

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.001941

14,15-DHET 对牛主动脉内皮细胞中内皮型
一氧化氮合酶表达影响的研究左的于¹,夏 勇²,石云敏¹,皮强中¹,罗素新¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院心血管内科,重庆 400016;2. 美国俄亥俄州立大学心肺研究所,美国哥伦布 43210)

【摘要】目的:探讨 14,15-二羟基二十碳三烯酸(14,15-DHET)对牛主动脉内皮细胞中内皮型一氧化氮合酶表达以及血管形成的影响。**方法:**将牛主动脉内皮细胞(bovine aortic endothelial cells,BAECs)按照不同 14,15-DHET 处理浓度分组为 0(对照组)、0.1、0.5、1、5 $\mu\text{mol/L}$ 组,刺激时间均为 24 h;按照时间梯度分组为 0(对照组)、4、8、12、24 h,刺激浓度均为 5 $\mu\text{mol/L}$,检测其内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)的蛋白表达水平,同时将人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)按照不同 14,15-DHET 浓度分组为 0(对照组)和 5 $\mu\text{mol/L}$ (处理组),刺激 24 h 后观察 14,15-DHET 对血管形成的影响。**结果:**在浓度梯度组中用 0.1、0.5、1、5 $\mu\text{mol/L}$ 的 14,15-DHET 处理 BAECs 后细胞内 eNOS 蛋白表达水平(1.456 ± 0.008 , 2.202 ± 0.045 , 3.931 ± 0.170 , 4.588 ± 0.179)与对照组相比均明显升高($P < 0.05$);在时间梯度组中用 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 14,15-DHET 处理 BAECs 4、8、12、24 h 后细胞内 eNOS 蛋白表达水平(1.521 ± 0.021 , 1.922 ± 0.061 , 3.642 ± 0.173 , 4.813 ± 0.134)与对照组相比均明显升高($P < 0.05$);使用 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 14,15-DHET 刺激 HUVECs 后,处理组小管总长度和小管分枝总长度($13\,715.000 \pm 448.092$, $12\,538.000 \pm 574.182$)与对照组($10\,426.000 \pm 950.537$, $8\,672.000 \pm 1\,025.486$)相比均明显升高($P=0.043$, $P=0.035$)。**结论:**本研究结果表明 14,15-DHET 可以增加牛主动脉内皮细胞的 eNOS 蛋白表达,并且有促进血管形成的作用。

【关键词】14,15-二羟基二十碳三烯酸;牛主动脉内皮细胞;人脐静脉内皮细胞**【中图分类号】**R331.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-05-30Effect of 14,15-DHET on the expression of endothelial nitric oxide synthase
in bovine aortic endothelial cellsZuo Deyu¹, Xia Yong², Shi Yunmin¹, Pi Qiangzhong¹, Luo Suxin¹

(1. Division of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 2. Davis Heart and Lung Research Institute, Division of Cardiovascular Medicine of Department of Molecular and Cellular Biochemistry, The Ohio State University College of Medicine, Columbus)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of 14,15-DHET on the expression of endothelial nitric oxide synthase(eNOS) in bovine aortic endothelial cells(BAECs) and angiogenesis. **Methods:** According to the concentration of 14,15-DHET, BAECs were divided into 0(control group), 0.1, 0.5, 1, and 5 $\mu\text{mol/L}$ groups, with a stimulation time of 24 hours; according to the time gradient, BAECs were divided into 0(control group), 4, 8, 12, and 24 hours groups, with a stimulation concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$. The expression of eNOS was measured. Human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) were divided into control group and treatment group, with a concentration of 14,15-DHET of 0 and 5 $\mu\text{mol/L}$, respectively, and the effect of 14,15-DHET on angiogenesis was observed after 24 hours of stimulation. **Results:** As for concentration gradient, the 0.1, 0.5, 1, and 5 $\mu\text{mol/L}$ 14,15-DHET groups had an expression level of eNOS protein in BAECs of 1.456 ± 0.008 , 2.202 ± 0.045 , 3.931 ± 0.170 , and 4.588 ± 0.179 , respectively, which was significantly higher than that in the control group($P < 0.05$). As for time gradient, the 4, 8, 12, and 24 hours groups treated with 5 $\mu\text{mol/L}$ 14,15-DHET

