

Nrf2 抑制剂在肿瘤治疗中的研究进展

牟伊¹, 宋雨¹, 文帅¹, 王燕¹, 姜正羽^{2*}

(1. 泰州学院医药与化学化工学院, 江苏 泰州 225300; 2. 中国药科大学药学院, 江苏省药物分子设计与成药性优化重点实验室, 江苏 南京 210009)

摘要: 核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 是一种多功能的转录因子, 在细胞保护机制中起着至关重要的作用。随着 Nrf2 调控新模式和新功能研究的不断深入, Nrf2 在恶性肿瘤中的促癌作用日益凸显。越来越多的证据表明 Nrf2 参与了肿瘤的发生、发展、转移和预后的整个过程, 抑制 Nrf2 是一种较有前景的肿瘤治疗策略。目前, Nrf2 抑制剂的研究尚处在早期阶段。本文简要介绍 Nrf2 的生物学功能, 以及其在肿瘤发生中的双重作用, 并根据结构类型对代表性的 Nrf2 抑制剂进行综述, 为围绕 Nrf2 调控开发抗肿瘤药物提供借鉴及思路。

关键词: Nrf2; 肿瘤; 肿瘤化疗; 抑制剂

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)02-0321-10

Research progress of Nrf2 inhibitor in tumor therapy

MOU Yi¹, SONG Yu¹, WEN Shuai¹, WANG Yan¹, JIANG Zheng-yu^{2*}

(1. College of Pharmacy and Chemistry & Chemical Engineering, Taizhou University, Taizhou 225300, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Drug Design and Optimization, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Nrf2 is a multi-effect transcription factor, which plays a crucial role in cytoprotective system. With the deepening of research on new regulatory modes and biologic functions of Nrf2, the oncogenic role of Nrf2 in malignant transformed tumors is increasingly obvious. More and more evidences show that Nrf2 is involved in the whole process of tumor occurrence, development, metastasis and prognosis, and inhibiting Nrf2 may be a promising strategy in tumor therapy. However, the development of Nrf2 inhibitors is still in early stage. In this paper, the biological function of Nrf2 and its dual role in tumor are briefly introduced, and representative Nrf2 inhibitors are reviewed according to their structure types, so as to provide reference and ideas for the development of anti-tumor drugs centering on the regulation of Nrf2.

Key words: Nrf2; tumor; chemotherapy for cancer; inhibitors

核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor, Nrf2) 是一类碱性亮氨酸拉链 (basic region-leucine zipper, bZIP) 转录因子, 由 *NFE2L2* 基因编码^[1]。Nrf2 可与小肌肉筋膜性纤维肉瘤 (small

musculoaponeurotic fibrosarcoma, sMAF) 蛋白形成异源二聚体, 该二聚体可识别并结合位于调控区域的抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 来增强靶基因的转录。一般而言, Nrf2 调控的基因主要参与氧化应激调节, 包括谷胱甘肽系统、硫氧还蛋白抗氧化系统以及 I 相、II 相和 III 相药物代谢相关的酶。通过诱导这些基因的转录, Nrf2 可以激活细胞防御系统, 保护细胞免受外源性和内源性的侵袭。因此 Nrf2 被认为是调节细胞保护系统的核心转录因子^[2]。

收稿日期: 2021-09-15; 修回日期: 2021-11-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81703363); 江苏省高校自然科学基金资助项目 (21KJB350008); 江苏省“六大人才高峰”资助 (YY-110).

*通讯作者 Tel: 86-25-83271351, E-mail: jiangzhengyucpu@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1346

Nrf2除了在细胞保护中发挥重要作用, 其还调节多种功能基因的转录, 特别是细胞代谢相关的基因^[3]。Nrf2通过调控关键酶的表达, 以调节脂类、碳水化合物、核苷酸和氨基酸的代谢。此外, Nrf2还参与调控几种蛋白酶体亚基和自噬基因的表达, 进一步增强了Nrf2在代谢调节网络中的影响。一般而言, Nrf2的激活可增强合成代谢途径, 有利于癌细胞的增殖。在肿瘤发生发展过程中, 激活Nrf2可提高肿瘤细胞的抗氧化能力和药物代谢能力, 从而提高肿瘤细胞的存活率^[4]。此外, Nrf2还参与肿瘤代谢网络改变, 使肿瘤更倾向于有氧酵解^[5]。Nrf2在多种不同类型的肿瘤细胞中过度激活^[6], 这些研究结果进一步证实了Nrf2的致癌作用, 开发Nrf2抑制剂将可能是一种有效肿瘤抑制策略。

然而靶向转录因子的抑制剂开发具有更大的挑战性, 特别是Nrf2复杂的调控网络进一步增加其研究的难度。到目前为止, Nrf2抑制剂的开发仍处于早期阶段。本文主要介绍Nrf2的生物学功能和调控网络以及Nrf2的致癌作用, 并对已报道的Nrf2抑制剂进行综述, 希望能够对Nrf2抑制剂的进一步研究有所帮助。

1 Nrf2的生物学功能和活性调节系统

机体时刻面对各种来源的氧化性和亲电性的化学物质, 这些化学物质可能对组织和细胞产生危害。为降低和缓解这种伤害, 机体形成了一套防御系统, 即严格控制参与应激反应的各种途径。在应激条件下, 防御系统可以感知异常, 上调细胞保护酶基因表达水平, 以抵抗各种有害损伤。在这些应激反应通路中, Nrf2属于bZIP转录因子CNC (cap-n-collar) 亚家族, 是细胞对环境应激反应的主要调节因子^[7]。Nrf2和sMAF蛋白的异源二聚体可以识别并结合位于这些基因上游的顺式调控元件序列(5'-GTGACnnnGC-3'), 从而诱导下游细胞保护酶基因的转录。

Nrf2可同时调控两个最重要的抗氧化系统, 分别为谷胱甘肽(GSH)和硫氧还蛋白依赖性的抗氧化系统^[4]。在谷胱甘肽依赖性的抗氧化系统中, Nrf2可调节GSH的生物合成、利用和相应的再生酶。在GSH的生物合成中, 谷氨酸-半胱氨酸连接酶催化(GCLC)和调节(GCLM)亚基可结合形成异源二聚体, 在催化GSH生物合成中发挥限速作用。Nrf2通过控制GCLC和GCLM的转录, 影响谷胱甘肽的生物合成^[8,9]。谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)可利用谷胱甘肽作为还原剂来减少过氧化物。Nrf2可通过调节GPx-2和GPx-4的表达来调节谷胱甘肽的消耗过程。此外, 谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GSR)也是Nrf2的靶基因之一, 主要负责从氧化态的GSSG转化为还原态的GSH, 维

