

分类号: Q95  
学号: 20212006014

密级: 公开  
单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 野骆驼细胞色素 *P450 2J2* 基因功能的研究

学位申请人	李好
指导教师	胡圣伟
申请学位门类级别	理学硕士
学科、专业名称	生物学
研究方向	动物学
所在学院	生命科学学院

中国·新疆·石河子

2024年7月

**Studies on the function of the cytochrome *P450 2J2* gene in the**

**Camelus bactrianus ferus**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Natural Science**

By

**Li Hao**

**(Zoological)**

Dissertation Supervisor: Hu Sheng Wei

July, 2024

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：李娜

时间：2024年7月8日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：李娜

时间：2024年7月8日

导师签名：胡玉华

时间：2024年7月8日

## 摘要

目的：野生双峰驼（*Camelus bactrianus ferus*）被世界自然保护联盟（IUCN）列为极度濒危物种，仅存于中国北部的塔克拉玛干沙漠、罗布泊沙漠和蒙古南部。野生双峰驼对盐分和毒素能够安全降解代谢，可能都与细胞色素 P450 表氧化酶（cytochrome P450 epoxygenase, CYP）基因有关。研究发现，野骆驼的 CYP 家族全部集中在 CYP1、CYP2 和 CYP3 亚家族中，且 *CYP2J2* 拷贝数明显多于其他哺乳动物。本实验通过构建 *CYP2J2* 基因敲入小鼠模型，研究基因、性状和肠道微生物三者之间的联系，揭示了野生双峰驼 *CYP2J2* 基因的生物功能。

方法：（1）通过 CRISPR/Pro 技术，针对靶基因进行设计、构建对应的 Donor Vector 和 gRNA 质粒，将野骆驼 *LOC102511878* 基因敲入小鼠 Rosa26 基因座，构建 *CYP2J2* 基因敲入 F0 代小鼠。

（2）构建成功的 F0 代小鼠与野生型小鼠杂交得到 F1 代杂合子小鼠，提取 F1 代小鼠基因组 DNA，设计引物进行 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳、测序鉴定和 Southern 印迹鉴定，确认转基因小鼠是否构建成功。（3）选择来自同一只 F0 代小鼠，敲入位点一致的 F1 代小鼠进行交配，得到 F2 代小鼠，再进行扩繁得到 F3、F4 和 F5 代纯合子、杂合子以及野生型小鼠。（4）测定不同基因型小鼠体重、空腹血糖和 EETs 等相关性状，分析组间差异。（5）采集不同基因型小鼠粪便，进行 16S rRNA 测序，分析不同基因型小鼠在不同水平上肠道菌群差异。

结果：（1）野骆驼 *P450 2J2* 转基因小鼠的构建与鉴定。通过与野生小鼠杂交产生 F1 代，对 F1 代小鼠尾组织基因组敲入位点同源重组片段进行 PCR 检测，F1 代 7 只小鼠分别扩增出 2600 和 4300 bp 片段，鉴定为阳性，符合预测长度。而野生对照组和阴性对照组样品未扩增出任何条带。经过测序鉴定和 Southern 印迹鉴定证明了 7 只 F1 代阳性小鼠为敲入正确片段的杂合型小鼠。（2）*CYP2J2* 转基因纯合子小鼠繁殖及表型研究。成功扩繁出 4 代小鼠，总计 84 只小鼠，并进行基因鉴定，其中纯合雌性 21 只，雄性 15 只；杂合雌性 19 只，雄性 16 只；野生雌性 7 只，雄性 6 只。（3）与野生组相比，纯合组（不分性别，雌雄混合组）小鼠体重显著降低（ $P < 0.05$ ）；与野生雄性组相比，纯合雄性小鼠体重显著降低，纯合雌性组虽然体重比野生雌性组低，但并不显著。空腹血糖试验中，纯合组与野生组，雄性纯合组与雄性野生组，雄性纯合组与雄性杂合组血糖水平存在显著差异。纯合组（不分性别，雌雄混合组）和杂合组（不分性别，雌雄混合组）的环氧二十碳三烯酸（EETs）水平显著高于野生组。（4）16S rRNA 测序微生物多样性分析。对小鼠粪便进行 16S rRNA 分析后发现，在属水平的 top10 中，雄性纯合和野生组的 *Akkermansia* 存在显著差异，在种水平 top10 中，纯合和野生组的 *Bacteroides\_caecimuris* 存在显著差异。通过绘制火山图，我们发现纯合组和野生组有 7 个显著属水平差异，其中 1 个显著下调，6 个显著上调；杂合组和野生组有 9 个显著属水平差异，其中 1 个显著下调，8 个显著上调。纯合组与环境信息处理（Environmental Information Processing）、新陈代谢（Metabolism）和人类疾病（Human Diseases）呈正相关，与遗