had an expression level of eNOS protein in BAECs of 1.521 ± 0.021 , 1.922 ± 0.061 , 3.642 ± 0.173 , and 4.813 ± 0.134 , respectively, which was significantly higher than that in the control group($P < 0.05$). After HUVECs were stimulated by 5 $\mu\text{mol/L}$ 14,15-DHET, the treatment group had significantly longer total tubular length and total tubular branching length than the control group($13\,715.000 \pm 448.092$ and $12\,538.000 \pm 574.182$ vs. $10\,426.000 \pm 950.537$ and $8\,672.000 \pm 1\,025.486$, $P=0.043$ and 0.035). **Conclusion:** The results of this study show that 14,15-

作者介绍:左的于, Email: 790660451@qq.com,

研究方向:心血管功能调节。

通信作者:罗素新, Email: 654816229@qq.com。

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(编号:2014CB542402);国家自然科学基金资助项目(编号:81270210);重庆市科委资助项目(编号:cstc2015shmszx 120066)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181121.1151.010.html>
(2018-11-21)

DHET can increase the expression of eNOS in BAECs and promote angiogenesis.

【Key words】14,15-DHET;bovine aortic endothelial cell;human umbilical vein endothelial cell

一氧化氮(nitric oxide,NO)是一种具有多种生物学功能的重要生物分子,广泛参与多种心血管疾病的发生,维持 NO 的正常生理水平,有助于维持心血管系统的稳态^[1]。并且 NO 在心血管生理过程中尤其重要,如血管内皮依赖性血管生成、血小板功能调节^[2]、调节血管张力和局部血流、抑制血管平滑肌细胞增殖、调节白细胞-内皮相互作用和调节血栓形成^[3]。有研究^[4]证实,乙酰胆碱(acetylcholine,Ach)能促使血管内皮细胞释放 NO,NO 被命名为内皮舒张因子(endothelium-derived relaxing factor,EDRF)。NO 可激活可溶性鸟苷单环化酶(soluble guanylyl cyclase,sGC),使环鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate,cGMP)水平增高,通过激活蛋白激酶使胞内 Ca^{2+} 外流,使血管舒张。内皮细胞在基础状态下释放的 NO 参与维持血管的正常张力。

NO 是 L-精氨酸在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase,NOS)催化作用下的产物。人体中 NOS 由 3 个不同的 NOS 异构体组成,并由 3 个不同的 NOS 基因编码:神经元型 NOS(neuronal nitric oxide synthase,nNOS;又名 NOS-1),主要存在于神经元;诱导型 NOS(inducible nitric oxide synthase,iNOS;又名 NOS-2)主要存在于单核-巨噬细胞系统;内皮型 NOS(endothelial nitric oxide synthase,eNOS;又名 NOS-3),主要存在于内皮细胞。NOS 的基本作用机制是催化 L-精氨酸合成 L-瓜氨酸和 $\text{NO}^{[5-6]}$ 。而 eNOS 主要表达于血管内皮中,也是已知最重要的内源性血管舒张因子之一。影响 eNOS 含量表达的因素有很多,如游离脂肪酸(free fatty acids,FFA)、炎性细胞因子,如白介素-6(interleukin-6,IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)和二甲双胍等^[7]。

花生四烯酸可作为调节细胞过程的第二信使,影响 NO 的形成^[8]。在花生四烯酸代谢途径中,细胞色素 P450 表氧化酶 2J2(cytochrome P450 2J2,CYP2J2)是一种非常重要的代谢酶^[9],花生四烯酸在 CYP2J2 催化下代谢得到环氧二十碳三烯酸类化合物(epoxyeicosatrienoic acids,EETs),EETs 通过可溶性环氧化物水解酶(soluble epoxide hydrolase,sEH)催化产生其对应的二羟基二十碳三烯酸类化合物

