

花生四烯酸代谢组学异常与经皮冠状动脉介入术后支架内再狭窄

高应东¹, 侯园龙¹ 综述, 王书奎¹, 肖平喜² 审校

(南京医科大学 1. 附属南京医院医学检验科 第三临床医学院临床检验诊断学教研室,
2. 附属南京医院心血管内科, 江苏省南京市 210006)

[关键词] 花生四烯酸; 代谢组学; 经皮冠状动脉介入治疗; 支架内再狭窄; 氧化应激

[摘要] 花生四烯酸代谢产物通过多种途径产生大量活性氧,促进了血管内皮细胞的炎症反应及氧化应激;经皮冠状动脉介入术后炎症反应与新生内膜形成密切相关,而内膜过度增生导致的再狭窄涉及到活性氧产生及氧化应激刺激。通过代谢组学方法筛选出花生四烯酸的差异代谢物,作为衡量冠状动脉支架植入术后再狭窄的关键标志物,可以为临床再狭窄的研究及治疗提供新的思路。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Metabonomics Anomaly of Arachidonic Acid and In-stent Restenosis after Percutaneous Coronary Intervention

GAO Ying-Dong¹, HOU Yuan-Long¹, WANG Shu-Kui¹, and XIAO Ping-Xi²
(1. Clinical Laboratory, the Affiliated Nanjing Hospital & Department of Clinical Laboratory Diagnostics, the Third Clinical School of Medicine, 2. Department of Cardiology, the Affiliated Nanjing Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210006, China)

[KEY WORDS] Arachidonic Acid; Metabonomics; Percutaneous Coronary Intervention; In-stent Restenosis; Oxidative Stress

[ABSTRACT] Arachidonic acid metabolites produced a large number of reactive oxygen species through a variety of ways, which promoted the inflammatory reaction and oxidative stress in vascular endothelial cells; Inflammation reaction after percutaneous coronary intervention (PCI) is closely related to neointimal formation, excessive intimal hyperplasia leads to in-stent restenosis. However, this whole process involves the production of reactive oxygen species and oxidative stress. Based on metabonomics method, a series of distinctive arachidonic acid metabolites could be screened as a key marker predicting in-stent restenosis after PCI, which could provide new ideas for clinical research and treatment of in-stent restenosis.

最近研究表明,心血管疾病与花生四烯酸(arachidonic acid, AA)代谢有很强的相关性^[1-2]。花生四烯酸及其代谢产生的小分子活性物质参与细胞增殖分化、炎症反应等生理过程,在人类心血管疾病的发生发展中起着重要作用。代谢组学在其诞生的近 10 年里在多个学科领域取得飞速发展并建立了多种代谢组学检测分析方法。本文针对花生四烯酸代谢组学在冠状动脉介入术后支架内

再狭窄中的可能机制作一综述。

1 花生四烯酸及其代谢产物与支架植入术后再狭窄

花生四烯酸可被环氧合酶(cyclooxygenase, COX)、脂氧化酶(lipoxygenase, LO)、细胞色素 P450 (cytochrome P-450, CYP450)表氧化酶催化代谢生

[收稿日期] 2014-04-11 [修回日期] 2014-05-08

[基金项目] 南京市医学科技发展项目(YKK14096);南京市青年卫生人才支持项目(QRX11246)

[作者简介] 高应东,医学硕士,副主任技师,研究方向为生物化学诊断,E-mail 为 lgydq@126.com。王书奎,医学博士,主任技师,教授,博士研究生导师,研究方向为细胞生物学及实验医学,E-mail 为 wsk_zzy@hotmail.com。通讯作者肖平喜,医学博士,副主任医师,研究方向为冠心病诊断与治疗,E-mail 为 sysu-xiao@163.com。

成具有生物活性的产物,包括前列腺素 (prostaglandin, PG)、白三烯 (leukotriene, LT) 以及环氧二十碳三烯酸 (epoxyeicosatrienoic acid, EET) 和 20-羟-二十烷四烯酸 (20-hydroxyeicosatetraenoic acid, 20-HETE)^[3],其本身及部分衍生物具有诱导血管内皮细胞氧化应激和促进炎症的作用。炎症反应被认为是冠状动脉支架置入术后再狭窄 (restenosis, RS) 发生发展的重要病理生理机制之一。

