

综述

Nrf2/ARE信号通路与胃癌耐药关系的研究进展

耿 苗 唐修文*

(浙江大学医学院生物化学与遗传学系, 杭州 310058)

摘要 胃癌是癌症死亡的第二大原因。化疗是胃癌治疗的主要方法之一, 胃癌化疗失败的主要原因是化疗药物的耐受。Nrf2/ARE信号通路与肿瘤耐药的关系是当前的研究热点。转录因子Nrf2作为抗氧化反应中的关键转录因子, 可以与抗氧化反应元件ARE结合, 正向调节II相解毒酶、抗氧化酶及某些药物转运泵基因等靶基因的表达, 诱导胃癌耐药性的产生。该综述整理归纳了Nrf2/ARE信号通路与胃癌耐药之间的关系。

关键词 Nrf2/ARE信号通路; 胃癌; 耐药性

世界卫生组织国际癌症研究中心最近的一份统计报告显示, 全世界癌症的发病率逐年递增。其中, 胃癌已成为威胁人类健康的第四大恶性肿瘤, 化疗是胃癌治疗的主要手段, 许多因素影响化疗的效果, 肿瘤细胞对化疗药物的耐药性是最重要的因素。耐药性又称抗药性, 一般是指病原体与药物多次接触后, 对药物的敏感性下降甚至消失, 致使药物对该病原体的疗效降低或无效。目前, 探索肿瘤细胞耐药性的产生机制已成为肿瘤研究领域的一大热点。肿瘤耐药机制包括: 肿瘤细胞内药物泵出增多、体内非特异解毒过程加强、DNA去甲基化^[1-2]、DNA损伤修复能力增强、细胞凋亡抑制等。肿瘤干细胞理论的提出, 揭示了肿瘤耐药的最根本原因^[3]。逆转肿瘤细胞的耐药性, 增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 是提高肿瘤化疗效果的关键。本实验室一直致力于该方面的研究, 最新发现, 木犀草素通过抑制Nrf2/ARE[核转录相关因子2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2); 抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)]信号通路而增敏人非小细胞肺癌细胞株A549对化疗药物的耐受性^[4]。本综述将着重介绍Nrf2/ARE信号通路与胃癌耐药的关系。

1 Nrf2/ARE信号通路概况

Nrf2/ARE信号通路是肿瘤化学预防与肿瘤多药耐药的重要机制。该信号通路包括三个核心分子: Nrf2、Kelch样ECH相关蛋白1(Kelch-like ECH-

associated protein 1, Keap1)和ARE。Nrf2是转录因子CNC(cap-'n'-collar)家族成员, 分子量66 kDa, 含有六个功能域, 分别为Neh1-6。Neh1是DNA结合区, 通过高度保守的碱性亮氨酸拉链结构(basic region-leucine zipper, bZIP)与小Maf蛋白(small Maf proteins, 包括MafG、MafK、MafW)形成异源二聚体, 结合到DNA上。Neh2中的氨基酸27-32和77-82分别为DLG和ETGE区, 是Keap1结合位点。位于C端的Neh3, 可能与转录活性有关。Neh4和Neh5两个区域一起与CREB(cAMP response element binding protein)蛋白相互作用, 起到转录活化的作用。Neh6区域富含丝氨酸, 是非Keap1依赖的Nrf2降解调控区域。Keap1是一个细胞质蛋白伴侣分子, 分子量69 kDa, 含有5个主要的功能域: NTR区(the N-terminal region)、BTB区(broad complex, tramtrack and brica-brac region)、IVR区(intervening region)、DGR区(double-glycine-rich region)和CTR区(the C-terminal region)。其中, BTB区为Keap1二聚化位点, 也是与Cul3结合的位点; IVR区富含丝氨酸, C273和C288与抑制Nrf2活性相关; DGR区富含双甘氨酸, 包含6个Kelch功能域, 是与Nrf2相互作用的位点。ARE是一个特异的DNA启动子结合序列: 5'-(G/A)TG A(G/C)n nnG C(G/A)-3'(n代表任意种类的核苷酸), 位于谷胱甘肽S转移

