

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.01.002

Keap1-Nrf2 信号通路参与子宫内膜癌细胞增殖、转移、耐药机制的研究

顾佩蓓 吴婷婷 杨 婷 张箴波[△]

(上海交通大学附属第一人民医院妇产科 上海 200080)

摘要 目的:研究 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Keap1)-核转录因子 E2 相关因子(Nrf2)信号通路对子宫内膜癌细胞生长、转移及耐药的影响。**方法:**选择代表 I 型子宫内膜癌细胞的 KLE 细胞株和代表 II 型子宫内膜癌的 ARK2 细胞株,采用 real-time PCR 和 Western blot 法测定两细胞株 Keap1 和 Nrf2 基因 mRNA、蛋白表达,MTT 法检测两细胞株对顺铂耐药性。对 Keap1 表达更低、耐药性更强的 ARK2 细胞株的 Keap1 基因过表达。Real-time PCR、Western blot、平板克隆实验、MTT 法、Transwell 迁徙、侵袭实验等方法研究 ARK2 细胞中 Keap1 过表达对 Nrf2 及下游靶基因表达、细胞生长、侵袭、耐药的影响。**结果:**在 ARK2 和 KLE 细胞中 Nrf2 基因 mRNA 表达无明显差异,ARK2 细胞中 Keap1 基因表达无论是 mRNA 还是蛋白水平在的表达均要低于 KLE 细胞株,而 Nrf2 蛋白水平的表达在 ARK2 细胞株中则要明显高于 KLE 细胞株。Keap1 表达较低的 ARK2 细胞较 Keap1 高表达的 KLE 细胞耐药性更高。ARK2 细胞株中 Keap1 过表达能够明显下调 Nrf2 蛋白及下游基因 ABCC2、 γ -GCS 表达;MTT 实验和平板克隆实验表明 Keap1 过表达能够降低 ARK2 细胞增殖能力;Keap1 过表达能够降低 ARK2 细胞迁徙和侵袭能力;Keap1 过表达能够显著提高 ARK2 细胞对顺铂的敏感性。**结论:**Keap-Nrf2 信号通路在子宫内膜浆液性癌细胞株 ARK2 中活化程度显著高于子宫内膜样癌细胞株 KLE,Keap1 对 Nrf2 蛋白表达调控是基于转录后的,且低表达的 Keap1 及高表达的 Nrf2 蛋白和肿瘤细胞的高耐药性有关。在子宫内膜浆液性癌细胞株 ARK2 中上调 Keap1 基因表达能够有效的下调 Nrf2 蛋白及其下游基因的表达,并降低肿瘤细胞的生长、迁徙、侵袭能力,且能提高肿瘤细胞对顺铂的敏感性。

关键词: 子宫内膜癌;Keap1;Nrf2;增殖;转移;耐药

中图分类号:R737.33;R-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)01-06-07

Study of Keap1-Nrf2 Pathway on Endometrial Cancer Cell Proliferation Metastasis and Drug Resistance

GU Pei-bei, WU Ting-ting, YANG Ting, ZHANG Zhen-bo[△]

(Department of Obstetrics and Gynecology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Keap1-Nrf2 pathway on the cell proliferation, metastasis, and drug resistance of endometrial cancer cells. **Methods:** The mRNA and protein levels of Keap1, Nrf2 as well as its downstream genes were assayed in KLE and ARK2 cell lines (which represent type I and II endometrial cancer), using real-time PCR and Western blot. MTT assay to detect the sensitivities of these two cell lines to cisplatin with different concentrations. Keap1 was overexpressed in ARK2 cell line with a lower Keap1 expression and higher drug resistance. Real-time PCR, Western blot, MTT, colony formation assay and transwell assay were performed to evaluate the effect of overexpression of keap1 on the expression of Nrf2 and its downstream gene, cell proliferation, invasion, migration and drug resistance of ARK2 cells. **Results:** There was no significant difference in mRNA expression of Nrf2 between ARK2 and KLE cells, but the expression of Keap1 gene in ARK2 cells was lower than that of KLE cell line both mRNA and protein expression. The expression of Nrf2 protein in the ARK2 cell line was significantly higher than that in the KLE cell line. Keap1 expression was lower in ARK2 cells than KLE cells; overexpression of Keap1 in ARK2 cell lines could significantly down-regulate expression of Nrf2 protein and of its downstream genes ABCC2 and γ -GCS; MTT experiments and colony formation assay showed overexpression of Keap1 could decrease the cell proliferation, migration and invasion of ARK2 cells, and enhanced its sensitivity to cisplatin. **Conclusions:** Activation of Keap-Nrf2 signaling pathway in endometrial serous carcinoma cell ARK2 was considerably higher than that in endometrioid adenocarcinoma cell KLE. The low expression of Keap1 and high expression of Nrf2 protein was associated with drug resistance of ARK2 cells. Overexpression of Keap1 gene expression could effectively down-regulate the expression of Nrf2 protein and its downstream genes in ARK2 cells, reduce the growth, migration and invasion of tumor cells, and enhance the sensitivity of tumor cells to chemotherapeutic drugs.

