

· 综述 ·

P62-Nrf2 通路在非酒精性脂肪性肝炎中的作用

吕泉锐 朱惠娟 龚凤英

中国医学科学院, 北京协和医学院, 北京协和医院内分泌科, 卫健委内分泌重点实验室, 协和转化医学中心 100730

通信作者: 龚凤英, Email: fygong@sina.com

【摘要】 非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是目前最常见的慢性肝病, 大约有 1/3 的 NAFLD 患者会发展为非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)。多数学者认为, NASH 的发病主要与肝脏脂肪异常积累和氧化应激等因素有关。核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 是细胞内抗氧化应激反应中的关键因子, 而 P62 是一种多功能蛋白质, 能够通过多种途径激活 Nrf2。研究发现, 抑制 P62-Nrf2 通路会加重肝脏脂肪变性、炎症反应和纤维化程度。而一些应用于其他疾病的药物, 包括氯硝柳胺乙醇胺、依西替米等能够通过激活该通路抑制 NASH 的发生、发展。

【关键词】 核因子 E2 相关因子 2; P62; 非酒精性脂肪性肝炎; 氧化应激

基金项目: 北京市自然科学基金 (7182130, 7082079); 国家自然科学基金 (81370898, 30771026, 30540036); 人社部留学人员科技活动项目择优资助经费 (启动类); 国家临床重点专科建设项目单位 (WBYZ2011-873)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121383-20200404-04010

Role of P62-Nrf2 pathway in nonalcoholic steatohepatitis Lyu Xiaorui, Zhu Huijuan, Gong Fengying. Department of Endocrinology, Key Laboratory of Endocrinology of National Health Commission, The Translational Medicine Center of PUMCH, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

Corresponding author: Gong Fengying, Email: fygong@sina.com

【Abstract】 Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common chronic liver disease currently, and about one-third of which will develop nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Most scholars believe that the pathogenesis of NASH is mainly related to the abnormal accumulation of liver fat and oxidative stress. Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) is a key factor in intracellular antioxidant stress response, and P62 is a multifunctional protein, which can activate Nrf2 through many ways. It is found that inhibition of P62-Nrf2 pathway could aggravate steatosis, inflammatory response and fibrosis of liver. It has been reported that some drugs used in other diseases, including niclosamide ethanolamine and ezetimibe, can inhibit the development of NASH by activating this pathway.

【Key words】 Nuclear factor E2-related factor 2; P62; Nonalcoholic steatohepatitis; Oxidative stress

Fund program: Natural Science Foundation of Beijing of China (7182130, 7082079); National Natural Science Foundation of China (81370898, 30771026, 30540036); Scientific Research Foundation for the Selected Returned Overseas Chinese Scholars, Ministry of Human Resources and Social Security of China (Start-up); National Key Program of Clinical Science (WBYZ2011-873)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121383-20200404-04010

目前, 非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的病因尚未完全明确。多数学者认为氧化应激在其发病过程中发挥重要作用。P62 是一种多功能蛋白质, 能激活抗氧化应激反应中的关键因子——核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)。因此, 本文就 P62-Nrf2 通路在

NASH 中发挥的作用及机制作一综述。

1 NASH 概述及发病机制

非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是一种由肝细胞脂质积聚引起的进行性疾病。随着疾病发展, NAFLD 可以从单纯性脂肪肝进展为 NASH, 甚至肝

硬化及肝癌。目前, NALFD 被认为是最常见的慢性肝病, 而其中大约有 30% 的 NAFLD 患者会发展为严重的 NASH^[1]。NASH 的病理特点主要包括: 脂肪变性、气球样变、小叶炎性反应和纤维化。然而, 尽管关于 NASH 治疗的研究越来越多, 目前尚缺乏针对该疾病的专门治疗药物。

