

综述

RelA/p65磷酸化：驱动癌症进展的关键修饰

曹 硕, 孙许涛, 吴思雨, 毛彩云, 宋运佳*

(黑龙江中医药大学基础医学院, 哈尔滨 150000)

摘要: p65磷酸化是NF- κ B信号通路的重要调控机制, 广泛参与了细胞增殖、凋亡、炎症和免疫应答等多种生理病理的调控。p65磷酸化能够诱导多种与癌症相关的基因表达, 同时通过影响细胞存活与凋亡来影响癌症的进展。在癌症中, NF- κ B通路通常异常激活, 尤其是p65磷酸化还影响了肿瘤环境中的炎症, 进一步推动癌症进展。因此, p65磷酸化被认为是多个癌症类型中的潜在治疗靶点, 通过影响其活性有望阻止肿瘤的生长和扩散。

关键词: RelA/p65; 磷酸化; 癌症; NF- κ B

Phosphorylation of RelA/p65: a crucial modification driving cancer progression

CAO Shuo, SUN Xutao, WU Siyu, MAO Caiyun, SONG Yunjia*

(School of Basic Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150000, China)

Abstract: Phosphorylation of p65 serves as a critical regulatory mechanism in the NF- κ B signaling pathway, playing a significant role in the regulation of various physiological and pathological processes including cell proliferation, apoptosis, inflammation, and immune responses. Phosphorylation of p65 can induce the expression of genes associated with cancer and impact cell survival and apoptosis, thus influencing cancer progression. Aberrant activation of the NF- κ B pathway, particularly phosphorylation of p65, is commonly observed in cancer, affecting inflammation within the tumor microenvironment and further driving cancer progression. Therefore, phosphorylation of p65 is considered a potential therapeutic target in various types of cancer, with the potential to inhibit tumor growth and metastasis by modulating its activity.

Key Words: RelA/p65; phosphorylation; cancer; NF- κ B

核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)蛋白家族是一类关键的转录调节因子, 存在于大多数细胞类型的细胞质中, 通过调节靶基因表达的方式在多种生理和病理活动中发挥调控作用, 如炎症和免疫反应、细胞增殖和分化以及肿瘤等^[1,2]。哺乳动物NF- κ B家族包括5个成员, 分别为p65(NF- κ B3/RelA)、p105/p50(NF- κ B1)、p100/p52(NF- κ B2)、

RelB和c-Rel。其中, p65和p50依赖的位于各自氨基末端附近的Rel同源结构域(Rel homology domain, RHD)形成的异源二聚体, 是NF- κ B最普遍也是目前被研究得最多的形式^[3,4]。p65蛋白的RHD对识别p65所调控基因的特定DNA序列具有至关重要的作用, 与p65蛋白羧基末端的转录激活结构域(transactivation domain, TAD)一起参与p65靶基因的

收稿日期: 2024-09-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(82205056); 黑龙江省自然科学基金优秀青年基金项目(YQ2022H020)

第一作者: E-mail: csapril1999@163.com

*通信作者: E-mail: songyunjia666@126.com

调控,当调控异常时会导致癌症等多种疾病发生^[5]。

1 p65的磷酸化

p65的翻译后修饰可精细调控NF- κ B的转录激活功能,并在相关疾病的发生和发展过程中发挥重要作用。目前的研究多集中于p65的磷酸化修饰及相关的各种激酶,涉及整个通路的信号传递过程。p65磷酸化的异常能直接导致NF- κ B的整个通路信号传递异常,进而引起相关疾病的发生。因此,其调控失常与多种恶性疾病发生密切相关。在目前的临床应用中,p65磷酸化已经是克感利咽口服液、栀子苷以及黄芩苷等药物治疗的重要靶点^[6-8]。

p65含有多个结构域。RHD结构域位于第19-306位氨基酸,呈 β 筒样二级结构,是Rel家族的标志。晶体衍射技术发现,RHD结构域包含N末端结构域、DNA结合结构域、二聚体结构域、NF- κ B抑制蛋白(inhibitor of NF- κ B, I κ B)结合位点以及核定位序列(nuclear localization sequence, NLS)亚结构^[9]。TAD结构域位于第428-551位氨基酸,主要负责p65的转录活性调节。TAD是一个富含酸性氨基酸的两性结构域,包含了TA1和TA2两个亚结构域。TA1位于靠近C末端第520-549位氨基酸。TA2位于第429-520位氨基酸,存在于NLS和TA1之间。上述不同部分共同构成p65,对NF- κ B通路进行精准和复杂的调控^[10]。

1.1 p65的磷酸化位点研究

p65磷酸化是NF- κ B翻译后修饰研究领域关注的重点。目前已经在p65上鉴定到了18个丝氨酸和5个苏氨酸的磷酸化位点以及多个相关的激酶。这些位点的磷酸化会导致p65的转录水平增加或降低,进而导致NF- κ B通路被激活或抑制。同时,还发现多种刺激物能从不同通路激活p65的磷酸化修饰,为响应这些刺激信号,胞质和细胞核中的p65在活化与非活化之间转化,从而改变自身定位和生物功能。总之,p65磷酸化在NF- κ B活性调控中发挥着重要的作用(表1)。

1.1.1 RHD内的磷酸化位点

位于RHD结构域内的丝氨酸S276是第1个被发现的p65磷酸化位点,可由多种激酶介导。首个发现也是目前研究最充分的一种主要的p65磷酸化激酶是蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)的催化亚基

PKAc。Zhong等^[11]证明,PKAc通过非共价作用与NF- κ B-I κ B复合物中的I κ B- α 和I κ B- β 结合而维持非活化状态,当受到NF- κ B激活剂如LPS的诱导时I κ B降解,导致与之结合的PKAc非cAMP依赖性激活以及随后的p65 S276磷酸化。值得注意的是,只有这种来自NF- κ B-I κ B复合物的PKAc所介导的磷酸化才能有效提高NF- κ B的转录活性,同时,其核易位以及与DNA的结合不受影响。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)刺激单核细胞时PKAc也会磷酸化p65的S276残基,但该过程是氧化应激依赖性的,具体表现为在没有活性氧(reactive oxygen species, ROS)存在的情况下,NF- κ B转录活性降低。同样的,NF- κ B核易位和与DNA的结合不受影响。这有助于确定在炎症性疾病中调控NF- κ B的新的机制^[12]。除PKAc外,丝裂原应激相关激酶1(mitogen-and stress-activated kinase 1, MSK1)也以ROS依赖性方式磷酸化p65^[13]。在TNF- α 处理的小鼠成纤维细胞中,细胞核内NF- κ B p65的S276被MSK1磷酸化,以增强NF- κ B的转录活性,但ROS清除可以阻碍MSK1与p65之间的相互作用^[13,14]。此外,在人MDA-MB-231细胞中,紫外线诱导的p65的反式激活主要依赖于MSK2而不是MSK1在p65 S276位点的磷酸化,该蛋白激酶通过正向调控NF- κ B活性促进细胞存活^[15]。需要说明的是,PKAc在胞质中磷酸化该位点,而MSK1/2介导的磷酸化发生在细胞核中。

丝氨酸/苏氨酸激酶Pim-1与肿瘤发生的控制有关,S276在TNF- α 刺激下能快速被Pim-1磷酸化,从而抵抗细胞因子信号抑制剂1(suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1)依赖性泛素化及随后的降解。并且Pim-1诱导的p65 S276磷酸化有助于稳定和激活p65并且可保护细胞免受TNF- α 诱导的凋亡^[16]。Wang等^[17]发现,Pim-1抑制剂SMI-4a预处理可降低细胞核中的p65上调和LPS诱导的S276磷酸化水平,这是SMI-4a抑制巨噬细胞产生细胞因子的原因,提示S276激酶途径可能成为LPS诱导的急性肺损伤的潜在治疗靶点。幽门螺杆菌J99先前未表征的促炎蛋白JHP940又称为细胞易位激酶A(cell translocating kinase A, CtkA),也是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。CtkA具有细胞易位活性,能够易位到HeLa细胞中并以激酶依赖性方式上调NF- κ B活性,高度保

