

Keap1-Nrf2/ARE 信号通路的抗氧化应激作用及其调控机制

胡流芳, 王 迎, 任汝静, 霍海如, 孙建辉, 李洪梅, 朱亚英, 谭余庆*

[摘要] Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Keap1)-核因子E2相关因子2(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE)信号通路是细胞氧化应激反应中的关键通路,其调控的下游Ⅱ相代谢酶和抗氧化蛋白/酶在细胞防御保护中发挥重要作用,也是近几年抗氧化研究领域的热点。本文从基本结构(包括Nrf2、Keap1及ARE三者的结构)、抗氧化应激作用(包括Keap1-Nrf2/ARE信号通路的基本功能及其信号通路调控的下游靶蛋白)、调控机制(包括Nrf2与Keap1的解偶联、Nrf2的降解减弱机制、门闩和枢纽学说及其他机制)等3方面就Keap1-Nrf2/ARE信号通路的抗氧化应激作用及其调控机制进行综述。

[关键词] Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白-1; 核因子E2相关因子2; 抗氧化反应元件; 氧化应激; 调控机制

[中图分类号] R34-33

[文献标志码] A

[文章编号] 1674-0440(2016)01-0146-08

DOI: 10.13220/j.cnki.jjpr.2016.01.022

Anti-oxidative stress actions and regulation mechanisms of Keap1-Nrf2/ARE signal pathway

HU Liu-fang, WANG Ying, REN Ru-jing, HUO Hai-ru, SUN Jian-hui, LI Hong-mei, ZHU Ya-ying, TAN Yu-qing*

(Center for Evaluation of Safety, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100029, China)

[Abstract] The epoxy chloropropane Kelch sample related protein-1(Keap1)-nuclear factor erythroid-2 related factor (Nrf2)/antioxidant response element(ARE) signal pathway is of critical importance in cellular antioxidant response. The induction of downstream phase Ⅱ metabolic enzymes and antioxidant protein/enzyme offers cellular protection under oxidative stress. Research of Nrf2 protein has gained much attention in recent years. This article reviews Keap1-Nrf2/ARE signal pathway in three perspectives: the basic structure including the structure of Nrf2, Keap1 and ARE, their involvement in anti-oxidative actions including the basic function of Keap1-Nrf2/ARE signal pathway and the downstream activation of phase Ⅱ metabolic enzymes and antioxidant protein/enzyme, as well as their regulation mechanisms, such as decoupling, degradation, the latch and the hinge.

[Key words] epoxy chloropropane Kelch sample related protein-1; nuclear factor erythroid-2 related factor 2; antioxidant response element; oxidative stress; regulation mechanism

氧化应激(oxidative stress)是指机体在遭受各种有害刺激时,体内高活性分子如活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)自由基产生过多,氧化程度超出氧化物清除能力,氧化系统和抗氧化系统动态失衡,从而导致组织损伤^[1]。研究表明,机体内氧化还原水平失衡是众多疾病的病理生理基础,近年来新发现的机体内源性抗氧化信号通路:Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白-1(epoxy chloropropane Kelch sample related protein-1, Keap1)-核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应

元件(antioxidant response element, ARE)信号通路,由于可抵抗内外界氧化和化学物质等刺激导致的氧化应激反应,在机体应对各种外来损伤的防御中起着非常重要的作用,因此被认为是机体内最重要的内源性抗氧化信号通路,也是近几年抗氧化研究领域的热点^[2]。本文就Keap1-Nrf2/ARE信号通路的抗氧化应激作用及其调控机制进行综述。

1 Keap1-Nrf2/ARE 信号通路的基本结构

1.1 Nrf2的结构

Nrf2蛋白相对分子质量为 6.6×10^4 ,位于2q31位

作者简介:胡流芳,女,在读硕士研究生,研究方向:中药药理学, E-mail:caems2014@163.com

作者单位:100029,北京,中国中医科学院中药研究所中药安全评价中心(胡流芳,王 迎,任汝静,霍海如,孙建辉,李洪梅,朱亚英,谭余庆)

*通讯作者:谭余庆,男,研究员,研究方向:中药药理学, E-mail:tanyq@263.net

点,属于Cap-n-Collar(CNC)调节蛋白家族,是具有高度保守的碱性亮氨酸拉链结构(basic leucine zipper, bZip)的转录因子,在未受诱导的正常细胞里,Nrf2的代谢是相当快的,半衰期($T_{1/2}$)只有10~30 min^[3]。除Nrf2外,该家族成员还包括核因子NF-E2(nuclear factor erythroid-2,NF-E2)、Nrf1、Nrf3、BTB-CNC异体同源体1(BTB and CNC homology1, Bach1)和BTB-CNC异体同源体2(BTB and CNC homology2, Bach2),尽管在DNA结合域和亮氨酸拉链域上有着高度同源性,却具有各自不同的生物学功能。

