

nNOS抑制剂亚胺基烯丁基-L-鸟氨酸对心肌缺血再灌注损伤的影响及机制

周 露, 李冰艳, 顾霞飞, 唐广胜*

南京医科大学 康达学院, 江苏 连云港 222000

摘要: 目的 探讨nNOS选择性抑制剂亚胺基烯丁基-L-鸟氨酸(L-VNIO)对心肌缺血再灌注(I/R)损伤的影响及机制。方法 构建SD大鼠离体心脏I/R模型和H9c2细胞缺氧/复氧(H/R)模型; nNOS抑制剂L-VNIO ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)持续给药整个再灌注或复氧过程。TTC染色测定心肌梗死面积; 流式细胞术检测H9c2细胞凋亡率; Fluo-3/AM Ca^{2+} 荧光探针通过流式细胞仪检测H9c2细胞内 Ca^{2+} 浓度; 试剂盒法测定离体心脏灌流液乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)水平以及H9c2细胞MDA水平和超氧化物歧化酶(SOD)活性; 离体心脏提取肌浆网, 试剂盒法检测肌浆网 Ca^{2+} -ATP酶(SERCA)活性, Western blotting检测肌浆网SERCA蛋白表达; Western blotting检测离体心脏中受磷蛋白(PLB)和兰尼碱受体2(RyR2)蛋白表达水平和磷酸化水平。**结果** 与I/R或H/R模型组相比, L-VNIO显著降低细胞凋亡率, 减少心肌梗死面积, 降低LDH、MDA水平, 提高SOD活性, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 此外, 与I/R或H/R模型组相比, L-VNIO组明显降低细胞内 Ca^{2+} 超载, 增高PLB磷酸化水平, 降低RyR2磷酸化水平, 增强SERCA活性($P < 0.05$)。**结论** nNOS抑制剂L-VNIO可以减轻I/R损伤, 机制与调节 Ca^{2+} 转运相关蛋白而降低I/R引起的 Ca^{2+} 超载相关。

关键词: 心肌缺血再灌注损伤; nNOS抑制剂; 亚胺基烯丁基-L-鸟氨酸; Ca^{2+} 超载; 肌浆网 Ca^{2+} -ATP酶(SERCA); 受磷蛋白(PLB); 兰尼碱受体

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)10-2159-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.10.012

Effect of nNOS inhibitor *N*-5-(1-imino-3-butenyl)-*L*-ornithine on myocardial ischemia-reperfusion injury and its mechanism

ZHOU Lu, LI Bingyan, GU Xiafei, TANG Guangsheng

Kangda College of Nanjing Medical University, Lianyungang 222000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of *N*-5-(1-imino-3-butenyl)-*L*-ornithine (L-VNIO), a selective inhibitor of nNOS, on myocardial I/R injury and its mechanism. **Methods** The ischemia/reperfusion (I/R) model of isolated hearts and the hypoxia/reoxygenation (H/R) model of H9C2 cells were established. The nNOS inhibitor L-VNIO was added throughout the reperfusion or reoxygenation process. Infarction size was measured by TTC staining. Cell apoptosis was measured by Annexin V-FITC staining with a flow cytometer. Intracellular concentration of Ca^{2+} was determined by Fluo-3/AM as a fluorescent signals using a flow cytometer. The levels of LDH, malondialdehyde (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD) were detected by the kit. Myocardial sarcoplasmic reticulum was isolated from refused rat hearts and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) activity was detected with a kit. The expression of SERCA, phospholamban (PLB), p-PLB, ryanodine receptor 2(RyR2) and p-RyR2 were detected by Western blotting. **Results** Compared with I/R or H/R model group, L-VNIO significantly decreased the rate of apoptosis, the size of myocardial infarction and the levels of LDH and MDA, while enhanced the activity of SOD ($P < 0.05$). In addition, L-VNIO significantly reduced intracellular Ca^{2+} overload, increased PLB phosphorylation, decreased RyR2 phosphorylation and enhanced SERCA activity compared with I/R or H/R group ($P < 0.05$). **Conclusion** The nNOS inhibitor L-VNIO can reduce I/R injury and reduce I/R-induced Ca^{2+} overload by regulating Ca^{2+} transport-related proteins.

