。穗花杉双黄酮(amentoflavone,AMF)是一种存在于多种药用植物中的天然双黄酮,因其多样的药理特性,特别是抗炎和抗氧化作用而受到关注[9]。既往研究已表明它在肿瘤[10]、阿霉素诱导的心肌病[11]和急性肺损伤[12]模型中具有保护作用。然而,它在AAA中的作用尚未被阐明。

因此,本研究首先利用血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ,Ang Ⅱ)和弹性蛋白酶两种AAA小鼠模型,观察AMF对AAA的形成和进展的作用,并通过网络药理学预测与实验验证相结合,确定AMF在AAA中的关键靶点,最后通过进一步的机制和细胞研究,确定AMF抑制VSMC的表型转换和AAA形成的具体作用机制。本研究重点探讨AMF对VSMC表型及AAA形成的作用及其下游机制,旨在为AAA的防治提供一种新的药理学干预方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

西方饮食饲料购自北京华阜康公司;戊巴比妥钠

购自上海法医学研究所;异氟烷购自中国鲁南贝特制药有限公司;渗透性微泵购自美国Alzet公司;弹性蛋白酶购自美国Sigma公司;AMF、AngⅡ、CCK-8试剂均购自美国MCE公司;HE和VVG染色试剂盒购自中国索莱宝公司;胎牛血清和DMEM/F12培养基购自美国Gibco公司;Ⅱ型胶原酶和大豆胰蛋白酶抑制剂购自美国Worthington公司;血小板衍生生长因子BB(platelet-derived growth factor BB,PDGFBB)和TNF-α购自美国PeproTech公司;Western及IP裂解液、蛋白酶抑制剂混合物、BCA蛋白浓度测定试剂盒、多聚甲醛、免疫染色封闭液、免疫染色一抗和二抗稀释液、含DAPI的抗荧光淬灭封片剂均购自上海碧云天生物科技公司;TRIzol试剂、反转录试剂盒、TB Green均购自日本TaKaRa公司;预染蛋白分子量Marker购自美国ThermoScientific公司;快速转膜液购自中国新赛美公司;NC膜购自美国PallCorporation公司;抗体稀释液购自中国中杉金桥公司;Transwell小室购自美国Corning公司;一抗GAPDH、基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2, MMP2)、基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)、Calponin、p65、IκBα、P-IκBα购自武汉三鹰生物科技公司,一抗αSMA抗体购自美国sigma公司;荧光二抗Alexa Fluor™ Plus 488和Alexa Fluor™ Plus 555均购自美国Invitrogen公司,荧光二抗IRDye® 800CW购自美国LI-COR公司;用于荧光定量PCR的引物均由上海生工公司合成;多功能酶标仪购自美国Thermo Fisher公司;倒置荧光显微镜购自日本OLYMPUS公司;电泳仪、T100 Thermal Cycler PCR仪、CFX96荧光定量PCR仪均购自美国Bio-Rad公司;鼠尾血压仪购自美国Softron公司;小动物高频超声成像系统VEVO 3100购自加拿大VisualSonics公司;Olympus SLIDEVIEW VS200购自日本OLYMPUS公司。

1.2 实验动物

选取24只6~8周龄的雄性C57BL/6J小鼠(体质量20~22 g)、60只同龄同体质量的雄性ApoE$^{-/-}$小鼠及1只8周龄雄性SD大鼠(体质量250~300 g)用于实验,所有动物购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物饲养于无特定病原体(specific pathogen free,SPF)屏障系统中。饲养环境温度设为24 ℃,相对湿度维持于55%~65%,并保持12 h明暗交替。实验期间,所有实验动物可自由摄食和饮水。所有侵入性操作(如皮下植入缓释泵、开腹手术等)在腹腔注射戊巴比妥钠后实施,实验结束后对其实施安乐死(戊巴比妥钠过量注射)。本研究已经陆军军医大学实验动物福利伦理委员会批准(AMUWEC20247122)。

若出现以下任一预期或非预期的不良事件,须立即实施安乐死以终止实验,防止动物遭受不必要的痛苦:①单次体质量下降超过15%(连续2次监测确认)或出现明显恶病质表现。②持续性腹泻超过3 d,且伴随采食量下降达50%以上;呼吸急促、口鼻发绀;严重脱水(眼窝凹陷、皮肤弹性丧失)等。③皮肤大面积咬伤或溃疡且无法愈合;重度真菌感染或全身性感染,表现为体温>39.5 ℃、精神极度萎靡。研究过程中未出现以上不良事件。

1.3 两种小鼠AAA模型的建立

1.3.1 AngⅡ诱导的AAA模型的建立 将ApoE$^{-/-}$小鼠按随机数表法分为6组(n=10):生理盐水+DMSO、生理盐水+AMF、AngⅡ+DMSO、AngⅡ+AMF组(AMF浓度为10、20、50 mg/kg)。生理盐水组:皮下植入内容物为生理盐水的缓释泵;AngⅡ组:皮下植入内容物为AngⅡ的缓释泵;DMSO组:腹腔注射DMSO 100 μL;AMF组:腹腔注射AMF 100 μL。AngⅡ模型依据既往报道构建[13]。ApoE$^{-/-}$小鼠到动物房后给予1周适应期,随后改喂西方饮食饲料(含20%蛋白质、21%脂肪、50%碳水化合物及0.15%胆固醇;该饲料提供的总热量中41%来自脂肪),持续4周。在1周的适应期后,经腹腔注射1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,皮下植入持续释放AngⅡ[速率为1 000 ng/(min·kg)]或生理盐水的渗透性微泵,于微泵植入前、植入后第2周和第4周采用尾套法测量血压。4周建模期间,从植入泵后的第2天开始,每天腹腔注射AMF(10、20、50 mg/kg)或其溶剂DMSO(100 μL),每2天注射1次,共计注射14次。4周后,通过超声评估腹主动脉内径。次日,以过量麻醉法处死小鼠,然后用PBS溶液进行灌注,随后,分离腹主动脉周围组织,将心脏至髂动脉的动脉段完整取下并拍照。取下的1段血管用多聚甲醛固定保存,另一部分于-80 ℃冻存。

1.3.2 外膜弹性蛋白酶孵育诱导的AAA模型的建立 将C57BL/6J小鼠按随机数表法分为4组(n=6):假手术+DMSO、假手术+AMF、弹性蛋白酶+DMSO、弹性蛋白酶+AMF组,假手术组的处理为主动脉外膜孵育高温失活的弹性蛋白酶20 min,弹性蛋白酶组的处理为主动脉外膜孵育弹性蛋白酶20 min,DMSO组的处理为腹腔注射DMSO 100 μL,AMF组的处理为腹腔注射AMF(20 mg/kg)100 μL。弹性蛋白酶诱导的AAA模型依据既往报道构建[14]。实验小鼠经1周适应后,腹腔注射1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)。随后,在体视显微镜下分离腹主动脉周围组织。将1颗浸透弹性蛋白

酶的小棉球(直径约3 mm)置于腹主动脉外膜孵育20 min。孵育结束后,用生理盐水充分冲洗腹腔,然后缝合关腹。2周建模期间,从手术后的第2天开始,每天腹腔注射AMF(20 mg/kg)或其溶剂DMSO 100 μL,每2天注射1次,共计注射7次。术后2周,通过超声检查评估腹主动脉内径。次日,以过量麻醉法处死小鼠,PBS灌注后,暴露并完整取下心脏至髂动脉的腹主动脉进行拍照,之后将组织样本分为2部分:一部分用多聚甲醛固定,另一部分于-80℃冻存。

1.4 AngⅡ模型小鼠血压的测量

测量前对分组实施盲法,以排除主观偏倚。小鼠预先进行每天1~2次适应性训练,使其熟悉操作者双手、仪器与尾套等的加压感。测量时开启BP-2010A主机并按屏幕提示完成软件配置,连接传感器与保温筒,选用尾径3~5 mm适用的加压感应器并确认橡胶膜完好。将小鼠置入专用鼠笼,连同鼠笼装入帆布鼠袋,扣紧魔术贴后放入37 ℃恒温箱。待小鼠安静后,将其尾部从保温筒拉出,于尾根部套上传感器,紧贴而不过紧。每只小鼠连续测量5次,5 min内完成全部测量。

