

Keap1-Nrf2-ARE 信号通路与糖尿病视网膜病变的相关性研究进展

唐艳红, 苏梅贵

(临夏州中医医院眼科, 甘肃 临夏 731400)

摘要:糖尿病视网膜病变(DR)是糖尿病并发症中最常见的微血管病变,是我国糖尿病(DM)患者视力下降甚至致盲的主要原因。近年来研究发现,氧化应激是 DR 的发病机制之一,而 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (Keap1)-核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)-抗氧化反应元件(ARE)信号通路是机体最重要的内源性抗氧化应激通路。故本文就 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路与氧化应激、DR 之间的相关性作一综述。

关键词:Keap1-Nrf2-ARE 信号通路;糖尿病视网膜病变;氧化应激

中图分类号:R774

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2024.10.041

文章编号:1006-1959(2024)10-0189-04

Research Progress on the Relationship Between Keap1-Nrf2-ARE Signaling Pathway and Diabetic Retinopathy

TANG Yan-hong, SU Mei-gui

(Department of Ophthalmology, Linxia State Hospital of Traditional Chinese Medicine, Linxia 731400, Gansu, China)

Abstract: Diabetic retinopathy (DR) is the most common microvascular disease among diabetic complications, and it is the main cause of vision loss and even blindness in patients with diabetes mellitus (DM) in our country. In recent years, it has been found that oxidative stress is one of the pathogenesis of DR, and Kelch-like epichlorohydrin related protein-1 (Keap1)-nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2)-antioxidant response element (ARE) signaling pathway is the most important endogenous anti-oxidative stress pathway. Therefore, this article reviews the correlation between Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway and oxidative stress and DR.

Key words: Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway; Diabetic retinopathy; Oxidative stress

糖尿病(diabetes mellitus, DM)已成为继心血管疾病和肿瘤之后第 3 位威胁人们健康和生命的非传染性疾病,已成为一个全球性的严重公共卫生问题^[1]。糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是 DM 最常见和严重的慢性并发症,是致残、致盲、致死的主要原因,严重影响着 DM 患者的生活质量。近年来 DR 发病机制研究重点已由四大生化机制向氧化应激机制转变。经研究证实^[2-4],氧化应激是 DR 发生发展的关键因素,而 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1(epoxy chloropropane Kelch sample related protein-1, Keap1)-核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2)-抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)信号通路是脊椎动物在进化过程中获得的最关键的细胞保护机

制之一,是近年发现的机体最重要的内源性抗氧化信号通路,也是一种综合的氧化还原敏感信号系统^[5]。目前,大量研究表明^[6-8],通过激活 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路,可以抑制氧化应激,延缓 DR 的发生发展,而以 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路为靶点防治由氧化应激导致的各种疾病是一种潜在的合理方法。故本文对 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路与氧化应激、DR 之间的相关性作一综述。

1 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路概述

Keap1-Nrf2-ARE 信号通路是机体抗氧化损伤的关键信号通路^[9]。生理状态下,胞浆内的 Keap1 通过含有 E3 的 Cul3 泛素连接酶与 Nrf2 结合在一起, Nrf2 被蛋白体酶降解。当机体发生氧化应激反应时,Keap1 与 Nrf2 解耦联,Keap1 的半胱氨酸残基被修饰,发生 Keap1 构象变化,稳定状态的 Nrf2 发生核转移进入细胞核,与 Maf 蛋白结合成异质二聚体后与 ARE 结合,启动 ARE 调控的 II 相代谢酶(谷胱甘肽-S-转移酶、NQO1、葡萄糖醛酸转移酶 1A6、黄曲霉素 B1 醛还原酶和微粒体环氧化物水解酶等)和抗氧化酶(HO-1、SOD 和 GSH-PX 等)的表达,从