表 1 p65中磷酸化位点与其相关功能和疾病总结

磷酸化位点	激酶	功能影响	相关疾病
S276	PKAc	增强NF-κB转录活性, 不改变核易位和DNA结合	头颈部鳞状细胞癌
S276	MSK1/2	增强NF-κB转录活性, 磷酸化位置在细胞核	—
S276	Pim-1	增强NF-κB转录活性, 减少细胞凋亡	急性肺损伤
S276	CtkA	增强NF-κB转录活性	人上皮细胞癌
S276	RSK p90	增强NF-κB转录活性	结肠癌
S276	PKCα	增强NF-κB转录活性, 调节单核细胞存活	—
T254	Pin1	增强NF-κB转录活性	肝细胞癌
T254	GSK-3α、GSK-3β	增强NF-κB转录活性	侏儒症
S205	—	可能为其他磷酸化反应所必需	—
S131、T136、S238、 S261、S269、S472	—	—	—
S42、S45	—	抑制NF-κB转录活性	—
S536	IKKα/β	增强NF-κB转录活性, 改变构象影响其他蛋白结合	—
S536	TBK1/IKKε	增强NF-κB转录活性	—
S536	ILK	增强NF-κB转录活性	胃癌
S536	RSK1	增强NF-κB下游基因的转录表达	血管炎症
S536	CDK6	直接调节胞质溶胶和细胞核中的p65磷酸化	胸腺和脾脏淋巴瘤
S536	GSK-3β	增强NF-κB转录活性	肺腺癌
S536	IRAK/CaMK II	增强NF-κB转录活性	—
S536	CK1α	增强NF-κB转录活性	淋巴样恶性肿瘤
S536	CK1γ1	抑制NF-κB转录活性和下游促炎因子的产生	炎症
S535	CaMKIV	增强NF-κB转录活性和抗凋亡基因表达	—
S547	ATM	抑制NF-κB转录活性	—
S529	CK II	增强NF-κB转录活性	—
T505	CHK1	抑制NF-κB转录活性, 促进细胞凋亡	肝细胞癌
S468	GSK-3β	抑制/增强NF-κB转录激活功能	肺腺癌
S468	IKKε	增强NF-κB转录活性	—
S468	IKKβ	抑制NF-κB转录活性	—
T435	—	增强NF-κB依赖性基因的表达	血管源性水肿
T464	PKG	促进p65与PGC-1α相互作用	肝脏脂肪变性
S311	PKCζ	增强NF-κB转录活性, 激活下游基因	肝细胞癌
S316	CKI	增强NF-κB转录活性, 细胞增殖	肺炎
T308	PKC	—	—

“—” 表示未知

守的S276残基磷酸化后触发p65的构象变化, 引起增强转录激活因子p300/CBP的募集, 最终使p65的转录活性增强。这种调控作用的发现将有助于理解幽门螺杆菌感染时炎症的发生机制: 高度保守的S276残基磷酸化后触发p65的构象变化, 引起增强转录激活因子p300/CBP的募集, 最终使p65的转录活性增强^[18]。因此, 甘查尔酮A^[19]等抗炎物通过抑制S276磷酸化来阻止p65亚基与p300/CBP的相互

作用可导致NF-κB反式激活减少, 从而发挥抗炎效果。

另外, 还有其他一些激酶能催化p65 S276磷酸化, 如核糖体S6激酶(ribosomal S6 kinase, RSK) p90和蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)。RSK p90是HT-29结肠上皮细胞中ERK1/2的下游靶激酶, 能够介导蛋白酶活化受体(protease-activated receptors, PARs)磷酸化p65。PAR1和PAR2的激活会诱导

RSK1和RSK2的核易位,抑制RSK1降低了PAR2但没有降低PAR1诱导的p65磷酸化;同样,RSK2的抑制仅阻断了PAR1诱导的p65磷酸化。不过,PAR激活后是以不依赖ERK的方式减少转录抑制因子组蛋白去乙酰化酶2(histone deacetylase 2, HDAC2)与p65的结合,继而增加NF- κ B的转录活性^[20],这对于炎症性肠病和结肠癌具有重要的临床意义。PKC的常规亚型PKC α 是NF- κ B的上游激活因子。在人和小鼠的巨噬细胞中,巨噬细胞集落刺激因子诱导PKC α 激活并依赖S276磷酸化,最终提高NF- κ B的转录活性以及调节单核细胞存活^[21]。

除了丝氨酸,RHD内的苏氨酸磷酸化位点T254也可因应答TNF刺激而被磷酸化修饰,修饰后生成的磷酸化Thr254-Pro基序能够募集肽基脯氨酰异构酶1(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1, Pin1),Pin1会阻碍p65与I κ B α 相互作用并增加其稳定性,导致p65的核积累和增强转录激活功能,这是通过阻断SOCS-1对p65的泛素化和其泛素化介导的蛋白质水解来实现的^[22]。脂肪酸合成酶抑制NF- κ B活性,不是通过调节p65基因的转录来调节p65表达,而是通过控制p65在T254位点而不是S536位点的磷酸化来调节其稳定性^[23]。此外,糖原合成酶激酶-3(glycogen synthase kinase 3, GSK-3)包括GSK-3 α 和GSK-3 β ,也被证实能够磷酸化p65的T254位点,而且这对于软骨细胞的早期发育至关重要,GSK-3 α 和GSK-3 β 敲除的小鼠的p65磷酸化被抑制,表现出明显的软骨细胞分化损伤和侏儒症^[24]。

Anrather等^[25]研究发现,p65上存在多重磷酸化并且不同丝氨酸残基的磷酸化程度存在差异,其中S205是磷酸化程度最高的位点,表明205位的丝氨酸磷酸化可能是发生其他磷酸化反应所必需的。同时,因为其他位点的磷酸化弥补,单个磷酸丝氨酸损失不影响p65整体的DNA结合活性。报告基因实验也显示,单一位点突变不足以完全失活p65,某个位点的突变只对某些特异刺激有影响,这暗示了p65上多个位点的差异磷酸化可能是其靶向特定基因亚群从而特异性响应不同细胞信号的原因。在此基础上,Lanucara等^[26]利用鸟枪法和靶向质谱策略的组合来定义SK-N-AS神经母细胞瘤细胞中内源性p65响应TNF- α 刺激时的磷酸化时

间动力学,并在p65上鉴定出多个磷酸化位点,包括7个此前未被描述过的新位点(S42、S131、T136、S238、S261、S269和S472)。其中,由PKA诱导的S45和S238以及由IKK β 诱导的T136、TS131和S311在p65的异二聚体伴侣p50存在时磷酸化水平显著增加,但继续添加I κ B α 后又显著降低。这说明稳态环境时NF- κ B-I κ B复合物中p65的多个可用的磷酸化位点受到I κ B的掩蔽或在与I κ B结合后构象变化使位点的可及性降低,表明不同p65二聚体可能受到差异调控从而产生功能特异性。此外,S42和S45的磷酸化通过降低p65与DNA的结合对p65转录产生负面影响。

1.1.2 TAD内的磷酸化位点

位于p65反式激活域的TA1亚域的S536被广泛研究,可受到多种激酶的作用发生磷酸化并影响下游的生物学功能。Sakurai等^[27]通过体外激酶实验首次发现了p65的S536位磷酸化修饰,利用免疫共沉淀的方法获得了此修饰的2种激酶——IKK α 与IKK β ,并发现该位点的磷酸化可能是通过改变p65的构象而影响与其他蛋白质的结合,进而增强转录。TANK结合激酶1(TANK binding kinase 1, TBK1)是IKK ϵ 的同源物,在酶学上彼此相似,并且都需要在它们的激活环中磷酸化一个关键的丝氨酸来维持激酶活性,被鉴定为p65 S536激酶^[28],并且IKK ϵ 和TBK1可能对p65的S536磷酸化的构成水平有显著影响^[29]。

