

## 选择性自噬接头蛋白 p62 与 Keap1-Nrf2 信号通路 在神经退行性疾病中的研究进展

高雅然<sup>1,2</sup>, 胡明<sup>2</sup>, 吕佩源<sup>2</sup>

1. 河北医科大学研究生院, 河北 石家庄 050017

2. 河北省人民医院, 河北 石家庄 050051

**摘要:** 在自噬小体形成的过程中, 选择性自噬接头蛋白 p62 作为连接自噬相关蛋白、LC3、聚泛素化蛋白之间的桥梁, 通过泛素信号途径将受损的蛋白质、线粒体及入侵的细菌转运到自噬小体中并降解。p62 作为一种自噬衔接蛋白将自噬和 Keap1-Nrf2 通路相关联。p62 可竞争性结合 Keap1, 通过自噬途径将其清除, 促使 Nrf2 解离入核, Nrf2 结合到下游抗氧化元件 p62 启动子区又可促进 p62 的生成, 形成正性反馈环路。神经退行性疾病病因复杂、发病机制尚不清楚, 自噬失调以 p62 调控的非经典途径激活 Keap1-Nrf2 信号通路成为该领域研究热点。

**关键词:** 神经退行性疾病; 自噬; p62; 氧化应激; kelch 样 ECH 相关蛋白 1; 核因子 E2 相关因子

中图分类号: R741

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2020.04.021

## Research advances in the role of the selective autophagy adaptor protein p62 and the Keap1-Nrf2 signaling pathway in neurodegenerative diseases

GAO Ya-Ran<sup>1,2</sup>, HU Ming<sup>2</sup>, LIU Pei-Yuan<sup>2</sup>. 1. Graduate school of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China; 2. Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, Hebei, China

Corresponding author: Liu Pei-Yuan, Email: peiyuanlu@163.com

**Abstract:** During the formation of autophagosomes, the selective autophagy adaptor protein p62 acts as the bridge between autophagy-related proteins, LC3, and polyubiquitinated proteins and transports damaged proteins, mitochondria, and invading bacteria to autophagosomes for degradation through the ubiquitin signaling pathways. As an autophagy adaptor protein, p62 associates autophagy with the Keap1-Nrf2 signaling pathway and can competitively bind to Keap1 and then clear it via the autophagy pathway. In addition, p62 promotes the dissociation and nuclear import of Nrf2, which, in turn, promotes the generation of p62 by binding to the downstream antioxidant response element on its promoter region, forming a positive feedback loop. Neurodegenerative diseases have complex etiologies and unclear pathogenesis, and autophagy dysregulation activating the Keap1-Nrf2 signaling pathway through the p62-regulated non-classical pathway has become a research hotspot in this field.

**Key words:** neurodegenerative disease; autophagy; p62; oxidative stress; Kelch-like ECH-associated protein 1; nuclear factor erythroid 2-related factor 2

神经退行性疾病 (neurodegenerative diseases, ND) 是一类以神经元退行性病变为基础的慢性、进行性、不可逆的神经系统疾病的总称, 主要包括阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森病 (Parkinson's disease, PD)、亨廷顿舞蹈病 (Hunting-

ton disease, HD)、肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 等, 其病因和发病机制十分复杂, 共同特征是神经元和神经胶质细胞中异常蛋白错误折叠、沉积。kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (kelch-like ECH-as-

基金项目: 2015 年河北省政府资助临床医学优秀基础和基础课题研究项目 (2015-361003-8)

