



E3 泛素连接酶接头蛋白 Keap1 的研究进展*

倪晓琦^{1,2)**} 陈锡威^{1,2)**} 金晓锋^{1,2)***}⁽¹⁾ 宁波大学医学院生物化学与分子生物学系, 宁波 315211; ⁽²⁾ 宁波大学医学院, 浙江省病理生理学技术研究重点实验室, 宁波 315211)

摘要 Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 是 E3 泛素连接酶的底物识别亚单位, 在蛋白质的泛素化修饰中起重要作用。蛋白质的泛素化修饰作为一种重要且复杂的蛋白质翻译后修饰, 在自噬和蛋白酶体系统中作为降解信号而被利用。野生型 Keap1 能够识别、结合多种底物蛋白质并通过 Keap1-Cul3-Rbx1 复合物泛素化。此外, Keap1 还作为一种抑癌蛋白而被广泛研究, 已发现诸多 Keap1 的体细胞突变或等位基因的异常缺失诱发人类多种疾病。当前的研究主要围绕在 Keap1-Nrf2 系统而很少涉及到其他下游底物。鉴于 Keap1 在细胞中的重要功能及广阔的发展空间, 这篇综述将对 Keap1 目前的研究现状进行总结。包括: 泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS), Keap1 的结构、功能、突变, Keap1 的泛素化底物及 Keap1 的相关疾病, 探讨 Keap1 在疾病中的临床意义及研究中存在的机遇与挑战。

关键词 泛素化, 降解, Keap1, Nrf2, 突变**中图分类号** Q74, Q55**DOI:** 10.16476/j.pibb.2021.0017

1 泛素-蛋白酶体系统

蛋白质是人体细胞、组织的重要成分, 也是机体重要的功能分子。正常生理条件下, 蛋白质需要通过及时地表达并被准确地修饰来维持正常功能, 然后在细胞内被降解, 以维持机体稳态。蛋白质降解过程不仅与细胞周期、信号传导、DNA 转录和翻译等生理过程有关, 还能下调对机体有危害的调节因子, 降解多余、功能失调和受损的细胞成分, 循环利用资源和能量, 具有十分重要的生理意义。人体细胞中存在多种蛋白质降解途径, 研究最多的是溶酶体途径和泛素-蛋白酶体 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 途径, 其中溶酶体途径主要降解细胞内吞的胞外蛋白质, UPS 则主要降解胞内泛素标记的蛋白质。

UPS 由泛素修饰蛋白质底物的特定酶和水解标记底物的 26S 蛋白酶体组成。泛素与底物的结合是通过由泛素活化酶 (ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素缀合酶 (ubiquitin-conjugating enzyme, E2) 和泛素-蛋白质连接酶 (ubiquitin-protein

ligase, E3) 组成的多步级联反应来实现的。简言之, E1 利用 ATP 水解产生的能量, 在泛素 C 端和 E1 酶活性催化位点的 Cys 残基之间生成硫酯键, 这种激活的泛素然后被转移到 E2, 在 E2 和泛素之间形成硫酯键, 最后, 带电荷的 E2 与数百个 E3 合作将激活后的泛素转移到目标底物, 最后使目标底物被泛素化修饰^[1]。其中, E3 包含两个不同的功能: 催化异肽键的形成和招募底物。两个主要的 E3 连接酶家族已被描述: HECT 结构域家族 (因其与 E6 相关蛋白羧基末端的同源性而命名) 和 RING 家族 (其包含了泛素连接酶活性所必需的内在环指

* 宁波大学“医学院核心课程建设”项目, 浙江省自然科学基金 (LY20C070001), 宁波大学医学院校医联合基金 (201901), 2021 年浙江省大学生科技创新活动暨新苗人才计划基金 (2021R405043), 宁波大学学生科研创新计划 (20121SRIP1901、20121SRIP1904) 资助, 国家自然科学基金 (31801165) 和王宽诚基金资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 0574-87609951, E-mail: jinxiaofeng@nbu.edu.cn

收稿日期: 2021-01-18, 接受日期: 2021-06-23

结构域或相关环指蛋白亚单位)^[2]。

而Cullins家族是迄今为止最大的E3连接酶复合体家族,它是一个进化上保守的蛋白质家族,在芽殖酵母和分裂酵母中包含3个相关基因,在蠕虫、果蝇和人类中包含6个相关基因。Cullins蛋白作为分子支架,可通过一个保守的C端结构域与环指蛋白Rbx1结合,而Rbx1蛋白则可招募一种带泛素的E2蛋白,即获得了E2的催化功能;而后通过一个独特的N端结构域,单个Cullins通过衔接蛋白与E3泛素连接酶结合以招募特定的底物。Cullin3(Cul3)作为Cullins家族的成员之一,可与具有BTB结构域broad complex-tramtrack-bric-a-brac的蛋白质直接结合,形成大量的BTB-Cul3-Rbx1泛素连接酶^[3]。Kelch样ECH关联蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1),作为Cul3-Rbx1 E3泛素连接酶复合物的底物衔接蛋白,目前已有许多研究证明了其突变与癌症发生之间的关联。本文将从Keap1蛋白的结构与功能、Keap1基因的突变情况、Keap1导致疾病发生发展的具体分子机制等方面作一综述。

2 Keap1蛋白的结构与功能

Keap1是一个分子质量为70 ku的蛋白质,包括624个氨基酸,位于19号染色体p13.2位,主要存在于细胞质中,正常情况下锚定于胞浆的肌动蛋白细胞骨架上。它是一种BTB-Kelch蛋白,是Cul3依赖的泛素连接酶复合物的底物衔接蛋白。Keap1主要结构域包括NTR结构域(N-terminal region, 1~60位氨基酸残基)、与Cul3相互作用的BTB结构域(61~179位氨基酸残基)、IVR结构域(intervening region, 180~314位氨基酸残基)、含有6个Kelch重复结构域的DGR结构域(double glycine repeat, 315~359、361~410、412~457、459~504、506~551、553~598位氨基酸残基)和CTR结构域(C-terminal region, 599~624位氨基酸残基)^[4](图1a)。

BTB结构域是一段进化上保守的基序,功能多样,包括介导Keap1同源二聚和与Cul3连接酶复合物结合的作用。且BTB结构域中的一个半胱氨酸残基C151被发现是Keap1在亲电刺激下降低E3活性所必需的^[5]。

IVR结构域富含一些半胱氨酸残基,可用来调节Keap1活性。此结构域上的C273和C288对于Keap1维持泛素E3连接酶活性和降解Nrf2是必不可少的。此外,IVR结构域将BTB结构域与C端Kelch/DGR结构域连接起来。同时,Keap1通过IVR结构域与Cul3的N端区域结合。

Keap1的Kelch/DGR域是一个六叶片β螺旋桨结构,其中I-VI螺旋桨的每个叶片由4个β-股(A~D)组成。β螺旋桨的中心核投射出不同长度的环,组成这些β股。根据惯例,连接β股A和B(A-B)或β股C和D(C-D)的短环定义了β螺旋桨的底部,而连接β股D和A(D-A)或β股B和C(B-C)的较长环定义了β螺旋桨的顶部^[6],该结构域具有识别与结合底物蛋白的功能。

3 Keap1的泛素化底物

Keap1通过泛素作用于其下游底物,例如核转录因子红系2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)被Keap1泛素化并靶向蛋白酶体降解;IκB激酶亚单位β(inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta, IKKβ)也可以被Keap1泛素化并由26S蛋白酶体降解。此外,选择性自噬接头蛋白p62(sequestosome1, SQSTM1/p62)、性别决定区域Y框9(sex determining region Y-box 9, SOX9)、凋亡调节剂(apoptosis regulator) Bcl-2、丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶(serine/threonine-protein phosphatase) PGAM5、线粒体Rho GTPase 2(mitochondrial Rho GTPase 2, Miro2)、STE20样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(STE20-like serine/threonine-protein kinase, SLK)和有丝分裂纺锤体装配检查点蛋白MAD2A(mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2A, MAD2L1),以及可能的非常规肌球蛋白Ixb(unconventional myosin-IXb, Myo9b)同样也被Keap1泛素化修饰并降解。值得注意的是,另外存在一些能被Keap1泛素化但不被降解的底物,如DNA复制许可因子(DNA replication licensing factor) MCM3、BRCA2定位协作因子(partner and localizer of BRCA2, PALB2)、内质网膜传感器NFE2L1(nuclear factor-erythroid 2-related factor 1, Nrf1)等。总之,Keap1作为E3泛素连接酶的

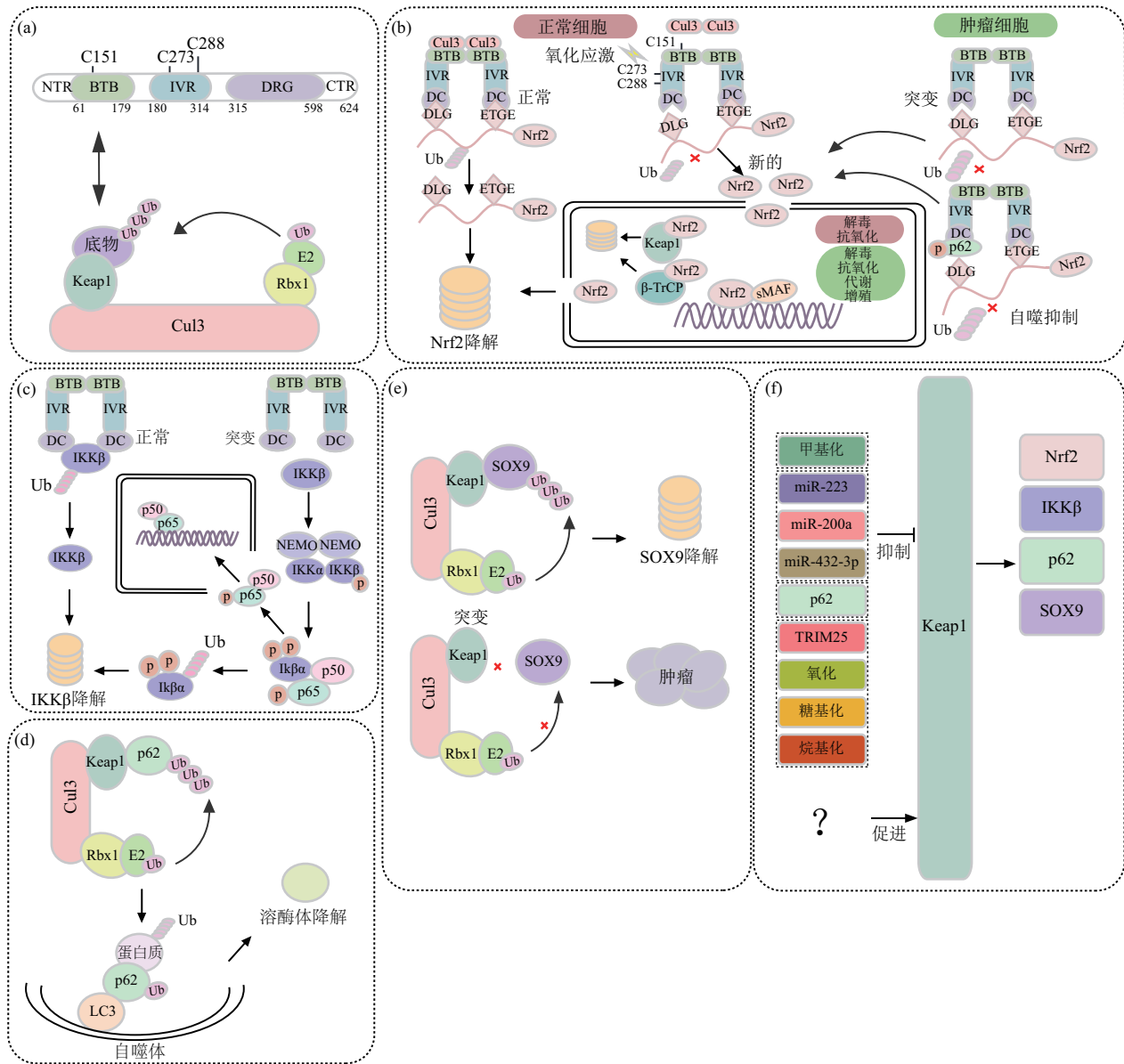


Fig. 1 Structure, function of Keap1 and Keap1-mediated mechanism pathways

图1 Keap1结构、功能及相关分子机制

(a) E3泛素连接酶的组成和Keap1蛋白的结构；(b) Keap1-Nrf2信号轴分子机制示意图；(c) Keap1-IKKβ信号轴分子机制示意图；(d) Keap1-p62信号轴分子机制示意图；(e) Keap1-SOX9信号轴分子机制示意图；(f) Keap1的调节网络。

接头蛋白，对比 Cul3 家族的另一种 E3 接头蛋白 SPOP 而言，其下游泛素化底物仍有很大的研究空

间。截至目前被文献报道的所有 Keap1 泛素化底物见表 1。

Table 1 Ubiquitylation substrates of Keap1

表 1 Keap1的泛素化底物

底物	功能	Keap1结合基序	参考文献
Bcl-2	抗凋亡		[7]
IKK β	NF- κ B信号通路的调控	³⁶ ETGE ³⁹	[8-9]
MAD2L1	细胞分裂	⁹² ESGE ⁹⁶	[10]
MCM3	DNA复制	³⁸⁷ ETGE ³⁹⁰	[11-12]
Miro2	线粒体运输		[13]
Myo9b	肌动蛋白运动分子		[14]
Nrf1	细胞氧化还原稳态	¹⁸¹ QDIDLG ¹⁸⁶	[15]
Nrf2	细胞氧化还原稳态	²⁶ QDIDLG ³¹ ⁷⁹ ETGE ⁸²	[16]
p62	自噬作用	³⁴⁹ STGE ³⁵² (phosphorylated)	[17-18]
PALB2	DNA修复	⁹¹ ETGE ⁹⁴	[19-20]
PGAM5	坏死	⁷⁹ ESGE ⁸²	[21]
SLK	凋亡		[11]
SOX9	细胞增殖	⁵⁹ DLK ⁶¹ ²⁵⁰ DLK ²⁵²	[22]

