

Nrf2在肿瘤化疗抵抗和耐药中的作用

周经纬 朱潇宽 程然 杨欣慧 徐佳倩* 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。在细胞内, Nrf2主要通过Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1)-Nrf2-ARE(antioxidant response element)信号通路调控下游基因的转录, 通过对抗氧化应激、防御有害物质的作用来保护细胞, 而这种保护作用在肿瘤细胞内则体现为对细胞生长的促进与帮助其抵抗化疗药物。近年来, Nrf2相关的肿瘤耐药性给临床肿瘤治疗带来不少困难, 越来越多的研究者开始关注此领域并进行了深入探索。该文在总结近年来相关研究成果的基础上, 重点阐述了Nrf2导致的肿瘤化疗抵抗和耐药及分子机制, 旨在为今后的研究与临床实践提供更多的信息。

关键词 Nrf2; 化疗抵抗; 肿瘤耐药

The Role of Nrf2 in Tumor Chemoresistance and Drug Resistance

Zhou Jingwei, Zhu Xiaokuan, Cheng Ran, Yang Xinhui, Xu Jiaqian*, 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] is a nuclear factor that regulates the transcription of downstream genes via Keap1-Nrf2-ARE pathway to protect cells against oxidative stress, and cytotoxic agents. However, in tumor cells, the existence of Nrf2 promoting tumor growth and their resistance to chemo-therapy drugs, has brought enormous difficulties to clinical treatments. Thus, recently, researches have been increasingly conducted upon the relations of Nrf2 and chemoresistance in tumors. In this review, we provide an updated overview on tumor chemoresistance linked with Nrf2 and its underlying mechanism, in order to offer a deeper perception for further clinical research and practice.

Keywords Nrf2; chemoresistance; tumor resistance

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, 由Moi等于1994年发现^[1]。在细胞内, Nrf2通过与抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)的结合, 调控许多下游靶基因的转录, 并由此在细胞抗氧化应激和外源性有毒物质诱导的防御反应中发挥重

要作用^[2-4]; 其活性主要受到Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1)的负调控^[5-6]。近年来, 也陆续发现不依赖于Keap1的Nrf2信号调控通路。Nrf2对肿瘤的发生与发展呈现双重的调控作用: 一方面, 在正常细胞中, Nrf2通过抵御氧化损伤发挥抗癌作用; 另一方面, Nrf2在肿瘤细胞内又能起到促进生长^[7-8]、抗凋亡^[9-10]、抵抗化疗药物的作用^[11]。随着人们对

收稿日期: 2018-07-19 接受日期: 2018-10-31

上海交通大学临床医学八年制RBL项目和国家自然科学基金(批准号: 81572691、81872230)资助的课题

*通讯作者: Tel: 021-63846590-778026, E-mail: xu-jq-1015@sjtu.edu.cn; E-mail: rongcai@shsmu.edu.cn

Received: July 19, 2018 Accepted: October 31, 2018

This work was supported by the Shanghai Jiaotong University School of Medicine Eight-year Clinical Medicine RBL Program and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81572691, 81872230)

*Corresponding authors. Tel: +86-21-63846590-778026, E-mail: xu-jq-1015@sjtu.edu.cn; E-mail: rongcai@shsmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-03-05 16:32:12 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.q.20190305.1632.004.html>

Nrf2了解的深入,不同类型肿瘤中与Nrf2相关的化疗抵抗现象陆续被发现。本综述主要围绕Nrf2相关的肿瘤化疗抵抗和耐药及其机制进行介绍,以期为临床治疗中面临的耐药难题提供线索和借鉴。

1 Nrf2的功能与活性调控

1.1 Nrf2的结构与功能

Nrf2包含7个高度保守的ECH相关蛋白同源结构域(Nrf2-ECH homology, Neh),分别被命名为Neh1到Neh7。其中Neh1可以与DNA结合或者与其他转录因子形成二聚体。Neh2能够与Keap1的Kelch结构域结合,通过蛋白酶体途径降解Nrf2,其对于Nrf2活性的调控最为重要。此外,富含丝氨酸的Neh6结构域也可调节Nrf2的稳定性。Neh3、Neh4和Neh5结构域可调节Nrf2的转录激活活性^[12]。Neh7可与核受体RXR α (retinoid X receptor α)结合,负调控ARE驱动的基因表达^[13]。