整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)是一种普遍表达且高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,与癌症发生进展有关。虽然ILK不参与LPS诱导的经典NF- κ B信号通路,但却介导S536磷酸化p65响应LPS来作为NF- κ B信号转导的替代激活途径。幽门螺杆菌是一种与胃炎、消化性溃疡和胃癌等疾病密切相关的细菌。ILK在幽门螺杆菌感染的巨噬细胞和胃癌细胞中,通过p65 S536位点的磷酸化,调节了NF- κ B信号通路的激活,进而影响了TNF- α 的产生^[30]。DNA损伤剂类抗癌药物多柔比星和依托泊苷刺激Saos-2-Tet-On-p53细胞后,通过抑癌因子p53参与MEK1/RSK1通路上调,激活的RSK1激酶从细胞质进入细胞核中对p65的S536进行磷酸化修饰,最终减少NF- κ B/I κ B α 复合体的核质穿梭、促进NF- κ B与同源kappaB增强子的结合以

及更强地激活NF- κ B下游相关基因的转录表达^[31]。研究发现, 血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 也能增加RSK激酶的活性, Ang II 通过Ras/MEK1/ERK/RSK信号通路增加了血管平滑肌细胞中p65 S536位点的磷酸化。这种磷酸化是时间和Ang II 浓度依赖性的。Ang II 诱导的NF- κ B激活及随后的促炎因子如白介素-6(interleukin 6, IL-6)的产生是其引起血管炎症的原因^[32]。细胞周期蛋白依赖性激酶6(cyclin-dependent kinases 6, CDK6)是CCD2相关激酶家族的成员, 在人类肿瘤中通常异常表达或激活。Buss等^[33]发现, CDK6能直接调节胞质溶胶和细胞核中的p65磷酸化, 并将其鉴定为一种S536特异性NF- κ B激酶。在E μ -v-cyclin转基因小鼠模型中, CDK6水平、S536的磷酸化水平、NF- κ B活性以及胸腺和脾脏淋巴瘤形成均增加, 提示CDK6可能通过NF- κ B促进肿瘤形成。此外, 在一项对肺腺癌的研究中发现, 在17 β -雌二醇(E2)激活的雌激素受体ER α 表达细胞中, p65表现出更快的S468和S536磷酸化, 增强了NF- κ B活性。LiCl作为GSK-3 β 的拮抗剂, 可消除E2增强的TNF α 触发的p65的S468磷酸化, 但增加了S536的磷酸化, 这种增加表现为S536位点磷酸化与总p65蛋白比例的增高, 这可能与核内外的信号传递相关^[34]。酪蛋白激酶的一个家族成员CK1 α (Casein kinase 1 alpha)在套细胞淋巴瘤中高表达^[35], 并且通过调节B细胞受体相关信号通路, 特别是p65 S536的磷酸化来影响NF- κ B信号通路的激活, 进而维持细胞的生存和增殖。这表明CK1 α 在NF- κ B信号通路中起着上游调控的作用, 影响p65的磷酸化状态。

EB病毒潜伏感染整合膜蛋白1(latent infection membrane protein 1, LMP1)能通过白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)受体相关激酶(IL-1 receptor-associated kinase, IRAK1)来诱导p65 S536磷酸化, 但IRAK1的激酶活性不是LMP1诱导的NF- κ B激活所必需的, 因此IRAK1被提议作为支架蛋白来募集p65 S536激酶以增强NF- κ B依赖性转录活性, 在LMP1诱导的NF- κ B激活途径中, IRAK1与钙调蛋白依赖性激酶 II (CaM kinases II, CaMK II) 相互作用并介导CaMK II 激活, 激活的CaMK II 可以在细胞质中磷酸化S536位点来激活NF- κ B, 从而参与EBV向增殖淋巴母细胞的转化过程^[36]。虽然绝大

多数研究数据显示, p65 S536位磷酸化后会对转录起到激活作用, 但也有少量文献表明磷酸化的p65 S536是NF- κ B通路的负调控因子, 通过抑制NF- κ B信号传导来防止有害炎症^[37,38]。具体地说, 酪蛋白激酶1家族成员CK1 γ 1通过S536磷酸化抑制NF- κ B转录活性和下游促炎因子的产生, 从而抑制被RNA病毒如仙台病毒激活的视黄酸诱导基因 I 信号通路及其介导的抗病毒反应, 起到负调控先天免疫的作用^[38]。

p65磷酸化是可逆的, 即磷酸化的p65可以在去磷酸化酶的作用下发生去磷酸化。由于p65的去磷酸化是恢复NF- κ B的正常响应能力的关键步骤, 其能在刺激物移除或靶基因表达后结束NF- κ B信号, 所以p65的去磷酸化在NF- κ B转录激活的调控中也扮演着重要角色。Chew等^[39]通过基因组规模的siRNA筛查证明, 去磷酸化酶WIP1能将S536去磷酸化, 以此降低p65与p300的相互作用, 发挥对NF- κ B的负调控作用。同样的方法也将蛋白磷酸酶2A鉴定为p65去磷酸化酶, 其特异性地使S536去磷酸化并抑制NF- κ B的转录活性^[40,41]。此外, 一种由牙龈卟啉单胞菌分泌的卤酸脱卤酶家族丝氨酸磷酸酶(phosphoserine aminotransferase)SerB, 可以特异性去磷酸化牙龈上皮细胞中p65的S536。SerB能够与p65结合并与其共定位在细胞质中, 促进其去磷酸化, 抑制TNF- α 激活的上皮细胞p65核转运, 进而调控炎症途径, 并抑制黏膜表面的固有免疫^[42]。

与S536相邻的S535残基可以被钙调蛋白依赖性激酶IV(CaM kinases IV, CaMKIV)磷酸化, 并且活性CaMKIV与野生型p65的共表达可以导致依托泊苷诱导的细胞凋亡恢复和细胞Bcl-2蛋白增加, 表明CaMKIV磷酸化NF- κ B p65在S535上增加了NF- κ B靶基因表达, 包括抗凋亡基因Bcl-2, 从而抑制细胞凋亡^[43]。依托泊苷类的药物会引起DNA双链断裂(double strands break, DSB), 当细胞内发生这样的DNA损伤时, DNA损伤应答信号通路被激活。该通路中的ATM(Ataxia telangiectasia mutated, 一种DSB形成时介导DNA损伤反应的核激酶)通过其N端与p65结合并特异性磷酸化p65的S547位点, 继而促进其与HDAC1的相互作用但不影响与DNA的结合, 最终下调NF- κ B下游基因的转录^[44]。此外,

在邻近TA2亚域的TA1亚域内的S529能被CK II 磷酸化, 而I κ B α 与p65的结合抑制了这种修饰。当I κ B α 降解后, CK II 通过磷酸化p65的S529位点, 增强NF- κ B的转录活性, 进而影响细胞生长^[45]。另一研究发现, NF- κ B通路会随年龄增长失调, 与年轻人相比, 老年人单核细胞核中的NF- κ B水平更高, 这种差异可能与p65 S529的磷酸化有关^[46]。

TA2亚域内的T505位点也可发生磷酸化。ARF作为肿瘤抑制因子是细胞防御癌基因激活的核心成分。CHK1是一种被ATR(ATM- and Rad3-related)激活的下游激酶, 可由激酶介导的ARF诱导而磷酸化, 在ARF诱导的细胞中, T505修饰的p65主要位于细胞核^[47]。其他诱导剂不能激活其磷酸化, 表明ARF诱导的接头蛋白可能也需要将CHK1靶向特定的底物。ARF对ATR激酶和CHK1的激活在机制和功能上与DNA损伤后的激活不同。当抗癌药顺铂处理后细胞发生DNA损伤, T505的磷酸化可导致NF- κ B靶基因*Bcl-xL*的转录抑制, 并诱导促凋亡基因*NOXA*^[48]。除凋亡外, T505的磷酸化还对许多细胞过程产生负调控, 如自噬、增殖和细胞迁移, 表明磷酸化T505会抑制NF- κ B活性和致癌性, 对于p65的肿瘤抑制活性是重要的^[48]。CHK1抑制剂是处于临床试验中的新型癌症疗法, CHK1对T505位点的磷酸化是ATR有效激活CHK1所必需的, 从而驱动对ATR/CHK1信号通路的依赖, 这是癌细胞在高水平DNA复制应激下生存所必需的, p65 T505磷酸化位点的突变会破坏DNA复制应激反应, 导致CHK1抑制剂耐药性^[49]。

