

综述



赵强, 南开大学生命科学学院教授, 国家杰出青年科学基金获得者。担任生物活性材料教育部重点实验室副主任和天津市重点实验室主任、中国生物医学工程学会理事、*Fundamental Research*编委、*Engineered Regeneration*副主编等。主要从事心血管生物材料与再生医学研究工作, 利用工程材料科学、化学生物学等原理方法开展交叉研究, 研发用于心血管修复再生与心血管疾病治疗的新材料与新技术。在国际权威学术期刊*Nat Chem Biol*、*Nat Commun*、*Cell Rep*、*Adv Mater*、*Cir Res*、*Adv Sci*、*J Am Soc Nephrol*、*Biomaterials*等发表论文100余篇, 出版或参编著作6部。主持国家重点研发计划、国家杰出青年科学基金、国家优秀青年科学基金和天津市杰出青年科学基金等省部级以上科研项目10余项。先后获得天津市自然科学一等奖(2019)和天津市科技进步二等奖(2016, 2022)。

NO/ROS氧化还原平衡在心血管疾病中的作用

孙宇瑶, 钱盟, 赵强*

(南开大学生命科学学院, 药物化学生物学国家重点实验室, 天津 300071)

摘要: NO/ROS氧化还原平衡与细胞稳态、功能以及信号转导密切相关。活性氧(ROS)过量产生以及一氧化氮(NO)减少或生物利用度降低等都会造成氧化还原失衡, 从而导致不同心血管疾病的发生。NO作为一种重要的气体信号分子, 参与维持氧化还原平衡及其相关的生理及病理过程。NO供体化合物及可控递送系统在生物医学领域展现了良好的应用前景。本文拟对胞内NO/ROS氧化还原平衡及其与心血管疾病之间的关系、可控递送NO和(或)清除ROS的生物材料及其在心血管疾病治疗中的应用进行系统总结及展望。

关键词: NO/ROS氧化还原平衡; 心血管疾病; 生物材料

Role of NO/ROS redox balance in cardiovascular diseases

SUN Yuyao, QIAN Meng, ZHAO Qiang*

(State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: NO/ROS redox balance is closely related to cell homeostasis, function and signal transduction. The overproduction of reactive oxygen species (ROS) or the decrease of nitric oxide (NO) and its bioavailability will cause redox imbalance and lead to a series of cardiovascular diseases. As an important gas signaling molecule, NO is involved in the maintenance of redox balance and related physiological and pathological processes. NO donor compounds and controllable delivery systems show great promise in the biomedical field. In this paper, the intracellular NO/ROS redox balance and its relationship with cardiovascular diseases, biomaterials with NO release and (or) ROS scavenging function and their applications will be summarized and prospected.

Key Words: NO/ROS redox balance; cardiovascular diseases; biomaterials

收稿日期: 2023-05-31

基金项目: 国家重点研发计划-战略性国际科技创新合作重点专项(2018YFE0200500); 国家杰出青年科学基金项目(81925021)

第一作者: E-mail: sunyuyao0617@126.com

*通信作者: E-mail: qiangzhao@nankai.edu.cn

NO/ROS平衡的失调会导致氧化应激/硝化应激的发生,造成心脏和血管表型异常,进而与一系列心血管疾病的发生有关。ROS主要由NAPDH氧化酶、黄嘌呤氧化酶、线粒体以及解耦联NOS (endothelial nitric oxide synthase, eNOS)产生。NO是一种多功能气体信号分子,在心血管系统的稳态调节中发挥重要作用。NO在血管生成和心脏保护中发挥重要作用。吸入NO能够改善白细胞对受损内皮的黏附作用,从而抑制心脏中ROS的过量产生。因此,现阶段已研发出ROS响应型NO供体、可注射水凝胶、硝酸酯功能化心肌补片等不同类型的NO可控递送材料,显示出了良好的治疗和应用前景。

1 氧化还原平衡

1.1 氧化还原精准调控

氧化还原调控与细胞稳态密切相关。细胞的氧化还原平衡为各种生物大分子发挥其正常功能提供了稳定的微环境,如蛋白质的氧化还原依赖性翻译后修饰是调节蛋白质功能和细胞信号转导的重要开关^[1]。细胞中的氧化还原调节系统包括小分子和大分子。活性物质具有多种化学性质,包括活性氧、活性氮、活性氯/溴、活性硫、活性碳基和活性硒。活性氧/活性氮主要包括过氧化氢、羟基自由基、超氧阴离子、一氧化氮和过氧亚硝酸盐^[2]。抗氧化酶包括超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽S转移酶、谷氧还蛋白、NO合成酶和S-亚硝基谷胱甘肽还原酶,是主要的大分子氧化还原调控系统。这些酶在调节活性氧/活性氮平衡中发挥重要作用。此外,一些氧化还原对包括谷胱甘肽/谷胱甘肽二硫、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氢/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氢/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸、过氧还蛋白-硫氧还蛋白和硫氧还蛋白(Trx)/二硫Trx等,通过与抗氧化酶协同作用,调节细胞氧化还原状态。

氧化还原平衡被破坏会造成生物大分子的氧化损伤或蛋白质的无序氧化修饰,与各种疾病的发生发展有关,包括癌症、糖尿病和神经退行性疾病等。但随着对疾病的不断研究发现,氧化还原平衡在疾病的不同发展阶段发挥的作用并不相

同。氧化还原状态的利弊必须在物种、时间、地点、水平和目标背景下的综合考虑,准确评估氧化还原状态和特定干预措施对于氧化还原的调控至关重要^[3]。基于此,Meng等^[4]提出精准氧化还原(precision redox)概念,从氧化还原状态的差异、功能的差异和治疗效果的差异三个方面介绍了氧化还原的确切性质,阐述机体氧化还原状态的时空精准属性,并提出抗氧化干预的“5R”氧化还原精准调控原则,即抗氧化要做到Right species、Right place、Right time、Right level和Right target,并指出该原则是抗氧化药物设计的关键(图1)。其中,Right species是指需要关注特定的氧化还原物质,包括活性物质、抗氧化酶和氧化还原对。Right time强调需要考虑不同时间点氧化还原状态的动态变化,如细胞周期的不同阶段、昼夜节律、季节、衰老或疾病过程。Right place意味着评估氧化还原状态时应该考虑不同的细胞器、细胞类型及组织。Right level是指在研究或应用氧化还原时需要注意其作用的有效范围,如果氧化水平过高,则会导致氧化应激损伤;而如果还原水平过高,则会导致还原应激。Right target有两个含义:一是要在分子水平上调控特定底物(如蛋白质、脂质、核酸等)的氧化水平,另一种是在宏观水平上针对不同个体建立不同的抗氧化剂应用方法。

1.2 活性氧(reactive oxygen species, ROS)

ROS是一种由内源性因素(线粒体、过氧化物酶、脂肪氧合酶、NADPH氧化酶和细胞色素P450等)以及外源性因素(紫外线、电离辐射、化疗、炎症细胞因子以及环境毒素等)产生的氧化剂,包括氧自由基(如超氧化物、羟基自由基、过氧自由基)和非自由基(如过氧化氢、次氯酸、臭氧)^[5,6]。基于其不稳定且高活性的化学性质,ROS可通过两种途径作用于细胞生理过程:其一,ROS可通过与细胞脂质、蛋白质以及DNA等生物大分子相互作用,介导衰老、疾病以及细胞死亡等过程^[7];其二,ROS可通过热休克因子1(heat-shock transcription factor 1, HSF1)、NF- κ B、p53、PI3K以及丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路参与细胞增殖等细胞内稳态功能的调控。