Nrf2-ARE信号通路在氧化还原稳态的调控中发挥关键作用。当细胞暴露于氧化应激时,大量游离的Nrf2由胞质易位至细胞核,Neh1结构域中的亮氨酸拉链(basic region leucine zipper, bZIP)结构与小Maf蛋白(包括MafG、MarK、MaW)形成异二聚体,后者识别靶基因ARE上的DNA基序(GCTGAGTCA),并与之结合,启动目标基因的转录^[2-3]。Nrf2所调控的下游基因编码产物主要分为8类:(1)细胞内氧化还原平衡调节相关的蛋白,如谷氨酸半胱氨酸连接酶(glutamate cysteine ligases, GCL)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)、硫氧还蛋白1(thioredoxin 1, TXN1)、硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TXNR)、过氧化物酶1(peroxiredoxin 1, PRDX1)、硫氧还蛋白1(sulfiredoxin 1, SRXN1)等,可降低活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平^[14];(2)三相解毒酶,如谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferases, GST)、NAD(P)H醌氧化还原酶-1[NAD(P)H quinone oxidoreductase-1, NQO1]、UGT(UDP-glucuronosyltransferase)、醛酮还原酶(aldo-keto reductase, AKR)等,可将异生物质代谢成较低毒性的形式,或催化偶联反应增加其溶解度从而促进消除^[15];(3)参与血红素代谢的酶,如血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HMOX-1)^[16];(4)参与脂质代谢的蛋白,如脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)^[17]、协助乙酰辅酶A(acetyl coenzyme A, Acetyl-CoA)完成柠檬酸穿梭(citrate shuttle)的ATP-柠檬酸

裂解酶(ATP citrate lyase, ACLY)^[18-19];(5)参与糖代谢的酶,如磷酸戊糖途径的关键酶葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)^[20-21];(6)在NADPH和核酸合成中起作用的酶,如苹果酸酶1(malic enzyme 1, ME1)和亚甲基四氢叶酸脱氢酶2(methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2, MTHFD2)等^[22];(7)参与自噬和凋亡调控的蛋白质,如B细胞淋巴瘤2基因(B cell lymphoma 2, BCL-2)和B细胞淋巴瘤-xL基因(B-cell lymphoma-extra large, Bcl-xL)所编码的蛋白^[10,23];(8)调节异物反应的蛋白质,如芳烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AHR)等^[24]。

1.2 Nrf2的活性调控

Keap1-Nrf2通路是Nrf2稳定性和活性调控的主要机制。Keap1是Nrf2的关键负调节因子,拥有3个独立的蛋白质结构域:N-端为BTB(broad complex, tramtrack and Bric-à-brac)结构域,与Cul3(cullin 3)结合,并由此形成二聚体结构;IVR(intervening region)结构域,含有数个感应细胞内氧化还原失衡的半胱氨酸残基;C-端为Kelch结构域,呈 β 螺旋结构,结合Nrf2的Neh2结构域。此外,IVR及Kelch结构域均含一些感应压力的半胱氨酸残基^[14]。生理状态下,Nrf2与Keap1同源二聚体相偶联,并锚定于胞质,通过含有E3的Cul3泛素连接酶与Nrf2结合,在胞质中进行Keap1依赖的泛素化和蛋白酶体降解,从而保持Nrf2的低水平表达。当受到氧化应激刺激时,Keap1作为胞内氧化还原状态的感受器,其敏感的半胱氨酸残基发生氧化,构象发生变化,从而导致Nrf2和Keap1解偶联^[6]。

Nrf2还受糖原合酶激酶-3(glycogen synthase kinase-3, GSK-3)的信号传导通路调控。GSK-3磷酸化Nrf2的Neh6结构域中的特定丝氨酸残基,形成E3连接酶衔接子 β -TrCP(β -transducin repeat-containing protein)的识别基序。Neh6结构域包含两个重要的模体(motif)结构,即DSGIS和DSAPGS,两者参与调控Nrf2的稳定性。Neh6被泛素连接酶衔接子 β -TrCP识别后,募集Cullin1/Rbx1复合物(cullin1/ RING-box protein 1 complex),使后者在GSK-3/ β -TrCP通路活化后,引起非Keap1依赖的Nrf2泛素-蛋白酶体降解^[25]。另外,陆续有研究发现,癌基因的突变,如K-RasG12D、B-RafV619E和MycERT2等可转录调控Nrf2的表达,从而对Nrf2的活性进行调控^[26]。

由此可见,Nrf2的上游调控机制复杂多样,可分

别在转录、翻译和翻译后修饰的水平受到调节,从而使得细胞内Nrf2的活性适应不同生理和病理条件下的需求。

2 Nrf2与肿瘤的关系

2.1 Nrf2与肿瘤发生

肿瘤发生往往牵涉基因突变和多级反应的积累,为渐进式过程。活性氧和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)的强氧化性所带来的毒性作用可导致基因突变,因此在既往研究中被认为与引发癌症关系密切。由于Nrf2是调节细胞氧化防御反应的关键转录因子,Nrf2所介导的抗氧化、抗毒性损伤等细胞保护性反应,可在一定程度上发挥抗癌作用。在动物实验中发现,采用高脂肪饮食后,*Nrf2*^{-/-}小鼠对脂肪性肝炎和肝硬化的易感性更高,更易发生肝癌,其原因是在*Nrf2*^{-/-}小鼠中,由于抗氧化能力的缺失,其对抗高脂饮食引起的氧化应激的能力变差,导致未折叠蛋白反应(unfolding protein reaction)和代谢酶表达紊乱^[27]。此外也有研究指出,相比暴露于相同水平1-溴丙烷(1-bromopropane)的野生型小鼠,*Nrf2*^{-/-}小鼠的肝脏组织病理学显示出更大的坏死区,表明*Nrf2*^{-/-}小鼠对肝毒性也更敏感^[28]。因此,*Nrf2*^{-/-}小鼠在一定程度上较野生型小鼠更易发生肿瘤,说明Nrf2在肿瘤发生的过程中具有抑癌基因的功能。

