

癌症预防中的 Keap1-Nrf2-ARE 通路

刘晓平

皖南医学院药理学系, 芜湖 241002, 安徽

摘要 癌症的治疗至今仍未取得重大进展, 因此做好癌症的预防工作就尤为关键。目前有很多自然物质(如从植物中提取的抗氧化剂)或化学合成物质(如添加在食品中的抗氧化剂)被用来预防癌症。最近发现, 有些癌症预防物是通过诱导二相抗氧化酶来清除体内的致癌物质或其它毒物, 而且这种诱导作用是通过 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路。因此, 对这一通路的了解有利于拓展癌症的研究及预防。

关键词 癌症; 预防; Keap1-Nrf2-ARE 信号通路

中图分类号: R73-36⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1009-2501(2008)06-0716-05

致癌物质对机体的损害(主要是针对 DNA 的损害)在癌症发生过程中起了关键作用。对此, 癌症的预防一般分为两个方面: 一是减少致癌物质的产生, 另外就是加速致癌物质的排除或解毒。外来物质(致癌物、药物及环境污染物等)在体内一般经历两相代谢过程。一相代谢过程(phase 1)主要是官能团反应, 在 P450 酶系的参与下, 机体对药物分子进行氧化、还原、羟化、水解等, 使大部分外来物质失活; 二相代谢过程(phase 2)主要是轭合反应, 在有关酶的催化下, 将内源性极性小分子物质如葡萄糖醛酸、谷胱甘肽(GSH)等, 经共价键结合到外来物质或一相代谢活化物的分子上, 使之失活、解毒^[1-2]。

致癌物质在体内的激活主要发生在一相代谢阶段, 而二相代谢可以通过结合反应来减少它们对机体的毒害。二相代谢过程是在一系列酶的参与下完成的, 它们有过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽-S 转移酶(glutathione S-transferase, GST)、环氧化物水解酶(epoxide hydrolase)、磺基转移酶(sulfotransferase)、乙酰基转移酶(acetyltransferase)、醌氧化还原酶(quinone oxidoreductase1, NQO1)、血红素加氧酶(heme oxygenase-1, HO-1)、UDP-glucuronosyl-transferase (UGT)、醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase)、谷氨酸半胱氨酸连接酶(γ -glutamate cysteine ligase, γ -GCL)、谷胱甘肽合成酶(glutathione synthetase)、 γ -glutamyl transpeptidase 等。它们能清除体内多种致癌物质及其它毒性或氧化性物质, 从而消除这些物质对 DNA 及生物功能蛋白的破坏, 以维持机体内环境的稳定, 起到抗毒、抗氧化、抗癌、抗衰老的作用^[3-4]。一般把这些酶统称为药物代谢二相酶(下称二相酶), 也称之为二相抗癌酶或二相抗氧化酶。因此, 诱导这些酶的表达, 是预防癌症的重要措施。目前研究认为, 二相酶的表达主要是通过 Keap1-Nrf2-ARE 通路, 本文对此通路作简要介绍, 以供从事癌症研究、预防或相关人员参考。

1 抗氧化反应元件(ARE)的结构与功能

十多年前, Rushmore 等研究发现, 在大鼠 GSTA2 基因的 5' 启动区有一段一致序列, 其核心序列是(A G) TGA (C T) nnnGC (A G), 其中 n 代表任意核苷, 由于 GST 酶系主要是催化 GSH 与毒性或氧化性物质结合而使它们解毒, 因此他们称这段序列为 ARE^[5-6]。后来又陆续发现多种二相酶基因的 5' 启动区含有 ARE。Talakay 等报道诱导物