不同种属(如人、鼠和鸡等)的Nrf2基因均含有6个高度保守的环氧丙氨酸(epichlorohydrin, EHC)相关蛋白同源结构域(Nrf2-EHC homology, Neh),分别被命名为Neh1-6^[4-5](图1):①Neh1区含有一个C端bZip,bZip通过与细胞核内小Maf蛋白(small Maf proteins,包括MafG、MafK、MafF)形成异二聚体,使Nrf2能识别ARE并与之结合,从而启动目标基因转录^[6]。②Neh2区是Nrf2与Keap1的结合区,含有DLG和ETGE两个结合位点,Neh2区通过蛋白酶介导Nrf2降解而对Nrf2活性进行负性调节,与Nrf2的转录活性密切相关^[7]。③Neh3位于Nrf2的C端,与细胞转录活性密切相关^[8]。④Neh4和Neh5位于Neh1和Neh2之间,对Nrf2目标基因的转录活化起着重要作用。当Nrf2进入细胞核,以Nrf2-Maf的形式与ARE结合后并不能立即启动转录,尚需Neh4、Neh5与共激活因子cAMP反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)相互作用,才能启动转录过程^[9]。⑤Neh6区域是一段非Keap1依赖的富含丝氨酸的Nrf2降解调控区域,与Nrf2的负性调节有关^[10]。

1.2 Keap1的结构

Keap1蛋白相对分子质量为 6.9×10^4 ,位于19p13.2位点,是Kelch家族的一种多区域阻遏蛋白,主要存在于细胞质中,是Nrf2的胞浆抑制蛋白,正常情况下锚定于胞浆的肌动蛋白细胞骨架上^[11]。人类Keap1蛋白一级结构含有5个结构域(图1):①NTR区,N端区域。②BTB区,常形成二聚体结构,是Keap1与Cul3(Cillion 3)作用的区域,可介导Nrf2的泛素化及蛋白降解。当该区域的Cys151发生突变时,可使Keap1与Cul3的作用解离,导致Nrf2不被泛素化。③IVR区,该区域不仅富含半胱氨酸,而且含有Keap1活性最强的半胱氨酸残基,是整个蛋白的功能调节区,不但参与亲电试剂及氧化剂的反应,其Cys273和Cys288等半胱氨酸位点还与Nrf2的泛素化有关,在氧化应激条件下,这些位点被诱导剂所修饰降低

了Nrf2的泛素化。④DGR区,又称Kelch区,含有6个重复的Kelch区域形成经典的 β 螺旋结构,含有多个蛋白质结合位点,既是Keap1与Nrf2的Neh2区的结合位点,也是Keap1与胞浆肌动蛋白的结合位点。⑤CTR区,C端区域^[12]。

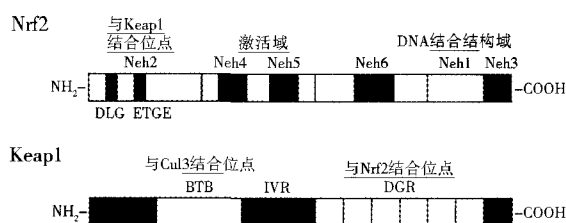


图1 Nrf2和Keap1的结构

1.3 ARE的结构

ARE是细胞保护蛋白的基因启动子区域的一段5'-TGACnnnGC-3'的核心保护序列,是机体重要的抗氧化反应元件,许多Ⅱ相代谢酶基因的5-启动区都含有ARE,这一序列能被多种氧化性和亲电性化合物激活。研究证实,Nrf2和Bach1均可与ARE结合,启动Ⅱ相代谢酶和抗氧化酶的基因表达,从而保护机体组织细胞的正常功能^[13]。

2 Keap1-Nrf2/ARE信号通路的抗氧化应激作用

Nrf2属于CNC调节蛋白家族,是具有碱性亮氨酸拉链结构的转录因子,广泛存在于机体各个器官,是细胞氧化还原反应的主控调节因子^[14]。正常生理情况下,Nrf2主要与其抑制剂Keap1结合,以其非活性状态存在于胞浆中,在泛素蛋白酶体途径作用下迅速降解,以保持生理状态下Nrf2的低转录活性^[15]。当细胞受到活性氧(ROS)或其他亲核剂刺激后,Nrf2与Keap1解偶联,活化的Nrf2转运进入细胞核,与Maf蛋白结合成异质二聚体后与ARE结合,激活靶基因表达,调控Ⅱ相代谢酶、抗氧化酶或药物转运体的转录活性,从而发挥抗氧化损伤作用^[16-17]。

2.1 Keap1-Nrf2/ARE信号通路的基本功能

Nrf2主要定位于代谢性解毒器官如肝、肾、肺及持续暴露在环境中的组织如皮肤等。目前Nrf2被认为是调节细胞对抗源性物质和氧化损伤的关键转录因子,但另一方面,学者们发现Nrf2的激活障碍或缺失均可增加细胞对应激原的敏感性,因此认为Nrf2在化学促癌、炎症修复进程延长及细胞凋亡等病变过程中同样也发挥了关键作用^[16-17]。

Keap1高表达于心骨骼肌等组织器官中,而低表达于脑、肺、肝、小肠、结肠、卵巢、睾丸及胎盘

等组织器官中。生理状态下,胞浆内的 Keap1 起着结合器的作用,通过含有 E3 的 Cul3 泛素连接酶与 Nrf2 结合在一起,Nrf2 作为目标被蛋白体酶降解。当氧化应激反应出现,Keap1 作为氧化还原反应的传感器,它末端敏感的半胱氨酸残基通过氧化还原反应产生高效分子(如亲电子试剂)而被修饰,导致其构象发生变化,从而使 Nrf2 解离,转入细胞核内,与 Maf 蛋白结合成异质二聚体后与 ARE 结合,激活靶基因表达,调控 II 相代谢酶、抗氧化酶或药物转运体的转录活性,从而发挥抗氧化损伤的作用,恢复细胞的稳态^[18-19]。随后,Keap1 进入细胞核内,与 Nrf2 一起出核并使 Nrf2 在胞浆内持续被蛋白体酶降解,Nrf2 水平下降,激活终止^[20]。

