

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.11.001

• 基础研究 •

eNOS 基因治疗促进大鼠缺血后肢的血管新生*

宋礼坡 郭连瑞 张 建 谷涌泉 王春梅 吴英锋 罗 涛 崔世军 李建新 汪忠镐

(首都医科大学宣武医院血管外科,首都医科大学血管外科研究所 北京 100053)

摘要 目的:评估内皮型一氧化氮合酶(Endothelial nitric oxide synthase, eNOS)基因治疗对大鼠缺血后肢血管新生的影响。**方法:**局麻下将 30 只雄性 SD 大鼠后肢缺血模型制作后,随机分成实验组和对照组,每组 15 只。模型制作后 1 周,采用肌肉注射的方法,实验组缺血后肢接受载有 eNOS 基因的 5 型重组腺病毒治疗,对照组接受生理盐水治疗。eNOS 基因治疗后 4 周,评估 SD 大鼠踝部动脉压、微循环灌注、数字减影血管造影、组织微血管计数以及 eNOS 蛋白的表达。**结果:**eNOS 基因治疗后 4 周,和对照组相比,接受 eNOS 基因治疗的大鼠缺血肢体,表现了更好的血流恢复(踝部动脉压(mmHg): 58.2 ± 4.7 vs 86.8 ± 4.3 , $P < 0.01$;微循环灌注: $142.0\% \pm 21.5\%$ vs $219.6\% \pm 26.2\%$, $P < 0.01$)、侧枝开放和血管新生(血管造影: 6.7 ± 1.1 vs 14.4 ± 1.7 , $P < 0.01$;微血管/肌纤维比值: 0.34 ± 0.03 vs 0.56 ± 0.02 , $P < 0.01$)以及 eNOS 蛋白的高表达(0.46 ± 0.02 vs 0.73 ± 0.02 , $P < 0.01$)。**结论:**eNOS 基因治疗促进 SD 大鼠缺血后肢的血管新生。

关键词:内皮型一氧化氮合酶;基因治疗;严重肢体缺血;血管新生

中图分类号:R-33;Q813;R654.4;R456 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)11-2001-05

eNOS Gene Therapy Enhance Neovascularization in Rat Ischemic Hindlimb*

SONG Li-po, GUO Lian-rui, ZHANG Jian, GU Yong-quan, WANG Chun-mei,

WU Ying-feng, LUO Tao, CUI Shi-jun, LI Jian-xin, WANG Zhong-gao

(Department of Vascular Surgery, Xuanwu Hospital, and Institute of Vascular Surgery,

Capital Medical University, Beijing, 100053, China)

ABSTRACT Objective: This study was to evaluate the effect of eNOS gene therapy on neovascularization in ischemic hindlimb of SD rat. **Methods:** Thirty ischemic hindlimb models of male SD rats were made under anesthesia. They were randomly divided into experiment and control group. Each group had 15 rats. One week later, experiment group received eNOS gene therapy and control group received normal saline therapy. Neovascularization in ischemic hindlimb was evaluated 4 weeks post gene therapy. Assessment of ischemic hindlimbs included ankle artery pressure, microcirculation perfusion, digital subtraction arteriography, histological capillary count, and eNOS protein expression. **Results:** Compared with control group, ischemic hindlimbs which received eNOS gene therapy showed better blood recovery(ankle artery pressure (mmHg): 58.2 ± 4.7 vs 86.8 ± 4.3 , $P < 0.01$; tissue microcirculation perfusion: $142.0\% \pm 21.5\%$ vs $219.6\% \pm 26.2\%$, $P < 0.01$), lateral branch opening and angiogenesis (digital subtraction arteriography: 6.7 ± 1.1 vs 14.4 ± 1.7 , $P < 0.01$; capillary/muscle fibers ratio: 0.34 ± 0.03 vs 0.56 ± 0.02 , $P < 0.01$), and higher eNOS expression (0.46 ± 0.02 vs 0.73 ± 0.02 , $P < 0.01$). **Conclusions:** eNOS gene therapy can enhance neovascularization in ischemic hindlimb of SD rat.

