

# 花生四烯酸细胞色素 P450 表氧化酶对凋亡内皮细胞 Bcl-2 表达、Caspase-3 及 MAPK 活性的影响

林立 王红 陆再英 汪道文\*

(华中科技大学同济医学院附属同济医院心内科, 武汉 430030)

**摘要** 花生四烯酸经细胞色素 P450 表氧化酶代谢产生的内皮来源超极化因子(EDHF)[表氧化二十烷烯酸(EETs)]对内皮细胞具有保护作用。研究了转染细胞色素 P450 表氧化酶基因 CYPB<sub>3</sub>-F87V、CYP2C11OR 及 CYP2J2 产生内源性 EETs, 通过检测内皮细胞中 Bcl-2 表达、caspase-3 的活性及 MAPK 磷酸化水平探讨内源性 EDHF 的内皮细胞保护效应及其抗 TNF- $\alpha$  诱导内皮细胞凋亡的作用机制。原代培养的牛主动脉血管内皮细胞转染 CYP450 表氧化酶基因 24 h 后, 加入 TNF- $\alpha$  作用一定时间诱导内皮细胞凋亡, 用 Western 印迹方法检测 Bcl-2 的表达, MAPK 磷酸化水平, 同时测定 caspase-3 的活性。结果显示转染表氧化酶基因能抑制 TNF- $\alpha$  诱导的时间依赖性 Bcl-2 下调, 抑制 Caspase-3 的激活。TNF- $\alpha$  使细胞内磷酸化 MAPK 水平呈时间依赖性减低, 转染表氧化酶基因后细胞内的磷酸化 MAPK 水平较对照组升高。因此, 转染表氧化酶基因 CYPB<sub>3</sub>-F87V、CYP2C11OR 以及 CYP2J2 使内皮细胞产生内源性 EETs (EDHF) 通过激活 MAPK (ERK1/2) 途径, 抑制抗凋亡基因 Bcl-2 的降解, 抑制 caspase-3 的激活, 从而抑制 TNF- $\alpha$  诱导的内皮细胞凋亡, 因而具有内皮保护效应。

**关键词** 内皮源性超极化因子; EETs; 凋亡; 内皮细胞; MAPK

血管内皮细胞能够合成释放一系列内皮来源扩血管因子, 包括 NO (一氧化氮)、PGI<sub>2</sub> (前列环素) 等, 并通过这些因子维持心血管系统稳态, 调节血压、抗动脉粥样硬化, 保护心脑血管<sup>[1,2]</sup>。近年来人们发现了另一类内皮来源扩血管因子, 它通过激活钙敏感的钾通道使平滑肌细胞处于超极化状态从而舒张血管, 因而被称为内皮来源超极化因子(endothelium-derived hyperpolarizing factors, EDHF)<sup>[1-3]</sup>。目前绝大多数研究认为 EDHF 是由血管内皮细胞中的细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 表氧化酶(epoxygenases) 在花生四烯酸的不饱和键上表氧化而生成的代谢产物——表氧化二十烷烯酸(epoxyeicosatrienoic acids, EETs)<sup>[3]</sup>。除扩张血管外, EETs 还具有促进上皮细胞增殖<sup>[4]</sup>、抗炎<sup>[5]</sup>、抗凝<sup>[6]</sup>等效应, 我们以往的一项研究结果也证实 EDHF 能增加内皮一氧化氮合酶(eNOS) 的表达和活性, 从而对 NO 的产生具有正反馈调节作用<sup>[7]</sup>。此后的研究中我们还发现转染表氧化酶基因能抑制 TNF- $\alpha$  诱导的内皮细胞凋亡。内皮细胞凋亡在动脉粥样硬化、高血压、心力衰竭、原发性肺动脉高压、移植血管病、糖尿病、肿瘤生长和转移等疾病的发生发展中起着重要作用<sup>[8,9]</sup>。因

