

Keap1 在肿瘤中的“双刃剑”作用

韩冰,孙悦,曹孟儒,胡晶
(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院,黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要:来自于外界环境的刺激破坏了机体内的氧化还原平衡,使细胞发生氧化应激反应。为了应对氧化应激所产生的毒性作用,机体内的细胞在进化过程中发生了一系列相对复杂的变化来应对氧化应激。Keap1 (Kelch like ECH associated protein)-Nrf2 [Nuclear factor erythroid 2 (NF-E2)- related factor 2]信号通路是影响细胞防御和生存的重要途径之一。目前的研究多关注于讨论 Nrf2 的作用,为了更好地了解 Keap1 在癌症中的作用,该文着重讨论 Keap1 促进和/或抑制肿瘤发生发展的作用和机制。

关键词:氧化应激;Keap1;Nrf2;肿瘤

中图分类号:R73-3 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-0242(2019)07-0529-06

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2019.07.A010

Keap1 Acts as a “Double-edged Sword” in Tumors

HAN Bing, SUN Yue, CAO Meng-ru, HU Jing
(Harbin Medical University Cancer Hospital, Harbin 150081, China)

Abstract: Stimulation from the external environment destroys the redox balance in the body and causes oxidative stress in the cells. In order to cope with the toxic effects of oxidative stress, cells in the body developed a series of complex action to response the oxidative stress during evolution. Keap1 (kelch like ECH associated protein)-Nrf2 [nuclear factor erythroid 2 (NF-E2) - related factor 2] signaling pathway is one of the important ways influencing cell defense and survival. Current research focuses on the role of Nrf2. To better understand the role of Keap1 in cancer, this review focuses on the role and mechanism of Keap1 promotion and/or inhibition of tumorigenesis.

Key words: oxidative stress; Keap1; Nrf2; tumor

2018年,癌症仍然是威胁人类健康的重要杀手,全球新增癌症病例1810万,其中有960万人死于癌症^[1]。目前的研究认为,癌症是细胞更新与细胞死亡之间的不平衡导致的,而氧化应激正是导致这种不平衡的重要原因之一。在目前的生存环境下,长期暴露于各种化学和物理污染,包括环境污染物、药物、重金属、外来生物、紫外线和电离辐射的危险正在大大增加氧化应激的发生。除了这些外在因素外,在代谢和病理过程中还会产生许多内在因素,包括由自由基和氧化剂组成的活性氧(reactive oxygen

species, ROS)^[2],以及导致氧化应激的促炎症细胞因子等都会增加氧化应激的发生。当在细胞中能够破坏关键大分子的促氧化剂和保护机体免受这些潜在有害物质伤害的抗氧化机制之间存在不平衡时,就会发生氧化应激。外源性药物和毒素还可以通过相关的酶作用于细胞基质来调节细胞的氧化应激作用。自由基具有单一的不成对电子,可以对蛋白质、脂质和DNA造成损伤,导致细胞功能降低进而促进恶性肿瘤的发生,也可导致神经元细胞死亡和神经退行性疾病^[3]。因此,为了应对这种毒性环境和氧化应激细胞的状态,机体需要建立细胞保护系统。

Keap1 (kelch like ECH associated protein) 和 Nrf2 [nuclear factor erythroid 2 (NF-E2) - related factor 2]是细胞存活和防止细胞毒性物质积累破坏

收稿日期:2019-02-26;修回日期:2019-04-13
基金项目:国家自然科学基金青年项目(81501960);哈尔滨医科大学附属肿瘤医院海燕科研基金重点项目(JJZD2019-04);黑龙江省自然科学基金留学归国人员基金项目(LC2016037)
通信作者:胡晶,E-mail:hujing@ems.hrbmu.edu.cn

