

# Nrf2/ARE 信号通路在动脉粥样硬化中的研究新进展

刘家汝 关秀茹

(哈尔滨医科大学附属第一医院检验科, 黑龙江 哈尔滨 150001)

**【摘要】** 动脉粥样硬化是一种综合脂质代谢紊乱和炎症的慢性心血管疾病。由于 Nrf2/ARE 信号通路是一种对氧化应激极为敏感的信号轴, 具有抗氧化活性, 参与调节细胞稳态、炎症因子释放及脂质形成等, 因此 Nrf2/ARE 信号通路与动脉血管内皮损伤和泡沫细胞形成密切相关, 并且对动脉粥样硬化具有双重调控效应。现就 Nrf2/ARE 信号通路在动脉粥样硬化中的作用进行综述, 旨在探寻防治动脉粥样硬化全新的分子靶点。

**【关键词】** 动脉粥样硬化; 核因子相关因子 2; 氧化应激

**【DOI】** 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2020.08.019

## Nrf2/ARE Signaling Pathway in Atherosclerosis

LIU Jiaru, GUAN Xiuru

(Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang, China)

**【Abstract】** Atherosclerosis is a chronic cardiovascular disease that combines lipid metabolism disorder and inflammatory response. Because the Nrf2/ARE signaling pathway is a signal axis which is extremely sensitive to oxidative stress and has antioxidant activity, it is involved in regulating cell homeostasis, inflammatory factors release and lipid formation. Therefore, Nrf2/ARE signaling pathway is closely related to the formation of endothelial cells and foam cells, and has dual regulatory effects on atherosclerosis. This article reviews the role of Nrf2/ARE signaling pathway in atherosclerosis in order to find a new molecular target for the prevention and treatment of atherosclerosis.

**【Key words】** Atherosclerosis; Nuclear factor related factor 2; Oxidative stress

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种以血管内皮细胞稳态失衡为始动, 伴随着血管收缩舒张功能障碍、脂质代谢紊乱和炎症因子释放等的综合病变<sup>[1]</sup>。大量研究表明, 氧化应激是血管损伤的内在基础<sup>[2]</sup>。因此, 维持细胞内氧化还原平衡对抵抗 AS, 保护心血管系统至关重要。核因子相关因子 2 (nuclear factor-related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 信号通路作为一种经典的细胞抗氧化途径, 其在 AS 的发生发展中也扮演着不同的角色<sup>[3]</sup>。现主要介绍 Nrf2/ARE 信号通路的结构及其在 AS 进展中的作用, 以期深入研究 AS 带来全新启示。

### 1 Nrf2/ARE 信号通路的结构

Nrf2 是 Nrf2/ARE 信号通路的中心枢纽, 其本质上是一种多功能转录因子, 同时又是一种关键的应激

调节器, 最初作为造血转录因子 NF-E2 p45 的同系物被分离出来, 故又名 NF-E2 相关因子 2<sup>[4]</sup>。Nrf2 含碱性亮氨酸拉链区, 属于 CNC (cap'-n'-cohar) 转录因子家族成员, 具有 605 个氨基酸残基。Nrf2 广泛调控 1 055 个基因的表达, 这些基因结构中含有顺式作用的 ARE (5'-GTGACNNNGC-3')<sup>[5]</sup>。ARE 序列存在于抗氧化、解毒、细胞增殖、代谢及免疫细胞存活有关基因的启动子区域。当细胞受到由活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 或亲电体引起的内源性和外源性应激时, Nrf2 诱导抗氧化防御和复合解毒相关靶基因的表达, 发挥抗氧化的生物活性。

### 2 Nrf2/ARE 信号通路的激活

#### 2.1 经典途径

作为一个重要的细胞保护因子, Nrf2 受调控的方式也十分独特。一种富含巯基的蛋白质—Kelch 样环

氧氯丙烷相关蛋白-1 (Kelch-like ECH-associated protein-1, KEAP1), 被证实是 Nrf2 的负向调控因子。正常情况下, KEAP1 通过与 Cullin3 蛋白和多泛素 Nrf2 形成泛素 E3 连接酶复合物降解 Nrf2。然而, 当氧化还原失衡时, ROS 直接修饰 KEAP1 的半胱氨酸残基致 KEAP1 功能失活, 引起 Nrf2 泛素化, 转入核与下游 ARE 结合<sup>[6]</sup>, 反式激活多种细胞保护基因, 如血红素加氧酶-1 和 NADPH-醌氧化还原酶-1, 以消除氧化应激和炎症。目前, Nrf2/ARE 信号通路因其在氧化损伤和炎症疾病中的关键作用备受关注。

