

• 基础论著 •

白藜芦醇促进 Keap1 蛋白降解的可能机制研究

王前 闫继红 吴波 孙海梅 杨姝 周德山

【摘要】 目的 探究白藜芦醇对经典抗氧化信号通路 Keap1-Nrf2-ARE 中关键蛋白 Keap1 的调控作用与机制。方法 培养 MDA-MB-231 细胞利用不同浓度的白藜芦醇(5 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$)处理 24 和 48 h, Western blot 方法检测细胞内 Keap1 蛋白和其调控转录因子 Nrf2 的表达变化。结合泛素-蛋白酶体抑制剂 MG-132 和溶酶体酶抑制剂氯喹的应用,进一步研究白藜芦醇降解 Keap1 蛋白的可能途径。结果 白藜芦醇明显降低 MDA-MB-231 细胞内 Keap1 蛋白的表达水平,具有浓度和时间依赖的倾向性;加入 MG-132 和氯喹并不影响白藜芦醇的作用。结论 白藜芦醇能够明显促进 Keap1 蛋白降解,进而激活 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路,增强细胞抗氧化应激的能力;而导致 Keap1 蛋白降解的途径有可能不依赖于泛素-蛋白酶体和溶酶体通路,详细机制仍有待进一步研究。

【关键词】 白藜芦醇; Keap1; 泛素-蛋白酶体途径; 溶酶体途径

Effect of resveratrol on degradation of Keap1 protein and its mechanism WANG Qian, YAN Ji-hong, WU Bo, SUN Hai-mei, YANG Shu, ZHOU De-shan. Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: ZHOU De-shan, Email: zhouds08@ccmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the effect and mechanism of resveratrol on Keap1, which is the key in the classic antioxidant signaling pathway Keap1-Nrf2-ARE. **Methods** The cultured MDA-MB-231 cells were treated with different concentrations of resveratrol (5 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$) for 24 or 48 hours. Western blot was performed to detect the intracellular Keap1 and its transcription factor Nrf2. Furthermore, an ubiquitin-proteasome inhibitor MG-132 and lysosomal enzyme inhibitor chloroquine, were applied to figure out the potential ways in which resveratrol could degrade Keap1 protein. **Results** Resveratrol significantly reduced the expression level of Keap1 protein in MDA-MB-231 cells. The effect was in a concentration- and time-dependent. However, the effect of resveratrol on Nrf2 content increased. This role was not inhibited by MG-132 or Chloroquine. **Conclusions** Resveratrol could dramatically promote the degradation of Keap1 protein, thereby activating the Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway and enhancing the ability of antioxidative cells. Our results indicated the degradation of Keap1 protein induced by resveratrol may not be dependent on the ubiquitin-proteasome or lysosome pathway; and the precise mechanism remains to be further studied.

【Key words】 Resveratrol; Keap1; Ubiquitin-proteasome pathway; Lysosomal pathway

动物和人的组织细胞内具有完善的抗氧化还原系统,发挥非常强的抗氧化能力,通过体内合成抗氧化剂(如谷胱甘肽和超氧化物歧化酶)或体外摄取抗氧化物质,保护机体免受氧化应激带来的损伤^[1]。Keap1 (Kelch-like ECH-associated)-Nrf2 (NF-E2-related factor 2)-ARE (antioxidant response elements) 是组织细胞抗氧化应答中最重要的信号转导通路,其中 Keap1 是调控核转录因子 Nrf2 活化的关键因素;Keap1 作为分子开关,开启或关闭 Nrf2 介导的抗氧化蛋白和二相解毒酶

