

p62/Nrf2 信号途径在细胞保护中的作用

李晓华¹, 唐乃夫¹, 厉永强^{2*}, 刘彬^{1*}

(河南大学 1. 护理与健康研究所, 2. 基础医学院, 河南 开封 475004)

摘要: 机体内外各种因素导致的氧化应激, 破坏细胞内氧化还原平衡, 激活或抑制许多信号通路和一些信号介导分子。Keap1-Nrf2-ARE 信号通路是机体维持氧化还原平衡和消除有毒有害物质损伤作用的重要通道之一, 通过诱导具有细胞保护功能的基因表达, 应对氧化应激和有害化学物质的破坏作用。一般认为, 维持 Nrf2 信号通路及其细胞保护作用为预防肿瘤发生的一种方式, 但如果控制 Nrf2 降解的基因突变使 Nrf2 持续活化也可能促进肿瘤发生, 或促进肿瘤细胞对化疗药物产生抵抗作用。自噬过程也与复杂的细胞功能相关, 通过降解和去除细胞内有害的蛋白质和受损的细胞器, 维持细胞的正常功能。已有研究显示, Keap1-Nrf2-ARE 信号通路与自噬通路的相互联系和相互影响是由自噬适配子蛋白 p62 与 Keap1 的直接作用完成的。自噬作用失调则以 p62 依赖的方式增强 Nrf2 的活性, 与多种疾病特别是恶性肿瘤的发病及治疗有关。本文就 p62 介导的 Nrf2 通路激活的调控机制及其与神经系统疾病、心血管疾病和恶性肿瘤的关系进行综述。

关键词: p62; 氧化应激; 核因子 E2 相关因子 2; Keap1; 自噬; 细胞保护作用

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 12-1995-11

Cytoprotective effect of p62/Nrf2 signaling pathway

LI Xiao-hua¹, TANG Nai-fu¹, LI Yong-qiang^{2*}, LIU Bin^{1*}

(1. Institute of Nursing and Health, 2. School of Basic Medical Science, Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract: The Nrf2-Keap1-ARE pathway is an important signaling axis that functions to protect cells against oxidative stress and harmful chemicals through the induction of cytoprotective genes. The maintenance and protective role of Nrf2 pathway has been recognized as a means for chemoprevention. On the other hand, constitutive activation of Nrf2, due to somatic mutations of genes that control Nrf2 degradation, promotes carcinogenesis and imparts chemoresistance to cancer cells. Autophagy is another tightly regulated complex cellular process that functions as a cellular quality control system to remove damaged proteins or organelles. Recently, these two cellular pathways were shown to intersect through the direct interaction between p62 (an autophagy adaptor protein) and Keap1. Dysregulation of autophagy was shown to result in prolonged activation of Nrf2 in a p62-dependent manner, which is associated with the pathogenesis and therapies of several human diseases including cancer. In this review, we discuss the molecular mechanisms of p62-mediated Nrf2 signaling pathway, with a special emphasis on their impact on nervous system disease, cardiovascular disease and cancer.

Key words: p62; oxidative stress; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; Keap1; autophagy; cytoprotection

氧化应激 (oxidative stress, OS) 指在遭受各种有

害刺激时, 机体内的活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、活性氮 (reactive nitrogen species, RNS) 等自由基产生过多, 超过机体的清除能力, 机体内氧化与抗氧化系统动态失衡, 导致组织损伤。为减轻这种损害, 生物在进化过程中不断完善自身复杂的防御功能, 其中核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2

收稿日期: 2018-08-03; 修回日期: 2018-09-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20872028, 21072045).

*通讯作者 Tel: 86-371-23885557, E-mail: liyongqiang@vip.henu.edu.cn;

Tel: 86-371-23880399, E-mail: lbgood5912@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0149

related factor 2, Nrf2) 介导的信号通路是细胞内抗氧化应激和维持氧化还原平衡的重要通路之一^[1]。Nrf2 是调控机体抗氧化应激反应的核转录因子, 能够诱导抗氧化、抗炎及生物转化酶等保护细胞的相关基因表达^[2]。在非应激条件下, Nrf2 连接到 Keap1-Cul3-E3 复合体上, 受 Cul-3-E3 泛素连接酶的作用迅速泛素化, 经由泛素-蛋白酶体通路降解。当细胞内发生氧化应激或亲电信号增强时, Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) 蛋白的半胱氨酸残基被氧化, 构象发生改变与 Nrf2 解偶联, 释放出游离的 Nrf2, 进入细胞核, 诱导一系列靶基因的表达^[3]。

p62 作为信号转导途径中一种支架和适配子蛋白, 分子结构中的多个功能结构域与相应蛋白相互作用, 介导多种细胞功能, 尤其在细胞的选择性自噬过程中发挥重要作用^[4]。2010 年, Komatsu 等^[5]研究发现, 在自噬缺陷的小鼠肝脏, p62 的大量积聚可以激活 Nrf2 通路, 这种作用是通过 p62 与 Keap1 蛋白的结合完成的。由此推测, p62 表现出的抗氧化作用与 Nrf2/Keap1 信号通路有关。氧化应激和过量 ROS 的产生与多种神经退行性疾病、慢性肝脏疾病、动脉粥样硬化、类风湿关节炎以及恶性肿瘤的发病密切相关, 也是机体衰老发生的重要原因。某些神经退行性疾病和慢性肝脏疾病中细胞自噬活性降低, 细胞内形成的异常蛋白质聚集体和包涵体中常发现 p62 蛋白存在^[6]。因此, p62 参与调节 Nrf2 信号途径的作用机制及与细胞抗氧化保护和疾病的关系引起广泛关注, 深入研究 p62 与 Nrf2/Keap1 信号通路的关系也将为寻找治疗这些疾病的新方法提供依据。

1 p62 的结构特征及表达调控

p62 也称 SQSTM1, 由 *SQSTM1* 基因编码, 分子质量为 62 kDa。最早是作为淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶 (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase, Lck) 结合配体被发现^[7], 后发现也可作为非典型蛋白激酶 C (atypical protein kinase C, aPKC) 的结合伴

侣^[8]。p62 蛋白含有 440 个氨基酸残基, 这些氨基酸序列包含至少 9 个带有结构性模体的结构域, 包括: ① PB1 结构域, 位于 N 末端的 Phox 和 Bem1 结构域, 介导 p62 蛋白低聚物形成及其与 aPKC、ERK、NBR1、MEK5 等的结合; ② ZZ 型锌指结构域 (ZNF), 可与 RIP (receptor interacting protein) 结合, 与肿瘤坏死因子信号转导和 NF- κ B 的激活途径有关; ③ p38 结合结构域, 与一种促有丝分裂蛋白激酶 (MAPK) p38 结合, 参与细胞因子受体信号转导通路; ④ TBS 结构域, 参与结合肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF6)。TRAF6 属于泛素蛋白连接酶 E3 的 RING (really interesting new gene) 结构域家族成员, 催化泛素连接成多聚泛素链, 也通过本身的多聚泛素化被激活, 在 NF- κ B 信号转导中发挥作用; ⑤ 核定位信号 (nuclear localization signal, NLS) 和核输出信号 (nuclear export signal, NES) 结构域, 介导 p62 在细胞质与细胞核之间持续快速穿梭移动; ⑥ LIR (LC3-interaction region), 由 22 个氨基酸构成的线状区域, 介导 p62 与微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 的相互作用, 在自噬体形成和自噬降解中起关键作用; ⑦ PEST 序列, 一段富含脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸和苏氨酸的 26 个氨基酸序列, 可能参与蛋白质的快速降解与更新; ⑧ KIR (Keap1 interacting region), 与 Keap1 结合的作用区域, Keap1 将 Cul-3 泛素连接酶募集到底物上, 促进其泛素化, 将标记多聚泛素链的 Nrf2 转运到蛋白酶体降解; ⑨ UBA 结构域 (ubiquitin-associated domains), 位于 p62 的 C 末端, 以非共价键的形式结合泛素, 选择性募集损伤的蛋白和细胞器, 传递至自噬泡经自噬途径降解。p62 还通过 UBA 结构域与 caspase-8 作用, 促进细胞凋亡^[9] (图 1)。