持还原态和氧化态GSH的平衡。硫氧还蛋白也是一类广泛存在的蛋白质, 可通过半胱氨酸-硫醇-二硫化物交换促进其他蛋白质的还原, 发挥抗氧化剂的作用。硫氧还蛋白抗氧化系统包括硫氧还蛋白(thioredoxin, TXN)、硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TXNRD)和sulfiredoxin(SRXN), 而这些均可被Nrf2调控^[10-13]。

除了这些抗氧化蛋白和酶外, Nrf2还介导一系列药物代谢酶的转录, 包括I相和II相药物代谢酶以及II相代谢相关的药物转运体。这些药物代谢酶可催化多种类型的药物代谢反应, 包括由细胞色素P450蛋白(cytochrome P450 proteins, CYPs)氧化, 醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenases, ALDHs)和醇脱氢酶(alcohol dehydrogenases, ADHs)等介导的氧化反应; 由NAD(P)H还原醌氧化还原酶1(NQO1)和醛酮还原酶(aldo-keto reductases, AKRs)介导的还原反应; 由葡萄糖醛酸转移酶(UDP-glucuronosyltransferases, UGTs)和磺基转移酶(sulfotransferases, SULTs)介导的结合反应, 这些反应几乎涵盖了所有药物代谢过程, 有利于促进肿瘤细胞对药物代谢^[14,15]。Nrf2还可调节NADPH的循环过程^[16]。NADPH是体内重要的还原性物质, 在多种抗氧化和代谢途径中起辅因子作用。值得注意的是, 几乎所有可产生NADPH的酶, 包括葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)、6-葡萄糖磷酸脱氢酶(6-phosphogluconate dehydrogenase, PGD)、异柠檬酸脱氢酶1(isocitrate dehydrogenase 1, IDH1)等都受Nrf2调控^[15]。磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)是一种生成NADPH、五碳糖戊糖以及5-磷酸核糖的糖酵解途径。G6PD和PGD是PPP过程中的关键酶, 可通过PPP途径影响NADPH的生成。Nrf2还可调控PPP中的其他酶, 如酮糖转移酶(Tkt)和醛缩转移酶1(Taldo1)等^[17], 以上研究表明Nrf2在增强PPP中起着关键作用。

由于Nrf2在细胞应激、代谢和氧化还原调节中起中枢性的作用, 细胞内有复杂和精细的Nrf2的活性调节机制。Nrf2是一种组成型表达的蛋白, 在细胞内的半衰期较短, 细胞内有多重降解机制负责Nrf2蛋白的降解, 构成了以Nrf2含量调节为核心的Nrf2活性调节的主导机制^[18]。其中, 泛素E3连接酶Keap1介导的泛素化降解途径是控制Nrf2蛋白水平最主要的途径。Nrf2的Neh2结构域中的两个保守序列ETGE(AA 79-82)和DLG(AA 29-31)是与Keap1的Kelch结构域相互作用的结合位点^[19,20]。“铰链和门闩”模型是Keap1和Nrf2相互作用模式的主要假说^[20]。根据此模型, Nrf2的ETGE序列能够以高亲和力与Keap1结合, 被称为铰链, 而Nrf2的DLG序列与Keap1的亲和力较弱, 被称为门

问。在正常生理状况下, Keap1 同源二聚体同时与 Nrf2 的 ETGE 和 DLG 序列结合, 形成 2:1 的复合物, 锁定在闭合构象。随后, Keap1 的 BTB 结构域与 CUL3 (cullin 3) 的 N 端区域发生相互作用, 组成完整的 E3 泛素连接酶 Keap1-CUL3-RING (CRL^{KEAP1}) 复合物^[21], 执行对 Nrf2 多泛素化标记并促使其被 26S 蛋白酶体快速降解^[22]。Keap1 含有多个高反应活性的半胱氨酸残基^[23]。这些半胱氨酸残基对 Keap1 二聚体与 Nrf2 结合形成三元复合物起重要调节作用。其中典型的是 Keap1 的 BTB 结构域的 Cys151, 以及位于 IVR 结构域的 Cys273 和 Cys288^[24]。当细胞遭到氧化应激或亲电物质攻击时, Keap1 的部分半胱氨酸残基被修饰, 使蛋白构象改变, 不能形成稳定的闭合构象, 而主要处于开放构象^[25]。此构象下, Nrf2 不能被 Keap1 构成的 E3 泛素连接酶复合物泛素化 (图 1)。因此, 当细胞处于氧化应激或是亲电物质含量升高时, Nrf2 蛋白的水平在短时间内迅速升高, Nrf2 随后转移入核, 诱导下游靶基因的表达, 激活细胞内防御系统^[26,27]。

除此之外, β -TRCP 也能在糖原合成激酶 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK-3) 的帮助下介导 Nrf2 的泛素化降解。Nrf2 的 Neh6 结构域含有两段保守序列 DSGIS (AA 334-338) 和 DSAPGS (AA 373-378) 可作为 β -Trecp 蛋白的底物识别序列^[28]。其中位于 DSGIS 序列中的 Ser335 和 Ser338 能够被 GSK-3 磷酸化^[29], 磷酸化的 DSGIS 序列能够被 β -Trecp 识别, 随后 Nrf2 可被 SKP1-CUL1- β -Trecp (SCF ^{β -TRCP}) 复合物泛素化进而通过

蛋白酶体降解。同时, 由于体内的 GSK-3 激酶活性受到 PI3K-Akt 通路的调节, 通过此种模式, 就将 Nrf2 的活性与细胞内和细胞外的多种信号通路建立其调控的关联性。此外, HRD1 也能介导 Nrf2 的泛素化降解并负调控 Nrf2 活性^[30]。例如, 在肝硬化等导致内质网应激时, HRD1 水平上调并导致 Nrf2 泛素化增加以及 Nrf2 介导的抗氧化通路受损^[30]。另外, CRIF1 也能促进 Nrf2 的泛素化降解, 且该过程与细胞是否受到氧化应激无关, 在正常生理条件下同样能够进行, 其具体调节机制尚不明确^[31]。除了泛素化修饰以外, 以蛋白质磷酸化修饰为代表的其他翻译后修饰途径也参与了 Nrf2 的活性调节^[32], 从而实现了细胞内 Nrf2 活性的精细调节网络 (图 2)。

2 Nrf2 对肿瘤的两面性

Nrf2 在癌症中的双重作用已经被广泛认可^[33,34]。正常情况下, Nrf2 可阻止正常组织和癌前组织癌变, 阻止正常细胞向癌变细胞的转化; 在肿瘤组织中, Nrf2 的过度激活可能有利于已经转化的癌细胞的存活和增殖。

