

Nrf2/ARE 在化学防癌机制中的作用

叶社房¹, 侯振清¹, 钟李明¹, 张其清^{1,2}

1. 厦门大学医学院生物医学工程研究中心, 福建 厦门 361005

2. 中国医学科学院协和医科大学生物医学工程研究所, 天津 300192

Role of Nrf2/ARE in chemoprevention of cancer

YE Shefang¹, HOU Zhenqing¹, ZHONG Li-ming¹, ZHANG Qi-qing^{1,2}

1. Research Center of Biomedical Engineering, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, P. R. China

2. Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, P. R. China

【摘要】 化学致癌过程是涉及启动、促进和进展等多阶段的复杂过程。癌症的化学预防是应用天然的或合成的化学物质,以阻断、抑制或其癌变过程,从而达到预防肿瘤的目的。化学致癌物的体内生物转化依靠肝脏的相I和相II代谢相酶来完成。作为对化学预防剂的应答反应,碱性亮氨酸拉链蛋白家族成员转录因子 Nrf2 首先从胞质蛋白 Keap1 上解离,然后发生核内转位,与相I代谢酶基因上游的抗氧化反应元件结合诱导相I代谢酶基因的表达,这是化学防癌的重要机制;Nrf2/ARE 对相I代谢酶的调节涉及 PI3K、MAPK、PKC 等细胞内重要信号传导途径。这些发现加深了化学防癌机制的认识并为评估潜在抗癌物质提供了新的策略。

中华肿瘤防治杂志,2007,14(3):222-225

【ABSTRACT】 Chemical carcinogenesis is involved in complicated multiple stages of initiation, promotion and progression. Chemoprevention comprises multiple intervention methods using either pharmacological or dietary agents to impede, arrest, or reverse carcinogenesis at various stages. Biotransformation of carcinogens may be associated with hepatic phase I and detoxifying enzymes. It is proved that Nrf2, a member of the basic-leucine zipper family of transcription factors, is dissociated from cytoplasmic protein Keap1 firstly in response to activation by chemopreventive agents, then translocated into nucleus, and binding with the antioxidant response element (ARE) to induce expression of phase I enzyme gene, which plays a crucial role in protection against carcinogenesis. Regulation of Phase I enzyme by Nrf2/ARE is also involved with PI3K, MAPK and PKC signal transduction pathways. Recent analyses argue that these pathways provide a insight into carcinogenesis and new strategies to evaluate vast potential chemopreventive agents.

Chin J Cancer Prev Treat, 2007, 14(3): 222 - 225

【关键词】 化学预防;氧化还原酶类/分析;Nrf2;综述文献

【KEY WORDS】 chemoprevention; oxidoreductases/analysis; Nrf2; review literature

【中图分类号】 R730.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5269(2007)03-0222-04

致癌过程是环境和遗传因素相互作用而引起多基因突变和其他生物大分子改变积累的结果,是涉及启动、促进和进展等多阶段的复杂过程。癌症的化学预防就是以天然或合成的化学物质预防、抑制或阻止癌变过程,以达到预防恶性肿瘤的发生。化学预防是肿瘤预防的有效措施之一,肿瘤预防药物研究已成为目

【第一作者简介】 叶社房,男,江西全南人,博士,讲师,主要从事肿瘤化学预防药物及其评价的研究工作。

Tel:86-592-2188677 E-mail: yeshefang@xmu.edu.cn

【通讯作者简介】 张其清,男,福建福州人,教授,博士生导师,主要从事新药开发和药物制剂的研究工作。

Tel:86-592-2185299 E-mail: zhangqiq@xmu.edu.cn

前肿瘤学和药学的研究热点。

1 化学预防剂的分类及作用机制

根据作用于致癌过程的不同阶段,化学预防剂可分为两大类。1) 阻断剂(blocking agents):其作用机制是阻止前驱物形成致癌剂或阻止致癌剂达到其靶点,包括抑制致癌物的产生及活化、增强抗氧化酶和加强解毒能力等;2) 抑制剂(suppressing agents):其作用机制是抑制肿瘤的促进和进展,阻止启动细胞获得恶性表型而变成恶性,包括诱导细胞凋亡和促进细胞分化、抑制鸟氨酸脱羧酶和环氧化酶、抑制新生血管形成、抗炎活性和加强细胞间和缝隙连接等^[1]。

