

## 人源可溶性环氧化物水解酶抑制剂的高通量筛选

王守宝, 郭 晶, 俞晓明, 杜冠华\*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所国家新药筛选中心, 北京 100050)

**摘要:** 本研究拟建立体外人源可溶性环氧化物水解酶 (hsEH) 抑制剂高通量筛选模型, 筛选 hsEH 抑制剂。利用大肠杆菌表达重组 hsEH, 化学合成其特异性的底物 PHOME, 建立了基于荧光测定的以 384 孔微板为载体的 hsEH 抑制剂高通量筛选模型 ( $Z' = 0.65$ )。对 47 360 种样品 (包括 25 040 种化合物和 22 320 种天然产物) 进行初筛, 选择初筛抑制率大于 80% 的 950 种样品作为活性样品进行复筛。最终确定 2 个化合物具有较强的抑制活性, 其  $IC_{50}$  值分别为 8.56 和 4.31  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果表明, 所建立的 hsEH 抑制剂高通量筛选模型具有灵敏、稳定、重复性好的特点。

**关键词:** 可溶性环氧化物水解酶; 抑制剂; 高通量筛选

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 11-1367-06

## High-throughput screening of human soluble epoxide hydrolase inhibitors

WANG Shou-bao, GUO Jing, YU Xiao-ming, DU Guan-hua\*

(National Center for Pharmaceutical Screening, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** To screen potential human soluble epoxide hydrolase (hsEH) inhibitors, a high-throughput screening model in 384-well microplate with total volume of 50  $\mu\text{L}$  was established. Recombinant hsEH was cloned and expressed in *E. coli*. and its specific substrate PHOME was synthesized. The HTS model was based on fluorescence analysis with enhanced sensitivity and specificity ( $Z' = 0.65$ ). A total of 47 360 samples (including 25 040 compounds and 22 320 natural products) were screened, of which 950 samples with inhibition greater than 80% were selected for further rescreening. Finally, two compounds with high inhibitory activity were identified, whose  $IC_{50}$  value were 8.56 and 4.31  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , separately. The results indicated that the method was stable, sensitive, reproducible and also suitable for high-throughput screening.

**Key words:** soluble epoxide hydrolase; inhibitor; high-throughput screening

环氧化物水解酶 (epoxide hydrolase, EH, EC.3.3.2.3) 是脊椎动物体内广泛存在的可以水解外源性以及内源性环氧化物生成二醇衍生物的一种酶, 由 554 个氨基酸残基组成, 分子质量约为 60 kDa。在哺乳动物 EH 可以分为微粒体型、胆固醇型、白三烯 A4 型以及胞质型 (即可溶性 EH, sEH) 等类型。这几种 EH 序列同源性很低 (氨基酸同源性 < 5%), 底物特异性明显不同<sup>[1-3]</sup>。

环氧二十碳三烯酸 (EETs) 是参与调节血管稳态、血压、缺血性损伤以及炎症等过程的一种旁分泌和自分泌信号分子。它们广泛分布于肺、心脏和肾脏微血管的内皮组织中<sup>[4, 5]</sup>。近年研究显示, EETs 就是内皮源性超极化因子 (EDHF), 进一步证明了 EETs 具有重要的生理作用。EETs 是可溶性环氧化物水解酶 (sEH) 的内源性底物, 后者是 EETs 的主要失活酶, 是体内降低 EETs 水平的最重要途径, sEH 通过催化 EETs 等脂肪族环氧化物水解生成相应的二羟基衍生物, 这一反应将 EETs 转化为难以掺入脂质双层的物质, 增大其极性并使其生物活性丧失, 最后被排出

收稿日期: 2010-06-08.