收稿日期: 2020-04-26; 修回日期: 2020-07-24

作者简介: 高雅然 (1988-), 女, 博士在读, 主治医师, 主要从事脑血管病及认知障碍相关研究。

通信作者: 吕佩源 (1962-), 男, 医学博士, 博士生导师, 主任医师, 教授, 主要从事脑血管病及认知障碍相关研究。Email: peiyuanlu@163.com。

sociated protein 1, Keap1) - 核因子 E2 相关因子 (nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2, Nrf2) 信号通路是机体维持氧化还原平衡、消除有害物质刺激损伤的重要途径之一。目前研究发现自噬与 Keap1-Nrf2 信号通路之间是通过选择性自噬接头蛋白 p62 与 Keap1 直接作用相关联, 自噬失调则以 p62 依赖的方式激活 Nrf2 信号通路。本文就 p62 与 Keap1-Nrf2 信号通路的基本结构、作用机制、相互作用及在神经退行性疾病中的影响作一综述。

## 1 自噬与 p62

自噬是人体内重要的生理现象之一, 可降解和去除细胞内有害的蛋白质和受损的细胞器, 是一个持续、动态的过程, 在生物体的稳态维持、应激反应、肿瘤抑制等方面发挥重要的作用。真核细胞中的蛋白质稳态主要由自噬-溶酶体和泛素-蛋白酶体系 (UPS) 维持, 在泛素化蛋白降解过程中 p62 作为枢纽将二者联系起来, 两个系统相互依赖、相互补充。

p62 (sequestosome-1/SQSTM1), 是一种选择性自噬接头蛋白, 包括多个功能区: ①泛素相关结构域 (ubiquitin-binding domain, UBA); ②KIR 结构域 (Keap1 interacting region, KIR); ③LC3 互作结构域 (LC3 interaction region, LIR); ④TRAF6 结合域 (TRAF6 binding domain, TB); ⑤锌指结构域 (zinc finger domain, ZNF); ⑥PBI 结构域 (phox and Bem1p domain, PBI) 等。p62 分子结构中多个功能性结构域决定其可与多种配体相互作用, 成为多种细胞信号转导的中心枢纽<sup>[1]</sup>。KIR 域参与氧化应激, 与 Keap1 相互作用, 而 Keap1-Nrf2 是目前公认的细胞应对氧化应激的防御通路; 还可通过 UBA 域和 LIR 域作为选择性自噬受体, 穿梭于受损的蛋白质、线粒体和细胞器对其进行清除, 在细胞选择性自噬过程中发挥重要作用<sup>[2,3]</sup>。

p62 作为细胞自噬底物蛋白, 通常情况下其表达与自噬活性呈负相关, 这是因为伴随溶酶体的降解, 与底物结合的 p62 也被蛋白水解酶水解。因此, p62 升高通常被认为是自噬受到抑制的标志。但在实际检测中 p62 水平升高与自噬激活同时出现的情况并不少见, 特别是在氧化应激和毒物刺激情况下更为常见。推测其原因可能是 p62 作为一种应激蛋白, 在氧化应激条件下表达水平会大幅上调。鉴于 p62 与自噬之间关系复杂, 同时由于细

胞自噬本身是一个高度动态、多阶段的过程, 因此, 在判定细胞自噬活性时, 需要综合评价自噬流的变化, 即自噬体形成、自噬体与溶酶体融合、底物降解等<sup>[4]</sup>。自噬失调或 p62 功能异常会导致多信号通路受阻、蛋白异常聚集, 从而诱导多种疾病发生, 如神经退行性疾病、糖尿病、癌症等。

## 2 Keap1-Nrf2 信号通路

Keap1-Nrf2 信号通路是目前公认的机体抵抗内外环境氧化和有害刺激的重要防御性转导通路。Keap1 是 Cul3-E3 泛素连接酶底物适配子蛋白, 人类 Keap1 蛋白质序列中包含 5 个区域, 其中 Kelch 区域拥有介导 Keap1 与 Nrf2 连接的多个蛋白位点。人类 Keap1 蛋白共包含 27 个半胱氨酸残基 (Cys), 其中 7 个 Cys (Cys151、257、273、288、297、434 和 13) 对 ROS 和亲电试剂非常敏感, 这些 Cys 的修饰可改变 Keap1 构象, 参与氧化还原信号转导。Nrf2 属于 CNC (Cap'n collar) 碱性亮氨酸拉链 (b-Zip) 转录激活因子家族, 其特征是高度保守的 CNC 结构域和 b-Zip 结构, 是调节体内氧化应激进行自我保护的主要调控器, 其发挥作用需要与抗氧化应答元件 (antioxidant response element, ARE) 相结合。Nrf2 几乎在所有的组织中都表达, 影响 Nrf2 发挥作用的主要为 Keap1, 它可对 Nrf2 转录水平和翻译后水平多个层面进行调控<sup>[5]</sup>, 是 Nrf2 转录活性的负向调节器。