另一方面,在肿瘤进展过程中,Nrf2的高表达却创造了利于癌细胞存活的环境。以一条重要通路的突变为例——*Nrf2/Keap1*通路突变在肺癌中最为常见,目前对此的合理解释是:呼吸系统常暴露在空气中的化学物质刺激下,其导致的基因突变可造成Nrf2-Keap1通路活性增强,以对抗氧化应激^[29];然而,当出现恶性转化时,突变的细胞可从被过度激活的该途径中获益,以逃避内源性的肿瘤抑制作用^[5,7]。在其他类型实体瘤中也存在*Nrf2/Keap1*突变,要么是杂合性碱基突变,要么是与杂合性碱基丢失(loss of heterozygosity, LOH)有关^[29-30],均存在于Nrf2和Keap1的相互作用区域,导致Nrf2通路的活化。*Nrf2*突变多被发现于Neh2域附近或内部^[5,30-31]。这表明,*Nrf2*或*Keap1*的体细胞突变导致了Nrf2过度表达或通路激活,增强癌细胞的抗氧化防御,提高它们的生存机会。由此可见,在肿瘤的发生和进展中,*Nrf2*扮演了双刃剑的角色,分别表现出癌基因和抑癌基因的作用和特点。

2.2 Nrf2与肿瘤的生长

肿瘤细胞为了满足快速增殖的需要,拥有很高的产能和合成代谢水平^[32]。其中谷氨酰胺(glutamine)代谢、磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)、丝氨酸从头合成(*de novo* serine synthesis, SPP)等代谢途径为肿瘤细胞提供了重要的中间产物,以满足自身高速生长的需求^[18,33-35]。而Nrf2下游靶基因编码的蛋白质中,第4~6类是与糖脂等代谢相关的酶,提示Nrf2与细胞对糖脂的利用和营养缺乏时的生存密切相关。

有研究表明,在肺癌细胞系A549中,Nrf2通过激活ME1(malic enzyme 1)、GCL(γ -glutamyl-cysteinyl-ligase)等代谢酶,将葡萄糖和谷氨酰胺重编程(re-programming)到合成代谢,促进PPP、核苷酸从头合成(*de novo* nucleotide synthesis)以及NADPH的合成^[18,36]。Singh等^[9]发现,Nrf2的持续激活降低了miR-1(microRNA-1)和miR-206(microRNA-206)的表达,导致细胞葡萄糖代谢改变,增强了PPP相关基因的表达,从而维持癌细胞高水平的合成代谢,促进肿瘤生长。

DeNicola等^[37]的研究显示,在非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC)细胞系中,Nrf2通过ATF4(activating transcription factor 4)调控丝氨酸/甘氨酸(glycine)合成关键酶PHGDH(phosphoglycerate dehydrogenase)、PSAT1(phosphoserine aminotransferase 1)、SHMT2(serine hydroxymethyltransferase 2)等的表达,来支持谷胱甘肽(glutathione, GSH)和核苷酸的生成。敲除*Nrf2*基因后,ATF4与上述酶的启动子结合减少,从而负调控丝氨酸/甘氨酸代谢,肿瘤增殖也因此被抑制。

在大鼠来源的耐药肝细胞癌变过程的早期,Nrf2/Keap1通路已出现失调,如氧化磷酸化的抑制、葡萄糖的利用和磷酸戊糖途径的激活等。这些代谢重编程现象,仅发生在最具侵略性的结节处,而非生长缓慢的病灶,前者以激活Nrf2-Keap1通路为特征^[8]。这也提示,Nrf2在肝癌发生的早期阶段,有助于Warburg效应的发生,所以Nrf2很可能是肝癌进程的重要推动者。Zhang等^[38]发现,Nrf2可以通过上调肝癌细胞中Bcl-xL和MMP-9(matrix metalloproteinase 9)的表达来抑制凋亡、促进细胞增殖;过表达的Nrf2还可以促进肝癌细胞的侵袭和转移。

此外,有研究证明,Nrf2是胰腺癌细胞增殖的必要因素:Nrf2的缺失可导致自分泌表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)信号缺陷,

特定的翻译调控相关蛋白因子被氧化,进而减少胰腺癌细胞内的cap(cAMP activated protein)依赖性和cap非依赖性mRNA的翻译。而联合靶向抑制EGFR下游底物AKT和谷胱甘肽抗氧化途径,来模拟Nrf2的基因敲除效应,可使胰腺癌细胞的生长受到显著抑制^[39]。

