

ASEA®

氧化还原信

号分子对

NRF2 通路的

影响

研究摘要：

英国巴斯大学

澳大利亚悉尼大  
学



导言

## Nrf2 - 一种转录因子

红细胞特异性核因子 2 (NF-E2) 是由安德鲁斯等人于 1993 年在小鼠体内首次发现、描述和克隆的。该多肽是转录因子基本区-亮氨酸拉链家族 (b-zip) 的一个新的造血细胞特异性成员 (1)。NF-E2 是与串联 AP1 (活化蛋白 1)-NF-E2 重复结合的蛋白之一，AP1 重复代表 HS2 内的核心增强子 (2)。

1994 年，人们发现了人类 CNC-bZIP 转录因子家族的一个成员，即 Nrf2 或 NF-E2 相关因子 2 (以前称为 HEBP1)，它能刺激 $\beta$ -球蛋白基因的转录。该因子被克隆，其基因组结构被分离出来，并首次被命名为核因子-红细胞生成素 2 相关因子，或 Nrf2。它被描述为一种类似于 NF-E2 的基本亮氨酸拉链转录激活因子。有趣的是，Nrf2 的表达并不局限于造血组织。

当时，人们还不知道 Nrf2 在高水平表达的非造血组织中发挥什么作用。小鼠和人类的 Nrf2 基因之间的高度保守性表明，它们具有令人好奇的重要功能，(2)。Nrf2 由核因子 (红细胞衍生 2) 样 2 基因 (NFE2L2) 编码，

该基因位于人类 2 号染色体 2q31.2 细胞遗传学带 (基因编号: 4780)。NFE2L2 由 5 个外显子和 4 个内含子组成，有 8 个转录本变体，包括有 6 种异构体的 Nrf2 编码 (3)。

几十年后，人们对这种蛋白质有了更多的了解。根据 NIH 癌症机构，Nrf2 是一种控制某些基因表达方式的蛋白质。这些基因有助于保护细胞免受自由基 (活性氧和活性氮) 的损害。是人体通过各种内源性系统产生的，(4)。这些游离自由基是重要的化合物，因为它们可能在某些病症的发展过程中扮演重要角色，而且它们还与衰老过程有关 (5)。目前的证据表明，NRF2 位于一个复杂调控网络的中心，并使 Nrf2 成为一个真正的多效应转录因子 (6)。

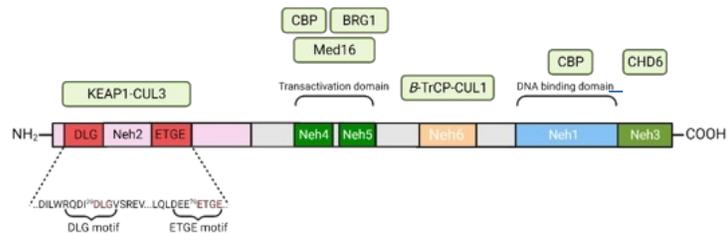
## 氧化还原信号分子对 NRF2 通路的影响

Nrf2 通过调控一系列抗氧化和 II 期解毒基因，是抗氧化反应和异生物代谢的主调控因子。因此，Nrf2 保护细胞免受从内源性物质和活性氧（ROS）到环境侵害等不同类型的压力（7）。

Nrf2 的活性受 Keap1（Kelch-like ECH-associated protein 1）调控，Keap1 是基于 Cullin 3 的 E3 泛素连接酶的适配亚基，是氧化和亲电压力的传感器（8）。

Keap1 是氧化和亲电压力的关键传感器。在平衡状态下，KEAP1 是 E3 泛素连接酶的一部分，它通过将转录因子 NRF2 靶向泛素化和蛋白酶体依赖性降解来严格调节其活性。在应激反应中，KEAP1 内的传感器半胱氨酸促成了一种复杂的分子机制，使 NRF2 摆脱泛素化，在细胞内积聚并转运到细胞核，在那里它可以促进其抗氧化转录程序，调节细胞保护基因的表达（9）。

### NRF2 Domain



### KEAP1 Domain

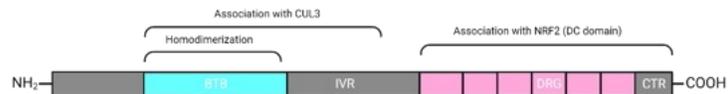


图 1: NRF2 (A) 和 KEAP1 (B) 的结构域。与 NRF2 相互作用的分子显示在绿色方框中，并置于其相互作用结构域的上方（根据参考文献 10 改编）。

物种间 NRF2 结构的系统发育保守性揭示了六个功能域的存在：Neh1（NRF2-ECH 同源结构域-1）到 Neh6。Neh1 包含介导 DNA 结合和二聚体形成的 CNC 和 bZIP 结构域，而 Neh3、Neh4 和 Neh5 则是转录激活结构域。在转录激活结构域中，Neh4 和 Neh5 通过招募组蛋白乙酰转移酶 cAMP 反应元件结合蛋白和 Mediator 复合体（9），对转录激活做出了重要贡献。

KEAP1 是一种富含半胱氨酸硫醇的氧化还原损伤传感器，而 NRF2 则是一种转录因子，能强有力地传递化学信号，调节一系列细胞保护基因。KEAP1 在静态条件下抑制 NRF2 的活性，而应激状态下，NRF2 则从 KEAP1 介导的抑制中解放出来。KEAP1-NRF2 系统是维持氧化还原平衡和抵御环境损伤的防御机制的一种有效装置（10）。

## 氧化还原信号分子对 NRF2 通路的影响

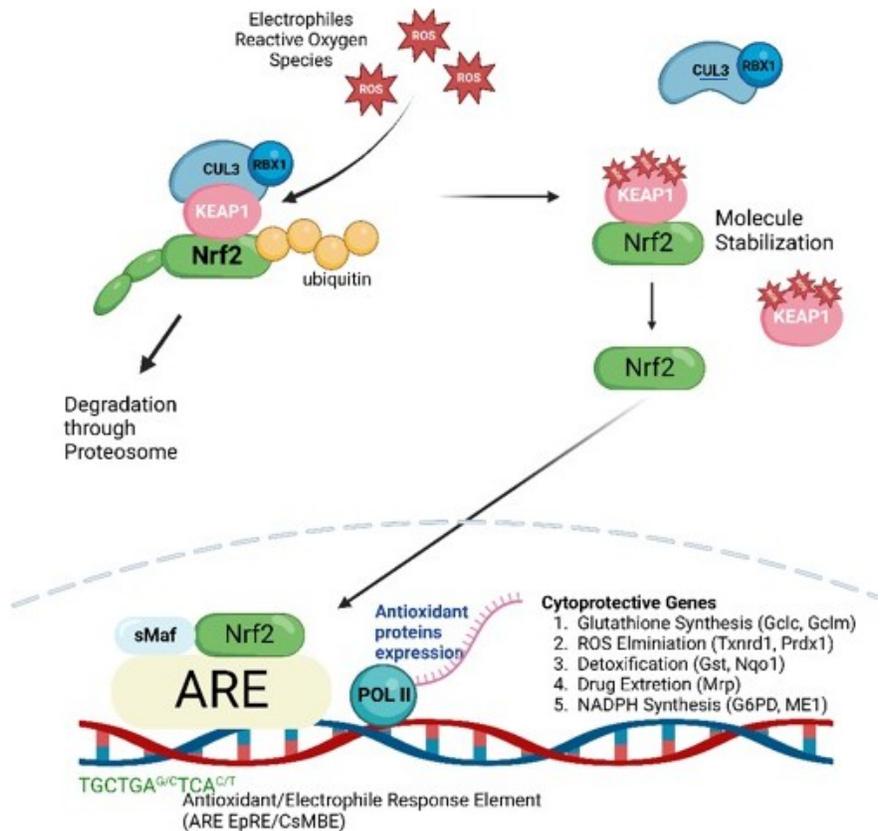
对 KEAP1-NRF2 系统的深入研究表明，NRF2 的活性及其调控机制对维持人体健康至关重要。需要强调的是，该系统的失调是多种不同人类疾病发病机制的基础 (11)。

