

核转录因子红细胞系-2p45 相关因子-2 调控 抗氧化酶表达与帕金森病

徐先结 叶钦勇

帕金森病是最常见的神经元退行性疾病之一,尽管其发病机制仍不十分清楚。但是,在过去的研究基础上,可以肯定的是氧化应激损伤在黑质部多巴胺能神经元退行性变中起着重要作用。

一、活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)与帕金森病

氧化应激损伤在帕金森病的发生中起着关键作用已被广泛认可^[1]。ROS 可以通过直接诱导蛋白质主链和侧链氧化,也可通过脂质过氧化和糖基化等过程间接诱导蛋白质氧化,从而导致蛋白质主链断裂、侧链 β -切除、蛋白质羧基化以及蛋白质-蛋白质交联,最终导致细胞变性死亡。研究显示帕金森病患者黑质致密部氧化脂类、蛋白质及 DNA 水平增加。

在正常情况下,机体存在自由基清除系统,在脑内主要有谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、超氧化物歧化酶(SOD)等,从而确保机体免遭自由基的损伤。帕金森病患者脑内 ROS 生成较正常人明显增多,当机体中 ROS 清除系统不能有效清除生成的 ROS 时,多余的 ROS 即可产生氧化应激损伤,对多巴胺能神经元造成损伤。

ROS 最主要的来源是线粒体呼吸链复合物 I (complex I, CI)。研究显示,帕金森病患者的黑质致密部和血小板中 CI 活性受损^[2]。在试验模型中,具有抑制 CI 活性的农药如牧草快、鱼藤酮和百草枯在大鼠和小鼠中可诱发出帕金森综合征^[3]。此外,神经毒性物质(MPTP)可被单胺氧化酶 B(MAO-B)氧化成 MPP⁺,在灵长类动物和小鼠中诱发出帕金森病症状^[4]。抑制 CI 导致氧原子被还原不完全而生成大量有害的 ROS,包括超氧化物^[5]。而超氧化物可能与 NO 反应而转变为破坏性更大的过氧亚硝酸盐,或者先被 SOD 催化再通过铁介导的芬顿反应(fenton reaction)而生成过氧化氢^[6]。

ROS 的另一重要来源是来自于黑质纹状体的多巴胺氧化代谢。超过 90% 的多巴胺储存在突出前小囊泡内,但仍有一小部分多巴胺在细胞质内处于自然状态或被 MAO-B 降解为 3,4-二羟苯乙酸、高香草酸、超氧化物、过氧化氢及多巴胺醌类^[6]。由于其强亲电子性质,多巴胺醌类与半胱氨酸残基具有很强的反应性,可以利用很多蛋白质中的巯基作为供氢体而形成醌蛋白和二硫键,并影响蛋白功能。多巴胺醌类可以与酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)、多巴胺转运体(dopamine transporter, DAT)、Parkin 和 α -核蛋白(α -synuclein)反应并使其转变为氧化还原醌蛋白^[7-9]。

慢性炎症也是帕金森病患者中 ROS 的来源之一^[10]。在尸检脑组织及实验动物模型中可见促炎性因子在帕金森病患者脑内积聚,分泌增加^[11]。最近体内试验成像研究显示帕金森病患者脑桥、基底节、前脑及颞叶脑皮层小胶质细胞被激活。近期一项大型的预期研究显示服用非甾体类抗炎药(NSAIDs)的人群中帕金森病发病率较同龄段的未服药者低 46%,NSAIDs 具有清除 ROS 和抑制 COX 活性的作用。类似的发现在非选择性 COX 抑制布洛芬的慢性服用者中也有报道^[12]。当暴露于致病因素时,单核/巨噬细胞系统中的免疫细胞如小胶质细胞募集到细胞膜上产生保护应答反应以杀死病原体,这一过程活化 NADPH 氧化酶并持续产生 ROS。此酶催化 NADPH 产生两个超氧离子及大量 H₂O₂。因此,持续激活小胶质细胞可能引起与氧化应激有关的神经元退行性变。

二、NRF2/ARE 调控抗氧化酶表达与帕金森病

尽管机体的抗氧化系统十分复杂,但是几乎都与核转录因子红细胞系-2p45(NF-E2)相关因子-2(NRF2)有关。NRF2 是 CNC(cap'n'collar)转录因子家族成员之一,可以调控一系列启动子区域有抗氧化应答元件(ARE)的抗氧化酶类基因表达,包括 HO-1、NQO1、GCL-M、GST 等,这些酶类均参与了二期抗氧化反应和解毒反应。NRF2 已被发现存在于大多数脑内细胞中,如多巴胺能神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞等,在这些区域调控抗氧化酶类表达以维持机体氧化还原平衡。