作者简介:顾佩蓓(1983-),主治医师,主要研究方向:辅助生殖相关疾病基础与临床,

E-mail: beibeisophia@163.com,电话:138175980697

[△]通讯作者:张箴波,E-mail: zhangzhenbozzb@aliyun.com,电话:021-37798941

(收稿日期:2018-07-23 接受日期:2018-08-18)

Key words: Endometrial cancer; Keap1; Nrf2; Proliferation; Metastasis; Drug resistance

Chinese Library Classification(CLC): R737.33; R-33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)01-06-07

前言

子宫内膜癌是起源于子宫内膜腺体的恶性肿瘤,占女性生殖系统恶性肿瘤的20%~30%,位列女性恶性肿瘤死亡率第七位,且发病率近年来呈上升趋势^[1]。基于临床和流行病学特征,通常将子宫内膜癌分为I型和II型^[2],其中I型子宫内膜癌占子宫内膜癌的大多数,其病理类型为子宫内膜样腺癌,预后较好^[3];而II型子宫内膜癌病理形态较少,其病理类型主要为子宫内膜浆液性癌,预后不良^[4]。目前针对子宫内膜癌的治疗形成了以手术治疗为主,放疗、化疗和内分泌为辅的综合治疗体系,但子宫内膜癌的预后并没有得到明显改善,尤其是II型子宫内膜癌,其侵袭性强,易出现转移及化疗耐药。

核转录因子E2相关因子2(Nuclear factor erythroid2-related factor 2, Nrf2)是具有高度保守的碱性亮氨酸拉链结构的转录因子,广泛分布于人体的各个器官中,是机体内抗氧化反应的中枢调节因子^[5]。Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白-1(epoxy chloropropane Kelch sample related protein-1, Keap1)是kelch家族的一种多区域阻遏蛋白,是Nrf2蛋白的关键调节因子,或称为“开关分子”^[6]。生理状态下,Keap1将Nrf2锚定在细胞质中,使Nrf2在泛素蛋白酶的作用下迅速被降解^[7];而在氧化应激状态下,Keap1和氧化应激源发生作用使其与Nrf2解离,细胞内Nrf2蛋白水平升高并转移至核内与下游的靶基因启动子的抗氧化反应原件结合,激活靶基因表达,调控II相代谢酶、药物转运体等的转录活性,从而发挥抗氧化损伤作用^[8]。在肿瘤细胞中,由于Keap1的缺失或是突变^[9,10],Nrf2出现异常活化^[11],从而促进肿瘤发生、发展^[12,13],并且和肿瘤的化疗耐药密切相关^[14,15]。在本研究中,我们通过体外研究Keap1基因对子宫内膜癌细胞生长、迁徙、耐药的影响及其相关机制,希望能够阐明Keap1-Nrf2信号通路对子宫内膜癌细胞生物功能的影响,从而进一步为子宫内膜癌的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

KLE细胞株和ARK2细胞株为本实验室保存,常规方法冻存。胎牛血清购于美国Gibco公司。DMEM/F12, RPMI-1640培养液购于美国Gibco公司。BCA蛋白检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。Keap1、Nrf2、ABCC2、 γ -GCS、GAPDH一抗试剂均购于美国Santa Cruz公司。顺铂购于美国Sigma公司。Real-time PCR引物序列由上海生物工程有限公司合成。RNA提取试剂Trizol购于美国Invitrogen公司。cDNA逆转录试剂盒及SYBR Green Real-time PCR试剂盒购于大连宝生物工程有限公司。Opti-MEM培养基购于美国Gibco公司。Lipofectamine™ 2000购于美国Invitrogen公司。质粒pLEX-Keap1-GFP,及慢病毒包装质粒psPAX2、pMD2.G由上海华测艾普医学检验所有限公司提供。

1.2 质粒的慢病毒包装

对数生长期的细胞293T铺到10 cm培养皿中,在37℃培养箱中静置培养24小时后,加入含4 μ g pLEX-Keap1-GFP,3 μ g psPAX2和1.2 μ g pMD2.G,4ml无血清无双抗的Opti-MEM培养基,40 μ L Lipofectamine™ 2000脂质体混合液,6小时后更换为新鲜的无双抗的10%胎牛血清培养基,继续培养;48小时后,在观察绿色荧光蛋白GFP的表达情况和细胞的病变情况,收集包含病毒颗粒的细胞培养基,置于4℃储存;并再加入新鲜的10%胎牛血清培养基(不含双抗),继续培养;72小时后,收集包含病毒颗粒的细胞培养基,与48小时收集的培养基混合,3000 rpm离心15分钟;将离心后的细胞上清用40 μ m滤头进行过滤,搜集病毒液留待后续实验使用。

1.3 细胞转染

对数生长期的ARK2细胞铺于6孔板,加入新鲜的无双抗的10%胎牛血清培养基,培养24小时后;将培养液更换为已制得的病毒液与10%胎牛血清培养基按1:1配制的混合液,并按1:1000的比例加入溴化己二甲胺,继续培养;24小时后弃去上清,更换为无双抗的10%胎牛血清培养基,48小时后在倒置荧光显微镜下观察GFP的表达;在培养基中添加1.5 μ g/mL嘌呤霉素进行筛选,常规更换培养液,1周天后扩增存活的高表达pLEX-Keap1-GFP的ARK2细胞记作ARK2-K留待后续实验使用。

1.4 MTT 实验

对数生长期细胞2000个/孔加入96孔板中,并加入200 μ L培养液常规培养,于设定的培养终点时间加入MTT10 μ L/孔,孵化4小时之后洗掉MTT,每孔加入150 μ L的DMSO,脱色25分钟,之后于570 nm测定吸光度值。

1.5 Western blot 法测定蛋白表达

收集各组细胞,冰浴下加入RIP1细胞裂解液,BCA法测定蛋白浓度,定量后蛋白上样,经SDS-PAGE后分离后转膜至PVDF膜,洗膜后封闭,加入一抗4℃孵育过夜,洗去一抗后二抗室温下杂交2小时,GENMED发光液铺满PVDF膜表面,室温下孵育10 min, Gene Box成像系统曝光并记录反应条带。