基因的表达^[2-3]。

白藜芦醇 (Resveratrol, Res) 是一种天然的植物抗氧化毒素,具有较强的抗氧化作用。有研究表明:白藜芦醇预处理能有效地保护暴露于氧化应激的原代肝细胞,增加过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 醌氧化还原酶和谷胱甘肽 S 转移酶的活性,这一作用主要通过增加 Nrf2 的水平,并促进其入核而实现^[4]。但白藜芦醇的详细作用机制目前尚不完全清楚。一般认为,多数 ARE 诱导物能够增强 Keap1 蛋白的泛素化,进而被蛋白酶体降解,致使 Keap1 蛋白减少, Nrf2 游离,入核启动相应的抗氧化酶基因表达,发挥抗氧化作用^[5]。本课题组前期研究亦发现:白藜芦

醇能够使 UVA (ultraviolet A) 辐射的 HacaT 细胞的 Keap1 蛋白含量明显减少,但 mRNA 含量无明显变化,推测白藜芦醇可能直接降解 Keap1 蛋白,但其机制尚不明确。因此,本研究重点关注白藜芦醇对 Keap1 蛋白降解的可能机制,为阐明白藜芦醇的抗氧化作用及其临床应用提供新的实验依据。

材料与方 法

一、材料

1. 人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231:首都医科大学公共卫生与家庭医学学院惠赠。

2. 主要试剂:胎牛血清(Hy-Clone 公司);青霉素-链霉素溶液,胰蛋白酶,Leibovitz's L-15 干粉培养基(Invitrogen 公司);白藜芦醇(纯度为 98.5%,张家界湘汇公司);DMSO(Sigma 公司);将白藜芦醇溶解于 DMSO 配制成 0.1 mol/L 的溶液,抽滤后分装, -20 °C 贮存备用;MG-132(上海碧云天生物技术),浓度为 20 g/L;氯喹(Sigma 公司)去离子水配制为 20 mmol/L 的溶液, -20 °C 保存;羊抗人 Keap1(Santa Cruz 公司);兔抗人 Nrf2 多克隆抗体(Santa Cruz 公司);小鼠 GAPDH 单克隆抗体(Millipore 公司);蛋白变性裂解液,SuperECL Plus 超敏发光液(北京普利莱公司)。

二、方法

1. 细胞培养:MDA-MB-231 细胞按 1×10^5 /ml 浓度接种于 25 cm² 培养瓶中,加入 Leibovitz's L-15 培养基(含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素),培养条件为 37 °C,100% 空气条件的加湿培养箱。至细胞融合度约 80% 时,0.05% 胰蛋白酶液消化,按 1:3 比例进行传代培养。

2. 实验分组:将对数生长期 MDA-MB-231 细胞分为 6 组:(1)对照组(I);(2)5 μmol/L 白藜芦醇作用 24 h;(3)20 μmol/L 白藜芦醇作用 24 h;(4)对照组(II);(5)5 μmol/L 白藜芦醇作用 48 h;(6)20 μmol/L 白藜芦醇作用 48 h。同时,设 0.02% DMSO 作用 48 h 组。

MG-132 抑制剂实验中 MDA-MB-231 细胞分 3 组:(1)对照组;(2)10 μmol/L MG-132 作用 24 h;(3)10 μmol/L MG-132 预处理 6 h 后加入 20 μmol/L 白藜芦醇作用 24 h。

氯喹实验 MDA-MB-231 细胞亦为 3 组:(1)对照组;(2)20 μmol/L 氯喹作用 24 h;(3)20 μmol/L 氯喹和 20 μmol/L 白藜芦醇同时作用 24 h。

3. Western blot 方法:分别收集各组细胞,提取蛋白,BCA 法测定总蛋白浓度,每孔上样 20 ~ 80 μg 蛋白(依目的蛋白表达量的大小而定),经电泳、转膜后,5%

脱脂牛奶封闭 1 h,分别与 Keap1 抗体(0.4 μg/ml)、Nrf2 抗体(0.2 μg/ml)、GAPDH 抗体(0.1 μg/ml)孵育 4 °C 过夜,TBST 漂洗 3 次,GAPDH 抗体(0.5 μg/ml)室温孵育 1 h,ECL 显色,X 线曝光,凝胶成像分析系统摄像并分析。记录目的条带与内参 GAPDH 的灰度值比值,用每个实验组的相对灰度值与对照组相对灰度值的比值来表示,实验重复 3 次。

