

环氧化物水解酶在高血压治疗中的作用及其机制研究进展

应志强,徐耕* (浙江大学医学院附属第二医院心内科,杭州 310009)

摘要:目的 介绍环氧化物水解酶及其抑制物的理化性质及其在抗高血压治疗中的作用和机制。方法 查阅相关文献,总结归纳环氧化物水解酶及其抑制物的理化性质和作用机制。结果 可溶性环氧化物水解酶(sEH)广泛存在于哺乳动物组织中,是内源性抗高血压物质——二十碳脂酸(EET)的主要转换酶,破坏sEH基因或抑制sEH可引起血压下降。结论 sEH抑制剂可能成为抗高血压的新药。

关键词:环氧化物水解酶;二十碳脂酸;抗高血压药物

中图分类号: R972.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-7693(2008)06-0506-03

Progress on the Treatment for Hypertension of Epoxide Hydrolase and Its Mechanisms

YI NG Zhi-qiang, XU Geng* (The Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To introduce the effects of epoxide hydrolase and its inhibitions for the antihypertensive therapy.

作者简介:应志强,男,博士研究生,主治医师 * 通讯作者:徐耕,教授,博导

Tel: (0571) 87784749 E-mail: xugengdoctor@sina.com

METHODS Consulting relative references, something about the role of epoxide hydrolase in hypertension control and its mechanisms was summarized. **RESULTS** Soluble epoxide hydrolase (sEH) is widely distributed in mammalian tissues. It is the primary enzyme that is responsible for the conversion of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) which are endogenous antihypertensive eicosanoids. Disruption of the sEH gene or inhibition of sEH decreases blood pressure. **CONCLUSION** Potent selective sEH inhibitors have potentiality to become a novel class of antihypertensive agent.

KEY WORDS: epoxide hydrolase; epoxyeicosatrienoic acids; antihypertensive agent

二十碳脂酸类化合物来源于花生四烯酸(AA),通过活化环氧化物合成酶、脂酶氧化酶和细胞色素 P450(CYP)这三种代谢酶而成,是内源性生物活性脂质载体,在调节稳态和许多病理生理过程中都起着重要作用。二十碳脂酸(EET)是由AA通过CYP过氧化物酶转化而来^[1],被认为是内源性抗高血压物质,增加其合成或减少其降解都可作为抗高血压的方法,因可溶性氧化物水解酶(sEH)是EET转化为双氢二十碳脂酸(DHET,是许多系统的生物活性抑制剂)的主要酶,现已成为抗高血压药物治疗的新靶点^[2]。笔者即对EET和sEH等的理化特性及抗高血压作用做一综述。

1 EET的合成、代谢和生物活性

人类CYP环氧化物合成酶有CYP2C₂、2J两种,能产生4种异构体,其中11,12-EET和14,15-EET是主要形式。EET和DHET在心、肝、肾等组织中都有存在。在冠脉循环中CYP2C是内源性高活性因子合成酶,主要产生11,12-EET^[3]。在各种应激状态如缺血再灌注损伤、牵拉损伤中,CYP2CmRNA和蛋白表达可增加5~10倍,EET也相应增加4~8倍^[4]。内源性EET以磷酸甘油酯形式存在,受刺激后可释放并被细胞快速摄取。细胞摄取EET的能力很强,在体外,平滑肌细胞和 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的14,15-EET共孵育也未达到饱和,而血管内皮细胞对11,12-EET的摄取量更大^[5]。EET的水解有选择性,14,15-EET是sEH最好的底物,产生8,9-DHET,短链 β 氧化脂肪酸(释放到间质中)和长链脂肪酸(存在于胞质中)^[6]。脂肪酸结合蛋白等可减少水化速度^[7]。

EET有许多生理功能,尤其是在心血管系统。它对肾脏、冠脉、肠道和脑循环中的血管都有舒张作用,这可能与活化平滑肌细胞中的 Ca^{2+} 和 K^{+} 等离子通道有关。EET可增加 Ca^{2+} 激活的 K^{+} 通道的开放状态,松弛收缩的冠脉,这种作用能被四甲乙胺、北非蝎毒素(Ca^{2+} 激活的 K^{+} 通道的抑制剂)和高 K^{+} 所阻断^[8]。EET还可抑制肾近曲小管和集合管的 $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATP酶,减少 Na^{+} 转运^[9];调节平滑肌细胞的迁移、前列腺素 E_2 产生和芳香酶活性;抑制凝血酶、AA和毒胡萝卜素所致的血小板聚集、钙离子迁移^[10]。在内皮细胞,EET可抑制细胞因子诱导的炎症反应,增加钙离子内流、促进纤溶过程和刺激血管形成^[11]。在sEH作用下由EET变成DHET的过程通常被认为是失活的过程,因此抑制sEH和增加EET浓度可能对心血管系统有益处。

2 sEH的分布和作用机制

sEH是一组功能相似的酶系,能够立体选择性地催化水解环氧化物生成光学活性环氧化物和相应水溶性的邻位二醇。根据底物的结构、酶的定位和物种,可分为哺乳动物类、植物类、白三烯类水解酶和微粒体过氧化物水解酶等6

