表氧化二十碳三烯对 eNOS 磷酸化水平的影响及其相关信号转导通路*

陈瑞娟 蒋建刚 肖 啸 汪道文**

(华中科技大学同济医学院附属同济医院高血压研究所, 武汉 430030)

摘要 内皮源性一氧化氮合酶(eNOS)是一氧化氮(NO)参与的血管稳态调节过程中的关键酶. 多种体液因子和机械刺激都可以通过磷酸化修饰调节 eNOS 的活性, 但具体的信号转导通路因刺激物不同而异. 最近发现花生四烯酸细胞色素 P450(CYP)表氧化酶代谢产物表氧化二十碳三烯(EETs)可以显著上调 eNOS 的蛋白表达并增强其活性, 但其分子机制尚不清楚. 通过在 4 代以内培养的牛主动脉内皮细胞中直接加入外源性 EETs 和转染 CYP 表氧化酶基因 CYP2C11 和 CYPF87V, 并同时给予实验组不同信号转导抑制剂进行干预, 观察其对总的 eNOS 表达及其在 Ser^{1179} 和 Thr^{497} 位点磷酸化水平的影响. 结果显示, 内外源性 EETs 均可以显著上调 eNOS 的蛋白表达并增强及其在 Ser^{1179} 和 Thr^{497} 位点的磷酸化水平; PI3K 抑制剂 LY294002 可以阻断 EETs 对 eNOS-Ser^{1179} 的磷酸化上调作用, 但它对 eNOS-$Thr(P)^{497}$ 并无影响, 而 Akt 抑制剂却可以抑制 eNOS 在这两个位点的磷酸化, 且这两种抑制剂都可以阻断 EETs 对 eNOS 的蛋白表达上调作用. 结果提示: (i) EETs 对 eNOS 的活性调节可能与 PI3K/Akt 所介导的 eNOS-Ser^{1179} 和 Akt 所介导的 eNOS- Thr^{497} 磷酸化水平改变相关; (ii) PI3K/Akt 信号通路可能参与了 EETs 对 eNOS 的蛋白表达上调过程.

关键词 表氧化二十碳三烯 内皮源性一氧化氮合酶 信号转导 磷酸化

血管内皮细胞在调节心血管功能, 维持心血管稳态和防止心脑血管疾病中起着至关重要的作用, 而内皮的多种生理效应都是由它分泌的血管活性物质包括 NO, PGI_2 和内皮源性超极化因子(EDHF)等介导的. 内皮源性一氧化氮合酶(eNOS)代谢精氨酸产生的 NO 是维持血管稳态的关键物质, 其保护效应主要是通过调节血管张力和血压, 抑制血管平滑肌细胞增殖和迁移, 抑制血小板聚集, 抑制单核细胞和血

2004-11-19 收稿, 2005-01-18 收修改稿
* 国家自然科学基金(批准号: 39870307, 30270561 和 30430320)资助项目
** 联系人, E-mail: dwwang@tjh.tjmu.edu.cn

小板的粘附等作用来实现的[1]. 花生四烯酸细胞色素P450(CYP)表氧化酶代谢产物表氧化二十碳三烯EETs具有调节血管张力、抗凝、抑制平滑肌细胞增殖、抗炎、防止内皮细胞凋亡等多种效应[2~4]，是不同于NO，PGI_2 的又一种血管保护因子，因EETs的许多特征与内皮源性超级化因子(EDHF)非常相似，而被认为是EDHF或其中的一种[2,3,5]. 研究表明，正常生理条件下, EETs介导的超极化反应在血管舒张反应中并不起主要作用，而只是作为NO依赖的血管舒张反应的一种补充或加强[5]，且NO还可以减少EDHF的释放[6]. 但在疾病状态下，比如高胆固醇血症、高血压、糖尿病等存在血管病变的疾病，由于内皮功能受损，NO合成减少，NO介导的扩管反应减弱，而此时EETs的合成增加，提示病理情况下EETs的重要性加强[5,6]. 作为两种重要的内皮源性血管活性物质，二者的消长之间是否存在着某种关联值得探讨.我们最近的研究显示，不同于NO对EDHF的负反馈调节，EETs能够显著上调eNOS的mRNA含量及蛋白表达，并可增强其活性，但关于活性调节的分子机制尚未完全明确[7]. 多数研究表明eNOS的活性调节除了受底物、辅助因子和调节蛋白影响外主要是通过不同的蛋白激酶和磷脂酶调节其不同位点的磷酸化水平来实现的. eNOS的磷酸化调节位点主要有Ser^{1177}[8~10]，Ser^{635}[11]，Ser^{116}[9,12]和Thr^{495}[13,14]，前两个位点的磷酸化可以增强其活性，后两个则相反. 有许多蛋白激酶如PI3K, PKB(Akt), PKA, AMPK, PKC等参与此过程，但具体的信号转导通路因刺激物不同而不同[8~16]. EETs能够上调eNOS的表达并增强其活性，而eNOS的活性又可被多种蛋白激酶所调节，在此研究背景下，本实验旨在进一步阐明EETs对eNOS的活性调节是否通过磷酸化来介导，并探讨可能相关的信号通路.