作者简介:唐艳红(1992.6-),女,甘肃东乡县人,本科,主治医师,主要从事眼底病的中医药防治与研究

通讯作者:苏梅贵(1992.8-),女,甘肃甘谷县人,硕士,住院医师,主要从事眼底病的中医药防治与研究

而发挥抗氧化应激作用,使细胞内环境保持稳态^[10]。

2 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路和氧化应激的关系

氧化应激是一种活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 及活性氮 (eactive nitrogen species, RNS) 生产和清除不协调而导致机体失衡的状态。在生理条件下,以 RNS 和氧自由基 [如超氧阴离子 (O_2^-)、羟自由基 (OH^-) 和过氧化氢 (H_2O_2)] 为主的自由基的产生是正常的,也是无法避免的。事实上,机体生理活动需要低、中等水平的自由基,促进细胞新陈代谢、增殖、分化、免疫系统调节和血管重塑^[11]。为了控制其水平,细胞使用酶和非酶的抗氧化防御系统。所有生物体在其一生中经常暴露在内源性和外源性氧化应激源中,其中一些会导致有害的反应性氧化剂和亲电性。此外,许多环境刺激,包括紫外线辐射、电离辐射、化疗药物、炎性细胞因子和环境毒素等,都可以触发高水平的 ROS 和 RNS,从而打破机体正常的氧化还原平衡,最终导致氧化应激的产生^[12]。ROS 和 RNS 的升高会导致蛋白质、脂质的氧化损伤,从而可激活 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路抗氧化应激。

激活 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路的关键是激活 Nrf2,而 Nrf2 的激活主要受 Keap1 介导及 Nrf2 自身的磷酸化等调控。半胱氨酸巯基反应活性高,参与调控细胞识别、信号传导等生理过程。研究证实^[13,14],人类 Keap1 共含有 27 个半胱氨酸残基,其中 7 对 (Cys151、Cys257、Cys273、Cys288、Cys297、Cys434、Cys613) ROS 和亲电子试剂具有高度反应性,并被认为参与氧化还原反应。氧化应激作用下,细胞中的蛋白质发生构象变化,Keap1 的特定半胱氨酸残基修饰,Keap1 与 Nrf2 结合阻止其进入细胞核,故 Keap1 也被称为 Nrf2 的抑制剂^[15]。当机体发生氧化应激反应时,产生的某些化合物可以与含半胱氨酸的蛋白以共价键结合构成内源性亲电反应的蛋白质组,氧化应激的主要生物反应是抗氧化防御系统,而 Keap1-Nrf2-ARE 是这些蛋白控制的氧化应激反应途径中最突出的信号通路^[16,17]。

3 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路和 DR 的关系

Keap1-Nrf2-ARE 信号通路在抗氧化反应调节中起着至关重要作用^[18]。研究表明^[19],通过激活 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路,可以抑制氧化应激,延缓 DR 的发生发展。在没有氧化应激的情况下,Keap1 使 Nrf2 隔离在胞浆中,介导了 Nrf2 蛋白酶体

的降解。在暴露于氧化应激的情况下,Keap1 经历了构象变化,允许 Nrf2 移位到细胞核,结合到 ARE 区域,并启动靶基因的转录^[20]。

大量研究强调了 DM 视网膜中高水平的 ROS 及其在细胞信号改变中的作用,这种改变导致视网膜细胞的损伤,最终导致 DR^[21,22]。在 DR 条件下,大量的 ROS 可引起视网膜微血管、视网膜细胞和视网膜神经节细胞的交替和损伤。人体有一个复杂的氧化应激反应系统,可减少氧化剂的产生或增强抗氧化能力,从而减轻 ROS 对细胞的损害。Li X 等^[23]建立了 2 型糖尿病 DR 大鼠模型,以正常大鼠作为对照组,结果发现模型组大鼠房水中抗氧化指标 SOD、GSH-Px 及抗氧化能力均显著低于对照组 ($P < 0.05$),即视网膜 Keap1 蛋白表达明显降低,Nrf2 蛋白表达明显升高,说明 DR 大鼠视网膜细胞凋亡明显增加,并伴有明显的氧化应激反应,而 Keap1-Nrf2-ARE 通路的激活可能起到减轻氧化应激损伤、保护视网膜的作用。Xu Z 等^[24]研究发现,与野生型小鼠相比,Nrf2 缺乏的糖尿病小鼠在糖尿病 5 周后视网膜超氧化物显著增加。

4 基于 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路治疗 DR 的机制

DR 的发病受多因素、多环节、多基因的影响,具体致病机制尚不明确,但氧化应激是 DR 的重要发病机制之一。研究表明^[25],Keap1-Nrf2-ARE 信号通路可能是药物发挥保护作用的潜在抗氧化应激通路,激活此信号通路,可为治疗 DR 提供新思路、新途径。