Key words: Endothelial nitric oxide synthase; Gene therapy; Critical limb ischemia; Neovascularization

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q813; R654.4; R456 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)11-2001-05

前言

重度肢体缺血(Critical Limb Ischemia, CLI)是外周血管疾病(Peripheral arterial disease, PAD)发展的不良表现阶段,临床表现以静息痛和或组织溃疡、坏死最终导致肢体缺失^[1]。临床治疗困难,有些病人的远端流出道或流入道相当差,再加上一些严重合并症,不适合行外科血管重建或腔内血管成形术,而药物保守治疗又不能从根本上解决缺血。随着基因研究的不断深

入,基因治疗作为一个相对新的治疗措施不断的应用到缺血性血管疾病领域,为这些 CLI 的无治疗选择病人(“no-option” patients)提供了一个治疗机会^[2]。大量的研究和动物实验证实:内皮型一氧化氮合酶 - 一氧化氮通路(eNOS-NO pathway)在血管形成(Angiogenesis)、血管发生(Vasculogenesis)、侧枝循环开放以及调节动脉硬化相关内皮功能衰老等方面起着非常关键的作用^[3-5],本研究通过对 SD 大鼠缺血后肢移植携带有 eNOS 基因的重组腺病毒载体,观察 eNOS 基因治疗对大鼠缺血后肢血

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(30471708)

作者简介:宋礼坡,主治医师,外科学博士,主要从事周围血管疾病的临床和基础研究,严重下肢缺血的再生医学治疗、血管组织工程和转化医学研究,电话:13269320601, E-mail: drliposong@126.com

(收稿日期:2017-11-02 接受日期:2017-12-01)

管新生和血运的影响,为临床应用基因治疗慢性严重下肢缺血提供一定的依据。

1 方法

1.1 后肢缺血模型制作

SD 大鼠,30 只,雄性,体重 180 g~200 g,由北京维通利华实验动物有限公司提供。随机分为 2 组,每组 15 只。所有 SD 大鼠采用 10 %水和氯醛腹腔内注射麻醉(0.3 mL/100 g)成功后,仰卧位固定于手术台上,常规备皮(双侧腹股沟至膝上),消毒,铺无菌巾,暴露手术区域,沿股动脉走向纵行切开皮肤,分离皮下脂肪及筋膜直至股动脉鞘,小心分离股动脉,股总动脉近端用动脉夹夹闭,分别结扎、切断股总动脉近端、股深动脉起始部、股浅动脉膝上处,切除结扎线之间的动脉以及结扎、切断附近的所有属支,确定无活动性出血后,关闭切口,缝合皮下组织及皮肤。(本研究两组动物均制作为左侧后肢缺血模型)。

1.2 eNOS 基因治疗

本研究委托北京五加和公司制作 Ad5-eNOS 重组腺病毒,滴度为 4.67×10^{11} pfu/mL。在缺血模型制作完成后 1 周进行基因治疗。用 1 mL 生理盐水将 1 mL Ad5-eNOS 重组腺病毒稀释

一倍,在实验组大鼠缺血后肢,采用肌肉注射方法在切除股动脉的部位沿手术切口两侧分 10 个注射点注入。对照组大鼠采用同样方法接受 2 mL 生理盐水治疗。

1.3 SD 大鼠缺血后肢的血运和血管新生评估

1.3.1 后肢踝部动脉压和微循环灌注测定 eNOS 基因治疗后 4 周,应用 PeriFlux System 5000(Perimed 公司,瑞典)对所有试验对象行踝部动脉压测量。SD 大鼠采用 10 %水和氯醛腹腔内注射麻醉(0.3 mL/100 g)成功后仰卧位固定,将 3 cm 袖带置于踝上方 2 cm 处,激光探头置于肢体末端,探测血流信号,当显示屏上出现激光多普勒信号的首次转折上升时(即 phase I),此转折点(图 1)(该结果由 PeriFlux System 5000 自动分析)被认为是该踝部动脉收缩压;连续测量三次取平均值作为最后统计值。