此本研究通过转染表氧化酶基因 CYPB<sub>3</sub>-F87V、CYP2C11OR 或 CYP2J2, 检测内源性 EETs (EDHF) 对内皮细胞凋亡过程中 Bcl-2 表达、caspase-3 活性以及 MAPK 磷酸化水平的影响, 以进一步探讨表氧化酶抗 TNF- $\alpha$  诱导的内皮细胞凋亡的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

所有细胞培养试剂, DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶(trypsin) 等购自 Gibco 公司; TNF- $\alpha$ 、放线菌素 D(actinomycin D, act D)、蛋白酶 K、溴化乙啶、苯甲基磺酰氟(PMSF)、亮抑蛋白酶肽、抑蛋白酶肽、二硫苏糖醇(DTT)、HEPES、Tween-20、牛血清白蛋白(BSA) 购自 Sigma 公司; Caspase-3 活性检测试剂盒购自 R&D 公司; 多克隆抗 Bcl-2 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 多克隆抗 ERK1/2 抗体及抗磷酸化 ERK1/2 抗体购自 NEB 公司; 细胞

收稿日期: 2006-08-03 接受日期: 2007-02-05

国家自然科学基金资助项目(No.30170387)

\* 通讯作者。Tel/Fax: 027-83662842, E-mail: dwwang@tjh.tjmu.

edu.cn

转染用 Superfect 脂质体购自美国 Qiagen 公司; 预染的 SDS-PAGE 蛋白质分子量标准购自美国 Bio-Rad 公司; 辣根过氧化物酶偶联羊抗兔 IgG 抗体购自 Jackson 公司; Western 杂交用增强化学发光试剂(SuperSignal Substrate, ECL)购自美国 Pierce 公司; 蛋白质杂交膜(PVDF 膜)购自德国 Schleicher and Schuell 公司。细胞色素 P450 表氧化酶 CYPBM<sub>3</sub>:F87V 和 CYP2C11OR cDNA, 及真核表达质粒 pCB<sub>6</sub> 由美国 Vanderbilt 大学 Capdevila 教授馈赠。CYP2J2 cDNA 由美国 NIH Zeldin 教授馈赠。

## 1.2 方法

**1.2.1 牛主动脉内皮细胞分离和培养** 从本地血清厂取刚处死小牛主动脉, 按已建立的胰蛋白酶消化分离法收集内皮细胞<sup>[7]</sup>。用 VIII 因子相关抗体(抗 von Willebrand 因子抗体)免疫荧光染色鉴定内皮细胞的纯度。所有实验均采用 4 代以内的细胞进行。

**1.2.2 细胞转染和瞬时表达** 以 pCB<sub>6</sub> 为空白对照质粒。分别构建成真核表达质粒 pCB<sub>6</sub>:CYP2C11OR、pCB<sub>6</sub>:CYPBM<sub>3</sub>:F87V 和 pCB<sub>6</sub>:CYP2J2<sup>[7]</sup>, 经酶切鉴定为正确质粒后大量扩增。按 Superfect 脂质体说明书要求进行细胞转染。

**1.2.3 Western 印迹分析** 基因转染 24 h 后, 内皮细胞经 TNF- $\alpha$  (5 ng/ml)/act D (0.01  $\mu$ g/ml) 进一步作用一定时间, 在冰育下去除细胞培养基, 用三去污裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 0.1% SDS, 100 mg/L PMSF, 1 mg/L 抑蛋白酶肽, 1% NP-40, 0.5% 去氧胆酸钠)裂解细胞。Bradford 法测定细胞裂解液中的总蛋白含量。将等量蛋白质用 8% SDS-PAGE 胶分离, 经转膜、封闭、一抗(兔抗 Bcl-2 多克隆抗体, 1:500)、二抗(辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔抗体)温育, 最后 ECL 法显影曝光。在检测磷酸化 MAPK 和总 MAPK 的 Western 印迹实验中, 在细胞中加入裂解缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1% Triton, 2.5 mmol/L 焦磷酸钠, 1 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸, 1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ g/ml 亮抑蛋白酶肽), 用超声破碎仪破碎细胞后进行上述步骤。其中兔抗磷酸化 MAPK 和总 MAPK 抗体稀释比例为 1:200。条带密度采用 GeneTools 软件进行分析。

