

核转录因子 Nrf2 与肺纤维化相关研究进展

刘学^{1,2}, 刘骅漫³, 张伟³

(1. 山东中医药大学, 山东 济南, 250014;

2. 山东省胸科医院, 山东 济南, 250013;

3. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南, 250011)

[关键词] Nrf2; 肺纤维化; 综述; 学术性

[中图分类号] R259.63 [文献标识码] A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.04.072

机体在氧化与抗氧化失衡的过程中产生大量活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS), 本身 ROS 容易与蛋白质、核酸、脂质等大分子物质发生氧化反应造成细胞生物膜损伤及胞内氧化磷酸化障碍, 此时, 机体会启动相应的抗氧化蛋白, 比如 SOD、GSH 等, 以减轻氧化应激反应对细胞的损伤。研究证实, Nrf2-Keap1-ARE 信号通路是目前机体最主要的内源性抗氧化信号通路^[1], 核因子 NF-E2 相关因子(Nrf2)是细胞氧化应激通路中最重要转录因子, 通过与抗氧化物反应元件(Antioxidant Response Elements, ARE)相互作用, 能够上调机体内多种抗氧化蛋白及Ⅱ相解毒酶的表达水平, 清除体内氧化应激产生的自由基, 从而维持细胞的氧化还原状态, 相反, Nrf2 缺失或激活障碍则会导致抗氧化酶减少, 加重细胞的氧化应激的负效应, 诱导某些氧化应激性纤维化疾病发病。

氧化应激是肺纤维化发生发展的重要病理机制已被证实, 但尚无确切可推广的临床有效药物, 面对目前的治疗“瓶颈”, 提高机体对氧化应激的耐受能力或可成为解决临床肺纤维化治疗局限性的突破口。西医治疗主要是联用或单用糖皮质激素、免疫抑制及细胞毒等药物, 大样本资料显示仅有不到 1/3 的患者病情能够得到改善, 且由于需要长期应用以上药物, 最终可伴随出现严重的不良反应。现就 Nrf2-Keap1-ARE 信号通路及与肺纤维化研究进展做如下综述。

1 Nrf2-Keap1-ARE 信号通路的分子基础

Nrf2-Keap1-ARE 信号通路主要是通过以下途径发挥信号转导作用, 首先是细胞内活化的 Nrf2 与 Keap1 解离, 解离后的 Nrf2 进入细胞核, 在胞核内与小 Maf 蛋白结合形成异二聚体, 遂即与细胞核内的抗氧化反应元件 ARE 序列结合, 进而启动Ⅱ相解毒酶和抗氧化酶基因的转录表达。参与该途径的酶类主要包括: 血红素氧合酶(HO-1)、CAT、GSTs、SOD、NAD(P)H 醌氧化还原酶(NQO1)等, 均在抗氧化

损伤中发挥至关重要的作用。

1.1 Nrf2 Nrf2 是属于转录因子 CNC (cap'n'collar) 家族中活力最强的转录调节因子^[2], 在机体容易发生氧化应激的多种细胞广泛表达, 比如持续暴露于外界环境的皮肤、肺脏、消化道等脏器的组织细胞, 以及具有代谢和解毒功能的肝脏、肾脏等脏器的组织细胞。Nrf2 是分子量为 66 ku 的一种蛋白, 含有一个碱性亮氨酸拉链(b-ZIP)结构, 其中包含 7 个结构域 Neh (Nrf2-ECH homology), 依次被命名为 Neh1-Neh7。各结构域功能如下: (1)Neh1 位于 Nrf2 的 C 端, 其结构域 b-ZIP 与转录因子形成异二聚体, 在细胞核内, Nrf2 识别后与 ARE 进行结合, 启动靶基因的转录。另外, 该结构域与泛素连接酶 UbcM2 作用可调控 Nrf2 的胞核转位和降解^[3]。(2)Neh2 结构域是调节 Nrf2 活性的主要功能域。以及 DLG 基序、ETGE 基序两个结合位点, 其中, Neh2 区含有与 Keap1 双甘氨酸序列的结合区, 促进 Nrf2 泛素化降解, 维持 Nrf2 的表达量在一个较低水平^[4]。(3)Neh3 结构域位于羧基端, 具有高度保守性, 主要功能是维持 Nrf2 的转录活性。通过招募共激动剂染色质解螺旋酶 DNA 结合蛋白 6 (Chromodomain Helicase DNA binding protein 6, CHD6), 上调 Nrf2 目标基因表达水平活化转录。(4)Neh4、Neh5 结构域在下游基因的启动转录中起重要作用, 与 Keap1 解离的 Nrf2 进入细胞核与 ARE 结合后并不能立即启动下游目标基因的转录, 只有通过 Neh4、Neh5 结构域与其他辅助蛋白如 CREB 结合蛋白等转录激活剂结合, 才能启动转录功能。(5)Neh6 结构域富含大量丝氨酸残基, 与非依赖性负性调节 Nrf2 氧化还原有关^[5], 其具体功能目前尚不明确。(6)Neh7 结构域研究较少, 与视黄酸 X 受体 α 结合可抑制 Nrf2 基因转录^[6]。