基金项目: 重大新药创制“科技重大专项”资助项目 (2009ZX09302-003).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165184, E-mail: dugh@imm.ac.cn

体外<sup>[6]</sup>。多项研究显示, sEH 参与了高血压、缺血性损伤等心脑血管疾病进程, 为临床治疗和药物研发提供了一个新颖的作用靶点<sup>[7-11]</sup>。

本研究通过利用大肠杆菌表达重组 hsEH 蛋白, 并合成其特异性底物 PHOME, 建立了基于荧光分析的灵敏、特异和操作性强的高通量筛选模型, 用于本中心样品库的高通量筛选, 为寻找 hsEH 抑制剂提供有力的工具。

## 材料与amp;方法

**样品与试剂** 高通量筛选样品由中国医学科学院药物研究所国家新药筛选中心样品库提供; 重组 hsEH 蛋白表达菌株 pET-32a/hsEH BL21, 由本实验室保种; HEPES、BSA (牛血清白蛋白) 购自 Sigma 公司; sEH 的特异性底物 (3-phenyl-oxiranyl)-acetic acid cyano-(6-methoxy-naphthalen-2-yl)-methyl ester (PHOME) 由本所俞晓明教授合成, 以 DMSO (二甲基亚砜) 配制成 100×贮备液 (5 mmol·L<sup>-1</sup>), 4 °C 保存; 抗体 sEH (H-215) 购自 Santa Cruz 公司 (sc-25797)。特异性 sEH 抑制剂 12-[3-adamantane-1-yl-ureido]-dodecanoic acid (AUDA) 购自 Cayman Chemical 公司, 临用时以 DMSO (二甲基亚砜) 配成相应浓度。

**实验仪器** SpectraMax M5 型连续光谱酶标测试仪 (SoftMax Pro Software 软件, 美国); EDR-384S 型自动分液系统 (日本); Costar 384 孔微板 (Corning Incorporated 公司, 美国); Hamilton Microlab<sup>®</sup> STARplus 自动工作站 (Hamilton Company, 瑞士)。

**人源可溶性环氧化物水解酶重组蛋白制备** 以人肝脏总 RNA 为模板, 经 RT-PCR 获得长度大约为 1 700 bp 的特异性扩增片段, 与理论值 1 637 bp 基本相符。将获得的 hsEH cDNA 与 pGEM-T 载体连接后转化 Top10 *E. coli*, 进行蓝白斑筛选。从中挑取白斑, 接种 LB 培养基中振荡培养, 用菌落 PCR 方法筛选阳性克隆, 并取阳性克隆质粒用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定, 证明目的基因已经连接到 pGEM-T 载体上。最后取菌液进行测序 (上海生工生物工程技术服务公司), 证明阳性克隆序列正确。然后构建 pET-32a/hsEH 表达质粒, 转入大肠杆菌中, 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 诱导表达 12 h, 取菌体超声破碎, 13 000×g 离心 10 min; 取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤, 加载 Ni-IDA 高亲和力纯化柱, 咪唑梯度洗脱, 测定 280 nm 处吸光度监测各部分洗脱液, 将含有目标蛋白的部分进行合并, 使用 Millipore Amicon Ultra-15 离心超滤管

(截留分子质量为 10 kDa) 进行浓缩, 再次蛋白定量后 -80 °C 保存。临用时现配制工作液, 其中酶工作液 A 的质量浓度为 5 μg·mL<sup>-1</sup>, 酶工作液 B 的质量浓度为 2.5 μg·mL<sup>-1</sup>, 置冰上待加样用。

**人源可溶性环氧化物水解酶生物活性测定方法** 根据文献<sup>[12, 13]</sup>合成特异性底物 PHOME, 其本身无荧光, 但在 hsEH 的作用下发生水解生成产物 6-甲氧基-2-萘醛 (6-methoxy-2-naphthaldehyde), 后者能在 330 nm 光波激发下发出波长为 465 nm 的荧光。动力学监测模式连续读取各时间点的荧光信号强度值, 代表产物 6-甲氧基-2-萘醛的生成量, 按照酶反应速率法, 其产物的生成速率可以反映酶的活力。

