

Nrf2-ARE 通路抑制作用研究展望

王秀君¹, 吴加国², 唐修文³

(1. 浙江大学医学院药理学系, 浙江 杭州 310058;

2. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院消化科, 浙江 杭州 310016;

3. 浙江大学医学院生物化学与遗传学系, 浙江 杭州 310058)

[摘要] 转录因子红细胞系-2p45(NF-E2)相关因子-2(nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2)通过上调解毒酶和抗氧化酶基因的表达, 为人体提供防御系统。然而, Nrf2 表达过高, 不但对肿瘤形成和生长起促进作用, 而且可增强肿瘤细胞的耐药性。

[关键词] 核胞浆转运蛋白类; 氧化性应激; 基因表达; 反应元件

[中图分类号] R 285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2010)01-0001-05

在人体细胞内, 存在着一系列的解毒酶及抗氧化酶以抵御外来有毒化合物对机体的伤害, 避免病变。这些酶包括谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)、NAD(P)H: 醌氧化还原酶 1(quinone oxidoreductase, NQO1)、UDP-葡萄糖醛酸转移酶(UDP-glucuronosyl-transferase, UGT)、醇醛酮还原酶家族 1 成员 C1(aldo -keto reductase family 1, member C1, AKR1C1)和谷氨酰半胱氨酸连接酶 GCL(GCLC, GCLM)等。它们的表达共同受转录因子红细胞系-2p45(NF-E2)相关因子-2(nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2)的调控。ARE(antioxidative responsive element, [5'-(G/A)TGA(G/C)nnnGC(G/A)-3']), n 代表任何种类核苷酸)是一个特异的 DNA-启动子结合序列, 位于这些基因的 5' 端启动序列^[1-4]。Nrf2 与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Kelch-like ECH-associated protein1, Keap1)解耦联, 通过 bZIP 与小分子肌腱纤维瘤蛋白(muscle aponeurotic fibrosarcoma protein, Maf)形成异二聚体并与 ARE 结合, 启动基因表达^[5-10]。

Nrf2 是一种属于帽和领 CNC(cap-'n'-collar, CNC)转录因子家族成员, 含有一高度保守的碱性亮氨酸拉链(basic region-leucine zipper, bZIP)结构。研究证明 Nrf2 转录活性主

要受 Keap1 的调控。在正常生理状态下, Keap1 的双甘氨酸序列(DGR)与 Nrf2 的 Neh2 部位相互作用(图 1, 2), 促进泛素蛋白酶体(Cul3 E3)降解 Nrf2, 从而使 Nrf2 的表达量维持在一个较低的水平。在氧化应激状态下, 亲电性化合物和 Keap1 的半胱氨酸相互作用使其构象发生变化, 与 Nrf2 解耦联, 使泛素蛋白酶体 Cul3 E3 不再降解 Nrf2, 导致 Nrf2 在细胞核内的表达量增加。

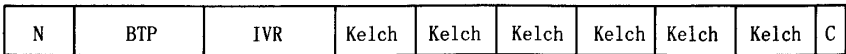
目前大量的研究结果证明 Nrf2 对癌变发生起正反两方面的作用。一方面激活 Nrf2 可以预防癌症; Nrf2 的激动剂例如酚类化合物抗氧化剂 BHA、1,2-双硫醇-3-硫酮的衍生物奥替普拉(oltipraz)及硫代异氰化物萝卜硫烷(sulforaphane, SUL)都能有效地激活 Nrf2, 诱导 ARE-调控基因(ARE-genebattery)的表达而起

收稿日期: 2009-12-05 修回日期: 2009-12-15

基金项目: 国家自然科学基金(30973555, 30970581); 卫生部/浙江省卫生厅(WKJ2007-2-008); 浙江省科技厅(2008C23054)。

作者简介: 王秀君(1965-), 女, 博士, 研究员, 主要从事抗肿瘤药理学与毒理学研究。

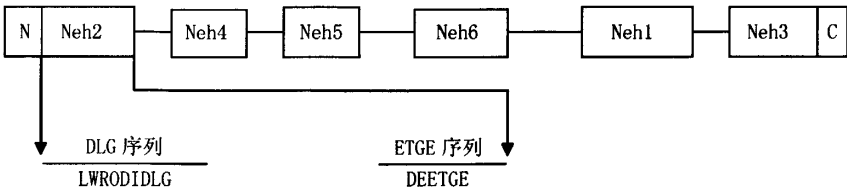
通讯作者: 唐修文(1965-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事细胞信号转导/分子药理; E-mail: xiuwentang@zju.edu.cn



Kelch/DGR 是与 Nrf2 的 Neh2 相互作用的功能域.

