

· 综述 ·

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2018.01.07

翻译后修饰对转录因子 NF-E2 相关因子 2 功能的调控

张艺瀚, 衣雨娇, 顾玉超*

(中国海洋大学医药学院, 教育部海洋药物重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要 抗氧化反应组件(AREs)普遍存在于编码抗氧化和/或解毒酶基因的启动子区域,为这些基因的转录启动所必需;而这些基因的表达对维持细胞内氧化还原稳态,抵抗活性氧类(ROS)引起的细胞损伤发挥重要作用。转录因子 NF-E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, NRF2)作为抗氧化反应中的关键转录因子,可以与 ARE 结合,启动其下游靶基因,在氧化应激及亲电子剂应激中发挥重要的调控作用,广泛参与炎症、增殖、凋亡、细胞分化、组织再生和代谢等过程;因此,激活 NRF2 有望成为治疗肿瘤及其他与氧化、炎症相关疾病的新策略。蛋白质的翻译后修饰,对蛋白质空间构象、稳定性及其与其他蛋白质间相互作用具有重要作用。因此,探究 NRF2 的翻译后修饰如磷酸化、乙酰化和泛素化的修饰过程等,对深入了解 NRF2 的功能及调控机制至关重要,并与某些疾病的发生发展密切相关。本文对近年来翻译后修饰对 NRF2 的活性及功能的调控进行综述。

关键词 转录因子 NF-E2 相关因子 2(NRF2);翻译后修饰;功能调控

中图分类号 Q71

Regulation of NRF2 by Post-translational Modifications

ZHANG Yi-Han, YI Yu-Jiao, GU Yu-Chao*

(School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Key Laboratory of Marine Drugs,
Ministry of Education, Qingdao 266003, Shandong, China)

Abstract Antioxidant responsive elements (AREs) are common in the promoter region of genes coding antioxidant and/or detoxifying enzymes. AREs are essential to activate these genes, whose expression is crucial to maintain the homeostasis of intracellular redox levels and protect cells against reactive oxygen species (ROS)-induced lesions. The nuclear factor erythroid-2 related factor 2 (NRF2), a critical transcription factor responsible for transcriptional activation of ARE-dependent genes, plays an important role in oxidative stress and electrophilic reagent stress and is involved in a variety of cellular processes including inflammation, cellular proliferation and differentiation, apoptosis, tissue regeneration and metabolism. Therefore, activating NRF2 could be a novel tactics for cancer therapy as well as diseases associated with oxidation or inflammation. The post-translational modifications (PTMs) of proteins mediate conformation alteration, stability and the interaction with other proteins. Consequently, PTMs of NRF2 such as phosphorylation, acetylation and ubiquitination are critical to its function, and thus closely related to certain disease development and progression. Here we review the mechanistic studies of NRF2 PTMs in recent years.

Key words nuclear factor erythroid-2 related factor 2 (NRF2); post-translational modification; function regulation

收稿日期: 2017-05-03; 修回日期: 2017-06-26; 接受日期: 2017-07-11

国家自然科学基金山东海洋科学中心项目(No. U1606403)和国家自然科学基金项目(No. 81272264)资助

* 通讯作者 Tel: 5320-82320670; E-mail: guych@126.com

Received: May 3, 2017; Revised: June 26, 2017; Accepted: July 11, 2017

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. U1606403 and 81272264)

* Corresponding author Tel: 5320-82320670; E-mail: guych@126.com

氧化应激(oxidative stress)常指因超氧化物,如过氧化氢、过氧化物、一氧化氮、脂质过氧化物等活性氧(reactive oxidative species, ROS)过度积累,而抗氧化物(如谷胱甘肽、抗坏血酸等)和抗氧化酶体系(如过氧化氢酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽 S 转移酶等)减少或失调所引起的一种细胞代谢失衡状态。氧化应激时,超氧化剂引起的细胞损伤或不良反应,在癌症、衰老、神经退行性疾病和其他疾病发生、发展中发挥作用^[1-3]。因此,阐明调控抗氧化防御机制的分子信号对于抗氧化剂干预治疗具有重要意义^[4]。抗氧化反应组件(antioxidant responsive elements, AREs)是细胞内某些基因启动子的顺式作用组件,其核心序列 5'-A/GTGANNNGCA/G-3'是多种氧化性及亲电子性物质分子的结合位点;当这些分子结合 ARE 后,可启动启动子的转录活性^[5, 6],对下游抗氧化基因,如苯醌氧化还原酶、谷胱甘肽 S 转移酶和血红素氧合酶等的表达具有重要调节作用^[7, 8]。

转录因子 NF-E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2 related factor 2, NRF2)是调控氧化还原内稳态的一个关键转录因子,经由调控基因启动子区域 ARE 促进内源性抗氧化剂、II 相代谢酶及其他胞内防御蛋白质的表达^[9]。NRF2 是调控细胞抵御外来氧化损伤的关键因子,其缺失或启动受阻将影响机体抗氧化应激能力,与临床多种病变的发生发展密切相关^[10-14]。

蛋白质翻译后的修饰是指在蛋白质翻译中或翻译后经历的共价加工过程。例如:①对某些氨基酸

的修饰,包括共价连接简单的官能团(乙酰基或磷酸基等)和引入一些复杂的结构(脂类或糖类等);②转录后切割(信号肽或活性肽等);③氨基酸的交联(丝氨酸或酪氨酸等)。其中,第一类蛋白质翻译后修饰是近些年的研究热点,主要包括磷酸化、乙酰化、泛素化、糖基化、羧基化、核糖基化、二硫键的配对以及甲基化和戊二酰化等。蛋白质翻译后修饰影响蛋白质的电荷状态、疏水性、构象和稳定性,进而影响其功能^[15-17]。本文对近年来翻译后修饰对于 NRF2 功能的影响的研究进行总结,并对未来的研究做了一些展望。