S468位点位于TA2结构域内, 能被GSK-3 β 、IKK ϵ 和IKK β 等激酶磷酸化, 修饰后的p65主要发挥调控NF- κ B的转录激活的作用。在未受刺激的HeLa细胞核中, GSK-3 β 磷酸化p65的S468位点, 并抑制NF- κ B的转录激活功能, 以使其维持在基本活性范围内^[50]。而在应答协同刺激的T细胞中, IKK ϵ 能够在细胞核内直接磷酸化p65的S468位点, 并增强下游基因转录^[28]。当应答TNF- α 和IL-1 β 等刺激时, IKK β 能在多种细胞的细胞质中磷酸化p65的S468位点, 该反应发生在I κ B-p65复合物内, 从而阻止NF- κ B入核^[51]。上述S468位点磷酸化后所表现出的多种活性进一步说明了p65翻译后修饰调控的复杂性。

T435也位于TAD的TA2内, TNF- α 刺激诱导, 可降低p65与HDAC1的相互作用, 并选择性增强NF- κ B依赖性基因的表达^[52]。Yeh等^[53]在研究MEK/ERK信号通路如何增强顺铂诱导的NF- κ B激活中发现, 蛋白磷酸酶4对T435去磷酸化修饰, 能增强顺铂诱导的NF- κ B转录活性, 造成细胞抗药性的下降和顺铂抗肿瘤效果的上升, 因此在响应顺铂刺激时p65 T435的磷酸化会导致p65转录激活受到抑制。Kim等^[54]在探讨癫痫持续状态在梨状皮层中所引发的严重血管源性水肿时, 发现伴有SMI-71表达的内皮细胞中p65 T435的磷酸化增加。通过可溶性TNF p55受体(sTNFp55R)输注中和TNF- α , 抑制内皮细胞中的p65 T435磷酸化, 可以减轻癫痫所诱导的血管源性水肿和神经元损伤。Zhou等^[55]通过突变实验发现, p65的T464残基对线粒体调控至关重要。抵抗素通过PKC激活PKG进而磷酸化T464来激活p65, 促进p65与PGC-1 α 的相互作用。这种相互作用使PGC-1 α 失活, 减少线粒体含量并诱导肝脏脂肪变性。

1.1.3 其他区域内磷酸化位点

位于p65 TAD与RHD的连接处的磷酸化位点不多, 目前发现的有S311、S316以及T308三个。Duran等^[56]通过对基因敲除小鼠的研究发现, 蛋白激酶C ζ (protein kinase C ζ , PKC ζ)能特异性诱导p65 S311磷酸化以响应TNF刺激, 且该位点的磷酸化对于NF- κ B募集p300/CBP、激活下游*IL-6*基因的转录起重要作用。一项对肺炎研究的实验结果显示, 敲除PKC ζ 基因的小鼠暴露于香烟烟雾和LPS后的肺炎症状比野生型小鼠轻, 这是因为PKC ζ 可使p65 S311磷酸化, 进而激活NF- κ B, 敲除PKC ζ 减少了炎症的发生^[57]。Wang等^[58]通过质谱分析表明, p65经IL-1 β 处理后在S316被磷酸化, p65 S316被磷酸化会导致NF- κ B转录激活和细胞增殖。荧光素酶测定显示, CKI抑制剂D4476显著降低了IL-1 β 过表达细胞处理的293C6细胞的NF- κ B诱导活性, 但对S316位点突变过表达的细胞无明显影响, 表明CKI是磷酸化p65中S316的激酶, S316的突变会引起NF- κ B的激活和细胞生长减少^[58]。p65 T308可以在磷酸酶抑制剂calyculin A处理下被磷酸化。同时, Ma等^[59]搜索了p65序列的蛋白基序数据库Scansite, PKC被认为是唯一假定的激酶靶向。

2 p65磷酸化与癌症的相关研究

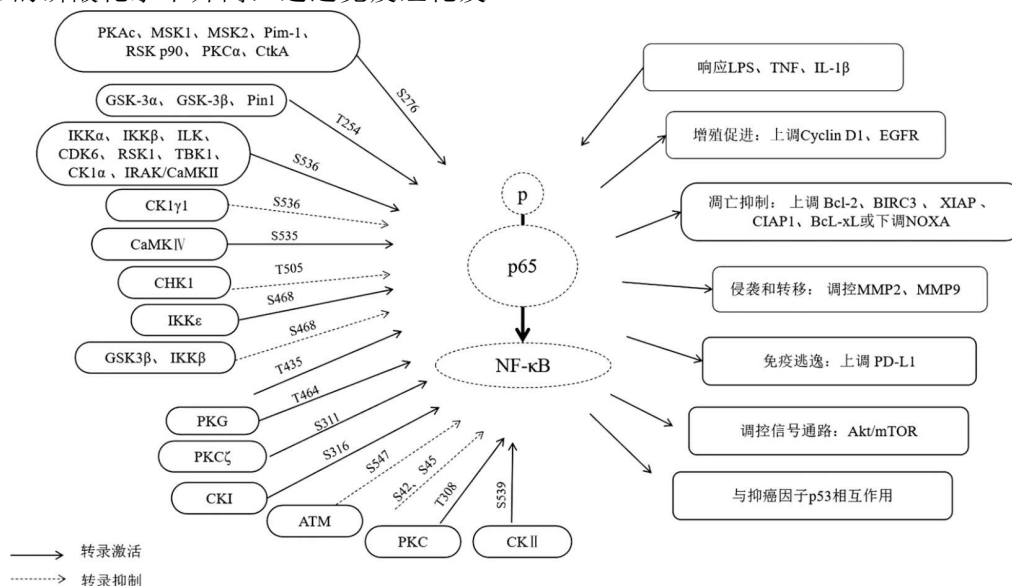
p65作为NF- κ B复合体的主要亚基, 其磷酸化修饰对癌症的形成和发展具有关键作用。p65磷酸化促进了NF- κ B依赖性炎症因子的表达, 如IL-6和IL-1 β 。这些因子不仅能增强癌症相关慢性炎症, 还能刺激癌细胞增殖及周围细胞的癌变; p65磷酸化还可以激活*Bcl-2*、*XIAP*等抗凋亡相关基因表达, 从而抑制细胞凋亡; 同时激活下游基因, 如*Cyclin D1*和*MMP9*, 促进细胞周期调控和肿瘤侵袭; 还能调控Akt/mTOR、MEK1/MSK1/p-p65(S276)等多条信号通路, 直接影响其在肿瘤细胞增殖、凋亡抑制、炎症及肿瘤微环境调节中的功能(图1)。

在众多癌症中, p65与肝癌和肺癌的关系研究广泛, 且均是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一, 所以其具有代表性, 其机制研究对临床治疗具有直接影响。本章节使用肝癌和肺癌最常见的亚型进行讨论。

2.1 p65磷酸化与肝细胞癌

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是肝癌的最常见类型, 是全球癌症相关死亡的常见原因。尽管多学科治疗有所改善, 但晚期肝细胞癌的预后仍有较大的进步空间。研究发现, 与正常肝细胞相比, 在肝细胞癌SMMC7721细胞中p65表达更高^[60]。Jiang等^[61]研究发现, HCC患者肝癌组织中p65的磷酸化水平升高, 通过免疫组化发