2.2 Keap1-Nrf2/ARE 信号通路调控的下游靶蛋白

Keap1-Nrf2/ARE 信号通路被激活后,可启动下游多种靶蛋白的表达。这些靶蛋白能在被激活后调节机体内氧化还原平衡,使机体从氧化应激状态恢复到正常的生理状态。Nrf2 结构的特异性,导致了其激动剂的多样性,同时伴随其下游靶蛋白的多样性。Nrf2 调控的下游靶蛋白目前已被证实分为 II 相代谢酶、抗氧化蛋白/酶、蛋白酶体/分子伴侣、抗炎因子以及 III 相代谢酶(即药物转运体)几类。目前醌氧化还原酶-1(NADPH:quinone oxidoreductase-1, NQO1)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)及 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -glutamylcysteine synthetase, γ -GCS)是 Nrf2 下游众多靶蛋白中最受关注,也是研究最多的抗氧化蛋白。

2.2.1 II 相代谢酶

II 相代谢酶是细胞在遭遇源性物质、致癌物等氧化应激损伤时或细胞毒性、基因突变、致癌性等可能性增加时发挥细胞保护作用的蛋白酶,又称 II 相解毒酶或 II 相抗氧化酶。进入体内的致癌物质、环境污染物等一般在体内要经历两相代谢过程。首先在 I 相代谢酶(如细胞色素 P450)的作用下,通过官能团反应转化成有活性的物质,从而对机体造成一定的损伤及危害。而 II 相代谢酶则可通过增加其亲水性,从而促使它们排出体外,避免了对机体的进一步危害^[21]。

Nrf2 信号通路调控的 II 相代谢酶主要包括谷胱甘肽-S 转移酶(glutathione S-transferases, GST)、NQO1、葡萄糖醛酸转移酶 1A6(UDP-glucuronyl transferase 1A6, UGT1A6)、黄曲霉素 B1 醛还原酶和微粒体环氧化物水解酶等。

NQO1 是真核生物细胞中普遍存在的一种黄素蛋白酶,含有 274 个氨基酸,具备抗氧化能力,它能借助 NADH 或 NADPH 作为电子供体,催化醌类及

其衍生物还原并使其毒性降解,从而阻止它们进一步参与氧化还原反应和产生 ROS,使细胞在各种代谢引起的氧化应激反应中得到保护^[22]。NQO1 与其他代谢酶一起在体内构成了代谢网以抵抗外来毒性物质,它在机体的解毒代谢中起重要作用^[23]。Kaspar 等^[24]研究显示,NQO1 为 Nrf2 的下游产物,Nrf2 的激活可刺激 NQO1 的表达。Liu 等^[25]研究结果也显示锌对庆大霉素引发的大鼠肝功能损伤时,NQO1 表达增加,且与 Nrf2 呈正相关性。Angeloni 等^[26]发现萝卜硫素可增加大鼠心肌细胞的基因转录,蛋白表达以及加强包括 NQO1 在内 II 相酶的活性,这些增长是时间-浓度依赖的。他们还发现 SFN 预处理能避免 H₂O₂ 氢诱导大鼠心肌细胞死亡,ROS 产生和 DNA 片段化。

2.2.2 抗氧化蛋白/酶

机体存在两类抗氧化系统,一类是酶抗氧化系统,包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)等;另一类是非酶抗氧化系统,包括麦角硫因、维生素 C、维生素 E、谷胱甘肽、褪黑素、 α -硫辛酸、类胡萝卜素、微量元素铜、锌、硒等^[1]。

Nrf2 信号通路调控的抗氧化蛋白/酶主要包括 HO-1、过氧化物酶-1、SOD、GSH-Px 和 γ -GCS 等。

HO-1 是血红素降解的限速酶,广泛分布于机体组织,主要位于滑面内质网中,可将血红素催化分解生成等摩尔数的 CO、胆红素和铁。迄今为止已发现有 3 种 HO 同工酶,分别为 HO-1、HO-2 和 HO-3。研究报道显示,HO-1 属于诱导型,应激、低氧、热休克、内毒素、细胞因子、血红素、重金属及氧化剂等多种因素均可诱导 HO-1 的表达和增强其酶的活性^[27]。HO-1 不仅在机体的生理状态下发挥作用,更主要是在机体应激状态或其他非正常状态下发挥重要作用。HO-1 发挥抗氧化作用主要与两方面有关:一方面 HO-1 阻止游离血红素参与氧化反应,另一方面 HO-1 可与其酶解产物 CO、胆红素一起共同发挥抗氧化、抗炎、扩张血管、改善组织微循环和抑制细胞凋亡等作用^[28]。如 HO-1/CO 系统就参与了机体众多生理和病理过程的调节,其中包括对炎症、胰岛素抵抗、糖尿病、肥胖以及肿瘤的抑制效应^[29]。对 HO-1 转基因小鼠研究发现,HO-1 基因敲除小鼠对氧化剂刺激的抵抗力明显较正常小鼠差,小鼠死亡率高,然而,HO-1 过表达的小鼠神经元对谷氨酸具有更高的耐受能力^[30]。通过不同途径诱导 HO-1 的表达或激活,可明显抑制氧化应激反应、炎症反应和肿瘤的生长。在对 Nrf2^{-/-}和野生型 SD 大鼠肝缺血再灌注