(dihydroxyeicosatrienoic acids,DHETs)。最近 1 项研究^[10]发现,sEH 双基因敲除的小鼠可作为评估 EET 介导的生化作用的一种非常有价值的模型。而 EETS 具有心脏保护、血管舒张、血管生成、抗炎、镇痛作用^[11]。14,15-环氧二十碳三烯酸(14,15-e-poxyeicosatrienoic acid,14,15-EET)是 EETs 的异构体之一,它已被证明可以减少大鼠心肌梗死面积以改善心肌局部缺血和再灌注损伤^[12],使大鼠心肌细胞株 H9c2 细胞的 NO 瞬时释放量增加^[13]以及上调牛主动脉内皮细胞中 eNOS 的表达^[14]。但是,一方面 14,15-EET 在血浆中并不稳定,它会在 sEH 催化下非常迅速地代谢为活性更稳定的 14,15-二羟基二十碳三烯酸(14,15-dihydroxyeicosatrienoic acid,14,15-DHET)^[15]。另一方面,14,15-DHET 在血清中的含量远高于 14,15-EET^[16],并且 Liu 等^[17]指出血清中 14,15-DHET 可以作为 14,15-EET 的替代标记物。最近,另一项研究^[18]指出对总 14,15-DHET 水平的检测可以当作是对 EET 依赖性 sEH 活性的测量,而葡萄糖醛酸化 DHET 可作为先兆子痫的标志物。然而,目前并没有研究发现 14,15-DHET 对血管内皮细胞中 eNOS 表达含量以及血管内皮功能的影响。所以本研究将探讨 14,15-DHET 对牛主动脉内皮细胞中 eNOS 表达含量以及人脐静脉内皮细胞血管形成的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞 牛主动脉细胞原代细胞提取自重庆市新月屠宰场购买的牛主动脉,提取的原代细胞于 CO_2 恒温培养箱中培养($37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、95%空气),用第 6~10 代的细胞进行实验。人脐静脉内皮细胞原代提取自重庆医科大学附属第一医院妇产科新生儿脐带,提取的原代细胞于 CO_2 恒温培养箱中培养($37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、95% O_2),用第 6~8 代的细胞进行实验。

1.1.2 实验试剂 DMEM 培养基、M199 培养基、FBS 培养基和细胞培养所需材料购于美国 Gibco 公司;聚偏氟乙烯膜(PVDF)购于美国 Bio-Rad Lab 公司;抗 eNOS 抗体购于美国 Millipore 公司;抗 β -肌动蛋白抗体(Anti- β -actin)和羊抗兔

免疫球蛋白 G 购于美国 Proteintech 抗体公司;BD 基质胶购自美国 BD 生物科学公司。其他试剂和化学药品来自不同供应商,纯度均达到分析纯级别。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与分组 按照现有方法,对 BAECs 和 HUVECs 进行分离和培养。利用添加青霉素 (100 U/mL) 和链霉素 (100 mg/mL) 和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基对 BAECs 进行试管培养;利用添加胎牛血清 (20%)、内皮细胞生长添加剂 (20 μ g/mL)、肝素 (100 μ g/mL)、左旋谷氨酰胺 (2 mmol/L)、青霉素 (1%)、链霉素 (1%) 的 M199 培养基对 HUVECs 进行试管培养。2 种细胞的培养条件均为温度 37 $^{\circ}$ C;饱和湿度;5%CO₂ 和 95%O₂。BAECs 和 HUVECs 生长至融合度达到 80%~90% 时,即可用于实验。该研究中使用的 BAECs,其传代次数为第 6~10 次。本研究利用不同浓度梯度和时间梯度的 14,15-DHET 对 BAECs 进行刺激。浓度梯度分组为 0 (对照组)、0.1、0.5、1.0、5.0 μ mol/L,刺激时间均为 24 h;时间梯度分组为 0 (对照组)、4、8、12、24 h,刺激浓度均为 5 μ mol/L。研究中使用的 HUVECs,其传代次数为第 6~8 次。本研究用 5 μ mol/L 14,15-DHET 刺激 HUVECs 24 h 进行实验。

