

本文引用: 杨阳, 姚智超, 霍丽蓉. Nf1 基因沉默对小鼠主动脉血管平滑肌细胞增殖与迁移及表型转化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(6): 493-499. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.06.005.

[文章编号] 1007-3949(2025)33-06-0493-07

· 实验研究 ·

Nf1 基因沉默对小鼠主动脉血管平滑肌细胞增殖与迁移及表型转化的影响

杨阳, 姚智超, 霍丽蓉

首都医科大学附属复兴医院中心实验室, 北京市 100038

[摘要] [目的] 探究 Nf1 基因沉默对平滑肌细胞增殖和迁移的作用及可能的机制。[方法] 以小鼠主动脉血管平滑肌细胞(MOVAS)为研究对象, 用 Nf1 siRNA 转染 MOVAS 后, RT-qPCR 验证 Nf1 siRNA 转染 MOVAS 效率, 实验分为对照组、siRNA NC 组和 Nf1 siRNA 组。采用 Ki-67 免疫荧光实验检测 MOVAS 增殖, 采用划痕实验、Transwell 实验评估 Nf1 基因沉默对 MOVAS 迁移能力的影响, 采用 Western blot 检测 Nf1 基因沉默对 MOVAS 表型标志蛋白表达水平的影响以及 Ras 下游信号胞外信号调节激酶(ERK)、p-ERK、蛋白激酶 B(Akt)、p-Akt 表达水平的差异。[结果] 与对照组相比, Nf1 siRNA 组 MOVAS 增殖能力显著升高(升高 33.23%, $P<0.05$)、迁移能力显著增强(划痕实验显示增强 35.47%, Transwell 实验显示增强 39.33%, $P<0.05$ 或 $P<0.01$), 收缩型蛋白平滑肌 22 α 蛋白(SM22 α)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和钙调蛋白 1(CNN1)的表达降低(分别降低 18.91%、23.38% 和 25.08%, $P<0.05$ 或 $P<0.01$), 合成型蛋白骨桥蛋白(OPN)表达增加(增加 58.70%, $P<0.05$), p-ERK、p-Akt 水平显著增加(分别增加 33.30% 和 2.42 倍, $P<0.05$ 或 $P<0.01$)。[结论] Nf1 基因沉默使 MOVAS 增殖与迁移能力显著增强, 并由收缩型向合成型的表型转化。

[关键词] 血管平滑肌细胞; 细胞增殖; 细胞迁移; 表型转化; Nf1 基因

[中图分类号] R5; R363

[文献标识码] A

Effect of Nf1 gene silencing on proliferation and migration and phenotypic transformation of mouse aortic vascular smooth muscle cells

YANG Yang, YAO Zhichao, HUO Lirong

Central Laboratory, Fuxing Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of Nf1 gene silencing on smooth muscle cell proliferation and migration and its possible molecular mechanism. **Methods** Using mouse aortic vascular smooth muscle cells (MOVAS) as the research object, the efficiency of Nf1 siRNA transfection in MOVAS was verified by RT-qPCR after transfection with Nf1 siRNA. The experiment was divided into control group, siRNA NC group, and Nf1 siRNA group. Ki-67 immunofluorescence assay was used to detect the proliferation of MOVAS. Scratch assay and Transwell assay were used to evaluate the effect in the migration ability of MOVAS caused by Nf1 gene silencing. Western blot was used to detect the effect of Nf1 gene silencing on the expression levels of MOVAS phenotype marker proteins and the differences in the expression levels of downstream Ras signals extracellular signal-regulated kinase (ERK), p-ERK, protein kinase B (Akt), and p-Akt.

Results Compared with the control group, the proliferation ability of MOVAS in the Nf1 siRNA group was significantly increased (increased by 33.23%, $P<0.05$), migration ability was significantly enhanced (scratch assay showed an increase of 35.47%, Transwell assay showed an increase of 39.33%, $P<0.05$ 或 $P<0.01$), and the expression of contractile proteins smooth muscle 22 α (SM22 α), α -smooth muscle actin (α -SMA), and calmodulin 1 (CNN1) was reduced (decreased by 18.91%, 23.38% and 25.08%, $P<0.05$ 或 $P<0.01$, respectively). The expression of synthetic protein osteopontin (OPN) was increased (increased by 58.70%, $P<0.05$), and the levels of p-ERK and p-Akt were significantly

[收稿日期] 2024-07-02

[修回日期] 2024-12-04

[基金项目] 北京市自然科学基金项目(7182065)

[作者简介] 杨阳, 硕士研究生, 研究方向为神经系统疾病的发病机制及其治疗, E-mail: yy15310529575@163.com。通信作者霍丽蓉, 博士后, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为神经系统疾病的发病机制及其治疗, E-mail: huolir@ccmu.edu.com。

increased (increased by 33.30% and 2.42 times, respectively, $P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Nf1 gene silencing can significantly enhance the proliferation and migration ability of MOVAS, and transform from a contractile phenotype to a synthetic phenotype.