**人源可溶性环氧化物水解酶抑制剂筛选模型的建立** 根据酶反应动力学原理, 利用反应速率法测定 hsEH 的酶活性。在反应曲线上选取初始阶段最接近直线的一段, 即可计算其反应初速度  $V_{max}$  (标示酶活性水平)。求出各样品处理后酶的  $V_{max}$ , 然后与正常对照进行比较, 计算出各样品的百分抑制率。

本实验选择 30 °C 和 pH 7.0 的 25 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES 缓冲液 (含 0.1 mg·mL<sup>-1</sup> BSA) 作为该酶反应的温度与缓冲系统。在黑色 Costar 96 孔微板中反应体积为 200 μL 的前提下, 对底物浓度、酶浓度、反应时间等进行了优化。然后又对 384 孔微板适用 50 μL 反应体系进行了确认和优化。

**高通量筛选实验评价及验证** Z'因子法是评估高通量筛选模型优劣的一种重要方法, 可根据公式计算:  $Z' = 1 - 3 \times (SD_{sig} + SD_{back}) / (M_{sig} - M_{back})$ , SD: 标准差, M: 均值; 其中 “sig” 代表信号, 孔中加入 hsEH 蛋白和底物反应; “back” 代表背景, 孔中不加 hsEH 蛋白只含底物孵育。384 孔板中各取 96 个孔的数据进行分析和计算。

另外, 为了进一步验证本模型的可靠性, 采用本模型对已获得一致认可的 sEH 特异性抑制剂 AUDA 进行了 IC<sub>50</sub> 测定。

**人源可溶性环氧化物水解酶抑制剂高通量筛选** 按照建立的 HTS 实验方法, 对 47 360 种样品 (包括 25 040 种化合物和 22 320 种天然产物) 进行初筛, 选择抑制率大于 80% 的样品作为活性样品进行复筛, 复筛程序同前。根据复筛结果, 选择抑制率大于 80% 的样品, 10 倍比依次稀释 5 个浓度: 1×10<sup>-1</sup>、1×10<sup>-2</sup>、1×10<sup>-3</sup>、1×10<sup>-4</sup> 及 1×10<sup>-5</sup> mg·mL<sup>-1</sup>, 最后根据测定结果利用软件 Origin 7.0 计算 IC<sub>50</sub>。

**统计学分析** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较

采用方差分析。

## 结果

### 1 人源可溶性环氧化物水解酶重组蛋白制备

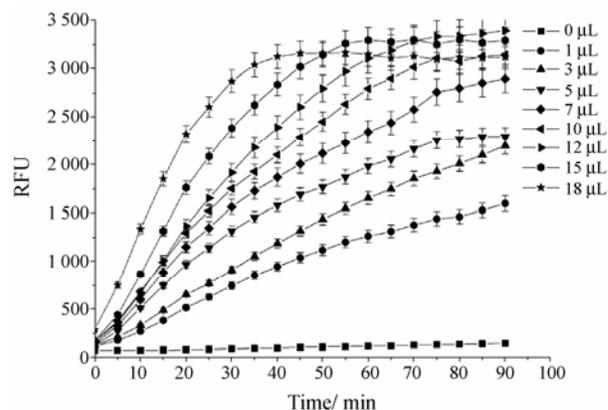
大肠杆菌表达的 hsEH 蛋白是一个融合蛋白,除了目的蛋白外,它的蛋白序列上还包含 Trx 蛋白、S-tag 及 His-tag,所以经计算该融合蛋白的分子质量约为 77 kDa。用 Ni-IDA 高亲和力纯化柱对诱导表达的重组 hsEH 进行纯化,咪唑洗脱结合的蛋白,测定 280 nm 处吸收度 ( $A_{280}$ ) 值代表不同管洗脱液中的蛋白洗脱量(图 1A)。收集  $A_{280}$  值高于空白的洗脱峰进行 SDS-PAGE 电泳分析,发现所洗脱的蛋白呈单一条带,经分析鉴定目的蛋白纯度大于 90%。然后用特异性的 hsEH 抗体对细菌裂解物进行了 Western blotting 分析,可以看到在 77 kDa 处有一明显的条带(图 1B)。