1.2.2 BAECs 蛋白样本的制备 BAECs 生长至融合度达到 80%~90% 时,使用磷酸盐缓冲盐水 (phosphate buffer saline, PBS) 将 BAECs 清洗 3 次。将清洗后的细胞转移至适量的细胞裂解液。在细胞裂解液中添加蛋白酶抑制剂后,将混合液放置在细胞破碎仪上,温度设备为 4 $^{\circ}$ C,振荡时间为 70 min。将振荡后的匀浆在 4 $^{\circ}$ C 条件下离心 10 min。然后采用考马斯蓝染色法 (Bradford 法) 测定蛋白质含量。

1.2.3 Western blot 检测 将蛋白样本在浓度为 8% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离,并转移至 PVDF 膜。将 PVDF 膜在封闭缓冲液中,在室温条件下孵育至少 1 h。用洗膜缓冲液将 PVDF 膜清洗 4 次 (每次 5 min)。将 PVDF 膜在一抗中孵育过夜。用洗涤缓冲液 (Tris-buffered Saline with Tween 20, TBST) 将 PVF 膜仔细清洗 3 次 (每次 10 min)。将 PVDF 膜在含 1% 脱脂奶粉的羊抗免疫球蛋白中孵育 1.5 h,用 TBST 仔细清洗 3 次后,用 ECL 蛋白质检测系统进行检测。

1.2.4 小管形成实验 在冰块上 BD 基质胶铺至 48 孔板上 (120 μ L/孔),并使其在 37 $^{\circ}$ C 条件下凝固 2 h。基质胶凝固后,小心地将 HUVECs 添加至 48 孔板 (每孔 3.0×10^4 个)^[9]。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 和 95% O₂ 条件下孵育 6 h 后,利用 EVOS FL 全自动显微成像系统随机选择显微视野对内皮细胞小管进行拍照,并利用 Image J 图像处理软件进行数据分析。本研究中,通过在每个小孔中随机选择 5 个低倍视野区 (40 倍) 人工计算小管总长度和分枝总长度,对小管形成的结构进行定量分析。

1.3 统计学处理

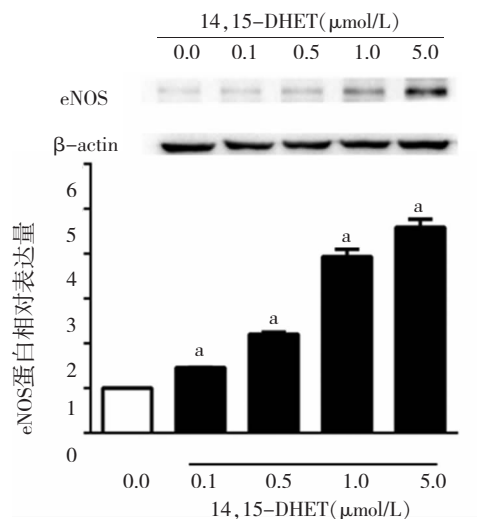
本研究中所有数据均采用 Graphpad Prism 6.0 进行统计分析,所得到的数值均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组比较采用单因素方差分析,组间分析采用 Tukey's 检验;用配

对 *t* 检验法对 HUVECs 小管形成能力的实验结果进行分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 不同浓度的 14,15-DHET 对 BAECs 中 eNOS 表达水平的影响

对 14,15-DHET 与 BAECs 中 eNOS 表达水平的剂量依赖性关系进行评估。确定不同浓度的 14,15-DHET 对 BAECs 中 eNOS 表达水平的影响。测定结果表明,用 0.1、0.5、1、5.0 μ mol/L 的 14,15-DHET 处理 BAECs 后细胞内 eNOS 蛋白表达水平 ($1.456 \pm 0.008, 2.202 \pm 0.045, 3.931 \pm 0.170, 4.588 \pm 0.179$) 与对照组相比均明显升高 ($F=307.300, P=0.000$) (图 1)。根据实验需要选取 5.0 μ mol/L 作为后续实验浓度。



a: 每组之间两两对比, $P < 0.05$

图 1 不同浓度的 14,15-DHET 对 BAECs eNOS 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