1.5 小鼠建模终点腹部血管超声检测

测量前对分组设盲,以排除人为因素干扰。两种模型的小鼠在对应的时间点进行超声检测(AngⅡ模型在建模第28天,弹性蛋白酶模型在建模第14天)。其中AngⅡ模型血管超声在肾动脉上段腹主动脉进行检测,弹性蛋白酶模型血管超声在肾动脉下段腹主动脉进行检测。在小鼠腹部涂抹一层脱毛膏,用棉签轻柔涂抹均匀,3 min后用纸巾彻底擦去乳膏及残留物。然后,启动小动物高频超声成像系统,选取腹部成像模式。小鼠在麻醉诱导盒中麻醉,后仰卧位置于平台上,口鼻佩戴麻醉面罩,以0.8 L/min流量输送1%异氟烷。用医用胶带将四肢固定于电极垫上。检查平台保持水平,超声探头垂直于平台表面放置。腹部涂上超声耦合剂。操作者将超声探头置于目标区域,切换至B模式后,腹主动脉及其周围解剖结构得以显示。随后沿X轴进行微调以获得清晰的腹主动脉纵切面图像,保存图像供后续分析,利用VsiApp软件对腹主动脉参数进行定量分析。

1.6 小鼠AAA切片HE染色

主动脉组织切片先置于55 ℃烘烤2 h,使组织更好地贴附于载玻片上。随后,在二甲苯中脱蜡2次,每次10 min。脱蜡后,通过递减浓度的乙醇梯度(100%、95%、85%、75%乙醇,各5 min)水化,最后用蒸馏水洗5 min。苏木精染色液染色5 min,用蒸馏水轻轻冲洗。然后,用分化液分化50~60 s,再以自来水冲洗2次,每次5 min。用伊红染色液染色10 min。染色结束后,沥干多余染液,迅速经不同浓度的乙醇脱水:在75%、85%、95%、100%乙醇(Ⅰ)各脱水2~3 s,然后在100%乙醇(Ⅱ)中脱水1 min。脱水后,用二甲苯透明2次,每次1 min,最后以中性树胶封片,切片完全干燥后,使用Olympus SLIDEVIEW VS200全片扫描仪进行扫描。

1.7 小鼠AAA切片VVG染色

主动脉组织切片于55 ℃烘烤2 h,二甲苯脱蜡2次各10 min。梯度乙醇(100%、95%、85%、75%,各5 min)水化,用蒸馏水冲洗5 min。之后用改良VG染液染色10 min,蒸馏水轻轻冲洗10 s。以新鲜配制的Verhoeff工作液(Verhoeff A∶B∶C=5∶2∶2)染色5 min,蒸馏水快速冲洗5~10 s,随后用Verhoeff分化液分化约20 s,蒸馏水冲洗10 s,弹力纤维即可显色。接着切片依次经75%、85%、95%、100%乙醇(Ⅰ)各2~3 s,100%乙醇(Ⅱ)1 min脱水。二甲苯透明2次各1 min,中性树胶封片。切片充分干燥后,用Olympus SLIDEVIEW VS200全片扫描仪进行扫描。

1.8 大鼠主动脉血管平滑肌细胞的分离与培养

原代大鼠主动脉血管平滑肌细胞(rat aortic vascular smooth muscle cell,RAVSMC)提取分离自8周龄雄性SD大鼠的腹主动脉,按课题组前期报道的方法进行培养[15]。用过量麻醉法处死大鼠,取下的腹主动脉剥除外膜,仅保留中膜部分。然后进行酶消化:先将血管置于缓冲液A(含1 mg/mL Ⅱ型胶原酶和1 mg/mL大豆胰蛋白酶抑制剂的HBSS)中37 ℃孵育20 min,之后,机械刮除内皮层,将中膜肌层剪成小块。组织块再置于缓冲液B(缓冲液A另加弹性蛋白酶)中37 ℃消化2 h,期间频繁吹打以促进消化。所得细胞悬液经室温、3 000 r/min离心3 min后,重悬于含10% FBS和1%青-链霉素的DMEM/F12培养液中,接种于0.04%明胶包被的培养皿。细胞纯度(>95%)经αSMA免疫荧光染色鉴定。实验使用第2~5代细胞。给予AMF(20 μmol/L)或PDGFBB(25 ng/mL)处理前,细胞先经6 h血清饥饿。

1.9 AMF和AAA共靶点网络药理学分析

为寻找潜在的治疗靶点,从Genecards数据库(https://www.genecards.org/)检索AAA相关的疾病基因。选取标注为与AAA相关的前2 000个基因,构成AAA靶点集合。为预测可能作用于AAA的物质,采用3个在线工具预测AMF的潜在靶点:Galaxy WEB(https://galaxy.seoklab.org/)、Super-PRED(https://pred.bioinfo.hk/superpred/)和SwissTargetPrediction(https://

www.swisstargetprediction.ch/)。整合结果并去除重复后,共获得399个AMF相关靶点,构成AMF靶点集合。将上述AAA靶点集与AMF靶点集取交集,重叠部分为共同靶点。将这些共同靶点输入STRING数据库(https://cn.string-db.org/)构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction,PPI)网络,将PPI网络数据导入Cytoscape(3.9.1版)进行网络可视化和图形优化。

1.10 AMF和AAA共靶点的GO和TRRUST分析

将AAA与AMF的共同靶点上传至Metascape在线平台(https://metascape.org),物种选择"Homo sapiens"。为探究潜在机制,进行GO富集分析,涵盖生物学过程(biological process,BP)、细胞组分(cell components,CC)和分子功能(molecular function,MF)3大类。同时利用Metascape整合的TRRUST[16]数据库研究转录因子-靶基因的调控关系,以识别潜在的上游转录调控通路。

1.11 大鼠主动脉血管平滑肌细胞的CCK-8实验

将RAVSMC以每孔5×10^3个细胞接种于96孔板,培养12 h,待细胞贴壁后,在无血清条件下维持6 h,按PDGFBB+DMSO,PDGFBB+AMF的分组方式,分别加入PDGFBB(25 ng/mL),AMF(20 μmol/L)或DMSO共同处理24、48和72 h。使用CCK-8试剂,依据制造商说明书评估细胞增殖,之后立即用酶标仪在450 nm处测定吸光度[*OD*(450)]值。

1.12 RT-qPCR检测AAA组织和RAVSMC中关键基因的mRNA表达水平

用TRIzol试剂提取RNA,取1 μg RNA,用反转录试剂盒合成cDNA,随后使用SYBR Green法进行实时定量PCR。每孔反应体系总量为20 μL,包括2 μL cDNA模板、1 μL正向引物、1 μL反向引物、10 μL预混液和6 μL去离子水。扩增在定量PCR仪上进行,通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$算法计算靶基因的相对表达水平。实验中使用的引物见表1。

1.13 Western blotting检测AAA组织和RAVSMC中关键基因的蛋白表达水平

为保证上样量均一,使用Western及IP裂解液提取细胞或组织总蛋白,并以BCA法定量。蛋白浓度调整一致后,加入上样缓冲液,于100 ℃加热变性10 min。变性后的样品与预染蛋白分子量Marker混合,经SDS-PAGE分离,使用10%分离胶,电泳条件为70 V 30 min,100 V 100 min。将分离的蛋白用快速转印液在室温下以400 mA转印30 min至NC膜上。转印完毕,用含5% BSA的TBST在室温下封闭1 h。将膜与用抗体稀释液以1∶1 000稀释的一抗[包括MMP2(1∶1 000)、MMP9(1∶1 000)、GAPDH(1∶10 000)、IκBα(1∶1 000)、P-IκBα(1∶1 000)、αSMA(1∶3 000)和Calponin(1∶1 000)],在4 ℃孵育过夜。次日,以TBST洗膜3次,每次10 min,在避光条件下与荧光标记二抗(1∶10 000)室温孵育60 min。TBST洗膜3次后,采用LI-COR ODYSSEY系统成像。