肢体末梢皮肤微循环灌注量(PU)的检测,若单纯用 PU 绝对数值作为指标,由于受测量时的基线数值、机器和人为因素等影响,各受检对象之间的测量结果会产生一定的误差,所以我们采用缺血肢体加热前和加热后的微循环灌注量随温度变化的百分比(Δ PU%)来反映微循环情况。即 Δ PU%=($P_{t2}-P_{t1}$)/ P_{t1} (该结果由 PeriFlux System 5000 自动分析完成)(图 2)。

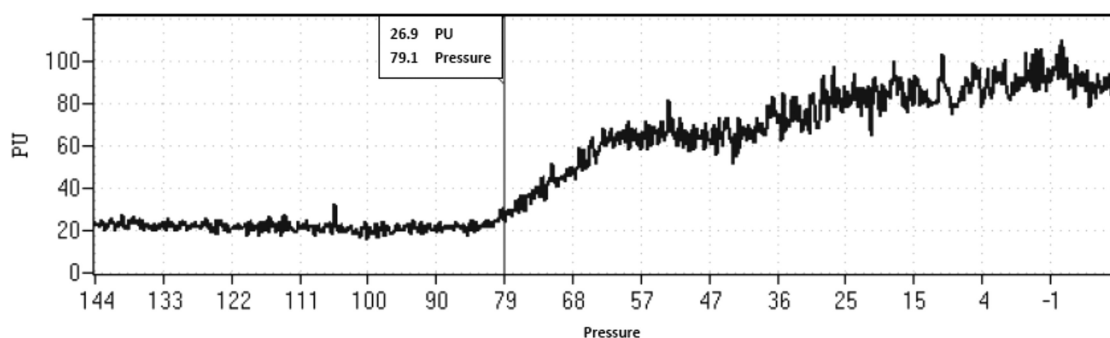


图 1 PeriFlux System 5000 自动分析踝部动脉收缩压

Fig.1 PeriFlux System 5000 automatic analysis of ankle artery pressure

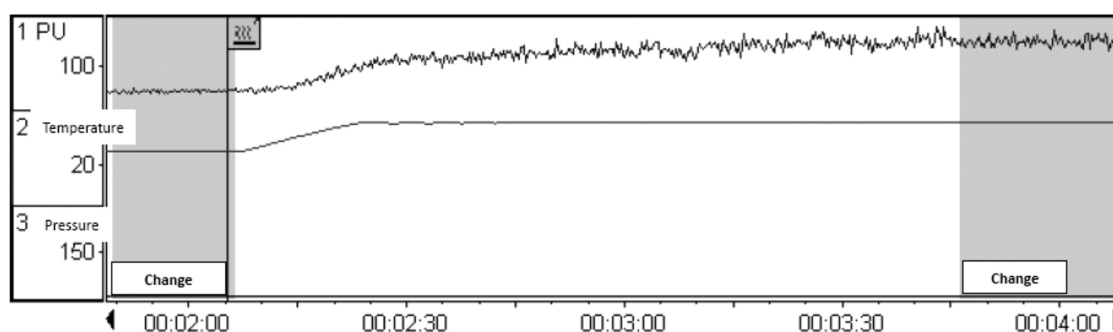


图 2 PeriFlux System 5000 自动分析微循环灌注量随温度变化的百分比

Fig.2 PeriFlux System 5000 automatic analysis of microcirculation perfusion(Δ percent) according to temperature change

