



Nrf2 在酒精性肝损伤模型中的研究进展

邢会杰^{1,2}, 宋琳亮¹, 方梅霞¹, 和 君¹, 李守军², 傅江南¹

(1. 暨南大学实验动物管理中心, 广州 510632; 2. 华南农业大学兽医学院, 广州 510642)

【摘要】 氧化应激的产生与酒精性肝损伤的发生发展密切相关, 目前被普遍认为是酒精性肝病的主要发病机制日益成为研究的热点。Nrf2 是目前发现的抵御外源性刺激和毒物的抗氧化应答反应的核心途径之一, 在许多药物或化学物质在体内的代谢解毒中具有重要作用, Nrf2 的缺失或激活障碍, 会加重氧化应激状态、破坏细胞内正常的氧化还原平衡稳态, 导致细胞毒性、功能障碍、凋亡, 甚至死亡。本文对 Nrf2 在酒精性肝损伤模型中的研究进行综述。

【关键词】 Nrf2; 酒精性肝损伤模型; 氧化应激

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 04-0074-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 004. 016

Progress in research of Nrf2 in alcoholic liver injury models

XING Hui-jie^{1,2}, SONG Lin-liang¹, FANG Mei-xia¹, HE Jun¹, LI Shou-jun², FU Jiang-nan¹

(1. Institute of Laboratory Animal, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

【Abstract】 The generation of oxidative stress is closely associated with the occurrence and development of liver injury induced by chronic alcohol consumption. It is widely considered that oxidative stress is the major mechanism of alcoholic liver disease has become a research hotspot. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a key transcription factor that induces a battery of cytoprotective genes in response to oxidative/electrophilic insults. Nrf2 may play an important role in the metabolism and detoxification of a variety of drugs and chemical compounds. Deficiency of Nrf2 may aggravate the oxidative stress and damage homeostasis of redox system, resulting in cell toxicity, dysfunction, and even death. In this article we will review the research progress of Nrf2 in alcoholic liver injury models.

【Key words】 Nrf2; Alcoholic liver injury model; Oxidative stress

肝脏是经口摄入的外源性毒物在小肠吸收后首先被暴露的器官, 是机体执行解毒和代谢自稳态功能的主要位点^[1]。肝脏也是酒精在体内代谢的特异性器官^[2]。酒精消费与多达 60 多种疾病相关, 在美国, 每年因慢性肝病死亡的 26000 人中, 其中有 46% 与酒精滥用或酗酒有关^[3]。酒精在肝脏代谢过程中产生的氧化应激是引起酒精性肝损伤的主

要因素, 酒精刺激肝脏发生氧化应激时, 为了维持机体的氧化还原平衡, 一系列抗氧化蛋白如过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶以及谷胱甘肽还原酶参与反应, 清除过多的氧化应激产物, 它们的共同作用保护了细胞和组织免受氧化应激损伤。一旦体内高活性分子如活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 和活性氮自由基

【基金项目】 广东省科技基础条件建设项目 (No. 2011B060300015), 国家自然科学基金 (No. 31101677)。

【作者简介】 邢会杰 (1980 -) 男, 在读博士, 执业兽医师, 主要从事实验动物人类疾病模型研究, E-mail: huijie920326@163.com。

【通讯作者】 傅江南, 男, 副教授, 主要从事实验动物基础与应用研究, E-mail: fujiangnan126@126.com。

(reactive nitrogen species, RNS) 等产生过多, 氧化程度超出氧化物的清除, 氧化系统和抗氧化系统失衡, 从而导致组织损伤^[4]。核转录因子 NF-E2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid-related factor 2, Nrf2) 是在肝脏中调节一系列解毒和抗氧化防御基因表达的必须转录因子, 是体内调节氧化应激的关键靶点, 其可以通过促进多种 II 相抗氧化酶和解毒酶的表达, 发挥重要的抗氧化作用, 是目前发现的细胞抗氧化应答的核心途径之一, 能够显著诱导机体的内源性抗氧化应答^[5-7]。在氧化应激情况下, Nrf2 可与抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 结合介导它的目的基因表达^[8]。本文将对 Nrf2 的分子结构, 激活和降解, 分子调控机制以及在酒精介导的肝脏氧化应激中的作用进行综述。