总结Nrf2在上述不同类型肿瘤细胞中的研究结果,其通过调控下游靶基因或者miRNA的表达,调控肿瘤细胞的糖、脂和氨基酸等多条代谢途径,促进肿瘤细胞的生长和增殖。

3 Nrf2与肿瘤化疗抵抗和耐药

3.1 Nrf2导致化疗抵抗和耐药的现象

肿瘤细胞中高表达的Nrf2,通过帮助细胞对抗氧化应激和化疗药物治疗,提高其生存能力,导致耐药^[40-41]。在肝癌细胞中,Nrf2/Keap1基因的突变激活了Nrf2/ARE途径。细胞核内Nrf2的高表达,上调其下游细胞保护性蛋白的转录,加强了肿瘤细胞的生存能力^[11,29,42]。在人卵巢癌细胞系A2780中,随着细胞内Nrf2活性的增加,其下游 γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶(γ -glutamylcysteine ligase, GLCL)催化亚基表达增高,谷胱甘肽含量上升,细胞抗氧化能力增强,细胞表现出对阿霉素治疗(adriamycin, ADM)的抵抗^[43]。有研究发现,相对于由子宫内膜样子宫内膜癌(endometrial endometrioid carcinoma, EEC)衍生的Ishikawa细胞系,由浆液性子宫内膜癌(endometrial serous carcinoma, ESC)衍生的细胞系SPEC-2中Nrf2表达更高,从而具有更强的耐顺铂(cisplatin)和紫杉醇(paclitaxel)的能力;而沉默Nrf2表达后,可使SPEC-2细胞系对化疗药物更加敏感。

此外,NSCLC细胞中Nrf2持续激活也可导致耐药现象。Zhan等^[45]发现,在肺腺鳞癌细胞系(lung adenosquamous carcinoma cell line)HTB-178、鳞状细胞癌细胞系(squamous cell carcinoma cell line)HTB-182以及肺癌细胞系A549中,Nrf2沉默后,As₂O₃(arsenic trioxide)等化疗药物介导的细胞毒作用比在野生型中更强;此外,Keap1也可通过Nrf2非依赖途径上调过氧化物增殖物激活物受体(peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)的表达水平,影响肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。研究表明,有20%~30%的NSCLC细胞中存在KRAS基因的突变^[46]。过表达的KRAS^{G12D}和KRAS^{WT}可以通过ERK通路

(extracellular regulated protein kinases pathway)提高细胞中Nrf2的水平,由此产生对顺铂的耐药性。而当用siRNA沉默Nrf2表达后,这种效果消失,说明KRAS过表达导致的耐药现象是Nrf2依赖性的^[47]。

3.2 Nrf2导致化疗抵抗和耐药的机制

大多数抗肿瘤药物在体内一般经历三相代谢过程: I相(Phase I)、II相(Phase II)和III相(Phase III)。Phase I主要是官能团反应,机体通过相关的酶对药物分子进行氧化、还原、羟化、水解等使其失活; Phase II是药物代谢过程中的关键步骤,通过I相酶将内源性极性小分子物质结合至药物或I相代谢活化物上,使药物失活的同时增加其水溶性; Phase III则是通过一系列的外排转运体将代谢产物转运至细胞外,目前关于这一阶段的研究较少,相关转运体的具体调控机制不明^[11,48]。

Nrf2与细胞内一些代谢酶类和蛋白转运体的功能调节密切相关,这些代谢酶类或转运体大多在抗肿瘤药物的I、II、III相代谢过程中发挥作用,增强肿瘤细胞对化疗的抵抗力和多重耐药性(multiple drug resistance, MDR)。也有研究发现,Nrf2可通过诱导激活抗凋亡途径,来帮助肿瘤细胞抵抗化疗药物^[23]。

3.2.1 Phase I及其相关解毒酶系 Nrf2通过促进其下游编码基因的表达,提高细胞内I相酶,例如AKR、AR(aldehyde reductase)和NQO1的含量,增强肿瘤细胞对外源性药物的代谢过程。AKR是一类与羰基还原反应相关的基因超家族,其中AKR1B10在肿瘤细胞中的表达能够抵抗羰基介导的细胞凋亡过程,通过脂质过氧化作用使多种抗肿瘤药物失活,包括阿霉素、丝裂霉素(mitomycin)等。而沉默AKR1B10则会导致肿瘤细胞凋亡率升高,细胞集落形态变小,增强化疗处理后的细胞减灭性应答^[49]。AR是AKR超家族中的一员,主要负责代谢各类内源性和外源性的醛类。有研究显示,AR活性较高的HepG2细胞对柔红霉素具有更强的耐药性,表明AR对于肿瘤细胞的耐药性有一定促进作用^[50],而AR抑制剂可以减弱这种耐药性^[11]。

HO-1(heme oxygenase-1)是体内血红素代谢过程的关键酶,可将血红素(heme)氧化为胆绿素(biliverdin),胆绿素随后被还原为胆红素(bilirubin),后者具有抗氧化作用来应对氧化刺激给细胞带来的损害^[51]。研究显示,通过PKC- δ -p38 MAPK-

Nrf2通路(protein kinase C- δ -p38 mitogen-activated protein kinase-Nrf2 pathway)激活的HO-1, 在巴豆醛(crotonaldehyde)刺激的人肝癌细胞中具有强烈的抗氧化和抗凋亡作用, 促进肿瘤细胞的生长^[52]。上述通路的持续激活, 刺激癌细胞形成化疗耐药性^[53]。