1.6 Real-time PCR 检测

收集各组细胞,Trizol法提取细胞总RNA,并测定样品OD260/OD280的比值,比值在1.8-2.0之间则满足实验要求。用cDNA逆转录试剂盒将mRNA逆转录为cDNA,并进行Real-time PCR扩增。Keap1上游引物5'-GGAGGCGGAGCCCGA-3',下游引物5'-GATGCCCTC AATGGACAACCA-3';Nrf2上游引物5'-ACACGGTCCACAGCTCAT C-3',下游引物5'-TGTCATCAAATCCATGTCCTG-3';ABCC2上游引物5'-ACGGACAGCTATCATGGCTTCT-3',下游引物5'-TGGT-CACCATGAGCT TCT -3'; γ -GCS上游引物5'-AGGAGCGAG-GACTGGAGCCAT-3',下游引物5'-TCCTCTGCAGCGAGCTC-CGT -3';GAPDH上游引物5'-ATCAAGTGGGGTGATGCTGG-3',下游引物5'-TGAAGTCGAGGAGACAACC-3';反应体系为20 μ L,包括上下游引物各0.5 μ L,SYBR Green荧光染料10

μL , cDNA5 μL , DEPC 水 4 μL ; 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 共 35 循环。

1.7 平板克隆实验

取对数生长期细胞, 以 200 个细胞 / 孔均匀接种于 6 孔板中, 常规培养 2 周, 当培养皿中出现肉眼可见的克隆时, 终止培养。细胞克隆甲醇固定 15 分钟后加结晶紫染色液孵育 20 分钟, 拍照观察并计数。

1.8 迁徙和侵袭实验

采用 transwell 法评估肿瘤细胞的迁徙和侵袭能力。迁徙实验采用对数生长期细胞, 以 1×10^5 个细胞接种于含 200 μL 无血清培养基和 0.1% BSA 的 8 μm 孔径 24 孔板 Transwell 上室, 下室加入 600 μL 含 10% FBS 的培养基, 24h 后用棉签擦去上室内的细胞, 加甲醛固定后用结晶紫染色对小室的底膜染色并观察。侵袭实验需预先在 transwell 上室中预先铺入基质胶, 其余步骤同迁徙实验。

1.9 化疗药物敏感性检测

取对数生长期的细胞, 2000 个 / 孔加入 96 孔板中, 并加入 200 μL 培养液, 24 小时细胞贴壁后更换含有不同浓度顺铂的培养液, 孵育 48 小时后每孔加入 MTT 10 μL / 孔, 孵化 4 小时之后洗掉 MTT, 每孔加入 150 μL 的 DMSO, 脱色 25 min 分钟, 之后于 570 nm 测定吸光度值。

1.10 统计学处理

数据均用采用均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 IBM SPSS 22 统计软件进行统计学分析, 计量资料组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 被认为存在统计学差异。

2 结果

2.1 子宫内膜癌细胞株中 Keap1、Nrf2 表达水平及耐药测定

选择代表 I 型子宫内膜癌细胞的 KLE 细胞株和代表 II 型子宫内膜癌的 ARK2 细胞株, 对其 Keap1 和 Nrf2 基因 mRNA 及蛋白表达进行测定, 结果: Keap1 基因表达无论是 mRNA 还是蛋白水平在 ARK2 细胞中的表达均要低于 KLE 细胞株; Nrf2 mRNA 表达在 KLE 细胞株和 ARK2 细胞株中表达无明显差异, 而 Nrf2 蛋白水平的表达在 ARK2 细胞株中则要明显高于 KLE 细胞株(图 1A-C)。说明 Keap1 对 Nrf2 的调控是基于转录后的。同时我们对两株细胞对顺铂的耐药性进行了评估, ARK2 细胞株及 KLE 细胞株对顺铂作用 48 小时的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 9.67 $\mu\text{g/mL}$ (8.10-12.07) $\mu\text{g/mL}$ 和 5.34 $\mu\text{g/mL}$ (4.10-6.42) $\mu\text{g/mL}$, ARK2 细胞较 KLE 细胞耐药性更高(图 1D), 这和临床中 II 型子宫内膜癌细胞对化疗药物耐药性更高的结论一致。