收稿日期: 2012-05-21 接受日期: 2012-07-30

国家自然科学基金(No.31170743)和浙江省科技计划(No.2011-C23078)资助项目

*通讯作者。Tel/Fax: 0571-88208266, E-mail: xiuwentang@zju.edu.cn

酶(glutathione S-transferase, GST)、NAD(P)H: 醌氧化还原酶1[NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, NQO1]、醇醛酮还原酶家族1成员C1(aldo-keto reductases 1 C1, AKR1C1)等II相解毒酶和抗氧化酶基因的5'端启动序列区。

正常细胞中, Nrf2/ARE信号通路的调控有两种情况。在一般状态下, 细胞质中的Nrf2与Keap1结合, Keap1作为一个泛素化底物结合蛋白, 通过与泛素连接酶Cul3结合, 介导Nrf2的泛素化降解, 抑制Nrf2下游基因的表达; 而在氧化应激状态下, 细胞通过PKC、MAPK和PI3K等途径使Keap1构象发生变化, 导致Nrf2与Keap1解偶联, Nrf2稳定性提高, 转移入核。核内的Nrf2通过Neh1区的bZIP结构与小Maf蛋白形成异二聚体, 识别抗氧化反应元件ARE, 从而启动ARE调控的II相解毒酶和抗氧化蛋白的转录与表达, 对正常细胞起到保护作用。而在肿瘤细胞中, Nrf2/ARE通路的调控相对复杂, 由于多种原因导致Nrf2的异常调控: (1) Keap1启动子超甲基化, 抑制了Keap1 mRNA的表达, Keap1蛋白表达减少, Nrf2和下游基因的表达增加^[5]; (2) Keap1发生突变, 突变位点集中在IVR和DGR区, 少量在其他三个区。突变后的Keap1失去与Nrf2结合的能力, Nrf2处于持续活化状态, 其中Cys288的突变对Nrf2的激活起重要作用^[6]; (3) Nrf2发生突变, 突变位置都位于或靠近DLG和ETGE区, 导致Nrf2无法与Keap1结合, Nrf2在核内累积^[7-8]; (4) p62与Keap1直接相互作用, 作用位点是p62的349-DPSTGE-354与Keap1 Kelch区的三个精氨酸。内源p62的累积或p62的异位表达抑制了Keap1介导的Nrf2泛素化和蛋白酶体降解, Nrf2的表达升高^[9]; (5) 前胸腺素 α 与Keap1相互作用, 释放部分与Keap1结合的Nrf2, 单体Nrf2的量增多^[10]; (6) p21与Nrf2直接相互作用, 作用位点是p21的¹⁵⁴KRR基序与Nrf2的²⁹DLG和⁷⁹ETGE。p21与Keap1竞争性地结合Nrf2, 抑制了Nrf2的泛素化降解, 增强了Nrf2的稳定性^[11]; (7) c-Jun和Nrf2形成异二聚体, 启动NQO1和其他ARE调节基因的表达^[12], 同时c-Jun氨基末端激酶(JNK)的激活诱导p62的表达, 进而激活Nrf2。

2 Nrf2/ARE信号通路胃癌的关系

免疫染色结果显示, 在所有类型的胃癌组织中, 约44%观察到核内Nrf2的累积。按照Lauren的分类, 胃癌可分为弥漫型胃癌、混合型胃癌和肠内型胃癌

三种, 其核内Nrf2的累积分别为58%、43%和29%。然而在正常的胃黏膜、胃表黏膜和胃黏膜腺细胞中均未发现Nrf2^[13]。由此推测, 胃癌中Nrf2的高表达对胃癌的发生起重要作用, 尤其是弥漫型胃癌。造成胃癌中Nrf2核内累积的原因有很多, Keap1或/Nrf2突变是其中最主要的因素, 约占50%^[14]。在未发生Keap1和Nrf2突变的胃癌中, Nrf2的核内累积则是通过其他多种途径调节实现的。在胃癌细胞中, p62高表达, 其阳性率接近100%^[15]。Zhang等^[16]首先发现, p62是一个肿瘤相关蛋白, 其作用可能是增加胰岛素样生长因子II的mRNA稳定性, 从而促进细胞的增殖, 加速肿瘤的发生。p62可与Keap1相互作用, 激活Nrf2并提高其稳定性, 使NQO1维持在一定水平^[17]。K-ras是ras家族中对人类癌症影响最大的基因, 它好像分子开关, 正常时能调控细胞生长的路径, 异常时则导致细胞持续生长, 阻止细胞自我毁灭。胃癌中K-ras发生突变, 该基因永久活化, 其编码的p21蛋白可与Nrf2结合, 增强Nrf2的稳定性, 提高基底Nrf2的抗氧化能力^[18]。