氧化应激途径的两个重要组成部分。虽然 Keap1 在非应激细胞中是 Nrf2 的抑制因子,但当细胞暴露于任何氧化应激时,它就会与 Nrf2 解耦联,使其进入细胞核并激活相关的细胞保护酶。这些酶包括几种 II 期解毒酶,如谷胱甘肽转移酶(GSTs)、NADP(H)、奎宁氧化还原酶(NQO1)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶(SODs)、环氧化物水解酶和血红素加氧酶(HO-1)^[4]。最近的研究表明,Keap1 和 Nrf2 不仅有助于正常细胞的存活,还能够促进肿瘤细胞的生长。Nrf2 在肿瘤细胞中的稳定或异常表达创造了有利于肿瘤细胞生长的环境,例如化疗药物和放射疗法的治疗抵抗性,这种现象被称为“Nrf2 的黑暗面”^[5]。同样,Keap1 基因突变也能够促进解毒/抗氧化基因的组成表达,从而促进肿瘤细胞的生长^[6]。总之,Keap1-Nrf2 信号途径在肿瘤中的作用不可忽视。

1 Keap1-Nrf2 途径对细胞保护作用

1.1 Keap1 的结构特征

Keap1, 又被称为 Nrf2 抑制剂, 是一类锌指蛋白。它包含 624 个氨基酸,分布在 5 个区域,即氨基末端区域(NTR)、BTB/POZ、富含半胱氨酸的介入区域(IVR)、双甘氨酸重复区域(DGR)/Kelch 区域以及羧基末端区域(CTR)。BTB 结构域负责 Keap1 的同源二聚化,是 Cullin 3(Cul3)/Ring box 1(Rbx1)依赖的 E3 泛素连接酶复合体的对接位点。DGR 结构域包含 6 个重复的 Kelch 基序,负责 Keap1 与肌动蛋白细胞骨架的相互作用,将 Keap1 锚定在细胞质中。DGR/Kelch 结构域能够促进并保持 Keap1 与 Nrf2 氨基末端的 Neh2 结构域相互作用。IVR 能够连接 BTB 和 DGR/Kelch 结构域并含有几个用于调节 Keap1 活性的半胱氨酸残基^[7]。总之,Keap1 的每一个区域都在参与调节 Nrf2 的功能中发挥着独特的作用。

1.2 Keap1 和 Nrf2 的相互作用机制

在正常生理条件下,Nrf2 通过与其负调控因子 Keap1 结合成复合物而被隔离在细胞质中,同时 Keap1 又可以通过 Cul3-Rbx1 依赖性 E3 泛素连接酶介导的泛素化和通过 26S 蛋白酶体降解来维持其在细胞中的稳态水平^[8]。有研究发现,泛素特异性酶

15(ubiquitin-specific protease 15,USP15)也是维持 Nrf2 水平的关键因素,它通过去泛素化抑制 Keap1 的降解,促进细胞中 Keap1-Cul3-E3 复合物的稳定,导致 E3 泛素连接酶的激活和 Nrf2 的泛素化降解而抑制其在细胞中的表达水平^[9]。另外,在氧化应激条件下,有研究提出了 Nrf2 和 Keap1 之间“铰链和门锁”的相互作用模型,其作用机制在于将单个 Nrf2 的低亲和力结合位点 DLG 和高亲和力结合位点 ETGE 与 Keap1 同型二聚体的两个 kelch 结构域的结合^[12]。