Key words: myocardial ischemia-reperfusion injury; nNOS inhibitor; *N*-5-(1-imino-3-butenyl)-*L*-ornithine; Ca^{2+} overload; sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA); phospholamban (PLB); ryanodine receptor

收稿日期: 2023-07-13

基金项目: 南京医科大学科技发展基金(NMUB2020039)

第一作者: 周 露(1990—),女,江苏省邳州市,硕士研究生,讲师,研究方向为心血管药理学。E-mail: lu86366662@njmu.edu.cn

*通信作者: 唐广胜(1991—),男,江苏省连云港市,硕士研究生,讲师,研究方向为数字解剖。E-mail: tanggs @njmu.edu.cn

缺血性心脏病是临床常见病,在全世界范围内都有很高的发病率和病死率。目前,临床上对于缺血性心脏病的治疗方式是通过溶栓或经皮冠状动脉介入以恢复缺血区血供。然而,恢复缺血区血供会引起进一步的心肌损伤,主要表现为心肌细胞死亡、心律失常、心功能障碍,最终会导致心脏衰竭甚至死亡^[1]。由心肌缺血后恢复血供所引起的损伤,被称为缺血再灌注(I/R)损伤,据统计,急性心肌梗死死亡患者中,超过一半是由再灌注损伤引起的^[2-3]。遗憾的是,再灌注损伤至今尚无有效治疗方法。

NO是调节心功能重要的信号分子,内源性NO由一氧化氮合酶(NOS)合成,多项研究表明NOS参与多种心脏疾病的发生发展,如心力衰竭、心室重构、I/R损伤等^[4-6],因此NOS抑制剂被认为是一种潜在的治疗药物,亚胺基烯丁基-L-鸟氨酸[N-5-(1-imino-3-butenyl)-L-ornithine, L-VNIO]选择性抑制神经元型一氧化氮合酶(nNOS)的活性。nNOS在心肌细胞中主要分布于线粒体和肌浆网,参与心肌收缩舒张以及细胞内Ca²⁺稳态的调节^[7-8]。研究表明,在多种病理状态下,nNOS活性增高,并可以通过调控兰尼碱受体2(RyR2)、受磷蛋白(PLB)、肌浆网Ca²⁺-ATP酶2a(SERCA2a)等Ca²⁺转运相关蛋白调节细胞内Ca²⁺稳态^[8-9]。本研究探讨L-VNIO在I/R损伤中的作用,并基于Ca²⁺转运相关蛋白探究其机制,为临床治疗I/R损伤提供新思路 and 理论依据。

1 材料

1.1 实验动物和细胞株

清洁级雄性SD大鼠,体质量220~240 g,购自南京医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号SCXK(苏)2002-0031。本实验经南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准(批号IACUC-2202043)。

大鼠心肌细胞H9c2购自中国科学院上海细胞库,培养于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中。

1.2 实验试剂

L-VNIO购自瑞士Enzo Life Sciences公司,货号ALX-270-216-M005,质量分数≥95%;DMEM、胎牛血清购自美国Hyclone公司;Fluo-3/AM钙离子荧光探针购自美国Life Technologies公司;2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)购自美国Sigma公司;乳酸脱氢酶(LDH)和超微量Ca²⁺-ATPase活性检测试剂盒购于南京建成生物工程所;离子霉素(ionomycin)以及蛋白浓度(BCA法)、超氧化物歧化酶(SOD)和

丙二醛(MDA)检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;β-actin、SERCA2抗体购自美国Cell Signaling公司;RyR2抗体、p-RyR2抗体购自英国Abcam公司;PLB抗体、p-PLB抗体购自美国Santa Cruz公司。

1.3 实验仪器

缺氧装置,英国Don Whitley Scientific公司;LSM710激光共聚焦显微镜,德国ZEISS公司;Langendorff灌流设备,美国Radnoti公司;BioRad Benchmark Plus酶标仪,美国BioTek公司;Kodak Image Station 4000R凝胶成像系统,美国Kodak公司;FACSCAN®流式细胞仪,美国BD公司;Optima L-XP超速离心机,美国Beckman Coulter公司。

