doi:10.116592/jjssx.09E019129

·基础研究·

内皮型一氧化氮合酶过表达对慢性低氧诱导小鼠肺动脉高压的作用

高 杰[1],兰 江[1],胡 蓉[1],李 红[1],黄 悦[2],苏 敏[1,3] (1.贵州医科大学组织学与胚胎学教研室,贵州 贵阳 550025;2.贵阳护理职业学院基础医学部,贵州 贵阳 550081;3.贵州医科大学贵州省细胞工程生物医药技术国家地方联合工程实验室/贵州省再生医学重点实验室,贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的** 探讨内皮型一氧化氮合酶(eNos)基因体内转染对小鼠慢性低氧性肺动脉高压(PAH)的作用。**方法** 将36只雄性清洁级昆明小鼠随机分为对照组、模型组和eNos治疗组,每组12只。采用间断性常压缺氧法建立小鼠慢性低氧性PAH的模型。观察4周后,将PEI/重组质粒复合物经尾静脉注射到eNos治疗组小鼠体内,其他2组注射等量生理盐水,继续低氧处理。转基因治疗30 d后,观察小鼠的一般情况、平均肺动脉压、右心室肥大指数及肺小动脉形态变化;采用RT-PCR方法检测外源荧光蛋白DsRed表达情况;采用Real-time PCR法检测各组肺组织eNos mRNA的表达;采用硝酸还原酶法检测各组小鼠肺组织NO含量。**结果** 与对照组小鼠相比,模型组小鼠的右心室肥大指数及平均肺动脉压较高,肺小动脉管壁厚度增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组小鼠相比,eNos治疗组小鼠的平均肺动脉压及右心室肥大指数增高减轻,肺小动脉管壁增厚减轻,差异有统计学意义($P<0.05$);eNos治疗组小鼠肺组织中可见外源性基因DsRed表达,eNos mRNA表达量和NO含量增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 外源性eNos基因体内转染能够改善慢性低氧诱导小鼠PAH模型的肺血管重构,使右心室肥大指数增高减轻,肺小动脉血管增厚减轻。

[关键词] 内皮型一氧化氮合酶;肺动脉高压;聚乙烯亚胺;一氧化氮
[中图分类号] R725 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-09-24

Effect of endothelial nitric oxide synthase overexpression on pulmonary hypertension induced by chronic hypoxia in mice

GAO Jie[1],LAN Jiang[1],HU Rong[1],LI Hong[1],HUANG Yue[2],SU Min[1,3] (1.Department of Histology and Embryology,Guizhou Medical University,Guiyang Guizhou 550025,China;2.Department of Basic Medicine,Guiyang Nursing Vocational College,Guiyang Guizhou 550081,China;3.National and Guizhou Joint Engineering Laboratory for Cell Engineering and Biomedicine Technique/Guizhou Province Key Laboratory of Regenerative Medicine,Guizhou Medical University,Guiyang Guizhou 550004,China)

Abstract: Objective To explore the effect of transfecting the endothelial nitric oxide synthase(eNos) gene in vivo on the mice with pulmonary hypertension induced by chronic hypoxia. **Methods** A total of 36 male mice were randomly divided into the control group,the

[基金项目] 贵州省科技支撑计划(黔科合支撑[2017]2970号);贵州省普通高校科技拔尖人才支持计划(黔科合KY字(2017(071)号);贵州省科学技术基金项目(黔科合J字[2012]2037号)