### 2 酶用量及监测时间的确定

根据作者前期的酶动力学初步研究显示,该酶的  $K_m$  值为  $6.72 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $V_{\max}$  为  $1.16 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}$ ,综合考虑底物 PHOME 水溶性的限制,暂定 200  $\mu\text{L}$  反应体系中底物 PHOME 的终浓度为  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。实验中先以黑色 96 孔微板为载体进行考察,各反应孔依次加入酶工作液 A: 0、1、3、5、7、10、12、15 及 18  $\mu\text{L}$ ,其余则以反应缓冲液补足。30  $^{\circ}\text{C}$  孵育 90 min,每隔 5 min 测定荧光强度 ( $E_x$ : 330 nm,  $E_m$ : 465 nm, cutoff: 455 nm),结果(图 2)可见,随着酶用量的增加,反应曲线的斜率也在稳步上升,但是在 12  $\mu\text{L}$  时酶相对于底物基本呈现饱和,15 及 18  $\mu\text{L}$  曲线亦证实了这一点,为保持底物的过量,酶工作液 A 的用量以 10  $\mu\text{L}$  较好。

在酶动力学研究中,测定酶活力的所有反应速率的比较都必须依赖该曲线的线性部分,因此要测

定酶促反应的最初反应速度。根据该酶的动态反应曲线,先是在 30  $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min,然后连续动态监测 6 min,间隔 2 min 读取一次荧光强度,共计读取 4 个时间点的荧光强度,这 4 个读值点均处于良好的线性区段内(图 2),可用于计算  $V_{\max}$ 。



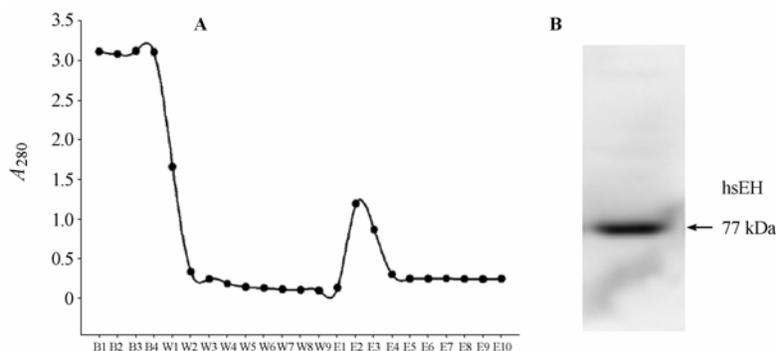
**Figure 2** The time-relative fluorescent intensity units (RFU) curve of 200  $\mu\text{L}$  reaction volume in 96-well black microplate. The volume of hsEH varied as followed: 0, 1, 3, 5, 7, 10, 12, 15, and 18  $\mu\text{L}$ . The fixed concentration of substrate PHOME is  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 底物浓度的确定

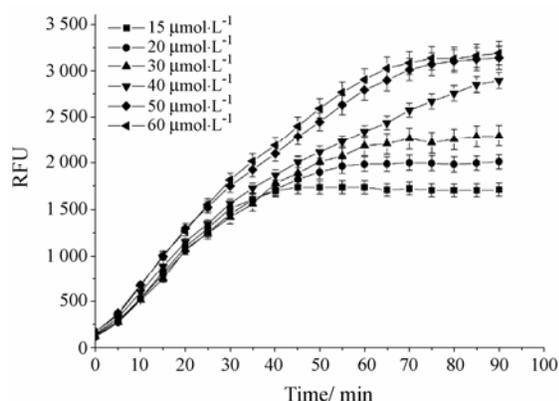
在确定酶的用量和监测时间后,还要考察底物 PHOME 的理想浓度。预实验中设置底物的浓度分别为: 15、20、30、40、50 及 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果(图 3)可以看到,随着底物浓度的增加,荧光信号强度也随之上升,并且信号窗也在加大,到达 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时可知此时底物已经处于对酶的过量状态,于是确定反应体系中底物浓度选用 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 4 384 孔微板筛选体系优化