4 Keap1的降解型底物

Keap1作为Cul3-Rbx1 E3泛素连接酶复合物的一部分,介导了包括Nrf2、Ikk β 、p62、SOX9、Bcl-2、PGAM5、Miro2、SLK、MAD2L1和Myo9b的降解。Keap1同这些底物一起组成了一个十分复杂的细胞生物学网络,参与了众多细胞过程。尤其在癌症中,Keap1既是抑癌蛋白也是促癌蛋白,因此,了解Keap1和这些底物所参与的信号级联反应非常重要。下文侧重于通过负调节4种底物Nrf2、Ikk β 、p62和SOX9来阐述Keap1在癌症或疾病中的作用,并提及了这4种底物互相之间的横向联系,提示了Keap1网络的复杂性。

4.1 Keap1与Nrf2

Keap1最初发现的底物就是Nrf2,也是人们研究最多的底物。Keap1-Nrf2系统是细胞防御和生存相互影响的重要节点,Keap1充当氧化还原损伤的富含半胱氨酸硫醇的传感器,而Nrf2是一个转录因子,作为效应器来协同激活细胞中包括抗氧化酶、排毒酶、炎症相关蛋白、药物转运蛋白和代谢酶等保护基因,在氧化应激和代谢过程中发挥重要作用^[23]。相反,Keap1-Nrf2的失调导致Nrf2异常激活也会引起病理变化,尤其在癌症中^[23-26]。

Nrf2由*Nfe2l2*基因编码,属于碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)转录因子和cap-n-collar (CNC)家族。Nrf2的分子质量约为68 ku,由人体内的589个氨基酸组成,可以分为7个保守

的功能结构域:Neh1~7。Neh1结构域包含介导与DNA结合和形成二聚体的CNC和bZIP结构域;Neh2结构域包含分别与Keap1具有高亲和力和低亲和力的ETGE和DLG基序,该结构域介导Nrf2的降解并抑制Nrf2的转录活性^[15];Neh3结构域位于Nrf2的C端,是必不可少的功能区域,可以与染色质域解旋酶DNA结合蛋白6(chromodomain-helicase-DNA-binding protein 6, CHD6)结合并激活抗氧化响应元件(antioxidant response element, ARE)^[27];Neh4和Neh5结构域可以与激活物cAMP反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)结合,以帮助Nrf2转运入细胞核^[28];具有大量丝氨酸残基的Neh6结构域抑制Nrf2转录,而与Keap1无关^[29];Neh7结构域识别类视黄醇X受体 α (retinoid X receptor alpha, RXR α)^[30]。另外,Nrf2的第40个氨基酸是磷酸化位点,该位点的磷酸化导致Nrf2从Keap1上解离^[31]。

正常生理条件下,Keap1的BTB结构域与Cul3 E3泛素连接酶复合物结合,两个Keap1分子通过BTB区形成同型二聚体,然后Keap1二聚体可以通过DGR结构域,结合Nrf2的ETGE和DLG基序,并以1:1的比例直接相互作用。Nrf2的Neh6域中DSGIS和DSAPGS氨基酸基序与Keap1结合,然后将泛素连接酶复合物上的泛素转移到Nrf2的ETGE和DLG基序之间的7个赖氨酸残基(K40、K50、K52、K53、K56、K64和K68)上。

Keap1 可能与泛素伴侣去泛素化蛋白 (deubiquitinating protein, VCP) VCPIP 和两个蛋白酶体泛素受体 26S 蛋白酶体非 ATPase 调节亚基 2 (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2, PSMD2) 和 26S 蛋白酶体非 ATPase 调节亚基 4 (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4, PSMD4) 的相互作用以诱导泛素化的 Nrf2 传递至蛋白酶体, 并被快速降解^[32]。在氧化应激条件下, 线粒体会产生大量的高活性分子, 例如活性氧。当活性氧含量超过细胞清除能力时, 氧化还原系统发生失衡, 对脂质、蛋白质和 DNA 造成氧化损伤, 并最终导致细胞凋亡, 组织或器官损伤。因此, Nrf2 途径被显著激活, 其具体机制如下: a. Keap1 的 IVR 区中 C273 和 C288 巯基被氧化形成二硫键, 导致空间构象变化。然后, 具有强结合能力的高亲和力 ETGE 基序仍然能够紧密结合 Keap1, 而弱的、低亲和力的 DLG 基序则与 Keap1 分离。随着 Nrf2 的空间定位变化, 它不能被泛素蛋白酶体降解^[33]。b. Keap1 的 BTB 结构域中的 C151 被修饰并产生位阻效应, 导致 Keap1 和 Cul3 解离^[34]。这破坏了 Keap1-Cul3 E3 泛素连接酶复合物的活性, 并抑制了泛素介导的 Nrf2 降解。当 Keap1-Keap1-Nrf2 的量达到饱和时, Keap1 同型二聚体无法在细胞中再生, 并且新生成的 Nrf2 由于其自身的保护而不再与 Keap1 结合。Nrf2 迁移到细胞核并与小 Maf 蛋白 (small Maf protein, sMaf) 结合。然后, Nrf2-sMaf 与 ARE 结合并增加抗氧化剂蛋白和 II 期解毒酶的转录激活。而细胞核中过多不必要的 Nrf2 则被糖原合酶激酶 3b (glycogen synthase kinase 3b, GSK-3 β) 磷酸化, 从而使其能够被包含 β 转导素重复序列包含蛋白 (β -transducin repeat-containing protein, β -TrCP) 识别, 被 β -TrCP-CUL1 E3 泛素连接酶复合物泛素化并通过蛋白酶体降解。但这种基于 β -TrCP 的 Nrf2 降解方式独立于 Keap1, 且被认为是次要的^[29]。细胞核中的 Nrf2 也能通过 Keap1 的短暂穿梭入核被泛素化而被抑制^[35]。当氧化还原平衡恢复后, Nrf2 从细胞核转移到细胞质, 在细胞质中被泛素化降解^[36] (图 1b)。

Keap1-Nrf2 系统吸引了基础和临床癌症研究领域科学家的广泛兴趣, 除了在细胞生理学和应激反应中起关键作用外, 其在癌细胞中也得到广泛利用, 并且在赋予癌细胞生长优势、支持癌症代谢和促进恶性转化方面起着关键作用。这与已知的

Nrf2 保护作用相反, 暗示了 Keap1-Nrf2 系统在癌症中的双重作用。为了研究 Keap1 在肿瘤发展中的直接作用, Wakabayashi 等^[37] 创建了 *Keap1* 基因敲除小鼠。这种遗传结构具有致死性, 并且在出生后 3 周内无法生存。然而, 在死亡之前, 这些小鼠表现出高水平的 Nrf2 信号传导, 并显示肝脏内排毒酶的上调。有报道说, Keap1 可以作为肿瘤转移的抑制剂, 它靶向非小细胞肺癌 (non-small cell lung carcinoma, NSCLC) 细胞中的 Nrf2-S100P 途径^[38]。最近有报道说, Keap1 缺失会过度激活 Nrf2, 并在小鼠中促进 *KRAs* (kainate-type glutamate receptors) 驱动的肺腺癌并导致对谷氨酰胺分解的依赖性^[39]。Keap1 缺失还能协同 PI3K 途径共同驱动免疫微环境改变的 NSCLC^[40]。此外, 在人类各种癌症中发现了 *Keap1* 的体细胞突变。发现 Keap1 的 N 端和 BTB 结构域上的某些突变可破坏 Keap1-Cul3-Rbx1 泛素复合物的形成, 而 Kelch 结构域上的其他突变则可减少 Keap1 与 Nrf2 的相互作用, 从而使其稳定^[41-43]。在肝癌和胆囊癌中发现 *Keap1* 的体细胞突变, 这些突变使 Nrf2 的表达不受限制, 从而导致 II 期解毒酶和抗氧化剂蛋白的诱导, 从而证明对癌细胞具有化学抗药性^[44]。最近一项研究将癌症中 40% 的 *Keap1* 突变归为 ANCHOR 突变体, 这些突变体比野生型 Keap1 和泛素化 Nrf2 结合更多的 Nrf2, 但它们不能促进 Nrf2 降解。在活细胞中, Keap1 R320Q 和 R470C ANCHOR 突变体与 Nrf2、p62 和多聚泛素共定位在快速融合和溶解的结构化球形液滴中。透射电子显微镜结合共聚焦荧光成像显示无膜相分离的生物分子冷凝物。Cloer 等^[32] 提出了一个模型, 其中 ANCHOR 突变体形成并形成 p62 依赖相分离的球形簇, 其包含被未修饰和磷酸化的 p62、多聚泛素和 Nrf2 包围的 Keap1 阳性核心。该模型可能代表某种受损的蛋白酶体降解和自噬之间的过渡状态。总之, 这些事件表明 Keap1 发挥抑癌作用, 因为它的缺乏会导致肿瘤发生, Keap1 表达或功能的降低则会促进肿瘤的进展。有趣的是, 最近研究表明 Keap1 在癌症中发挥双重作用。在肝特异性 *Keap1* 基因敲除小鼠模型中, Keap1 缺失引起的 Nrf2 激活可防止肝纤维化的癌症的发生。这提示了 Keap1 在非酒精性慢性肝癌中的促癌作用^[45]。

最近有研究关注于 Keap1 与 Nrf2 之间蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 上, 提出 Keap1 不仅能抑制 Nrf2, 它也受 Nrf2 抑

制。过量 Keap1 的存在是对细胞内环境有害的。Nrf2 缺乏的细胞中, 由于 Keap1 靶向 Miro2 的降解, 导致线粒体稳态显著失调^[13]。此外, 可抑制 Keap1 的 Nrf2 蛋白不足会导致 Rho GTPase 激活蛋白 1 (Rho GTPase-activating protein 1, RhoGAP1) 过量, 从而调节 Cdc42 (cell division cycle 42) 活性。这损害了足小体的组装并破坏了肌动蛋白的重排, 从而阻止了血管生成^[46]。但 Nrf2 能充当蛋白质束缚 Keap1, 允许足小体组装核血管生成, 而不受 Nrf2 转录活性的调控^[47]。最近人们还似乎将 Keap1-Nrf2 系统与衰老联系起来^[48]。已经有研究表明, Nrf2 会在衰老或者早衰模型中增加^[49]。Keap1 在衰老中的作用仍有待发现。

4.2 Keap1和IKK β

IKK β 由 *IKKB* 基因编码, 是一种丝氨/苏氨酸激酶, 分子质量为 86 ku。IKK β 主要位于细胞质中, 也可以在细胞核中少量存在。IKK β 包含 756 个氨基酸, 由 4 个结构域组成: N 端激酶结构域 (kinase domain, KD)、二聚结构域 (scaffold/dimerization domain, SDD)、泛素样结构域 (ubiquitin-like domain, ULD)、C 端 NEMO 结合结构域 (NEMO binding domain, NBD)^[50]。

细胞质中的 IKK β 在核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 级联反应中起着关键控制者的作用。多种促炎刺激可以激活 IKK β , 然后将 IKK β 磷酸化, 从而导致核因子 κ B 抑制剂 (inhibitor of nuclear factor-kappa-B, I κ B) 泛素化并随后通过 26S 蛋白酶体途径降解。I κ B 的去除导致 NF- κ B 的核易位并诱导与免疫反应、细胞增殖、血管生成、细胞存活, 肿瘤侵袭、转移和上皮间充质转化有关的基因转录^[51]。此外, IKK β 还通过磷酸化介导的抑癌基因抑制作用显示了其非 NF- κ B 的致瘤性^[52]。细胞核中的 IKK β 则是紫外线诱导的 NF- κ B 活化中 I κ B 泛素化和降解的衔接蛋白^[53]。

有研究发现, Keap1 通过充当 IKK β E3 连接酶来下调 NF- κ B 信号通路, 进而抑制癌症^[9]。生理情况下, Keap1 DLG 结构域与 IKK β KD 结构域的 ETGE 基序结合, 并介导 IKK β 上的第 555 位赖氨酸的 K48 型多聚泛素化及随后的 26S 蛋白酶体降解。IKK β 的酪氨酸尤其是 Tyr525 主导了 Keap1 对 Nrf2 的特异性识别^[54]。Keap1 对 IKK β 的失调同样也在癌症中出现。Keap1 是抑癌的, 在肝癌中的 S404X 和 D479G 突变体以及肺癌和乳腺癌中的 G333C、G364C、R413L 和 G430C 突变体被证明减弱 Keap1

和 IKK β 的结合亲和力及之后的泛素化和降解, 导致 NF- κ B 通路激活而促进肿瘤的发生发展。有趣的是, C23Y 突变体会干扰 Keap1-Cul3-Rbx1 泛素复合物的形成, 但和野生型 Keap1 介导的 IKK β 泛素化之间没有差异。总之, 这些事件说明, 一些 Keap1 突变体也作为肿瘤的启动子。另外, 一项对肺癌突变的全面表征研究表明, Cul3-Keap1-Rbx1 复合物任一成分的遗传改变都足以破坏复合物的完整性, 导致 IKK β 降解的失调及随后 NF- κ B 的异常激活, 进而促进肺癌的发生发展^[55] (图 1c)。