[通信作者] 苏 敏,E-mail:summ30@163.com

[9] Shervin D,Pratt K,Healey T,et al. Anterior knee pain following primary total kneearthroplasty[J]. World J Orthop,2015,6(10):795-803. doi:10.5312/wjo.v6.i10.795.
[10] 李龙杰,张 磊,张海森,等.类风湿关节炎全膝关节置换术中保留髌下脂肪垫的临床研究[J].重庆医学,2019,48(19):3397-3399. doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.19.041.
[11] Khan M,Osman K,Green G,et al. The epidemiology of failure in total knee arthroplasty: avoiding your next revision[J]. Bone Joint J,2016,98-B(1_Supple_A):105-112. doi:org/10.1302/0301-620x.98b1.36293.
[12] 买买提克里木·吐松江.维吾尔族正常膝关节参数的测量及其临床意义[D].新疆:新疆医科大学,2014. doi:10.7666/d.D601983.
[13] 曾俊杰,郭 艾.手术相关因素对全膝关节置换术后功能恢复的影响[J].中华关节外科杂志(电子版),2019,13(5):611-614. doi:10.3877/cma.j.issn.1674-134X.2019.05.016.
[14] Han W,Cai S,Liu Z,et al. Infrapatellar fat pad in the knee:is local fat good or bad for knee osteoanhritis[J]. Arthritis Res Ther,2014,16(4):145. doi:org/10.1186/ar4607.
[15] 辛雨佳,徐永胜,包呼日查.髌下脂肪垫研究进展[J].内蒙古医学杂志,2020,52(1):27-30. doi:10.16096/J.cnki.nmgyxzz.2020.52.01.008.
[16] 朱志刚,金大地,罗吉伟,等.股骨远端解剖形态性别差异与假体形态设计的关系[J].中国临床解剖学杂志,2008,26(4):386-388. doi:10.3969/j.issn.1001-165X.2008.04.012.
[17] 刘向林.股骨远端形态对全膝关节置换术中标准截骨后屈伸间隙影响的研究[D].承德:承德医学院,2018. doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2017.12.07.
[18] 郝 岩,张树明,周 密,等.北京地区健康成人膝关节测量及其临床意义[J].实用骨科杂志,2017,23(4):323-327.
[19] 张志峰,赵振群,黄 健,等.汉族与蒙古族胫骨近端部分数字化解剖形态的测量与对比[J].中国组织工程研究,2015,19(53):8627-8632. doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.53.017.
[20] Kim TK,Phillips M,Bhandari M,et al. What differences in morphologic features of the knee exist among patients of various races? A systematic review[J]. Clin Orthop Relat Res,2017,475(1):170-182. doi:10.1007/s11999-016-5097-4.

(编辑:杨 颖)

model group, and the eNos treatment group, wih 12 mice in each group. The mice in the model group and the eNos treatment group were prepared with normal pressure intermittent hypoxia method to establish the model of chronic hypoxic PAH. After observation of 4 weeks, mice in the eNos treatment group were transfected with plasmid by PEI-mediated in vivo, while mice in the other two groups were treated with equivalent saline. Besides, hypoxia was continued while transfection. The mean pulmonary artery pressure (mPAP), right ventricular hypertrophy index and pulmonary microvascular changes were observed after 30 days. The expression of exogenous fluorescent protein DsRed was detected by RT-PCR. Real-time PCR was used to detect the mRNA expression of eNos in pulmonary tissues of each group. Nitrate reductase methods was used to detect NO content in pulmonary tissues of each group. **Results** Compared with the control group, the right ventricular hypertrophy index and mPAP in the model group were higher, and the pulmonary arteriole wall thickness was increased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with mice in the model group, mice in the eNos treatment group showed decreased increases in mean pulmonary artery pressure and right ventricular hypertrophy index, as well as decreased thickening of pulmonary arteriole walls, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Expression of exogenous DsRed was found in the pulmonary tissue of mice in the eNos treatment group. The eNos mRNA expression and NO content were increased in the pulmonary tissue of the eNos treatment group compared with the model group ($P<0.05$). **Conclusion** Transfection with eNos gene in vivo can improve pulmonary vascular remodeling in PAH model of chronic hypoxic-induced mice, reduce right ventricular hypertrophy index and reduce pulmonary arteriole thickening.

Keywords: endothelial nitric oxide synthase; pulmonary hypertension; polyethyleneimine; nitric oxide

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是一种以肺血管阻力进行性增加的恶性肺血管疾病,其主要病理改变为血管内皮异常增殖、平滑肌纤维肥大及血管内膜增厚,临床症状隐匿,常常快速进展为慢性肺源性心脏病(肺心病),导致患者预后较差[1-3]。常见治疗措施以药物治疗为主,但其只能不同程度改善患者的临床症状,不能从根本上治疗。随着对 PAH 发病机制的深入研究,阻止及逆转肺血管重构已被认为是有效防治 PAH 的关键环节[4]。