[KEY WORDS] vascular smooth muscle cell; cell proliferation; cell migration; phenotypic transformation; Nf1 gene

1型神经纤维瘤病(neurofibromatosis type 1, NF1)是一种由于Nf1基因突变引起的常染色体显性遗传性多系统疾病^[1-2],其特点是表型多变,具有患恶性肿瘤和高发病的风险^[3]。主要临床表现为多发性咖啡斑、Lisch结节、皮肤/真皮神经纤维瘤、丛状神经纤维瘤和骨缺损^[4]。脑血管病是NF1患者严重的并发症,NF1患者并发血管病变具有高发病率和死亡率,30岁以下的NF1患者发生血管病变的可能性要高出7倍以上^[5]。NF1患者并发的血管病变包括缺血性和出血性脑卒中、血管扩张或狭窄、肾动脉狭窄等^[6-8]。其中,脑卒中和脑动脉狭窄是最常见的血管并发症^[9]。目前,NF1患者并发潜在血管病变的具体分子机制有待阐明。

在NF1血管病变的小鼠模型中,Nf1^{+/−}小鼠在动脉损伤反应中新生内膜形成明显增加,其病理特征为平滑肌细胞的过度增殖和聚集以及巨噬细胞功能障碍^[10]。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的表型转化与其增殖能力、迁移能力的改变密切相关。在多种血管周围环境因素的刺激作用下,VSMC会从静止的收缩表型转变为合成表型^[11-12]。合成型VSMC从中膜迁移到内皮下间隙,大量增殖并产生基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)、胶原蛋白、弹性蛋白和蛋白聚糖,从而形成新的平滑肌细胞层,参与组织修复和重塑^[13]。目前,在NF1患者并发血管狭窄的病理过程中,VSMC是否发生表型转化有待探究。

本课题组前期研究发现了一个NF1患者并发脑血管狭窄的家系,基因筛查结果表明该家系所有患者的Nf1基因第5号外显子发生Q181X(c.541C-T)无义点突变^[14]。具体来说,编码的氨基酸序列中,谷氨酰胺被替换为终止密码子,导致Nf1基因在翻译到特定位置时提前终止,产生了一个由180个氨基酸组成的截短蛋白,这一变化使得Nf1基因丧失了其完整的编码功能域。应用CRISPR-Cas9技术建立Nf1-Q181X点突变小鼠模型,磁共振血管成像显示Nf1-Q181X点突变组小鼠均存在脑血管狭窄。此外,在颈动脉损伤模型中观察到,Nf1-Q181X点突变促进颈动脉新生内膜形成,从而导致血管狭窄^[15]。本研究以小鼠主动脉血管平滑肌细胞

(mouse aortic vascular smooth muscle cell, MOVAS)为研究对象,探讨Nf1基因沉默对MOVAS增殖和迁移的影响,在细胞层面为NF1并发血管狭窄的分子机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验细胞及主要试剂

MOVAS购自武汉普诺赛生命科技有限公司。DMEM高糖培养基、双抗和0.25%胰蛋白酶(Gibco);胎牛血清(CellMax);二甲基亚砜(Sigma);NP-40裂解液、结晶紫染液、4%多聚甲醛固定液和DAPI染液(Solarbio);Transwell小室(Corning);免疫荧光二抗稀释液(碧云天);BCA蛋白定量试剂盒(上海生工);Ki-67、平滑肌22α蛋白(smooth muscle 22α, SM22α)、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)、钙调蛋白1(calmodulin 1, CNN1)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)、p-Akt、胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)和p-ERK(CST);羊抗兔荧光二抗594、HRP标记的羊抗兔二抗(Abcam)。Nf1 siRNA及其阴性对照由上海吉玛基因科技有限公司合成。

1.2 细胞培养

将MOVAS细胞系复苏、传代,在含有10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素溶液的高糖DMEM培养基中进行培养,并置于37℃、5%CO₂细胞培养箱中,选取5~10代状态良好的MOVAS用于实验。