的研究中发现,当肝缺血 60 min 后再进行灌注时,野生型 SD 大鼠肝内的枯否氏细胞明显激活,肝、肾组织中 Nrf2 核转位明显增加,Nrf2 及 HO-1 在蛋白和 mRNA 水平明显增高,大鼠血清肌酐清除率明显降低;而 Nrf2^{-/-}SD 大鼠则未出现上述保护作用^[31]。在大鼠心脏中,结扎左冠状动脉前降支可诱导心肌 Nrf2 水平下降,而缺血预适应可通过促进 Nrf2 的核转运进而增加抗氧化因子 HO-1 的表达进而减少心肌氧化应激水平,保护缺血诱导的心肌损伤^[32]。

SOD 又称为肝蛋白、奥古蛋白,被认为是生物体中最重要的酶之一,是机体内氧自由基的头号杀手,被称为是人体内天然的垃圾清道夫。SOD 与人体生理病理以及各种疾病的发生发展都有着密切联系,具有抗炎、抗病毒、抗辐射、抗衰老等作用^[33]。有关 SOD 的研究一直是热点,并逐渐成为许多氧化应激引起的疾病的治疗靶点。SOD 是由金属辅酶与蛋白质构成的一种金属酶。因其金属辅酶的不同可分为 MnSOD、CuSOD 和 ZnSOD 等不同亚型。SOD 在体内以 3 种方式存在: SOD1,胞浆内的 CuSOD、ZnSOD; SOD2,线粒体内的 MnSOD; SOD3,细胞外的 MnSOD。3 种酶都可在不同位置通过歧化反应将超氧自由基转变为 H₂O₂ 和水,之后 GSH-Px 和 CAT 可再将 H₂O₂ 转化为水,从而保护细胞免受氧化应激损伤。研究证实,白藜芦醇通过激活 Nrf2,进而促进 SOD 的表达,从而可降低 H₂O₂ 刺激引起的大鼠肝原代细胞的氧化应激损伤^[34]。另外用 Nrf2 的特异性激活剂莱菔硫烷预处理后,可明显改善缺血/再灌注损伤大鼠的心脏左室舒张末压(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP)及左室形成压(left ventricular developed pressure, LVDP),而使用特异性抑制剂 5-HD 预处理后则出现了相反的作用^[31],这说明莱菔硫烷可能通过激活 Nrf2 下游的抗氧化蛋白的表达,从而对大鼠心脏缺血/再灌注损伤发挥着一定的保护作用。在其他的研究中同样发现 Nrf2 的激活可介导 SOD 蛋白表达,如紫柳黄酮通过激活磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)/Nrf2 信号通路,上调 SOD 蛋白表达抑制线粒体氧化应激反应^[35]。

γ -GCS 是体内还原型 GSH 合成的一种限速酶,由具有催化功能的重链亚单位(γ -GCS_h)和无催化活性但对 γ -GCS_h 的活性起调节作用的轻链亚单位(γ -GCS_l)组成的二聚体。增加 γ -GCS 的含量和活性不仅可促进 GSH 的合成且还可增强组织细胞的抗氧化应激能力。研究显示,外源性化学有毒物质和氧化应激产物(如 ROS)能促进 Nrf2 入核激活,从而

上调 γ -GCS 基因的表达^[36]。Nrf2^{+/-}小鼠给予吡唑喂养后,小鼠肝 GST、 γ -GCS 和 HO-1 蛋白表达明显上调,并明显减轻小鼠肝的氧化应激反应,但 Nrf2^{-/-}小鼠肝的氧化应激损伤明显加重,而无上述蛋白表达的上调^[37]。由此提示 γ -GCS 是 Nrf2 调控的下游靶基因。

2.2.3 蛋白酶体/分子伴侣 蛋白酶体是细胞调控特定蛋白和除去错误折叠蛋白的主要场所。蛋白酶体的降解途径在许多细胞进程,如基因表达调控、细胞周期、氧化应激反应中都起着重要的作用。包括热休克蛋白在内的分子伴侣家族主要是协助新生肽链折叠组装成有功能的蛋白质。26S 蛋白酶体主要包括 20S 核心颗粒,19S 调节颗粒和 11S 调节颗粒。Pickering 等^[38]研究发现在小鼠胚胎成纤维细胞中,转位入核的 Nrf2 与蛋白酶体 β 亚基的 ARE 或亲电反应元件(electrophile response element, E_pRE)区域相结合,以使 20S 蛋白酶体核心颗粒和 11S 蛋白酶体调节颗粒的表达量大幅度提高,从而降解氧化蛋白,应对细胞的氧化应激。Cullinan 等^[39]证明,在内质网应激条件下,未折叠蛋白或错误折叠蛋白会导致 PERK 应激通路的激活,而 Nrf2 作为 PERK 的底物之一被激活,从而上调分子伴侣蛋白的表达,促进蛋白的正确折叠;同时也解释了缺失 Nrf2 细胞比野生型细胞在错误蛋白刺激下更易死亡的原因。