为节约待筛样品、酶和底物的用量,降低筛选成本,提高通量,在前面 96 孔微板检测体系的基础上将适用于 96 孔微板的 200  $\mu\text{L}$  反应体系按比例缩小至

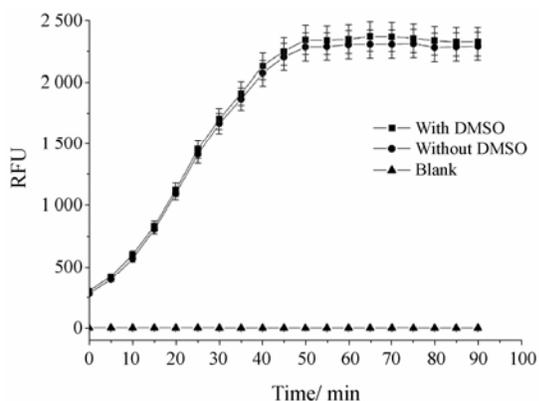


**Figure 1** The purification (A) and identification (B) of hsEH in *E. coli*



**Figure 3** The time-relative fluorescent intensity units (RFU) curve of 200  $\mu\text{L}$  reaction volume in 96-well black microplate. The concentration of substrate PHOME varied as followed: 15, 20, 30, 40, 50, and 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . The fixed volume of hsEH extract is 10  $\mu\text{L}$ .  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$

384 孔微板适用的 50  $\mu\text{L}$  体系: 底物 PHOME 工作液 25  $\mu\text{L}$  (终浓度为 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 反应缓冲液 22.5  $\mu\text{L}$ , 酶工作液 A 用量为 2.5  $\mu\text{L}$ 。另外, 对酶工作液 A (5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 进行 2 倍稀释, 使之成为酶工作液 B (2.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 此时酶工作液加样体积为 5  $\mu\text{L}$ , 反应缓冲液相应调整为 20  $\mu\text{L}$ 。结果如图 4 所示, 酶反应曲线仍然较好地符合酶动力学。



**Figure 4** The time-relative fluorescent intensity units (RFU) curve of 50  $\mu\text{L}$  reaction volume with or without 2% DMSO in 384-well black microplate. The fixed concentration of PHOME is 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and the fixed volume of hsEH extract is 10  $\mu\text{L}$  in 50  $\mu\text{L}$  reaction volume.  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$

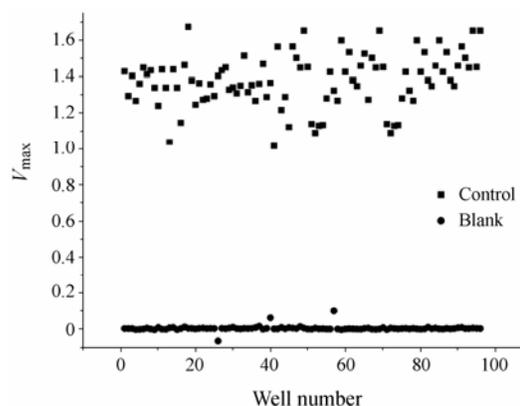
## 5 DMSO 对该筛选模型的影响

DMSO 对于有机化合物有着良好的溶解性。在高通量筛选中, 通常采用 DMSO 来溶解样品。采用 384 孔微板, 每孔反应总体积为 50  $\mu\text{L}$ , 其中 DMSO 含量 1  $\mu\text{L}$ , 使此检测体系中 DMSO 的含量为 2%, 超过实际筛选时 1% 的水平, 结果 (图 4) 显示, 2% DMSO