NQO1是一种黄素酶, 在机体内以NADH或NADPH为氢供体, 能够还原醌类物质并使其毒性降低, 生成NAD⁺。NQO1在肿瘤细胞尤其是肝癌细胞中的表达远高于正常细胞, 推测与肿瘤细胞快速代谢过程对NAD⁺的需要相关^[11]; 这种过表达也可使化疗药物失活, 诱导肿瘤细胞的MDR形成^[54]。

3.2.2 Phase II及其相关II相酶 与Nrf2相关的II相酶主要为GSH、葡萄糖醛酸等小分子的转移酶类, 在肿瘤细胞内这些酶的表达受Nrf2的影响而上调。谷氨酸半胱氨酸连接酶是GSH合成过程中的关键酶, 该酶和其调节亚基(glutamate-cysteine ligase modifier subunit, GCLM)的表达水平, 也受Nrf2的调节作用影响^[40,55-56]。

GST可以催化许多外源性的亲电子化合物与GSH的结合, 也可以作用在药物I相代谢产物上, 使药物失活并提高水溶性以达到解毒的效果。GST主要介导肿瘤细胞对顺铂、卡莫司汀(carmustine)、环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)和ADM的耐药性^[57]。GST- π 是GST家族成员之一, 抑制SMMC-7721、Huh-7和PLC/PRF/5肿瘤细胞系的GST- π 1, 会使得细胞对化疗药物如ADM、顺铂、索拉非尼(sorafenib)和表阿霉素(epirubicin)等更加敏感^[58]。

3.2.3 Phase III及其相关外排转运体 由Nrf2介导的外排转运体可将外源性的代谢产物排出细胞外, 减少肿瘤细胞内化疗药物的积累, 从而增强细胞的耐药性。例如, MRP(multidrug resistance-associated protein)是一类属于ATP结合盒式蛋白(ATP-binding-cassette transporter, ABC)超家族的ATP依赖性膜转运蛋白, 在通过药理作用激活的Nrf2介导通路中, Nrf2可以通过结合至MRP对应基因启动子近端的ARE序列, 刺激并协同诱导MRP的表达^[59-60]。有研究显示, Nrf2激活剂在小鼠肝脏中可以诱导MRP2-6的表达^[61], 而MRP2则被认为是肝癌细胞中与耐药性相关的最主要转运蛋白^[62]。

乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistant protein, BCRP)同样是一种ATP结合转运蛋白, 在对索拉非尼耐药的肝癌细胞中检测到BCRP的高表达^[63], 说明

BCRP在肝癌细胞的MDR中发挥重要作用。此外, 研究发现, Nrf2可以通过结合至BCRP对应基因启动子的ARE结合位点, 激活BCRP的转录^[64]。

3.2.4 抗细胞凋亡 Suryakant等^[10,23]的研究表明, Nrf2通过与抗凋亡基因*Bcl-xL*和*Bcl-2*启动子的结合, 上调其表达。而*Bcl-2*蛋白表达的增高, 又导致促凋亡基因*Bax*的表达下降, caspase 3/7(cysteine-specific proteinase 3/7)的活性降低, 增强细胞的抗凋亡能力, 导致肿瘤细胞对化疗抵抗^[12]。

因此, Nrf2可通过调控体内抗肿瘤药物代谢相关蛋白的活性, 从多个步骤促进抗肿瘤药物在体内的代谢过程; 同时Nrf2的抗凋亡作用又帮助肿瘤细胞抵抗以诱导细胞凋亡为机制的药物, 从而增强肿瘤细胞的MDR。

3.3 Nrf2抑制剂对抗化疗耐药的作用

鉴于Nrf2对于肿瘤有保护作用, 并可导致化疗耐药, 近年来发现, 许多有Nrf2抑制功能的化学物质和植物提取物, 如抗坏血酸(ascorbic acid)、鸦胆苦醇(brusatol)、芹菜素(apigenin)等, 能够在一定程度上加强肿瘤治疗的效果^[11,40]。

抗坏血酸是体内的一种强抗氧化剂, 研究发现它能够抑制Nrf2的作用。与伊马替尼(imatinib)敏感性细胞系KCL22相比, 在耐药的慢性粒细胞白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)细胞系KCL22/SR中, Nrf2与 γ -GCSL(γ -glutamylcysteine synthetase light subunit)基因启动子ARE的结合要强得多。同时, 在KCL22/SR细胞中, γ -GCSL的表达和谷胱甘肽的水平也较高。在KCL22/SR细胞中添加抗坏血酸后, Nrf2-ARE的结合受到抑制, 并且 γ -GCSL表达和GSH水平降低, 从而部分恢复了细胞对伊马替尼的敏感性^[65], 但其具体的分子机制未明。

鸦胆苦醇可通过增加Nrf2的泛素化降解, 降低细胞内Nrf2水平。用A549细胞异种移植到裸鼠中成瘤后, 与单独使用顺铂组相比, 鸦胆苦醇和顺铂共处理在抑制肿瘤生长和诱导细胞凋亡方面有着更显著的效果。此外, Nrf2低表达的A549-K异种移植裸鼠, 对鸦胆苦醇处理无反应, 表明鸦胆苦醇介导的对顺铂致敏作用, 依赖于Nrf2的表达^[66]。