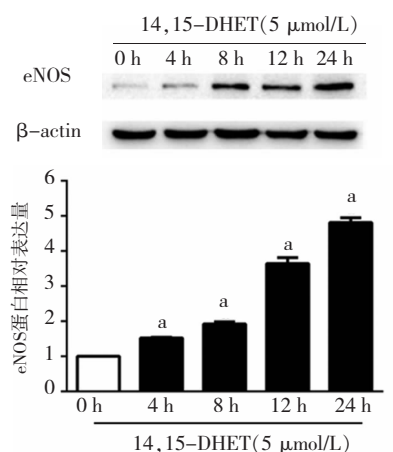
2.2 不同时间点的 14,15-DHET 刺激对 BAECs 中 eNOS 表达水平的影响

对 14,15-DHET 与 BAECs 中 eNOS 表达水平的时间依赖性关系进行评估。确定不同时间点的 14,15-DHET 刺激对 BAECs 中 eNOS 表达水平的影响。测定结果表明,用 5.0 μ mol/L 的 14,15-DHET 处理 BAECs 0、4、8、12、24 h 后细胞内 eNOS 蛋白表达水平 ($1.521 \pm 0.021, 1.922 \pm 0.061, 3.642 \pm 0.173, 4.813 \pm 0.134$) 与对照组相比均明显升高 ($F=407.700, P=0.000$) (图 2)。根据实验需要,选取 24 h 作为后续实验作用时间。

2.3 14,15-DHET 对 HUVECs 小管形成能力的影响

14,15-DHET 对 HUVECs 小管形成能力的影响进行了评估 (放大 40 倍进行显微观察)。用 5.0 μ mol/L 的 14,15-DHET 刺激 HUVECs 24 h。分析结果表明,使用 5.0 μ mol/L 的 14,15-DHET 刺激 HUVECs 后,处理组小管总长度和小管分

枝总长度($13\,715.000 \pm 448.092$, $12\,538.000 \pm 574.182$)与对照组($10\,426.000 \pm 950.537$, $8\,672.000 \pm 1\,025.486$)相比均明显升高(表 1、图 3)。

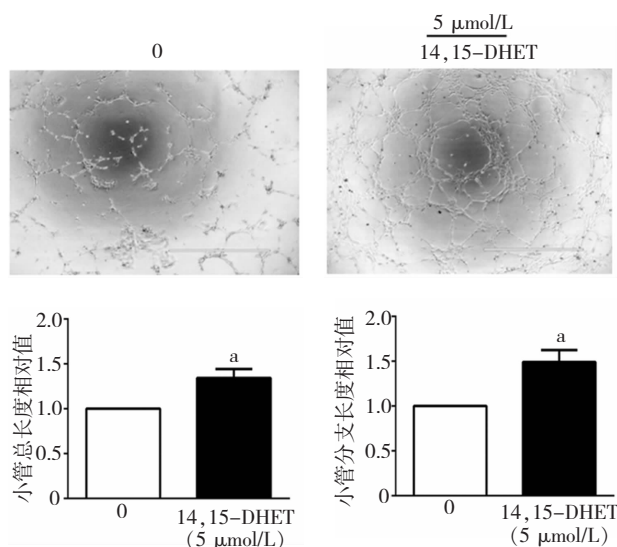


a: 每组之间两两对比, $P < 0.05$

图 2 14,15-DHET 刺激不同时间对 BAECs eNOS 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

表 1 14,15-DHET 小管形成能力比较

组别	小管总长度	小管分支总长度
处理组	$13\,715.000 \pm 448.092$	$12\,538.000 \pm 574.182$
对照组	$10\,426.000 \pm 950.537$	$8\,672.000 \pm 1\,025.486$
<i>t</i> 值	3.397	3.675
<i>P</i> 值	0.043	0.035



a: 与对照组对比, $P < 0.05$

图 3 14,15-DHET 对 HUVECs 小管形成能力的影响 ($n=4$)