1 转录因子 NF-E2 相关因子 2 的结构及功能

1.1 NRF2 的结构

NRF2 包含 6 个结构域 Neh1、Neh2、Neh3、Neh4、Neh5 和 Neh6 (Fig. 1)。其中, Neh1 结构域包括碱性亮氨酸拉链结构(basic leucine zipper, bZIP)、核定位序列及含亮氨酸的核输出序列。该结构域可与 Maf 形成二聚体后与 DNA 结合^[18]。Neh2 结构域可与胞浆 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (Kelch-like ECH-associated protein-1, Keap1)的 Kelch 区结合。同时,该区域有多个赖氨酸残基,介导蛋白酶对 NRF2 的泛素化降解^[19]。Neh3 参与招募共激动剂-染色质解螺旋酶 DNA 结合蛋白 CHD6 活化转录。Neh4、Neh5 是富含酸性残基的独立转录结构域,可协同启动 cAMP 反应组件结合蛋白(即 CREB protein)的结合蛋白(CREB protein-binding protein, CBP)。Neh6 与 NRF2 氧还非依赖的负性调节有关^[20]。

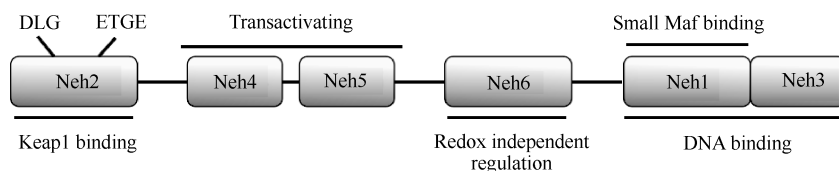


Fig. 1 The structure of NRF2 NRF2 contains six conserved domains, designated Neh1-Neh6. Neh2 is a Keap1-binding domain. Neh4 and Neh5 are transcriptional activation domains. Neh1, the Cap N' Collar Basic Leucine Zipper (CNC-bZIP) domain of NRF2, is located in the C-terminal half of the molecule and constitutes the basic DNA-binding domain and interferes with the binding to the Maf

1.2 NRF2 的功能

NRF2 属于 CNC-bZIP 即 CNC 亮氨酸拉链转录启动因子家族^[21]。NRF2 通过诱导一系列编码抗氧化剂保护蛋白质的表达,促进细胞内氧化还原环境的调节,因此,成为抗氧化应激的重要通路^[22]。NRF2 在维持细胞的环境稳态,尤其是细胞应对各种外界应激时发挥重要作用。当细胞与毒物分子

(如 ROS、RNS 等)结合进入信号传导系统时,低浓度的 ROS 和 RNS 有利于维持胞内信号的传导,但高浓度则用于防御微生物^[23, 24]。因此,生理学上的分子浓度需经过精细的调控,而在此过程中 NRF2 发挥重要作用。

NRF2 参与调控 100 多个基因表达,通过与 DNA 结合,如抗氧化反应组件(AREs)、亲电反应组

件(EpREs)响应多种胞内应激^[25]。除了直接快速的稳态维持作用外,NRF2 也发挥长时程作用,其与 NF- κ B、p53、AhR、mTOR、AP1 和 NOTCH1 等信号通路均有功能上的联系^[26-32]。因此,NRF2 广泛参与炎症、增殖、凋亡、细胞分化、组织再生和代谢等过程^[33-35]。

2 转录因子 NF-E2 相关因子 2 在疾病中的作用

NRF2 参与多个下游靶基因的调控,包括细胞氧化还原稳态、细胞生长和凋亡、炎症反应以及泛素介导的降解途径相关的基因^[36-38]。NRF2 可精确调控相关防御基因的表达,有利于细胞对抗外源性致伤因素的损害作用,对维持细胞氧化还原稳态至关重要。研究发现,活性氧与多种疾病的病理相关,推测 NRF2 可能成为多种疾病治疗的新靶标^[39]。同时,大量的证据证实,NRF2 可抵御多种疾病的病理状态,如哮喘、肺纤维化和急性肺损伤、神经疾病、肺气肿、心血管疾病、炎症、狼疮样自身免疫性肾炎及牙周疾病等^[40-45]。

据文献报导,NRF2 启动可抑制癌变(尤其在早期)。该论证包括很多实验,如某些药物激活 NRF2 而抑制癌变或 NRF2 敲除易致癌变等^[25]。但随着研究的深入,发现 NRF2 通过降低胞内自由基以及增强抗炎等途径,促进应激条件下细胞的存活,因此,也有可能促进肿瘤细胞的存活^[46]。近期,Gonzalez-Donquiles 等阐明了 NRF2 在结直肠癌中的双向调控作用^[47]。NRF2 与炎症相关疾病有密切联系,NRF2 经调控氧化应激抑制氧化应激反应产生的 NF- κ B 和 AP-1,进而抑制促炎细胞因子及趋化因子的产生,从而提高细胞保护作用,抵制炎症组织的损伤作用^[48, 49]。Fisher 等研究表明,在大鼠非酒精性脂肪肝模型中,NRF2 上调可有效启动抗氧化基因表达,保护肝细胞^[50]。在药物诱导的肝损伤中,NRF2 高表达亦发挥重要的保护作用^[51, 52]。在筛选具有逆转人类细胞衰老潜能基因时发现,转录因子 NRF2 介导的细胞抗氧化通路的紊乱是介导细胞衰老的驱动力。一种用于治疗脂肪肝的 NRF2 激动剂奥替普拉,可推迟间充质干细胞衰老过程,并提高其体内活性^[53]。在雷帕霉素缓解百草枯中毒所致的肺纤维化,柚皮素改善 D-半乳糖诱导的行为功能障碍和神经缺陷中,NRF2 均发挥重要作用^[54, 55]。诸多研究已证明,NRF2 在多种疾病及药物治疗中发挥重要的调控作用。