现, HCC患者的肝癌组织中S276和S536的磷酸化水平比非癌组织高。Xu等^[62]研究表明, 被炎症介导的抑制蛋白1(Arrestin beta 1, ARRB1)可以增强p65的活性, 并促进其磷酸化, 原因是ARRB1通过与p65结合促进其在S536位点的磷酸化, 驱动肝细胞的恶性增殖。p65在S536位点的磷酸化还会激活ARRB1启动子和Akt/mTOR信号转导, 与肝癌的发生发展密切相关。Zuo等^[63]的最新研究发现, 在中晚期HCC组织中, NF- κ B p65高表达, 而p65 S536的磷酸化水平表达不高。体内实验表明p65 S536的磷酸化模拟突变体(p65/S536D)可以阻止肿瘤进展和转移。p65 S536磷酸化抑制了NF- κ B p65的核转移, 并减少了*Bcl-2*、PCNA、Ki67抗凋亡因子和细胞增殖相关因子的表达, 以促进细胞凋亡, 通过降低与上皮-间充质转化相关的标记物以及MMP2和MMP9的表达实现抑制细胞迁移和侵袭。S536在不同的HCC研究中表达水平不同, 可能与所用不同模型背后的致瘤机制及不同的肿瘤时期有关。Chen等^[64]研究表明, 在HCC和正常肝组织中, 表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)和肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白3(A20) mRNA的表达水平之间存在显著的正相关性, 表明EGFR信号通路可能影响肝脏中A20的表达, 使用MSK1抑制剂H89预处理细胞可以抑制p65在S276位点的磷酸化, 并降低A20蛋白水平, 表明EGFR可能通过



图片展示了p65磷酸化的激酶及其特定位点(左侧)以及p65磷酸化在癌症发生发展中涉及的主要机制(右侧)

图1 p65磷酸化的激酶、位点及其驱动癌症的机制示意图

MEK1/MSK1/p-p65(S276)信号通路促进A20的表达,并且这种表达可能与肝癌的发展有关。

Moles等^[65]通过创建p65 T505A突变的敲入小鼠模型,探究了T505位点磷酸化在体内对NF- κ B功能的影响。研究发现,部分肝切除或四氯化碳(CCl₄)诱导肝损伤后的T505A小鼠表现出异常的肝细胞增殖。这种异常增殖与p65的T505位点在DNA复制应激或某些DNA损伤剂(如顺铂)处理后被Chk1激酶磷酸化有关。磷酸化后的p65 T505导致NF- κ B活性受到抑制,限制了肝细胞的异常增殖和DNA损伤反应,进而对肝脏的再生和癌症发展产生重要影响。Shu等^[66]研究发现,异油酸碱通过损害PP2A/I2PP2A相互作用和刺激PP2A依赖性S536位点被去磷酸化,从而抑制NF- κ B并导致HCC细胞凋亡。

p65磷酸化除了影响细胞凋亡和增殖,还可以促进炎症微环境的形成,导致肝细胞癌的发生和进展。Pin1在与p65中的磷酸化Thr254-Pro基序结合后,可诱导p65中S276基序的磷酸化,以介导其与DNA结合,敲除Pin1可显著抑制p65磷酸化中T254和S276的表达,从而降低HepG2细胞中NF- κ B的活性,从而抑制HCC肿瘤的进展^[67]。

2.2 p65磷酸化与肺腺癌

肺癌是近年来年全球第二大最常见的癌症,其中非小细胞肺癌是最常见的肺癌类型,约占所有肺癌病例的85%,而肺腺癌是最常见的非小细胞肺癌亚型,约占40%^[68]。p65磷酸化在肺腺癌中被证明具有重要的功能调节作用。

E2通过ER α 促进肺腺癌细胞增殖和肿瘤生长,E2增加了表达ER α 的细胞中TNF- α 受体表达和TNF- α 触发的NF- κ B活性,此过程中发现GSK-3 β 增强了TNF- α 诱导的核p65在S468和S536残基的磷酸化,尤其是S468磷酸化,促进了NF- κ B的转录激活,表明GSK-3 β 在E2/TNF- α 信号串扰中发挥作用,E2通过ER α 促进肺腺癌细胞增殖和肿瘤生长^[34]。砷尽管有毒,但它也被用作治疗某些疾病的药物。砷诱导的BRWD3下调抑制肺腺癌细胞增殖并通过p53和p65通路诱导细胞凋亡,这是因为BRWD3敲低会导致p65、S276和S536的磷酸化及其下游抗凋亡基因BIRC3、XIAP和CIAP1的下调^[69]。砷诱导的BRWD3下调可能对肺腺癌治疗具有潜在意义。这些结论表明,p65磷酸化在肺腺癌中通常升高,且

其活化与癌细胞增殖、抗凋亡相关。

2.3 p65磷酸化与其他癌症疾病

NF- κ B是一种关键的转录因子,能够控制多种细胞功能,p65作为其亚基,其磷酸化能增强NF- κ B的转录活性,导致下游基因的表达发生改变。因此,p65磷酸化与多种癌症相关。

APOBEC1互补因子(APOBEC1 complementation factor, A1CF)能够促进肾癌细胞增殖、抑制细胞凋亡。这与A1CF抑制p65 S536磷酸化有关。p65 S536磷酸化下调导致其在细胞核内的积累减少,进而导致NF- κ B下游靶基因IFN- β 的表达在转录水平和蛋白质水平下调^[70]。同时,该研究还发现,肾癌组织中A1CF表达高,p65 S536磷酸化表达下降^[70]。

Zhang等^[71]在中药方剂黄连解毒汤对口腔鳞状细胞癌细胞系的抗肿瘤研究中发现,黄连解毒汤特异性抑制S468位点的磷酸化,这可能是其具有抗肿瘤功能的原因之一。

实验发现,重组CtkA能显著增强人上皮细胞癌中p65 S276的磷酸化但不直接磷酸化p65亚基,可能通过NF- κ B上游元件间接发挥作用^[18]。PKA抑制剂H-89^[72]及姜黄素类似物UBS109^[73]可以通过抑制PKAc下调p65 S276的磷酸化,进而抑制头颈部鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma, SCC)的生长,提示S276激酶途径可能是治疗头颈部SCC的潜在靶点。

Ma等^[74]研究ZCL-082这种含硼化合物,发现其可以靶向RSK1并抑制p65在S536位点的磷酸化来抑制NF- κ B信号通路,从而在体外和体内达到抑制淋巴瘤细胞增殖的作用。

PAK5(p21-activated kinase 5)是一种PAK家族的蛋白激酶,具有多种生物学功能,在细胞信号传导中扮演着重要角色。PAK5通过促进p65的磷酸化和核内转移来促进乳腺癌细胞的增殖。PAK5的过表达增加了p65在细胞核中的分布,而PAK5的沉默则减少了p65在细胞核中的分布。p65的激活可以通过直接结合到Cyclin D1的启动子上来增加其蛋白质表达,从而促进乳腺癌细胞的增殖^[75]。Chen等^[76]合成了一系列三聚氰菊糖苷B衍生物,其中化合物7和13a能够结合IKK β ,抑制p65的磷酸化以及p65的核转移,最终通过调控NF- κ B下游与转移、凋亡和细胞周期相关的基因表达,发挥抑制乳腺

癌生长的作用。

Song等^[77]研究表明, G蛋白偶联受体C类组5成员A(G protein-coupled receptor class C group 5 member A, GPRC5A)在大多数非小细胞肺癌中被抑制。这是因为p65与视黄酸受体 α/β (retinoic acid receptor α/β , RAR α/β)复合并被募集到GPRC5A启动子处的RA反应元件位点, 导致RNA聚合酶II复合破坏并抑制转录, 在此过程中, 若S276位点突变抑制结果则不会产生, p65 S276位点的磷酸化是与RAR α/β 相互作用和抑制GPRC5A所必需的。

Hong等^[78]通过PCR检测显示, 黑色素瘤细胞和组织中lnc-PKNOX1-1显著降低。而lnc-PKNOX1-1上调可降低黑色素瘤中IL-8表达并促进p65在S536位点的磷酸化, p65 S536的磷酸化能够促进黑色素瘤细胞的增殖、迁移和侵袭, 表明lnc-PKNOX1-1通过调节IL-8和p65磷酸化抑制黑色素瘤的发展。

3 p65磷酸化与其他修饰相互作用

p65的功能受到多种翻译后修饰的精细调控, 包括磷酸化、乙酰化、甲基化和泛素化等。其中, 磷酸化是最常见且研究最深入的修饰之一, 但通常不会单独发挥作用, 而是与其他修饰相互协同或相互拮抗, 构建了一个动态且复杂的调控网络, 精确控制NF- κ B通路的活性和功能。