1.3 细胞转染

将细胞稀释后按 2×10^5 个/孔的密度接种于12孔板,当细胞融合至80%时,换用无血清培养基,细胞分为3组:对照组、siRNA NC组、Nf1 siRNA组。按照Lipo3000试剂转染说明书分别转染siRNA NC和Nf1 siRNA,转染后培养6 h,去除培养液,加入新鲜的含有胎牛血清的DMEM完全培养基,继续培养48 h后收取细胞样品,用于后续实验。Nf1 siRNA靶向序列:正义链为5'-GCUCCUGUCAUUCUCUATT-3',反义链为5'-UAGAGAGAAUGACAGGAGCTT-3'。

1.4 RT-qPCR 检测

按照 Trizol 试剂说明书从细胞中提取总 RNA, 以总 RNA 为模板, 使用 RevertAid first-strand cDNA synthesis kit 试剂盒反转录成 cDNA。以反转录得到的 cDNA 为模板, 加入特异引物和 SYBR Green mix 检测试剂进行实时荧光定量 PCR。引物序列: Nf1 上游为 5'-ATGGCTTCACATTCTGG-3', 下游为 5'-ATAACTGTAACCTGGTC-3'; 内参 GAPDH 上游为 5'-AGGTGGTGTGAACGGATTTG-3', 下游为 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行定量分析。

1.5 免疫荧光观察

将不同组的细胞悬液接种于含有细胞爬片的 6 孔板中, 进行细胞培养处理, 待其爬片后, 移除培养液, 用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 随后用 PBS 溶液清洗 3 次, 然后用 0.1% Triton X-100 进行通透化和 5% BSA 封闭 30 min。置于 4 ℃冰箱中与一抗孵育过夜。次日, 添加荧光标记的二抗室温避光孵育 1 h。最后, 用 DAPI 孵育, 用于染色和标记细胞核。移去 DAPI, PBS 洗 3 次后封片, 在荧光显微镜下记录最终染色结果并拍照。

1.6 Western blot 检测

采用含有磷酸酶和蛋白酶抑制剂的 NP-40 裂解缓冲液进行细胞总蛋白的提取。等量的蛋白样品通过 12.5% 的 SDS-PAGE 凝胶进行分离, 并转移到 PVDF 膜上。随后放入 5% 脱脂奶粉封闭液中室温封闭 2 h, 加一抗, 于 4 ℃ 孵育过夜。用 TBST 洗膜后, 加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗, 在室温下孵育 2 h, 加 TBST 洗涤 3 次, 再加入增强化学发光试剂, 并在成像系统上曝光显影。

1.7 细胞划痕实验

将转染后的细胞制成细胞悬液, 按照 2×10^5 个/孔的密度接种在 12 孔板中, 将原有完全培养基替换成无血清培养基以排除细胞本身增殖对实验结果的影响, 待细胞长满后, 使用 200 μ L 移液管的尖端在融合的细胞上划出一道划痕。在划痕后 0 h、24 h 用倒置显微镜进行拍照和记录划痕面积的变化, 并通过 Image J 软件测定细胞迁移的距离。

1.8 Transwell 实验

使用 24 孔和 8 μ m 孔径的 Transwell 小室测定细胞迁移。用无血清培养基重悬细胞, 加入 Transwell 培养板的上层小室中, 将小室插入孔内并向下室加入完全培养基, 于 37 ℃ 培养 24 h, 将迁移到外膜侧的细胞用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 清洗后用 1% 结晶紫染液染色 15 min, 用 PBS 轻轻冲洗掉剩余的染

液, 在显微镜下对迁移细胞进行可视化并记录数据。

1.9 统计学分析

实验数据采用 Graphpad prism 9.0 软件进行统计分析。实验重复 3 次, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 Nf1 siRNA 转染 MOVAS 后 Nf1 mRNA 的表达

RT-qPCR 检测结果显示, 与对照组相比, siRNA NC 组 Nf1 mRNA 表达无明显改变, Nf1 siRNA 组 Nf1 mRNA 表达降低了 30.84% ($P < 0.01$; 图 1)。上述结果表明, Nf1 siRNA 可有效抑制 Nf1 基因的表达。

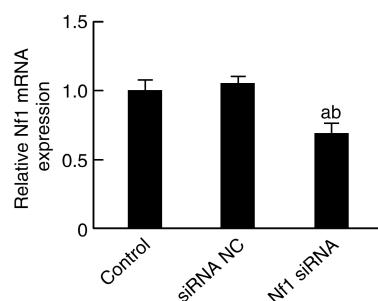


图 1. Nf1 siRNA 转染 MOVAS 后 Nf1 mRNA 的表达
a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 siRNA NC 组比较。