2008-02-22 收稿 2008-06-04 修回

刘晓平, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 分子药理学。

Tel: 0553-3932529 E-mail: liuxiaoping@wnmc.edu.cn

可以通过 ARE 来诱导二相酶基因的转录, 他们将这些种类、结构不同的诱导物分为 9 大类, 分别是迈克尔反应受体类(Michael reaction acceptors)、联苯芬类(diphenols)、苯醌类(quinones)、异硫氰酸盐类(isothiocyanates)、过氧化物类(Peroxides)、硫醇类(mercaptans)、三价砷类(trivalent arsenicals)、重金属类(heavy metals)、dithio lethiones 类^[7-8]。但后来发现 ARE 并不都是有功能的, Zhang 等在培养的人上皮细胞中发现, 含有 ARE 的 GST-P1 基因对多种典型的 ARE 诱导剂没有反应^[9]。但在笔者的研究中, 小鼠的 GST-P1 及 GCLC 基因可明显被银杏叶提取物(EGb) 所诱导^[10]。这种情况的产生可能与 ARE 相邻的序列不同有关, Hayes 等研究小鼠的 NQO1 启动子发现, ARE 相邻的侧翼序列对 ARE 的功能十分关键^[11]。他们还发现 ARE 中的部分序列与 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate 反应元件很相似(TGAC/GTCA), 如人 NQO1 基因 ARE 中的 TGACTCAGC 和大鼠 GST-P 基因 ARE 中的 TGATTCAG, 而此反应元件就是激活蛋白因子(AP-1)的结合部位, 提示 AP-1 可以与 ARE 结合^[12]。后来发现, 属于 AP-1 类因子的 c-Fos 和 Jun-D 就可以结合 ARE。但是 AP-1 类因子与 ARE 结合并不能表明就可以激活它, 而且很可能阻止其它因子与 ARE 的结合。研究表明, 过度表达的 AP-1 类因子(如 c-Fos 和 Fra1) 反而抑制了带有 ARE 的报告基因在 HepG2 细胞中的表达, 而当小鼠 c-Fos 基因被敲除后, 其体内多种组织中的 NQO1 和 GST 活性被明显提高^[13-14]。研究还表明, ARE 元件中的 GC 盒对其功能尤为重要, 因为改变这一部位的结构就可完全取消 ARE 对诱导物的反应^[15]。ARE 序列还可能存在某种程度的退化, 一项新研究发现小鼠的 NQO1 基因的 ARE 跨 24 个碱基对(-444 到-421), 它控制着相关基因持续性和诱导性的表达, 包含序列 5'-GAGTCA-CAGTCACTCGGCAAAATT-3', 其中斜体部分被突变后, 该 ARE 的功能将全部丧失^[11]。

由于 ARE 的激活物种类较多, 而且结构各不相同, 因此激活物与 ARE 的结合不可能是受体-配体的模式。Talalay 等进行的多项研究表明, ARE 的诱导物都有一个共同的特性, 就是它们都可以与 sulfhydryl groups 类发生反应^[16]。因此, 诱导物激活 ARE 可能是通过与信号蛋白上巯基类

发生相互作用。90 年代末, Yamamoto 等在此领域的研究取得里程碑式的突破, 他们发现在诱导物信号传递给核内的 ARE 的过程中, 两种信号蛋白参与了传递, 一种是 Nrf2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2), 类似于 *Drosophila* cap ' n' collar 的转录因子, 另一种是 Keap1 (kelch-like ECH-associated protein 1), 类似于 *Drosophila* actin binding protein Kelch 的胞浆蛋白^[17-19]。