芹菜素是一种存在于多种蔬果中, 具有抗炎、抗氧化和抗癌作用的类黄酮(flavonoid)^[67]。芹菜素通过抑制PI3K/Akt/Nrf2通路, 导致Nrf2下游基因转录减少, 使耐阿霉素(doxorubicin-resistant)的肝癌细

胞BEL-7402/ADM对阿霉素敏感,并增加细胞内阿霉素浓度。与阿霉素单独处理组相比,用芹菜素和阿霉素共同处理细胞后,能够抑制肿瘤生长,并诱导细胞凋亡,从而对抗化疗耐药^[68]。白杨素(chrysin)也是一种类黄酮,通过下调PI3K-Akt和ERK信号,显著降低耐阿霉素BEL-7402(BEL-7402/ADM)细胞内Nrf2的表达,使Nrf2下游基因*HO-1*、*AKR1B10*和*MRP5*表达降低,抑制Nrf2依赖的化疗耐药性^[69]。

熊果酸(ursolic acid)是一种天然五环三萜化合物(pentacyclic triterpene compound),具有多种药理学特性,如抗炎和抗癌等。在耐顺铂的人肝癌细胞HepG2/顺铂中,熊果酸和顺铂的联合用药,显著降低了Nrf2及其下游基因的表达,从而阻断细胞周期,诱导细胞凋亡。而在干扰Nrf2表达的HepG2/顺铂细胞中,熊果酸-顺铂的作用减弱,说明熊果酸减弱肿瘤对顺铂的抗性,依赖于Nrf2/ARE途径^[70]。

由以上研究可见,通过降低胞内Nrf2水平,减少其下游基因的表达,肿瘤细胞对化疗药物的敏感性有所提高,说明Nrf2抑制剂可以与传统化疗药物相配合,增强药物的治疗效果。

4 结语与展望

Nrf2作为细胞内重要的转录因子,既可在一定程度上抑制正常细胞的癌变,又能够在肿瘤细胞内发挥增强防御、加速药物代谢、促进代谢重编程等作用,以促进肿瘤细胞的生长。大量的研究表明,这种促进作用的机制,主要是Nrf2靶基因的编码产物在抗肿瘤药物I、II、III相代谢过程中发挥作用,以及Nrf2对细胞凋亡的抑制作用,而有关Nrf2抑制剂的研究也进一步佐证了这一促进作用。当然,进一步针对Nrf2导致肿瘤化疗抵抗与耐药的研究仍然非常必要,例如针对Nrf2与MRP的关系等尚未明确的具体机制的探索,以及Nrf2与其他较为重要的肿瘤细胞内调节因子之间的相互联系等。Nrf2与肿瘤细胞生长的密切关系,提示了未来人们设计特异性针对Nrf2靶基因蛋白的药物或是Nrf2的特异性抑制剂,可作为抗肿瘤药物开发的新方向;而针对Nrf2介导的肿瘤细胞耐药性的研究,也为未来对现有抗肿瘤药物进行结构调整、克服细胞耐药性提供了新思路。

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 Jaramillo MC, Zhang DD. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev* 2013; 27(20): 2179-91.

3 Takagi Y, Kobayashi M, Li L, Suzuki T, Nishikawa K, Yamamoto M. MafT, a new member of the small Maf protein family in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320(1): 62-9.

4 Malhotra D, Portales-Casamar E, Singh A, Srivastava S, Arenillas D, Happel C, *et al.* Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(17): 5718-34.

5 Menegon S, Columbano A, Giordano S. The dual roles of NRF2 in cancer. *Trends Mol Med* 2016; 22(7): 578-93.

6 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.

7 Siegel D, Franklin WA, Ross D. Immunohistochemical detection of NAD(P)H: Quinone oxidoreductase in human lung and lung tumors. *Clin Cancer Res* 1998; 4(9): 2065-70.

8 Burns JS, Manda G. Metabolic pathways of the Warburg effect in health and disease: Perspectives of choice, chain or chance. *Int J Mol Sci* 2017; 18(12): pii: E2755.

9 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.

10 Nitire SK, Jaiswal AK. Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *J Biol Chem* 2012; 287(13): 9873-86.

11 Tian B, Lu ZN, Guo XL. Regulation and role of nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) in multidrug resistance of hepatocellular carcinoma. *Chem Biol Interact* 2018; 280: 70-6.

12 Rojo de la Vega M, Chapman E, Zhang DD. NRF2 and the hallmarks of cancer. *Cancer Cell* 2018; 34(1): 21-43.

13 Wang H, Liu K, Geng M, Gao P, Wu X, Hai Y, *et al.* RXR α inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. *Cancer Res* 2013; 73(10): 3097-108.

14 Tebay LE, Robertson H, Durant ST, Vitale SR, Penning TM, Dinkova-Kostova AT, *et al.* Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radic Biol Med* 2015; 88(Pt B): 108-46.

15 Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul* 2006; 46: 113-40.