**1.2.4 Caspase-3 活性分析** TNF- $\alpha$ /act D 诱导后, 收集所有悬浮和贴壁细胞, 加入 caspase-3 裂解液, 冰育 10 min 后, 4  $^{\circ}$ C 12000 g 离心 10 min 沉淀碎裂的细胞骨架成分。用 Bradford 方法检测上清液中的蛋白

质浓度。按试剂盒说明书要求将反应底物——一种以 p-nitroanilide(p-NA) 标记的合成多肽 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) 加入细胞裂解上清液中, 激活的 caspase-3 剪切 caspase 特异性的 DEVD, 释放出显色分子 p-NA, 用酶标仪在 405 nm 波长检测吸光度, 反映上清液中的 caspase-3 活性, 结果以 TNF- $\alpha$ /act D 诱导组内皮细胞的吸光度与相应对照组的吸光度之比值表示<sup>[10]</sup>。

**1.2.5 统计学分析** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 *t* 检验进行显著性检验。

## 2 结果

### 2.1 转染表氧化酶基因抑制 TNF- $\alpha$ 诱导的 Bcl-2 降解

我们以往的实验已经证实表氧化酶基因瞬时转染后内皮细胞中 CYPBM<sub>3</sub>:F87V、CYP2C11OR 和 CYP2J2 的表达以及内源性 EETs(EDHF) 合成增加<sup>[7]</sup>。本试验在转染表氧化酶基因 24 h 后, 加入 TNF- $\alpha$ /act D 作用一定时间(8~48 h) 诱导内皮细胞凋亡, 以 Western 印迹检测内皮细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的水平。结果表明, 促凋亡的细胞因子 TNF- $\alpha$  导致内皮细胞中 Bcl-2 的水平明显降低(图 1, TNF- $\alpha$ /act D 作用 24 h), 且这种降低呈一定的时间依赖性, 即 TNF- $\alpha$ /act D 作用时间越长, Bcl-2 表达水平越低(图

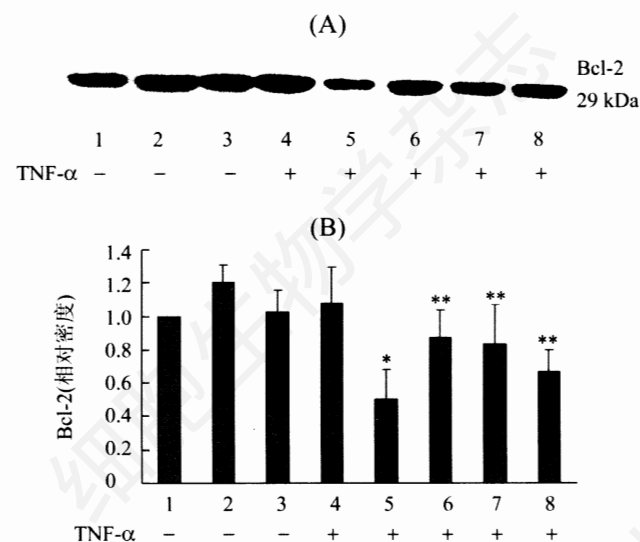


图 1 转染表氧化酶基因抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 Bcl-2 降解

A: Western 印迹检测内皮细胞中 Bcl-2 水平。B: 采用 GeneTools 密度分析软件将 Western 印迹条带进行密度扫描后的结果( $n=4$ , 与转染 pCB<sub>6</sub> 且未加入 TNF- $\alpha$  诱导组比较, \* $P<0.01$ ; 与转染 pCB<sub>6</sub> 且加入 TNF- $\alpha$  诱导组比较, \*\* $P<0.05$ )。1、4: pCB<sub>6</sub>; 2、5: CYPBM<sub>3</sub>:F87V; 3、6: CYP2C11OR; 4、8: CYP2J2。