化学致癌物的体内生物转化依靠肝脏的相和相代谢酶来完成。化学致癌物经相代谢酶(如细胞色素 P450)催化后形成亲电子活性致癌物,与 DNA 及蛋白质结合形成加成物,引起癌基因和抑癌基因改变;而经相代谢酶,如谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)的生物转化作用,使终致癌物亲水性增强,促进其体外排泄。抗氧化剂可以通过抑制致癌物的活化或诱导相代谢酶的解毒作用阻断或逆转癌症发生。与相代谢酶不同的是相代谢酶的诱导不会增加致癌风险,因此能诱导相代谢酶的化学物质被认为具有癌化学预防能力^[1]。异硫氰酸盐(sulforaphane)是在十字花科植物中发现的一种代表性的癌化学阻断剂,它不直接与自由基或活性氧物质发生反应,而是通过激活相代谢酶基因上游启动子区域一些特异共同的抗氧化反应元件,诱导相代谢酶基因的表达,以增强机体抗氧化、抗突变和抗肿瘤的能力。研究表明,异硫氰酸盐可抑制相代谢酶细胞色素 P450,诱导相代谢酶 GST、NAD(P)H 醌氧化还原酶(quinone oxidoreductase 1, NQO1)、UDP-葡萄糖醛酰转移酶(UDP-glucuronosyltransferase, UGT)等的活性阻断化学致癌的启动阶段^[2]。

2 相代谢酶的交互调控机制

研究表明,参与化学致癌物质体内生物转化的相和相代谢酶是由共同的启动子元件来调控^[3]。异源性物质反应元件(xenobiotic responsive element, XRE),由转录因子芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)激活,主要调节相代谢酶表达;AhR 受体通路已在细胞氧应激状态下的细胞色素 P450 还原酶的诱导机制中得到了证实^[3]。近年来,在一些相代谢酶基因的上游启动子区域发现了一段抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE),这一序列只对一些具有抗氧化能力的外来物反应,且较具专一性。目前证实,碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)蛋白家族的转录因子 Nrf2(nuclear factor E2 p45-related factor 2)被激活后,发生核内转位,与 Maf 等转录因子形成杂化二聚体结合到 ARE 元件,参与下游相代谢酶基因的调控^[3]。目前,已证实多种化学预防剂通过 Nrf2/ARE 机制诱导相代谢酶表达。

AhR 和 Nrf2 是 2 个重要但又互相区别的代谢酶调节转录因子。过去一直认为相代谢酶之间只存在序贯和协同代谢的关系。目前越来越多的证据提示,AhR 和 Nrf2 间不仅在代谢方式上互相协同,而且在调节水平上还相互作用。Miao 等^[4]研究发现,Nrf2 基因转录可直接被 AhR 受体激活。对大鼠 Nrf2 基因序列分析时,在其启动子区域发现了 3 个异源性物质

反应 XRE 样元件,分别是位于 -712 的 XREL1 和位于 +755 位的 XREL2 以及 +850 位的 XREL3;荧光素酶报告基因分析发现,AhR 诱导剂 2,3,7,8-四氯代二苯并二恶英(TCDD)可同时诱导 XREL1、XREL2、XREL3 基因,其中对 XREL2 基因的诱导能力最强,这些 XRE 样反应元件的功能在随后的基因突变和凝胶迁移率实验中均得到验证。另外,染色质免疫共沉淀法还进一步证实了 AhR 可直接与 Nrf2 基因的启动子区结合,结果提示 Nrf2/ARE 可能是位于 AhR/XRE 下游的一个调节靶序列。AhR 对 Nrf2 的直接作用表明,相代谢酶在调节水平上成为一个完整的体系,有利于外源性物质和毒性致癌物的解毒。

3 Nrf2/ARE 与相代谢酶诱导

ARE 元件存在于大鼠/小鼠 GST A2 亚基、大鼠/人 NQO1、-GCS 等与相代谢酶基因启动子 5 调控区。人类 ARE 元件长 24 bp,包括 1 个 TRE 元件(TPA response element, TRE,亦称 AP1/TPA 反应元件)和 1 个类 TRE 元件。两者间隔 3 bp,反向排列,其后紧随一“GC”盒。ARE 元件具有保守序列 5-(G/A)TGA(G/C)nnnGC(G/A)-3,该序列对相代谢酶 NQO1 的诱导是必需的;但一些含有该保守序列的相代谢酶 GSTP1 却对 ARE 元件诱导剂缺乏相应的敏感性,提示在相代谢酶基因上游可能还存在其他重要调节序列^[5]。

