

# Nrf2的代谢调节作用与肿瘤的生长和增殖

周天域 吕鑫 陈雨桐 樊秋菊\* 蔡蓉\*

(上海交通大学医学院, 生物化学与分子细胞生物学系, 上海 200025)

**摘要** 核转录因子Nrf2[nuclear factor erythroid 2 (NFE2) related factor 2]是细胞内重要的调节因子。通过与Keap1(Kelch-like-ECH associated protein 1)蛋白质的相互作用, Nrf2可以调控下游基因转录, 发挥抗氧化应激、维持细胞内稳态的功能, 而Nrf2在肿瘤细胞中的表达与肿瘤的发生发展具有重要关系。Nrf2通过调节肿瘤细胞代谢模式调控细胞生长和增殖, 近年来成为了细胞生物学和肿瘤生物学领域的研究热点之一。该文介绍了Nrf2对于活性氧分子产生与清除以及多种物质代谢途径的调控作用, 着重阐明Nrf2的代谢调节作用对肿瘤细胞生长增殖的影响及其与肿瘤耐药的关系, 旨在为今后的临床研究提供更多信息。

**关键词** Nrf2; 代谢调节; 肿瘤生长; 肿瘤增殖

## The Function of Nrf2 in Metabolic Regulation and Its Role in Tumor Growth and Proliferation

Zhou Tianyu, Lü Xin, Chen Yutong, Fan Qiuju\*, Cai Rong\*

(Department of Biochemistry & Molecular Cell Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

**Abstract** The Nrf2 [nuclear factor erythroid 2 (NFE2) related factor 2], whose activity is regulated by Keap1 (Kelch-like-ECH associated protein 1) through proteasomal degradation, plays a cytoprotective role in the cell by facilitating downstream gene transcription for defending against oxidative stress and maintaining cellular redox homeostasis. Besides, the existence of Nrf2 in cells is of great significance in tumor metabolism and growth, which becomes one of the current research focuses in cell and cancer biology. In this paper, we reviewed the effects of Nrf2 on the generation and scavenging of ROS (reactive oxygen species) and cellular metabolism. In addition, we also focused on how Nrf2 affects tumor growth and proliferation through metabolic regulation, and introduced its relationship to tumor drug resistance in order to cast insight on further clinical research.

**Keywords** Nrf2; metabolic regulation; tumor growth; tumor proliferation

Nrf2[nuclear factor erythroid 2 (NFE2) related factor 2]是CNC亮氨酸拉链转录激活因子(CNC-basic leucine zipper, CNC-bZIP)家族的成员之一, 于1994年被发现<sup>[1]</sup>。Nrf2的表达受其抑制性结合蛋白Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1)影响, 在

细胞内保持稳定水平<sup>[2-3]</sup>。随着研究的深入, Nrf2被证实参与多种基因的转录激活, 调控下游抗氧化蛋白应对氧化应激<sup>[2-4]</sup>。有趣的是, 通过对Nrf2敲除小鼠的研究发现, Nrf2对肿瘤的发生发展呈现出双刃剑的作用——生理状态下, 它能够保护正常细胞、

收稿日期: 2016-09-24 接受日期: 2016-12-14

上海交通大学医学院临床医学八年制RBL项目、上海交通大学医学院第十期大学生创新训练项目(批准号: 2016035)和国家自然科学基金(批准号: 81572691)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-63846590-778026, E-mail: fanqiuju93@shsmu.edu.cn; E-mail: rongcai@shsmu.edu.cn

Received: September 24, 2016 Accepted: December 14, 2016

This work was supported by the Shanghai Jiaotong University School of Medicine Eight-year Clinical Medicine RBL Program, Shanghai Jiaotong University School of Medicine the 10th Innovative Practice Program for Undergraduates (Grant No.2016035) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81572691)

\*Corresponding authors. Tel: +86-21-63846590-778026, E-mail: fanqiuju93@shsmu.edu.cn; E-mail: rongcai@shsmu.edu.cn

网络出版时间: 2017-02-27 15:20:50 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170227.1520.006.html>

抑制肿瘤发生;但在肿瘤发展过程中,它对肿瘤的生长、增殖及耐药性的产生又有促进作用<sup>[5-7]</sup>。因此,大量的研究开始关注Nrf2对肿瘤生物学行为的影响。近来发现,Nrf2对肿瘤细胞的代谢调节十分重要,它通过参与活性氧生成与清除、糖脂代谢、丝氨酸和一碳单位代谢等重要的细胞内代谢过程的调控,影响肿瘤细胞生长、增殖、死亡等重要的生命活动过程。有关Nrf2在肿瘤中的两面性作用请见Menegon等<sup>[8]</sup>撰写的综述。Chartoumpakis等<sup>[9]</sup>在2015年对Keap1/Nrf2通路在肿瘤和非肿瘤代谢中的作用进行了介绍。而本综述主要围绕Nrf2在代谢调节中的重要作用,就它与肿瘤生长与增殖的联系展开,以期临床肿瘤的靶向治疗提供新的可能。