IKK β 和 Nrf2 是 Keap1 的主要底物。考虑到 Keap1-Nrf2-ARE 和 IKK β -NF- κ B 通路在炎症和癌症的病理过程中起相反的作用, 因此 NF- κ B 信号传导和 Nrf2-ARE 通路的干扰对于维持平衡至关重要。目前已经报道了关于 NF- κ B 信号传导和 Nrf2-ARE 途径之间串扰的一些初步发现。NF- κ B 信号传导可以通过 p65 (NF- κ B 的亚单位) 和 Keap1 的相互作用来抑制 Nrf2-ARE 途径^[56]。在另一项研究中, p65 通过从 Nrf2 剥夺 CBP 和促进组蛋白脱乙酰基酶 3 (histone deacetylase 3, HDAC3) 募集到 ARE 参与了抗氧化基因表达的下调^[57]。最近一项对 Keap1-IKK β 之间 PPI 的研究表明, Keap1 是 Keap1-Nrf2-ARE 和 IKK β -NF- κ B 之间串扰的新节点, 该发现也为细胞氧化还原稳态的调节机制提供了有价值的见解^[54]。

4.3 Keap1与p62

p62, 也称为 SQSTM1, 是一种泛素结合自噬受体, 分子质量为 62 ku。p62 主要位于细胞质中并且可以在细胞质和细胞核之间穿梭, 在自噬体以及溶酶体中也存在。p62 具有多个结构域, 包括 N 端 Phox1 和 Bem1p 结构域 (Phox1 and Bem1p, PB1), 其介导 p62 的异二聚或均聚而作为蛋白质结合模块; LC3 相互作用域 (LC3-interacting region, LIR), 介导与 ATG8 家族蛋白的相互作用; 泛素相关结构域 (ubiquitin-associated, UBA), 能与多聚泛素化底物的 K63 型多泛素链特异性结合; Keap1 相互作用区 (Keap1-interacting region, KIR), 介导了与 Keap1 的结合; ZZ 型锌指 (ZZ-type zinc finger, ZZ), 介导了与受体相互作用的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase1, RIPK1) 的相互作用。此外, p62 还具有肿瘤坏死因子受体相关因子 6 结合基序 (tumor necrosis receptor-associated factor 6 (TRAF6)-binding, TB)。p62 被认为是一个多功能

信号枢纽，它参与了营养敏感中雷帕霉素复合物1 (rapamycin complex1, mTORC1) 机械性靶点的激活^[58]、炎症和凋亡过程中NF- κ B的激活^[59]，抗氧化反应中Keap1-Nrf2通路的激活^[18]，以及在选择性自噬中提到的受体作用^[60]。最近研究发现，p62在引起液-液相分离中也有重要作用^[61-63]。

有研究发现，Keap1充当p62的E3泛素连接酶，将p62靶向泛素化和自噬降解，而保护疾病中细胞的死亡^[17]。Keap1同源二聚体与p62二聚体上的两个高亲和力KIR基序结合，导致其UBA结构域上的K420残基被泛素化修饰，进而p62所具有的与泛素化蛋白质聚集体螯合成p62包涵体的能力得到进一步增强。随后包涵体与自噬体膜上LC3 (自噬相关蛋白8的同源蛋白) 结合的能力也被加强，使p62和被泛素化的蛋白质一起通过溶酶体途径被降解 (图1d)。在退行性疾病包括骨佩吉特病、肌萎缩侧索硬化、额颞叶痴呆，以及包涵体肌病中^[64-65]，存在p62-UBA结构域内的主要遗传性错译或者缺失突变，但是p62突变如何参与疾病的发病机制目前尚不清楚，可能与泛素结合活性降低有关。而研究发现，这些不同组织的共同致病机理是p62聚集体和泛素化内含物积累导致的。p62 S349的磷酸化可以被UBA结构域中的点突变破坏，该突变会减弱其泛素结合功能^[66]。然后，p62上的S349的磷酸化增加了p62对Keap1的亲合力^[67]。也可以想象p62中的UBA结构域相关疾病突变影响S349磷酸化，从而废除了Keap1-Cul3介导的UBA结构域泛素化。最近研究发现，在Keap1相互作用区域内也存在着与骨佩吉特病和肌萎缩侧索硬化相关的p62错义突变^[68-69]，这些突变导致p62与Keap1相互作用的丧失和Nrf2信号的减弱，这些突变还可能影响p62的UBA域的泛素化修饰。

P62与Keap1-Nrf2通路之间存在串扰，p62可以激活Nrf2，并转运至细胞核并激活抗氧化基因，来响应氧化应激。P62的调控作用可以通过3条途径：a. 磷酸化的p62 KIR域可能识别Keap1的DGR域，形成p62-Keap1复合物，该复合物可通过UPS途径清除^[70]；b. p62通过组装p62-Keap1复合物和LC3形成LC3-p62-Keap1复合物来控制Keap1转化，通过选择性自噬消除p62^[71]；c. Nrf2启动靶基因p62的表达^[72]。最近Tan等^[62]在二乙基亚硝胺诱导的肝癌发生模型中，发现凋亡调节因子1 (modulator of apoptosis 1, MOAP-1) 缺陷小鼠表

现出较高的肿瘤负担且伴随着p62自噬小体和Nrf2信号传导的水平过高^[62]。他们提出MOAP-1介导p62自噬小体的解离释放Keap1并抑制Nrf2信号传导。在诱导刺激p62自噬小体形成的细胞应激之后，MOAP-1被募集到p62自噬小体中，并降低了其水平，而与自噬途径无关。MOAP-1与p62的PB1-ZZ域相互作用，并干扰其自身低聚和液-液相分离，从而拆卸了p62分子。最近也有研究表明，p62激活的Nrf2途径是神经退行性疾病的重要标志。p62-Keap1-Nrf2阳性反馈回路和Nrf2通路参与消除阿尔茨海默病诱导的活性氧 (ROS) 和蛋白质聚集^[31]。神经退行性疾病中也很容易观察到p62自噬小体，神经元中的p62自噬小体如何调控及维持p62-Keap1-Nrf2正反馈环路的体内平衡可能是治疗神经退行性疾病的潜在目标。

4.4 Keap1和SOX9

SOX9是结构相关的性别决定区Y盒转录因子家族的一个成员，在发育过程中对实现不同的功能至关重要。SOX9由3个结构域组成：DIM结构域、HMG结构域、反式结构域。DIM结构域位于N端，介导自身的二聚化；HMG结构域在DIM之后，由两个核定位信号和夹在中间的一个核出口信号组成，介导与DNA的结合和核定位；反式结构域包括保守域2 (conserved domain-2, K2)，脯氨酸、谷氨酰胺和富含丙氨酸的域 (proline, glutamine, and alanine rich domain, PQA) 以及一个反式激活域 (transactivation domain, TA)^[73]。

最近有研究发现，Keap1是SOX9的E3连接酶，靶向泛素化和蛋白酶体降解，抑制癌症的发生^[22]。正常情况下，Keap1可以结合分别位于SOX9 N端和K2结构域上的DLK基序，后者是Keap1的主要结合位点。当K2域上的DLK基序缺失将阻止Keap1介导的SOX9第249位赖氨酸上的多聚泛素化 (泛素是K6、K11、K27和K33的混合连接型) 及进一步的蛋白酶体途径降解。此外，SOX9的磷酸化促进了其与Keap1的相互作用，例如CKI激动剂或DNA损伤药物可通过促进Keap1的磷酸化，进而促进其对SOX9降解来抑制SOX9介导的肿瘤发生。然而，肺癌中的R204P、G333S、W497L、G603W和E611D Keap1突变体被证明减弱Keap1和SOX9的结合亲和力及之后的泛素化和降解，从而促进肺癌的发生。有趣的是，Keap1 R470C突变体在免疫共沉淀实验中表现出增强的SOX9结合，而在促进SOX9多聚泛素化和降

解方面表现出与Keap1野生型类似的行为。总之,肺癌中Keap1体细胞突变导致SOX9蛋白水平升高,导致了肺癌的预后差以及恶性进展(图1e)。

SOX9是Nrf2的靶基因,SOX9的稳定性也能受到Keap1介导的转录水平的调节。Schmidlin等^[74]研究发现,神暴露(诱导p62将Keap1隔离而激活Nrf2)和Keap1功能缺失突变导致的Nrf2激活,上调了SOX9,进而增加了非小细胞肺癌的转移潜力。最近Nabeshima等^[75]发现Keap1缺失促进了K-ras/p53突变驱动的胆管癌的进展,虽然胆管癌中SOX9高表达,但其高表达的背后是受到转录水平还是翻译后修饰调控的仍不为所知。总之,SOX9与Nrf2之间的串扰,体现了癌症发生过程的复杂调节。然而SOX9不仅是癌基因,在宫颈癌^[76]、黑色素瘤^[77]和膀胱癌^[78]中是抑癌的,在此等人类癌症中Keap1介导的SOX9失调可能起相反作用。Keap1是抑癌还是促癌取似乎决于癌症的特异性。

5 Keap1与疾病的关系

5.1 通过Keap1-Nrf2通路影响疾病发生

5.1.1 肾脏疾病

由于氧化应激是肾脏疾病的主要致病和加重因素,Keap1-Nrf2系统被认为是肾脏保护的治疗靶点。据报道,在大鼠慢性肾病(CKD)模型中,Keap1抑制剂CDDO-9,11-dihydro-trifluoroethyl amide(CDDO-dhTFEA,也称为dh404)在高剂量的情况下,即Keap1少量存在时,能通过激活NF- κ B介导的炎症反应,加重肾脏纤维化,印证了上文Keap1对NF- κ B的抑制作用。而低剂量的CDDO-dhTFEA,即Keap1大量存在时,Nrf2被异常激活,但没有NF- κ B响应,则能改善肾脏纤维化。因此激活Nrf2对肾病的治疗有重要意义。然而,必须考虑到Keap1抑制剂可能会影响Nrf2以外的Keap1靶点活性。最后,来自正在进行的研究项目数据表明,Keap1抑制剂可以改善3期CKD和T2DM(2型糖尿病)患者的肾小球滤过率,而无安全隐患。因此,Keap1-Nrf2系统是肾脏疾病最有希望的治疗靶点之一,虽然Keap1抑制剂在不同肾病中发挥作用不一,但毋庸置疑它有望是肾脏关键疗法的一部分,并且在肾病中Keap1存在Nrf2异常激活的机制还有待进一步研究^[79]。

Keap1-Nrf2通路在肾毒病中也发挥重要作用。已知庆大霉素(GM)可有效治疗严重的甚至危及

生命的感染。然而,注射GM后肾功能会受损,氧化/抗氧化失衡,所以GM的肾毒副作用限制了其临床应用。通过查阅文献发现,地奥司明(DS)是一种具有广泛生物活性的黄酮类化合物,具有十分重要的生物学意义。GM显著降低了肾细胞Nrf2、谷氨酰半胱氨酸合成酶(GCLC)、血红素氧化酶1(HO-1)、超氧化物歧化酶3(SOD-3)、蛋白激酶B(AKT)和磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)的表达,但上调了Keap1的表达。相反,DS给药可显著减轻GM诱导的肾功能障碍,恢复肾脏氧化/抗氧化状态。此外,DS和GM联合处理显著增强Nrf2、GCLC、HO-1、SOD3、AKT和p-AKT的表达,同时Keap1下调。组织病理学检查也显示,DS显著减少GM诱导的组织损伤。不言而喻,通过抑制Keap1,激活Nrf2系统能起到保护肾脏的作用。综上所述,DS能通过靶向Keap1-Nrf2-ARE、AKT和PPAR信号通路,有望成为GM肾毒性的保护剂^[80]。

5.1.2 肝脏疾病

研究表明,氧化应激在肝脏疾病的病理机制中起着重要作用,故氧化应激关键转录因子Nrf2的正常表达与否十分关键。在体外培养的肝细胞中,HBV病毒一方面能够诱导细胞发生氧化应激反应,另一方面能够通过激活Nrf2-ARE通路,使Nrf2下游的抗氧化基因大量表达,从而发挥抗氧化应激的细胞保护作用。在非酒精性脂肪性肝炎的小鼠动物模型中,姜黄素治疗能使小鼠肝脏损伤的程度明显缓解,其机制可能就是姜黄素通过激活Nrf2而使其下游抗氧化酶表达量升高,继而抑制氧化应激。同理,在小鼠肝纤维化动物模型中,甘草次酸通过上调Nrf2的表达,继而使Nrf2下游的抗氧化酶基因表达增加,发挥保护作用,而在Nrf2缺乏小鼠中肝脏的纤维化及炎性反应程度却进一步加重,说明Nrf2在改善肝脏纤维化方面起一定作用。在肝脏缺血再灌注损伤的实验研究中发现,相比野生型小鼠,Nrf2缺乏小鼠在15 d-PGJ2(15-脱氧-12,14-前列腺素J2)治疗后,肝损伤的程度虽不能得到缓解,但该药物可以通过激活Nrf2-ARE通路而有效降低肝脏缺血再灌注损伤的程度。以上研究表明,氧化应激广泛存在于多种肝脏疾病中,且通过Nrf2再激活抗氧化系统能够对肝细胞起到保护作用^[81]。

