

## TRIB3 激活 NRF2 促进肺癌细胞增殖并抑制其凋亡

余娇娇, 张 诚, 向昱瑾, 胡卓伟, 崔 冰\*, 花 芳\*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室,  
中国医学科学院代谢紊乱和肿瘤发生相关机制和靶点发现重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 核转录因子 NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 是调控细胞氧化还原稳态的重要蛋白。NRF2 异常激活所致抗氧化能力提高是导致肿瘤恶性进程和耐药形成的关键原因。本文旨在探究应激蛋白 TRIB3 (tribbles homolog 3) 调节氧化应激, 促进肺癌细胞增殖并抑制其凋亡的分子机制。本研究首先对癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 数据库中 576 个肺癌临床样本进行生物信息学分析, 发现 TRIB3 高表达肺癌患者 NRF2-ARE (antioxidant response element) 信号通路活化。双荧光素酶报告基因实验和实时荧光定量 PCR 检测证实 TRIB3 促进核转录因子 NRF2 的转录激活活性, 上调其下游靶基因表达。机制及生物学验证研究结果表明, TRIB3 主要通过干扰 KEAP1 (kelch-like ECH-associated protein-1)-NRF2 相互作用, 进而增强 NRF2 稳定性。敲低 TRIB3 促进活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 产生, 抑制细胞生长并增加卡铂引起的细胞凋亡; 过表达 NRF2 可逆转敲低 TRIB3 产生的抑增殖、促凋亡效应; 而在 NRF2 敲低的肿瘤细胞中, 抑制 TRIB3 并不影响肿瘤细胞的增殖和凋亡水平。综上, 本研究表明, 应激蛋白 TRIB3 抑制 KEAP1-NRF2 相互作用, 继而上调 NRF2 转录激活活性, 促进肿瘤增殖并降低化疗药物敏感性; 靶向 TRIB3-NRF2 信号轴可能成为治疗肺癌的新策略。

**关键词:** TRIB3; 氧化应激; 蛋白相互作用; NRF2; 增殖; 凋亡

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)05-1352-08

## TRIB3 promotes lung cancer cell survival and inhibits apoptosis through NRF2 activation

YU Jiao-jiao, ZHANG Cheng, XIANG Yu-jin, HU Zhuo-wei, CUI Bing\*, HUA Fang\*

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, CAMS Key Laboratory of Molecular Mechanism and Target Discovery of Metabolic Disorder and Tumorigenesis, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** The nuclear transcription factor nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) plays a crucial role in maintaining cellular redox homeostasis. The aberrant NRF2 signaling confers enhanced antioxidant capacity, which is linked to tumor progression and therapeutic resistance. The current study investigates the biological effects and molecular mechanism of tribbles homolog 3 (TRIB3), a stress-induced protein, in regulating cell survival and apoptosis in lung cancer. This study first performed the RNA sequencing data analysis with 576 lung adenocarcinoma patients from the cancer genome atlas (TCGA) database. The NRF2- antioxidant response element (ARE) signature was enriched in patients with high TRIB3 expression. Dual-luciferase reporter assay and real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) were used to confirm the effect of TRIB3 on the kelch-like ECH-associated

收稿日期: 2021-02-05; 修回日期: 2021-03-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973344, 81874316, 81703564); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2016-I2M-1-007, 2016-I2M-3-008); 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费 (2017PT31046, 2018RC350004); 北京高校卓越青年科学家项目 (BJJW-ZYJH01201910023028).

\*通讯作者 Tel: 86-10-83161187, E-mail: cuibing@imm.ac.cn; huafang@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0187

protein-1 (KEAP1)-NRF2 pathway. Abrogation of *TRIB3* impaired NRF2 transcriptional activity and reduced the expression of its target genes. Moreover, TRIB3 enhanced NRF2 stability *via* blocking KEAP1-NRF2 interaction. *TRIB3*-depletion promoted reactive oxygen species (ROS) production, restrained cell proliferation, and enhanced carboplatin-induced apoptosis. In addition, *NRF2* overexpression recovered the tumor inhibition effect of *TRIB3*-depletion. Consistently, TRIB3 failed to modulate apoptosis in *NRF2* depletion cells. In summary, this study shows that TRIB3 inhibits the KEAP1-NRF2 interaction and upregulates the transcriptional activity of NRF2, thereby promoting lung cancer cell proliferation and reducing the sensitivity to chemotherapy. Targeting the TRIB3-NRF2 signal axis may become a new strategy for ROS homeostasis and lung cancer treatment.

**Key words:** TRIB3; oxidative stress; protein-protein interaction; NRF2; proliferation; apoptosis

在肿瘤快速增殖过程中,肿瘤细胞常处于缺氧、营养匮乏、内质网应激等应激环境中。这些应激因素均能引起细胞内大量活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 产生。研究发现,肿瘤细胞内适度的 ROS 可通过激活癌基因和诱导肿瘤免疫逃逸等多种机制促进肿瘤生长和转移。然而,当氧化应激信号持续过度活化导致肿瘤细胞内 ROS 水平超过死亡阈值时,肿瘤细胞则会发生凋亡<sup>[1]</sup>。肺癌治疗中常用的化疗药物如顺铂、卡铂等均可通过诱导细胞内 ROS 大量产生,激活凋亡信号通路,发挥抗肿瘤作用<sup>[2]</sup>。为维持应激条件下的存活以及抵抗化疗药物的杀伤作用,肿瘤细胞会启动细胞内抗氧化体系程序,进而恢复肿瘤细胞内氧化还原态。由此可见,肿瘤细胞抗氧化能力增强与肿瘤的发生和发展,特别是耐药产生密切相关。