细胞内 p62 蛋白含量主要受转录水平的调控, 翻译后的自噬性降解也对 p62 蛋白水平产生较大影响,

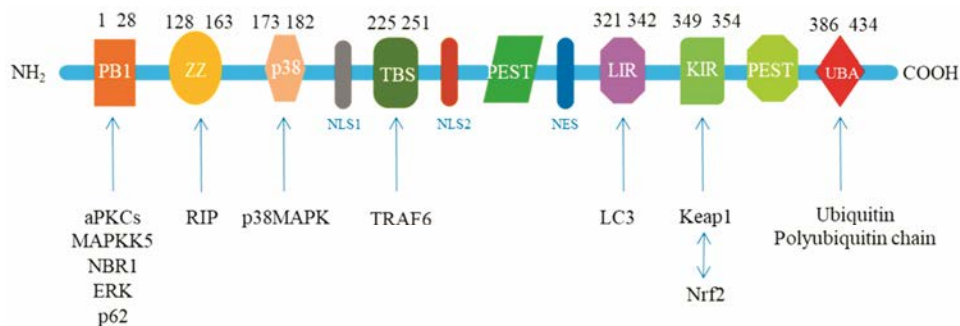


Figure 1 The functional domains of p62

经氧化应激活化的 Nrf2 途径是诱导编码 p62 的 *SQSTM1* 在转录水平表达的重要因素。内质网应激也诱导 *SQSTM1* 的 mRNA 表达, 该过程受到 Ras-ERK 和 JNK/c-Jun 信号的调控。细胞内蛋白酶体途径受到抑制和处于应激 (如饥饿、缺氧) 状态也能诱导 p62 的合成^[10]。p62 蛋白通过自噬途径被迅速降解。若 *SQSTM1* 的 mRNA 表达没有大幅度改变时, p62 蛋白水平增高是自噬损伤的标志。

2 Nrf2 的结构及调控

Nrf2 属于 CNC-bZIP 家族成员, 是抗氧化防御系统的重要转录因子。鼠的 Nrf2 蛋白由 597 氨基酸组成, 人 Nrf2 蛋白则由 605 个氨基酸构成。Nrf2 是一种功能模块化的蛋白质, 由 Itoh 等^[11]首次克隆并命名为 erythroid cell-derived protein with CNC homology (ECH), 由不同的保守结构域构成, 称为 Neh (Nrf2-ECH homology) 结构域。目前有 7 个结构域被报道, 即 Neh1~Neh7, 每一结构域都具有不同的功能。Neh1 是包含碱性亮氨酸拉链 (bZIP) 的结构域, 与其他蛋白质和 DNA 结合形成同源二聚体。Neh2 位于 Nrf2 的 N 末端, 介导 Nrf2 与 Keap1 的结合, 在 Keap1 抑制 Nrf2 活性过程中起关键作用。Neh3 位于 Nrf2 的 C 端, 参与 Nrf2 对靶基因的反式激活。若去除 Nrf2 蛋白 C 端的 16 个氨基酸, Nrf2 的 bZIP 结构域则丧失功能^[12]。Neh4 和 Neh5 位于 Neh1 与 Neh2 之间, 也是 Nrf2 发挥反式激活作用的结构域。分别与具有转录激活作用的 CBP (cAMP-response-element-binding protein-binding protein) 和 BRG1 结合, 协同诱导组蛋白乙酰化和染色质解聚, 使 RNA 聚合酶复合物易于与 DNA 的启动子区域相互作用, 启动靶基因 mRNA 的转录^[13]。Neh6 和 Neh7 参与对 Nrf2 的翻译后调节, 尽管对 Nrf2 活性也起着抑制作用, 但与 Neh2 与 Keap1 结合作用的机制不同。Neh6 和 Neh7 对 Nrf2 活性调节作用也与氧化还原状态无关。Neh6 还包含 DSGIS 和 DSAPGS 两个保守的模体, 参与 β -TrCP (β -transducin repeat-containing protein) 对 Nrf2 识别和结合。Neh7 还可以直接作用于维甲酸 X 受体 α (retinoid X receptor α , RXR α) 的 DNA 结合的结构域, 减少 Neh4 和 Neh5 与相应辅助激活因子的结合, 抑制 Nrf2 的活性^[14]。Nrf2 活性的调节主要通过改变 Nrf2 蛋白的降解速度完成。在基础条件下, Nrf2 受 Cul-3-E3 泛素连接酶催化迅速泛素化, 经 26S 蛋白酶体降解。鼠类肝癌 Hepa 细胞 Nrf2 的半寿期仅有 13 min, 人肝癌 HepG2 细胞的半寿期也仅 15 min^[15]。

Keap1 是 Cul3-E3 泛素连接酶底物适配子蛋白,

与 Cul3-E3 泛素连接酶结合形成 Keap1-Cul3-E3 复合物, 并在细胞质与 Nrf2 结合, 促进 Nrf2 蛋白泛素化和蛋白酶体降解, 维持 Nrf2 在低水平状态^[16]。Keap1 含有 627 个氨基酸残基, 人类 Keap1 包含 27 个半胱氨酸残基, 其中的部分半胱氨酸残基对 ROS 和亲电子试剂非常敏感。Keap1 半胱氨酸残基的修饰可改变 Keap1 的构象, 使其与 Nrf2 解耦联。因此, Keap1 被视为氧化应激的传感器^[17]。Keap1 包含 5 个结构域, 包括 N 端结构域、BTB (broad complex, Tramtrack, and Bric-a-Brac) 结构域、IVR (intervening region) 结构域、Kelch 重复结构域又称 DGR (double glycine repeat) 区和 C 端结构域。其中, BTB 结构域是与其他蛋白质相互作用的结构域, 参与同源或异源二聚体的形成, 也参与 Keap1 与 Cul3-E3 泛素连接酶结合过程。IVR 结构域含有较多半胱氨酸残基, 其中 Cys257、Cys273、Cys288 和 Cys297 已确定与 Keap1 作用有关, 还可以与 Cul3-E3 泛素连接酶作用, 诱导 Nrf2 的泛素化^[18]。Kelch 重复结构域介导 Keap1 与 Nrf2 的 Neh2 结合。Nrf2 与 Keap1 的作用机制一般用“铰链与门闩模型” (hinge-and-latch model) 解释。Neh2 包括 2 个高度保守的肽段序列与 Keap1 结合, 即低亲和力的 DLG 模体 (门闩) 和高亲和力的 ETGE 模体 (铰链)^[19]。在非氧化应激状态下, 细胞质内同源二聚体的 Keap1 中的 2 个 Kelch 结构域分别与 ETGE 和 DLG 模体结合, 这种“两点结合”的模式保证 Nrf2 的构象易受 Cul3-E3 泛素连接酶催化作用, 迅速泛素化并于 26S 蛋白酶体快速降解。Nrf2 的泛素化位点位于 DLG 与 ETGE 模体之间的一段 α -螺旋, 包含 7 个赖氨酸残基。Keap1 与 ETGE 模体具有较高的亲和力, 而与 DLG 模体结合特点是“快速连接和快速断开”。在氧化应激条件下, ROS 通过对 IVR 结构域的半胱氨酸残基的修饰, 改变 Keap1 的构象, 致使低亲和力的 DLG 模体与 Keap1 解开 (打开门闩), 使 Cul3-E3 泛素连接酶不能有效作用于 Nrf2 的泛素化位点, Nrf2 的泛素化和蛋白酶体降解被阻断。但高亲和力的 ETGE 模体并未与 Keap1 解开, 类似于门的铰链连接。在此状态下, 由于细胞质中 Nrf2 通过 ETGE 模体与 Keap1 结合, 占据 Keap1 的结合位点但不能被降解, 两者的结合处于饱和状态, 新合成的 Nrf2 易于转移至细胞核内, 与 sMaf 形成异二聚体后识别并结合 ARE 基因序列, 诱导多个与细胞保护相关基因的表达^[20] (图 2)。