5.1.3 炎症

炎症可以定义为对有害的内源性和外源性刺激的保护性免疫反应。然而,长期或自身免疫性炎症

反应会导致机体各种有害状态。炎症相关分子被鉴定为Nrf2的内源性诱导因子。例如, 15 d-PGJ2是COX-2(环氧合酶2)途径的最终产物之一, 主要由巨噬细胞产生, 并具有强大的抗炎作用。15d-PGJ2通过与Keap1相互作用, 强烈激活Nrf2并抑制炎症性转录因子如NF- κ B。然后, 一方面, Nrf2通过ROS介导抑制炎症。ROS在炎症性疾病的进展中起重要作用, 但过量的ROS会对脂质、蛋白质和DNA造成损伤, 导致细胞和组织损伤。受损的细胞释放DAMP(损伤相关分子模式), 如热休克蛋白和高迁移率族蛋白B1, 它们激活参与先天免疫反应的巨噬细胞, 活化的巨噬细胞再释放出各种炎症介质和细胞因子, 诱导一系列炎症反应, 因此, Nrf2的抗氧化功能有助于消除过多的ROS和随后的炎症反应。另一方面, Nrf2除了通过消除ROS发挥抗炎作用, 还可通过ROS非依赖机制抑制炎症。Nrf2以ROS介导的方式直接抑制巨噬细胞中IL-6、IL-1b这些促炎细胞因子基因的转录, Nrf2结合到这些促炎细胞因子基因的调节域内, 并抑制RNA聚合酶II向这些位点的募集。且重要的是, 促炎性细胞因子基因的抑制发生在早期阶段, 这表明Nrf2能迅速解决炎症。综上表明, Keap1抑制Nrf2激活能抑制炎症的发生发展。在处理炎症时, 几类化合物可主动破坏Keap1-Nrf2相互作用并激活Nrf2, 如三萜类化合物是齐墩果酸的衍生物, 这些小分子通过与Keap1的C151共价结合来阻止Nrf2降解, 类似于异硫氰酸盐, 天然三萜类化合物由于具有抗炎作用而被用于中医, 并且以多种形式存在, 如油酸和熊烷^[82]。

5.1.4 少肌症

骨骼肌健康对于预防各种与年龄有关的疾病很重要。骨骼肌质量的丧失, 即肌肉减少症, 是老年人身体残疾、生活质量差和慢性疾病的基础, 而Keap1-Nrf2系统在此疾病中有关键作用。已经有研究证明, Keap1抑制在骨骼肌中对耐力的有益作用, 考虑到Keap1和Nrf2之间的关系非常严格, 我们认为Keap1抑制的有益作用主要归因于Nrf2的激活。为了确定骨骼肌Nrf2对运动能力的贡献, 在骨骼肌中对Nrf2的负调节剂Keap1进行特异性抑制, 并检查Nrf2途径激活的细胞自主和非细胞自主效应。

Keap1被破坏引起骨骼肌特异性Nrf2活化, 能增强脂肪酸(FAs)的动员和氧化、增加骨骼肌质量和运动能力。Keap1抑制能增强FAs的 β 氧化作

用, 增加线粒体活性而不是数量来发挥细胞自主效应。为了确定Nrf2的遗传激活是否能重现这种效果, 发现在Keap1敲降(Keap1-KD)小鼠骨骼肌中Keap1蛋白和mRNA的表达降低。而Nqo1是Nrf2的典型靶基因之一, 被确定在Keap1-KD骨骼肌中被上调, 这表明Nrf2途径在Keap1-KD骨骼肌中被激活; 而Nrf2缺乏的小鼠确实表现出运动耐力受损。综上可知, 由于全身性Keap1抑制而引起的Nrf2途径活化增加了运动能力。

还有, 众所周知, 运动过程中的肌肉收缩会产生ROS。尽管尚不清楚控制ROS产生的确切机制, 但线粒体被认为是ROS的主要来源, 尤其是通过电子传递链复合物I和III。虽然长时间或高强度运动会产生过量的ROS, 导致骨骼肌氧化损伤, 但最近的研究表明, 运动诱导的ROS在生理上起着重要作用, 并是骨骼肌适应的重要介体。肌肉收缩和运动增加Nrf2蛋白水平和活性, 而Nrf2的激活能抑制运动诱导的转录反应, 因此我们认为Nrf2的最佳激活平衡了维持生理信号所需的有益ROS水平和限制了有害ROS水平, 保护组织免受氧化损伤。这些结果表明了Nrf2可以进行多峰代谢调节, 从而增加运动耐力。我们建议适当的Nrf2激活可用于抗衰老干预。

总之, 骨骼肌中的Nrf2激活增加了慢速氧化性肌纤维类型并改善了运动耐力, 而负责耐力运动的慢速氧化肌纤维功能对于预防老年人的肌肉减少症和体弱尤为关键; 并且那些具有Nrf2途径激活的骨骼肌表现出运动耐力的增强和脂肪酸 β 氧化过程的增加。其机制就是骨骼肌中的Nrf2激活通过体液和/或神经元信号传导促进与脂肪组织的通讯, 并促进脂肪酸作为能源的利用, 从而导致线粒体活性增加和运动过程中有效的能量产生, 从而改善运动耐力。正如有些报道表明, Nrf2的全身激活可增强运动能力, 并最终有助于预防与年龄相关的肌肉减少症和虚弱, 但骨骼肌Nrf2的激活可减少骨骼肌质量, 表明Nrf2在参与骨骼肌生理学中的复杂性, 即Nrf2在每个组织和器官中对全身运动能力的贡献不同, 这可作为未来解决此类疾病的一个重要方向^[83]。

5.1.5 眼科疾病

正如上述所说, 研究已证实Nrf2对肝脏、肾脏和心脏细胞具有保护作用, 同时已用于癌症的临床治疗。而现在越来越多的实验研究发现, 抗氧化应激药物对多种眼球细胞具有良好的保护作用, 印

证了氧化应激与多种眼科疾病的病理过程相关。Nrf2是细胞抗氧化反应的中枢调节者,在细胞的防御保护中发挥了重要作用。以下讨论,Keap1-Nrf2-ARE系统,公认的抗氧化应激的重要通路,也是目前眼科研究的热点之一。

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD),主要在55岁以上人群发病,是引起失明的最常见原因,它的发病是由多种因素长期作用的结果,其中氧化应激对视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞的损害作用是导致AMD发生发展的主要病理机制。RPE细胞的损伤归因于细胞内抗氧化防御系统的衰弱或ROS水平的增加。动物实验表明,Nrf2基因敲除小鼠表现出与人类AMD相似的病理改变,如氧化损伤、过度自噬和炎症反应等,说明Nrf2信号通路的缺失将增加视网膜年龄相关性疾病的易感性;而当敲除Nrf2的负性调控因子Keap1时,却能部分恢复大龄鼠RPE细胞Nrf2信号通路活性,说明细胞中Keap1抑制导致的转录因子Nrf2及其下游信号分子的激活可有效提高RPE细胞抗氧化损伤能力。综上所述,Nrf2介导的信号通路能保护年龄相关性的视网膜损伤如AMD,并有可能作为治疗AMD的靶点,同时,RPE细胞中Nrf2的表达对AMD进展有无影响也值得进一步研究。

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病的严重并发症之一,不仅是糖尿病性微血管病变中最重要的表现,也是一种具有特异性改变的眼底病变。它是导致发达国家成人致盲的常见原因,但其导致视力障碍和丧失的机制尚未完全阐明,因而引起人们越来越多的关注。我们猜测,高血糖能够诱导细胞内ROS生成增加,而ROS又能启动血糖异常代谢途径,各种代谢产物又不断将氧化应激放大,导致更多的自由基生成,激发了更大的氧化应激,最终引起视网膜毛细血管内皮细胞及周细胞凋亡,血-视网膜屏障破坏以及视网膜神经节细胞凋亡。研究发现,在Nrf2缺乏的糖尿病小鼠中,过氧化物表达、引起DR的重要炎症因子——肿瘤坏死因子- α 都明显高于Nrf2存在的糖尿病小鼠;而视网膜中抗氧化蛋白GSH水平却明显低于野生型糖尿病小鼠。总之证实了Nrf2信号通路在延缓DR发生发展中起重要作用。

视神经(optic nerve)损伤,又称之为外伤性视神经炎病变(traumatic optic neuropathy),是颅脑损伤中常见和严重的并发症之一,约占颅脑外伤

的2%~5%。众多实验已证明,Nrf2介导的信号通路能保护氧化应激所致的神经退行性病变。体内及体外研究均发现,长效栀子素衍生物能通过激活Nrf2信号通路减少氧化应激损伤所致的视网膜神经节细胞死亡,抗氧化剂R- α 硫辛酸通过激活Nrf2信号通路上调下游因子HO-1的表达,从而保护氧化应激导致的视网膜神经节细胞损伤。总之,上调Nrf2信号通路能减轻视网膜神经节细胞的损伤。

还有葡萄膜炎、早产儿视网膜病变等多种眼科疾病都表明了Keap1-Nrf2系统在其中抗氧化应激的作用,但其在多种眼科疾病的发生发展机制中究竟扮演了什么角色,还有待于进一步研究。目前的动物实验已显示,多种Nrf2激动剂对多种眼细胞具有保护作用,因此Keap1-Nrf2-ARE通路可作为治疗眼科疾病的一个新的靶点,预期对临床眼科疾病的治疗发挥重要作用^[84]。

5.1.6 神经退行性疾病

事实表明,Keap1-Nrf2系统在神经退行性疾病中也发挥重要作用。Keap1抑制、Nrf2激活对氧化应激所致神经退行性变的保护作用已经得到了很好的研究:Nrf2转录因子通过诱导多种细胞防御和解毒酶的表达,在神经退行性疾病中起保护作用。Nrf2是调控细胞氧化应激反应的重要转录因子,而中枢神经系统对氧化应激敏感。所以异常的Nrf2水平将导致氧化应激的发生,而氧化应激又可导致异常蛋白质聚集、小胶质细胞活化和线粒体功能障碍等病理特征,这些病理过程将产生ROS,进而脂质、蛋白质和DNA损伤。这些病理生理事件包括各种各样的神经退行性疾病,包括阿尔茨海默病(AD)、亨廷顿氏病(HD)、帕金森病(PD)、缺血和中风。a. 帕金森病(PD)。Keap1-Nrf2系统和癌基因*DJ-1*调控PD疾病的发生。*DJ-1*是一种氧化应激传感器基因,也是一种转录调节因子。在正常氧化应激条件下,*DJ-1*的表达增加,Nrf2依赖基因的表达正常,后通过应激诱导的细胞死亡帮助减少氧化应激的发生;而在*DJ-1*基因缺陷的患者中,Nrf2依赖基因的表达减少,氧化应激增加。当细胞内氧化还原状态不平衡时,即*DJ-1*过度的氧化也会使其功能丧失,从而导致PD的氧化应激。这表明,功能失调的Nrf2水平与家族性PD的发病机制有关。*DJ-1*阻止Keap1与Nrf2相互作用,从而防止Nrf2的泛素化而保护神经元免于氧化应激和细胞死亡;在没有*DJ-1*的情况下,Nrf2是不稳定的,转录反应在基础条件和诱导条件下都会变迟钝从而

导致PD的发生发展。而多巴胺类似物6-羟基多巴胺(6-HAD)具有高度神经毒性,被发现能够激活Nrf2,进而激活细胞防御机制,以防止氧化应激。因此,6-HAD可作为Nrf2激活剂以成为PD的治疗靶点,从而改善PD的病情。

b. 亨廷顿氏病(HD)。研究表明,在HD的初级阶段,Nrf2激动剂通过Keap1-Nrf2-ARE系统过表达重要的细胞保护基因,激活星形胶质细胞和小胶质细胞,这可能会保护由ROS引起的脑损伤。星形胶质细胞中Keap1-Nrf2通路的激活加速了神经元对非兴奋性毒性谷氨酸的抵抗。因此,Nrf2的激活和过表达是治疗HD的一个令人鼓舞的治疗靶点。还有,在氧化应激下,p62能通过直接竞争使Nrf2与Keap1解离,随后激活Nrf2并介导Keap1的自噬降解,从而在脑缺血损伤期间清除ROS,对预防氧化损伤和减轻内质网应激起着重要作用,所以抑制Keap1表达,促进Nrf2激活也是一个重要的防治HD的切入点^[85]。

c. 阿尔茨海默病。同样地,Keap1-Nrf2系统也调控AD的发生。在AD患者的大脑中Nrf2显著减少,这可能解释了神经元对神经退行性疾病损伤易感性增加的原因。另一项研究显示,DJ-1能稳定功能失调的Nrf2,它通过阻止Keap1与Nrf2的联系,导致Keap1受蛋白酶体降解而Nrf2稳定表达。有研究利用果蝇模型,确定了Nrf2负性调节因子Keap1抑制是挽救AD相关Nrf2缺陷和随后预防神经元变性的有效靶点。此外,有研究还发现了一种新的化合物——1,4-二苯基-1,2,3-三唑化合物,它直接阻断了Nrf2和Keap1之间的结合,从而可以减弱AD在小鼠神经元中的毒性作用。因此,直接的Keap1-Nrf2干扰因子对神经退行性疾病中观察到的Nrf2活性缺陷具有针对性,在此基础上进一步开发此类化合物可以作为潜在的新药,来预防神经衰弱和其他神经退行性疾病^[86]。还有某些药物或慢病毒也可导致Nrf2表达增加,使Nrf2增加抗氧化基因的表达,改善活性氧积累的肽类,即其也可以作为AD的治疗靶点,从而改善AD的病情。最后,有研究提供了第一个体内证据,即对Nrf2负性调节因子Keap1的特异性抑制,通过与Nrf2激活相关,可以防止AD引起的神经元毒性。总的来说,我们特别强调Keap1是AD中Nrf2活化的有效靶点,并支持进一步研究Keap1直接抑制剂预防体内神经退行性变^[86]。