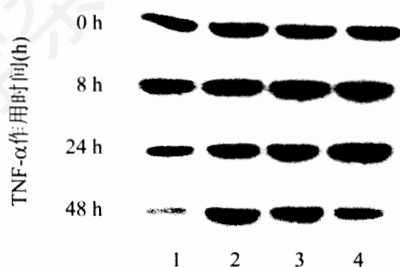


图2 Western 印迹检测 TNF- $\alpha$ /act D 作用不同时间内皮细胞中 Bcl-2 水平

1: pCB<sub>6</sub>; 2: CYP2C11OR; 3: CYPBM<sub>3</sub>-F87V; 4: CYP2J2。

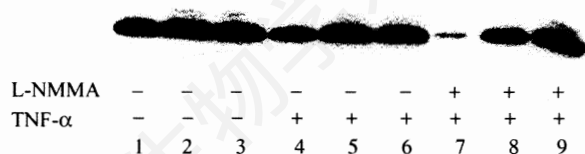


图3 Western 印迹检测 L-NMMA 对内皮细胞中 Bcl-2 表达的影响

1、4、7: pCB<sub>6</sub>; 2、5、8: CYP2C11OR; 3、6、9: CYPBM<sub>3</sub>-F87V。

2), 这与文献报道的结果相一致<sup>[11]</sup>; 转染表氧化酶基因 CYP2C11OR、CYPBM<sub>3</sub>-F87V 或 CYP2J2 后, 内皮细胞中 Bcl-2 表达水平较转染对照质粒组有明显升高(图 1)。而且随着 TNF- $\alpha$ /act D 作用时间延长, 表氧化酶基因对 Bcl-2 的保护效应越明显(图 2)。

曾有人报道<sup>[11]</sup>, 抑制 Bcl-2 的降解是 NO 抗凋亡效应的机制之一。因此, 本研究在加入一氧化氮合酶抑制剂 L-NMMA (2 mmol/L, 2 h) 抑制 NO 合成后再用 TNF- $\alpha$  诱导, 结果发现 L-NMMA 导致转染空白质粒 pCB<sub>6</sub> 的内皮细胞中 Bcl-2 水平进一步明显下降, 在转染表氧化酶基因 CYPBM<sub>3</sub>-F87V 和 CYP2C11OR 的内皮细胞中, Bcl-2 仍然维持在较高的水平, 显著高于转染空载体 pCB<sub>6</sub> 的对照组(图 3)。提示 L-NMMA 不能消除表氧化酶基因抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 Bcl-2 下调的效应。

## 2.2 转染表氧化酶基因抑制 TNF- $\alpha$ 诱导的 caspase-3 激活

转染表氧化酶基因 24 h, 再加入 TNF- $\alpha$ /act D 作用 24 h, 然后检测 caspase-3 活性。结果显示, TNF- $\alpha$  刺激后, 对照组内皮细胞中 caspase-3 的活性显著升高, 这与以往的研究结果一致。但是在转染表氧化酶基因的内皮细胞中, caspase-3 的活性较对照组明显减低(图 4)。

## 2.3 转染表氧化酶基因促进 MAPK 的激活

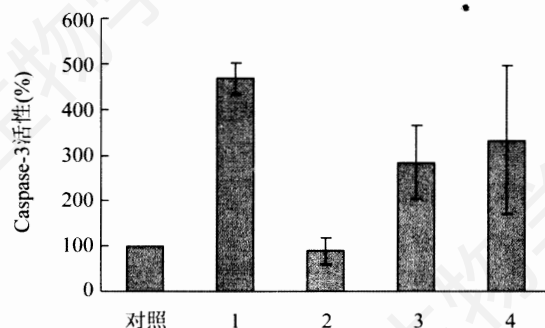


图4 以 DEVD-p-nitroanilide 为底物检测转染不同质粒后内皮细胞 caspase-3 活性, 结果表示为 TNF- $\alpha$ /act D 诱导后的吸光度与相应对照组(仅加入 act D)吸光度之比值