2 方法

2.1 动物分组及离体心脏I/R模型构建、给药

将SD大鼠随机分成3组:对照组、模型组、L-VNIO组。麻醉后的大鼠立即仰卧固定取出心脏,漂洗后迅速将心脏固定于Langendorff灌流系统上开始灌流,K-H灌流液体积流量为2.0~2.5 mL·min⁻¹。待平衡灌注20 min、心脏达稳定状态后,关闭蠕动泵停灌心脏,制作心肌缺血模型。心脏停灌30 min后,打开蠕动泵对心脏进行复灌120 min。nNOS特异性抑制剂L-VNIO(10 μmol·L⁻¹)^[10]于再灌注开始即溶于K-H灌流液中给予,持续整个再灌注过程。

2.2 心肌梗死面积测定

再灌注结束后,迅速取下大鼠心脏并置于-20℃中冰冻5 min。将冰冻后的心脏从心尖至心底横向切成约1.0 mm厚的薄片,浸入1%的TTC磷酸盐缓冲液中,于37℃孵育15 min。染色后的心脏薄片在10%福尔马林溶液中固定4 h,相机拍照后用图像分析软件Image Ro Plus 6.0测定左心室梗死区面积与全心面积,以梗死区面积/全心面积评估心肌梗死情况。

2.3 试剂盒法检测心脏灌流液中LDH、MDA浓度

离体心脏再灌注30 min时,收集灌流液进行心肌组织LDH、MDA浓度测定,按照检测试剂盒说明书步骤进行操作。

2.4 肌浆网SERCA活性测定

取再灌注结束后大鼠心脏,通过超速离心法提取肌浆网,BCA法测定蛋白浓度后,采用比色定磷法,按照试剂盒说明书操作步骤测定SERCA活性。

2.5 Western blotting法检测相关蛋白表达

取造模完成的心脏组织提取蛋白,BCA法进行

蛋白定量后加入 SDS 上样缓冲液, 99 °C 加热样品 5 min 后保存。取 50 μg 蛋白上样, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭, 依次加入一抗、二抗, 加发光液后在显影仪上显影, 使用 Image J 软件对条带进行灰度分析。

2.6 细胞分组及缺氧/复氧(H/R)模型构建

H9c2 细胞随机分为 3 组: 对照组、模型组、L-VNIO (10 μmol·L⁻¹)^[10] 组。用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养细胞, 待细胞长至 60% 左右时, 更换为含 1% 胎牛血清的 DMEM, 以使细胞生长“同步化”。将培养基更换为不含胎牛血清并经 100% N₂ 饱和处理的无糖 DMEM (pH 6.4) 后, 立即将细胞移入密封的缺氧罐中, 在 37 °C、100% N₂ 的缺氧环境中缺氧培养 3 h, 随后将培养基更换为含 1% FBS 并经 95% 空气/5% CO₂ 饱和处理的 DMEM 后, 立即放入二氧化碳培养箱中, 在正常氧环境下继续培养 6 h。nNOS 抑制剂 L-VNIO 于复氧开始时给予, 并持续整个复氧过程。

2.7 H9c2 细胞凋亡测定

H9c2 细胞完成造模后, 使用胰酶将细胞消化、离心, PBS 洗涤后, 严格按照 AnnexinV-FITC 凋亡试剂盒的说明书步骤进行操作, 最后使用流式细胞仪进行细胞凋亡测定。