NRF2 最重要的特点是其可诱导性。KEAP1 与 CUL3 和 RBX 合作，作为 E3 泛素连接酶复合物的底物识别元件，使 NRF2 的功能具有可诱导性。在正常情况下，泛素化的 NRF2 会被蛋白酶体降解，正是 NRF2 的这种组成性降解将 NRF2 的数量和活性维持在较低水平。KEAP1-CUL3 复合物的 E3 泛素连接酶活性在暴露于亲电物和 ROS 时会被破坏，而亲电物和 ROS 会修饰 KEAP1 的半胱氨酸残基，从而使新合成的 NRF2 在细胞核中积累并激活转录。因此，KEAP1 具有高活性半胱氨酸残基，可通过开启或关闭 KEAP1-CUL3 复合物的泛素 E3 连接酶活性，成为应对氧化还原紊乱的高效、灵敏的生物传感器 (10)。

当细胞暴露于氧化应激或化学预防化合物时，Nrf2 会转位到细胞核，与其强制性的伙伴 Maf 形成异源二聚体，并与 ARE 序列结合，激活几种不同类型基因的转录。Nrf2 的下游基因大多在启动子中含有 ARE 序列 (12)。Nrf2 介导转录的一个最重要的特点是对异生物和氧化应激的可诱导性反应。

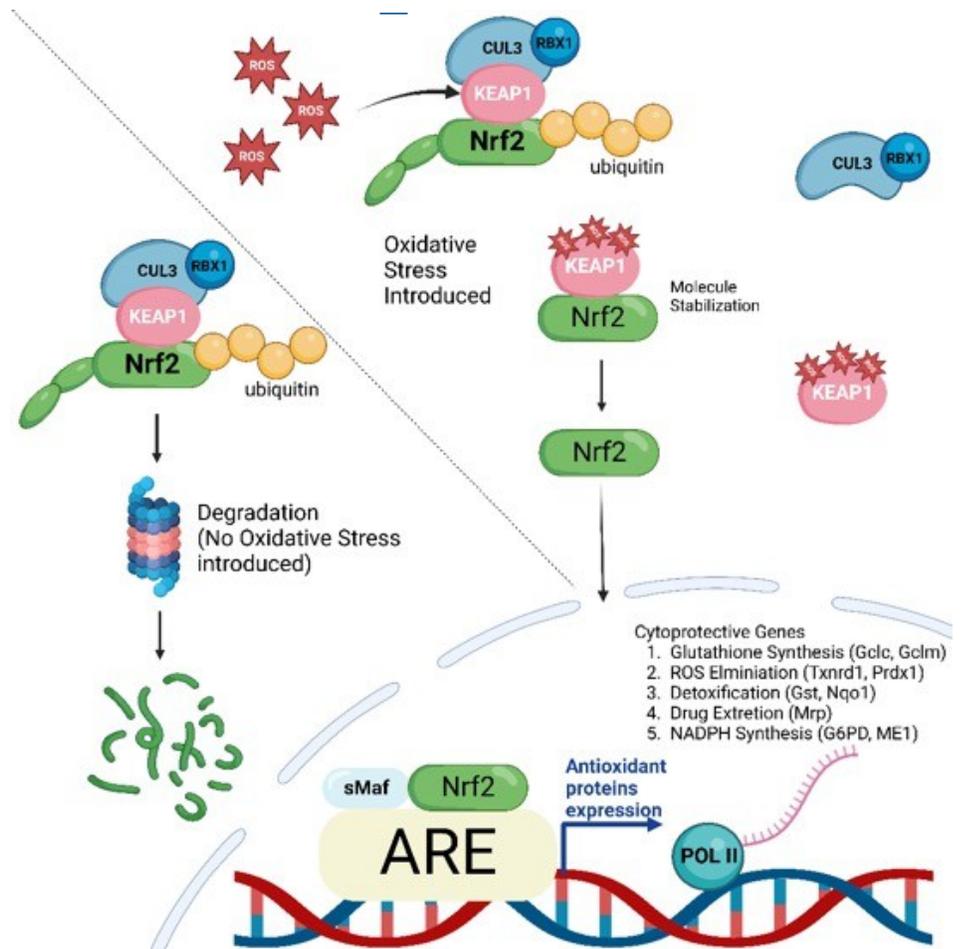
图 2:

KEAP1-NRF2 是一个双组分系统。在细胞质中，NRF2 被 KEAP1-CUL3 泛素 E3 连接酶复合物，以标记其通过以下方式降解  
蛋白酶体。当细胞暴露于亲电物或活性氧时，KEAP1 被修饰，KEAP1-CUL3 泛素 E3 连接酶的活性下降，从而导致 NRF2 的稳定。稳定和积累的 NRF2 会转移到细胞核，并激活一系列细胞保护基因（根据参考文献 10 改编）。



## 氧化还原信号分子对 NRF2 通路的影响

图 3: KEAP1-NRF2 系统。在正常情况下，Nrf2 通过 Keap1 不断泛素化，并在蛋白酶体中降解。在暴露于电介质或氧化应激后，Keap1 失活。稳定的 Nrf2 在细胞核中积聚，并激活许多细胞保护基因（根据参考文献 13 改编）。



总结上述，KEAP1-Nrf2 系统是维持氧化还原平衡的有效装置。KEAP1 是氧化还原损伤的传感器，而 Nrf2 则是转录因子，它能强有力地传递化学信号，调节一系列细胞保护基因。

