

花生四烯酸细胞色素 P450 表氧化酶代谢产物 环氧二十碳三烯酸生物学作用

唐杨烽综述 徐志云审校

【摘要】 对于花生四烯酸经细胞色素 P450 表氧化酶作用生成的环氧二十碳三烯酸 (EETs), 最初在心血管及肾脏系统中被广泛研究, 并发现 EETs 的舒张血管、抑制血小板的聚集、抑制血管平滑肌细胞的炎症反应及平滑肌细胞的迁移、增强纤维蛋白的溶解等作用, 为预防及治疗许多心血管疾病如高血压、动脉粥样硬化等提供了新的研究方向。近来研究发现 EETs 具有促进机体肿瘤细胞的增殖、迁移等作用, 其有可能使 EET 成为肿瘤治疗的新靶点。深入研究 EETs 的生物学作用及其作用机制, 将为临床治疗某些疾病提供新的思路。

【关键词】 花生四烯酸; 细胞色素 P450 表氧化酶; 环氧二十碳三烯酸; 血管调控

DOI: 10.3969/j.issn.1673-6583.2010.02.013

花生四烯酸经细胞色素 P450 (cytochrome P-450, CYP450) 表氧化酶作用生成环氧二十碳三烯酸 (EETs), EETs 在机体中主要经可溶性的环氧化物水解酶 (sEH) 的作用而被快速代谢转变成相应的二氢二十碳三烯酸 (DHETs)。目前研究已经表明 EETs 具有舒张血管、调节离子通道、抗炎、促进新生血管形成、调节细胞增殖、促进多肽激素的释放以及促进机体肿瘤细胞的增殖、迁移等作用, 并对其作用机制进行了相关研究, 提出 EETs 存在细胞膜受体和细胞内 2 种不同的作用机制。本文对 EETs 的生成、代谢、生物学作用及其作用机制进行探讨。

在正常生理状态下游离的花生四烯酸水平很低, 但当细胞膜受到各种刺激时, 花生四烯酸便从细胞膜的磷脂池中释放出来, 然后在细胞内质网中的细胞色素 P450 表氧化酶主要是 CYP2C 和 CYP2J 家族的作用下生成 4 种 EETs, 虽然各种表氧化酶均能催化花生四烯酸形成 4 种 EETs, 但多数情况下主要产物是 11, 12-和 14, 15-EET^[1,2]。内皮细胞中所表达的 CYP2C9 和 CYP2J2 是血管系统中 EETs 的主要来源; 缓激肽或乙酰胆碱刺激能使内皮细胞中 EET 的生成量增加 2~5 倍; 应激情况下也能促进内皮细胞 EET 的合成^[3]。

1 EETs 的生物学作用

EETs 在不同的组织及细胞中有多种不同的生物学作用。在血管平滑肌细胞中, 其能引起血管的

舒张及抑制细胞迁移; 在内皮细胞中具有抗炎、促进新生血管形成、促进溶解纤维蛋白的表达及调节钙离子信号通道的作用; 此外, 其还能促进肾小管及肾小球膜细胞的有丝分裂、诱发支气管的扩张、抑制血小板黏附、影响心肌细胞的预激性及多肽类激素的释放; 最近研究表明其还具有促进肿瘤细胞增殖、侵蚀及转移等作用。

1.1 扩张血管作用

EETs 在内皮细胞通过花生四烯酸代谢产生, 通过增加钙离子敏感的钾通道的开放程度, 使血管平滑肌细胞超极化而产生内皮依赖性血管舒张反应^[4]。体外试验发现 10 pM 的 14, 15-EET 就能有效扩张离体冠状微血管^[5], 表明 EETs 舒张血管作用的存在; 采用细胞色素 P450 (CYP) 酶抑制剂或钙离子敏感的钾通道开放阻滞剂可阻止 EETs 引起的血管超极化舒张反应^[6]。这些研究说明 EETs 的特征与超极化因子 (EDHF) 非常相似, 因此认为 EETs 就是一种 EDHF, 对包括冠状血管在内的许多血管床都发挥着重要作用。