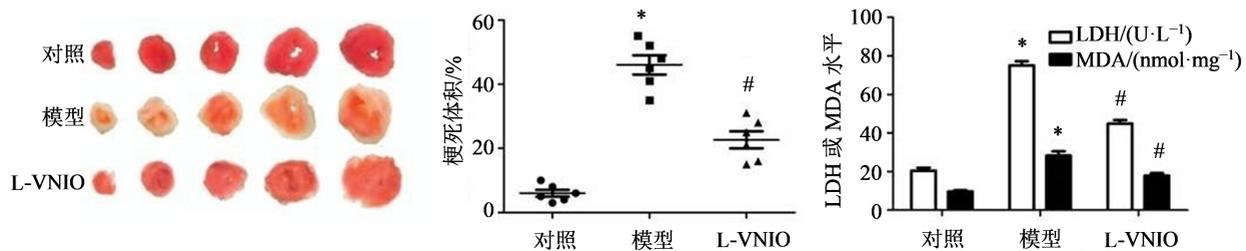
2.8 试剂盒法检测 H9c2 细胞 MDA 水平和 SOD 活性

取造模完成的 H9c2 细胞, 加入裂解液提取蛋白, BCA 法检测各组蛋白浓度后, 按照试剂盒说明书检测 MDA 水平和 SOD 活性。

2.9 H9c2 细胞胞浆 Ca²⁺ 浓度测定

收集造模完成后的 H9c2 细胞, PBS 清洗后, 加入 10 μmol·L⁻¹ Fluo-3/AM 在 37 °C 避光孵育 30 min, 最终细胞以 200 μL PBS 重悬。使用流式细胞仪检测细胞荧光强度 (F), 激发波长和发射波长分别是 488 nm 和 525 nm。计算胞浆游离 Ca²⁺ 浓度 [Ca²⁺]_i。

$$[Ca^{2+}]_i = K_d(F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

图1 nNOS抑制剂减轻离体心脏I/R损伤($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 nNOS inhibitor alleviated I/R injury in isolated heart ($\bar{x} \pm s, n=6$)

$K_d = 400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; F_{max} 通过加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ionomycin 获得; F_{min} 通过加入 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGTA 获得。

2.10 统计学分析

利用 GraphPad Prism 8.0 软件进行资料分析, 各组计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 Tukey 检验。

3 结果

3.1 nNOS 抑制剂减轻离体心脏 I/R 损伤

如图 1 所示, 与对照组比较, 离体心脏经 I/R 后, 梗死面积明显增加 [(6.70 ± 0.96)% vs (45.84 ± 1.86)%], $P < 0.05$; 与模型组比较, nNOS 抑制剂 L-VNIO 显著抑制 I/R 损伤所引起的梗死面积增加 [(22.67 ± 1.48)% vs (45.84 ± 1.86)%], $P < 0.05$ 。与对照组比较, 模型组 LDH 和 MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, nNOS 抑制剂 L-VNIO 显著降低了 I/R 所升高的 LDH 活性和 MDA 水平 ($P < 0.05$)。结果表明, 在离体心脏 I/R 模型中 nNOS 抑制剂 L-VNIO 显著减轻 I/R 损伤。

3.2 nNOS 抑制剂减轻 H9c2 细胞 H/R 损伤

与对照组相比, 模型组 H9c2 细胞凋亡率和 MDA 水平显著升高, SOD 活性显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, L-VNIO 组细胞凋亡率和 MDA 水平显著降低, SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$)。结果表明, H/R 引起细胞凋亡和氧化应激, nNOS 抑制剂 L-VNIO 可以有效抑制细胞凋亡和氧化应激, 从而减轻 H9c2 细胞 H/R 损伤。结果见图 2。

3.3 nNOS 抑制剂降低 H/R 细胞内 Ca²⁺ 浓度

如图 3 所示, 与对照组相比, 模型组 H9c2 细胞内 Ca²⁺ 浓度显著升高 ($P < 0.05$); 而 L-VNIO 组细胞内 Ca²⁺ 浓度显著低于模型组 ($P < 0.05$)。结果提示 nNOS 抑制剂 L-VNIO 可以减轻 H/R 引起的钙超载。