当细胞回复静态时，它们之间的关系又回到 NRF2 的活性受 KEAP1 抑制，而暴露于应激时，NRF2 会在从 KEAP1 介导的抑制中释放出来（10）。

### Nrf2-KEAP1 通路和调控

Nrf2-KEAP1 通路是感知和应对氧化和亲电压力的基本途径。在经典的 Nrf2-KEAP1 信号通路中 Keap1 是一种关键的 Nrf2 抑制因子，在调节 Nrf2 信号通路方面发挥着关键作用。

## 氧化还原信号分子对 NRF2 通路的影响

Keap1 是连接 Nrf2 和泛素化连接酶 Cullin-3 的桥梁。氧化应激物或亲电子物会抑制 Nrf2 的泛素依赖性降解，从而增加 Nrf2 的核积累。作为一种富含半胱氨酸的蛋白质，Keap1 是化学诱导剂的绝佳传感器 (14)。

Nrf2 是一种转录因子，会影响许多参与抗氧化应激和药物代谢的不同基因的表达。因此，调节 Nrf2 的表达是治疗或预防疾病的一个重要目标，据报道，这种调节受到表观遗传学的影响 (15)。

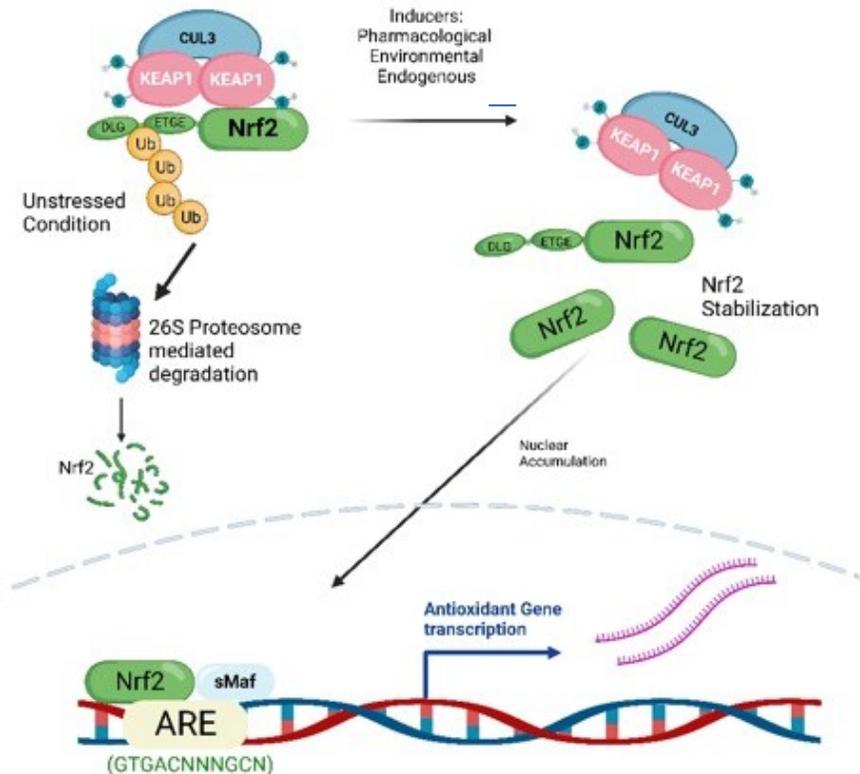


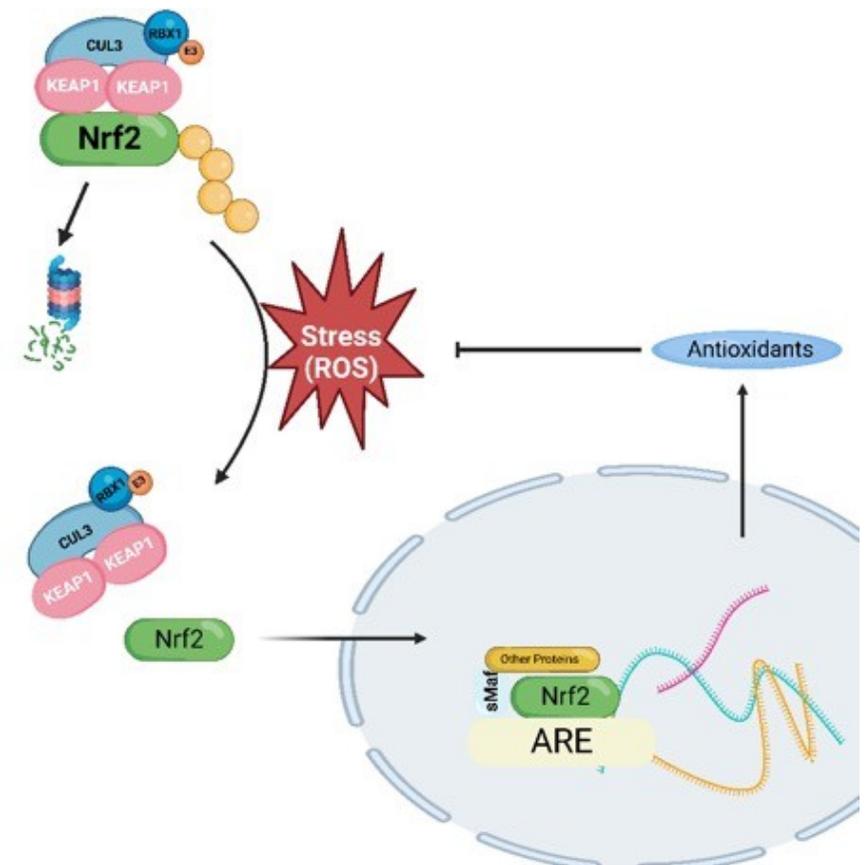
图 4:  
Nrf2 信号通路示意图 (根据参考文献 16 改编和修改)

Nrf2 的表达是细胞固有的，因此可确保对氧化应激和炎症做出保护性反应。在生理条件下，Nrf2 在泛素蛋白酶系统的作用下会迅速更替。Nrf2 的稳定性由 KEAP-1 控制，KEAP-1 是内源性和环境氧化信号以及亲电子反应的氧化还原传感器。(17).