## 2.2 非经典途径

以往, 针对 Nrf2/ARE 通路活化机制的研究一直专注于经典途径。最近, 一种全新的 Nrf2 激活方式引起学术界的广泛关注, 这一途径被称为 Nrf2 非经典激活途径。该途径涉及一系列调节蛋白, 如 p62、DPP3、WTX、PALB2、p21 和 BRCA1, 它们通过 KEAP1 或 Nrf2 的直接相互作用解离 KEAP1-Nrf2 复合物, 启动 Nrf2/ARE 信号通路<sup>[7]</sup>。其中, 关于 SQSTM1/p62 竞争激活 Nrf2 通路的研究最为全面。p62 是一种自噬底物蛋白, 其结构域中识别 KEAP1 相互作用区的 349-DPSTGE-354 基序和 Nrf2 的 Neh2 结构域中的 ETGE 基序相似。这一独特的蛋白构象揭示 p62 和 Nrf2 之间潜在的作用关系。据报道, 氧化应激导致自噬缺陷时, 大量蓄积的 p62 将 KEAP1 隔离到自噬体中, 阻止 Nrf2 泛素化, 转录激活 Nrf2 靶基因, 启动 Nrf2/ARE 信号通路<sup>[8]</sup>。此外, 最新研究表明, 被 p62 持续激活的 Nrf2 将反馈刺激 p62 的磷酸化, 形成的正向循环回路与肿瘤细胞增殖及 ROS 升高有关<sup>[9-11]</sup>。

## 3 Nrf2/ARE 信号通路与 AS

研究证明, AS 病变的血管中脂质和蛋白质已被氧化修饰, 并且氧化程度与疾病的严重程度紧密相关, 这表明氧化应激可能是 AS 发生的关键信号。Nrf2/ARE 信号通路可激活一系列抗氧化酶的转录, 包括血红素加氧酶 1、NADPH 脱氢酶、过氧化物还原酶-1 等<sup>[12]</sup>, 这些酶的变化将直接或间接调控 AS 进程。因此, 了解 Nrf2 与 AS 的相互作用对阐明 AS 发生机制有重要启示。

### 3.1 Nrf2/ARE 信号通路的抗 AS 作用

作为一个敏感的抗氧化应激通路, Nrf2/ARE 信号通路通过自身抗氧化性发挥其抗 AS 的作用, 主要体现在以下方面: 保护血管内皮完整、减少脂质蓄积及抑制炎症。

#### 3.1.1 保护血管内皮完整

正常情况下, 血管内皮细胞内环境处于动态平

衡。AS 过程中, 细胞内环境稳态失衡, 动脉血管内皮受损, 发生功能障碍。目前, 大量研究发现 Nrf2 与血管内皮完整密切相关。去乙酰化酶 6 影响多种年龄相关的疾病, 如血脂异常和心血管疾病。Jin 等<sup>[13]</sup>证明, 去乙酰化酶 6 通过激活 Nrf2 抑制胆固醇结晶诱导的血管内皮细胞功能障碍。Yan 等<sup>[14]</sup>转染 siRNA 或用 Nrf2 抑制剂阻断 Nrf2/ARE 信号通路, 结果显示氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 刺激的脐静脉内皮细胞中超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性明显降低, 相反, 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3、ROS 以及丙二醛等内皮损伤因子明显上升。阿司匹林丁香酚酯通过调节一氧化氮合酶和 Nrf2 信号通路, 保护血管内皮细胞免受氧化应激损伤, 具有抗血栓、抗 AS 和抗氧化作用<sup>[15]</sup>。