3 p62 介导的 Keap1-Nrf2-ARE 通路活化机制

2010 年, 5 个课题组先后独立证明 p62 与 Keap1 相互作用, 进而阐明 Nrf2-Keap1-ARE 通路与自噬作

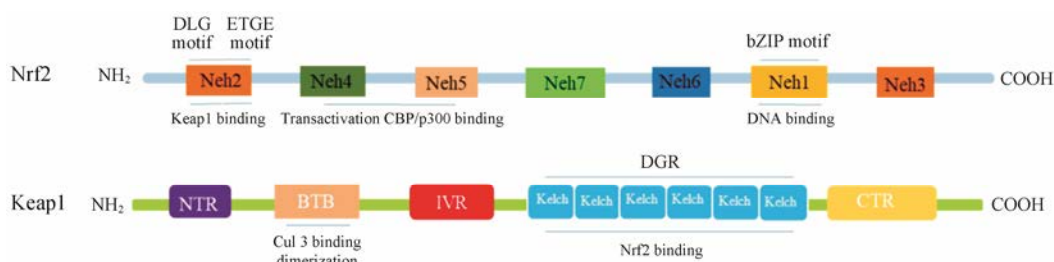


Figure 2 Domain structure of Nrf2 and Keap1 protein

用的相互联系^[21, 22]。其中 3 个课题组证明了 p62 的 KIR 结构域 (349-DPSTGE-354) 直接参与结合 Keap1。自噬缺陷导致 p62 蛋白积聚时, Keap1 被限制在 p62 蛋白的聚合物中, p62 通过 LIR 结构域与自噬相关蛋白 LC3 结合形成 LC3-p62-Keap1 复合体, 将 Keap1 转运至自噬体降解, 减少 Keap1-Cul3-E3 复合体的形成, 降低 Nrf2 泛素化以及通过泛素-蛋白酶体通路的降解, 活化 Nrf2 信号通路^[23]。因此, p62 在调节 Keap1 自噬性降解和控制 Keap1 作用方面发挥关键作用。p62 过度表达会降低 Keap1 的半衰期, 而敲除 p62 或 Atg7 基因延长其半衰期, 造成 Keap1 积聚^[24]。X 射线晶体结构分析表明, p62 的 KIR 结构域结合 Kelch 重复结构域的方式与 Nrf2 ETGE 模体结合 Keap1 的方式十分类似, 提示 p62 过表达或在细胞内大量积聚可竞争性抑制 Keap1 与 Nrf2 的结合^[5]。但是, 由于 Keap1 与 p62 的结合解离常数显著低于 Keap1 与 Nrf2 ETGE 模体的结合解离常数, p62 似乎对 Keap1 与 Nrf2 的结合不会产生太大影响。根据蛋白质氨基酸序列分析结果, p62-KIR 的氨基酸序列中与 Nrf2-ETGE 的谷氨酸残基相对应的氨基酸残基是 351 位的丝氨酸残基 (S351), 且 S351 保守性强, 由此 Komatsu 课题组^[25]推测, 如果 p62 的 S351 磷酸化, 其与 Keap1 的亲合力将会大大增加, 达到与 Nrf2-ETGE 竞争的程度。实际检测的结果是, KIR 结构域中 S351 的磷酸化使 p62 与 Keap1 亲合力提高了大约 30 倍, 显著增强了 p62 与 Keap1 结合能力。但 p62 磷酸化的确切信号途径尚不清楚, 目前认为至少 mTOR (mammalian target of rapamycin)、ULK1 (UNC-51-like kinase 1) 和 TBK1 (TANK-binding kinase 1) 3 种不同激酶参与这一过程。p62 的 S351 被 mTORC1 诱导产生磷酸化后, 更易与 Keap1 的结合, 促进 Keap1 的自噬性降解^[26]。

p62 的表达也受 Nrf2 调控, Nrf2 直接与 p62 启动子区的抗氧化反应元件 ARE 结合, 在转录水平诱导 p62 的表达^[27]。同时, p62 表达量增加能够通过结合 Keap1 增加 Keap1 的降解, 减少 Nrf2 泛素化, 使 Nrf2

的作用增强, 形成了一条正反馈回路。p62 与 Nrf2 的正反馈调节机制受多种因素影响, 在细胞抗氧化作用机制以及许多疾病发病和治疗策略制定中具有重要意义。应用自噬缺陷小鼠模型发现, 敲除小鼠肝细胞自噬信号通路中关键的 Atg5 或 Atg7 基因, 均能观察到 p62-Keap1 在细胞质积聚和 Nrf2 持续活化及其所致组织损伤和肿瘤产生^[28]。此类非经典 Nrf2 活化现象也在 Atg7 敲除的小鼠肺、表皮角化细胞和黑色素细胞中观察到。早期对低剂量砷剂致癌作用机制的研究中, 发现低剂量亚砷酸钠通过降低 Nrf2 的泛素化水平, 活化 Nrf2, 但并没有 Keap1 的半胱氨酸修饰^[29]。以后的研究发现, 砷剂激活 Nrf2 的作用, 是通过 p62 途径 (非经典途径) 完成的^[30]。

4 p62/Nrf2 通路的细胞保护作用

氧化应激过程产生的 ROS 造成生物大分子损伤, 是导致多种疾病和衰老的重要因素。Keap1-Nrf2-ARE 信号通路作为机体抗氧化应激和维持氧化还原平衡的重要信号通道之一, 能够诱导与 ROS 清除、生物转化、DNA 修复和线粒体功能相关的基因表达, 如超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和过氧化氢酶 (catalase, CAT) 等, 降低细胞内 ROS 含量, 减少氧化应激所造成的损伤。在认识 p62 与 Nrf2-Keap1-ARE 通路相互作用的机制前, 已有研究发现, NF- κ B 介导的细胞保护作用需要 p62 的参与。p62 缺陷的小鼠细胞内 ROS 水平显著提高, 细胞死亡率和恶性转化均增加^[31]。羟基酪醇 (hydroxytyrosol) 能够诱导视网膜色素上皮细胞中 Nrf2 表达, 增加细胞的 GSH 水平, 保护细胞免受 t-BHP 导致的凋亡, 此过程伴随 p62 表达的显著变化。羟基酪醇处理细胞 6 h 后, p62 的 mRNA 表达量以羟基酪醇剂量依赖方式提高。特别是经羟基酪醇处理 24 h 后, p62 的蛋白质水平显著增加^[32]。能量物质供应不足和营养过剩都可造成细胞内 ROS 水平增高。禁食后提供高糖无脂饮食的小鼠, mTORC1 活性增加, 抑制自噬作用, 使肝细胞 p62 水平增加, 促进 Keap1 的降解和 Nrf2 的活化, 减