Figure 1. The expression of Nf1 mRNA in MOVAS after Nf1 siRNA transfection

2.2 Nf1 基因沉默促进 MOVAS 增殖

Ki-67 免疫荧光实验结果显示, 与对照组和 siRNA NC 组相比, Nf1 siRNA 组 Ki-67 阳性细胞比率分别升高 33.23% 和 28.85% ($P < 0.05$), 而对照组与 siRNA NC 组 Ki-67 阳性细胞比率无明显差异 (图 2)。上述结果表明, Nf1 基因沉默可以促进 MOVAS 增殖。

2.3 Nf1 基因沉默促进 MOVAS 迁移

细胞划痕实验结果显示, 在划痕实验 24 h 后, 与对照组和 siRNA NC 组相比, Nf1 siRNA 组划痕恢复百分比明显增加 ($P < 0.01$; 图 3)。Transwell 实验结果显示, 与对照组和 siRNA NC 组相比, Nf1 siRNA 组迁移细胞数量明显增加, 分别升高 39.33% 和 34.67% (均 $P < 0.05$; 图 4)。上述结果表明, Nf1 基因沉默后 MOVAS 的迁移能力显著增强。

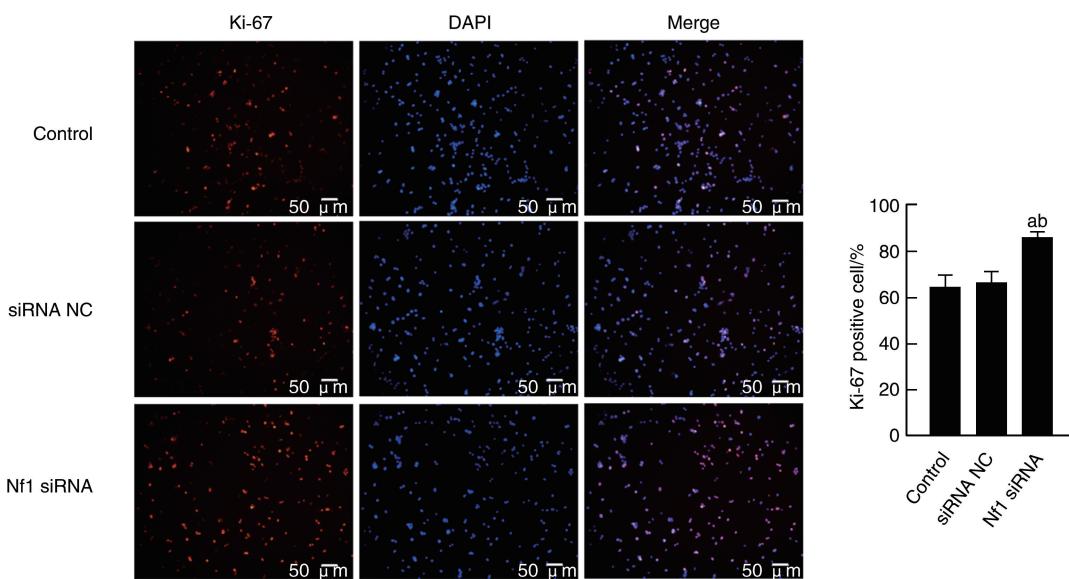


图 2. Ki-67 免疫荧光实验检测 Nf1 基因沉默对 MOVAS 增殖能力的影响

蓝色为 DAPI 标记的细胞核,红色为 Ki-67 标记。a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 siRNA NC 组比较。

Figure 2. Ki-67 immunofluorescence assay was used to detect the effect of Nf1 gene silencing on the proliferation ability of MOVAS