核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2) 是细胞抗氧化应激体系中关键的转录因子,在维护细胞内氧化还原平衡稳态中发挥关键作用<sup>[3,4]</sup>。正常生理条件下, NRF2 在细胞质中与 kelch 样环氧丙烷相关蛋白-1 (kelch-like ECH-associated protein-1, KEAP1) 结合,处于易降解、非活性状态。氧化应激状态时, NRF2 与 KEAP1 解离并转位至细胞核,与细胞核内抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 结合,启动下游抗氧化相关基因的转录<sup>[4]</sup>。研究发现, NRF2 信号通路在肺癌、肝癌等多种实体肿瘤发生发展过程中均存在异常活化的现象<sup>[5-8]</sup>。异常活化的 NRF2 不仅介导细胞内氧化还原稳态维持,同时促进肿瘤细胞代谢重编程并重塑免疫微环境,促进肿瘤发生发展和肿瘤耐药的发生<sup>[9]</sup>。然而,调控肿瘤细胞内 NRF2 异常活化的机制尚未完全阐明。

假性激酶 TRIB3 (tribbles homolog 3) 作为压力和代谢应激蛋白在肿瘤的发生发展过程中具有重要作用。内质网应激、糖剥夺、缺氧及炎症因子刺激等多种应激条件均能上调 TRIB3 表达<sup>[6,7,10,11]</sup>。肿瘤细胞内高表达的 TRIB3 可通过自噬抑制、肿瘤干性增强、促癌因子降低老化反应等多种机制促进肝癌、结肠癌、肺癌、

乳腺癌、白血病和黑色素瘤等多种肿瘤的发生和发展进程<sup>[10-17]</sup>。

研究团队近期研究结果发现, TRIB3 与表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR) 相互作用,促进肺癌细胞生长,降低化疗药物的敏感性<sup>[13]</sup>。进一步通过基因富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA) 等研究手段发现, NRF2 信号在 TRIB3 高表达的肺癌患者中显著富集。敲低 *TRIB3* 显著增加肿瘤细胞内 ROS 的产生。基于以上研究证据,本研究从调控氧化还原稳态的角度阐明在应激条件下的 TRIB3 促进肿瘤细胞存活并抑制其凋亡的分子机制,进一步完善 TRIB3 促进肺癌恶性进展的研究。本研究将有助于阐明肿瘤细胞内氧化还原应激调控的关键机制,为开发新型肺癌治疗策略提供理论基础。

## 材料与方法

**试剂** 放线菌酮 (cycloheximide, CHX; 货号 C104450, Sigma-Aldrich 公司); 胰酶、胎牛血清、RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基和 IMDM 培养基 (Gibco 公司); 转染试剂 VigoFect (货号 T001, 北京威格拉斯生物技术有限公司); protein A/G 琼脂糖珠 (货号 sc-2003, Santa Cruz 公司); Lipofectamine LTX with Plus Reagent 转染试剂 (货号 15338100) 和 Lipofectamine™ RNAiMAX 转染试剂 (货号 13778150) (美国 Invitrogen 公司); qPCR (real-time quantitative PCR) 引物 (睿博兴科生物技术有限公司); BCA (bicinchoninic acid) 法蛋白质定量试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司); TransZol Up、EasyScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 逆转录试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司); KAPA SYBR® fast qPCR 试剂盒 (美国 KAPA Biosystems 公司); 活性氧检测试剂盒 (碧云天生物技术有限公司); NRF2 抗体和 KEAP1 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司); TRIB3 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, Proteintech group); 抗 DDK、GFP 和 HA 抗体 (北京博尔迈生物技术有限公司);

GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 抗体和辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记二抗 (中杉金桥生物技术有限公司)。

**细胞培养** 人肺癌细胞系 NCI-H157、PC-9 和 NCI-H1975 (中国医学科学院基础医学研究所细胞中心), 培养于 RPMI-1640 培养基 (含 10% 胎牛血清、青霉素  $100 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、链霉素  $100 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); 人胚肾细胞 HEK293T 由本实验室长期保存, 培养于含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基; 所有细胞置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中。

**质粒** pGMARE-luc 质粒 (上海翊圣生物科技有限公司); KEAP1-HA、NRF2-DDK、TRIB3-GFP、TRIB3-HA、Ub-GFP 和 pRL-TK 质粒由实验室长期保存; pGMARE-luc 基因质粒 (上海翊圣生物科技有限公司)。

**主要仪器** 电泳仪 (六一仪器厂); 冷冻高速离心机 (美国 Beckman 公司); 5200 全自动化学发光成像系统 (上海天能科技有限公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); 激光共聚焦显微镜 (日本奥林巴斯公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司); Countstar 细胞计数仪 (上海睿钰生物科技有限公司)。