表1 RT-qPCR引物序列

Table 1 RT-qPCR primer sequences

Gene	Primer (5'→3')
rGAPDH	Forward:GCCCAGCAAGGATACTGAGA
	Reverse:GATGGTATTCGAGAGAAGGGAGG
rMMP2	Forward:AGAGGATACCCCAAGCCACT
	Reverse:AAAGGCAGCGTCTACTTGCT
rMMP9	Forward:TCGGATGGTTATCGCTGGTG
	Reverse:GCTCGAGTAGGACAGAAGCC
rACTA2	Forward:AGGATGCAGAAGGAGATCACAG
	Reverse:CTGGAAGGTAGATAGAGAAGCC
rCNN1	Forward:GTCTGCTGAGGTAAAGAACA
	Reverse:ACTCATTGACCTTCTTCACA
mGAPDH	Forward:CCACTCTTCCACCTTCGATG
	Reverse:CCACCACCCTGTTGCTGTA
mMMP2	Forward:CTGTGTTCTTCGCAGGGAAT
	Reverse:TGTGCAGCGATGAAGATGAT
mMMP9	Forward:GGTACTGGAAGATGTCGTGT
	Reverse:TGAAGTCTCAGAAGGTGGAT

1.14 大鼠主动脉血管平滑肌细胞免疫荧光染色

将培养于盖玻片上的RAVSMC用预冷PBS洗涤3次,每次5 min,以去除残余培养基,用4%多聚甲醛室温固定20 min,随后用PBS充分洗涤3次。经PBS洗涤后,用含0.5% Triton X-100的PBS室温通透10 min。通透后,用PBS洗涤3次,在室温下用免疫染色封闭液封闭1 h,弃去封闭液,加入用免疫染色一抗稀释液稀释的一抗。所用一抗为:p65(1∶100)和αSMA(1∶200),于湿盒中4 ℃孵育过夜,之后吸去一抗,用PBS洗涤3次,每次10 min。随后加入相应的荧光二抗(1∶500),于37 ℃避光反应1 h,孵育结束后,在避光条件下用PBS洗涤3次,每次10 min。用含DAPI的抗荧光淬灭封片剂将盖玻片细胞面朝下封片,用VS200成像系统观察并拍照。

1.15 大鼠主动脉血管平滑肌细胞的Transwell实验

将悬浮于无血清DMEM/F12培养基中的RAVSMC以1×10^4个/孔接种于Transwell小室上室,下室加入含10%FBS的DMEM/F12。按DMSO+CTL,DMSO+PDGFBB,AMF+CTL,AMF+PDGFBB的分组

方式向上、下室同时加入PDGFBB(25 ng/mL)、AMF(20 μmol/L)或DMSO。孵育24 h后,对迁移的细胞进行固定、结晶紫染色,并用倒置相差显微镜观察。

1.16 大鼠主动脉血管平滑肌细胞划痕实验

将RAVSMC接种于6孔板培养过夜,血清饥饿6 h后,用无菌P200移液器吸头在均匀的单层细胞上划痕,形成一致的间隙,然后用无菌PBS轻柔洗涤2次,去除脱落的细胞。随后,将培养基立即更换为含1% FBS的DMEM/F12,并分别加入PDGFBB(25 ng/mL)、AMF(20 μmol/L)或DMSO。分别于划痕后0 h和24 h拍摄划痕区域图像。为评估细胞迁移,使用Image J软件分析迁移指数,即迁移入划痕区域的细胞面积相对于初始(0 h)的比例。

1.17 统计学分析

所有统计分析使用GraphPad Prism 8.0软件。数据以$\bar{x}\pm s$表示。两组正态分布数据间比较采用非配对Student's t检验。多组间比较采用单因素或双因素方差分析,继以Sidak's事后检验。P<0.05为差异具有统计学意义,生物学实验均重复3次及以上。

2 结果

2.1 AMF抑制两种模型小鼠AAA的形成和进展

本研究构建Ang Ⅱ输注的ApoE$^{-/-}$模型和弹性蛋白酶诱导模型,以评估AMF对AAA的影响。在Ang Ⅱ输注的ApoE$^{-/-}$模型中,给予西方饮食饲料的ApoE$^{-/-}$小鼠输注生理盐水或Ang Ⅱ 4周以诱导AAA,在此期间,每2天腹腔注射AMF或DMSO(图1A)。与DMSO组相比,20 mg/kg AMF处理组的小鼠AAA发病率最低(图1B)。因此,本研究选择20 mg/kg剂量的AMF进行后续实验。通过对小鼠血压和体质量的检测,发现AMF处理未改变Ang Ⅱ模型中ApoE$^{-/-}$小鼠的血压(图1C)和体质量(图1D),而AMF处理显著抑制了Ang Ⅱ刺激下AAA的形成,表现为与Ang Ⅱ+DMSO组相比,AAA死亡率显著降低(P<0.05,图1E),AAA形态显著改善(图1F)。超声评估进一步证实了这一保护效应,具体表现为:与DMSO组比较AMF处理组小鼠主动脉扩张程度减轻(P<0.01,图1G)。4周建模终点时的组织学评估显示,AMF处理可减轻弹力纤维断裂(P<0.001,图1H)。在弹性蛋白酶诱导的模型中(图2A)观察到一致的结果,AMF给药同样改善了AAA的形态(图2B)、减轻主动脉扩张程度(P<0.001,图2C)、降低弹性纤维的降解(P<0.001,图2D)。综上,这些数据表明AMF能有效抑制AAA的形成和进展。

2.2 网络药理学分析确定MMP2和MMP9为AMF对AAA抑制作用的关键分子靶点

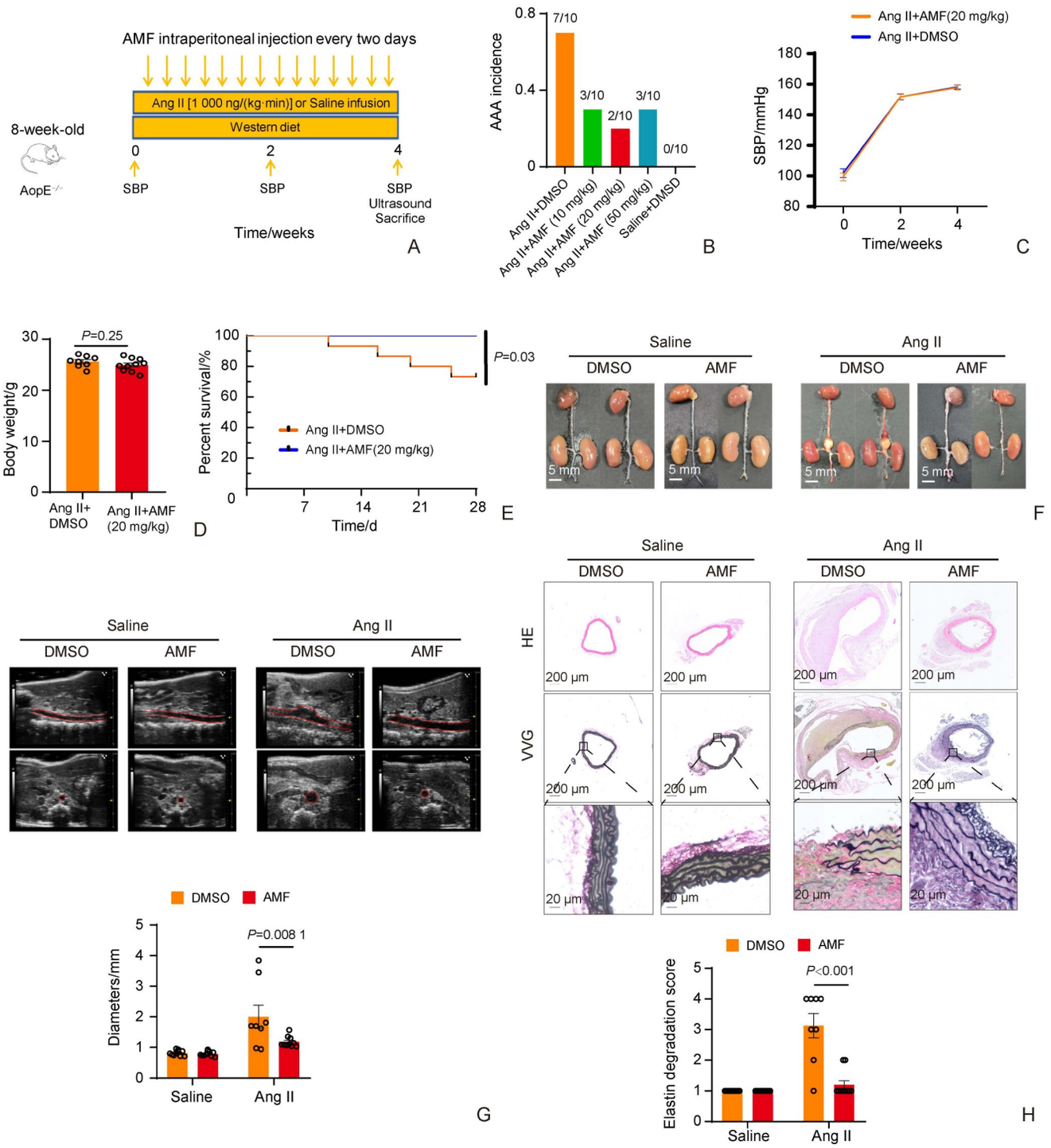
为探究AMF如何保护AAA,本研究采用网络药理学方法辅以RT-qPCR和Western blotting验证了AMF的潜在下游靶点。从GeneCards数据库中获取AAA相关疾病基因,同时利用Galaxy WEB、Super-PRED和SwissTargetPrediction平台预测AMF的潜在靶点(图3A)。交叉分析这些数据识别出1组共同靶点(图3B)。随后通过STRING构建PPI网络,结果显示:MMP2和MMP9是该网络中的核心节点蛋白(图3C),利用RT-qPCR和Western blotting实验,发现在AMF处理后,主动脉瘤组织中MMP2和MMP9的表达均显著降低(P<0.05,图3D~G)。这些结果表明,AMF通过抑制MMP2和MMP9的表达来减缓AAA的进展。