3.4 nNOS 抑制剂提高 I/R 离体心脏的 SERCA 活性

进一步探讨 nNOS 抑制剂减轻 I/R 引起的 Ca²⁺

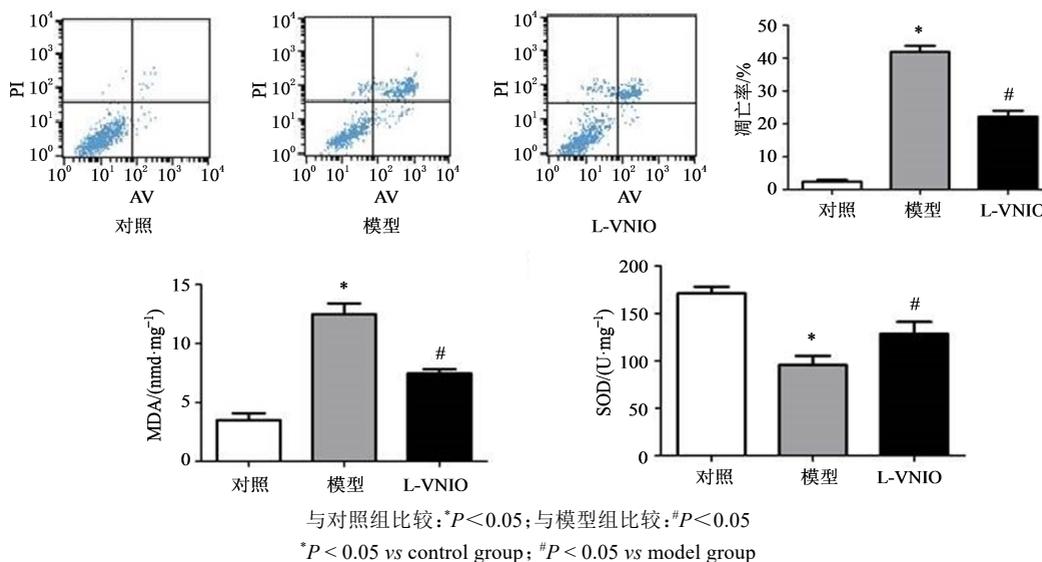


图2 nNOS抑制剂减轻H9c2细胞H/R损伤($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 nNOS inhibitor alleviated H/R injury in H9c2 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

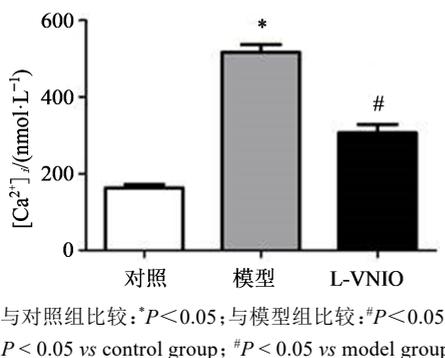


图3 nNOS抑制剂对H/R诱导的胞内 Ca^{2+} 浓度的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of nNOS inhibitor on intracellular Ca^{2+} concentration induced by H/R ($\bar{x} \pm s, n=3$)

超载的机制,肌浆网是心肌细胞维持细胞内 Ca^{2+} 稳态的主要细胞器, SERCA是心肌细胞肌浆网摄取 Ca^{2+} 的主要通道。结果表明I/R以及nNOS抑制剂对SERCA的蛋白表达水平没有明显影响(图4-B)。而对SERCA活性有明显影响(图4-A):与对照组比较, I/R引起SERCA活性显著降低($P < 0.05$);与模

型组比较, L-VNIO使SERCA活性部分回升($P < 0.05$),肌浆网摄取 Ca^{2+} 能力改善。

3.5 nNOS抑制剂降低I/R离体心脏的PLB和RyR2磷酸化水平

SERCA活性受PLB调节, PLB磷酸化后SERCA活性增强。I/R以及nNOS抑制剂对PLB的蛋白表达水平没有明显影响,但明显影响其磷酸化水平。与对照组比较,模型组PLB磷酸化水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较, L-VNIO组PLB磷酸化水平显著增强($P < 0.05$,图5)。结果提示, L-VNIO可能通过增强PLB磷酸化而增强SERCA活性。