3 翻译后修饰对转录因子 NF-E2 相关因子 2 的调控作用

3.1 泛素化修饰

泛素化即蛋白质被泛素共价修饰的过程,在几乎所有的真核细胞活动中发挥关键作用。泛素-蛋白酶体通路是真核细胞内最主要的蛋白质降解途径。

Keap1 是 NRF2 活性的负性调节因子。在氧化还原内稳态条件下,Keap1 与 NRF2 结合,将其锚定在胞浆。同时,Keap1 可与 Cullin-3(CUL3)作用,作为 E3 泛素化连接酶适配器,促进 NRF2 泛素化,使其在蛋白酶作用下降解,以维持 NRF2 处于非游离及不断降解的非活性状态^[56]。研究发现,Keap1 有多个半胱氨酸残基,C273 和 C288 两个半胱氨酸位点,是 Keap1 发挥对 NRF2 负性调控的关键位点。在氧化剂或是亲电子试剂作用下,C273 和 C288 位点被修饰,会导致 NRF2 与 Keap1 结合不稳定或使 Keap1 上的 CUL3 解离,从而使 NRF2 泛素化被抑制,NRF2 入核与 ARE 作用并启动下游抗氧化基因的表达^[57, 58](Fig. 2)。除此以外,在抗氧化剂作用下,Keap1 的 C151 位半胱氨酸被修饰,是 NRF2 从 Keap1 释放出来发挥保护作用的必要条件^[59](Fig. 2)。

研究发现,Keap1 的 BTB 复杂区域中,Y141 酪氨酸磷酸化后,Keap1 蛋白稳定性增加,而用 H₂O₂ 处理使其去磷酸化或将 Y141 酪氨酸突变为丙氨酸后,致 Keap1 蛋白稳定性下降并失去功能。而 Keap1 的降解,使其对 NRF2 负性调控下降,释放 NRF2 入核,启动细胞保护作用。同时发现,Keap1 发挥功能需要二聚体或多聚体的形成,但 T141 酪氨酸突变并不会改变蛋白质形成二聚体或多聚体的能力。同时,突变的 Keap1 可与 NRF2 结合,但无降解 NRF2 的作用^[60]。不仅如此,Keap1 的 Y85 酪氨酸位点磷酸化后,可促进 Keap1 的核输出,而 Keap1 调控 CUL3 出核,进而促进胞浆内 Keap-CUL3 与 NRF2 结合,调控 NRF2 的含量^[61]。以上研究提示,Keap1 酪氨酸磷酸化/去磷酸化作用,可以改变 Keap1 稳定性或胞内定位,进而影响 NRF2 的泛素化作用(Fig. 2)。

在此基础上,科研人员开始探究蛋白质翻译后的修饰在疾病中的影响。结果显示,PKC ϵ 可磷酸化 Keap1 的 S599、S602 丝氨酸位点,进而促进 Keap1 与 NRF2 的结合,增加 NRF2 泛素化降解(Fig. 2)。因此,在人类肺癌以及肝癌组织中发现低

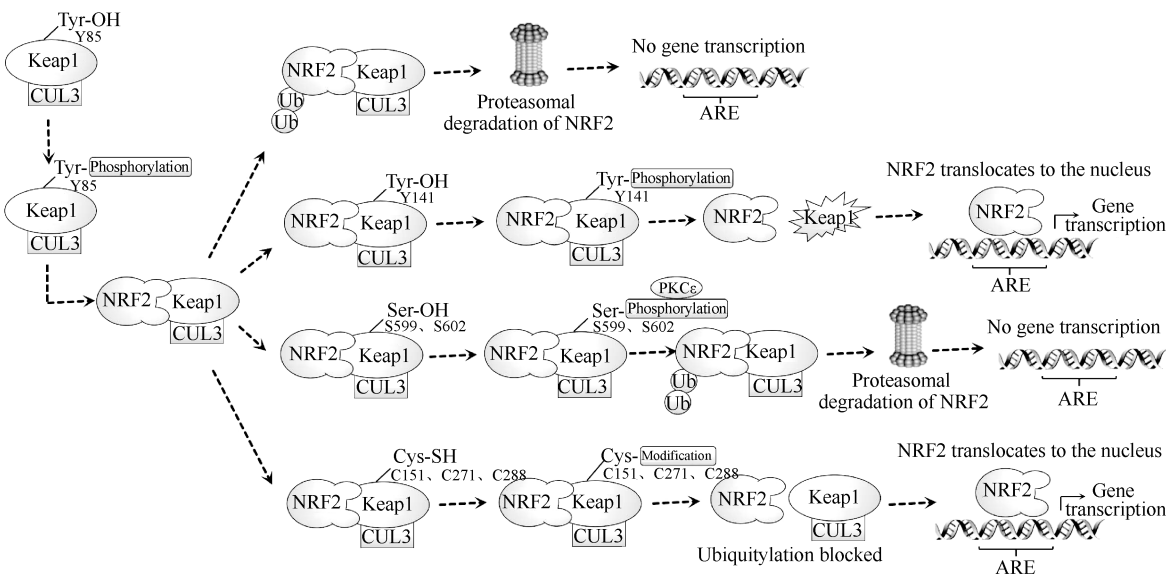


Fig. 2 The ubiquitination of NRF2 The repressor protein Keap1 recognizes and targets Nrf2 to a cullin 3 (CUL3)-based E3 ubiquitin ligase for ubiquitylation and subsequent degradation by the 26S proteasome. Antioxidant-induced Keap1 Tyr85 phosphorylation controls the nuclear export and degradation of the Keap1-CUL3-Rbx1 complex to allow normal Nrf2 activation and repression. Phosphorylation of Tyr141 regulates the stability and degradation of Keap1. Phosphorylation of Ser599 exposes the deeply buried Ser602 for phosphorylation in Keap1 and enhances Keap1-NRF2 interaction. Modification of Cys (C151, C273, C288) in Keap1 leads to a disruption of the activity of NRF2 to escape from Keap1-mediated repression

水平表达的 PKCε 和高水平表达的 NRF2,而 NRF2 过表达会增加肿瘤细胞耐药性。因此,PKCε 通过调控 Keap1 磷酸化,进而影响其与 NRF2 结合以及 NRF2 泛素化^[62]。