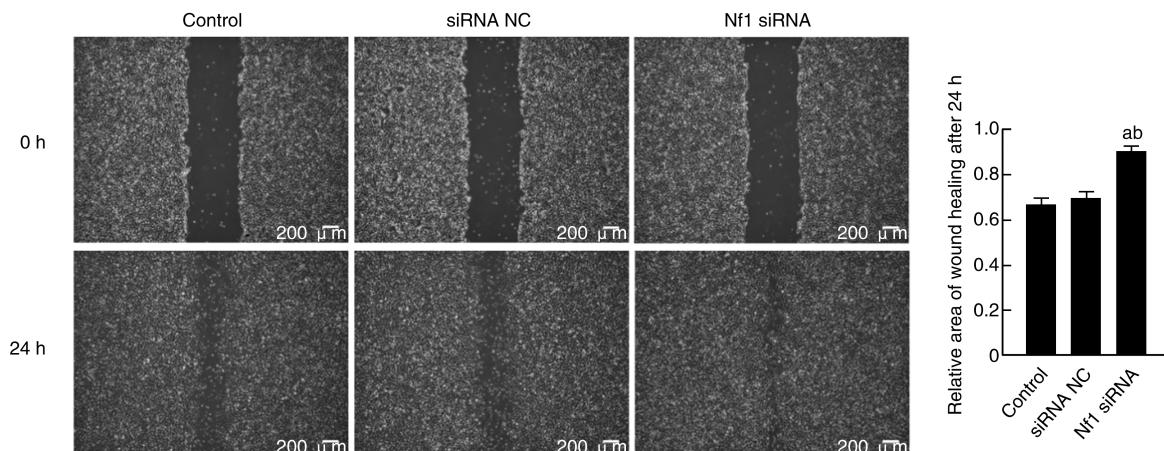


图 3. 细胞划痕实验检测 Nf1 基因沉默对 MOVAS 迁移能力的影响

a 为 $P<0.01$,与对照组比较;b 为 $P<0.01$,与 siRNA NC 组比较。

Figure 3. Cell scratch assay was used to detect the effect of Nf1 gene silencing on the migration ability of MOVAS

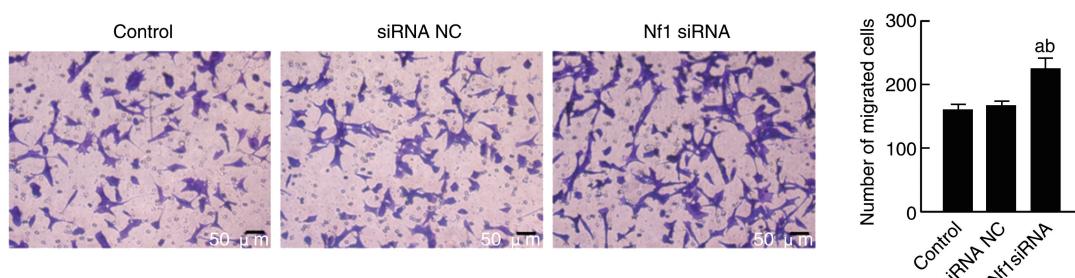


图 4. Transwell 实验检测 Nf1 基因沉默对 MOVAS 迁移能力的影响

a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 siRNA NC 组比较。

Figure 4. Transwell assay was used to detect the effect of Nf1 gene silencing on the migration ability of MOVAS

2.4 Nf1 基因沉默促进 MOVAS 表型转换

在血管损伤或应对机械应力时, VSMC 去分化成合成表型, 其特征是高增殖和高迁移速率, 最终导致血管重塑和血管阻塞^[16]。先前的实验结果表明 Nf1 基因沉默促进 MOVAS 增殖和迁移, 为了明确在这个过程中, MOVAS 的表型是否发生转化, 采用 Western blot 检测 MOVAS 收缩型蛋白和合成型蛋白的表达。结果显示, 与对照组和 siRNA NC 组

相比, Nf1 siRNA 组 MOVAS 收缩型蛋白 SM22 α 的表达分别降低 18.91% 和 20.11%, α -SMA 的表达分别降低 23.38% 和 18.41%, CNN1 的表达分别降低 25.08% 和 24.80%, 合成型蛋白 OPN 的表达分别升高 58.70% 和 64.40% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 图 5)。上述结果表明, Nf1 基因沉默诱导 MOVAS 从收缩型向合成型转化, 进而促进 MOVAS 的增殖和迁移。