#### 3.1.2 减少脂质蓄积

在 AS 形成过程中, 动脉内膜中脂质的积累招募大量炎症细胞至血管内皮, 导致细胞因子和 ROS 的持续产生, 后者将低密度脂蛋白氧化为 ox-LDL, 促进泡沫细胞形成。Yang 等<sup>[16]</sup>发现, Nrf2 和沉默信息调节因子 1 (Sirt1) 协同激活丹参酮 C 处理的巨噬细胞中过氧化物酶 1 的转录, 过氧化物酶 1 上调 ATP 结合盒转运体 A1 (ABCA1) 表达并减少细胞内脂质堆积, 抑制泡沫细胞形成。在脂质摄取方面, Nrf2 仍参与调控巨噬细胞清道夫受体的转录。巨噬细胞中 Nrf2 缺失导致清道夫受体 A 和凝集素型氧化低密度脂蛋白受体 1 (LOX-1) 上调, 加速 ox-LDL 的摄取和泡沫细胞的形成<sup>[17]</sup>。

#### 3.1.3 抑制炎症

在抗 AS 方面, Nrf2/ARE 信号通路还抑制白介素 (IL)-1 $\beta$ 、IL-6 等炎症因子的释放。用丝裂原活化蛋白激酶抑制剂作用于脂多糖刺激的 RAW264.7 巨噬细胞后, 发现 Nrf2 的核转位和 HO-1 表达水平明显下降, 促炎因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 释放减少, 提示激活 Nrf2/ARE 通路可有效缓解炎症<sup>[18]</sup>。从基因水平上看, Li 等<sup>[19]</sup>发现, 高表达人肺腺癌转移相关转录本 1 基因的脐静脉内皮细胞用 ox-LDL 处理后, 其分泌的外泌体不断将肺腺癌转移相关转录本 1 释放入成熟的树突状细胞, 后者与 Nrf2 相互作用, 抑制 ROS 积累和树突状细胞的成熟, 阻碍炎症发生, 避免 AS 进一步加重。

另外, 实验证明, 二氢杨梅素激活 Nrf2/ARE 通路后细胞内 ROS 和线粒体 ROS 含量显著降低, NLRP3 炎症小体的活化受抑制, IL-1 $\beta$  释放减少, 由此说明

Nrf2/ARE 通路激活负向调控 NLRP3/IL-1 $\beta$  促炎通路,为维持粥样斑块的稳定创造有利环境<sup>[20-21]</sup>。

### 3.2 Nrf2/ARE 信号通路的致 AS 作用

尽管 Nrf2/ARE 信号通路的抗氧化应激效应体现在预防和延缓 AS 的方方面面,但近几年有报道指出 Nrf2/ARE 信号通路具有致 AS 的作用。CD163<sup>+</sup>巨噬细胞被认为是 AS 病变中的特征细胞。Liu 等<sup>[22]</sup>发现,多氯联苯(一种环境污染物)促进巨噬细胞/单核细胞向 CD163<sup>+</sup>巨噬细胞极化,并且该过程经由活化 Nrf2 信号通路实现,因此 Nrf2 信号通路极可能是加速 AS 的潜在诱因。除 CD163 外, Nrf2 已被证明调节 ApoE<sup>-/-</sup>Nrf2<sup>+/+</sup>小鼠巨噬细胞清道夫受体-B 的表达,辅助巨噬细胞吸收 ox-LDL,促进动脉粥样斑块的形成<sup>[23]</sup>。Kloska 等<sup>[24]</sup>也提出,一方面, Nrf2 通路的激活可能保护细胞免受氧化应激和衰老;另一方面,将 Nrf2<sup>-/-</sup>小鼠骨髓移植到 ApoE<sup>-/-</sup>高胆固醇血症小鼠体内后,后者 AS 病变程度明显改善,突出了 Nrf2 致 AS 的活性。Freigang 等<sup>[25]</sup>报道称, Nrf2<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>小鼠体内促炎细胞因子 IL-1 的生成减少,提示 Nrf2 全基因敲除可防止高脂饮食诱导的 AS 形成。相似的是, Barajas 等<sup>[26]</sup>也提出 Nrf2 的表达以一种性别依赖的方式促进 AS 病变的形成。和 Nrf2<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>雌鼠(18.5%)相比, Nrf2<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>雄鼠(47%)体内粥样斑块生成明显减少,并且进一步的研究发现此过程极可能是 Nrf2 影响血浆脂蛋白和胆固醇转运的结果。由此可知,目前为止 Nrf2 在 AS 中的作用仍不明确,单纯的认为 Nrf2/ARE 信号通路只是一种抗氧化通路的说法并不严谨。