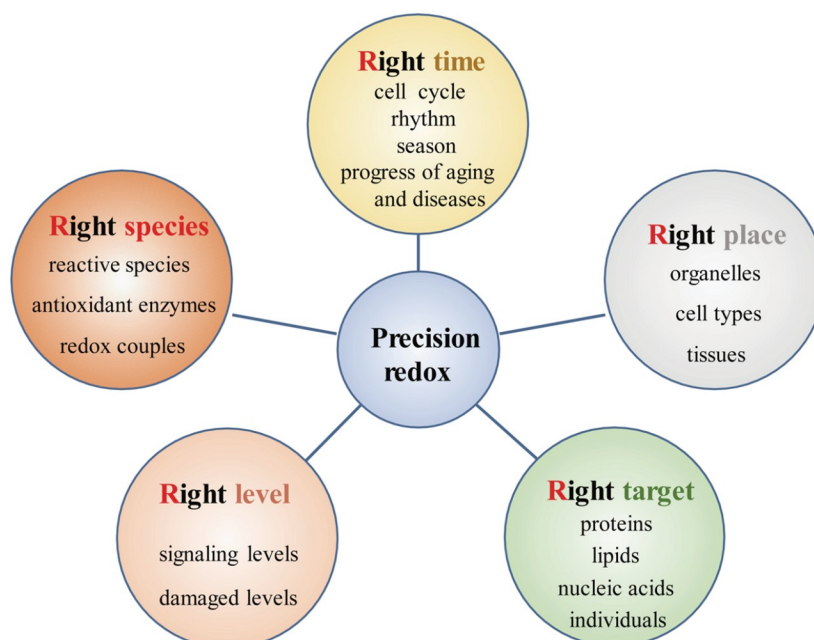


图1 “5R”氧化还原精准调控原则

生理浓度的ROS对于维持细胞信号转导通路、抵御入侵微生物、基因表达以及细胞生长或死亡等过程是不可缺少的,但过量的ROS会对细胞大分子(如DNA、脂质、蛋白质等)造成损伤,最终导致细胞坏死和凋亡。就心血管疾病而言,ROS会促进动脉粥样硬化斑块的形成,同时会降低NO活性并抑制血管收缩,诱发高血压。此外,ROS还参与心肌 Ca^{2+} 的负调控,诱发心律不齐,并通过诱导心肌肥厚信号通路和细胞凋亡来促进心脏重塑的发生。

心血管系统中ROS的来源主要包括NADPH氧化酶、黄嘌呤氧化酶、NOS(nitric oxide synthase)以及髓过氧化物酶、线粒体细胞色素和血红蛋白等。NOS和血红蛋白同时也是RNS的主要来源,RNS包括NO和传递NO生物活性的SNO(氨基酸、肽和蛋白质中NO修饰的半胱氨酸)^[8,9]。此外,NO和SNO也可以由位于溶酶体或线粒体内膜等酸性隔间中的亚硝酸盐通过XO等酶的作用产生。同时,这些酶促氧化系统之间也存在相互作用,如Nox可诱导eNOS解耦联,上调XO活性并促进线粒体ROS产生^[10]。

1.2.1 NADPH氧化酶(NADPH oxidases, Nox)

Nox家族共有7个成员,分别是Nox1-5和DUOX1/2。心血管系统中广泛表达多种亚型的

Nox,主要为Nox1、Nox2、Nox4和Nox5。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)中广泛表达的是Nox1和Nox4,此外Nox4还在内皮、心肌细胞和心肌干细胞中广泛表达,而Nox2主要分布于内皮、血管平滑肌细胞和心肌细胞中^[11]。Nox参与高血压、左心室肥大以及心肌梗死等多种心血管疾病的发生。此外,Nox还参与血管新生以及血压调控等心血管生理过程^[12]。

1.2.2 黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)

XO是血管中ROS的重要来源,其利用分子氧作为电子受体生成超氧化物和过氧化氢。一些促动脉粥样硬化刺激(如血管紧张素Ⅱ和振荡剪切力)都能增强内皮XO的表达和活性^[13-15]。此外,XO可以从肝脏和循环中释放出来,并通过与内皮糖胺聚糖结合黏附在内皮细胞上。XO在心衰患者中表现出更高的丰度和活性,心衰患者心脏和脉管系统的XO上调,分别导致机械-能量解耦和血管收缩。在实验动物动脉粥样硬化和人类动脉粥样硬化斑块中,内皮细胞XO和血浆XO的活性均升高,表明XO产生的超氧化物与动脉粥样硬化的发展有关^[16]。抑制XO可改善高胆固醇血症动物主动脉环内皮依赖性、NO介导的血管舒张,并逆转重度吸烟者的内皮功能障碍^[17]。XO抑制剂如别嘌呤醇、钨和非布司他能抑制ApoE-KO小鼠动脉粥样硬化

的发展^[18,19]。

1.2.3 线粒体

正常情况下, 线粒体氧化磷酸化产生生理水平的超氧化物, 这些超氧化物通过锰依赖性超氧化物歧化酶(MnSOD、SOD2)转化为 H_2O_2 , 随后通过谷胱甘肽过氧化物酶1(GPx1)转化为 H_2O ^[20,21]。病理条件下, ROS过量或ROS清除不足均可诱导线粒体氧化应激。事实上, 有许多研究表明人动脉粥样硬化与线粒体氧化应激和能量代谢紊乱有关。线粒体SOD2的整体缺失或心脏缺失会分别导致心肌病和充血性心力衰竭导致围产期死亡, 这些研究充分证明了线粒体氧化还原平衡的重要性^[22]。此外, ApoE-KO背景下的杂合SOD2^{+/-}敲除小鼠线粒体中ROS水平升高, 动脉分支点动脉粥样硬化加速^[23]。

1.2.4 ROS的检测

(1)化学发光法

化学发光法(chemiluminescent, CL)是检测ROS最常用的手段之一。CL的基本原理是利用ROS检测试剂反应释放出的能量, 激发产物分子, 使其电子发生非辐射跃迁, 回到基态时能量以光子形式释放出来。利用ROS与试剂反应发光的机理, 通过暗室、放大器、光检测器等简单仪器分析光强即可测量ROS的存在与浓度。鲁米诺(Luminol)是化学发光法中最常应用的检测试剂, 自1928年首次发现鲁米诺试剂被氧化可显蓝光后, 其已被广泛运用于刑侦分析中的血迹检测。值得注意的是, 鲁米诺本身具有被氧化后即发光的特性, 因此其对ROS的响应是非选择性的, 一般仅作为辅助手段进行ROS分析, 在特定体系下可利用其他试剂或控制实验条件针对性地排除非目标活性氧的干扰, 提高选择性。

(2)荧光探针法

荧光探针法利用ROS的高氧化性与荧光探针发生反应, 当生成物与原探针的荧光效应有较大差别时, 可通过对荧光强度的测定间接检测ROS的存在与含量。该方法精度和灵敏度较高、操作简单、重复性好, 在多个领域被广泛利用。常用的荧光探针包括二氯荧光素、二氢罗丹明和二氢乙锭等。但这三种探针由于易与生物体或反应体系内如高铁离子、次氯酸等反应, 存在ROS选择性较