1　材料和方法

1.1　主要试剂

DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、乙二胺四乙酸(EDTA)购自 GIBCO 公司；PMSF(苯甲基磺酰氟)，Aprotinin，Tween-20，牛血清白蛋白(BSA)，二甲基亚砜(DMSO)，8, 9-epoxyeicosatrienoic acid (8, 9-EET)，11, 12-EET，14, 15-EET，CYP 表氧化酶抑制剂 17-ODYA 购自 Sigma 公司；Akt 抑制剂 IL-6-Hydroxymethyl-chiro-inositol 2-[(R)-2-O-methyl-3-O-octadecylcarbonate]购自 ALEXIS 公司；PI3K 抑制剂 LY294002 购自 Calbiochem 公司；兔抗人 eNOS，兔抗人 eNOS-Thr(P)^{495}，兔抗 β-actin 抗体购自加拿大 Santa Cruz 生物技术公司；分别编码 CYP2C11 和 CYPF87V 的全长 cDNA 以及抗 CYP2C11 和 CYPF87V 的单克隆抗体由 Vanderbilt 大学的 Dr. Jorge Capdevila 惠赠；兔抗人 eNOS-Ser(P)^{1177} 抗体购自美国 Cell Signaling 公司；辣根过氧化物酶(HRP)偶联鼠抗兔 IgG 抗体购自北京中山生物技术公司；Western 杂交显影用增强的化学发光试剂(ECL)购自 PIERCE 公司；预染的蛋白质分子量标准购自 Fermentas(MBI)公司; PVDF 膜购自德国 Schleicher&Schuell 公司；重组腺相关病毒载体质粒 pXXUF1，包装质粒 pXX2，辅助包装质粒 pXX6 和包含有绿色发光蛋白(GFP) cDNA 的质粒由美国 Pittburgh 大学的肖啸教授赠送.

1.2　实验方法

(1) 重组腺相关病毒 rAAV-CYPF87V，rAAV-CYP2C11 和rAAV-GFP的包装与复制：按照我们已经建立的三质粒共转染方法在人胚肾上皮细胞系(293 细胞)包装和复制生成 rAAV-CYPF87V，rAAV-CYP2C11 和rAAV-GFP，之后用肝素柱纯化和斑点杂交法确定病毒滴度[7].

(2) 牛主动脉内皮细胞的分离和培养：从屠宰场获得新鲜小牛主动脉，用胰蛋白酶消化法分离收集内皮细胞，磷酸缓冲盐溶液(NaCl 0.1 mol/L, KCl 2.68 mmol/L, Na_2HPO_4 8 mmol/L, KH_2PO_4 1.47 mmol/L)洗涤 2 次，室温下 2000 r/min 离心 5 min，弃上清，用含 10%FBS，5 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的低糖 DMEM 培养基悬浮后置于 37℃, 5%CO_2 的培养箱中培养. 4 h 后换一次培养基以除去未贴壁的杂细胞. 细胞长至 90%汇合时进行传代，选择 4 代以内的细胞进行实验.

(3) 内皮细胞的初步鉴定：在显微镜下观察细胞形态，牛主动脉内皮细胞呈梭形或多角形，当细胞生长至汇合时出现接触性抑制，呈典型铺路石样外观. 此外，抗 CD31 染色阳性为内皮细胞特异性反应. 镜

下观察和抗 CD31 染色证实内皮细胞纯度大于 80%方用于实验.

(4)外源性 EETs 诱导干预实验:

EETs 对总的 eNOS 和磷酸化 eNOS 的量效及时效关系分析: 将 4 代以内的牛主动脉内皮细胞接种于六孔培养板, 当细胞长至 80%汇合时, 分别加入 8, 9-EET, 11, 12-EET (0~200 nmol/L, 2 h)或者于细胞收获前 0~4 h 分别加入 100 nmol/L 的 8, 9-EET, 11, 12-EET, 14, 15-EET 三种 EETs, 然后按实验要求收获细胞.

PI3K 抑制剂和 Akt 抑制剂对 EETs 诱导的 eNOS 蛋白表达及其磷酸化水平变化的影响: 4 代以内的牛主动脉内皮细胞被接种于六孔培养板, 当细胞长至 80%汇合时, 分别加入 100 nmol/L 的 8, 9-EET, 11, 12-EET, 14, 15-EET 或等量的无水乙醇(溶媒作为阴性对照), 实验组还需同时加入 PI3K 抑制剂 LY294002 (10 μmol/L)或 Akt 抑制剂(20 nmol/L), 继续培养 2 h 后按实验要求收获细胞并进行下一步实验.

(5) 内源性 EETs 诱导干预实验: 将 4 代以内的牛主动脉内皮细胞接种于六孔培养板, 当细胞长至 50%汇合时, 分别加入含有不同 CYP 表氧化酶基因的重组腺相关病毒 rAAV-CYPF87V, rAAV-CYP2C11 和 rAAV-GFP(阴性对照)(50 m.o.i./cell), 在 37℃, 5%CO_2 环境下继续培养 1 周后, 实验组分别加入 AA-CYP 表氧化酶抑制剂 17-ODYA(100 μmol/L), PI3K 抑制剂 LY294002 (10 μmol/L)或 Akt 抑制剂(20 nmol/L), 温育 24 h 后收获细胞进行相关实验.

(6) Western blot 分析内外源性 EETs 对 eNOS 表达及其磷酸化的影响:

细胞蛋白质的提取: 将六孔细胞培养板置于冰上, 吸弃培养基, 用预冷的 PBS 缓冲液洗涤一次后加入三去圬细胞裂解液(50 mmol/L Tril-Cl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.02%NaN_3, 0.1%SDS, 100 μg/mL PMSF, 1 μg/mL Aprotinin, 1%NP-40, 0.5%去氧胆酸钠)裂解细胞, 冰浴 20 min 后离心 1 min, 再将胞浆部分转移至 EP 管中, 用 Bradford 法测定细胞裂解液中蛋白质的浓度后置–20℃保存备用.

Western 杂交: 制备 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(分离胶 8%, 积层胶 4.5%), 将等量蛋白质加入 1/2 体积的 3×加样缓冲液(155 mmol/L Tril-Cl pH 6.8, 30%(*v*/*v*)甘油, 6.9%(*w*/*v*)SDS, 0.05%溴酚蓝, 250 mmol/L 二巯基乙醇), 煮沸 3 min 后上样, 垂直电泳分离蛋白质, 然后将蛋白电转至经甲醇活化处理过的 PVDF 膜上(4℃过夜). 室温下用含 5%脱脂奶粉的 TBS-T 溶液(10 mmol/L Tris-Cl, 100 mmol/L NaCl, 0.1%Tween-20)封闭 2 h, 弃去封闭液后分别加入兔抗 eNOS-Ser(P)^{1177} 和 β-actin 抗体, 4℃缓摇过夜. 次日用 TBS-T 溶液于室温下洗膜 4 次, 每次 15 min, 之后再加入辣根过氧化物酶(HRP)偶联的鼠抗兔 IgG 抗体, 室温下缓摇 2 h 后用 TBS-T 溶液洗膜 4 次(具体方法同前), 最后按 ECL 试剂说明书要求显影, 根据荧光强度曝光数秒或数分钟不等. 同一 PVDF 膜经回收处理后再接着测定 eNOS-Thr(P)^{495} 和总的 eNOS(具体过程如上所述). 重组腺相关病毒 rAAV 所介导的细胞色素 P450 表氧化酶 CYP2C11 和 CYPF87V 在内皮细胞的有效表达分别用相应的抗体进行检测(方法同上).