Keap1 是一种富含半胱氨酸的分子,当暴露于氧化损伤时,Keap1 中关键的具有高度活性的半胱氨酸残基就会充当氧化还原传感器。这些半胱氨酸位于 BTB 区域的 cys151^[10]和 IVR 结构域的 cys273 和 cys288^[11],半胱氨酸的修饰作用可能改变 Keap1 二聚体的构象,导致 Keap1 与 Nrf2 结合的破坏,从而激活并促进 Nrf2 的核易位。实际上,Keap1 中硫醇的修饰被认为会改变其构象并导致 Nrf2 从 DLG 序列中释放出来,但与 Keap1 结合的 ETGE 序列保持不变,从而有效防止 Nrf2 的泛素化降解^[12]。因此,新激活的 Nrf2 易位至细胞核,与 Maf 蛋白二聚化^[13],该异二聚体能够与细胞多种保护基因上的抗氧化应答元件(antioxidant response element,ARE)结合。ARE 就是一种顺式调节元件或增强子序列,存在于编码 II 期解毒酶和抗氧化蛋白的基因的启动子区域中。在人类中,该序列在 NADP(H)和醌氧化还原酶-1(NQO1)的基因中表达^[14]。因此,Keap1-Nrf2 通过相互作用能够激活细胞的防御系统,并参与细胞氧化损伤而产生的有害有毒物质的解毒作用。

2 Keap1-Nrf2 途径的双重作用

2.1 Keap1 作为肿瘤抑制因子

如前所述,氧化应激是环境损伤和肿瘤发生所引起的负面效应^[15]。因此,维持细胞的氧化还原稳态是机体调节机制的主要目的。为此目的,细胞在转录调控下配备了一组抗氧化基因以保护细胞免受这些有毒物质的攻击。Nrf2 能够提供针对氧化和亲电应激的保护从而促进细胞的存活^[16]。有报道,在 Keap1 敲除的小鼠模型中探讨 Nrf2 信号通路的调控机制,发现这种遗传结构的改变是致命的,导致在

小鼠出生后的3周内死亡,致死原因是食管和前胃的过度角化;同时检测出 Nrf2 信号的过度激活以及 GST 和 NQO1 等解毒酶的上调表达^[17]。总之,Nrf2 的持续性活化不利于转基因小鼠的长期存活,并且增加了包括肿瘤发生在内的不良预后风险^[18]。最近还有研究证实 Keap1 能够抑制非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的转移,其作用机制是通过调节 Nrf2/S100P 信号通路而发挥作用。Keap1 可以是作为 NSCLC 中预测肿瘤进展和监测治疗效果的分子标志物^[19]。这些研究证明,Keap1 是一种抑癌基因,由于它的缺失导致肿瘤的发生。

2.2 Keap1 作为肿瘤启动子

2.2.1 Keap1 的体细胞突变

在多种癌症中报道了 Keap1 基因存在突变体。最初是在人肺腺癌细胞系中鉴定出了 Keap1 基因的突变体^[20],在 Keap1 的 Kelch/DGR 结构域中,甘氨酸被半胱氨酸所取代。突变的 Keap1 不能形成 Keap1-Cul3-Rbx1 复合物,导致其对 Nrf2 的亲和力降低,使 Nrf2 在这些细胞中活化^[21]。此后,肺癌组织中也发现 Keap1 基因的 Kelch 或 IVR 结构域中存在多个突变体。在肝癌和胆囊癌中也检测到 Keap1 的突变能够导致 Nrf2 的过度表达,促进 II 期解毒酶和抗氧化蛋白的激活。越来越多的研究证明 Keap1 在多种癌症中发生突变,并且 Keap1 不同的表达状态对肿瘤的作用也不相同。例如,在乳腺癌基因组研究中 Keap1 的 N 末端结构域的突变(C23Y)消除了其对 Nrf2 的抑制作用,有利于癌细胞存活和治疗耐药^[22]。除了这些突变体之外,Keap1 基因突变也已在卵巢癌、子宫内膜癌和肺乳头状腺癌细胞^[23]中被发现。