对 Nrf2 与鸡 ECH 蛋白的进行同源性分析发现,人 Nrf2 包括 6 个高度保守的 ECH 同源结构域(Nrf2-ECH homology):Neh1、Neh2、Neh3、Neh4、Neh5 和 Neh6。其中 Neh1 与 bZIP 家族蛋白结构域同源;位于 N 端的 Neh2 是与 Keap1 高度结合的区域,对 Nrf2 功能起负性调控作用。在相代谢酶诱导实验中,凝胶迁移率实验(EMSA)证实 Nrf2 对 ARE 元件有较强的特异性结合活性,而 bZIP 蛋白家族成员的其他转录因子 Jun/Fos 与 ARE 元件缺乏结合力;Nrf2 和 ARE 的共转染实验还表明 Nrf2 对 ARE 元件有正向调节作用。与其他 bZIP 家族蛋白成员相似,Nrf2 必需与 Maf、JunD、cJun、ATF4 等形成杂化二聚体才能结合到 ARE 元件,诱导相代谢酶基因的表达^[6]。

外源性致癌化合物的暴露在诱发多种恶性肿瘤方面起重要的作用,而参与致癌物解毒的相代谢酶活性的下降可能与多种癌症的发生密切相关。Thimmulappa 等^[7]在给 Nrf2^{-/-}鼠和野生型鼠喂食异硫氰酸盐后,首次利用基因芯片方法分析了鼠小肠中 Nrf2 下游基因组目标基因,结果发现了大量 Nrf2 调节的解毒酶、抗氧化蛋白和降低毒物毒性的细胞保护蛋白表达水平升高。Iida 等^[8]研究了 Nrf2^{-/-}小鼠对亚硝酸胺致癌物 BBN 引起的膀胱癌的易感性及 Oltipraz 防癌

效果。结果表明,在暴露于BBN时,Nrf2^{-/-}小鼠膀胱癌的发生率显著增加;而Oltipraz以Nrf2依赖性的方式诱导肝脏和膀胱组织中相代谢酶的表达。相代谢酶通过促进BBN的葡萄糖醛酸化,显著降低尿液中终致癌物N-亚硝基胺的浓度,从而显著降低Nrf2野生型小鼠膀胱癌的发生,而对Nrf2^{-/-}小鼠无此保护作用。这些结果进一步表明,Nrf2是调节相代谢酶表达的重要转录因子,通过与靶基因的ARE元件结合,调节多种解毒酶的表达。机体内Nrf2基因的功能下降或丧失可能在多种癌症的发生过程中起一定的作用,是肿瘤遗传易感性相关的重要候选基因之一。

4 Nrf2-Keap1解离状态对相代谢酶诱导的影响

研究发现,诱导ARE元件转录激活的化合物结构呈多样复杂化的特点^[9]。目前已经证实能诱导ARE元件转录活性的化合物包括联苯酚、苯醌、过氧化氢、硫醇、砷剂、异硫氰酸盐等,这些化合物诱导ARE转录激活的机制还不完全明了^[9]。有人认为它们对ARE的转录激活可能是通过中间受体蛋白的介导来实现的^[10]。对NQO1和GST诱导的研究表明,大多数化学预防剂对巯基有烷化或氧化作用,因此推测含有巯基的中间蛋白有可能作为ARE元件激活剂的感应靶受体^[9,10]。