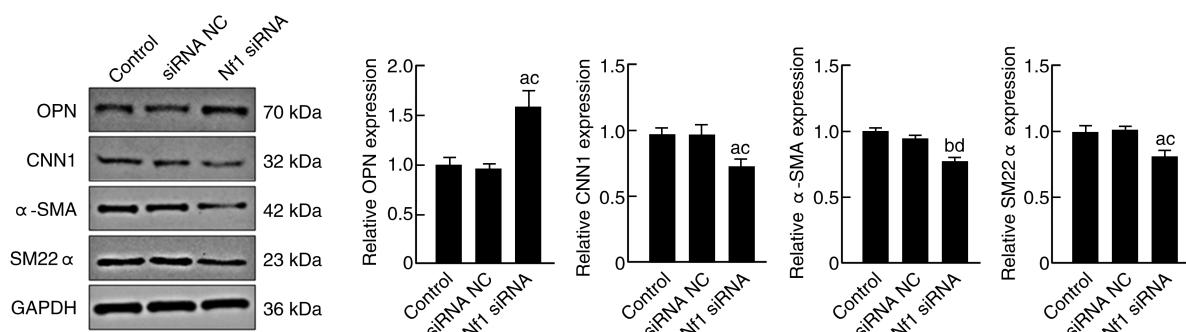


图 5. Western blot 检测 Nf1 基因沉默对 MOVAS 收缩型蛋白和合成型蛋白表达的影响

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 siRNA NC 组比较。

Figure 5. Western blot was used to detect the effect of Nf1 gene silencing on the expression of MOVAS contractile and synthetic proteins

2.5 Nf1 基因沉默上调 p-ERK 和 p-Akt 蛋白表达

Western blot 检测结果显示, 与对照组和 siRNA NC 组相比, Nf1 siRNA 组 p-ERK 的表达分别升高 33.30% 和 35.15%, p-Akt 的表达分别升高 2.42 倍

和 2.29 倍 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而对照组与 siRNA NC 组 p-ERK、p-Akt 的表达无明显差异(图 6)。这些结果表明, Nf1 基因沉默后引起的 MOVAS 表型转化与激活 ERK 和 Akt 信号通路有关。

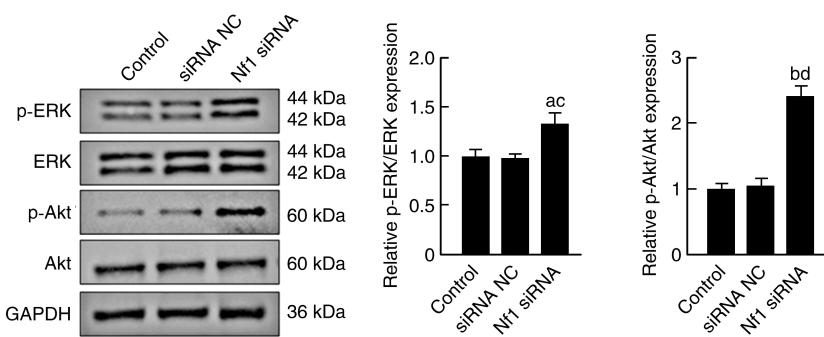


图 6. Western blot 检测 Nf1 基因沉默对 MOVAS 中 ERK、Akt 及其磷酸化蛋白表达的影响

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 siRNA NC 组比较。

Figure 6. Western blot was used to detect the effect of Nf1 gene silencing on the expression of ERK, Akt and their phosphorylated proteins in MOVAS

3 讨 论

VSMC 不同于肌肉、骨骼和心血管肌细胞, 表现出显著的细胞可塑性, 其特点是对外界刺激和信号

的反应显著。VSMC 通常处于静止的收缩状态, 很少在成熟的、功能性血管中增殖, 且表达平滑肌特异性收缩相关的蛋白, 包括通道蛋白 SM22 α 、 α -SMA 和 CNN1^[13]。合成型 VSMC 的特征是收缩相关基因

的表达减少,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成增加,增殖、迁移能力增强。ECM的沉积和重塑是提供合适的机械强度和组织结构的必要条件^[17]。在血管发育、血管损伤的愈合以及心血管疾病患者血管的异常重构等过程中,VSMC的特性发生改变,并通过肌丝密度、收缩标志基因和收缩力的变化来监测^[18]。有研究表明,与肺动脉高压相关的血管结构改变的特点是VSMC由“静息”状态转变为更活跃的“促增殖”“抗细胞死亡”和“促炎症”状态,这种转化导致ECM成分的积累(主要是胶原蛋白),以及肺小动脉厚度的增加^[19]。研究表明,主动脉平滑肌细胞可以发生与动脉粥样硬化相关的DNA甲基化,可能通过下调主动脉平滑肌细胞相关的增强子来最小化或逆转平滑肌细胞收缩特性,从而发生表型转化,进一步加速动脉粥样硬化^[20]。VSMC的异常增殖促进斑块形成并导致斑块的不稳定性增加^[21-22]。本研究发现,Nf1基因沉默能够调控VSMC表型转化,因此,抑制VSMC从收缩表型向合成表型转化对预防NF1患者发生心脑血管事件具有重要意义。