图1 Keap1 蛋白质的主要功能区分布示意图

Fig.1 Simplified diagram showing Keap1 protein domains



Neh2 是与 Keap1 的 Kelch/DGR 结合区即 Nrf2 活性区,包括 DLG 序列和 ETGE 序列,它们是主要的 Nrf2 突变发生部位.

图2 Nrf2 蛋白质的主要功能区分布示意图

Fig.2 Simplified diagram showing Nrf2 protein domains,DLG and ETGE sequences

到化学预防癌变的作用。有研究报道,这些化合物在 Nrf2 基因敲除小鼠中起不到上述作用^[11-12]。另一方面 Nrf2 长期处于过高表达则与恶性癌变相关联。Singh 等^[14]研究明确了 Keap1 的突变定位,并发现在许多非小细胞肺癌和一些象 H460、A549 的肺癌细胞系中,因 Keap1 的突变导致 Nrf2-Keap1 信号转导通路失控,Nrf2 在细胞核中累积^[13-14]。Shibata 等^[5]在癌细胞中发现了 Nrf2 的 DLG 序列发生体细胞突变(图2),尤其是有吸烟史或患鳞状上皮细胞癌的患者。这些氨基酸序列的突变导致了 Nrf2 在核内累积,并促进了 Nrf2-ARE 调控基因的转录和表达。据报道,大约在 11% 的肺癌患者中发现了 Nrf2 的获得性功能突变,Nrf2 的突变导致了对 Keap1-Cul3 E3 连接酶的识别降低,细胞中 Nrf2 的总表达量增加,致使受其调控的抗氧化酶基因、II 相解毒酶和药物流出泵基因的表达及谷胱甘肽(GSH)水平均增加^[14]。GSH 和相关解毒酶参与抗癌药物及氧化应激副产物的解毒作用,上述系统的正调节增强了癌细胞对药物的解毒作用,促进了癌变的发生,增加了癌细胞的耐药性^[5]。因此,在正常细胞内 Nrf2/ARE 通路的激活和抑制被严格地调控;若抑制通路失控,将会引起 Nrf2 过度激活,其靶基因过量表达,以促进癌变的发生和癌细

胞的生长,同时增强了癌细胞的防御能力。基于 Nrf2 抑制作用的研究,发现其对治疗癌症具有重大的意义^[15]。

1 Nrf2 通路的抑制作用研究及其临床意义

自 Nrf2 被发现以来,在此领域中处于领先地位的数家(来自日本、美国、英国)实验室集中对 Keap1 这条抑制通路进行了研究。最近研究表明,Nrf2 可被多条信号通路所抑制(图3)。Brown^[16]等报道,激活转录因子 3(ATF3)是一种 Nrf2/ARE 的阻遏物,ATF3 与 Nrf2 形成异二聚体,可减弱 CBP 与 ARE 及 Nrf2 的相互作用。因为 CBP 是一种 CREB-结合蛋白,能与 Nrf2 的 2 个转录激活域相互作用,具有激活 Nrf2 转录活性的功能,所以 CBP 与 ARE 及 Nrf2 的相互作用减弱,将导致 Nrf2 转录活性的降低。Wang 等^[17]也报道,视黄酸通过其受体(RAR α)抑制 Nrf2 的转录活性,RAR α 与 Nrf2 相互作用增加可减少 Nrf2 与 ARE 的结合,因此其转录活性降低。抑癌基因 p53 也能作为阻遏物与 ARE 结合而抑制 Nrf2 的转录活性^[18]。