3.2 SUMO 化修饰

类似于泛素化修饰过程,小泛素相关修饰物 (small ubiquitin-related modifier, SUMO)也可共价修饰靶蛋白的赖氨酸残基。SUMO 与靶蛋白之间这种可逆的共价连接,在蛋白质相互作用、DNA 修复、DNA 与蛋白质结合活性、维持基因组稳定及转录调控等方面均发挥重要的调节作用^[63, 64]。E3 泛素连接酶复合物介导 NRF2 的泛素化降解,是研究细胞水平调节 NRF2 表达最为广泛的机制。虽然缺乏相关机制研究,但仍存在 NRF2 在细胞核中降解的可能。最新研究发现,NRF2 可被 SUMO-1 和 SUMO-2 的 SUMO 化,提供一种独立于 Keap1 的细胞核降解的新机制。同时发现,As₂O₃ 处理 HepG2 细胞后,可增强 SUMO 对靶蛋白的附着,增加 NRF2 的 SUMO 化修饰。该机制对于早幼粒细胞白血病的治疗具有重要作用^[65, 66]。

3.3 磷酸化修饰

蛋白质磷酸化是一种蛋白质的翻译后修饰方式,参与调控多种信号传导、细胞周期、基因表达等生命活动,是最常见的修饰过程。磷酸化主要在蛋

白质激酶催化下,将 ATP 的磷酸基转移到底物蛋白质的氨基酸残基(丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)上,或者在信号作用下结合 GTP。NRF2 蛋白有多个丝氨酸、苏氨酸及酪氨酸残基位点,因此,极有可能发生磷酸化修饰。该修饰主要发生于哪些氨基酸位点,修饰后蛋白质的性质及功能发生怎样的改变,得到了广泛的探究。

研究显示,NRF2 是某些蛋白激酶的底物,包括蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、糖原合酶激酶 3 (glycogen synthase kinase-3, GSK-3)、酪蛋白激酶 2 (casein kinase 2, CK2) 和酪氨酸蛋白激酶 Fyn^[67]。

研究表明,在抗氧化剂作用下,Keap1 的 C151 半胱氨酸修饰是 NRF2 从 Keap1 释放出来发挥保护作用的必要条件之一。同时研究发现,抗氧化剂促 NRF2 释放过程中,NRF2 磷酸化修饰也是必要条件。该磷酸化主要发生在 NRF2 的 S40 丝氨酸位点。在 PKC 的介导下,磷酸化 NRF2,使 NRF2 从 Keap1 释放并入核,同时启动相关基因的表达^[57] (Fig. 3)。

共价修饰启动 NRF2 的活性,使其从 Keap1 释放出来,已获得广泛的探究。但 NRF2 从 Keap1 释放后通过修饰调控 NRF2 活性的研究较少。最近的研究表明,在神经母细胞瘤细胞中,CK2 可磷酸化

NRF2 的 Neh4 和 Neh5 结构域,影响其核异位及转录活性^[68]。同时,酪氨酸激酶 Fyn 可磷酸化 NRF2 的 Y568 位酪氨酸,致 NRF2 从核中移出,减少入核 NRF2 总量,进而影响其与 ARE 的结合^[69] (Fig. 3)。进一步研究发现,多功能丝氨酸/苏氨酸激酶 GSK-3 磷酸化酪氨酸激酶 Fyn 的苏氨酸残基,致其核异位,促进 Fyn 磷酸化 NRF2 T568 位酪氨酸,致 NRF2 从核中移出及泛素化降解^[70] (Fig. 3)。

随后,科研人员探究 NRF2 磷酸化修饰与疾病治疗的关系。脑出血在脑血管疾病中危害较大,有

较高致残致死率。而脑血肿形成后将产生炎症,氧化应激对大脑造成二次损伤以及神经功能障碍。因此,抑制脑内炎症及氧化应激,对降低脑出血损伤有重要意义。研究已证实,富马酸二甲酯可启动 CK2, CK2 磷酸化 NRF2,进而促进 NRF2 与 Maf 结合形成异二聚体,其可调控抗炎、抗氧化应激相关基因的表达,从而减缓脑出血所致的炎症,降低血脑屏障渗透性及改善神经系统受损状况^[67]。不仅如此,在心缺血再灌注中,PKC 可磷酸化 NRF2,促使其入核进而保护心肌^[71]。

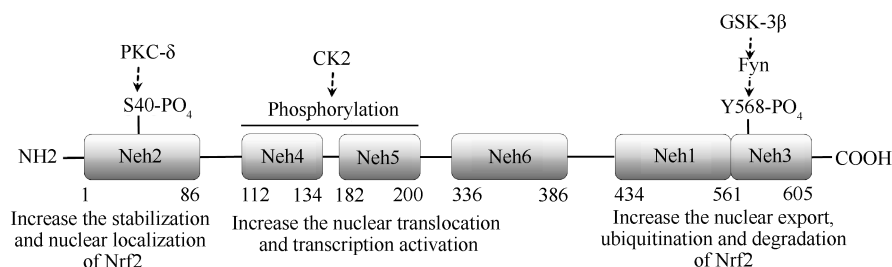


Fig. 3 The phosphorylation of NRF2 The phosphorylation of NRF2 Ser40 by PKCδ results in the escape or release of NRF2 from Keap1. Phosphorylation of NRF2 in the transcription activation domain (Neh4 and Neh5) by CK2 is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of NRF2. Active GSK3β phosphorylates Src A sub-family members including Fyn that enter the nucleus leading to phosphorylation of NRF2 Tyr568, and subsequent nuclear export and degradation of NRF2

3.4 乙酰化修饰

作为一种普遍存在的,可逆且高度调控的蛋白质翻译后修饰方式,乙酰化修饰在生物学过程中起重要的调控作用。蛋白质乙酰化修饰主要是赖氨酸、丝氨酸和苏氨酸残基共价结合乙酰基的过程。该修饰调控蛋白质多种性质的变化,如蛋白质稳定性、胞内定位、转录活性等,同时也与多种疾病密切相关。