2.2.2 Keap1 的表观遗传沉默

Keap1 的表观遗传修饰也已显示出对 Nrf2 的调节作用。研究发现,与正常支气管上皮细胞系相比,Keap1 在肺癌细胞系和癌组织中的表达降低,可能与表观遗传学机制有关,在肺癌^[24]、前列腺癌^[25]、恶性神经胶质瘤和结肠直肠癌^[26]中,Keap1 的启动子区域内特定 CpG 位点的甲基化可以诱导局部染色质重塑和抑制转录,导致其与必需 DNA 序列的结合来影响 Keap1 表达。因此,甲基化修饰能够抑制 Keap1 的表达,导致 Nrf2 的激活。Keap1 的表观遗传修饰能够促进肿瘤细胞的生长。简言之,Keap1 表达或功能缺失能够促进肿瘤的发生发展。

3 Keap1-Nrf2 途径在治疗中的作用

在癌症中 Keap1-Nrf2 通路激活后,Nrf2 高表达的癌细胞对化疗药物如依托泊苷、卡铂、顺铂、5-氟尿嘧啶和多柔比星的敏感性较差^[27]。而用 siRNA 干扰技术抑制 Nrf2 的表达后能够有效逆转肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[28]。并且还有研究发现,Keap1 表达水平的改变能够激活 Nrf2 并导致胆囊癌对 5-氟尿嘧啶的治疗耐药。相反,抑制 Nrf2 的表达能够增强 γ -射线对肺癌和胰腺癌细胞系的细胞毒性作用和放疗敏感性^[25]。

理想情况下,Nrf2 转录因子的抑制剂,包括木犀草素^[29]、异烟肼、抗坏血酸、维甲酸、brusatol^[30]、二甲双胍和葫芦巴碱等能够恢复肿瘤细胞对化疗药物和放疗的敏感性,提高常规抗癌治疗手段的疗效^[31]。总之,Nrf2 过度表达的细胞对放疗和化疗药物有很强的治疗抵抗性,大大影响了对肿瘤的治疗效果。

4 Keap1-Nrf2 与其他信号通路之间的相互作用

大量研究表明,多种蛋白质可以通过改变 Keap1-Nrf2 的结合来激活 Keap1-Nrf2 信号通路。X 染色体上的 Wilms 瘤基因(WTX)通过与 Nrf2 竞争性结合到 Keap1 来稳定 Nrf2^[32]。PALB2(partner and localizer of BRCA2) 也被证明与 Keap1 结合能够抑制 Nrf2 泛素化降解^[33]。二肽基肽酶 3(dipeptidyl peptidase 3, DPP3)能够与 Keap1 结合,并抑制 Nrf2 泛素化和促进 Nrf2 依赖性的转录激活^[34]。所有这些都与 Keap1 结合的蛋白都含有 ETGE 基序,表明某些含有 ETGE 的蛋白能够通过竞争性结合 Keap1,从而抑制 Keap1 介导的 Nrf2 泛素化来上调 Nrf2 的表达。因此,这些蛋白的调节功能在于促进 Keap1-Nrf2 途径的激活。在本节中,我们将重点关注 Keap1-Nrf2 复合物与 p62、CDK20、Bcl-2 以及 NF- κ B 之间的相互作用。

4.1 Keap1 和 p62

有研究表明,p62/SQSTM1(sequestosome 1)可以调节 Nrf2 的活性^[35-37]。P62 是一种骨架蛋白,可与泛素化蛋白结合,通过自噬途径降解靶蛋白和受损的细胞器。P62 含有 STGE 结合序列,其类似于位于

Nrf2 的氨基酸 349 和 354 之间的 ETGE 序列, p62 通过 STGE 序列直接与 Keap1 的 kelch 结构域相互作用, 从而破坏 Keap1-Nrf2 复合物的形成和稳定。同时, p62 还能够与 LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) 结合, LC3 与自噬体双层膜结构的形成相关, 从而导致 Keap1-Nrf2 途径与自噬途径发生相关作用。P62 的异位过表达或抑制自噬小体的形成能够抑制 Keap1 和 p62 直接相互作用, 而自噬小体吞噬 Keap1 后导致 Nrf2 泛素化减少, 促进 Nrf2 的稳定, 最终导致携带 ARE 的基因的过表达, 我们将其命名为 Nrf2 激活的非经典机制。在敲除 Keap1 的小鼠模型中的研究发现, 通过非经典机制促进 Nrf2 的过度活化是自噬缺陷小鼠中肝损伤的主要原因^[38]。与 Keap1 能够通过自噬—溶酶体途径降解的观点一致, siRNA 介导的 p62 下调使 Keap1 的半衰期增加了两倍, Keap1 表达水平的增加, 导致 Nrf2 及其靶基因的表达均降低。由自噬失调引起的这种非经典的 Nrf2 激活机制为研究 Nrf2-Keap1 途径又增加了一个新视角。