多项研究表明,一氧化氮(nitric oxide, NO)作为一种内皮来源的血管舒张因子,能直接舒张血管,可维持肺循环的稳定,对治疗早期 PAH 有一定效果,但常引起不良反应[5-7]。血管内皮是合成 NO 的主要场所,内皮型一氧化氮合成酶(endothelial nitric oxide synthase, eNos)是血管内皮合成 NO 的特异性酶[8],其产生的内源性 NO 在舒张血管张力方面有着非常重要的作用。有研究表明,慢性低氧不仅会引起内源性 NO 的合成及释放减少,也会影响其生物活性,进一步导致 PAH 的形成[9]。因此,通过 eNos 转基因技术恢复 NO 的生成对 PAH 的治疗具有重要意义[10]。本研究拟通过聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)介导含有 eNos 基因的真核表达载体 pBudCE4.1-eNos-DsRed 在模型小鼠体内进行转染,观察其转染后在小鼠肺组织的表达情况,探讨 eNos 基因转染对慢性低氧诱导小鼠 PAH 的作用,以期为转基因治疗 PAH 奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

昆明种小鼠,健康清洁级,雄性,鼠龄 6~8 周,体质量 30~40 g,均由贵州医科大学实验动物中心提供[生产许可证:SCXK(黔)2012-0001];阳离子聚合物 PEI 由美国 Sigma 提供;一氧化氮试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成;pBudCE4.1-eNos-DsRed 载体由苏敏课题组保存提供。

1.2 动物分组及小鼠肺动脉高压模型的建立

采用间断性常压缺氧法建立小鼠 PAH 动物模型,将 36 只昆明种小鼠随机分为 3 组:对照组、模型组、eNos 治疗组,每组 12 只。除对照组小鼠外,其余小鼠置于自制有机玻璃缺氧箱内,用氧监测控制系统使缺氧箱氧浓度控制在(10±0.5)%,舱内的 CO_2 和水蒸气分别用钠石灰和氯化钙吸收。通过缺氧箱上通气孔与大气压保持平衡,每天 8 h,每周 6 d,第 7 天不缺氧。对照组小鼠呼吸正常空气,与其他组小鼠放于同一房间以相同饮食饲养。除低氧和处理条件不同外,3 组小鼠的生活环境和饲养条件相同。造模 4 周后,以平均肺动脉压力(mean pulmonary artery pressure, mPAP)明显增高,肺动脉管壁变厚、管腔变小,右心室肥大指数增高等作为造模成功的表现。

1.3 重组质粒 pBudCE4.1-eNos-DsRed 体内转染

将重组质粒 pBudCE4.1-eNos-DsRed 80 μg 溶于生理盐水中,总体积为 250 μL;取 216 μL PEI 储备液(N/P 为 9)溶于 40 μL 生理盐水,总体积为 250 μL;将两种溶剂混合 15 min,经尾静脉注入 eNos 治疗组小鼠体内。对照组与模型组小鼠注入等量生理盐水,继续在低氧环境下饲养观察 30 d。

1.4 mPAP 及右心肥大指数检测

转基因治疗后,通过右心导管测定肺动脉压,10%水合氯醛 0.3 mL/100 g 腹腔注射麻醉,经右侧颈部静脉插入右心导管至肺动脉干,稳定 10 min 后检测

mPAP。处死小鼠,取出心脏,解剖镜下沿心室间隔边缘剪下右心室(right ventricular,RV)、左心室(left ventricle,LV)、室间隔(ventricular septum,S),用滤纸吸干后在电子天平上分别称定质量。将右心室与左心室加室间隔质量之比值[RV/(LV+S)]作为右心室肥大指数来评估右心肥大程度。

1.5 肺动脉组织形态观察

肺组织石蜡切片进行 HE 染色,光镜下观察肺血管的形态变化。每张切片连续观察 10 个视野,选取直径 50~150 μm 的肺小动脉,采用 Leica QWinV3 图像采集分析系统进行测量,计算均值作为小鼠的肺血管形态计量学指标,MT 表示肺小动脉管壁厚。

1.6 RT-PCR 检测 DsRed mRNA 的表达情况

转基因治疗后,采用 Trizol 法提取每组小鼠肺组织内总 RNA,使用逆转录试剂盒按照随机引物法合成 cDNA 第一链,克隆 DsRed 基因片段,上下游引物分别为:5′-ACGCGTCGACGCCTCCTCCGAGGACGTCATC-3′和 5′-CTAGTCTAGACTACAGGAACAGGTGGTGGCGG-3′,产物 677 bp。反应条件为:94 ℃变性 30 s,61 ℃退火 30 s,68 ℃延伸 45 s,共计 35 个循环,将扩增产物跑电泳,以内参基因为对照分析 DsRed mRNA 的表达情况。