羧肽酶 B(carboxypeptidase B, CPB)和 P300 蛋白是多种转录因子的助启动剂^[72,73],可调控乙酰转移酶的作用^[74]。在酵母双杂交实验中发现,CPB 与 NRF2 结合,推测 CPB 能通过乙酰化作用调控 NRF2 的转录^[75]。进一步探究证实,P300 与 NRF2 有直接的相互作用,且 NRF2 蛋白赖氨酸残基被乙酰化,同时敲除 NRF2 的 Neh1 区域后,NRF2 乙酰化作用消失,且敲除 Neh4、Neh5 区域也显著降低 NRF2 乙酰化作用,Neh5 协调 Neh4 介导 NRF2 与 P300 的结合。为进一步探究 Neh1 区域的乙酰化修饰位点,将 Neh1 区域分为多个子区域进行逐一敲除后发现,敲除 Neh1 某个子区域与敲除整个 Neh1,对乙酰化作用的降低无明显差异,提示 Neh1 有多个位点参与了乙酰化修饰。氨基酸序列分析发现,Neh1 有 18 个赖氨酸残基(CNC 区域有 6 个,bZIP 有 12 个),且 CNC 区参与更多的乙酰化作用。Neh1 区域

乙酰化修饰并不会改变 NRF2 泛素化及其稳定性,也不影响其胞内定位,但却可以促进 NRF2 的转录启动以及与 DNA 的结合^[76] (Fig. 4)。

进一步的乙酰化研究发现,Neh3 有 4 个赖氨酸残基。同时,Neh3 区功能尚未探明,因此 Kawai 等^[77]将研究重点放在 Neh3 区。研究结果发现,Neh3 区乙酰化/去乙酰化作用,在 NRF2 核质穿梭中发挥作用,赖氨酸残基乙酰化参与调控 NRF2 转录活性。为进一步确认 Neh3 区乙酰化位点,采用氨基酸突变法将 K588、K591、K595、K596 酪氨酸位点突变,发现 K588 和 K591 位赖氨酸可能是乙酰化修饰位点,该位点赖氨酸乙酰化促进 NRF2 核聚集以及转录活性 (Fig. 4)。

随后,科研人员探究 NRF2 乙酰化修饰与疾病治疗的关系。实验证实,Sirtuin type 1 经由脱乙酰化促进 NRF2 稳定性,启动 NRF2/ARE 抗氧化信号通路,在百草枯中毒所致的肺损伤中起保护作用^[78]。不仅如此,组蛋白脱乙酰酶抑制剂可促进 NRF2 乙酰化启动其功能,进而在骨关节炎中发挥保护作用^[79]。在以上疾病研究中发现,NRF2 乙酰化修饰在不同疾病、不同细胞体系中具有不同的作用,提示 NRF2 乙酰化修饰作用可能因细胞体系或修饰位点不同而不同。

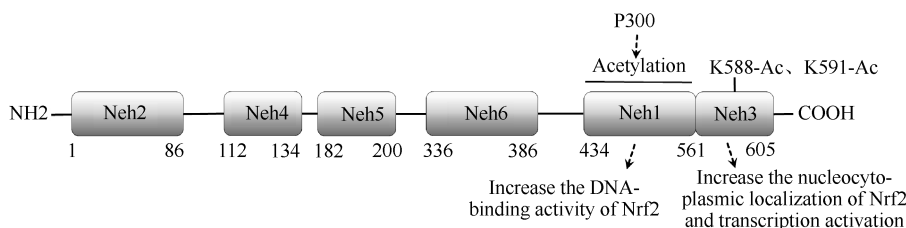


Fig. 4 The acetylation of NRF2 Acetylation of NRF2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of NRF2. Acetylation of NRF2 Lys588 and Lys591 in the Neh3 domain increases the nuclear localization and the transcriptional activity of NRF2

3.5 甲基化修饰

甲基化是极为重要的蛋白质翻译后修饰。甲基转移酶将 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 分子中的活性甲基转移至各种氨基酸残基的含 N、O 或 S 原子的官能团上。前期研究已证实, p300/CBP 可参与 NRF2 多个赖氨酸位点的乙酰化^[76], 而在 p300/CBP 复合物中包含 2 种精氨酸甲基转移酶 PRMT1 和 CARM1, 可转录辅启动因子参与转录调控^[80]。该结果提示, NRF2 可能存在甲基化修饰。最近研究发现, NRF2 可被 PRMT1 甲基化但不能被 CARM1 甲基化。进一步位点分析证实, NRF2 第 437 位精氨酸是 PRMT1 甲基化的位点。同时, 该位点甲基化修饰对 NRF2 与 DNA 的结合有重要调控作用^[81]。

3.6 NRF2 不同类型的翻译后修饰间的相互作用

诸多研究已证实, NRF2 存在不同类型的翻译后修饰过程, 如泛素化、磷酸化、甲基化等。同一蛋白质的多个位点以及多种修饰之间协同或拮抗, 组成蛋白质相互作用精确调控的复杂网络。但 NRF2 不同类型的蛋白质翻译后修饰间是否存在相互作用仍未完全阐明。NRF2 S40 位丝氨酸位点可被 PKC 磷酸化, 抑制 NRF2 泛素化降解, 进而促进其与 Keap1 解离, 入核并启动相关基因的表达^[82]。但进一步研究表明, 多功能丝氨酸/苏氨酸激酶 GSK-3 β 磷酸化, Fyn 苏氨酸残基致其核异位, 促进 Fyn 磷酸化。Fyn 促使 NRF2 T568 酪氨酸磷酸化致使 NRF2 从核中移出, 并促进其泛素化降解^[70]。由于泛素化、磷酸化及甲基化作用于不同的氨基酸, 因此, 并不存在直接的拮抗作用, 但三者是否会通过构象改变等方式相互协同或拮抗, 目前未见相关报导。此外, SUMO 化、乙酰化以及泛素化均可发生在蛋白质的赖氨酸, 因此, 有可能会有相互拮抗。但目前关于 NRF2 SUMO 化、乙酰化以及泛素化位点仍未完全阐明, 且三者之间是否会有拮抗作用也亟待被揭示。