少过量 ROS 对细胞的损伤作用^[33]。高水平的 p62 也能够增加 mTORC1 活性,减少细胞的自噬作用,进一步增加 p62 蛋白水平,对于保护细胞和维持细胞在机体能量代谢异常情况下的生存有重要意义。支气管上皮细胞慢性镉暴露所致恶性转化的研究中,细胞内 ROS 的变化引起了广泛的关注。在细胞发生恶性转化前,在镉诱导下细胞内 ROS 水平明显增加。但在恶性转化之后,细胞自噬作用障碍, p62 含量增加, Nrf2 被激活,抗氧化相关的酶如 CAT、SOD1 和抗凋亡蛋白如 Bcl-2、Bcl-xL 表达量增加,细胞内 ROS 水平下降,致使细胞凋亡率下降,细胞的生存、增殖和恶变率增加^[34]。利用光敏剂对肿瘤细胞进行光动力学治疗时,细胞内产生了高浓度 ROS 和含 p62 和 NBR1 (neighbor of BRCA1 gene 1) 的聚集物,且该聚集物需通过 p38MAPK 途径调节的自噬作用清除。用遗传学方法或药物阻断 p38MAPK 途径可减少 p62 和 NBR1 聚集物的形成,降低 Nrf2 活性,增加光敏剂诱导的氧化应激作用和细胞死亡率。p62 缺陷时细胞内聚集物减少, ROS 水平降低, caspase 活性降低,细胞生存率增加^[35]。Kaposi 肉瘤相关疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV) 能够诱导被感染内皮细胞的 Nrf2 活化,活化的方式与由 ROS 介导的“经典途径”无关,是通过磷酸化 p62 的 S351 和 S403,增加其与 Keap1 亲和力,诱导 Keap1 的 63 位赖氨酸的多泛素化及降解增加所致^[36]。

许多与衰老相关疾病中,氧化应激作用是造成蛋白质损伤的重要因素,受损蛋白质在细胞质聚集并泛素化,经自噬过程清除。p62 能够加速自噬作用,减少受损蛋白对细胞的毒害作用。因此,有人将 p62 作为衰老相关疾病的潜在治疗靶点,并展开多项研究。在视网膜黄斑变性发病机制的研究中,已确认 p62 通过加强自噬清理作用和活化 Nrf2 抗氧化信号通路保护视网膜色素上皮细胞。特别是在氧化应激条件下, p62 与 Nrf2 相互促进,形成正反馈调节机制,为视网膜黄斑变性的预防和治疗手段提供新的思路^[37]。正常皮肤黑色素细胞暴露在 H₂O₂ 时,自噬作用显著增强,保护细胞避免氧化损伤。但白癜风患者黑色素细胞的自噬功能受损,对 H₂O₂ 造成的氧化损伤高度敏感。Li 课题组等^[38]证明,白癜风患者黑色素细胞的自噬异常与 Nrf2-p62 通路的损伤有关。上调 Nrf2-p62 通路或 p62 水平可减轻 H₂O₂ 对白癜风黑色素细胞的氧化损伤作用。因此,上调 p62 相关的信号通路可用于治疗白癜风。同一课题组应用辛伐他汀保护白癜风黑色素细胞避免 H₂O₂ 的氧化损伤作用。结果显示,经

辛伐他汀处理后的黑色素细胞内 ERK/JNK 和 p62 均被激活,并与活化的 Nrf2 形成正反馈调节环路,有效提高黑色素细胞的抗氧化能力,为此类药物的临床应用提供了实验依据^[39]。

5 p62/Nrf2 通路与神经系统疾病

Nrf2 在脑组织中广泛存在,是调节自噬、氧化应激和炎症的重要信号分子^[40]。已发现 Nrf2 在调节小胶质细胞功能,保护神经元及星形胶质细胞避免氧化损伤方面发挥关键作用^[41]。在小鼠中枢神经系统, Nrf2 具有细胞保护作用, Nrf2 缺陷小鼠对缺血性脑损伤的敏感性增加。星形胶质细胞表达的 Nrf2 也能保护细胞及临近神经元,减少有害物质对细胞的损伤。但在 Keap1 敲除小鼠,持续激活 Nrf2 则表现出对细胞的损伤作用^[42]。Nrf2 活性随年龄增长而下降,是影响神经退行性疾病发病的重要因素。

氧化应激通过激活 Nrf2,刺激一系列自噬基因的表达,特别是 p62 的表达。脑组织中的 p62 也受 mTOR 复合物作用而磷酸化,进一步激活 Nrf2^[43]。人脑组织病理分析结果显示,各种神经退行性疾病如阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、路易体痴呆 (dementia with Lewy bodies, DLB)、帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 和肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 等脑组织细胞质包涵体中均有 Keap1 与 p62 共定位^[44]。AD 患者脑组织总 p62 水平显著高于非 AD 患者,特别是 AD 患者脑组织 p62 蛋白的 349 位丝氨酸残基 (S349) 磷酸化程度显著升高,并与脑组织的持续氧化应激状态有关^[45]。二硫化碳 (carbon disulfide, CS₂) 是一种在化工工业广泛应用的有机溶剂,可造成多种神经系统疾病。CS₂ 处理的大鼠脊髓神经元的 mTORC1 信号系统被激活,增加 p62 水平和其磷酸化状态,降低 Keap1 的水平。Nrf2 从细胞质转位的细胞核,诱导 Nrf2-ARE 信号系统的活化,抗氧化酶的表达量显著增加。说明 CS₂ 导致神经系统氧化应激的同时,通过激活 p62-Nrf2-Keap1 途径,减少氧化应激损伤,具有相应的保护作用^[46]。近年来,在寻找治疗神经退行性疾病新靶点时,人们对 Nrf2 控制的抗氧化途径寄予希望。在体外实验中发现,一种神经细胞分化诱导剂鼠尾草酸在诱导 PC12 细胞分化过程中,通过 Nrf2 诱导 p62 表达,促进 TrkA 信号,增强 Nrf2 的作用。如将 p62 基因敲除,鼠尾草酸诱导神经分化作用被抑制^[47]。

脑组织氧化应激对细胞的损伤可降低自噬功能,细胞内有害蛋白质和损伤的细胞器不能及时清除,

最终导致神经元死亡。自噬功能障碍导致错误折叠细胞毒性蛋白以包涵体形式过量积聚,是多种神经退行性疾病的病理学标志。在各种神经退行性疾病的神经元细胞质的包涵体中都发现 p62 蛋白的存在和细胞核 Nrf2 水平降低^[48]。p62 缺陷小鼠脑组织 Nrf2 的核转位也下降,并表现出类似 AD 样的症状^[49]。二甲基延胡索酸 (dimethyl fumarate, DMF) 通过激活 Nrf2, 可减轻帕金森病毒毒素 6-羟多巴胺在鼠黑质纹状体产生氧化应激,具有神经保护作用^[50]。营养学研究表明,食用含多酚类物质如花青素、芪类、褪黑激素、山柰酚、槲皮素、白藜芦醇和完整水果,可激活自噬,保护神经元避免氧化应激损伤。多种多酚类物质能够激活神经元的 Nrf2, 启动 ARE 介导生物转化酶类和抗氧化应激蛋白的转录和表达,如谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase)、谷胱甘肽转移酶 (glutathione transferase, GST) 和 SOD, 减少氧化应激^[51]。在一项对一种巴西特有浆果 açai 营养机制研究中,发现摄入大量 açai 食物大鼠的海马和额皮质的 ROS 和炎症标志物减少, Nrf2 表达显著增加,内源性抗氧化酶激活,但额皮质的 p62 积聚显著低于对照组。免疫组化染色结果也显示,补充 açai 可使动物额皮质“斑点状”包涵体减少。更深入的机制研究发现,摄入 açai 食物通过抑制 mTOR 的磷酸化,激活 beclin1, 减少 p62 积聚和 LC3 的转变,诱导海马和额皮质的自噬^[52]。