**质粒转染** HEK293T 细胞采用 VigoFect 转染试剂进行质粒转染, 培养细胞密度达到 70% 时,  $10 \mu\text{g}$  质粒稀释至  $200 \mu\text{L}$  IMDM 培养基中, 轻轻混匀; 将  $4 \mu\text{L}$  VigoFect 转染试剂稀释至  $200 \mu\text{L}$  IMDM 培养基中, 轻轻混匀, 室温放置 5 min; 将稀释的 VigoFect 逐滴加入稀释的质粒中, 轻轻混匀, 室温放置 15 min; 将混匀的转染工作液逐滴加到细胞中, 转染后 24~72 h 检测质粒表达情况。PC9 细胞采用 Lipofectamine™ LTX Reagent 转染试剂进行质粒转染, 将适量细胞接种于 6 孔板中, 待其密度合适时, 将  $2.5 \mu\text{g}$  质粒稀释于  $250 \mu\text{L}$  Opti-MEM 培养基中, 轻轻混匀; 加入  $3 \mu\text{L}$  PLUS™ Reagent, 混匀后室温孵育 5 min; 加入  $9 \mu\text{L}$  Lipofectamine™ LTX Reagent, 轻轻混匀, 室温孵育 30 min 后滴加到细胞中, 转染后 24~72 h 检测质粒表达情况。

**siRNA 转染** TRIB3 siRNA 和 NRF2 siRNA 由广州锐博生物科技有限公司合成, 序列如下: si-h-TRIB3\_001, CCAGAAACGAGCTCGAAGT, si-h-TRIB3\_002, GTCGCTTTGTCTTCGCTGA; si-h-NRF2\_001, CGTTTGATGACAATGA, si-h-NRF2\_002, GAGAAAG AATTGCCTGTAA。将适量细胞接种于 6 孔板中, 待其密度合适时, 将 TRIB3 siRNA 或 NRF2 siRNA 稀释于  $150 \mu\text{L}$  RPMI-1640 培养基中; 将 Lipofectamine RNAi MAX  $9 \mu\text{L}$  稀释于  $150 \mu\text{L}$  RPMI-1640 培养基中; 室温孵育 5 min 后, 将含有 siRNA 的培养基滴加到含有 Lipofectamine RNAi MAX 的培养基中, 轻轻混匀, 室温孵育 30 min 后滴加到细胞中, 转染后 24~72 h 检

测 siRNA 表达情况。

**蛋白质免疫印迹 (Western blot)** PBS (phosphate buffered saline) 清洗并收集细胞, 加入一定体积的 RIPA (radio immunoprecipitation assay) 裂解液, 冰上裂解 30 min, 于  $12\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 30 min 后, 取上清。BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白定量后, 用 RIPA 裂解液调整至均一浓度, 加入  $5\times$  上样缓冲液于  $98^\circ\text{C}$  变性 10 min。蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 湿法转膜。PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜用含 5% 脱脂奶粉的 TBST (tris-buffered saline with tween 20) 封闭 1 h, 加入特异性抗体  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。次晨, TBST 洗膜 3 次 (每次 10 min), 加入对应二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次。完成洗膜后, PVDF 膜表面加 ECL (electrochemiluminescence) 发光液, 置于 Tanon 5200 全自动化学发光成像系统中曝光拍照。

**实时荧光定量 PCR** 采用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 并根据全式金 EasyScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 逆转录试剂盒说明书将总 RNA 逆转录至 cDNA。按照 KAPA SYBR® fast qPCR 试剂盒说明书配制 qPCR 反应体系并进行反应。以 GAPDH 作为内参, 按照  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法进行数据处理。引物由睿博兴科生物技术有限公司合成, 序列如下所示: TRIB3-F: 5'-GCTTTGTCTTCGCTGACCGTGA-3', TRIB3-R: 5'-CTGAGTATCTCAGGTCCCACGT-3'; HMOX1 (heme oxygenase 1)-F: 5'-CCAGGCAGAGAATGCTGAGTTC-3', HMOX1-R: 5'-AAGACTGGGCTCTCCTTGTTC-3'; NQO1 [NADP(H):quinone oxidoreductase 1]-F: 5'-CCTGCCATTCTGAAAGGCTGGT-3', NQO1-R: 5'-GTGGTGATGGAAAGCACTGCCT-3'; GCLC (glutamate-cysteine ligase catalytic subunit)-F: 5'-GGAAGTGATGTGGACACCAGA-3', GCLC-R: 5'-GCTTGTAGTCAGGATGGTTTTCG-3'; GCLM (glutamate-cysteine ligase modifier subunit)-F: 5'-TCTTGCCCTCTGCTGTGTGATG-3', GCLM-R: 5'-TTGGAACTTGCTTCAGAAAGCAG-3'; GAPDH-F: 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3', GAPDH-R: 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCAA-3'。

**免疫共沉淀实验 (co-immunoprecipitation, CO-IP)** 当培养细胞密度达到 70% 时, 按照 VigoFect 说明书进行质粒转染, 转染 24~48 h 后收集细胞, 加入含蛋白酶抑制剂的 CO-IP 裂解液, 冰上裂解 30 min。离心后取上清, 获得总蛋白样品。吸取少量裂解液用于 Western blot 分析, 剩余裂解液加入  $3 \mu\text{g}$  抗体和  $20 \mu\text{L}$  protein A/G 琼脂糖珠, 于  $4^\circ\text{C}$  缓慢旋转过夜。次日, 使用 CO-IP 洗液清洗 4 次, 小心吸除上清, 留沉淀。加入