Nf1基因编码神经纤维瘤蛋白,通过促进有活性的Ras-GTP水解为无活性的二磷酸构象,在多种细胞中负向调节Ras活性。Nf1基因缺失导致Ras过度激活,进而引起Akt/mTOR通路和Raf/MEK/ERK通路的激活^[23]。ERK分为ERK1和ERK2,ERK1和ERK2具有高度序列同源性。ERK1/2通路在细胞外细胞因子、生长因子的作用下,参与从质膜到胞核的信号转导,从而发挥细胞增殖效应^[24]。在典型的p-ERK1/2通路中,配体诱导的质膜上受体酪氨酸激酶激活,并以GTP结合形式激活Ras,触发MAP3K RAF的激活,启动下游磷酸化级联反应,依次激活MAP2K MEK和MAPK ERK,从而调节细胞核内基因表达,介导细胞的生物学行为发生改变^[25]。MAPK级联反应的激活可以引起下游蛋白的磷酸化,进而引起平滑肌细胞收缩基因的抑制和去分化基因的转录^[26]。PI3K/Akt通路在细胞增殖、黏附、迁移、侵袭、代谢等多种细胞功能中发挥关键作用,已被证明参与多种疾病的病理过程。最近的研究证明,PI3K/Akt信号通路以磷酸化依赖的方式介导VSMC去分化,并在新生内膜增生中发挥重要作用^[27]。同时,抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路可以抑制PDGF-BB诱导的VSMC增殖、迁移和表型转化^[28]。本研究结果证明,Nf1基因沉默导致VSMC中的ERK、Akt磷酸化水平发生改变,需要进一步的研究以更充分阐明Nf1基因沉默在

VSMC表型和功能改变中的作用,从而提供异常ERK信号驱动的血管疾病治疗的新策略。另外,PI3K/Akt/mTOR通路和Raf/MEK/ERK通路通过RTK/GPCR及其相关的细胞内分子形成多个前馈和反馈回路,使PI3K/Akt/mTOR和Ras/MAPK通路交叉调节,在多个水平上相互作用^[29]。本研究发现,在Nf1基因沉默促进VSMC增殖和迁移的过程中,PI3K/Akt/mTOR通路和Raf/MEK/ERK通路的相互作用关系目前尚不清楚,这些失调的通路可以为未来潜在治疗靶点的选择提供新思路。

综上,本研究证明了Nf1基因沉默通过激活PI3K/Akt信号通路和MEK/ERK1/2信号通路影响平滑肌细胞的表型和功能,对探究NF1患者并发血管狭窄的病理机制提供新思路。然而,需要更多研究进一步揭示Nf1基因沉默引起血管内膜增生和血管狭窄发生的病理生理改变及可能存在的分子机制,以此了解NF1基因突变与潜在血管改变的关系,并最终预防脑血管事件的发生。

[参考文献]

- [1] KEHRER-SAWATZKI H, COOPER D N. Challenges in the diagnosis of neurofibromatosis type 1 (NF1) in young children facilitated by means of revised diagnostic criteria including genetic testing for pathogenic NF1 gene variants [J]. Hum Genet, 2022, 141(2): 177-191.
- [2] ANASTASAKI C, CHATTERJEE J, KOLESKE J P, et al. NF1 mutation-driven neuronal hyperexcitability sets a threshold for tumorigenesis and therapeutic targeting of murine optic glioma [J]. Neuro Oncol, 2024, 26(8): 1496-1508.
- [3] LEE T J, CHOPRA M, KIM R H, et al. Incidence and prevalence of neurofibromatosis type 1 and 2: a systematic review and Meta-analysis [J]. Orphanet J Rare Dis, 2023, 18(1): 292.
- [4] RAMAMOORTHY S, LEBRECHT D, SCHANZE D, et al. Biallelic inactivation of the NF1 tumour suppressor gene in juvenile myelomonocytic leukaemia: genetic evidence of driver function and implications for diagnostic workup [J]. Br J Haematol, 2024, 204(2): 595-605.
- [5] KALLIONPÄÄ R A, UUSITALO E, LEPPÄVIRTA J, et al. Prevalence of neurofibromatosis type 1 in the finnish population [J]. Genet Med, 2018, 20(9): 1082-1086.
- [6] CHELLERI C, SCALA M, DE MARCO P, et al. Case report: revascularization failure in NF1-related moyamoya syndrome after selumetinib: a possible pathophysiological correlation? [J]. Front Pediatr, 2023, 11: 1051026.
- [7] CORONA-RIVERA J R, BARRIOS-PRIETO E, RIVERA-RAMÍREZ B, et al. Aneurysms involving the coronary ar-