2.2.4 抗炎因子 研究表明,Nrf2 在角叉菜胶诱导的炎症中起作用,它可上调细胞 HO-1 和抗氧化酶过氧化物还酶 1(peroxiredoxin 1, Prx1)的表达量^[40]。HO-1 作用于血红素分解的副产物有强有力的抗炎作用,可以选择性地抑制脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导的促炎因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1(interleukin-1, IL-1)和巨噬细胞炎症蛋白-1 β (macrophage inflammatory protein-1 β , MIP-1 β)的增加,同时增加 LPS 诱导的 IL-10 的表达。Kim 等^[41]指出,Nrf2 可通过 HO-1 等负性调控各种细胞因子(TNF- α 、IL-1 和 IL-6)、趋化因子、细胞黏附因子、基质金属蛋白酶、环氧化酶-2、诱导型一氧化氮合酶等炎性介质,从而在炎症导致的功能紊乱中发挥保护作用。

2.2.5 III 相代谢酶 随着对 Nrf2 研究的不断深入,发现 Nrf2 的靶基因还包括了药物转运体这一特殊蛋白酶体。药物转运体,又称 III 相代谢酶,是人体组织生物膜存在介导药物跨膜转运的特殊转运蛋白。研究发现按其转运的不同方向,药物转运体大致可分为两类:一类可转运底物进入细胞,增加

细胞内底物浓度,为摄取性转运体,如有机阴离子多肽转运体(organic anion transporting polypeptide, OATP)、有机阳离子转运体(organic cation transporter, OCT)和肽转运体(peptide transporter, PEPT)等;另一类是依赖ATP分解释放的能量,将底物逆向泵出细胞,降低底物在细胞内的浓度,为外排性转运体,如P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-related protein, MRP)、肺耐药蛋白(lung resistance-related protein, LRP)和乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)等。这些转运体广泛存在于大部分器官,且在药物的吸收、分布及代谢等过程有重要作用^[42]。Nrf2激动剂tBHQ不仅可激活Nrf2,诱导其下游II相酶HO-1等的表达,同时也可抑制Ca²⁺依赖性ATP结合盒转运蛋白A1(ATP-binding cassette A1, ABCA1)转运体的降解^[43]。Nrf2激动剂BHA和EQ可通过Nrf2调控小鼠肝的摄取性转运体MRP、OATP2B1^[44]。当ARE启动子中与Nrf2结合域发生突变,MRP2的表达随之改变,进而抵抗异源性物质对细胞的伤害^[45]。

3 Keap1-Nrf2/ARE信号通路的调控机制

一般情况下,核因子对其下游基因的调控作用需要与相应的配体作用。Nrf2虽具有DNA结合结构域(DNA-binding domain, DBD)结构,但却没有一般核因子所特有的配体结构域(ligand binding domain, LBD)结构^[46]。Nrf2结构的特殊性,导致了其功能的多样性,同时也表现在其激活机制的多样性。激活Nrf2及其靶基因的表达是一个极其复杂的过程,有关其激活机制的研究是其中的重点。

3.1 Nrf2与Keap1的解偶联

大部分学者认为,Keap1可对Nrf2的活性进行负性调节。生理状态下,细胞内整体环境稳定,大部分Nrf2以非活性状态存在于胞浆中,与Keap1通过Neh2结构域偶联并与胞浆肌动蛋白结合锚定在胞浆;蛋白酶降解系统通过其介导的泛素化水平维持Nrf2的基础水平;而另一部分被激活的Nrf2则入核介导基因的基本转录^[47]。与其他核因子不同,Nrf2通过Neh2区与Keap1结合,当细胞或机体处于氧化应激或亲电子物质刺激下,Keap1的结构发生变化从而与Nrf2解离。解离后的Nrf2转移进入细胞核与相应蛋白结合,并调控下游靶基因的表达。由于Keap1蛋白上富含电敏感半胱氨酸结构,在氧化应激或亲电子物质的刺激下这些半胱氨酸变异,进而导致Keap1构象的变化^[48]。目前,已证实多数Nrf2激动剂都能直接作用于Keap1的Cys273等半胱氨酸

上的4个位点,进而导致Nrf2与Keap1解离^[49]。此外,有学者发现Nrf2泛素化降解的程度能随着Keap1结构的变异而降低,即此时Nrf2蛋白稳定性增加^[50]。激活的Nrf2转移进入细胞核后即与核内的Maf蛋白结合形成异二聚体,进而与ARE结合并调控下游靶基因的转录^[51]。

3.2 Nrf2的降解减弱机制

Nrf2的降解减弱受到多方面的调控,最主要的是Keap1介导的泛素化与蛋白酶作用和Nrf2的磷酸化作用机制,其他的还包括亚细胞定位、转录后修饰等调控机制,目前尚在继续研究中^[52-53]。

3.2.1 Keap1介导的泛素化与蛋白酶对Nrf2的降解减弱机制 Kobayashi等^[12]的研究表明,Keap1能作为泛素化连接酶促进Nrf2泛素化,而蛋白酶又参与了Nrf2稳定性和活性调节。生理状态下,由于Keap1与Nrf2结合并将其固定于胞浆中而难以发挥活性,同时Nrf2在泛素化和蛋白酶共同作用下发生降解,使得Nrf2趋于一般水平状态。Zhang等^[54]研究发现Keap1上IVR区的Cys273和Cys288两个半胱氨酸位点与Keap1对Nrf2泛素化作用有关,关系着Keap1-Nrf2复合物的稳定性。现已证明Keap1上上述两个半胱氨酸位点中的任何一个突变为丝氨酸时,其泛素化作用都会消失。当氧化剂或亲电试剂存在时,Cys273、Cys288被修饰,引起Keap1构象改变,可能带来Nrf2的解偶联,同时也会消除或减弱对Nrf2的泛素化作用,于是基于此途径的Keap1介导的泛素化及蛋白酶作用下的对Nrf2的降解作用消除或减弱。