1.2 对离子通道的调节作用

1.2.1 钾离子通道 研究表明, 几种 EETs 均可促进不同血管平滑肌细胞膜的 BK_{Ca} 通道开放, 使血管平滑肌细胞发生超极化作用, 从而发挥扩血管效应, 采用膜片钳技术证实 EDHF 开通冠脉血管平滑肌细胞膜 BK_{Ca} 通道从而发挥超极化作用。研究还发现 EETs 在其他组织中也能激活 BK_{Ca} 通道; 如在血小板中激活 BK_{Ca} 通道减少血小板对内皮细胞的

黏附^[7],激活气道中的 BK_{Ca} 通道,使平滑肌细胞超极化而舒张气道^[8,9]。EETs 能通过激活心肌细胞内的线粒体 ATP 敏感性钾通道,从而调节心肌细胞的电生理特性、舒缩功能及保护心肌的缺血-再灌注损伤等^[10-12]。但 EETs 对体内其他类型的钾离子通道是否有影响,尚待进一步研究。

1.2.2 钙离子通道 EETs 可调节 L 型钙通道的活性。用全细胞膜片钳技术发现,CYP450 抑制剂可减少大鼠心室肌细胞钙离子流;而细胞外给予 11,12-EET 增加细胞钙电流。因而认为 CYP450 可能通过生成 EETs,进而引起细胞内 cAMP 的含量增加,增加钙离子流,提示 EETs 可以增加钙通道活性。此外,研究还发现 EETs 能激活瞬时型感受器电位(TRPV4)钙离子通道,形成钙离子信号复合物来发挥扩血管效应^[13,14]。但有研究将 L 型钙通道重建入脂质双分子层,观察 EETs 对其影响时,发现 EETs 可直接抑制 L 型钙通道的活性,具体表现为抑制 L 型钙通道的开放率,在去极化时加速通道失活,减少已开放的 L 型钙通道电流幅度。目前 EETs 对钙通道是抑制还是激活,或是否存在剂量依赖性,值得进一步探讨。

1.2.3 其他离子通道 EETs 还能影响其他的离子通道,如 EETs 能抑制心肌细胞的钠离子通道;用微电极技术测定在气道平滑肌细胞 5,6-EET 和 11,12-EET 所引起的超极化中的氯离子电导,结果显示 EETs 直接抑制钙离子敏感性氯离子通道^[15]。

1.3 抗炎作用

研究发现,EETs 在内皮细胞中主要通过抑制细胞因子及脂多糖(LPS)介导的核因子- κ B(NF- κ B)的转录及 I κ B 激酶的活化、减少肿瘤坏死因子介导的血管细胞黏附分子-1 以及细胞间黏附分子、E 选择素的表达,从而抑制单核细胞对血管壁的黏附来发挥抗炎作用。Spiecker 等^[16]的研究也证实了 EETs 在机体具抗炎作用。然而,不同类型的 EETs 对组织的抗炎作用存在一定的差异,并且 EETs 发挥抗炎作用可能存在剂量依赖性。在生理条件下,EETs 在机体抗炎中的重要性还存在疑问。

1.4 促进新生血管的形成

目前对 EETs 在促进新生血管形成研究发现,介导此过程的信号途径依赖于不同物种及不同类型的内皮细胞而定。对人体脐静脉内皮细胞在 CYP2C9 过度表达或加入外源性 11,12-EET 的研究发现,其新生血管的形成机制包括促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)磷酸酯酶-1 的激活抑制 c-Jun

氨基端激酶、上调细胞周期蛋白 D1 和促进细胞增殖^[17,18]。另,11,12-EET 促血管形成的机制还涉及激活磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)磷酸化、抑制转录因子 FOXO1 和 FOXO3a 表达,减少细胞周期蛋白激酶抑制剂 P27Kipl 生成,以及包括表皮生长因子受体磷酸化、cAMP-PKA(蛋白激酶 A)的激活、COX-2 介导前列腺素的合成等机制参与^[19]。用 11,12-EET 对猪的冠状内皮细胞研究发现,丝裂原活化蛋白激酶(ERK1/2)的磷酸化也参与新生血管的形成,这与以前研究发现的 11,12-EET 在猪的主动脉内皮细胞中能激活酪氨酸激酶相一致。