1: pCB<sub>6</sub>; 2: CYP2C11OR; 3: CYPBM<sub>3</sub>-F87V; 4: CYP2J2。

MAPK (ERK1/2) 能使抗凋亡蛋白 Bcl-2 磷酸化, 抑制其降解, 因此具有抗凋亡效应<sup>[11]</sup>。前面的实验发现表氧化酶基因转染能抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 Bcl-2 降解, 因此, 本研究进一步检测转染 CYP450 表氧化酶基因后 ERK1/2 活性的变化。如图 5 所显示, 在转染 pCB<sub>6</sub> 的对照组内皮细胞中, 随着时间 TNF- $\alpha$  作用时间延长, 磷酸化 ERK1/2 水平逐渐降低, 这与文献报道的结果一致<sup>[11]</sup>。转染表氧化酶基因 CYP2C11OR 或 CYPBM<sub>3</sub>-F87V 后, 内皮细胞中 ERK1/2 的磷酸化水平在所检测的各时间点较对照组都有明显的升高(图 5)。特别在 TNF- $\alpha$  诱导 1 h 后, 对照组内皮细胞 ERK1/2 的磷酸化水平较前有所降低, 而转染表氧化酶基因的内皮细胞 ERK1/2 磷酸化水平反而进一步增加(图 5C)。总 ERK1/2 水平无明显改变(图 5B)。

## 3 讨论

EDHF (EETs) 是继 NO 和 PGI<sub>2</sub> 之后人们发现的第三类内皮来源的舒血管因子<sup>[1-3]</sup>。除扩张血管外, EETs 还具有抗炎<sup>[5]</sup>、抗凝<sup>[6]</sup>、增加 eNOS 表达和酶活性的作用<sup>[7]</sup>。本研究进一步探讨了表氧化酶对内皮细胞 Bcl-2 表达、caspase-3 及 MAPK 活性的影响, 以初步了解 EDHF 抗内皮细胞凋亡的作用机制。

除了脂氧化酶和环氧化酶途径外, 花生四烯酸还通过细胞色素 P450 表氧化酶途径代谢产生 4 种 EETs (14,15-, 11,12-, 8,9-, 以及 5,6-EETs)。目前已经发现多种 CYP450 表氧化酶<sup>[12]</sup>, 本研究选择了其中三种: CYPBM<sub>3</sub>-F87V、CYP2C11OR 及 CYP2J2 转染内皮细胞。CYPBM<sub>3</sub>-F87V 是一种细菌 (*Bacillus megaterium*, BM3) CYP450 酶的突变体, 能高效选择性的产生 14S, 15R-EET<sup>[13]</sup>。CYP2C11 是从小鼠肝脏中克隆的一种