另外,还有研究表明一些 Nrf2 阻遏物有选择性地调控基因的转录。Bach1 是一种以抑制 HO-1 转录为主的 Nrf2 阻遏物,对 Nrf2-ARE 通路的其它基因的抑制作用很小,对细胞内的 GSH

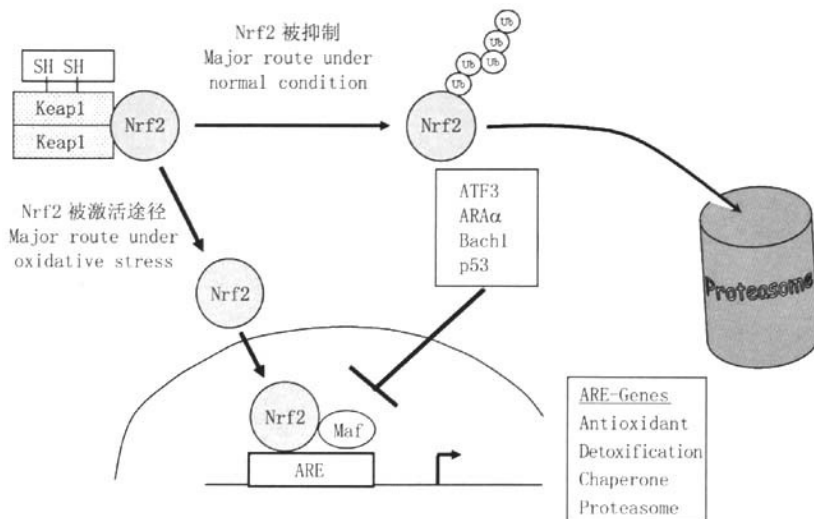


图3 主要抑制和激活 Nrf2-ARE 信号通路系统示意图

Fig.3 The major inhibitory and activating Nrf2-ARE signaling pathways

含量的影响也很小^[19]。尽管如此,有关 Nrf2 被激活转移到细胞核之后是如何被调控和抑制的了解依然甚少,亟待深入研究。

Shibata 等近期研究结果表明^[5],通过特异的小干扰 RNA 降低 Nrf2 的表达水平可逆转肿瘤耐药。与转染非相关小干扰 RNA (scrambled siRNA) 的细胞对照,抗肿瘤药物顺铂对转染了 Nrf2 小干扰 RNA 的 EBC-1 和 A549 细胞的增殖抑制作用较对照组更显著^[5]。在肺癌中,61.8% 的肿瘤细胞核内 Nrf2 累积。与转染非相关小干扰 RNA 的细胞对照,抗肿瘤药物对转染 Nrf2 小干扰 RNA 的 SK-OV 细胞毒性更大,抗肿瘤药物的作用对 Nrf2 基因缺失的细胞较对照组细胞毒性也大很多。这一结果证实降低 Nrf2 的表达(转录活性),可增强癌细胞对药物的敏感性。利用裸鼠皮下移植瘤进行的实验也得到了类似的结果。对已经建立的人非小细胞肺癌 A549 皮下移植瘤和 H460 皮下移植瘤进行抗肿瘤药物处理后发现,经过铂类药物卡铂(carboplatin)处理后瘤体变小了些,但如果卡铂和 Nrf2 小干扰 RNA 同时处理瘤体则变得更小;免疫细胞组学结果还表明,细胞增殖的标志蛋白质 Ki67 在瘤细胞中表达明显降低^[13]。由

此可见,Nrf2 特异的小干扰 RNA 的研究具有临床价值;与此同时,这一研究也表明 Nrf2 通路抑制剂作为抗肿瘤药物的增敏剂的开发和利用具有广阔的临床应用前景。

2 利用 H460-ARE 报告基因试验细胞株为模型发现新的 Nrf2 通路的抑制剂和阻遏物

利用 Nrf2 诱导机制,我们设计了专门受 Nrf2 调控的 ARE 并构建了 ARE-荧光素酶报告基因载体,率先以 H460 细胞株为模型建立了 H460-ARE 报告基因试验(reporter gene assay)细胞株(专利申报中)。实验表明,通过特异的小干扰 RNA 降低 Nrf2 的表达水平可降低 H460-ARE 报告基因试验细胞株的荧光素酶活性,而且 Nrf2 的表达水平与荧光素酶活性呈正相关;实验还证明,转染非相关小干扰 RNA 对荧光素酶活性则无影响。因此,利用此体系能够检测到 Nrf2 的抑制作用。再者,Nrf2 在 H460 细胞中总表达量很高,此体系还有灵敏度高特点。早期的一些 ARE 报告基因试验细胞株分别是利用 HepG2 和 MCF7 而建立的^[20-21],在常态下这些细胞 Nrf2 表达很低,因此这些 ARE 报告基因试验细胞株对检测激动