4 问题与展望

大量研究已证实, NRF2 广泛参与多种与氧化

应激和炎症相关的疾病, 其经由调控下游多种基因的表达, 对于维持细胞内氧化还原内环境稳态有重要作用。目前, 关于 NRF2 的研究集中于其在诸多疾病 (如肿瘤、肺纤维化、牙周疾病等) 以及疾病治疗中的作用, 虽然关于 NRF2 磷酸化、乙酰化以及泛素化的研究较多也比较全面, 但其在疾病的发生与治疗中的作用并未完全阐明。同时, NRF2 SUMO 化及甲基化的研究较少, NRF2 其他蛋白质翻译后修饰尚未见报道, 有待进一步探究。

参考文献 (References)

- [1] Gonzalez-Sanchez E, Perez MJ, Nytofte NS, *et al.* Protective role of biliverdin against bile acid-induced oxidative stress in liver cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, **97**: 466-477
- [2] Subastri A, Suyavaran A, Preedia Babu E, *et al.* Troxerutin with copper generates oxidative stress in cancer cells: its possible chemotherapeutic mechanism against hepatocellular carcinoma [J]. *J Cell Physiol*, 2017, doi: 10.1002/jcp.26061. [Epub ahead of print]
- [3] Nesi G, Sestito S, Digiacoio M, *et al.* Oxidative stress, mitochondrial abnormalities and proteins deposition: Multitarget approaches in Alzheimer's disease [J]. *Curr Top Med Chem*, 2017, doi: 10.2174/1568026617666170607114232. [Epub ahead of print]
- [4] Akram S, Teong HF, Fliegel L, *et al.* Reactive oxygen species-mediated regulation of the Na⁺-H⁺ exchanger 1 gene expression connects intracellular redox status with cells' sensitivity to death triggers [J]. *Cell Death Differ*, 2006, **13**(4): 628-641
- [5] McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, *et al.* The Cap'n Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes [J]. *Cancer Res*, 2001, **61**(8): 3299-3307
- [6] Nishinaka T, Miura T, Shimizu K, *et al.* Identification and characterization of functional antioxidant response elements in the promoter of the aldo-keto reductase AKR1B10 gene [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, doi: 10.1016/j.cbi.2017.02.008. [Epub ahead of print]
- [7] 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 U S A*, 1996, **93**(25): 14960-14965
- [8] Santofimia-Castano P, Clea Ruy D, Garcia-Sanchez L, *et al.* Melatonin induces the expression of Nrf2-regulated antioxidant enzymes via PKC and Ca²⁺ influx activation in mouse pancreatic acinar cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, **87**: 226-236
- [9] Wasserman WW, Fahl WE. Functional antioxidant responsive elements [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, **94**(10): 5361-5366