Nrf2 还可在转录水平上受到调控。NFE2L2 基因启动子上有多个调控序列 (18)。有趣的是，所谓的 Nrf2 激活剂应称为 "KEAP1" 抑制剂。在正常情况下，Keap1 在细胞内以二聚体形式存在，作为底物连接蛋白与基于 Cul3/Rbx1 的 E3-泛素连接酶和 Nrf2 的复合物相互作用，从而导致 Nrf2 持续泛素化并随后被蛋白酶降解。这将使 Nrf2 调节的抗氧化物维持在较低的基础水平。在细胞应激或暴露于轻度氧化应激时，Nrf2 会从 Keap1 上解离，变得稳定，并转移到细胞核中，在那里它与其他蛋白因子相互作用并与 ARE 结合，导致抗氧化基因转录增加 (10)。

## 氧化还原信号分子对 Nrf2 通路的影响

图 5:  
Keap1 是 Nrf2 激活和 ARE 驱动的  
抗氧化基因表达的主要调节因子  
(根据参考文献 19 改编)。



应激条件（如氧化和亲电应激）和化学诱导剂导致 Nrf2 与 Keap1 分离的主要机制是 Keap1 的半胱氨酸残基被氧化。半胱氨酸的巯基可能被氧化形成二硫桥、亚硫酸、或磺酸。这些氧化还原修饰会导致 Keap1 与 Nrf2 分离，从而导致 Nrf2 稳定和核转运（19）。

Nrf2 转录活性的失调已在多种疾病的发病机制中得到描述，Nrf2/Keap1 轴已成为细胞稳态的关键调节因子。尽管 Nrf2 在调节生物过程中的重要性已经得到了充分证实和广泛的详细讨论，但人们对 Keap1 的关注却很少超出 Nrf2 活性和氧化还原传感的调控范围（20）。

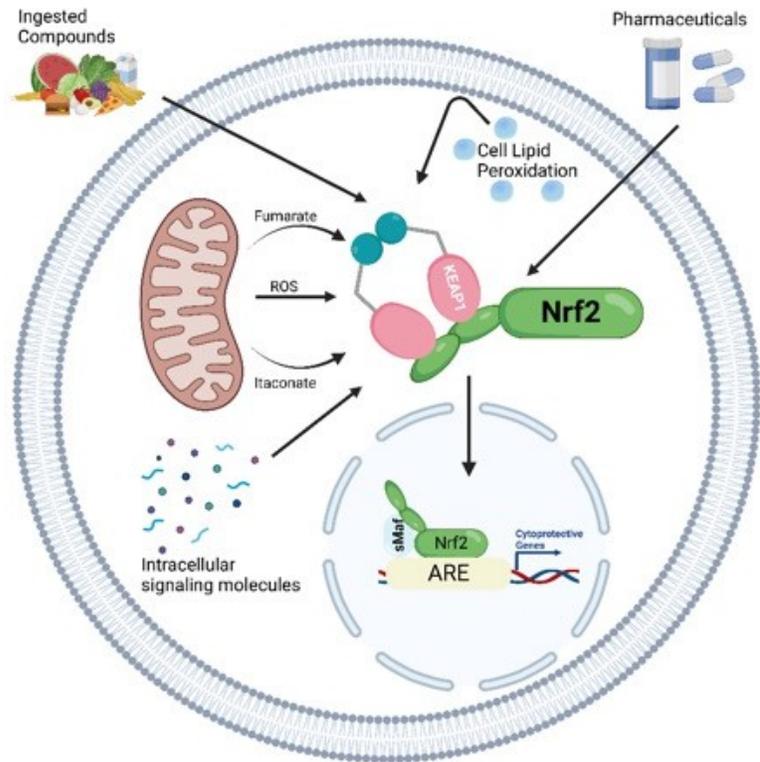
重要的是要考虑到人类饮食中含有大量可影响和激活 Nrf2 信号通路的活性化合物（52）。其中，有些甚至被认为是强效的 Nrf2 激活剂。这些天然存在的化合物会刺激各种上游激酶，干扰 Keap1-Nrf2 的相互作用和/或扰乱细胞的氧化还原平衡，从而激活 Nrf2 通路（14）。

## 氧化还原信号分子对 NRF2 通路的影响

图 6:

KEAP1-NRF2 通路将对各种细胞压力的感应与细胞保护基因表达的上调结合在一起。内源性和外源性应激分子能直接与 KEAP1 内的活性半胱氨酸残基结合，导致 NRF2 稳定化并上调细胞保护基因的表达。其细胞保护转录程序（改编自参考文献 21）。

姜黄中的姜黄素和西兰花等十字花科蔬菜中的莱菔硫烷等化合物可直接激活 Nrf2-Keap1 通路 (22)。



## Nrf2 和解毒蛋白

### 谷胱甘肽、GCLC/GCLM

1888 年，J. de Rey-Paihade 从酵母和许多动物组织的提取物以及新鲜蛋清中发现了谷胱甘肽。1921 年，霍普金斯提出，从肝脏、骨骼肌和酵母中分离出的噻硫磷是一种由半胱氨酸和谷氨酸组成的二肽，但这些作者可能由于对 Van Slyke 氨基 N 数据的误读，忽略了噻硫磷中甘氨酸的存在。为纪念发现噻硫磷的历史，霍普金斯将这种物质命名为“谷胱甘肽” (23)。谷胱甘肽又称 GSH，是细胞代谢的内源性成分，是由甘氨酸、半胱氨酸和谷氨酸组成的三肽。谷胱甘肽通过结合亲电子基团，帮助解毒，否则亲电子物可能会与蛋白质或核酸结合，导致细胞损伤和基因突变 (24)。它存在于许多组织中，浓度相对较高，谷胱甘肽在细胞中的浓度为 1-10 毫摩尔，与葡萄糖、钾和胆固醇类似，在多个生理过程中发挥关键作用，如维持氧化还原平衡、通过解毒减少氧化应激、调节免疫系统等。谷胱甘肽对氧化应激的作用使人们猜测这种分子可能对几种氧化还原失衡的慢性疾病有治疗作用 (25)。

谷胱甘肽具有多种功能，包括通过减少氧化应激和维持氧化还原平衡进行抗氧化防御、代谢解毒异种生物和外源化合物、细胞周期调节、免疫系统调节以及纤维化 (26)。它的主要作用是保护细胞大分子免受内源性和外源性活性氧 (ROS) 和氮氧的侵害。特别是，GSH 可催化氢过氧化物、过硫酸盐和脂质过氧化物解毒，并直接清除各种氧化剂分子，如超氧阴离子、羟自由基、一氧化氮和碳自由基 (26; 27)。基本上，GSH 能通过提供H+中和 ROS，并通过提供 e- 使蛋白质半胱氨酸保持活性还原形式。GSH 作为还原剂的能力取决于 GSH/GSSG 比率和谷胱甘肽总浓度，而这两个因素会受到应激条件的负面影响 (28)。GSH 可维持细胞氧化还原状态，并影响氧化还原信号转导、细胞增殖和死亡，GSH 的平衡受原始合成和 GSH 氧化还原状态的调节。因此，Nrf2 对通过 GSR 的转录调控维持 GSH 氧化还原状态和保护细胞免受氧化应激至关重要。(29)。

谷氨酸半胱氨酸连接酶 (GCL) 是一种在合成 GSH 过程中发挥关键作用的酶。GCL 的催化亚基是该酶的关键组成部分。此外，GSH 合成的第一步是由 GCL 完成的，GCL 由催化亚基 (GCLC) 和修饰亚基 (GCLM) 组成 (30)。因此，谷氨酸-半胱氨酸连接酶 (又称γ-谷氨酰胱氨酸合成酶) 是谷胱甘肽合成的第一个限速酶 (31)。