1 Nrf2 概述

1.1 Nrf2 分子结构

Nrf2 是一种碱性亮氨酸拉链转录因子, 属于 CNC (Cap 'n' collar) 转录因子家族中活力最强的转录调节因子^[9], Nrf2 的分子结构包含 Neh1-6 区, 这些区在不同物种间高度保守^[10-11]。其中, Neh1 区是 bZipDNA 结合区, Nrf2 通过 Neh1 区与 Mafs 发生相互作用, 并与 DNA 形成异二聚体。Neh2 区介导 Nrf2 与胞质抑制因子 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 的结合。Neh3 区位于 Nrf2 羧基末端, 对于 Nrf2 下游多种抗氧化反应元件 ARE 依赖性基因的转录激活具有重要作用。Neh4 和 Neh5 区共同结合另一种转录共激活因子 CBP, 参与 Nrf2 转录活性的调控。Neh6 区目前被认为是一种 Keap1 非依赖性的 Nrf2 负性调控区域, 参与 Nrf2 的降解^[12]。

1.2 Nrf2 的激活和降解

在正常生理稳态状态下, Nrf2 的激活依赖于 Keap1, Nrf2 和 Keap1 在细胞质内形成复合体处于抑制状态, 并通过 Keap1 介导的泛素化对 Nrf2 持续进行降解以维持转录形成的 Nrf2 之间的平衡^[13]。当机体受到氧化应激或亲电子基团刺激时, Keap1 介导的泛素化被阻止, 导致 Keap1 的构像发生改变, 使 Nrf2 从 Keap1 上解耦联, Nrf2 核转位水平升高, 游离的 Nrf2 进入核内, 与下游目标基因的 ARE 结合并介导目标基因的转录表达, 从而激活 Nrf2 信号通路^[14-15]。在氧化还原平衡恢复之后, Nrf2 转回

入胞浆并通过泛素化降解, 促进 Nrf2 的消耗, 使 Nrf2 维持到正常水平^[16-17]。过去几十年的研究证据表明 CNC 转录因子家族的另外一个转录因子 Bach1 也可以激活 Nrf2, 生理状态下, Bach1 结合到 ARE 启动子区域阻止 Nrf2 的结合^[18]。在应激状态下, Bach1 被 Nrf2 取代, 导致 Nrf2 激活, 这说明在不同细胞状态下, Bach1 与 Nrf2 可竞争性结合到同一基因结合位点^[19]。

1.3 Nrf2 主要目标基因

作为对氧化应激或亲电子基团刺激的反应, Nrf2 转位入核和 Maf 形成异二聚体后与 ARE 结合通过上调下游抗氧化目标基因的转录控制着细胞的命运, 而这些目标基因的最主要特点是在其启动子区域都含有 ARE 序列。Nrf2 可介导多种细胞保护和解毒基因的转录激活发挥功能, 其调控的下游目标基因^[20-24]主要包括 谷氨酸-半胱氨酸连接酶 (glutamate-cysteine ligase, GCL), 谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx), 硫氧还蛋白 (thioredoxin, Trx), 硫氧还蛋白还原酶 (thioredoxin reductase, TrxR), 过氧化物氧化还原酶 (peroxiredoxin, Prx) 和血红素单加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 等氧化还原平衡蛋白, 具有保持细胞内谷胱甘肽和 硫氧还蛋白水平以及降低 ROS 水平的功能; 谷胱甘肽-转移酶 (Glutathione-S-transferase, GST), NAD(P)H: 醌氧化还原酶 1 (NAD(P)H quinone oxidoreductase-1, NQO1) 和葡萄糖醛酸转移酶 (UDP-glucuronosyltransferase, UGT) 等 II 相解毒酶, 在体内主要发挥降解外源性毒物转化为无毒物质和催化结合反应提高外源性毒物的水溶性以利于消除的作用; 和多药耐药相关蛋白 (multidrug resistance-associated protein, MRP) 等转运蛋白, 可以控制内源性底物和外源性毒物的吸收和排出。