16 Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, *et al.* Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem* 2000; 275(21): 16023-9.

17 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.
- 18 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.
- 19 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.
- 20 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.
- 21 Dang CV, Le A, Gao P. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res* 2009; 15(21): 6479-83.
- 22 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.
- 23 Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2-induced antiapoptotic Bcl-xL protein enhances cell survival and drug resistance. *Free Radic Biol Med* 2013; 57: 119-31.
- 24 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.
- 25 Cuadrado A. Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by glycogen synthase kinase 3/beta-TrCP. *Free Radic Biol Med* 2015; 88(Pt B): 147-57.
- 26 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.
- 27 Paul J. Meakin, Sudhir Chowdhry, Ritu S. Sharma, Fiona B. Ashford, Shaun V. Walsh, Rory J. McCrimmon, *et al.* Susceptibility of Nrf2-null mice to steatohepatitis and cirrhosis upon consumption of a high-fat diet is associated with oxidative stress, perturbation of the unfolded protein response, and disturbance in the expression of metabolic enzymes, but not with insulin resistance. *Mol Cell Biol.* 2014; 34(17): 3305-20.
- 28 Liu F, Ichihara S, Valentine WM, Itoh K, Yamamoto M, Sheik Mohideen S, *et al.* Increased susceptibility of Nrf2-null mice to 1-bromopropane-induced hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2010; 115(2): 596-606.
- 29 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.
- 30 Shibata T, Ohta T, Tong KI, Kokubu A, Odogawa R, Tsuta K, *et al.* Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(36): 13568-73.
- 31 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.
- 32 Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324(5930): 1029-33.
- 33 Altman BJ, Stine ZE, Dang CV. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2016; 16(11): 749.
- 34 Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* 2011; 476(7360): 346-50.
- 35 Labuschagne CF, van den Broek NJ, Mackay GM, Vousden KH, Maddocks OD. Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells. *Cell Rep* 2014; 7(4): 1248-58.
- 36 Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 2009; 30(1/2): 42-59.
- 37 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.
- 38 Zhang M, Zhang C, Zhang L, Yang Q, Zhou S, Wen Q, Wang J. Nrf2 is a potential prognostic marker and promotes proliferation and invasion in human hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2015; 15: 531.
- 39 Chio IL, Jafarnejad SM, Ponz-Sarvis 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.
- 40 No JH, Kim YB, Song YS. Targeting nrf2 signaling to combat chemoresistance. *J Cancer Prev* 2014; 19(2): 111-7.
- 41 Zhang DD. The Nrf2-Keap1-ARE signaling pathway: the regulation and dual function of Nrf2 in cancer. *Antioxid Redox Signal* 2010; 13(11): 1623-6.
- 42 Nault JC, Rebouissou S, Zucman Rossi J. NRF2/KEAP1 and Wnt/ β -catenin in the multistep process of liver carcinogenesis in humans and rats. *Hepatology* 2015; 62(3): 677-9.
- 43 Shim GS, Manandhar S, Shin DH, Kim TH, Kwak MK. Acquisition of doxorubicin resistance in ovarian carcinoma cells accompanies activation of the NRF2 pathway. *Free Radic Biol Med* 2009; 47(11): 1619-31.
- 44 Jiang T, Chen N, Zhao F, Wang XJ, Kong B, Zheng W, *et al.* High levels of Nrf2 determine chemoresistance in type II endometrial cancer. *Cancer Res* 2010; 70(13): 5486-96.
- 45 Zhan L, Zhang H, Zhang Q, Woods CG, Chen Y, Xue P, *et al.* Regulatory role of KEAP1 and NRF2 in PPAR γ expression and chemoresistance in human non-small-cell lung carcinoma cells. *Free Radic Biol Med* 2012; 53(4): 758-68.
- 46 Califano R, Landi L, Cappuzzo F. Prognostic and predictive value of K-RAS mutations in non-small cell lung cancer. *Drugs* 2012; 72 Suppl 1: 28-36.
- 47 Tao S, Wang S, Moghaddam SJ, Ooi A, Chapman E, Wong PK, *et al.* Oncogenic KRAS confers chemoresistance by upregulating NRF2. *Cancer Res* 2014; 74(24): 7430-41.
- 48 莫享阳, 乔洪源, 欧阳学农, 余宗阳. Keap1/Nrf2/ARE信号通路介导非小细胞肺癌耐药机制的研究进展. 现代肿瘤医学(Mo Xiangyang, Qiao Hongyuan, Ouyang Xuenong, Yu Zongyang. Research progress on Keap1/Nrf2/ARE signaling pathways mediating the drug resistance mechanisms in non-small cell lung cancer. *Modern Oncology*) 2015; 23(9): 1322-24.
- 49 Matkowskyj KA, Bai H, Liao J, Zhang W, Li H, Rao S, *et al.* Aldoketoreductase family 1B10 (AKR1B10) as a biomarker to