通过酵母双杂交筛选分析技术发现在胞质存在一种锚着于肌动蛋白的细胞质蛋白Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1),这种蛋白与果蝇看家结合蛋白kelch属于同系物。Keap1包含5个保守结构域NTR、BTB/POZ、IVR、DGR、CTR,其中DGR是肌动蛋白结合区,对锚定Nrf2蛋白有重要作用^[9]。研究发现,在人和鼠Keap1蛋白的DGR域含有高度保守的25个半胱氨酸残基。采用与诱导物结合的探针、酶学、放射标记及UV色谱等方法,确定了巯基的氧化或共价修饰是识别相代谢酶诱导物并与之反应的重要细胞“传感器”^[9,10]。Keap1的羧基端第273和288位巯基对维持Keap1/Nrf2复合物的稳定性有重要意义。Keap1巯基的修饰能使Keap1构象发生改变,引起Keap1/Nrf2复合物分离,释放出的Nrf2转运到细胞核内与其他转录因子Maf形成二聚体,结合到相代谢酶基因5'上游的ARE元件启动子区,促使相代谢酶基因转录活化^[10]。静息状态的细胞,胞质蛋白Nrf2的半衰期相对较短($t_{1/2}$ 为10~20 min),与Keap1结合而处于屏蔽失活状态;此时Nrf2的生理性降解主要是通过泛素蛋白酶途径,以从头合成(de novo)的方式更新;细胞受到刺激时,Nrf2从Keap1中解离,Nrf2的半衰期明显延长,此时核内Nrf2转录因子水平的提高是以亚细胞再分布的形式由胞质向核内转移,以适应诱导剂及时有效地启动相代谢酶基因的

转录^[11]。

Keap1-Nrf2调控系统中,Keap1对Nrf2的抑制作用对相代谢酶的调节很重要。敲除Keap1基因的小鼠由于食管、前胃的过度角化以及随后出现的饮食困难,大部分死于出生后3周左右;该鼠肝和胚胎纤维母细胞的相代谢酶表达水平明显升高;若Nrf2基因同时被敲除的情况下,可以完全逆转Keap1敲除后所观察到的致死性发育缺陷表型的出现^[12]。结果提示转录因子Nrf2是受Keap1调节的重要靶蛋白之一。

5 Nrf2-Keap1的信号调控机制

研究表明,磷脂酰肌醇激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)、蛋白激酶C(protein kinase C,PKC)、丝裂酶原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases,MAPKs)等细胞内重要信号传导途径在Nrf2水平的转录后调节机制中起重要作用^[11]。

PI3K是一种胞内磷脂酰肌醇激酶,其产物包括3,4-二磷酸磷脂酰肌醇(PF3,4-P2)和3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PF3,4,5-P3)等,它们都是位于质膜上的第二信使。PI3K既具有丝/苏氨酸激酶的活性,也具有磷脂酰肌醇激酶的活性,对调节细胞的分裂、分化、凋亡等有重要作用。体外实验表明,抗氧化剂tBHQ通过激活PI3K激酶,使胞质肌动微丝骨架解聚,促使Nrf2发生核内转移;PI3K激酶选择性抑制剂LY294002对ARE启动子介导的相代谢酶NQO1和GSTA2基因转录有抑制作用;PI3K激酶过表达可剂量依赖性激活ARE启动子的转录活性;显性负突变Nrf2基因转染的细胞可完全抑制PI3K激酶过表达对ARE启动子的激活^[13]。由于大多相代谢酶诱导剂不影响PI3K激酶的下游靶分子蛋白激酶B(PKB/Akt)活性状态,因此PI3K激酶对Nrf2转录活性修饰机制有待于进一步阐明。

MAPK是蛋白激酶级联反应的中间体,是细胞内重要的激酶系统,在细胞生长、分化和肿瘤形成等过程中起非常关键作用。MAPK激酶的重要成员ERK、JNK、p38在化学预防剂诱导的相代谢酶中起重要作用^[14]。用异硫氰酸盐和tBHQ处理HepG2和Hepalcc7细胞系,发现ERK2和JNK1磷酸化水平升高;MAPK特异性抑制剂PD098059预处理细胞后,ERK2和JNK1磷酸化水平下降,ARE下游靶基因NQO1转录也被抑制;在显性负突变ERK2和JNK1基因转染的细胞观察到ARE报告基因活性被抑制^[15]。这些结果提示,ERK和JNK通路对ARE下游相代谢酶基因的转录呈正向调节作用。用tBHQ处理HepG2细胞后p38磷酸化水平升高,p38特异性抑制剂SB203580预处理细胞后NQO1的活性显著性升高;显性负突变p38或MKK(p38上游激酶)基