2 Nrf2 的分子调控机制

Keap1 即是氧化物和亲电子物质诱导 Nrf2 活化的化学感受器, 也是泛素-蛋白酶系统介导 Nrf2 降解的调节器, 在 Nrf2 信号通路的分子调控机制中居于核心地位^[22]。生理状态下, Keap1 作为 cullin 3 (Cul3)-Rbx1-E3 泛素连接酶与底物 Nrf2 的连接分子, 不断对 Nrf2 进行泛素化和蛋白酶体降解, 此时细胞的 Nrf2 低水平表达^[25]。当机体在氧化应激或亲电子物质刺激情况下, Nrf2 通过与 Keap1 蛋白上的关键半胱氨酸残基发生化学反应, 使 Keap1-Cul3-

Rbx1-E3 复合体分离,从而抑制 Nrf2 泛素化,并增强 Nrf2 蛋白的稳定性,Nrf2 呈高水平表达并转移入核发挥作用。当机体自稳态恢复,Keap1 从胞浆中穿梭进入细胞核,从 ARE 上移走 Nrf2,然后 Nrf2-Keap1 复合物再次移位出核转入细胞质中,Nrf2-Keap1 复合物则再次通过 Cul3-Rbx1-E3 依赖性泛素酶机制降解。Nrf2 重新保持低水平表达,Nrf2 信号通路被抑制^[22]。研究发现,包括细胞外信号调控酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK),磷酸肌醇激酶(phosphoinositide-3-kinase, PI3K),蛋白酶 C (protein kinase C, PKC)等激酶通路均参与 Nrf2 的分子调控,其机制是蛋白激酶能通过直接磷酸化 Nrf2 的方式促使其与 Keap1 分离,激活 Nrf2 的转录和表达^[26]。另外,Bach1 通过与 Nrf2 竞争性结合 ARE 启动子区域位点达到对 Nrf2 的调控,这被认为是 Nrf2 通路的一种新的反馈抑制调节机制^[19]。

3 Nrf2 在酒精性肝损伤模型中的作用

Nrf2 是否在酒精介导的肝脏氧化应激损伤中起主要作用尚不完全清楚,对 Nrf2 的研究结论中尚存在相互矛盾的观点。多数认为 Nrf2 的激活在对抗酒精介导的肝脏氧化应激中具有重要作用。在体动物实验利用 Nrf2 基因缺陷小鼠饲喂一定剂量的酒精后与野生型小鼠相比增加了肝脏相关疾病的致死率,并认为酒精对 Nrf2 基因缺陷小鼠的不利效应是由于脂肪生成的增加,总谷胱甘肽和线粒体谷胱甘肽的耗竭和库弗氏细胞介导的炎症反应的加剧的综合结果^[27]。离体实验利用 siRNA 技术,对 Nrf2 基因进行干扰后发现,酒精介导的肝脏氧化应激和脂质过氧化水平明显升高^[28],另外,在用酒精孵育人类肝细胞实验中表现出酶释放提高,GSH 耗竭和脂质过氧化水平的上升。也证实了 Nrf2 具有保护肝细胞避免酒精介导的氧化应激损伤的作用^[29]。胎儿酒精综合症是酒精滥用的主要毒副效应,近来利用待孕母鼠给予酒精饲喂实验^[30]发现,可明显提高小鼠胚胎中 Nrf2 蛋白和 Nrf2-ARE 结合,并伴随着多种 Nrf2 下游目标抗氧化基因和蛋白如 SOD1、SOD2、SOD3、过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶、硫氧还蛋白、谷胱甘肽过氧化物酶中等程度的升高^[31]。以上诸多结果表明,Nrf2 在避免酒精介导的肝脏氧化应激损伤中具有重要保护作用。