5.1.7 心血管疾病

Keap1-Nrf2系统在心血管疾病中也起到了非常重要的作用。在心肌肥大的早期,Keap1释放Nrf2后易位至细胞核内,启动许多抗氧化基因,例如SOD、CAT和GPx等的转录,对心脏中的病理性氧化应激进行广泛的细胞防御:这表明早期Keap1-Nrf2系统发挥积极作用。然而,到晚期阶段,前期Nrf2的过度激活导致Nrf2表达下调,无法维持心肌细胞内氧化还原稳态,因此,心脏持续的氧化应激将诱导心脏重塑,并最终导致心力衰竭,这表明晚期Keap1-Nrf2系统发挥消极作用。还有研究表明,4-羟基壬烯酸可以通过形成加合物直接诱导Keap1的构象变化;或通过增加线粒体ROS的产生间接诱导Keap1的构象变化激活Nrf2,在活化抗氧化酶的基础上,刺激GSH生物合成,进一步保护心脏,但4-羟基壬烯酸诱导Nrf2核聚集的机制仍有待阐明^[87]。

5.1.8 缺血/再灌注损伤

缺血性心脏病(IHD)是全球范围内死亡和残疾的主要原因,据估计每年全球约有740万人死亡。尽管通常以经皮冠状动脉介入治疗和冠状动脉搭桥术为代表的心肌再灌注治疗已成为IHD治疗的主流方法,但缺血再灌注(IR)损伤仍然是一个尚未解决的问题,主要影响再灌注治疗的有效性。因此,如何有效地预防心肌IR损伤已引起研究人员越来越多的兴趣。尽管尚未完全阐明心肌IR损伤的机制,但氧化应激和炎症已被证明是造成心肌IR损伤的原因,所以Nrf2是关键转录因子。在生理状态下,Nrf2通过与作为Nrf2生理抑制剂的Keap1结合而主要存在于细胞质中。然而,在氧化应激条件下,Nrf2通过与Keap1分离而转移到细胞核中,随后激活了抗氧化基因如HO-1的转录,可保护细胞免受氧化应激和炎症诱导的损伤。还有,经子昔诱导的预处理可通过激活Nrf2/HO-1信号通路抑制氧化应激来减轻心肌IR损伤。此外,Nrf2的激活能抑制NLRP3炎症小体介导的经由ROS在脑IR上的损伤。因此,Nrf2被认为是心肌IR损伤的治疗靶标。

据报道,Sweroside(一种从拟南芥(*Swertia pseudochinensis* Hara)中提取的secridoid葡萄糖苷)具有抗氧化和抗炎活性从而减轻IR带来的机体损伤。它可能与Keap1相互作用来发挥作用。已确定经Sweroside处理后,Keap1的表达水平显著

降低了51%;而Nrf2在细胞质中的表达降低了50%,但在细胞核中的表达水平几乎提高了两倍,这支持了Sweroside抑制Keap1表达并促进Nrf2核易位的假说。越来越多的证据表明,一些小分子可通过中断Keap1-Nrf2的PPI导致Nrf2活性升高。考虑到在分子对接模型中预测了Keap1和Sweroside之间的相互作用,推断Sweroside通过竞争性结合Keap1,进而促进Nrf2从Keap1-Nrf2复合物中逃逸而被激活。此外,证实了Sweroside对HO-1和ROS的作用可以通过抑制Nrf2得以挽救,这进一步证明了其抗氧化作用是Nrf2依赖性的。综上,可以此为方向寻找能特异性靶向Keap1抑制而激活Nrf2的药物来防治IR^[88]。

5.2 Keap1与癌症

文献表明,Keap1是一种肿瘤抑制因子,也是一种重要肿瘤蛋白。Keap1招募底物并靶向泛素化和蛋白酶体或自噬降解,从而保持底物的低水平。

而癌症中Keap1介导的泛素化降解功能失调,这往往是由于癌症中存在的Keap1体细胞突变导致的。例如在肺癌中Keap1体细胞突变导致Nrf2或IKK β 或SOX9蛋白水平升高,并通过不同的级联反应而导致肺癌的发生和恶性进展。此外,Keap1点突变在胃癌(11.1%)、肝癌(2.8%)、结肠直肠癌(7.8%)、前列腺癌(1.3%)、胆囊癌(30.7%)、卵巢癌(37%)、胶质瘤(1.7%)、头颈癌(42%)和透明肾细胞癌(4.7%)等多种人类癌症中被发现^[89],但大多数这些突变的功能性后果和机制仍然未知。也有研究确定了Keap1突变的3种不同的功能类别:a.最有可能代表乘客事件的沉默突变;b.亚型突变;c.功能性死亡蛋白质^[90]。提示了Keap1突变功能的多样性。为此,我们将癌症中的Keap1突变进行了归纳(表2),并在下文详细介绍了Keap1突变导致肺癌发生发展的详细机制。

Table 2 Somatic mutations of Keap1 in various human cancers

表2 各类人类癌症中Keap1的体细胞突变

癌症	突变	参考文献
肺癌	R71L、E117K、S144F、V155F、V155F、V167F、G186R、R204P、S224Y、L231V、S243C、P318_fs、P318L、R320Q、G333C、G364C、S404X、L413R、D422N、G423V、G430C、N469fs、N460fs、R470H、R470S、R470C、D479G、G480W、W497L、W544C、R554Q、R601W、G603W、E611D	[91-96]
肝癌	N183S、N222K、D236Y、C249Y、H274Y、R336Q、L342M、G464D、W554X、E593*	[43, 97-99]
子宫内膜癌	C13T、T43M、R169C、H274Q、R320Q、Q337X、A356T、G367D、P384L、H424R、R507Q	[97, 100]
胆囊腺癌	P181_fs、G332_fs、S338L、G379D	[99]
乳腺癌	C23Y、D256G、E449*、L452fs*6、V453fs*27、A522V	[43, 97, 99]
盲肠腺癌	G558G	[97]
结直肠腺癌	R234W、T330I、Q359X、V606M	[43]
胃腺癌	Q82H、S233N、F280L、L281P、C288Y、G350S	[43]
肾癌	Y54D、M409T、W544R	[97]
大肠癌	S45P、I125V、T142M、D165N、A191D、M503I、R536H	[97]
卵巢癌	S45S、F107L、R116P、A159T、A188V、N189K、P412S、E611K、	[97, 101]
食道癌	E138A、V324M	[97]
胰腺癌	V428V	[97]
前列腺癌	M209L、Y255F、T314M、D357N、A407V	[43, 97, 102]
恶性黑色素瘤	V302fs*48、1518delC、1519delG	[97, 103]
泌尿道癌	E218Q、E244K	[97]
自主神经节疾病	S35I	[97]

有研究证实,Keap1能够抑制NSCLC的转移,其作用机制是通过调节Nrf2/S100P信号通路而发挥作用。它可以作为NSCLC中预测肿瘤进展和监测治疗效果的分子标志物。这些研究证明,Keap1是一种抑癌基因,由于它的缺失导致肿瘤的发生。在

多种癌症中报道了Keap1基因存在突变体。最初是在人肺腺癌细胞系中鉴定出了Keap1基因的突变体,在Keap1的Kelch/DGR结构域中,甘氨酸被半胱氨酸所取代。此后,肺癌组织中也发现Keap1基因的Kelch或IVR结构域中存在多个突变体。在肝

癌和胆囊癌中也检测到 Keap1 的突变能够导致 Nrf2 的过度表达, 促进 II 期解毒酶和抗氧化蛋白的激活。越来越多的研究证明, Keap1 在多种癌症中发生突变, 并且 Keap1 不同的表达状态对肿瘤的作用也不相同。例如, 在乳腺癌基因组研究中 Keap1 N 端结构域的突变 (C23Y) 消除其对 Nrf2 的抑制作用, 有利于癌细胞存活和治疗耐药。除了这些突变体之外, Keap1 基因突变也已在卵巢癌、子宫内膜癌和肺乳头状腺癌细胞中被发现^[104]。以下详细介绍一下 Keap1 与肺癌的关系。

Keap1 缺失促进 KRAS 驱动的肺癌并导致对谷氨酰胺分解的依赖。大约 20% 的 KRAS 突变型肺癌 (LUAD) 肿瘤携带编码 Keap1 基因功能缺失突变。Keap1 的高频率突变提示, 氧化应激反应在肺肿瘤发生中起重要作用。实验显示, 在 KRAS 驱动的 LUAD 小鼠模型中使用 CRISPR-Cas9 基因敲除 Keap1 的方法, 发现 Keap1 缺失对肺癌进展的影响: 在小鼠中, Keap1 的缺失会使 Nrf2 过度活跃, 并促进 KRAS 驱动的 LUAD。通过基于 CRISPR-Cas9 的基因筛选和代谢组学分析, 发现 Keap1 缺失或 Nrf2 突变型癌症依赖于谷氨酰胺分解的增加, 这一特性可通过谷氨酰胺酶的药理抑制进行治疗^[39]。

受体酪氨酸激酶 (RTK) -丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路在肺癌和其他癌症的发展中起着重要作用, 并且该通路的多个节点经常发生突变或拷贝数改变。靶向 RTK-MAPK 通路的抑制剂被认为能导致肺癌和其他癌症的临床反应。靶向 RTK-MAPK 途径的抑制剂治疗, 可增加 Keap1 完整细胞中的 ROS, 而 Keap1 的丢失则消除了这种增加效应。此外, Keap1 的缺失还能增加 Nrf2 的活性, 而后通过增加谷胱甘肽的合成减少 ROS 的产生, 改变细胞代谢, 使细胞在缺乏 MAPK 信号的情况下增殖。总结来说: 在多种靶向 RTK-MAPK 途径的抑制剂存在下, Keap1-Nrf2 通路的改变可能会促进细胞生存, RTK-MAPK 途径抑制剂通过阻断 MAPK 信号并诱导 ROS 减少, 使 Nrf2 稳定至低水平, 但 Keap1 缺失或 Nrf2 过表达足以在 MAPK 信号缺失的情况下恢复细胞增殖。然而, 此前有研究表明, Nrf2 对 ROS 的解毒和对氧化还原状态的调节有助于肿瘤的发生。最近也发现 Nrf2 是一种致癌基因, 除了它在调节氧化还原状态中的作用外, Nrf2 还可以调节许多代谢酶的表达, 将葡萄糖和谷氨酰胺重新定向到支持增殖的合成代谢途径中,

以及控制丝氨酸和甘氨酸生物合成以支持谷胱甘肽和核苷酸的生产。因此在 Keap1 缺失时, 增加 Nrf2 的表达可以通过降低 ROS 和调节代谢途径来增强对 RTK-MAPK 途径抑制的抵抗力。Nrf2 负性调节因子 Keap1 的缺失, 调节肺癌 BRAF、NRAS、KRAS、EGFR 和 ALK 基因突变。在大约 30% 的肺鳞状细胞癌和大约 20% 的肺腺癌中, Keap1-Nrf2 通路中某些元素发生了基因改变。该途径的改变可与 RTK-Ras 途径的改变同时发生, 尽管在肺癌的癌基因阴性亚群中, Keap1-Nrf2 的改变更为丰富^[105]。

6 调控和影响 Keap1 的因素

6.1 甲基化修饰对 Keap1 转录水平的影响

首先, Keap1 功能在转录水平受到调控。Keap1 受到甲基化的启动子的直接调控。已有实验证实, 在非小细胞肺癌、结肠癌、前列腺癌中, Keap1 基因的启动子区 CpG 岛高甲基化而低表达, 且 Keap1 启动子区域内 CpG 岛高甲基化在乳腺癌、前列腺癌及结肠癌等肿瘤中直接或间接促进了化疗耐药, 从而证实 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路与多重耐药机制相关联^[9] (图 1f)。

6.2 几种微小 RNA 对 Keap1 翻译水平的影响

其次, Keap1 功能在翻译水平受到调控。有研究发现, 几种微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 调节 Keap1 在人类疾病中的表达。miRNAs 是一种识别特定 mRNAs 3' 非翻译区域 (3'untranslated regions, 3'UTR) 的小非编码分子, 通过翻译阻断或强制降解来负调控 mRNA 的丰度。首先, 检索 TargetScan 数据库发现, Keap1 mRNA 的 3'UTR 上有 miR-223 结合位点。通过实验发现, miR-223 模拟转染 HepG2 细胞的内源性 miR-223 表达上调, 并观察到 Keap1 蛋白质水平的降低; 而在 miR-223 抑制剂转染的 HepG2 细胞中观察到 miR-223 表达的显著降低和 Keap1 蛋白质水平的增加。这些结果表明, miR-223 的表达负调控 HepG2 细胞中 Keap1 的蛋白质水平。总之, Keap1 受 miR-223 靶向调控, 而且 Keap1 的负调控因子 miR-223 在 T2DM 肝损伤中是一个有吸引力的治疗靶点^[106]。另一项研究表明, 果糖诱导 miR-200a 低表达而上调 Keap1, 从而阻断 Nrf2 抗氧化途径, 增强 ROS 驱动的 TXNIP, 激活 NLRP3 内酰胺酶, 干扰脂质代谢相关蛋白, 引起细胞氧化应激、损伤和脂质沉积。而 Polydatin 增强 miR-200a 表达以控制 Keap1-

Nrf2通路是治疗果糖相关性肝损伤和脂质沉积的一种治疗策略^[107]。此外,在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中miR-432-3p通过抑制Keap1 mRNA的翻译而正向调节Nrf2的活性^[108](图1f)。