差等缺点。基于此, 许多学者在其原理基础上根据测定环境的不同, 又开发出了多种衍生物作为新型探针, 进一步提高了荧光探针法的选择性。

(3)分光光度法

分光光度法在众多ROS检测手段中, 具有操作简便、仪器成本低等优点。使用分光光度仪探测不同ROS在其特定波长或特定范围内的吸光度或光强, 进一步分析其吸收峰的位置、峰高、峰面积即可定性定量测定ROS。但该方法可能存在产物溶解性低、检测试剂能与多种氧化还原酶反应, 难以进行长时间ROS原位测量以及测试环境具有选择性等问题。

(4)电子顺磁共振法

当外加磁场存在时, 由于电子自旋量子数为1/2, 电子顺磁共振法有且仅有与磁场平行方向或逆平行方向两种取向, 从而使未成对电子形成能量不同的两种能级。当施加电磁波频率满足一定条件时, 低能级电子会跃迁至高能级, 此现象称为电子顺磁共振(electron paramagnetic resonance, EPR)。对于自由基及ROS, 其总磁矩绝大部分来源于电子自旋, 因此通常直接称作电子自旋共振(electron spin-resonance spectroscopy, ESR)。放大共振时的能量吸收信号并观测记录, 对ROS、自由基等进行检测的方法称为ESR法。ESR法是迄今为止所有检测技术中最直接、最灵敏、选择性最高、可信度最高的分析测量ROS的技术, 无需对样品进行复杂处理, 部分ROS可进行非破坏性测量。但ESR技术仪器与测试成本高昂、对样品要求较高限制了其应用。

1.3 一氧化氮(NO)

NO是一种具有重要生理功能的小分子气体自由基(图2), 由L-精氨酸和氧气经一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化生成。Furchgott、Ignarro和Murad因发现NO作为内皮源性松弛因子在血管内皮中的作用而获得1998年的诺贝尔奖。大量证据表明, NOS产生的内源性NO与众多心血管事件相关。在生理水平下, NO可作为抗氧化剂, 减弱芬顿反应, 终止自由基链反应, 抑制过氧化物酶和氧化酶的产生。NO不仅参与心肌或血管收缩性的调控, 同时介导心血管组织的重塑过

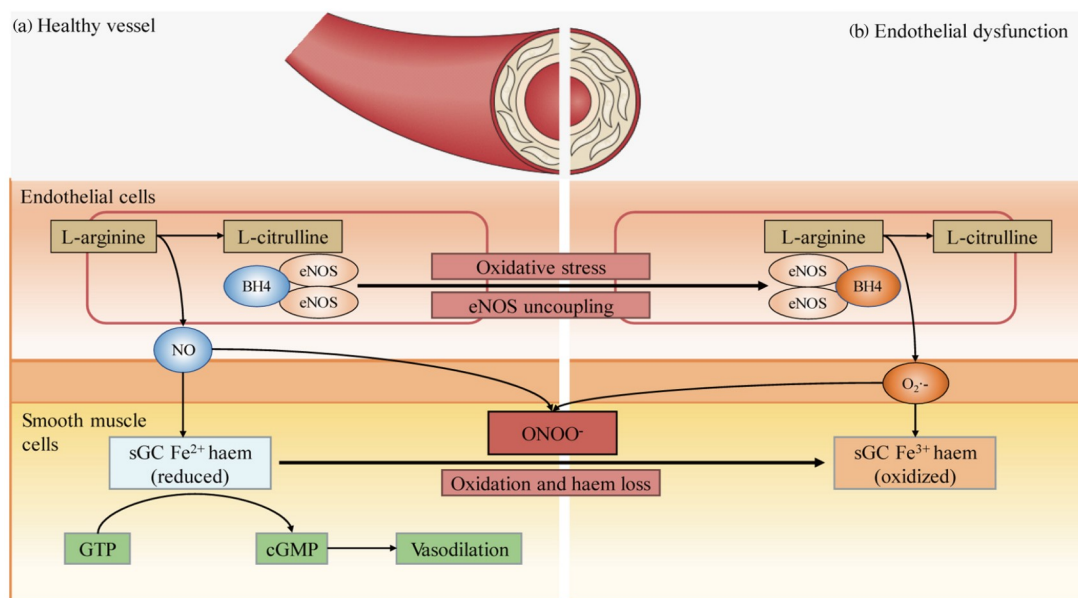


图2 NO信号通路在健康和疾病中的作用

程(如纤维化)以及代谢(如棕色脂肪和血管周围脂肪)^[24]。NO在哺乳动物系统中的功能不仅限于血管信号传导,还与其他系统相关,包括神经元信号传导和宿主防御等。

血管中存在多种机制参与NO的产生和信号响应。内源性NO由NOS作用产生,NOS包括由NOS1编码的神经型NOS(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)、NOS2编码的诱导型NOS(inducible nitric oxide synthase, iNOS)以及NOS3编码的内皮型NOS(endothelial nitric oxide synthase, eNOS); eNOS最早发现于血管内皮中,而nNOS和iNOS分别发现于神经和巨噬细胞中。

1.3.1 eNOS

在心血管系统中,eNOS主要由血管内皮和心内膜的内皮细胞表达,此外也少量表达于心肌细胞和血小板中。血流剪切力以及缓激肽、乙酰胆碱等激动剂可通过对转录因子NF- κ B和KLF2的共同调控激活eNOS mRNA和蛋白质水平的表达^[25]。此外,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor)和其他促血管生成因子如bFGF(basic fibroblast growth factor, bFGF)也可以通过PI3K/Akt依赖性S1177磷酸化或PLC依赖性细胞溶质Ca²⁺的增加激活eNOS,增加eNOS活性,促进NO的生成。

eNOS产生的NO主要通过两种不同途径调节

心血管功能,其一是通过激活sGC/cGMP/PKG/MAPK通路,促进内皮细胞增殖和迁移,增加血管生成;其二是通过蛋白S-亚硝化的途径^[26,27]。eNOS产生的NO可以从内皮细胞扩散进入平滑肌细胞,诱导血管扩张。同时,内皮产生的NO也可以入血抑制血小板的聚集和黏附^[28-30]。除了这些抗高血压和抗血栓特性外,eNOS产生的NO还具有多种抗动脉粥样硬化作用,包括抑制LDL氧化、防止白细胞黏附血管内皮和白细胞向血管壁迁移、抑制血管平滑肌细胞增殖。*eNOS*缺陷小鼠的相关实验也证实了eNOS在维持心血管功能中的作用。在*ApoE*^{-/-}动脉粥样硬化模型中,*eNOS*的缺失加速了动脉粥样硬化过程^[31]。值得注意的是,过度表达*eNOS*也是有害的,*eNOS*过表达造成BH₄相对较少,导致eNOS解耦联也是促AS的重要机制之一^[32]。eNOS解耦联不仅会降低NO生成,同时会加剧已经存在的氧化应激,诱导AS的发生发展。此外,最近一些研究通过使用骨髓嵌合体小鼠模型发现,红细胞也可表达功能性eNOS,通过NO信号通路在一定程度上参与血压和心肌损伤的调节^[33,34]。