对酶反应曲线没有明显影响。

## 6 高通量筛选模型评价及验证

分别测定 96 个正常对照孔 (Control: buffer 20  $\mu\text{L}$ , enzyme 5  $\mu\text{L}$ , PHOME 25  $\mu\text{L}$ ) 和 96 个空白对照孔 (Blank: buffer 25  $\mu\text{L}$ , PHOME 25  $\mu\text{L}$ ) 的  $V_{\max}$ , 结果 (图 5) 求得 Control 孔的值为  $1.37 \pm 0.14$ , 而 Blank 孔的值为  $0.0021 \pm 0.0141$ , 计算 Z' 值为 0.65。另外, 本模型测定 sEH 特异性抑制剂 AUDA 的  $\text{IC}_{50}$  值为 9.95  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 与文献<sup>[12-14]</sup>报道基本平行。因此可以认为本模型是一种灵敏度高、稳定性好的高通量筛选方法。



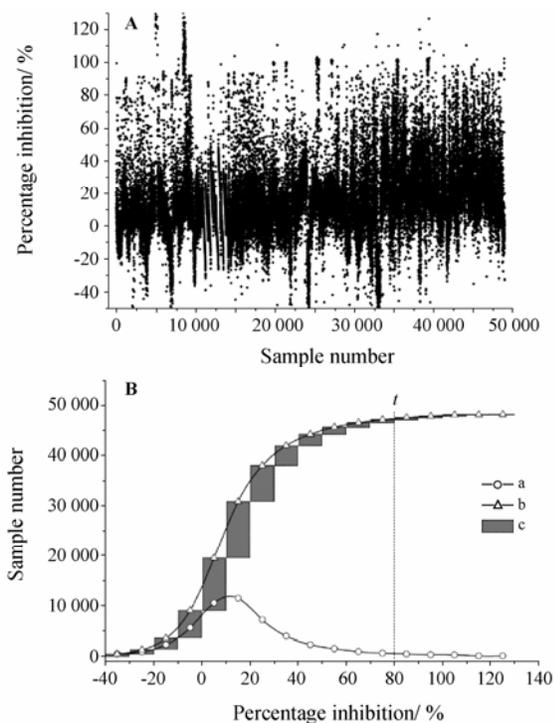
**Figure 5** The  $V_{\max}$  values of 96 control wells and 96 blank wells. Control: buffer 20  $\mu\text{L}$  + hsEH 5  $\mu\text{L}$  + PHOME 25  $\mu\text{L}$ ; Blank: buffer 25  $\mu\text{L}$  + PHOME 25  $\mu\text{L}$

## 7 人源可溶性环氧化物水解酶抑制剂高通量筛选<sup>[15]</sup>

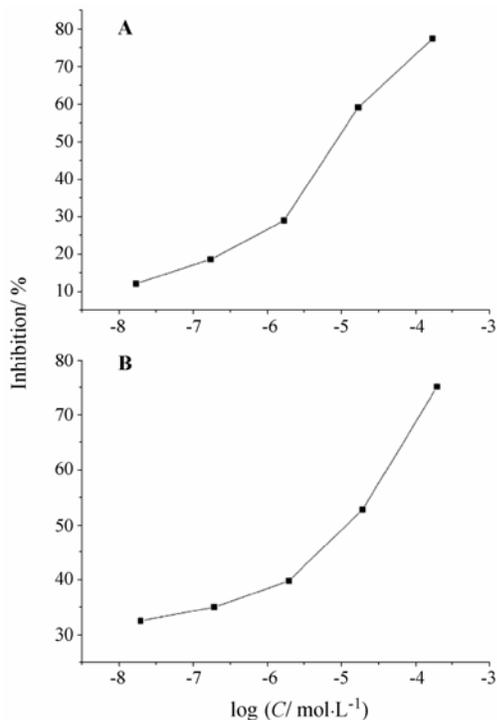
按照建立的 HTS 实验方法对 47 360 种样品进行了筛选 (图 6), 然后对抑制率大 (等) 于 80% 的 950 种样品进行了复筛, 选择活性较高、量效关系较好的样品进行  $\text{IC}_{50}$  的测定。最终确定 J14577 和 J14592 两种化合物对人源可溶性环氧化物水解酶有较强的抑制活性, 其中 J14577 的  $\text{IC}_{50}$  值为 8.56  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , J14592 的  $\text{IC}_{50}$  值为 4.31  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (图 7)。

