

Nrf2/ARE 通路调节机制的研究进展

易小芳, 谭超[△]

摘要:核因子 E2 相关因子 Nrf2 是一个参与多种蛋白表达的核转录因子,是机体氧化应激反应的调节中枢,它与抗氧化反应元件(ARE)结合后可启动下游多个抗氧化、抗炎蛋白及解毒酶等的表达,其介导的这一信号通路参与了炎症、肿瘤等多种病理过程的发生发展。本综述在阐述其基本结构、生物学效应以及介导的信号通路的基础上,针对各种参与该信号通路正负向调控的因素及调控机制的最新研究进展进行了概述,为抗炎症、抗氧化以及抗肿瘤等生物化学治疗提供了新的靶点,在此基础上,本文也展望了生物信息学技术的应用将会为这一靶点的干预提供更好的发展前景。

关键词:Nrf2; Nrf2/ARE 信号通路; 氧化性应激

中图分类号:R392.1 **文献标志码:**A **DOI:**10.11958/j.issn.0253-9896.2015.05.032

Research progress of Nrf2/ARE pathway regulating mechanism

YI Xiaofang, TAN Chao[△]

The First Clinical Medical College, Three Gorges University, Yichang 443002, China

[△]Reviser E-mail: yczxytanchao@sina.com

Abstract: Nuclear factor E2 related factor Nrf2 is a nuclear transcription factors involved in a variety of protein expression. As a center of oxidative stress regulation, it combines with antioxidant components (antioxidant responsive element, ARE) and activates downstream multiple anti-oxidation, anti-inflammatory and detoxifying enzyme protein expression. This signaling pathway is involved in the development of inflammation, tumor and other pathological process. This review describes the basic structure, biological effects and signaling pathways of Nrf2, summarizes the latest progress about mechanisms of factors, which are involved in the positive and negative regulations of signal pathway, providing a new target for anti-inflammatory, antioxidant, and antitumor biochemical treatment. Based on these, the paper also looks forward to applying bioinformatics technology and providing better prospects for the development of target intervention.

Key words: Nrf2 ; Nrf2/ARE signal pathway; oxidative stress

核因子 E2 相关因子(nuclear factor erythroid-derived factor 2-related factor,Nrf2)属于 Cap'-n'-Collar(CNC)家族的转录因子^[1]。作为抗氧化转录因子,Nrf2 与抗氧化反应元件(antioxidant responsive element, ARE)结合,启动下游多个抗氧化、抗炎蛋白及解毒酶等的表达,构成 Nrf2/ARE 通路,是机体抵御各种氧化应激的重要保护通路。Nrf2 在解毒器官如肝、肾以及与外界环境接触的器官,如皮肤、肺、消化道等有大量表达。作为抗氧化应激的调节中枢,Nrf2 在机体内的表达及其调控具有重要意义,本文对新近研究进行综述。

1 Nrf2 的基本结构

Nrf2 含 589 个氨基酸,属于 CNC 家族的碱性亮氨酸拉链(bZIP)转录因子^[2],含有 6 个区,即 Neh1~6,其中 Neh1 区的亮氨酸拉链结构 bZIP 可与小 Maf 蛋白结合形成异源二聚体,进而获得与抗氧化元件 ARE 上 DNA 分子结合的能力,Neh2 是 Nrf2 与 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1(Kelch-like ECH-

associated protein 1,Keap1)结合的区域,这一区域即 Nrf2 的第 69~84 氨基酸这一包含 16 个氨基酸的短肽,它包含了与 Keap1 结合的 ETGE 基序和 DLG 结合位点。Neh4 和 Neh5 区则是和共激活因子环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein,CREB)结合后辅助 Nrf2 靶基因转录激活^[3],这一过程与 Nrf2 的第 596 和 599 位氨基酸被 CREB(CREBBP)乙酰化有关。Neh6 区含有大量的丝氨酸残基,是氧化还原非敏感区,在氧化应激状态下与 Nrf2 的降解相关。另外,Nrf2 的第 40 位氨基酸是磷酸化位点,Nrf2 的磷酸化对其与 Keap1 解离及发挥生物学功能有关。

2 Nrf2 的活性

2.1 Nrf2/Keap1 复合体 在生理状态下,Keap1 作为 Nrf2 的负调控因子将 Nrf2 锁定在胞浆内并介导其泛素化以维持胞内 Nrf2 的稳态^[4]。Keap1 由 BTB、IVR、双甘氨酸重复区域(double glycine repeat or Kelch repeats,DGR)以及 CTR4 个部

作者单位:湖北宜昌,三峡大学第一临床医学院检验科(邮编 443002)