1.3.2 数字减影血管造影(Digital Subtraction Angiography, DSA) eNOS 基因治疗后 4 周,所有动物完成后肢踝部动脉压和微循环灌注评估后,接受动脉造影,麻醉成功后,仰卧位于造影台,沿前正中线依次切开腹壁各层,将腹腔脏器翻至一侧,切开后腹膜,小心分离出腹主动脉,用套管针刺入腹主动脉,向前推送套管针至腹主动脉末端,然后在透视下,定好位;撤掉其中套针,观察到套管内返血良好,数字减影模式下,以 0.5 mL/s

的速度注入造影剂(碘海醇)总量约 3 mL 同时行双侧后肢动脉造影。并通过图像回放分析,将每侧肢体造影图像放大到相同的倍数,取股骨中上 1/3 点,向股骨做垂直线,计数跨过该垂直线上的血管数目。

1.3.3 后肢缺血组织微血管计数 所有动物造影完毕后处死,沿原手术切口切取内收肌群肌肉组织,重量约为 15~20 g,然后所有组织标本立即用 10 %甲醛固定。石蜡切片 HE 染色(苏木

素-伊红染色)。微血管计数:为避免肌肉组织水肿、组织萎缩等其他因素的影响,我们用肌纤维来校正微血管数目,即采用微血管数/肌纤维数比值来反映肢体组织微血管数目。(由CMIS2020病理图文分析系统自动分析)。

1.3.4 后肢缺血组织 eNOS 含量检测 Western Blot 方法进行后肢缺血组织 eNOS 含量检测实验步骤:(1)肌组织匀浆:将一小块肌组织放在 10 mM Tris-HCl 缓冲液(pH7.4)里进行组织溶解(注意在冰块上操作,防止蛋白降解)。4℃下,组织匀浆液在 $1500 \times g$ 离心 20 min,去除不溶解的杂质。(2)用 Bradford 法测量加样的蛋白浓度,以达到最佳上样蛋白量。(3)在 8% SDS-PAGE 凝胶上电泳,根据蛋白 Marker 的指示来确定电泳时间的长短。(4)转移蛋白:在 48℃,400 mA 条件下将蛋白转移到 PVDF 膜上。(5)封闭:48℃下,用 Blotto(成分:5%脱脂牛奶,TBS,0.1% Tween, pH 7.6)进行膜封闭,过夜。(6)一抗(Rabbit anti-eNOS polyclonal antibody, Abcam, 英国)反应:室温下,和一抗(抗 eNOS 1:1000)反应 2 小时。(7)用 Blotto 冲洗膜 3 次。(8)二抗(Goat polyclonal to rabbit IgG, Abcam, 英国)反应:加辣根过氧化物酶交联的二抗(1:3000)反应 1 小时。(9)用增强的化学发光法探测蛋白免疫反应,并曝光在 X 线片上。

用 ImageJ 软件自动分析蛋白质电泳各泳道条带的累积光密度值(Integrated Density)来反映 eNOS 的表达量, β -actin 作为内参,并将 eNOS 和 β -actin 两者的累积光密度值相比,来校正

蛋白加样量的误差。计算公式:累积光密度值(Integrated Density)=总面积(Area) $\times$ 平均灰度值(Mean Gray Value)(由 ImageJ 软件自动分析计算)。

1.4 统计分析

连续变量统计指标表达为平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),对两组资料进行正态性检验和方差齐性检验,满足正态分布和方差齐性,两组之间比较采用独立样本 t 检验; $P < 0.05$ 认为具有显著统计学差异。所有统计分析采用 SPSS 统计分析软件(16.0 版本,美国)。

2 结果

2.1 大鼠后肢踝部动脉压、微循环灌注测量结果

大鼠后肢踝部动脉压(mmHg)结果:对照组为 58.2 ± 4.7 ,实验组(基因治疗组)为 86.8 ± 4.3 ,($P=0.003$)。

大鼠后肢微循环灌注(增加百分比)结果:对照组为 $142.0\% \pm 21.5\%$,实验组(基因治疗组)为 $219.6\% \pm 26.2\%$,($P=0.006$)。