3 Nrf2/ARE信号通路参与胃癌耐药的机制

Nrf2/ARE信号通路是胃癌耐药产生的原因之一, 图1描绘了胃癌细胞中Nrf2/ARE信号通路可能的异常调控情况, 并列出了Nrf2/ARE信号通路参与胃癌耐药的可能机制。

3.1 调节下游基因表达, 诱导胃癌耐药的产生

目前认为, Nrf2的靶基因主要有NQO1、HO-1、GST、Mrps、UGT、GCLC、GCLM等, 其中多数已证实为肿瘤耐药机制的核心组成部分。

3.1.1 GST对化疗药物的灭活和解毒能力增强 谷胱甘肽S-转移酶(GST)是谷胱甘肽结合反应的关键酶, 催化谷胱甘肽结合反应的起始步骤。GST介导的MDR主要发生在烷化剂、蒽环类和铂类药物耐药细胞。许多非亲水性药物及毒物通过与GST结合, 水溶性增加, 易从细胞内移出, 或是GST催化这些药物或毒物与GSH(glutathione S-transferase)结合被GSX(glutamine synthetase X)泵排出体外, 使肿瘤细胞对某些化疗药物的抗性增高, 导致肿瘤耐药。Nrf2/ARE信号通路可调节GST的表达, 增强对化疗药物的灭活和解毒能力。薛英威等^[19]发现, 人胃癌耐药细胞株SGC7901/VCR对长春新碱的耐药性是SGC7901细胞株的16.56倍, Western blot检测GST的

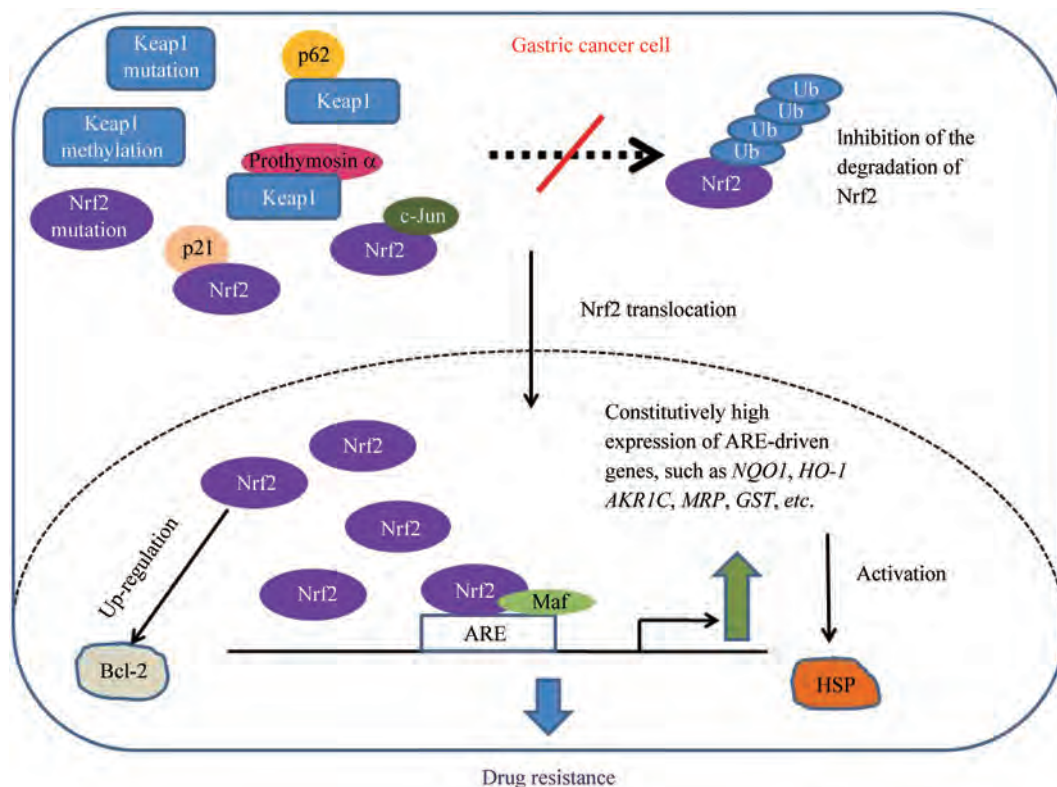


图1 胃癌细胞中Nrf2/ARE信号通路与耐药的关系

Fig.1 The relationship between Nrf2/ARE signaling pathway and drug resistance in gastric cancer cells