3.1 磷酸化与乙酰化

p65的磷酸化和乙酰化之间的关系密不可分, 表现为p65不同位点的磷酸化能增强K310的乙酰化。Yao等^[79]研究发现, 在下腔静脉狭窄术后1天, 磷酸化p65和乙酰化p65的蛋白质表达分别上调了185.4%和92.4%, 表明磷酸化和乙酰化协同发挥作用。S536位点的磷酸化是p65在K310位点乙酰化的先决条件^[80]。p65的T435位点磷酸化能减弱其与HDAC1的结合, HDAC1募集减少使p65的乙酰化水平增加^[52]。此外, TNF- α 诱导p65在S311位点的磷酸化抑制了HDAC5介导的p65 K310的去乙酰化, 阻碍HDAC5-p65相互作用并促进*PD-L1*转录, 来促进NF- κ B的激活^[81]。以上研究证明, p65磷酸化对其乙酰化有重要作用。

3.2 磷酸化与泛素化

泛素化与磷酸化修饰之间存在交互作用。三基

序蛋白21(Trim21)是一种E3泛素蛋白连接酶, *Trim21*敲低会减轻角质形成细胞炎症^[82]。Trim21与胞质溶胶中的p65共定位, 并通过赖氨酸63(K63)键物理结合和泛素化p65。Trim21增强了p65与I κ B激酶的相互作用, 从而促进了磷酸化p65、核转运和下游基因激活, 这可能是Trim21局部应用显著改善了咪喹莫特诱导的银屑病样病变的原因。

在CK1 γ 1存在下, p65和CUL2之间的相互作用明显增强, CK1 γ 1介导的p65在S536位点的磷酸化通过E3泛素连接酶CUL2和COMMD1促进p65泛素化降解, 从而抑制NF- κ B转录活性和下游信号通路, 最终对RIG-1信号介导的先天免疫进行负调节^[38]。

3.3 磷酸化与其他修饰的关系

除了乙酰化和泛素化, 磷酸化还可以与甲基化协同作用, 与糖基化和小泛素相关修饰化(small ubiquitin-like modifier, SUMO)拮抗作用。磷酸化与什么修饰类型起到什么作用, 取决于修饰位点、细胞类型及微环境等多种因素。

p65中K310位点的单甲基化可以被组蛋白甲基转移酶GLP的锚蛋白重复序列识别, 该序列在基础条件下通过GLP介导的组蛋白H3K9二甲基化降低p65靶基因染色质的开放状态。PKC ζ 通过磷酸化p65的S311, 阻断GLP与p65 K310单甲基化的结合, 减弱对靶基因的抑制^[83]。Silva等^[84]使用Thiamet-G(ThG)处理的小鼠肠系膜动脉中的糖基化水平有所增加, 这与p65 S536磷酸化减少相关联。LPS处理的小鼠显示出糖基化修饰的NF- κ B p65亚单位的减少, 而经ThG处理的小鼠中未观察到这种减少, p65磷酸化降低可能解释了ThG治疗的抗炎作用。HCC患者癌组织中的p-p65水平升高, 并且SUMO1表达存在类似现象, 而SUMO2/3无此现象。进一步的临床数据显示, SUMO1与p65的磷酸化水平呈正相关, 表明SUMO1相关的SUMO化p65和S276磷酸化p65均增加了肝癌细胞的活力和侵袭性, 这可以降低肝癌细胞的凋亡^[61]。

4 总结与展望

磷酸化是p65最重要的翻译后修饰方式。本文总结了多个已知的磷酸化位点, 包括S276、S536、S468等18个丝氨酸和5个苏氨酸, 不同位点的磷酸化能够影响NF- κ B在核内的转录活性、DNA结合能

力和其对靶基因的调控效果。

p65的磷酸化与多种癌症相关,比较常见的有肝癌与肺癌等。p65磷酸化后会促进NF- κ B转录因子的活化,进而促进一系列与炎症、抗凋亡、细胞增殖和肿瘤进展相关的基因表达。这是癌症中p65的磷酸化发挥作用的核心机制。p65的磷酸化对癌症发展的调节作用是复杂和多样的,这不仅取决于磷酸化位点,还受其他细胞内外等多种因素的影响。同时,磷酸化还与其他修饰动态的相互作用,对生理和病理过程共同产生深远影响。p65的磷酸化在很多癌症中是促进肿瘤发生发展的因素,但并不是所有的癌症都会表现出p65水平的升高。

p65的磷酸化在癌症的发生、发展和治疗中具有重要意义,进一步研究其机制有助于开发新的抗癌策略。由于p65磷酸化在癌症中的重要作用,它成为一个潜在的治疗靶点,深入了解p65磷酸化及其特异性修饰途径,不仅有助于全面揭示NF- κ B的复杂功能与调控机制,还能为相关疾病的具体模型提供理论基础。这些研究将为基于肿瘤特定基因靶向精准治疗开辟新路径,推动抗肿瘤治疗的个性化与高效化进程。

作者贡献声明:

曹 硕:拟定写作思路,撰写文章并修改,绘制图表并定稿;

孙许涛:协助文章设计,文献收集与整理,论文撰写与修改;

吴思雨、毛彩云:文献收集与整理,论文撰写与修改;

宋运佳:文章的整体设计和目标设定,提出了研究的主要问题和方法,论文撰写。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1] Alharbi KS, Afzal O, almalki WH, et al. Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) inhibition as a therapeutic target for plant nutraceuticals in mitigating inflammatory lung diseases. *Chem Biol Interact*, 2022, 354: 109842
- [2] Sharma V, Chaudhary AA, Bawari S, et al. Unraveling cancer progression pathways and phytochemical therapeutic strategies for its management. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1414790
- [3] Msweli S, Pakala SB, Syed K. NF- κ B transcription factors: their distribution, family expansion, structural conservation, and evolution in animals. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(18): 9793
- [4] Deka K, Li Y. Transcriptional regulation during aberrant activation of NF- κ B signalling in cancer. *Cells*, 2023, 12(5): 788
- [5] Leeman JR, Weniger MA, Barth TF, et al. Deletion analysis and alternative splicing define a transactivation inhibitory domain in human oncoprotein REL. *Oncogene*, 2008, 27(53): 6770-6781
- [6] Zhang X, Sun CY, Zhang YB, et al. Kegan Liyan oral liquid ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through inhibition of TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway and MMP-9 expression. *J Ethnopharmacol*, 2016, 186: 91-102
- [7] Feng J, Guo C, Zhu Y, et al. Baicalin down regulates the expression of TLR4 and NF- κ B-p65 in colon tissue in mice with colitis induced by dextran sulfate sodium. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(11): 4063-4072
- [8] Shi Q, Cao J, Fang L, et al. Geniposide suppresses LPS-induced nitric oxide, PGE2 and inflammatory cytokine by downregulating NF- κ B, MAPK and AP-1 signaling pathways in macrophages. *Int Immunopharmacol*, 2014, 20(2): 298-306
- [9] Malek S, Huang DB, Huxford T, et al. X-ray crystal structure of an I κ B β -NF- κ B p65 homodimer complex. *J Biol Chem*, 2003, 278(25): 23094-23100
- [10] Ngo KA, Kishimoto K, Davis-Turak J, et al. Dissecting the regulatory strategies of NF- κ B related target genes in the inflammatory response reveals differential transactivation logics. *Cell Rep*, 2020, 30(8): 2758-2775
- [11] Zhong H, Suyang H, Erdjument-Bromage H, et al. The transcriptional activity of NF- κ B is regulated by the I κ B-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell*, 1997, 89(3): 413-424
- [12] Jamaluddin M, Wang S, Boldogh I, et al. TNF- α -induced NF- κ B/RelA Ser276 phosphorylation and enhanceosome formation is mediated by an ROS-dependent PKAc pathway. *Cell Signal*, 2007, 19(7): 1419-1433
- [13] Xue Y, Li C, Deng S, et al. 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1 selectively modulates ROS-responsive NF- κ B targets through recruitment of MSK1 and phosphorylation of RelA/p65 at Ser276. *J Biol Chem*, 2023, 299(11): 105308
- [14] Vermeulen L. Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J*, 2003, 22(6): 1313-1324
- [15] Jacks KA, Koch CA. Differential regulation of mitogen-