## 1 Keap1-Nrf2-ARE信号通路

### 1.1 Nrf2的结构特征

Nrf2包含7个Neh(Nrf2-ECH homology)同源结构域,即Neh1~Neh7。其中,定位于N-端的Neh2结构域对于调控Nrf2的稳定性和活性最为重要<sup>[10]</sup>,包含7个可受泛素化修饰的赖氨酸残基以及2个Keap1结合位点(ETGE和DLG)<sup>[11]</sup>,Keap1通过这2个结合位点与Nrf2相连接。Neh1和Neh6结构域也可调控Nrf2的稳定性。Neh1包含一个亮氨酸拉链结构bZIP(basic leucine zipper),是Nrf2与其他转录因子的结合位点<sup>[1]</sup>。另外,有研究表明,Neh1还可受到泛素连接酶UbcM2(ubiquitin-conjugating enzyme M2)的修饰,调控Nrf2的稳定性<sup>[12]</sup>。Neh6结构域包含2个与 $\beta$ -TrCP( $\beta$ -transducin repeats-containing proteins)结合的位点<sup>[13]</sup>。Neh3、Neh4、Neh5结构域能够感受细胞外激活剂的影响,转录激活Nrf2的下游靶基因。Neh3结构域的功能是促进一些辅激活蛋白的招募,如CHD6(chromodomain helicase DNA binding protein 6)等<sup>[14]</sup>。近来研究发现,Neh7结构域可与核受体RXR $\alpha$ (retinoic X receptor  $\alpha$ )发生直接结合,RXR $\alpha$ 敲除后将上调抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)驱动基因表达;反之,过量表达RXR $\alpha$ 则会下调相应基因的表达<sup>[15]</sup>。

### 1.2 Keap1对Nrf2的活性调节

Nrf2的表达受到转录和翻译后水平的调控,其中Keap1-Nrf2通路是其受调控的主要机制。体内的泛素-蛋白酶体系统将Nrf2的量控制在较低水平,被泛素化修饰的Nrf2会被迅速降解<sup>[4]</sup>。Keap1是

Nrf2在细胞质中的接头蛋白,有2个Nrf2的结合位点,通过其BTB(broad complex, tramtrack and bric-a-brac)区结合Nrf2,将Nrf2连接到Keap1-Cul3-E3复合体<sup>[16]</sup>。当细胞内发生氧化应激或有亲电刺激信号传入,如活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)累积时,Keap1蛋白的半胱氨酸残基被氧化,改变Keap1的空间构象,导致DLG(dosimetric leaf gap)序列与Keap1的亲和力减弱而分离,释放出游离的Nrf2进入细胞核,与靶基因上的ARE结合,促进靶基因的转录<sup>[17]</sup>。除此之外,Nrf2还参与调控与转录因子NF- $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B)、转化相关蛋白53(transformation related protein 53, p53)、AHR(aryl hydro-carbon hydroxylase receptor)等有关的信号通路,发挥相应作用<sup>[18]</sup>。现已发现许多蛋白质经磷酸化、乙酰化等修饰后调节Nrf2的活性<sup>[19]</sup>,可见Keap1-Nrf2通路受到复杂精密的细胞信号转导网络调控。

此外,有研究发现,癌基因对于Nrf2的转录能够起到调控作用。在肿瘤细胞中,Ras/Raf/MEK(mitogen-activated protein kinase)/ERK(extracellular-signal-regulated kinase)信号转导途径中的K-RasG12D与B-RafV619E均能够通过c-Jun(cellular-jun proto-oncogene)及c-Myc(cellular-myelocytomatosis viral oncogene)增强Nrf2的转录,降低细胞内ROS水平,促进肿瘤的发生与生长<sup>[20]</sup>。

### 1.3 Nrf2-ARE通路

当体内氧自由基过量聚集超过机体代偿能力时,体内的氧化-抗氧化平衡遭到破坏,接受刺激信号后的Nrf2与Keap1脱离,使游离的Nrf2增加并易位至细胞核,与小Maf(v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog)(如MafG)蛋白质形成异二聚体,结合于靶基因的ARE上,激活各种受其调控的细胞保护基因的转录<sup>[21]</sup>。Nrf2-ARE通路在内源性抗氧化应答机制中十分重要。目前研究发现,由Nrf2-ARE通路调节的内源性保护基因主要有抗氧化蛋白,如抗氧化酶NAD(P)H:醌氧化还原酶1(NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1, NQO1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)和血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)<sup>[22]</sup>。上述酶类含量的升高,能够保护机体免受活性物质(如ROS和RNS)及

一些毒性物质(如致癌物、药物代谢活化产物等)的侵害。

体内动物实验研究表明,与野生型相比, *Nrf2* 敲除的小鼠对氧化应激引起的损伤敏感性增高。可见, Nrf2-ARE通路在抗氧化损伤、抗应激、抗炎反应等方面有重要作用。此外,对于神经系统中该通路的研究发现,星形胶质细胞中Nrf2的过表达可保护神经元免受氧化损伤,可能对神经退行性病变有预防作用<sup>[23]</sup>。