1.3 统计学分析

Western blot 的结果用凝胶成相分析系统测定蛋白条带的相对光密度值, 每组实验均重复 3 次, 用 *t* 检验进行差异显著性分析, $P<0.05$ 被认为有统计学意义.

2 结果

2.1 外源性 EETs 对 eNOS 蛋白表达及磷酸化的影响

3 种外源性 EETs 不仅能明显上调总的 eNOS 表达, 还显著增强 eNOS-Ser^{1179} 和 eNOS-Thr^{497} 位点的磷酸化水平, 且该效应具有明显的剂量和时间依赖性(图 1). 对 Western blot 结果进行密度扫描分析显示, 与对照组相比差异具有显著性($P<0.05$). 进一步实验表明 PI3K 抑制剂或 Akt 抑制剂都可以抑制此效应, 只是 PI3K 抑制剂对 Thr^{497} 位点的磷酸化改变并无影响, 这提示 EETs 上调 eNOS-Thr^{497} 位点的磷酸化效应是通过 Akt 依赖性和 PI3K 非依赖性的方式实现的, PI3K/Akt 途径可能参与 EETs 对 eNOS 蛋白表达和

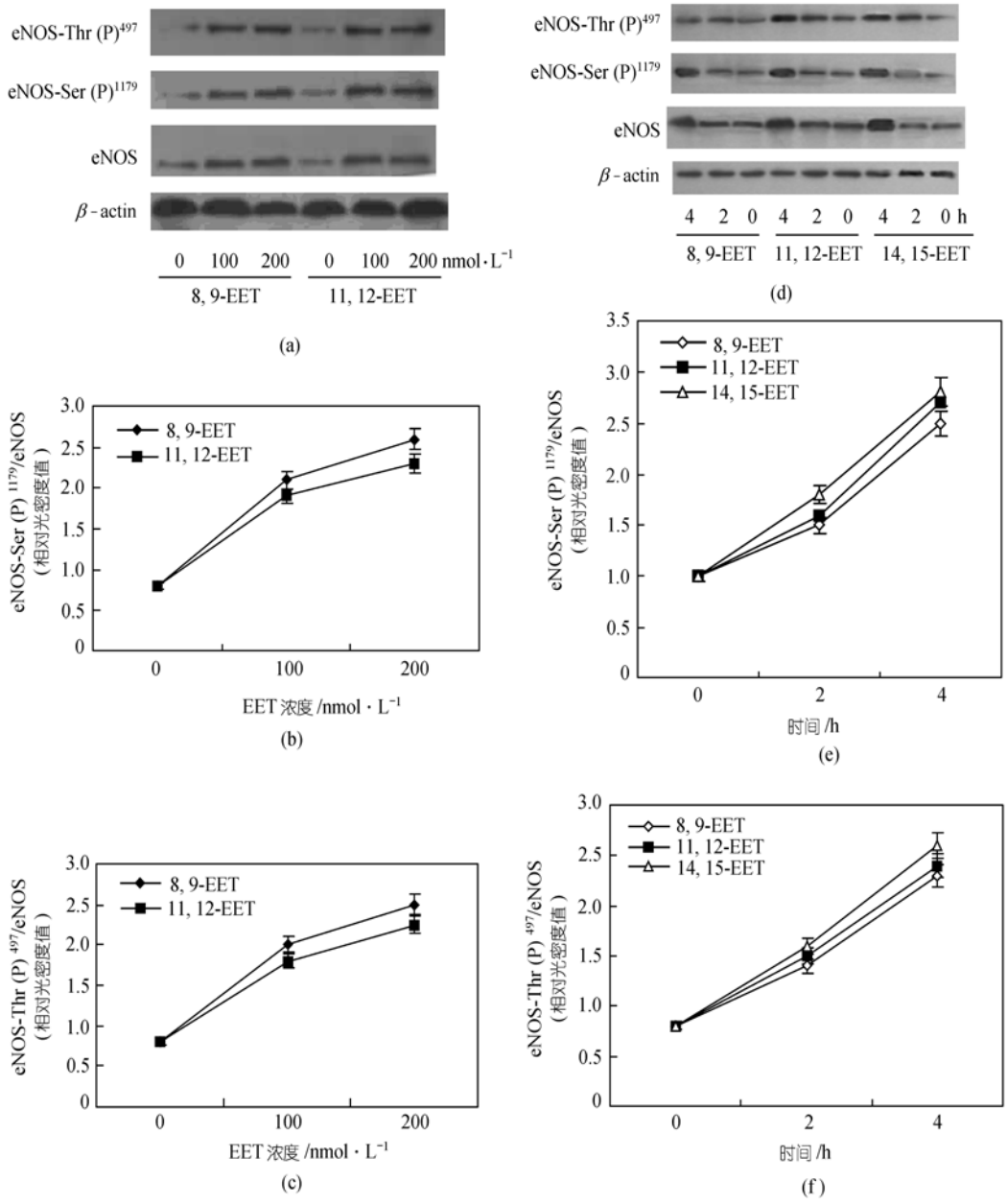


图 1　EETs 对总的 eNOS 和磷酸化 eNOS 的量效及时效关系

(a)和(d)为 Western 杂交(3 次独立实验的代表性结果), 显示 EETs 可以增加 eNOS 蛋白表达和它在 Ser^{1179} 和 Thr^{497} 位点的磷酸化水平, 且随 EETs 浓度的增加或时间延长该效应明显增强, 表现为剂量和时间依赖性. (b), (c), (e)和(f)为条带扫描密度分析结果, 各组数据均用相应 β-actin 进行标准化处理, phosphor-eNOS 与 eNOS 的比值以均数±标准差表示

eNOS-Ser^{1179} 位点的磷酸化上调过程(图 2 和 3).