2×上样缓冲液, 98 °C变性 10 min, 样品进行 Western blot 分析。CO-IP 裂解液配方: 25 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl、150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、0.5% NP40、2.5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA 和 5% glycerol; CO-IP 洗液配方: 25 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl、150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、0.25% NP40、2.5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA 和 5% glycerol。

**细胞增殖检测** 实验采用 Countstar 细胞计数仪测定细胞增殖情况。向对数生长期细胞转染相应 siRNA 或过表达质粒, 在指定时间点消化细胞, 将细胞样本与 0.2% 台盼蓝按照 1:1 比例混匀染色后, 立即吸取 20 μL 样本加入计数板对应样本槽中, 将计数板插入载物台中进行测定, 计算细胞数目。

**细胞凋亡检测** 转染特定 siRNA 且状态良好的细胞给予化疗药物卡铂 (30 μmol·L<sup>-1</sup>) 刺激。18 h 后, 采用 Annexin V 633 细胞凋亡检测试剂盒 (日本同仁化学研究所) 测定肿瘤细胞凋亡情况。

**细胞 ROS 检测** 实验采用活性氧检测试剂盒测定细胞内 ROS。对数生长期细胞加入终浓度为 10 μmol·L<sup>-1</sup> DCFH-DA (2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate), 在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中于 37 °C 孵育 30 min 后, PBS 洗 3 次, 选择激发波长 488 nm 及发射波长 525 nm 条件, 分别采用激光共聚焦显微镜和流式细胞仪进行检测。

**GSEA 分析** 从 UCSC Xena 平台 (<https://xena.ucsc.edu/>) 获取癌症基因组图谱 TCGA 数据库肺癌相关数据 LUAD HiSeqV2\_PANCAN ( $n = 576$ )。按照 *TRIB3* 表达高低将肺癌患者分为 *TRIB3* 高表达组 (90%~100%,  $n = 58$ ) 和 *TRIB3* 低表达组 (0%~10%,  $n = 58$ )。获取 GSEA 平台 NRF2\_01 数据集 (<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>), 使用 GSEA v4.1.0 for Windows 软件进行信号通路分析, FDR  $q$  (false discovery rate  $q$  value) < 0.25 视为具有显著性差异。

**统计学分析** 实验平均重复 3 次以上, 数据以平均值 ± 标准误 [mean ± SEM (standard error of the mean)] 表示, 使用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析, 组间比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  视为有统计学差异。

## 结果

### 1 *TRIB3* 增强 NRF2 转录激活活性

基于 TCGA 数据库肺癌数据信息, 将肺癌患者分为 *TRIB3* 高表达组 (90%~100%,  $n = 58$ ) 和 *TRIB3* 低表达组 (0%~10%,  $n = 58$ )。采用 GSEA 基因富集方法分析 *TRIB3* 和 NRF2 信号之间的关系, 结果显示, *TRIB3* 高表达组患者 NRF2 信号显著富集 (图 1A)。采用基因载体 pGMARE-luc 和对照报告基因载体 pRL-TK 共转

染 *TRIB3*, 发现在 *TRIB3* 低表达的人非小细胞肺癌 NCI-H157 细胞中, 过表达 *TRIB3* 可增强 NRF2 的转录激活活性 (图 1B); 在 *TRIB3* 高表达的人非小细胞肺癌 PC9 细胞上, 敲低 *TRIB3* 则抑制 NRF2 的转录激活活性 (图 1C)。进一步采用荧光实时定量 PCR 检测 *TRIB3* 对 NRF2 靶基因转录的影响, 结果显示, 在 NCI-H157 细胞中过表达 *TRIB3* 后, NRF2 抗氧化的靶基因即血红素氧合酶-1 (*HMOX1*)、苯琨还原酶 1 (*NQO1*)、谷氨酰半胱氨酸连接酶催化亚基 (*GCLC*) 和谷氨酰半胱氨酸连接酶修饰亚基 (*GCLM*) 的表达均显著增加 (图 1D)。在 PC9 细胞中敲低 *TRIB3* 后, 上述 NRF2 靶基因的表达显著降低 (图 1E)。上述结果提示, *TRIB3* 在非小细胞肺癌中能够增强 NRF2 的转录激活活性, 促进其下游靶基因表达。