### 血红素加氧酶 1

血红素加氧酶-1 (HO-1) 是一种细胞保护性酶，能对氧化和/或炎症刺激做出反应，具有减轻氧化应激的能力。HO-1 的一个主要功能是代谢组织中因红细胞更替而积累的血红素 (32)。HO-1 是一种受 Nrf2 调节的基因，因为它是 Nrf2 的靶基因之一，在不同类型的细胞中都有显著表达 (33)。在生理平衡状态下，HO-1 在大多数细胞和组织中的表达量较低或没有表达。然而，在大多数细胞，HO-1 在应对大量的促氧化刺激时会高度上调，提供保护防止氧化损伤。

## 氧化还原信号传递

电子转移信号转导或氧化还原信号转导需要亲电子体 (能吸引电子的分子) 与亲核体 (能放弃电子的分子) 发生反应。氧化还原信号传递涉及的反应是，亲电子体带走电子，使亲核体处于更氧化的状态 (氧化反应)。在这种情况下，亲电子体被称为氧化剂 (35)。总之，通过失去或获得一个电子而发生的氧化和还原反应会引起分子结构和功能特性的变化，从而改变信号传递过程 (36)。

氧化还原信号是所有细胞正常生理的一部分，包括内皮细胞受血流刺激的生长，在缺血/再灌注损伤等病理生理反应中也发挥着重要作用。与 cAMP 等第二信使的信号转导不同，活性物种的信号转导涉及目标信号蛋白半胱氨酸残基的化学修饰，而不是与目标蛋白半胱氨酸残基的非共价结合 (35)。与氧化还原信号转导相关的事件在生理水平的氧化和亚硝酸应激下被触发，通过氧化还原传感器的去谷胱甘肽化和 GSH/GSSG 水平的提高，从暂时的失衡恢复回平衡状态 (37)。参与氧化还原信号传导的主要分子是活性氧 (ROS) (36)。ROS 或是线粒体氧化磷酸化 (有氧代谢) 过程中产生的副产物，或通过细胞信号诱导的细胞质中的 NADPH 氧化酶产生 (38)。它包括超氧阴离子、过氧化氢和羟自由基等分子，所有这些分子都具有固有的化学特性，可对不同的生物目标产生反应。ROS 通常与氧化应激有关，这提示它们会对脂质、蛋白质和 DNA 造成破坏。然而，在过去的二十年里，人们发现 ROS 也是调节生物和生理过程的信号分子。似乎在进化的早期，大自然就选择了 ROS 作为信号转导机制以适应环境中养分和氧化环境的变化。事实上，在原核生物中，存在着 ROS 直接激活转录因子以适应应激的机制 (39)。

(人乳腺 MCF7 衍生的报告细胞系) 和 HEPG2 细胞 (人肝癌、非致癌细胞系)

1- 方法

AREc32 和 HepG2 细胞的细胞培养

AREc32 细胞系是一种稳定转染的 MCF7 细胞系，它含有受八个拷贝的大鼠 Gsta2 ARE 控制的荧光素酶基因构建体。人类肝脏 HepG2 细胞具有正常人类肝细胞的许多特殊功能。这两种细胞都是在 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 澳大利亚 Thermo Fisher Scientific 公司) 中培养的，该培养基补充有 10% 的胎牛血清 (FBS, 澳大利亚 Sigma-Aldrich 公司) 和 1% 的青霉素 (澳大利亚 Sigma-Aldrich 公司)。用 0.25% 的胰蛋白酶 (澳大利亚赛默飞世尔科技公司) 消化汇合度超过 90% 的培养细胞，进行以下生物测定。

电解水溶液的制备

RSM 是通过使用纯盐和水的专利电解工艺生成并稳定的。使用适当的分析方法确定了 RSM 的存在。制备了不同的 RSM 样品，并对其进行了 Nrf2 活性筛选 (表 1)。

表 1 提供的 RSM 样本。

标签	信息
对照组	0.27% 氯化钠
V10 v1	常规, 当前 ARS, 1 号样本
V10 v2	常规, 当前 ARS, 2 号样本
V10 v3	常规, 当前 ARS, 3 号样本

氧化还原信号分子研究

一项为期 8 周的安慰剂双盲对照人体试验表明，氧化还原信号分子 (RSM) 在调节基因表达方面发挥了作用，并将其与细胞中的关键功能和重要通路联系在一起。研究显示，其中一些基因表达上调，并与关键基因的转录有关。经过转录谱分析，发现与未接受 ARS 治疗的受试者相比，有五个基因的表达量出现了显著的倍数变化：这些基因是：

KCTD12、EGR1、PYROXD1、IRAK3 和 CCR10。

有意义的是，当停止使用 RSM 后，这些基因的表达恢复正常，这表明需要继续使用这些分子来维持持续的转录谱调节。

利用 PANTHER (通过进化关系的蛋白质分析) 和 Wikipathways 对 KCTD12、EGR1、PYROXD1、IRAK3 和 CCR10 基因进行了分析，以确定它们与不同通道之间的关系。其中一些通路包括脑源性神经营养因子信号通路、人类促甲状腺激素信号通路、NRF2 通路、VEGFA- VEGFR 信号通路2 等。这些基因以及与这些基因相关的其他通道对细胞的健康和功能至关重要。

关于 Nrf2 通路，研究发现该通路负责开启和关闭基因，而这些基因是产生谷胱甘肽等保护性蛋白的必要条件，这些蛋白将对体内的有害化合物。该通路能够开启和关闭基因表达 (40; 41; 42)。

人们还了解到，Nrf2 是抗氧化反应的关键调节因子 (43; 42)，能促进细胞对抗应激的能力 (44; 45)。当这一通路被激活时，细胞就能在受到损伤时做出反应，并恢复它们的活力。因为 Nrf2 通路的激活可促进细胞稳态 (46; 47; 48)。

此外，响应 Nrf2 通路的基因参与保护细胞免受氧化应激 (43)。事实上，Nrf2 途径是参与应激适应的主要途径之一 (49; 50)。当 Nrf2 被激活时，体内会产生更多的抗氧化蛋白来对抗氧化应激。

## 在 AREc32 细胞上进行 Nrf2 荧光素酶检测

使用 AREc32 细胞对 RSM 样品进行 Nrf2 荧光素酶检测，以检查 Nrf2 的活性，其中荧光素酶的表达是通过稳定转染的 Nrf2 报告基因构建物诱导的。将能有效激活 Nrf2 的合成食品添加剂叔丁基对苯二酚 (tBHQ) 作为阳性对照。使用的对照包括电解前收集的 0.27% NaCl 混合液。