表达, 耐药细胞株明显高于非耐药细胞株, 当用三氧化二砷处理SGC7901/VCR细胞株24 h后, GST的表达降低, 同时耐药系数下降。

3.1.2 MRP转运化疗药物能力增强 多药耐药相关蛋白(multidrug resistance associated protein, MRP)属于ABC转运蛋白超家族(ATP-binding cassette transporter super-family)成员, 介导肿瘤细胞对一些疏水性的化疗药物, 如依托泊苷、表柔比星等产生耐药性。MRP主要分布在细胞膜上, 如同一个药物转运泵, 通过ATP水解释放能量将药物转运出细胞, 降低细胞内的药物浓度, 增强肿瘤细胞对化疗药物的耐受^[20]。Nrf2/ARE信号通路可调节MRP的表达, 增强转运化疗药物的能力。约55%的胃癌中MRP高表达^[21], 在耐阿霉素的胃癌细胞株中, MRP的表达明显高于敏感细胞株。更重要的是, MRP的表达对胃癌化疗方案的优化可能具有一定的指导意义。

3.1.3 HO-1抑制肿瘤细胞凋亡 血红素加氧酶HO-1(heme oxygenase-1)是血红素分解代谢过程中的限速酶。HO有三种类型: 氧应激诱导型HO-1、组成型HO-2及尚未明确的HO-3。HO-1过度表达可

促使肿瘤细胞增殖、抵抗氧化应激、血管生成及病灶转移, 在快速增长的肿瘤细胞中, HO-1具有抗氧化及抗凋亡效应^[22-23]。Nrf2/ARE信号通路可调节HO-1的表达, 抑制肿瘤细胞凋亡, 产生耐药。聚乙二醇锌原卟啉(Zinc protoporphyrin, ZnPP)可通过阻断HO-1的活性提高肿瘤细胞对喜树碱、阿霉素等化疗药物的敏感性, 这一作用是通过阻止Bcl-2和延迟Bag-1的表达来实现的^[24]。用siRNA降低HO-1的表达可诱导细胞凋亡, 其机制可能是增加Fas蛋白的表达和caspase-3的活性。

3.2 激活HSP, 影响胃癌耐药

一切生物细胞在环境温度升高或者有害理化因素的作用下, 都会产生一组特殊蛋白即热休克蛋白(HSP), 又称应激蛋白。HSP与肿瘤耐药性相关的机制目前有两种看法: 一是HSP直接参与了MDR1的表达或是P-gp蛋白构象的成熟和细胞定位; 二是HSP促进凋亡抑制的作用, 使细胞对化疗药物诱导的凋亡产生抗性, 该作用可能是通过下调细胞凋亡相关基因和蛋白酶活性(如SAPK/JNK和caspase等)从而拮抗细胞凋亡的。胃癌组织中HSP90 β 高表

达, 阳性率约为30%^[25], HSP27和HSP70的表达水平也有不同程度的提高^[26]。在耐长春新碱的胃癌细胞株SGC7901/VCR中, HSP90 β 的表达比SGC7901高。Ahmed等^[27]发现在氧化应激条件下, *Nrf2*和下游基因表达增加, HSP被激活。HSP的持续高表达降低了胃癌对化疗药物的敏感度, 增强了耐药性。

3.3 上调Bcl-2, 介导胃癌耐药

Bcl-2是一个细胞死亡的负调控因子, 在许多类型的细胞受到外界刺激时能保护细胞免于凋亡。Niture等^[28]研究发现, 在肿瘤细胞中, *Nrf2*上调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达, 为肿瘤细胞提供抗氧化保护, 抑制肿瘤细胞凋亡, 进而参与耐药的产生。Wang等^[29]研究发现, 在胃癌中, Bcl-2的表达增加, 肿瘤细胞的抗凋亡能力增强, 耐药性也随之增加。