三、统计学方法

实验数据用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,两组以上采用 One-Way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 白藜芦醇对 MDA-MB-231 细胞 Keap1 蛋白含量的影响:与对照组相比,20 μmol/L 白藜芦醇处理 24 h 后,Keap1 蛋白含量下降 18% ($P < 0.05$),5 μmol/L 和 20 μmol/L 白藜芦醇处理 48 h 组,Keap1 蛋白含量分别下降 29% 和 46% ($P < 0.05$),可见白藜芦醇的作用具有时间和浓度依赖的倾向性。相应 Nrf2 蛋白含量增加 ($P < 0.05$)(图 1)。DMSO 组 Keap1 含量无明显变化,表明 DMSO 溶剂本身不影响 Keap1 蛋白含量。

2. MG-132 和氯喹不影响白藜芦醇对 MDA-MB-231 细胞内 Keap1 蛋白的降解:与 MG-132 处理组比较,加入白藜芦醇,Keap1 蛋白含量仍明显下降 ($P < 0.05$)(图 2)。与氯喹组相比,给予白藜芦醇后,Keap1 蛋白含量仍下降 ($P < 0.05$)(图 3)。

讨 论

氧化应激所致的组织细胞损伤是恶性肿瘤、心脑血管疾病以及内分泌代谢性疾病等发生发展的主要因素之一。Keap1-Nrf2-ARE 信号通路在机体氧化应激反应中发挥重要的调控作用。正常情况下,胞质内的 Keap1 与核转录因子 Nrf2 相连,将 Nrf2 锚定在细胞骨架分子 actin 上,Keap1 亦可作为 Cul3 依赖的 E3 泛素蛋白连接酶复合体的适配底物,介导 Nrf2 泛素化,被 26S 蛋白酶体降解^[6]。当细胞受到氧化应激刺激时,胞质内的 Keap1 与 Nrf2 解离,抑制 Nrf2 泛素化降解,使 Nrf2 蛋白稳定。游离的 Nrf2 进入细胞核与 Maf (muscle aponeurotic fibrosarcoma protein) 蛋白结合成异二聚体,并识别和结合 ARE 上,启动下游多种 ARE 依赖的基因转录,增强细胞的抗氧化应激能力^[7],可见,Keap1 在该信号转导通路中居于核心地位。近年,大量体外研究表明:天然的抗氧化剂白藜芦醇能够调节该细胞内信号转导分子的活性,增强抗氧化酶的表达。本实验表