## 讨论

sEH 通过对体内 EETs 水平的调控参与血管功能调节、炎症反应等过程。对于心脑血管疾病, 抑制 sEH 活性, 使体内 EETs 水平增加, 发挥其生理或药理作用, 是一种很有前景的治疗途径。寻找 sEH 抑制剂已经成为世界各大制药公司新药研发的热点。目前最好的抑制剂是 1, 3-二烷基脲类 (dialkylureas), 但是这类化合物与其他类型抑制剂一样具有难以克服的弱点, 理化性质不够理想、生物利用度很低以及安全性



**Figure 6** The distribution of inhibitory activities of 47 360 samples on hsEH. Panel A: The scatter curve of inhibitory activities of 47 360 samples on hsEH. Panel B: Line a presented an approx normal distribution curve of 47 360 samples on percentage inhibition; line b and floating column c presented the accumulated distribution curve of 47 360 samples on percentage inhibition; *t* marked the threshold inhibition ratio of 80% which 950 hits exceeded in the initial screening



**Figure 7** The concentration-response curves of J14577 (A) and J14592 (B) on hsEH. The  $IC_{50}$  value of J14577 is  $8.56 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , the  $IC_{50}$  value of J14592 is  $4.31 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

较差都导致其成药性较差,限制了其进一步开发成为临床安全有效的治疗药物<sup>[14, 16]</sup>。迄今为止, Arete Therapeutics 公司的 1, 3-二取代脲类化合物 AR9281 是唯一获准进入临床研究的 sEH 抑制剂<sup>[10]</sup>。在这种背景下开发其他更为合理的、安全、有效的新型抑制剂具有重要意义和广阔的应用前景。

目前已经分别从人、大鼠、小鼠、鸡以及植物如马铃薯等克隆和表达了 sEH。重组蛋白在分子量、水解活性、抑制以及免疫原性等方面都与从人肝脏分离的蛋白非常相似。其中 hsEH 已经从人肝脏克隆并利用杆状病毒表达系统在 SF21 昆虫细胞重组表达成功,但是在原核系统表达未见报道<sup>[17-19]</sup>。本研究采用大肠杆菌原核表达体系成功克隆表达 hsEH, 其蛋白诱导表达量非常高,而且已经证实具有很好的生物学功能,完全可以满足其抑制剂高通量筛选的要求。

在 sEH 的水解酶活性检测方面,最初采用放射性同位素标记的底物,后又采用色谱法检测,均比较费时费力,代价也高。后来渐渐为分光光度法所取代,利用 4-nitrophenyl-*trans*-2, 3-epoxy-3-phenylpropyl carbonate (NEPC) 作为底物进行动力学观察,以评价有效的酶抑制活性。但是分光光度法的局限性在于其需要的底物浓度较高,而且底物需要进行化学修饰以消除自身干扰。近年有报道将一系列具有荧光的  $\alpha$ -cyanoesters 和  $\alpha$ -cyanoethers 作为 sEH 的底物用于酶抑制剂的研究<sup>[12]</sup>,从此基于荧光分析的酶活性测定方法得到了快速发展。本研究根据文献合成 sEH 特异性底物 PHOME,用于重组 hsEH 的活性检测。另外,此前文献<sup>[13, 20]</sup>均采用终点法,需要长时间孵育,并需要额外加入终止液终止反应,结果也容易受到干扰。本研究根据酶动力学原理采用反应速率法,克服了反应时间的限制,降低了假性结果出现的可能性,增强了灵敏度、特异性和可操作性;并且将 96 孔反应体系缩减为适用于 384 孔微板,提高了筛选效率。