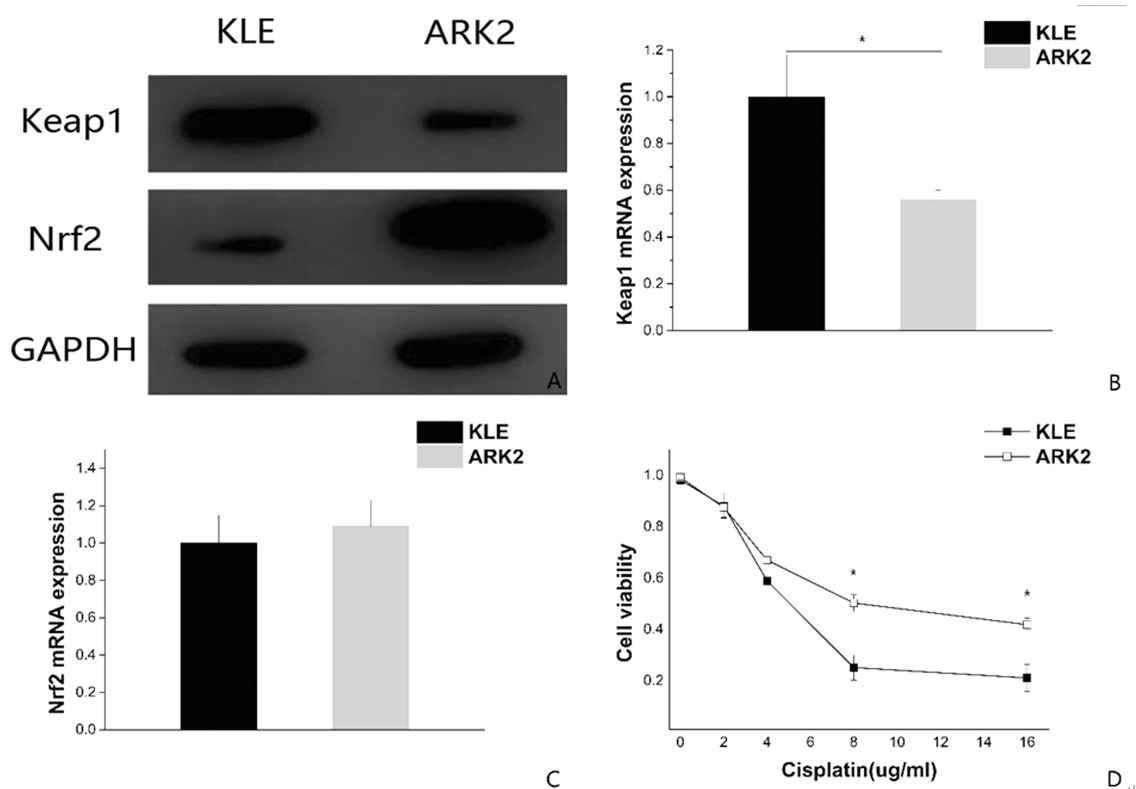


图 1 KLE 和 ARK2 细胞 Keap1、Nrf2 基因表达以及细胞耐药性的比较

注: (A) KLE 和 ARK2 细胞 Keap1 及 Nrf2 蛋白表达结果; (B) KLE 和 ARK2 细胞 Keap1 mRNA 表达结果; (C) KLE 和 ARK2 细胞 Nrf2 mRNA 表达结果; (D) KLE 和 ARK2 细胞在不同浓度顺铂作用 48 小时后的细胞存活率比较。* 表示 $P < 0.05$ 。

Fig.1 Comparison of Keap1, Nrf2 gene expression and drug resistance in KLE and ARK2 cells

Note: (A) protein levels of Keap1 and Nrf2 were compared between KLE and ARK2 cells; (B) mRNA level of Keap1 was compared between KLE and ARK2 cells; (C) mRNA level of Nrf2 was compared between KLE and ARK2 cells; (D) KLE and ARK2 cells were treated with the indicated doses of cisplatin for 48 h. Cell viability was determined by MTT assay. * means $P < 0.05$.

2.2 Keap1 过表达的 ARK2 细胞株建立

选取 Keap1 低表达且耐药性更强的 ARK2 细胞株, 对其 Keap1 基因的表达进行了过表达(记录为 ARK2-K 细胞株); 荧光显微镜下显示 ARK2-K 细胞的转染效率大于 80%(图 2),

WB 显示 ARK2-K 细胞中 Keap1 表达明显升高, 且 Nrf2 蛋白表达水平明显下降, 且 Nrf2 下游基因 ABCC2、 γ -GCS 的蛋白及 mRNA 表达明显降低(图 3)。

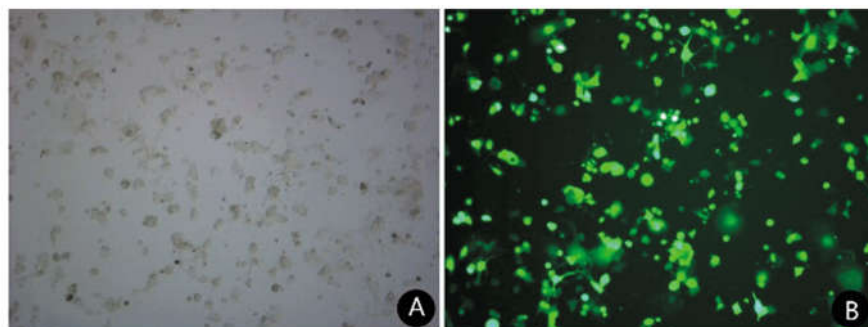


图 2 ARK2 细胞的转染效率($\times 200$)

注:(A)明场图;(B)绿色荧光图。

Fig.2 Transfection efficiency of ARK2 cells($\times 200$)

Note: (A) bright field microscopy; (B) green fluorescence microscopy.