2.2 大鼠后肢数字减影血管造影

本研究两组动物均制作左侧后肢缺血模型(图中白色直线为后肢动脉结扎和切断部位),DSA 下两组左侧缺血后肢侧枝开放和新生血管数目,对照组为 6.7 ± 1.1 ,实验组(基因治疗组)为 14.4 ± 1.7 ,($P < 0.001$),见下图造影图片。



图 3 对照组

Fig. 3 Control group

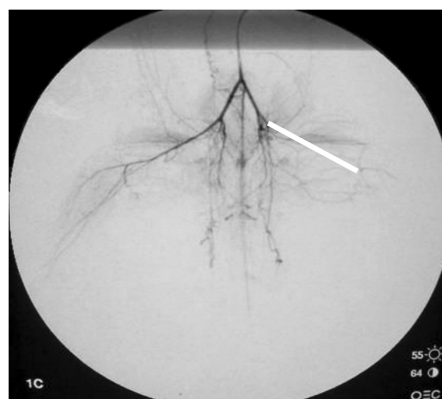


图 4 实验组

Fig. 4 Experiment group

2.3 微血管计数

采用微血管数/肌纤维数比值来反映肢体组织微血管数目。(由 CMIS2020 病理图文分析系统自动分析产生)对照组为 0.34 ± 0.03 ,基因治疗组为 0.56 ± 0.02 ,($P < 0.001$)。

2.4 eNOS 蛋白表达结果

用 ImageJ 软件自动分析蛋白质电泳各泳道条带的累积光密度值:对照组为 0.46 ± 0.02 ,基因治疗组为 0.73 ± 0.02 ,($P=0.001$)。

3 讨论

3.1 基因治疗在下肢动脉硬化闭塞症无治疗选择的重度肢体缺血患者治疗中的作用

CLI 在 PAD 人群中发病率约为 11%,而在年龄超过 70 岁的 PAD 患者中发病率约占 20%,死亡率高,预后差^[2]。基于血

管新生的基因治疗为这类无治疗选择患者提供了一个治疗方法,通过移植促进血管新生的相关细胞因子基因来促使缺血组织生成大量新生血管,改善那些终末期肢体缺血的无选择病人缺血组织的血供从而达到改善或缓解临床症状、甚至避免截肢(或者降低截肢平面)等目的^[2,6]。

多个动物实验和临床研究证实了基因治疗的有效性和安全性^[2,6-12]。Deev 等^[7]将编码有 VEGF 基因的重组质粒通过肌注方法注入严重间歇性跛行患者的缺血肢体,患者治疗后 6 个月,1 年,2 年的无痛行走距离分别提高 110.4%,167.2%,和 190.8%。Matsumoto 等^[8]用编码有人成纤维细胞生长因子(human fibroblast growth factor-2,hFGF-2)基因的重组 Sendai 病毒载体治疗严重肢体缺血患者,结果显示能够显著改善患者的生活质量(包括躯体活动能力,躯体角色功能,肢体疼痛,生活活力等)。Kitrou 等^[9]总结了目前已经应用在临床治疗缺血性血管