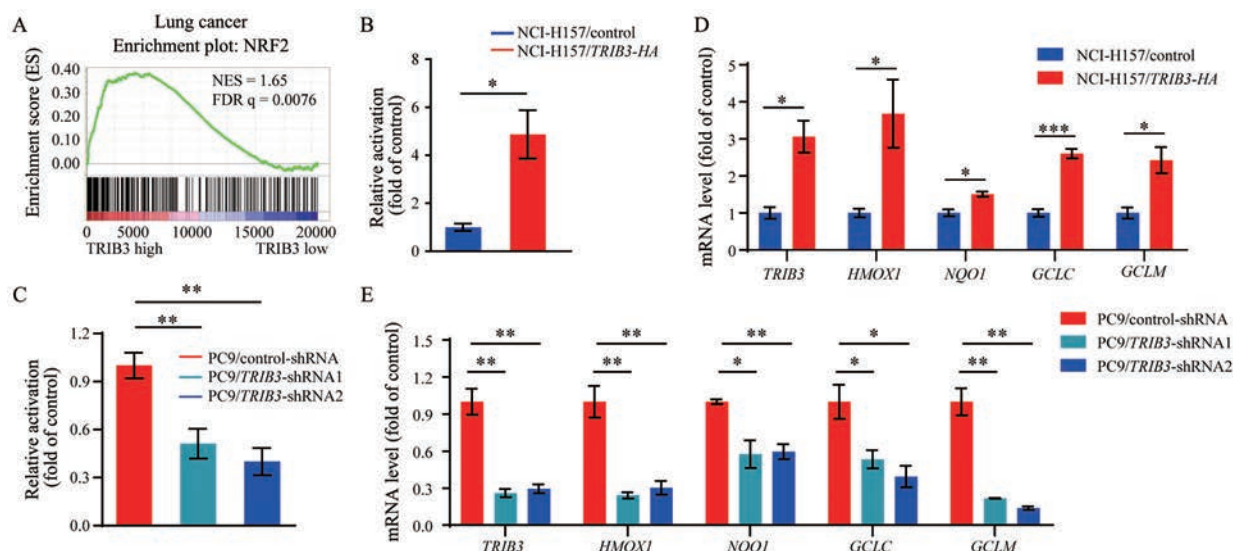
### 2 *TRIB3* 解除 KEAP1-NRF2 相互作用并增强 NRF2 稳定性

为明确 *TRIB3* 增强 NRF2 转录激活活性是否与其上调 NRF2 表达相关, 采用免疫印迹检测 *TRIB3* 对 NRF2 表达的影响。结果发现, NCI-H157 过表达 *TRIB3* 上调 NRF2 蛋白表达; 而在 PC9 和 NCI-H1975 细胞上敲低 *TRIB3* 可明显减少 NRF2 表达量 (图 2A)。实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 敲低 *TRIB3* 并不影响 NRF2 的 mRNA 水平 (图 2B), 提示 *TRIB3* 可能通过调节 NRF2 蛋白稳定性上调其表达。为验证上述假说, 采用蛋白合成抑制剂放线菌酮 (CHX) 阻断 NRF2 从头合成途径, 进而检测 *TRIB3* 对 NRF2 稳定性的影响。结果显示, 敲低 *TRIB3* 后, NRF2 蛋白降解半衰期缩短, 稳定性下降 (图 2C)。以上结果提示, *TRIB3* 通过增强 NRF2 稳定性上调其蛋白表达。

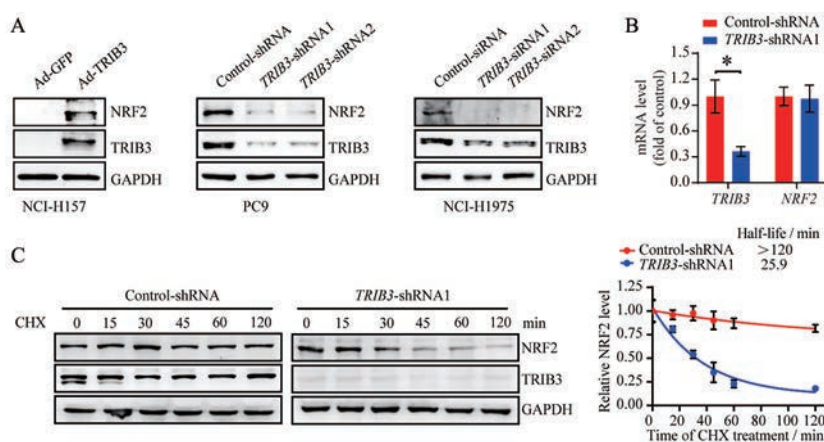
研究发现, KEAP1 经泛素连接酶 cullin3 介导的 NRF2 泛素化是促进 NRF2 降解的主要途径<sup>[4,18,19]</sup>。在非小细胞肺癌 PC9 中进行的免疫共沉淀研究发现, *TRIB3* 与 KEAP1 具有相互作用 (图 3A), 而 *TRIB3* 与 KEAP1 之间的相互作用可抑制 KEAP1-NRF2 相互作用 (图 3B), 进而抑制 NRF2 泛素化 (图 3C)。这些结果提示, *TRIB3* 主要通过抑制 KEAP1-NRF2 相互作用, 增强 NRF2 稳定性, 进而促进 NRF2 表达。

### 3 *TRIB3* 介导的促增殖、抗凋亡作用与其上调 NRF2 水平相关

为确认 *TRIB3* 通过维持 NRF2 稳定性降低细胞内氧化还原水平, 进而促进非小细胞肺癌增殖, 作者首先运用 DCFH-DA 活性氧荧光探针检测细胞内氧化还原水平。结果显示, 敲低肺癌细胞 PC9 中 *TRIB3* 后, 肿瘤细胞内 DCF 荧光强度显著增加 (图 4A、B)。采用 Countstar 细胞计数仪测定细胞增殖情况, 发现对照细胞敲低