1.3.2 nNOS

nNOS通常在心肌细胞的肌浆网、心脏自主神经元和神经节以及血管平滑肌细胞中表达。迄今为止,nNOS共有5种剪接变体:nNOS α 、

nNOS β 、nNOS μ 、nNOS γ 和nNOS1-2。近期有研究表明, nNOS在血管生理及病理过程中发挥重要的调控作用, 且独立于nNOS产生的NO在中枢神经系统中的作用^[35]。

nNOS不同位点的磷酸化可以在不同程度上调控其活性。目前在心肌细胞和血管平滑肌细胞中有两个主要的nNOS磷酸化位点, 分别是CaMK II 依赖的Ser852磷酸化以及AKT依赖的Ser1417磷酸化, 前者可通过抑制Ca²⁺-钙调蛋白的结合抑制nNOS活性, 而后者可以增强心肌细胞和VSMCs中nNOS的活性^[36,37]。

1.3.3 iNOS

白细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、神经元以及纤维母细胞等多种类型的细胞在炎症或氧化应激状态下都会发生iNOS的转录。在心血管系统中, iNOS的表达主要与病理性重构相关。在急性缺血、败血症或心衰的情况下, iNOS丰度可能增加, 导致S-亚硝基化异常升高, 最终造成亚硝化应激^[38]。

细胞质中iNOS产生NO的水平主要依赖于该酶转录水平的调控^[39]。与eNOS和nNOS不同, iNOS的功能不受胞内Ca²⁺调节, 只由细胞因子或内毒素激活^[40]。iNOS可通过与eNOS竞争BH4来抑制eNOS产生NO。血管中iNOS表达上调会诱导一种重要的氧化剂——过氧亚硝酸盐的产生^[41-43], 促进动脉粥样硬化形成。实际上, 人动脉粥样硬化斑块中iNOS的表达与过氧亚硝酸盐形成的标志物硝基酪氨酸有关。

1.3.4 NO的检测

(1) Griess试剂法

Griess法是一种间接测定NO的方法, 在水溶液中, NO快速被氧化生成亚硝酸盐。该测定方法是在酸性(磷酸)条件下, 亚硝酸根与磺胺发生重氮反应, 生成重氮复合物, 再与N-萘基乙二胺二盐酸盐发生耦合反应, 生成产物在540 nm处有最大吸收峰。该测定方法可用于检测各种生物和实验液体基质(如血浆、血清、尿液和组织培养基)中的NO含量, 对于不同液体基质中NO的灵敏性不同。Griess法是检测液体基质中NO含量最常用的方法之一, 该方法适用范围广、操作简单, 但需要注意的是, 这是一种间接检测NO的方法, 通过分光

光度法测定吸光度值, 检测限低。

(2) 荧光探针法

荧光探针法是一种可视化检测手段, 大量荧光探针被报道用于检测NO, 常用的探针基于荧光素和罗丹明类荧光染料。DAF-FM DA是一种商品化可用于检测细胞内NO含量的荧光探针, 探针与细胞共孵育后, 通过激光共聚焦成像, 根据荧光信号强度反应NO水平。同时, 一类近红外荧光探针可通过活体成像技术, 检测组织中的NO水平。荧光探针法灵敏度高、适用范围广, 但可能存在特异性和基于生物物质的自发荧光问题。

(3) 电化学法

NO电化学传感器可用于测量生物样品中的NO浓度, 检测限可以达到nmol级别。NO可以被电化学还原或氧化, 并且由此产生的电子转移被转化为与NO浓度呈正比的电流。该方法可以定量检测NO浓度, 灵敏度高。

(4) 化学发光法

化学发光法采用高度灵敏的臭氧化学发光技术, 在液体和呼出气NO测量方面具有优势。该测定方法利用NO与臭氧反应在反应室内产生光子, 从而能够高度灵敏地检测生物样品中的NO代谢物, 包括亚硝酸盐、硝酸盐和亚硝基硫醇。反应分布器与检测器相连, 可极大地提高实验灵活性, 还可用于测定化学释放时特定代谢物中NO含量, 以及化学反应和细胞中NO的产生速率。

(5) 电子顺磁共振波谱法

电子顺磁共振波谱法可直接检测NO含量。NO与捕获剂反应后形成稳定的NO加合物, 通过测定加合物的信号强度, 确定NO含量。

2 氧化还原平衡与心血管疾病

目前, 心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)仍然是全球范围内导致死亡的重要原因。许多因素都与心血管疾病的发生有关, 氧化还原失衡在其病理机制中发挥着重要的调控作用。(图3)

2.1 氧化还原失衡导致的心血管疾病

2.1.1 动脉粥样硬化

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性进行性疾病, 以血管硬化和管腔狭窄为特征, 与脂质过氧化、内皮功能障碍、活化的巨噬细胞

释放炎症介质以及血管内膜平滑肌细胞的迁移和增殖有关。内膜中的单核细胞分化为巨噬细胞,吞噬大量氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, oxLDL),导致炎性泡沫细胞的形成,是动脉粥样硬化的标志。

内皮结构和功能完整是维持血管系统正常功能的关键。ROS水平过高会导致内皮功能紊乱,并进一步导致其衰老和炎症反应的激活,加速动脉粥样硬化进程。内皮黏附因子的表达以及炎性细胞对内皮细胞的浸润作用与动脉粥样硬化发生及发展密切相关。NO和ROS在这一过程中发挥的作用大相径庭。eNOS产生的NO通过调节血流及血管重塑以及抑制血小板聚集和白细胞浸润等途径维持血管稳态。ROS则与细胞因子或瘦素介导的黏附因子表达上调有关。ROS不仅通过上调内皮TLR2的表达促进血管中氧化低密度脂蛋白、凋亡细胞以及细胞碎片氧化特异性表位(oxidation-specific epitopes, OSEs)的识别,同时参与细胞内信号级联,促进拉伸及振荡剪切应力介导的黏附因子的表达^[44,45]。

血管平滑肌细胞增殖和分化状态对AS的发展至关重要,一方面血管平滑肌细胞可以促进新生内膜的形成,但另一方面可以稳定斑块并防止其破裂^[46]。ROS介导的氧化应激对动脉粥样硬化的影响主要是通过调控NADPH氧化酶的活性。然而,其对动脉粥样硬化背景下血管平滑肌细胞的作用

仍不明确。新生内膜血管平滑肌细胞中Nox1的表达比正常中膜细胞高, Nox1水平上调与ERK1/2和MMP9激活有关^[47]。与对照组相比,缺乏Nox1的小鼠股动脉损伤后内膜新生较少^[48]。巨噬细胞在动脉粥样硬化发生和发展中发挥关键作用,而研究表明Nox、XO以及线粒体都与巨噬细胞ROS产生有关。其中, Nox是巨噬细胞ROS的主要来源。有研究表明, Nox来源的ROS参与单核细胞的分化和巨噬细胞功能的调控。巨噬细胞中线粒体产生的ROS可以促进MCP-1的产生,从而调控单核细胞的浸润和病变区域的炎症反应^[49,50]。

除此之外,近年来有研究证实了干/祖细胞在动脉粥样硬化和氧化应激中的作用。干/祖细胞可以分化为血管细胞系,参与血管再生过程^[51]。研究发现,氧化应激参与调控干细胞分化成血管平滑肌细胞的过程^[52]。Xiao等^[53]表明, Nox4来源的H₂O₂对于干细胞向血管平滑肌细胞的分化是必不可缺的。

2.1.2 心力衰竭

心力衰竭(heart failure, HF)是一个总称,指心脏功能的慢性恶化,在此期间,心脏无法维持足够的心输出量(cardiac output, CO)来维持器官灌注和组织稳态^[54,55]。心衰是一种心血管综合征,由心室充盈和射血的结构或功能障碍引起(如高血压或心肌梗死)。心衰是一个突出的公共卫生问题,全球患病人数约为3 700万,被称为“21世纪的流