Myong 等^[4]通过测定 92 名支架植入术后再狭窄患者血清中的二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA) 和 AA 的含量,发现 EPA/AA 比率在术后再狭窄患者中明显下降,这可能提示 EPA/AA 比率将是预示支架植入术后再狭窄的潜在标志物^[4]。十四烷基硫代乙酸 (tetradecylthioacetic acid, TTA) 作为一种抗氧化剂,其涂抹的支架安置在猪冠状动脉后,发现花生四烯酸的含量显著上升,而且与 TTA 的剂量成正相关。这表明 TTA 作为抗氧化剂用于支架涂层中反而会起到促进炎症的作用,进而引起花生四烯酸发生变化,这可能提示花生四烯酸在支架植入术后的炎症反应中发挥了重要作用^[5]。

2 氧化应激与支架植入术后再狭窄

经皮冠状动脉介入术 (percutaneous coronary intervention, PCI) 对于冠状动脉粥样硬化性心脏病具有划时代的意义。但是,即便是应用了药物洗脱支架,仍有 5% ~ 10% 的再狭窄率。Hasokawa 等^[6]认为:RS 分为血栓形成阶段、细胞因子作用阶段、炎症反应阶段,最终导致新生内膜的大量增生引起血管壁的重构从而引起 RS。大量研究证实活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和氧化应激 (oxidative stress, OS) 涉及参与动脉粥样硬化和再狭窄的病理生理过程^[7]。氧化应激诱导内皮细胞损伤的机制非常复杂,主要表现为氧自由基的过氧化反应,并且氧化应激又可以促进炎症因子的释放,从而进一步激活和加强氧化应激。

研究表明,ROS 在支架植入术后再狭窄病理生理过程中起重要作用,生物体的氧化应激状态常与自由基增加伴同存在,氧化应激引起的氧化损伤反应常由自由基介导发生^[8]。血管内皮细胞、平滑肌细胞、外膜成纤维细胞等都产生 ROS,除线粒体呼吸链复合物 I ~ III 部位^[9]能产生 ROS 外,一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS)、辅酶 II (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶 (NADPH oxidase, NOX)、黄嘌呤氧化酶和脱偶联环

氧合酶所催化的反应均伴有 ROS 的生成。研究表明内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 脱偶联是导致 NO 水平下降和氧自由基水平升高的重要机制,其中 ROS 水平升高又是造成 eNOS 脱偶联的主要原因^[10]。NOX 与 gp91phox 为同源物,其主要生物学功能是产生 ROS^[11]。心血管疾病 ROS 的另一个来源是黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XOD),XOD 以分子氧为电子受体,通过级联反应生成大量的活性氧。另外 COX 催化的花生四烯酸过氧化反应也产生自由基。Kim 等^[12]研究发现,COX-2 与诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 共同参与调控炎症反应的过程,体外实验已表明,iNOS 通过与 COX-2 结合增加其表达从而促进前列腺素的释放。

金属裸支架 (bare metal stent, BMS) 术后再狭窄可以解释为 ROS 导致新生内膜的形成^[13]。Ohtani 等^[14]发现血管紧张素 II 型受体阻断剂通过下调 NOX 的表达降低支架植入术后再狭窄的发生。Chen 等^[15]利用 NOX2^{-/-} 基因敲除小鼠进行研究,发现与野生型鼠相比,NOX2^{-/-} 基因敲除小鼠在经股动脉血管损伤后,其内膜增生和白细胞分化明显减轻。支架植入术后的炎症反应与新生内膜的形成密切相关,这可能是因为炎症细胞引起 ROS 大量聚集,加重损伤部位的氧化应激刺激从而导致支架植入术后再狭窄^[16]。临床研究表明冠状动脉支架植入术能激活中性粒细胞产生 ROS,这一过程在再狭窄的发病机制中有一定作用^[17]。Ohtani 等^[14]观察 BMS 植入兔动脉后发现 ROS 水平明显升高,并伴有 NOX、p22phox、gp91phox 表达下调。Pendyala 等^[18]发现在猪体内植入紫杉醇洗脱支架 (paclitaxel-eluting stent, PES) 后,与 BMS 相比,超氧离子增多和 NOX 活性升高,并指出这可能与支架局部过度的炎症反应及非支架覆盖血管远端超氧离子的产生有关。紫杉醇洗脱支架能够活化 NOX 的活性,引起线粒体中 ROS 的产生和释放^[19]。雷帕霉素洗脱支架植入后的大鼠内皮细胞超氧离子自由基产生增多,NO 水平降低^[20]。