1.7 Real-time PCR 法检测各组肺组织 eNos mRNA 的表达

各组小鼠肺组织 RNA 的提取及逆转录同前,上下游引物分别为:5′-GGATTCTGGCAAGACCGATTACA-3′和 5′-ACTTGTCCAAACACTCCACGCTG-3′,产物 152 bp。内参引物上下游引物分别是:5′-TGAGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3′和 5′-GCTCGTTGCCAATAGTGATGACC-3′,产物 149 bp。采用伯乐 SYBR Green 试剂盒进行荧光定量 PCR,反应条件为:95 ℃变性 10 s,58.7 ℃退火 30 s,68 ℃延伸 5 s,共计 39 个循环。eNos 基因的相对表达量通过 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 计算。

1.8 硝酸还原酶法检测肺组织中的 NO 表达

转基因治疗后,按照 NO 试剂盒说明,采用硝酸还原酶法检测各组小鼠肺组织 NO 含量。取小鼠肺组织制成组织匀浆,离心取上清液,用该方法检测 NO_2^- 和 NO_3^- 浓度,以代表肺组织 NO 含量。

1.9 统计分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,所有数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较使用单因素方差分析进行处理,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

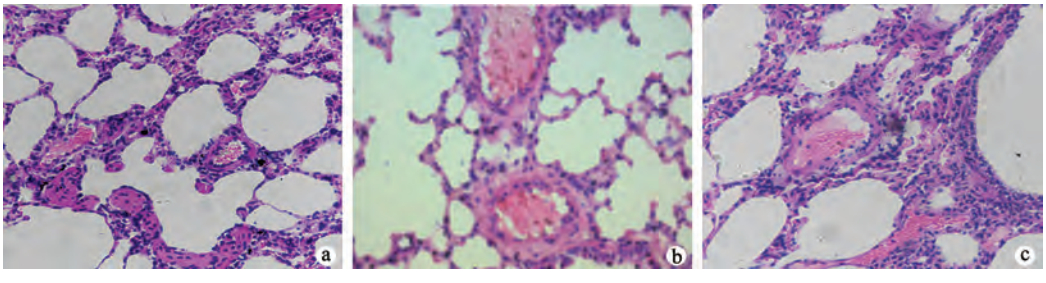
2 结果

2.1 动物一般情况观察

造模后,模型组及 eNos 治疗组小鼠毛发灰暗无光泽,呼吸急促,活动明显减少,饮食下降,体质量明显减轻。转基因治疗后,eNos 治疗组小鼠一般症状逐渐改善,活动良好,毛发有光泽,食欲及体质量也逐渐增加。对照组小鼠治疗前后一般症状没有变化。

2.2 各组小鼠右心肥大指数、mPAP 及肺小血管结构变化

与对照组小鼠相比,模型组小鼠的右心室肥大指数及 mPAP 明显较高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组小鼠相比,eNos 治疗组小鼠经转基因治疗后右心室肥大指数及 mPAP 增高减轻,差异有统计学意义($P<0.05$);但与对照组小鼠相比,仍见右心室肥大指数及 mPAP 增高(表 1)。与对照组小鼠相比,模型组小鼠肺血管管壁 MT 增加,管腔狭窄;与模型组小鼠相比,eNos 治疗组小鼠的肺小血管管壁 MT 变薄,但仍然比对照组小鼠管壁厚(图 1)。



a:对照组;b:模型组;c:eNos 治疗组

图 1 各组小鼠肺血管形态改变(HE×400)

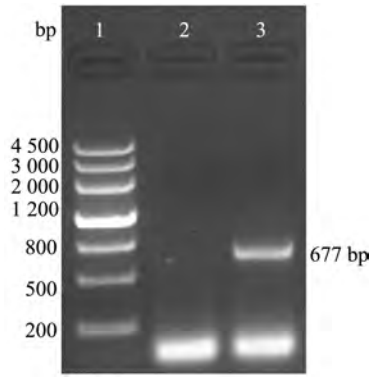
表 1 各组小鼠 RV/(LV+S)、mPAP、MT 变化($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

