



## Keap1-Nrf2通路在炎症疾病中的研究进展

周文艳, 胡珊珊, 张万年, 庄春林

### Research progresses on Keap1-Nrf2 pathway in inflammatory diseases

ZHOU Wenyan, HU Shanshan, ZHANG Wannian, ZHUANG Chunlin

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202405013>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 山楂酸药理作用的研究进展

Research progress on the pharmacological effects of maslinic acid

药学实践与服务. 2024, 42(5): 185-189 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202307052](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202307052)

#### 新斯的明与山莨菪碱联合应用对肺型氧中毒的保护作用及其机制的研究

Protective effect and mechanisms of neostigmine in combination with anisodamine against pulmonary oxygen toxicity

药学实践与服务. 2024, 42(10): 433-438, 444 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202310049](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202310049)

#### 脓毒症治疗的研究进展

Progress on the treatment of sepsis

药学实践与服务. 2024, 42(11): 457-460, 502 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202405059](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202405059)

#### 基于NLRP1炎症小体探讨百合知母汤抗抑郁的作用机制

Exploration of the antidepressant mechanism of Baihe Zhimu decoction based on NLRP1 inflammasome

药学实践与服务. 2024, 42(8): 325-333 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202401033](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202401033)

#### 基于网络药理学和分子对接技术探究定清片活性成分治疗白血病的作用机制

Mechanism of effective ingredients of Dingqing tablets in the treatment of leukemia based on network pharmacology and molecular docking technology

药学实践与服务. 2024, 42(11): 479-486 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202401073](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202401073)

#### 基于UHPLC-Q/TOF-MS代谢组学策略的葛根-知母药对防治阿尔茨海默病的药效与作用机制研究

Study on the pharmacological effects and mechanism of Gegen-Zhimu herb pair in preventing and treating Alzheimer's disease by UHPLC-Q/TOF-MS metabolomics strategy

药学实践与服务. 2025, 43(1): 30-40 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202409035](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202409035)



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 综述 ·

## Keap1-Nrf2 通路在炎症疾病中的研究进展

周文艳<sup>1</sup>, 胡珊珊<sup>1</sup>, 张万年<sup>2</sup>, 庄春林<sup>2</sup> (1. 宁夏医科大学药学院, 宁夏 银川 750004; 2. 海军军医大学药理学系, 上海 200433)

**[摘要]** Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1-核因子 e2 相关因子 2(Keap1-Nrf2) 通路已被证实是应对氧化应激的重要防御机制, 调控该系统或许能成为众多疾病的有效治疗策略。主要探讨了 Keap1-Nrf2 通路在炎症疾病中的研究进展, 介绍了 Keap1-Nrf2 通路的基本组成成分及激活机制, 阐述了 Keap1-Nrf2 通路调控炎症与 NF-κB 通路、HO-1 之间的影响、与炎症介质和酶的表达、炎症小体之间的关系。介绍了靶向 Keap1-Nrf2 通路的天然产物来源抑制剂、小分子抑制剂以及临床进展, 探讨了 Keap1-Nrf2 通路在炎症治疗中的潜在应用价值。

**[关键词]** Keap1; Nrf2; 炎症; 作用机制; 抑制剂

**[文章编号]** 2097-2024(2025)00-0001-13 **[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202405013

## Research progresses on Keap1-Nrf2 pathway in inflammatory diseases

ZHOU Wenyan<sup>1</sup>, HU Shanshan<sup>1</sup>, ZHANG Wannian<sup>2</sup>, ZHUANG Chunlin<sup>2</sup> (1. School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** The Keap1-Nrf2 pathway has been shown to be an important defense mechanism against oxidative stress, which may be an effective therapeutic strategy for many diseases. The research progresses on Keap1-Nrf2 pathway in inflammatory diseases were mainly reviewed. The basic components and activation mechanism of Keap1-Nrf2 pathway were introduced. The relationship between Keap1-Nrf2 pathway and the crosstalk between NF-κB pathway and HO-1 pathway, the expression of inflammatory mediators and enzymes, and inflammatory bodies were expounded. Natural product-derived inhibitors, small molecule inhibitors targeting Keap1-Nrf2 pathway and their clinical progress were introduced, and the potential application value of Keap1-Nrf2 pathway in the treatment of inflammation was discussed.

**[Key words]** Keap1; Nrf2; mechanism of action; inflammation; inhibitor

### 1 Keap1-Nrf2 通路

Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)-核因子 e2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Nrf2)系统已被证实是应对氧化应激的重要防御机制, 调控该系统或许能成为众多疾病的有效治疗策略, 激活 Nrf2 的策略已经在心血管疾病、呼吸系统疾病和神经退行性疾病等得到初步的验证<sup>[1]</sup>。

1999 年, 在一项双杂交筛选试验中, Keap1 被鉴定为一种抑制 Nrf2 转录活性的蛋白质, 对亲电试剂敏感<sup>[2]</sup>。Keap1 的结构包括 5 个不同的结构域: N 末端区域(n-terminal region, NTR)、BTB 结

构域(bric-a-brac, BTB)、间插区 IVR 区域(linker intervening region, IVR)、双甘氨酸重复序列结构域(double glycine repeat, DGR)以及 C 末端区域(c-terminal region, CTR)。Keap1 通过 BTB 结构域招募 E3 连接酶复合物亚基 Cullin-3, 并促使 Nrf2 进行泛素化。同时, Keap1 的两个分子与底物 Nrf2 的单个分子结合, Keap1 通过 Kelch 结构域和 Nrf2 结合, 每个 Kelch 结构域都与 Nrf2 蛋白中的 2 个基序之一结合, 称为 ETGE 和 DLG 基序<sup>[3]</sup>。

Nrf2 由基因 NFE2L2 编码, Nrf2 存在 7 个高度保守的功能域 Neh1 至 Neh7(Nrf2-ECH 同源性), N 末端 Neh2 结构域是抑制蛋白 Keap1 的结合位点。Neh1 允许 Nrf2 与抗氧化反应元件(antioxidant response elements, ARE)识别并结合。Neh3 位于 Nrf2 的羧基末端, 作为反式激活结构域激活下游相关基因的转录。Neh4 和 Neh5 代表转录激活区, 通过与 cAMP 反应元件结合蛋白(cyclic-AMP response binding protein, CREB)相互作用来

**[基金项目]** 国家自然科学基金“优秀青年基金”资助项目(82022065)

**[作者简介]** 周文艳, 硕士研究生, Tel:18070268181, Email: wyzhou20@163.com

**[通信作者]** 庄春林, 教授, 研究方向: 药物设计, Tel: (021) 81871204, Email: zclnathan@163.com

调节 Nrf2 转录。Neh6 区域是 Keap1 独立的调控区域,参与 Keap1 替代降解途径,Neh7 结构域与视黄酸 X 受体  $\alpha$  相互作用,从而抑制 Nrf2<sup>[4]</sup>。

Nrf2 主要受 Keap1 调控,在正常情况下,由于 E3 泛素连接酶 Keap1 的存在,大部分 Nrf2 蛋白的水平在细胞质中保持较低水平。当细胞暴露于氧化应激时,Keap1 的半胱氨酸残基被修饰,由 Keap1 介导的 Nrf2 泛素化被抑制。随后,Nrf2 稳定,易位进入细胞核,诱导一系列靶基因的表达。这个调控系统被称为 Keap1-Nrf2 系统,游离和新合成的 Nrf2 易位到细胞核后,与一种小肌肉腱膜纤维肉瘤癌基因同源物(Maf)蛋白异二聚化,形成的异二聚体识别 ARE,即 Nrf2 靶基因调控区域中存在的增强子序列,对于招募转录关键因子至关重要<sup>[5]</sup>。然而,Nrf2 诱导剂能够与其他蛋白质上的半胱氨酸结合,共价 Nrf2 激活剂存在潜在的脱靶效应,因此临床前研究的重点是开发蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 和蛋白水解靶向嵌合体 (proteolysis-targeting chimeras, PROTACs) 以提高特异性<sup>[6]</sup>。

## 2 Keap1-Nrf2 通路调控炎症的机制

炎症是人体对各种刺激因素(例如某些化学物质、感染和组织损伤)的生理反应,这种防御机制涉及多种介质,引发相关反应。Keap1 和 Nrf2 被认为是氧化应激的关键调节因子,它们通过抑制氧化应激和炎症反应保护细胞<sup>[7]</sup>。尽管 Keap1-Nrf2 通路在炎症中的分子作用机制尚未明确,但有些研究已经揭示了 Keap1-Nrf2 通路在炎症不同途径的相互作用。

炎症调控中,Nrf2 与核因子- $\kappa$ B(nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)之间存在串扰。NF- $\kappa$ B 是一个转录因子家族,在炎症中起着至关重要的作用。由形成复合物的不同蛋白质的二聚体组成,哺乳动物中有五个 NF- $\kappa$ B 家族成员: RelA/p65、RelB、c-Rel、p50(NF- $\kappa$ B1)和 p52(NF- $\kappa$ B2)<sup>[8]</sup>。在典型的 NF- $\kappa$ B 激活途径中,NF- $\kappa$ B 被其抑制蛋白,包括 I $\kappa$ B 家族成员和其他含有 ankirin 重复序列的调节因子,以无活性形式隔离在细胞质中。在特定刺激如促炎细胞因子、PAMPs、氧化应激和生长因子等作用下,IKK(I $\kappa$ B 激酶复合物)中的 I $\kappa$ B 激酶  $\beta$ (IKK $\beta$ ) 被激活,进而磷酸化 I $\kappa$ B 蛋白,导致其泛素化和蛋白酶体降解。典型途径依赖于 IKK $\beta$  和支架蛋白 NEMO(NF- $\kappa$ B essential modulator, NEMO)主要引发 I $\kappa$ B- $\alpha$  的磷酸化以及含有 p65 的异源二聚体的