## 2 Nrf2的代谢调节作用

### 2.1 Nrf2调节ROS的生成与清除

由于ROS(如H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、O<sub>2</sub><sup>-</sup>等)的强氧化性所带来的细胞毒性会造成DNA片段的损伤,这与肿瘤的发生发展关系密切。ROS的生成由NAD(P)H酶、黄嘌呤氧化酶或以线粒体电子传递链中半醌复合物为例的氧化还原反应复合物调控<sup>[24]</sup>。Nrf2主要通过线粒体及NAD(P)H酶调控ROS的生成。实验证实, *Nrf2* 敲除后线粒体生成ROS速率增加,其原因是Nrf2的缺失造成底物不足,损伤复合体I的功能,也可能与复合体II的电子逆流相关<sup>[25]</sup>。Nrf2也可通过控制ROS底物活性和线粒体脂肪酸氧化,影响氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)过程,调节线粒体ROS的产生<sup>[26-27]</sup>。在*Nrf2* 敲除的条件下,2种亚型的NAD(P)H酶催化亚基——NOX2和NOX4相应增加和减少,说明Nrf2与NOX4之间存在负反馈。在内环境稳态条件下,NOX4催化生成过氧化物以及过氧化氢,通过半胱氨酸感受器的氧化以及Keap1的失活途径激活Nrf2, Nrf2抑制NOX4转录从而减少ROS的生成<sup>[28]</sup>。此外,研究发现, Nrf2与MafG的SUMO(small ubiquitin-like modifier)化可以增加谷氨酸-半胱氨酸连接酶催化亚基(glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC)的表达<sup>[29]</sup>。GCLC是谷氨酸-半胱氨酸连接酶(glutamate-cysteine ligase, GCL)的亚基,是细胞内催化生成谷胱甘肽(glutathione, GSH)的限速酶<sup>[19]</sup>。GSH是起到抗氧化防御的重要分子,还原型谷胱甘肽的巯基可以被氧化,生成氧化型谷胱甘肽,后者在NADPH存在的条件下还原成还原型谷胱甘肽,形成氧化还原循环,消除细胞中的ROS。

### 2.2 Nrf2与物质代谢调节

近几年来, Nrf2在细胞物质代谢(包括糖脂、

丝氨酸、一碳单位代谢等)调节中的重要作用受到研究者的关注。在肺癌细胞中, Nrf2启动磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)中的酶编码基因的转录过程,包括葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G-6-PD)、磷酸葡萄糖酸脱氢酶(phosphogluconate dehydrogenase, PGD)、转酮醇酶(transketolase, TKT)和转醛醇酶-1(transaldolase-1, TALDO-1)以及合成NADPH相关酶的编码基因,包括苹果酸酶1(malic enzyme 1, ME1)和异柠檬酸脱氢酶1(isocitrate dehydrogenase 1, IDH1),促进NADPH的合成;同时, Nrf2激活核苷酸从头合成途径的相关基因磷酸核糖焦磷酸氨基转移酶(phosphoribosyl pyrophosphate aminotransferase, PPAT)和亚甲基四氢叶酸脱氢酶-2(methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-2, MTHFD-2),加速核苷酸合成代谢。在*Nrf2* 敲除的细胞内,嘌呤核苷酸合成的初级产物磷酸核糖焦磷酸(phosphoribosyl pyrophosphate, PRPP)和次黄嘌呤核苷酸(inosine monophosphate, IMP)有所减少,证明Nrf2对于嘌呤核苷酸的从头合成途径也很重要<sup>[30]</sup>。

利用iTRAQ(isobaric tags for relative and absolute quantitation)分析发现, Nrf2可影响多条脂质代谢途径,包括多不饱和脂肪酸生物合成途径、通过肝脏X受体(liver X receptors, LXRs)、NF-Y(nuclear factor-Y)和SREBP(sterol regulatory element binding protein)对于脂质代谢的调控途径、脂肪酸的 $\omega$ -氧化途径等<sup>[31]</sup>。研究表明, Nrf2对于脂质代谢主要起到负调节的作用。例如CDDO-Im(synthetic oleanolic triterpenoid 1-[2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oyl]imidazole)依赖Nrf2下调脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)、乙酰辅酶A羧化酶1(acetyl CoA carboxylase 1, ACC1)、乙酰辅酶A羧化酶2(ACC2)等脂质合成的相关蛋白质<sup>[32]</sup>。并且, Nrf2负调节ATP-柠檬酸裂解酶,抑制乙酰辅酶A生成,是调控脂质沉积的重要分子<sup>[31]</sup>。另一方面, Nrf2也可通过ATF4(activating transcription factor 4)调控丝氨酸/谷氨酸合成的关键酶的表达,如磷酸甘油酸脱氢酶(phosphoglycerate dehydrogenase, PHGDH)、磷酸丝氨酸氨基转移酶(phosphoserine aminotransferase, PSA)和丝氨酸羟甲基转移酶(serine hydroxymethyltransferase, SHMT)<sup>[33]</sup>,活化ME1来促进谷氨酰胺分解,辅助谷胱甘肽以及核苷酸的生

成<sup>[30]</sup>。目前,由Nrf2/SKN-1(Nrf2/skinhead-1)调控的脯氨酸分解代谢与脂质代谢的联系已被证实,保守的脯氨酸分解代谢酶——醛脱氢酶-6(aldehyde dehydrogenase-6, ALH-6)的突变增强脂肪动员,上调脂肪酸氧化关键酶等基因的表达,该途径与机体在营养缺乏时的生存密切相关<sup>[34]</sup>。