1.2 Keap1 Keap1 为 Kelch 家族多区域阻遏蛋白, 分子量为 69kDa, 主要功能是对 Nrf2 信号通路起负性调节作用。生理状态下, Keap1 在胞浆中与 Nrf2 结合, 使 Nrf2 不能发生跨

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81273704); “泰山学者”建设工程项目(编号: ts20110819)

第一作者: 刘学, 男, 2016 级博士研究生, 研究方向: 呼吸系统疾病的中西医诊疗

通讯作者: 张伟, 男, 医学博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 呼吸系统疾病的中西医诊疗, E-mail: hux-

izhijia@126.com

核膜转运,抑制 Nrf2 活力。另外,Keap1 还能够降解 Nrf2 的 E3 泛素连接酶,维持 Nrf2 地表达量。Keap1 蛋白一级结构有 5 个结构域,N 末端序列(NTR)、C 末端序列(C-terminal Region,CTR)、BTB 区、IVR 区、DGR 区,其中 BTB 区及 IVR 区是调节 Keap1 蛋白功能的主要结构域。BTB 区(Broad Complex,Tramtrack,Bric-a-brac)与细胞骨架的肌动蛋白结合,主要功能是 Keap1-Nrf2 解离、阻止 II 相解毒酶抗氧化基因转录有关;IVR 区(Intervening Region)富含半胱氨酸,容易参与氧化还原反应,同时还参与泛素化连接酶形成,与 Nrf2 稳定性有关;DGR 区(Double Glycine Riched Region):该区的 6 个双链甘氨酸重复序列形成经典 6 片 p 螺旋,该结构上含有多个与特定蛋白结合的位点,比如有 Keap1 与胞浆肌动蛋白结合的位点、Keap1 与 Neh2 区的结合位点等,能够影响 Nrf2 及信号通路转导活性。

1.3 ARE ARE 是细胞核内一个特异的 DNA-启动子结合序列,它在生物体内广泛分布,是体内重要的保护性顺式应答元件。ARE 位于 II 相解毒酶和抗氧化酶基因的 5' 端启动序列(5'-GAGTCACAGTGAGTGGCAAAATT-3'),氧化剂或亲电性化合物激活 Nrf2,Nrf2 与抗氧化酶基因的 5' 端的 ARE 结合,导致下游 II 相解毒酶和抗氧化酶、抗炎症因子等多种蛋白酶表达,提高细胞的抗氧化和抗炎能力,维持细胞内环境稳态^[7]。

2 Nrf2-Keap1-ARE 信号通路的激活

生理状态下,细胞内环境的氧化-还原态维持相对稳定状态,Nrf2 与伴侣蛋白分子 Keap1 结合,且通过泛素蛋白酶途径持续降解,保持动态平衡状态,Nrf2 主要存在于细胞质,与 Keap1 结合,处于非活性状态。当细胞被亲电子物质或氧化剂等攻击处于氧化应激状态时,Nrf2 与 Keap1 解偶联后激活并发生跨膜转运入核,启动 Nrf2-Keap1-ARE 信号通路下游抗氧化酶蛋白表达,发挥抗氧化的作用。因此,Nrf2-Keap1-ARE 信号通路的激活离不开 Nrf2 与 Keap1 解偶联以及 Nrf2 的跨膜转运。