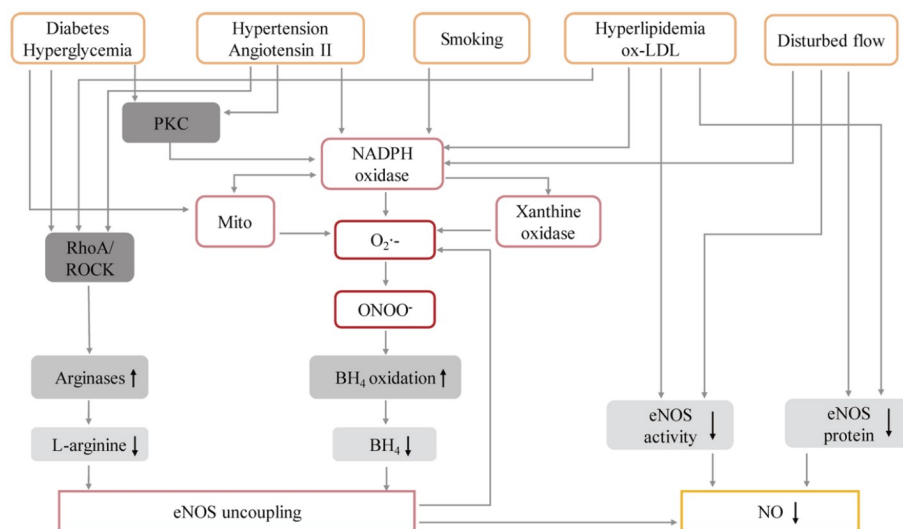


图3 心血管危险因素诱导血管氧化应激并减少内皮细胞NO的产生

行病”。

NO扩散进入平滑肌和心肌细胞, 刺激sGC产生环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP), cGMP通过各种细胞内效应分子, 如cGMP依赖性蛋白激酶、cGMP门控离子通道和cGMP调控的磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDEs)发挥下游作用。在心肌中, NO介导的cGMP升高可改善左心室扩张和心肌功能。NOS活性失调与HF的发生有关, 且这一过程伴随 Ca^{2+} 转运失调以及心肌重塑。由于超氧阴离子导致NO失活和eNOS表达下调, HF患者体内的NO生物利用度降低, NO-sGC-cGMP通路受损。此外, 由于氧化应激, HF患者的sGC的氧化还原状态发生改变, 导致sGC的平衡向NO不敏感状态转变^[56,57]。这种氧化应激通过神经激素激活和炎症分子的释放进一步恶化, 导致NO生物利用度进一步降低^[58,59]。这些紊乱最终导致血管变硬, 舒张功能障碍, 全身和肺血管收缩, 从而加重左、右心室后负荷。

2.1.3 缺血再灌注损伤

缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injuries, I/R)与心肌梗死、中风、手术和器官移植等多种严重疾病有关, 是导致死亡的最常见原因之一。

心肌缺血再灌注是世界上最常见的心血管疾病, 也是导致死亡的主要原因。在冠状动脉粥样硬化斑块上形成血栓是导致心脏供血不足的主要原因。许多机制, 如细胞内 Na^+ 、 H^+ 和 Ca^{2+} 离子的积累, 线粒体膜电位紊乱导致通透性过渡孔的形成, 细胞凋亡和自噬均参与了心肌I/R损伤的发病机制。此外, I/R过程中ROS的增加导致氧化/抗氧化失衡, 也是导致I/R损伤的关键因素。

NO对心肌I/R损伤具有保护作用。首先, NO增加心肌细胞肌层和线粒体膜中 K^+ ATP通道的活性, 使动作电位和收缩持续时间缩短, 减少对ATP的需求, 从而减少心脏损伤; 其次, NO对心肌细胞钙超载有抑制作用^[60]; 第三, NO通过抑制线粒体通透性过渡孔来维持细胞稳态^[61]; 第四, NO激活环氧化酶-2导致细胞保护性前列腺素的形成并抑制促凋亡蛋白。

目前, 已经有许多研究报道了NO对心肌缺血再灌注的保护作用。在体外实验中, NO供体S-亚硝基-N-乙酰青霉胺显著减少了梗死面积和心肌损

伤^[62]。Duranski等^[63]在诱导心肌梗死之前, 将一氧化氮的前体亚硝酸盐注射到小鼠左心室, 观察到类似的效果。在另一项研究中, 用瑞舒伐他汀预处理大鼠3周, 减轻了受I/R影响的心肌细胞损伤^[64]。

2.2 基于氧化还原平衡调控的疾病治疗方法

心血管系统可被视为“典型的NO系统”, 内皮功能受损会导致NO释放不足或生物利用度降低, 从而诱导心血管疾病的发生。NO产生相对不足可能会进一步促进氧化酶活性, 表明NO可能是ROS产生的调控者之一。NO和 O_2^- 的相对含量决定了其相互作用的化学命运: 生理状态下NO会促进S-亚硝基化, 而在病理状态下则会诱导氧化应激^[65]。

现阶段已开发出基于氧化还原平衡调控的治疗方法, 如清除ROS、NO可控递送以及兼具清除ROS和可控释放NO的双功能生物材料等。

2.2.1 ROS响应药物递送系统

ROS响应药物递送系统在癌症治疗、免疫治疗和胃肠道疾病等领域得到了广泛的关注。然而, ROS在上述微环境中浓度较低, 限制了ROS响应药物释放的进一步应用。I/R心脏损伤可导致ROS的快速积累和持续产生, 可作为药物释放触发器。Li等^[66]制备了一种负载bFGF的ROS响应水凝胶(Gel-bFGF), 并将其直接注射到心包腔中用于心脏修复。其原理是携带bFGF的交联聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)水凝胶能在ROS存在条件下降解, 实现bFGF的可控释放。大鼠模型和猪模型的体内实验均证明了水凝胶提高了bFGF在心包腔内的滞留, 从而促进bFGF穿透心外膜并与心肌结合, 抑制心肌细胞凋亡并促进其增殖, 减少I/R损伤后的纤维化, 促进心肌血管生成并改善心脏功能。

2.2.2 NO可控递送系统

多项研究表明了NO供体作为心血管疾病治疗靶点的作用。NO供体化合物主要包括有机硝酸酯类、偶氮二醇烯鎗盐类(NONOates)、S-亚硝基硫醇类(RSNO/SNO)、呋咱氮氧化物类、NO-金属配合物类。有机硝酸酯是一类用于治疗冠状动脉疾病的NO供体药物, 通过全身血管扩张起作用, 硝酸甘油作为第一个用于治疗心绞痛的NO药物已长

期应用于临床。Heiss等^[67]的研究发现,补充无机硝酸盐能改善内皮功能,这一作用与循环血管祖细胞、内源性亚硝酸盐以及S-亚硝基硫醇水平增加有关。外源性NO已被证实可以抑制心脏重塑,有助于早期心室舒张,改善收缩功能。此外,NO供体通过其对冠状动脉和肺循环的血管扩张作用,分别改善冠状动脉灌注和降低肺血管阻力。而将NO供体化合物和生物材料相结合制备的可控释放NO的材料如可注射水凝胶、电纺丝材料等已经在动物模型中展示出良好的应用前景。