3 花生四烯酸与氧化应激

细胞膜磷脂含有大量的多不饱和脂肪酸,其中花生四烯酸是人体分布最广的一种。当细胞受到刺激时,激活细胞膜上的磷脂酶 A2,使膜上的 AA 释放出来。AA 通过促进活性氧的产生,进而诱发氧化应激,主要有以下几条通路:第一,花生四烯酸

能够引起细胞内钙离子浓度增加,钙离子激活 NOX5,产生过量的 ROS^[21];第二,AA 能通过激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 进而激活高糖诱导的内皮细胞产生大量的活性氧^[22]。Lee 等^[23]在牛主动脉内皮细胞中加入 AA 和高糖,应用活性氧捕获剂二氢乙啶 (dihydroethidium, DHE)、双氢罗丹明 123 (dihydrogen rhodamine 123, DHR123) 孵育技术,发现细胞液中氧化型谷胱甘肽 (oxidized glutathione, GSSG) 的含量与 AA 和高糖浓度呈正相关,这表明 AA 能够促进氧化应激。受体交互作用蛋白 1 (receptor-interacting protein 1, RIP1) 作为信号分子能够调控花生四烯酸并消耗谷胱甘肽,进而诱导氧化应激,产生大量 ROS,造成细胞凋亡^[24]。AA 可以提高线粒体膜的流动性,降低线粒体呼吸链复合酶的活性,从而导致经电子传递链生成的 O²⁻ 显著增多,使线粒体产生过量 ROS^[25]。除上述途径外,AA 在通过环加氧酶途径、脂氧化酶途径时,也产生大量 ROS,加重氧化应激。

AA 作为一种重要的炎症因子,与氧化应激之间存在复杂的相互作用关系,它既能诱导氧化应激及大量 ROS 的产生,同时又通过提高抗氧化酶活性及减少线粒体 ROS 的生成来抑制氧化应激,而氧化应激对 AA 的释放也有正反两方面的作用^[26]。

4 花生四烯酸衍生物与氧化应激

花生四烯酸主要通过环氧合酶途径、脂氧酶途径作用分别产生前列腺素、血栓素 (thromboxane, TX) 和白三烯等。另外 AA 的细胞色素 P450 途径是近 10 余年研究的热点,其代谢产物 EET 和 20-HETE 在体内的生理和病理过程中发挥着重要作用。

20-HETE 是 CYP450 ω -羟化酶催化 AA 代谢的主要产物,它作为体内重要的血管活性物质,在调节血压方面发挥一定作用;抑制 20-HETE 产生,可减少由于缺血引起的心肌梗死面积,因而其可能成为治疗心脏缺血性疾病的新靶点^[27]。人类发现的 CYP 羟化酶包括 CYP4A11 和 CYP4F2,在体内,COX2 对 20-HETE 代谢和失活起重要作用^[28-29]。研究表明 20-HETE 能够诱导肺动脉内皮细胞和牛主动脉内皮细胞产生 ROS 引起凋亡反应,在此研究基础上,发现由 20-HETE 诱导产生的 ROS,能够被 NOX 抑制剂 Apocynin、Rac1 所抑制,这显示 20-HETE 引起的心肌细胞凋亡可能由 Rac1/2 和 NOX 系统所介导。通过注射二氢睾酮 (dihydrotestoster-

one, DHT) 建立大鼠高血压模型,能诱导 CYP4A2 和 20-HETE 的表达及合成,其机制则与 gp91 和 p47phox 表达增加有关^[30]。在人脐静脉内皮细胞 CYP4A1 或 CYP4A2 的表达水平与 20-HETE 呈正相关。研究证实核因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 的过表达能够促进 20-HETE 的释放;丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路的抑制剂 U0126 能够使 NF- κ B 的表达下调,这说明 20-HETE 作为上游小分子能够激活 MAPK/ERK 通路,进而激活 NF- κ B 促进细胞氧化应激^[31]。而 NF- κ B 对氧化应激十分敏感,并能够诱导 gp91phox 的表达,进而激活氧化酶产生更多的自由基^[32]。