传信息处理（Genetic Information Processing）和生物系统（Organismal Systems）呈负相关。杂合组与细胞过程（Cellular Processes）呈正相关，与环境信息处理和遗传信息处理呈负相关。野生组与环境信息处理、遗传信息处理和生物系统呈正相关，与细胞过程、新陈代谢和人类疾病呈负相关。

结论：利用 CRISPR/Pro 技术，获得野骆驼 *CYP2J2* 基因 Rosa26 定点敲入小鼠，繁育出大量子代小鼠，证实 *CYP2J2* 转基因小鼠可正常存活和繁殖。通过对其繁殖后小鼠的体重、空腹血糖和 EETs 等性状以及粪便 16S rRNA 测序的分析，表明 *CYP2J2* 基因影响了小鼠的生长（体重）、肠道菌群和血糖。

**关键词：**野骆驼；*CYP2J2*；EETs；空腹血糖；16S rRNA

## Abstract

**Object:** The *Camelus bactrianus ferus* is classified as critically endangered by the World Conservation Union (IUCN) and exists only in the Taklamakan and Lop Nor deserts of northern China and southern Mongolia. The wild Bactrian camel's ability to safely degrade and metabolise salts and toxins may be linked to the cytochrome P450 epoxygenase (CYP) gene. It was found that the CYP family in wild camels is entirely concentrated in the CYP1, CYP2 and CYP3 subfamilies, and the copy number of *CYP2J2* is significantly higher than that of other mammals. In this experiment, the biological function of the *CYP2J2* gene in wild Bactrian camel was revealed by constructing a *CYP2J2* knock-in mouse model to study the linkage between genes, traits and gut microbes.

**Methods:** (1) The *CYP2J2* knock-in F0 generation mice were constructed by designing and constructing the corresponding Donor Vector and gRNA plasmid for the target gene through CRISPR/Pro technology, and knocking the wild camel *LOC102511878* gene into the Rosa26 locus of mice. (2) Successfully constructed F0 generation mice were crossed with wild-type mice to obtain F1 generation heterozygous mice. Genomic DNA of F1 generation mice was extracted, and primers were designed for PCR amplification, agarose gel electrophoresis, sequencing identification and Southern blotting identification, to confirm whether the transgenic mice were successfully constructed. (3) Select the F1 generation mice from the same F0 generation mice with the same knock-in site for mating to obtain the F2 generation mice, and then amplify and propagate them to obtain the F3, F4, and F5 generations of pure and heterozygous as well as wild-type mice. (4) Determine the related traits such as body weight, fasting blood glucose and EETs of mice of different genotypes and analyse the differences between groups. (5) The faeces of mice of different genotypes were collected and subjected to 16S rRNA sequencing to analyse the differences in the intestinal flora of mice of different genotypes at different levels.

**Results:** (1) Construction and identification of wild camel *P450 2J2* transgenic mice. The F1 generation was generated by crossing with *Camelus bactrianus ferus*, and the homologous recombination fragments of the genomic knock-in site in the tail tissues of the F1 generation mice were detected by PCR, and the 7 mice in the F1 generation were amplified with 2,600 and 4,300 bp fragments, respectively, which were identified as positive and conformed to the predicted length. The wild control and negative control samples did not amplify any bands. Sequencing identification and Southern blot identification proved that the seven F1 generation positive mice were heterozygous mice knocked into the correct fragment. (2) Breeding and phenotyping of *CYP2J2* transgenic heterozygous mice. Four generations of mice, totalling 84 mice, were successfully expanded and genetically characterised, including 21 pure females and 15 males, 19 heterozygous females and 16 males, and 7 wild females and 6 males. (3) Compared with the wild group,

the body weight of mice in the pure group (mixed group of males and females regardless of sex) was significantly lower ( $P < 0.05$ ); compared with the wild male group, the body weight of mice in the pure male group was significantly lower, and the body weight of mice in the pure female group was lower than that of the wild female group, but it was not significant. In the fasting blood glucose test, there were significant differences in blood glucose levels between the pure and wild groups, the male pure and male wild groups, and the male pure and male heterozygous groups. The levels of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) were significantly higher in the pure (gender-neutral, mixed group of males and females) and heterozygous (gender-neutral, mixed group of males and females) groups than in the wild group. (4) Microbial diversity analysis by 16S rRNA sequencing. 16S rRNA analysis of mouse faeces revealed significant differences between *Akkermansia* in the male pure and wild groups at the genus level top10, and *Bacteroides\_caecimuris* in the pure and wild groups at the species level top10. By plotting volcanoes, we found seven significant genus-level differences between the pure and wild groups, of which one was significantly down-regulated and six were significantly up-regulated, and nine significant genus-level differences between the heterozygous and wild groups, of which one was significantly down-regulated and eight were significantly up-regulated. The heterozygous group was positively correlated with Environmental Information Processing, Metabolism and Human Diseases, and positively correlated with Genetic Information Processing and Organismal Systems. (Organismal Systems. The heterozygous group was positively correlated with Cellular Processes and negatively correlated with Environmental Information Processing and Genetic Information Processing. The wild group was positively correlated with Environmental Information Processes, Genetic Information Processes and Organismal Systems, and negatively correlated with Cellular Processes, Metabolism and Human Disease.