### 2.3 Nrf2在代谢性疾病中的病理调控作用

目前研究发现,Nrf2与脂肪肝、糖尿病等代谢性疾病的发生与发展具有紧密联系。Nrf2能够抑制脂质的摄取和合成,并激活大量应对氧化应激的酶类,抑制由缺乏甲硫氨酸和胆碱饮食(methionine and choline-deficient diet, MCD)引起的非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)的发生<sup>[35]</sup>。Nrf2能够通过芳烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AHR)编码基因上的ARE相结合,通过AHR信号转导途径抑制脂肪细胞的分化<sup>[36]</sup>。同时,也有研究表明,Nrf2可以通过与过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (peroxisome proliferators-activated receptor gamma, Ppar $\gamma$ )基因启动子结合激活其转录,促进脂肪细胞的分化<sup>[37]</sup>。

此外,由于Nrf2对于氧化应激反应和代谢的调控,其在糖尿病的发生与发展过程中也发挥了重要的病理调控作用。在健康小鼠体内敲除*Keap1*激活Nrf2,可显著抑制糖尿病的发生,特别是由高脂饮食诱发的糖尿病;而在糖尿病动物模型中,胰岛素敏感性及胰岛素分泌均得到显著改善,血糖水平下降,表明Nrf2可控制和改善糖尿病<sup>[38]</sup>。

## 3 Nrf2与肿瘤细胞代谢

### 3.1 肿瘤细胞的代谢特征

与正常细胞相比,肿瘤细胞通过有氧糖酵解来获得能量,即细胞中大部分丙酮酸不进入线粒体参与三羧酸循环产生ATP,而是在乳酸脱氢酶A(lactate dehydrogenase A, LDHA)的催化下还原为乳酸,这种现象称为瓦伯格效应(Warburg effect)<sup>[37]</sup>。多种因素可以诱导这种代谢转变。例如,局部缺氧的条件下会稳定低氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia induced factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ),促进血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和人内皮细胞环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)的生成,调节肿瘤血管新生。HIF-1 $\alpha$ 也上调葡萄糖转运体1(glucose transporter 1, GLUT1)的表达,提高葡萄糖的摄取,为

肿瘤生长提供原料<sup>[39]</sup>。除此以外,即便在氧充足的情况下,研究者发现,癌基因和抑癌基因对HIF-1 $\alpha$ 的活性也有影响,如*Ras*基因可抑制HIF-1 $\alpha$ 羟基化而提高它的表达,再通过上述机制促肿瘤生长<sup>[40]</sup>。此外,大量研究证明,线粒体功能受损可导致丙酮酸脱氢酶复合物(pyruvate dehydrogenase complex, PDC)合成受阻,丙酮酸不能正常脱氢脱羧生成乙酰CoA进入三羧酸循环,直接造成了细胞有氧糖酵解的现象<sup>[41]</sup>。

这种代谢方式对于肿瘤细胞的生长和增殖十分重要,糖酵解的上调为合成大量生物大分子(biomass)提供足够的原料。经过对碳原子示踪实验的研究,证实许多生物分子(如核苷酸、氨基酸、脂质等)与糖酵解中间产物有紧密联系,生物合成途径对糖酵解效率的下调极为敏感。此外,多余的葡萄糖通过磷酸戊糖途径转变为NADPH和磷酸-5-核糖(ribose 5-phosphate, R-5-P),而NADPH和R-5-P分别是合成脂质和核酸分子的重要中间代谢产物,直接决定细胞的增殖速度<sup>[42]</sup>。此外,大量乳酸的合成成为肿瘤创造酸性环境,更利于其浸润转移。肿瘤细胞对氮原子也有很高需求,其主要来源是谷氨酰胺。细胞大量增殖所需的嘌呤核苷酸、嘧啶核苷酸、葡萄糖胺-6-磷酸(glucosamine-6-phosphate, GlcN-6-P)及一些非必需氨基酸的合成,都需要谷氨酰胺的参与。谷氨酰胺还帮助细胞摄取营养必需氨基酸,满足生物合成所需。研究发现,细胞间的谷氨酰胺可以促进L-氨基酸转运蛋白1(L-type amino acid transporter 1, LAT1)的底物进入胞内,包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸<sup>[43]</sup>。

正常细胞需要生长因子的刺激,通过相应的信号转导途径,严格调控细胞营养物质的摄取。然而,肿瘤细胞的增殖可不依赖于生长因子等外界因素的调控<sup>[44]</sup>。肿瘤细胞中癌基因的异常活化与抑癌基因的丢失会通过多种途径,持续提高细胞对葡萄糖、谷氨酰胺及必需氨基酸的摄入,最后进入不可控的增殖状态<sup>[45]</sup>。其中,磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)-蛋白激酶B(protein kinase B, PKB, 又称AKT)(PI3K-AKT)信号通路对葡萄糖摄取起到了重要调节作用。该通路不仅可促进*GLUT1* mRNA的表达,而且能诱导它从细胞内易位至细胞膜内表面,提高葡萄糖的摄取<sup>[46]</sup>。另外,AKT能够激活己糖激酶