核易位。在非经典 NF- $\kappa$ B 通路中,特定细胞因子家族成员激活 IKK $\alpha$ ,导致 p100 磷酸化并生成 p52/RelB 复合物<sup>[9,10]</sup>。NF- $\kappa$ B 作为关键调控因子之一,诱导炎症基因表达,包括促炎细胞因子、趋化因子、粘附分子、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的转录<sup>[11]</sup>。

当前,Keap1-Nrf2 通路和 NF- $\kappa$ B 在细胞中的相互作用主要涉及以下几个方面:①Keap1 通过泛素化降解 IKK $\beta$ ,从而抑制 NF- $\kappa$ B 的活性;②Nrf2 可以阻止 I $\kappa$ B- $\alpha$  蛋白酶体降解,进而抑制 NF- $\kappa$ B 核易位;③NF- $\kappa$ B 复合物的一个亚基 p65 与 Nrf2 的转录共激活因子 CREB 结合蛋白(CREB binding protein, CBP)竞争,因此,p65 的高表达水平降低 CBP 对 Nrf2 转录的可用性,优先转录 NF- $\kappa$ B,驱动基因 Nrf2 通过与 CBP 竞争来抵消 NF- $\kappa$ B 驱动的炎症反应;④Nrf2 通过降低细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平,抑制氧化应激介导的 NF- $\kappa$ B 活化<sup>[12]</sup>;⑤Ras 相关 C3 肉毒毒素底物 1(ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1)诱导 NF- $\kappa$ B,调节 Nrf2,此过程是独立于 Keap1,随后 Nrf2 抑制 NF- $\kappa$ B,形成调节反馈环路<sup>[13]</sup>。

Keap1-Nrf2/HO-1 在炎症中扮演着关键角色,HO-1 是一种抗炎蛋白,其主要作用是催化血红素降解和释放抗炎因子以防止游离血红素引发的毒性。Nrf2 对 HO-1 的表达进行调节,抑制氧化应激,减少 ROS 的产生,发挥抗炎作用<sup>[14]</sup>。

Nrf2 是一种关键的抗炎蛋白,它通过调控炎症介质和酶的表达来发挥其抗炎作用。这包括:①细胞因子和趋化因子:Nrf2 可以抑制促炎细胞因子和趋化因子的过度产生,如 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等。②细胞黏附分子:Nrf2 可以抑制细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)等细胞黏附分子的表达,从而限制炎症细胞向炎症组织的迁移和浸润。③基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP):Nrf2/HO-1 轴可以抑制基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)和基质金属蛋白酶-7(matrix metalloproteinase 7, MMP-7)表达,有利于炎症性肠病的治疗。④COX-2 和 iNOS:Nrf2 可以抑制 COX-2 和 iNOS 等促炎基因的表达,从而减轻炎症反应。总之,Nrf2 在炎症过程中发挥关键作用,通过调控多种炎症介质和酶的表达,抑制炎症反应<sup>[15]</sup>。

此外,相关研究表明,Nrf2 的激活可以降低



ROS 诱导的结构蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 炎性小体的转录, 从而抑制 NLRP3 炎性体的激活。NF- $\kappa$ B、Nrf2 和 NLRP3 炎症小体之间存在相互关系。抑制 Nrf2 会降低 NF- $\kappa$ B 活性, 从而减轻炎症, 而 Nrf2 的激活可以抑制 NF- $\kappa$ B 和 NLRP3 的表达, 抑制炎症反应<sup>[16]</sup>。

### 3 靶向 Keap1-Nrf2 调控剂

#### 3.1 天然产物来源治疗炎症的 Keap1-Nrf2 信号通路抑制剂

天然产物来源的 Keap1-Nrf2 信号通路抑制剂在炎症性疾病治疗中具有广泛的应用前景, 其中, 萜类、黄酮类、生物碱类和醌类化合物在药理作用方面取得了显著的研究成果。这些发现为天然产物在炎症性疾病治疗中的潜在应用提供了有力支持, 为炎症性疾病的治疗提供了多样化的选择。

##### 3.1.1 萜类化合物

研究表明, 木香内酯通过激活 Nrf2 抗氧化途径降低细胞内 ROS, 并通过靶向 NF- $\kappa$ B 和 Nrf2 通路改善溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC)<sup>[17]</sup>。人参皂苷 Rb1 直接与 Keap1 结合并促进其泛素化, 导致 Nrf2 水平升高, 可减少动脉粥样硬化斑块形成及氧化应激和炎症反应<sup>[18]</sup>。在神经退行性疾病方面, 鼠尾草酸通过激活 Keap1-Nrf2 转录通路引发的 2 期酶诱导发挥抗氧化、抗炎和神经保护作用, 进而减弱 NLRP3 激活, 在阿尔茨海默病 (alzheimer's disease, AD)、帕金森病 (parkinson's disease, PD) 中具有潜在应用<sup>[19]</sup>。

##### 3.1.2 黄酮类化合物

黄酮类化合物在各种疾病状态下表现出显著的药理作用。例如, 牡荆素在肾脏炎症疾病中显示出明显的疗效。它通过激活 Nrf2/HO-1 通路, 增加谷胱甘肽过氧化酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 的表达, 抑制脂质过氧化和铁死亡<sup>[20]</sup>。橙皮苷具有抗氧化活性和心脏保护作用, 通过降低 ROS 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的水平, 以及增加抗氧化标志物, 如超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和谷胱甘肽的水平, 减少炎症肿瘤坏死因子的释放, 从而保护心脏免受毒性损害<sup>[21]</sup>。黄酮木脂素能保护小鼠免受 LPS 诱导的急性肺损伤 (acute lung injury, ALI), 依赖于抗氧化防御性 Nrf2 通路的上调, 从而抑制 LPS 激活的促炎介质分泌、NLRP3 炎症小体和 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路<sup>[22]</sup>。

##### 3.1.3 生物碱类化合物

生物碱类化合物对多种疾病表现出重要的药理作用。例如, 氧小檗碱对 LPS 诱导的 ALI 具有显著的保护作用, 通过 HO-1 信号通路以及抑制 p65 的易位, 增强抗氧化防御基因的表达, 促进 Keap1 的降解和 Nrf2 的核转位来产生保护作用<sup>[23]</sup>。芸香碱可以通过激活 Nrf2 核易位和抑制 HCT116 细胞中活性氧的产生, 增强 Nrf2 介导的抗氧化反应, 进而抑制炎症性肠病<sup>[24]</sup>。此外, 胡椒碱衍生物 HJ105 在 AD 治疗中通过抑制 Keap1-Nrf2 相互作用, 上调核 Nrf2, 从而显示出神经保护作用<sup>[25]</sup>。

##### 3.1.4 醌类化合物

醌类化合物是一类经过深入研究的 Nrf2 诱导剂, 其在哮喘和其他炎症性疾病中显示出重要的药理作用。具体而言, 棘皮色素 A (echinochrome A, EchA) 作为一种天然醌, 能够通过 Michael 受体基团的氧化转变为亲电醌, 并与 Keap1 反应性的硫醇结合, 上调 Nrf2 水平, 发挥抗氧化和抗炎作用<sup>[26]</sup>。另一种醌类化合物大叶茜草素 (mollugin, MLG) 具有抗肿瘤和抗炎活性。MLG 能够下调巨噬细胞在 LPS 或肿瘤坏死因子刺激下诱导的炎症反应, 并通过激活 Nrf2 抗氧化途径来降低细胞内活性氧水平。此外, MLG 还能够有效地与转化生长因子  $\beta$  活化激酶 1 (transforming growth factor- $\beta$  activated kinase-1, TAK1) 和 Keap1 结合, 参与抑制 TAK1-NF- $\kappa$ B/MAPKs 和 MLG 介导的 Nrf2 激活<sup>[27]</sup>。

#### 3.2 小分子抑制剂

受到共价 Nrf2 激活剂显著效果的启示, 研究人员已经设计和鉴定出许多直接作用于 Keap1-Nrf2 PPI 界面的非共价分子, 期望在选择性、稳定性和安全性方面有所提升。这些分子主要可以分为几类, 包括多肽类、萘磺酰胺类、四氢异喹啉类、三唑类、吡啶类。

##### 3.2.1 肽类 Keap1-Nrf2 抑制剂

Keap1 通过 Kelch 结构域和 Nrf2 结合, 每个 Kelch 结构域都与 Nrf2 蛋白中的 ETGE 和 DLG 基序之一结合<sup>[3]</sup>。针对这种蛋白质-蛋白质相互作用, 研究者对肽抑制剂特别感兴趣, 因为它们在结构上与 Keap1 相互作用的 Nrf2 表位相似。Keap1 上的亲水结合位点需要带电和极性序列与 Nrf2 实现高亲和力相互作用, 这导致细胞通透性成为一个挑战。已报道的大量线性或环状肽, 尽管有部分用于增强细胞通透性, 但在细胞测定中活性不足或活性显著降低, 这种有限的细胞活性阻碍了 Nrf2 类似肽作为有效 Keap1-Nrf2 抑制剂的应用。Iegre 等<sup>[28]</sup>