Nrf2 的激活包括以下 2 个途径: ①经典途径: 即生理条件下, Nrf2 与 Keap1 结合锚定在细胞质中处于非活性状态, 当氧化应激或亲电信号增强达到一定水平时, 引发 Keap1 构象改变, Keap1 与 Nrf2 解偶联, Nrf2 转位进入细胞核与 ARE 结合, 诱导细胞保护基因的表达。②非经典途径: 即 p62 依赖的 Nrf2 激活<sup>[6]</sup>。当胞内 p62 大量聚集, 可与 Nrf2 竞争结合 Keap1, 导致 Nrf2 与 Keap1 解离, 继而入核启动下游保护性基因的表达。p62-Keap1 复合物的形成导致 Keap1 在自噬体中隔离并通过自噬而降解。此外, p62 是 Nrf2 的转录靶标, 氧化应激时, Nrf2 转录激活并诱导 p62 产生, 进而再次激活 Nrf2, 在 p62 和 Nrf2 之间形成一个正反馈环。

## 3 p62 与 Keap1-Nrf2 信号通路间的相互作用

p62 可以通过 Keap1 调节 Nrf2 信号通路, 即前面提到的非经典途径, 多项研究先后独立证实了 p62 与 Keap1-Nrf2 之间的关系——在自噬缺陷的小鼠肝脏中, p62 的大量积聚可以激活 Nrf2 通路,

这种作用是通过 p62 与 Keap1 的结合完成的,也揭开了自噬与 Nrf2 信号通路关联研究的新篇章。

通过 X 射线晶体结构分析发现,p62 的 KIR 域结合 Keap1 的方式与 Nrf2 的 ETGE 模体结合 Keap1 的方式十分类似,提示 p62 过表达或在细胞内大量聚积可竞争性抑制 Keap1 与 Nrf2 的结合。但是,由于 Keap1-p62 的结合/解离常数显著低于 Keap1-Nrf2 ETGE 模体的结合/解离常数,p62 似乎对 Keap1-Nrf2 结合影响不大。通过分析发现,p62-KIR 域的氨基酸序列中与 Nrf2-ETGE 的谷氨酸残基相对应的是 351 位的丝氨酸残基(S351),但 S351 保守性更强。当 S351 被 mTORC1 磷酸化后<sup>[7]</sup>,p62 与 Keap1 的亲合力提高了约 30 倍,达到与 Nrf2-ETGE 竞争的程度,进而导致 Nrf2 的累积。2015 年,Jiang 等<sup>[6]</sup>发现,p62 的过表达可显著降低 Keap1 的半衰期,而敲除 p62 或 Atg7 基因会延长其半衰期,造成 Keap1 聚积。

#### 4 p62-Keap1-Nrf2 信号通路在神经退行性疾病中的作用

多项研究已证实 p62 与 Keap1-Nrf2 信号通路在神经退行性疾病中发挥重要作用<sup>[8,9]</sup>。研究发现 AD、PD、ALS 等脑组织细胞质包涵体中均有 Keap1 与 p62 共定位。