- [10] Hybertson BM, Gao B. Role of the Nrf2 signaling system in health and disease[J]. *Clin Genet*, 2014, **86** (5): 447-452
- [11] Ahuja M, Ammal Kaidery N, Yang L, *et al.* Distinct Nrf2 signaling mechanisms of fumaric acid esters and their role in neuroprotection against 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine- induced experimental Parkinson's-like disease [J]. *J Neurosci*, 2016, **36**(23): 6332-6351
- [12] Kubben N, Zhang W, Wang L, *et al.* Repression of the antioxidant NRF2 pathway in premature aging[J]. *Cell*, 2016, **165**(6): 1361-1374
- [13] Al-Sawaf O, Clarnet T, Fragoulis A, *et al.* Nrf2 in health and disease; current and future clinical implications [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, **129**(12): 989-999
- [14] Murphy KE, Park JJ. Can co-activation of Nrf2 and neurotrophic signaling pathway slow Alzheimer's disease? [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, **18**(6), doi: 10.3390/ijms18061168
- [15] Eisenberg-Lerner A, Ciechanover A, Merbl Y. Post-translational modification profiling - A novel tool for mapping the protein modification landscape in cancer [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2016, **241** (14): 1475-1482
- [16] Du Toit A. Post-translational modification: Sweetening protein quality control[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, **15**(5): 295
- [17] Gu B, Zhu WG. Surf the post-translational modification network of p53 regulation[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, **8**(5): 672-684
- [18] 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 beta-globin locus control region [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, **91**(21): 9926-9930
- [19] Zhang DD. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway[J]. *Drug Metab Rev*, 2006, **38** (4): 769-789
- [20] 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 U S A*, 2004, **101**(7): 2046-2051
- [21] Cho HY, Reddy SP, Kleeburger SR. Nrf2 defends the lung from oxidative stress[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, **8**(1-2): 76-87
- [22] Foresti R, Bucolo C, Platania CM, *et al.* Nrf2 activators modulate oxidative stress responses and bioenergetic profiles of human retinal epithelial cells cultured in normal or high glucose conditions [J]. *Pharmacol Res*, 2015, **99**: 296-307
- [23] Dodson M, Redmann M, Rajasekaran NS, *et al.* KEAP1-NRF2 signalling and autophagy in protection against oxidative and reductive proteotoxicity[J]. *Biochem J*, 2015, **469**(3): 347-355
- [24] Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution [J]. *Genes Cells*, 2011, **16**(2): 123-140
- [25] Hayes JD, McMahon M, Chowdhry S, *et al.* Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, **13** (11): 1713-1748
- [26] Lee DF, Kuo HP, Liu M, *et al.* KEAP1 E3 ligase-mediated downregulation of NF-kappaB signaling by targeting IKKbeta[J]. *Mol Cell*, 2009, **36**(1): 131-140
- [27] You A, Nam CW, Wakabayashi N, *et al.* Transcription factor Nrf2 maintains the basal expression of Mdm2: an implication of the regulation of p53 signaling by Nrf2 [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, **507**(2): 356-364
- [28] Miao W, Hu L, Scrivens PJ, *et al.* Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes [J]. *J Biol Chem*, 2005, **280** (21): 20340-20348
- [29] Shibata T, Saito S, Kokubu A, *et al.* Global downstream pathway analysis reveals a dependence of oncogenic NF-E2-related factor 2 mutation on the mTOR growth signaling pathway [J]. *Cancer Res*, 2010, **70**(22): 9095-9105
- [30] Niture SK, Jaiswal AK. Hsp90 interaction with Inrf2 (Keap1) mediates stress-induced Nrf2 activation [J]. *J Biol Chem*, 2010, **285**(47): 36865-36875
- [31] Kim H, Jung Y, Shin BS, *et al.* Redox regulation of lipopolysaccharide-mediated sulfiredoxin induction, which depends on both AP-1 and Nrf2 [J]. *J Biol Chem*, 2010, **285** (45): 34419-34428
- [32] Wakabayashi N, Shin S, Slocum SL, *et al.* Regulation of notch1 signaling by nrf2: implications for tissue regeneration [J]. *Sci Signal*, 2010, **3**(130): ra52
- [33] Yang L, Fan X, Cui T, *et al.* Nrf2 promotes keratinocyte proliferation in psoriasis through up-regulation of Keratin 6, Keratin 16 and Keratin 17 [J]. *J Invest Dermatol*, 2017, **137** (10): 2168-2176
- [34] Pistollato F, Canovas-Jorda D, Zagoura D, *et al.* Nrf2 pathway activation upon rotenone treatment in human iPSC-derived neural stem cells undergoing differentiation towards neurons and astrocytes[J]. *Neurochem Int*, 2017, **108**: 457-471
- [35] Chen YY, Tsai CF, Tsai MC, *et al.* Inhibitory effects of rosmarinic acid on pterygium epithelial cells through redox imbalance and induction of extrinsic and intrinsic apoptosis[J]. *Exp Eye Res*, 2017, **160**: 96-105
- [36] Cheng X, Ku CH, Siow RC. Regulation of the Nrf2 antioxidant pathway by microRNAs: new players in micromanaging redox homeostasis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, **64**: 4-11
- [37] Lee YJ, Lee DM, Lee SH. Nrf2 expression and apoptosis in quercetin-treated malignant mesothelioma cells [J]. *Mol Cells*, 2015, **38**(5): 416-425
- [38] Keleku-Lukwete N, Suzuki M, Otsuki A, *et al.* Amelioration of inflammation and tissue damage in sickle cell model mice by Nrf2 activation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, **112**(39): 12169-12174
- [39] Lu MC, Ji JA, Jiang ZY, *et al.* The Keap1-Nrf2-ARE pathway as a potential preventive and therapeutic target: an update [J]. *Med Res Rev*, 2016, **36**(5): 924-963
- [40] Chiu AV, Saigh MA, McCulloch CA, *et al.* The role of Nrf2 in the regulation of periodontal health and disease[J]. *J Dent Res*, 2017, **96**(9): 975-983
- [41] Duan L, Li J, Ma P, *et al.* Vitamin E antagonizes ozone-induced asthma exacerbation in Balb/c mice through the Nrf2 pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, **107**(Pt A): 47-56
- [42] Wang L, Wang M, Hu J, *et al.* Protective effect of 3H-1, 2-dithiole-3-thione on cellular model of Alzheimer's disease involves Nrf2/ARE signaling pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, **795**: 115-123
- [43] Mozzini C, Cominacini L, Garbin U, *et al.* Endoplasmic reticulum stress, NRF2 signalling and cardiovascular diseases in a nutshell[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2017, **19**(8): 33
- [44] Cai ZY, Sheng ZX, Yao H. Pachymic acid ameliorates sepsis-induced acute kidney injury by suppressing inflammation and activating the Nrf2/HO-1 pathway in rats [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, **21**(8): 1924-1931
- [45] Yoh K, Itoh K, Enomoto A, *et al.* Nrf2-deficient female mice develop lupus-like autoimmune nephritis [J]. *Kidney Int*, 2001, **60**(4): 1343-1353
- [46] Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, **12**(8): 564-571
- [47] Gonzalez-Donquiles C, Alonso-Molero J, Fernandez-Villa T, *et al.* The NRF2 transcription factor plays a dual role in colorectal cancer: A systematic review [J]. *PLoS One*, 2017, **12** (5): e177549
- [48] Qin T, Du R, Huang F, *et al.* Sinomenine activation of Nrf2 signaling prevents hyperactive inflammation and kidney injury in a mouse model of obstructive nephropathy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, **92**: 90-99
- [49] Yang HL, Lin MW, Korivi M, *et al.* Coenzyme Q0 regulates NFkappaB/AP-1 activation and enhances Nrf2 stabilization in