2.3 AMF抑制VSMC的表型转换

为阐明AMF在调节VSMC表型转换中的作用,本研究分离并鉴定了原代大鼠腹主动脉RAVSMC(图4A)并通过一系列实验方法验证AMF对VSMC表型转换的调控。通过CCK-8实验评估AMF的细胞毒性并确定后续体外实验应使用的AMF浓度,结果显示:AMF在浓度高达20 μmol/L且处理48 h时,未表现出细胞毒性(图4B)。因此,选定该浓度用于后续实验。AMF处理显著抑制了PDGFBB诱导的RAVSMC表型转换,mRNA表达水平表现为收缩型标志物Calponin(P<0.001)和αSMA(P<0.05)的表达下调得到回升且分泌态标志物MMP2(P<0.05)、MMP9(P<0.01)的表达上调受到了抑制(图5A);蛋白水平同样表现为收缩型标志基因Calponin(P<0.01)和αSMA(P<0.001)的表达下调得到回升且分泌态标志物MMP2(P<0.01)、MMP9(P<0.001)的表达上调受到了抑制(图5B)。在细胞功能方面,CCK-8实验结果显示,AMF处理显著减弱了PDGFBB诱导的增殖(P<0.001,图5C)。此外,通过划痕实验和Transwell实验证实,AMF处理显著削弱了PDGFBB诱导的迁移能力的增加(P<0.001,图5D、E)。这些发现表明,AMF可抑制VSMC的表型转换。

2.4 AMF通过阻断VSMC中的NF-κB p65信号通路抑制MMP2、MMP9表达

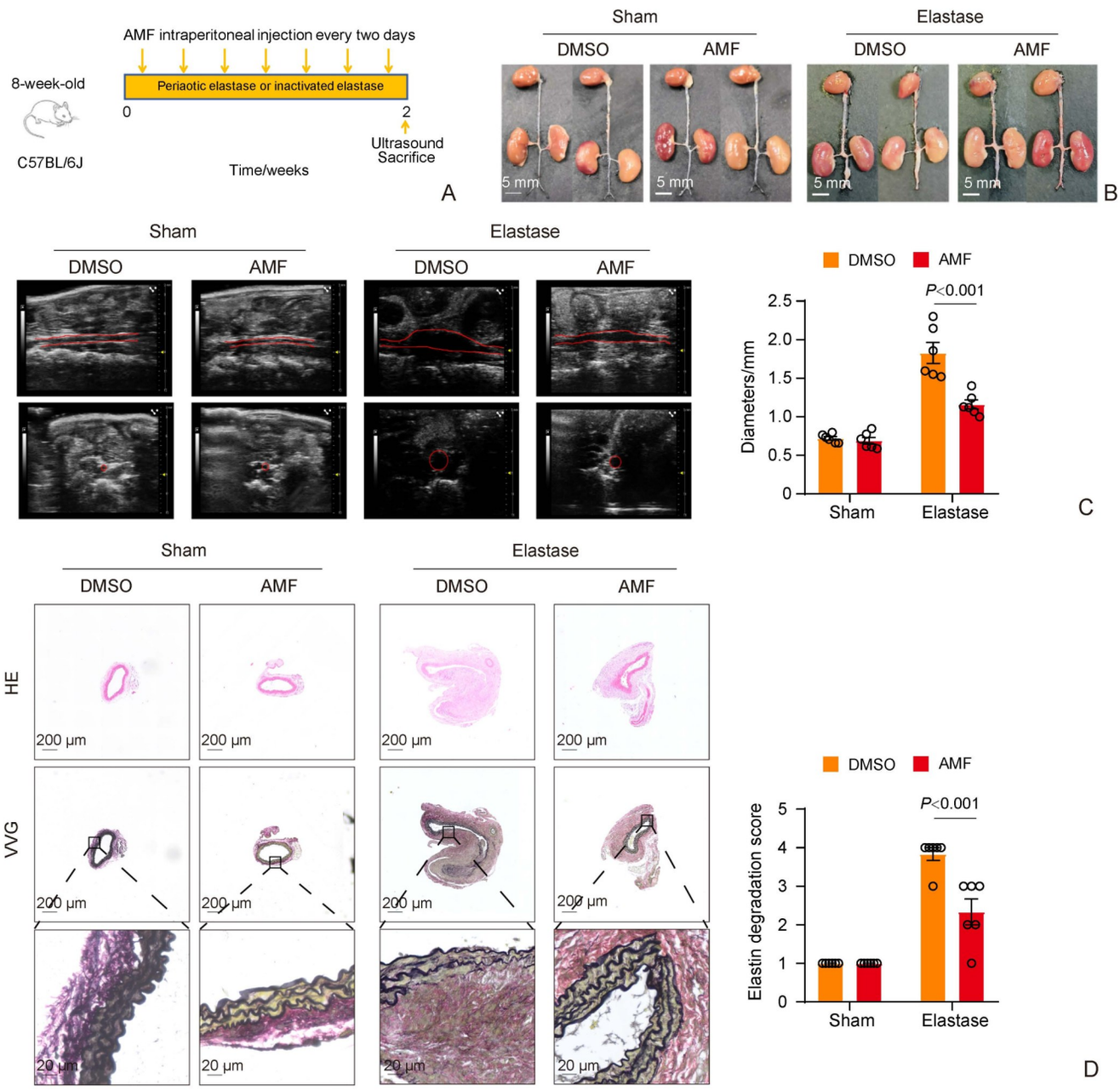
为探究AMF对AAA和VSMC表型转换调控的上游信号,本研究首先利用TRRUST对AMF和AAA的共靶点进行转录因子网络分析。该分析预测RELA(p65)-NF-κB的核心亚基可能是调控AMF处理下游靶基因的首位转录因子(图6A)。同时,Western blotting结果显示:AMF抑制了IκBα的磷酸化(P<0.001,图6B),这



A: Schematic illustration of the experimental design of the Ang Ⅱ-induced AAA model in ApoE$^{-/-}$ mice; B: Incidence of AAA following treatment with AMF (10, 20, 50 mg/kg) or DMSO in Ang Ⅱ-induced AAA model; C: Blood pressure changes in Ang II-induced AAA model; D: Body weight changes in Ang Ⅱ-induced AAA model; E: Survival curve of ApoE$^{-/-}$ mice treated with AMF (20 mg/kg) or DMSO; F: Representative images of AAA in Ang Ⅱ-induced AAA model with AMF (20 mg/kg) or DMSO; G: Ultrasonographic images (top) and corresponding measurements (bottom) of abdominal aortic diameter in AMF- or DMSO-treated mice; H: Representative HE and VVG staining of suprarenal aortic sections with quantitative elastin grading

图1 血管紧张素Ⅱ诱导的小鼠模型中AMF对AAA发生发展的影响

Figure 1 Effect of AMF on the initiation and progression of AAA in an Ang Ⅱ-induced mouse model



