

# Nrf2/HO-1 信号通路在肝纤维化形成中的调控作用研究进展

## Progress in the Regulation of Nrf2 / HO-1 Signaling Pathway in Liver Fibrosis Formation

陈英 徐晨珊 盛开 韦星雨 张扬

Ying Chen Chenshan Xu Kai Sheng Xingyu Wei Yang Zhang

浙江中医药大学 中国·浙江 杭州 310051

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, Zhejiang, 310051, China

**摘要:** 肝纤维化是由各种致病因素引起的肝脏持续慢性损伤并修复的一种病理生理过程, 随病变进展可导致肝功能损害、肝硬化甚至肝癌。目前大量研究表明肝纤维化是可逆的且有多种信号通路参与肝纤维过程, 其中 Nrf2/HO-1 信号通路在肝纤维化过程中发挥着重要作用。因此, 论文通过对 Nrf2/HO-1 信号通路在肝纤维化形成中的调控作用作一总结与整理, 为探索肝纤维化的发病机制, 寻找新的治疗靶点提供理论依据。

**Abstract:** Liver fibrosis is a pathophysiological process caused by sustained chronic liver injury and repair caused by various pathogenic factors, which can lead to liver function impairment, cirrhosis and even liver cancer. A large number of studies have shown that liver fibrosis is reversible and various signaling pathways participate in liver fiber process, among which Nrf2 / HO-1 signaling plays an important role in liver fibrosis. Therefore, this paper summarizes the regulatory role of Nrf2 / HO-1 signaling in liver fibrosis, which provides theoretical basis for exploring the pathogenesis of liver fibrosis and finding new therapeutic targets.

**关键词:** 肝纤维化; Nrf2/HO-1 信号通路; 肝星状细胞; 氧化应激; 血管紧张素 II

**Keywords:** liver fibrosis; Nrf2 / HO-1 signaling pathway; hepatic stellate cells; oxidative stress; angiotensin

**DOI:** 10.12346/pmr.v4i3.6688

## 1 引言

肝纤维化是由各种致病因子引起机体自我修复的一种病理过程, 伴随肝脏细胞弥漫性组织外基质 (extracellular matrix, ECM) 过度沉积与异常分布发生, 兼有损伤性和修复性, 易导致肝功能严重损伤<sup>[1-2]</sup>、肝硬化甚至肝癌等。肝纤维化的形成发展由多种信号通路共同调控, 如 TGF- $\beta$  信号通路、MAPK 信号通路、PI3K 信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路、Nrf2/HO-1 信号通路等<sup>[3]</sup>。其中 Nrf2/HO-1 信号通路在肝纤维化过程中发挥着重要作用, 因此论文就 Nrf2/HO-1 信号通路在肝纤维化形成中的调控作用的研究进展做一综述。

## 2 Nrf2/HO-1 信号通路概述

### 2.1 Nrf2/HO-1 信号通路的组成

Nrf2/HO-1 信号通路由 Nrf2、Keap1、ARE 和 HO-1 等共同组成, 在细胞内发挥着重要的抗氧化及细胞毒防御

作用<sup>[4]</sup>。

核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2) 属于 Cap-n-collor 碱性亮氨酸拉链 (CNC-bZIP) 家族<sup>[5]</sup>, 是其中活力最强的转录调节因子<sup>[6]</sup>, 在肝脏中高度表达<sup>[7]</sup>。人 Nrf2 基因含有 Neh1-Neh7 七个不同特殊功能的相关蛋白同源结构区域。Neh1 是其最重要的结构区域, 在其主导下胞核内的小肌肉筋膜纤维肉瘤蛋白结合 Nrf2 形成特殊异二聚体, 提供 ARE 序列结合部位; Neh2 区域含有两种高度保守的结合位点能够与 Keap1 蛋白结合, 且二者结合越多 Nrf2 活性越低; Neh3 区域与特定的 ATP 酶 / 解旋酶 DNA 结合蛋白 6 结合启动转录过程; 在 Nrf2 进入胞核与 ARE 结合后, 位于 Neh1、7 区域之间的 Neh4、5 区域共同激活 cAMP 反应元件结合蛋白, 转录过程启动; Neh6 区域中含有高度保守的两个肽序列与  $\beta$ -转导重复相容蛋白结合后能抑制 Nrf2 的活动; Neh7 区域通过结合维甲酸 X $\alpha$  受