作者简介:易小芳(1976),女,本科,主管技师,从事生殖免疫方面研究

[△]审校者 E-mail: yczxytanchao@sina.com

分组成^[5]。其中,Keap1 的 DGR 区可分别与 Nrf2Neh2 区的 DLG 基序和 ETGE 基序结合,即 1 分子 Nrf2 可以结合 2 分子 Keap1,同时 DGR 区也是 Keap1 与胞浆内肌动蛋白结合的部位。Keap1 的 DGR 区由 6 个重复的双甘氨酸序列形成一个“口袋”样结构与 Nrf2Neh2 区的 DLG 或 ETGE 基序结合,在 Nrf2 与 Keap1 结合时,1 分子 Keap1 的 DGR 区与 Nrf2 的 DLG 结合,另 1 分子 Keap1 的 DGR 区与 Nrf2 的 ETGE 基序结合,而这 2 分子 Keap1 会形成一个二聚体,Keap1 的 BTB 区则参与 Keap1 二聚体的形成,并调节 Nrf2 与 Keap1 的结合^[6]。当氧化应激时,由各种因素导致 Keap1 及其二聚体空间构象发生改变时,Nrf2 即可与 Keap1 解离,继而入核发挥生物学功能。

2.2 Nrf2/ARE 通路 ARE 是位于一些保护性基因上游调节区的一个 DNA-启动子结合序列,而 Nrf2 是这一序列的激活因子,当活化的 Nrf2 进入细胞核与 Maf 蛋白(包括 MafG、MafK、MafF)结合成异二聚体后与 ARE 序列结合,使受 ARE 调控的基因开始转录,从而启动 II 相解毒酶、抗氧化酶等保护性基因的表达^[7-8]。ARE 与 Nrf2 的这种结合不仅需要其与 Maf 蛋白结合形成二聚体,更重要的是 Nrf2 对氧化还原敏感,因此它们之间的这种结合较具专一性,这使得该通路成为机体抗氧化等防御机制中的重要通路。

2.3 生物学功能 Nrf2 是目前发现在氧化应激时最为重要的转录因子,它参与细胞氧化应激等多种防御机制,从而在炎症、肿瘤等疾病的发生发展中扮演重要角色。它启动抗氧化基因的表达以及诱导 II 相解毒酶的产生在机体对抗氧化、亲电子以及外源性毒物损伤过程中起到决定性作用^[9]。Nrf2 与 ARE 结合继而启动了下游抗氧化基因的转录,在这个过程中,ARE 被 Nrf2 结合并激活是较具专一性的,这使得 Nrf2 在机体防御尤其是抗氧化过程中至关重要,因而最终作为抗氧化、解毒、抗炎、抗肿瘤等防御机制中的重要靶点。

3 Nrf2/ARE 通路的调节

3.1 Nrf2/ARE 通路的激活

3.1.1 Nrf2/ARE 通路的正常生理激活 正常状况下,锁定 1 个分子 Nrf2 的 Keap1 二聚体与 E3 泛素连接酶形成复合物,介导 Nrf2 的泛素化降解^[10]。当应激时,Nrf2 的磷酸化、Keap1 中对氧化还原敏感的半胱氨酸残基特别是 Cys257、Cys273、Cys288、Cys293 被修饰以及 Keap1 构象发生改变,使得 Nrf2 的低亲和力位点 DLG 与 Keap1 发生解离,而另一个结合基序 ETGE 由于亲和力高仍与 Keap1 结合,这一变化恰巧阻止了 Nrf2 的降解,当 Keap1 被饱和后,新合成的 Nrf2 进入核内与 ARE 结合,启动目标基因的转录,即 Nrf2/ARE 通路被激活。这就是铰链和锁存模型^[11]。而激活 Nrf2/ARE 通路的途径除了使 Keap1 构象改变,释放 Nrf2 入核外,还通过 Keap1 的降解来增强这一信号通路。某些 miRNA 如 miRNA200a 可以作用于 Keap1 mRNA 的 3'-UTR 使得 Keap1 的 mRNA 降解^[12],也有报道称氧化及电离辐射应激时,Cul3 依赖的泛素化会由 Nrf2 转移至 Keap1,使得 Keap1 自身发生降解,Nrf2 得以释放,启动 Nrf2/ARE 通路^[13]。Nrf2 与 Keap1 结合主要依靠其高亲和力结合基序 ETGE,而含有 ETGE 基序的

这一类物质如 PALB2 则通过阻断 Keap1 与 Nrf2 的结合对 Nrf2/ARE 通路进行正向调节。最近也有报道称某些抑癌蛋白也可通过与 Keap1 结合来激活 Nrf2/ARE 通路^[14]。