4.1 西医治疗 Zhou X 等^[26]将培养的视网膜原代 Müller 细胞用谷氨酰胺合成酶 (GS) 抗体进行鉴定,并将其随机分为 3 组:正常血糖组 (NG, 5.5 mmol/L)、高血糖组 (HG, 30 mmol/L)、高血糖组 (30 mmol/L) 加普罗布考 (HGPB, 10 μ L),结果发现普罗布考可抑制高糖培养的人视网膜 Müller 细胞内 ROS 的生成,促进细胞增殖,减少凋亡,这可能与 Keap1-Nrf2-Are 氧化应激信号通路激活有关。Liu Q 等^[27]将小鼠分为 DM 组和非 DM 对照组,结果发现与非 DM 对照组相比,DM 组小鼠视网膜中 Nrf2 的表达明显上调,而非诺贝特可减轻 DR 氧化应激和神经炎症反应,其原因主要是通过调节 Nrf2 的表达和 NLRP3 的炎症小体激活来实现的。Xu X 等^[28]将 126 只 DR 大鼠随机分为模型组、实验组和对照组,模型组大鼠注射生理盐水,实验组给予氨基甲酰促红细胞生成素 (CEPO) 治疗,对照组给予红花黄色素 (SY) 治疗,

结果显示实验组 Nrf2 的表达水平明显高于对照组 ($P<0.05$),说明 CEPO 治疗 DR 的疗效优于 SY。因此,CEPO 可能在不影响血管生成的情况下通过激活 Nrf2 信号通路抑制 DR 大鼠视网膜组织细胞的凋亡和氧化应激损伤。Shi Q 等^[29]将大鼠随机分为正常对照组、糖尿病对照组和帕比农(BP)治疗组,结果发现与对照组相比,BP 治疗组 Nrf2 水平上调,提示 BP 通过激活 Nrf2 途径能显著降低 DR 大鼠视网膜前炎性细胞因子(IL-18 和 IL-1 β)表达,提高 SOD、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性,增强受损视网膜的抗氧化能力。

4.2 中医药治疗 Cai J 等^[30]研究发现,50、100 和 250 $\mu\text{g/ml}$ 的黄精多糖可促进 Nrf2 的表达,降低氧化应激,延缓 DR 的进展。Dong C 等^[31]将雄性鼠随机分为对照组、糖尿病组、人参皂苷 Rb1 组(20 mg/kg)和人参皂甙 Rb1 组(40 mg/kg),结果发现糖尿病大鼠视网膜 MDA 含量明显高于对照组($P<0.05$);且与糖尿病组比较,人参皂甙(20、40 mg/kg)治疗后 MDA 含量降低($P<0.05$);另与对照组相比,糖尿病组 Nrf2 含量降低($P<0.05$),表明人参皂甙 Rb1(20、40 mg/kg)可增加视网膜细胞核中 Nrf2 的含量。这些研究表明,人参皂苷 Rb1 可以通过激活 Nrf2 信号通路来调节大鼠视网膜抗氧化功能,进而减轻 DR。Bucolo C 等^[32]对正常和高糖条件下培养的人视网膜色素上皮细胞(RPE)进行了体外研究,结果证实姜黄素通过激活 Nrf2 信号通路对高糖诱导的 RPE 细胞损伤具有保护作用,提示姜黄素可能在 DR 的治疗中具有一定的治疗价值。Zhang T 等^[33]将 45 只小鼠随机分为 3 组:DR 模型、DR+高良姜精(1 mg/kg)、DR+高良姜精(10 mg/kg),结果发现高良姜素可诱导 Nrf2 的活化,且在 Nrf2 基因敲除的糖尿病小鼠中,高良姜素对血-视网膜屏障分解的衰减作用减弱。

4.3 其他治疗 Arumugam B 等^[34]研究发现,杨梅素衍生物 F2(杨梅叶提取物)可通过激活 Nrf2 来抗氧化,可以作为未来治疗 DR 的药物。Li S 等^[35]予以雄性糖尿病大鼠不同剂量的萝卜硫素(SFN),结果发现 SFN 增加了损伤视网膜中 Nrf2 的核积聚,并增加了 Nrf2 下游的两种主要抗氧化剂 HO-1 和 NQO1 的表达,延缓了 DR 的发生、发展。Song Y 等^[36]研究发现,蓝莓花色苷(BA)能上调视网膜抗氧化能力,提高 GSH 含量和谷胱甘肽过氧化物酶活性,降低 MDA 和 ROS