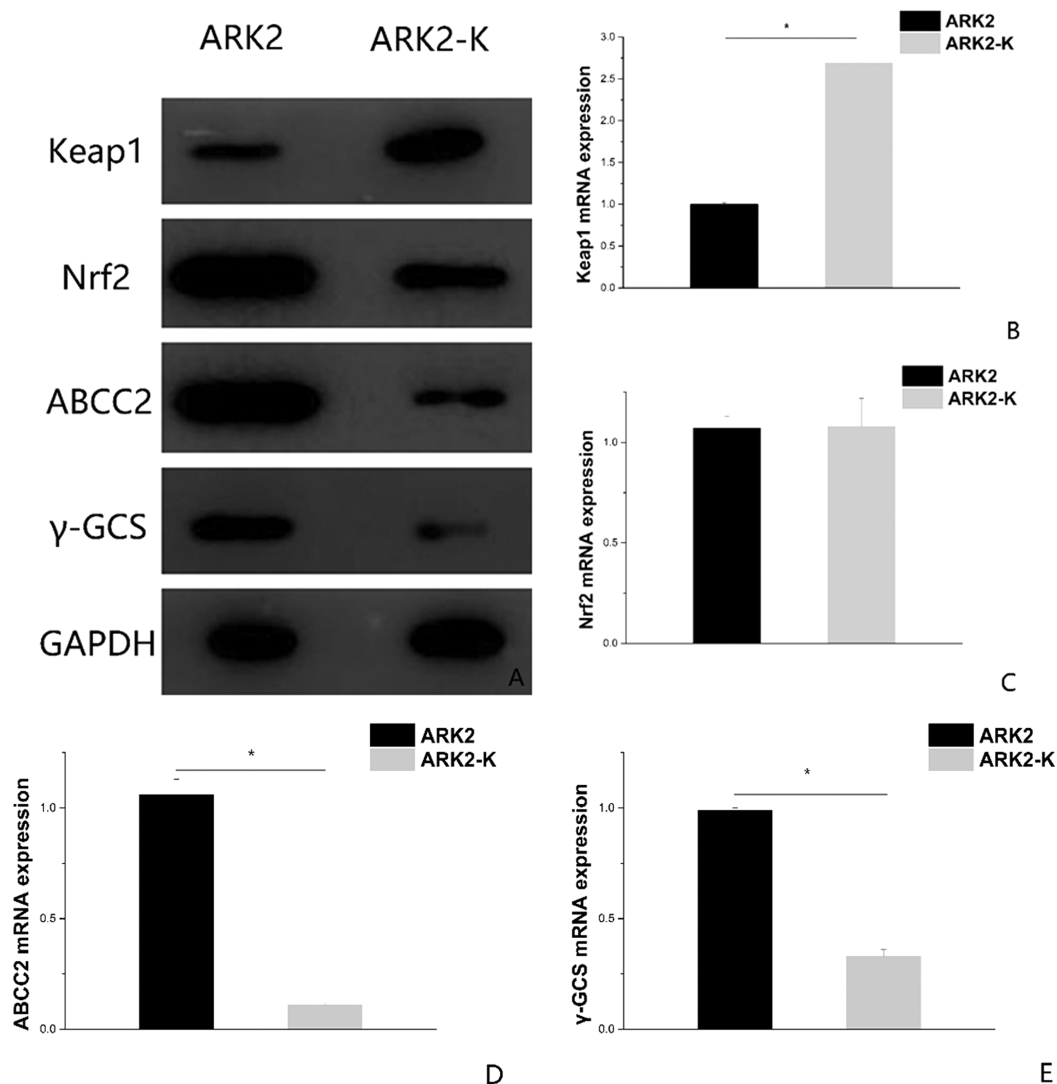


图 3 ARK2 和 ARK2-K 细胞 Keap1、Nrf2 及下游基因表达比较

注:(A)ARK2 和 ARK2-K 细胞中 Keap1、Nrf2、ABCC2 和 γ -GCS 蛋白表达结果;ARK2 和 ARK2-K 细胞中 Keap1 (B)、Nrf2 (C)、ABCC2 (D)和 γ -GCS (E) mRNA 表达结果。* 表示 $P < 0.05$ 。

Fig.3 Comparison of Keap1, Nrf2 and its downstream genes expression in ARK2 and ARK2 cells

Note: (A) protein levels of Keap1, Nrf2, ABCC2 and γ -GCS were compared between ARK2 and ARK2-K cells; Keap1 (B), Nrf2 mRNA (C), ABCC2 (D) and γ -GCS mRNA expression (E) were compared between ARK2 and ARK2-K cells. * means $P < 0.05$.

2.3 Keap1 过表达能够降低 ARK2 细胞增殖能力

平板克隆形成实验显示,Keap1 过表达后 ARK2 细胞的克隆形成能力明显减低(图 4A-B),ARK2 和 ARK2-K 细胞的克隆形成率分别为 66.59.01%和 34.4.60%(图 4C)。同时 MTT 实