在人体中,EET 由细胞色素 P450 表氧化酶的 2 个亚基 CYP2b 和 CYP2c 催化花生四烯酸生成具有较高生物活性的 4 种形式:5,6-EET、8,9-EET、11,12-EET 和 14,15-EET^[33]。EET 在体内具有多种生物学功能,包括扩张血管、降低血压、促进纤溶、调节血管生长及抗炎等^[34]。正常情况下生成的 EET 在很短的时间内经可溶性环氧化物水解酶 (soluble epoxide hydrolase, sEH) 的作用被迅速代谢转变成生物活性低的二聚体,即 5,6-DHET、8,9-DHET、11,12-DHET 和 14,15-DHET。通过抑制 sEH 可减慢 EET 的降解速度,提高 EET 的水平。

5 心血管氧化应激和代谢组学

缺氧在心血管疾病和众多疾病中起有害作用,Tissot van Patot 等^[35]利用代谢组学的方法对低氧环境进行研究分析,寻找缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF) 在缺氧环境下被激活的证据:14 位试验者处于低气压室内,相当于海拔 4300 米高度的低氧环境中,分析白细胞中 HIF-1 DNA 结合蛋白和 HIF- α 蛋白水平,并采用基于核磁共振 (¹H nuclear magnetic resonance, ¹H-NMR) 代谢组学方法研究 47 个代谢物中关于氧化应激的代谢标志物,结果表明谷胱甘肽循环水平降低 35% ($P=0.001$),乳酸和琥珀酸水平分别增加 29% 和 158% ($P=0.007$ 和 $P=0.001$),尿液中 15-F2t-异前列烷 (15-F2t-isop) 水平也有所增加 ($P=0.037$),表明缺氧可引起血液和尿液中有关氧化应激的代谢标志物水平增加。在美国,每年因腹主动脉瘤而死亡的人数几乎达到 9000 人,氧化应激可能参与了其病理和发病过程。Ciborowski 等^[36]通过液相色谱-质谱联用技术对人类代谢组学研究,寻找氧化应激对于腹主动脉瘤病

因发生的影响,将来自人类主动脉瘤不同部位(腔内和腔外层,动脉瘤壁和健康的主动脉壁)的代谢物进行对比,发现与炎症和氧化应激相关的代谢物,其在脂肪酸酰胺中可能起到潜在的作用。

Mallat 等^[37]利用液质联用技术通过脂质提取和酯水解的方法研究了 30 个颈动脉粥样硬化斑块中的内源性代谢物的变化,发现与未发病人群相比,动脉硬化患者斑块中 HETE 含量差异显著,其中 9-HETE 的含量最高,这提示 HETE 可能会作为动脉硬化斑块的内源性标志物。Willey 等^[38]从动脉硬化患者分离出的单核细胞中发现 5-LO 和 5-HETE 上调且呈高度正相关,这提示 5-LO 通路的上调可能与心脏病有关;目前大量的研究以花生四烯酸的代谢物作为氧化应激指标,进行了关于动脉粥样硬化的相关机制研究^[39-40]。就目前而言,利用代谢组学的方法探讨动脉粥样硬化发生机制并没有得到广泛的应用,但是通过对不同生物体液和组织提取的方法,花生四烯酸的变化在这个领域内已得到越来越广泛的认识。

6 小结与展望

氧化应激作为一个系统性的变化,这就决定了关于引起 RS 的研究内容不能太单一,要多层次、多视角去分析 RS 的病理过程。众所周知,人体是一个多代谢多途径多调控网络构成的有机整体,RS 并非仅由体内的某一种生物分子或细胞因子失调所致,而是系统中的生物代谢网络发生了一系列病理改变的整体表现;抛开生物体系的系统复杂性去研究 RS 的变化,往往只能解释某一局部现象,难以阐述整个机体代谢紊乱进而难以遴选出 RS 相关的生物标志物。临床上将胱抑素 C(cystatin C, CysC)、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)等作为再狭窄的检测标志物^[41],但这些物质只能说明炎症的发生,不能成为冠状动脉粥样硬化性疾病所特有的生物标志物。而气相色谱-飞行时间质谱仪(GC/TOF)和超高效液相色谱-电喷雾-四极杆飞行时间串联质谱仪(UP-LC/Q-TOF)两种分析仪器的代谢组学分析可以用来研究这种系统性反应对下游代谢物的影响。

针对花生四烯酸代谢物的研究,在 GC/TOF 和 UPLC/Q-TOF 的基础上,运用 LC-MS-MS 等定量技术可分析花生四烯酸 3 条代谢通路中的主要代谢产物。今后的研究方向可基于代谢组学的方法从系统生物代谢网络的角度以花生四烯酸的衍生物及