水平,还能增加 Nrf2 水平。这些结果提示,BA 可以保护视网膜细胞免受糖尿病引起的氧化应激和炎症反应,这可能是通过 Nrf2 信号来调节的。

5 总结

DR 是糖尿病最常见的微血管病变之一,迄今为止仍无靶点药物。目前大量研究表明,Keap1-Nrf2-ARE 是抗氧化应激反应最重要的内源性信号通路,合理激活 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路可能未来防治糖尿病并发症的一个潜在靶点。临床应对 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路进行更进一步的深入研究,探讨其在治疗 DR 方面的作用机制。

参考文献:

- [1]Darenskaya MA,Kolesnikova LI,Kolesnikov SI.Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction [J].Bull Exp Biol Med,2021,171(2):179-189.
- [2]Ola MS,Al-Dosari D,Alhomida AS.Role of Oxidative Stress in Diabetic Retinopathy and the Beneficial Effects of Flavonoids [J].Curr Pharm Des,2018,24(19):2180-2187.
- [3]Suzuki Y,Yao T,Okumura K,et al.Elevation of the vitreous body concentrations of oxidative stress-responsive apoptosis-inducing protein (ORAIP) in proliferative diabetic retinopathy[J].Graefes Archive for Clinical & Experimental Ophthalmology, 2019,257(7):1519-1525.
- [4]Yang X,Huo F,Liu B,et al.Crocins Inhibits Oxidative Stress and Pro-inflammatory Response of Microglial Cells Associated with Diabetic Retinopathy Through the Activation of PI3K/Akt Signaling Pathway[J].Journal of Molecular Neuroscience,2017,61(4):581-589.
- [5]Kang KA,Piao MJ,Ryu YS,et al.Interaction of DNA demethylase and histone methyltransferase upregulates Nrf2 in 5-fluorouracil-resistant colon cancer cells [J].Oncotarget,2016,7(26):40594-40620.
- [6]Kowluru RA,Mishra M,Institute KE,et al.Epigenetic regulation of redox signaling in diabetic retinopathy: Role of Nrf2[J].Free Radical Biology and Medicine,2017,103:155-164.
- [7]Li X,Deng A,Liu J,et al.The Role of Keap1-Nrf2-ARE Signal Pathway in Diabetic Retinopathy Oxidative Stress and Related Mechanisms[J].International Journal of Clinical Experimental Pathology,2018,11(6):3084-3090.
- [8]Goldstein LD,Lee J,Gnad F,et al.Recurrent loss of NFE2L2 exon 2 is a mechanism for Nrf2 pathway activation in human cancers[J].Cell Reports,2016,16(10):2605-2617.
- [9]Silva MDF,Prucoli L,Morroni F,et al.The Keap1/Nrf2-ARE Pathway as a Pharmacological Target for Chalcones [J].