Conclusion: Using CRISPR/Pro technology, we obtained feral camel CYP2J2 gene Rosa26 targeted knock-in mice and bred a large number of zygotic mice, confirming that CYP2J2 transgenic mice can survive and reproduce normally. Analysis of traits such as body weight, fasting blood glucose and EETs, as well as faecal 16S rRNA sequencing in their bred mice showed that the CYP2J2 gene affected growth (body weight), intestinal flora and blood glucose.

**Key words:** Camelus bactrianus ferus; CYP2J2; EETs; oral glucose tolerance; 16S rRNA

# 目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
目录.....	V
第一章 文献综述.....	1
1.1 细胞色素 P450.....	1
1.1.1 细胞色素 P450 的结构.....	2
1.1.2 细胞色素 P450 研究的相关性.....	2
1.2 细胞色素 P450 2J2 (CYP2J2) .....	3
1.2.1 CYP2J2 在肝外组织中的表达.....	3
1.2.2 其他脊椎动物和转基因模型中的 CYP2J2 同源物.....	4
1.2.3 CYP2J2 的生理作用.....	5
1.3 野骆驼.....	7
1.3.1 野骆驼的进化.....	7
1.3.2 野骆驼的分布及处境.....	8
1.3.3 野骆驼的生物特性.....	9
1.4 Rosa26.....	9
1.4.1 Rosa26 位点的发现.....	9
1.4.2 Rosa26 位点的应用.....	10
1.5 本课题研究目的及意义.....	11
1.6 本课题研究内容.....	11
1.6.1 野骆驼 <i>P450 2J2</i> 转基因小鼠的构建与鉴定.....	12
1.6.2 野骆驼 <i>P450 2J2</i> 转基因纯合子小鼠繁殖及性状研究.....	12
1.6.3 基于 16S rRNA 测序微生物多样性分析.....	12
第二章 野骆驼 <i>P450 2J2</i> 转基因小鼠的构建与鉴定.....	13
2.1 材料.....	13
2.1.1 主要试剂.....	13
2.1.2 主要仪器.....	13
2.1.3 实验动物.....	13
2.2 方法.....	14
2.2.1 基因、转录本.....	14

2.2.2 确定敲入位点.....	15
2.2.3 gRNA 的设计及合成.....	15
2.2.4 构建 donor vector.....	15
2.2.5 制备 gRNA 和 Cas9mRNA 转录模板.....	15
2.2.6 受精卵的准备.....	15
2.2.7 原核显微注射.....	15
2.2.8 代孕鼠制备及胚胎移植.....	16
2.2.9 F0 代小鼠基因型鉴定.....	16
2.2.10 聚合酶链式反应.....	17
2.2.11 琼脂糖凝胶电泳.....	17
2.2.12 转基因小鼠的传代和建系.....	18
2.2.13 F1 代小鼠基因型鉴定 PCR 条件.....	19
2.2.14 测序鉴定.....	19
2.2.15 Southern 印迹鉴定.....	20
2.3 结果.....	20
2.3.1 <i>P450 2J2</i> 基因的表达载体的构建和酶切鉴定.....	20
2.3.2 <i>P450 2J2</i> 基因敲入位点同源重组片段 PCR 检测.....	21
2.3.3 测序鉴定.....	23
2.3.4 Southern 印迹鉴定.....	24
2.4 讨论.....	24
2.5 结论.....	25
第三章 野骆驼 <i>P450 2J2</i> 转基因纯合子小鼠繁殖及性状研究.....	26
3.1 材料.....	26
3.1.1 材料.....	26
3.1.2 试剂.....	26
3.1.3 仪器.....	26
3.2 方法.....	27
3.2.1 <i>P450 2J2</i> 转基因小鼠繁殖及鉴定.....	27
3.2.2 <i>P450 2J2</i> 转基因小鼠的相关表型.....	28
3.3 结果.....	29
3.3.1 小鼠繁殖代数.....	29
3.3.2 小鼠 F2 代提取 DNA 浓度测定.....	30
3.3.3 小鼠 PCR 基因鉴定.....	30
3.3.4 体重.....	32