对于散发的神经退行性疾病,衰老是重要的危险因素。随着年龄增加,细胞的蛋白降解系统的效率越来越低。已有报道, *NRF2* 缺陷可加重早期 PD 患者神经元的蛋白质积聚、炎症和死亡。一般认为,泛素-蛋白酶体降解系统和自噬系统的变化相互影响,均与神经退行性疾病的发病机制有关^[53]。近期一项研究结果显示,大脑皮质神经元的 26S 蛋白酶体功能障碍可提高线粒体的 p62 和 OPTN 的磷酸化程度, p62 的 UBA 和 LIR 结构域分别将泛素化物质与自噬体连接,表现为早期阶段选择性自噬^[54]。由于神经元基础自噬效率较高,短期 26S 蛋白酶体功能障碍诱导自噬发生可能对细胞具有保护作用,但持续 26S 蛋白酶体功能障碍可能启动过度自噬,甚至导致自噬性细胞死亡^[55]。

6 p62/Nrf2 通路与心血管疾病

心肌细胞对有氧代谢的需求很高,需要大量线粒体的支持。在机体所有细胞类型中,心肌细胞的线粒体含量最高,占据细胞体积的 40%。心肌细胞的这种特征能产生更多的 ROS。但与之矛盾的是,心肌组

织的 SOD、CAT、谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽还原酶的含量并没有相应提高,远低于肝脏,使心脏更易于受到氧化应激的损伤。心血管系统过多的 ROS 产物造成血管损伤,通过血管内皮细胞与血管平滑肌细胞相互作用,最终导致异常血管重构,是高血压、动脉粥样硬化和心衰的重要病理基础^[56]。Nrf2 在调控机体抗氧化应激反应中具有重要作用。Nrf2 启动子多态性的调查数据显示, Nrf2 的表达量下降可增加心血管疾病的发病概率^[57]。动物实验结果显示,小鼠心肌组织 Nrf2 基因敲除加重缺血性心力衰竭,并提高主动脉缩窄的死亡率。在持续应用血管紧张素 II 之后, Nrf2 基因敲除小鼠表现出比野生型小鼠更严重心脏氧化应激和心肌肥厚^[58]。心血管损伤作用常表现为 Nrf2 激活,同时细胞内 p62 也发生相应的变化。DPP-4 抑制剂吉格利汀通过激活 Nrf2, 直接降低血管平滑肌细胞的异常增殖和迁移。吉格利汀激活 Nrf2 不仅在 mRNA 水平,也经 p62 的作用,增加 Keap1 的蛋白酶体降解,诱导 Nrf2 的靶基因 HO-1 和 NQO1 的表达,这类药物对预防动脉粥样硬化和心肌梗死作用显著^[59]。体内实验证明,血管损伤后, p62 在降低血管新生内膜增生和颈动脉重塑方面发挥基础作用。p62 基因敲除小鼠的大动脉血管平滑肌细胞在体外培养和胎牛血清作用下较野生型的增殖更快,细胞密度更高,说明 p62 对血管平滑肌细胞增殖具有抑制作用。另外, p62 缺陷的血管平滑肌细胞较野生型迁移更快,说明 p62 对血管平滑肌细胞迁移具有抑制作用^[60]。

大多数心肌损伤或心肌细胞死亡都是由于缺血增加 ROS 启动的。心肌损伤引发的急性炎症反应,使嗜中性粒细胞和巨噬细胞渗透到心肌组织,也成为 ROS 的另一来源,心肌缺血再灌注进一步增加心脏的 ROS 负荷,加大对心肌的损害作用。已观察到心肌梗死患者服用大剂量他汀类药物能显著改善疗效,尽管他汀类药物介导心脏保护作用的机制不清楚,有证据显示他汀类除抑制炎症反应外,也激活 Nrf2 通路。阿伐他汀用于冠状动脉左前降支闭塞的大鼠,诱导 Nrf2 和 HO-1 的表达,使梗死面积减少 20%^[61]。心肌细胞培养模型也显示, Nrf2 通过降低 ROS 并诱导抗氧化酶和生物转化酶的表达对心肌细胞的保护作用^[62]。应用鼠类心肌梗死模型,发现多种 Nrf2 诱导剂能够减少梗死面积、保护左心室功能和减少心律失常的发生。一种三萜系化合物甲基巴多素隆,来源于天然产物齐墩果酸,作为 Nrf2 的强力诱导剂已进行了临床试验,可在多个器官激活 Nrf2, 对心脏具有

保护作用^[63]。白藜芦醇也已被证明有希望用于临床治疗肿瘤和心血管疾病。用白藜芦醇处理后,小鼠睾丸的 Nrf2 以及其下游基因如 *NQO-1*、*HO-1*、*SOD*、*CAT* 和金属硫蛋白的表达量均显著增加。研究发现,白藜芦醇诱导的 Nrf2 活化主要依赖 p62 的作用, p62 促进 Keap1 降解,完成 Nrf2 活化过程^[64]。

动脉粥样硬化源自血管局部区域胆固醇酯的沉积、炎症和氧化应激的相互作用,导致内皮细胞损伤和平滑肌细胞增殖。应用小鼠模型或人内皮细胞检测的结果显示,活化 Nrf2 能够减缓动脉粥样硬化的发生^[65]。用氧化低密度脂蛋白 (LDL) 处理骨髓来源的巨噬细胞,细胞内 Nrf2 升高,减轻氧化损伤,对细胞有保护作用。如巨噬细胞中缺乏 Nrf2,可加速泡沫细胞的形成,促进动脉粥样硬化的发生^[66]。高活性 Nrf2 抑制动脉粥样硬化的形成和发展与其抗炎作用有关,而 Nrf2 对平滑肌细胞增殖的控制则影响动脉粥样硬化斑块形成^[67]。Sergin 等^[67]报道,动脉粥样硬化的泛素化包涵体含有大量 p62 蛋白, p62 被隔离在泛素化包涵体中对机体是一种保护作用,因为敲除 *p62* 基因可导致泛素化和错误折叠蛋白质的弥散性分布,实验动物的预后更差。动脉粥样硬化血管的局部区域过量产生的 ROS,在促进泛素化包涵体形成的同时,也活化 Nrf2,诱导 p62 的表达^[68]。p62 作为适配子蛋白将各种蛋白质转移到这种细胞质的小体中,其中 Keap1 被募集并隔离是 Nrf2 活化的快速机制。应用 DHA 可以诱导 p62 阳性细胞质小体形成,大部分 Keap1 被隔离,同时活化 Nrf2,可显著增强血管内皮细胞对炎症信号的耐受作用。如敲除 *p62* 或 *Keap1* 基因,将显著降低 DHA 介导的抗炎作用^[69]。