6.3 Keap1蛋白翻译后水平修饰的调控

最后,Keap1蛋白受翻译后修饰水平的调控。功能研究表明,在多种癌症细胞模型内,TRIM25正调控Keap1含量,即其通过直接靶向Keap1进行泛素化和降解,激活Nrf2信号并降低ROS水平,从而促进肿瘤细胞存活^[109](图1f)。以下还有几种经典的对Keap1的翻译后修饰。

6.3.1 氧化修饰(oxidation)

活细胞在氧化和还原之间保持平衡,这种氧化还原平衡的扰动被认为是导致多种疾病的原因。调节氧化还原状态的最新尝试集中在亲电试剂(EPs)上,它们可激活有效的细胞防御系统抵抗氧化应激。这种方法的一个例子是鼠尾草酸(CA)和鼠尾草酚(CS),这是在迷迭香(*Rosmarinus officinalis*)中发现的化合物。重要的是,CA和CS本身不是亲电的,而是响应氧化而变成亲电的,然后激活Keap1/Nrf2/ARE转录途径来合成内源性抗氧化剂“2期”酶^[110]。

正常状态下,细胞质中的Nrf2与Keap1结合并处于活性相对抑制状态。而在外界氧化应激刺激下(如ROS或RNS),解偶联后的Nrf2进入细胞核,与ARE相结合,启动下游的抗氧化酶,这些酶包括超氧化物歧化酶(superoxidodismutase, SOD)、醌氧化还原酶、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathioneperoxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶(catalase, CAT)等。现在,有越来越多的天然抗氧化剂被发现,其具有抵抗细胞内氧化过度的情况,如白藜芦醇、姜黄素、原花青素、槲皮素、茶多酚等^[111]。在COPD患者中,长期受到烟草中自由基和化学物质刺激时,会引起Keap1构象的改变或者由高度活性的氧化物直接促使Nrf2被磷酸化,导致Nrf2与Keap1解离而活化,活化的Nrf2进入细胞核,与ARE结合,启动ARE下游的抗氧化蛋白或促抗氧化蛋白合成酶等基因转录和表达以抵抗内外界的有害刺激。

除了通过氧化调节Keap1,在某些化学和氧化应激条件下,Keap1本身可以通过修饰其中心连接域而使自身多聚泛素化。此外,在压力应激条件下,Nrf2的DLG基序可以从Keap1上断开,允许

多泛素结合蛋白p62的结合,进入自噬介导的溶酶体途径降解。

6.3.2 糖基化修饰(glycosylation)

O-连接N-乙酰氨基葡萄糖(O-GlcNAc)是一种动态翻译后修饰(PTM),能可逆性修饰数千种核、细胞质和线粒体蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基。在哺乳动物中,O-GlcNAc由O-GlcNAc转移酶(OGT)添加,并由O-GlcNAc酶(OGA)去除。异常的O-GlcNAc酰化与各种人类疾病,特别是癌症有关。例如,许多癌蛋白(如Myc、Akt)和肿瘤抑制物(如p53、AMPK)被O-GlcNAc酰化,从而影响致癌信号和治疗反应。

OGT抑制的许多转录效应受氧化还原应激耐受的主要调节因子Nrf2的激活。此外,我们发现多个肿瘤表达数据中,低OGT活性的特征与Nrf2激活密切相关,即OGT抑制激活Nrf2依赖的转录程序。在这些信息的指导下,我们确定Keap1、Nrf2的主要负调节因子,是OGT的直接底物。

为了阐明O-GlcNAc酰化对Keap1的功能效应,经过对纯化的Keap1进行基于质谱(MS)的蛋白质组学分析,确定了11个候选O-GlcNAc位点:4个假定的O-GlcNAc位点(S102、S103、S104和S166)位于BTB结构域的 α 螺旋内;另外6个潜在的O-GlcNAc位点(T388、S390、S391、T400、S404和S410)位于第二个Kelch基序的 β 链中,而最终候选位点(S533)位于第五个Kelch基序中。我们通过Nrf2活性的转录和ROS读数判断,Keap1在S104处的O-GlcNAc酰化是其介导Nrf2泛素化和蛋白酶体破坏的能力所必需的,并且不可糖基化的S104A突变体Keap1赋予Nrf2依赖性抵抗erastin诱导的细胞死亡,但S104糖基化不是Keap1二聚所必需的。文献表明,OGT在非应激条件下与Keap1相互作用并组成糖基化,后抑制OGT降低Keap1 O-GlcNAc酰化。在许多人类肿瘤中,Nrf2通路被不适当地激活,赋予肿瘤生长优势和治疗抗性。可能通过Keap1糖基化的药理作用抑制Nrf2信号,从而使癌细胞对化疗或放疗敏感。有趣的是,O-GlcNAc水平和Nrf2活性随葡萄糖波动而变化,即葡萄糖饥饿会复制OGT抑制,导致Keap1去糖基化,减少Keap1-Cul3相互作用,并诱导Nrf2通路,所以通过小分子OGA拮抗剂对Keap1去糖基化的药理学抑制,可以阻止癌细胞中葡萄糖饥饿诱导的Nrf2。表明Keap1 O-GlcNAc酰化将营养感应

与下游胁迫抗性联系起来, 因此, 通过 Keap1 O-GlcNAc 酰化控制 Nrf2 信号可能具有病理生理意义, 尤其是在灌注不良、低血糖/缺氧的实体瘤中。

Keap1 通过其 BTB 结构域和部分中间区结构域与 Cul3 结合, 而 Keap1 Kelch 基序与底物相互作用。其上 S104 的 O-GlcNAc 酰化可通过增强 Keap1-Cul3 结合、优化 Keap1 构象或两者促进与 Cul3 的生产性相互作用及其底物的有效泛素化。一些研究表明, IKK β 也是一个靶点。因此, 在未来的研究中确定 IKK β 或其他 Keap1 底物是否也在对 OGT 抑制的反应中积累将是有趣的。此外, 虽然 Keap1 Kelch 结构域上的候选 O-GlcNAc 位点对 Nrf2 调节没有显著影响, 但它们可能有助于其他 Keap1-Cul3 底物的结合, 或者可能调节 Keap1 以响应其他信号。未来的工作将集中于 S104 之后 Keap1 O-GlcNAc 位点的潜在功能后果和下游效应^[112-113]。

6.3.3 烷基化 (alkylation)

在基础条件下, 胞质蛋白 Keap1 与 Nrf2 导致其启动子区域包含 ARE 的细胞保护性基因的表达水平较低。文献表明人 Keap1 的 27 个半胱氨酸残基中的一个或多个烷基化会导致细胞质中 Nrf2 的泛素化和蛋白酶体介导的降解降低, Nrf2 核积累, 再通过 ARE 上调细胞保护性基因的表达从而增强抗氧化能力而保护细胞, 并预防诸如癌症的退化性疾病。因此, 鉴定这些半胱氨酸残基对特定亲电试剂最具反应性有助于阐明这种癌症预防机制, 也称为化学预防。

酶的诱导, 例如醌还原酶、葡糖醛酸转移酶、谷胱甘肽 S-转移酶和磺基转移酶可以保护细胞免受致癌物的毒性和肿瘤作用。细胞核中 Nrf2 浓度的增加, 会上调 ARE 并诱导这些化学预防酶的表达。经查阅文献得知, 某些亲电子化合物能使 Keap1 烷基化, 表明这些化合物具有上调 ARE 并诱导酶的能力^[114]。如碳正离子、醌、醌甲基化物、醌亚胺、环氧化物和 Michael 受体之类的亲电子试剂均能与 Keap1 反应, 并可能是癌症化学预防剂, 但应预期这些化合物中反应性最强的物质会引起毒性 (尤其是高剂量时)。因此, 只有弱亲电试剂 (例如 Michael 受体黄腐酚) 能在很宽的剂量范围内显示出化学预防癌症的活性, 而不会显示出毒性。因此, 可以预期在生物系统中不与水或其他弱亲核试剂反应的情况下就可以使用这种癌症化学预防剂。所以, 可以将 Keap1 烷基化的天然产物 (如

黄腐酚) 用于预防癌症, 它们可能通过诱导 ARE 调节的保护酶而起化学保护剂的作用。而在 Keap1 的各种半胱氨酸残基中, C151 对亲电试剂的反应性最强。且具有共轭二乙炔碳的泛醇可以共价修饰 Keap1 中的 C151 残基, 从而使 Keap1 失活, 导致 Nrf2-ARE 途径的激活^[115-116]。

内源性代谢物衣康酸 (itaconate) 最近已成为巨噬细胞功能的调节因子, 但其确切的作用机制仍不清楚。在小鼠和人巨噬细胞中, 脂多糖 (LPS) 激活 Nrf2 所需的就是衣康酸。此外, 衣康酸是一种抗炎代谢产物, 可通过半胱氨酸残基的烷基化直接修饰蛋白质。如其烷基化了 Keap1 蛋白上的 Cys 残基 151、257、288、273 和 297, 使 Nrf2 能够增加具有抗氧化和抗炎能力的下游基因表达, 即衣康酸的抗炎作用需要 Nrf2 的激活。一种新的细胞可渗透的衣康酸衍生物, 4-辛基衣康酸酯 (4-octyl itaconate) 的使用, 可保护体内脂多糖诱导的致死性并减少细胞因子的产生。

衣康酸是对 LPS 的反应, 部分通过 I 型干扰素 (IFN) 产生, 并通过 Nrf2 激活和一种关键的促炎性调节剂琥珀酸脱氢酶 (SDH) 抑制作用来促进抗炎程序。通过下调 IFN 应答, 进一步限制了炎症基因的表达及其自身的产生。这有助于解释为什么缺乏 Nrf2 的小鼠对败血性休克更加敏感, 即使在某些情况下也可以保护这些小鼠免于发炎。我们确定衣康酸是一种炎症调节剂, 可以通过新近鉴定的翻译后修饰直接修饰蛋白质, 从而揭示了使用衣康酸治疗炎症性疾病的治疗机会。此外, 最近从衣康酸与维生素 B12 形成了一个有趣的联系, 这有必要在炎症和免疫方面进行进一步的研究。进一步了解衣康酸酯作为 I 型 IFN 的抗炎代谢产物和调节剂的作用可能会为炎症疾病的发病机理提供新的见解^[117]。

7 展 望

Keap1 作为 E3 泛素连接酶接头蛋白, 其介导的泛素化通常走向蛋白质降解并影响某些信号事件。我们也对其中 4 种降解型底物进行了详细的阐述, 然而泛素化是个复杂的翻译后修饰过程, 降解型泛素化修饰并不是其唯一通路。因此为了解 Keap1 究竟是通过降解型泛素化修饰还是非降解型来影响下游底物, 其泛素化底物似乎可成为一个切入点。众所周知, Keap1 通常结合拥有 E (T/S) GE 基序的底物蛋白, 如 Nrf2、IKK β 、p62、

SOX9、PGAM5、PALB2和MCM3等。有趣的是,在这些底物中,拥有另一个DLG基序的底物蛋白如Nrf2、IKK β 被Keap1泛素化后被蛋白酶体降解,然而仅含有E(T/S)GE基序的底物蛋白如PGAM5、PALB2和MCM3被Keap1泛素化修饰,但蛋白质稳定性并不受影响。而同样存在具有ETGE和DLG基序的Nrf1仅被Keap1泛素化而不被降解。此外SOX9不同于其他,它与Keap1结合是通过两个DLG基序,这种基序与DLG基序非常相似。在这里我们提出一种猜想,底物是否标记为泛素化降解以及其降解动力学如何,可能部分取决于DLG基序的存在。但这似乎不足以完全解决泛素化之后通路的问题,因此,今后更多底物的发现可能有助于解决该问题。

Keap1作为一种抑癌基因,在人类癌症中存在着各式的Keap1体细胞突变,且这些突变遍布在整个Keap1蛋白。因此,了解特定的体细胞突变对蛋白质功能有何影响,能为以后治疗那些存在Keap1突变的癌症提供一定的见解。例如一项对鳞状细胞肺癌中体细胞突变的研究表明,Keap1中没有一个突变发生在与Nrf2直接相互作用的氨基酸中。然而,其中一些突变能增强Keap1和Nrf2之间的相互作用,尽管它们不影响泛素化,但它们阻止了Nrf2的蛋白酶体降解。总之,探究Keap1突变影响其底物蛋白结合能力或者是泛素化具有重要意义。此外Keap1癌症基因组的改变与癌基因信号通路的异常激活存在一定联系,并提示泛素介导的肿瘤蛋白水解作用有助于肿瘤的发展。因此,进一步研究Keap1激活机制并开发针对Keap1表达的药物可能对癌症的治疗或预防具有重要的临床意义。

上文讨论了Keap1在由于氧化应激导致的许多人类疾病中的负面作用。Keap1抑制剂的出现为对这些疾病有效的治疗或预防剂。早期的Keap1抑制剂是作用于Keap1半胱氨酸发挥作用的亲电子试剂,也被称之为Keap1间接抑制剂。如三萜化合物2-氰基-3,12-二氧ooleana-1,9-二烯-28-油酸(CDDO)的衍生物是极强的亲电反击反应诱导剂。这些衍生物与C151结合并破坏KEAP1和CUL3之间的相互作用。具有与CDDO类似骨架结构的小分子(例如CDDO-Im)已被开发为立体选择性KEAP1-C151结合试剂。但这些抑制剂存在着很大的缺陷,Keap1的抑制剂可能会产生脱靶反应,引起潜在的毒性作用。为此,在Keap1-Nrf2 PPI研究的基础上,人们已经开发了针对Keap1-Nrf2 PPI