4.2 Keap1 与 CDK20

CDK20 (cell cycle-related kinase 20) 是一种新发现的蛋白激酶, 在多种肿瘤细胞的生长和增殖中起着关键作用。CDK20 能够与 Keap1 结合, 靶向调节 Nrf2 的降解。这种相互作用是由 CDK20 中进化保守的 ETGE 序列介导的。此外, CDK20 还能够与 Nrf2 竞争性结合 Keap1, 增强 Nrf2 的转录活性并降低细胞活性氧水平。在 CDK20 缺失的肿瘤细胞中, 细胞增殖能力下降, 而放化疗的敏感性增强。总之, 目前的研究表明 CDK20 正向调节 Keap1-Nrf2 信号途径介导的细胞保护作用, 促进肿瘤进展和放化疗的治疗抵抗^[39]。

4.3 Keap1 与 Bcl-2/Bcl-xL

Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2)/Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) 通过促进肿瘤细胞的存活而非促进细胞增殖发挥作用。Keap1 也被发现是介导 Bcl-2 / Bcl-xL 降解的关键参与者。具有 kelch1 结构域的 Keap1 能够与 Bcl-2 的 BH2 结构域相互作用, 并促进其泛素化降解, 导致 Bcl-2 不能形成 Bcl-2/Bax 异源二聚体, Bax (Bcl2-associated X protein) 的表达水平增加, 促进肿瘤细胞的凋亡^[40]。

还有研究报道, 与 Bcl-2 结合的 Keap1 的 DGR

结构域中存在的 G333 残基的另一突变位点, 降低了它们之间的相互作用, 使 Bcl-2 的表达增加。另外, 在氧化/亲电应激过程中 Bcl-2 从 Keap1 上解离, 导致 Bcl-2/Bax 异源二聚体增加和 Bax 的表达减少, 从而抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤细胞存活以及化疗耐药^[41]。

4.4 Keap1 与 NF-κB

IKKβ (IκB kinase β) 通过激活核因子 NF-κB (nuclear factor of kappa B) 途径参与肿瘤的发生发展。同样, IKKβ 也含有 ETGE 结合基序, Keap1 在 Cul3/Rbx1 泛素连接酶复合物作用下, 能够与 IKKβ 结合并促进其泛素化, 而 Keap1 的消耗导致 IKKβ 稳定表达以及 NF-κB 依赖的血管生成因子的表达上调。在人类癌症基因组的分析中发现, Cul3、Keap1 和 Rbx1 基因组位点表达丢失和错义突变占很高的百分比。人类癌症中 KEAP1-Cul3-Rbx1 复合物的失活可能会阻止 IKKβ 降解并导致 NF-κB 活化。总之, 通过 Keap1 介导的 IKKβ 泛素化的失调可能促进肿瘤发生发展^[42]。

5 结论和展望

随着对 Keap1 的研究深入, 越来越多的证据表明 Keap1 在氧化应激中发挥着多种功能。它可以作为 Keap1-Cul3-Rbx1 依赖的 E3 连接酶复合物的酶底物的衔接蛋白; 同时又是 Nrf2 的关键调节因子, 在消除 Nrf2 过度激活方面发挥着重要作用。最近研究又证实某些含有 ETGE 结构域的蛋白能够通过竞争性结合 Keap1, 并抑制 Keap1 介导的 Nrf2 泛素化来上调 Nrf2 的表达。并且, Nrf2 过度表达对放疗和化疗有很强的治疗抵抗性。