3.3.5 空腹血糖.....	32
3.3.6 小鼠血清中环氧二十碳三烯酸（EETs）水平.....	33
3.4 讨论.....	34
3.5 结论.....	35
第四章 基于 16S rRNA 测序微生物多样性分析.....	36
4.1 材料.....	36
4.2 方法.....	36
4.2.1 基因组 DNA 提取与样品检测.....	36
4.3 结果.....	37
4.3.1 小鼠肠道 OTU 分析.....	37
4.3.2 Alpha 多样性分析.....	39
4.3.3 小鼠肠道菌群组成分析.....	43
4.3.4 Beta 多样性分析.....	58
4.3.5 Tax4Fun 功能注释.....	60
4.4 讨论.....	60
4.5 结论.....	61
第五章 全文总结及创新点.....	62
5.1 结论.....	62
5.2 创新点.....	62
作者简介.....	64
参考文献.....	65
致谢.....	79

## 第一章 文献综述

### 1.1 细胞色素 P450

细胞色素 P450 是一个超家族的酶，是人体内负责药物和外来化合物第一阶段代谢的主要酶系统。P450 是真核细胞中的膜结合蛋白。虽然一些参与内源性底物代谢的 P450 酶存在于线粒体膜中，但那些参与内源性底物代谢的 P450s 都存在于线粒体膜中<sup>[1]</sup>。作为微粒体电子传递链的末端氧化酶，P450 一般不会单独发挥作用，而是需要与其他蛋白质相互作用。

支持 NADPH 依赖性氧合反应的最简单系统包括三个主要组成部分：P450、NADPH-细胞色素 P450 还原酶（CPR）和磷脂<sup>[2-4]</sup>。在这一系统中，需要 CPR 和 P450 相互作用，使 NADPH 的还原等价物通过两个单一的电子转移步骤从 CPR 转移到 P450<sup>[5,6]</sup>。然而，作为膜结合蛋白，它们的运动被限制在脂质双分子层的范围内，通常是内质网的范围内。

已知其他蛋白质也有助于发挥 P450 的单氧化酶功能，其中最显著的是细胞色素 b<sub>5</sub>。在许多情况下，P450 与其氧化还原伙伴的相互作用提供了催化 P450 依赖性加氧反应所需的电子，但在某些情况下，相互作用起着构象作用，通过改变反应循环中不一定涉及电子传递步骤的一个步骤来影响功能<sup>[7,8]</sup>。这在血红素酶细胞色素 b<sub>5</sub> 中得到了证实，它可以作为一种异构效应器，而不为 P450 依赖性底物代谢提供电子<sup>[9]</sup>。

P450 蛋白的各组成部分并非以等摩尔浓度存在。除了为 P450 介导的新陈代谢提供电子外，CPR 还在血红素加氧酶、脂肪酸去饱和酶以及某些情况下参与细胞色素 b<sub>5</sub> 催化。尽管 CPR 对许多不同的反应都有贡献，但它的浓度通常是有限的。据未经处理的大鼠肝脏微粒体的早期估计，使用细胞色素 c 还原酶活性来量化 CPR 水平时，P450 比 CPR 多约 20 倍<sup>[10]</sup>。用免疫化学方法测量 CPR 时，P450 与 CPR 的比例约为 5:1<sup>[11]</sup>。已知可形成 1:1 摩尔复合物的蛋白质在相对浓度上的这种差异提出了有关 P450 及其相关 ER 蛋白如何组织的重要问题。彼得森（Peterson）提出了一个有趣的早期模型<sup>[12]</sup>，即多个 P450 分子被中心 CPR 包围，中心 CPR 能够在簇内随机转移电子。簇外的 P450 接收电子的速度要慢得多。

P450 和 CPR 的相对比率受诱导剂的影响而发生变化：据报道，苯巴比妥治疗后，P450: CPR 的比率约为 30:1<sup>[1,13]</sup>。在未经处理的大鼠体内，细胞色素 b<sub>5</sub> 的水平通常与 P450 的水平处于同一范围，比 CPR 高出很多。血红素加氧酶 -1（HO-1）的水平也因诱导状态的不同而变化很大。在未经处理的大鼠体内，血红素加氧酶 -1 的水平实际上