2 Nrf2-Keap1 的结构与作用

2.1 Nrf2 的作用 Moi 等最初发现 Nrf2 是一种 66000 的蛋白质, 其有一个基本的亮氨酸结构域, 几乎在各种细胞内都可表达, 它可以与 DNA 的 NF-E2 区结合^[20]。在造血细胞中, NF-E2 区参与调节球蛋白基因的表达。Nrf2 对于鼠类的生长发育、红细胞生存并不发挥重要作用, 因为敲除 Nrf2 基因的小鼠还可正常生长^[21]。可是 Yamamoto 等发现 NF-E2 区包含 ARE 序列(GTGACTCAGCA), 而且推测 Nrf2 可能参与对 ARE 的调节。他们发现转录因子 Nrf2 首先和肌腱纤维瘤蛋白 Maf (muscle aponeurotic fibrosarcoma protein) 以异二聚体的形式结合, 然后该异二聚体再与 ARE 结合, 而且与 ARE 的亲合力很高, 从而启动二相酶基因的转录。当小鼠被敲除 Nrf2 基因后, 多种基因(如环氧化物水解酶、GCL、GSTs、HO-1、醌氧化还原酶和 UDP-glucuronosyltransferase 1A6) 的基础表达水平都被降低, 而且这些基因对已知的诱导物(oltipraz 或 butylated hydroxyanisole) 也失去反应^[17, 22]。用不含 Nrf2 的裸基因小鼠进行研究发现, 致癌物 benzopyrene 可使这些鼠的胃前部长出很多肿瘤, 而且用二相酶诱导物 oltipraz 不能预防及阻止这些肿瘤的发生和发展^[23-24]。同样, 不含 Nrf2 的裸基因小鼠也不能抵抗 aflatoxin B1^[25] 的致癌作用, 而且它们与正常小鼠相比, 更容易发生 acetaminophen^[26] 所导致的肝脏毒性, 也更容易发生缺氧引起的肺部损伤^[27], 而且其纤维原细胞只能表达正常该类细胞 15% 的 GCL mRNA^[28]。更有趣的是, ARE 基因本身也包含有功能性的 ARE, 而且也可以被 ARE 的诱导物所诱导, 这又提示诱导信号可能通过 Nrf2 的自身调节被放大^[29]。McMahon 等发现一种有效的诱导物 sulforaphane, 在大鼠肝 RI34 细胞内只能稍微增加 Nrf2 mRNA 水平, 但同

时可增加二相酶 NQO1 的 mRNA 水平达 20 倍^[30]。可见上游信号 Nrf2 的稍微变化, 对下游所调节酶的表达的影响是巨大的。

2.2 Keap1 的结构及与 Nrf2 的相互作用 同一研究小组通过双杂交筛选系统对 Nrf2 活性做了进一步研究, 最终确定是 Keap1 抑制了 Nrf2 从胞浆转移到核内^[31]。他们的研究表明, Keap1 是一种相对分子质量为 69000 的蛋白质, 它在胞浆中锚定于肌动蛋白 (anchored to actin)^[32]。小鼠的 Keap1 含有 5 个结构域: (1) N 末端区域 (NTR); (2) 宽阔复杂区及 BTB 区 (Bric a brac), 这是肌动结合蛋白和锌指转录因子中蛋白相互作用区域, 它常与其它 BTB 区形成复合物; (3) 干预区域 (IVR), 这一区域富含半胱氨酸; (4) DGR 区, 它含有 6 个 Kelch 片段; (5) C 末端 (CTR)^[33]。对 Keap1 点突变的研究揭示: 正常状况下 Nrf2 被 Keap1 控制 (sequestered) 在胞浆中, 当受到诱导物的刺激后, Nrf2 从 Keap1 上解离下来, 进入胞核与 Maf 蛋白形成异二聚体 (heterodimer), 然后该异二聚体再与 ARE 结合, 最终导致二相酶基因的转录^[34-35]。一项新研究发现, 在转基因细胞里看到 Keap1 结合在肌动蛋白细丝上, 直接就可以发现 Nrf2 的 Neh2 域与 Keap1 的 Kelch 重复区的相互作用, 就是这种作用使 Keap1 把 Nrf2 控制在胞浆中^[36]。尽管诱导物促使 Nrf2 从 Keap1 分离的确切机制还不十分清楚, 但 Talalay 等的研究对此提供了线索。他们发现 Nrf2 和 Keap1 都含有多个半胱氨酸残基, 例如小鼠的 Keap1 和 Nrf2 分别含有 25 个和 7 个该类残基。小鼠 Keap1 上所有半胱氨酸残基都可与 ARE 诱导物相互作用, 例如地塞米松、sulforaphane 和 bis (2-and 4-hydroxybenzylidene) acetones (Michael reaction acceptor), 而且还发现 C257、C273、C288 和 C297 是最容易与诱导物相互作用的残基^[37]。该研究提示诱导物是先和 Keap1 上的特定的残基发生相互作用, 使 Keap1 变构, 触发了 Nrf2 从 Keap1 上解离, 然后通过核孔进入核内, 与 ARE 结合触发相关酶基因的转录。Nrf2-Keap1-ARE 信息系统可用图 1 来表示。