2.1 Nrf2 的激活机制 Nrf2 的激活受多种机制调控,主要涉及 Nrf2 与 Keap1 的解偶联以及依赖于介导 Nrf2 稳定性的机制。

2.1.1 Nrf2 与 Keap1 解偶联机制 Nrf2 的活性受 Keap1 蛋白调控,同源二聚体 Keap1 的两个 DGR 分别与 Nrf2 的 Neh2 结构域的 DLG 序列和 ETGE 序列结合将 Nrf2 限制在细胞质内,另外,Keap1 还能调控 Nrf2 泛素化及蛋白酶不断降解 Nrf2^[8],因此,非应激状态时,Nrf2 主要存在于在细胞质中处于非游离及不断降解的非活性状态^[2]。关于 Nrf2 与 Keap1 解离机制,主要可分为 2 种:(1)氧化应激时 Keap1 构象改变导致 Nrf2 与 Keap1 解离而活化 Nrf2。亲电子物质或氧化剂直接作用于 Keap1 的两个半胱氨酸位点 C273 和 C288,导致 Keap1 发生构象改变,二聚体 Keap1 的一个 DGR 与 Nrf2 结构域的 DLG 序列结合断开,导致 Keap1 与 Nrf2 解

偶联,进入细胞核与小 Maf 蛋白结合形成异二聚体,与抗氧化反应元件 ARE 序列识别并进行结合,进而启动受 ARE 调控的 II 相解毒酶和抗氧化酶基因的转录。同时,如果 Nrf2-Keap1-Cul3 复合物构型发生改变,不利于 Nrf2 泛素化和降解^[9]。(2)某些蛋白激酶通路导致 Nrf2 的直接磷酸化促使 Nrf2 与 Keap1 分离而活化 Nrf2^[340]。多种蛋白激酶比如蛋白激酶 C(Protein Kinase C,PKC)、丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen Activated Protein Kinases,MAPKs)和胰腺内质网激酶(PERK)等途径也可诱导 Nrf2 直接磷酸化,干扰细胞质内 Nrf2-Keap1 的相互作用,激活 Nrf2/ARE 信号通路,特异性激酶抑制剂可以阻滞磷酸化激活 Nrf2,但是具体机制尚未完全明确^[10]。研究发现,Nrf2 的 Ser40 是 PKC 磷酸化作用位点^[11],用谷氨酸替代 Nrf2 的 Ser40 位点可导致 Nrf2 磷酸化,使 Nrf2 在细胞核的表达增多。内质网非折叠蛋白的蓄积通过内质网定位的胰腺内质网激酶 PERK 直接磷酸化 Nrf2 来激活 Nrf2^[5]。当细胞内环境的氧化还原态恢复后,Nrf2 与 ARE 解离,由胞核返回胞浆,通过泛素化及蛋白降解,或负反馈调节,关闭 Nrf2 信号通路,维持低水平 Nrf2 表达。

2.1.2 Nrf2 稳定性机制 Nrf2 稳定性与蛋白磷酸化有关。正常情况下,Keap1 调控 Nrf2 泛素化及蛋白酶不断降解 Nrf2,Nrf2 主要存在细胞质中处于低浓度非活性状态。氧化应激时 Nrf2 的稳定性增强、表达量增加,当 Nrf2 发生磷酸化时,能减弱蛋白酶对 Nrf2 的识别,降低对 Nrf2 的泛素化和降解。研究发现,蛋白酶抑制剂对 Nrf2 作用敏感,能够降低对 Nrf2 的降解,增加其在细胞核的蓄积。蛋白酶体抑制剂作用于 HepG2 细胞后,通过免疫荧光法检测发现细胞核内 Nrf2 蛋白表达明显增加,同时 Nrf2 下游抗氧化基因 γ -GCLmRNA 增加^[12]。有关研究发现,Nrf2 本身也可能含有氧化应激感受器,但目前无有力证据支持^[13]。

2.1.3 竞争性抑制 Nrf2 在细胞质中,前胸腺素、ALZ50 活化克隆蛋白、FAC1 蛋白等活性蛋白,均可与 Nrf2 竞争性结合 Keap1 而影响其活化程度。Karapetian 等^[14]发现,前胸腺素 α 与 Keap1 直接特异性结合能力很强,远远超过与 Nrf2 结合的能力,导致 Nrf2 与 Keap1 分离而活化,通过质粒过表达及 RNA 沉默干涉技术实验发现,胞质内 Nrf2 进入细胞核的数量与前胸腺素 α 含量具有相关性;在细胞核里,Bach1 具有跟 Nrf2 相同的 CNC 结构,可以竞争 Nrf2 与 ARE 在细胞核的结合位点,Beach1 通过抑制 Nrf2 下调 ARE 下游基因表达。