本研究利用此模型对中心样品库进行了大规模筛选,得到了两种具有较强抑制活性的化合物 J14577 和 J14592,其化学结构与目前已知的抑制剂相比具有新颖性。虽然这两种化合物对 sEH 的抑制作用并不是特别强,距离新药开发也需要很多更深入的探索性研究,但是其仍具有一定的价值。在下一步的工作中,除了以其为基础进行结构优化外,作者亦将借鉴系统生物学和多靶点药物治疗的新思路,不仅仅局限于 sEH 此单一靶点,还要针对其他影响

EETs 水平的靶点诸如细胞色素 P450 表氧化酶、水解酶等进行研究, 考察化合物是否能够从多个靶点、多个层次调控 EETs 的代谢, 从而尝试寻找基于 EETs 的多靶点药物。

## References

- [1] Chiamvimonvat N, Ho CM, Tsai HJ, et al. The soluble epoxide hydrolase as a pharmaceutical target for hypertension [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, 50: 225-237.
- [2] Decker M, Arand M, Cronin A. Mammalian epoxide hydrolases in xenobiotic metabolism and signalling [J]. *Arch Toxicol*, 2009, 83: 297-318.
- [3] Fretland AJ, Omiecinski CJ. Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology [J]. *Chem Biol Interact*, 2000, 129: 41-59.
- [4] Spector AA, Fang X, Snyder GD, et al. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function [J]. *Prog Lipid Res*, 2004, 43: 55-90.
- [5] Larsen BT, Gutterman DD, Hatoum OA. Emerging role of epoxyeicosatrienoic acids in coronary vascular function [J]. *Eur J Clin Invest*, 2006, 36: 293-300.
- [6] Inceoglu B, Schmelzer KR, Morisseau C, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition reveals novel biological functions of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2007, 82: 42-49.
- [7] Jung O, Brandes RP, Kim IH, et al. Soluble epoxide hydrolase is a main effector of angiotensin II-induced hypertension [J]. *Hypertension*, 2005, 45: 759-765.
- [8] Schmelzer KR, Kubala L, Newman JW, et al. Soluble epoxide hydrolase is a therapeutic target for acute inflammation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 9772-9777.
- [9] Fang X. Soluble epoxide hydrolase: a novel target for the treatment of hypertension [J]. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 2006, 1: 67-72.
- [10] Imig JD, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8: 794-805.
- [11] Simpkins AN, Rudic RD, Schreihof DA, et al. Soluble epoxide inhibition is protective against cerebral ischemia via vascular and neural protection [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174: 2086-2095.
- [12] Jones PD, Wolf NM, Morisseau C, et al. Fluorescent substrates for soluble epoxide hydrolase and application to inhibition studies [J]. *Anal Biochem*, 2005, 343: 66-75.
- [13] Wolf NM, Morisseau C, Jones PD, et al. Development of a high-throughput screen for soluble epoxide hydrolase inhibition [J]. *Anal Biochem*, 2006, 355: 71-80.
- [14] Morisseau C, Goodrow MH, Newman JW, et al. Structural refinement of inhibitors of urea-based soluble epoxide hydrolases [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 63: 1599-1608.
- [15] Zhang DS, Zhang TT, Li SJ, et al. High throughput screening for glutathione S-transferase inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin (药理学报)*, 2008, 43: 108-112.
- [16] Hwang SH, Tsai HJ, Liu JY, et al. Orally bioavailable potent soluble epoxide hydrolase inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2007, 50: 3825-3840.
- [17] Beetham JK, Tian T, Hammock BD. cDNA cloning and expression of a soluble epoxide hydrolase from human liver [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1993, 305: 197-201.
- [18] Grant DF, Storms DH, Hammock BD. Molecular cloning and expression of murine liver soluble epoxide hydrolase [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268: 17628-17633.
- [19] Stapleton A, Beetham JK, Pinot F, et al. Cloning and expression of soluble epoxide hydrolase from potato [J]. *Plant J*, 1994, 6: 251-258.
- [20] Morisseau C, Hammock BD. Measurement of soluble epoxide hydrolase (sEH) activity [J]. *Curr Protoc Toxicol*, 2007, 33 Suppl: 4.23.1-4.23.18.