### 4 结语

在 AS 中,氧化应激致 ROS 升高是疾病发生发展的重要损伤因素。Nrf2 是 Nrf2/ARE 信号通路中一个关键的转录因子,可精细调节 II 期解毒酶和一系列抗氧化酶的表达,缓解因氧化还原失衡引起的细胞炎症、凋亡和坏死等<sup>[27]</sup>。大量数据显示, Nrf2/ARE 信号通路具有高效的抗氧化效应。例如, Nrf2 敲除的动物组织较正常组织更易受到氧化应激的毒害<sup>[28]</sup>。除此之外, ROS 生成增加和 Nrf2 功能紊乱是促进血管衰老、加重老年血管疾病发病的重要机制<sup>[29]</sup>,因此恢复 Nrf2/ARE 信号通路,对降低包括 AS 在内多种心血管疾病的死亡率和发病率有极大的指导意义。然而,由于过度激活 Nrf2/ARE 信号通路加速 AS,并且当前对该特性的探究大多局限于简单的动物模型,所以深入发掘 Nrf2/ARE 信号通路及其作用靶点在 AS 中的机制将为预防和治疗 AS 开辟新的道路。

### 参考文献

- [1] Slocum C, Kramer C, Genco CA. Immune dysregulation mediated by the oral microbiome: potential link to chronic inflammation and atherosclerosis [J]. *J Intern Med*, 2016, 280(1):114-128.
- [2] Bertin R, Chen Z, Marin R, et al. Activity of myricetin and other plant-derived polyhydroxyl compounds in human LDL and human vascular endothelial cells against oxidative stress [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 82:472-478.
- [3] Wei R, Enaka M, Muragaki Y. Activation of KEAP1/NRF2/P62 signaling alleviates high phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells by suppressing reactive oxygen species production [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):10366.
- [4] Yamamoto M, Kensler TW, Motohashi H. The KEAP1-NRF2 System: a thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis [J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(3):1169-1203.
- [5] Malhotra D, Portales-Casamar E, Singh A, et al. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(17):5718-5734.
- [6] Schmoll D, Engel CK, Glombik H. The Keap1-Nrf2 protein-protein interaction: a suitable target for small molecules [J]. *Drug Discov Today Technol*, 2017, 24:11-17.
- [7] Silva-Islas CA, Maldonado PD. Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 134:92-99.
- [8] Hashimoto K, Simmons AN, Kajino-Sakamoto R, et al. TAK1 regulates the Nrf2 antioxidant system through modulating p62/SQSTM1 [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 25(17):953-964.
- [9] Goode A, Rea S, Sultana M, et al. ALS-FTLD associated mutations of SQSTM1 impact on Keap1-Nrf2 signalling [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2016, 76:52-58.
- [10] Riz I, Hawley TS, Marsal JW, et al. Noncanonical SQSTM1/p62-Nrf2 pathway activation mediates proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma cells via redox, metabolic and translational reprogramming [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(41):66360-66385.
- [11] Sun X, Ou Z, Chen R, et al. Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Hepatology*, 2016, 63(1):173-184.
- [12] Maltese G, Psefteli PM, Rizzo B, et al. The anti-ageing hormone klotho induces Nrf2-mediated antioxidant defences in human aortic smooth muscle cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(3):621-627.
- [13] Jin Z, Xiao Y, Yao F, et al. SIRT6 inhibits cholesterol crystal-induced vascular endothelial dysfunction via Nrf2 activation [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 387(1):111744.
- [14] Yan R, Yan J, Chen X, et al. Xanthoangelol prevents ox-LDL-induced endothelial cell injury by activating Nrf2/ARE signaling [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2019, 74(2):162-171.
- [15] Huang MZ, Yang YJ, Liu XW, et al. Aspirin eugenol ester attenuates oxidative injury of vascular endothelial cells by regulating NOS and Nrf2 signalling pathways [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(7):906-918.
- [16] Yang Y, Li X, Peng L, et al. Tanshinolol C inhibits oxidized low-density lipoprotein induced macrophage foam cell formation via a peroxiredoxin 1 dependent pathway [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(3):882-890.
- [17] Ooi BK, Goh BH, Yap WH. Oxidative stress in cardiovascular diseases: involvement of Nrf2 antioxidant redox signaling in macrophage foam cells