2.2 Nrf2 跨核膜转运机制 氧化应激状态时,Keap1 构象改变,Nrf2 发生磷酸化,致使两者解离,Nrf2 由胞质向胞核转运,细胞核内 Nrf2 明显增多,Nrf2 跨核膜转运主要取决于 NLS 和 NES 之间的平衡。NLS 是一种氨基酸序列,存在于细胞的许多蛋白质中并可介导蛋白质由细胞质向细胞核转运,其中核转运蛋白 importin Karyopherin 和 importing 以及能量供应体 RanGTP 在 Nrf2 入核转运过程中发挥了重要的作

用。NESTA 结构主要由氧化物的类型决定,NESTA 结构的失活可促使 Nrf2 的核转移。研究发现,MAPK、ERK、JNK、P38 信号通路的蛋白激酶可相互作用交叉调控增加 Nrf2 的核转位,Nrf2 在 JAK 的催化下通过 Tyr 残基磷酸化胞浆到胞核的转位。

2.3 Nrf2-Keap1-ARE 信号通路调节的下游抗氧化蛋白基因 Nrf2-Keap1-ARE 信号通路的重要性主要体现在该通路被激活后,通过一系列的逐级反应,调控下游多种保护性基因的转录表达以发挥强大的抗氧化保护作用,Nrf2/ARE 信号通路调控抗氧化蛋白主要包括 II 相解毒酶、抗氧化蛋白类等,有增强组织抗氧化能力、抗炎、抗动脉硬化、抗凋亡、抗肿瘤、神经保护等作用^[15]。其中,抗氧化蛋白可以用来维持体内氧化还原平衡状态,其作用主要是通过催化自由基转化和增加自由基排除来体现。

2.3.1 血红素氧合酶 1 血红素氧合酶 1(HO-1)是血红素降解限速酶,在体内能够催化血红素生成胆红素、一氧化碳和铁离子。HO-1 不仅可以阻止游离血红素参与氧化反应,而且机体的抗氧化、抗炎、抗凋亡、改善微循环等作用直接与 HO-1 及其酶解产物密切相关,是机体最重要的内源性保护体系之一^[8]。实验研究发现,鹅掌菜酚通过增加 Nrf2 蛋白表达及核转位,减轻仓鼠肺成纤维细胞的氧化损伤,伴随可见 HO-1 表达增强,而应用 Nrf2siRNA 之后,HO-1 表达明显下降。通过对比观察野生型与 Nrf2-/-SD 大鼠肝脏缺血再灌注实验,发现当先予肝脏缺血 60min 处理后再予灌注,野生型大鼠比 Nrf2-/-大鼠出现明显的组织保护作用。野生型大鼠肝脏保护细胞被激活,Nrf2 由细胞质向细胞核转移增加,肝组织中 Nrf2、HO-1 蛋白及 mRNA 表达水平明显提高,而 Nrf2-/-大鼠则没有出现以上保护作用。以上结果提示 HO-1 的表达受 Nrf2 调控。

2.3.2 GSH GSH 作为体内重要的抗氧化蛋白类,可与自由基结合将其排出体外,减轻氧化应激对细胞蛋白质、脂质、DNA 损伤。细胞内 GSH 表达主要由谷胱甘肽合成酶、谷胱甘肽还原酶、谷氨酸半胱氨酸连接酶以及部分谷胱甘肽 S 转移酶调节,这些调节酶均受 Nrf2 的转录调节。Li 等^[16]研究发现,NRK-52E 细胞转染 Nrf2 质粒后,再予细胞以氧化损伤后,NRK-52E 细胞内 GSH 表达明显高于对照组,细胞存活率升高,相反,应用基因沉默技术敲除 Nrf2 后,NRK-52E 细胞 GSH 表达明显低于对照组,细胞存活率下降。Lu 等^[17]研究发现,将 Nrf2+/+小鼠喂食吡唑后,肝脏谷胱甘肽 S 转移酶(GST)蛋白表达明显上调,而 Nrf2-/-小鼠改变不明显,明显可见肝脏的氧化应激损伤。