组别	RV/(LV+S)	mPAP(mmHg)	MT(μm)
对照组	0.21±0.04	16.4±2.3	8.6±1.6
模型组	0.44±0.03*	35.9±1.6*	28±1.3*
eNos 治疗组	0.33±0.04*#	26.8±2.6*#	20±1.87*#

*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$

2.3 RT-PCR 检测小鼠肺组织内 DsRed mRNA 的表达

转基因治疗后,eNos 治疗组小鼠在 677 bp 处有一条特异性条带,提示外源 DsRed 在肺组织有表达,由此说明外源 eNos 基因在肺组织成功表达。肺组织逆转录产物 RT-PCR 结果见图 2。

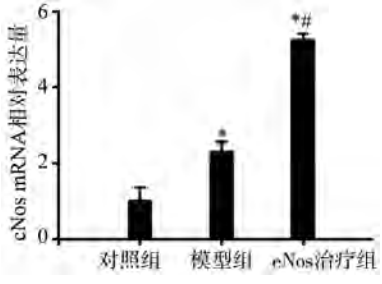


1:DNA Marker Ⅲ;2:模型组;3:eNos 治疗组

图 2 DsRed 基因在肺组织中的 RT-PCR 结果

2.4 Real-time PCR 检测小鼠肺组织内 eNos mRNA 的表达

转基因治疗后,模型组和 eNos 治疗组小鼠肺组织内 eNos mRNA 的表达均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);eNos 治疗组小鼠肺组织内 eNos mRNA 的量明显高于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)。Real-time PCR 结果见图 3。

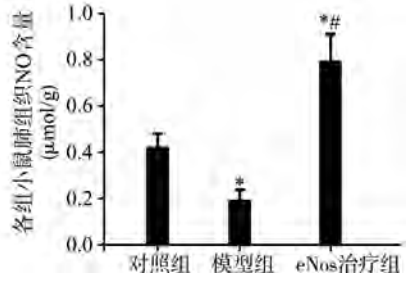


*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$

图 3 各组小鼠肺组织 eNos mRNA 量的变化

2.5 肺组织 NO 含量的检测结果

体内转染 3 d 后,用硝酸还原酶法检测各组小鼠肺组织 NO 含量。结果显示,与对照组小鼠相比,模型组小鼠的 NO 含量较低,差异有统计学意义($P<0.05$);与对照组和模型组相比,eNos 治疗组小鼠的 NO 含量均较高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。



*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.01$

图 4 各组小鼠肺组织 NO 含量的变化

3 讨论

PAH 是一组由多种病因引起的具有相似临床症状和病理改变的一类疾病。发生 PAH 时因肺循环阻力增加,右心负荷增大,常常导致右心衰发生。目前研究 PAH 动物模型的方法有野百合碱注射法、外科手术法、慢性低氧诱导等,前两种方法都有一定的限制,因此本研究采用慢性低氧诱导法[11]。此模型的病理演变与临床上大多数继发性 PAH 的病理生理过程相似。该方法的原理是低氧刺激因子引起肺血管收缩、肺血管重塑、肺动脉中膜增厚、肺血管阻力增加,从而导致 PAH 和右心衰竭。本研究结果显示,模型组小鼠右心室肥大指数明显高于对照组,肺小动脉管壁增厚,平均肺动脉升高,表明慢性低氧能引起小鼠肺血管重构及右心肥大,动物造模成功。

PEI 是一种新型的阳离子多聚物基因释放载体,能够介导寡核苷酸和质粒 DNA 进行体内、外转染[12]。PEI 价格便宜、细胞毒性低,但其转染效率不低于各种商品化的转染试剂,且不需要在溶酶体或吞噬泡的情况下进行转染,也不影响外源基因转染细胞或在细胞蛋白表达的效率[13]。影响 PEI 体内转染效率最重要的参数是 PEI/DNA 复合物的 N/P 比值,N 代表 PEI 中氮的量,P 代表 DNA 中磷酸酯的量,当 N/P 的比值约等于 9 时,转染效率最高。因此,本研究中的 PEI/DNA 复合物的 N/P 比值采用 9,并通过静脉转染,结果显示可在小鼠肺组织检测到外源目的基因的表达。但由于静脉全身给药,PEI/DNA 复合物通过血液循环到达全身的静脉血管,致使其复合物停留在肺组织的量减少,因此可通过多次注射及加大注射质粒的总量,在一定程度上改善目的基因在肺组织的表达效率低这一问题。由于目的基因 eNos 在正常肺组织有表达,本研究中的 pBudCE4.1-eNos-DsRed 真核表达载体是在目的基因 eNos 去终止密码子后加上了去起始密码子的 DsRed 荧光标记基因,因此,通过 RT-PCR 方法检测 DsRed 荧光标记基因的表达可以间接反映外源目的基因 eNos 的表达情况[14]。本研究 RT-PCR 结果表明,基因转染后,eNOS 治疗组有 DsRed 的表达,因此,经 PEI 介导外源目的基因进行体内转染肺组织的方法是可行的。