- teries in a neonate with neurofibromatosis 1 [J]. *Am J Med Genet A*, 2023, 191(9): 2422-2427.
- [8] LEHMAN L L, ULLRICH N J. Cerebral vasculopathy in children with neurofibromatosis type 1 [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(20): 5111.
- [9] DESMOND F J, BUTURE A, KAVANAGH E C, et al. Ischemic stroke with extensive vasculopathy in a patient with neurofibromatosis type 1 [J]. *Radiol Case Rep*, 2022, 17(9): 3370-3372.
- [10] STANSFIELD B K, BESSLER W K, MALI R, et al. Ras-Mek-Erk signaling regulates Nfl heterozygous neointima formation [J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(1): 79-85.
- [11] 李岩, 安芸, 张赫彬, 等. 华良姜素对PDGF-BB诱导血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(10): 865-871.
- LI Y, AN Y, ZHANG H B, et al. Effects of jaranol on proliferation and migration of vascular smooth muscle cells induced by PDGF-BB [J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(10): 865-871.
- [12] 盛晓潜, 王树人. 血管平滑肌细胞移行及表型转换的分子机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(11): 917-921.
- SHENG X Z, WANG S R. Molecular mechanisms of vascular smooth muscle cell migration and phenotype transition [J]. *Chin J Arterioscler*, 2008, 16(11): 917-921.
- [13] ASHRAF J V, AL HAJ ZEN A. Role of vascular smooth muscle cell phenotype switching in arteriogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10585.
- [14] LIANG J T, HUO L R, BAO Y H, et al. Cerebral vasculopathy in a Chinese family with neurofibromatosis type I mutation [J]. *Neurosci Bull*, 2013, 29(6): 708-714.
- [15] LIANG C, HUO L, ZHU Y, et al. The Q181X point mutation in Nfl induces cerebral vessel stenosis [J]. *Neurosci Bull*, 2023, 39(5): 813-816.
- [16] HU Y, CAI Z, HE B. Smooth muscle heterogeneity and plasticity in health and aortic aneurysmal disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(14): 11701.
- [17] LIU M, GOMEZ D. Smooth muscle cell phenotypic diversity [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(9): 1715-1723.
- [18] CAO G, XUAN X, HU J, et al. How vascular smooth muscle cell phenotype switching contributes to vascular disease [J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 180.
- [19] SHEIKH A Q, LIGHTHOUSE J K, GREIF D M. Recapitulation of developing artery muscularization in pulmonary hypertension [J]. *Cell Rep*, 2014, 6(5): 809-817.
- [20] LACEY M, BARIBAULT C, EHRLICH K C, et al. Atherosclerosis-associated differentially methylated regions can reflect the disease phenotype and are often at enhancers [J]. *Atherosclerosis*, 2019, 280: 183-191.
- [21] BASATEMUR G L, JØRGENSEN H F, CLARKE M C H, et al. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(12): 727-744.
- [22] ELMARASI M, ELMAKATY I, ELSAYED B, et al. Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis, hypertension, and aortic dissection [J]. *J Cell Physiol*, 2024, 239(4): e31200.
- [23] TAMURA R. Current understanding of neurofibromatosis type 1, 2, and schwannomatosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5850.
- [24] GILBERT C J, LONGENECKER J Z, ACCORNERO F. ERK1/2: an integrator of signals that alters cardiac homeostasis and growth [J]. *Biology (Basel)*, 2021, 10(4): 346.
- [25] LUCAS R M, LUO L, STOW J L. ERK1/2 in immune signalling [J]. *Biochem Soc Trans*, 2022, 50(5): 1341-1352.
- [26] ZHANG X, CHEN J, WANG S. Serum amyloid a induces a vascular smooth muscle cell phenotype switch through the p38 MAPK signaling pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 4941379.
- [27] XU X, ZHANG D D, KONG P, et al. Sox10 escalates vascular inflammation by mediating vascular smooth muscle cell transdifferentiation and pyroptosis in neointimal hyperplasia [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(8): 112869.
- [28] WANG H, ZHONG B, GENG Y, et al. TIPE2 inhibits PDGF-BB-induced phenotype switching in airway smooth muscle cells through the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Respir Res*, 2021, 22(1): 238.
- [29] SHORNING B Y, DASS M S, SMALLEY M J, et al. The PI3K-AKT-mTOR pathway and prostate cancer: at the crossroads of AR, MAPK, and WNT signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4507.

(此文编辑 文玉珊)