RyR2是心肌细胞肌浆网释放 Ca^{2+} 的主要通道,图5结果表明I/R以及nNOS抑制剂对RyR2的蛋白表达水平没有明显影响,但明显影响其磷酸化水平。与对照组相比,模型组RyR2磷酸化水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较, L-VNIO组较模型组RyR2磷酸化水平显著降低($P < 0.05$)。结果提示L-

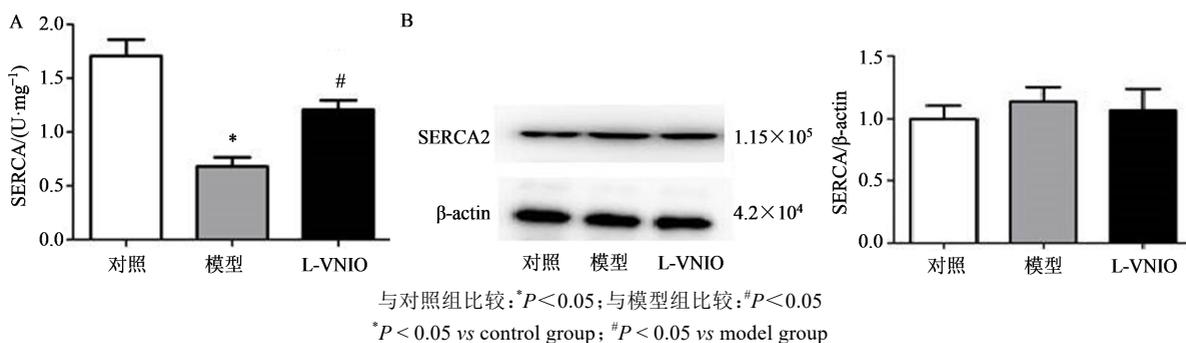
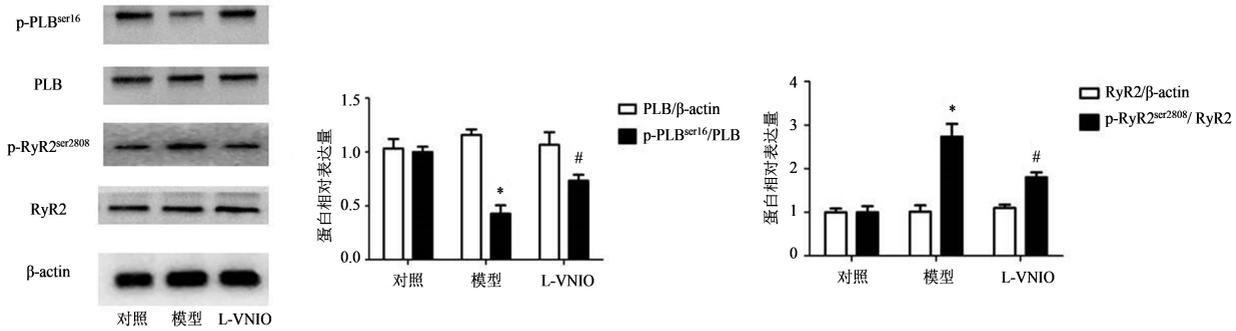


图4 nNOS抑制剂对I/R诱导的SERCA活性(A)及其蛋白表达(B)的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of nNOS inhibitor on SERCA activity (A) and its protein expression (B) induced by I/R ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

图5 nNOS抑制剂对I/R诱导的PLB和RyR2蛋白表达及其磷酸化水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of nNOS inhibitor on PLB and RYR2 protein expression and phosphorylation induced by I/R ($\bar{x} \pm s, n=3$)

VNIO可能通过降低RyR2磷酸化水平,减少肌浆网 Ca^{2+} 释放,减轻I/R引起的 Ca^{2+} 超载。

4 讨论

目前,心肌I/R损伤仍然是研究热点,如何有效防治I/R损伤也是医学界亟需解决的难题。本研究通过构建离体心脏I/R损伤模型和H9c2细胞H/R损伤模型证明nNOS选择性抑制剂L-VNIO可以降低细胞凋亡率、减少梗死面积,同时降低LDH和MDA水平、增强SOD活性而减轻氧化应激,以上结果说明nNOS抑制剂L-VNIO可以有效减轻I/R损伤。L-VNIO是一种较新的nNOS抑制剂,可以与L-精氨酸竞争与nNOS结合,对nNOS选择性强,被广泛应用于科学研究。此外,本研究还发现L-VNIO还可以减轻I/R引起的 Ca^{2+} 超载,这种作用是通过增强SERCA活性、降低RyR2磷酸化水平从而增强肌浆网 Ca^{2+} 摄取、减少 Ca^{2+} 泄露而实现的。