(hexokinase, HK)磷酸化葡萄糖, 并激活磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK), 催化糖酵解中的限速步骤。Ras也被证实可上调*GLUT1* mRNA的表达, 增加葡萄糖的摄入。转录因子c-Myc则在调节谷氨酰胺的吸收上有重要作用, 其通过诱导谷氨酰胺转运体*ASCT2*(alanine cysteine seine transporter)和*SN2*(system N transporter 2)的转录, 促进谷氨酰胺酶*GLS1*(glutaminase 1)、磷酸核糖焦磷酸合成酶(phosphoribosyl pyrophosphate synthetase, PRPS2)和氨甲酰磷酸合酶(carbamoyl phosphate synthase, CAD)的表达, 将谷氨酰胺转化为谷氨酸盐, 转化成 $\alpha$ -酮戊二酸进入三羧酸循环, 参与细胞合成代谢<sup>[41]</sup>。

### 3.2 Nrf2在肿瘤细胞中对合成代谢的调节作用

研究显示, 在多种肿瘤细胞(包括肺癌、胰腺癌等)中, Nrf2呈现高表达, 造成这种现象的原因多与*Keap1*基因有关。现已证实在肺癌细胞中, *Keap1*基因突变后导致的*Keap1*蛋白改变阻止了E3泛素连接酶的作用, Nrf2不能被泛素化降解而在细胞核中累积<sup>[47-48]</sup>。另外, 在肺癌、前列腺癌等细胞中, *Keap1*基因启动区的DNA甲基化会下调*Keap1*基因表达, 导致Nrf2的高表达<sup>[49-50]</sup>。除*Keap1*基因突变外, *Nrf2*突变也会影响*Keap1*-Nrf2间的相互作用, 其Neh2结构域与*Keap1*结合的2个结合位点-ETGE和DLG发生突变, 会抑制Nrf2的泛素化降解, 导致Nrf2积聚<sup>[11]</sup>。

如本文2.2中所述, Nrf2可从多方面改变肿瘤细胞的代谢途径, 促进增殖。代谢相关酶, 如参与脂肪酸 $\beta$ 氧化的线粒体酶系、丙酮酸脱氢酶激酶(pyruvate dehydrogenase kinase, PDK)等, 多含半胱氨酸残基, 可被ROS/RNS氧化, 形成二硫键, 导致酶失活<sup>[51]</sup>。因此, Nrf2可通过影响ROS间接调控相关酶的活性, 进而调控细胞脂肪酸氧化及丙酮酸进入三羧酸循环等代谢过程。丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)的358和436位的半胱氨酸残基亦受ROS影响, 使其活性受到抑制, 导致更多的葡萄糖进入磷酸戊糖途径, 积累代谢中间产物<sup>[52]</sup>。在肺癌细胞中, PI3K-AKT信号通路的持续激活, 可以增加Nrf2在细胞核中的积聚, 改变肿瘤细胞中葡萄糖和谷氨酰胺的合成代谢途径, 促进磷酸戊糖途径, 使还原剂NADPH和重要中间代谢产物R-5-P的合成增多, 提高肿瘤细胞的合成代谢效率<sup>[30]</sup>。实验证明, Nrf2还可调控miR-1与miR-206的表达, 这些miRNA可拮抗其下游靶基因*G-6-PD*、*PGD*和*TKT*的表达。在肿瘤细胞中, Nrf2积聚抑制

miR-1与miR-206的活性, 增强磷酸戊糖途径代谢效率<sup>[53]</sup>。此外, 如2.1和2.2所述, 由于Nrf2可增强GCLC及ME1的表达, 使肿瘤细胞GSH合成增加。GSH作为细胞内的还原剂, 是起到抗氧化作用的重要分子, 其高表达体现了肿瘤细胞中氧化应激水平的变化。GSH通过降低肿瘤细胞中ROS水平, 促进肿瘤细胞的生长<sup>[30]</sup>。

### 3.3 Nrf2与肿瘤细胞增殖调控

组织学研究在胃肠等上皮组织的肥厚部分观察到大量Nrf2积聚, 提示正是Nrf2的积聚激活代谢相关基因的表达, 引起细胞大量增殖<sup>[30]</sup>。并且, 在胃肠中的代谢相关基因能被激活, 而肝脏中的水平远低于前者, 两种表型的差异说明, Nrf2需在具有增殖信号的细胞中才能发挥调控代谢的作用。

有研究者在研究了表皮生长因子受体(epidermal growth factor, EGFR)介导的信号通路对Nrf2的影响后发现, 在上皮细胞中, EGFR对循环牵张力(cyclic stretch)诱导的Nrf2依赖性ARE介导的转录应答十分必要<sup>[54]</sup>。在肺癌细胞株NCI-H292中, EGFR/MAPK信号通路可激活Nrf2, 进而促进细胞增殖。而在肺癌细胞株A549中, *Keap1*突变使Nrf2高表达, 在这样的背景下, Nrf2的激活不能被表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinases inhibitor, EGFR-TKI)阻断, 说明了*Keap1*突变对Nrf2的调控作用更为主要<sup>[55]</sup>。