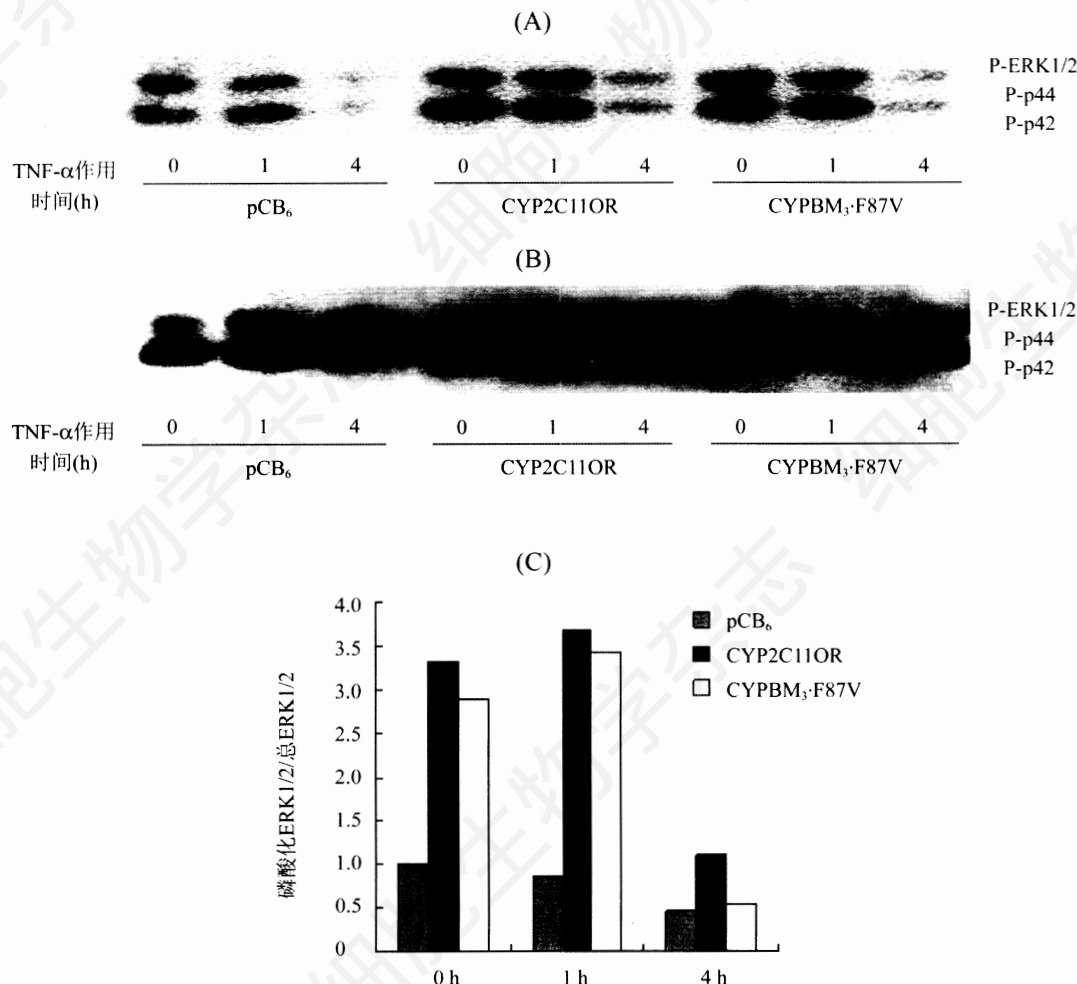


图5 Western印迹检测ERK1/2水平

A: 用抗磷酸化ERK1/2抗体杂交后的条带; B: 同一张膜再次用抗ERK抗体(识别所有磷酸化和非磷酸化ERK)杂交后条带, 显示细胞中总ERK水平; C: 采用GeneTools密度分析软件将Western印迹条带进行密度扫描后的结果, 各时间的ERK磷酸化水平 = 磷酸化ERK1/2条带密度值 / 相应总ERK1/2条带密度值。

表氧化酶, 将它与CYP450还原酶(CYPOR)进行偶连产生的融合基因CYP2C11OR能生成四种EET<sup>[14]</sup>。CYP2J2能产生四种EETs, 是人血管内皮细胞中EETs的主要来源, 但是它的酶活性相对较低<sup>[5,6]</sup>。我们以往的实验已经证实转染上述基因后内皮细胞中内源性EETs(EDHF)的合成增加<sup>[7]</sup>。

内皮细胞中有多种促凋亡的蛋白酶和抗凋亡的蛋白质起着相互抗衡的作用, 它们的平衡失调导致内皮细胞凋亡<sup>[8,9]</sup>。Bcl-2是一种抗凋亡蛋白, 能稳定线粒体膜, 抑制线粒体释放出凋亡因子, 抑制凋亡复合体形成, 抑制caspase-3激活, 从而抑制细胞凋亡<sup>[11]</sup>; 而caspase-3则是一种蛋白水解酶, 它的激活是凋亡过程中的核心环节<sup>[9]</sup>。因此, 本研究检测了转染表氧化酶基因后内皮细胞中Bcl-2水平和caspase-3活性