NRF2 调控抗氧化酶类基因表达的分子机制十分复杂。在基础状态下 NRF2 半衰期很短并几乎在大多数细胞中无法检测到,这是因为 NRF2 在细胞质内与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)结合,后者可沉默 NRF2 并将其提呈给基于 Cul3 的 E3 泛素连接酶,导致 NRF2 被泛素化及蛋白水解^[13]。

而当机体处于氧化应激状态或予以某些药物干预时,NRF2 与 Keap1 分离并进入核内,在核内 NRF2 与 Maf 蛋白结合形成异二聚体。NRF2-Maf 异二聚体识别并结合到 ARE 上,随后诱导下游抗氧化酶基因表达(图 1)。

三、NRF2 与 Keap1 的结合及降解

NRF2 蛋白具有六个功能域,被称为 Neh1~Neh6 区域。其中,Neh2 位于 NRF2 的 N 末端,是同二聚体 Keap1 的结合位点,Keap1 与 NRF2 结合后促进其降解。氧化应激使 NRF2 脱离 Keap1 介导的蛋白酶水解,稳定 NRF2 并使其向核内转移。关于

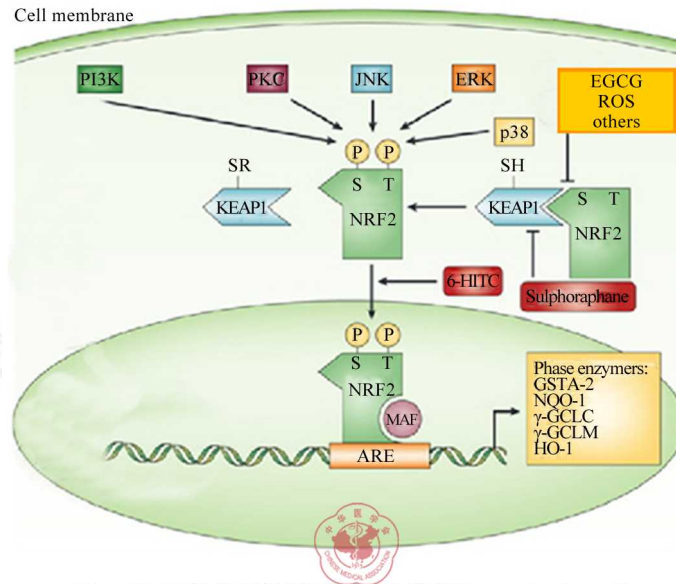


图1 NRF2的作用机制示意图(摘自Nature Reviews Cancer 3, 768-780, October 2003)

NRF2与Keap1的反应机制,Tong等^[14]提出了一种铰链模型理论。他们认为在氧化还原自稳态情况下,一个NRF2利用位于NRF2 N末端的一半位置的ETGE(hinge)和DLG(latch)结合位点与两个Keap1分子结合形成 α 螺旋结构以进一步泛素化^[15]。另一方面,当暴露于改变氧化还原状态的元素时,Keap1二聚体结构变化打断了Keap1与DLG基序之间的微弱结合。结果是NRF2仍然利用其ETGE铰链结构与Keap1结合但由于受了DLG基序的影响,不能形成正确的 α 螺旋结构并泛素化。而修饰后的Keap1二聚体仍旧与未泛素化的NRF2结合在一起,这种模型提示至少部分新合成的NRF2能逃离与Keap1的结合而进入到核内。

四、NRF2与GSK-3

GSK-3是一种与代谢过程密切相关的丝氨酸/苏氨酸激酶。受到细胞存活信号PI3K及其下游途径Akt信号途径的调控。PI3K/Akt/GSK-3 β 信号轴与帕金森病神经元保护的关系可由以下两点证实:(1)Akt活性随着年龄而降低,而年龄是散发性帕金森病的最大危险因素^[16];(2)曾有报道GSK-3基因中单核苷酸多态性导致的GSK-3表达活性增加与帕金森病的发病有联系^[17]。