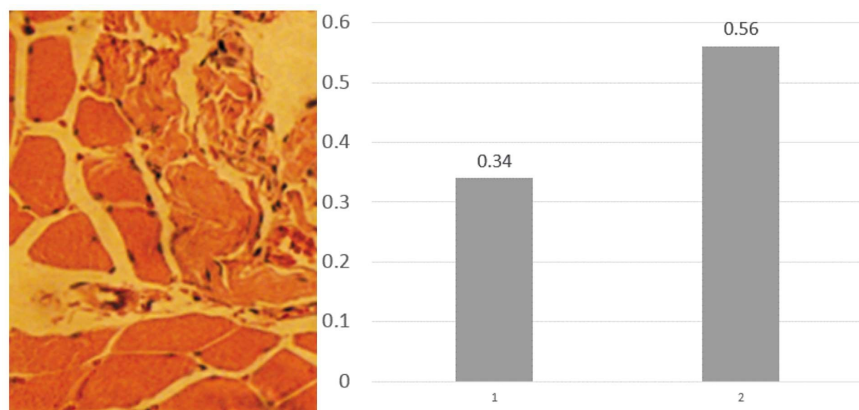
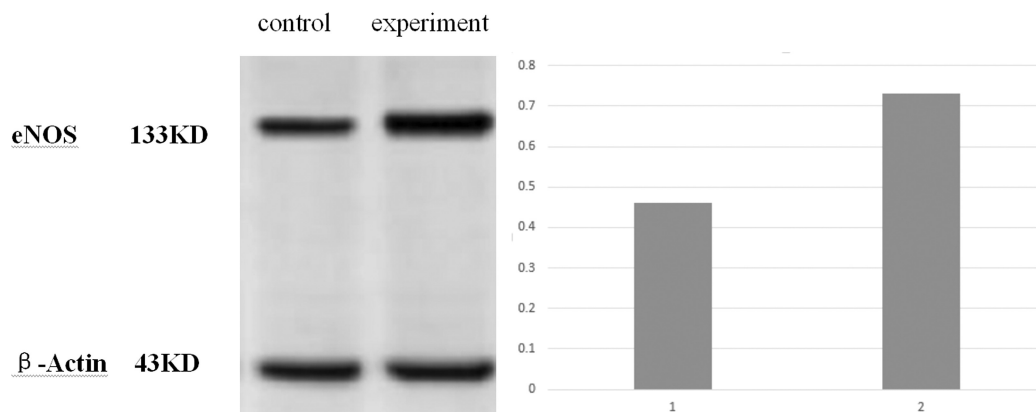
图 5 缺血组织 HE 染色($\times 200$) 和统计结果Fig. 5 HE staining of ischemic tissue($\times 200$) and statistical results

图 6 Western Blot:左侧是对照组,右侧是实验组

Fig. 6 Western Blot: Left is control group and right is experiment group

疾病领域的细胞因子基因:包括血管内皮生长因子、肝细胞生长因子、成纤维细胞生长因子、低氧诱导因子-1、基质衍生因子-1(又叫 CXCL12)等。我们的研究初步发现移植 eNOS 基因,可以促进 SD 大鼠缺血后肢的 eNOS 表达和血管新生(和对照组相比,基因治疗组明显增加侧枝开放和微血管新生),进而改善缺血后肢血运(和对照组相比,基因治疗组明显增加踝部动脉压和微循环灌注),证实了增加 eNOS 基因表达可促进血管新生的有效性,所以为将来应用基因治疗缺血性血管疾病(冠心病、脑卒中、下肢慢性缺血等)提供一定的研究基础,即有可能将其作为可干预的靶基因进行调控。

3.2 基因治疗载体的选择

在我们这个研究中选择 5 型腺病毒作为 eNOS 基因载体进行治疗。外源基因输送系统主要分为三类:物理导入载体、重组病毒载体和合成非病毒载体。每种载体系统均有优点和不足,其中病毒载体具有输送效率高、靶向性好的特点^[13-15],常用的载体病毒有单纯疱疹病毒,腺病毒,牛痘病毒,辛德毕斯病毒等,该方法具有转染效率高、能够持续稳定表达外源基因的特点,且实施方便,在体内外均能有有效的转染^[16]。腺病毒作为基因治疗载体已经应用在临床治疗,显示其作为基因载体的治疗安全性^[17,18]。我们的研究选择 5 型腺病毒作为基因的载体,输注到缺血组织后,能够明显的促进血管新生和改善缺血后肢血运,也证明了该基因载体的高效率和有效性。我们这项研究为将来进一步探索基因治疗和基因转染干细胞的相关研究提供了一