4 小结

综上所述, *Nrf2*/ARE信号通路与胃癌耐药之间存在着密切联系。胃癌中*Nrf2*的异常调控, 引起下游蛋白表达或活性提高, 从而导致耐药性的产生。本综述对*Nrf2*/ARE信号通路与胃癌耐药的研究进展进行了归纳, 对胃癌的耐药机制进行了深入的探讨, 为胃癌的预防、治疗和预后提供了新的思路。近来, 本实验室和国际上一些研究小组的研究表明, 抑制*Nrf2*活性, 从而下调*Nrf2*调控基因的表达, 可以提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 给肿瘤的治疗带来新的希望。因此, *Nrf2*抑制剂的研究具有广阔的前景。

参考文献 (References)

- 顾玉兰, 朱海杭, 卜平. DNA甲基化与肿瘤多药耐药关系的研究进展. 实用癌症杂志(Gu Yulan, Zhu Haihang, Bu Ping. Research progress on DNA methylation and cancer multidrug resistance. The Practical Journal of Cancer) 2004; 19(6): 666-8.
- 廖绍兰, 王平. 肿瘤的多药耐药机制及逆转剂的研究进展. 国外医药抗生素分册(Liao Shaolan, Wang Ping. Research progress on multidrug resistance mechanism of cancer cells and its reversal agents. World Notes on Antibiotics) 2008; 29(1): 7-11.
- 高伟波, 陈书长, 赵春华. 肿瘤干细胞与肿瘤耐药. 基础医学与临床(Gao Weibo, Chen Shuchang, Zhao Chunhua. Cancer stem cells and drug resistance. Basic and Clinical Medicine) 2006; 26(6): 662-6.
- Tang X, Wang H, Fan L, Wu X, Xin A, Ren H, *et al.* Luteolin inhibits *Nrf2* leading to negative regulation of the *Nrf2*/ARE pathway and sensitization of human lung carcinoma A549 cells to therapeutic drugs. Free Radic Biol Med 2011; 50(11): 1599-609.
- Hanada N, Takahata T, Zhou Q, Ye X, Sun R, Itoh J, *et al.* Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer. BMC Cancer 2012; 12: 66.
- Hayes JD, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: Permanent activation of an adaptive response in cancer. Trends Biochem Sci 2009; 34(4): 176-88.
- 毛景涛, 叶尔买克·唐沙哈尔, 沈辉, 王周权, 张明鑫, 陈敬信, 等. *Nrf2*在食管鳞癌组织中的表达及意义. 细胞与分子免疫学杂志(Mao Jingtao, Ermek·Tangsakar, Shen Hui, Wang Zhouquan, Zhang Mingxin, Chen Jingxin, *et al.* Expression and clinical significance of *Nrf2* in esophageal squamous cell carcinoma. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology) 2011; 27(11): 1231-3.
- Kim YR, Oh JE, Kim MS, Kang MR, Park SW, Han JY, *et al.* Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. J Pathol 2010; 220(4): 446-51.
- Lau A, Wang XJ, Zhao F, Villeneuve NF, Wu T, Jiang T, *et al.* A noncanonical mechanism of *Nrf2* activation by autophagy deficiency: Direct interaction between Keap1 and p62. Mol Cell Biol 2010; 30(13): 3275-85.
- Mel'nikov SV, Evstaf'eva AG, Vartapetian AB. Prothymosin alpha interaction with KEAP1 doesn't lead to prothymosin alpha ubiquitination and degradation. Mol Biol (Mosk) 2007; 41(5): 868-75.
- Chen W, Sun Z, Wang XJ, Jiang T, Huang Z, Fang D, *et al.* Direct interaction between *Nrf2* and p21(Cip1/WAF1) upregulates the *Nrf2*-mediated antioxidant response. Mol Cell 2009; 34(6): 663-73.
- Jaiswal AK. Regulation of genes encoding NAD(P)H: Quinone oxidoreductases. Free Radic Biol Med 2000; 29(3/4): 254-62.
- Yoo NJ, Kim YR, Lee SH. Expression of NRF2, a cytoprotective protein, in gastric carcinomas. Apmis 2010; 118(8): 613-4.
- Yoo NJ, Kim HR, Kim YR, An CH, Lee SH. Somatic mutations of the KEAP1 gene in common solid cancers. Histopathology 2012; 60(6): 943-52.
- Qian HL, Peng XX, Chen SH, Ye HM, Qiu JH. p62 expression in primary carcinomas of the digestive system. World J Gastroenterol 2005; 11(12): 1788-92.
- Zhang JY, Chan EK, Peng XX, Tan EM. A novel cytoplasmic protein with RNA-binding motifs is an autoantigen in human hepatocellular carcinoma. J Exp Med 1999; 189(7): 1101-10.
- Kwon J, Han E, Bui CB, Shin W, Lee J, Lee S, *et al.* Assurance of mitochondrial integrity and mammalian longevity by the p62-Keap1-Nrf2-Nqo1 cascade. EMBO Rep 2012; 13(2): 150-6.
- DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K, *et al.* Oncogene-induced *Nrf2* transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. Nature 2011; 475(7354): 106-9.
- 薛英威, 韩继广, 李宝馨, 杨宝锋. 三氧化二砷对胃癌细胞SGC7901多药耐药的逆转作用及其机制. 药学报(Xue Yingwei, Han Jiguang, Li Baoxin, Yang Baofeng. Reversal effect and mechanism of arsenic trioxide on multidrug resistance of gastric carcinoma cells SGC7901. Acta Pharmaceutica Sinica) 2007; 42(9): 949-53.
- Zaman GJ, Flens MJ, van Leusden MR, de Haas M, Mulder HS, Lankelma J, *et al.* The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91(19): 8822-6.
- Alexander D, Yamamoto T, Kato S, Kasai S. Histopathological