研究证实,GSK-3是NRF2的负性调控剂。GSK-3并不改变NRF2的蛋白水平,其对NRF2的调控主要是改变细胞核内外的分布^[18]。活化的GSK-3可以磷酸化NRF2而使其从核内输出。体外研究显示当细胞中过表达NRF2时,二期抗氧化酶基因HO-1、NQO1、GCL-M等转录水平明显上升。但共表达GSK-3时明显降低这些基因的转录活性及蛋白水平。因此,GSK-3对NRF2的功能起负性调控作用。进一步的研究显示,GSK-3对NRF2的作用与其对酪氨酸激酶(Fyn)的磷酸化有关。GSK-3可磷酸化Fyn的苏氨酸残基而致其在细胞核内聚集^[19]。进入核内的Fyn可磷酸化NRF2的568位点的酪氨酸残基,使NRF2向核外输出。

在体内试验用MPTP(30 mg/kg)处理野生型C57BL/6小鼠,黑质部TH阳性细胞死亡及纹状体多巴胺减少,同时伴随非激活状态的Ser9磷酸化形式的GSK3大量减少^[20]。在用MPTP处理之前先予以GSK-3干预能有效抑制MPTP诱导的黑质致密部TH阳性神经元丢失和纹状体多巴胺减少^[20]。这些研究提示GSK-3可能在帕金森病多巴胺神经元死亡中扮演重要角色,因此抑制GSK-3可能成为帕金森病神经元保护治疗的一种潜在治疗策略。

五、NRF2与Bach1

Bach1是一种亚铁血红素(Heme)结合蛋白,属于CNC转录因子家族,包括BTB/POZ、bZIP、CLS结构域和6个半胱氨酸-脯氨酸(CP)基序。Bach1是细胞内一种转录抑制因子,在人体各组织中广泛表达^[21],与NRF2一样,Bach1也与Maf蛋白结合成异二聚体再结合到ARE上,但引起的效应是使其下游基因表达抑制,研究发现,Bach1能与NRF2竞争性结合ARE下调抗氧化酶基因表达。在调控HO-1基因表达的转录因子中,Bach1和NRF2起着关键作用。在生理条件下,Bach1缺失将导致多种组织中HO-1的高水平表达;暴露于诱导剂时,NRF2缺失细胞的HO-1表达减少。起初,Bach被视为一种受血红蛋白调控的可抑制HO-1和珠蛋白基因表达的转录抑制因子^[22],但越来越多的研究认为Bach1扮演着氧化应激传感器的角色,已证实Bach1能抑制HO-1和NQO1的表达^[23-24]。Bach1的具体作用机制见图2。

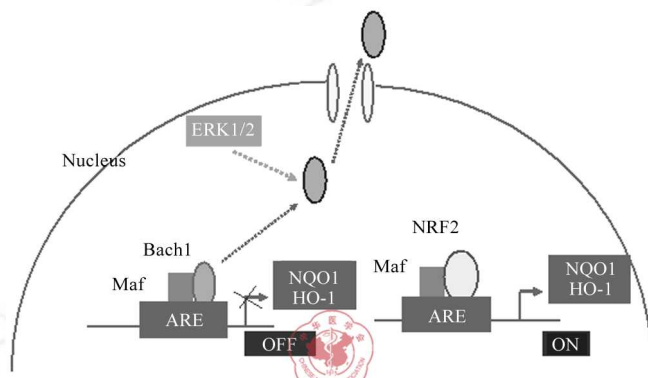


图2 Bach1的作用机制示意图

六、多酚类抗氧化剂对 NRF2/ARE 途径的调控与帕金森病的治疗

研究发现亲电子化合物能破坏 Keap1/NRF2 反应并诱导抗氧化剂应答反应。这些化合物可能比传统的抗氧化剂如维生素有优势,因为他们的效应更持久并可以通过 NRF2 信号介导的转录效应而放大^[25]。数类药物可通过与 Keap1 分子中氧化还原敏感性半胱氨酸残基反应而使 NRF2 与 Keap1 分离^[26]。这些药物包括:(1)来源于邻苯二酚,间苯二酚和对苯二酚的醌类;(2)迈克尔反应受体;(3)异硫氰酸盐类和二硫代甲氨酸酯类;(4)1,2-二硫杂环戊二烯-3-硫酮类及其他有机硫化物;(5)过氧化物;(6)三价醌剂;(7)重金属;(8)吡啶二聚体类;(9)类胡萝卜素类。