然而,也有与以上相反的研究结果认为,机体在酒精介导的肝脏氧化应激损伤保护中,HO-1 作为

抗氧化防护因子具有关键性作用,其具体机制是在酒精介导肝脏氧化应激损伤期间 HO-1 是依赖 Nrf2 被激活后发挥抗氧化应激损伤作用的。这一观点在大鼠给予酒精实验中发现 Nrf2 在肝脏的表达下降得到证实,同时研究认为另外一个 AREs 的调控子 ATF4 可能是上调氧化应激保护基因的主要机制^[32]。Yeligar 等^[33]也认为酒精介导的 HO-1 并不主要是由库弗氏细胞中的 Nrf2 调控的,他们指出 HO-1 在给予酒精的大鼠模型中主要是由枯否氏细胞中的低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor-1 α)调控的,同时指出 HO-1 的上调阻止了酒精介导的肝损伤中炎性因子的过量形成而对肝细胞氧化应激损伤起到保护作用。

4 结语

目前的研究已经明确,Nrf2 信号通路是在生物体抵御外源性刺激和毒物的适应性保护反应中具有重要作用。虽然 Nrf2 在酒精性肝脏氧化应激损伤中是否起主要保护作用尚有争议,但至少可以确定的是酒精介导的肝损伤氧化应激水平与 Nrf2 基因具有相关性,关于酒精性肝病研究中对 Nrf2 基因的研究还处于初期阶段,接下来还有很多关于 Nrf2 在酒精性肝病中未知问题需要进一步研究加以证实。但越来越多的研究表明,Nrf2 在涉及氧化应激损伤的人类多种疾病中具有重要的细胞保护作用,随着对 Nrf2 研究的进一步深入,对 Nrf2 分子的功能、激活方式、目标底物、分子调控机制和在疾病中的生物学作用等方面的了解和认识也会进一步加强,并为其在生物学等领域的机理研究、以及预防和干预治疗与之相关的疾病开辟新途径。

参考文献:

- [1] Shin SM, Yang JH, Ki SH. Role of the Nrf2-ARE pathway in liver diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013;763257.
- [2] Wu KC, Liu J, Klaassen CD. Role of Nrf2 in preventing ethanol-induced oxidative stress and lipid accumulation [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 262(3):321-329.
- [3] Yoon YH, Yi H. Liver cirrhosis in the United States, 1970 - 2007 surveillance report #88. 2010. NIAAA homepage. <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/surveillance88/Cir07.htm>
- [4] Lu SC, Mato JM. Role of methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in alcohol-associated liver cancer [J]. *Alcohol*, 2005, 35(3):227-234.
- [5] Copple IM. The Keap1-Nrf2 cell defense pathway - a promising therapeutic target? [J]. *Adv Pharmacol*, 2012, 63:43-79.
- [6] Lewis KN, Mele J, Hayes JD, et al. Nrf2, a guardian of