2.2　内源性 EETs 对 eNOS 蛋白表达及其磷酸化的影响

细胞色素 P450 表氧化酶 CYPF87V, CYP2C11 可以高效代谢花生四烯酸产生 EETs, 我们用包含有 CYP 表氧化酶基因的重组腺相关病毒 rAAV-CYPF87V, rAAV-CYP2C11 转染牛主动脉内皮细胞以产生内源性 EETs, 病毒转染后 1 周左右, 分别加入

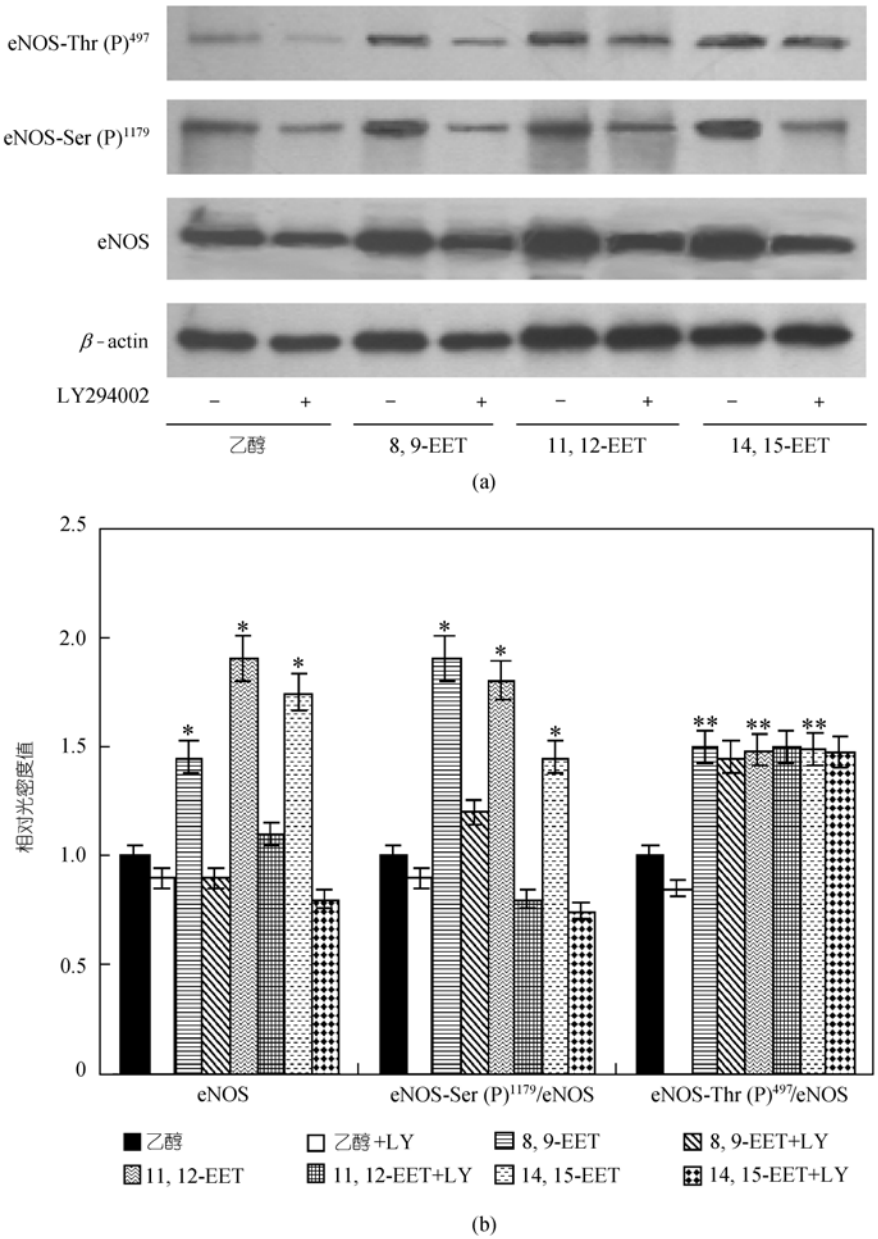


图 2 PI3K 抑制剂对外源性 EETs 诱导的 eNOS 蛋白表达及其磷酸化水平上调作用的影响

(a) Western 杂交(3 次独立实验的代表性结果), 显示 3 种 EETs 都可以增加 eNOS 蛋白表达和它在 Ser^{1179} 和 Thr^{497} 位点的磷酸化水平, PI3K 抑制剂可以抑制 EETs 对 eNOS 和 eNOS-Ser(P)^{1179} 的上调, 但对 eNOS-Thr^{497} 位点的磷酸化水平改变并无影响. (b) 显示条带扫描密度分析结果, 各组数据均用相应β-actin 进行标准化处理后以均数±标准差表示. * 代表与对应空白对照组和 LY 抑制剂组相比皆有显著性差异; ** 代表仅与对应空白对照组相比有显著性差异(P<0.05)

PI3K 抑制剂 LY294002, Akt 抑制剂和 CYP 表氧化酶抑制剂 17-ODYA, 继续温育 24 h 后裂解细胞, 进行 Western blot 分析. 首先用抗 CYP2C11 和 CYPF87V 抗体检测病毒表达情况, 证实其在内皮细胞里已进行足够有效的表达(图 4). 进一步 Western blot 结果显示: 与对照 GFP 组相比, 两种 CYP 表氧化酶转染内皮细胞后都可以显著上调 eNOS 蛋白表达, 增强 eNOS 在 Ser^{1179} 和 Thr^{497} 位点的磷酸化水平(P<