早期研究表明, 增强 Nrf2 活性可抑制肿瘤发生, 而 Nrf2 表达缺失可提高多种致癌物对肿瘤发生的易感性^[35]。Nrf2 通过清除 ROS 和活性氮氧化物 (RNS)、促进化学致癌物的代谢或者通过诱导其靶基因的表达修复氧化损伤等途径, 抑制肿瘤发生^[36]。多项研究证实, Nrf2 激活剂可使 *Nrf2*^{-/-} 小鼠预防化学和辐射 (电离、紫外线) 诱导的癌变。

另一方面, Nrf2 作为一种细胞保护剂, 可增强细胞

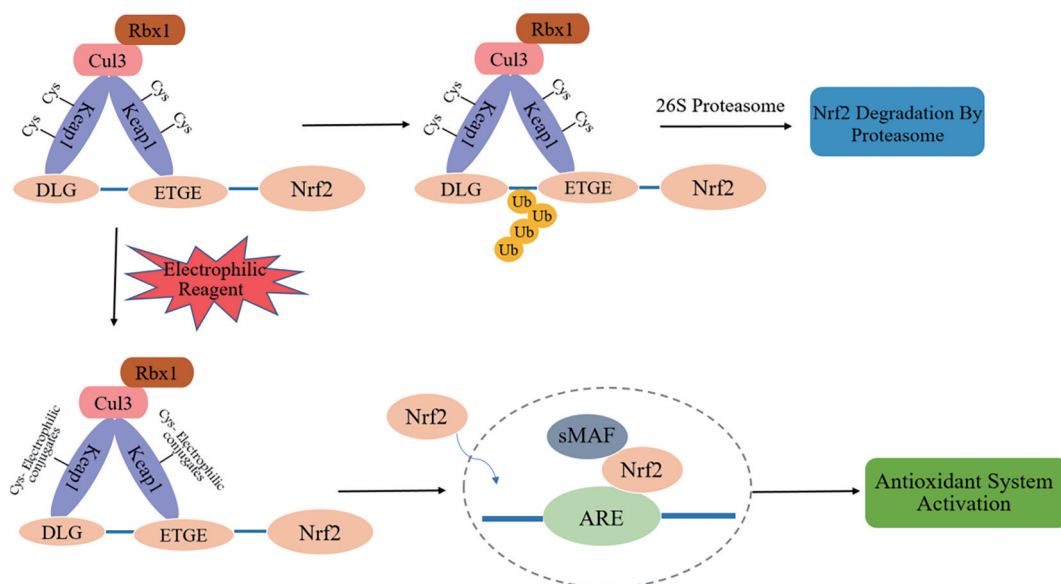


Figure 1 Keap1-dependent ubiquitination and proteasomal degradation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). Under physiological conditions, Nrf2 can be ubiquitinated by binding to KEAP1 via both the ETGE and DLG motifs of Nrf2, and the ubiquitinated Nrf2 will be degraded by the 26S proteasome. Under oxidative or electrophilic stress, Nrf2 can escape the Keap1-dependent ubiquitination and then translocate to the nucleus to regulate the transcription of downstream genes

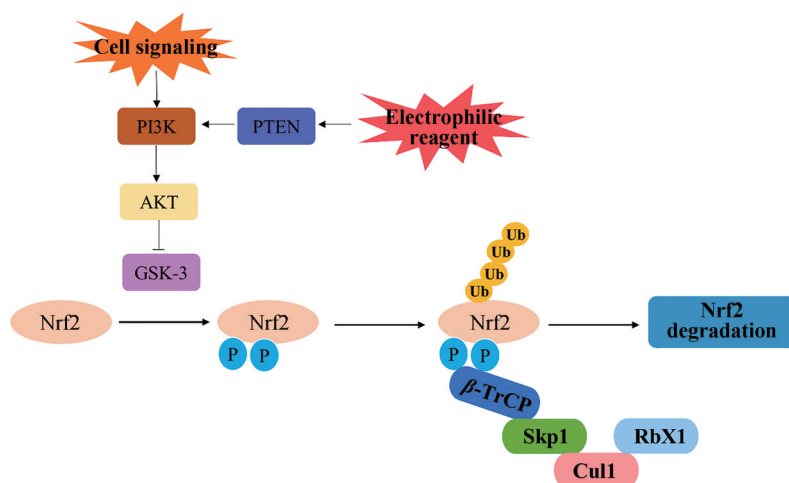


Figure 2 GSK-3 regulates Nrf2 degradation. Nrf2 can be phosphorylated by GSK-3 at Ser335 and Ser338 within the Neh6 domain. The phosphorylated DSGIS motif in Nrf2 Neh6 domain serves as an anchoring site for β -TrCP. Then, the E3 ubiquitin ligase complex, consisting of β -TrCP, Skp1, Cull1 and Rbx1, can mediate the ubiquitination of Nrf2. The ubiquitylated Nrf2 will be degraded by 26S proteasome. The kinase activity of GSK-3 is highly controlled by PI3K-AKT signaling which is regulated by multiple growth factors, G protein-coupled receptors, and ion channels. Thus, β -TrCP-dependent Nrf2 degradation is determined the complex cellular signaling network

的存活率, 因此提高 Nrf2 活性也可使肿瘤细胞受益。Nrf2 能显著抑制氧化应激, 降低肿瘤对化疗药物的敏感性^[33,37]; 此外 Nrf2 的激活还可提高谷胱甘肽和硫氧还蛋白抗氧化系统的活性, 增强肿瘤对细胞毒药物的解毒作用。Nrf2 还可提高 ATP 依赖的药物外排泵如多药耐药系统 (multidrug resistance system, MDR) 的活性, 导致肿瘤细胞内药物有效浓度降低, 增强肿瘤耐药。进一步的生物学研究表明, Nrf2 可以通过复杂的机制为肿瘤细胞提供多种营养物质, 为肿瘤细胞的生长创造有利条件^[38]。因此, Nrf2 激活可能会对肿瘤细胞产生保护作用, 并且能够促进耐药肿瘤的发生和发展。

目前已经在多种癌症中发现转录因子 Nrf2 的过度激活, 其中 *NFE2L2* 功能获得突变和 *KEAP1* 功能缺失突变在肺癌的发生和发展中得到了深入的研究^[39]。*KEAP1* 功能缺失性突变首次在人肺腺癌细胞系中发现, 突变的 *KEAP1* 蛋白对 Nrf2 蛋白的亲合力降低, 从而导致其对 Nrf2 的抑制作用下降。在 61% 的 NSCLC 细胞系和 41% 的肿瘤样本中, 等位基因缺失导致 *KEAP1* 活性下降^[40,41]。对不同组患者的分析得出相似的结果, 即 *KEAP1* 功能缺失突变激活 Nrf2, 促进了肺癌细胞生长。最近, 众多的研究表明 *NFE2L2* 功能获得突变和 *KEAP1* 功能缺失突变对于肺癌细胞抵抗免疫治疗、放射治疗和化学治疗均起到了重要的促进作用^[42-44]。另有研究显示应激蛋白 *TRIB3* 能够抑制肺癌细胞中 *Keap1*-Nrf2 相互作用, 从而上调 Nrf2 转录激活活性, 促进肿瘤增殖并降低化疗药物敏感性^[45]。