- assessment of multidrug resistance in gastric cancer: Expression of P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein, and lung-resistance protein. *Surg Today* 1999; 29(5): 401-6.
- 22 辛 爱, 唐修文. Nrf2_ARE信号通路与肿瘤发生及耐药性的关系. *细胞生物学杂志(Xin Ai, Tang Xiuwen. The role of Nrf2_ARE signal pathway in tumorigenesis and drug resistance. Chinese Journal of Cell Biology)* 2009; 31(3): 319-24.
- 23 Tanaka S, Akaike T, Fang J, Beppu T, Ogawa M, Tamura F, *et al.* Antiapoptotic effect of haem oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour. *Br J Cancer* 2003; 88(6): 902-9.
- 24 Fang J, Sawa T, Akaike T, Greish K, Maeda H. Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a heme oxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin. *Int J Cancer* 2004; 109(1): 1-8.
- 25 Liu X, Ye L, Wang J, Fan D. Expression of heat shock protein 90 beta in human gastric cancer tissue and SGC7901/VCR of MDR-type gastric cancer cell line. *Chin Med J (Engl)* 1999; 112(12): 1133-7.
- 26 Ehrenfried JA, Herron BE, Townsend CM Jr, Evers BM. Heat shock proteins are differentially expressed in human gastrointestinal cancers. *Surg Oncol* 1995; 4(4): 197-203.
- 27 Ahmed K, Furusawa Y, Tabuchi Y, Emam HF, Piao JL, Hassan MA, *et al.* Chemical inducers of heat shock proteins derived from medicinal plants and cytoprotective genes response. *Int J Hyperthermia* 2012; 28(1): 1-8.
- 28 Nitire SK, Jaiswal AK. Nrf2 up-regulates anti-apoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *J Biol Chem* 2012; 287(13): 9873-86.
- 29 Wang JH, Du JP, Zhang YH, Zhao XJ, Fan RY, Wang ZH, *et al.* Dynamic changes and surveillance function of prion protein expression in gastric cancer drug resistance. *World J Gastroenterol* 2011; 17(35): 3986-93.

Nrf2/ARE Signaling Pathway and Drug Resistance in Gastric Cancer

Geng Miao, Tang Xiuwen*

(Department of Biochemistry and Genetics, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

Abstract Gastric cancer is the second leading cause of cancer mortality worldwide. The major cause of treatment failure for gastric cancer is drug resistance to chemotherapy, which is currently one of the primary treatment options. Nrf2 as a key transcription factor, in response to oxidative stress, can bind to antioxidant response element ARE to regulate the expression of target genes of phase II detoxification enzymes, antioxidant enzymes and some drug transporter genes positively, which induce drug resistance of gastric cancer. In this review, we summarize Nrf2/ARE signaling pathway and drug resistance in gastric cancer.

Key words Nrf2/ARE signaling pathway; gastric cancer; drug resistance

Received: May 21, 2012 Accepted: July 30, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31170743) and the Science and Technology Foundation of Zhejiang Province (No.2011C23078)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-88208266, E-mail: xiuwentang@zju.edu.cn