AD 以进行性认知功能障碍和行为损害为特征,典型的病理学特征包括  $\beta$  淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid protein, A $\beta$ )形成的老年斑和过度磷酸化 tau 蛋白形成的神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)等。通过对 AD 双转基因 APP/PS1 小鼠的研究发现,提高大脑 p62 水平可以增强由 p62 介导的自噬途径,加速老年斑等异常蛋白的清除,改善认知功能<sup>[10]</sup>。Nrf2 缺乏的 AD 模型小鼠炎症反应显著增加、自噬功能障碍增强,神经元中可见累积的多泡小体、内涵体和溶酶体<sup>[11]</sup>。多酚类物质(如花青素、姜黄素、白藜芦醇、槲皮素等)是天然的 Nrf2 激动剂,在 AD 及一项针对与年龄相关的神经退行性疾病研究中发现,多酚类物质不仅能够激活 Nrf2,同时具有强的抗 A $\beta$  毒性作用,可以改善认知功能、降低淀粉样蛋白沉积并抑制 tau 蛋白过磷酸化<sup>[12,13]</sup>。

PD 是继 AD 后第二大常见的神经退行性疾病,黑质多巴胺能神经元进行性变性、丢失,突变的  $\alpha$ -突触核蛋白以及路易小体(Lewy body, LB)的异常聚集是主要的病理特征。研究显示<sup>[14]</sup>,在 PD 模型中,富马酸二甲酯(DMF)靶向激活 Nrf2 可增强内

源性脑防御机制,调节依赖 p62 的自噬途径发挥神经保护作用,Nrf2 基因缺陷可加重早期 PD 患者神经元的异常蛋白质积聚、炎症和死亡。同时经过对 PD 患者尸检样本进行 Nrf2 激活标记物(NQO1 和 p62)分析发现 NQO1 与 p62 染色不仅在神经元中呈阳性,在 LB 中也呈阳性。这些结果表明,PD 所致的氧化应激激活 Nrf2,但由于 Nrf2 诱导产物如 NQO1 和 p62 被部分封存于 LB 中,导致生理性 Nrf2 细胞防御能力被削弱。从侧面证实 p62-Keap1-Nrf2 信号通路在 PD 中发挥的保护作用。

HD 是一种常染色体显性遗传神经退行性疾病,突变的亨廷顿蛋白(Huntingtin, Htt)在胞质聚集并损害神经细胞。有研究表明,Htt 蛋白周围有 p62 存在并且与 LC3-II 蛋白相互作用促使这些内含物通过选择性自噬途径被清除。HD 相关蛋白 poly Q 的错误折叠亦可导致神经元变性,p62 敲除可使胞质中 poly Q 蛋白聚集<sup>[15]</sup>,进一步加重损伤。2017 年 Quinti 等<sup>[16]</sup>发现一种含有苯三唑的 Nrf2 诱导剂可对 HD 小鼠 Keap1 的 Cys151 进行共价修饰,激活 Nrf2,进一步有效抑制小胶质细胞和星形胶质细胞中促炎细胞因子 IL-6 的释放。

对于散发的神经退行性疾病,衰老是重要的风险因素。巴西莓(açaí)是一种巴西特有的棕榈树果实,有研究发现老龄大鼠(确认存在与年龄相关的认知功能障碍)食用巴西莓后海马和额叶皮质的 ROS 和炎症标记物减少,Nrf2 表达增加,但额叶皮质的 p62 降低,“斑点状”包涵体减少。同时发现摄入充足巴西莓可抑制 mTOR 的磷酸化作用,减少 p62 积聚和 MAP1B-LC3 的转换,诱导海马和额叶皮质的自噬<sup>[17]</sup>。二硫化碳(carbon disulfide, CS<sub>2</sub>)是一种化工有机溶剂,可造成多种神经退行性疾病,研究发现<sup>[18]</sup>用 CS<sub>2</sub> 处理的大鼠模型的脊髓神经元 mTORC1 信号系统被激活,可诱导 p62 表达及磷酸化,激活 p62-Nrf2-Keap1 途径,减少氧化应激损伤。