提出了一种双组分肽吻合策略,以快速访问靶向 Keap1-Nrf2 相互作用的各种受限和功能化的肽。其中,含有脂肪酸标签的 P8-H 肽与 Keap1 表现出纳摩尔亲和力,并能有效诱导 ARE 基因的转录。通过 Cys 依赖性接合方法,可以轻松地开发具有不同功能的 Nrf2 肽。研究发现,肽 P8-H 是迄今为止已知的最有效的 Keap1-Nrf2 肽抑制剂。为了改善肽类化合物的活性、细胞通透性,邹季花<sup>[29]</sup>等设计了一系列以 Nrf2 为基础的 9-mer Ac-LDEETGEFL-NH<sub>2</sub> 的线性肽。在此基础上构建了一种环状结构,即将线性肽与 Keap1 结合的晶体结构相结合。这种创新设计的环状 9-mer,称为 ZC9,其与 Keap1 的结合  $K_d$  值为 51 nmol/L,显示出高效的选择性及亲和力。ZC9 的独特性体现在其优良的物理化学性质,如良好的水溶性(>38 mg/ml)及细胞渗透性。在体外实验中,特别是在 LPS 诱导的氧化损伤和急性肺损伤模型中,ZC9 表现出显著的剂量反应逆转活性且无明显毒性。这些研究为肽模拟物的设计提供了有用的起点,并为了解 Keap1-Nrf2 通路激活机制提供了新的见解。

### 3.2.2 萘磺酰胺类 Keap1-Nrf2 小分子抑制剂

姜正羽课题组<sup>[30]</sup>发现并鉴定了第一个在纳摩尔浓度下有效的 Keap1-Nrf2 抑制剂 1(CPUY192002)具有对称萘磺酰胺结构。通过荧光偏振法(fluorescence polarization, FP)测得该化合物的  $IC_{50}$  值为 28.6  $\mu$ mol/L,生物膜层干涉(biolyer interferometry, BLI)技术测得其与 Keap1 的结合力  $K_d$  值为 3.59  $\mu$ mol/L。随后,通过结构改造对 CPUY192002 进行溶解度优化,将结构中的甲氧基替换成乙酰氨基得到具有纳摩尔浓度的对称性分子 2(CPUY192018) ( $IC_{50}$ =14.4 nmol/L)。等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)测定化合物对 Keap1 Kelch 结构域亲和力  $K_d$  值为 39.8 nmol/L,研究表明,后者具有更好的理化性质。化合物 2 在体外和体内都显示出有效的 Nrf2 活化作用,并且已被证明在 LPS 诱导的慢性肾脏炎症中有抑制作用<sup>[31]</sup>。

Jain<sup>[32]</sup>等人在对化合物 1 进行研究时,特别关注了磺胺连接区的改造。他们发现,将羧基团替换为二烷基对活性并没有显著效果。然而,一个关键的突破是将羧酸替换成酰胺基团得到化合物 3 ( $IC_{50}$ =63 nmol/L)。表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)实验测得化合物 3 的靶点亲和力  $K_d$  值为 44 nmol/L,这个改动在化合物 3 与 Kelch 络合物的 X 射线结构中得到了证实,化合物 3 中的二乙酰胺与 Asn 414 的酰胺侧链形成两个强氢键,

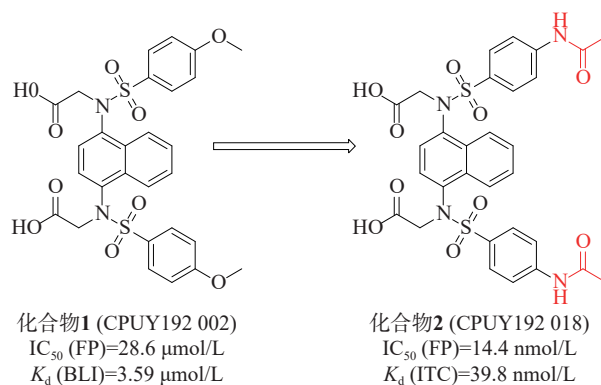


图1 化合物1和化合物2的结构式

同时与 Ile 461 的骨架羰基也形成了氢键。这一结构变化使得化合物 3 具有了较低的负电荷和更高的配体效率。这些改进的取代基推测可能增强了化合物 3 与 Kelch 结构域之间的亲和力,从而提高了其在该蛋白靶点上的生物活性。

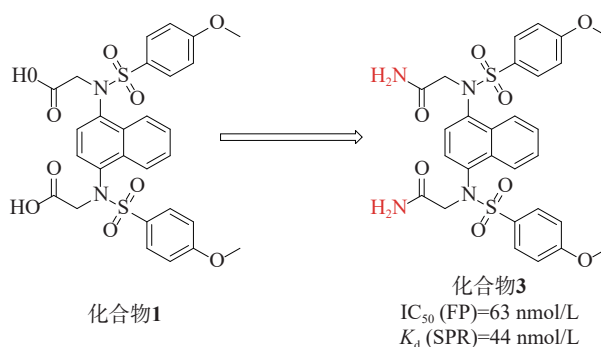


图2 化合物3的结构式

我们小组<sup>[33]</sup>先前报道的化合物 4(NXPZ-2) ( $K_d$ =212 nmol/L)是在化合物 3 的结构基础上,将其结构中的一个甲氧基替换为氨基而得到的一种有效的 Keap1-Nrf2 PPI 抑制剂。研究发现, NXPZ-2 的高疏水性和对称性限制了其溶解度。基于首次确定的 Keap1 Kelch 结构域与 NXPZ-2 的晶体复合物,对 NXPZ-2 进行了进一步的结构优化,发现了不对称的萘磺酰胺<sup>[34]</sup>。降低二氨基萘的对称性是提高药物活性及溶解度的一种策略。通过在磺基的一侧引入不同的取代基,得到不对称的二氨基萘,这被证实是改善化合物体内性能的一种有效策略。

本课题组设计将链状烷烃连接到对称萘磺酰胺 NXPZ-2 的氨基苯基处。体外实验结果显示,结合活性随着碳链长度的增加而逐渐降低。针对溶解度较好的取代基进行了进一步的实验,结果表明,将取代基在链上多延伸两个碳,并在尾部连接哌嗪基团,得到了活性最好的化合物 5<sup>[35]</sup>。荧光各向异性实验(fluorescence anisotropy, FA)测得其  $K_d$  值为 210 nmol/L,其活性优于 NXPZ-2,并具有较低

的细胞毒性( $CC_{50} > 100 \mu\text{mol/L}$ )。此外,研究团队还在 NXPZ-2 的氨基苯基处引入了一系列单取代氨基酸片段和伪氨基酸片段,评价了其蛋白抑制活性、水溶性和体外/体内抗炎活性。在一项新的探索中,首先评估了氨基酸在氨基苯基位置的适宜性。通过 FP 评价 6 个衍生物对 Keap1-Nrf2 PPI 抑制活性,并检测细胞毒性。结果显示,这 6 个衍生物对 Keap1-Nrf2 PPI 有较强的抑制作用, $K_d$  值为 250 ~ 630 nmol/L,与母药 NXPZ-2 一致,未见明显的细胞毒性。在进一步优化中,发现含(R)-偶氮环烷基的化合物 6( $K_d = 220 \text{ nmol/L}$ )的抑制活性最高,远高于对映体和外消旋体。实验结果显示,大部分化合物能显著降低促炎细胞因子 TNF- $\alpha$  和

IL-6 的水平。其中,化合物 6 的体外结合活性与 NXPZ-2 相似,具有较好的抗炎活性。进一步的抗炎实验表明,化合物 6 能显著减轻 LPS 诱导的 ALI 小鼠模型的炎症反应,并触发 Nrf2 核易位。

另外,研究团队还设计合成了一种新型的含有二氨基萘的磷酸酯化合物 POZL<sup>[36]</sup>。磷酸基团的引入是调节分布系数和提高类药性质的经典药物设计策略,适用于克服 NXPZ-2 的局限性。磷酸二酯化合物 POZL 显示出最强的效力,其  $K_d$  值为 940 nmol/L。研究表明,POZL 处理能增加 Nrf2 的表达和核易位,抑制  $\beta$ -位点淀粉样前体蛋白裂解酶-1 的表达,从而降低  $\beta$ -淀粉样蛋白的产生,改善 AD 小鼠的认知缺陷。

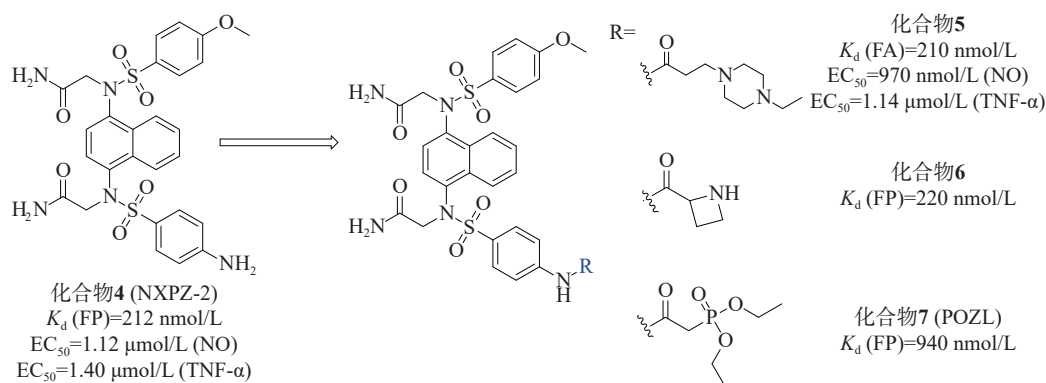


图3 化合物5~7的结构式

在此基础上,采用分子杂交策略,结合 NXPZ-2 和 Nrf2 活化剂萝卜硫素(sulforaphen, SFN),合成了一系列新型含异硫氰酸酯的萘磺酰胺与硫醚、亚砷和砷部分结构的化合物。这些新化合物具有较好的 Keap1-Nrf2 PPI 抑制活性和低细胞毒性。其中,化合物 11 在 LPS 诱导的腹膜巨噬细胞模型中表现出优异的抗炎活性,通过触发 Nrf2 核易位减轻肺损伤。