超过了血红素加氧酶 -1, 血红素加氧酶 -1 与血红素加氧酶-1 之比约为 0.2:1; 然而, 镉处理会诱导血红素加氧酶 -1, 并使血红素加氧酶 -1 与血红素加氧酶 -1 之比增至 3:1。与所有需要 CPR 作为电子供体的蛋白质总和相比, CPR 的摩尔水平总是有限的, 因此, CPR 与单个电子受体的比例变化预计会对药物处置、血红素代谢和其他 CPR 介导的功能(如脂肪酸代谢)产生深远影响。事实上, 包括类固醇生成障碍、生殖器畸形和安特利-比克斯勒综合征在内的各种弊病已被确认为 CPR 基因突变导致的表型。导致这些突变的原因是突变的 CPR 与 P450 相互作用和/或向 P450 提供电子的能力受损<sup>[15-17]</sup>。

### 1.1.1 细胞色素 P450 的结构

与大多数酶不同, P450 显示出一系列不同底物的动力学活性, 甚至包括负协同和正协同作用的情况。因此, 人们对 P450 与不同基底的空间相互作用细节非常感兴趣。

第一个 P450 结构是 1985 年发表的可溶性原核生物 P450 101A1。直到最近, 与人类结构相关的大多数信息都是从针对 P450 101A1 的人类 P450 建模或基于机制的抑制研究中推断出来的, 这些研究允许预测对底物结合很重要的活性位点氨基酸。由于这些膜蛋白样品的疏水性, 以及许多底物和抑制剂的低溶解度, 哺乳动物 P450 的结晶用于 X 射线晶体学的结构分析一直很困难。随着哺乳动物 P450 的克隆和表达的进展, 以及新的晶体学软件(主要是多波长异常衍射相位)的发展, 哺乳动物 P450 的结构最近得到了解决, 包括 E.Johnson 和 Astex 小组的几种人类 P450: 2A6、2C8、2C9 和 3A4<sup>[18-23]</sup>。根据目前可用的 P450 晶体结构, 尽管底物选择性、物种来源或代谢作用存在差异, 但所有 P450 都显示出相似的整体折叠, 主要由 $\alpha$ 螺旋(A-L)和一些 $\beta$ 折叠( $\beta 1 - \beta 4$ )组成。更可变的活性位点和血红素位于 $\alpha$ 螺旋区域。随着哺乳动物 P450 结构的出现和更多结构的出现, 有可能解决与底物和抑制剂结合和动力学相关的一些问题, 并更好地预测药物与特定 P450 的相互作用。

### 1.1.2 细胞色素 P450 研究的相关性

如今, P450 相关研究已经成熟。但这并不意味着所有问题都已解决。在发现这个蛋白质超家族<sup>[24]</sup>56 年后, 我们可以思考对 P450 研究带来了哪些益处。在人类医学领域里对 P450 的研究已经取得了许多成果。

许多疾病与 P450 相关, 关联最密切的是内分泌疾病<sup>[25]</sup>。例如, 许多先天性肾上腺皮质增生症的临床病例被认为是由 *CYP21A2* 基因中的氨基酸替换引起的<sup>[26]</sup>。了解参与药物代谢的人类 P450s, 有助于快速确定候选新药的底物、抑制剂和诱导剂, 并能在体外快速预测人体(体内)药代动力学和药物间相互作用。根据我们对人类 P450s 的了解, 药物化学家可以更好的进行设计, 指导化学合成以避免快速代谢和生物活化为有

毒产物<sup>[27]</sup>。

在药物开发领域，现在可以通过药物与 P450 的相互作用，从与人类模型异同的角度来研究动物模型中药物的代谢与毒性。此外，还可以避免药物代谢中的遗传多态性和药代动力学变异等许多问题。潜在的抑制剂（例如利托那韦等针对 P450 3A4 的药物）也可以得到有效管理。