早期的证据提示这些 NRF2 诱导剂可以抑制帕金森病的进展。叔丁基对苯二酚 (tBHQ),一种被广泛用作食品保护剂的对苯二酚,在体外研究中显示抗 6-OHDA 的保护作用^[27]。此外,一项近期在果蝇属帕金森病模型实验中,与 α -共核蛋白毒性相关的神经元死亡能够用给予莱菔硫烷干预而减轻,后者为一种富含于绿花椰菜中的异硫氰酸盐,能增加 GSH 合成或 GSH 连接酶活性^[28],莱菔硫烷的有益效应可能部分来源于 NRF2 依赖的诱导 NQO1 将多巴胺能神经细胞内的多巴胺醌类从细胞中移去^[29]。类似的效应也出现在多酚类如白藜芦醇^[30]、姜黄素^[31]或一些儿茶酚类。

少数儿茶酚源性醌类具有很高氧化还原活性,会耗竭 GSH,形成醌蛋白而使神经元死亡,如前面所述的多巴胺醌类。但是另一些儿茶酚源性醌类可能通过选择性改变 Keap1 结构而激活 NRF2 途径,从而为神经元提供保护作用。目前比较明确的有这种保护作用的有以下三种含二酚结构的分子:(1)儿茶酚源性化合物如左旋多巴;(2)具有儿茶酚环的多巴胺激动剂如溴隐亭和阿扑吗啡(Apo);(3)植物来源的或人工合成的含有类似儿茶酚环结构的化合物如鼠尾草酚、鼠尾草酸^[32]、表没食子儿茶素^[33]、槲皮素^[34]、去甲二氢愈创木酸^[35]等。其他可能有这种效应的还有来源于间苯二酚或氢醌类的二酚,如某种花青苷类及 tBHQ。

最后,人工合成的或植物来源的儿茶素可能对多巴胺能神经细胞具有抗氧化作用和神经元保护作用。研究显示鼠尾草酚可减轻抗鱼藤酮^[36]和狄氏剂^[37]对多巴胺能细胞的氧化应激损伤而发挥神经元保护作用。这种化合物所涉及的信号途径可能破坏了 NRF2/Keap1 反应并可能同时激活了 PI3K/Akt 信号途径^[38]。

七、展望

过去十年的证据显示氧化应激与帕金森病的疾病发生学紧密相连。在寻求帕金森病的神经元保护治疗中,近来的研究发现提示 NRF2 作为一种调节氧化还原平衡的转录因子,是一个非常具有前景的靶点。而不同来源的儿茶酚源性醌类可利用其醌类结构增加 NRF2 水平并通过受体信号途径激活 PI3K/Akt 通路,增加 NRF2 的核内聚集而增强机体的抗氧化损伤能力。在体内外试验中显示出神经元保护作用。但是这些醌类化合物调控 NRF2 的具体途径还未完全明了,因此,需要进一步的研究。总之,以 NRF2 为靶点,研究开发具有抗氧化神经元保护作用的药物为治疗帕金森病提供了一条新的途径。

参 考 文 献

- [1] Cuadrado A, Rojo AI. Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases and brain infections. *Curr Pharm Des*, 2008, 14:429-442.
- [2] Haas RH, Nasirian F, Nakano K, et al. Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 1995, 37:714-722.
- [3] Betarbet R, Greenamyre JT. Parkinson's disease: animal models. *Handb Clin Neurol*, 2007, 83:265-287.
- [4] Rojo AI, Montero C, Salazar M, et al. Persistent penetration of MPTP through the nasal route induces Parkinson's disease in mice. *Eur J Neurosci*, 2006, 24:1874-1884.
- [5] Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P) +