3 讨论

14,15-EET 是由花生四烯酸通过 CYP2J2 代谢而来的具有生物活性介导功能的物质^[20-22]。一方面,

CYP2J2 基因功能多态性是冠心病(coronary heart disease, CHD)的独立风险因素^[23]。另一方面, Jiang 等^[24]的研究表明, 14,15-EET 可上调 eNOS 的表达。Gross 等^[13]报告称,在心脏局部缺血发生前, EETs 对心肌就通过调节活性 eNOS 产生 NO 而发挥保护作用。但 14,15-EET 在正常人血浆中并不稳定,它在 sEH 作用下会迅速转变为活性更稳定的 14,15-DHET^[25],并且 14,15-DHET 在血浆中的含量远远高于 14,15-EET^[16]。已有研究^[26]报告称, 14,15-DHET 在 CHD 患者血清中被认为是 CYP2J2 活性的重要标志物之一,其含量在 CHD 患者血清中明显高于正常人,根据本研究结果推测 14,15-DHET 水平增高可能是 CHD 患者机体内的一种代偿性自我保护机制。另有 1 项研究^[27]报告称,肺部细胞 CYP2J2 过度表达的小鼠,其 2 周后的 14,15-DHET 水平和 eNOS 活性明显高于正常小鼠,也显示出 14,15-DHET 和 eNOS 之间可能存在密切的相关性。然而,目前尚无针对 14,15-DHET 对内皮细胞的 eNOS 水平的影响,以及对血管内皮细胞功能影响的研究。

本项研究结果显示, 14,15-DHET 可引起 BAECs 中 eNOS 表达水平明显增高,并有增强 HUVECs 小管形成能力的作用。该研究有 3 项新的发现。第一,为了探讨不同浓度 14,15-DHET 对 eNOS 表达水平的影响,采用 0.1、0.5、1.0、5.0 μmol/L 的 14,15-DHET 对 BAECs 刺激 24 h。结果显示, BAECs 中 eNOS 蛋白表达水平呈浓度依赖性显著增高,且在 5.0 μmol/L 处升高达 4.6 倍。第二,为探讨 14,15-DHET 不同刺激时间对 eNOS 表达水平的影响,本实验使用 5.0 μmol/L(最大浓度)的 14,15-DHET 对 BAECs 刺激 4、8、12、24 h。结果显示, eNOS 表达水平呈时间依赖性显著增高,且在作用 24 h 时升高达 4.8 倍。第三,为了探讨 14,15-DHET 对 HUVECs 血管形成的影响,本实验选用使 eNOS 蛋白表达上升最为明显的刺激浓度(5.0 μmol/L)和时间(24 h)作用于 HUVECs。分析结果表明,经 14,15-DHET 刺激后, HUVECs 的小管形成能力显著性增高,推测与 eNOS 表达含量增加而使 NO 增加有关,验证了 Lu 等^[28]研究得出的 NO 增多或可增强 HUVECs 小管形成能力的结论。

综上所述,本研究结果发现 14,15-DHET 不仅可以提高 BAECs 的 eNOS 蛋白表达水平,还增强 HUVECs 小管形成能力。根据研究结果推测, 14,

15-DHET 与 14,15-EET 相比作为花生四烯酸下游含量更多、更稳定的代谢物,可通过上调 eNOS 蛋白表达水平,发挥改善血管内皮功能的作用。若用于临床治疗,也许在减少心血管系统疾病的发生发展中可以成为一个新的干预靶点。