首先,研究引入了 SFN 的异硫氰酸酯基团取代 NXPZ-2 的氨基,得到化合物 8( $K_d = 106 \text{ nmol/L}$ ),其抑制活性高于 NXPZ-2。随后,引入含有硫醚的碳链结构,得到化合物 10 的活性( $K_d = 1.49 \mu\text{mol/L}$ )比相应的化合物 9( $K_d = 3.5 \mu\text{mol/L}$ )高 2 倍。进一步尝试氧化衍生物的硫原子,得到含亚砷的化合物,其中化合物 11( $K_d = 455 \text{ nmol/L}$ )表现出较好的活性。对这些新化合物进行抗炎活性评价,发现它们能显著抑制 ROS 和 NO 的产生以及促炎细胞因子 TNF- $\alpha$  的表达。在 LPS 诱导的 ALI 小鼠模型中,化合物 11 明显减轻了炎症和肺损伤,并触发 Nrf2 核易位。

UC 是一种病因不明的特发性炎症性疾病,可

能与肠道炎症和氧化应激有关。Keap1-Nrf2 通路为 UC 治疗提供了有效的防御机制,硫化氢( $\text{H}_2\text{S}$ )也显示出相似且相关的生物学功能。 $\text{H}_2\text{S}$  作为重要的内源性气体信号分子,它通过促进活性氧的清除进行抗氧化,有助于修复受损组织并促进结肠炎的消退<sup>[37]</sup>。通过酯接头将 Keap1-Nrf2 PPI 抑制剂与一个成熟的  $\text{H}_2\text{S}$  供体部分连接,合成了一系列杂交衍生物。化合物 12<sup>[38]</sup> 是一种有效的 Keap1-Nrf2 PPI 抑制剂( $IC_{50} = 96.7 \text{ nmol/L}$ ),其被选中进一步修饰。通过酯键将化合物 12 与  $\text{H}_2\text{S}$  供体 ADT-OH 衍生物偶联,设计制备了一系列新的杂化分子。其中,化合物 13<sup>[39]</sup> 被确定为疗效最好的候选药物。实验结果表明,化合物 13 能有效缓解硫酸葡萄糖钠诱导的结肠炎,提高对氧化应激的防御能力,比母体药物更有效。总体而言,Keap1-Nrf2 抑制剂和  $\text{H}_2\text{S}$  供体的协同组合具有治疗溃疡性结肠炎的潜力,分子杂交可能是治疗多因素炎症性疾病的一种有前途的策略。

### 3.2.3 四氢异喹啉类 Keap1-Nrf2 小分子抑制剂

第一个非共价 Keap1-Nrf2 抑制剂是在 2013 年通过高通量筛选发现的四氢异喹啉类化合物



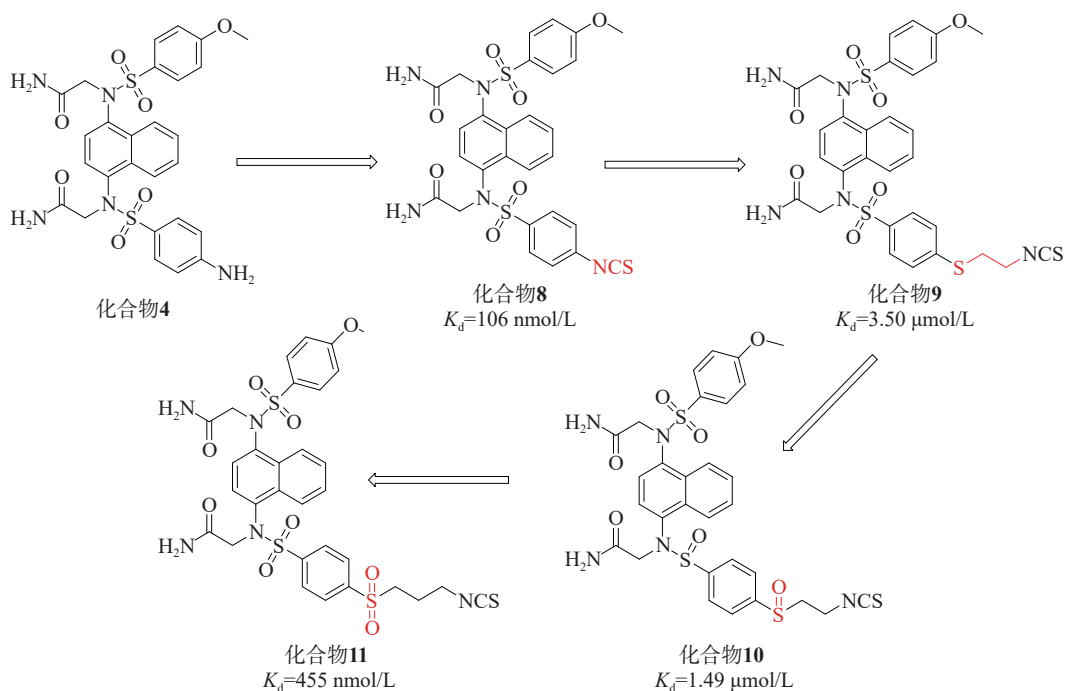


图4 化合物11的设计思路

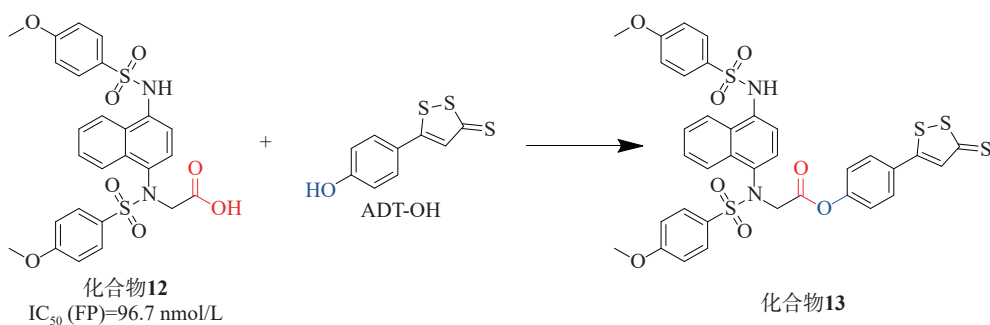


图5 化合物13的设计思路

14(LH601A)<sup>[40]</sup>,是唯一具有活性的非对映体,FP实验中测得其亲和力 $IC_{50}$ 值为 $2.3\ \mu\text{mol/L}$ ,SPR实验测得其与Keap1的结合活性 $K_d$ 值为 $1.0\ \mu\text{mol/L}$ 。在细胞水平上,LH601A可以诱导Nrf2核易位,上调Nrf2靶基因和蛋白。化合物14和早期报道的萘磺酰胺类抑制剂的一个共同特征是存在至少一个羧酸基团。迄今为止,用酰胺取代萘磺酰胺的两个酸性基团已合成得到多种高活性的Nrf2抑制剂,因此,研究人员尝试用四氮唑、甲酯、酰胺等替代酸或制备两性离子类似物,结果表明其抑制活性减弱或消失,证明该酸性官能团不可取代<sup>[41]</sup>。后续的优化研究在LH601A的第5位引入了乙二醇得到了化合物15( $IC_{50} = 0.18\ \mu\text{mol/L}$ ),其中,化合物15的结合亲和力增加了4倍,且对MDCK-MDR1细胞具有通透性<sup>[42]</sup>。在非酸性四氢异喹啉(THIQ)的第5位引入乙二醇或羟基取代基允许在P3口袋处参与额外的氢键相互作用,从而产生迄今为止已

知的最有效的THIQ Keap1结合剂。然而,由于含酸化合物常见的血脑屏障穿透性差,因此在中枢神经系统适应症方面,该类抑制剂的开发仍需持续的研究。

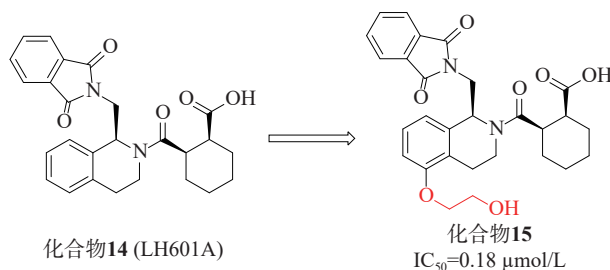


图6 化合物14和15的结构式

### 3.2.4 三唑类Keap1-Nrf2小分子抑制剂

Tong等<sup>[43]</sup>首次成功运用基于片段的方法直接针对Keap1-Nrf2相互作用进行研究。他们通过X射线晶体学筛选,确定了Keap1-Nrf2结合口袋中的3个“热点”。这一方法帮助他们获得了一种