- and stress-activated protein kinase-1 and -2 (MSK1 and MSK2) by CK2 following UV radiation. *J Biol Chem*, 2010, 285(3): 1661-1670
- [16] Nihira K, Ando Y, Yamaguchi T, et al. Pim-1 controls NF- κ B signalling by stabilizing RelA/p65. *Cell Death Differ*, 2010, 17(4): 689-698
- [17] Wang J, Cao Y, Liu Y, et al. PIM1 inhibitor SMI-4a attenuated lipopolysaccharide-induced acute lung injury through suppressing macrophage inflammatory responses via modulating p65 phosphorylation. *Int Immunopharmacol*, 2019, 73: 568-574
- [18] Kim DJ, Park KS, Kim JH, et al. *Helicobacter pylori* proinflammatory protein up-regulates NF- κ B as a cell-translocating Ser/Thr kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(50): 21418-21423
- [19] Furusawa J, Funakoshi-Tago M, Tago K, et al. Licochalcone A significantly suppresses LPS signaling pathway through the inhibition of NF- κ B p65 phosphorylation at serine 276. *Cell Signal*, 2009, 21(5): 778-785
- [20] Wang H, Moreau F, Hirota CL, et al. Proteinase-activated receptors induce interleukin-8 expression by intestinal epithelial cells through ERK/RSK90 activation and histone acetylation. *FASEB J*, 2010, 24(6): 1971-1980
- [21] Wang Y, Mo X, Piper MG, et al. M-CSF induces monocyte survival by activating NF- κ B p65 phosphorylation at Ser276 via protein kinase C. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28081
- [22] Ryo A, Suizu F, Yoshida Y, et al. Regulation of NF- κ B signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol Cell*, 2003, 12(6): 1413-1426
- [23] Barlow L, Josephraj S, Gu B, et al. FASN negatively regulates p65 expression by reducing its stability via Thr254 phosphorylation and isomerization by Pin1. *J Lipid Res*, 2024, 65(4): 100529
- [24] Itoh S, Saito T, Hirata M, et al. GSK-3 α and GSK-3 β proteins are involved in early stages of chondrocyte differentiation with functional redundancy through RelA protein phosphorylation. *J Biol Chem*, 2012, 287(35): 29227-29236
- [25] Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. cis-acting element-specific transcriptional activity of differentially phosphorylated nuclear factor- κ B. *J Biol Chem*, 2005, 280(1): 244-252
- [26] Lanucara F, Lam C, Mann J, et al. Dynamic phosphorylation of RelA on Ser42 and Ser45 in response to TNF α stimulation regulates DNA binding and transcription. *Open Biol*, 2016, 6(7): 160055
- [27] Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, et al. I κ B kinases phosphorylate NF- κ B p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem*, 1999, 274(43): 30353-30356
- [28] Mattioli I, Geng H, Sebald A, et al. Inducible phosphorylation of NF- κ B p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK ϵ . *J Biol Chem*, 2006, 281(10): 6175-6183
- [29] Adli M, Baldwin AS. IKK-i/IKK ϵ controls constitutive, cancer cell-associated NF- κ B activity via regulation of Ser-536 p65/RelA phosphorylation. *J Biol Chem*, 2006, 281(37): 26976-26984
- [30] Ahmed AU, Sarvestani ST, Gantier MP, et al. Integrin-linked kinase modulates lipopolysaccharide- and helicobacter pylori-induced nuclear factor κ B-activated tumor necrosis factor- α production via regulation of p65 Serine 536 phosphorylation. *J Biol Chem*, 2014, 289(40): 27776-27793
- [31] Bohuslav J, Chen L, Kwon H, et al. p53 Induces NF- κ B activation by an I κ B kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *J Biol Chem*, 2004, 279(25): 26115-26125
- [32] Zhang L, Ma Y, Zhang J, et al. A new cellular signaling mechanism for angiotensin II activation of NF- κ B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(6): 1148-1153
- [33] Buss H, Handschick K, Jurrmann N, et al. Cyclin-dependent kinase 6 phosphorylates NF- κ B P65 at serine 536 and contributes to the regulation of inflammatory gene expression. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51847
- [34] Cheng LC, Lin CJ, Chen PY, et al. ER α -dependent estrogen-TNF α signaling crosstalk increases cisplatin tolerance and migration of lung adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta*, 2021, 1864(8): 194715
- [35] Manni S, Fregnani A, Quotti Tubi L, et al. Protein kinase CK1 α sustains B cell receptor signaling in mantle cell lymphoma. *Front Oncol*, 2021, 11: 733848
- [36] Kim JE, Kim SY, Lim SY, et al. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II-IRAK1 interaction in LMP1-induced NF- κ B activation. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(3): 325-334
- [37] Pradère JP, Hernandez C, Koppe C, et al. Negative regulation of NF- κ B p65 activity by serine 536 phosphorylation. *Sci Signal*, 2016, 9(442):
- [38] Wang Y, Hu L, Tong X, et al. Casein kinase 1 γ 1 inhibits the RIG-I/TLR signaling pathway through phosphorylating p65 and promoting its degradation. *J Immunol*, 2014, 192(4): 1855-1861
- [39] Chew J, Biswas S, Shreeram S, et al. WIP1 phosphatase is a negative regulator of NF- κ B signalling. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(5): 659-666
- [40] Li S, Wang L, Berman MA, et al. RNAi screen in mouse astrocytes identifies phosphatases that regulate NF- κ B signaling. *Mol Cell*, 2006, 24(4): 497-509