验结果显示,48 小时之内 ARK2,ARK2-K 细胞的增殖能力无统计学差异,72 小时后 ARK2-K 细胞的增殖能力要降低(图 4D)。

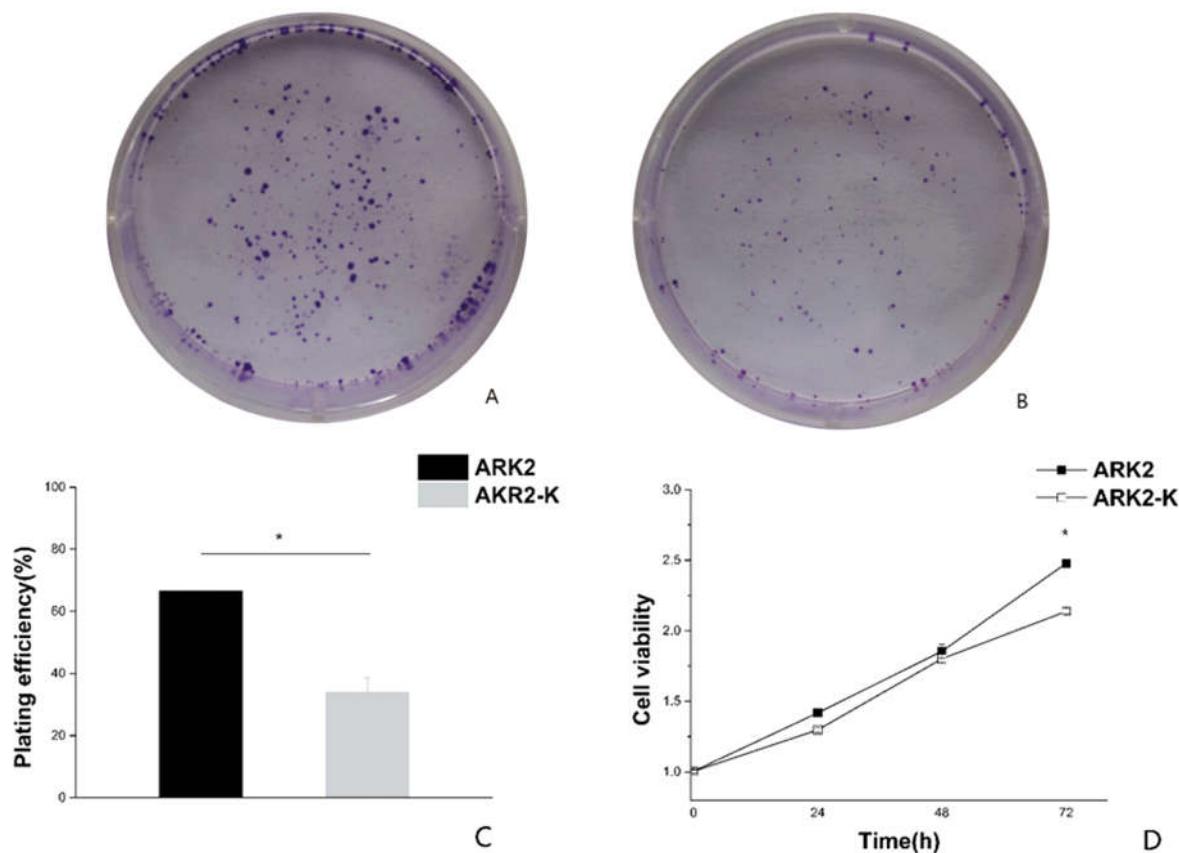


图 4 ARK2 和 ARK2-K 细胞增殖能力比较

注:ARK2 细胞(A)和 ARK2-K 细胞(B)平板克隆实验比较;(C)14 天克隆形成率比较;
(D)MTT 比较 ARK2 和 ARK2-K 细胞 72 小时内增殖能力。* 表示 $P < 0.05$ 。

Fig.4 Comparison of proliferation ability of ARK2 and ARK2-K cells

Note: Comparison of colony formation ability between ARK2(A) cells and ARK2-K(B) cells; (C)14-day plating efficiency comparison;

(D) using MTT assay to compare ARK2 and ARK2-K cell proliferation in 72 hours. * means $P < 0.05$.

2.4 Keap1 过表达能够降低 ARK2 细胞迁徙和侵袭能力

Transwell 迁徙实验结果显示,ARK2-K 细胞的迁徙能力要明显低于 ARK2 细胞(数量为 104 ± 33 个/高倍视野 vs 361 ± 94 个/高倍视野)(图 5A-B);ARK2-K 细胞的侵袭能力要明显低于 ARK2 细胞(数量为 56 ± 16 个/高倍视野 vs 175 ± 43 个/高倍视野)(图 5C-D)。

2.5 Keap1 过表达能够提高 ARK2 细胞对化疗药物敏感性

对不同浓度顺铂孵育 48 小时后的 ARK2,ARK2-K 细胞采用 MTT 法测定存活率,结果显示顺铂作用下两细胞株均出现不同程度的药物浓度依赖的细胞增殖抑制作用,其中 ARK2-K 和 ARK2 细胞对顺铂的 IC_{50} 分别为 $5.251 \mu\text{g/mL}$ ($4.657-5.909$) $\mu\text{g/mL}$ 和 $8.41 \mu\text{g/mL}$ ($7.116-10.248$) $\mu\text{g/mL}$,结果显示 Keap1 过表达能够显著提高 ARK2 细胞对顺铂敏感性,见图 6。

3 讨论

Keap1-Nrf2 信号通路的是机体最重要的内源性抗氧化信

号通路,生理状态下 Keap1-Nrf2 信号通路在抵抗机体细胞的炎症、凋亡、癌变等方面发挥了重要作用^[16,17]。然而近年来在皮肤癌、喉癌、肺癌、前列腺癌、乳腺癌等多种肿瘤组织中均发现 Keap-Nrf2 信号通路的异常活化^[18,19]。在肿瘤组织中由于 Keap1 或 Nrf2 基因发生突变,使其蛋白结合部位的结构域发生改变,两者结合力减弱,从而导致 Nrf2 蛋白持续处于活化状态,持续活化的 Nrf2 蛋白同样也能够保护肿瘤细胞免于氧化应激的破坏,并且和肿瘤的发生、增殖、耐药有密切关系^[20-22]。因此,在本研究中我们针对 Keap1-Nrf2 信号通路对子宫内膜癌细胞生长、迁徙、耐药的影响进行研究。

Chen N 等人研究表明,正常子宫内膜及子宫内膜良性疾病中,Nrf2 多数呈阴性表达或弱阳性表达,子宫内膜样癌组织中仅 6%呈强阳性表达,而在子宫内膜浆液性癌中强阳性表达率则为 68%,说明 Keap1-Nrf2 信号通路在某些类型的子宫内膜癌中异常活化,且 Nrf2 表达和预后密切相关^[23]。在本研究中我们同样也发现 Nrf2 蛋白表达在子宫内膜浆液性癌来源的细胞株 ARK2 中要显著高于子宫内膜样癌来源的细胞株 KLE,