【作者简介】陈英 (1999-), 女, 中国浙江绍兴人, 在读本科生, 从事医药方面研究。

体阻止 Neh4、5 的活化进程,从而抑制 Nrf2 的激活<sup>[8]</sup>。综上,Nrf2 通过对 DNA 序列中的抗氧化反应原件(antioxidant response element, ARE)的识别、结合,实现目标基因的转录表达。

Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein1, Keap1) 为 Nrf2 的特异性受体,对氧化和亲电应激细胞保护反应起主要调节作用,并负向调节 Nrf2 信号通路<sup>[9]</sup>。Keap1 蛋白有 5 个结构域,其中发挥调节 Keap1 蛋白功能的主要结构域为 BTB 区及 IVR 区<sup>[10]</sup>。BTB 区可结合细胞骨架的肌动蛋白,促使 Keap1-Nrf2 解离,对 II 相解毒酶抗氧化基因的转录抑制也有重要作用;富含半胱氨酸的 IVR 区经刺激后可与 Nrf2 解离进而恢复后者活性,同时还影响泛素化连接酶的形成,调节 Nrf2 的稳定性。此外 DGR 区经典 6 片  $\alpha$  螺旋含有多个特定蛋白结合位点,能与 Nrf2 分子 N 端 Neh2 功能区的 ETGE 序列及 DLG 序列结合形成异二聚体,进而调节 Nrf2 及其通路的活性。ETGE 序列在其中至关重要,若发生突变或缺失则无法使两分子产生相互作用<sup>[6]</sup>。在正常状态下,该异二聚体被 Keap1 的 DGR 区域锚定于细胞质肌动蛋白,并通过 Keap1-Cul 3-Rbx 依赖的泛素化过程保持平衡,Nrf2 无法发生跨核膜转运而处于惰性状态,此时机体氧化和抗氧化系统处于平衡状态<sup>[11]</sup>。

ARE 存在于抗氧化蛋白类基因、II 相解毒酶基因、蛋白酶体/分子伴侣类基因、抗炎因子类基因等基因的启动子区域,为特异的保护性顺式作用元件或 DNA-启动子结合序列<sup>[10]</sup>。ARE 参与 Nrf2 转录因子调节基因的进展,Nrf2 与之结合后,可调节 NAD(P)H 醌氧化还原酶 1、血红素加氧酶-1 和谷胱甘肽合酶等 ARE 介导的抗氧化酶类和 II 相解毒酶基因的表达<sup>[7]</sup>。

血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1,HO-1) 主要分布在血细胞活跃代谢的组织器官如骨髓、肝、脾等<sup>[12]</sup>。作为血红素分解代谢的限速酶,其在生物体内最容易被诱导产生,属于抗氧化酶。在分子氧和 NADPH-细胞色素 P-450 还原酶的参与下<sup>[13]</sup>,HO-1 能催化血红素氧化降解<sup>[9]</sup>。HO-1 及其降解产物的协同作用包括抗炎、抗氧化、调控细胞凋亡等,参与机体多种病理生理反应。同时,HO-1 对细胞氧化应激损伤具有高度敏感性<sup>[13]</sup>。