最近, 一些研究者对 Nrf2 稳定性进行了报道, 在未受诱导的细胞里, 内生的 Nrf2 消除是相当快的, 其半衰期介于 10~30 min 之间^[37-38]。象

c-Jun、p53 和 IκBα 等转录因子一样, 控制在胞浆中的 Nrf2 也是通过泛素化的方式降解的^[39], 一旦受到诱导物的刺激, Keap1 的结构发生改变, 控制在胞浆中的 Nrf2 就被释放出来, 而且与泛素脱离, 其稳定性就明显提高了。但并不是说游离的 Nrf2 就不降解, 只是其降解的速度明显减慢了^[40]。

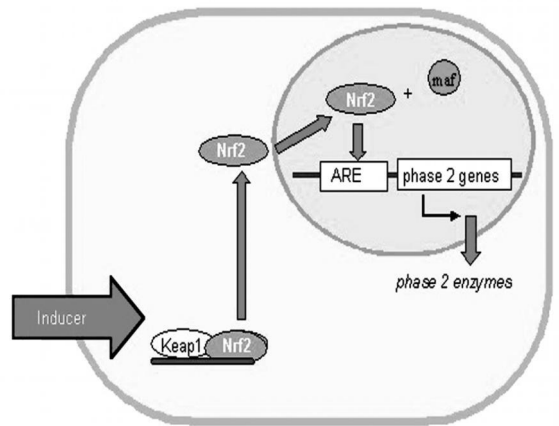


图 1 Nrf2-Keap1-ARE 信息系统的示意图

3 小结

Keap1-Nrf2-ARE 通路是最近十年抗毒、抗氧化研究领域的一大热点, 对这一通路的深入研究, 将解释或部分解释机体对癌症进行自身防御的机制, 通过对该通路的调节, 可以起到预防癌症的效果。目前, 在该领域还有以下问题值得深入研究: (1) 诱导物与 Keap1 (或 Nrf2) 的确切作用方式。 (2) 寻找高效低毒的诱导物。 (3) 体内是否有其它因素或因子或信息通路对该通路有影响? (4) Keap1 在诱导前后的稳定性。

参考文献

- [1] Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics [J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58(5/6): 737-747.
- [2] Wilkinson JJ, Clapper ML. Detoxication enzymes and chemoprevention [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1997, 216(3): 192-200.
- [3] Itoh K, Ishii T, Wakabayashi N, et al. Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress [J]. Free Radic Res, 1999, 31(4): 319-324.
- [4] Dhakshinamoorthy S, Long DJ 2nd, Jaiswal AK. Antioxidant regulation of genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens [J]. Curr Top Cell Regul,