将 AREc32 细胞以  $1 \times 10^6$  个/孔的密度播种在 96 孔板中，当细胞达到 90% 的融合度时用 RSM 样品处理。24 小时后，将所有上清液转移到新的 96 孔板中进行谷胱甘肽检测。将原板中的细胞与 triton 裂解缓冲液 (20 升) 混合。室温下振荡平板 10 分钟，得到细胞裂解液，然后在  $-20^{\circ}\text{C}$  下冷冻 20 分钟。最后，收集细胞裂解液 (15 升) 并转移到 96 孔微胎盘中。在 96-WP 中加入荧光素缓冲液 (100 升)，并在 5 分钟内记录生物荧光[19]。与阴性对照组 (仅使用培养基的细胞) 相比，Nrf2 的活化以变化倍数计算。

## 细胞存活力

用阿拉玛蓝检测法监测经 RSM 样品处理 24 小时后 AREc32 细胞的存活力。此法广泛用于细胞存活力测试。去除上清液后，将 AREc32 细胞置于 100 升阿拉玛蓝染料溶液中。然后在  $37^{\circ}\text{C}$  的加湿培养箱中再培养 2 小时。使用微孔板阅读器在 545 nm 波长处测量激发光谱，在 595 nm 波长处测量发射光谱，从而确定各孔的光密度。对照组 (仅使用培养基的细胞) 的吸光度被视为细胞存活率为 100%，处理后的细胞存活率通过将吸光度与对照组进行归一化计算得出百分比。

## 利用高效液相色谱法和荧光检测法测量谷胱甘肽

按照 Steele 等人，2012 年和 Afzal 等人，2023 年的描述，对样品和标准物质中的谷胱甘肽进行了 4-氟-7-氨基磺酰基苯并呋喃 (ABD-F) 衍生化。

制备由 800 mM 半胱氨酸、50 mM 半胱氨酸-甘氨酸、同型半胱氨酸和谷胱甘肽 (GSH) 组成的标准溶液，然后用水或 DMEM 按顺序稀释 2 倍至 6 倍。将每种溶液与等体积的含 1 毫摩尔乙二胺四乙酸 (EDTA) 的 1%5-磺基水杨酸、乙二胺四乙酸 (EDTA) 混合，然后然后在  $4^{\circ}\text{C}$  下以 14,000 g 离心 10 分钟。上清液随后被转移到新的试管中，并储存在  $-80^{\circ}\text{C}$  温度下，然后用于 ABD-F 衍生反应。

将从 AREc32 细胞中收集的经过各种处理的上清液从冷冻室中取出，使其达到室温。将小瓶放入设置为 35 摄氏度的加热块中，然后加入 50 升上清液。加入 30 升 1 mM 三 (2-羧基乙基) 膦酸盐来还原硫化键，随后加入 30 升 50 mM N-乙酰半胱氨酸作为内标。然后在  $35^{\circ}\text{C}$  下孵育 5 分钟。向样品中加入 100 升硼酸盐缓冲液和 30 升 ABD-F。在加入 50 升 2 M 盐酸停止衍生反应之前，将样品在  $35^{\circ}\text{C}$  温度下再培养 10 分钟。为去除任何微粒物质，微离心瓶在  $4^{\circ}\text{C}$  下以 14,000 g 离心 5 分钟。

然后将混合溶液放入高效液相色谱 (HPLC) 小瓶中，装入 Dionex HPLC 系统的自动进样器中，该系统由 WPS-3000 自动进样器、ultimate 3000 泵、ACC-3000 自动进样器、柱室和 FLD-3100 荧光检测器组成。该系统配备了一个 Luna RP-18 端盖，由 Phenomenex 公司提供的 SecurityGuard C18 色谱柱支架中的 SecurityGuard C18 色谱柱保护。Chromleon7.0 色谱数据 Dionex 系统用于控制仪器、获取数据和量化峰面积。

## Western Blot 分析

HepG2 细胞在 T75 细胞培养瓶中生长至充盈。然后用有效浓度的培养基、50 M tBHQ、V10 v1 和 V10 v2 处理细胞，以激活 Nrf2。培养 24 小时后，以 500 mL/min 离心收集细胞颗粒。g,  $4^{\circ}\text{C}$  下离心 5 分钟。细胞颗粒与含 1% 蛋白酶抑制剂的放射免疫共沉淀测定缓冲液混合，用 Pierce™ BCA 蛋白测定试剂盒测定其浓度。用 SDS-PAGE 电泳分离每个样品中 10 mg/mL 的总蛋白，然后用 iBlot 2 凝胶转移装置将蛋白转移到 PVDF 膜上。用溶于 PBST [PBS 缓冲液加 1% 吐温 20] 的 3% 牛血清白蛋白 (BSA) 在室温下孵育膜 1 小时。膜与 GCLC、HO-1 一抗在  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。用 GAPDH 作为载荷对照。

所有这些抗体均购自细胞信号技术公司 (Cell Signaling Technology)。用 SuperSignal West Pico Plus ECL 试剂盒孵育膜上的免疫反应带，并用 iBright CL750 进行显色。使用 ImageJ 软件分析特定条带并量化其强度。

## 统计分析

使用 GraphPad Prism 9.0 软件 (美国 GraphPad 软件公司) 进行统计分析。数据以至少三次实验的平均值±平均值标准误差 (SEM) 表示。组间统计比较采用单因素方差分析和 Tukey 检验， $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2- 结果和结论

### 细胞存活力

首先对细胞存活力进行剂量反应评估，以了解 AREc32 细胞如何对不同浓度的信号分子做出反应。这就确定了 RSM 可能对细胞产生毒性的浓度，并确定了最佳剂量范围测试。

该测试评估细胞暴露于氧化还原信号分子 (V10 v1 和 V10 v2 样品) 时的存活能力和功能。结果表明，细胞存活并能在整个实验过程中保持其结构和功能的完整性。

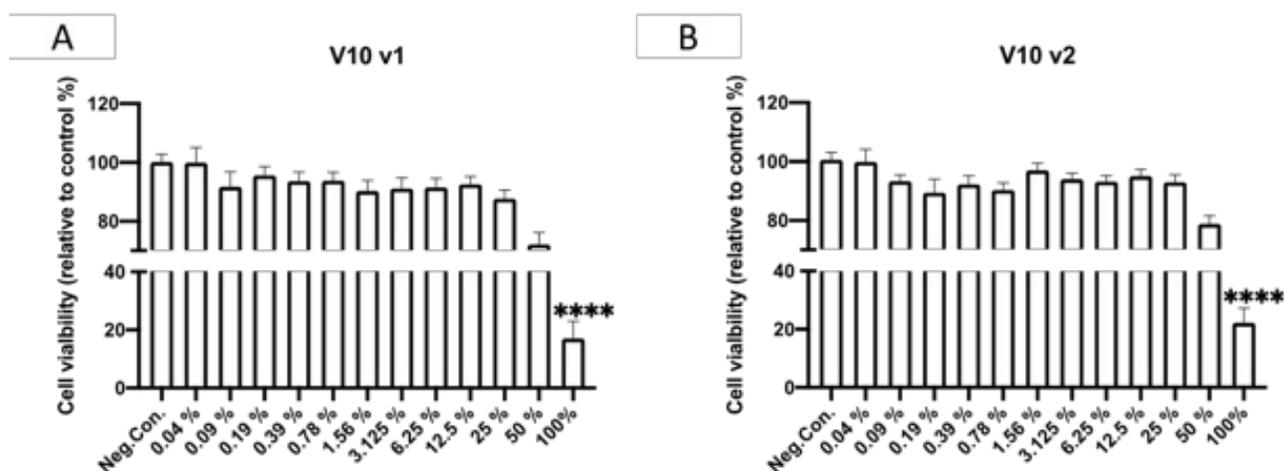


图 7:

AREc32 细胞的细胞活力 (A、B)。\*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. Blank (细胞只含培养基)，在 GraphPad Prism 9 中进行单因素方差分析。

### 激活 Nrf2

与失活细胞相比，大多数样本显示出轻度的 Nrf2 激活 (约增加 2 倍)。在用 ARS 处理的细胞中，可以观察到 Nrf2 通路有轻微但明显的活化。暴露于 RSM 的细胞显示出 Nrf2 激活的增加，这表明这种补充剂有可能通过 Nrf2 途径诱导细胞抗氧化反应，从而有助于细胞抵御氧化应激并促进细胞的整体健康。

对 V10 v2 进行了测试，将其与之前的 V10 v1 样品进行比较，以评估是否可能获得一致的结果，特别是适度的 Nrf2 激活。如图 ABC 所示，V10 v1 和 V10 v2 的 Nrf2 激活程度相当，最大 Nrf2 激活程度分别为  $1.63 \pm 0.52$  倍和  $1.69 \pm 0.80$  倍。两种溶液都不会对细胞造成明显的毒性。因此，结果是一致的。

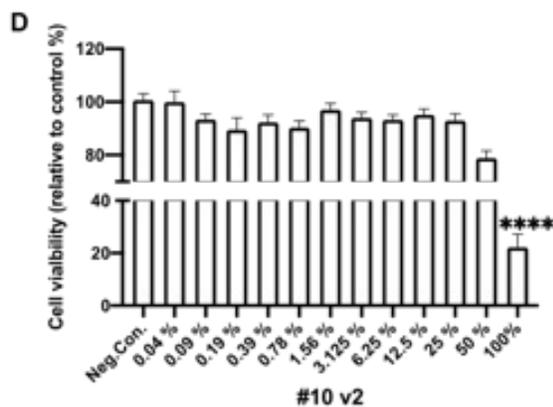
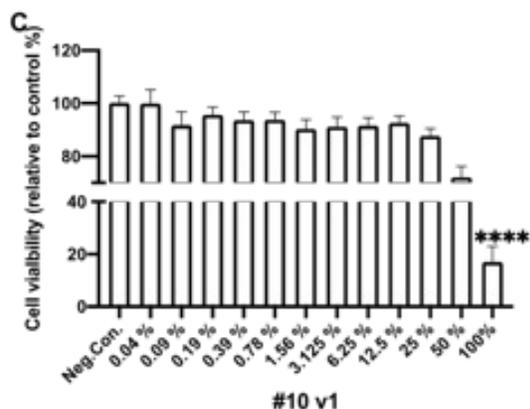
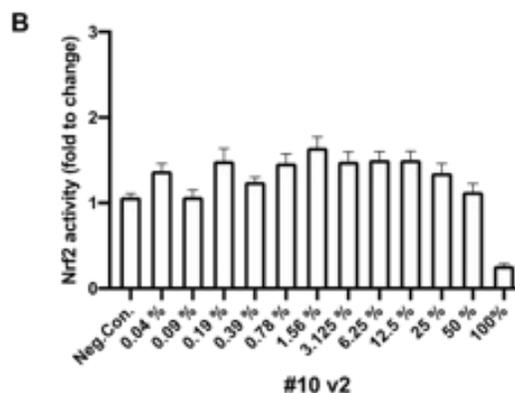
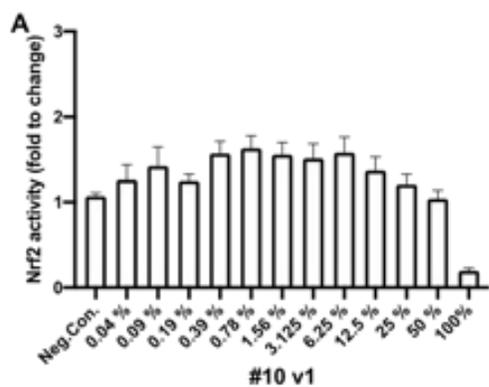
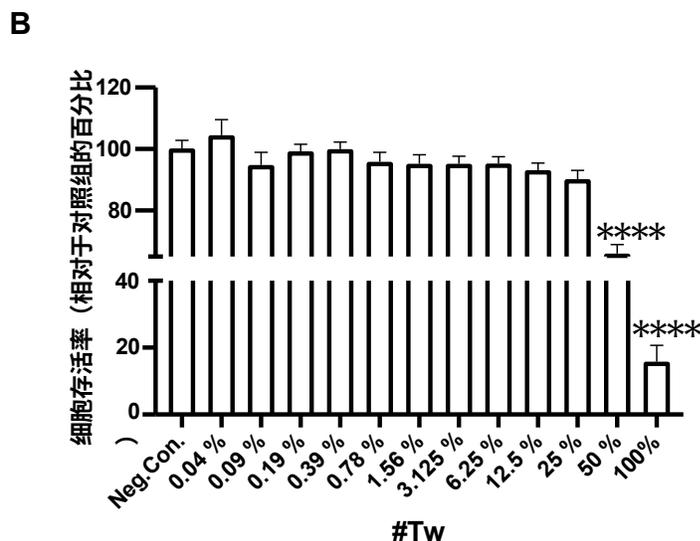
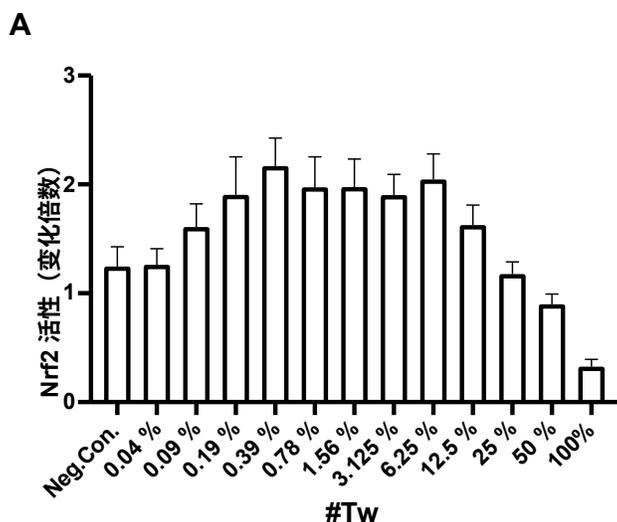