NASH 的发病机制至今尚未明确, 目前的主流学说为“二次打击学说”。第一次“打击”指肝脏发生脂肪变性。由于胰岛素抵抗等因素, 肝脏内游离脂肪酸流入增加, 脂肪从头生成增加, 以及脂质输出途径受损, 导致肝脏内脂肪异常积累^[2]。第二次“打击”指肝脏发生氧化应激。肝脏内脂肪酸积聚过多, 伴随线粒体功能受损, 产生过量的活性氧簇, 从而导致 Kupffer 细胞数量增多且活化, 其分泌的炎症因子增加, 使肝脏内炎症反应增加; 此外脂肪酸还可激活肝星状细胞, 促进其产生胶原, 使肝脏纤维化程度增加^[3-4]。

2 P62 和 Nrf2 概述

P62 也被称为 SQSTM1/A170/ZIP/STAP, 相对分子质量为 62 000, 最初被鉴定为一种能结合淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶 (LCK) 的蛋白质。磷酸化 P62 是其活性形式。P62 具有多个功能基序, 其中微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 相互作用区 (LIR) 和 C 末端泛素相关 (UBA) 结构域能作为自噬受体/接收器, 通过识别多泛素链、与 LC3 结合参与自噬过程, 从而清除受损的蛋白质和细胞器^[5]。近年来的研究还发现, P62 通过激活不同通路发挥不同的作用, 如 P62 能激活核因子- κ B, 促进炎症反应的发生; 激活 Nrf2, 发挥抗氧化应激的作用; 激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (mTORC1), 感知机体营养状态的变化。

Nrf2 (或称 Nfe2l2) 是一种碱性亮氨酸拉链转录因子, 能调节抗氧化酶、亲电结合酶、泛素/蛋白酶体、热休克蛋白等多种细胞应激相关因子的转录过程^[6]。Nrf2 作为抗氧化、抗炎等细胞防御手段的主要调节因子, 对心血管疾病、肝脏疾病和肾脏疾病等发挥保护作用。

正常情况下, Nrf2 主要通过与其 Kelch ECH 相关蛋白 1 (Keap1) 和肌动蛋白细胞骨架的相互作用而定位在细胞质中。而 Nrf2 的降解通常是由 Keap1-Cul3-E3 泛素连接酶复合物将其泛素化后, 在 26S 蛋白酶体上完成的^[7]。当细胞受到氧化应激刺激后, Keap1 的巯基发生改变, 使其与 Nrf2 解离, 导致

Nrf2 进入细胞核内, 与靶基因启动子区的抗氧化反应元件 (ARE) 结合, 促进抗氧化酶的表达, 启动抗氧化应激反应^[8]。研究发现, P62 能够通过两种途径激活 Nrf2。首先, 内源性 P62 的积累能将 Keap1 隔离成聚集体, 从而抑制 Keap1 介导的 Nrf2 泛素化和随后蛋白酶体降解 Nrf2 的过程^[9]。其次, Keap1 自身的降解也受 P62 的调控。研究发现, P62 的过表达能显著缩短 Keap1 的半衰期, 而抑制 P62 的表达则能延长 Keap1 的半衰期^[10]。因此, P62 能通过加快 Keap1 的降解, 间接使 Nrf2 的积累增加, 稳定性增加, 从而发挥抗氧化应激的作用。Nrf2 还能促进 P62 基因 (SQSTM1 基因) 的转录。二者之间形成一个正反馈环, 互相促进, 共同发挥抗氧化应激的作用^[11]。

3 P62 和 Nrf2 在 NASH 中的作用

3.1 Nrf2 在 NASH 中的作用 研究显示, 敲除 Nrf2 基因会导致小鼠从单纯性脂肪肝发展为 NASH^[12]。主要与 Nrf2 改善肝脏脂肪变性和减轻炎症反应及纤维化程度有关。

研究发现, 与野生型小鼠相比, Nrf2 基因敲除小鼠肝脏内参与脂肪酸合成的 ATP-柠檬酸裂解酶、乙酰辅酶 A 羧化酶- α 、脂肪酸合成酶的 mRNA 表达显著增加^[13]; 而肝脏特异性表达 Nrf2 的 NASH 模型小鼠肝脏中与 β 氧化相关的肉碱棕榈酰转移酶 II (CPT2) 基因和负责甘油三酯输出的微粒体甘油三酯转移蛋白 (MTTP) 基因等的 mRNA 表达水平明显升高^[14]。上述结果表明, Nrf2 能抑制肝脏内脂肪酸合成相关蛋白酶, 促进脂肪酸氧化和脂质运输相关蛋白的表达, 从而改善肝脏脂肪变性。