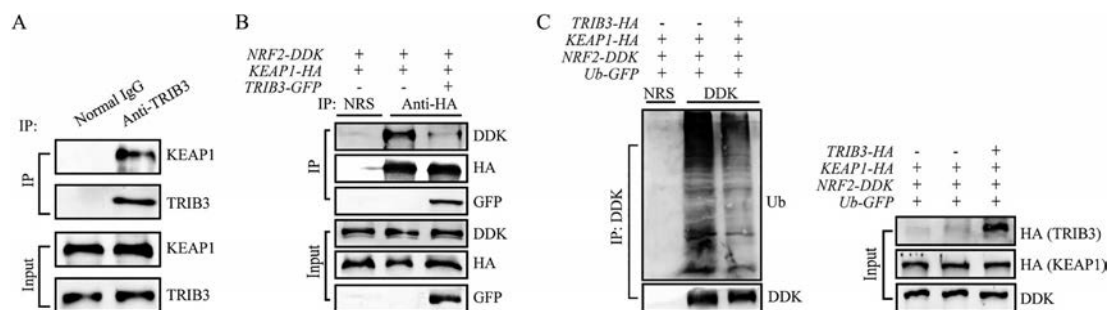
**Figure 1** Tribbles homolog 3 (TRIB3) promotes the transcriptional activity of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) and enhances NRF2 antioxidative targets expression. A: Gene set enrichment (GSEA) enrichment plot for *NRF2* gene signatures in *TRIB3* high group and *TRIB3* low group of lung adenocarcinoma patients from the cancer genome atlas (TCGA) database; B: Transcriptional activity of NRF2 in NCI-H157 cells with or without *TRIB3* overexpression was measured by antioxidant response element (ARE)-driven luciferase report assay; C: Transcriptional activity of NRF2 in PC9 cells stably expressed control-shRNA or *TRIB3*-shRNA; D: Relative mRNA fold change of NRF2 downstream genes in NCI-H157 cells with or without *TRIB3* overexpression; E: Relative mRNA fold change of NRF2 downstream genes in PC9 cells stably expressed control-shRNA or *TRIB3*-shRNA.  $n = 3$ , mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . HMOX1: Heme oxygenase 1; NQO1: NADP(H):quinone oxidoreductase 1; GCLC: Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit; GCLM: Glutamate-cysteine ligase modifier subunit; shRNA: Short hairpin RNA



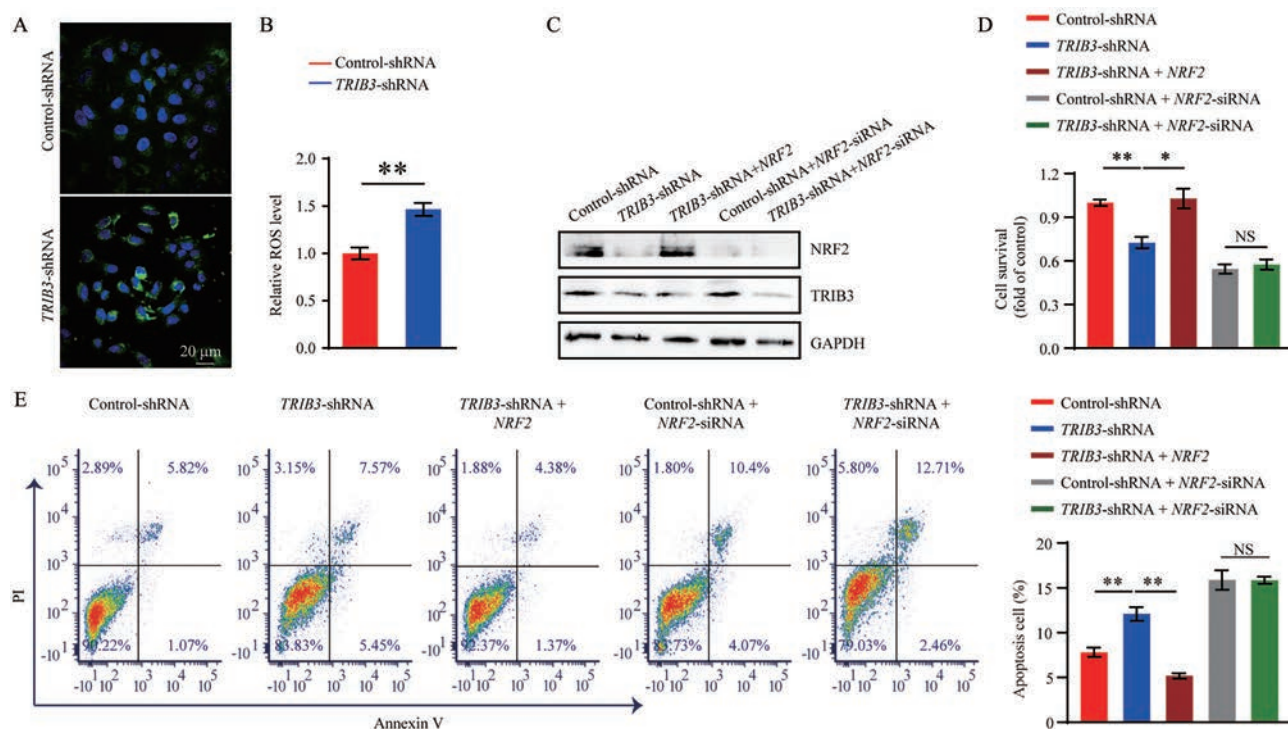
**Figure 2** TRIB3 inhibits the degradation of NRF2. A: Western blot analyses of TRIB3 and NRF2 expression in the indicated NSCLC cell lines with TRIB3 manipulation; B: *NRF2* and *TRIB3* mRNA expression in control or *TRIB3*-silenced PC9 cells were determined by real-time quantitative PCR (qPCR); C: Control or *TRIB3*-silenced PC9 cells were treated with cycloheximide (CHX) at indicated intervals, and protein stability of NRF2 was analyzed by Western blot.  $n = 3$ , mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ . GFP: Green fluorescent protein; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