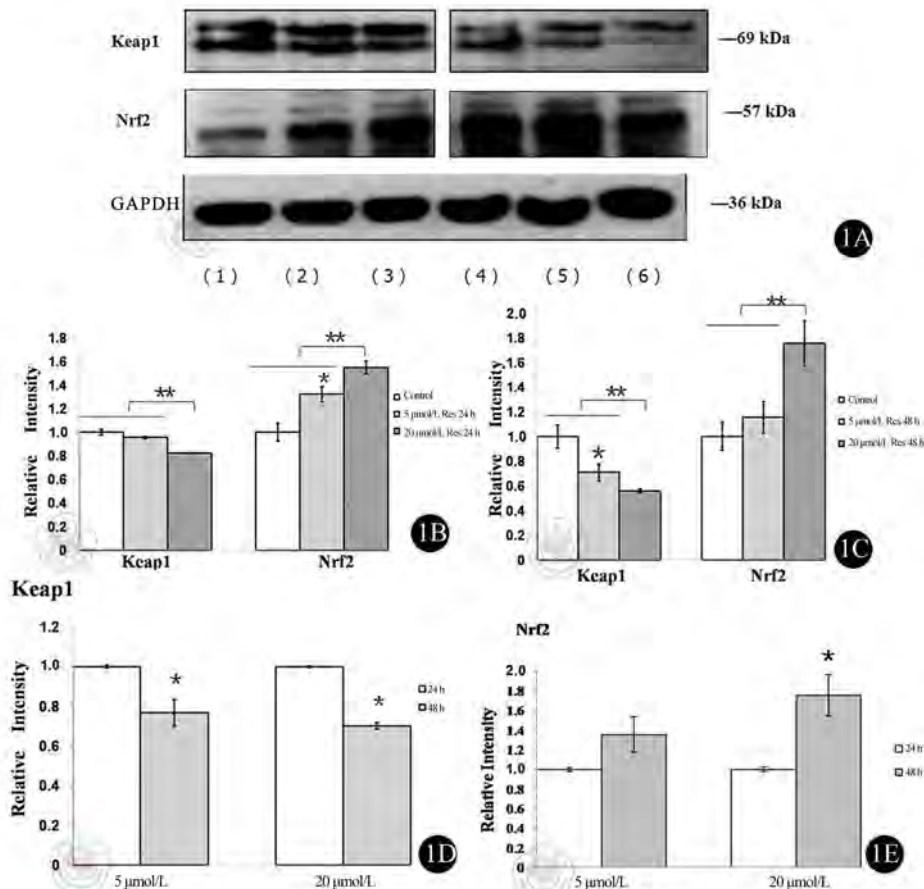


图1 白藜芦醇对MDA-MB-231各组细胞中Keap1和Nrf2表达的影响;图1B~1E各组实验中Keap1和Nrf2表达相对强度结果。与对照组相比, * $P < 0.05$, 差别有统计学意义。与对照组和实验组相比, ** $P < 0.05$, 差别均有统计学意义。(1) 对照组(24 h); (2) 5 μmol/L白藜芦醇作用24 h; (3) 20 μmol/L白藜芦醇作用24 h; (4) 对照组(48 h); (5) 5 μmol/L白藜芦醇作用48 h; (6) 20 μmol/L白藜芦醇作用48 h

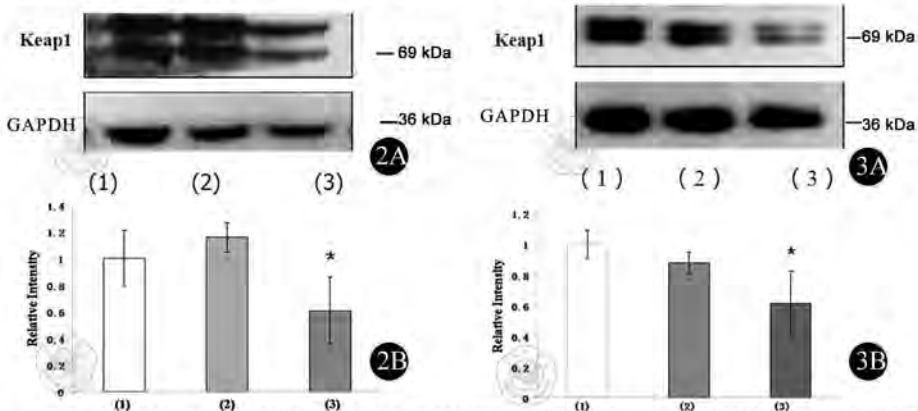


图2 2A: 显示MG-132预处理MDA-MB-231细胞,白藜芦醇对Keap1表达的调节;2B: 实验各组Keap1表达相对强度结果。与对照组相比, * $P < 0.05$, 差别有统计学意义。(1) 对照组; (2) 10 μmol/L MG-132作用24 h; (3) 10 μmol/L MG-132预处理6 h后加入20 μmol/L白藜芦醇作用24 h 图3 3A: 氯喹处理MDA-MB-231细胞,检测白藜芦醇对Keap1蛋白表达的作用;3B: 实验各组Keap1表达相对强度结果。与对照组相比, * $P < 0.05$, 差别有统计学意义。(1) 对照组; (2) 20 μmol/L氯喹作用24 h; (3) 20 μmol/L氯喹和20 μmol/L白藜芦醇同时作用24 h