而在一些特定的肝癌中, 肿瘤细胞可利用过表达

p62 蛋白等方式, 通过异常的蛋白-蛋白相互作用, 在 *NFE2L2* 和 *KEAP1* 基因未突变的情况下, 实现 Nrf2 的过度活化。p62 蛋白可以识别 *Keap1* 中的 Nrf2 结合位点, 通过竞争性的方式结合到 *Keap1* 蛋白上, 从而使得 Nrf2 免于被泛素化降解, 实现 Nrf2 的异常活化^[46]。而肿瘤细胞内信号通路异常导致的 p62 磷酸化可进一步增加 p62 和 *Keap1* 蛋白的亲合力, 增强 Nrf2 激活效应^[47]。这种 Nrf2 的激活模式既可以有效帮助肿瘤起始细胞的存活从而促进肿瘤发生^[48], 也有利于肿瘤细胞实现凋亡抵抗、药物耐药等效应促进肿瘤的进一步发展和恶化^[49]。

以上研究表明, 不同肿瘤细胞可通过多种模式实现 Nrf2 的过度激活。上调 Nrf2 活性不仅保护肿瘤细胞免受各种压力应激和氧化损伤, 还可调节下游靶基因的转录, 增加抗氧化蛋白、药物代谢酶、药物转运蛋白、还原酶等的表达, 同时还参与肿瘤的发、进展、转移和预后的全过程。抑制肿瘤细胞内的 Nrf2 活性可通过多种机制实现肿瘤治疗, 包括破坏肿瘤细胞内氧化还原平衡、促进肿瘤细胞凋亡、逆转肿瘤细胞耐药并增强抗肿瘤免疫等^[50,51]。因此, 开发安全有效的 Nrf2 抑制剂可能是一种很好的肿瘤治疗策略。

3 Nrf2 抑制剂研究进展

随着 Nrf2 激活的促癌功能被越来越关注, 越来越多的研究者致力于发现 Nrf2 抑制剂。迄今为止, 具有不同化学类型和结合靶点的分子已被报道显示 Nrf2 抑制作用^[52]。尽管这些药物作用机制各异, 但它们在不同的肿瘤细胞中均显示了明确的 Nrf2 抑制作用。

3.1 黄酮类 Nrf2 抑制剂 一些天然黄酮类化合物被报道具有 Nrf2 抑制活性。但值得注意的是其中一些黄酮衍生物在不同的研究中对 Nrf2 活性表现出相反的作用。黄酮类衍生物汉黄芩素 (wogonin, 图 3) 是传统中草药黄芩的主要有效成分之一, 具有抗炎、抗肿瘤等多种生物活性, 特别是耐药肿瘤的治疗中具有较好的疗效。研究表明, 在慢性粒细胞白血病 K562/A02 和 K562R 细胞中, 汉黄芩素可通过下调 Nrf2 来克服多柔比星 (DOX) 和伊马替尼的耐药。此外, 在 K562/A02 异种移植模型中, 汉黄芩素 ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 显著增强 DOX 对肿瘤的抑制作用^[53]。

木犀草素 (luteolin) 是一类存在于苔藓、蕨类、木兰花等植物中的黄酮类化合物。木犀草素可增强 Nrf2 的 mRNA 不稳定性, 降低 Nrf2 的 mRNA 和蛋白水平, 进而抑制 Nrf2-ARE 系统的活性, 提高 A549 细胞对抗肿瘤药物的敏感度^[54]。另一项研究也显示 luteolin 可以通过抑制 *Nrf2*^{+/+} 小鼠 A549 细胞移植瘤模型上的 Nrf2 通路来增强顺铂的抗癌作用, 而对 *Nrf2*^{-/-} 小鼠则没有作用^[55]。在奥沙利铂耐药和 Nrf2 活化的结直肠癌肿瘤 HCT116-OX 和 SW620-OX 细胞中, 木犀草素可浓度依赖地抑制细胞增殖^[56]。木犀草素 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 能显著提高奥沙利铂、顺铂和 DOX 在耐药细胞株 HCT116-OX 和 SW620-OX 中的抗癌功效。另一方面, 在急性氯化汞暴露引起的肝中毒模型中, luteolin 又可增强 Nrf2-ARE, 提高抗氧化防御系统活性, 减轻肝损伤^[57]。以上研究表明, luteolin 在不同的病理条件下, 对 Nrf2 可表现出不同的作用。

白杨黄素 (chrysin), 又名 5,7-二羟黄酮, 已经被证明可以通过减少 Nrf2 进入细胞核的转运和抑制 HO-1 和 NQO1 的表达来抑制 Nrf2 信号通路^[58]。白杨素 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可显著增加 DOX 在耐 DOX 细胞 BEL-7402/ADM 中疗效, 这一类细胞高表达 Nrf2。通过在 mRNA 和蛋白表达水平抑制 Nrf2, 同时下调其下游基因 HO-1 和 AKR1B10, 白杨素 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可显著增加细胞内 DOX 浓度^[59]。

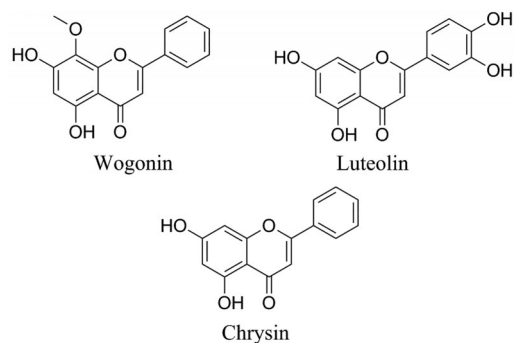


Figure 3 Structures of flavone derivatives

3.2 甾体类 Nrf2 抑制剂 不同于许多在微摩尔浓度下才能显示 Nrf2 抑制活性的化合物, 一些糖皮质激素在纳摩尔浓度下表现出显著的 Nrf2 抑制活性^[60]。以地塞米松 (dexamethasone, 图 4) 为代表的糖皮质激素可表现出糖皮质激素受体 (GCR) 依赖的 Nrf2 抑制活性^[61]。这些化合物的 Nrf2 抑制活性与 GCR 的激活活性相关, 表明了 GCR 参与 Nrf2 的活性调节机制。其中, 丙酸氯倍他索 (clobetasol propionate) 能够通过激活糖皮质激素受体, 促进 Nrf2 的泛素化降解, 进而抑制 Nrf2 活性^[62]。