## 2.2 Nrf2/HO-1 信号通路的活化

在生理状态下与 Keap1 结合的 Nrf2 处于低敏感状态,经泛素-蛋白酶体途径被迅速降解。而经氧化或亲电子刺激后,Keap1 蛋白构象改变,Nrf2-Keap1 结合体解耦连抑制 Nrf2 降解,而游离 Nrf2 则由胞质进入核启动抗氧化应激反应,并参与解毒和消除危害机体的外源性化学物质及其代谢产物<sup>[7,14]</sup>。此外,细胞发生氧化应激后多种蛋白激酶被激活,直接诱导 Nrf2 磷酸化,Nrf2 激活<sup>[4]</sup>。同时,Nrf2-Keap1 复合体解耦连,游离 Nrf2 移位至胞核识别、结合 ARE 核心序列激活下游基因的转录,促使下游抗氧化剂酶类及 II 相解

毒酶表达<sup>[6]</sup>。

HO-1 是下游表达产物之一,正常生理状态下 HO-1 的表达与活性较低,Nrf2 激活后 HO-1 表现出明显的抗氧化作用:一方面可催化血红素降解有利于阻止器官组织的氧化反应;另一方面其酶解产物有效清除 ROS,共同发挥抑制炎症活动、抗氧化反应、抑制细胞凋亡等作用<sup>[12]</sup>。

Nrf2/HO-1 信号通路的激活还可以降低细胞内氧化应激水平,抑制肝星状细胞的 (Hepatic stellate cell, HSC) 活化,延缓肝纤维化的过程<sup>[14]</sup>。Nrf2 及其下游保护性基因共同组成的抗氧化应激通路是现今发现的最重要的内源性抗氧化应激通路<sup>[7]</sup>。

## 2.3 Nrf2/HO-1 信号通路的调控

在 Nrf2/HO-1 信号传递过程中,有多种机制参与调控 Nrf2/HO-1 信号通路。

蛋白质稳定性是许多 ARE 依赖基因的诱导剂介导 Nrf2 激活的主要调控机制之一<sup>[15]</sup>。由于细胞内蛋白质的稳定性通常由蛋白酶体的降解速率决定,这种蛋白水解机制成为控制 Nrf2 蛋白稳定性和转录活性的主要方式。蛋白酶体抑制剂通过抑制其降解作用稳定 Nrf2。而通过依赖泛素的 26S 蛋白酶体降解蛋白质是一个高度调控的过程,涉及底物分子特异性识别和靶向。底物被蛋白酶体复合体降解之前由 E3 泛素连接酶进行泛素化,对需要降解的目标蛋白的选择主要取决于是否存在降解子,作为 E3 连接酶的识别基序,两者之间的相互作用被认为是调节靶蛋白稳定性的关键限速步骤。ARE 诱导剂可能通过阻止或减弱 E3 连接酶对 Nrf2 的识别相互作用亦或直接抑制了 E3 连接酶活性而降低蛋白酶体的降解速率。稳定 Nrf2。

同蛋白酶体,Keap1 也参与了 Nrf2 稳定性的调控。Keap1/Nrf2 复合物被认为是一种细胞氧化还原传感器,能调节 ARE 依赖基因的氧化应激激活过程。Keap1 蛋白带有的半胱氨酸残基被认为是亲电化合物直接攻击的靶点,从而导致 Nrf2 蛋白的释放。Keap1 在细胞质中保留 Nrf2,而且还积极促进其泛素化和被蛋白酶体降解的过程,任一残基突变都会消除这种泛素化活性。

除了直接影响 Keap1 外,Keap1 应激释放 Nrf2 还依赖于 Nrf2 自身的磷酸化,特别是在 Neh2 结构域位点上。Nrf2 被认为在多个位点被不同的蛋白激酶磷酸化,而其中一些由 PKC 家族成员介导的位点会促使 Nrf2 向胞核聚集。这些激酶的磷酸化发生在 Nrf2 的 40 位丝氨酸残基上,该位点位于 Neh2 结构域,表明该残基可能在调节 Nrf2 与 Keap1 的相互作用中发挥重要作用。