氧化应激为突破口,探讨其与 RS 之间的关系及作用机制,并筛选出差异代谢物作为衡量 PCI 术后 RS 的关键标志物,进而为心血管类疾病的研究和药物开发提供支持。

[参考文献]

- [1] Althurwi HN, Elshenawy OH, El-Kadi AO. Fenofibrate modulates cytochrome P450 and arachidonic acid metabolism in the heart and protects against isoproterenol-induced cardiac hypertrophy [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2014, 63(2): 167-177.
- [2] Elshenawy OH, Anwar-Mohamed A, El-Kadi AO, et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is a potential therapeutic target in cardiovascular diseases [J]. Curr Drug Metab, 2013, 14(6): 706-719.
- [3] Elshenawy OH, Anwar-Mohamed A, Abdelhamid G, et al. Murine atrial HL-1 cell line is a reliable model to study drug metabolizing enzymes in the heart [J]. Vascu Pharmacol, 2013, 58(4): 326-333.
- [4] Myong HY, Kennosuke Y, Masahiko O, et al. Plasma eicosapentaenoic acid/arachidonic acid ratio predicts late in-stent restenosis after bare metal stenting in patients with acute myocardial infarction [J]. Circulation, 2012, 126: A11 256.
- [5] Kuiper KK, Salem M, Gudbrandsen OA, et al. Dose-dependent coronary artery intimal thickening after local delivery of the anti-oxidant tetradecylthioacetic acid from stents [J]. Atherosclerosis, 2007, 195(1): e39-e47.
- [6] Hasokawa M, Shinohara M, Tsugawa H, et al. Identification of biomarkers of stent restenosis with serum metabolomic profiling using gas chromatography/mass spectrometry [J]. Circulation Journal, 2012, 76(8): 1 864-873.
- [7] Kochiadakis GE, Arfanakis DA, Marketou ME, et al. Oxidative stress changes after stent implantation: a randomized comparative study of sirolimus-eluting and bare metal stents [J]. Int J Cardiol, 2010, 142(1): 33-37.
- [8] Juni RP, Duckers HJ, Vanhoutte PM, et al. Oxidative stress and pathological changes after coronary artery interventions [J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 61(14): 1 471-481.
- [9] Al Ghouleh I, Khoo NK, Knaus UG, et al. Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: new concepts in reactive oxygen species signaling [J]. Free Radic Biol Med, 2011, 51(7): 1 271-288.
- [10] Liu VW, Huang PL. Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice [J]. Cardiovasc Res, 2008, 77(1): 19-29.
- [11] Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology [J]. Physiol Rev, 2007, 87(1): 245-313.
- [12] Kim JB, Han AR, Park EY, et al. Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NF-kappa B inactivation in RAW 264.7 macrophage cells [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(12): 2 345-351.
- [13] Farb A, Burke AP, Kolodgie FD, et al. Pathological mechanisms