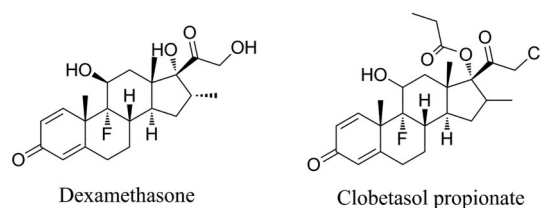


Figure 4 Structures of glucocorticoid derivatives

3.3 维甲酸类 Nrf2 抑制剂 全反式维甲酸 (ATRA, 图 5) 又称维生素 A 酸或维甲酸, 与其他一些维甲酸受体 (RAR- α) 激动剂是一类作用机制较明确的 Nrf2 抑制剂。ATRA 不影响 Nrf2 的蛋白水平和核累积, 但其通过促进 RAR α 与 Nrf2 形成复合物, 抑制了 Nrf2 与 ARE 结合^[63]。研究发现 RAR α 可结合 Nrf2 的 Neh7 区域, 复合物的形成显著抑制了 Nrf2 对 ARE 序列的识别。贝沙罗汀 (bexarotene) 是一种 RXR α 特异性配体, 也可以通过依赖 RXR α 的方式抑制 Nrf2 的转录活性^[64]。

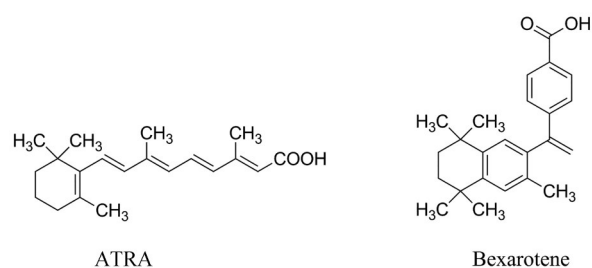


Figure 5 Structures of ATRA and bexarotene

3.4 异烟肼类 Nrf2 抑制剂 异烟肼是一类经典的抗结核病药物, 对结核杆菌有抑制和杀灭作用。研究报道, 异烟肼可在多种小鼠和人类来源的细胞系中抑制 Nrf2-ARE 的活性。其对 Nrf2 的抑制可有效干扰脂肪组织的形成^[65]。进一步的研究发现, 异烟肼可以提高 Hep3B 细胞内 Nrf2 的胞质蛋白水平, 同时降低核内 Nrf2 蛋白水平^[66]。一些异烟肼类似物, 比如异烟酰胺 (isonicotinic acid, 图 6) 和乙硫异烟胺 (ethionamide), 也表现出 Nrf2 抑制活性。其中乙硫异烟胺能以 Nrf2

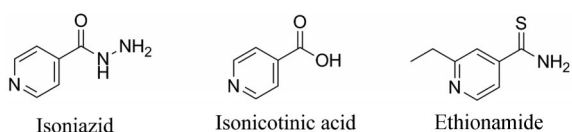


Figure 6 Structures of isoniazid and its analogs

依赖的方式增加急性单核细胞白血病 THP-1 细胞在肿瘤化疗中对 As_2O_3 的敏感性^[67]。到目前为止, 这些抗结核小分子已被证实不会影响 Nrf2 的 mRNA 和蛋白质水平, 但是其抑制 Nrf2 机制仍不清楚, 需要进一步的研究来阐明这一独特的机制。

3.5 其他 Nrf2 抑制剂 二甲双胍 (metformin, 图 7) 作为治疗 2 型糖尿病的一线药物, 也被证实能够抑制 Nrf2-ARE 系统。研究表明二甲双胍可降低 HepG2 细胞中 Nrf2 的 mRNA 和蛋白水平, 其下调机制不依赖 Keap1 和 AMPK^[68]。进一步研究表明, 二甲双胍诱导 miR-34a 抑制 Nrf2 通路, 增加野生型 p53 肿瘤细胞对氧化应激和凋亡的敏感性^[69]。值得注意的是, 一些研究也报道了二甲双胍对 Nrf2 的激活作用, 说明二甲双胍在不同条件下对 Nrf2 会产生不同效应^[70]。

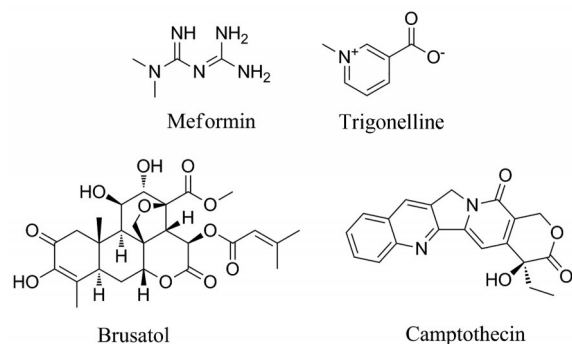


Figure 7 Other small molecules with Nrf2 inhibition activity

Brusatol 是较早被报道的一种强效 Nrf2 抑制剂^[71]。Brusatol 能有效降低细胞内的 Nrf2 水平, 增强 A549 细胞等多种肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[72]。研究表明, Brusatol 的作用机制主要是通过抑制蛋白质翻译途径发挥作用。这种非选择性的作用机制限制该化合物的进一步研究。喜树碱 (camptothecin) 是一种拓扑异构酶抑制剂, 同时也能抑制 Nrf2。喜树碱 (0.1 或 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 能显著抑制 HepG2、SMMC-7721 和 A549 细胞中 Nrf2 表达和转录活动, 可在体外和异种移植瘤模型中 ($3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 均可增加这些细胞对表柔比星和 5-FU 的敏感性^[73]。

葫芦巴碱 (trigonelline) 是一种豆科植物葫芦巴的提取物, 能够通过减少 Nrf2 蛋白的细胞核累积而抑制 Nrf2 活性。在抑制 Nrf2 的同时, 葫芦巴碱可阻断 Nrf2

依赖性的蛋白酶体基因表达, 导致蛋白酶体活性降低^[74]。葫芦巴碱对 Nrf2 抑制作用可增加肿瘤细胞在体内外水平对化疗药物敏感性。常山酮 (halofuginone) 是一种广谱抗球虫药, 其也被发现具有抑制 Nrf2 的活性^[75]。作用机制研究表明, 常山酮主要通过引起氨基酸缺乏应激反应, 降低细胞内蛋白质合成进而减少细胞内 Nrf2 的含量。初步的药理学研究显示常山酮同样可以有效增加多种耐药肿瘤细胞对药物的敏感性。