2.3.3 SOD SOD 是人体最重要的抗氧化酶,其中铜锌 SOD 主要存在细胞质中,锰 SOD 主要在线粒体中。Rubio 研究发

现,免疫荧光发现治疗组的细胞质和细胞核中均有 Nrf2,对照组 Nrf2 只存在于细胞浆^[18]。

2.3.4 醌氧化还原酶 1 醌奉旨还原酶 1(NQO1)属于 II 相解毒酶中的一种,以 NAD(P)H 为受体,催化醌类及其衍生物发生双电子还原反应,调节细胞内物质维持氧化还原稳态,其催化过程中自由基等氧化产物的形成,对各类代谢原因引起的氧化应激损伤均具有保护作用。通过染色体免疫沉淀分析法发现,在细胞核内,Nrf2 与 NQO1 基因的 ARE 序列相结合并激活 NQO1 目标蛋白的表达。研究发现,冠状动脉内皮细胞用高糖培养后胞内 Nrf2 转录水平明显提高,并上调 NQO1 表达水平,而对于 Nrf2 基因敲除或者 Keap1 过表达的细胞则无明显改变。研究发现,给予 1% tBHQ(w/w)喂养小鼠 4 周后,在减轻小鼠大脑缺血再灌注引起的脑皮质损伤同时,还可增强小鼠皮质的 NQO1 蛋白的表达,相反,在 Nrf2-/-小鼠中变化不显著^[19]。

3 Nrf2 诱导剂

研究发现,Nrf2 在氧化应激中有重要的保护作用,被视为一种好蛋白,保护人类调整氧化/抗氧化失衡,在许多疾病发病中扮演重要角色,如慢性阻塞性肺疾病、肺纤维化、糖尿病、中枢神经系统疾病、肿瘤等。因此,探索 Nrf2 为研究靶点的药物在疾病的治疗作用成为研究热点,可以诱导 Nrf2 依赖的抗氧化应答,保护细胞抵御外来毒物,可指导临床用药及新药研发。

3.1 植物来源 Nrf2 诱导剂 许多天然植物具有较强的抗氧化作用,其中抗氧化作用比较强的成分有莱菔硫烷、姜黄素、白藜芦醇、咖啡酸苯乙酯、番茄红素等等。姜黄素、咖啡酸苯乙酯等主要通过促进 Keap1-Nrf2 解离活化 Nrf2 发挥抗氧化作用^[20]。白藜芦醇、表儿茶素酸酯、槲皮素等主要通过酚羟基清除自由基起到抗氧化作用^[21]。莱菔硫烷抗氧化作用机制主要是通过激活 Nrf2 信号通路诱导 II 相解毒酶表达。

3.2 化学合成 Nrf2 诱导剂 某些化学合成的药品,如富马酸二甲酯、PMX-290、甲基巴多索隆也是 Nrf2 强诱导剂^[22]。研究发现,甲基巴多索隆可以诱导 Nrf2/AER 信号通路 Nrf2 核易位,促进 II 相解毒酶表达,抑制 NF-KB 活性等发挥抗氧化作用,曾用于治疗糖尿病肾病 III 期临床实验,但因肾功能毒副作用而终止。Wong 等^[23]研究发现,化合物 PXM-290 通过加强 Keap1 和 Clu3 结合抑制 Nrf2 泛素化,增加 Nrf2 表达量及转录活性。富马酸二甲酯(BG-12)可以治疗多发性硬化症,其作用机制主要是抑制 NF-kB 活性、促进活化的 T 淋巴细胞凋亡、增加细胞因子 IL-4、IL-5 的释放,激动 Nrf2 以增加 NQO1、HO-1 以及谷胱甘肽的表达水平等。