- healthspan and gatekeeper of species longevity [J]. *Integr Comp Biol*, 2010, 50(5):829–843.
- [7] Magesh S, Chen Y, Hu L. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents [J]. *Med Res Rev*, 2012, 32(4):687–726.
- [8] Mathers J, Fraser JA, McMahon M, et al. Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress [J]. *Biochem Soc Symp*, 2004, (71):157–76.
- [9] Yu X, Kensler T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention [J]. *Mutat Res*, 2005, 591(1–2):93–102.
- [10] Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation [J]. *Antioxid Redox Signal*. 2005, 7(3–4):385–94.
- [11] Lee JM, Li J, Johnson DA, et al. Nrf2, a multi-organ protector? [J]. *FASEB J*. 2005, 19(9):1061–6.
- [12] Baird L, Dinkova-Kostova AT. The cytoprotective role of the Keap1–Nrf2 pathway [J]. *Arch Toxicol*. 2011, 85(4):241–72.
- [13] Rushworth SA, Macewan DJ. The role of Nrf2 and cytoprotection in regulating chemotherapy resistance of human leukemia cells [J]. *Cancers (Basel)*, 2011, 3(2):1605–1621.
- [14] Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Phosphorylation of nrf2 at ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(45):42769–42774.
- [15] McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, et al. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(24):21592–215600.
- [16] Giudice A, Arra C, Turco MC. Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents [J]. *Methods Mol Biol*. 2010, 647:37–74.
- [17] Itoh K, Mimura J, Yamamoto M. Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13(11):1665–1678.
- [18] Shan Y, Lambrecht RW, Donohue SE, et al. Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin [J]. *FASEB J*, 2006, 20(14):2651–2653.
- [19] Kaspar JW, Jaiswal AK. Antioxidant-induced phosphorylation of tyrosine 486 leads to rapid nuclear export of bach1 that allows nrf2 to bind to the antioxidant response element and activate defensive gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(1):153–162.
- [20] Reisman SA, Csanaky IL, Aleksunes LM, et al. Altered disposition of acetaminophen in nrf2-null and keap1-knockdown mice [J]. *Toxicol Sci*, 2009, 109(1):31–40.
- [21] Long DJ 2nd, Gaikwad A, Multani A, et al. Disruption of the nad(p)h:quinone oxidoreductase 1 (nqo1) gene in mice causes myelogenous hyperplasia [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(11):3030–3036.
- [22] Rushworth SA, Chen XL, Mackman N, et al. Lipopolysaccharide-induced heme oxygenase-1 expression in human monocytic cells is mediated via nrf2 and protein kinase C [J]. *J Immunol*, 2005, 175(7):4408–4415.
- [23] Chi L, Ke Y, Luo C, et al. Depletion of reduced glutathione enhances motor neuron degeneration in vitro and in vivo [J]. *Neuroscience*, 2007, 144(3):991–1003.
- [24] Jung KA, Kwak MK. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants [J]. *Molecules*, 2010, 15(10):7266–7291.
- [25] Furukawa M, Xiong Y. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(1):162–171.
- [26] Zhang H, Forman HJ. Acrolein induces heme oxygenase-1 through pkc-delta and pi3k in human bronchial epithelial cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 38(4):483–490.
- [27] Lamlé J, Marhenke S, Borlak J, et al. Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 prevents alcohol-induced fulminant liver injury [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(4):1159–1168.
- [28] Gong P, Cederbaum AI. Nrf2 is increased by CYP2E1 in rodent liver and HepG2 cells and protects against oxidative stress caused by CYP2E1 [J]. *Hepatology*, 2006, 43(1):144–153.
- [29] Yao P, Nussler A, Liu L, et al. Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways [J]. *J Hepatol*, 2007, 47(2):253–261.
- [30] Abu-Bakar A, Satarug S, Marks CG, et al. Acute cadmium chloride administration induces hepatic and renal CYP2A5 mRNA, protein and activity in the mouse: involvement of transcription factor NRF2 [J]. *Toxicol Lett*, 2004, 148(3):199–210.
- [31] Dong J, Sulik KK, Chen SY. Nrf2-mediated transcriptional induction of antioxidant response in mouse embryos exposed to ethanol in vivo: implications for the prevention of fetal alcohol spectrum disorders [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(12):2023–33.
- [32] Bardag-Gorce F, Oliva J, Lin A, et al. Proteasome inhibitor up regulates liver antioxidative enzymes in rat model of alcoholic liver disease [J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 90(1):123–130.
- [33] Yeligar SM, Machida K, Kalra VK. Ethanol-induced HO-1 and NQO1 are differentially regulated by HIF-1alpha and Nrf2 to attenuate inflammatory cytokine expression [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(46):35359–35373.

〔修回日期〕2014-02-18