- oxidation-reduction state. *Biochem J*, 2002, 368:545-553.
- [6] Fasano M, Bergamasco B, Lopiano L. Modifications of the iron-neuromelanin system in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 2006, 96:909-916.
- [7] Kuhn DM, Arthur RE Jr, Thomas DM, et al. Tyrosine hydroxylase is inactivated by catechol-quinones and converted to a redox-cycling quinoprotein: possible relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem*, 1999, 73:1309-1317.
- [8] Tessari I, Bisaglia M, Valle F, et al. The reaction of alpha-synuclein with tyrosinase: possible implications for Parkinson disease. *J Biol Chem*, 2008, 283:16808-16817.
- [9] LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Weihofen A, et al. Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nat Med*, 2005, 11:1214-1221.
- [10] Smith PF. Inflammation in Parkinson's disease: an update. *Curr Opin Investig Drugs*, 2008, 9:478-484.
- [11] Gerhard A, Pavese N, Hotton G, et al. In vivo imaging of microglial activation with [¹¹C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 2006, 21:404-412.
- [12] Chen H, Jacobs E, Schwarzschild MA, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 2005, 58:963-967.
- [13] Furukawa M, Xiong Y. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Mol Cell Biol*, 2005, 25:162-171.
- [14] Tong KI, Padmanabhan B, Kobayashi A, et al. Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Mol Cell Biol*, 2007, 27:7511-7521.
- [15] Padmanabhan B, Tong KI, Ohta T, et al. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol Cell*, 2006, 21:689-700.
- [16] Ikeyama S, Kokkonen G, Shack S, et al. Loss in oxidative stress tolerance with aging linked to reduced extracellular signal-regulated kinase and Akt kinase activities. *Faseb J*, 2002, 16:114-116.
- [17] Kwok JB, Hallupp M, Loy CT, et al. GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 2005, 58:829-839.
- [18] Salazar M, Rojo AI, Velasco D, et al. Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem*, 2006, 281:14841-14851.
- [19] Jain AK, Jaiswal AK. GSK-3beta acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *J Biol Chem*, 2007, 282:16502-16510.
- [20] Wang W, Yang Y, Ying C, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta protects dopaminergic neurons from MPTP toxicity. *Neuropharmacology*, 2007, 52:1678-1684.
- [21] Sun J, Hoshino H, Takaku K, et al. Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J*, 2002, 21:5216-5224.
- [22] MacLeod AK, McMahon M, Plummer SM, et al. Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes: demonstration that the KEAP1-NRF2 pathway, and not the BACH1-NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds. *Carcinogenesis*, 2009, 30:1571-1580.
- [23] Ishikawa M, Numazawa S, Yoshida T. Redox regulation of the transcriptional repressor Bach1. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38:1344-1352.
- [24] Dhakshinamoorthy S, Jain AK, Bloom DA, et al. Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants. *J Biol Chem*, 2005, 280:16891-16900.
- [25] Satoh T, Lipton SA. Redox regulation of neuronal survival mediated by electrophilic compounds. *Trends Neurosci*, 2007, 30:37-45.
- [26] Dinkova-Kostova AT, Fahey JW, Talalay P. Chemical structures of inducers of nicotinamide quinone oxidoreductase 1 (NQO1). *Methods Enzymol*, 2004, 382:423-448.
- [27] Jakel RJ, Townsend JA, Kraft AD, et al. Nrf2-mediated protection against 6-hydroxydopamine. *Brain Res*, 2007, 1144:192-201.
- [28] Trinh K, Moore K, Wes PD, et al. Induction of the phase II detoxification pathway suppresses neuron loss in Drosophila models of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 2008, 28:465-472.
- [29] Han JM, Lee YJ, Lee SY, et al. Protective effect of sulforaphane against dopaminergic cell death. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 321:249-256.
- [30] Jin F, Wu Q, Lu YF, et al. Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *Eur J Pharmacol*, 2008, 600:78-82.
- [31] Jagatha B, Mythri RB, Vali S, et al. Curcumin treatment alleviates the effects of glutathione depletion in vitro and in vivo; therapeutic implications for Parkinson's disease explained via in silico studies. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44:907-917.
- [32] Satoh T, Kosaka K, Itoh K, et al. Carnosic acid, a catechol-type electrophilic compound, protects neurons both in vitro and in vivo through activation of the Keap1/Nrf2 pathway via S-alkylation of targeted cysteines on Keap1. *J Neurochem*, 2008, 104:1116-1131.
- [33] Kweon MH, Adhami VM, Lee JS, et al. Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate. *J Biol Chem*, 2006, 281:33761-33772.
- [34] Murakami A, Ashida H, Terao J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett*, 2008, 269:315-325.
- [35] Guzman-Beltran S, Espada S, Orozco-Ibarra M, et al. Nordihydroguaiaretic acid activates the antioxidant pathway Nrf2/HO-1 and protects cerebellar granule neurons against oxidative stress. *Neurosci Lett*, 2008, 477:167-171.
- [36] Kim SJ, Kim JS, Cho HS, et al. Carnosol, a component of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) protects nigral dopaminergic neuronal cells. *Neuroreport*, 2006, 17:1729-1733.

- [37] Park JA, Kim S, Lee SY, et al. Beneficial effects of carnolic acid on dieldrin-induced dopaminergic neuronal cell death. *Neuroreport*, 2008, 19: 1301-1304.
- [38] Martin D, Rojo AI, Salinas M, et al. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem*, 2004, 279: 8919-8929.

(收稿日期:2010-12-20)

(本文编辑:戚红丹)

徐先结,叶钦勇.核转录因子红细胞系-2p45 相关因子-2 调控抗氧化酶表达与帕金森病[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2011,5(8): 2330-2334.