## 3 Nrf2/HO-1 信号通路及肝纤维化

### 3.1 Nrf2/HO-1 信号通路及 HSC

在受到刺激因素时静息态 HSC 发生表型改变活化转变为肌成纤维细胞,其产生的平滑肌肌动蛋白通过旁分泌与自

分泌作用,使HSC增殖分泌过多细胞外基质沉积于汇管区,这种活化状态引起的稳态失衡最终导致了肝纤维化<sup>[16]</sup>。作为肝纤维化发生的中心环节,HSC的激活是各种因素通过不同机制和方式作用的结果,现阶段主要通过从HSC激活机制中寻找分子靶点来达到制药及治疗的目的<sup>[17]</sup>。

有研究指出HSCs活化的关键并不在于表型的转化,而在于HSC凋亡。即通过HSCs凋亡削减HSCs活化细胞数量,进而使其致病的异常生理活动降低甚至停止<sup>[18]</sup>。

其中,Nrf2作为HSC中与氧化应激反应密切相关的中枢调节因子,在调控肝脏炎症、肝纤维化以及肝癌的过程中起重要作用<sup>[18-20]</sup>。Nrf2与抗氧化反应元件的相互作用能够介导细胞氧化平衡、调节细胞对凋亡信号的敏感度,当Nrf2减少或缺失时,HSC功能障碍,活化状态减少,凋亡加速<sup>[21]</sup>。大量研究证实Nrf2、HO-1蛋白表达的增加可诱导HSC-LX2细胞凋亡,从而抑制肝纤维化的发生<sup>[14, 22]</sup>。

### 3.2 Nrf2/HO-1 信号通路与肝脏氧化应激

氧化应激是引起肝细胞损伤的关键因素<sup>[23]</sup>。在肝纤维化发展过程中呈现了与氧化应激水平明显的相关性,即成纤维细胞内活性氧簇水平明显升高后刺激HSC大量活化,活化后的HSC又能刺激活化氧簇水平的继续增高<sup>[24]</sup>。

Nrf2在抗氧化应激反应中扮演着中枢调节者角色,能够与ARE识别并结合,使抗氧化蛋白和Ⅱ相解毒酶表达量增加,继而调节细胞氧化平衡使细胞对凋亡信号趋于迟钝<sup>[19]</sup>。当Nrf2缺如或激活受阻时,氧化应激源对细胞的毒性作用增强,细胞发生功能失调甚至凋亡<sup>[21]</sup>。此外Nrf2基因敲除小鼠对乙酰氨基酚诱导的肝细胞损伤表现出明显的易感性也证明了Nrf2/HO-1信号通路可通过抗氧化伤害机制实现抗肝纤维化。

近年来中国和其他国家相关研究表明许多药物通过提高肝脏Nrf2/HO-1信号通路表达来对抗肝损伤、肝纤维化的发生发展。例如,被认为具有良好抗氧化应激作用的丹参酮ⅡA能够通过激活上游蛋白激酶ERK、上调Nrf2表达及活性而诱导肝组织中HO-1蛋白表达,降低细胞毒性<sup>[25]</sup>。而Exendin-4可在肝脏脂质沉积未明显减轻的情况下通过激活该通路显著降低糖尿病小鼠的肝脏纤维化及氧化应激程度<sup>[26]</sup>。此外小柴胡汤能明显改善由CCl<sub>4</sub>诱导的慢性肝纤维化,抗肝纤维化机制可能与上调Nrf2通路抵抗氧化应激有关。肝爽颗粒和银杏内酯B、川芎嗪等单体中药以及蒿鳖养阴软坚方、虎金丸等中药复方的作用机制亦同理。但实际上,临床上暂时未找到Nrf2的有效激动剂。尽管中医药调节Nrf2/HO-1信号通路发挥抗纤维化作用的机制仍然存在许多难解问题,但深入探索中药中能激动Nrf2的有效成分,有益于为抗肝纤维化的研究提供新思路和新靶点<sup>[16,27,28]</sup>。