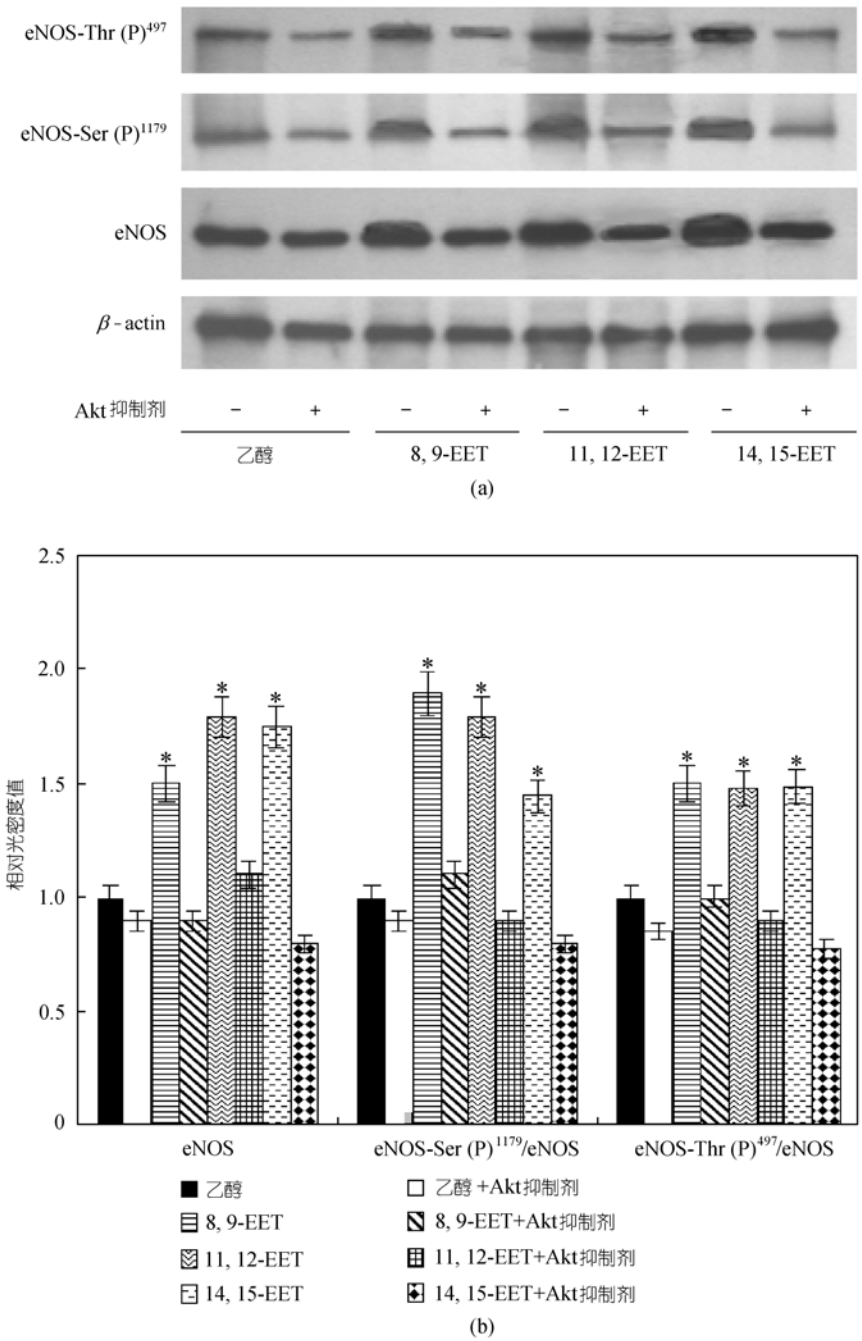


图 3　Akt 抑制剂对外源性 EETs 诱导的 eNOS 蛋白表达及其磷酸化水平上调作用的影响

(a) Western 杂交(为 3 次独立实验的代表性结果)，显示 8, 9-, 11, 12- 和 14, 15-EET 均可以上调 eNOS 表达，并增强 eNOS-Ser^{1179} 与 eNOS-Thr^{497} 位点的磷酸化水平，用 Akt 抑制剂处理后此效应可被抑制. (b) 条带扫描密度分析结果，用相应β-actin 将各组数据进行标准化处理后以均数±标准差表示. * 代表与对应空白对照组和 Akt 抑制剂组相比差异有显著性意义($P < 0.05$)

0.05). CYP 表氧化酶抑制剂 17-ODYA，PI3K 抑制剂 LY294002 和 Akt 抑制剂都可抑制此效应，表明 CYP 表氧化酶的确是通过其花生四烯酸代谢产物 EETs 发挥的上述作用，且该过程可能由 PI3K/Akt 信号转导



图 4 重组腺相关病毒 rAAV 所介导的细胞色素 P450 表氧化酶在牛主动脉内皮细胞的有效表达

通路所介导. 具体为: EETs 通过激活 PI3K/Akt 上调 eNOS 蛋白表达和 eNOS-Ser(P)^{1179}, 同时还经 Akt 通路增强 eNOS-Thr^{497} 位点的磷酸化水平, 这与外源性 EETs 的结果完全一致(图 5).

3 讨论

内皮源性舒张因子 NO, 是一种由eNOS代谢产生的血管活性物质, 它通过调节血管张力、血管的形成及重构, 在维持心血管稳态和抗动脉粥样硬化中发挥着重要作用[1]. 内皮功能失调, NO合成减少, 被认为是心血管系统疾病如动脉粥样硬化发生、 发展的始动和加重因素, 同时也是多种心血管危险因素如高血压、高脂血症、糖尿病等导致心血管并发症发生的中心环节, 因此, 有关eNOS功能调节的研究近年来受到了国内外学者的广泛关注和重视.