- distinguish hepatocellular carcinoma from benign liver lesions. *Hum Pathol* 2014; 45(4): 834-43.
- 50 Lee KW, Ko BC, Jiang Z, Cao D, Chung SS. Overexpression of aldose reductase in liver cancers may contribute to drug resistance. *Anticancer Drugs* 2001; 12(2): 129-32.
 - 51 Sahoo SK, Sawa T, Fang J, Tanaka S, Miyamoto Y, Akaike T, *et al.* Pegylated zinc protoporphyrin: A water-soluble heme oxygenase inhibitor with tumor-targeting capacity. *Bioconjug Chem* 2002; 13(5): 1031-38.
 - 52 Lee SE, Yang H, Jeong SI, Jin YH, Park CS, Park YS, *et al.* Induction of heme oxygenase-1 inhibits cell death in crotonaldehyde-stimulated HepG2 cells via the PKC- δ -p38-Nrf2 pathway. *PLoS One* 2012; 7(7): e41676.
 - 53 Furfaro AL, Traverso N, Domenicotti C, Piras S, Moretta L, Marinari UM, *et al.* The Nrf2/HO-1 axis in cancer cell growth and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 1958174.
 - 54 Brar SS, Kennedy TP, Whorton AR, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Ghio AJ, *et al.* Reactive oxygen species from NAD(P)H: Quinone oxidoreductase constitutively activate NF- κ B in malignant melanoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280(3): C659-76.
 - 55 Reddy NM, Kleeberger SR, Bream JH, Fallon PG, Kensler TW, Yamamoto M, *et al.* Genetic disruption of the Nrf2 compromises cell-cycle progression by impairing GSH-induced redox signaling. *Oncogene* 2008; 27(44): 5821-32.
 - 56 Vollrath V, Wielandt AM, Iruretagoyena M, Chianale J. Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene. *Biochem* 2006; 395(3): 599-609.
 - 57 Sau A, Tregno FP, Valentino F, Federici G, Caccuri AM. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Arch Biochem Biophys* 2010; 500(2): 116-22.
 - 58 Tao N, Zhou H, Tang H, Cai X, Zhang W, Ren J, *et al.* Sirtuin 3 enhanced drug sensitivity of human hepatoma cells through glutathione S-transferase π 1/JNK signaling pathway. *Oncotarget* 2016; 7(31): 50117-30.
 - 59 He J, Zhou Z, Yin J, He C, Zhou S, Yu Y. Schisandra chinensis regulates drug metabolizing enzymes and drug transporters via activation of Nrf2-mediated signaling pathway. *Drug Des devel Ther* 2014; 9: 127-46.
 - 60 Aleksunes LM, Slitt AL, Maher JM, Augustine LM, Goedken MJ, Chan JY, *et al.* Induction of Mrp3 and Mrp4 transporters during acetaminophen hepatotoxicity is dependent on Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 226(1): 74-83.
 - 61 Maher JM, Cheng X, Slitt AL, Dieter MZ, Klaassen CD. Induction of the multidrug resistance associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. *Drug Metab Dispos* 2005; 33(7): 956-62.
 - 62 Zollner G, Wagner M, Fickert P, Slibert D, Fuchsbichler A, Zatloukal K, *et al.* Hepatobiliary transporter expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2005; 25(2): 367-79.
 - 63 Huang WC, Hsieh YL, Hung CM, Chien PH, Chien YF, Chen LC, *et al.* BCRP/ABCG2 inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib. *PLoS One* 2013; 8(12): e83627.
 - 64 Singh A, Wu H, Zhang P, Happel C, Ma J, Biswal S. Expression of ABCG2 (BCRP) is regulated by Nrf2 in cancer cells that confers side population and chemoresistance phenotype. *Mol Cancer Ther* 2010; 9(8): 2365-76.
 - 65 Tarumoto T, Nagai T, Ohmine K, Miyoshi T, Nakamura M, Kondo T, *et al.* Ascorbic acid restores sensitivity to imatinib via suppression of Nrf2-dependent gene expression in the imatinib-resistant cell line. *Exp Hematol* 2004; 32(4): 375-81.
 - 66 Ren D, Villeneuve NF, Jiang T, Wu T, Lau A, Toppin HA, *et al.* Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(4): 1433-8.
 - 67 Lefort EC, Blay J. Apigenin and its impact on gastrointestinal cancers. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57(1): 126-44.
 - 68 Gao AM, Ke ZP, Wang JN, Yang JY, Chen SY, Chen H. Apigenin sensitizes doxorubicin-resistant hepatocellular carcinoma BEL-7402/ADM cells to doxorubicin via inhibiting PI3K/Akt/Nrf2 pathway. *Carcinogenesis* 2013; 34(8): 1806-14.
 - 69 Gao AM, Ke ZP, Shi F, Sun GC, Chen H. Chrysin enhances sensitivity of BEL-7402/ADM cells to doxorubicin by suppressing PI3K/Akt/Nrf2 and ERK/Nrf2 pathway. *Chem Biol Interact* 2013; 206(1): 100-8.
 - 70 Wu S, Zhang T, Du J. Ursolic acid sensitizes cisplatin-resistant HepG2/DDP cells to cisplatin via inhibiting Nrf2/ARE pathway. *Drug Des Devel Ther* 2016; 10: 3471-81.