剂非常有用;但在检测抑制作用时需要激动剂诱导 Nrf2-ARE 通路,因此很难判断实验结果是一种小分子化合物的作用还是 2 种小分子化合物发生反应后的结果,这样必然会给实验结果的解释带来一些困难,有时还会产生一些假阳性或假阴性的结果。利用 H460-ARE 报告基因试验细胞株,我们发现了一些能够降表达 Nrf2 的小分子抑制剂,增敏抗肿瘤药物奥沙利铂、博来霉素和依托泊苷等,还发现了一些新的 Nrf2 通路的阻遏物。

为了进一步验证小分子抑制剂对非小细胞肺癌的增敏作用是通过抑制 Nrf2 通路而实现的,我们分别利用 pRS-GFP、pRS-shNrf2 质粒转染 H460 细胞株,经过长期加筛选剂筛选,挑选上百个克隆培养并经多次检测最后分别获得了稳定表达 pRS-GFP 的对照细胞株和稳定表达 pRS-shNrf2 的 Nrf2 降表达细胞株^[22]。如果这些小分子抑制剂具有对 Nrf2 介导非小细胞肺癌增敏的作用,在 pRS-GFP 的对照细胞株增敏作用就将比在稳定表达 pRS-shNrf2 的 Nrf2 降表达细胞株中更为显著。除此之外,我们还将绿色荧光蛋白 GFP 基因和带 GFP 标签的 Keap1 野生型基因在 H460 细胞中表达并建立了稳定表达的细胞株^[23]。如果这些小分子抑制剂具有对 Nrf2 介导非小细胞肺癌增敏的作用,在 GFP 对照细胞株增敏作用就将比在稳定表达 Keap1-GFP 的 Nrf2 降表达细胞株中更为显著。这些模型细胞株的建立将促进小分子抑制剂的开发。

3 展 望

因为 Nrf2 对癌变发生起正反两方面的作用,Nrf2 领域也已成为当前癌症研究的热门课题之一,Nrf2 抑制机制研究将会是 Nrf2 领域的主要生长点。Nrf2 抑制作用研究将主要集中在如下几方面:①发现新的抑制 Nrf2 通路的代谢途径;②蛋白质修饰包括磷酸化、泛素化及类泛素化,以及一些主要的信号转导通路,比如 MAPKs、JAK-STAT、Wnt 及 TGF- β 对 Nrf2 的抑制作用的研究;③开发一些有临床应用价值的 Nrf2 小分子抑制剂,这些小分子抑制剂不仅具有增敏肿瘤细胞的潜力^[24-25],而且还将有利于

揭示 Nrf2 的抑制作用。

随着学科之间互相渗透和交叉,蛋白质组化学技术和芯片技术的完善,以及象 H460-ARE 报告基因试验细胞株模式系统的建立,在不远的将来 Nrf2-ARE 抑制作用的研究将会在基础理论和临床应用上有突破性进展。

References:

- [1] MINERVA R G, KWAK M K, DOLAN P M, et al. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice [J]. *PNAS*, 2001, 98(6): 3410-3415.
- [2] MORIMITSU Y, NAKAGAWA Y, HAYASHI K, et al. A sulforaphane analogue that potently activates the Nrf2-dependent detoxification pathway [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(5): 3456-3463.
- [3] LEE J M, CALKINS M J, CHAN K, et al. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(14): 12029-12038.
- [4] THIMMULAPPA R K, MAI K H, SRISUMA S, et al. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(18): 5196-5203.
- [5] SHIBATA T, OHTA T, TONG K I, et al. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy [J]. *PNAS*, 2008, 105(36): 13568-13573.
- [6] DINKOVA-KOSTOVA A T, HOLTZCLAW W D, COLE R N, et al. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants [J]. *PNAS*, 2002, 99(18): 11908-11913.
- [7] LEE J S, SURH Y J. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention [J]. *Cancer Lett*, 2005, 224(2): 171-184.
- [8] NGUYEN T, SHERRATT P J, PICKETT C B. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003, 43: 233-260.