*TRIB3* 后, 肿瘤细胞增殖能力显著降低; 过表达 *NRF2* 可逆转敲低 *TRIB3* 引起的细胞增殖速度减慢; 而在 *NRF2* 敲低的肿瘤细胞中抑制 *TRIB3* 并不影响细胞增殖 (图 4C、D)。这些结果说明, 敲低 *TRIB3* 抑制肿瘤细胞增殖, 同时 *TRIB3* 促进肿瘤细胞增殖与其上调 *NRF2* 表达相关。

肺癌治疗中常用的铂类化疗药物, 如顺铂、卡铂等均可通过诱导细胞内产生大量 ROS, 促进凋亡通路活化, 进而发挥抗肿瘤效果。为确认 *TRIB3* 对铂类药物化疗敏感性的影响, 采用 Annexin V 633 细胞凋亡检测试剂盒检测 *TRIB3* 对卡铂所致细胞凋亡的影响。结果发现, 敲低 *TRIB3* 显著增强卡铂诱导的细胞凋亡, 过表



**Figure 3** TRIB3 interrupts the interaction between KEAP1 and NRF2. A: Co-immunoprecipitation (co-IP) assay analyzes the interaction of TRIB3 and KEAP1 in PC9 cells; B: Co-IP assay analyzes the effect of TRIB3 on the interaction between KEAP1 and NRF2; C: Co-IP assay analyzes the effect of TRIB3 on the ubiquitination of NRF2. IgG: Immunoglobulin G; KEAP1: Kelch-like ECH-associated protein-1; DDK: DYKDDDDK tag; NRS: Normal rabbit serum; Ub: Ubiquitin



**Figure 4** NRF2 is required for TRIB3 to restore redox balance and facilitate cancer cell proliferation. A: Immunofluorescent staining of reactive oxygen species (ROS) by 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) in PC9 cells stably expressed control-shRNA or *TRIB3*-shRNA. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ ; B: ROS levels, as indicated by DCF fluorescence, were measured by flow cytometry in control or *TRIB3*-silenced PC9 cells; C: Western blot analyses of TRIB3 and NRF2 expression in the indicated cells; D: Cell proliferation was measured by Countstar cell analyzers in indicated cells transfected with indicated siRNA; E: Apoptosis levels were assessed by Annexin V/PI flow cytometry after 18 h treatment of 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  carboplatin.  $n = 3$ , mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . NS: Non-significance; PI: Propidium iodide

达 *NRF2* 可逆转敲低 *TRIB3* 产生的促凋亡效应; 而在 *NRF2* 敲低的细胞中抑制 *TRIB3* 并不会进一步增强细胞凋亡(图4E)。以上结果表明, *TRIB3* 介导的促增殖、抗凋亡作用与其上调 *NRF2* 水平密切相关。

## 讨论

肺癌是世界范围内发病率和死亡率排名前列的恶性肿瘤, 其中非小细胞肺癌是最为常见的肺癌类型, 约

占肺癌总数的 85% 左右。在过去的 20 年里, 随着分子靶向治疗和免疫治疗的应用, 非小细胞肺癌的临床治疗取得巨大进步。然而, 由于大多数非小细胞肺癌患者由于肿瘤缺乏有效生物标志物及免疫治疗不敏感, 化疗仍为肺癌首选的治疗方式<sup>[20]</sup>。肿瘤复发或化疗耐药问题依然是肺癌治疗面临的主要挑战。在正常细胞中, *NRF2* 是维持氧化还原稳态以抵御外界不良刺激的关键转录因子。在肺癌细胞中, 大量表达转录因子 *NRF2* 不仅促

进肺癌细胞在多种应激条件下增殖,同时引发肺癌耐药发生<sup>[3,7]</sup>。NRF2下游靶基因 *NQO1*、*HMOX1*、*GCLC* 和 *GCLM* 主要介导 NRF2 抗氧化功能,进而维持肿瘤细胞在缺氧、营养匮乏和内质网应激等应激环境中存活。顺铂、卡铂等铂类药物以及泰素、博来霉素、多柔比星等其他常见化疗药物也主要是通过促进 ROS 诱导细胞凋亡产生抗肿瘤作用。上调 NRF2 的下游抗氧化靶基因也因此参与肿瘤细胞化疗药物耐药的形成。不仅如此, NRF2 还可直接上调多药耐药相关蛋白家族成员 MRP1 (multidrug resistance-associated protein 1)、MRP2、MRP3 的表达,共同参与肺癌耐药的形成<sup>[21]</sup>。本研究中,作者发现肿瘤细胞内异常高表达的应激蛋白 TRIB3 通过增强 NRF2 表达调控细胞内氧化还原稳态,进而促进肿瘤在应激条件下存活,同时降低肺癌细胞对化疗药物卡铂的敏感性。靶向 TRIB3 降低其表达可上调细胞内 ROS,进而抑制肺癌增殖并增加化疗药物卡铂的敏感性,因此 TRIB3 可能成为肺癌治疗的新药靶。