#### 5 展望

近年来,自噬与抗氧化过程的相互作用受到了广泛关注,相关研究提示自噬可能在多种疾病模型中增强抗氧化过程。p62 是 Keap1-Nrf2 信号途径中的重要调节器,而 p62 与 Nrf2 之间的正反馈调节机制受多种因素影响,在细胞抗氧化作用机制以及许多疾病发病和治疗策略制定中具有重要意义。目前关于 p62 介导的自噬及 Nrf2 信号通路的研究

在肿瘤相关领域研究较为深入,但在神经退行性疾病领域相对较少,细节尚不清楚,进一步研究和探讨 p62-Keap1-Nrf2 信号途径复杂严密的调控机制,不但能帮助我们深入认识神经退行性疾病,也将为预防和治疗此类疾病提供新思路。

### 参 考 文 献

- [1] Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and autophagy adaptor [J]. FEBS J, 2015, 282(24): 4672-4678.
- [2] Hewitt G, Korolchuk VI. Repair, reuse, recycle: the expanding role of autophagy in genome maintenance [J]. Trends Cell Biol, 2017, 27(5): 340-351.
- [3] Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm [J]. Essays Biochem, 2017, 61(6): 609-624.
- [4] Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. Autophagy, 2016, 12(1): 1-222.
- [5] Silva-Islas CA, Maldonado PD. Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation [J]. Pharmacol Res, 2018, 134(8): 92-99.
- [6] Jiang T, Harder B, Rojo de la Vega M, et al. p62 links autophagy and Nrf2 signaling [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 88(Pt B): 199-204.
- [7] Hensley K, Harris-White ME. Redox regulation of autophagy in healthy brain and neurodegeneration [J]. Neurobiol Dis, 2015, 84: 50-59.
- [8] Antonio P, Ludovic C, Fiona G, et al. Autophagic and lysosomal defects in human tauopathies: analysis of post-mortem brain from patients with familial Alzheimer disease, corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy [J]. Acta Neuropathol Commun, 2016, 4: 22.
- [9] Cuadrado A, Rojo AI, Wells G, et al. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(4): 295-317.
- [10] Caccamo A, Ferreira E, Branca C, et al. P62 improves AD-like pathology by increasing autophagy [J]. Mol Psychiatry, 2017, 22(6): 865-873.
- [11] Joshi G, Gan KA, Johnson DA, et al. Increased Alzheimer's disease-like pathology in the APP/PS1ΔE9 mouse model lacking Nrf2 through modulation of autophagy [J]. Neurobiol Aging, 2015, 36(2): 664-679.
- [12] Gaudreault R, Mousseau N. Mitigating Alzheimer's disease by natural polyphenols: A review [J]. Curr Alzheimer Res, 2019, 16(6): 529-543.
- [13] Ahmed T, Javed S, Javed S, et al. Resveratrol and Alzheimer's disease: mechanistic insights [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(4): 2622-2635.
- [14] Lastres-Becker I, García-Yagüe AJ, Scannevin RH, et al. Repurposing the NRF2 activator dimethyl fumarate as therapy against synucleinopathy in Parkinson's disease [J]. Antioxid Redox Signal, 2016, 25(2): 61-77.
- [15] Kurosawa M, Matsumoto G, Kino Y, et al. Depletion of p62 reduces nuclear inclusions and paradoxically ameliorates disease phenotypes in Huntington's model mice [J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(4): 1092-1105.
- [16] Quinti L, Dayalan Naidu S, Träger U, et al. KEAP1-modifying small molecule reveals muted NRF2 signaling responses in neural stem cells from Huntington's disease patients [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(23): E4676-E4685.
- [17] Poulse SM, Bielinski DF, Carey A, et al. Modulation of oxidative stress, inflammation, autophagy and expression of Nrf2 in hippocampus and frontal cortex of rats fed with açai-enriched diets [J]. Nutr Neurosci, 2017, 20(5): 305-315.
- [18] Wang S, Chen Y, Kou R, et al. Carbon disulfide activates p62-Nrf2-keap1 pathway in rat nerve tissues [J]. Toxicology, 2016, 368-369: 19-27.