7 p62/Nrf2 通路与恶性肿瘤

自噬在维持正常组织的稳态和肿瘤的生长中发挥关键作用。处于营养缺乏的恶劣微环境中,肿瘤细胞需要依赖自噬作用与之适应,降解蛋白质可有效提供氨基酸,为细胞生存和增殖所需蛋白质提供合成原料。肿瘤细胞中自噬持续激活是由于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的失调造成的。自噬对于肿瘤细胞是一把“双刃剑”。在肿瘤微环境中,自噬作用可以促进肿瘤细胞的存活和增殖,但有些情况下对肿瘤细胞有抑制作用。有人提出,抑制自噬保护肿瘤细胞的机制可能与以下几种作用有关:① 自噬的底物之一 p62 在细胞内积聚,激活 NF- κ B;② p62 积聚增加 Nrf2 的稳定性,使肿瘤细胞对氧化应激具有更强的抵抗力;③ 细胞保留包括线粒体在内的部分受损细胞器,维持了细胞的基本代谢和功能^[70]。Denk 和

Zatloukal 课题组^[71]首先在人肝细胞癌的细胞质透明小体中发现 p62 的积聚。人类的多种肿瘤细胞中都能够检测到 p62 的过度积聚。因此,编码 p62 DNA 质粒的疫苗有可能用于癌症的免疫治疗^[72]。

不断有证据显示, Nrf2 蛋白水平在许多类型的癌细胞和癌症患者的肿瘤标本中是增加的, Nrf2 的持续激活与多种实体瘤对化疗药物耐药有关^[73]。Nrf2 活性在某些癌细胞内的异常增高与 Keap1-Nrf2 系统的调节相关,并引起关注。开始人们对这些发现感到困惑,因为研究者一直认为, Keap1-Nrf2 系统主要在预防化学致癌方面起作用。然而, Nrf2 活性增高使癌细胞获得更强的抗氧化和药物代谢活性,对细胞有保护作用,利于癌细胞的恶性转化^[74]。许多证据还表明, Nrf2 蛋白表达水平与恶性肿瘤的侵袭性及不良预后正相关^[75],据此有人提出 Nrf2 表达量可作为恶性肿瘤不良预后的预测指标^[76],通过各种途径降低 Nrf2 的表达或靶向促进 Nrf2 的降解成为提高肿瘤疗效和改善肿瘤患者预后的新的治疗策略^[77]。也有研究发现, Nrf2 基因多态性是某些肿瘤治疗的预后标志物之一^[78]。一般认为,至少有 4 条途径与癌细胞内 Nrf2 激活有关:① *Nrf2*、*Keap1* 或 *CUL3* 突变造成 Nrf2 在癌细胞中的活性异常增高;② *Keap1* 表观遗传学变化导致 *Keap1* 表达下降, Nrf2 增加;③ p62、p21 等与 Keap1 结合的蛋白在细胞内积聚,阻断 Nrf2 与 Keap1 的结合,导致 Nrf2 在细胞内大量积聚,并发挥作用;④ 受肿瘤代谢物如延胡索酸的作用, Keap1 的半胱氨酸修饰影响其活性,导致 Nrf2 的积聚。以上所有分子水平的变化的结果均是阻断 Keap1 与 Nrf2 的结合,使 Nrf2 在肿瘤细胞内积聚,增加具有细胞保护作用靶基因的表达,使肿瘤细胞获得对化疗和放疗耐受的能力^[79]。一项对 175 例胃癌患者的研究结果表明, Nrf2 阳性组患者的总生存率显著低于 Nrf2 阴性组, Nrf2 表达阳性与对以 5-氟尿嘧啶为基础的联合化疗的耐药呈正相关关系^[80]。

值得注意的是, Nrf2 与 p62 形成的正反馈回路,可能是某些致癌因素作用的关键途径。在对砷诱导皮肤癌机制的研究中,发现砷剂作用于人皮肤角质化 HaCaT 细胞可通过激活 Nrf2 诱导 p62 的表达,小鼠皮肤的砷的慢性暴露也增加表皮细胞 p62 表达水平,并与增殖有关,但此作用机制却与自噬无关。提示砷诱导 p62 表达并形成 p62/Nrf2 正反馈回路在砷诱导皮肤癌机制中的重要作用,靶向抑制 p62 可用于预防砷对皮肤癌的诱导作用^[81]。有研究显示,在 p62 诱导的肝细胞癌发生过程中, Nrf2 具有重要的中介作用。

用 p62 KIR 结构域点突变方式减少 p62 与 Keap1 的结合,可降低 Nrf2 活性,使 p62 失去致癌作用^[82]。但是,因突变所致的 Nrf2 活化在人肝细胞癌病例中仅占 14% 左右^[83]。一项关于肝细胞癌模型的研究结果显示,小鼠肝细胞癌和人肝细胞癌中 HepG2 细胞 Nrf2 活化主要是由于 p62 的作用而不是因 Nrf2 基因突变所致^[84]。

乳腺癌细胞的 Nrf2 和 p62 表达量均较癌旁组织及良性乳腺上皮细胞高,对多柔比星抵抗的乳腺癌细胞的 Nrf2 和 p62 表达量也显著高于多柔比星敏感细胞群,将多柔比星抵抗的乳腺癌细胞的 Nrf2 和 p62 基因沉默后,对多柔比星的敏感性显著提高^[85]。应用 Nrf2 抑制剂能够降低 HCV 阳性的肝癌患者对抗癌药物的耐药作用^[86]。顺铂抵抗的人卵巢癌细胞 p62 的表达水平远高于顺铂敏感者,且这种顺铂耐药作用是通过调节 Keap1-Nrf2-ARE 信号途径实现的。在顺铂耐药的人卵巢癌细胞内敲除 p62 可恢复其对顺铂的敏感性^[87]。

8 展望

Nrf2-Keap1 和自噬通路均是通过上调一系列抗氧化和细胞保护基因的表达,减少氧化应激和细胞内外有害物质的破坏作用。正常情况下,Nrf2 的间断活化对细胞具有保护作用,能够维持细胞结构完整和功能的正常进行。但如果调控 Nrf2 的基因突变使 Nrf2 持续活化,则促进肿瘤发生并增强肿瘤细胞对化疗药物的抵抗作用。自噬也是一种细胞应激反应,在维护细胞内蛋白质稳态和细胞器健康方面发挥关键作用。p62 作为自噬信号通路中的支架和适配子蛋白,是自噬信号与 Nrf2 信号通路的相互连接和相互作用的枢纽。自噬作用障碍可导致细胞内的 p62 积聚,将 Keap1 转运至自噬体降解,减少 Nrf2 的降解,活化 Nrf2 信号通路。尽管 p62/Nrf2 信号途径的诸多细节尚不清楚,但目前研究已显示其在多种疾病尤其肿瘤的发生、发展以及治疗效果方面有重要作用。进一步研究和探讨 p62/Nrf2 信号途径复杂严密的调控机制,不但帮助人们深入认识相关疾病的生理和病理机制,也将为预防和延缓疾病的发展提供理论依据,为寻找相关疾病的治疗和新药的作用靶点提供新思路。

References

[1] Stepkowski TM, Kruszewski MK. Molecular cross-talk between the NRF2/KEAP1 signaling pathway, autophagy, and apoptosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50: 1186–1195.

[2] Zhao CY, Wang XL, Peng YK. Role of Nrf2 in neurodegenerative diseases and recent progress of its activators [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 375–384.

[3] Kobayashi M, Li L, Iwamoto N, et al. The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29: 493–502.