种亚型^[12],其中哺乳类是最重要的亚型,和环氧脂酸代谢相关。在肝、肾的血管组织中都有高活性sEH存在,其编码的基因在人类是有19个外显子的长约45 kb的EPHX2,定位在8p21-p12^[13]。但存在基因多态性,在日本人群中就发现有36种SNP和5'侧翼区的一个插入缺失变异^[14],EPHX2的基因变异可影响sEH的活性^[15]。

sEH是 α/β 水解酶家族中的成员,通过共价的酰基或烷基中间体的形成和水解这两步来完成。Asp³³³和His⁵²³是该酶发挥催化活性所必须的保守残基,存在于所有环氧化物中,用其他氨基酸替代后其活性可下降99%^[16]。后来有学者通过位点直接突变法证实Asp⁴⁹⁵也是催化活性所必须的,和前两者共同形成催化三角^[17]。sEH是一同型二聚体,每个亚单位都包含氨基端和羧基端,氧化水解的活性区域在羧基端,氨基末端在建立稳定的二聚体结构中起重要的作用,且具有磷酸酶的活性^[18]。磷酸化羟酯是该酶很好的底物,尤其是对双羟基硬脂酸单磷酸。

3 sEH的抑制剂

迄今为止已研发了好几代sEH的抑制物,早期的包括查耳酮氧化物和反义-3-苯乙醛,前者的抑制作用更强。但因它们都是通过与酶共价结合而起作用,相对不稳定,尤其是存在谷胱甘肽时^[19];而后者是选择性的慢结合抑制物。尿素衍生物和氨基甲酸酯是最近发展的稳定、有效的选择性抑制剂^[20],N,N'-二环己脲(DCU)是其代表,IC₅₀为 $0.16\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,但难溶解于水的特点使其应用受到限制。于是又合成了许多衍生物来优化其性能:用炔链取代N'环己烯生成的衍生物(CDU)可使效率增强8~16倍;在CDU炔链末端接上羧基可增加其水溶性而不削减其有效性;若在此基础上再用金刚烷烷基替代N'环己烯(AUDA)则可进一步增加其水溶性^[21]。这种烷基胺类抑制剂的作用机制与尿素羧基氧能和sEH中的Tyr³⁸¹、Tyr⁴⁶⁵以氢键结合,与Gln³⁸²相互作用稳定环氧化物的负电荷,其羧基端的Asp³³³还可接受酶抑制物复合物的氢键等作用有关。

4 sEH和血压调节

近年来许多学者对sEH及其抑制剂在血压调节中的作用进行了研究。在自发性高血压大鼠模型的高血压前期和高血压期sEH的表达都升高^[22],尿液中EET的代谢产物DHET也增多。在血管紧张素II注射引起的高血压中也发现肾皮质和微血管网中sEH的表达增加^[23],连续腹腔内注射sEH抑制剂DCU 4 d可降低收缩压30 mmHg。另一种sEH抑制剂AUDA通过去氧皮质酮钠盐的疾病模式增加尿液中水、钠的排出来降血压^[24]。大脑中sEH对血压的调节方式和外周有所差别。在自发性高血压大鼠中sEH在下丘脑和脑中表达升高,但

sEH抑制剂 AUDA却能进一步升高其血压和增快心率,并降低压力感受器的自发性反射调节。不过也有学者认为 sEH 抑制剂 AUDA 的这种升压作用是 sEH 介导的活行氧化物质 (ROS)增加的结果,是抗高血压的一种表现^[25]。

sEH 抑制剂降血压的可能机制:①在肾脏循环中,有扩张血管作用的 11,12-EET可降低 AT-II引起的血管收缩;②当细胞受刺激时,sEH的抑制剂可促进 EET转变成磷酸酯,并加快 EET的释放,促进血管的舒张^[26];③当 sEH被抑制时,增加的 EET经过氧化转换成短链环氧脂酸,而间质中的短链环氧脂酸可促进有效的血管舒张;④AUDA还可增加尿液中的水、盐排泄,降低心率和促进肾脏的灌注。

5 展望

除了可用于治疗高血压外,sEH的抑制剂对动脉粥样硬化、急性呼吸窘迫综合征和吸烟有关的肺炎等疾病也有益处,但其有效性、安全性、药物动力学特征和可能的相互作用等都需进一步研究,相信在不久的将来,随着研究的深入,一种安全有效的抗高血压新药物将被大家所接受。