nNOS与多种疾病相关,包括高血压、心衰、心肌梗死和缺血再灌注损伤等^[11],但nNOS在疾病中的作用存在争议。有研究表明,在I/R小鼠中,nNOS过表达小鼠较野生型小鼠梗死面积减小,左心室功能改善^[12],这意味着nNOS在心肌梗死小鼠中发挥保护作用,而也有研究报道线粒体中的NOS(即nNOS)可以通过氧化应激和产生过氧亚硝基而引起心肌和肾脏的I/R损伤^[13-14]。可见,nNOS在I/R损伤中可能发挥双重作用。本研究发现nNOS选择性抑制剂L-VNIO可以降低细胞凋亡率、减少梗死面积、减轻 Ca^{2+} 超载,发挥抗I/R损伤的心肌保护作用,这与Hu等^[10]的研究结果一致。在病理状态下,nNOS会发生脱偶联,产生超氧阴离子,引起氧化应激,或与NO生成过氧亚硝酸盐,产生细胞毒作用,介导I/R损伤^[15-16]。抑制剂L-VNIO可

以抑制过氧根离子和NO生成^[17],从而发挥抗I/R损伤的作用。

Ca^{2+} 超载是引起心肌I/R损伤的主要机制之一^[18],心肌细胞内肌浆网是调节细胞内 Ca^{2+} 稳态的主要细胞器。肌浆网膜上有3种重要的 Ca^{2+} 转运相关蛋白^[19]:(1)SERCA,在心脏中表达的是SERCA2a,可以将胞浆中的 Ca^{2+} 摄入肌浆网内,在心衰或再灌注时,其表达和活性均受影响;(2)PLB,与SERCA相互作用,可以通过磷酸化增强SERCA活性;(3)RyR,将肌浆网中的 Ca^{2+} 释放到胞浆中,其表达和活性在心脏疾病状态下也会发生变化。这3种 Ca^{2+} 转运相关蛋白均与nNOS密切相关。首先,nNOS可以通过产生活性氮簇如过氧化亚硝酸盐而影响蛋白磷酸酶活性从而调节PLB磷酸化,影响SERCA活性^[20]。其次,nNOS调控RyR的巯基亚硝基化,而巯基亚硝基化会活化RyR通道,促进 Ca^{2+} 漏出^[10]。本研究结果证实nNOS抑制剂可以通过升高PLB磷酸化水平,提高SERCA活性,增加肌浆网 Ca^{2+} 摄取。另外,nNOS抑制剂可能通过调控PKA活性而降低RyR磷酸化水平,从而减少 Ca^{2+} 渗漏。最终,nNOS抑制剂降低胞内 Ca^{2+} 浓度,减轻 Ca^{2+} 超载。