最近, 被广泛研究的天然产物雷公藤甲素 (trip-tolide) 也被报道具有 Nrf2 抑制活性。ChIP 实验研究表明, 雷公藤甲素能有效抑制转录因子 Nrf2 结合到靶基因的启动子区域, 进而实现抑制 Nrf2 的转录活性。在 *IDH1* 突变的神经胶质瘤细胞中, 雷公藤甲素能显著地抑制谷胱甘肽的合成, 从而表现出对脑胶质瘤的选择性毒性作用^[76]。但是雷公藤甲素抑制 Nrf2 的具体靶标和分子机制尚不清楚。

3.6 靶向 Nrf2 抑制剂 化合物 ML385 (图 8) 是通过高通量筛选发现具有 Nrf2-ARE 抑制活性的化合物, 其能有效抑制 Nrf2 与靶基因的结合, 从而抑制其下游靶基因表达^[77]。体外作用机制研究表明, ML385 能够直接抑制 Nrf2-MafG 蛋白和含有 ARE 的 DNA 序列结合。ML385 (1 或 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与铂类药物、DOX 或紫杉醇联合使用时, 能够显著增加这些药物在 NSCLC 细胞中的细胞毒性。在 Nrf2 高度活化的 NSCLC 细胞中, ML385 ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 联合卡铂用药, 可产生显著抗肿瘤作用。

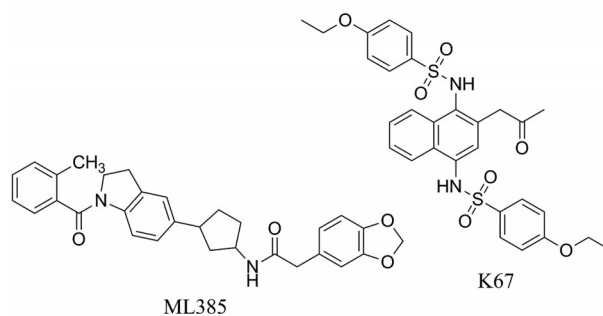


Figure 8 Targeted Nrf2 inhibitor. ML385 is a small molecular inhibitor of Nrf2/MafG-ARE complex. K67 is an inhibitor of Keap1-p62 protein-protein interaction

最近, Merck 公司的研究小组报道了一种新的 Nrf2 抑制剂策略^[78]。他们采用 Nrf2/MafG/DNA 三元复合物作为模型, 以和 DNA 结合的多肽片段作为结构模板, 设计获得了一系列能够有效抑制 Nrf2/MafG 复合物结合到 ARE 序列上的多肽先导物。这种直接抑制 Nrf2/MafG 和 DNA 中的 ARE 序列相互作用的作用模式具有较好的选择性, 避免了已有的 Nrf2 抑制剂特异性不足的问题, 为进一步探索发现具有临床开发价值

的选择性 Nrf2 探索了新的路径。

针对部分肿瘤细胞系利用过表达的 p62 实现 Nrf2 的过度活化的特征, 已有研究团队利用此特点, 针对 Keap1-p62 的相互作用, 开发 Keap1-p62 选择性的抑制剂, 恢复 Keap1 对 Nrf2 的负调节作用, 进而实现 Nrf2 抑制的目标。K67 是第一个报道的具有一定选择性的 Keap1-p62 抑制剂。K67 能在 p62 过表达的 Huh-1 肝细胞癌细胞系中促进 Nrf2 的泛素化降解, 抑制 Nrf2 系统的活性, 从而增强顺铂等治疗效果^[79]。随后, Tadahiko Mashino 小组针对 K67 的化学结构开展了构效关系和结构衍生化研究。研究虽然未获得显著提升的化合物结构, 不过这些衍生物同样表现出在 p62 过表达的 Huh-1 肝细胞癌细胞系的 Nrf2 抑制和化疗增敏作用^[80,81]。

4 Nrf2 抑制剂在肿瘤治疗的问题与展望

Nrf2 在肿瘤治疗中的双重功能已经进行了较深入的研究^[82]。随着对 Nrf2 调控新模式和新功能研究的不断增多, Nrf2 根据其在癌症特征中的作用而发挥的抑癌促癌作用也越来越明显^[83]。Nrf2 是否属于癌基因尚不确定, 但 Nrf2 的促肿瘤作用已在不同类型肿瘤中得到了较充分的验证。Nrf2 活化与铁死亡^[84,85]、细胞自噬^[86,87]等肿瘤新特征的关系也得到了揭示。这些新进展进一步支持了抑制 Nrf2 可能是一种新颖的肿瘤治疗方法。相对于 Nrf2 的促癌功能研究的快速进展, 开发 Nrf2 抑制剂用于癌症治疗的研究仍然有限。目前现有的 Nrf2 抑制剂研究大多缺乏具体作用靶标, 很少有表现出直接和选择性的作用机制。考虑到 Keap1 依赖的 Nrf2 抑制系统在癌症中经常失活, 应该在癌症背景下探索不依赖于 Keap1 的 Nrf2 调控网络的全景图, 发掘能抑制 Nrf2 活性的潜在药物靶点。此外, 通过靶向细胞核中 Nrf2 相关的 PPIs 直接抑制 Nrf2 的转录活性, 特别是干扰 Nrf2-MafG-ARE 的相互作用, 是一种有前景的策略。然而, 对于 Nrf2-MafG-ARE 作用界面知之甚少, 限制了靶向抑制剂的发现。对 Nrf2-MafG-ARE 复合物的结构生物学研究将有助于相应抑制剂的开发。目前, Nrf2 抑制剂的研究尚处在较早期的阶段, 突破性的进展尤其需要学科的交叉和合作。

作者贡献: 牟伊是本文第一作者, 负责文献的收集整理以及主要内容的撰写; 宋雨负责文章图片和结构式的绘制; 文帅负责 Nrf2 生物学研究部分的整理与修改; 王燕负责 Nrf2 抑制剂部分的文献检索和内容修改; 姜正羽为本文通讯作者, 负责综述选题与框架设计, 稿件修改等工作。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

[1] Itoh K, Igarashi K, Hayashi N, et al. Cloning and characteriza-

tion 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.