因转染的细胞能显著增强 tBHQ 诱导 ARE 报告基因活性^[16]。结果提示 p38 与 ERK、JNK 通路对 ARE 转录激活可能存在不同的作用机制。

PKC 是一类 Ca^{2+} 、磷脂依赖性的蛋白激酶,在跨膜信号传递过程中起着重要作用。PKC 通过催化多种蛋白质的丝/苏氨酸残基磷酸化,调节多种细胞的代谢、生长、增殖和分化。利用 PKC 激动剂佛波脂(phorbol-12myristate-13-acetate, PMA)处理细胞,发现 Nrf2 首先发生核内移位,并诱导 ARE 下游相代谢酶基因的表达; PKC 抑制剂能阻断 Nrf2 诱导的 ARE 转录激活。Nrf2 结合 Keap1 的结构域 Neh2 第 40 位丝氨酸残基是 PKC 磷酸化的重要位点,对 Nrf2 的解离有重要作用,但不参与 Nrf2 稳定性维持或核移位,以及 ARE 介导的下游靶基因表达^[17]。最近还有研究表明,PKC 的重要同工酶新家族成员,包括由 δ 及 ζ 组成的非典型 PKC(atypical PKC, aPKC)在 40 位丝氨酸残基磷酸化激活以及 ARE 的下游靶基因的激活中也起重要作用^[18]。

6 结语

化学预防是癌症研究的重要领域之一。相代谢酶的诱导可促进致癌物的生物转化、阻断或抑制癌症发展进程,是化学防癌的重要机制之一。Nrf2 作为对化学预防剂的应答诱导相代谢酶基因表达的重要转录因子,促进了我们对化学防癌机制的认识,同时也为我们评估潜在抗癌物质提供了一种全新的策略。

【参考文献】

- [1] Surh Y J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals [J]. *Nature Rev Cancer*, 2003, 3(10): 768 - 780.
- [2] Basten GB, Bao Y P, Williamson G. Sulforaphane and its glutathione conjugate but not sulforaphane nitrile induce UDP-glucuronosyl transferase (UGTIA1) and glutathione transferase (GSTA1) in cultured cells [J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23 (8): 1399 - 1404.
- [3] 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.
- [4] Miao W, Hu L, Scrivens P J, et al. Transcriptional regulation of NRF2 expression by the AHR-XRE signaling pathway: Direct cross-talk between phase and drug-metabolizing enzymes [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(21): 20340 - 20348.
- [5] Nioi P, McMahon 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 (Pt 2): 337 - 348.
- [6] Kwak M K, Wakabayashi N, Kensler T W. Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers [J]. *Mutation Res*, 2004, 555(1 - 2): 133 - 148.
- [7] Thimmulappa R K, Mai K H, Srisuma S, et al. Biswal, Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(18): 5196 - 5203.
- [8] Iida K, Itoh K, Kumagai Y, et al. Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(18): 6424 - 6431.
- [9] Dinkova-Kostova A T, Holtzclaw W D, Cole W 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]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(18): 11908 - 11913.
- [10] 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 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(7): 2040 - 2045.
- [11] Nguyen T, Sherratt P J, Huang H C, 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.
- [12] Wakabayashi N, Itoh K, Wakabayashi J, et al. Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation [J]. *Nat Genet*, 2003, 35(3): 238 - 245.
- [13] Kang K W, Lee S J, Park J W, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress [J]. *Mol Pharmacol*, 2002, 62(5):1001 - 1010.
- [14] Kong A N, Owuor E, Yu R, et al. Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE) [J]. *Drug Metab Rev*, 2001, 33(3 - 4): 255 - 271.
- [15] Keum Y S, Owuor E D, Kim B R, et al. Involvement of Nrf2 and JNK1 in the activation of antioxidant responsive element (ARE) by chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate (PEITC) [J]. *Pharmacol Res*, 2003, 20(9):1351 - 1356.
- [16] Yu R, Mandlikar S, Lei W, et al. p38 mitogen-activated protein kinase negatively regulates the induction of phase drug-metabolizing enzymes that detoxify carcinogens [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(4):2322 - 2327.
- [17] Bloom D A, Jaiswal A K. Phosphorylation of Nrf2S40 by PKC in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2 but not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of ARE-mediated NQO1 gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (45): 44675 - 44682.
- [18] Numazawa S, Ishikawa M, Yoshida A, et al. Atypical protein kinase C mediates activation of NF-E2-related factor 2 in response to oxidative stress [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 285(2): C334 - C342.

收稿日期:2005 - 11 - 14 修回日期:2006 - 04 - 04

(编辑:范开席)