## 1.2 细胞色素 P450 2J2 (CYP2J2)

细胞色素 P450 (CYP) 是膜结合、依赖 NADPH 的含血红素单加氧酶超家族，参与异种生物和内源性化合物的氧化。CYPs 将分子氧中的一个氧原子插入其产物中，同时将第二个原子还原成水。细胞色素 P450 2J2 (CYP2J2) 是一种主要存在于人类肝外组织中的酶，主要在心血管系统中表达，在肠、肾、肺、胰腺、脑、肝等中水平较低<sup>[28]</sup>，它是人类 CYP2J 亚家族的唯一成员，也是主要的花生四烯酸 (AA) 环氧化酶之一。CYP2J2 基因包含 9 个外显子和 8 个内含子，约为 40.3 千碱基 (kb)，其中包括约 6 kb 的 5'侧翼区和约 1 kb 的 3'非翻译区<sup>[29]</sup> (GenBank 编号 AF272142)。该基因编码 502 个氨基酸，可转化为约 58 kDa 的蛋白质产物。CYP2J2 在人体心脏中的蛋白表达量变化很大，而据报道在肝脏中的表达量比较稳定<sup>[30]</sup>。与许多 CYP 同工酶类似，CYP2J2 在整个人群中都有多态性表达。然而，已发现的多态性相对罕见，而且似乎具有种族特异性，但 CYP2J2\*7 除外。该 SNP (rs890293) 与启动子区域 (-50 bp) 的 G > T 取代有关，导致转录因子 Sp1 的结合减少<sup>[29]</sup>。CYP2J2\*7 在不同种族群体中被发现，等位基因频率在 1.1-17% 之间<sup>[29,31]</sup>。研究表明，在高加索人群中，CYP2J2\*7 等位基因会导致蛋白质表达量减少 40%，但以依巴斯汀或阿司咪唑为底物的酶活性不会发生显著变化<sup>[32]</sup>。因此，CYP2J2\*7 等位基因在不同种族群体中的存在和不同的等位基因频率会改变罹患心血管疾病 (CVD) 的风险。

### 1.2.1 CYP2J2 在肝外组织中的表达

CYP2C 和 CYP2J 家族含有酶，这些酶已被表征为产生 EET、PUFA 环氧化物和环氧树脂 eCB 的初级 CYP 环氧合酶<sup>[33-35]</sup>。在人类中，这些酶中研究最充分的包括 CYP2J2 (人类中唯一的 2J 酶)，CYP2C8，CYP2C9，以及较小程度的 CYP2C19<sup>[33]</sup>。2C 酶与其他异生素对应物非常相似，在肝脏中具有最高水平的表达<sup>[36,37]</sup>。CYP2J2 最早在肝脏中被发现。然而，它被认为是一种肝外 P450，在心脏中主要表达<sup>[38-41]</sup>。具体来说，CYP2J2 在主动脉内皮和心肌细胞中高度表达，更广泛地在右心室中表达<sup>[42]</sup>。CYP2J2 也在大脑<sup>[43]</sup>和胃肠道 (GI) <sup>[44-47]</sup>。

GTE<sub>x</sub> 数据库的基因组分析证实了 CYP2J2 的组织特异性表达。按丰度排序, CYP2J2 在心肌 (n = 412) 中的主要表达为 23.9 RPKM, 其次是肝脏 (19.19 RPKM, n = 119), 小肠 (18.5 RPKM, n = 88) 和脑<sup>[48]</sup>。重要的是, GTE<sub>x</sub> 数据库是从大量患者样本中抽样的。其他数据库, 如 FANTOM5 项目数据库, 表明 CYP2J2 在小肠中表达, 其次是肝脏, 大脑, 然后是心脏<sup>[49]</sup>。总的来说, 人类基因组分析与全球各个研究小组的表达分析相结合, 表明 CYP2J2 主要在心脏中表达, 这表明其心血管意义。

发现心肌中的 CYP2J2 mRNA 水平比 CYP2C8 或 CYP2C9 高近 20,000 倍。此外, CYP2J2 在血管内皮中表达<sup>[50-52]</sup>。重要的是, 发现在心脏中观察到的 EET 谱与 CYP2J2 产生的 EET 谱相匹配, 从而证明 CYP2J2 可能是心脏中的主要环氧合酶<sup>[41]</sup>。这种类型的分析偶联特异性 CYP 表达和 EET 区域异构体谱—可以扩展到任何 CYP 环氧合酶的研究, 以识别任何给定组织内的主要代谢物。重要的是要考虑到, 无论在不同组织中的表达程度如何, CYP 环氧合酶都将有助于 EET 的局部产生, 从而有助于由此产生的生理学。

CYP2J2 存在于大脑的几个区域, 包括海马体, 小脑和星形胶质细胞<sup>[31,53,54]</sup>。人类 CYP2J2 活性与啮齿动物中多种 CYP2J 酶的活性进行了正态比较, 因为大鼠和小鼠具有许多不同的 CYP2J, 而人类只有 CYP2J2。

在啮齿动物中, 这些 CYP2J 酶已被证明也在各种大鼠脑特异性区域和细胞类型中表达<sup>[55-57]</sup>。与心脏类似, 大脑中的 CYP2J 已被证明可以对各种脑部疾病 (如帕金森氏症) 起到保护作用<sup>[58]</sup>。尽管 CYP2J2 在心脏中占主导地位, 但其生化功能在其表达的其他组织中仍然存在, 因此有必要进一步研究 CYP2J2 功能在其他组织中的生理相关性。