假性激酶 TRIB3 具有激酶样结构域,但因缺乏 ATP 结合位点,因而没有激酶活性,主要是通过蛋白-蛋白相互作用发挥生物学效果。作者实验室近年来围绕 TRIB3 的促癌机制展开多项研究,证实 TRIB3 可通过与 p62、PML-RAR $\alpha$ 、 $\beta$ -catenin、EGFR 等关键促肿瘤蛋白相互作用,促进白血病及多种实体肿瘤的恶性进展<sup>[10-17]</sup>。在肺癌中,作者既往研究探讨了 TRIB3 对促增殖信号的影响,证实 TRIB3 通过与 EGFR 相互作用,募集 PKC $\alpha$  与 EGFR 形成复合物,催化 EGFR 发生 Thr654 位磷酸化及后续的 K63 泛素化修饰。这种泛素化修饰促进 EGFR 回膜循环,增强 EGFR 稳定性并促进非小细胞肺癌恶性进展<sup>[13]</sup>。本研究主要从 TRIB3 调控细胞内氧化还原稳态的角度,探讨了在应激条件下 TRIB3 促进肿瘤细胞存活并抑制凋亡的分子机制。本研究结果表明,TRIB3 主要通过 KEAP1 相互作用,抑制 KEAP1-NRF2 相互作用进而增强 NRF2 稳定性、上调 NRF2 表达。明确 TRIB3 与 NRF2 之间的作用关系不仅有助于解析应激条件下肿瘤细胞 NRF2 高表达的分子机制,同时可完善 TRIB3 促进肺癌恶性进展的机制研究。

综上所述,本研究有助于阐明肿瘤细胞内内质网应激及氧化还原应激调控的关键机制,为设计和开发新型抗肿瘤药物并克服肺癌耐药提供了理论基础。

**作者贡献:** 花芳、崔冰负责实验设计和指导,以及提供研究经费支持;余娇娇负责实验方案实施及实验数据采集处理;张诚和向昱瑾参与部分分子生物学实验和细胞实验;胡卓伟审校。

**利益冲突:** 文章内容不涉及相关利益冲突,无作者署名争议。

## References

- [1] Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative stress in cancer [J]. *Cancer Cell*, 2020, 38: 167-197.
- [2] Liu WJ, Du Y, Wen R, et al. Drug resistance to targeted therapeutic strategies in non-small cell lung cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 206: 107438.
- [3] Rojo de la Vega M, Chapman E, Zhang DD. NRF2 and the hallmarks of cancer [J]. *Cancer Cell*, 2018, 34: 21-43.
- [4] Cuadrado A, Rojo AI, Wells G, et al. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18: 295-317.
- [5] Liu Y, Tao S, Liao L, et al. TRIM25 promotes the cell survival and growth of hepatocellular carcinoma through targeting Keap1-Nrf2 pathway [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 348.
- [6] DeNicola GM, Chen PH, Mullarky E, et al. NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer [J]. *Nat Genet*, 2015, 47: 1475-1481.
- [7] Homma S, Ishii Y, Morishima Y, et al. Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15: 3423-3432.
- [8] Zhang L, Chen Q, Wang J. Advances in anti-tumor drug research based on reactive oxygen regulation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1453-1465.
- [9] Abed DA, Goldstein M, Albanyan H, et al. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5: 285-299.
- [10] Hua F, Li K, Yu JJ, et al. TRIB3 links insulin/IGF to tumour promotion by interacting with p62 and impeding autophagic/proteasomal degradations [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7951.
- [11] Cui B, Patrick AE, Leonard LD, et al. Highlights of the 2nd International Symposium on Tribbles and Diseases: tribbles tremble in therapeutics for immunity, metabolism, fundamental cell biology and cancer [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9: 443-454.
- [12] Hua F, Shang S, Yang YW, et al. TRIB3 interacts with  $\beta$ -catenin and TCF4 to increase stem cell features of colorectal cancer stem cells and tumorigenesis [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156: 708-721.e15.
- [13] Yu JJ, Zhou DD, Yang XX, et al. TRIB3-EGFR interaction promotes lung cancer progression and defines a therapeutic target [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 3660.
- [14] Yu JM, Sun W, Wang ZH, et al. TRIB3 supports breast cancer stemness by suppressing FOXO1 degradation and enhancing SOX2 transcription [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 5720.
- [15] Li K, Wang F, Cao WB, et al. TRIB3 promotes APL progression through stabilization of the oncoprotein PML-RAR $\alpha$  and inhibition of p53-mediated senescence [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31: 697-710.e7.
- [16] Li K, Zhang TT, Wang F, et al. Metformin suppresses melanoma

- progression by inhibiting KAT5-mediated SMAD3 acetylation, transcriptional activity and TRIB3 expression [J]. *Oncogene*, 2018, 37: 2967-2981.
- [17] Yeerjiang Z, Wang F, Yang Z, et al. TRIB3 promotes B-ALL progression by suppressing CTSZ-mediated BCR-ABL degradation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2628-2635.
- [18] Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2 [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 7130-7139.
- [19] Zhang DD, Lo SC, Cross JV, et al. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 10941-10953.
- [20] Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer [J]. *Nature*, 2018, 553: 446-454.
- [21] Young LC, Campling BG, Cole SP, et al. Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7: 1798-1804.