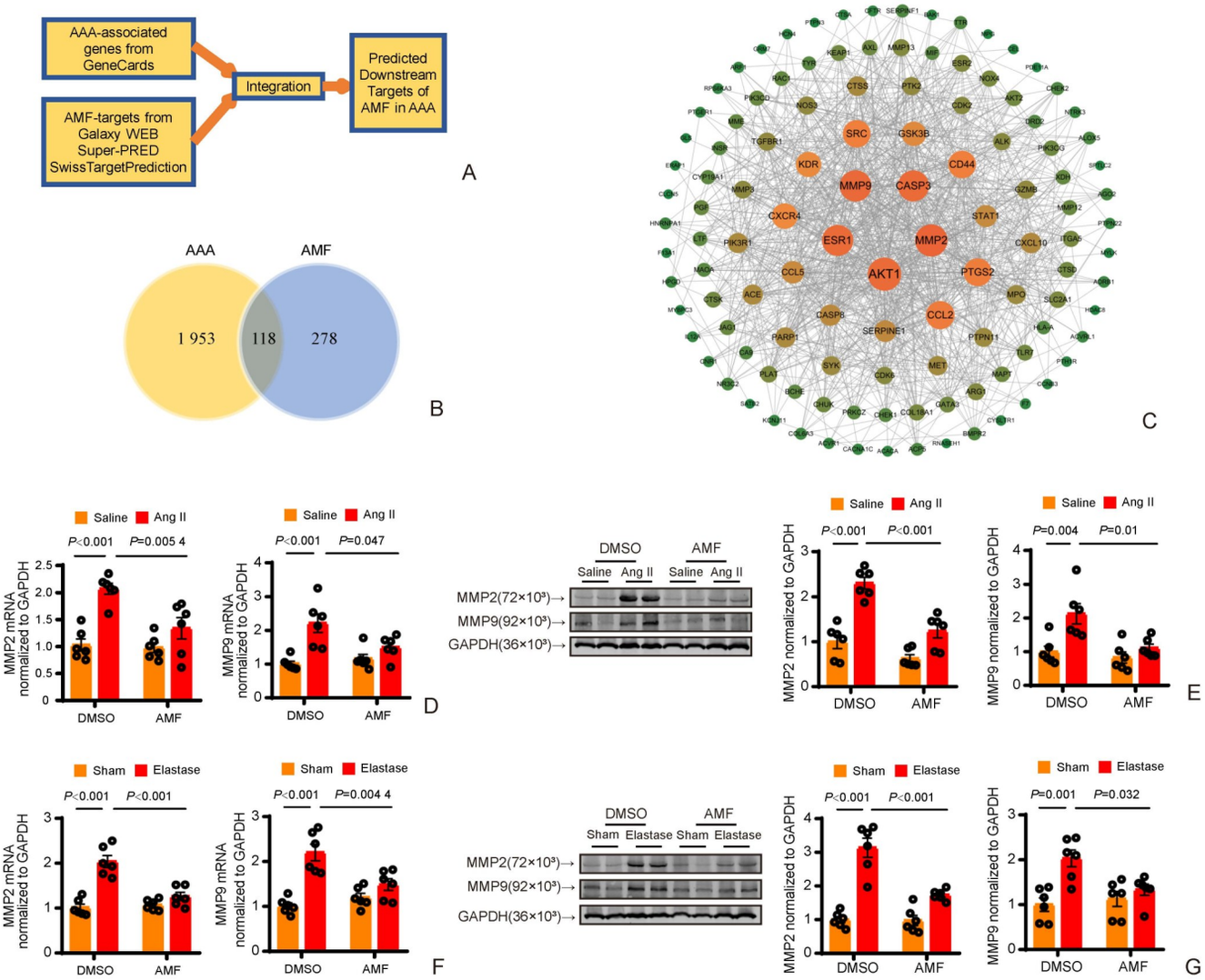
A: Schematic illustration of the experimental design of the periaortic elastase-induced AAA model; B: Representative aortic images from each group; C: Ultrasound imaging and aortic diameter quantification in C57BL/6J mice treated with AMF or DMSO; D: HE and VVG staining of infrarenal aortic segments with elastin integrity scoring

图2 弹性蛋白酶诱导的小鼠模型中AMF对AAA发生发展的影响

Figure 2 Effect of AMF on the initiation and progression of AAA in the elastase-induced mouse model

反映了NF-κB信号的活化受抑;免疫荧光染色显示,AMF显著减少了PDGFBB诱导的p65核内积聚(图6C)。这些结果提示AMF是NF-κB通路的负向调节剂。

为进一步证实AMF是否通过NF-κB信号通路抑制VSMC表型转换并抑制MMP2和MMP9表达,本研究在AMF处理下用TNF-α恢复NF-κB信号活性。在RAVSMC中,RT-qPCR结果显示:NF-κB信号的激活可逆转AMF介导的Calponin(P<0.05)、αSMA(P<0.05)mRNA的水平上升以及MMP2(P=0.087)、MMP9(P<0.05)mRNA的水平下调(图6D)。Western blotting结果同样显示:NF-κB信号的激活可逆转AMF介导的Calponin(P<0.05)、αSMA(P=0.063)mRNA水平的上升以及MMP2(P<0.001)、MMP9(P<0.001)蛋白水平的下调(图6E)。综上,这些数据证明AMF通过减弱



A: Flowchart for predicting downstream targets of AMF and AAA; B: Venn diagram depicting overlapping genes between AAA targets and predicted AMF targets; C: PPI network generated using STRING and visualized in Cytoscape, identifying MMP2 and MMP9 as key nodes; D and E: RT-qPCR (D) and representative Western blotting (E, left) with quantification (E, right) of MMP2 and MMP9 expression in aortic tissues from Ang Ⅱ-infused ApoE$^{-/-}$ mice treated with AMF or DMSO; F and G: RT-qPCR (F) and representative Western blotting (G, left) with quantification (G, right) of MMP2 and MMP9 in aortic tissues from elastase-treated C57BL/6J mice with or without AMF

图3 网络药理学分析辅以实验验证确定AMF作用于AAA的关键分子靶点

Figure 3 Identification of the key molecular targets of AMF in AAA by network pharmacology analysis combined with experimental validation

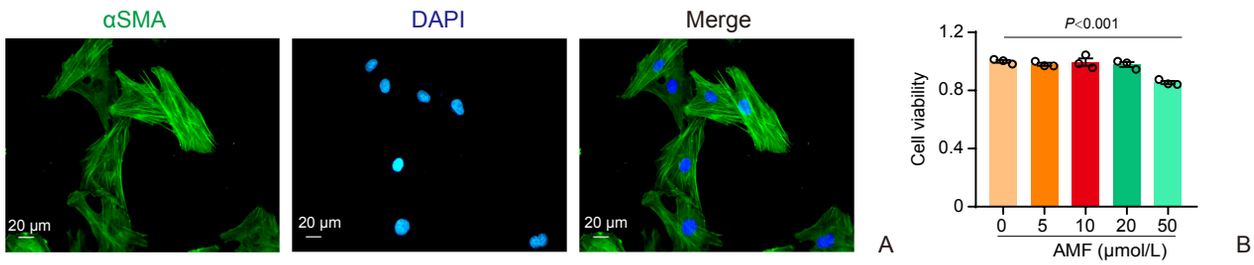
NF-κB通路活化来抑制VSMC表型转换和MMP2、MMP9表达。

3 讨论

本研究确定AMF是AAA发生发展的有效抑制剂,并证实,在两种小鼠模型(Ang Ⅱ输注的ApoE$^{-/-}$模型和弹性蛋白酶诱导模型)中,AMF可减轻动脉瘤的形成和进展。通过网络药理学预测与严格的实验验证相结合,本研究阐明了AMF通过抑制NF-κB-MMP轴来抑制VSMC表型转换和AAA进展的新机制。