## 1.2.2 其他脊椎动物和转基因模型中的 CYP2J2 同源物

为了评估 CYP2J2 的生理功能, 了解系统发育相关的 CYP2J 酶之间的跨物种差异也很重要。与人类 CYP2J2 同源序列最接近的脊椎动物包括恒河猴或黑猩猩<sup>[59-62]</sup>。据报道, 人类和猴子之间的 CYP2J2 亚型相似度为 95%<sup>[63]</sup>, 这一观察结果得到了基因组测序数据库的支持<sup>[64-66]</sup>。

小鼠和大鼠啮齿动物模型中的几种 CYP2J2 同源物有助于探索 PUFA-环氧化物的生理作用。例如, 小鼠 *CYP2J* 基因座内有七个基因, 包括 *CYP2J5*, *CYP2J6*, *CYP2J8*, *CYP2J9*, *CYP2J11*, *CYP2J12* 和 *CYP2J13*<sup>[67]</sup>。*CYP2J6* 是最接近 *CYP2J2* 的同源物, 在一级氨基酸序列水平上具有 84% 的同源性<sup>[62]</sup>。大鼠基因组数据库表明, 大鼠与人 *CYP2J2* 的同源物包括 *CYP2J3*, *CYP2J4*, *CYP2J10*,

*CYP2J13* 和 *CYP2J16*<sup>[68]</sup>, 其中 *CYP2J4* 在同源序列中最接近, 相似性为 76%<sup>[62]</sup>。为了更好地了解啮齿动物基因组和基因的细胞特异性表达, 最近的一项研究对来自八只 C57BL/6 小鼠的 20 个组织进行了单细胞转录组学<sup>[69]</sup>。探索细胞特异性表达数据集可能有助于深入了解人类 CYP 的细胞特异性表达。在 C57BL/6 小鼠中, *CYP2J6* 在神经胶质细胞中高表达, 如少突胶质细胞祖细胞、少突胶质细胞和星形胶质细胞。由于神经胶质细胞的串扰在神经炎症和神经退行性疾病中起着重要作用<sup>[70]</sup>, 该数据表明星形胶质细胞和少突胶质细胞中的 PUFA 环氧化物可能促进小胶质细胞极化, 形成抗神经炎症性小胶质细胞表型。

### 1.2.3 CYP2J2 的生理作用

*CYP2J2* 转基因模型为 *CYP2J2* 在患病状态下的活性提供了关键的见解。例如, 有一些研究表明表达 *CYP2J2* 的小鼠对实验诱导的疾病更具抵抗力<sup>[71-78]</sup>。Zeldin 实验室是第一个生成转基因 *CYP2J2* (*CYP2J2*-Tr) 动物模型的实验室<sup>[79,80]</sup>。为此, 将 *CYP2J2* cDNA 克隆到 pBS- $\alpha$ MHC-hGH 中, pBS- $\alpha$ MHC-hGH 是一种含有  $\alpha$ MHC 启动子的载体, 用于转基因的心肌细胞特异性表达。此外, 将人生长激素加入载体中, 以增强转基因 mRNA 的稳定性。然后将该转基因注射到 C57BL/6 小鼠胚胎的原核中, 该胚胎被植入假怀孕小鼠<sup>[79,80]</sup>。由此产生的表达 *CYP2J2* 的转基因小鼠成为一种强大的工具, 自成立以来一直被使用。

使用这些转基因小鼠的研究是第一个验证环氧合酶在体内作用的研究。例如, 与野生型小鼠相比, *CYP2J2*-Tr 小鼠的左心室功能在缺血后恢复更大<sup>[81]</sup>。这证实了先前的发现, 即 *CYP2J2* 在产生心脏保护性 EET 中至关重要。另一项研究检查了 EETs 对心肌细胞 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  的影响通道, 这是一种参与维持心脏正常兴奋收缩周期的通道<sup>[82]</sup>。

例如, 一项研究报告称, EETs 会增加  $\text{I}_{\text{Ca}}$  在大鼠心肌细胞中<sup>[83]</sup>, 而另一项报道 EETs 对猪心脏 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  具有抑制特性通道<sup>[84]</sup>。利用 *CYP2J2*-Tr 小鼠, 证明 *CYP2J2* 介导的 EETs 代谢物的产生对  $\text{I}_{\text{Ca}}$  在心肌细胞中, 从而调节基础心脏 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  通道活动<sup>[85]</sup>。总的来说, *CYP2J2*-Tr 小鼠被证明是 P450 环氧合酶在体内作用的强大资源。