4 Nrf2/ARE 信号通路调控肺纤维化的作用机制

4.1 抗应激 Morito 等^[24]认为 Nrf2/ARE 信号通路对肺纤维化的保护机制主要是提高细胞内 ARE 敏感的抗氧化酶表

达水平,观察发现 IPF 患者增生的肺泡上皮细胞中红系衍生核因子 2 相关因子 2(Nrf2)的显著增加,Nrf2 能够与 ARE 结合,启动 ARE 调控的抗氧化酶基因表达,如血红素加氧酶-1(HO-1)。Petrache 等^[25]观察发现,在原发性肺纤维化患者中,Nrf2 主要在 II 型肺泡细胞表达,其表达量是正常肺组织的 5 倍,随着病程进展,抗氧化酶表达持续升高,在第 16 天表达最高,说明两者具有相关性,并且研究发现其对实验性肺纤维化的保护作用显著。通过体内动物及细胞实验研究,证实 Nrf2/ARE 信号通路通过上调下游 HO-1、NQO1 等抗氧化物的表达,调节体内氧化应激水平,减少细胞外基质(如胶原)的合成,抑制成纤维细胞转分化为肌成纤维细胞,下调 α -SMA 的表达,降低肺纤维化大鼠的死亡率,最终起到抗肺纤维化的作用。相关研究证实,Nrf2 的缺乏使抗氧化酶的水平下降,导致小鼠模型对多种肺病易感^[26]。Kikuchi 等^[27]认为,在博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型中,肺组织纤维化病理评分及氧化应激指标 8-ohdG 明显升高,Nrf2 通过调节 Th1/Th2 平衡向 Th2 偏移,降低小鼠体内氧化应激水平,从而抑制肺纤维化的发生。这也就进一步证实了 Nrf2/ARE 通路的对肺纤维化确实有保护作用。

4.2 抗凋亡 研究发现,肺纤维化始于肺泡,肺泡上皮细胞的凋亡在肺纤维化发生发展中发挥重要作用^[28]。Nrf2 调节细胞凋亡主要通过两种途径:其一,Nrf2 过表达直接调节 Fas 途径诱导细胞凋亡的敏感性^[29]。其二,Nrf2 过表达提高 GSH 水平间接调节细胞对凋亡信号的敏感性。相关实验证实,缺少 Nrf2 可以使肺泡上皮细胞增殖不良,并且对氧化剂诱导的细胞凋亡更敏感,补充谷胱甘肽(GSH)可对抗 Nrf2 缺乏造成的病理改变,并且可抑制 Nrf2 缺乏所导致的炎症因子表达^[30]。研究发现,博来霉素诱导的肺纤维化大鼠中 HO-1 的过表达,可减轻肺内 ECM 的沉积,降低肺泡上皮细胞的凋亡,减缓肺纤维化的发展。另外,HO-1 本身的过表达及其代谢产物一氧化碳均可阻止 TNF- α 介导的肺成纤维细胞的凋亡过程,一氧化碳靶酶可去除 HO-1 对肺组织细胞凋亡的抑制作用。

4.3 抗感染 对肺微血管内皮细胞应用 siRNA 技术干预 Nrf2 的表达后,再予过氧化氢处理可出现明显的炎症损伤及氧化应激反应,其损伤幅度与 Nrf2 被抑制程度相关,证明在细胞的氧化损伤和炎症损伤中 Nrf2 发挥重要的保护作用^[31]。15-脱氧-(12,14)-前列腺素 J(2)[15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2)15d-PG J2]与 Keap1 相互作用可激活 Nrf2 的表达,属于 Nrf2 的内源性诱导剂。Nrf2 基因敲除小鼠表现出较野生型小鼠更明显的急性肺损伤,15d-PGJ2 通过激活 Nrf2 途径避免急性肺损伤。Cho 等^[32]研究发现,博来霉素导致 Nrf2-/- 小鼠的肺间质水肿及胶原蛋白沉积及肺组织纤维细胞增殖明显,肺泡灌洗液中可见大量炎症因子,提示靶向敲除 Nrf2 可极大提高小鼠对博来霉素诱导的肺组织炎症和纤维化的易感性。