个参考和积累了一定经验。

3.3 eNOS-NO 通路在血管新生中的作用及其临床应用前景

我们的研究选择 eNOS 基因作为干预靶点,是因为 eNOS 基因及其下游 NO 信号通路在组织缺血后血管新生、动脉硬化、血管内皮老化功能减低等多个病理生理过程中起着非常关键的作用。大量的研究证实:动脉内皮细胞老化和内皮功能障碍是动脉硬化、钙化和继发血栓形成进而导致组织缺血的一个重要的病理生理机制^[19-21],eNOS-NO 通路在组织缺血后血管新生、动脉硬化、血管内皮老化功能减低等多个病理生理过程中起着非常关键的作用^[3-5,22-24]。因此,受损的 eNOS-NO 代谢通路是参与外周动脉闭塞性疾病发展的一个重要因素之一,从而使 eNOS 作为动脉硬化和内皮功能障碍相关的缺血性血管疾病(比如冠心病、缺血性卒中、下肢动脉硬化闭塞症等)预防策略和治疗策略中的一个非常重要的干预靶点^[25-28]。恢复病变动脉 NO 到正常水平将是一个非常重要的治疗措施,这可以通过补充外源性 NO 或其他治疗措施(比如增强 eNOS 生物活性、增加 eNOS 基因表达、增加 NO 合成或其信使的合成或降低它们的分解)来实现。

我们的研究从增加 eNOS 基因表达出发,通过将携带有 eNOS 基因的病毒载体注入到缺血组织,促进其合成,进而发挥促进血管新生(和对照组相比,基因治疗组明显增加侧枝开放和微血管新生)和改善缺血组织血运(和对照组相比,基因治疗组明显增加踝部动脉压和微循环灌注)的作用。该研究为进一