- [41] Yang J, Fan GH, Wadzinski BE, et al. Protein phosphatase 2A interacts with and directly dephosphorylates RelA. *J Biol Chem*, 2001, 276(51): 47828-47833
- [42] Takeuchi H, Hirano T, Whitmore SE, et al. The serine phosphatase SerB of porphyromonas gingivalis suppresses IL-8 production by dephosphorylation of NF- κ B RelA/p65. *PLoS Pathog*, 2013, 9(4): e1003326
- [43] Soon Bae J, Kyoo Jang M, Hong SH, et al. Phosphorylation of NF- κ B by calmodulin-dependent kinase IV activates anti-apoptotic gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305(4): 1094-1098
- [44] Sabatel H, Di Valentin E, Gloire G, et al. Phosphorylation of p65(RelA) on Ser547 by ATM represses NF- κ B-dependent transcription of specific genes after genotoxic stress. *PLoS ONE*, 2012, 7(6): e38246
- [45] Wang D, Westerheide SD, Hanson JL, et al. Tumor necrosis factor α -induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J Biol Chem*, 2000, 275(42): 32592-32597
- [46] Tavenier J, Rasmussen LJH, Houlind MB, et al. Alterations of monocyte NF- κ B p65/RelA signaling in a cohort of older medical patients, age-matched controls, and healthy young adults. *Immun Ageing*, 2020, 17(1): 25
- [47] Rocha S, Garrett MD, Campbell KJ, et al. Regulation of NF- κ B and p53 through activation of ATR and Chk1 by the ARF tumour suppressor. *EMBO J*, 2005, 24(6): 1157-1169
- [48] Msaki A, Sánchez AM, Koh LF, et al. The role of RelA (p65) threonine 505 phosphorylation in the regulation of cell growth, survival, and migration. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(17): 3032-3040
- [49] Hunter JE, Campbell AE, Butterworth JA, et al. Mutation of the RelA(p65) Thr505 phosphosite disrupts the DNA replication stress response leading to CHK1 inhibitor resistance. *Biochem J*, 2022, 479(19): 2087-2113
- [50] Buss H, Dörrie A, Schmitz ML, et al. Phosphorylation of serine 468 by GSK-3 β negatively regulates basal p65 NF- κ B activity. *J Biol Chem*, 2004, 279(48): 49571-49574
- [51] Schwabe RF, Sakurai H. IKK β phosphorylates p65 at S468 in transactivation domain 2. *FASEB J*, 2005, 19(12): 1758-1760
- [52] O'Shea JM, Perkins ND. Thr435 phosphorylation regulates RelA (p65) NF- κ B subunit transactivation. *Biochem J*, 2010, 426(3): 345-354
- [53] Yeh PY, Yeh KH, Chuang SE, et al. Suppression of MEK/ERK signaling pathway enhances cisplatin-induced NF- κ B activation by protein phosphatase 4-mediated NF- κ B p65 Thr dephosphorylation. *J Biol Chem*, 2004, 279(25): 26143-26148
- [54] Kim JE, Ryu HJ, Choi SY, et al. Tumor necrosis factor- α mediated threonine 435 phosphorylation of p65 nuclear factor- κ B subunit in endothelial cells induces vasogenic edema and neutrophil infiltration in the rat piriform cortex following status epilepticus. *J Neuroinflamm*, 2012, 9(1): 6
- [55] Zhou L, Yu X, Meng Q, et al. Resistin reduces mitochondria and induces hepatic steatosis in mice by the protein kinase C/protein kinase G/p65/PPAR gamma coactivator 1 alpha pathway. *Hepatology*, 2013, 57(4): 1384-1393
- [56] Duran A. Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by PKC in NF- κ B transcriptional activation. *EMBO J*, 2003, 22(15): 3910-3918
- [57] Yao H, Hwang J, Moscat J, et al. Protein kinase C ζ mediates cigarette Smoke/Aldehyde- and lipopolysaccharide-induced lung inflammation and histone modifications. *J Biol Chem*, 2010, 285(8): 5405-5416
- [58] Wang B, Wei H, Prabhu L, et al. Role of novel serine 316 phosphorylation of the p65 subunit of NF- κ B in differential gene regulation. *J Biol Chem*, 2015, 290(33): 20336-20347
- [59] Ma Z, Chalkley RJ, Vosseller K. Hyper-O-GlcNAcylation activates nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) signaling through interplay with phosphorylation and acetylation. *J Biol Chem*, 2017, 292(22): 9150-9163
- [60] Wang J, Huang Q, Chen M. The role of NF- κ B in hepatocellular carcinoma cell. *Chin Med J (Engl)*, 2003, 116(5): 747-752
- [61] Jiang C, Zhang C, Dai M, et al. Interplay between SUMO1-related SUMOylation and phosphorylation of p65 promotes hepatocellular carcinoma progression. *Biochim Biophys Acta*, 2024, 1871(1): 119595
- [62] Xu X, Lei Y, Chen L, et al. Phosphorylation of NF- κ Bp65 drives inflammation-mediated hepatocellular carcinogenesis and is a novel therapeutic target. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 253
- [63] Zuo W, Ma H, Bi J, et al. Phosphorylation of RelA/p65 Ser536 inhibits the progression and metastasis of hepatocellular carcinoma by mediating cytoplasmic retention of NF- κ B p65. *Gastroenterol Rep*, 2024, 12: goae094
- [64] Chen H, Wu X, Zhou H, et al. Epidermal growth factor upregulates the expression of A20 in hepatic cells via the MEK1/MSK1/p-p65 (Ser276) signaling pathway. *Am J Transl Res*, 2021, 13(2): 708-718
- [65] Moles A, Butterworth JA, Sanchez A, et al. A RelA(p65) Thr505 phospho-site mutation reveals an important mechanism regulating NF- κ B-dependent liver regeneration and cancer. *Oncogene*, 2016, 35(35): 4623-4632
- [66] Shu G, Zhang L, Jiang S, et al. Isoliensinine induces

- dephosphorylation of NF- κ B p65 subunit at Ser536 via a PP2A-dependent mechanism in hepatocellular carcinoma cells: roles of impairing PP2A/I2PP2A interaction. *Oncotarget*, 2016, 7(26): 40285-40296
- [67] Shinoda K, Kuboki S, Shimizu H, et al. Pin1 facilitates NF- κ B activation and promotes tumour progression in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, 2015, 113(9): 1323-1331
- [68] Shi J, Hua X, Zhu B, et al. Somatic genomics and clinical features of lung adenocarcinoma: a retrospective study. *PLoS Med*, 2016, 13(12): e1002162
- [69] Zhu Y, Xiao M, Zhao R, et al. Arsenic-induced down-regulation of BRWD3 suppresses proliferation and induces apoptosis in lung adenocarcinoma cells through the p53 and p65 pathways. *Hum Exp Toxicol*, 2024, 43: 9603271241279166
- [70] Liu Y, Yang J, Weng D, et al. A1CF binding to the p65 interaction site on NKRF decreased IFN- β expression and p65 phosphorylation (Ser536) in renal carcinoma cells. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(7): 3576
- [71] Zhang L, Ling Z, Hu Z, et al. Huanglianjiedu Decoction as an effective treatment for oral squamous cell carcinoma based on network pharmacology and experimental validation. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 553
- [72] Arun P, Brown MS, Ehsanian R, et al. Nuclear NF- κ B p65 phosphorylation at serine 276 by protein kinase a contributes to the malignant phenotype of head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(19): 5974-5984
- [73] Zhu S, Moore T, Morii N, et al. Synthetic curcumin analog UBS109 inhibits the growth of head and neck squamous cell carcinoma xenografts. *Curr Cancer Drug Targets*, 2014, 14(4): 380-393
- [74] Ma C, Liu M, Zhang J, et al. ZCL-082, a boron-containing compound, induces apoptosis of non-Hodgkin's lymphoma via targeting p90 ribosomal S6 kinase 1/NF- κ B signaling pathway. *Chem Biol Interact*, 2022, 351: 109770
- [75] Zhang YC, Huo FC, Wei LL, et al. PAK5-mediated phosphorylation and nuclear translocation of NF- κ B-p65 promotes breast cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 146
- [76] Chen T, Chen X, Liu L, et al. Synthesis of melampomagnolide B derivatives as potential anti-triple negative breast cancer agents. *Eur J Med Chem*, 2024, 264: 116024
- [77] Song H, Ye X, Liao Y, et al. NF- κ B represses retinoic acid receptor-mediated GPRC5A transactivation in lung epithelial cells to promote neoplasia. *JCI Insight*, 2023, 8(1): e153976
- [78] Hong A, Cao M, Li D, et al. Lnc-PKNOX1-1 inhibits tumor progression in cutaneous malignant melanoma by regulating NF- κ B/IL-8 axis. *Carcinogenesis*, 2023, 44(12): 871-883
- [79] Yao X, Chen W, Liu J, et al. Deep vein thrombosis is modulated by inflammation regulated via sirtuin 1/NF- κ B signalling pathway in a rat model. *Thromb Haemost*, 2019, 119(3): 421-430
- [80] Rajendrasozhan S, Chung S, Sundar IK, et al. Targeted disruption of NF- κ B1 (p50) augments cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema in mice: a critical role of p50 in chromatin remodeling. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 298(2): L197-L209
- [81] Zhou Y, Jin X, Yu H, et al. HDAC5 modulates PD-L1 expression and cancer immunity via p65 deacetylation in pancreatic cancer. *Theranostics*, 2022, 12(5): 2080-2094
- [82] Yang L, Zhang T, Zhang C, et al. Upregulated E3 ligase tripartite motif - containing protein 21 in psoriatic epidermis ubiquitylates nuclear factor - κ B p65 subunit and promotes inflammation in keratinocytes*. *Br J Dermatol*, 2021, 184(1): 111-122
- [83] Levy D, Kuo AJ, Chang Y, et al. Lysine methylation of the NF- κ B subunit RelA by SETD6 couples activity of the histone methyltransferase GLP at chromatin to tonic repression of NF- κ B signaling. *Nat Immunol*, 2011, 12(1): 29-36
- [84] Silva JF, Olivon VC, Mestriner FLAC, et al. Acute increase in O-GlcNAc improves survival in mice with LPS-Induced systemic inflammatory response syndrome. *Front Physiol*, 2019, 10: 1614