### 3.3 Nrf2/HO-1 信号通路与血管紧张素Ⅱ (AngⅡ)

AngⅠ经血管紧张素转化酶水解转化为AngⅡ。实验证明RAAS系统中的ACE-AngⅡ-AT1R轴通过激活HSC、

诱导HSC增殖和抑制HSC凋亡、加重胶原沉积、增加促纤维化因子的数量等多种途径加速肝纤维化进程。且AngⅡ能使机体内NADPH氧化酶活性增高,促使ROS在肾脏和心血管大量合成,使机体氧化应激能力增强<sup>[29]</sup>。由此,被ROS活化的PKC可诱导Nrf2从复合物解离并移动进入核,同时使HO-1的表达量显著上升,基于此,部分学者认为AngⅡ能够激活Nrf2/HO-1信号通路从而导致肝纤维化。Ferrostatin-1能够缓解AngⅡ诱导的星状胶质细胞的炎症和铁死亡,其内在机制极可能是其能够抑制ROS水平和激活Nrf2/Keap1/HO-1信号通路。

## 4 结语与展望

综上所述,Nrf2/HO-1信号通路是人体内调控细胞氧化损伤的重要通路,在肝纤维化过程中发挥着重要调节作用,该信号通路的细胞因子和分子对HSC增殖活化起抑制作用,未来有望通过操控其表达水平来诱导HSC凋亡以对抗肝纤维化。但仍有一些具体机制有待进一步研究。例如,Nrf2-Keap1相互作用调节Nrf2稳定性的机制尚不明确、Nrf2与其他转录因子的相互作用机制也有待深入研究等。

Nrf2/HO-1信号通路因其在氧化应激、炎症反应、调控人体稳态中的重要作用,在慢性肝病、心血管疾病、神经疾病、小儿呼吸疾病的预防与治疗都具有广泛的应用前景。虽然激活该通路对人体有保护作用,但过度激活会适得其反。所以如何对该通路的开关进行微调,使其能够更好地被应用于临床,也是仍需解决的问题。

## 参考文献

- [1] 徐列明,刘平,沈锡中,等.肝纤维化中西医结合诊疗指南(2019年版)[J].中国中西医结合杂志,2019,39(11):1286-1295.
- [2] 徐小元,丁惠国,李文刚,等.肝硬化诊治指南[J].临床肝胆病杂志,2019,35(11):2408-2425.
- [3] 詹康.肝纤维化发生相关信号传导通路的研究进展[J].湖北民族大学学报(医学版),2020,37(3):87-90.
- [4] 董文珠,曹晓倩,王璐,等.AngⅡ-ROS-PKC/Nrf2/HO-1通路调控LX-2细胞增殖的机制研究[J].浙江中医药大学学报,2018,42(4):319-325.
- [5] 胡睿.Nrf2/ARE信号通路参与小柴胡汤抗大鼠肝纤维化的机制研究[D].遵义:遵义医学院,2018.
- [6] 郭依依.姜黄素对急性高脂血症大鼠肝脏氧化应激及Nrf2/HO-1信号通路的影响[D].石家庄:河北医科大学,2016.
- [7] 唐诗慧.蒿鳖养阴软坚方正丁醇提取部分影响Nrf2/HO-1信号通路抑制肝纤维化的作用[D].天津:天津医科大学,2018.
- [8] 叶胜,曹钰.Nrf2/HO1信号通路调控脑缺血一再灌注氧化应激损伤的研究进展[J].中华急诊医学杂志,2019,28(12):1571-1575.
- [9] HU L, TIAN K, ZHANG T, et al. Cyanate Induces Oxidative Stress Injury and Abnormal Lipid Metabolism in Liver through Nrf2/HO-1 [J].Molecules, 2019,24(18):3231-3251.