最初的研究认为eNOS是一种Ca^{2+}/CaM (camodulin钙调素)依赖性酶, 激动剂通过提高胞浆中的钙离子浓度激活eNOS. 近年来又有研究发现许多刺激物通过非Ca^{2+}依赖性的磷酸化修饰来调节eNOS的活性, 包括缓激肽(BK)、雌激素、血管内皮生长因子(VEGF)、流体剪切力(FSS)等, Ca^{2+}拮抗剂无法阻断这种方式的激活效应. 在此过程中, 丝氨酸1179(Ser^{1179})和苏氨酸 497(Thr^{497})是eNOS的两个比较重要的调节位点(人的Ser^{1177} 和Thr^{495} 分别与牛的Ser^{1179} 和Thr^{497} 相对应), 其中Ser^{1179} 位点可被多种蛋白激酶磷酸化, 包括PI3K, Akt(PKB), PKA, AMPK等[8~16], 通过增强从eNOS还原酶区到氧化酶区的电子流, 提高NO的产量[17], 而定位于CaM结合区的Thr^{497} 则是一个负性调节位点, 它被磷酸化后可以抑制eNOS的活化.

除了NO和PGI_2外, EDHF是人们新近发现的第三类内皮来源的舒血管因子, 它通过激活钙离子敏感的钾通道使内皮下血管平滑肌发生超极化而舒张血管[18]. 目前关于EDHF的化学成分尚有争议, 但多数研究认为花生四烯酸细胞色素P450 表氧化酶代谢产物EETs就是EDHF或其中的一种[3,5]. 细胞色素P450表氧化酶是花生四烯酸(AA)除脂氧化酶和环氧化酶外的第三条代谢途径, 它可以催化AA产生四种EETs即 5, 6-, 8, 9-, 11, 12-和 14, 15-EET, 不同的EETs具有的生理效应基本相似. 内皮细胞通过分泌多种生物活性物质来维持血管的稳态, 研究表明, NO和EDHF这两种重要的内皮源性血管活性物质之间存在着调控关联, 一方面NO可以减少EDHF的释放[6]; 另一方面EETs却可以上调eNOS的蛋白表达并增强其活性[7]. 在此基础上, 本研究进一步提示EETs对eNOS的活性调节可能与PI3K/Akt介导的Ser^{1179} 和Thr^{497} 磷酸化水平改变相关, 此外还证明除了MAPK, PKC外, PI3K/Akt信号转导通路也参与了EETs对eNOS的蛋白表达上调过程.

我们的结果显示, 转染CYP表氧化酶可以上调eNOS-Ser^{1179} 位点的磷酸化水平, 且PI3K抑制剂和Akt抑制剂都可以抑制此效应, 提示EETs可能是通过PI3K/Akt途径上调eNOS-Ser(P)^{1179}. 通过激活PI3K/Akt提高eNOS-Ser^{1179} 位点的磷酸化水平, 进而增强eNOS的活性是一个经典的eNOS磷酸化活性调节信号转导通路[8~19]. Akt的活性突变体Akt^{myr}可以增强eNOS-Ser^{1179}位点的磷酸化水平, 提高eNOS的活性, PI3K为Akt的上游激酶, PI3K抑制剂和Akt抑制剂都可以阻断VEGF 对eNOS-Ser^{1179} 位点的磷酸化水平上调作用而抑制eNOS的活化, 且Akt的失活突变体Akt^{AA}和Akt^{AAA}也可以抑制VEGF对eNOS的磷酸化活性调节[20]. 我们以前的研究表明EETs可以增强eNOS的活性, 这很有可能是通过EETs上调eNOS-Ser^{1179} 位点的磷酸化水平来实现的.

Thr^{497} 是eNOS的一个负性磷酸化活性调节位点, 蛋白激酶C(PKC)和AMPK(AMP-activated protein kinase)都可以使eNOS-Thr^{497} 磷酸化从而降低eNOS的活性[14,15,21]. BK主要是通过降低eNOS在Thr^{497} 位点的磷酸化水平而上调eNOS活性的, PKC抑制剂可增强此效应[14,15]. 此外, eNOS-Thr^{497} 的去磷酸化也参与了VEGF和H_2O_2 介导的eNOS活化过程[12,19]. 然而我们的结果显示EETs增强了eNOS-Thr^{497} 位点的磷酸化水平, 这似乎与以前的结果EETs可以上调