Chowdhry 等^[15]研究发现, 与野生型小鼠相比, Nrf2 基因敲除的 NASH 模型小鼠肝脏内醌氧化还原酶活性及抗氧化剂谷胱甘肽含量均显著降低, 而白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 、一氧化氮合酶、环氧合酶等的 mRNA 表达水平增加。表明 Nrf2 基因敲除导致小鼠的抗氧化应激能力降低, 并促进炎症反应的发生。此外, 过表达 Nrf2 的 NASH 模型小鼠的肝脏胶原纤维沉积程度与对照组相比明显下降; 与活性氧簇生成相关的细胞色素 P450 2E1、细胞色素 P450 4A10 和 NADPH 氧化酶 2 等氧化剂的表达也随之下降, 提示 Nrf2 能改善小鼠的肝脏纤维化程度, 可能与其介导的抗氧化应激反应有关^[16]。总之, 这些结果表明 Nrf2 可能通过介导抗氧化应激反应, 减轻 NASH 小鼠肝脏中的炎症反应和纤维化程度。

3.2 P62-Nrf2 通路在 NASH 中的作用 研究发现,

与健康人和NAFLD患者相比,NASH患者肝脏中P62的表达明显升高。同时,NASH模型小鼠肝脏中P62的表达也较对照小鼠显著增加。P62能够通过激活Nrf2促进抗氧化蛋白的表达。提示P62在NASH的发病过程中也发挥了一定作用^[17]。

研究表明,与单独敲除 Nrf2 或P62基因的小鼠相比,同时敲除 Nrf2 和P62基因(DKO型)的小鼠肝脏脂肪变性、活动度和纤维化评分均明显增加,同时敲除Nrf2和P62基因会加重NASH的严重程度^[18]。进一步研究发现,DKO型小鼠还表现出血清和粪便中脂多糖水平升高,而脂多糖能促进Kupffer细胞分泌的炎性因子肿瘤坏死因子- α mRNA表达增加。这些结果提示,同时敲除P62和 Nrf2 基因可使小鼠体内脂多糖的表达增加,导致Kupffer细胞介导的炎性反应增加,从而促进NASH的发生、发展^[18]。

棕榈酸是哺乳动物体内常见的一种饱和脂肪酸,能诱导细胞产生脂毒性。脂毒性指细胞内脂肪酸的过度积累,产生了过量的活性氧簇,导致细胞发生功能障碍或死亡,与NASH的发生、发展密切相关。Park等^[19]发现,P62基因敲除小鼠胚胎成纤维细胞棕榈酸诱导产生的活性氧簇含量是对照组的8倍左右,同时还伴有 Keap1 蛋白的降解减少以及 Nrf2 靶基因的表达下降。进一步研究发现,P62能通过促进 AMP 依赖性蛋白激酶和UNC-51样自噬激活激酶-1之间的相互作用,诱导 ULK1 的磷酸化,导致细胞发生自噬,促进Keap1降解和 Nrf2 激活,从而保护细胞免受脂毒性的损害^[20]。