[4] Liu SM, Dong YJ, Liu B. Progress of study on p62 and protein degradation pathways [J]. *Acta Physiologica Sin (生理学报)*, 2015, 67: 48–58.

[5] Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12: 213–223.

[6] 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 [J]. *Biophys Rev*, 2017, 9: 41–56.

[7] Park I, Chung J, Walsh CT, et al. Phosphotyrosine-independent binding of a 62-kDa protein to the Src homology 2 (SH2) domain of p56lck and its regulation by phosphorylation of Ser-59 in the lck unique N-terminal region [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92: 12338–12342.

[8] Sanchez P, De Carcer G, Sandoval IV, et al. Localization of atypical protein kinase C isoforms into lysosome-targeted endosomes through interaction with p62 [J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 3069–3080.

[9] Jin Z, Li Y, Pitti R, et al. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling [J]. *Cell*, 2009, 137: 721–735.

[10] Liu WJ, Ye L, Huang WF, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2016, 21: 29.

[11] Itoh K, Igarashi K, Hayashi N, et al. Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins [J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15: 4184–4193.

[12] Nioi P, Nguyen T, Sherratt PJ, et al. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 10895–10906.

[13] Katoh Y, Itoh K, Yoshida E, et al. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription [J]. *Genes Cells*, 2001, 6: 857–868.

[14] Zenkov NK, Kozhin PM, Chechushkov AV, et al. Mazes of Nrf2 regulation [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2017, 82: 556–

- 564.
- [15] Zenkov NK, Menshchikova EB, Tkachev VO. Keap1/Nrf2/ARE redox-sensitive signaling system as a pharmacological target [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2013, 78: 19–36.
- [16] Baird L, Llères D, Swift S, et al. Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 15259–15264.
- [17] Sihvola V, Levenon AL. Keap1 as the redox sensor of the antioxidant response [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2017, 617: 94–100.
- [18] Canning P, Cooper CD, Krojer T, et al. Structural basis for Cul3 protein assembly with the BTB-Kelch family of E3 ubiquitin ligases [J]. *Biol Chem*, 2013, 288: 7803–7814.
- [19] Katoh Y, Iida K, Kang MI, et al. Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 433: 342–350.
- [20] Dinkova-Kostova AT, Kostov RV, Canning P. Keap1, the cysteine-based mammalian intracellular sensor for electrophiles and oxidants [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2017, 617: 84–93.
- [21] Lau A, Wang XJ, Zhao F, et al. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62 [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30: 3275–3285.
- [22] Copple IM, Lister A, Obeng AD, et al. Physical and functional interaction of sequestosome 1 with Keap1 regulates the Keap1-Nrf2 cell defense pathway [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 16782–16788.
- [23] Jiang T, Harder B, Rojo de la Vega M, et al. p62 links autophagy and Nrf2 signaling [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 88: 199–204.
- [24] Guo W, Kan JT, Cheng ZY, et al. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator in mitochondria and mitochondria dysfunction [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012: 878052.
- [25] Ichimura Y, Waguri S, Sou YS, et al. Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy [J]. *Mol Cell*, 2013, 51: 618–631.
- [26] Moscat J, Diaz-Meco MT. Feedback on fat: p62-mTORC1-autophagy connections [J]. *Cell*, 2011, 147: 724–727.
- [27] Liu Y, Kern JT, Walker JR, et al. A genomic screen for activators of the antioxidant response element [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 5205–5210.
- [28] Ni HM, Boggess N, McGill MR, et al. Liver-specific loss of Atg5 causes persistent activation of Nrf2 and protects against acetaminophen-induced liver injury [J]. *Toxicol Sci*, 2012, 127: 438–450.
- [29] Wang XJ, Sun Z, Chen W, et al. Activation of Nrf2 by arsenite and monomethylarsonous acid is independent of Keap1-C151: enhanced Keap1-Cul3 interaction [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 230: 383–389.
- [30] Lau A, Zheng Y, Tao S, et al. Arsenic inhibits autophagic flux, activating the Nrf2-Keap1 pathway in a p62-dependent manner [J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33: 2436–2446.
- [31] Duran A, Linares JF, Galvez AS, et al. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13: 343–354.
- [32] Zou X, Feng Z, Li Y, et al. Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways [J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23: 994–1006.
- [33] Rhee SG, Bae SH. The antioxidant function of sestrins is mediated by promotion of autophagic degradation of Keap1 and Nrf2 activation and by inhibition of mTORC1 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 88: 205–211.
- [34] Son YO, Pratheeshkumar P, Roy RV, et al. Nrf2/p62 signaling in apoptosis resistance and its role in cadmium-induced carcinogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289: 28660–28675.
- [35] Rubio N, Verrax J, Dewaele M, et al. p38(MAPK)-regulated induction of p62 and NBR1 after photodynamic therapy promotes autophagic clearance of ubiquitin aggregates and reduces reactive oxygen species levels by supporting Nrf2-antioxidant signaling [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 67: 292–303.
- [36] Gjyshi O, Flaherty S, Veetil MV, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces Nrf2 activation in latently infected endothelial cells through SQSTM1 phosphorylation and interaction with polyubiquitinated Keap1 [J]. *J Virol*, 2015, 89: 2268–2286.
- [37] Wang L, Ebrahimi K, Chyn M, et al. Biology of p62/sequestosome-1 in age-related macular degeneration (AMD) [M]// Bowes Rickman C, LaVail M, Anderson R, et al. *Retinal Degenerative Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham Heidelberg: Springer, 854: 17–22.
- [38] He Y, Li S, Zhang W, et al. Dysregulated autophagy increased melanocyte sensitivity to H₂O₂-induced oxidative stress in vitiligo [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42394.
- [39] Chang Y, Li S, Guo W, et al. Simvastatin protects human melanocytes from H₂O₂-induced oxidative stress by activating Nrf2 [J]. *J Invest Dermatol*, 2017, 137: 1286–1296.
- [40] Shah ZA, Li RC, Thimmulappa RK, et al. Role of reactive oxygen species in modulation of Nrf2 following ischemic reperfusion injury [J]. *Neuroscience*, 2007, 147: 53–59.