针对目前常用的NO类药物稳定性差、易自发分解等缺点,Wu等^[68]通过分子设计,合成了半乳糖保护的氮烯醇类NO供体化合物,实现了NO的“可控”“按需”释放。我们课题组进一步将该类NO供体化合物与生物材料(多糖、多肽等)结合,制备了具有可控释放NO功能的生物材料^[69,70],并成功用于不同类型缺血性疾病治疗,包括心肌梗死^[71]、下肢缺血^[69,72,73]、心力衰竭^[74,75]等,对于疾病模型下血管稳态的调控、血管损伤性疾病的治疗具有重要意义^[76,77]。

深入研究发现,内源性半乳糖苷酶会导致一定程度的NO非特异性释放,针对这一问题,我们利用化学生物学“凸凹互补”原理设计制备了一氧化氮靶向递送系统,从而可以将NO精准递送至病灶部位。首先,通过对半乳糖分子6-O位进行甲基化修饰,合成了不被内源性半乳糖苷酶识别的“非天然”糖。同时,筛选了一种来自A4嗜热菌的热稳定半乳糖苷酶(A4- β -Gal)并进行工程化改造,获得了能够水解甲基化NO化合物的突变酶(A4- β -GalH363A)。这种新型的NO递送系统有效解决了内源性酶导致的NO非特性释放和由此引发的副作用。将这种“凸凹互补”的一氧化氮递送体系应用于大鼠下肢缺血模型及小鼠急性肾缺血(acute kidney injury, AKI)模型,靶向NO递送能够更加有效地促进血管新生并恢复大鼠下肢的血流灌注,促进AKI小鼠的肾脏组织修复并有效改善肾脏功能^[78]。我们进一步利用该递送系统,通过模拟天然血管内皮释放NO的功能,构建了仿生功能化人工血管,有效改善了材料表面的抗凝血性能,提高了人工血管的通畅性^[79]。

受硝酸酯类药物的启发,我们设计制备了一

类硝酸酯功能化修饰的可降解聚合物材料,其可以在体内通过多步反应转化生成NO。从而将小分子药物转化为一类具有治疗功能的生物材料^[80]。在此基础上,我们利用静电纺丝技术制备了硝酸酯功能化心肌补片,分别在大鼠和猪的心梗模型中应用了该补片。补片可利用心肌梗死区域低氧和酸性微环境加速转化产生NO,有效发挥NO的心肌保护功能,并促进梗死心肌的修复再生。同小分子硝酸酯类药物相比,该补片材料可在心肌组织原位转化形成NO,从而更好地发挥心脏保护功能。同时,还可以有效解决小分子硝酸酯药物全身递送导致的反射性心动过速和低血压等不良反应^[81]。

血管旁路移植术(bypass grafting)是目前治疗冠心病和外周血管疾病的重要手段,临床上亟需发展用于替代自体血管的人工血管。动物(猪)来源的天然血管可经过去细胞化处理消除免疫原性,并保留良好的细胞外基质结构。我们将其与硝酸酯功能材料结合,设计了一种具有缓释一氧化氮功能的生物复合型人工血管。在小鼠和兔子血管移植模型中,复合人工血管局部释放的NO可以有效改善血管组织再生,促进内皮形成,并抑制内膜增生和血管钙化等病理性血管重构,显著提高血管的长期通畅性。研究结果充分证明,NO能够通过调控血管干/祖细胞命运改善血管组织再生,这种缓释NO的生物复合型人工血管具有良好的临床转化前景^[82]。

2.2.3 同时具有ROS清除和NO递送双重功能的生物材料

临床研究表明,在急性肺损伤患者中,吸入NO气体可以显著扩张肺循环,改善通气灌注比和氧合,但这种作用是短暂的,仅能持续几天。吸入的NO首先遇到局部高浓度的ROS,ROS可以清除NO并氧化可溶性鸟苷酸环化酶受体。第一代NO供体(如有机硝酸酯)需要酶激活,导致其具有耐受性,在疾病的氧化和炎症条件下发挥作用受到限制。并且,长期使用有机硝酸盐治疗会导致内皮功能障碍。最近的研究提出,心脏中ROS和RNS之间的不平衡会造成NO信号通路受损,进而导致心血管系统衰竭。ROS可以通过氧化蛋白质中与NO反应的位点或其他影响NO结合的位点抑制NO发挥

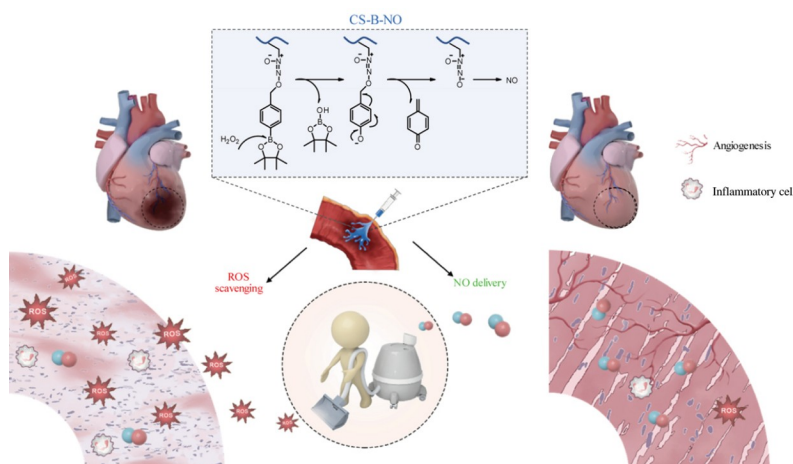


图4 具有清除ROS和释放NO双重功能的可注射水凝胶CS-B-NO治疗I/R心肌损伤示意图

作用^[83]。此外,过量的ROS可直接与NO发生反应,产生一种强效氧化剂过氧亚硝酸,介导非蛋白和蛋白巯基的氧化,并增加线粒体中相关蛋白酪氨酸的硝化^[84]。酪氨酸的硝化会改变体外蛋白质的功能,损害细胞功能。

因此,将NO供体与其他作用结合,如清除ROS、协同抑制氧化酶、使用四氢生物蝶呤(BH4)或NOHA偶联NOS和直接激活下游信号通路以绕过NO清除反应等,为疾病的治疗提供了新的机遇。

近年来,NO具有重要的心肌保护作用,利用生物材料局部可控递送NO可有效改善心肌梗死后的组织修复再生。针对心肌缺血/再灌注损伤后的病理学特征,我们设计了一种硼酸酯基团保护的氮烯醇供体分子,其可以与ROS反应并分解释放NO。进一步将该前药分子与壳聚糖载体材料结合,制备成可注射水凝胶。在小鼠心肌缺血再灌注损伤模型中应用该水凝胶,能够有效调节缺血再灌注损伤后的ROS/NO失衡,进而抑制心肌缺血损伤、减少心肌细胞凋亡,促进血管新生并改善心脏重构(图4)^[85]。

Chen等^[86]制备了一种既能释放生物活性物质姜黄素又能释放NO的复合水凝胶。其中姜黄素具有抗炎、抗氧化以及抗凋亡的特性,而NO能够促进血管生成。在谷胱甘肽作用下,将姜黄素/多肽(Cur-FFE-ss-ERGD)和Nap-FFGGG-NO以4:1的比例组装成凝胶。该水凝胶通过水解姜黄素与肽段之间的酯键持续释放低浓度姜黄素,并在 β -半乳糖苷酶催化下可控释放NO。体内研究表明,经心肌内

注射后该水凝胶能够抑制ROS相关的p38/NF- κ B通路,降低MMPs和TGF- β 1的表达,上调SIRT1的表达,显著减少胶原沉积,改善心功能,抑制不良心肌重构。