3.1 VSMC的表型转换及其分泌的MMP2和MMP9是AAA发病的重要机制

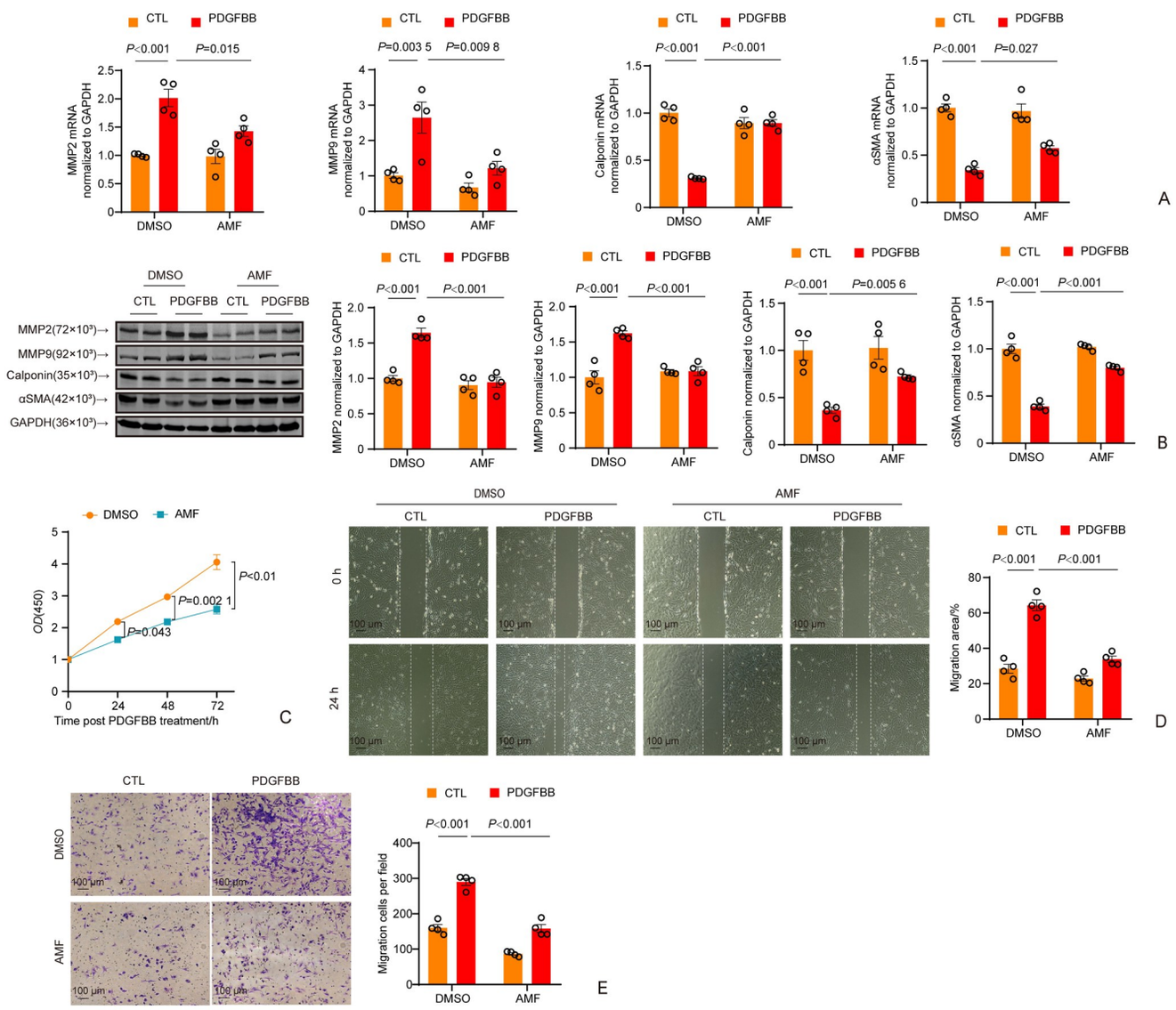
AAA的发病机制是一个多因素交织的复杂过程,其中VSMC从收缩、静止状态向合成、增殖、迁移表型的转变是AAA病理过程的基石[3-5]。在病理条件下,血流动力学异常或氧化应激等初始刺激作用于血管



A: Representative immunofluorescence staining of αSMA (green) and DAPI (blue) in isolated RAVSMC; B: CCK-8 assay was used to detect the viability of RAVSMC treated with AMF

图4 RAVSMC的鉴定及体外研究中AMF浓度的筛选

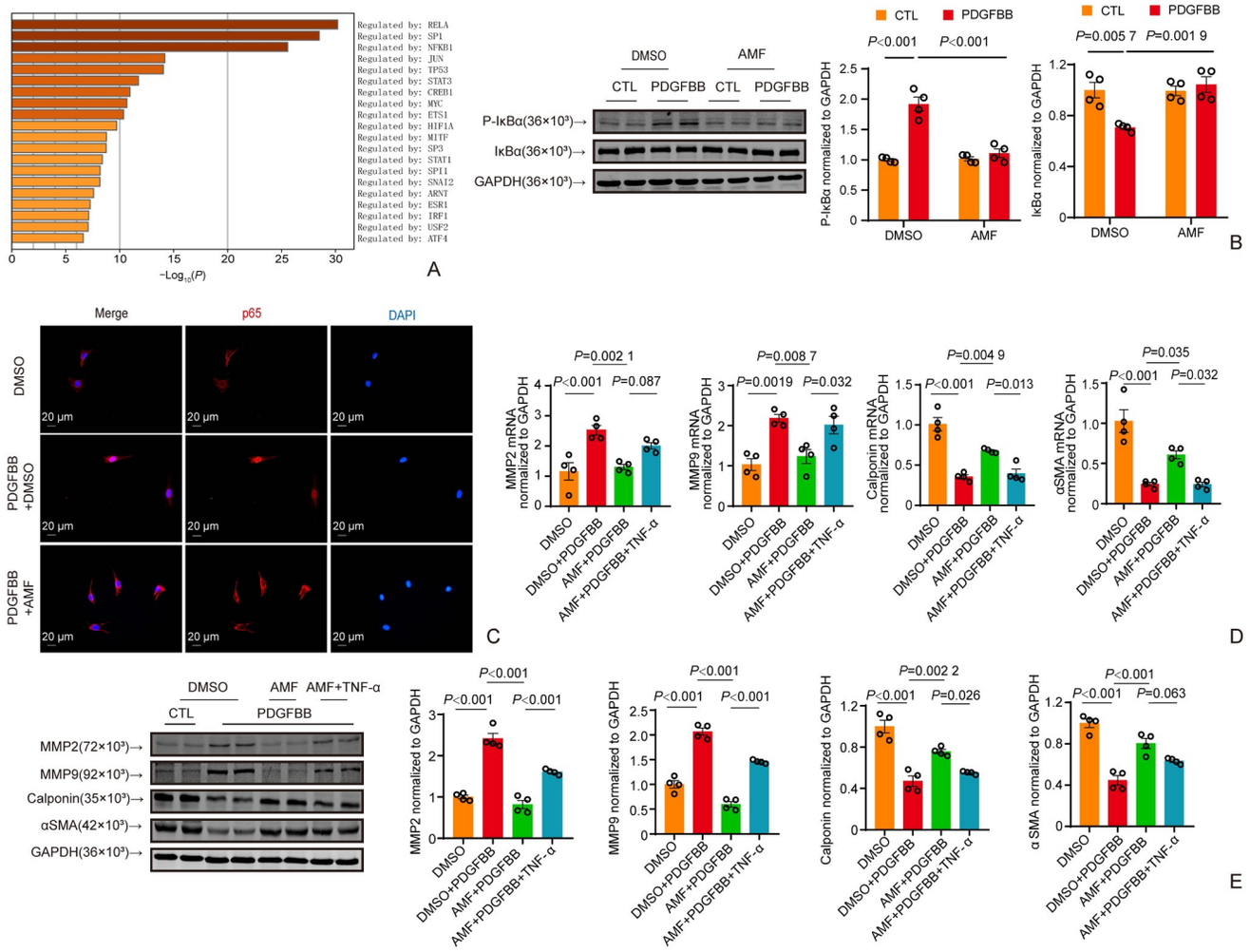
Figure 4 Identification of RAVSMC and screening of AMF concentrations for *in vitro* studies



A and B: RT-qPCR (A) and representative Western blotting (B, left) with quantification (B, right) of MMP2, MMP9, Calponin and αSMA in RAVSMC treated with PDGFBB and/or AMF; C: CCK-8 assay detecting the proliferation of RAVSMC after PDGFBB with AMF or DMSO treatment for 0, 24, 48, and 72 h; D: Representative wound healing assay (left) showing RAVSMC migration under indicated treatments with quantification (right); E: Representative transwell migration assay (left) of RAVSMC under the indicated treatments with quantification (right)