- of fatal late coronary stent thrombosis in humans[J]. *Circulation*, 2003, 108(14): 1 701-706.
- [14] Ohtani K, Egashira K, Ihara Y, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates in-stent restenosis by inhibiting inflammation and progenitor cells[J]. *Hypertension*, 2006, 48(4): 664-670.
- [15] Chen Z, Keaney JF Jr, Schulz E, et al. Decreased neointimal formation in NOX2-deficient mice reveals a direct role for NADPH oxidase in the response to arterial injury[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(35): 13 014-019.
- [16] Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, et al. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans[J]. *Circulation*, 1999, 99(1): 44-52.
- [17] Inoue T, Kato T, Hikichi Y, et al. Stent-induced neutrophil activation is associated with an oxidative burst in the inflammatory process, leading to neointimal thickening[J]. *Thromb Haemost*, 2006, 95(1): 43-48.
- [18] Pendyala LK, Li J, Shinke T, et al. Endothelium-dependent vasomotor dysfunction in pig coronary arteries with paclitaxel-eluting stents is associated with inflammation and oxidative stress[J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2009, 2(3): 253-262.
- [19] Alexandre J, Hu Y, Lu W, et al. Novel action of paclitaxel against cancer cells: bystander effect mediated by reactive oxygen species[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8): 3 512-517.
- [20] Varbiro G, Veres B, Gallyas F, et al. Direct effect of Taxol on free radical formation and mitochondrial permeability transition[J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31(4): 548-558.
- [21] Jagnandan D, Church JE, Banfi B, et al. Novel mechanism of activation of NADPH oxidase 5 calcium sensitization via phosphorylation[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(9): 6 494-507.
- [22] Inoguchi T, Li P, Umeda F, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells[J]. *Diabetes*, 2000, 49(11): 1 939-945.
- [23] Lee SJ, Mun GI, An SM, et al. Evidence for the association of peroxidases with the antioxidant effect of p-coumaric acid in endothelial cells exposed to high glucose plus arachidonic acid[J]. *BMB Rep*, 2009, 42(9): 561-567.
- [24] Kim S, Dayani L, Rosenberg PA, et al. RIP1 kinase mediates arachidonic acid-induced oxidative death of oligodendrocyte precursors[J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2010, 2(2): 137-147.
- [25] Schonfeld P, Wojtczak L. Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1767(8): 1 032-040.
- [26] 陶磊, 傅淑霞. 花生四烯酸与氧化应激的研究进展[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(11): 2 233-236.
- [27] 韩冰, 赵慧颖. 20-羟二十烷四烯酸在血压及血管舒缩功能中的调节作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(2): 189-192.
- [28] Xu F, Falck JR, Ortiz de Montellano PR. Catalytic activity and isoform-specific inhibition of rat cytochrome P450 4F enzymes[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 308(3): 887-895.
- [29] Miyata N, Roman RJ. Role of 20-hydroxyecosatetraenoic acid (20-HETE) in vascular system[J]. *J Smooth Muscle Res*, 2005, 41(4): 175-193.
- [30] Singh H, Cheng J, Deng H, et al. Vascular cytochrome P450 4A expression and 20-hydroxyecosatetraenoic acid synthesis contribute to endothelial dysfunction in androgen-induced hypertension[J]. *Hypertension*, 2007, 50(1): 123-129.
- [31] Kang JS, Yoon YD, Han MH, et al. Glabridin suppresses intercellular adhesion molecule-1 expression in tumor necrosis factor-alpha-stimulated human umbilical vein endothelial cells by blocking sphingosine kinase pathway: implications of Akt, extracellular signal-regulated kinase, and nuclear factor-kappa B/Rel signaling pathways[J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 69(3): 941-949.
- [32] Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. NF-kappa B regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(9): 5 657-667.
- [33] Michaelis UR, Fisslthaler B, Barbosa-Sicard E, et al. Cytochrome P450 epoxygenases 2C8 and 2C9 are implicated in hypoxia-induced endothelial cell migration and angiogenesis[J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt 23): 5 489-498.
- [34] 蒋云, 许丹焰, 赵水平. 可溶性环氧化物水解酶抑制剂在心血管领域中的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(2): 165-168.
- [35] Tissot van Patot MC, Serkova NJ, Haschke M, et al. Enhanced leukocyte HIF-1alpha and HIF-1 DNA binding in humans after rapid ascent to 4300 m[J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(11): 1 551-557.
- [36] Ciborowski M, Martin-Ventura JL, Meilhac O, et al. Metabolites secreted by human atherothrombotic aneurysms revealed through a metabolomic approach[J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(3): 1 374-382.
- [37] Mallat Z, Nakamura T, Ohan J, et al. The relationship of hydroxyecosatetraenoic acids and F2-isoprostanes to plaque instability in human carotid atherosclerosis[J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(3): 421-427.
- [38] Willey MB, Alborn WE, Lutzke BS, et al. The development of methodology for clinical measurement of 5-lipoxygenase pathway intermediates from human peripheral blood mononuclear cells[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(5): 1 397-403.
- [39] Saenger AK, Laha TJ, Edenfield MJ, et al. Quantification of urinary 8-iso-PGF2 alpha using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and association with elevated troponin levels[J]. *Clin Biochem*, 2007, 40(16-17): 1 297-304.
- [40] Yin H, Cox BE, Liu W, et al. Identification of intact oxidation products of glycerophospholipids in vitro and in vivo using negative ion electrospray iontrap mass spectrometry[J]. *J Mass Spectrom*, 2009, (5): 672-680.
- [41] Shlipak MG, Ix JH, Bibbins-Domingo K, et al. Biomarkers to predict recurrent cardiovascular disease: the Heart and Soul Study[J]. *Am J Med*, 2008, 121(1): 50-57.