3 总结与展望

细胞内NO/ROS氧化还原平衡为其发挥正常功能提供了稳定的微环境,已有大量证据表明自由基(ROS/RNS)参与了心血管疾病、肿瘤等病理生理过程。自1980年Robert Furchgott首次发现EDRF后,人们逐渐意识到这种气体分子在体内发挥的重要作用。NO也为其他内源性气体信号分子,如一氧化碳(CO)和硫化氢(H_2S)等的研究打开了大门。内皮eNOS来源的NO主要通过sGC/cGMP信号通路参与维持细胞、内皮稳态等生理过程。ROS和NO在LDL氧化、内皮细胞活化、巨噬细胞浸润/活化等过程中发挥着相反的作用。同时,心血管危险因素也会导致内皮NO的产生减少,并促进NADPH氧化酶、XO、线粒体和解耦联eNOS等来源的ROS的产生。

随着人们逐渐意识到NO在生理及病理生理过程中发挥的关键作用,近年来已研发出多种新型NO供体化合物和基于生物材料的NO递送系统,用于不同类型疾病的治疗。这些材料能够实现NO的可控释放,有些还具有响应并清除ROS功能,能够调节病理微环境的ROS/NO失衡,发挥更好的治疗效果。与此同时,现有的研究也存在实验模型造模时间较短、临床意义较小以及长期稳定给药等

问题, 需要结合作用机制研究进一步优化, 以更好满足临床应用的需求。

参考文献

- [1] Pajares M, Jiménez-Moreno N, Dias IHK, et al. Redox control of protein degradation. *Redox Biol*, 2015, 6: 409-420
- [2] Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative stress. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86(1): 715-748
- [3] Jones DP, Go YM. Redox compartmentalization and cellular stress. *Diabetes Obesity Metab*, 2010, 12: 116-125
- [4] Meng J, Lv Z, Zhang Y, et al. Precision redox: the key for antioxidant pharmacology. *Antioxid Redox Signal*, 2021, 34(14): 1069-1082
- [5] Takahashi K, Okumura H, Guo R, et al. Effect of oxidative stress on cardiovascular system in response to gravity. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7): 1426
- [6] Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biol Med*, 2013, 60: 1-4
- [7] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(1): 44-84
- [8] Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch Eur J Physiol*, 2010, 459(6): 923-939
- [9] Li H, Horke S, Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2014, 237(1): 208-219
- [10] Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*, 2017, 120(4): 713-735
- [11] Santillo M, Colantuoni A, Mondola P, et al. NOX signaling in molecular cardiovascular mechanisms involved in the blood pressure homeostasis. *Front Physiol*, 2015, 6: 194
- [12] García-Redondo AB, Aguado A, Briones AM, et al. NADPH oxidases and vascular remodeling in cardiovascular diseases. *Pharmacol Res*, 2016, 114: 110-120
- [13] Nishino T, Okamoto K, Eger BT, et al. Mammalian xanthine oxidoreductase-mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J*, 2008, 275(13): 3278-3289
- [14] Landmesser U, Spiekermann S, Preuss C, et al. Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(4): 943-948
- [15] McNally JS, Davis ME, Giddens DP, et al. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circulatory Physiol*, 2003, 285(6): H2290-H2297
- [16] Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest*, 1993, 91(6): 2546-2551
- [17] Guthikonda S, Sinkey C, Barenz T, et al. Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers. *Circulation*, 2003, 107(3): 416-421
- [18] Schröder K, Vecchione C, Jung O, et al. Xanthine oxidase inhibitor tungsten prevents the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice fed a Western-type diet. *Free Radical Biol Med*, 2006, 41(9): 1353-1360
- [19] Nomura J, Busso N, Ives A, et al. Xanthine oxidase inhibition by febuxostat attenuates experimental atherosclerosis in mice. *Sci Rep*, 2014, 4(1): 4554
- [20] Peoples JN, Saraf A, Ghazal N, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. *Exp Mol Med*, 2019, 51(12): 1-13
- [21] Wang Y, Wang GZ, Rabinovitch PS, et al. Macrophage mitochondrial oxidative stress promotes atherosclerosis and nuclear factor- κ B-mediated inflammation in macrophages. *Circ Res*, 2014, 114(3): 421-433
- [22] Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M, et al. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *J Biol Chem*, 2006, 281(44): 33789-33801
- [23] Ballinger SW, Patterson C, Knight-Lozano CA, et al. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation*, 2002, 106(5): 544-549
- [24] Balligand JL, Feron O, Dessy C. eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev*, 2009, 89(2): 481-534
- [25] Farah C, Michel LYM, Balligand JL. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(5): 292-316
- [26] Maron BA, Tang SS, Loscalzo J. S-Nitrosothiols and the S-nitrosoproteome of the cardiovascular system. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18(3): 270-287
- [27] Martinez-Ruiz A, Lamas S. Detection and proteomic identification of S-nitrosylated proteins in endothelial cells. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 423(1): 192-199
- [28] Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol*, 2000, 190(3): 244-254
- [29] Li H, Förstermann U. Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(27): 3133-3145
- [30] Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 2012, 33(7): 829-837
- [31] Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, et al. Accelerated

- atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation*, 2001, 104(4): 448-454
- [32] Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, et al. Over-expression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*, 2002, 110(3): 331-340
- [33] Kuhn V, Diederich L, Keller Iv TCS, et al. Red blood cell function and dysfunction: redox regulation, nitric oxide metabolism, anemia. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 26(13): 718-742
- [34] Yang J, Gonon AT, Sjöquist PO, et al. Arginase regulates red blood cell nitric oxide synthase and export of cardioprotective nitric oxide bioactivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(37): 15049-15054
- [35] Melikian N, Seddon MD, Casadei B, et al. Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation. *Trends Cardiovasc Med*, 2009, 19(8): 256-262
- [36] Lekontseva O, Chakrabarti S, Jiang Y, et al. Role of neuronal nitric-oxide synthase in estrogen-induced relaxation in rat resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 339(2): 367-375
- [37] Trappanese DM, Liu Y, McCormick RC, et al. Chronic β 1-adrenergic blockade enhances myocardial β 3-adrenergic coupling with nitric oxide-cGMP signaling in a canine model of chronic volume overload: new insight into mechanisms of cardiac benefit with selective β 1-blocker therapy. *Basic Res Cardiol*, 2015, 110(1): 456
- [38] Hare J. Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35(7): 719-729
- [39] Pautz A, Art J, Hahn S, et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*, 2010, 23(2): 75-93
- [40] Bian K, Ke Y, Kamisaki Y, et al. Proteomic modification by nitric oxide. *J Pharmacol Sci*, 2006, 101(4): 271-279
- [41] Gunnett CA, Lund DD, McDowell AK, et al. Mechanisms of inducible nitric oxide synthase-mediated vascular dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(8): 1617-1622
- [42] Marfella R, Di Filippo C, Esposito K, et al. Absence of inducible nitric oxide synthase reduces myocardial damage during ischemia reperfusion in streptozotocin-induced hyperglycemic mice. *Diabetes*, 2004, 53(2): 454-462
- [43] Virdis A, Colucci R, Fornai M, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition improves vascular endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock: role of inducible nitric-oxide synthase and oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 312(3): 945-953
- [44] Mullick AE, Soldau K, Kiessses WB, et al. Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. *J Exp Med*, 2008, 205(2): 373-383
- [45] Lehoux S. Redox signaling in vascular responses to shear and stretch. *Cardiovasc Res*, 2006, 71(2): 269-279
- [46] Nowak WN, Deng J, Ruan XZ, et al. Reactive oxygen species generation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(5): e41
- [47] Xu S, Shriver AS, Jagadeesha DK, et al. Increased expression of nox1 in neointimal smooth muscle cells promotes activation of matrix metalloproteinase-9. *J Vasc Res*, 2012, 49(3): 242-248
- [48] Lee MY, Martin AS, Mehta PK, et al. Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH Oxidase 1 (Nox1) contribution to injury-induced neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(4): 480-487
- [49] Zhang Y, Choksi S, Chen K, et al. ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages. *Cell Res*, 2013, 23(7): 898-914
- [50] Xu Q, Choksi S, Qu J, et al. NADPH oxidases are essential for macrophage differentiation. *J Biol Chem*, 2016, 291(38): 20030-20041
- [51] Sun G, Gerecht S. Vascular regeneration: engineering the stem cell microenvironment. *Regenerative Med*, 2009, 4(3): 435-447
- [52] Xiao Q, Zeng L, Zhang Z, et al. Stem cell-derived Sca-1⁺ progenitors differentiate into smooth muscle cells, which is mediated by collagen IV-integrin $\alpha_1/\beta_1/\alpha_v$ and PDGF receptor pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292(1): C342-C352
- [53] Xiao Q, Luo Z, Pepe AE, et al. Embryonic stem cell differentiation into smooth muscle cells is mediated by Nox4-produced H₂O₂. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 296(4): C711-C723
- [54] Damy T, Ratajczak P, Shah AM, et al. Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet*, 2004, 363(9418): 1365-1367
- [55] Takimoto E, Champion HC, Li M, et al. Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. *J Clin Invest*, 2005, 115(5): 1221-1231
- [56] Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, et al. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(9): 755-768
- [57] Munzel T, Genth-Zotz S, Hink U. Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase. *Hypertension*, 2007, 49(5): 974-976