- 2000, 36: 201—216.
- [5] 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.
 - [6] 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(2): 89—116.
 - [7] Prestera T, Holtzclaw WD, Zhang Y, et al. Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(4): 2965—2969.
 - [8] Tanigawa S, Fujii M, Hou DX. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin[J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42(11): 1690—1703.
 - [9] Zhang Y, Gonzalez V, Xu MJ. Expression and regulation of glutathione S-transferase P1-1 in cultured human epidermal cells[J]. *J Dermatol Sci*, 2002, 30(3): 205—214.
 - [10] Liu XP, Goldring CEP, Copple IM, et al. Extract of Ginkgo biloba induces the phase 2 genes through Keap1-Nrf2-ARE signalling pathway[J]. *Life Sci*, 2007, 80(17): 1586—1591.
 - [11] Nioi P, McHahon M, Itoh K, et al. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence[J]. *Biochem J*, 2003, 374(10): 337—348.
 - [12] Li Y, Jaiswal AK. Regulation of human NAD(P)H: quinone oxidoreductase gene. Role of AP1 binding site contained within human antioxidant response element[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(28): 15097—15104.
 - [13] Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase1 gene[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(25): 14960—14965.
 - [14] Wilkinson J, Radjendirane V, Pfeiffer GR, et al. Disruption of c-Fos leads to increased expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase1 and glutathione S-transferase[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 253(3): 855—858.
 - [15] Nguyen T, Rushmore TH, Pickett CB. Transcriptional regulation of a rat liver glutathione S-transferase Ya subunit gene. Analysis of the antioxidant response element and its activation by the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(18): 13656—13662.
 - [16] Talalay P, De Long MJ, Prochaska HJ. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(21): 8261—8265.
 - [17] Itoh K, Chiba T, Takahashi S, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 236(2): 313—322.
 - [18] Yates MS, Kensler TW. Chemopreventive promise of targeting the Nrf2 pathway[J]. *Drug News Perspect*, 2007, 20(2): 109—117.
 - [19] Satoh T, Okamoto SI, Cui J, et al. Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic phase II inducers[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(13): 768—773.
 - [20] 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 h-globin locus control region[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(21): 9926—9930.
 - [21] Chan K, Lu R, Chang JC, et al. NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(24): 13943—13948.
 - [22] Ramos-Gomez M, Kwak M, Dolan PM, et al. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(6): 3410—3415.
 - [23] Ramos-Gomez M, Dolan PM, 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.
 - [24] Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, et al. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a] pyrene-induced stomach tumors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(11): 7610—7615.
 - [25] Kwak MK, Egner PA, Dolan PM, et al. Role of phase 2 enzyme induction in chemoprotection by dithioethiones [J]. *Mutat Res*, 2001, 480/481(Sep 1): 305—315.
 - [26] Chan K, Han XD, Kan W. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(8): 4611—4616.
 - [27] Cho HY, Jedlicka AE, Reddy SPM, et al. Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice[J].

- Cell Mol Biol, 2002, 26(2): 175—182.
- [28] Chan JY, Kwong M. Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein[J] . Biochim Biophys Acta, 2000, 1517(1): 19—26.
 - [29] Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M, et al. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter[J] . Mol Cell Biol, 2002, 22(4): 2883—2892.
 - [30] McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, et al. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression[J] . J Biol Chem, 2003, 278(24): 21592—21600.
 - [31] Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain [J] . Genes Dev, 1999, 13(1): 76—86.
 - [32] 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.
 - [33] Xue FL, Cooley L. Kelch encodes a component of intercellular bridges in Drosophila egg chambers[J] . Cell, 1993, 72(5): 681—693.
 - [34] Hong F, Freeman ML, Liebler DC. Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane[J] . Chem Res Toxicol, 2005, 18(12): 1917—1926.
 - [35] 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.
 - [36] Kang MI, Kobayashi A, Wakabayashi N, et al. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes [J] . Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(7): 2046—2051.
 - [37] Stewart D, Killeen E, Naquin R, et al. Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium[J] . J Biol Chem, 2003, 278(4): 2396—2402.
 - [38] Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC, et al. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome[J] . J Biol Chem, 2003, 278(7): 4536—4541.
 - [39] Pahl HL, Baeuerle A. Control of gene expression by proteolysis[J] . Curr Opin Cell Biol, 1996, 8(3): 340—347.
 - [40] Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Wakabayashi N. Keap1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein[J] . Biochemistry, 2005, 44(18): 6889—6899.

Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway in the chemoprevention of cancer

LIU Xiao-ping

Department of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui, China

ABSTRACT Chemoprevention of cancers is still very important since we have not got effective treatments for them. Many natural products (e.g. extracts from plants) or chemical synthetic substances (e.g. additives in foods) were used as chemoprevention regents. Some of them fight the carcinogens or other toxins through induction of the phase 2 antioxidant enzymes. Recently, it is wildly believed that the mechanism of this induc-

tion is the activation of Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway. Thus understanding of this signaling pathway will widen the field of the cancer research and chemoprevention.

KEY WORDS cancer; chemoprevention; Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway

本文编辑:李娟