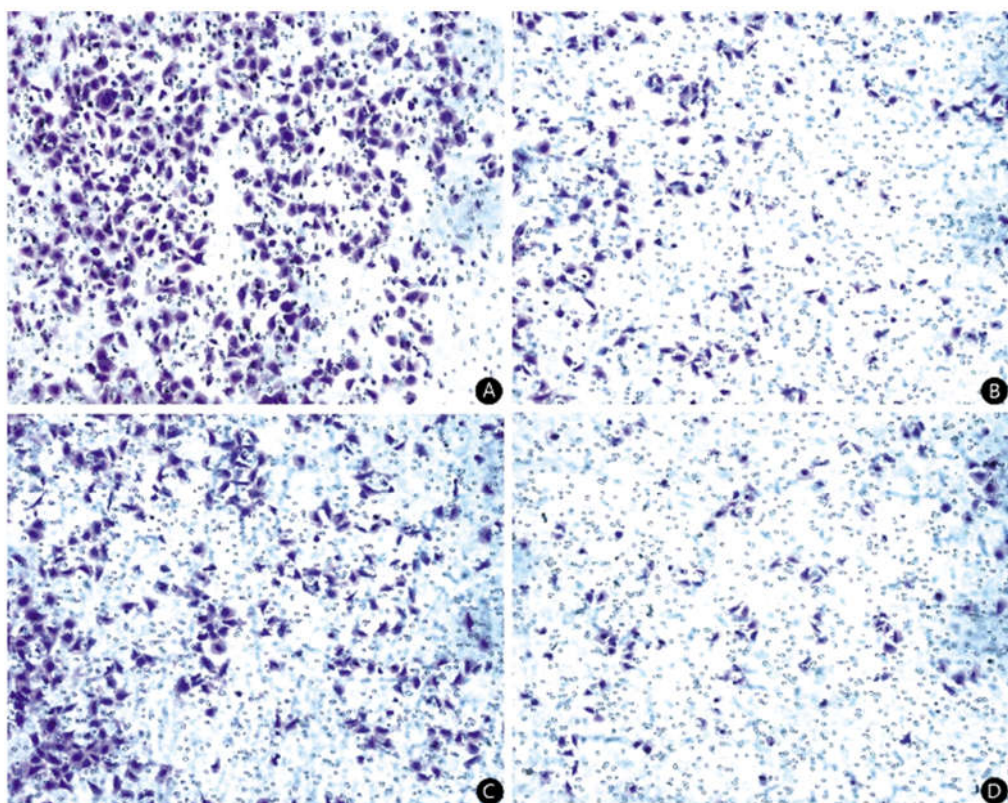


图 5 Transwell 法比较 ARK2 和 ARK2-K 细胞迁徙和侵袭能力

注: ARK2 细胞(A)和 ARK2-K 细胞(B)迁徙能力比较; ARK2 细胞(C)和 ARK2-K 细胞(D)侵袭能力比较。

Fig. 5 The migration and invasion of ARK2 and ARK2-K cells were compared by Transwell method

Note: The migration ability of ARK2 cells (A) and ARK2-K cells; (B) were compared; and the invasion abilities of ARK2 cells; (C) and ARK2-K cells; (D) were compared.

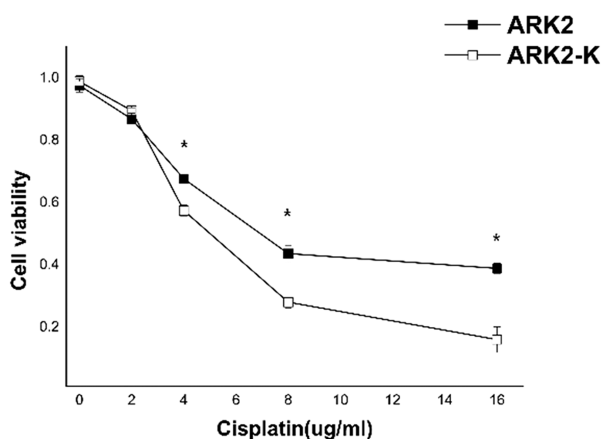


图 6 MTT 法比较 ARK2 和 ARK2-K 细胞在不同浓度顺铂作用 48 小时后的细胞存活率比较

Fig.6 ARK2 and ARK2-K cells were treated with the indicated doses of cisplatin I for 48 h. Cell viability was determined by MTT assay.

注: * 表示 $P < 0.05$.

Note: * means $P < 0.05$.

但 Nrf2 mRNA 表达在 ARK2 和 KLE 细胞中无明显差别, 而 Keap1 表达无论是 mRNA 还是蛋白表达在 ARK2 细胞中的表达均要低于 KLE 细胞株, 说明在子宫内膜癌细胞中, Keap1 对 Nrf2 的调控是基于转录后的。

之前的研究表明 Nrf2 和肿瘤的增殖、迁徙、侵袭密切相

关。肿瘤细胞的上皮间质化和增殖及侵袭密切相关, 出现上皮间质化的肿瘤细胞中 N-cadherin 的过表达能够增加 Nrf2 的活性^[24]。在食管癌细胞中抑制 Nrf2 的表达后 MMP2 等侵袭相关基因的表达明显降低, 并且能够上调 E-cadherin 的表达, 使得肿瘤细胞的生长、侵袭能力明显降低^[25]。在本研究中我们在在子宫内膜浆液性癌来源的细胞株 ARK2 中上调 Keap1 表达, 能够显著的降低 ARK2 细胞中 Nrf2 蛋白及其下游耐药相关基因 ABCC2、 γ -GCS 的表达, 细胞功能学实验表明 Keap1 过表达能够降低 ARK2 细胞的增殖、迁徙、侵袭能力, 并且提高 ARK2 细胞对顺铂的敏感性。