- [58] Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EHC, et al. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiologica*, 2009, 196(2): 193-222
- [59] Schmidt HHHM, Hofmann F, Stasch JP. Handbook of experimental pharmacology. cGMP generators, effectors and therapeutic implications. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(191): v-vi
- [60] Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 40(1): 16-23
- [61] Kim JS, Ohshima S, Padiaditakis P, et al. Nitric oxide: a signaling molecule against mitochondrial permeability transition- and pH-dependent cell death after reperfusion. *Free Radical Biol Med*, 2004, 37(12): 1943-1950
- [62] Kanno S, Lee PC, Zhang Y, et al. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase. *Circulation*, 2000, 101(23): 2742-2748
- [63] Duranski MR, Greer JJM, Dejam A, et al. Cytoprotective effects of nitrite during *in vivo* ischemia-reperfusion of the heart and liver. *J Clin Invest*, 2005, 115(5): 1232-1240
- [64] Dinapoli P, Taccardi A, Grilli A, et al. Chronic treatment with rosuvastatin modulates nitric oxide synthase expression and reduces ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Cardiovasc Res*, 2005, 66(3): 462-471
- [65] Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med*, 2003, 9(4): 160-168
- [66] Li Z, Zhu D, Hui Q, et al. Injection of ROS-Responsive hydrogel loaded with basic fibroblast growth factor into the pericardial cavity for heart repair. *Adv Funct Mater*, 2021, 31(15): 2004377
- [67] Heiss C, Meyer C, Totzeck M, et al. Dietary inorganic nitrate mobilizes circulating angiogenic cells. *Free Radical Biol Med*, 2012, 52(9): 1767-1772
- [68] Wu X, Tang X, Xian M, et al. Glycosylated diazeniumdiolates: a novel class of enzyme-activated nitric oxide donors. *Tetrahedron Lett*, 2001, 42(23): 3779-3782
- [69] Zhao Q, Zhang J, Song L, et al. Polysaccharide-based biomaterials with on-demand nitric oxide releasing property regulated by enzyme catalysis. *Biomaterials*, 2013, 34(33): 8450-8458
- [70] Gao J, Zheng W, Zhang J, et al. Enzyme-controllable delivery of nitric oxide from a molecular hydrogel. *Chem Commun*, 2013, 49(80): 9173-9175
- [71] Yao X, Liu Y, Gao J, et al. Nitric oxide releasing hydrogel enhances the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells for myocardial infarction. *Biomaterials*, 2015, 60: 130-140
- [72] Du W, Zhang K, Zhang S, et al. Enhanced proangiogenic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by a nitric oxide releasing polymer. *Biomaterials*, 2017, 133: 70-81
- [73] Zhang K, Chen X, Li H, et al. A nitric oxide-releasing hydrogel for enhancing the therapeutic effects of mesenchymal stem cell therapy for hindlimb ischemia. *Acta BioMater*, 2020, 113: 289-304
- [74] Liu Q, Ji G, Chu Y, et al. Enzyme-responsive hybrid prodrug of nitric oxide and hydrogen sulfide for heart failure therapy. *Chem Commun*, 2022, 58(53): 7396-7399
- [75] Zhou X, Wang H, Zhang J, et al. Functional poly(ϵ -caprolactone)/chitosan dressings with nitric oxide-releasing property improve wound healing. *Acta BioMater*, 2017, 54: 128-137
- [76] Midgley AC, Wei Y, Li Z, et al. Nitric-oxide-releasing biomaterial regulation of the stem cell microenvironment in regenerative medicine. *Adv Mater*, 2020, 32(3): 1805818
- [77] Zhou X, Zhang J, Feng G, et al. Nitric oxide-releasing biomaterials for biomedical applications. *Curr Med Chem*, 2016, 23(24): 2579-2601
- [78] Hou J, Pan Y, Zhu D, et al. Targeted delivery of nitric oxide via a 'bump-and-hole'-based enzyme-prodrug pair. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(2): 151-160
- [79] Wei Y, Jiang H, Chai C, et al. Endothelium-mimetic surface modification improves antithrombogenicity and enhances patency of vascular grafts in rats and pigs. *JACC Basic Transl Sci*, 2023. doi: 10.1019/j.jacbts.2022.12.009
- [80] 赵强. 一种硝酸酯可降解生物活性材料及其制备方法与应用: ZL201810739149.X[P]. 2019-10-18
- [81] Zhu D, Hou J, Qian M, et al. Nitrate-functionalized patch confers cardioprotection and improves heart repair after myocardial infarction via local nitric oxide delivery. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4501
- [82] Wang F, Qin K, Wang K, et al. Nitric oxide improves regeneration and prevents calcification in bio-hybrid vascular grafts via regulation of vascular stem/progenitor cells. *Cell Rep*, 2022, 39(12): 110981
- [83] Hare JM, Stamler JS. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest*, 2005, 115(3): 509-517
- [84] Yakovlev VA, Mikkelsen RB. Protein tyrosine nitration in cellular signal transduction pathways. *J Receptors Signal Transduction*, 2010, 30(6): 420-429
- [85] Hao T, Qian M, Zhang Y, et al. An injectable dual-function hydrogel protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by modulating ROS/NO disequilibrium. *Adv Sci*, 2022, 9(15): 2105408
- [86] Chen G, Li J, Song M, et al. A mixed component supramolecular hydrogel to improve mice cardiac function and alleviate ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Adv Funct Mater*, 2017, 27(34): 1701798