的几种直接抑制剂。这些直接抑制剂通过非共价机制通过抑制Keap1-Nrf2 PPI起作用,也被认为是一种用于治疗 and 预防多种疾病和病症的新颖治疗策略。最近也开发了Keap1与其他底物之间的直接抑制剂,有研究发现N-[2-丙酮基-4-(4-乙氧基苯磺酰基氨基)萘-1-基]-4-乙氧基苯磺酰胺(K67)是磷酸化p62-Keap1相互作用的抑制剂,可降低肝癌中Nrf2的水平。K67抑制肝癌细胞的增殖并加速抗癌药物的作用。K67还可能使癌细胞对抗癌药物的抵抗力降低,尤其是在HCV阳性肝癌患者中。因此,在未来Keap1与底物之间的PPI的研究可以为更多直接作用与PPI的Keap1抑制剂提供见解。Keap1抑制剂在疾病中是把双刃剑,Keap1抑制剂的使用在肝病模型中已经体现出Keap1抑制剂的黑暗一面。Keap1抑制剂可以激活Nrf2改善3期慢性肾脏疾病和2型糖尿病患者的肾小球滤过率而发挥积极作用,但也能激活NF- κ B而加重肾纤维化。因此,在使用Keap1抑制剂时,肾病中NF- κ B和Nrf2激活的对立面似乎更加体现了Keap1抑制剂特异性的重要性。此外,Keap1的其他功能也是目前研究的热点,虽然已经有了实质性的进展,但Keap1的功能仍有待完善。特别是在衰老这一人类不可避免的事件中,虽然已经提出Keap1-Nrf2在衰老中的重要作用,但仅局限于Nrf2的作用,而Keap1的神秘面纱却始终没有揭开。因此,在未来,衰老中Keap1的非规范功能研究是重要的。

参 考 文 献

- [1] Park J, Cho J, Song E J. Ubiquitin-proteasome system (UPS) as a target for anticancer treatment. Arch Pharm Res, 2020, 43(11): 1144-1161
- [2] Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, et al. The ubiquitin-proteasome system. J Biosci, 2006, 31(1): 137-155
- [3] Pohl C, Dikic I. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. Science, 2019, 366(6467): 818-822
- [4] Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. Genes Cells, 2011, 16(2): 123-140
- [5] Kopacz A, Kloska D, Forman H J, et al. Beyond repression of Nrf2: an update on Keap1. Free Radic Biol Med, 2020, 157: 63-74
- [6] Lo S C, Li X, Henzl M T, et al. Structure of the Keap1: Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. EMBO J, 2006, 25(15): 3605-3617
- [7] Tian H, Zhang B, Di J, et al. Keap1: one stone kills three birds Nrf2, IKK β and Bcl-2/Bcl-xL. Cancer Lett, 2012, 325: 26-34
- [8] Kim J E, You D J, Lee C, et al. Suppression of NF- κ B

- signaling by KEAP1 regulation of IKKbeta activity through autophagic degradation and inhibition of phosphorylation. *Cell Signal*, 2010, **22**(11): 1645-1654
- [9] Lee D F, Kuo H P, Liu M, *et al.* KEAP1 E3 ligase-mediated downregulation of NF-kappaB signaling by targeting IKKbeta. *Mol Cell*, 2009, **36**(1): 131-140
- [10] Karttunen M, Choy W Y, Cino E A. Prediction of binding energy of Keap1 interaction motifs in the Nrf2 antioxidant pathway and design of potential high-affinity peptides. *J Phys Chem B*, 2018, **122**(22): 5851-5859
- [11] Mulvaney K M, Matson J P, Siesser P F, *et al.* Identification and characterization of MCM3 as a Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) substrate. *J Biol Chem*, 2016, **291**(45): 23719-23733
- [12] Tamberg N, Tahk S, Koit S, *et al.* Keap1-MCM3 interaction is a potential coordinator of molecular machineries of antioxidant response and genomic DNA replication in metazoa. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 12136
- [13] O'mealey G B, Plafker K S, Berry W L, *et al.* A PGAM5-KEAP1-Nrf2 complex is required for stress-induced mitochondrial retrograde trafficking. *J Cell Sci*, 2017, **130**(20): 3467-3480
- [14] Wu B, Yang S, Sun H, *et al.* Keap1 inhibits metastatic properties of NSCLC cells by stabilizing architectures of F-actin and focal adhesions. *Mol Cancer Res*, 2018, **16**(3): 508-516
- [15] Tian W, Rojo De La Vega M, Schmidlin C J, *et al.* Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) differentially regulates nuclear factor erythroid-2-related factors 1 and 2 (NRF1 and NRF2). *J Biol Chem*, 2018, **293**(6): 2029-2040
- [16] Yamamoto M, Kensler T W, Motohashi H. The KEAP1-NRF2 system: a thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis. *Physiol Rev*, 2018, **98**(3): 1169-1203
- [17] Lee Y, Chou T F, Pittman S K, *et al.* Keap1/Cullin3 modulates p62/SQSTM1 activity via UBA domain ubiquitination. *Cell Rep*, 2017, **19**(1): 188-202
- [18] Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, *et al.* The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol*, 2010, **12**(3): 213-223
- [19] Ma J, Cai H, Wu T, *et al.* PALB2 interacts with KEAP1 to promote NRF2 nuclear accumulation and function. *Mol Cell Biol*, 2012, **32**(8): 1506-1517
- [20] Orthwein A, Noordermeer S M, Wilson M D, *et al.* A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. *Nature*, 2015, **528**(7582): 422-426
- [21] Lo S C, Hannink M. PGAM5, a Bcl-XL-interacting protein, is a novel substrate for the redox-regulated Keap1-dependent ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem*, 2006, **281**(49): 37893-37903
- [22] Shao N, Huang H, Idris M, *et al.* KEAP1 mutations drive tumorigenesis by suppressing SOX9 ubiquitination and degradation. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, **7**(21): 2001018
- [23] Taguchi K, Yamamoto M. The KEAP1-NRF2 system as a molecular target of cancer treatment. *Cancers (Basel)*, 2020, **13**(1): 46
- [24] Rojo De La Vega M, Chapman E, Zhang D D. NRF2 and the hallmarks of cancer. *Cancer Cell*, 2018, **34**(1): 21-43
- [25] Deblasi J M, Denicola G M. Dissecting the crosstalk between NRF2 signaling and metabolic processes in cancer. *Cancers (Basel)*, 2020, **12**(10): 3023
- [26] Liu Y, Lang F, Yang C. NRF2 in human neoplasm: cancer biology and potential therapeutic target. *Pharmacol Ther*, 2021, **217**: 107664
- [27] Zhang Y, Qiu L, Li S, *et al.* The C-terminal domain of Nrf1 negatively regulates the full-length CNC-bZIP factor and its shorter isoform LCR-F1/Nrf1beta; both are also inhibited by the small dominant-negative Nrf1gamma/delta isoforms that down-regulate ARE-battery gene expression. *PLoS One*, 2014, **9**(10): e109159
- [28] Krajka-Kuzniak V, Paluszczak J, Baer-Dubowska W. The Nrf2-ARE signaling pathway: an update on its regulation and possible role in cancer prevention and treatment. *Pharmacol Rep*, 2017, **69**(3): 393-402
- [29] Taguchi K, Yamamoto M. The KEAP1-NRF2 system in cancer. *Front Oncol*, 2017, **7**: 85
- [30] Li Y, Wang H, Wang X J, *et al.* The short isoform of PML-RARalpha activates the NRF2/HO-1 pathway through a direct interaction with NRF2. *FEBS Lett*, 2017, **591**(18): 2859-2868
- [31] Zhang W, Feng C, Jiang H. Novel target for treating Alzheimer's diseases: crosstalk between the Nrf2 pathway and autophagy. *Ageing Res Rev*, 2021, **65**: 101207
- [32] Cloer E W, Siesser P F, Cousins E M, *et al.* P62-dependent phase separation of patient-derived KEAP1 mutations and NRF2. *Mol Cell Biol*, 2018, **38**(22): e00644-17
- [33] Magesh S, Chen Y, Hu L. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Med Res Rev*, 2012, **32**(4): 687-726
- [34] Wang P, Song J, Ye D. CRL3s: The BTB-CUL3-RING E3 ubiquitin ligases. *Adv Exp Med Biol*, 2020, **1217**: 211-223
- [35] Nguyen T, Sherratt P J, Nioi P, *et al.* Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J Biol Chem*, 2005, **280**(37): 32485-32492
- [36] Camp N D, James R G, Dawson D W, *et al.* Wilms tumor gene on X chromosome (WTX) inhibits degradation of NRF2 protein through competitive binding to KEAP1 protein. *J Biol Chem*, 2012, **287**(9): 6539-6550
- [37] Wakabayashi N, Itoh K, Wakabayashi J, *et al.* Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat Genet*, 2003, **35**(3): 238-245
- [38] Chien M H, Lee W J, Hsieh F K, *et al.* Keap1-Nrf2 interaction suppresses cell motility in lung adenocarcinomas by targeting the S100P protein. *Clin Cancer Res*, 2015, **21**(20): 4719-4732
- [39] Romero R, Sayin V I, Davidson S M, *et al.* Keap1 loss promotes kras-driven lung cancer and results in dependence on

- glutaminolysis. *Nat Med*, 2017, **23**(11): 1362-1368
- [40] Best S A, De Souza D P, Kersbergen A, *et al.* Synergy between the KEAP1/NRF2 and PI3K pathways drives non-small-cell lung cancer with an altered immune microenvironment. *Cell Metab*, 2018, **27**(4): 935-943.e4
- [41] Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, *et al.* Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res*, 2008, **68**(5): 1303-1309
- [42] Singh A, Misra V, Thimmulappa R K, *et al.* Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med*, 2006, **3**(10): e420
- [43] Yoo N J, Kim H R, Kim Y R, *et al.* Somatic mutations of the KEAP1 gene in common solid cancers. *Histopathology*, 2012, **60**(6): 943-952
- [44] Shibata T, Ohta T, Tong K I, *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): 13568-13573
- [45] Mohs A, Otto T, Schneider K M, *et al.* Hepatocyte-specific NRF2 activation controls fibrogenesis and carcinogenesis in steatohepatitis. *J Hepatol*, 2021, **74**(3): 638-648
- [46] Kopacz A, Kloska D, Proniewski B, *et al.* Keap1 controls protein nitrosation and apoptosis-senescence switch in endothelial cells. *Redox Biol*, 2020, **28**: 101304
- [47] Kloska D, Kopacz A, Cysewski D, *et al.* Nrf2 sequesters Keap1 preventing podosome disassembly: a quintessential duet moonlights in endothelium. *Antioxid Redox Signal*, 2019, **30**(14): 1709-1730
- [48] Kloska D, Kopacz A, Piechota-Polanczyk A, *et al.* Nrf2 in aging - focus on the cardiovascular system. *Vascul Pharmacol*, 2019, **112**: 42-53
- [49] Wang R, Liu L, Liu H, *et al.* Reduced NRF2 expression suppresses endothelial progenitor cell function and induces senescence during aging. *Aging (Albany NY)*, 2019, **11**(17): 7021-7035
- [50] Xu G, Lo Y C, Li Q, *et al.* Crystal structure of inhibitor of kappaB kinase beta. *Nature*, 2011, **472**(7343): 325-330
- [51] Gamble C, McIntosh K, Scott R, *et al.* Inhibitory kappa B kinases as targets for pharmacological regulation. *Br J Pharmacol*, 2012, **165**(4): 802-819
- [52] Lee D F, Kuo H P, Chen C T, *et al.* IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell*, 2007, **130**(3): 440-455
- [53] Tsuchiya Y, Asano T, Nakayama K, *et al.* Nuclear IKKbeta is an adaptor protein for IkappaBalpha ubiquitination and degradation in UV-induced NF-kappaB activation. *Mol Cell*, 2010, **39**(4): 570-582
- [54] Jiang Z Y, Chu H X, Xi M Y, *et al.* Insight into the intermolecular recognition mechanism between Keap1 and IKKbeta combining homology modelling, protein-protein docking, molecular dynamics simulations and virtual alanine mutation. *PLoS One*, 2013, **8**(9): e75076
- [55] Thu K L, Pikor L A, Chari R, *et al.* Genetic disruption of KEAP1/CUL3 E3 ubiquitin ligase complex components is a key mechanism of NF-kappaB pathway activation in lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2011, **6**(9): 1521-1529
- [56] Yu M, Li H, Liu Q, *et al.* Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the Nrf2-ARE pathway. *Cell Signal*, 2011, **23**(5): 883-892
- [57] Narkiewicz J, Klasa-Mazurkiewicz D, Zurawa-Janicka D, *et al.* Changes in mRNA and protein levels of human HtrA1, HtrA2 and HtrA3 in ovarian cancer. *Clin Biochem*, 2008, **41**(7-8): 561-569
- [58] Duran A, Amanchy R, Linares J F, *et al.* P62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol Cell*, 2011, **44**(1): 134-146
- [59] Sanz L, Diaz-Meco M T, Nakano H, *et al.* The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *EMBO J*, 2000, **19**(7): 1576-1586
- [60] Rogov V, Dotsch V, Johansen T, *et al.* Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell*, 2014, **53**(2): 167-178
- [61] Sanchez-Martin P, Sou Y S, Kageyama S, *et al.* NBR1-mediated p62-liquid droplets enhance the Keap1-Nrf2 system. *EMBO Rep*, 2020, **21**(3): e48902
- [62] Tan C T, Chang H C, Zhou Q, *et al.* MOAP-1-mediated dissociation of p62/SQSTM1 bodies releases Keap1 and suppresses Nrf2 signaling. *EMBO Rep*, 2021, **22**(1): e50854
- [63] Sanchez-Martin P, Saito T, Komatsu M. p62/SQSTM1: 'Jack of all trades' in health and cancer. *FEBS J*, 2019, **286**(1): 8-23
- [64] Bucelli R C, Arhzaouy K, Pestronk A, *et al.* SQSTM1 splice site mutation in distal myopathy with rimmed vacuoles. *Neurology*, 2015, **85**(8): 665-674
- [65] Rea S L, Majcher V, Searle M S, *et al.* SQSTM1 mutations - bridging Paget disease of bone and ALS/FTLD. *Exp Cell Res*, 2014, **325**(1): 27-37
- [66] Ishimura R, Tanaka K, Komatsu M. Dissection of the role of p62/Sqstm1 in activation of Nrf2 during xenophagy. *FEBS Lett*, 2014, **588**(5): 822-828
- [67] Ichimura Y, Waguri S, Sou Y S, *et al.* Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol Cell*, 2013, **51**(5): 618-631
- [68] Goode A, Rea S, Sultana M, *et al.* ALS-FTLD associated mutations of SQSTM1 impact on Keap1-Nrf2 signalling. *Mol Cell Neurosci*, 2016, **76**: 52-58
- [69] Wright T, Rea S L, Goode A, *et al.* The S349T mutation of SQSTM1 links Keap1/Nrf2 signalling to Paget's disease of bone. *Bone*, 2013, **52**(2): 699-706
- [70] Bartolini D, Dallaglio K, Torquato P, *et al.* Nrf2-p62 autophagy pathway and its response to oxidative stress in hepatocellular carcinoma. *Transl Res*, 2018, **193**: 54-71
- [71] Liao W, Wang Z, Fu Z, *et al.* p62/SQSTM1 protects against cisplatin-induced oxidative stress in kidneys by mediating the cross talk between autophagy and the Keap1-Nrf2 signalling pathway. *Free Radic Res*, 2019, **53**(7): 800-814
- [72] Ho C J, Gorski S M. Molecular mechanisms underlying