具有纳摩尔亲和力的 Keap1 分子结合的先导化合物。研究人员发现,将苯并三唑部分直接连接到苯丙酸的  $\alpha$  碳上,能与 Keap1 的侧链 Tyr525 形成堆叠相互作用,同时满足 Gln530 和 Ser555 与双齿受体基序的氢键要求。经过一系列的结构优化,研究人员得到了候选化合物 16<sup>[44]</sup>( $EC_{50}$ =12 nmol/L,  $K_d$ =1.3 nmol/L)。化合物 16 满足从片段筛选中鉴定的三点药效团(酸、芳香受体和磺胺),并对 Keap1 Kelch 结构域具有很高的亲和力,因此,它可以作为基于细胞和体内研究的理想工具化合物。在人肺上皮细胞系中也证实了化合物 16 增加 NQO1 活性的能力,并且对支气管上皮细胞无细胞毒性。在此基础上,根据结构活性关系对候选化合物 16 进行了优化。成功筛选出一种具有显著抑制 Keap1-Nrf2 相互作用的化合物 17<sup>[45]</sup>( $EC_{50}$ =47.4 nmol/L)。

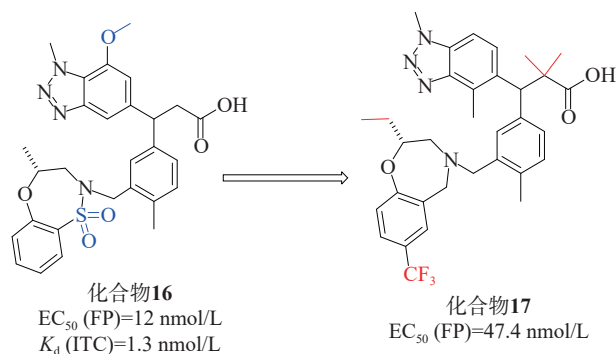


图7 化合物16和17的结构式

Wells 等<sup>[46]</sup>通过对接和虚拟筛选设计了一系列基于1,4-二芳基-1,2,3-三唑支架的配体。首先,通过乙基和叠氮苯中间体反应合成了36个三唑类文库,在固定剂量的FP测定和已建立的比色法NQO1诱导法(在Hepa1c1c7小鼠肝癌细胞中评估Nrf2依赖性转录)中,除苯基4位带有对甲酰胺的化合物外,所有化合物均能够在10  $\mu$ mol/L浓度下破坏Keap1-Nrf2相互作用,是具有显著效力的苯甲酸衍生物。然而,只有6种化合物在细胞测定中显示出Nrf2诱导能力,其中4个带有4-(3-硝基苯基)三唑基序,所以选择4-苯基三唑部分的间硝基取代作为第二代文库。第二代文库由1-乙基-3-硝基苯和一系列3位取代基合成的,大部分化合物在FP和NQO1诱导测定中表现出良好的效活性。为了检验四唑部分作为羧酸同分异构体的影响,制备了第三个文库,并以1-乙基-3-三苯和之前筛选的小系列3-取代苯胂为原料,制备了一系列1,2,3-三唑化合物。虽然FP实验中有两种化合物表现出显著的活性,但NQO1诱导能力测试普遍较差,表明

它们不是有效的Nrf2诱导剂。剂量-反应评价实验结果表明,除了叔丁基和硫甲基取代基外,其他取代基活性均良好。其中,化合物18a、18b和18c显示出优越的活性 [ $EC_{50}$ =7.1~10.0  $\mu$ mol/L、CD(NQO1)=0.6~1.3  $\mu$ mol/L]。同时,透析测定证明了碘取代化合物的可逆结合,也证实了该化合物通过破坏Keap1-DLG而不是Keap1-ETGE相互作用来发挥作用。

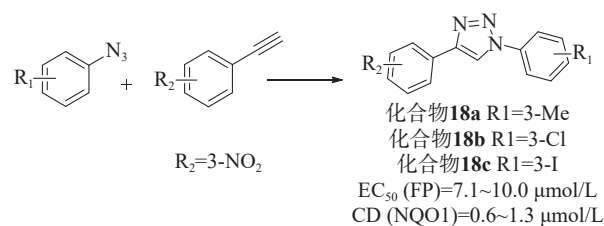


图8 化合物18a~18c的设计思路

张静夏课题组<sup>[47]</sup>考虑到酚类取代基噁二唑可能对脑缺血损伤具有潜在的保护作用,而三唑的电子性质与噁二唑相似,故将1,2,4-噁二唑核心替换为1,2,4-三唑,以获得酚取代基三唑。为了增加血脑屏障透过率,在骨架中添加苯基以提高其亲脂性,合成了一系列在苯基上具有不同取代基的化合物进行进一步的探索。硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)作为刺激物诱导PC12细胞凋亡,可以模拟缺血性脑卒中神经元氧化应激。首先通过SNP诱导的PC12细胞凋亡模型初步筛选了这些化合物的神经保护活性。在4位被单基团取代时,含烷基的化合物可能发挥更好的神经保护作用,其次是含卤素的化合物;3位取代基优于2位或4位取代基;此外,同时占据位置3和5位可能有利于神经保护作用。进一步研究对有前途的化合物在PC12和HaCaT细胞上的细胞毒性评估其安全性 [ $IC_{50}$ (PC12)=262.7  $\mu$ mol/L、 $IC_{50}$ (HaCat)=162.7  $\mu$ mol/L]。两项测试表明化合物19( $K_d$ =22.7  $\mu$ mol/L)突出的神经保护作用以及对PC12和HaCaT细胞的低毒性,被选为进一步实验化合物。化合物19通过提高SOD水平和降低MDA的产生来缓解体内氧化应激。

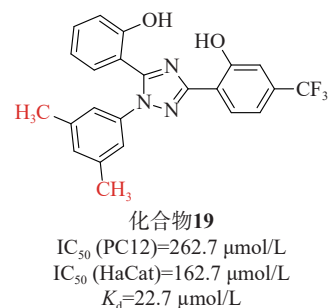


图9 化合物19的结构式



此外, Western Blot 检测发现化合物 19 促进 Nrf2 的核易位及上调 Nrf2 依赖性酶的表达水平, SPR 实验表明, 化合物 19 能与 Keap1 Kelch 结构域结合。

### 3.2.5 吡啶类 Keap1-Nrf2 小分子抑制剂

Barbara 课题组<sup>[48]</sup> 基于分子建模和亚结构搜索方法, 发现了一系列化合物。酸性抑制剂与带有羧基的 Keap1-Nrf2 相互作用以阴离子形式存在于中性水溶液中, 这会阻碍细胞易位过程。为了解决这个问题, 研究人员尝试使用四唑环或硝基替代羧基, 以获得对 Keap1 具有高亲和力的化合物, 并在基于细胞的实验中展现出更高的活性。其中, 化合物 20 被发现是活性最高的吡啶衍生物。这一系列化合物的生物学实验结果表明, 在对 Nrf2 及其下游靶 ARE 基因 NQO1 和 TKT 编码的两种酶的表达实验中, 化合物 20 活性更强。在细胞毒性实验中, GI<sub>50</sub> 值大于 5 μmol/L, 毒性最小。

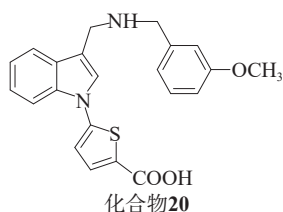


图 10 化合物 20 的结构式

Clara 等<sup>[49]</sup> 以褪黑激素类似物化合物 21 [ $K_i(hMT_1R)=35$  nmol/L、 $K_i(hMT_2R)=4$  nmol/L] 为起始化合物, 在噁二唑酮氮上加入不同取代基、用噁二唑胺取代噁二唑酮环、在连接物中插入双键、用二氢萘环或萘环代替吡啶, 对起始分子的每个部分进行了修改, 得到了一系列类似物。

在氧自由基吸收能力(oxygen radical absorbance capacity, ORAC)的评估测试中, 所有吡啶衍生物的 ORAC 值优良, 证明与杂环上 3 号取代基的性质无关, 用二氢萘或萘芯代替吡啶对 ORAC 测定中的抗氧化活性有害。在 AREc32 细胞系中, 使用 Nrf2 依赖性荧光素酶报告基因试验来评估激活 Nrf2 的能力, 化合物 22、23 的诱导效果最好, CD 值分别为 15.1 和 1.8 μmol/L,  $K_i(QR2)$  值分别为 6.6 和 3.2 nmol/L, 实验表明连接体中存在吡啶核和双键对于实现 Nrf2 的良好诱导至关重要。实验人员为了评估分子与 Keap1 的 Kelch 结构域相互作用的能力, 进行了 SPR 实验, 以著名的 Keap1 结合剂 ML334 作为内参, 在产生的 10 个共振单元的 SPR 信号变化中, 3 个化合物 SPR 响应值等于或大于 ML334, 4 个化合物 SPR 值较小, 可初步判定化合物 22、23 对 Nrf2 的激活可能是由于这些分子

与 Keap1 结合所致。

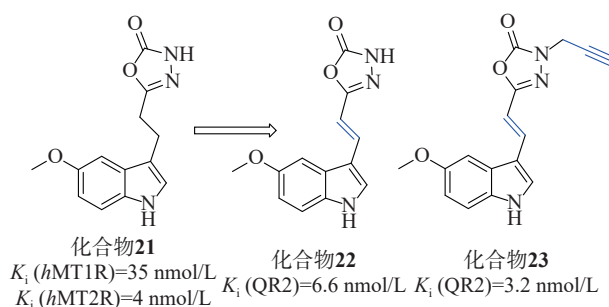


图 11 化合物 21 ~ 23 的结构式

姜正羽课题组<sup>[50]</sup> 基于已有结构, 用苯环取代了萘环。然后, 在核心苯环上引入一个小的疏水基团 3-甲氧基苯胺, 采用 FP 法研究了化合物核心苯环上不同取代基对其活性的影响, 发现在其核心苯环引入 2 位甲基的化合物 24 ( $IC_{50} = 30.0$  μmol/L) 的效力最高。课题组假设化合物 24 的核心苯环可能占据 P3 口袋以稳定结合构象。因此, 将仲胺与核心苯环的甲基部分环化得到化合物 25 ( $IC_{50} = 14.4$  μmol/L), 与化合物 24 相比, 其活性提高了大约 2 倍。随后基于化合物 25 的结构, 对其吡啶环结构、苯磺酰胺片段上取代基以及吡啶环和苯基环之间的连接部分进行探索。系统地评估了化合物 26 苄基部分的不同取代基对活性的影响, 发现原来的 3-甲氧基是最优选择。化合物 26 与 Keap1 的分子对接结合模式发现羧酸部分插入 P2 子口袋, 2,4,6-三甲基取代苯基环占据疏水性口袋 P5, 苄基部分占据极性 P1 子口袋。最终以亚甲基类似物化合物 26 ( $IC_{50} = 16.4$  μmol/L) 进行下一步优化。