鉴于其在心脏中的表达, *CYP2J2* 在心血管疾病中起着重要作用。例如, 心脏重塑是与心血管疾病有关的生理过程, 导致许多并发症, 包括心功能障碍和心律失常<sup>[86]</sup>。在过表达人心肌细胞特异性 *CYP2J2* 的转基因小鼠中, 与野生小鼠相比, 心律失常诱导性降低<sup>[76]</sup>。另一项研究表明, *CYP2J2* 能够完全抑制心脏重塑, 这一过程不可避免地导致心律失常<sup>[74]</sup>。其他研究表明, *CYP2J2* 的过表达减轻了

TNF $\alpha$ 诱导的心脏损伤<sup>[77]</sup>, TNF $\alpha$ 是一种产生并参与全身炎症的常见细胞因子<sup>[87]</sup>。*CYP2J2* 的过表达也被证明可以减少化疗药物诱导的心脏毒性。由于 EETs 可防止心肌缺血再灌注损伤, 因此产生了过表达心肌细胞特异性的 *CYP2J2* 的转基因小鼠, 以测试 *CYP2J2* 是否能够减少 DOX 诱导的心脏毒性<sup>[88]</sup>。令人信服的是, 与野生型小鼠心脏相比, *CYP2J2* 过表达的转基因小鼠表现出更少的心肌细胞凋亡和更好的超声心动图读数<sup>[88]</sup>。*CYP2J2* 过表达还可以改善心肺功能并防止缺血<sup>[89,90]</sup>。*CYP2J2* 在心血管疾病中的更多作用已被广泛研究<sup>[91,92]</sup>。

据报道, 在大脑中, *CYP2J2* 是第二高表达的 CYP, 暗示其在介导神经退行性疾病和脑血管疾病中的潜在作用。神经退行性疾病, 如阿尔茨海默病, 与中国汉族中发现的 *CYP2J2* 多态性有关<sup>[93]</sup>。在体内, 啮齿动物中的 *CYP2J* 酶对帕金森病模型具有保护作用<sup>[94]</sup>。然而, 利用具有大脑特异性过表达的 *CYP2J2* 转基因小鼠的脑部疾病研究目前尚不可用。然而, *CYP2J2* 的内皮过表达可防止小鼠的实验性脑缺血<sup>[95]</sup>。将这些与组织特异性表达的重要性相结合, 有望迎来阐明 *CYP2J2* 环氧合酶功能在对抗脑部疾病中的作用的新工作。

除了心脑血管特性<sup>[96,97]</sup>, *CYP2J2* 与糖尿病等慢性疾病有关。虽然 PUFA 环氧化物对糖尿病疾病有效, 但只有少数研究直接检查 *CYP2J2* 对糖尿病的影响<sup>[76]</sup>, 或高脂肪饮食引起的非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) <sup>[73]</sup>。鉴于 CYP 环氧合酶及其 EET 产物在维持体内平衡中的作用, 像 *CYP2J2* 这样的环氧合酶很可能参与基础表达低的其他组织对疾病的生理反应。

尽管存在组织特异性表达差异, 但 *CYP2J2* 和其他环氧合酶在癌症中上调, 促进血管生成和肿瘤发生, 因此被认为是促癌的。特别是与健康的人细胞系或组织相比, 通过人源性癌细胞系和人癌组织的 mRNA 和蛋白质水平测量的 *CYP2J2* 表达升高<sup>[98]</sup>。后续研究表明, *CYP2J2* 过表达通过 EET 的产生促进了四种不同人类癌细胞系的肿瘤转移<sup>[99]</sup>。有趣的是, miRNA, 如 let-7, 一种在人类癌症中常见的失调<sup>[100,101]</sup>, 增加了 *CYP2J2* 在人类癌症中的表达<sup>[102]</sup>。虽然用于抑制肿瘤发生<sup>[102]</sup>, 但 let-7b miRNA 疗法的推广同样降低了癌症表型以及翻译后调节 *CYP2J2* 表达的 *CYP2J2* 活性<sup>[102]</sup>, 这表明涉及 *CYP2J2* 及其在癌症中的活性的调节网络存在更大的复杂性。由于 CYP 环氧合酶产生多个 EET 区域异构体, 因此区域异构体可能会根据其随后的合成代谢和分解代谢途径表现出不同的生理行为<sup>[103]</sup>。Rand 等人发现, 8,9-EET, 5,6-EET 和 11,12-EET 是 COX-1 和 COX-2 的底物, 按降序排列, 导致产物可以被 sEH 进一步代谢, 最终形成一种称为 ct-8,9-E-11-HET 的血管生成脂质<sup>[104]</sup>。虽然发现单个下游 omega-6 代谢物在 CYP 生物激活后具有血管生成性, 但 EDP omega-3 环氧化物的形成已被证明具有抗癌特性