- autophagy-mediated treatment resistance in cancer. *Cancers* (Basel), 2019, **11**(11): 1775
- [73] Panda M, Tripathi S K, Biswal B K. SOX9: an emerging driving factor from cancer progression to drug resistance. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, **1875**(2): 188517
- [74] Schmidlin C J, Zeng T, Liu P, *et al.* Chronic arsenic exposure enhances metastatic potential *via* NRF2-mediated upregulation of SOX9. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, **402**: 115138
- [75] Nabeshima T, Hamada S, Taguchi K, *et al.* Keap1 deletion accelerates mutant k-ras/p53-driven cholangiocarcinoma. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2020, **318**(3): G419-G427
- [76] Wang H Y, Lian P, Zheng P S. SOX9, a potential tumor suppressor in cervical cancer, transactivates p21WAF1/CIP1 and suppresses cervical tumor growth. *Oncotarget*, 2015, **6**(24): 20711-20722
- [77] Passeron T, Valencia J C, Namiki T, *et al.* Upregulation of SOX9 inhibits the growth of human and mouse melanomas and restores their sensitivity to retinoic acid. *J Clin Invest*, 2009, **119**(4): 954-963
- [78] Aleman A, Adrien L, Lopez-Serra L, *et al.* Identification of DNA hypermethylation of SOX9 in association with bladder cancer progression using CpG microarrays. *Br J Cancer*, 2008, **98**(2): 466-473
- [79] Nezu M, Suzuki N, Yamamoto M. Targeting the KEAP1-NRF2 system to prevent kidney disease progression. *Am J Nephrol*, 2017, **45**(6): 473-483
- [80] Ali F E M, Sayed A M, El-Bahrawy A H, *et al.* Targeting KEAP1/Nrf2, AKT, and PPAR-gamma signals as a potential protective mechanism of diosmin against gentamicin-induced nephrotoxicity. *Life Sci*, 2021, **275**: 119349
- [81] 刘冲, 彭御冰, 王忠. Keap1-Nrf2-ARE 信号通路在多器官疾病中的研究进展. *中国临床医学*, 2015, **22**(2): 239-243
Liu C, Peng Y B, Wang Z. *Chinese Journal of Clinical Medicine*, 2015, **22**(2): 239-243
- [82] Keleku-Lukwete N, Suzuki M, Yamamoto M. An overview of the advantages of KEAP1-NRF2 system activation during inflammatory disease treatment. *Antioxid Redox Signal*, 2018, **29**(17): 1746-1755
- [83] Onoki T, Izumi Y, Takahashi M, *et al.* Skeletal muscle-specific Keap1 disruption modulates fatty acid utilization and enhances exercise capacity in female mice. *Redox Biol*, 2021, **43**: 101966
- [84] 赵玉霞, 姚进. Nrf2/Keap1/ARE 信号通路与眼科疾病. *眼科新进展*, 2014, **34**(11): 1097-1100
Zhao Y X, Yao J. *Recent Advances in Ophthalmology*, 2014, **34**(11): 1097-1100
- [85] Kerr F, Sofola-Adesakin O, Ivanov D K, *et al.* Direct Keap1-Nrf2 disruption as a potential therapeutic target for Alzheimer's disease. *PLoS Genet*, 2017, **13**(3): e1006593
- [86] Deshmukh P, Unni S, Krishnappa G, *et al.* The Keap1-Nrf2 pathway: promising therapeutic target to counteract ROS-mediated damage in cancers and neurodegenerative diseases. *Biophys Rev*, 2017, **9**(1): 41-56
- [87] Liu F, Xia Y, Parker A S, *et al.* IKK biology. *Immunol Rev*, 2012, **246**(1): 239-253
- [88] Li J, Zhao C, Zhu Q, *et al.* Sweroside protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and pyroptosis partially *via* modulation of the Keap1/Nrf2 axis. *Front Cardiovasc Med*, 2021, **8**: 650368
- [89] Fabrizio F P, Sparaneo A, Trombetta D, *et al.* Epigenetic versus genetic deregulation of the KEAP1/NRF2 axis in solid tumors: focus on methylation and noncoding RNAs. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, **2018**: 2492063
- [90] Hast B E, Cloer E W, Goldfarb D, *et al.* Cancer-derived mutations in KEAP1 impair NRF2 degradation but not ubiquitination. *Cancer Res*, 2014, **74**(3): 808-817
- [91] Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*, 2012, **489**(7417): 519-525
- [92] Berger A H, Brooks A N, Wu X, *et al.* High-throughput phenotyping of lung cancer somatic mutations. *Cancer Cell*, 2016, **30**(2): 214-228
- [93] Bamford S, Dawson E, Forbes S, *et al.* The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer*, 2004, **91**(2): 355-358
- [94] Padmanabhan B, Tong K I, Ohta T, *et al.* Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol Cell*, 2006, **21**(5): 689-700
- [95] Lee D F, Kuo H P, Liu M, *et al.* KEAP1 E3 ligase-mediated downregulation of NF-kappa B signaling by targeting IKK beta. *Mol Cell*, 2009, **36**(1): 131-140
- [96] Singh A, Misra V, Thimmulappa R K, *et al.* Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med*, 2006, **3**(10): 1865-1876
- [97] Tate J G, Bamford S, Jubb H C, *et al.* COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res*, 2019, **47**(D1): D941-D947
- [98] Cleary S P, Jeck W R, Zhao X, *et al.* Identification of driver genes in hepatocellular carcinoma by exome sequencing. *Hepatology*, 2013, **58**(5): 1693-1702
- [99] Shibata T, Kokubu A, Gotoh M, *et al.* Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer. *Gastroenterology*, 2008, **135**(4): 1358-1368, 1368 e1351-1354
- [100] Wong T F, Yoshinaga K, Monma Y, *et al.* Association of keap1 and nrf2 genetic mutations and polymorphisms with endometrioid endometrial adenocarcinoma survival. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, **21**(8): 1428-1435
- [101] Konstantinopoulos P A, Spentzos D, Fountzilias E, *et al.* Keap1 mutations and Nrf2 pathway activation in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, 2011, **71**(15): 5081-5089
- [102] Zhang P, Singh A, Yegnasubramanian S, *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): 336-346
- [103] Miura S, Shibasaki M, Kasai S, *et al.* A somatic mutation of the

- KEAP1 gene in malignant melanoma is involved in aberrant NRF2 activation and an increase in intrinsic drug resistance. *J Invest Dermatol*, 2014, **134**(2): 553-556
- [104] 韩冰,孙悦,曹孟儒,等. Keap1在肿瘤中的"双刃剑"作用. *中国肿瘤*, 2019, **28**(7): 529-534
Han B, Sun Y, Cao M R, *et al.* *China Cancer*, 2019, **28**(7): 529-534
- [105] Krall E B, Wang B, Munoz D M, *et al.* Correction: KEAP1 loss modulates sensitivity to kinase targeted therapy in lung cancer. *Elife*, 2017, **6**: e33173
- [106] Ding X, Jian T, Wu Y, *et al.* Ellagic acid ameliorates oxidative stress and insulin resistance in high glucose-treated HepG2 cells via miR-223/keap1-Nrf2 pathway. *Biomed Pharmacother*, 2019, **110**: 85-94
- [107] Zhao X J, Yu H W, Yang Y Z, *et al.* Corrigendum to "Polydatin prevents fructose-induced liver inflammation and lipid deposition through increasing miR-200a to regulate Keap1/Nrf2 pathway" [*Redox Biol.* 18 (2018) 124-137]. *Redox Biol*, 2019, **22**: 101101
- [108] Akdemir B, Nakajima Y, Inazawa J, *et al.* miR-432 induces NRF2 stabilization by directly targeting KEAP1. *Mol Cancer Res*, 2017, **15**(11): 1570-1578
- [109] Liu Y, Tao S, Liao L, *et al.* TRIM25 promotes the cell survival and growth of hepatocellular carcinoma through targeting Keap1-Nrf2 pathway. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 348
- [110] Satoh T, Mckercher S R, Lipton S A. Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs. *Free Radic Biol Med*, 2013, **65**: 645-657
- [111] 熊款款,谭磊,王爱兵,等. Keap1-Nrf2/ARE信号通路抗氧化机制及抗氧化剂的研究进展. *动物医学进展*, 2021, **42**(4): 89-94
Xiong K K, Tan L, Wang A B, *et al.* *Progress in Veterinary Medicine*, 2021, **42**(4): 89-94
- [112] Chen P H, Smith T J, Wu J, *et al.* Glycosylation of KEAP1 links nutrient sensing to redox stress signaling. *EMBO J*, 2017, **36**(15): 2233-2250
- [113] Xu T H, Du Y, Sheng Z, *et al.* OGT-mediated KEAP1 glycosylation accelerates NRF2 degradation leading to high phosphate-induced vascular calcification in chronic kidney disease. *Front Physiol*, 2020, **11**: 1092
- [114] Luo Y, Eggler A L, Liu D, *et al.* Sites of alkylation of human Keap1 by natural chemoprevention agents. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2007, **18**(12): 2226-2232
- [115] Ohnuma T, Nakayama S, Anan E, *et al.* Activation of the Nrf2/ARE pathway via S-alkylation of cysteine 151 in the chemopreventive agent-sensor Keap1 protein by falcariindiol, a conjugated diacetylene compound. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, **244**(1): 27-36
- [116] Liu G, Eggler A L, Dietz B M, *et al.* Screening method for the discovery of potential cancer chemoprevention agents based on mass spectrometric detection of alkylated Keap1. *Anal Chem*, 2005, **77**(19): 6407-6414
- [117] Mills E L, Ryan D G, Prag H A, *et al.* Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. *Nature*, 2018, **556**(7699): 113-117

Research Progress of E3 Ubiquitin Ligase Adaptor Protein Keap1*

NI Xiao-Qi^{1,2)**}, CHEN Xi-Wei^{1,2)**}, JIN Xiao-Feng^{1,2)***}

¹⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, China;

²⁾Zhejiang Provincial Key Laboratory of Pathophysiology, Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract Kelch-like ECH associated protein 1(Keap1), a typical substrate-recognition subunit of the Cul-RING E3 ligase, plays a significant role in ubiquitination. Ubiquitination, an important post-translational modification, enables a degradation signal in both autophagy and ubiquitin-proteasome system. Recently, several substrates can be recognized and binded by wild-type Keap1, and subsequently degraded by ubiquitin proteasome system (UPS) via Keap1-Cul3-Rbx1 complex. Additionally, Keap1 has also been widely studied as a tumor suppressor protein, and mutation or abnormally deletion of *Keap1* alleles contributes to different kinds of diseases. The study of Keap1 has mainly concentrated on the Keap1-Nrf2 axis, but rarely extends to downstream substrates. Given that the great importance of Keap1 in cells, this review summarizes the current research status of Keap1, including ubiquitin-proteasome system, Keap1's structure and function, the mutation of *Keap1*, the substrates of Keap1, and Keap1-related diseases. It may provide a new thought for targeted therapy of Keap1-associated diseases through discussing the challenges of Keap1-related fields in clinic.

Key words ubiquitination, degradation, Keap1, Nrf2, mutation

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0017

* This work was supported by grants from the Core Courses of Medical School of Ningbo University, the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY20C070001), Zhejiang Key Laboratory of Pathophysiology and Medical School of Ningbo University Joint Fund (201901), the Program of "Xinmiao" (Potential) Talents in Zhejiang Province (2021R405043), the Student Research and Innovation Program of Ningbo University (2021SRIP1901, 2021SRIP1904), The National Natural Science Foundation of China (31801165) and the K. C. Wong Magna Fund in Ningbo University.

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-574-87609951, E-mail: jinxiaofeng@nbu.edu.cn

Received: January 18, 2021 Accepted: June 23, 2021