变化以探讨其抗细胞凋亡的机制。结果显示, TNF-α刺激导致内皮细胞中Bcl-2的表达水平呈时间依赖性的降低, 同时caspase-3活性增加; 而转染表氧化酶基因CYPBM<sub>3</sub>-F87V、CYP2C11OR以及CYP2J2能显著抑制TNF-α诱导的Bcl-2水平减低和caspase-3激活。而且CYPBM<sub>3</sub>-F87V、CYP2C11OR基因的效应比CYP2J2强一些, 这与它们的表氧化酶活性的差异是一致的。

据报道, NO能抑制Bcl-2蛋白的降解, 一氧化氮合酶(NOS)抑制剂L-NMMA显著抑制细胞内Bcl-2的水平, 这是NO发挥抗凋亡效应的机制之一<sup>[11]</sup>。如前所述, 我们以往的一项研究证实表氧化酶基因能上调eNOS表达和活性, 促进NO产生<sup>[7]</sup>。那么表氧化酶基因是否通过上调NO来抑制TNF-α诱导的Bcl-2

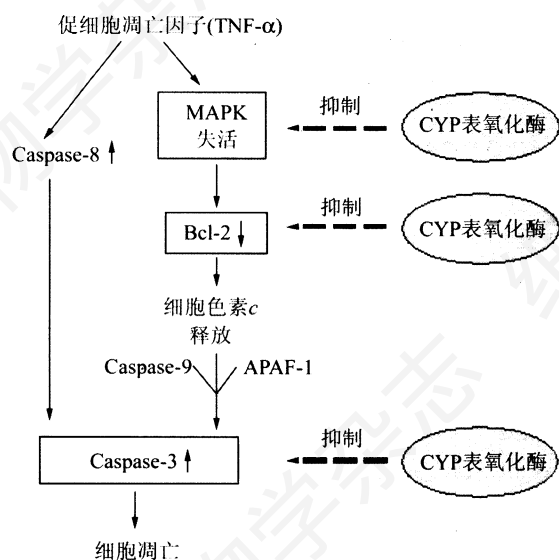


图6 细胞色素 P450 表氧化酶基因抑制 TNF- $\alpha$  诱导的内皮细胞凋亡

降解呢? 因此, 本研究在加入 L-NMMA 抑制 NO 生成后再加入 TNF- $\alpha$ , 发现 L-NMMA 不能消除表氧化酶基因对抗 TNF- $\alpha$  诱导的 Bcl-2 下调的效应, 这说明表氧化酶基因的这一作用与其上调 eNOS 表达的效应无关, 而是其自身的直接作用。

已有多项研究报道 EETs (EDHF) 参与细胞内一些信号转导途径的调节<sup>[3,12,15]</sup>。例如, 用 CYP 2C8 (一种细胞色素 P450 表氧化酶) 转染猪冠状动脉内皮细胞能够促进 ERK1/2 的磷酸化<sup>[15]</sup>。本研究也同样证实在 TNF- $\alpha$  诱导前后, 转染表氧化酶基因都能使内皮细胞中 ERK1/2 的磷酸化水平明显升高, 这说明 MAPK 是 EETs 发挥生理效应的重要信号转导途径。而且, TNF- $\alpha$  诱导 1 h 后, 转染表氧化酶基因的内皮

细胞中 ERK1/2 的磷酸化水平较前进一步增加。据报道, 在内皮细胞中 MAPK (ERK1/2) 促使 Bcl-2 第 87 位的丝氨酸磷酸化, 稳定 Bcl-2, 抑制其降解<sup>[11]</sup>, 因此, 表氧化酶可能通过激活 ERK1/2 途径, 抑制 Bcl-2 的降解而发挥其抗内皮凋亡作用。近年来的研究表明, PI-3K 以及它的下游信号分子 Akt (也被称为 protein kinase B) 在内皮细胞的保护机制中也起着重要作用<sup>[16]</sup>, PI-3K/Akt 等途径是否参与 EETs 的抗凋亡效应还有待于进一步的研究。