此外, 作为最常见的EGFR下游通路之一, 上文提到的PI3K-AKT信号通路对Nrf2的影响也被证实。当该通路被阻断时, *Keap1*沉默细胞中原先高表达的代谢相关基因会下降至野生型水平<sup>[56]</sup>, 说明它对Nrf2起促进作用。值得注意的是, Nrf2与PI3K-AKT信号通路的作用受到抑癌基因*Pten*的影响。*Pten*蛋白质是一种磷酸酶, 调控细胞进入凋亡过程, 避免生长失控的细胞进一步形成肿瘤。正常情况下, *Pten*使磷脂酰肌醇三磷酸(phosphatidylinositol triphosphate, PIP3)去磷酸化, 将PI3K-AKT信号通路下调至适当的水平。*Pten*缺失时, PIP3积聚, 磷酸化AKT第1308位丝氨酸残基, 使其活化。如本文3.2中所述, PI3K-AKT信号通路是通过增加Nrf2亲核性来提高其活性的, 而该实验又证明, 活化的Nrf2可通过影响AKT的磷酸化激活PI3K-AKT信号通路, 这种正反馈机制是Nrf2对于肿瘤生长增殖作用的基础<sup>[30]</sup>。

在胰管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma,

PDA)中, Kras(Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)也有独特的作用。在Kras诱导下, Nrf2通过刺激持续增殖和抑制凋亡进程造成胰腺上皮内瘤样病变, 启动胰腺癌的发生。Nrf2能特异性调节胞质中的ROS, 调节氧化还原平衡, 通过Kras突变的胰腺上皮细胞中的AKT, 促进EGFR的自分泌信号, 启动cap依赖的翻译进程<sup>[57]</sup>。这些效应都能够为PDA的发生与扩散创造条件。

除此以外, 还有研究证实在人乳腺癌细胞中, HER2和Nrf2可以相互调控。通过RT-qPCR的分析, 研究者发现, 在MCF7细胞中, HER2与Nrf2单独过表达可以使另一个的mRNA水平提高1.5~2倍, 且两者同时过表达可以进一步上调HER2的水平, 并激活下游MDR1(multidrug resistance gene 1)、NQO1、GCLC等多种基因<sup>[58]</sup>。相反地, Nrf2的缺失可以抑制HER2和HER3表达, 降低这两种受体的水平, 并能提高对靶向化疗药物的敏感性<sup>[59]</sup>。可见, 在人乳腺癌细胞中, HER2与Nrf2的相互作用对其生长增殖及耐药性的产生起到重要作用。

由以上在多种肿瘤细胞中的研究结果可以发现, 细胞内的增殖信号对Nrf2的功能极为重要, 各自以不同的方式影响它对于肿瘤细胞生长、增殖及耐药性产生的调控过程。

### 3.4 Nrf2在肿瘤治疗和耐药中的作用

Nrf2在肿瘤细胞治疗和耐药过程中也发挥了重要作用<sup>[60]</sup>。抗肿瘤药物一般在体内经历两相代谢过程。一相代谢主要是官能团反应, 在P450酶系的作用下对药物分子进行氧化、还原、羟化等作用, 致使药物失活; 二相代谢主要是在代谢酶的作用下, 将一些内源性的极性小分子共价结合到一相代谢物上致其失活。二相代谢相关酶的异常表达与肿瘤耐药有密切关系, 其最经典的调控通路就是Nrf2-Keap1-ARE途径<sup>[61]</sup>。许多研究表明, 该通路介导的下游基因多与肿瘤耐药机制有密切联系<sup>[62]</sup>, 如谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferases, GSTs)。与野生型小鼠相比, 在Nrf2敲除小鼠体内, GSTs的一种同工酶GSTM1/2(glutathione S-transferase M1/2)的基础表达下降3~6倍, 提示Nrf2可调控GSTs的活性。自从发现GSTs同工酶的异常表达与肿瘤的耐药有关以来, 越来越多的实验证实, GSTs可代谢抗肿瘤药物, 其机理可能与这些抗肿瘤药物具有亲电性有关。除调控二相代谢相关酶表达之外, Nrf2还可联合其他通路,

串联多种耐药机制。运用siRNA干扰Nrf2表达后, 可提高多种肿瘤细胞对化疗药物的敏感性<sup>[63]</sup>。

## 4 结语与展望

随着对Nrf2的研究深入, 越来越多的证据表明, Nrf2在细胞代谢以及肿瘤的生长增殖中具有重要作用。Nrf2作为一种重要的转录因子, 一方面可以通过调控正常细胞中ROS的生成与清除, 减少正常细胞内的氧化损伤, 抑制肿瘤发生; 另一方面, Nrf2可参与多种物质的代谢途径, 通过调控肿瘤细胞中一些代谢相关酶的活性而促进肿瘤生长与增殖, 同时它还与肿瘤耐药性的产生有关。基于Nrf2的双重作用, Nrf2抑制剂将会在抑制肿瘤生长与增殖、提高肿瘤化疗敏感性等方面做出巨大贡献, 也将为肿瘤治疗及预后提供新思路。