- attenuation of LPS-induced inflammation and redox imbalance: Evidence from in vitro and in vivo studies[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, **1859**(2): 246-261
- [50] Fisher CD, Lickteig AJ, Augustine LM, *et al.* Experimental non-alcoholic fatty liver disease results in decreased hepatic uptake transporter expression and function in rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, **613**(1-3): 119-127
- [51] Bai X, Chen Y, Hou X, *et al.* Emerging role of NRF2 in chemoresistance by regulating drug-metabolizing enzymes and efflux transporters[J]. *Drug Metab Rev*, 2016, **48**(4): 541-567
- [52] Herpers B, Wink S, Fredriksson L, *et al.* Activation of the Nrf2 response by intrinsic hepatotoxic drugs correlates with suppression of NF-kappaB activation and sensitizes toward TNF alpha-induced cytotoxicity[J]. *Arch Toxicol*, 2016, **90**(5):1163-1179
- [53] Kubben N, Zhang W, Wang L, *et al.* Repression of the antioxidant NRF2 pathway in premature aging[J]. *Cell*, 2016, **165**(6):1361-1374
- [54] Xu Y, Tai W, Qu X, *et al.* Rapamycin protects against paraquat-induced pulmonary fibrosis: activation of Nrf2 signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, **490**(2): 535-540
- [55] Zhang Y, Liu B, Chen X, *et al.* Naringenin ameliorates behavioral dysfunction and neurological deficits in a D-galactose induced aging mouse model through activation of PI3K/Akt/Nrf2 pathway [J]. *Rejuvenation Res*, 2017, doi: 10.1089/rej.2017.1960. [Epub ahead of print]
- [56] Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution [J]. *Genes Cells*, 2011, **16**(2):123-140
- [57] Niture SK, Jain AK, Jaiswal AK. Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance[J]. *J Cell Sci*, 2009, **122**(Pt 24): 4452-4464
- [58] Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, **23**(22): 8137-8151
- [59] Eggler AL, Luo Y, van Breemen RB, *et al.* Identification of the highly reactive cysteine 151 in the chemopreventive agent-sensor Keap1 protein is method-dependent [J]. *Chem Res Toxicol*, 2007, **20**(12): 1878-1884
- [60] Jain AK, Mahajan S, Jaiswal AK. Phosphorylation and dephosphorylation of tyrosine 141 regulate stability and degradation of INrf2. a novel mechanism in Nrf2 activation[J]. *J Biol Chem*, 2016, **291**(3): 1199
- [61] Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Antioxidant-induced INrf2 (Keap1) tyrosine 85 phosphorylation controls the nuclear export and degradation of the INrf2-Cul3-Rbx1 complex to allow normal Nrf2 activation and repression [J]. *J Cell Sci*, 2012, **125**(Pt 4):1027-1038
- [62] Niture SK, Gnatt A, Jaiswal AK. Oncogene PKC epsilon controls INrf2-Nrf2 interaction in normal and cancer cells through phosphorylation of INrf2 [J]. *J Cell Sci*, 2013, **126**(Pt 24): 5657-5669
- [63] Morris JR, Garvin AJ. SUMO in the DNA double-stranded break response: similarities, differences, and cooperation with ubiquitin [J]. *J Mol Biol*, 2017, doi: 10.1016/j.jmb.2017.05.012. [Epub ahead of print]
- [64] Skelly MJ, Frungillo L, Spoel SH. Transcriptional regulation by complex interplay between post- translational modifications[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2016, **33**: 126-132
- [65] Ramani K, Tomasi ML, Yang H, *et al.* Mechanism and significance of changes in glutamate-cysteine ligase expression during hepatic fibrogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2012, **287**(43): 36341-36355
- [66] Malloy MT, McIntosh DJ, Walters TS, *et al.* Trafficking of the transcription factor Nrf2 to promyelocytic leukemia-nuclear bodies: implications for degradation of NRF2 in the nucleus[J]. *J Biol Chem*, 2013, **288**(20): 14569-14583
- [67] Iniaighe LO, Krafft PR, Klebe DW, *et al.* Dimethyl fumarate confers neuroprotection by casein kinase 2 phosphorylation of Nrf2 in murine intracerebral hemorrhage [J]. *Neurobiol Dis*, 2015, **82**: 349-358
- [68] Apopa PL, He X, Ma Q. Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2008, **22**(1): 63-76
- [69] Jain AK, Jaiswal AK. GSK-3beta acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2 [J]. *J Biol Chem*, 2007, **282**(22): 16502-16510
- [70] Rizvi F, Shukla S, Kakkar P. Essential role of PH domain and leucine-rich repeat protein phosphatase 2 in Nrf2 suppression via modulation of Akt/GSK3beta/Fyn kinase axis during oxidative hepatocellular toxicity[J]. *Cell Death Dis*, 2014, **5**: e1153
- [71] Buelna-Chontal M, Guevara-Chavez JG, Silva-Palacios A, *et al.* Nrf2-regulated antioxidant response is activated by protein kinase C in postconditioned rat hearts[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, **74**: 145- 156
- [72] Chen L, Fischle W, Verdin E, *et al.* Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation [J]. *Science*, 2001, **293**(5535): 1653-1657
- [73] Cesena TI, Cardinaux JR, Kwok R, *et al.* CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta is acetylated at multiple lysines: acetylation of C/EBPbeta at lysine 39 modulates its ability to activate transcription [J]. *J Biol Chem*, 2007, **282**(2): 956-967
- [74] Goodman RH, Smolik S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development [J]. *Genes Dev*, 2000, **14**(13): 1553-1577
- [75] Katoh Y, Itoh K, Yoshida E, *et al.* Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription [J]. *Genes Cells*, 2001, **6**(10): 857-868
- [76] Sun Z, Chin YE, Zhang DD. Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, **29**(10): 2658-2672
- [77] Kawai Y, Garduno L, Theodore M, *et al.* Acetylation-deacetylation of the transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) regulates its transcriptional activity and nucleocytoplasmic localization [J]. *J Biol Chem*, 2011, **286**(9): 7629-7640
- [78] Ding YW, Zhao GJ, Li XL, *et al.* SIRT1 exerts protective effects against paraquat-induced injury in mouse type II alveolar epithelial cells by deacetylating NRF2 in vitro [J]. *Int J Mol Med*, 2016, **37**(4): 1049-1058
- [79] Cai D, Yin S, Yang J, *et al.* Histone deacetylase inhibition activates Nrf2 and protects against osteoarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, **17**: 269
- [80] An W, Kim J, Roeder RG. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53 [J]. *Cell*, 2004, **117**(6): 735-748
- [81] Liu X, Li H, Liu L, *et al.* Methylation of arginine by PRMT1 regulates Nrf2 transcriptional activity during the antioxidative response [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, **1863**(8): 2093-2103
- [82] Bloom DA, Jaiswal AK. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H: quinone oxidoreductase-1 gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(45): 44675-44682