- [2] Baird L, Dinkova-Kostova AT. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway [J]. *Arch Toxicol*, 2011, 85: 241-272.
- [3] Chartoumpakis DV, Wakabayashi N, Kensler TW. Keap1/Nrf2 pathway in the frontiers of cancer and non-cancer cell metabolism [J]. *Biochem Soc Trans*, 2015, 43: 639-644.
- [4] Hayes JD, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer [J]. *Trends Biochem Sci*, 2009, 34: 176-188.
- [5] Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M. Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2013, 34: 340-346.
- [6] Menegon S, Columbano A, Giordano S. The dual roles of NRF2 in cancer [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22: 578-593.
- [7] 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: 1169-1203.
- [8] Higgins LG, Kelleher MO, Eggleston IM, et al. Transcription factor Nrf2 mediates an adaptive response to sulforaphane that protects fibroblasts *in vitro* against the cytotoxic effects of electrophiles, peroxides and redox-cycling agents [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 237: 267-280.
- [9] Lu SC. Regulation of glutathione synthesis [J]. *Mol Aspects Med*, 2009, 30: 42-59.
- [10] 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: 5718-5734.
- [11] Agyeman A, Chaerkady R, Shaw P, et al. Transcriptomic and proteomic profiling of KEAP1 disrupted and sulforaphane-treated human breast epithelial cells reveals common expression profiles [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 132: 175-187.
- [12] Chorley BN, Campbell MR, Wang X, et al. Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 7416-7429.
- [13] Hirotsu Y, Katsuoka F, Funayama R, et al. Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 10228-10239.
- [14] Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013, 53: 401-426.
- [15] Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism [J]. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39: 199-218.
- [16] Yates MS, Tran QT, Dolan PM, et al. Genetic *versus* chemoprotective activation of Nrf2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid-treated mice [J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30: 1024-1031.
- [17] Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, et al. Nrf2 redirects glucose

- and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming [J]. *Cancer Cell*, 2012, 22: 66-79.
- [18] Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, et al. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85: 705-717.
- [19] Tong KI, Padmanabhan B, Kobayashi A, et al. Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 7511-7521.
- [20] Tong KI, Kobayashi A, Katsuoka F, et al. Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism [J]. *Biol Chem*, 2006, 387: 1311-1320.
- [21] Furukawa M, Xiong Y. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 162-171.
- [22] Furukawa M, He YJ, Borchers C, et al. Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5: 1001-1007.
- [23] Janssen-Heininger YM, Mossman BT, Heintz NH, et al. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises [J]. *Free Radical Biol Med*, 2008, 45: 1-17.
- [24] Yamamoto T, Suzuki T, Kobayashi A, et al. Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28: 2758-2770.
- [25] Baird L, Lleres 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, 38: 15259-15264.
- [26] Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species [J]. *Adv Enzym regul*, 2006, 46: 113-140.
- [27] Zheng F, Gonçalves FM, Abiko Y, et al. Redox toxicology of environmental chemicals causing oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2020, 34: 101475.
- [28] Rada P, Rojo AI, Chowdhry S, et al. SCF/ β -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner [J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31: 1121-1133.
- [29] Chowdhry S, Zhang Y, McMahon M, et al. Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity [J]. *Oncogene*, 2013, 32: 3765-3781.
- [30] Wu T, Zhao F, Gao B, et al. Hrd1 suppresses Nrf2-mediated cellular protection during liver cirrhosis [J]. *Gen Devel*, 2014, 28: 708-722.
- [31] Kang HJ, Hong YB, Kim HJ, et al. CR6-interacting factor 1 (CRIF1) regulates NF-E2-related factor 2 (NRF2) protein stability by proteasome-mediated degradation [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 21258-21268.
- [32] Liu T, Lv YF, Zhao JL, et al. Regulation of Nrf2 by phosphorylation: consequences for biological function and therapeutic implications [J]. *Free Radical Biol Med*, 2021, 168: 129-141.
- [33] Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12: 564-571.
- [34] Hayes JD, McMahon M. The double-edged sword of Nrf2: subversion of redox homeostasis during the evolution of cancer [J]. *Mol Cell*, 2006, 21: 732-734.
- [35] Hayes JD, McMahon M, Chowdhry S, et al. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13: 1713-1748.
- [36] Hu R, Saw CL, Yu R, et al. Regulation of NF-E2-related factor 2 signaling for cancer chemoprevention: antioxidant coupled with antiinflammatory [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13: 1679-1698.
- [37] Zhang DD. The Nrf2-Keap1-ARE signaling pathway: the regulation and dual function of Nrf2 in cancer [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13: 1623-1626.
- [38] Rojo de la Vega M, Chapman E, Zhang DD. NRF2 and the hallmarks of cancer [J]. *Cancer Cell*, 2018, 34: 21-43.
- [39] 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.
- [40] Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, et al. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth [J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 1303-1309.
- [41] Takahashi T, Sonobe M, Menju T, et al. Mutations in Keap1 are a potential prognostic factor in resected non-small cell lung cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2010, 101: 500-506.
- [42] Binkley MS, Jeon YJ, Nesselbush M, et al. KEAP1/NFE2L2 mutations predict lung cancer radiation resistance that can be targeted by glutaminase inhibition [J]. *Cancer Discov*, 2020, 10: 1826-1841.
- [43] Marinelli D, Mazzotta M, Scalera S, et al. KEAP1-driven mutations in lung adenocarcinoma unresponsive to immunotherapy despite high tumor mutational burden [J]. *Ann Oncol*, 2020, 31: 1746-1754.
- [44] Singh A, Daemen A, Nickles D, et al. NRF2 activation promotes aggressive lung cancer and associates with poor clinical outcomes [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27: 877-888.
- [45] Yu JJ, Zhang C, Xiang YJ, et al. TRIB3 promotes lung cancer cell survival and inhibits apoptosis through NRF2 activation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 1352-1359.
- [46] 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.
- [47] 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.