### 参考文献 (References)

1. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. 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 beta-globin locus control region. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91(21): 9926-30.
2. Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system in cancers: Stress response and anabolic metabolism. Front Oncol 2012; 2(26): 200.
3. Barančik M, Grešová L, Barteková M, Dvořánová I. Nrf2 as a key player of redox regulation in cardiovascular diseases. Physiol Res 2016; 65: S1-S10.
4. Malloy MT, McIntosh DJ, Walters TS, Flores A, Goodwin JS, Arinze IJ. Trafficking of the transcription factor Nrf2 to promyelocytic leukemia-nuclear bodies: Implications for degradation of NRF2 in the nucleus. J Biol Chem 2013; 288(20): 14569-83.
5. Iida K, Itoh K, Kumagai Y, Oyasu R, Hattori K, Kawai K, et al. Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. Cancer Res 2004; 64(18): 6424-31.
6. Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, et al. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98(6): 3410-5.
7. Satoh H, Moriguchi T, Takai J, Ebina M, Yamamoto M. Nrf2 prevents initiation but accelerates progression through the Kras signaling pathway during lung carcinogenesis. Cancer Res 2013; 73(13): 4158-68.
8. Menegon S, Columbano A, Giordano S. The Dual Roles of NRF2 in Cancer. Trends Mol Med 2016; 22(7): 578-93.
9. Chartoumpakis DV, Wakabayashi N, Kensler TW. Keap1/Nrf2 pathway in the frontiers of cancer and non-cancer cell metabolism. Biochem Soc Trans 2015; 43(4): 639-44.

- 10 Zhang Y, Gordon GB. A strategy for cancer prevention: Stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Mol Cancer Ther* 2004; 3(7): 885-93.
- 11 McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J Biol Chem* 2004; 279(30): 31556-67.
- 12 Plafker KS, Nguyen L, Barneche M, Mirza S, Crawford D, Plafker SM. The ubiquitin-conjugating enzyme UbcM2 can regulate the stability and activity of the antioxidant transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 2010; 285(30): 23064-74.
- 13 Rada P, Rojo AI, Chowdhry S, McMahon M, Hayes JD, Cuadrado A. SCF/ $\beta$ -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Mol Cell Biol* 2011; 31(6): 1121-33.
- 14 Nioi P, Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 2005; 25(24): 10895-906.
- 15 Wang H, Liu K, Geng M, Gao P, Wu X, Hai Y, *et al.* RXR $\alpha$  inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. *Cancer Res* 2013; 73(10): 3097-108.
- 16 Villeneuve NF, Tian W, Wu T, Sun Z, Lau A, Chapman E, *et al.* USP15 negatively regulates Nrf2 through deubiquitination of Keap1. *Mol Cell* 2013; 51(1): 68-79.
- 17 Tong KI, Padmanabhan B, Kobayashi A, Shang C, Hirotsu Y, Yokoyama S, *et al.* Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Mol Cell Biol* 2007; 27(21): 7511-21.
- 18 Wakabayashi N, Slocum SL, Skoko JJ, Shin S, Kensler TW. When NRF2 talks, who's listening? *Antioxid Redox Signal* 2010; 13(11): 1649-63.
- 19 Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(8): 564-71.
- 20 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.
- 21 Jaramillo MC, Zhang DD. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev* 2013; 27(20): 2179-91.
- 22 Kim J, Keum YS. NRF2, a Key Regulator of antioxidants with two faces towards cancer. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 2746457.
- 23 Johnson JA, Johnson DA, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Vargas MR, *et al.* The Nrf2-ARE pathway: An indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1147: 61-9.
- 24 Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82(1): 47-95.
- 25 Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radic Biol Med* 2015; 88(Pt B): 179-88.
- 26 Holmstrom KM, Baird L, Zhang Y, Hargreaves I, Chalasani A, Land JM, *et al.* Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration. *Biol Open* 2013; 2(8): 761-70.
- 27 Ludtmann MH, Angelova PR, Zhang Y, Abramov AY, Dinkova-Kostova AT. Nrf2 affects the efficiency of mitochondrial fatty acid oxidation. *Biochem J* 2014; 457(3): 415-24.
- 28 Kovac S, Angelova PR, Holmstrom KM, Zhang Y, Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1850(4): 794-801.
- 29 Ramani K, Tomasi ML, Yang H, Ko K, Lu SC. Mechanism and significance of changes in glutamate-cysteine ligase expression during hepatic fibrogenesis. *J Biol Chem* 2012; 287(43): 36341-55.
- 30 Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, *et al.* Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* 2012; 22(1): 66-79.
- 31 Kitteringham NR, Abdullah A, Walsh J, Randle L, Jenkins RE, Sison R, *et al.* Proteomic analysis of Nrf2 deficient transgenic mice reveals cellular defence and lipid metabolism as primary Nrf2-dependent pathways in the liver. *J Proteomics* 2010; 73(8): 1612-31.
- 32 Shin S, Wakabayashi J, Yates MS, Wakabayashi N, Dolan PM, Aja S, *et al.* Role of Nrf2 in prevention of high-fat diet-induced obesity by synthetic triterpenoid CDDO-imidazolide. *Eur J Pharmacol* 2009; 620(1/2/3): 138-44.
- 33 DeNicola GM, Chen PH, Mullarky E, Sudderth JA, Hu Z, Wu D, *et al.* NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer. *Nat Genet* 2015; 47(12): 1475-81.
- 34 Pang S, Lynn DA, Lo JY, Paek J, Curran SP. SKN-1 and Nrf2 couples proline catabolism with lipid metabolism during nutrient deprivation. *Nat Commun* 2014; 5: 5048.
- 35 Chowdhry S, Nazmy MH, Meakin PJ, Dinkova-Kostova AT, Walsh SV, Tsujita T, *et al.* Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* 2010; 48(2): 357-71.
- 36 Shin S, Wakabayashi N, Misra V, Biswal S, Lee GH, Agoston ES, *et al.* NRF2 modulates aryl hydrocarbon receptor signaling: Influence on adipogenesis. *Mol Cell Biol* 2007; 27(20): 7188-97.
- 37 Pi J, Leung L, Xue P, Wang W, Hou Y, Liu D, *et al.* Deficiency in the nuclear factor E2-related factor-2 transcription factor results in impaired adipogenesis and protects against diet-induced obesity. *J Biol Chem* 2010; 285(12): 9292-300.
- 38 Uruno A, Furusawa Y, Yagishita Y, Fukutomi T, Muramatsu H, Negishi T, *et al.* The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus. *Mol Cell Biol* 2013; 33(15): 2996-3010.
- 39 Bartrons R, Caro J. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J Bioenerg Biomembr* 2007; 39(3): 223-9.
- 40 Yun J, Rago C, Cheong I, Pagliarini R, Angenendt P, Rajagopalan H, *et al.* Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science* 2009; 325(5947): 1555-9.
- 41 Devic S. Warburg effect—a consequence or the cause of carcinogenesis? *J Cancer* 2016; 7(7): 817-22.
- 42 Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(2): 85-95.
- 43 Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, *et al.* Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1):

- Characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1514(2): 291-302.
- 44 Eberhardy SR, Farnham PJ. c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. *J Biol Chem* 2001; 276(51): 48562-71.
- 45 Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab* 2016; 23(1): 27-47.
- 46 Barthel A, Okino ST, Liao J, Nakatani K, Li J, Whitlock JP Jr, *et al.* Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. *J Biol Chem* 1999; 274(29): 20281-6.
- 47 Li QK, Singh A, Biswal S, Askin F, Gabrielson E. KEAP1 gene mutations and NRF2 activation are common in pulmonary papillary adenocarcinoma. *J Hum Genet* 2011; 56(3): 230-4.
- 48 Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, Nakahara I, Tanaka H, Ohtsujii M, *et al.* Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res* 2008; 68(5): 1303-9.
- 49 Zhang P, Singh A, Yegnasubramanian S, Esopi D, Kombairaju P, Bodas M, *et al.* Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1 function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth. *Mol Cancer Ther* 2010; 9(2): 336-46.
- 50 Wang R, An J, Ji F, Jiao H, Sun H, Zhou D. Hypermethylation of the Keap1 gene in human lung cancer cell lines and lung cancer tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373(1): 151-4.
- 51 Hurd TR, Prime TA, Harbour ME, Lilley KS, Murphy MP. Detection of reactive oxygen species-sensitive thiol proteins by redox difference gel electrophoresis: Implications for mitochondrial redox signaling. *J Biol Chem* 2007; 282(30): 22040-51.
- 52 Holyoak T, Zhang B, Deng J, Tang Q, Prasanna CB, Fenton AW. Energetic coupling between an oxidizable cysteine and the phosphorylatable N-terminus of human liver pyruvate kinase. *Biochemistry* 2013; 52(3): 466-76.
- 53 Singh A, Happel C, Manna SK, Acquah-Mensah G, Carrerero J, Kumar S, *et al.* Transcription factor NRF2 regulates miR-1 and miR-206 to drive tumorigenesis. *J Clin Invest* 2013; 123(7): 2921-34.
- 54 Papaiahgari S, Yerrapureddy A, Hassoun PM, Garcia JG, Birukov KG, Reddy SP. EGFR-activated signaling and actin remodeling regulate cyclic stretch-induced NRF2-ARE activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36(3): 304-12.
- 55 Yamadori T, Ishii Y, Homma S, Morishima Y, Kurishima K, Itoh K, *et al.* Molecular mechanisms for the regulation of Nrf2-mediated cell proliferation in non-small-cell lung cancers. *Oncogene* 2012; 31(45): 4768-77.
- 56 Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, *et al.* Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64(11): 3892-9.
- 57 Chio II, Jafarnejad SM, Ponz-Sarvisse M, Park Y, Rivera K, Palm W, *et al.* NRF2 promotes tumor maintenance by modulating mRNA translation in pancreatic cancer. *Cell* 2016; 166(4): 963-76.
- 58 Kang HJ, Yi YW, Hong YB, Kim HJ, Jang YJ, Seong YS, *et al.* HER2 confers drug resistance of human breast cancer cells through activation of NRF2 by direct interaction. *Sci Rep* 2014; 4: 7201.
- 59 Khalil HS, Langdon SP, Kankia IH, Bown J, Deeni YY. NRF2 regulates HER2 and HER3 signaling pathway to modulate sensitivity to targeted immunotherapies. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 4148791.
- 60 Kim SK, Yang JW, Kim MR, Roh SH, Kim HG, Lee KY, *et al.* Increased expression of Nrf2/ARE-dependent anti-oxidant proteins in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Free Radical Bio Med* 2008; 45(4): 537-46.
- 61 Wang XJ, Sun Z, Villeneuve NF, Zhang S, Zhao F, Li Y, *et al.* Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* 2008; 29(6): 1235-43.
- 62 Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res* 2008; 58(5/6): 262-70.
- 63 Homma S, Ishii Y, Morishima Y, Yamadori T, Matsuno Y, Haraguchi N, *et al.* Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15(10): 3423-32.