该课题组进一步对化合物 26 进行设计优化, 最后得到了活性最高的化合物 27 [ $IC_{50}=22$  nmol/L、 $K_d(ITC)=58.4$  nmol/L、 $K_d(BLI)=26.4$  nmol/L], 在体外显著激活 Nrf2 调控的细胞保护防御系统。体内实验证明, 化合物 27 对 LPS 诱导的 H9C2 细胞损伤具有细胞保护作用。该课题组将吡啶环为核心代替萘支架设计的一系列化合物, 促进了 Keap1-Nrf2 PPI 抑制剂的发展。

## 4 Keap1-Nrf2 通路抗炎治疗临床进展

在众多 Keap1-Nrf2 通路抗炎药物中, 有 3 种药物近年来应用最广泛: 富马酸二甲酯、齐墩果烷三萜以及甲基巴多索隆(bardoxolone methyl, CDDO-Me)。研究人员也不断推动着它们的临床进展, 与此同时, 其他药物也不断进入临床试验, 如表 1 所示。

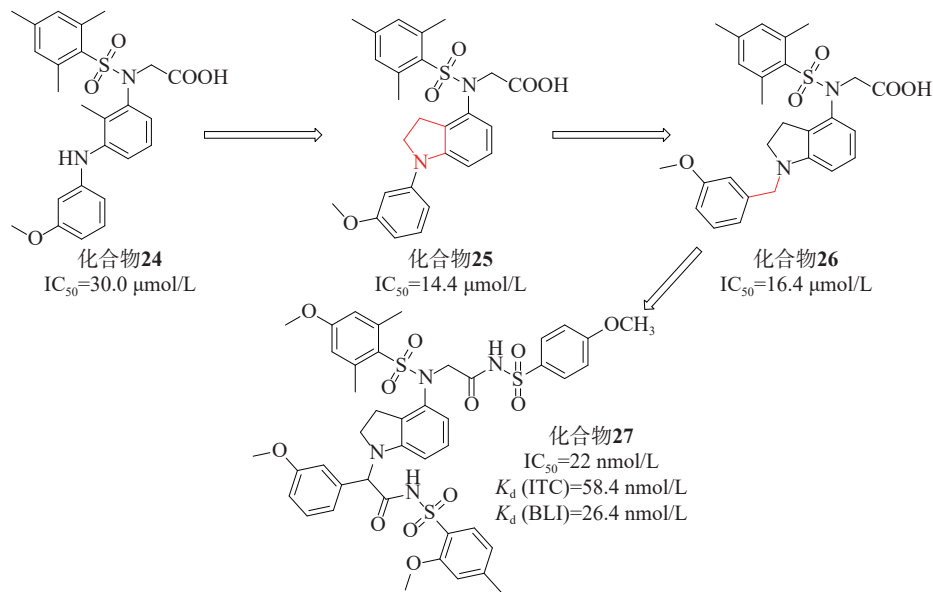


图 12 化合物 27 的设计思路

表 1 药物在临床试验中的应用

临床试验编号	试验标题	试验药物	适应症
NCT06319339	Nrf2激活对周围动脉疾病患者大血管功能、微血管功能、腿部功能和步行能力的影响	富马酸地罗西美	外周动脉闭塞性疾病
CTIS2023-506 795-27-00	富马酸二甲酯对肾上腺髓神经患者的影响:一项多中心、安慰剂对照、II b/III期试验	富马酸二甲酯	神经系统疾病肾上腺脑白质营养不良
NCT05959759	富马酸二甲酯治疗颅内未破裂动脉瘤:双盲随机对照试验	富马酸二甲酯	颅内动脉瘤炎症
CTR20232004	单中心、开放、单次给药试验评价硝酮嗪片在肾功能不全和健康受试者中药代动力学特征	硝酮嗪	肾功能不全糖尿病肾病
NCT05811949	富马酸二甲酯对多发性硬化症认知表现、灰质和丘脑病理学的影响:相关性研究。	富马酸二甲酯	多发性硬化症
NCT05798520	一项2部分、多中心、随机、盲法、主动控制的2期研究,依次评估BIIB091单一疗法和BIIB091联合富马酸地罗西美治疗复发型多发性硬化症参与者的安全性和有效性	富马酸地罗西美BIIB-091	复发性多发性硬化
NCT05718375	CU01-1001治疗2型糖尿病肾病蛋白尿患者 24 周疗效评估和安全性评估的多中心、随机、双盲、安慰剂对照、平行II b期临床试验	CU-01	非胰岛素依赖型糖尿病白蛋白尿2型糖尿病肾病
CTR20221451	一项旨在评价Diroximel Fumarate(BIIB098)用于亚太地区成年复发型多发性硬化受试者中的安全性和耐受性以及药代动力学的开放性、单臂、多中心、III期研究	富马酸地罗西美	复发性多发性硬化
NCT05083923	一项开放标签、单臂、多中心、III期研究,旨在评估富马酸二羟甲基(BIIB098)在亚太地区复发性多发性硬化症患者中的安全性、耐受性和药代动力学	富马酸地罗西美	复发性多发性硬化
NCT04948606	一项前瞻性观察性研究,评估真实世界环境中富马酸二羟甲基噻啉的治疗持久性、安全性、耐受性和有效性(EXPERIENCE-CA+IL研究)	富马酸地罗西美	复发性多发性硬化
NCT04890353	免疫调节剂富马酸二甲酯对急性缺血性中风的影响	富马酸二甲酯	急性缺血性卒中
NCT04890366	免疫调节剂富马酸二甲酯与阿替普酶联合治疗急性缺血性中风	富马酸二甲酯	急性缺血性卒中
CTR20210206	多中心、随机、双盲、安慰剂平行对照试验探索性研究硝酮嗪治疗2型糖尿病肾病患者的有效性和安全性	硝酮嗪	2型糖尿病肾病
NCT04702997	评估甲基巴多索隆在有快速进展风险的慢性肾病患者中的安全性、耐受性和疗效的II期试验	甲基巴多索隆	慢性肾病
NCT04657926	使用夹竹桃苷和丹皮酚(APPA)治疗膝关节骨性关节炎的安慰剂对照、双盲、随机试验	APPA	膝关节炎
CTR20202126	硝酮嗪治疗肌萎缩侧索硬化症有效性和安全性的多中心、随机、双盲、安慰剂对照临床研究	硝酮嗪	肌萎缩侧索硬化
NCT04468165	通用延迟释放富马酸二甲酯(Sclera®或Marovarex®, Hikma)在治疗中东和北非地区复发缓解型多发性硬化症的常规医疗实践中的有效性和安全性	富马酸二甲酯	复发-缓解型多发性硬化
CTR20192413	多中心、随机、双盲、平行、安慰剂对照试验研究硝酮嗪片治疗2型糖尿病肾病患者的有效性和安全性	硝酮嗪	2型糖尿病肾病

(续表 1)

临床试验编号	试验标题	试验药物	适应症
NCT04292080	富马酸二甲酯的长期分析,以减缓地理萎缩区域的增长	富马酸二甲酯	地图样萎缩年龄相关性黄斑变性
NCT04263610	一项开放标签、随机、IV期研究,以评估 Tildrakizumab 在对富马酸二甲酯治疗无反应的中度至重度慢性斑块状银屑病患者中的疗效和安全性(TRANSITION)	富马酸二甲酯替瑞奇珠单抗	斑块状银屑病
NCT04221191	法国患者支持计划(PSP)OroSEP 中包含的缓解-复发多发性硬化症(RR-MS)患者的富马酸二甲酯(Tecfidera®)持久性研究	富马酸二甲酯	复发-缓解型多发性硬化
NCT04142749	一项评估奥替普拉疗效和安全性的多中心、随机、双盲、安慰剂对照、平行、III期临床试验	奥替普拉	肝硬化代谢功能障碍相关的脂肪肝病
NCT04125745	CXA-10在肺动脉高压中的安全性和有效性试验的II期开放标签研究	10-硝基油酸	肺动脉高压
NCT04072861	在健康志愿者和慢性肾病3-4期受试者中使用RBT-9进行的1b期剂量递增研究	Stannous protoporphyrin (Renibus Therapeutics)	慢性肾病急性肾损伤

#### 4.1 神经系统疾病

许多神经系统疾病的发生与氧化应激密切相关,神经炎症是由创伤、缺氧、中毒、感染等因素引发的中枢及周围神经系统的炎症,可能导致神经元变性及退化,成为阿尔茨海默病、帕金森病、中风等神经系统疾病及神经损伤的关键病理过程。因此,抑制炎症对于预防和治疗神经系统疾病具有重要意义。