- [41] Rojo AI, Innamorato NG, Martín-Moreno AM, et al. Nrf2 regulates microglial dynamics and neuroinflammation in experimental Parkinson's disease [J]. *Glia*, 2010, 58: 588–598.
- [42] Calkins MJ, Vargas MR, Johnson DA, et al. Astrocyte-specific overexpression of Nrf2 protects striatal neurons from mitochondrial complex II inhibition [J]. *Toxicol Sci*, 2010, 115: 557–568.
- [43] Hensley K, Harris-White ME. Redox regulation of autophagy in healthy brain and neurodegeneration [J]. *Neurobiol Dis*, 2015, 84: 50–59.
- [44] Tanji K, Maruyama A, Odagiri S, et al. Keap1 is localized in neuronal and glial cytoplasmic inclusions in various neurodegenerative diseases [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2013, 72: 18–28.
- [45] Tanji K, Miki Y, Ozaki T, et al. Phosphorylation of serine 349 of p62 in Alzheimer's disease brain [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2014, 2: 50.
- [46] Wang S, Chen Y, Kou R, et al. Carbon disulfide activates p62-Nrf2-keap1 pathway in rat nerve tissues [J]. *Toxicology*, 2016, 368–369: 19–27.
- [47] Kosaka K, Mimura J, Itoh K, et al. Role of Nrf2 and p62/ZIP in the neurite outgrowth by carnosic acid in PC12h cells [J]. *J Biochem*, 2010, 147: 73–81.
- [48] Ramsey CP, Glass CA, Montgomery MB, et al. Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases [J]. *Neuropathol Exp Neurol*, 2007, 66: 75–85.
- [49] Ramesh Babu J, Lamar Seibenhener M, Peng J, et al. Genetic inactivation of p62 leads to accumulation of hyperphosphorylated tau and neurodegeneration [J]. *J Neurochem*, 2008, 106: 107–120.
- [50] Jing X, Shi H, Zhang C, et al. Dimethyl fumarate attenuates 6-OHDA-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells and in animal model of Parkinson's disease by enhancing Nrf2 activity [J]. *Neuroscience*, 2015, 286: 131–140.
- [51] Poulouse SM, Bielinski DF, Shukitt-Hale B. Walnut diet reduces accumulation of polyubiquitinated proteins and inflammation in the brain of aged rats [J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24: 912–919.
- [52] Poulouse SM, Bielinski DF, Carey A, et al. Modulation of oxidative stress, inflammation, autophagy and expression of Nrf2 in hippocampus and frontal cortex of rats fed with açai-enriched diets [J]. *Nutr Neurosci*, 2017, 20: 305–315.
- [53] Lastres-Becker I, García-Yagüe AJ, Scannevin RH, et al. Repurposing the NRF2 activator dimethyl fumarate as therapy against synucleinopathy in Parkinson's disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 25: 61–77.
- [54] Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. *Autophagy*, 2016, 12: 1–222.
- [55] Nikolettou V, Papandreou ME, Tavernarakis N. Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22: 398–407.
- [56] Satoh K, Satoh T, Kikuchi N, et al. Basigin mediates pulmonary hypertension by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *Circ Res*, 2014, 115: 738–750.
- [57] Chen QM, Maltagliati AJ. Nrf2 at the heart of oxidative stress and cardiac protection [J]. *Physiol Genomics*, 2018, 50: 77–97.
- [58] Strom J, Xu B, Tian X, et al. Nrf2 protects mitochondrial decay by oxidative stress [J]. *FASEB J*, 2016, 30: 66–80.
- [59] Choi SH, Park S, Oh CJ, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition by gemigliptin prevents abnormal vascular remodeling via NF-E2-related factor 2 activation [J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 73: 11–19.
- [60] Sugimoto R, Warabi E, Katayanagi S, et al. Enhanced neointimal hyperplasia and carotid artery remodeling in sequestosome 1 deficient mice [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14: 1546–1554.
- [61] Sun G, Li Y, Ji Z. Atorvastatin attenuates inflammation and oxidative stress induced by ischemia/reperfusion in rat heart via the Nrf2 transcription factor [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8: 14837–14845.
- [62] He X, Kan H, Cai L, et al. Nrf2 is critical in defense against high glucose-induced oxidative damage in cardiomyocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 46: 47–58.
- [63] Yates MS, Tauchi M, Katsuoka F, et al. Pharmacodynamic characterization of chemopreventive triterpenoids as exceptionally potent inducers of Nrf2-regulated genes [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6: 154–162.
- [64] Zhao Y, Song W, Wang Z, et al. Resveratrol attenuates testicular apoptosis in type 1 diabetic mice: role of Akt-mediated Nrf2 activation and p62-dependent Keap1 degradation [J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 609–617.
- [65] Zakkar M, Van der Heiden K, Luong le A, et al. Activation of Nrf2 in endothelial cells protects arteries from exhibiting a proinflammatory state [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29: 1851–1857.
- [66] Ruotsalainen AK, Inkala M, Partanen ME, et al. The absence of macrophage Nrf2 promotes early atherogenesis [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 98: 107–115.
- [67] Sergin I, Bhattacharya S, Emanuel R, et al. Inclusion bodies enriched for p62 and polyubiquitinated proteins in macro-

- phages protect against atherosclerosis [J]. *Sci Signal*, 2016, 9: ra2.
- [68] Johansson I, Monsen VT, Pettersen K, et al. The marine n-3 PUFA DHA evokes cytoprotection against oxidative stress and protein misfolding by inducing autophagy and NFE2L2 in human retinal pigment epithelial cells [J]. *Autophagy*, 2015, 11: 1636–1651.
- [69] Mildenerger J, Johansson I, Sergin I, et al. N-3 PUFAs induce inflammatory tolerance by formation of KEAP1-containing SQSTM1/p62-bodies and activation of NFE2L2 [J]. *Autophagy*, 2017, 13: 1664–1678.
- [70] Yoshida GJ. Therapeutic strategies of drug repositioning targeting autophagy to induce cancer cell death: from pathophysiology to treatment [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10: 67.
- [71] Stumptner C, Heid H, Fuchsbichler A, et al. Analysis of intracytoplasmic hyaline bodies in a hepatocellular carcinoma. Demonstration of p62 as major constituent [J]. *Am J Pathol*, 1999, 154: 1701–1710.
- [72] Sabbieti MG, Agas D, Capitani M, et al. Plasmid DNA-coding p62 as a bone effective anti-inflammatory/anabolic agent [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 3590–3599.
- [73] Bao LJ, Jaramillo MC, Zhang ZB, et al. Nrf2 induces cisplatin resistance through activation of autophagy in ovarian carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7: 1502–1513.
- [74] Padmanabhan B, Tong KI, Ohta T, et al. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer [J]. *Mol Cell*, 2006, 21: 689–700.
- [75] Cho HY, Kim K, Kim YB, et al. Expression patterns of Nrf2 and Keap1 in ovarian cancer cells and their prognostic role in disease recurrence and patient survival [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2017, 27: 412–419.
- [76] Tong YH, Zhang B, Yan YY, et al. Dual-negative expression of Nrf2 and NQO1 predicts superior outcomes in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 45750–45758.
- [77] Mostafavi-Pour Z, Ramezani F, Keshavarzi F, et al. The role of quercetin and vitamin C in Nrf2-dependent oxidative stress production in breast cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13: 1965–1973.
- [78] Ishikawa T. Genetic polymorphism in the NRF2 gene as a prognosis marker for cancer chemotherapy [J]. *Front Genet*, 2014, 5: 383.
- [79] Taguchi K, Yamamoto M. The KEAP1-NRF2 system in cancer [J]. *Front Oncol*, 2017, 7: 85.
- [80] Kawasaki Y, Ishigami S, Arigami T, et al. Clinicopathological significance of nuclear factor (erythroid-2)-related factor 2 (Nrf2) expression in gastric cancer [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 5.
- [81] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 3983–3988.
- [82] Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M. Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2013, 34: 340–346.
- [83] Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets [J]. *Nat Genet*, 2015, 47: 505–511.
- [84] Umemura A, He F, Taniguchi K, et al. p62, upregulated during preneoplasia, induces hepatocellular carcinogenesis by maintaining survival of stressed HCC-initiating cells [J]. *Cancer Cell*, 2016, 29: 935–948.
- [85] Wei Y, Liu D, Jin X, et al. PA-MSHA inhibits the growth of doxorubicin-resistant MCF-7/ADR human breast cancer cells by downregulating Nrf2/p62 [J]. *Cancer Med*, 2016, 5: 3520–3531.
- [86] Saito T, Ichimura Y, Taguchi K, et al. p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12030.
- [87] Xia M, Yu H, Gu S, et al. p62/SQSTM1 is involved in cisplatin resistance in human ovarian cancer cells *via* the Keap1-Nrf2-ARE system [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45: 2341–2348.