综上所述, Keap-Nrf2 信号通路在子宫内膜浆液性癌细胞 ARK2 中活化程度显著高于子宫内膜样癌细胞 KLE 细胞, 低表达的 Keap1 及高表达的 Nrf2 蛋白和肿瘤细胞的高耐药性有关。上调 Keap1 基因表达, 能够有效降低 ARK2 细胞中 Nrf2 蛋白及其下游基因的表达, 降低肿瘤细胞的生长、迁徙、侵袭能力, 并提高肿瘤细胞对顺铂的敏感性。因此, Keap1-Nrf2 信号通路有望成为未来子宫内膜浆液性癌治疗的潜在靶标。

参考文献(References)

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90
- [2] Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma [J]. Gynecol Oncol, 1983, 15(1): 10-17
- [3] Alvarez T, Miller E, Duska L, et al. Molecular profile of grade 3 endometrioid endometrial carcinoma: is it a type I or type II

- endometrial carcinoma?[J]. *Am J Surg Pathol*, 2012, 36(5): 753-761
- [4] Moore KN, Fader AN. Uterine papillary serous carcinoma [J]. *Clin Obstet Gynecol*, 2011, 54(2): 278-291
- [5] Sykiotis GP, Habeos IG, Samuelson AV, et al. The role of the antioxidant and longevity-promoting Nrf2 pathway in metabolic regulation[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2011, 14(1): 41-48
- [6] Sun Z, Zhang S, Chan JY, et al. Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(18): 6334-6349
- [7] Kang MI, Kobayashi A, Wakabayashi N, et al. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(7): 2046-2051
- [8] McMahon M, Lamont DJ, Beattie KA, et al. Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(44): 18838-18843
- [9] Padmanabhan B, Tong KI, Ohta T, et al. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer[J]. *Mol Cell*, 2006, 21(5): 689-700
- [10] Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, et al. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer [J]. *PLoS Med*, 2006, 3(10): e420
- [11] Giudice A, Montella M. Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention [J]. *Bioessays*, 2006, 28(2): 169-181
- [12] Kwak MK, Kensler TW. Targeting NRF2 signaling for cancer chemoprevention[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 244(1): 66-76
- [13] Zhang L, Wang N, Zhou S, et al. Propofol induces proliferation and invasion of gallbladder cancer cells through activation of Nrf2 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31: 66
- [14] Cho JM, Manandhar S, Lee HR, et al. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: implication to cancer cell resistance[J]. *Cancer Lett*, 2008, 260(1-2): 96-108
- [15] Wang XJ, Sun Z, Villeneuve NF, et al. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2 [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(6): 1235-1243
- [16] 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: 89-116
- [17] Jeong WS, Jun M, Kong AN. Nrf2: a potential molecular target for cancer chemoprevention by natural compounds [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(1-2): 99-106
- [18] Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, et al. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(5): 1303-1309
- [19] Kim YR, Oh JE, Kim MS, et al. Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin [J]. *J Pathol*, 2010, 220(4): 446-451
- [20] Pi J, Diwan BA, Sun Y, et al. Arsenic-induced malignant transformation of human keratinocytes: involvement of Nrf2 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45(5): 651-658
- [21] Homma S, Ishii Y, Morishima Y, et al. Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(10): 3423-3432
- [22] Xia M, Yu H, Gu S, et al. p62/SQSTM1 is involved in cisplatin resistance in human ovarian cancer cells via the Keap1-Nrf2-ARE system[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(6): 2341-2348
- [23] Chen N, Yi X, Abushahin N, et al. Nrf2 expression in endometrial serous carcinomas and its precancers [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2010, 4(1): 85-96
- [24] Jain AK, Bloom DA, Jaiswal AK. Nuclear import and export signals in control of Nrf2[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(5): 2052
- [25] Shen H, Yang Y, Xia S, et al. Blockage of Nrf2 suppresses the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells in hypoxic microenvironment [J]. *Dis Esophagus*, 2014, 27 (7): 685-692

(上接第 5 页)

- [24] Travers MT, Gow IF, Barber MC, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and L-tryptophan transport in human breast cancer cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1661(1): 106-112
- [25] Zhang T, Tseng C, Zhang Y, et al. CXCL1 mediates obesity-associated adipose stromal cell trafficking and function in the tumour microenvironment[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11674
- [26] Laurent V, Guerard A, Mazerolles C, et al. Periprostatic adipocytes act as a driving force for prostate cancer progression in obesity[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10230
- [27] Zhang Y, Nowicka A, Solley TN, et al. Stromal Cells Derived from Visceral and Obese Adipose Tissue Promote Growth of Ovarian Cancers[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136361
- [28] Kalinski P & Talmadge JE. Tumor Immuno-Environment in Cancer Progression and Therapy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1036: 1-18
- [29] Shalpour S & Karin M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3347-3355
- [30] Pedersen L, Idorn M, Olofsson GH, et al. Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK Cell Mobilization and Redistribution[J]. *Cell Metab*, 2016, 23(3): 554-562
- [31] Yang W, Bai Y, Xiong Y, et al. Potentiating the antitumour response of CD8(+) T cells by modulating cholesterol metabolism[J]. *Nature*, 2016, 531(7596): 651-655
- [32] Geiger R, Rieckmann JC, Wolf T, et al. L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity [J]. *Cell*, 2016, 167(3): 829-842, e813
- [33] Ma EH, Bantug G, Griss T, et al. Serine Is an Essential Metabolite for Effector T Cell Expansion[J]. *Cell Metab*, 2017, 25(2): 482