明:白藜芦醇具有使细胞内 Keap1 表达下降作用。与此同时,核转录因子 Nrf2 表达增加,提示白藜芦醇可能通过促进 Keap1 蛋白降解,激活 Nrf2,发挥抗氧化应激

的作用。

已知在真核细胞存在四种蛋白水解体系:泛素-蛋白酶体体系、自噬-溶酶体体系、线粒体蛋白酶体系和钙

依赖蛋白酶体系^[8]。而且,细胞内大多数蛋白由泛素和相关酶介导,通过泛素-蛋白酶体通路降解。该降解途径为底物蛋白先以多聚泛素链的形式标记,而后被26S蛋白酶体识别,在ATP参与下降解成不同长度的肽段^[9-10]。业已证明:醛基肽类蛋白酶抑制剂MG-132为广泛应用的蛋白酶体抑制剂,具有抑制26S蛋白酶体降解蛋白的作用。本实验结果表明:加入MG-132后,不影响白藜芦醇对MDA-MB-231细胞内Keap1的降解作用,提示Keap1的降解可能由其他途径完成。据报道细胞暴露于醌诱导的氧化应激下,Keap1泛素化程度增加,但26S蛋白酶体抑制剂MG-132不能阻断Keap1的降解^[6]。近年报道:在Atg7-或p62缺失的小鼠肝细胞中Keap1蛋白积聚,而蛋白酶体抑制剂MG-132不影响Keap1的积聚,提示肝细胞Keap1可能通过自噬-溶酶体通路降解,以维持组织细胞的氧化还原平衡^[11],但给予溶酶体酶抑制剂(氯喹)后,亦不影响白藜芦醇对MDA-MB-231细胞内的Keap1降解作用。本实验结果表明:白藜芦醇具有较强的抗氧化应激作用,主要是通过降解Keap1蛋白,促进核转录因子Nrf2入核,启动抗氧化应激一系列酶和蛋白的表达,但有关白藜芦醇降解Keap1蛋白的途径仍不完全清楚,有待于今后进一步实验证明。阐明这一问题,对于深入研究Keap1蛋白相关疾病的发生机制具有重要理论意义,并为临床相关疾病预防与治疗提供实验依据。

参 考 文 献

[1] Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*,

2007,35:1147-1150.

- [2] Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, et al. Dual role of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res*, 2008, 58:262-270.
- [3] Baird L, Dinkova-Kostova AT. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol*, 2011, 85:241-272.
- [4] Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *Eur J Pharmacol*, 2008, 591:66-72.
- [5] Giudice A, Arra C, Turco MC. Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents. *Methods Mol Biol*, 2010, 674:37-74.
- [6] Zhang DD, Lo SC, Sun Z, et al. Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway. *J Biol Chem*, 2005, 28:30091-30099.
- [7] 李航, 段惠军. Nrf2/ARE 信号通路及其调控的抗氧化蛋白. *中国药理学通报*, 2011, 27:300-303.
- [8] Knecht E, Aguado C, Carcel J, et al. Intracellular protein degradation in mammalian cells: recent developments. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66:2427-2443.
- [9] Hasselgren PO, Fischer JE. Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. *Ann Surg*, 2001, 233:9-17.
- [10] Dudek EJ, Shang F, Liu Q, et al. Selectivity of the ubiquitin pathway for oxidatively modified proteins: relevance to protein precipitation diseases. *FASEB J*, 2005, 19:1707-1709.
- [11] Taguchi K, Fujikawa N, Komatsu M, et al. Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. *PNAS*, 2012, 109:13561-13566.

(收稿日期:2013-02-26)

(本文编辑:戚红丹)

王前, 闫继红, 吴波, 等. 白藜芦醇促进 Keap1 蛋白降解的可能机制研究[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(7):2991-2994.

中 华 临 床 医 师 杂 志