步应用 eNOS 基因治疗缺血性血管疾病提供了研究基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Nehler MR, Duval S, Diao L, et al. Epidemiology of peripheral arterial disease and critical limb ischemia in an insured national population [J]. *J Vasc Surg*, 2014, 60(3): 686-695. e2
- [2] Kitrou P, Karnabatidis D, Brountzos E, et al. Gene-based therapies in patients with critical limb ischemia [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2017, 17(4): 449-456
- [3] Luque Contreras D, Vargas Robles H, Romo E, et al. The role of nitric oxide in the post-ischemic revascularization process [J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 112(2): 553-563
- [4] Qian J, Fulton D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium [J]. *Front Physiol*, 2013, 4: 347
- [5] Siragusa M, Fleming I. The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction[J]. *Pflugers Arch*, 2016, 468(7): 1125-1137
- [6] Miao YL, Wu W, Li BW, et al. Clinical effectiveness of gene therapy on critical limb ischemia: a meta-analysis of 5 randomized controlled clinical trials[J]. *Vasc Endovascular Surg*, 2014, 48(5-6): 372-377
- [7] Deev RV, Bozo IY, Mzhavanadze ND, et al. pCMV-vegfl65 Intramuscular Gene Transfer is an Effective Method of Treatment for Patients With Chronic Lower Limb Ischemia [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2015, 20(5): 473-482
- [8] Matsumoto T, Tanaka M, Yoshiya K, et al. Improved quality of life in patients with no-option critical limb ischemia undergoing gene therapy with DVC1-0101[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30035
- [9] Grossman PM, Mohler ER 3rd, Roessler BJ, et al. Phase I study of multi-gene cell therapy in patients with peripheral artery disease[J]. *Vasc Med*, 2016, 21(1): 21-32
- [10] Rong SL, Wang XL, Zhang CY, et al. Transplantation of HGF gene-engineered skeletal myoblasts improve infarction recovery in a rat myocardial ischemia model[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0175807
- [11] Chung ES, Miller L, Patel AN, et al. Changes in ventricular remodelling and clinical status during the year following a single administration of stromal cell-derived factor-1 non-viral gene therapy in chronic ischaemic heart failure patients: the STOP-HF randomized Phase II trial[J]. *Eur Heart J*, 2015, 36(33): 2228-2238
- [12] Melina R Kibbe AY, Rajiv Parakh, Farrell O Mendelsohn, et. al. Abstract 19419: A Phase IIa Randomized Double-Blind, Placebo Controlled Study to Evaluate Plasmid Stromal Cell-Derived Factor-1 for Treatment of Critical Limb Ischemia - The STOP-CLI Trial[J]. *Circulation*, 2014, 130(Suppl2 A19419)
- [13] 吕楠, 马柳青, 陈顺, 等. 基因治疗的输送屏障及输送载体的研究 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(1): 177-179
Lv Nan, Ma Liu-qing, Chen Shun, et al. Study on Gene Delivery Barriers and Vectors for Therapy[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2014, 14(1): 177-179
- [14] Oggu GS, Sasikumar S, Reddy N, et al. Gene Delivery Approaches for Mesenchymal Stem Cell Therapy: Strategies to Increase Efficiency and Specificity [J]. *Stem Cell Rev*, 2017 [Epub ahead of print]
- [15] Rathnam C, Chueng SD, Yang L, et al. Advanced Gene Manipulation Methods for Stem Cell Theranostics [J]. *Theranostics*, 2017, 7(11): 2775-2793
- [16] 王月丽, 魏继楼, 程红蕾, 等. 外源基因转染细胞技术的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(7): 1382-1384
Wang Yue-li, Wei Ji-lou, Cheng Hong-lei, et al. Advances in Technology of Heterologous Genes Transfecting Cells[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2014, 14(7): 1382-1384
- [17] Bobek V, Taltynov O, Pinterova D, et al. Gene therapy of the ischemic lower limb--Therapeutic angiogenesis [J]. *Vascular pharmacology*, 2006, 44(6): 395-405
- [18] Baumgartner I, Chronos N, Comerota A, et al. Local gene transfer and expression following intramuscular administration of FGF-1 plasmid DNA in patients with critical limb ischemia [J]. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2009, 17(5): 914-921
- [19] Sepúlveda C, Palomo I, Fuentes E. Mechanisms of endothelial dysfunction during aging: Predisposition to thrombosis [J]. *Mech Ageing Dev*, 2017, 164: 91-99
- [20] Tesaro M, Mauriello A, Rovella V, et al. Arterial ageing: from endothelial dysfunction to vascular calcification [J]. *J Intern Med*, 2017, 281(5): 471-482
- [21] Shi Y, Vanhoutte PM. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes[J]. *J Diabetes*, 2017, 9(5): 434-449
- [22] Jones Buie JN, Oates JC. Role of interferon alpha in endothelial dysfunction: insights into endothelial nitric oxide synthase-related mechanisms[J]. *Am J Med Sci*, 2014, 348(2): 168-175
- [23] Boopathy GTK, Kulkarni M, Ho SY, et al. Cavin-2 regulates the activity and stability of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) in angiogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(43): 17760-17776
- [24] Lee HY, Zeeshan HMA, Kim HR, et al. Nox4 regulates the eNOS uncoupling process in aging endothelial cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 113: 26-35
- [25] Rai H, Parveen F, Kumar S, et al. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with coronary artery disease: an updated meta-analysis and systematic review [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113363
- [26] Zhu J, Song W, Li L, et al. Endothelial nitric oxide synthase: a potential therapeutic target for cerebrovascular diseases[J]. *Mol Brain*, 2016, 9: 30
- [27] Kumar A, Misra S, Kumar P, et al. Association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of ischemic stroke: A meta-analysis[J]. *Neurol India*, 2017, 65(1): 22-34
- [28] Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms [J]. *Gene*, 2016, 575 (2 Pt 3): 584-599