1.5 调节细胞增殖

许多研究认为花生四烯酸 CYP 代谢产物是一种有丝分裂原或其他致分裂因子的调节剂,对调节细胞增殖发挥重要作用。表皮生长因子(EGF)是一种强大的表皮细胞有丝分裂原,Chen 等^[20]研究发现,EETs 促进肝素结合性 EGF 的卵裂,参与 EGF 诱导的细胞有丝分裂过程;并且还发现 EETs 通过 Src 激酶激活促发一系列酪氨酸激酶信号级联放大效应、金属蛋白酶的激活及抑制内皮细胞的凋亡等机制促进细胞增殖。通过感染了能高效表达 EETs 的 CYP 表氧化酶的 LLCKPc14 细胞研究发现,PI3K/Akt 途径也参与 14,15-EET 抑制细胞凋亡的发生,并提出在表达高水平 CYP 表氧化酶的细胞中 PLA2(磷脂酶 A2)-花生四烯酸-EET 途径是一种重要的细胞内信号传导途径。14,15-EET 及 8,9-EET 也能刺激小鼠肾小球基底细胞的有丝分裂,但此过程中除了上述机制,还有 Na⁺/H⁺ 交换通道激活的参与。对猪的主动脉和鼠的脑微血管平滑肌细胞研究发现,14,15-EET 可以抑制前列腺素 E 的合成,8,9-EET 也有微弱效应,而 11,12-EET 和 5,6-EET 则无此作用,认为 14,15-EET 可以抑制血管平滑肌细胞中猪生长激素合成酶的活性,减少前列腺素 E2 的生成并加强血小板源性生长因子(PDGF)诱导的平滑肌细胞的增殖反应,提示 14,15-EET 通过竞争性抑制猪生长激素合成酶的活性而影响平滑肌细胞的增殖。

1.6 其他

除此以外,EETs 还能刺激许多多肽类激素的释放,如 5,6-EET 及 14,15-EET 能促进生长激素从下丘脑神经元中释放出来;CYP2J2 和内源性的 EETs 存在于内分泌腺,提示 EETs 也可能参与胰腺激素的分泌过程;11,12-EET 通过 cAMP-

PKA 信号途径抑制鼠的主动脉平滑肌细胞的迁移^[21]; Jiang 等^[22]研究已证实表氧化酶 CYP 2J2 在人类肿瘤组织中选择性的高表达, 转染 CYP2J2 和外源性 EETs 能非常显著地促进肿瘤增殖, 表氧化酶抑制剂和转染反义 2J2 则非常显著地抑制肿瘤增殖; CYP2J2 的促肿瘤增殖作用与 EGFR、MAPK 及 PI3K 的激活有关; 还发现 CYP2J2 和 EETs 通过上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xL 的表达和抑制凋亡蛋白 Bax 的表达防止肿瘤细胞凋亡; CYP2J2 和 EETs 能明显促进肿瘤的迁移和侵袭生长。但是具体的作用机制目前还不是很清楚。另外 11, 12-EET 还能通过 cAMP 启动子促进 tPA 基因的表达, 增强纤维蛋白的溶解作用。

2 EETs 的作用机制

EETs 作用机制可能是膜受体机制: 即 EETs 与细胞膜上的相应受体结合从而激活细胞内的信号传导通路; 另一种是细胞内作用机制: EETs 或是刚被整合到磷脂中的 EETs 直接作用于离子通道、信号传导复合物或是转录因子而发挥作用。亦有可能两种机制同时存在。

2.1 EET 的膜受体机制

血浆中的 EETs 与细胞膜 EET 受体结合后激活相应的信号传导通路, 从而调节离子通道或基因的表达, 实现相应细胞特性及功能的改变。Wong 等^[23]对具有高亲和性的与 14(R), 15(S)-EET 相结合的细胞表面蛋白位点的人类 U937 细胞的研究证实了这种机制的存在; 并且还发现猪的单核细胞表面也含有与 14, 15-EET 高亲和力结合的蛋白位点, 两者结合后能增加细胞内 cAMP 的含量和激活蛋白激酶 A(PKA), 从而调节相关受体的表达; 另外, 11, 12-EET 激活 BK_{Ca} 通道和 tPA 表达, 主要通过 G 蛋白偶联受体 GTP 结合蛋白介导途径^[24]; 11, 12-EET 也能激活 cAMP-PKA 信号传导途径, 且此途径同时也能刺激 COX-2 的表达^[25]。