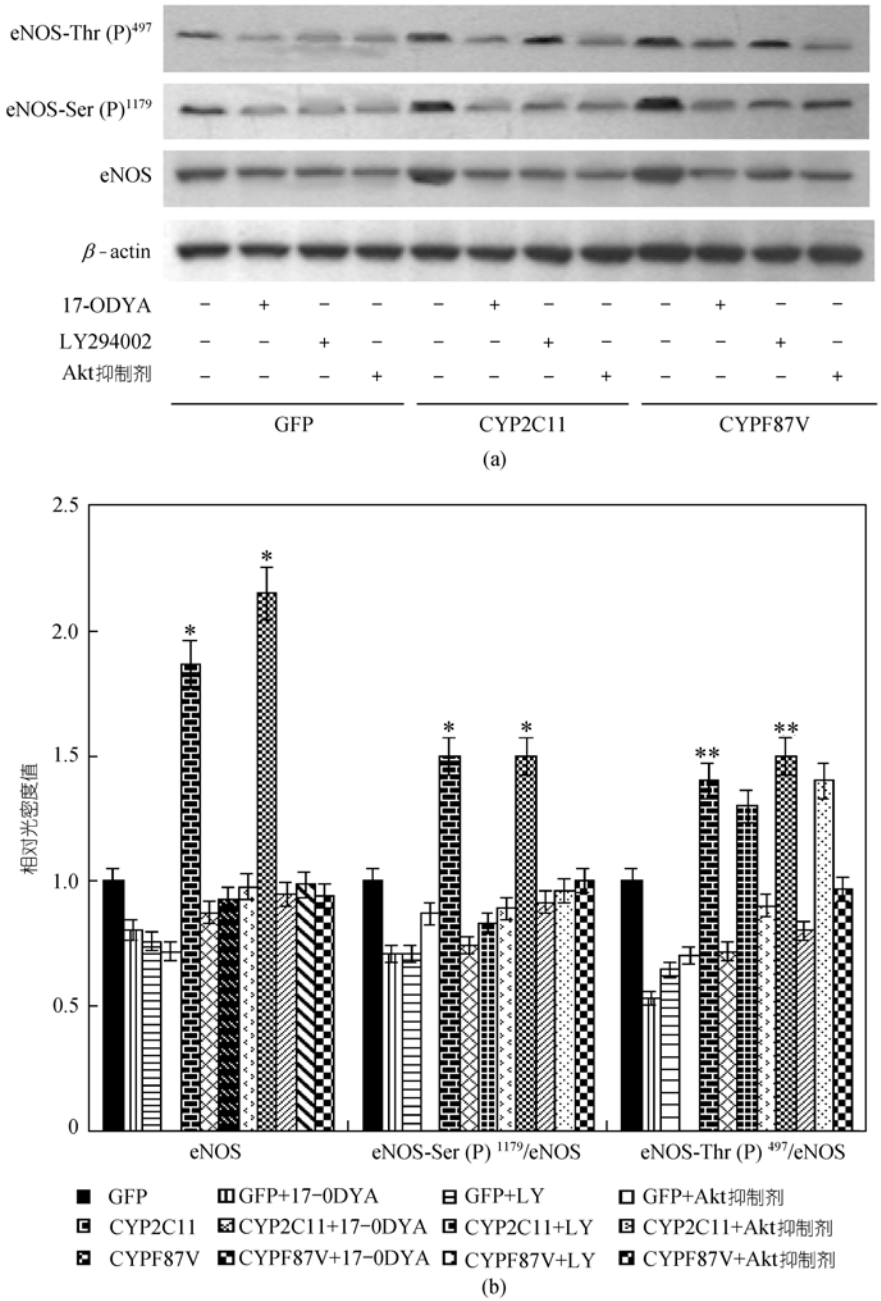


图 5　PI3K 抑制剂或 Akt 抑制剂对 CYP450 表氧化酶介导的 eNOS 蛋白表达及其磷酸化水平上调作用的影响

(a) Western 杂交(3 次独立实验的代表性结果), 显示两种 AA-CYP 表氧化酶都可以增强 eNOS 蛋白表达和 eNOS-Ser^{1179} 与 eNOS-Thr^{497} 位点的磷酸化水平, 加入 Akt 抑制剂或 CYP 表氧化酶抑制剂 17-ODYA 后该效应可被抑制, PI3K 抑制剂 LY294002 只能够抑制 eNOS 蛋白表达和 eNOS-Ser^{1179} 位点的磷酸化水平的改变, 并不能阻断 EETs 对 eNOS-Thr(P)^{497} 的上调. (b) 显示条带密度扫描分析结果, 各组数据均用相应β-actin 进行标准化处理后以均数±标准差表示. * 代表与相应空白对照组和各种抑制剂组相比皆有显著性差异; ** 代表与相应空白对照组和 17-ODYA, Akt 抑制剂组相比都有显著性差异($P < 0.05$)

eNOS的活性相矛盾，我们认为高活性分子在体内的复杂调节可能导致了此现象的发生，而EETs对eNOS的调节可能是双向的，一方面EETs可以上调eNOS的蛋白表达并增强Ser^{1179} 位点的磷酸化水平使其活性提高；另一方面EETs可增强Thr^{497} 位点的磷酸化水平降低其活性，最终的结果是EETs使NO的产生增多但

又不至于过多，从而使调节效应达到最佳，这种双向调节的模式可能是同时或顺次发生的. 有研究报道VEGF可以顺次激活PKA和PKC，前者使eNOS-Ser^{1179}磷酸化，eNOS-Thr^{497}去磷酸化，eNOS活性提高；后者使eNOS-Ser^{1179}去磷酸化，eNOS- Thr^{497}磷酸化，eNOS活性降低，这提供了一条完整的eNOS激活失活信号通路[13]. 我们的结果同时反映了eNOS的活化和失活，存在着两种可能：一种是EETs同时增强Ser^{1179}和Thr^{497}位点的磷酸化水平，效应中和后表现为活性提高；另一种是EETs通过顺次增强Ser^{1179}和Thr^{497}位点的磷酸化水平来控制eNOS的激活失活，由于选择检测的时间点可能恰好位于eNOS激活和失活消长的区间内，即Ser1179 位点已经被充分磷酸化而Thr497 位点尚未完全磷酸化，故出现的净效应为eNOS活性增加. 此外，Bernier 等人[22]报道BK 激活MAPK(mitogen-activated protein kinase)使其与eNOS发生顺行性的分离和重组，而MAPK对eNOS的直接作用为抑制其活性，因此它被认为参与了eNOS被BK激活后的失活过程. 从某种程度上讲，这也支持了我们所提出的刺激物对eNOS进行双向调节的假说.

另外，我们的结果还显示，Akt抑制剂可以抑制EETs对eNOS-Thr^{497}位点的磷酸化上调作用，PI3K抑制剂LY294002 则对此无影响. 尽管PI3K被认为是Akt的上游调节酶，但Akt也可以通过非PI3K依赖的方式激活[23]. 结果表明，EETs通过PI3K/Akt途径上调eNOS-Ser^{1179}磷酸化水平，但对eNOS-Thr^{497}位点的磷酸化的调节却是Akt依赖，PI3K非依赖的方式，提示这两种Akt可能是非同源的. 此外，目前尚无Akt可以直接磷酸化eNOS-Thr^{497}的证据，提示Akt对eNOS-Thr(P)^{497}的调节可能是间接的通过激活其他蛋白激酶或抑制某种相关磷脂酶来实现的[13~15].