参 考 文 献

- [1] Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide; a physiologic messenger molecule [J]. *Annu Rev Biochem*, 1994, 63: 175-195.
- [2] Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases [J]. *Mol Aspects Med*, 2005, 26(1-2): 33-65.
- [3] Huang PL. eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2009, 20(6): 295-302.
- [4] Fleming I, Busse R. NO; the primary EDRF [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31(1): 5-14.
- [5] Boucher JL, Moali C, Tenu JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization [J]. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55(8-9): 1015-1028.
- [6] Tsutsui M, Shimokawa H, Otsuji Y, et al. Nitric oxide synthases and cardiovascular diseases: insights from genetically modified mice [J]. *Circ J*, 2009, 73(6): 986-993.
- [7] Calvert JW, Gundewar S, Jha S, et al. Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling [J]. *Diabetes*, 2008, 57(3): 696-705.
- [8] Signorello MG, Segantin A, Leoncini G. The arachidonic acid effect on platelet nitric oxide level [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1791(11): 1084-1092.
- [9] Spector AA. Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(S): 52-56.
- [10] Edin ML, Gholipour BH, Gruzdev A, et al. Epoxide hydrolase 1 (EPHX1) hydrolyzes epoxyeicosanoids and impairs cardiac recovery after ischemia [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(9): 3281-3292.
- [11] Morisseau C, Hammock BD. Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013, 53: 37-58.
- [12] Gross GJ, Hsu A, Falck JR, et al. Mechanisms by which epoxyeicosatrienoic acids (EETs) elicit cardioprotection in rat hearts [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(3): 687-691.
- [13] Gross GJ, Hsu A, Pfeiffer AW, et al. Roles of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and mitochondrial permeability transition pore (MPTP) in epoxyeicosatrienoic acid (EET)-induced cardioprotection against infarction in intact rat hearts [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, 59(18): 20-29.
- [14] Wang H, Lin L, Jiang J, et al. Up-regulation of endothelial nitric-oxide synthase by endothelium-derived hyperpolarizing factor involves mitogen-activated protein kinase and protein kinase C signaling pathways [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307(2): 753-764.
- [15] Fang X, Hu S, Xu B, et al. 14,15-dihydroxyeicosatrienoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor- α [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290(1): 55-63.
- [16] Shinde DD, Kim KB, Oh KS, et al. LC-MS/MS for the simultaneous analysis of arachidonic acid and 32 related metabolites in human plasma: basal plasma concentrations and aspirin-induced changes of eicosanoids [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, 911(5): 113-121.
- [17] Liu P, Zhang S, Gao J, et al. Downregulated serum 14,15-e-poxyeicosatrienoic acid is associated with abdominal aortic calcification in patients with primary aldosteronism [J]. *Hypertension*, 2018, 71(4): 592-598.
- [18] Santos JM, Park JA, Joiakim A, et al. The role of soluble epoxide hydrolase in preeclampsia [J]. *Med Hypotheses*, 2017, 108: 81-85.
- [19] Yuan Y, Shan N, Tan B, et al. SRC-3 plays a critical role in human umbilical vein endothelial cells by regulating the PI3K/Akt/mTOR pathway in preeclampsia [J]. *Reprod Sci*, 2018, 25(5): 748-758.
- [20] Zeldin DC. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(39): 36059-36062.
- [21] Bishop-Bailey D, Wray J. Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2003, 71(1-2): 1-22.
- [22] Capdevila JH, Falck JR, Harris RC. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase [J]. *J Lipid Res*, 2000, 41(2): 163-181.
- [23] Spiecker M, Darius H, Hankeln T, et al. Risk of coronary artery disease associated with polymorphism of the cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2 [J]. *Circulation*, 2004, 110(15): 2132-2136.
- [24] Jiang JG, Chen RJ, Xiao B, et al. Regulation of endothelial nitric-oxide synthase activity through phosphorylation in response to epoxyeicosatrienoic acids [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2007, 82(1-4): 162-174.
- [25] Deng Y, Theken KN, Lee CR. Cytochrome P450 epoxygenases, soluble epoxide hydrolase and the regulation of cardiovascular inflammation [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(2): 331-341.
- [26] Yang T, Peng R, Guo Y, et al. The role of 14,15-dihydroxyeicosatrienoic acid levels in inflammation and its relationship to lipoproteins [J]. *Lipids Health Dis*, 2013, 12(1): 151.
- [27] Zheng C, Wang L, Li R, et al. Gene delivery of cytochrome p450 epoxygenase ameliorates monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension in rats [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 43(6): 740-749.
- [28] Lu A, Wang L, Qian L. The role of eNOS in the migration and proliferation of bone-marrow derived endothelial progenitor cells and in vitro angiogenesis [J]. *Cell Biol Int*, 2015, 39(4): 484-490.

(责任编辑:唐秋姗)