除了 Gas-cAMP-PKA 途径以外, 在不同的生理条件下还有其他许多信号通路的存在。如酪氨酸激酶串联、Src 激酶、MAPK 及 PI3K/Akt 途径介导 EETs 在内皮细胞、动脉平滑肌细胞、肾小球基底膜细胞、肾小管上皮细胞及心肌细胞中的作用^[26, 27]; 同时 11, 12-EET 在内皮细胞中的抗炎作用主要是通过抑制细胞因子活化 NF- κ B 介导的转录过程来实现。但是目前 EET 膜受体尚未得到最终确定。

2.2 EET 的细胞内作用机制

EETs 可能进入到细胞内后直接干扰细胞内的

效应受体而发挥相应的生物学作用。细胞内的 EETs 可能由细胞从外界摄取, 或是从含 EET 的磷脂上水解下来, 或是由细胞内的花生四烯酸经 CYP 表氧化酶代谢而来。细胞内的 EET 可能直接作用于脂肪酸结合蛋白(FABP)、离子通道或是转录因子而产生效应, 或是磷脂中的 EET 影响膜蛋白或磷脂介导的信号传导通路来发挥相应效应。目前对 EET 的细胞内作用机制进行了相关的研究。将内皮细胞中磷脂上 EET 进行放射标记, 然后加入钙离子载体 A-23187, 在 20 min 以后才能在细胞外液中检测到相应的 EET^[5], 这表明从磷脂上释放下来的 EET 需要在细胞质中停留至少 20 min 以后才会被逐渐释放到细胞外液中去。并且研究还发现, 细胞对 EET 摄取速度非常快, 使其在细胞内的含量短时间内快速上升。将细胞外的 14, 15-EET 整合到血管平滑肌细胞的磷脂中只需要 3 min。EET 在细胞内能直接影响细胞内蛋白的合成, Lu 等通过膜片钳技术证实 EETs 能干扰心肌细胞内的 Na⁺/K⁺ 敏感性的 ATP 通路(K_{ATP})^[11], 并且还在 K_{ATP} 离子通路中检测出了 EET 的结合位点^[12]; 除此以外人们还发现在细胞内的 FABPs 及过氧化物酶体增生物激活受体 γ (PPAR γ)上也存在 EETs 的结合位点^[28]。所有这些均支持 EETs 细胞内作用机制的存在, 有待进一步研究证实。

3 结论及展望

虽然对花生四烯酸的 CYP450 表氧化酶及其作用产物 EETs, 在机体中的代谢过程及生物学作用有了许多认识, 但是仍有许多值得研究的问题: 如 CYP 表氧化酶的多态性对 EETs 代谢及其生物学作用有何影响? 如何运用现代分子生物学技术, 如基因的过度表达或基因的敲除寻找稳定的 EET 受体激动剂或拮抗剂, 从而有助于我们对 EETs 的一些重要生物学作用的研究? 对于近年来研究发现的 EETs 具有促进机体肿瘤细胞增殖、迁移等作用研究, 也有可能使 EET 成为肿瘤的治疗的新靶点。深入研究 EETs 将为临床治疗某些疾病提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology[J]. Science, 2001, 294(5548): 1871-1875.
- [2] Capdevila JH, Falck JR, Harris RC. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation: molecular and functional properties of arachidonic acid monooxygenases[J]. J Lipid Res, 2000, 41(2): 163-181.