- Molecules,2018,23(7):1803–1824.
- [10]Nezu M,Souma T,Yu L,et al.Transcription factor Nrf2 hyperactivation in early-phase renal ischemia-reperfusion injury prevents tubular damage progression [J].Kidney International,2016,91(2):387–401.
- [11]Rodríguez ML,Pérez S,Mena-Mollá S,et al.Oxidative Stress and Microvascular Alterations in Diabetic Retinopathy: Future Therapies[J].Oxid Med Cell Longev,2019,2019:4940825.
- [12]Wu Y,Tang L,Chen B.Oxidative stress: implications for the development of diabetic retinopathy and antioxidant therapeutic perspectives[J].Oxid Med Cell Longev,2014;2014:752387.
- [13]Li C,Cheng L,Wu H,et al.Activation of the KEAP1–NRF2–ARE signaling pathway reduces oxidative stress in Hep2 cells[J].Molecular Medicine Reports,2018,18(3):2541–2550.
- [14]Quinti L,Naidu SD,Träger U,et al.KEAP1-modifying small molecule reveals muted NRF2 signaling responses in neural stem cells from Huntington's disease patients[J].National Academy of Sciences,2017,114(23):E4676–E4685.
- [15]Almeida M,Soares M,Ramalhinho AC,et al.Prognosis of hormone-dependent breast cancer seems to be influenced by KEAP1,NRF2 and GSTM1 genetic polymorphisms[J].Molecular Biology Reports,2019,46(3):3213–3224.
- [16]Li B,Jiang T,Liu H,et al.Andrographolide protects chondrocytes from oxidative stress injury by activation of the Keap1–Nrf2–Are signaling pathway [J].Journal of Cellular Physiology,2018,234(1):561–571.
- [17]Ozben T.Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy[J].J Pharm Sci,2007,96(9):2181–2196.
- [18]David JA,Rifkin WJ,Rabbani PS,et al.The Nrf2/Keap1/ARE Pathway and Oxidative Stress as a Therapeutic Target in Type II Diabetes Mellitus[J].J Diabetes Res,2017,2017:4826724.
- [19]Keleku-Lukwete N,Suzuki M,Yamamoto M.An Overview of the Advantages of KEAP1–NRF2 System Activation during Inflammatory Disease Treatment [J].Antioxid Redox Signal,2018,29(17):1746–1755.
- [20]Chuan ZJ,Wei Y,Chao D,et al.Keap1–Nrf2 signaling pathway confers resilience versus susceptibility to inescapable electric stress[J].Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci,2018,268(8):865–870.
- [21]Ahmad,Ahsan.Biomarkers of inflammation and oxidative stress in ophthalmic disorders [J].J Immunoassay Immunochem,2020,41(3):257–271.
- [22]Pickering RJ,Rosado CJ,Sharma A,et al.Recent novel approaches to limit oxidative stress and inflammation in diabetic complications[J].Clin Transl Immunology,2018,7(4):e1016.
- [23]Li X,Deng A,Liu J,et al.The role of Keap1–Nrf2–ARE signal pathway in diabetic retinopathy oxidative stress and related mechanisms[J].International Journal of Clinical and Experimental Pathology,2018,11(6):3084–3090.
- [24]Xu Z,Wei Y,Gong J,et al.NRF2 plays a protective role in diabetic retinopathy in mice[J].Diabetologia,2014,57(1):204–213.
- [25]Battino M,Giampieri F,Pistollato F,et al.Nrf2 as regulator of innate immunity: A molecular Swiss army knife! [J].Biotechnology Advances,2018,36(2):358–370.
- [26]Zhou X,Ai S,Chen Z,et al.Probucol Promotes High Glucose-Induced Proliferation and Inhibits Apoptosis by Reducing Reactive Oxygen Species Generation in Müller Cells[J].International Ophthalmol,2019,39(12):2833–2842.
- [27]Liu Q,Zhang F,Zhang X,et al.Fenofibrate ameliorates diabetic retinopathy by modulating Nrf2 signaling and NLRP3 inflammasome activation [J].Mol Cell Biochem,2018,445 (1–2): 105–115.
- [28]Xu X,Cai Y,Yu Y.Molecular mechanism of the role of carbamyl erythropoietin in treating diabetic retinopathy rats [J].Exp Ther Med,2018,16(1):305–309.
- [29]Shi Q,Wang J,Cheng Y,et al.Palbinone alleviates diabetic retinopathy in STZ-induced rats by inhibiting NLRP3 inflammatory activity[J].J Biochem Mol Toxicol,2020,34(7):e22489.
- [30]Cai J,Zhu Y,Zuo Y,et al.Polygonatum Sibiricum Polysaccharide Alleviates Inflammatory Cytokines and Promotes Glucose Uptake in High-glucose- and High-insulin-induced 3T3–L1 Adipocytes by Promoting Nrf2 Expression[J].Molecular Medicine Reports,2019,20(4):3951–3958.
- [31]Dong C,Liu P,Wang H,et al.Ginsenoside Rb1 attenuates diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats [J].Acta Cirurgica Brasileira,2019,34(2):e201900201.
- [32]Bucolo C,Drago F,Maisto R,et al.Curcumin prevents high glucose damage in retinal pigment epithelial cells through ERK1/2-mediated activation of the Nrf2/HO–1 pathway [J].J Cell Physiol,2019,234(10):17295–17304.
- [33]Zhang T,Mei X,Ouyang H,et al.Natural flavonoid galangin alleviates microglia-triggered blood-retinal barrier dysfunction during the development of diabetic retinopathy [J].J Nutr Biochem,2019,65:1–14.
- [34]Arumugam B,Palanisamy UD,Chua KH,et al.Protective effect of myricetin derivatives from Syzygium malaccense against hydrogen peroxide-induced stress in ARPE-19 cells[J].Mol Vis,2019,25:47–59.
- [35]Li S,Yang H,Chen X.Protective effects of sulforaphane on diabetic retinopathy: activation of the Nrf2 pathway and inhibition of NLRP3 inflammasome formation [J].Exp Anim,2019,68 (2):221–231.
- [36]Song Y,Huang L,Yu J.Effects of blueberry anthocyanins on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes through Nrf2/HO–1 signaling[J].J Neuroimmunol,2016,301:1–6.

收稿日期:2023–05–09;修回日期:2023–05–26

编辑/杜帆