目前 Keap1 的研究尚在起步阶段, 是否有其他蛋白能与 Nrf2 竞争性结合 Keap1, 从而引起肿瘤发生发展及耐药的机制仍未完善。而 Keap1 是否可以脱离 Nrf2-ARE 通路发挥作用, 也尚未报道。正如本文所讨论的, Keap1 在不同情况下具有肿瘤保护和肿瘤抑制的“双刃剑”作用, 批判性地评估它们在肿瘤中的状态是非常重要的, 通过增加表达其活性来刺激或促进致癌物质的解毒作用, 为肿瘤治疗及评估预后提供新思路和新靶点。相信随着学科之间的不断渗透与交叉, 科学技术的不断完善, 在不远的将

来对 Keap1 信号通路的机制研究将会在理论基础和临床应用上取得突破性进展。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6):394-424.
- [2] Sajadimajid S, Khazaei M. Oxidative stress and cancer; the role of Nrf2 [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2018, 18(6): 538-557.
- [3] Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(9):1304-1309.
- [4] Lee JH, Khor TO, Shu L, et al. Dietary phytochemicals and cancer prevention; Nrf2 signaling, epigenetics, and cell death mechanisms in blocking cancer initiation and progression[J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 137(2):153-171.
- [5] Menegon S, Columbano A, Giordano S. The dual roles of NRF2 in cancer [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22 (7):578-593.
- [6] Basak P, Sadhukhan P, Sarkar P, et al. Perspectives of the Nrf-2 signaling pathway in cancer progression and therapy [J]. *Toxicol Rep*, 2017, 4:306-318.
- [7] Ogura T, Tong KI, Mio K, et al. Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(7):2842-2847.
- [8] Jung BJ, Yoo HS, Shin S, et al. Dysregulation of NRF2 in cancer; from molecular mechanisms to therapeutic opportunities[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2018, 26(1):57-68.
- [9] Villeneuve NF, Tian W, Wu T, et al. USP15 negatively regulates Nrf2 through deubiquitination of Keap1 [J]. *Mol Cell*, 2013, 51(1):68-79.
- [10] Dayalan Naidu S, Muramatsu A, Saito R, et al. C151 in KEAP1 is the main cysteine sensor for the cyanooxone class of NRF2 activators, irrespective of molecular size or shape[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):8037.
- [11] Sivanzade F, Prasad S, Bhalerao A, et al. NRF2 and NF- κ B interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders; Molecular mechanisms and possible therapeutic approaches[J]. *Redox Biol*, 2019, 21:101059.
- [12] Taguchi K, Yamamoto M. The KEAP1-NRF2 system in cancer[J]. *Front Oncol*, 2017, 7:85.
- [13] Tong YH, Zhang B, Fan Y, et al. Keap1-Nrf2 pathway: a promising target towards lung cancer prevention and therapeutics[J]. *Chronic Dis Transl Med*, 2015, 1(3):175-186.
- [14] Matzinger M, Fischhuber K, Heiss EH. Activation of Nrf2 signaling by natural products-can it alleviate diabetes? [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(6):1738-1767.
- [15] Kasai S, Yamazaki H, Tanji K, et al. Role of the ISR-ATF4 pathway and its cross talk with Nrf2 in mitochondrial quality control[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2019, 64(1): 1-12.
- [16] Cheng D, Wu R, Guo Y, et al. Regulation of Keap1-Nrf2 signaling; the role of epigenetics [J]. *Curr Opin Toxicol*, 2016, 1:134-158.
- [17] Staurengo-Ferrari L, Badaro-Garcia S, Hohmann MSN, et al. Contribution of Nrf2 modulation to the mechanism of action of analgesic and anti-inflammatory drugs in pre-clinical and clinical stages [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1536.
- [18] Taguchi K, Maher JM, Suzuki T, et al. Genetic analysis of cytoprotective functions supported by graded expression of Keap1[J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(12):3016-3126.
- [19] Chien MH, Lee WJ, Hsieh FK, et al. Keap1-Nrf2 interaction suppresses cell motility in lung adenocarcinomas by targeting the S100P protein [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(20):4719-4132.
- [20] Barrera-Rodriguez R. Importance of the Keap1-Nrf2 pathway in NSCLC: is it a possible biomarker [J]? *Biomed Rep*, 2018, 9(5):375-382.
- [21] Sayin VI, LeBoeuf SE. Activation of the NRF2 antioxidant program generates an imbalance in central carbon metabolism in cancer[J]. *eLife*, 2017, 6:e28083.
- [22] Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional regulation by Nrf2[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(17):1727-1745.
- [23] Li QK, Singh A, Biswal S, et al. KEAP1 gene mutations and NRF2 activation are common in pulmonary papillary adenocarcinoma[J]. *J Hum Genet*, 2011, 56(3):230-234.
- [24] Muscarella LA, Parrella P, D'Alessandro V, et al. Frequent epigenetics inactivation of KEAP1 gene in non-small cell lung cancer[J]. *Epigenetics*, 2011, 6(6):710-719.
- [25] Zhang P, Singh A, Yegnasubramanian S, et al. Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1 function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(2):336-346.
- [26] Hanada N, Takahata T, Zhou Q, et al. Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer

- [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12:66.
- [27] Shibata T, Kokubu A, Gotoh M, et al. Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer [J]. *Gastroenterology*, 2008, 135(4): 1358–1368.
- [28] 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.
- [29] Chian S, Thapa R, Chi Z, et al. Luteolin inhibits the Nrf2 signaling pathway and tumor growth in vivo [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 447(4):602–608.
- [30] Olayanju A, Copple IM, Bryan HK, et al. Brusatol provokes a rapid and transient inhibition of Nrf2 signaling and sensitizes mammalian cells to chemical toxicity-implications for therapeutic targeting of Nrf2 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 78:202–212.
- [31] Zhu J, Wang H, Chen F, et al. An overview of chemical inhibitors of the Nrf2-ARE signaling pathway and their potential applications in cancer therapy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 99:544–556.
- [32] Camp ND, James RG, Dawson DW, et al. Wilms tumor gene on X chromosome(WTX) inhibits degradation of NRF2 protein through competitive binding to KEAP1 protein[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(9):6539–6550.
- [33] Ma J, Cai H, Wu T, et al. PALB2 interacts with KEAP1 to promote NRF2 nuclear accumulation and function [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(8): 1506–1517.
- [34] Hast BE, Goldfarb D, Mulvaney KM, et al. Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(7):2199–2210.
- [35] Copple IM, Lister A, Obeng AD, et al. Physical and functional interaction of sequestosome 1 with Keap1 regulates the Keap1-Nrf2 cell defense pathway [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(22):16782–16788.
- [36] 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.
- [37] 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(3):213–223.
- [38] 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.
- [39] Wang Q, Ma J, Lu Y, et al. CDK20 interacts with KEAP1 to activate NRF2 and promotes radiochemoresistance in lung cancer cells[J]. *Oncogene*, 2017, 36(37):5321–5330.
- [40] Tian H, Zhang B, Di J, et al. Keap1: one stone kills three birds Nrf2, IKKbeta and Bcl-2/Bcl-Xl [J]. *Cancer Lett*, 2012, 325(1):26–34.
- [41] 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.
- [42] Lee DF, Kuo HP, Liu M, et al. KEAP1 E3 ligase-mediated downregulation of NF-kappaB signaling by targeting IKKbeta[J]. *Mol Cell*, 2009, 36(1):131–140.