- [3] Huang A, Sun D, Jacobson A, et al. Epoxyeicosatrienoic acid are released to mediate shear-stress-dependent hyperpolarization of arteriolar smooth muscle[J]. *Circ Res*, 2005, 96(3): 376-383.
- [4] Spector AA, Fang X, Snyder GD, et al. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function[J]. *Prog Lipid Res*, 2004, 43(1):55-90.
- [5] Fang X, Kaduce TL, Weintraub NL, et al. Pathways of epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells. Implications for the vascular effects of soluble epoxide hydrolase inhibition[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(18): 14867-14874.
- [6] Gauthier KM, Deeter C, Krishna UM, et al. 14,15-Epoxyeicos-5(Z)-enoic acid; a selective epoxyeicosatrienoic acid antagonist that inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in coronary arteries[J]. *Circ Res*, 2002, 90(9):1028-1036.
- [7] Kreutz F, Rixinger T, Buerkle MA, et al. Membrane potential-dependent inhibition of platelet adhesion to endothelial cells by epoxyeicosatrienoic acids[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(3): 595-600.
- [8] Benoit C, Renaudon B, Salvail D, et al. EETs relax airway smooth muscle via an EpDHF effect; BKCa channel activation and hyperpolarization[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 280(5): L965-L973.
- [9] Dumoulin M, Salvail D, Gaudreault SB, et al. Epoxyeicosatrienoic acids relax airway smooth muscles and directly activate reconstituted KCa channels[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 1998, 275(3): L423-L431.
- [10] Seubert J, Yang B, Bradbury JA, et al. Enhanced postischemic functional recovery in CYP2J2 transgenic hearts involves mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and p42/p44 MAPK pathway[J]. *Circ Res*, 2004, 95(5): 506-514.
- [11] Lu T, Hoshi T, Weintraub NL, et al. Activation of ATP-sensitive K⁺ channels by epoxyeicosatrienoic acids in rat cardiac ventricular myocytes[J]. *J Physiol*, 2001, 537(3): 881-827.
- [12] Lu T, Hong MP, Lee HC. Molecular determinants of cardiac KATP channel activation by epoxyeicosatrienoic acids[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(19):19097-19104.
- [13] Earley S, Heppner TJ, Nelson MT, et al. TRPV4 forms a novel Ca²⁺ signaling complex with ryanodine receptors and BKCa channels[J]. *Circ Res*, 2005, 97(12):1270-1279.
- [14] Falck JR, Krishna UM, Reddy YK, et al. Comparison of vasodilator properties of 14,15-EET analogs: structural requirements for dilation[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 284(1):H337-H349.
- [15] Salvail D, Cloutier M, Rousseau E. Functional reconstitution of an eicosanoid modulated Cl⁻ channel from bovine tracheal smooth muscle[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 282(3): C567-C577.
- [16] Spiecker M, Liao JK. Vascular protective effects of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 433(2):413-420.
- [17] Fleming I, Busse R. Endothelium-derived epoxyeicosatrienoic acids and vascular function[J]. *Hypertension*, 2006, 47(4): 629-633.
- [18] Newman JW, Morisseau C, Hammock BD. Epoxide hydrolases: their role and interactions with lipid metabolism[J]. *Prog Lipid Res*, 2005, 44(1):1-51.
- [19] Michaelis UR, Falck JR, Schmidt R, et al. Cytochrome P450C9-derived epoxyeicosatrienoic acids induce the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(2):321-326.
- [20] Chen JK, Capdevila J, Harris RC. Heparin-binding EGF-like growth factor mediates the biological effects of P450 arachidonate epoxygenase metabolites in epithelial cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002 99(9):6029-6034.
- [21] Sun J, Sui X, Bradbury JA, et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell migration by cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids [J]. *Circ Res*, 2002 90(9): 1020-1027.
- [22] Jiang JG, Chen CL, Wang DW, et al. Cytochrome P450 2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells and is up-regulated in human tumors[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(11):4707-4715.
- [23] Wong PY, Lai PS, Falck JR. Mechanism and signal transduction of 14(R), 15(S)-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) binding in guinea pig monocytes[J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2000, 62(4):321-333.
- [24] Fukao M, Mason HS, Kenyon JL, et al. Regulation of BKCa channels expressed in human embryonic kidney 293 cells by epoxyeicosatrienoic acid[J]. *Mol Pharmacol*, 2001, 59(1): 16-23.
- [25] Michaelis UR, Fisslthaler B, Barbosa-Sicard E, et al. Cytochrome P450 epoxygenases 2C8/9-derived are implicated in hypoxia-induced endothelial cell migration and angiogenesis[J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(23):5489-5498.
- [26] Pozzi A, Macias-Perez I, Abair T, et al. Characterization of 5,6- and 8,9-epoxyeicosatrienoic acids (5,6- and 8,9-EET) as potent in vivo angiogenic lipids[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(29):27138-27146.
- [27] Wang Y, Wei X, Xiao X, et al. Arachidonic acid epoxygenase metabolites stimulate endothelial cell growth and angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 314(2):522-532.
- [28] Widstrom RL, Norris AW, Spector AA. Binding of cytochrome P450 monooxygenase and lipoxygenase pathway products by heart fatty acidbinding protein[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(4):1070-1076.

(收稿:2009-12-03 修回:2010-02-02)

(本文编辑:金谷英)