3.2.2 Nrf2的磷酸化对Nrf2的降解减弱机制 Nrf2的Neh2区上有个degron结构,是该区的丝氨酸残基。Nrf2可被蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)家族中的很多成员磷酸化,其被PKC磷酸化作用的位点在Ser40^[55]。发生氧化应激时,Nrf2的degron区可被磷酸化而使构象改变,阻碍了泛素化依赖蛋白酶作用的蛋白降解途径中的由E3泛素化连接酶对Nrf2上degron结构的识别,即减弱了蛋白酶对Nrf2的识别与作用过程,从而使Nrf2的稳定性与含量增加,同时激活了其固有的转录活性。

3.3 门闩和枢纽学说

有部分学者认为Nrf2的激活与调控是基于“门闩和枢纽”学说机制^[56]。该学说认为,在细胞质中,Keap1二聚体的两个DGR区分别与Nrf2的DLG和ETGE区相结合,从而介导Nrf2的泛素化降解。一旦遭受到亲电试剂或者氧化剂刺激时,亲和力相对较低的DLG区就会从DGR区上解离下来,然而具有

高亲和力的 ETGE 区仍然牢固地结合在 DGR 上,于是 Nrf2 就不能再被泛素连接酶识别而被泛素化降解。同时,整个过程中 Keap1 的位点仍被 Nrf2 占据,新生成的 Nrf2 由于 Keap1 的位点饱和而不能被结合,所以就会以游离状态源源不断地进入细胞核与 Maf 蛋白结合成二聚体,识别并与 ARE 结合,从而发挥转录活性,促进 ARE 介导的下游靶基因的表达。

3.4 其他机制

此外,有报道当 Nrf2 从 Keap1 上解离后,除了与 Maf 蛋白作用激活 Nrf2 /ARE 信号通路发生效应外,也会与 Nrf2 上两个活性区 Neh4、Neh5 的共激活因子 CBP 蛋白结合而促使该激活因子也协同参与激活 Nrf2 目标基因的转录活性^[52]。

4 结语

综上所述,越来越多的研究成果表明,Nrf2 蛋白在机体抵抗外来刺激、保护机体功能中发挥着十分重要的作用。因此随着研究的不断深入,对 Nrf2/ARE 信号通路的进一步了解将有助于更加全面理解它在机体氧化还原平衡维持与调节中的作用,为抗氧化治疗提供新思路,为多种疾病的防治提供重要的参考。

【参考文献】

[1] Cai L, Kang YJ. Oxidative stress and diabetic cardiomyopathy: a brief review[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2001,1(3):181-193.

[2] Jeong WS, Jun M, Kong AN. Nrf2: A potential molecular target for cancer chemoprevention by natural compounds[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006,8(1/2): 99-106.

[3] Zhu J, Wang H, Ji X, et al. Different Nrf2 expression between glioma stem cells and non-stem-like cells in glioblastoma[J]. *Oncol Lett*, 2014,7(3):693-698.

[4] Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-keap1 Regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species[J]. *Adv Enzyme Regul*, 2006,46:113-140.

[5] Moi P, Chan K, Asunis I, et al. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the β -globin locus control region[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(21): 9926-9930.

[6] Takagi Y, Kobayashi M, Li L, et al. MafT, A new member of small Maf protein family in zebrafish[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004,320(1): 62-69.

[7] Nioi P, Nguyen T, Sherratt PJ, et al. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation[J]. *Mol Cell Biol*, 2005,25(24):10895-10906.

[8] Michalopoulos GK. Liver regeneration[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213(2): 286-300.

[9] Johnsen O, Murphy P, Prydz H, et al. Interaction of the cnc-zip factor tcf11/lcr-f1/nrf1 with mafg: binding-site selection and regulation of transcription[J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(2):512-520.

[10] McMahon M, Thomas N, Itoh K, et al. Redox-regular turn over of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 dngron[J]. *J Biol Chem*, 2004,279(30): 31556-31567.

[11] 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.

[12] Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate for proteasomal degradation of Nrf2[J]. *Mol Cell Biol*, 2004,24(16):7130-7139.

[13] Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity[J]. *J Biol Chem*, 1991,266(18):11632-11639.

[14] Sykiotis GP, Habeos IG, Samuelson AV, et al. The role of the antioxidant and longevity-promoting Nrf2 pathway in metabolic regulation[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2011,14(1): 41-48.

[15] Liu Z, Xiang Y, Sun G. The KCTD family of proteins structure, function, and disease relevance[J]. *Cell Biosci*, 2013,3(1):45-49.

[16] de Haan JB. Nrf2 Activators as attractive therapeutics for diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2011,60(11):2683-2684.

[17] McMahon M, Lamont DJ, Beattie KA, et al. Keap1 Perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010,107(44):18838-18843.

[18] Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution[J]. *Genes Cells*, 2011,16(2):123-140.

[19] Sun Z, Zhang S, Chan JY, et al. Keap1 Controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(18): 6334-6349.