3.1.2 II 相酶诱导剂介导的 Nrf2/ARE 通路激活 5,6-二氢环戊烯-1,2-二硫杂环戊烯-3-硫酮(5,6-dihydrocyclopenta-1,2-dithiole-3-thione,CPDT)及萝卜硫素(sulforaphane,SF)等 II 相酶诱导剂可以快速升高 Nrf2 的浓度,进而增强 Nrf2 的转录活性,但它们并不调节 Nrf2 基因的转录以及 Keap1 的表达。同时,它们也不引起 Nrf2-Keap1 及泛素化酶复合体的解离;相反,它们都能抑制 Nrf2 的磷酸化以维持 Nrf2 与 Keap1 的结合。研究表明,它们主要是通过进入细胞核,在核内抑制 Nrf2 蛋白酶体降解以维持其蛋白稳定性这种方式来增强 Nrf2 的转录活性^[15]。但 CPDT 与 SF 在 Keap1 敲除的细胞中又没有升高 Nrf2 的能力,由此推断它们是通过 Keap1 依赖和非依赖两种方式调节 Nrf2 的活性^[16]。

3.1.3 其他与 Nrf2/ARE 通路激活有关的因素 研究发现 Nrf2 的基础骨架和亮氨酸拉链区域分别含有 1 个核定位信号和 1 个核输出信号,Neh5 区域上含有 1 个氧化敏感的核输出信号,这些发现表明 Nrf2 可能自发地响应外界信号,非 Keap1 依赖地入核执行转录功能^[17]。

3.2 Nrf2/ARE 通路的负向调节

3.2.1 Keap1 介导的 Nrf2/ARE 通路负向调节 在 Nrf2/ARE 通路的负向调节中最主要的就是 Keap1 这一因素,它不仅将 Nrf2 锁定在胞浆内,还通过泛素化对 Nrf2 进行快速降解,对于细胞内 Nrf2 水平的稳态起巨大作用。此外,Keap1 也可以在应激诱导后通过阻断 Nrf2 与 ARE 的结合来抑制 Nrf2/ARE 通路的激活。Keap1 对 Nrf2 的抑制作用在 Nrf2/ARE 通路的负向调节中占主导地位。越来越多研究发现,许多 miRNA 参与 Nrf2/ARE 的负向调节。譬如,miR-144 在 MLL (myelogenous leukaemia)细胞株中可以抑制 Nrf2 mRNA 的表达^[18],miR-28a 在乳腺上皮细胞中可以靶向作用于 Nrf2mRNA 的 3'-UTR,引起 Nrf2 mRNA 的降解,从而负向调节 Nrf2/ARE 通路^[19],这些都是直接作用于 Nrf2 从而达到负向调节作用的。

3.2.2 核因子(NF)- κ B 介导的 Nrf2/ARE 通路负向调节 NF- κ B 和 Nrf2 均在机体的免疫和抗氧化调节中发挥着重要的作用,当 NF- κ B 信号通路激活时,Nrf2 信号通路会受到抑制。已有研究表明,NF- κ B 的 p56 亚基强烈抑制 Nrf2 的转录活性,并且 p56 的 C-端转录激活区对于 p56 的反抑制功能是必不可少的,但与其激活靶基因的能力无关,P56 抑制 Nrf2 与 Keap1 不同,它主要是从两个层面来影响 Nrf2 的活性,一是抑制 Nrf2 与 MafK 的二聚化来直接导致 DNA 的结合能力减弱;另一方面是抑制 Nrf2-CREB 的相互作用,CREB 协同参与 Nrf2 对目标基因转录活性的增强,p56 通过与 Nrf2 竞争结合 CREB 从而间接的抑制了 Nrf2 的转录活性^[20]。这一研究发现为针对 NF- κ B 介导的促炎、促肿瘤提供了新的治疗途径。

3.2.3 转录抑制因子介导的 Nrf2/ARE 通路负向调节 Nrf2 需要与 Maf 蛋白形成异二聚体后才可与 ARE 结合,而现研究发现体内广泛存在的转录抑制因子 Bach1 在某种程度上

存在与 Nrf2 竞争性结合 Maf 蛋白的现象,从而可以在 Nrf2 与 ARE 结合这一环节阻遏这一抗氧化通路的启动,参与 Nrf2/ARE 通路的负向调节^[21]。