备受关注的富马酸二甲酯于2014年就被 Biogen 批准用于治疗复发型多发性硬化症<sup>[51]</sup>,富马酸地罗西美也针对复发性多发性硬化进行了临床试验(NCT05798520)。越来越多的研究者关注到 SFN 对神经系统的保护作用,研究结果证实了 SFN 在急慢性神经退行性病变和神经发育疾病等神经系统疾病的预防和辅助治疗方面具有巨大应用潜力。SFN 通过经典途径调控 Nrf2 通路,即通过化学修饰 Keap1 半胱氨酸残基(主要为 Cys151)阻止 Keap1 与 Nrf2 结合,从而抑制 Nrf2 的泛素化和降解,实现 Nrf2 的积累以及依赖 Nrf2 调控的下游基因转录增强<sup>[52]</sup>,减轻炎症反应。

#### 4.2 心血管系统疾病

研究表明,Nrf2 作为一种重要的抗氧化基因,对心血管系统具有保护作用。已在动物实验中得到证实,Nrf2 敲除小鼠较正常小鼠心血管事件发生率增加,提示 Nrf2 表达与各种心血管疾病的发生发展有着重要联系<sup>[21]</sup>。Nrf2 在心血管疾病中的作用机制复杂且多样。在动脉粥样硬化中,Nrf2 通过抑制氧化低密度脂蛋白的摄取和泡沫细胞的形成,降低斑块形成的风险<sup>[53]</sup>。在缺血再灌注损伤与心肌梗死中,Nrf2 能够减轻氧化应激和炎症反应,从而减少心肌损伤和梗死面积<sup>[54]</sup>。此外,研究还发现,在心血管疾病中 Nrf2 的表达受到多种因素的调控,如 Keap1、p27 蛋白、钙离子稳态调节等。这

些调控因子在不同的心血管疾病中发挥的作用也各有差异,进一步揭示了 Nrf2 在心血管疾病中具有广泛的应用前景。

#### 4.3 肾脏疾病

在肾缺血再灌注、慢性肾脏疾病和糖尿病肾病等不同类型的肾脏疾病中,Nrf2 的激活都发挥着关键性的作用。它主要通过以下两个方面的作用来发挥其生理功能:第一,Nrf2 的活化能够上调肾组织中抗氧化蛋白的表达,如硫氧还蛋白、HO-1 和 GCL 等,从而清除体内的过量活性氧。第二,Nrf2 还能够调控 NF- $\kappa$ B,抑制肾组织中炎症介质的表达,如细胞因子、趋化因子、黏附分子、COX-2 和 iNOS 等<sup>[55]</sup>。炎症介质的过度表达会导致肾脏组织的损伤和炎症反应,Nrf2 通过抑制这些炎症介质的表达,能够发挥肾脏保护作用。

由 Reata 制药公司开发的 CDDO-Me 是另一种广为人知的 Nrf2 激活剂,可强烈激活 Keap1-Nrf2 系统<sup>[56]</sup>。研究表明,CDDO-Me 的开发有望为各种类型肾脏疾病患者提供有前景的新治疗方法。如今评估 CDDO-Me 在慢性肾病患者中的安全性、耐受性和疗效的临床试验已经进展到 II 期(NCT04702997)。

#### 4.4 肝脏疾病

先前的研究发现,Nrf2 激活能够防止酒精诱导的氧化应激和肝脏中游离脂肪酸的积累,通过增加参与抗氧化防御的基因表达和减少参与脂肪生成的基因表达来发挥肝脏保护作用<sup>[57]</sup>。刘等<sup>[58]</sup>发现,黄芩苷显著减弱代谢功能障碍相关性脂肪肝小鼠肝组织中的脂质积累、肝硬化和肝细胞凋亡,降低促炎生物标志物并增强抗氧化酶,这些酶似乎受到上调的 p62-Keap1-Nrf2 信号级联的调节;黄芩苷和全反式维甲酸(Nrf2 抑制剂)的联合治疗显示出黄芩苷及其诱导的抗氧化和抗炎反应明显减弱了



肝脏保护作用。

## 5 总结与展望

本文主要探讨了 Keap1-Nrf2 通路在炎症疾病中的研究进展。首先,介绍了 Keap1-Nrf2 通路的基本概念,包括其组成成分及激活机制。其次,阐述了 Keap1-Nrf2 通路调控炎症的机制,包括与 NF- $\kappa$ B 通路、HO-1 之间的串扰、与炎症介质和酶的表达、炎症小体之间的关系。此外,本文还介绍了通过激活 Keap1-Nrf2 通路来治疗炎症的天然产物来源抑制剂、小分子抑制剂以及临床进展。

近年来,大量研究已经表明 Keap1-Nrf2 通路在炎症疾病中具有重要的调控作用。通过了解该通路的激活机制和调控机制,我们可以开发出针对该通路的治疗策略。天然产物来源的抑制剂和小分子抑制剂已经显示出潜在的治疗效果,并且在临床上取得了一些进展。然而,许多问题也不断接踵而来,亲电性的 Keap-Nrf2 抑制剂的非特异性、小分子 Keap1-Nrf2 PPI 的潜在脱靶作用、天然产物来源的抑制剂对机体的特异性和副作用都将限制它们在临床中的应用。仍然需要进一步的研究来深入了解 Keap1-Nrf2 通路的调控机制,并开发更具针对性和高效性的治疗方法。例如, Nrf2 基因具有双重作用,既能为正常细胞提供保护,抵抗氧化应激,被认为具有肿瘤抑制功能;然而在肿瘤细胞中过度激活,通过抗氧化作用,促进肿瘤细胞的存活和增殖,表现出癌基因的特征<sup>[1]</sup>。目前迫切需要和精准的 Keap1-Nrf2 抑制剂来实现病理条件下 Nrf2 的特异性激活。

此外,我们可以探索新的治疗策略,如基因编辑和基因治疗、蛋白降解技术如 PROTACs 以及自噬靶向嵌合体(autophagy-targeting chimeras, AUTUCs)以提高 Keap1-Nrf2 通路的活性和特异性。同时,进一步研究 Keap1-Nrf2 通路与其他关键信号通路之间的相互作用,以及其在不同炎症疾病中的具体调控机制。总之,Keap1-Nrf2 通路在炎症治疗中具有巨大的潜力,为炎症疾病的治疗提供了新的思路。

作者贡献:周文艳负责文献检索、数据核对及综述撰写;胡珊珊参与负责文献检索、数据核对及综述撰写;张万年、庄春林负责为综述撰写思路并对稿件进行修改和审校。

利益冲突:所有作者均不存在利益冲突。

### 【参考文献】

[1] LIN L, WU Q, LU F F, et al. Nrf2 signaling pathway: current

status and potential therapeutic targetable role in human cancers[J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1184079.

- [2] ITOH K, WAKABAYASHI N, KATOH Y, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(1): 76-86.
- [3] DINKOVA-KOSTOVA A T, KOSTOV R V, CANNING P. Keap1, the cysteine-based mammalian intracellular sensor for electrophiles and oxidants[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2017, 617: 84-93.
- [4] BELLEZZA I, GIAMBANCO I, MINELLI A, et al. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865(5): 721-733.
- [5] YAMAMOTO M, KENSLER T W, MOTOHASHI H. The KEAP1-NRF2 system: a thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis[J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(3): 1169-1203.
- [6] ADINOLFI S, PATINEN T, JAWAHAR DEEN A, et al. The KEAP1-NRF2 pathway: Targets for therapy and role in cancer[J]. *Redox Biol*, 2023, 63: 102726.
- [7] ALMUKAINZI M, EL-MASRY T A, SELIM H, et al. New insight on the cytoprotective/antioxidant pathway Keap1/Nrf2/HO-1 modulation by *Ulva intestinalis* extract and its selenium nanoparticles in rats with carrageenan-induced paw edema[J]. *Mar Drugs*, 2023, 21(9): 459.
- [8] HAYDEN M S, GHOSH S. NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions[J]. *Genes Dev*, 2012, 26(3): 203-234.
- [9] SAHA S, BUTTARI B, PANIERI E, et al. An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation[J]. *Molecules*, 2020, 25(22): 5474.
- [10] OECKINGHAUS A, HAYDEN M S, GHOSH S. Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(8): 695-708.
- [11] LI Q T, VERMA I M. NF-kappaB regulation in the immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(10): 725-734.
- [12] GANESH YERRA V, NEGI G, SHARMA S S, et al. Potential therapeutic effects of the simultaneous targeting of the Nrf2 and NF- $\kappa$ B pathways in diabetic neuropathy[J]. *Redox Biol*, 2013, 1(1): 394-397.
- [13] CUADRADO A, MARTÍN-MOLDES Z, YE J P, et al. Transcription factors NRF2 and NF- $\kappa$ B are coordinated effectors of the Rho family, GTP-binding protein RAC1 during inflammation[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(22): 15244-15258.
- [14] HUANG C Y, DENG J S, HUANG W C, et al. Attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by hispolon in mice, through regulating the TLR4/PI3K/Akt/mTOR and Keap1/Nrf2/HO-1 pathways, and suppressing oxidative stress-mediated ER stress-induced apoptosis and autophagy[J]. *Nutrients*, 2020, 12(6): 1742.
- [15] AHMED S M, LUO L, NAMANI A, et al. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(2): 585-597.