总之, 本研究证明了转染细胞色素 P450 表氧化酶基因通过激活 MAPK (ERK1/2), 抑制 TNF- $\alpha$  诱导的抗凋亡基因 Bcl-2 水平下调, 抑制 caspase-3 的激活, 从而抑制 TNF- $\alpha$  诱导的内皮细胞凋亡(图 6)。本研究为进一步探讨内皮细胞功能失调相关性疾病(如动脉粥样硬化、高血压、心力衰竭、糖尿病、肿瘤等)的发生机制及防治策略提供了新的探索方向。

#### 参考文献 (References)

- [1] Vanhoutte PM *et al. Prog Cardiovas Dis*, 1996, **39**: 229
- [2] Félétou M *et al. J Mol Cell Cardiol*, 1999, **31**: 15
- [3] Fisslthaler B *et al. Nature*, 1999, **401**: 493
- [4] Chen JK *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**: 13789
- [5] Node K *et al. Science*, 1999, **285**: 1276
- [6] Node K *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 15983
- [7] Wang H *et al. J Pharmacol Exp Ther*, 2003, **307**: 753
- [8] Berk BC *et al. Ann N Y Acad Sci*, 2001, **947**: 93
- [9] Stefanec T. *Chest*, 2000, **117**: 841
- [10] Kotamraju S *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**: 33585
- [11] Rossig L *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**: 25502
- [12] Zeldin DC. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 36059
- [13] Graham-Lorence S *et al. J Biol Chem*, 1997, **272**: 1127
- [14] Qu W *et al. Mol Pharmacol*, 1998, **54**: 504
- [15] Fleming I *et al. Pflugers Arch*, 2001, **442**: 511
- [16] Hermann C *et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 402

## Effect of Arachidonic Acid Cytochrome P450 Epoxygenase on Bcl-2 Expression, Caspase-3 and MAPK Activity in Apoptotic Endothelial Cells Induced by TNF- $\alpha$

Li Lin, Hong Wang, Zai-Ying Lu, Dao-Wen Wang\*

(Cardiology Division, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**Abstract** Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EHDF) may protect endothelial cells against apoptosis induced by TNF- $\alpha$ , the purpose of the present study was to investigate the effects of endogenous EDHF produced by cytochrome P450 (CYP) epoxygenases transfection on Bcl-2 levels, caspase-3 activity and the phosphorylation of MAPK in apoptotic endothelial cells induced by TNF- $\alpha$ . Three or four passages of cultured bovine aortic endothelial cells (BAECs) were transfected with CYPBM<sub>3</sub>-F87V, CYP2C11OR, CYP2J2 or the empty vector (pCB<sub>6</sub>). Twenty-four hours later transfected cells were incubated with TNF- $\alpha$  for appropriate time, the Bcl-2 levels and MAPK phosphorylation were detected by Western blot analysis, and caspase-3 activity was examined by using DEVD-*p*-nitroanilide as a substrate. TNF- $\alpha$  decreased Bcl-2 protein level in a time-dependent manner and increased significantly caspase-3 activity. Transfection of BAECs with epoxygenases prevented the decrease of Bcl-2 protein and caspase-3 activation induced by TNF- $\alpha$  compared with controls. Incubation of BAECs with TNF- $\alpha$  induced a marked dephosphorylation of MAPK in a time-dependent manner. Transfection with epoxygenases increased the phosphorylation levels of MAPK at all examined time points. The present study demonstrates that transfection of CYP epoxygenases may protect endothelial cells and inhibit endothelial apoptosis by increasing the phosphorylation level of ERK1/2, preventing both degradation of anti-apoptotic protein Bcl-2 and activation of caspase-3 induced by TNF- $\alpha$ .

**Key words** endothelium-derived hyperpolarizing factor; epoxyeicosatrienoic acid; apoptosis; endothelial cells; MAPK

Received: August 3, 2006 Accepted: February 5, 2007

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (No.30170387)

\*Corresponding author. Tel/Fax: 86-27-83662842, E-mail: dwwang@tjh.tjmu.edu.cn