eNos 可在多种细胞中表达,其包括 3 种亚型,分别是神经元型 nNos、诱导型 iNos 及内皮型 eNos[15]。eNos 是血管内皮中生成 NO 的唯一限速酶。正常情况下,在血管内皮中,L-精氨酸和分子氧在 eNos 的催化

作用下生成 NO 和胍氨酸。NO 以旁分泌的方式激活血管平滑肌纤维鸟苷酸环化酶,生成 CGMP,在调节肺血管稳态方面发挥着重要作用[16-19]。但在某些病理情况下,如高血压、动脉粥样硬化、充血性心力衰竭及糖尿病等,患者 eNos 功能出现障碍,不再生成 NO,造成 NO 生物利用度降低及氧化应激增加,导致或加重内皮功能障碍[20]。NO 的合成受内皮中 eNos 的表达及其活性调节,慢性低氧时 NO 合成与释放减少,可进一步导致 PAH 的形成[21]。有研究表明,慢性低氧性 PAH 的发病率与 NO 生物合成障碍有关,其可能的机制为 eNos/NO 体系功能障碍,其中 eNos 缺陷是内源性 NO 代谢障碍及 NO 生成不足的主要原因[22-23]。因此,本研究通过 eNos 转基因技术来增加内源性 NO 产量,以达到有效缓解慢性低氧性 PAH 的病理过程。本研究结果显示,转基因治疗后,eNOS 治疗组小鼠右心室肥厚及肺小动脉管壁增厚减轻,且 NO 的表达量增加,其可能机制为通过外源 eNos 基因转染重建了 eNos/NO 系统功能,使内源性 NO 合成增加,通过 NO-cGMP 信号转导通路调节肺血管张力以及肺血管重构,从而达到缓解慢性低氧性 PAH 病理过程的效应。

综上所述,由 PEI 介导的 eNos 转基因治疗对慢性低氧性 PAH 有一定的缓解,能够改善右心肥厚及肺小动脉管壁增厚的病理症状,可能是由于内源性 NO 合成增加的作用,但是进一步的作用机制还需深入研究。

[参考文献]

[1] 王利婷,荆志成. 肺动脉高压治疗药物研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2017,44(2):127 - 132. doi:10.13220/j.cnki.jipr.2017.02.008.

[2] 许蜀闽,郑绿珍,刘福玉,等. 牛磺酸抗缺氧及防治肺动脉高压的研究及其细胞机制初探[J]. 局解手术学杂志,2006,15(5):295 - 297. doi:10.3969/j.issn.1672 - 5042.2006.05.004.

[3] 樊士勇,周辛波,钟 武. 新作用机制肺动脉高压靶向治疗药物研究进展[J]. 临床药物治疗杂志,2018,16(2):1 - 4. doi:10.3969/j.issn.1672 - 3384.2018.02.001.

[4] Abe K,Toba M,Alzoubi A,et al. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension[J]. Circulation,2010,121(25):2747 - 2754. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.927681.

[5] 刘 芸,王立波. 鼻腔 NO 检测在儿童呼吸系统疾病中的应用价值[J]. 中国循证儿科杂志,2019,14(3):236 - 239. doi:10.3969/j.issn.1673 - 5501.2019.03.015.

[6] Archer SL,Weir EK,Wilkins MR. Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experimental therapies[J]. Circulation,2010,121(18):2045 - 2066. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.847707.

[7] 尹成一,赵 丹,张湘燕. 慢性间歇性低氧诱导细胞凋亡的机制及研究进展[J]. 贵州医药,2019,43(3):372 - 374. doi:10.3969/j.issn.1000 - 744X.2019.03.012.