- [16] HOU Y H, WANG Y T, HE Q, et al. Nrf2 inhibits NLRP3 inflammasome activation through regulating Trx1/TXNIP complex in cerebral ischemia reperfusion injury[J]. *Behav Brain Res*, 2018, 336: 32-39.
- [17] HE J C, LIU L, LIU X J, et al. Epoxymicheliolide prevents dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by inhibiting TAK1-NF- $\kappa$ B pathway and activating Keap1-NRF2 signaling in macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 113(Pt A): 109404.
- [18] WANG Z C, NIU K M, WU Y J, et al. A dual Keap1 and p47<sup>phox</sup> inhibitor Ginsenoside Rb1 ameliorates high glucose/ox-LDL-induced endothelial cell injury and atherosclerosis[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(9): 824.
- [19] SATOH T, TRUDLER D, OH C K, et al. Potential therapeutic use of the rosemary diterpene carnosic acid for Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and long-COVID through NRF2 activation to counteract the NLRP3 inflammasome[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(1): 124.
- [20] SONG J Y, WANG H R, SHENG J Y, et al. Vitexin attenuates chronic kidney disease by inhibiting renal tubular epithelial cell ferroptosis via NRF2 activation[J]. *Mol Med*, 2023, 29(1): 147.
- [21] JIA Y X, GUO H, CHENG X Z, et al. Hesperidin protects against cisplatin-induced cardiotoxicity in mice by regulating the p62-Keap1-Nrf2 pathway[J]. *Food Funct*, 2022, 13(7): 4205-4215.
- [22] HONG H W, LOU S Y, ZHENG F L, et al. Hydnocarpin D attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via MAPK/NF- $\kappa$ B and Keap1/Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Phytomedicine*, 2022, 101: 154143.
- [23] AI G X, WU X Y, DOU Y X, et al. Oxyberberine, a novel HO-1 agonist, effectively ameliorates oxidative stress and inflammatory response in LPS/D-GalN induced acute liver injury mice via coactivating erythrocyte metabolism and Nrf2 signaling pathway[J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 166: 113215.
- [24] ZHANG Y B, YAN T T, SUN D X, et al. Rutaecarpine inhibits KEAP1-NRF2 interaction to activate NRF2 and ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 148: 33-41.
- [25] YANG X P, ZHI J K, LENG H F, et al. The piperine derivative HJ105 inhibits A $\beta_{1-42}$ -induced neuroinflammation and oxidative damage via the Keap1-Nrf2-TXNIP axis[J]. *Phytomedicine*, 2021, 87: 153571.
- [26] LEE S M, HU L Q. Nrf2 activation through the inhibition of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction[J]. *Med Chem Res*, 2020, 29(5): 846-867.
- [27] LIU X J, SHEN X F, WANG H, et al. Mollugin prevents CLP-induced sepsis in mice by inhibiting TAK1-NF- $\kappa$ B/MAPKs pathways and activating Keap1-Nrf2 pathway in macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 125(Pt A): 111079.
- [28] IEGRE J, KRAJCOVICOVA S, GUNNARSSON A, et al. A cell-active cyclic peptide targeting the Nrf2/Keap1 protein-protein interaction[J]. *Chem Sci*, 2023, 14(39): 10800-10805.
- [29] ZOU J H, YAN J Y, LU Y F, et al. Cyclic peptide Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors: design, synthesis, and *in vivo* treatment of acute lung injury[J]. *J Med Chem*, 2024, 67(6): 4889-4903.
- [30] JIANG Z Y, LU M C, XU L L, et al. Discovery of potent Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor based on molecular binding determinants analysis[J]. *J Med Chem*, 2014, 57(6): 2736-2745.
- [31] LU M C, ZHAO J, LIU Y T, et al. CPUY192018, a potent inhibitor of the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction, alleviates renal inflammation in mice by restricting oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation[J]. *Redox Biol*, 2019, 26: 101266.
- [32] JAIN A D, POTTETI H, RICHARDSON B G, et al. Probing the structural requirements of non-electrophilic naphthalene-based Nrf2 activators[J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 103: 252-268.
- [33] ZHANG L, XU L J, CHEN H H, et al. Structure-based molecular hybridization design of Keap1-Nrf2 inhibitors as novel protective agents of acute lung injury[J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 222: 113599.
- [34] WINKEL A F, ENGEL C K, MARGERIE D, et al. Characterization of RA839, a noncovalent small molecule binder to Keap1 and selective activator of Nrf2 signaling[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(47): 28446-28455.
- [35] LIU G D, HOU R L, XU L J, et al. Crystallography-guided optimizations of the Keap1-Nrf2 inhibitors on the solvent exposed region: from symmetric to asymmetric naphthalenesulfonamides[J]. *J Med Chem*, 2022, 65(12): 8289-8302.
- [36] SUN Y, XU L J, ZHENG D P, et al. A potent phosphodiester Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor as the efficient treatment of Alzheimer's disease[J]. *Redox Biol*, 2023, 64: 102793.
- [37] XIE Z Z, LIU Y, BIAN J S. Hydrogen sulfide and cellular redox homeostasis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 6043038.
- [38] LU M C, ZHANG X, ZHAO J, et al. A hydrogen peroxide responsive prodrug of Keap1-Nrf2 inhibitor for improving oral absorption and selective activation in inflammatory conditions[J]. *Redox Biol*, 2020, 34: 101565.
- [39] ZHANG X, CUI K N, WANG X L, et al. Novel hydrogen sulfide hybrid derivatives of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor alleviate inflammation and oxidative stress in acute experimental colitis[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(5): 1062.
- [40] HU L Q, MAGESH S, CHEN L, et al. Discovery of a small-molecule inhibitor and cellular probe of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(10): 3039-3043.
- [41] ONTORIA J M, BIANCOFIORE I, FEZZARDI P, et al. Combined peptide and small-molecule approach toward nonacidic THIQ inhibitors of the KEAP1/NRF2 interaction[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2020, 11(5): 740-746.
- [42] WEN X, THORNE G, HU L Q, et al. Activation of NRF2 signaling in HEK293 cells by a first-in-class direct KEAP1-NRF2 inhibitor[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2015, 29(6): 261-266.

- [43] TONG K I, KATOH Y, KUSUNOKI H, et al. Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(8): 2887-2900.
- [44] DAVIES T G, WIXTED W E, COYLE J E, et al. Monoacidic inhibitors of the kelch-like ECH-associated protein 1: nuclear factor erythroid 2-related factor 2(KEAP1: NRF2)protein-protein interaction with high cell potency identified by fragment-based discovery[J]. *J Med Chem*, 2016, 59(8): 3991-4006.
- [45] KASEDA S, SANNOMIYA Y, HORIZONO J, et al. Novel Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor UBE-1099 ameliorates progressive phenotype in alport syndrome mouse model[J]. *Kidney360*, 2022, 3(4): 687-699.
- [46] BERTRAND H C, SCHAAP M, BAIRD L, et al. Design, synthesis, and evaluation of triazole derivatives that induce Nrf2 dependent gene products and inhibit the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction[J]. *J Med Chem*, 2015, 58(18): 7186-7194.
- [47] LAO Y Q, WANG Y, CHEN J W, et al. Synthesis and biological evaluation of 1, 2, 4-triazole derivatives as potential Nrf2 activators for the treatment of cerebral ischemic injury[J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 236: 114315.
- [48] COSIMELLI B, GRECO G, LANERI S, et al. Identification of novel indole derivatives acting as inhibitors of the Keap1-Nrf2 interaction[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2019, 34(1): 1152-1157.
- [49] HERRERA-ARZAMENA C, ESTRADA-VALENCIA M, PÉREZ C, et al. Tuning melatonin receptor subtype selectivity in oxadiazolone-based analogues: Discovery of QR2 ligands and NRF2 activators with neurogenic properties[J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 190: 112090.
- [50] ZHOU H S, HU L B, ZHANG H, et al. Design, synthesis, and structure-activity relationships of indoline-based kelch-like ECH-associated protein 1-nuclear factor(erythroid-derived 2)-like 2(Keap1-Nrf2)protein-protein interaction inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(19): 11149-11168.
- [51] ZHOU H S, WANG Y, YOU Q D, et al. Recent progress in the development of small molecule Nrf2 activators: a patent review(2017-present)[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2020, 30(3): 209-225.
- [52] ZHANG ZX, TIAN SW, YOU Y. The pathophysiological role of neuroinflammation in neurodegenerative and psychiatric disorders[J]. *中南医学科学杂志*, 2017, 45(3): 312-314.
- [53] YANG Y Y, LI X Y, PENG L Y, et al. Tanshindiol C inhibits oxidized low-density lipoprotein induced macrophage foam cell formation via a peroxiredoxin 1 dependent pathway[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(3): 882-890.
- [54] JAKOBS P, SERBULEA V, LEITINGER N, et al. Nuclear factor(erythroid-derived 2)-like 2 and thioredoxin-1 in atherosclerosis and ischemia/reperfusion injury in the heart[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 26(12): 630-644.
- [55] CLERICI S, BOLETTA A. Role of the KEAP1-NRF2 axis in renal cell carcinoma[J]. *Cancers*, 2020, 12(11): 3458.
- [56] TORRES V E, CHAPMAN A B, DEVUYST O, et al. Tolvaptan in later-stage autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(20): 1930-1942.
- [57] WU K C, LIU J, KLAASSEN C D. Role of Nrf2 in preventing ethanol-induced oxidative stress and lipid accumulation[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 262(3): 321-329.
- [58] LIU WJ, CHEN WW, CHEN JY, et al. Baicalin attenuated metabolic dysfunction-associated fatty liver disease by suppressing oxidative stress and inflammation via the p62-Keap1-Nrf2 signalling pathway in db/db mice [J]. *Phytother Res*, 2023: 1-16.
- [收稿日期] 2024-05-09 [修回日期] 2024-12-26  
[本文编辑] 李睿旻