本研究证实了nNOS选择性抑制剂L-VNIO可以减轻离体心脏I/R损伤以及心肌细胞H/R损伤,其机制与nNOS抑制剂影响 Ca^{2+} 转运蛋白活性或磷酸化水平,减轻 Ca^{2+} 超载有关。但目前实验仅在离体心脏和细胞水平开展,尚未开展在体实验,因而nNOS选择性抑制剂L-VNIO对在体实验动物的抗心脏I/R损伤作用尚未明确,这也是将要探究的内容。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2011, 123(6): 594-604.
- [2] Burley D S, Baxter G F. Pharmacological targets revealed by myocardial postconditioning [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9(2): 177-188.
- [3] Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: Preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(5): 1723-1741.
- [4] 任星桥, 李晓彤, 林小英, 等. eNOS/PKG-1 通路在 L-精氨酸抗野百合碱所致大鼠右心室重构中的作用 [J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(8): 1117-1121.
Ren X Q, Li X T, Lin X Y, et al. Role of eNOS/PKG-1 pathway in L-Arginine against right ventricular remodeling induced by monocrotaline in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2021, 37(8): 1117-1121.
- [5] 王颖婷, 嘎珍, 张林泉, 等. 内皮型一氧化氮合酶在心血管疾病中的调节作用研究进展 [J]. *医学理论与实践*, 2023, 36(6): 926-928.
Wang Y T, Ga Z, Zhang L Q, et al. Research progress on the regulatory role of endothelial nitric oxide synthase in cardiovascular diseases [J]. *J Med Theory Pract*, 2023, 36(6): 926-928.
- [6] 汪晓庆, 曹威, 宋先兵, 等. HIF-1 α 基因转染人胃腺癌 SGC7901 细胞对裸鼠移植瘤的影响及机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 8(8): 1128-1132.
Wang X Q, Cao W, Song X B, et al. Effect and possible mechanism of HIF-1 α gene transfection of human gastric adenoma SGC7901 xenografts in nude mice [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2017, 8(8): 1128-1132.
- [7] Dedkova E N, Blatter L A. Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase [J]. *J Physiol*, 2009, 587(4): 851-872.
- [8] Strasen J, Ritter O. Role of nNOS in cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2011, 21(2):58-63.
- [9] Inserte J, Hernando V, Ruiz-Meana M, et al. Delayed phospholamban phosphorylation in post-conditioned heart favours Ca²⁺ normalization and contributes to protection [J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 103(4): 542-553.
- [10] Hu L, Wang J, Zhu H, et al. Ischemic postconditioning protects the heart against ischemia-reperfusion injury via neuronal nitric oxide synthase in the sarcoplasmic reticulum and mitochondria [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(5): e2222.
- [11] El-Mas M M, Abdel-Rahman A A. Endothelial and neuronal nitric oxide synthases variably modulate the oestrogen-mediated control of blood pressure and cardiovascular autonomic control [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2014, 41(3): 246-254.
- [12] Burkard N, Williams T, Czolbe M, et al. Conditional overexpression of neuronal nitric oxide synthase is cardioprotective in ischemia/reperfusion [J]. *Circulation*, 2010, 122(16): 1588-1603.
- [13] Zenebe W J, Nazarewicz R R, Parihar M S, et al. Hypoxia/reoxygenation of isolated rat heart mitochondria causes cytochrome C release and oxidative stress; evidence for involvement of mitochondrial nitric oxide synthase [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 43(4): 411-419.
- [14] Viñas J L, Sola A, Hotter G. Mitochondrial NOS upregulation during renal I/R causes apoptosis in a peroxynitrite-dependent manner [J]. *Kidney Int*, 2006, 69(8): 1403-1409.
- [15] Xia Y. Superoxide generation from nitric oxide synthases [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(10): 1773-1778.
- [16] Laursen J B, Somers M, Kurz S, et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: Implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin [J]. *Circulation*, 2001, 103(9): 1282-1288.
- [17] Pigott B, Bartus K, Garthwaite J. On the selectivity of neuronal NOS inhibitors [J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 168(5): 1255-1265.
- [18] 魏成露, 冯庆敏, 陈宋程, 等. 心肌缺血再灌注损伤分子机制的研究进展 [J]. *海南医学院学报*, 2022, 28(16): 1268-1274.
Wei C L, Feng Q M, Chen S C, et al. Advances in molecular mechanism of myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *J Hainan Med Univ*, 2022, 28(16): 1268-1274.
- [19] Lim G, Venetucci L, Eisner D A, et al. Does nitric oxide modulate cardiac ryanodine receptor function? Implications for excitation-contraction coupling [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 77(2): 256-264.
- [20] Martin P D, James Z M, Thomas D D. Effect of phosphorylation on interactions between transmembrane domains of SERCA and phospholamban [J]. *Biophys J*, 2018, 114(11): 2573-2583.

[责任编辑 兰新新]