综上所述,Nrf2/ARE 通路是体内重要的抗氧化、抗炎、抗肿瘤通路,但最近也有文献报道其促使了肿瘤的生长^[22],对其通路的调节成为疾病生物化学治疗的一个重要靶点。目前尚未得到 Nrf2 的蛋白晶体结构,而其蛋白空间结构可能有助于更好地研究 Nrf2 及其介导的信号通路,同时也可以采用生物信息学方法对可能与 Nrf2/ARE 通路有相互作用的物质,如 miRNA、化学药物等进行计算机模拟并做出预测,从而有效地缩短筛选该通路调控分子的时间。

参考文献

- [1] Zhu J, Wang H, Ji X, et al. Differential Nrf2 expression between glioma stem cells and non-stem-like cells in glioblastoma[J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(3): 693-698.
- [2] Gao B, Doan A, Hybertson BM. The clinical potential of influencing Nrf2 signaling in degenerative and immunological disorders[J]. *Clin Pharmacol*, 2014, 3(6): 19-34.
- [3] Sato K, Yama K, Murao Y, et al. Epalrestat increases intracellular glutathione levels in Schwann cells through transcription regulation [J]. *Redox Biol*, 2013, 19(2): 15-21.
- [4] Ma L, Liu X, Zhao Y, Chen B, et al. Ginkgolide B reduces LOX-1 expression by inhibiting Akt phosphorylation and increasing Sirt1 expression in oxidized LDL-stimulated human umbilical vein endothelial cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74769.
- [5] Liu Z, Xiang Y, Sun G. The KCTD family of proteins: structure, function, disease relevance[J]. *Cell Biosci*, 2013, 3(1): 45-49.
- [6] Kobayashi E, Suzuki T, Yamamoto M. Roles nrf2 plays in myeloid cells and related disorders[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013: 529219.
- [7] Saldanha JF, Leal VD, Stenvinkel P, et al. Resveratrol: why is it a promising therapy for chronic kidney disease patients[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013: 963217.
- [8] Mercado N, Kizawa Y, Ueda K, et al. Activation of Transcription Factor Nrf2 Signalling by the Sphingosine Kinase Inhibitor SKI- II Is Mediated by the Formation of Keap1 Dimers[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88168.
- [9] Tao S, Justiniano R, Zhang DD, et al. The Nrf2-inducers tanshinone I and dihydrotanshinone protect human skin cells and reconstructed human skin against solar simulated UV[J]. *Redox Biol*, 2013, 1(1): 532-541.
- [10] Wu KC, Cui JY, Klaassen CD, et al. Effect of graded nrf2 activation on phase-i and -ii drug metabolizing enzymes and transporters in mouse liver[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): 39006-39017.
- [11] Jianglin Ma, Hong Cai, Tongde Wu, et al. PALB2 interacts with KEAP1 to promote NRF2 nuclear accumulation and function[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(8): 1506-1517.
- [12] Eades G, Yang M, Yao Y, et al. miR-200a regulates Nrf2 activation by targeting Keap1 mRNA in breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(47): 40725-40733.
- [13] Hine CM, Mitchell JR. NRRF2 and Phase II Response in Acute Stress Resistance Induced by Dietary Restriction[J]. *J Clin Exp Pathol*, 2012, S4(4): 7329.
- [14] Cino EA, Killoran RC, Karttunen M, et al. Binding of disordered proteins to a protein hub[J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 2305.
- [15] Maqesh S, Chen Y, Hu L. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents [J]. *Med Res Rev*, 2012, 32(4): 687-726.
- [16] Li Y, Paonessa JD, Zhang Y. Mechanism of chemical activation of Nrf2[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): 35122-35133.
- [17] Jiang ZY, Chu HX, Xi MY, et al. Insight into the intermolecular recognition mechanism between Keap1 and IKK β combining homology modeling protein-protein docking, molecular dynamics simulations and virtual alanine mutation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75076.
- [18] Sangokoya C, Telen MJ, Chi JT. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease[J]. *Blood*, 2010, 116(20): 4338-4348.
- [19] Shah NM, Rushworth SA, Murray MY, et al. Understanding the role of NRF2-regulated miRNAs in human malignancies[J]. *Oncotarget*, 2013, 4(8): 1130-1142.
- [20] Cuadrado A, Martin-Moldes Z, Ye J, et al. Transcription factors NRF2 and NF- κ B are coordinated effectors of the Rho family, GTP-binding protein RAC1 during inflammation[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(22): 15244-15258.
- [21] Shelton P, Jaiswal AK. The transcription factor NF-E2-related factor 2(Nrf2): a protooncogene[J]. *FASEB J*, 2013, 27(2): 414-423.
- [22] Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, et al. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer[J]. *Redox Biol*, 2013, 1(1): 45-49.

(2014-08-11 收稿 2014-10-20 修回)

(本文编辑 李国琪)