- formation[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11):2336.
- [18] Ren J, Su D, Li L, et al. Anti-inflammatory effects of Aureusidin in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via suppressing NF- $\kappa$ B and activating ROS- and MAPKs-dependent Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 387:114846.
- [19] Li H, Zhu X, Hu L, et al. Loss of exosomal MALAT1 from ox-LDL-treated vascular endothelial cells induces maturation of dendritic cells in atherosclerosis development[J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(18):2255-2267.
- [20] Hu Q, Zhang T, Yi L, et al. Dihydromyricetin inhibits NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis by activating the Nrf2 signaling pathway in vascular endothelial cells[J]. *Biofactors*, 2018, 44(2):123-136.
- [21] 武亚琳, 梁斌, 杨志明. NLRP3/IL-1 $\beta$  途径的促动脉粥样硬化作用及临床应用[J]. *心血管病学进展*, 2019, 40(6):943-946.
- [22] Liu J, Yang B, Wang Y, et al. Polychlorinated biphenyl quinone promotes macrophage polarization to CD163<sup>+</sup> cells through Nrf2 signaling pathway[J]. *Environ Pollut*, 2020, 257:113587.
- [23] Bozaykut P, Karademir B, Yazgan B, et al. Effects of vitamin E on peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 in hypercholesterolemia-induced atherosclerosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 70:174-181.
- [24] Kloska D, Kopacz A, Piechota-Polanczyk A, et al. Nrf2 in aging—Focus on the cardiovascular system[J]. *Vascul Pharmacol*, 2019, 112:42-53.
- [25] Freigang S, Ampenberger F, Spohn G, et al. Nrf2 is essential for cholesterol crystal-induced inflammasome activation and exacerbation of atherosclerosis[J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(7):2040-2051.
- [26] Barajas B, Che N, Yin F, et al. NF-E2-related factor 2 promotes atherosclerosis by effects on plasma lipoproteins and cholesterol transport that overshadow antioxidant protection[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(1):58-66.
- [27] 孙雪梅, 王瑞婷. 核因子相关因子 2-抗氧化反应元件信号传导通路对心血管疾病保护作用的研究进展[J]. *临床内科杂志*, 2015, 32(8):572-574.
- [28] Matana A, Ziros PG, Chartoumpekis DV, et al. Rare and common genetic variations in the Keap1/Nrf2 antioxidant response pathway impact thyroglobulin gene expression and circulating levels, respectively[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 173:113605.
- [29] Ungvari Z, Tarantini S, Nyúl-Tóth Á, et al. Nrf2 dysfunction and impaired cellular resilience to oxidative stressors in the aged vasculature: from increased cellular senescence to the pathogenesis of age-related vascular diseases[J]. *Geroscience*, 2019, 41(6):727-738.

收稿日期:2020-01-31

## 《心血管病学进展》征订征稿启事

《心血管病学进展》(ISSN 1004-3934, CN 51-1187/R)是由国家新闻总署批准的心血管病学专业性医学杂志,也是介绍国内和国外心血管病学及有关学科最新进展的学术刊物。本刊为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、首届全国中文核心期刊和四川省优秀期刊,并被多家数据库收录。

本刊以“综述”为主,内容以临床实用为主,并适当刊登与临床有关的基础理论研究性文章。主要栏目有主题综述(专家约稿)、指南解读、论著、学术前沿、综述、译文(节译、文摘、快讯)、讲座、述评、编译等。主要读者对象为心血管临床医师及防治科研人员,以及医学院校师生教学和学习参考,对基层医务工作者尤为适宜。热忱欢迎广大医药卫生工作者踊跃投稿和订阅本刊。

### 1. 投稿

本刊已开通网上投稿,官方网站地址:<http://xxgbxzz.paperopen.com>

请进入“作者投稿”,在“作者投稿管理平台”中投稿。

### 2. 订阅

本刊为月刊,16开本,每册15元,全年180元,全国各地邮局均可订阅(邮发代号:62-165)。

订阅本刊也可直接与编辑部联系。

本刊地址:四川省成都市青羊区青龙街82号成都市第三人民医院内《心血管病学进展》编辑部;邮政编码:610031;电话:028-61318656;E-mail:xxgbxjzcd@aliyun.com。

本刊编辑部