[20] The protective role of Nrf2 in streptozotocin-induced diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2010,59(4):850-860.

[21] De Long MJ, Santamaria AB, Talalay P. Role of cytochrome P1-450 in the induction of NAD(P)H: quinone reductase in a murine hepatoma cell line and its mutants[J]. *Carcinogenesis*, 1987,8(10):1549-1553.

[22] Eizirik DL, Flodstrom M, Karlens AE, et al. The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells[J]. *Diabetologia*, 1996, 39(8): 875-890.

[23] Jiang T, Huang Z, Lin Y, et al. The protective role of Nrf2 in STZ-induced diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2010,59(4): 850-860.

[24] Kaspar JW, Jaiswal AK. Antioxidant-induced phosphorylation

- of tyrosine 486 leads to rapid nuclear export of Bach1 that allows Nrf2 to bind to the antioxidant response element and activate defensive gene expression[J]. *J Biol Chem*, 2010,285(1): 153-162.
- [25] Liu J, Zhou ZX, Zhang W, et al. Changes in hepatic gene expression in response to hepatoprotective levels of zinc[J]. *Liver Int*, 2009,29(8):1222-1229.
- [26] Angeloni C, Leoncini E, Malaguti M, et al. Modulation of phase II enzymes by sulforaphane: implications for its cardioprotective potential[J]. *J Agric Food Chem*, 2009,57(12):5615-5622.
- [27] Maines MD, Ibrahim NG, Kappas A. Solubilization and partial purification of heme oxygenase from rat liver[J]. *J Biol Chem*, 1977,252(16): 5900-5903.
- [28] Kongpetch S, Kukongviriyapan V, Prawan A, et al. Crucial role of heme oxygenase-1 on the sensitivity of cholangiocarcinoma cells to chemotherapeutic agents[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34994.
- [29] Fireman E. Ultrafine and nanoparticles-induced oxidative stress: the role of heme oxygenase-1 and carbon monoxide as anti-inflammatory pathways[J]. *J Asthma*, 2011, 49(1): 8-9.
- [30] Fauconneau B, Petegnief V, Sanfeliu C, et al. Induction of heat shock proteins (HSPs) by sodium arsenite in cultured astrocytes and reduction of hydrogen peroxide-induced cell death[J]. *J Neurochem*, 2002,83(6): 1338-1348.
- [31] Tanaka Y, Maher JM, Chen C, et al. Hepatic ischemia-reperfusion induces renal heme oxygenase-1 via NF-E2-related factor 2 in rats and mice[J]. *Mol Pharmacol*, 2007,71(3): 817-825.
- [32] Bai Y, Cui WP, Xin Y, et al. Prevention by sulforaphane of diabetic cardiomyopathy is associated with up-regulation of Nrf2 expression and transcription activation[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2013;57:82-95.
- [33] Piao CS, Gao S, Lee GH, et al. Sulforaphane protects ischemic injury of hearts through antioxidant pathway and mitochondrial K⁺ (ATP) channels[J]. *Pharmacol Res*, 2010,61(4): 342-348.
- [34] Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008,591(1-3): 66-72.
- [35] Zhang R, Chae S, Lee JH, et al. The cytoprotective effect of butin against oxidative stress is mediated by the up-regulation of manganese superoxide dismutase expression through a PI3 K/Akt/Nrf2-dependent pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(6): 1987-1997.
- [36] Jiang Q, Dai AG. The pathway of PI3k/Akt-aPKC/zeta-Nrf2 Regulating the expression of gamma-glutamylcysteine synthetase in the bronchial epithelial cells of rats[J]. *Chin J Appl Physiol*, 2011,27(1):115-119.
- [37] Lu Y, Gong P, Cederbaum AL. Pyrazole induced oxidative liver injury independent of CYP2E1/2A5 induction due to Nrf2 deficiency[J]. *Toxicology*, 2008,252(1-3): 9-16.
- [38] Pickering AM, Linder RA, Zhang H, et al. NrQ-Dependent induction of proteasome and Pa28 regulator are required for adaptation to oxidative stress[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(13): 10021-10031.
- [39] Cullinan SB, Zhang D, Hannink M, et al. Nrf2 Is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival[J]. *Mol Cell Biol*, 2003,23(20): 7198-7209.
- [40] Otterbein LE, Bach FH, Alam J, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway[J]. *Nat Med*, 2000,6(4): 422-428.
- [41] Kim J, Cha YN, Surh YJ. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders[J]. *Mutat Res*, 2010,690(1-2): 12-23.
- [42] Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, et al. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development[J]. *Pharmacol Rev*, 2003,55(3): 425-461.
- [43] Lu Q, Tang SL, Liu XY, et al. Tertiary-butylhydroquinone up-regulates expression of ATP-binding cassette transporter alvia nuclear factor E2-related factor 2/heme oxygenase-1 signaling in THP-1 macrophage-derived foam cells[J]. *Circ J*, 2013, 77(9): 2399-2408.
- [44] Cheng X, Maher J, Dieter MZ, et al. Regulation of mouse organic anion-transporting polypeptides (Oatps) in liver by prototypical microsomal enzyme inducers that activate distinct transcription factor pathways[J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33(9): 1276-1282.
- [45] Vollrath V, Wielandt A, Iruretagoyena M, et al. Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene[J]. *Biochem J*, 2006, 395(3): 599-609.
- [46] Li W, Kong AN. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response[J]. *Mol Carcinog*, 2009,48(2): 91-104.
- [47] Adams J, Kelso R, Cooley L. The Kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function[J]. *Trends Cell Biol*, 2000, 10(1): 17-24.
- [48] Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, 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[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(7): 2040-2045.
- [49] Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, 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]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002,99(18):11908-11913.
- [50] Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007;47:89-116.
- [51] Magesh 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.
- [52] Li W, Jain MR, Chen C, et al. Nrf2 Possesses a redox-insensitive nuclear export signal overlapping with the leucine zipper motif[J]. *J Biol Chem*, 2005,280(31)28430-28438.
- [53] Nguyen T, Sherratt PJ, Nioi P, et al. Nrf2 Controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynam-