- [10] 刘学,刘骅漫,张伟.核转录因子Nrf2与肺纤维化相关研究进展[J].湖南中医杂志,2018,34(4):160-164.
- [11] 李孟心,张枫惠,韩高铤,等.Nrf2/HO-1信号通路在人诱导性多能干细胞氧化应激中的作用[J].中国生物化学与分子生物学报,2019,35(7):794-802.
- [12] 李海平,黄菱,符传海,等.血清中核因子E2相关因子2、HO-1水平与胆汁淤积性肝病患者肝损伤程度的关系分析[J].中国实验诊断学,2020,24(9):1462-1466.
- [13] 张丽,赵龙凤,杨慧,等.还原型谷胱甘肽对大鼠肝星状细胞HSC-T6增殖及核转录因子NF-E2相关因子2/血红素加氧酶-1信号通路的影响[J].中华肝脏病杂志,2012,20(7):507-511.
- [14] 卢娜. 蒿鳖养阴软坚方通过影响Nrf2/HO-1信号通路抑制肝纤维发生[D].天津:添加医科大学,2017.
- [15] NGUYEN T, YANG C S, PICKETT C B. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress [J].Free Radic Biol Med,2004,37(4):433-41.
- [16] 吕艳杭,吴姗姗,王振常,等.中医药通过Nrf2/ARE发挥抗肝纤维化作用的研究进展[J].中华中医药学刊,2021,39(1):142-145.
- [17] 李博,张寿文,程波翔,等.肝纤维化与Wnt信号转导通路及该通路干预研究现状[J].中华中医药学刊,2017,35(5):1174-1176.
- [18] 蔡陈效,鈕莉,王晓晗,等.慢病毒载体介导的Nrf2表达下调对肝星状细胞生物学行为的影响[J].中国现代医生,2020,58(13):15-18+26+193.
- [19] 张孝盈,宓余强.肝纤维化影响因素的研究进展[J].医学综述,2018,24(6):1062-1066.
- [20] 李桃,王汉东,丁宇,等.Nrf2基因敲除对小鼠蛛网膜下腔出血后小胶质细胞/巨噬细胞活化的影响[J].医学研究生学报,2015,28(1):11-15.
- [21] 孙静. 转录因子Nrf2在小鼠酒精暴露引发的肝脏及胰腺损伤中的作用及其机制研究[D].沈阳:中国医科大学,2018.
- [22] 张丽,方步武.虎杖苷抑制肝星状细胞增殖活化的作用和机制研究[J].天津医科大学学报,2020,26(4):309-312.
- [23] Devi SL, Anuradha CV. Oxidative and nitrosative stress in experimental rat liver fibrosis: protective effect of taurine[J]. Environ Toxicol Pharmacol,2010,29(2):104-110.
- [24] 王蓉,王静,宋复兴,等.丹参素通过调节Nrf2/HO-1和NF- $\kappa$  B/I $\kappa$ B $\alpha$ 信号通路发挥抗大鼠肝纤维化的作用[J].中国药理学与毒理学杂志,2019,33(10):918-918.
- [25] 张笑菲,高卓维,吕志平,等.丹参酮II A抑制肝纤维化作用机制的研究进展[J].山东医药,2018,58(28):86-89.
- [26] 方舒,蔡迎迎,李萍,等.Exendin-4通过激活Nrf2/HO-1通路减轻糖尿病小鼠的肝脏氧化应激及纤维化[J].南方医科大学学报,2019,39(4):464-470.
- [27] 侯书鹏.银杏内酯B通过Nrf2/HO-1通路抑制糖尿病大鼠肝损伤机制研究[J].陕西中医,2021,42(8):1005-1009.
- [28] 刘晓昆,王立新.肝爽颗粒通过Nrf2/HO-1信号通路缓解慢性肝损伤作用及机制研究[J].天津中医药大学学报,2021,40(1):98-103.
- [29] 廉亚洁.探讨血管紧张素转换酶2、氧化应激与高血压的关系[J].中西医结合心血管病电子杂志,2015,3(2):102-103.