[8] 袁 莹,宋艳辉. 新生儿肺动脉高压与 eNOs 之间关系研究的最新进展[J]. 医药前沿,2017,7(7):5 - 6. doi:10.3969/j.issn.2095 - 1752.2017.07.001.

[9] Cooney R,Hynes SO,Duffy AM,et al. Adenoviral-mediated gene transfer of nitric oxide synthase isoforms and vascular cell proliferation[J]. J Vascul Res,2006,43(5):462 - 472. doi:10.1159/000095163.

[10] Ito T,Ozawa K,Shimada K. Current drug targets and future therapy of pulmonary arterial hypertension[J]. Curr Med Chem,2007,14(6):719 - 733. doi:10.2174/092986707780059562.

[11] 肖诗亮,高思海,杨辰垣. 常压缺氧性大鼠肺动脉高压模型的改进[J]. 临床心血管病杂志,2001,17(4):190. doi:10.3969/j.issn.1001 - 1439.2001.04.024.

[12] 鄂 晓,游庆霞,陈 效,等. 泊洛沙姆 188 修饰聚乙烯亚胺作为基因载体的体外评价[J]. 医药导报,2019,38(2):238 - 243. doi:10.3870/j.issn.1004 - 0781.2019.02.022.

[13] 张 敏,邬军文,姚 昀,等. 聚乙烯亚胺及其配位聚合物凝胶在基因载体中的应用[J]. 药学服务与研究,2017,17(6):411 - 414. doi:10.5428/pcar20170604.

[14] 高福兰,齐家龙,舒聪妍,等. 序列优化的小鼠 IL-33 基因在哺乳动物细胞中的有效分泌表达[J]. 中国生物工程杂志,2019,39(3):46 - 55. doi:10.13523/j.cb.20190307.

[15] Michelakis ED. The role of the NO axis and its therapeutic implications in pulmonary arterial hypertension[J]. Heart Fail Rev,2003,8(1):5 - 21. doi:10.1023/a:1022150819223.

[16] Yetik-Anacak G,Catravas JD. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease[J]. Vascul Pharmacol,2006,45(5):268 - 276. doi:10.1016/j.vph.2006.08.002.

[17] Mccarthy H,Coulter J,Robson T,et al. Gene therapy via inducible nitric oxide synthase: a tool for the treatment of a diverse range of pathological conditions[J]. J Pharmacy Pharmacol,2010,60(8):999 - 1017. doi:10.1211/jpp.60.8.0007.

[18] Cooney R,Hynes SO,Sharif F,et al. Effect of gene delivery of NOS isoforms on intimal hyperplasia and endothelial regeneration after balloon injury[J]. Gene Therapy,2007,14(5):396 - 404. doi:10.1038/sj.gt.3302882.

[19] Gunnett CA. Mechanisms of inducible nitric oxide synthase-mediated vascular dysfunction[J]. Arterioscler Thrombo Vasc,2005,25(8):1617 - 1622. doi:10.1161/01.ATV.0000172626.00296.ba.

[20] 时敏敏,孟 强,张正军,等. 促甲状腺激素对人微血管内皮细胞一氧化氮合酶的影响及其机制研究[J]. 中国医师杂志,2018,20(1):64 - 66. doi:10.3760/cma.j.issn.1008 - 1372.2018.01.016.

[21] 王 丽,汪 佩,李岩鹏,等. 17β-雌二醇和 2-甲氧基雌二醇对慢性低氧性肺动脉高压大鼠体内内皮素-1/一氧化氮体系的影响[J]. 中国循环杂志,2016,31(5):489 - 494. doi:10.3969/j.issn.1000 - 3614.2016.05.017.

[22] Cooney R,Hynes SO,Duffy AM,et al. Adenoviral-mediated gene transfer of nitric oxide synthase isoforms and vascular cell proliferation[J]. J Vascul Res,2006,43(5):462 - 472. doi:10.1159/000095163.

[23] 叶 楠,龚 辉,王 昕. 长链非编码 RNA Beta2.7 通过上调 eNOS/NO 通路影响内皮细胞功能[J]. 复旦学报(医学版),2019,46(4):459 - 465. doi:10.3969/j.issn.1672 - 8467.2019.04.005.

(编辑:杨 颖)