REFERENCES

- [1] SPECTOR A A, FANG X, SNYDER G D, *et al.* Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function [J]. *Prog Lipid Res*, 2004, 43(1): 55-90.
- [2] YU Z, XU F, HUSE L M, *et al.* Soluble epoxide hydrolase regulates hydrolysis of vasoactive epoxyeicosatrienoic acids [J]. *Circ Res*, 2000, 87(11): 992-998.
- [3] FISSLTHALER B, POPP R, KISS L, *et al.* Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries [J]. *Nature*, 1999, 401(6752): 493-497.
- [4] FISSLTHALER B, POPP R, MICHAELIS U R, *et al.* Cyclic stretch enhances the expression and activity of coronary endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase [J]. *Hypertension*, 2001, 38(6): 1427-1432.
- [5] HUANG A, SUN D, JACOBSON A, *et al.* Epoxyeicosatrienoic acids are released to mediate shear stress-dependent hyperpolarization of arteriolar smooth muscle [J]. *Circ Res*, 2005, 96(3): 376-383.
- [6] FANG X, KADUCE T L, WEINTRAUB N L, *et al.* Pathways of epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells: implication for the vascular effects of soluble epoxide hydrolase inhibition [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(18): 14867-14874.
- [7] WIDSTROM R L, NORRIS A W, VAN DER VEER J, *et al.* Fatty acid-binding proteins inhibit hydration of epoxyeicosatrienoic acids by soluble epoxide hydrolase [J]. *Biochemistry*, 2003, 42(40): 11762-11767.
- [8] CAMPBELL W B, GEBREMEDHIN D, PRATT P F, *et al.* Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors [J]. *Circ Res*, 1996, 78(3): 415-423.
- [9] SATOH T, COHEN H T, KATZ A I. Intracellular signaling in the regulation of renal Na-K-ATPase. II. Role of eicosanoids [J]. *J Clin Invest*, 1993, 91(2): 409-415.
- [10] SNYDER G D, KRISHNA U M, FALCK J R, *et al.* Evidence for a membrane site of action for 14, 15-EET on expression of aromatase in vascular smooth muscle [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 283(5): H1936-1942.
- [11] NODE K, HUO Y, RUAN X, *et al.* Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxidegenase-derived eicosanoids [J]. *Science*, 1999, 285(5431): 1276-1279.
- [12] NEWMAN J W, MORISSEAU C, HAMMOCK B D. Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism [J]. *Prog Lipid Res*, 2005, 44(1): 1-5.
- [13] SANDBERG M, MEIJER J. Structural characterization of the human soluble Epoxide hydrolase gene (EPHX2) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 221(2): 333-339.
- [14] SAITO S, IIDA A, SEKINE A, *et al.* Seventy genetic variations in human microsomal and soluble epoxide hydrolase genes (EPHX1 and EPHX2) in the Japanese population [J]. *J Hum Genet*, 2001, 46(6): 325-329.
- [15] KOERNER I P, JACKS R, DEBARBER A E, *et al.* Polymorphisms in the human soluble epoxide hydrolase gene EPHX2 linked to neuronal survival after ischemic injury [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(17): 4642-4649.
- [16] PINOT F, GRANT D F, BEETHAM J K, *et al.* Molecular and biochemical evidence for the involvement of the Asp-333-His-523 pair in the catalytic mechanism of soluble epoxide hydrolase [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(14): 7968-7974.
- [17] ARAND M, WAGNER H, OESCH F. Asp333, Asp495, and His523 form the catalytic triad of rat soluble epoxide hydrolase [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(8): 4223-4229.
- [18] CRONIN A, MOWBRAY S, DURK H, *et al.* The N-terminal domain of mammalian soluble epoxide hydrolase is a phosphatase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(4): 1552-1557.
- [19] MORISSEAU C, DU G, NEWMAN J W, *et al.* Mechanism of mammalian soluble epoxide hydrolase inhibition by chalcone oxide derivatives [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 356(2): 214-228.
- [20] MORISSEAU C, GOODROW M H, DOWDY D, *et al.* Potent urea and carbamate inhibitors of soluble epoxide hydrolases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(16): 8849-8854.
- [21] ARGIRIADI M A, MORISSEAU C, GOODROW M H, *et al.* Binding of alkylurea inhibitors to epoxide hydrolase implicates active site tyrosines in substrate activation [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(20): 15265-15270.
- [22] SEUBERT J M, XU F, GRAVES J P, *et al.* Differential renal gene expression in pre-hypertensive and hypertensive spontaneously hypertensive rats [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 289(3): F552-561.
- [23] IMIG J D, ZHAO X, CAPDEVILA J H, *et al.* Soluble epoxide hydrolase inhibition lowers arterial blood pressure in angiotensin II hypertension [J]. *Hypertension*, 2002, 39(2): 690-694.
- [24] LOCH D, HAMMOCK B, BROWN L. Soluble epoxide hydrolase inhibition in doca-salt hypertensive rats prevents vascular remodeling and dysfunction [J]. *Cardiovasc J S Afr*, 2004, 15(4 Suppl 1): S9.
- [25] SELLERS K W, SUN C, DIEZ-FREIRE C, *et al.* Novel mechanism of brain soluble epoxide hydrolase-mediated blood pressure regulation in the spontaneously hypertensive rat [J]. *FASEB J*, 2005, 19(6): 626-628.
- [26] FANG X, WEINTRAUB N L, MCCAWE R B, *et al.* Effect of soluble epoxide hydrolase inhibition on epoxyeicosatrienoic acid metabolism in human blood vessels [J]. *Am J Physiol*, 2004, 287(6): H2412-2420.

收稿日期: 2007-07-24