图5 AMF对血管平滑肌细胞表型转化的调控作用

Figure 5 Regulatory effect of AMF on the phenotypic switching of VSMC



A:TRRUST analysis of upstream transcription factors that potentially regulate overlapped AMF and AAA targets; B:Representative Western blotting (left) and quantification (right) of IκBα phosphorylation in RAVSMC treated with PDGFBB with DSMO or AMF for 1 h; C:Representative immunofluorescence staining of p65 (red) and DAPI (blue) in RAVSMC following treatment with PDGFBB with DMSO or AMF for 1 h; D and E:RT-qPCR(D), representative Western blotting (E, left) and quantification (E, right) of MMP2, MMP9, Calponin and αSMA in RAVSMC treated with PDGFBB and/or AMF, TNF-α

图6 AMF通过调控RAVSMC中NF-κB p65信号通路抑制RAVSMC中MMP2/9的表达及表型转换

Figure 6 AMF suppresses MMP2/9 expression and phenotypic switching in RAVSMC by modulating the NF-κB p65 signaling pathway

壁,VSMC发生表型转换由初始的收缩态转分化为分泌态,αSMA和Calponin等收缩态标志物表达量明显减少,MMP2和MMP9等分泌态标志物表达大量上调,导致主动脉中膜ECM的降解[17-19],最终造成血管壁结构完整性丧失并促发动脉瘤的形成与扩张。因此,寻找抑制VSMC的表型转换及MMP2/9分泌的干预措施对于AAA的防治至关重要。

3.2 AMF对AAA发生发展的抑制作用主要表现为对MMP2和MMP9的抑制

网络药理学分析揭示MMP2和MMP9是AMF作用于AAA的关键靶点。这一预测得到了体内外实验的验证,结果显示:AMF处理显著下调了动脉瘤组织和培养的RAVSMC中MMP2和MMP9的表达,这种下调有效保护了主动脉壁内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的结构完整性。尤为重要的是,本研究的数据提示这种保护效应有赖于VSMC的参与——VSMC是AAA血管中膜MMP2和MMP9的主要细胞来源[17],从而强调了AMF的治疗作用部分由VSMC介导。

3.3 AMF通过抑制VSMC的表型转换改善AAA

本研究的另一关键发现是AMF对VSMC表型转换的抑制作用。本研究的实验表明,AMF不仅逆转了

PDGFBB诱导的合成标志物(MMP2和MMP9)的表达,还恢复了收缩蛋白(Calponin、αSMA)的表达,同时降低了VSMC在表型转换后提高的增殖和迁移能力[20-21]。这种对VSMC行为的直接调控代表了一种超越单纯MMP2和MMP9抑制的重要机制,因为它直接作用于蛋白水解失衡的细胞根源。

3.4　AMF对MMP2/9的抑制有赖于NF-κB信号通路

AAA的发生伴随着主动脉壁的慢性炎症反应。在众多的炎症相关通路中,NF-κB信号通路被认为是调节基质降解和细胞表型重塑的关键中枢。本研究确定了NF-κB信号是AMF靶向的关键调控通路,TRRUST分析预测转录因子RELA(p65)是主要的候选因子。经典的NF-κB通路是炎症和基质降解的主控调节器[22-23],其在VSMC中的活化已直接与表型转化相关联[24]。本研究结果显示,AMF通过阻止IκBα的磷酸化,有效地将p65/p50复合物"扣留"在胞浆中,从而抑制其核转位,并下调促炎和基质降解基因(包括MMP2和MMP9)的转录[25-28]。这表明AMF至少部分通过NF-κB信号通路抑制VSMC的表型转化和MMP2/9的表达。

本研究尚存在一些局限性。首先,网络药理学与实验数据虽强烈提示MMP2和MMP9和NF-κB为关键靶点,但AMF的直接分子靶标仍未明确,其受体及下游信号级联激酶尚待鉴定;未来可利用细胞热转变分析或药物亲和反应靶标稳定性等技术寻找AMF的直接结合伴侣[29]。其次,本研究聚焦VSMC,而AAA涉及巨噬细胞、T细胞和内皮细胞等多种细胞类型[30-32],这些细胞同样表达MMP2和MMP9,本研究未能区分AMF作用于VSMC与其他细胞群体的相对贡献;今后借助病变血管VSMC特异性递送系统将有助于阐明其细胞特异性效应。此外,生物体内信号网络是较为复杂的,AMF除了可以抑制NF-κB外,对于其他致病转录因子(如AP-1、Smad或者MAPK级联)是否会起到调控作用并不清楚,这样的单一分子的研究无法给出全面的多组学生物信息,这也是本文走向精准结构药理学的一个障碍。最后,应审慎解读本研究的转化意义。小鼠模型难以精确再现人类AAA数十年缓慢进展与复杂合并症,在开展人体试验前,AMF的疗效与安全性仍需在灵长类等大型动物模型中加以验证。

综上所述,本研究针对AAA缺乏有效药物的现状,发现AMF在Ang Ⅱ和弹性蛋白酶两种小鼠模型中均可抑制动脉瘤形成与进展。通过网络药理学预测与实验验证,证实AMF通过抑制NF-κB信号通路,阻止IκBα磷酸化及p65核转位,进而下调VSMC中MMP2和MMP9的表达,逆转VSMC由收缩型向合成型的表型转换,保护主动脉中膜细胞外基质完整性。这揭示了AMF靶向NF-κB-MMP轴抑制VSMC表型转换的新机制,为AAA治疗提供了候选药物(图7)。但本研究中AMF的直接结合靶点及对其他细胞类型的作用以及其他可能的分子机制仍需进一步阐明。

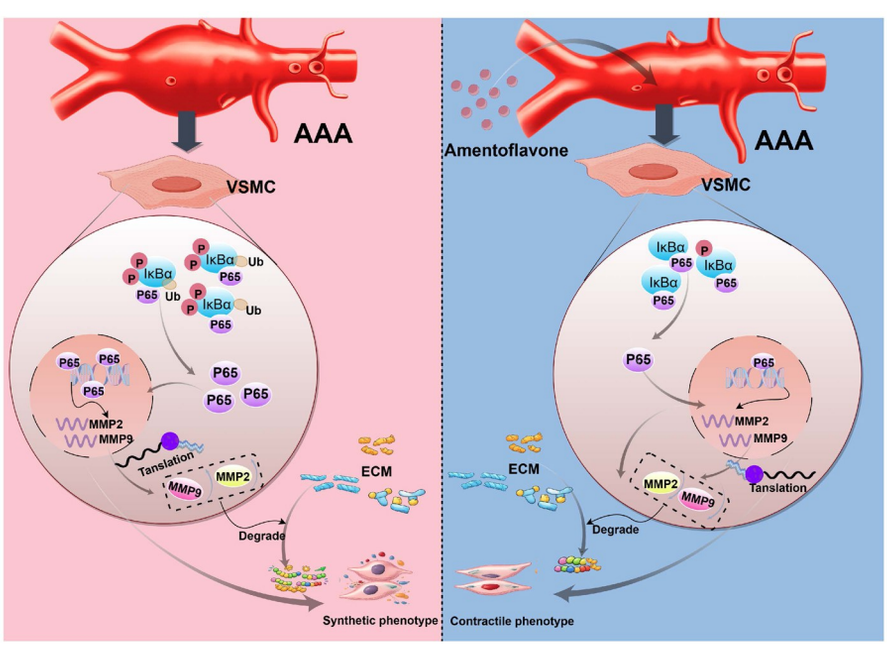


图7　AMF对VSMC表型转换与AAA形成的保护作用示意图

Figure 7　Schematic illustration of the AMF-mediated protection of VSMC phenotype switching and AAA formation

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] SAKALIHASAN N, LIMET R, DEFAWE O. Abdominal aortic aneurysm[J]. Lancet, 2005, 365(9470): 1577-1589. DOI:10.1016/S0140-6736(05)66459-8.

[2] BENSON T W, CONRAD K A, LI X S, *et al*. Gut microbiota-derived trimethylamine N-oxide contributes to abdominal aortic aneurysm through inflammatory and apoptotic mechanisms[J]. Circulation, 2023, 147(14): 1079-1096. DOI:10.1161/circulationaha.122.060573.

[3] WEN Y, LIU Y Y, LI Q, *et al*. Spatiotemporal ATF3 expression determines VSMC fate in abdominal aortic aneurysm[J]. Circ Res, 2024, 134(11): 1495-1511. DOI: 10.1161/circresaha.124.324323.