5 中药或中药单体基于 Nrf2/ARE 信号通路调节氧化/抗氧化失衡治疗肺纤维化

目前国内外基于 Nrf2/ARE 信号通路包括该通路下游的单一靶点转化因子或核蛋白调控氧化/抗氧化失衡作为肺纤维化发病机理探讨药物治疗效果的文章较多,如刘理静等^[33]观察大黄素对肺纤维化大鼠的保护作用及部分机制研究,测定肺组织测定肺组织羟脯氨酸(HYP)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)含量,采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素(IL)-6、IL-7 浓度,通过 Western blot 分析肺组织中 Kelch 样 ECH 联合蛋白(Keap1)、NF-E2 相关因子 2(Nrf2)、核因子-kB(NF-kB)p65 表达,结果证明大黄素可能通过增强抗氧化能力及抑制炎症反应对肺纤维化大鼠产生保护作用,启示大黄素能够激活 Nrf2 从而发挥抗脂质过氧化损伤作用,通过阻碍 NF-kB 核转位抑制肺纤维化大鼠促炎因子的分泌。罗庆凯等^[34]观察苦参碱对博来霉素诱导肺纤维化大鼠中 Nrf2 表达的影响,采用免疫组化法(SP)分析每组不同时间点肺组织中 Nrf2 蛋白水平,RT-PCR 检测大鼠肺组织中 Nrf2 mRNA 的表达,结果证明 Nrf2 通过抑制早期的氧化应激反应,对博来霉素导致的大鼠肺间质纤维化表现出一定防治作用,苦参碱通过早期上调 Nrf2 表达调节氧化应激抑制大鼠模型的肺纤维化进展。申永春等^[35]探讨槲皮素对香烟暴露大鼠肺组织氧化应激和 Nrf2 表达的影响,采用 HE 染色观察肺部形态学变化,匀浆肺组织检测谷胱甘肽和丙二醛的变化,western blot 法检测 Nrf2 的表达,结果显示槲皮素能降低香烟暴露导致大鼠肺组织的高氧化应激状态,下调熏烟诱导的 Nrf2 高表达。孙万良等^[36]研究 EGCG 对大鼠放射性肺损伤的防治效果及作用机制,发现 EGCG 可显著降低肺组织纤维化评分;显著降低血清 MDA 水平,增强血清 T-SOD 活力,上调胞内 Nrf-2、NQO-1、HO-1 的表达,结果提示 EGCG 通过激活 Nrf2/ARE 信号通路增加下游抗氧化酶表达以提高机体抗氧化能力,可明显减轻放射性肺损伤及改善纤维化病变。

参考文献

- [1] Yu X, Kensler T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention [J]. *Mutat Res*, 2005, 591(1-2): 93-102.
- [2] Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M. Toward clinical application of the Keap1 - Nrf2 pathway [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2013(34): 340-346.
- [3] Plafker KS, Nguyen L, Barneche M, et al. The ubiquitin-conjugating enzyme UbcM2 can Regulate the stability and activity of the antioxidant transcription factor Nrf2 [J]. *J Biol Chem*, 2010(285): 23064-23074.
- [4] Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, et al. The Keap1 - Nrf2 pathway: mechanisms of activation and dysregulation in cancer [J]. *Redox Biol*, 2013(1): 45-49.