- [48] 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.
- [49] Todoric J, Antonucci L, Di Caro G, et al. Stress-activated NRF2-MDM2 cascade controls neoplastic progression in pancreas [J]. *Cancer Cell*, 2017, 32: 824-839.e8.
- [50] Mou Y, Wen S, Gao XX, et al. Advances in anti-tumor drug research based on reactive oxygen regulation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1453-1465.
- [51] Liu Y, Lang F, Yang C. NRF2 in human neoplasm: cancer biology and potential therapeutic target [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 217: 107664.
- [52] Zhu J, Wang H, Chen F, et al. An overview of chemical inhibitors of the Nrf2-ARE signaling pathway and their potential applications in cancer therapy [J]. *Free Radical Biol Med*, 2016, 99: 544-556.
- [53] Xu X, Zhang X, Zhang Y, et al. Wogonin reversed resistant human myelogenous leukemia cells *via* inhibiting Nrf2 signaling by Stat3/NF-kappaB inactivation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 39950.
- [54] Tang X, Wang H, Fan L, et al. Luteolin inhibits Nrf2 leading to negative regulation of the Nrf2/ARE pathway and sensitization of human lung carcinoma A549 cells to therapeutic drugs [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50: 1599-1609.
- [55] Chian S, Thapa R, Chi Z, et al. Luteolin inhibits the Nrf2 signaling pathway and tumor growth *in vivo* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 447: 602-608.
- [56] Chian S, Li YY, Wang XJ, et al. Luteolin sensitizes two oxaliplatin-resistant colorectal cancer cell lines to chemotherapeutic drugs *via* inhibition of the Nrf2 pathway [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15: 2911-2916.
- [57] Yang D, Tan X, Lv Z, et al. Regulation of Sirt1/Nrf2/TNF-alpha signaling pathway by luteolin is critical to attenuate acute mercuric chloride exposure induced hepatotoxicity [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37157.
- [58] Wang J, Wang H, Sun K, et al. Chrysin suppresses proliferation, migration, and invasion in glioblastoma cell lines *via* mediating the ERK/Nrf2 signaling pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 721-733.
- [59] Gao AM, Ke ZP, Shi F, et al. Chrysin enhances sensitivity of BEL-7402/ADM cells to doxorubicin by suppressing PI3K/Akt/Nrf2 and ERK/Nrf2 pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2013, 206: 100-108.
- [60] Kratschmar DV, Calabrese D, Walsh J, et al. Suppression of the Nrf2-dependent antioxidant response by glucocorticoids and 11beta-HSD1-mediated glucocorticoid activation in hepatic cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e36774.
- [61] Ki SH, Cho IJ, Choi DW, et al. Glucocorticoid receptor (GR)-associated SMRT binding to C/EBPbeta TAD and Nrf2 Neh4/5: role of SMRT recruited to GR in GSTA2 gene repression [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 4150-4165.
- [62] Choi EJ, Jung BJ, Lee SH, et al. A clinical drug library screen identifies clobetasol propionate as an NRF2 inhibitor with potential therapeutic efficacy in KEAP1 mutant lung cancer [J]. *Oncogene*, 2017, 36: 5285-5295.
- [63] Wang XJ, Hayes JD, Henderson CJ, et al. Identification of retinoic acid as an inhibitor of transcription factor Nrf2 through activation of retinoic acid receptor alpha [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 19589-19594.
- [64] Wu J, Wang H, Tang X. Rexinoid inhibits Nrf2-mediated transcription through retinoid X receptor alpha [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 452: 554-559.
- [65] Chen Y, Xue P, Hou Y, et al. Isoniazid suppresses antioxidant response element activities and impairs adipogenesis in mouse and human preadipocytes [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 273: 435-441.
- [66] Verma AK, Yadav A, Dewangan J, et al. Isoniazid prevents Nrf2 translocation by inhibiting ERK1 phosphorylation and induces oxidative stress and apoptosis [J]. *Redox Biol*, 2015, 6: 80-92.
- [67] Peng H, Wang H, Xue P, et al. Suppression of NRF2-ARE activity sensitizes chemotherapeutic agent-induced cytotoxicity in human acute monocytic leukemia cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 292: 1-7.
- [68] Do MT, Kim HG, Khanal T, et al. Metformin inhibits heme oxygenase-1 expression in cancer cells through inactivation of Raf-ERK-Nrf2 signaling and AMPK-independent pathways [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 271: 229-238.
- [69] Do MT, Kim HG, Choi JH, et al. Metformin induces microRNA-34a to downregulate the Sirt1/Pgc-1alpha/Nrf2 pathway, leading to increased susceptibility of wild-type p53 cancer cells to oxidative stress and therapeutic agents [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 74: 21-34.
- [70] Ashabi G, Khalaj L, Khodaghali F, et al. Pre-treatment with metformin activates Nrf2 antioxidant pathways and inhibits inflammatory responses through induction of AMPK after transient global cerebral ischemia [J]. *Metab Brain Dis*, 2015, 30: 747-754.
- [71] Ren D, Villeneuve NF, Jiang T, et al. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 1433-1438.
- [72] Vartanian S, Ma TP, Lee J, et al. Application of mass spectrometry profiling to establish brusatol as an inhibitor of global protein synthesis [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15: 1220-1231.
- [73] Chen F, Wang H, Zhu J, et al. Correction: camptothecin suppresses NRF2-ARE activity and sensitises hepatocellular carcinoma cells to anticancer drugs [J]. *Br J Cancer*, 2019, 121: 511-512.
- [74] Arlt A, Sebens S, Krebs S, et al. Inhibition of the Nrf2 transcription factor by the alkaloid trigonelline renders pancreatic cancer cells more susceptible to apoptosis through decreased proteasomal

- gene expression and proteasome activity [J]. *Oncogene*, 2013, 32: 4825-4835.
- [75] Tsuchida K, Tsujita T, Hayashi M, et al. Halofuginone enhances the chemo-sensitivity of cancer cells by suppressing NRF2 accumulation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 103: 236-247.
- [76] Yu D, Liu Y, Zhou Y, et al. Triptolide suppresses IDH1-mutated malignancy *via* Nrf2-driven glutathione metabolism [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117: 9964-9972.
- [77] Singh A, Venkannagari S, Oh KH, et al. Small molecule inhibitor of NRF2 selectively intervenes therapeutic resistance in KEAP1-deficient NSCLC tumors [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 3214-3225.
- [78] Simov V, Altman MD, Bianchi E, et al. Discovery and characterization of novel peptide inhibitors of the NRF2/MAFG/DNA ternary complex for the treatment of cancer [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 224: 113686.
- [79] 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.
- [80] Yasuda D, Nakajima M, Yuasa A, et al. Synthesis of Keap1-phosphorylated p62 and Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors and their inhibitory activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26: 5956-5959.
- [81] Yasuda D, Ohe T, Takahashi K, et al. Inhibitors of the protein-protein interaction between phosphorylated p62 and Keap1 attenuate chemoresistance in a human hepatocellular carcinoma cell line [J]. *Free Radic Res*, 2020, 54: 859-571.
- [82] Torrente L, DeNicola GM. Targeting NRF2 and its downstream processes: opportunities and challenges [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2021. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-052220-104025.
- [83] Kang JS, Nam LB, Yoo OK, et al. Molecular mechanisms and systemic targeting of NRF2 dysregulation in cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 177: 114002.
- [84] Takahashi N, Cho P, Selfors LM, et al. 3D Culture models with CRISPR screens reveal hyperactive NRF2 as a prerequisite for spheroid formation *via* regulation of proliferation and ferroptosis [J]. *Mol Cell*, 2020, 80: 828-844.
- [85] Wu WL, Papagiannakopoulos T. The center cannot hold: NRF2 battles ferroptosis in the 3rd dimension [J]. *Mol Cell*, 2020, 80: 760-761.
- [86] Mondal G, Debnath J. NRF2 activates macropinocytosis upon autophagy inhibition [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39: 596-598.
- [87] Su H, Yang F, Fu R, et al. Cancer cells escape autophagy inhibition *via* NRF2-induced macropinocytosis [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39: 678-693.