[4] ZHAO G Z, ZHAO Y, LU H C, *et al*. BAF60c prevents abdominal aortic aneurysm formation through epigenetic control of vascular smooth muscle cell homeostasis[J]. J Clin Investig, 2022, 132(21): e158309. DOI: 10.1172/jci158309.

[5] WANG J, TIAN X X, YAN C H, *et al*. TCF7L1 accelerates smooth muscle cell phenotypic switching and aggravates abdominal aortic aneurysms[J]. JACC Basic Transl Sci, 2023, 8(2): 155-170. DOI:10.1016/j.jacbts.2022.07.012.

[6] ZHANG H D, YUE H W, SUN Y J, *et al*. Targeting USP21 to inhibit abdominal aortic aneurysm progression by suppressing the phenotypic transition of vascular smooth muscle cells[J]. Cell Rep Med, 2025, 6(9): 102328. DOI: 10.1016/j.xcrm.2025.102328.

[7] LIU X, ZHAO L, LIU D S, *et al*. Cytoplasmic and nuclear NFATc3 cooperatively contributes to vascular smooth muscle cell dysfunction and drives aortic aneurysm and dissection[J]. Acta Pharm Sin B, 2025, 15(7): 3663-3684. DOI: 10.1016/j.apsb.2025.05.016.

[8] ZHONG L T, SUN Y L, CHEN G J, *et al*. Genetic ablation of miR-146a induces abdominal aortic aneurysm formation by intensifying inflammatory M1-like macrophages polarization and vascular smooth muscle cell phenotypic switching[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2025, 45(12): 2210-2225. DOI:10.1161/atvbaha.125.322994.

[9] XIONG X F, TANG N, LAI X D, *et al*. Insights into amentoflavone: a natural multifunctional biflavonoid[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 768708. DOI: 10.3389/fphar.2021.768708.

[10] MENEZES J C J M D S, DIEDERICH M F. Bioactivity of natural biflavonoids in metabolism-related disease and cancer therapies[J]. Pharmacol Res, 2021, 167: 105525. DOI:10.1016/j.phrs.2021.105525.

[11] FANG G Y, LI X C, YANG F Y, *et al*. Amentoflavone mitigates doxorubicin-induced cardiotoxicity by suppressing cardiomyocyte pyroptosis and inflammation through inhibition of the STING/NLRP3 signalling pathway[J]. Phytomedicine, 2023, 117: 154922. DOI: 10.1016/j.phymed.2023.154922.

[12] ZONG Y, ZHANG H L. Amentoflavone prevents sepsis-associated acute lung injury through Nrf2-GCLc-mediated upregulation of glutathione[J]. Acta Biochim Pol, 2017, 64(1): 93-98. DOI:10.18388/abp.2016_1296.

[13] DAUGHERTY A, CASSIS L A. Mouse models of abdominal aortic aneurysms[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(3): 429-434. DOI:10.1161/01.ATV.0000118013.72016.ea.

[14] BHAMIDIPATI C M, MEHTA G S, LU G Y, *et al*. Development of a novel murine model of aortic aneurysms using peri-adventitial elastase[J]. Surgery, 2012, 152(2): 238-246. DOI:10.1016/j.surg.2012.02.010.

[15] YU J Y, WANG W, YANG J N, *et al*. LncRNA PSR regulates vascular remodeling through encoding a novel protein arteridin[J]. Circ Res, 2022, 131(9): 768-787. DOI:10.1161/circresaha.122.321080.

[16] SANG W Y, WANG L, YAN X J, *et al*. Establishment of risk model and analysis of immunoinfiltration based on mitophagy-related associated genes in atrial fibrillation[J]. J Inflamm Res, 2023, 16: 2561-2583. DOI: 10.2147/jir.s415410.

[17] MAGUIRE E M, PEARCE S W A, XIAO R, *et al*. Matrix metalloproteinase in abdominal aortic aneurysm and aortic dissection[J]. Pharmaceuticals, 2019, 12(3): 118. DOI: 10.3390/ph12030118.

[18] FANG L X, OHASHI K, OTAKA N, *et al*. Omentin attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice[J]. Cardiovasc Res, 2022, 118(6): 1597-1610. DOI:10.1093/cvr/cvab179.

[19] NOSOUDI N, NAHAR-GOHAD P, SINHA A, *et al*. Prevention of abdominal aortic aneurysm progression by targeted inhibition of matrix metalloproteinase activity with batimastat-loaded nanoparticles[J]. Circ Res, 2015, 117(11): e80-e89. DOI:10.1161/circresaha.115.307207.

[20] SONG T Y, ZHAO S, LUO S S, *et al*. SLC44A2 regulates vascular smooth muscle cell phenotypic switching and aortic aneurysm[J]. J Clin Investig, 2024, 134(16): e173690. DOI:10.1172/jci173690.

[21] XU Y, ZHANG H F, CHEN Y X, *et al*. SRF SUMOylation modulates smooth muscle phenotypic switch and vascular remodeling[J]. Nat Commun, 2024, 15: 6919. DOI: 10.1038/s41467-024-51350-5.

[22] MAO H M, ZHAO X C, SUN S C. NF-κB in inflammation and cancer[J]. Cell Mol Immunol, 2025, 22(8): 811-839. DOI:10.1038/s41423-025-01310-w.

[23] YU H, LIN L B, ZHANG Z Q, *et al*. Targeting NF-κB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5: 209. DOI:10.1038/s41392-020-00312-6.

[24] YOSHIDA T, YAMASHITA M, HORIMAI C, *et al*. Smooth muscle-selective inhibition of nuclear factor-κB attenuates smooth muscle phenotypic switching and neointima formation following vascular injury [J]. J Am Heart Assoc, 2013, 2(3): e000230. DOI:10.1161/jaha.113.000230.

[25] ZHANG L, LENG X X, QI J X, *et al*. The adhesin RadD enhances *Fusobacterium nucleatum* tumour colonization and colorectal carcinogenesis [J]. Nat Microbiol, 2024, 9(9): 2292-2307. DOI:10.1038/s41564-024-01784-w.

[26] HUANG Y L, LI G, LI D, *et al*. Ethyl caffeate alleviates inflammatory response and promotes recovery in septic-acute lung injury *via* the TNF-α/NF-κB/MMP9 axis[J]. Phytomedicine, 2025, 141: 156700. DOI:10.1016/j.phymed.2025.156700.

[27] SONG J H, HWANG B, LYEA PARK S, *et al*. IL-28A/IL-10Rβ axis promotes angiogenesis *via ENOS*/AKT signaling and AP-1/NF-κB/MMP-2 network by regulating HSP70-1 expression [J]. J Adv Res, 2025, 73: 247-263. DOI: 10.1016/j.jare.2024.08.013.

[28] ZHANG J F, WANG P, YAN Y J, *et al*. IL-33 enhances glioma cell migration and invasion by upregulation of MMP2 and MMP9 *via* the ST2-NF-κB pathway [J]. Oncol Rep, 2017, 38(4): 2033-2042. DOI:10.3892/or.2017.5926.

[29] CHEN F Y, LI C, CAO H Y, *et al*. Identification of adenylate kinase 5 as a protein target of ginsenosides in brain tissues using mass spectrometry-based drug affinity responsive target stability (DARTS) and cellular thermal shift assay (CETSA) techniques [J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(8): 2741-2751. DOI:10.1021/acs.jafc.1c07819.

[30] RAFFORT J, LAREYRE F, CLÉMENT M, *et al*. Monocytes and macrophages in abdominal aortic aneurysm [J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(8): 457-471. DOI: 10.1038/nrcardio.2017.52.

[31] WU X X, LIU X Y, CHENG Y Z, *et al*. Single-cell RNA sequencing reveals endothelial cell heterogeneity and Sox18-mediated EndMT in abdominal aortic aneurysm [J]. Theranostics, 2025, 15(18): 9486-9507. DOI: 10.7150/thno.110254.

[32] ZHAO G Z, LU H C, CHANG Z Y, *et al*. Single-cell RNA sequencing reveals the cellular heterogeneity of aneurysmal infrarenal abdominal aorta [J]. Cardiovasc Res, 2021, 117(5): 1402-1416. DOI:10.1093/cvr/cvaa214.

(收稿:2026-04-24;修回:2026-05-02)

(编辑 栾 嘉)