- [9] WAKABAYASHI N, DINKOVA-KOSTOVA A T, HOLTZCLAW W D, et al. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response; fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101 (7) : 2040-2045.
- [10] ZIPPER L M, MULCAHY R T. The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (39) : 36544-36552.
- [11] FAHEY J W, HARISTOY X, DOLAN P M, et al. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo [a] pyrene-induced stomach tumors [J]. *PNAS*, 2002, 99 (11) : 7610-7615.
- [12] RAMOS-GOMEZ M, DOLAN P M, ITOH K, et al. Interactive effects of nrf2 genotype and oltipraz on benzo[a]pyrene-DNA adducts and tumor yield in mice [J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24 (3) : 461-467.
- [13] SINGH A, MISRA V, THIMMULAPPA R K, et al. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer [J]. *PLoS Med*, 2006, 3 (10) : e420.
- [14] PADMANABHAN B, TONG K I, OHTA T, et al. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer [J]. *Mol Cell*, 2006, 21 (5) : 689-700.
- [15] XIN Ai, TANG Xiu-wen (辛爱, 唐修文). The role of Nrf2-ARE signal pathway in tumorigenesis and drug resistance [J]. *Chinese Journal of Cell Biology* (细胞生物学杂志), 2009, 31 (3) : 319-324. (in Chinese)
- [16] BROWN S L, SEKHAR K R, RACHAKONDA G, et al. Activating transcription factor 3 is a novel repressor of the nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2 (Nrf2)-regulated stress pathway [J]. *Cancer Res*, 2008, 68 (2) : 364-368.
- [17] WANG X J, HAYES J D, HENDERSON C J, et al. Identification of retinoic acid as an inhibitor of transcription factor Nrf2 through activation of retinoic acid receptor alpha [J]. *PNAS*, 2007, 104 (49) : 19589-19594.
- [18] FARAONIO R, VERGARA P, DI MARZO D, et al. p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (52) : 39776-39784.
- [19] MACLEOD A K, MCMAHON M, PLUMMER S M, et al. Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes: demonstration that the KEAP1-NRF2 pathway, and not the BACH1-NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds [J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30 (9) : 1571-1580.
- [20] ZHU M, FAHL W E. Development of a green fluorescent protein microplate assay for the screening of chemopreventive agents [J]. *Anal Biochem*, 2000, 287 (2) : 210-217.
- [21] WANG X J, HAYES J D, WOLF C R. Generation of a stable antioxidant response element-driven reporter gene cell line and its use to show redox-dependent activation of nrf2 by cancer chemotherapeutic agents [J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (22) : 10983-10994.
- [22] XIN Ai, REN Huan-yu TANG Xiu-wen (辛爱, 任环宇, 唐修文). Down-regulation of Nrf2 enhances the cytotoxicity of Oxaliplatin to H460 cells [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences* (浙江大学学报: 医学版), 2010, 39 (1) : 11-16. (in Chinese)
- [23] QU Li-yan, GAO Peng, WANG Hong-yan, et al (曲丽艳, 高鹏, 王洪燕, 等). Nrf2 down-regulated cell line H460-N5 with Keap1 over-expression increased sensitivity to anti-cancer drug [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences* (浙江大学学报: 医学版), 2010, 39 (1) : 6-10. (in Chinese)
- [24] LAU A, VILLENEUVE N F, SUN Z, et al. Dual roles of Nrf2 in cancer [J]. *Pharmacol Res*, 2008, 58 (5-6) : 262-270.
- [25] HAYES J D, MCMAHON M. NRF2 and KEAP1 mutations; permanent activation of an adaptive response in cancer [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2009, 34 (4) : 176-188.

[责任编辑 黄晓花]