法能有效地使 HIV 病毒迅速灭活,保证了检测工作者的人身安全,省略了高温灭活的操作^[12]。

另外,标准曲线及质量控制的血浆样品,文献报道多以空白溶剂(如有机试剂、水)配制工作液再加入血浆基质的方法进行配制,该配制方法中的空白溶剂比例对临床血浆样品检测是否存在影响一直是该领域内的一个讨论热点。本研究直接以空白血浆配制标准曲线及质控样品,定量分析临床血浆样品的血药浓度,提高了检测结果的可靠性。同时,本研究中的稀释效应的考察以及在标准品称量中采用双份称量分别用于标准曲线和质控样品的配制,也保证了检测结果的准确性与可靠性。

本研究建立的 LC-MS/MS 方法同时测定人血浆中 LPV 和 RTV 的血药浓度,选择性强、重复性好、灵敏、准确,且操作简单、快速,适用于两药复方用后的临床血药浓度监测。

【参考文献】

- [1] Huang XJ, Xu XL, Yang QY, *et al.* Efficacy and biological safety of lopinavir/ritonavir based anti-retroviral therapy in HIV-1-infected patients: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:8528-8536.
- [2] 姚亚敏,沐俊,孙骥,等.洛匹那韦药代动力学的研究进展[J]. *药学实践杂志*, 2012, 30(5):336-339.
- [3] Gleason RL Jr, Caulk AW, Seifu D, *et al.* Current efavirenz (EFV) or ritonavir-boosted lopinavir (LPV/r) use correlates with elevated markers of atherosclerosis in HIV-infected subjects in Addis Ababa, Ethiopia [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4):1-18.
- [4] Tulsi D M, Hemal K, Puran S, *et al.* Simultaneous quantitation of HIV-protease inhibitors ritonavir, lopinavir and indinavir in human plasma by UPLC-ESI-MS-MS [J]. *J Chromatogr Sci*, 2012, 50(7):625-635.
- [5] 陈柳林,黄树庭.含洛匹那韦/利托那韦的初治抗病毒方案治疗 HIV/HCV 合并感染者的疗效观察[J]. *中国艾滋病性病*, 2014, 20(12):895-897.
- [6] Yao YM, Mu J, Sun J, *et al.* Effect of the Tang herb on the pharmacokinetics of lopinavir in rats [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2014, 23(1): 28-32.
- [7] Yoshiko U, Tsuyoshi O, Masahiko N, *et al.* A simple HPLC method for simultaneous determination of lopinavir, ritonavir and efavirenz [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(6): 715-718.
- [8] 寇惠娟,叶敏,付强,等.高效液相色谱法同时测定人血浆中洛匹那韦和利托那韦浓度[J]. *中国科学*, 2012, 42(4): 326-332.
- [9] Yao YM, Sun JJ, Chen J, *et al.* LC-MS/MS Method for simultaneous quantification of lopinavir and ritonavir in human plasma [J]. *Acta Pharm Sin*, 2010, 45(2): 279-282.
- [10] Rajasekhar D, Jaswanthkumar I, Ravi K, *et al.* Simultaneous determination of ritonavir and lopinavir in human plasma after protein precipitation and LC-MS-MS [J]. *Chromatographia*, 2010, 71(9): 815-824.
- [11] Francis M, Elaine K, Jun Z, *et al.* Rapid, simultaneous determination of lopinavir and ritonavir in human plasma by stacking protein precipitations and salting-out assisted liquid/liquid extraction, and ultrafast LC-MS/MS [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 651(1): 112-116.
- [12] 邹尚荣,李燕青,莫玉泉,等. LC-MS/MS 同时测定人血浆中洛匹那韦和利托那韦浓度[J]. *中国现代应用药学*, 2011, 28(7):661-665.
- [13] Manish Y, Rajasekhar R, Hemal K, *et al.* Application of a rapid and selective method for the simultaneous determination of protease inhibitors, lopinavir and ritonavir in human plasma by UPLC-ESI-MS/MS for bioequivalence study in Indian subjects [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(4):1115-1122.
- [14] Wang PG, Wei JS, Kim G, *et al.* Validation and application of a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for simultaneous quantification of lopinavir and ritonavir in human plasma using semi-automated 96-well liquid-liquid extraction [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1130(2): 302-307.
- (收稿日期:2015-11-12 修回日期:2015-12-16)
- (上接第 152 页)
- ic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1 [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(37):32485-32492.
- [54] Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(22):8137-8150.
- [55] Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(45): 42769-42774.
- [56] Tong KI, Katoh Y, Kusunoki H, *et al.* Keap1 Recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(8):2887-900.
- (收稿日期:2015-09-06 修回日期:2015-12-02)