4 基于P62-Nrf2通路的潜在治疗药物

4.1 氯硝柳胺乙醇胺(Niclosamide ethanolamine, NEN) NEN是美国食品药品监督管理局(FDA)批准的一种驱虫药,广泛应用于肠道寄生虫感染的治疗。动物实验表明,NEN能够降低高脂饮食小鼠肝脏内的脂肪含量和聚集程度,从而减轻肝脂肪变性^[21]。还有研究发现,使用NEN干预肝Hepa1c1c7细胞后,饱和脂肪酸诱导的细胞死亡数明显下降,同时还伴有P62的磷酸化和Keap1的降解增加^[22]。而敲除P62基因后再使用NEN处理小鼠胚胎成纤维细胞发现,细胞内Nrf2的表达和饱和脂肪酸诱导的细胞死亡数与对照组相比无明显差异。表明NEN能够改善小鼠肝脏脂肪变性,通过激活P62-Nrf2通路减轻脂毒性的损害^[22]。

4.2 依西替米(Ezetimibe) 依西替米是一种有效的胆固醇吸收抑制剂,经FDA批准广泛用于治疗高

胆固醇血症。基于45例NAFLD患者的药物试验发现,经过24个月的依西替米治疗后,患者的肝脏病理特征如脂肪变性、坏死性炎性反应、气球样变以及NAFLD活性评分等与治疗前相比均得到明显改善^[23]。在NASH模型小鼠中也得到了一致的结果,即给予依西替米处理能够明显减少小鼠肝脏内的脂滴大小和数量;降低炎性因子、转氨酶和肝I型胶原mRNA的表达水平以及改善纤维化程度^[24-25]。进一步研究发现,与对照组相比,用含依西替米饲料喂养的小鼠肝脏内TBARS(反映肝脏氧化应激程度)水平降低,同时还检测到P62磷酸化水平和依西替米的表达明显增加。上述结果提示,依西替米能够通过激活P62-Nrf2通路,减轻小鼠肝脏的氧化应激反应,从而抑制NASH的发生、发展^[25]。

综上所述,NAFLD是目前最常见的慢性肝病,大约有1/3的患者会发展为NASH。然而,目前尚未研发出能治愈NASH的药物。Nrf2作为体内最重要的抗氧化因子,能够被P62所激活,调控下游抗氧化剂的表达,启动抗氧化反应。研究发现,抑制P62-Nrf2通路会加重小鼠肝脏内脂肪变性、炎性反应和纤维化程度,从而促进NASH的发生、发展。而NEN和依西替米能激活该通路,介导抗氧化应激反应,从而减轻肝细胞脂毒性和NASH小鼠肝脏脂肪变性和纤维化程度。但是,目前对P62-Nrf2通路在NASH中作用机制的研究还不够深入,同时也尚未进行NEN和依西替米治疗NASH患者的临床试验。未来还需要继续探索P62-Nrf2通路在NASH中的作用,为其成为NASH治疗靶点提供证据。

参 考 文 献

- [1] Dietrich P, Hellerbrand C. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2014, 28 (4): 637-653. DOI: 10.1016/j.bpg.2014.07.008.
- [2] Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Gastroenterol, 2013, 48 (4): 434-441. DOI: 10.1007/s00535-013-0758-5.
- [3] Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, et al. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it [J]. Mitochondrion, 2006, 6 (1): DOI: 1-28. 10.1016/j.mito.2005.10.004.
- [4] Li S, Tan HY, Wang N, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16 (11): 26087-26124. DOI: 10.3390/ijms161125942.
- [5] Komatsu M, Kageyama S, Ichimura Y. P62/SQSTM1/A170:

- physiology and pathology[J]. *Pharmacol Res*, 2012, 66(6):457-462. DOI:10.1016/j.phrs.2012.07.004.
- [6] Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007, 47(1):89-116. DOI:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046.
- [7] Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(22):8137-8151. DOI:10.1128/mcb.23.22.8137-8151.2003.
- [8] Wang X, Hai CX. ROS acts as a double-edged sword in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus; is Nrf2 a potential target for the treatment? [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2011, 11(12):1082-1092. DOI:10.2174/138955711797247761.
- [9] Lau A, Wang XJ, Zhao F, et al. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency; direct interaction between Keap1 and P62[J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(13):3275-3285. DOI:10.1128/MCB.00248-10.
- [10] Taguchi K, Fujikawa N, Komatsu M, et al. Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, 109(34):13561-13566. DOI:10.1073/pnas.1121572109.
- [11] Jain A, Lamark T, Sjøttem E, et al. P62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(29):22576-22591. DOI:10.1074/jbc.M110.118976.
- [12] Wang C, Cui Y, Li C, et al. Nrf2 deletion causes "benign" simple steatosis to develop into nonalcoholic steatohepatitis in mice fed a high-fat diet[J]. *Lipids Health Dis*, 2013, 12(1):165. DOI:10.1186/1476-511X-12-165.
- [13] Meakin PJ, Chowdhry S, Sharma RS, et al. Susceptibility of Nrf2-Null mice to steatohepatitis and cirrhosis upon consumption of a high-fat diet is associated with oxidative stress, perturbation of the unfolded protein response, and disturbance in the expression of metabolic enzymes but not with insulin resistance[J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(17):3305-3320. DOI:10.1128/MCB.00677-14.
- [14] Lee LY, Kohler UA, Zhang L, et al. Activation of the Nrf2-ARE pathway in hepatocytes protects against steatosis in nutritionally induced non-alcoholic steatohepatitis in mice[J]. *Toxicol Sci*, 2014, 142(2):361-374. DOI:10.1093/toxsci/kfu184.
- [15] Chowdhry S, Nazmy MH, Meakin PJ, et al. Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(2):357-371. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.007.
- [16] Pierluigi R, Hannah D, Stephanie E, et al. Genetic Nrf2 overactivation inhibits the deleterious effects induced by hepatocyte-specific c-met deletion during the progression of NASH[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:1-15. DOI:10.1155/2017/3420286.
- [17] 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, 12:399-403. DOI:10.1038/ncb2021.
- [18] Akiyama K, Warabi E, Okada K, et al. Deletion of both P62 and Nrf2 spontaneously results in the development of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Exp Anim*, 2018, 67(2):201-218. DOI:10.1538/expanim.17-0112.
- [19] Park JS, Dong HK, Da HL, et al. Concerted action of P62 and Nrf2 protects cells from palmitic acid-induced lipotoxicity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 466(1):131-137. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.08.120.
- [20] Lee DH, Park JS, Lee YS, et al. SQSTM1/P62 activates NFE2L2/NRF2 via ULK1-mediated autophagic KEAP1 degradation and protects mouse liver from lipotoxicity[J]. *Autophagy*, 2020, 10:1-25. DOI:10.1080/15548627.2020.1712108.
- [21] Tao H, Zhang Y, Zeng X, et al. Niclosamide ethanolamine improves blood glycemic control and reduces hepatic steatosis in mice[J]. *Nat Med*, 2014, 20(11):1263-1269. DOI:10.1038/nm.3699.
- [22] Park JS, Lee YS, Lee DH, et al. Repositioning of niclosamide ethanolamine (NEN), an anthelmintic drug, for the treatment of lipotoxicity[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 137:143-157. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.030.
- [23] Park H, Shima T, Yamaguchi K, et al. Efficacy of long-term ezetimibe therapy in patients with nonalcoholic fatty liver disease[J]. *J Gastroenterol*, 2011, 46(1):101-107. DOI:10.1007/s00535-010-0291-8.
- [24] Nozaki Y, Fujita K, Yoneda M, et al. Long-term combination therapy of ezetimibe and acarbose for non-alcoholic fatty liver disease[J]. *J Hepatol*, 2009, 51(3):548-556. DOI:10.1016/j.jhep.2009.05.017.
- [25] Lee DH, Han DH, Nam KT, et al. Ezetimibe, an NPC1L1 inhibitor, is a potent Nrf2 activator that protects mice from diet-induced nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 99:520-532. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.009.

(收稿日期:2020-04-04)

(本文编辑:刘欣)