- [5] Cullinan SB, Zhang D, Hannink M, et al. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK - dependent cell survival[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(20): 7198 - 7209.
- [6] Wang H, Liu K, Geng M, et al. RXR α inhibits the NRF2 - ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2[J]. *Cancer Res*, 2013(73): 3097 - 3108.
- [7] Lee JM, Calkins MJ, Chan K, et al. Identification of the NF - E2 - related factor - 2 - dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis[J]. *J Biol Chem*, 2003(278): 12029 - 12038.
- [8] Agarwal A, Nick HS. Renal response to tissue injury: Lessons from heme Oxygenase - 1 Gene Ablation and expression[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(5): 965 - 973.
- [9] Maher J, Yamamoto M. The rise of antioxidant signaling - the evolution and hormetic actions of Nrf2[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010(244): 4 - 15.
- [10] Mann GE, Bonacasa B, Ishii T, et al. Targeting the redox sensitive Nrf2 - Keap1 defense pathway in cardiovascular disease: protection afforded by dietary isoflavones[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2009(9): 139 - 145.
- [11] Jain AK, Jaisw AK. GSK 3 - β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF - E2 related factor 2[J]. *J Bio Chem*, 2007, 282(22): 16502 - 16510.
- [12] Sekhar KR, Soltaninassab SR, Borrelli MJ, et al. Inhibition of the 26S proteasome induces expression of GLCLC the catalytic subunit for gamma glutamylcysteine synthetase[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 270(1): 311 - 317.
- [13] Baird L, Dinkova - Kostova AT. The cytoprotective role of the Keap1 Nrf2 pathway[J]. *Arch Toxicol*, 2011, 85(4): 241 - 272.
- [14] Karapetian RN, Evstafieva AG, Abaeva IS, et al. Nuclear oncoprotein prothymosin alpha is a partner of Keap1: implications for expression of oxidative stress - protecting genes[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(3): 1089 - 1099.
- [15] Kim SK, Yang JW, Kim MR, et al. Increased expression of Nrf2 - ARE - dependent anti - oxidant proteins in tamoxifen resistant breast cancer cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45(4): 537 - 546.
- [16] Li J, Jin J, Li M, et al. Role of Nrf2 in protection against triptolide induced toxicity in rat kidney cells[J]. *Toxicol Lett*, 2012, 213(2): 194 - 202.
- [17] Lu Y, Gong P, Cederbaum AI. Pyrazole induced oxidative liver injury independent of CYP2E1/2A5 induction due to Nrf2 deficiency[J]. *Toxicology*, 2008, 252(1 - 3): 9 - 16.
- [18] Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: Activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 591(123): 66 - 72.
- [19] Shih AY, Li P, Murphy TH. A Small - Molecule - Inducible Nrf2 - Mediated Antioxidant Response Provides Effective Prophylaxis against Cerebral Ischemia In Vivo[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2005, 25(44): 10321 - 10335.
- [20] Ramya P, Krishnaswamy R, Padma VV. Quercetin modulates OTA induced oxidative stress and redox signaling in HepG2 cells - up regulation of Nrf2 expression and down regulation of NF - κ B and COX - 2[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014(1840): 681 - 692.
- [21] 谢建林, 林明宝, 侯琦. 核转录因子 Nrf2 与肺部炎症疾病研究进展[J]. *药理学报*, 2015, 50(9): 1080 - 1087.
- [22] Chen CY, Jang JH, Li MH, et al. Resveratrol upregulates heme oxygenase - 1 expression via activation of NF - E2 - related factor 2 in PC12 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005(331): 993 - 1000.
- [23] Wong DP, Wells G, Hagen T. Heteroaromatic 4 - arylquinols are novel inducers of nuclear factor - erythroid 2 - related factor 2 (Nrf2)[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010(643): 188 - 194.
- [24] Morito N, Yoh K, Itoh K, et al. Nrf2 regulates the sensitivity of death receptor signals by affecting intracellular glutathione levels[J]. *Oncogen*, 2003, 22(58): 9275 - 9281.
- [25] Petrache I, Otterbein LE, Alam J, et al. Heme oxygenase - 1 inhibits TNF - α induced apoptosis in cultured fibroblasts[J]. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2000, 278(2): L312.
- [26] Rangasamy T, Guo J, Mitzner WA, et al. Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice[J]. *J Exp Med*, 2005, 202(1): 47 - 59.
- [27] Kikuchi N, Ishii Y, Morishima Y, et al. Nrf2 protects against pulmonary fibrosis by regulating the lung oxidant level and Th1/Th2 balance[J]. *Respiratory Research*, 2010, 11(1): 31.
- [28] Barbas Filho JV, Ferreira MA, Sesso A, et al. Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)/usual interstitial pneumonia (UIP)[J]. *J Clin Pathol*, 2001(54): 132 - 138.
- [29] Morito N, Yoh K, Itoh K, et al. Nrf2 regulates the sensitivity of death receptor signals by affecting intracellular glutathione levels[J]. *Oncogen*, 2003, 22(58): 9275 - 9281.
- [30] Marzec JM, Christie JD, Reddy SP, et al. Functional polymorphisms in the transcription factor NRF - 2 in humans increase the risk of acute lung injury[J]. *FASEB J*, 2007, 21(9): 2237 - 2246.
- [31] 宓交琳. Nrf2 在大鼠肢体爆炸后短暂低温肺保护中的作用及机制[D]. 重庆: 第三军医大学, 2008.
- [32] Cho HY, Reddy SPM, Yamamoto M, et al. The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis[J]. *The FASEB journal*, 2004, 18(11): 1258.
- [33] 刘理静, 钱江, 张平. 大黄素对肺纤维化大鼠的保护作用及部分机制研究[J]. *中药药理学通报*, 2015, 31(2): 266 - 268.
- [34] 罗庆凯, 何振华, 张秀峰, 等. 苦参碱对博来霉素诱导的肺纤维化大鼠中 Nrf2 表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2012, 22(13): 16 - 18.
- [35] 申永春, 杨婷, 文富强, 等. 槲皮素对香烟暴露大鼠肺组织氧化应激和 Nrf2 表达的影响[J]. *西部医学*, 2011, 11(6): 12 - 16.
- [36] 孙万良, 魏丽, 张晶, 等. EGCG 对大鼠放射性肺损伤的防治作用及机制探索[J]. *生物技术通讯*, 2013, 24(4): 504 - 509.