我们以前的研究表明EETs可以通过激活MAPK, PKC 信号通路上调 eNOS 的蛋白表达，这里又发现PI3K/Akt 也参与了 EETs 对 eNOS 蛋白表达的调节过程. 为了证明 CYP 表氧化酶是通过其代谢产物 EETs而非其直接与 eNOS 结合发挥的调节作用，我们在转染CYP表氧化酶后加入其抑制剂17-ODYA进行处理，结果显示所有效应都被抑制. 此外，我们还用 3 种不同形式的外源性 EETs 对内皮细胞进行诱导干预，所得结果与基因转染完全一致，表明 CYP 表氧化酶对eNOS 的调节的确是通过其花生四烯酸代谢产物EETs 来实现的. 因 EETs 可同时上调总的 eNOS 蛋白表达，影响其对磷酸化 eNOS 调节的观察，为排除这种干扰，我们用 Phosphor-eNOS 与 eNOS 的比值进行比较和统计学分析，得出了上述结论，具有可信性.

此外，eNOS是一种经典的Ca^{2+}/CaM依赖性酶，而EETs的产生与NO类似，也呈Ca^{2+}依赖性. 有研究表明，AMPK在Ca^{2+}/CaM存在时可以磷酸化Ser^{1179}活化eNOS，而当Ca^{2+}/CaM缺乏时则表现为磷酸化Thr^{497}使eNOS失活[16]. 在我们的结果中，Akt的双重作用与AMPK的角色非常相象，是否也和Ca^{2+}浓度改变相关有待进一步探讨.

总之，我们的研究结果表明, EETs 对 eNOS 的活性上调作用可能与 PI3K/Akt 介导的 eNOS-Ser^{1179}位点的磷酸化水平增强有关，且 EETs 能够同时通过Akt 信号途径上调 eNOS-Thr(P)^{497}，这可能也参与了eNOS 的活性调节过程. 此外，EETs 还能够通过激活PI3K/Akt 增加 eNOS 的蛋白表达. 鉴于病理状态下NO 合成减少，EETs 生成增多，因此研究二者之间的调控关系，阐明相关的信号转导通路，对于深入了解疾病的发生发展过程及其病理生理变化具有比较重要的意义.

致谢 Vanderbilt 大学的 Jorge Capdevila 博士提供编码 CYPF87V 突变体和 CYP2C11 的全长 cDNA 以及相应的单克隆抗体，谨致谢意.

参 考 文 献

1 Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. Prog Cardiovasc Dis, 1995, 38: 87~104
2 Harder D R, Campbell W B, Roman R J. Role of citochrome P450 enzymes and metabolites of arachidonic acid in the control of vascular tone. J Vasc Res, 1995, 32: 79~92
3 Gebremedhin D, Harder D R, Pratt P F, et al. Bioassay of an endothelium-derived hyperpolarizing factor from bovine coronary arteries: role of a cytochrome P450 metabolite. J Vasc Res, 1998, 35: 274~284[DOI]
4 Node K, Huo Y, Ruan X, et al. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. Science, 1999, 285: 1276~1279[DOI]
5 Cohen R A, Vanhoutte P M. Endothelium-dependent hyperpolarization beyond nitric oxide and cyclic GMP. Circulation, 1995, 92:

3337~3349
6 Bauersachs J, Popp R, Hecker M, et al. Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. Circulation, 1996, 94: 3341~3347
7 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 Pharmacol Exp Ther, 2003, 307: 753~764 [DOI]
8 Fulton D, Gratton J P, McCabe T J, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. Nature, 1999, 399: 597~601[DOI]
9 Gallis B, Corthals G L, Goodlett D R, et al. Identification of flow-dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. J Biol Chem, 1999, 274: 30101~30108[DOI]
10 Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. Nature, 1999, 399: 601~605[DOI]
11 Yong C B, Jinah H, Michelle S, et al. Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser635 by protein kinase A-dependent mechanism. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283: 1819~1828
12 Kou R, Greif D, Michel T. Dephosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase by vascular endothelial growth factor. Implications for the vascular responses to cyclosporin A. J Biol Chem, 2002, 277: 29669~29673[DOI]
13 Michell B J, Chen Z P, Tiganis T, et al. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. J Biol Chem, 2001, 276: 17625~17628[DOI]
14 Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, et al. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. Circ Res, 2001, 88: 68~75
15 Harris M B, Ju H, Venema V J, et al. Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. J Biol Chem, 2001, 276: 16587~16591 [DOI]
16 Chen Z P, Mitchelhill K I, Michell B J, et al. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial nosynthase. FEBS Lett, 1999, 443: 285~289[DOI]
17 McCabe T J, Fulton D, Roman L J, et al. Enhanced electron flux and reduced cvalmodulin dissociation may explain “Calcium- independent” eNOS activation by Phosphorylation. J Biol Chem, 2000, 275: 6123~6128[DOI]
18 Lu T, Katakam P V, VanRoollins M, et al. Dihytroxyeicosatrienoic acids are potent acivators of Ca(2+)-activated K(+) channels in isotiated rat coronary myocytes. J Physiol, 2001, 534:651~667 [DOI]
19 Thomas S R, Chen K, Keaney J F Jr. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. J Biol Chem, 2002, 277: 6017~6024 [DOI]
20 Boo Y C, Sorescu G, Boyd N, et al. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. J Biol Chem, 2002, 277: 3388~3396[DOI]
21 Zou M H, Hou X Y, Shi C M, et al. Modulation by peroxynitrite of Akt- and AMP-activated kinase-dependent Ser1179 phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. J Biol Chem, 2002, 277: 32552~32557[DOI]
22 Bernier S G, Haldar S, Michel T. Bradykinin-regulated interactions of the mitogen-activated protein kinase pathway with the endothelial nitric-oxide synthase. J Biol Chem, 2000, 275: 30707~30715[DOI]
23 Konishi H, Matsuzaki H, Tanaka M, et al. Activation of RAC-protein kinase by heat shock and hyperosmolarity stress through a pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 7639~7643[DOI]