图 8:

RSM V10v1 (A) 和 V10 v2 (B) 激活的 Nrf2。细胞活力见 (C) 和 (D)。\*\*\*\* p<0.0001 vs. Blank (仅细胞和培养基)，通过 GraphPad Prism 9 的单因素方差分析。

图 9:

V10 v3 的 Nrf2 激活 (A) 和细胞活力 (B)。\*\*\*\* p<0.0001 vs. Blank (仅细胞和培养基)，通过 GraphPad Prism 9 的单因素方差分析。



此外，在另一个实验室进行的另一项研究也对样本的 Nrf2 活性进行了测试，以验证研究结果。在

总体而言，研究结果是相似的。表 2 列出了两位研究人员在 Nrf2 激活方面的详细结果和比较。

标签	NICM 的 Nrf2 成果	SOM 的 Nrf2 结果
空白	1	1
V10 v1	1.63±0.52	2.25±0.19
V10 v2	1.69±0.80	2.23±0.23
V10 v3	2.04±0.91	3.5
阳性对照	12.43 ± 2.93	16.89 ± 3.62

表 2. 国立辅助医学研究所 (NICM) 和医学院 (SOM) 的 Nrf2 最大效应 RSM。显示的结果代表 Nrf2 与对照组 (培养液中未添加任何处理剂) 相比，在使用 RSM 处理的细胞中，V10 v1、V10 v2 和 V10 v3 的 Nrf2 通路出现了轻微但明显的激活。

在表 2 中，两家不同的实验室在分析同一组样本时独立得出了相似的结果。特别是，Nrf2 活性始终出现在 V10 样本中。这些一致的发现促使我们选择这些样本进行进一步的机理实验，旨在研究 Nrf2 调节的抗氧化潜力。

V10 v1 和 V10 v2 的 Nrf2 激活程度相当，最大激活程度分别为  $1.63 \pm 0.52$  倍和  $1.69 \pm 0.80$  倍。两种溶液都不会对细胞造成明显的毒性。V10 v3 在培养基中的浓度为 6.25% 时，其激活 Nrf2 的最大值为对照组的  $2.04 \pm 0.91$  倍，但没有造成任何明显的细胞毒性。

### Nrf2 调节的 GSH 表达增加

为了研究氧化还原信号分子可能会增加 GSH 的产生，采用 HPLC 和荧光检测法测定了 AREc32 细胞中 GSH 和衍生硫醇 CysGly 的细胞外水平。使用 V10v2 激活后增加了 1.52 倍。我们还注意到，V10 v2 的半胱氨酸和 CysGly 生成量明显减少。这些结果表明，V10 v2 诱导了新陈代谢，增加了 GSH 的表达。

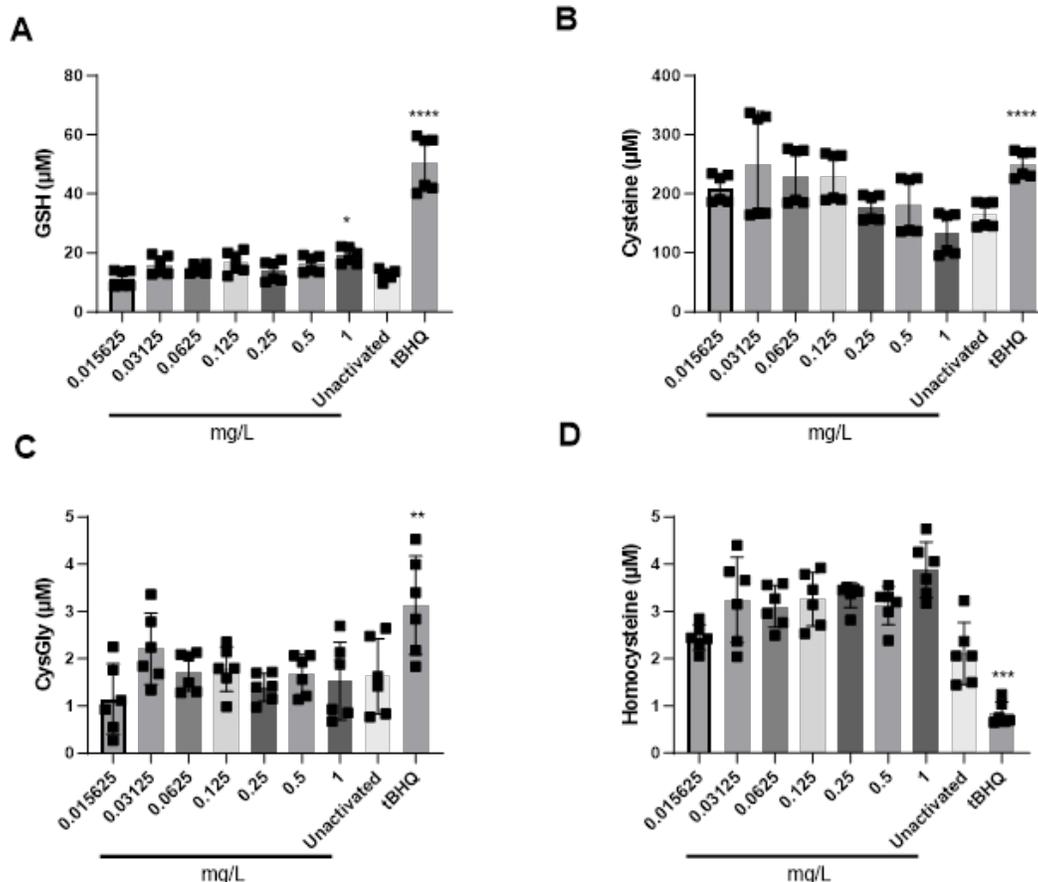


图 10:

(A) GSH、(B) 半胱氨酸、(C) cysGly 和 (D) #10v2 对 AREc32 细胞诱导的同型半胱氨酸。未激活的细胞只含培养基。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

\*\*\*\* $p < 0.0001$  与未激活细胞

Nrf2 调节的 GCLC 和 HO-1 表达量增加

作为对 Nrf2 荧光素酶活性测定的补充，还通过 Western 印迹法研究了 V10 v2 对 Nrf2 调控靶蛋白 GCLC 和 HO-1 表达的影响。这些实验使用了人肝细胞系 HepG2 细胞。HepG2 是一种人肝癌细胞系，它常用于药物代谢和肝毒性研究。

阳性对照 tBHQ (50 M) 能显著上调 GCLC 和 HO-1 的表达 (

图 11 和 12)。抗氧化蛋白表达 GCLC 的 Western 印迹分析表明，与空白对照 (阴性对照,  $p < 0.01$ ) 相比，#10 v2 表现出更高的该蛋白表达量。在

此外，V10 v2 (0.25 毫克/升) 诱导的 HO-1 显著增加，表明其抗氧化活性突出。

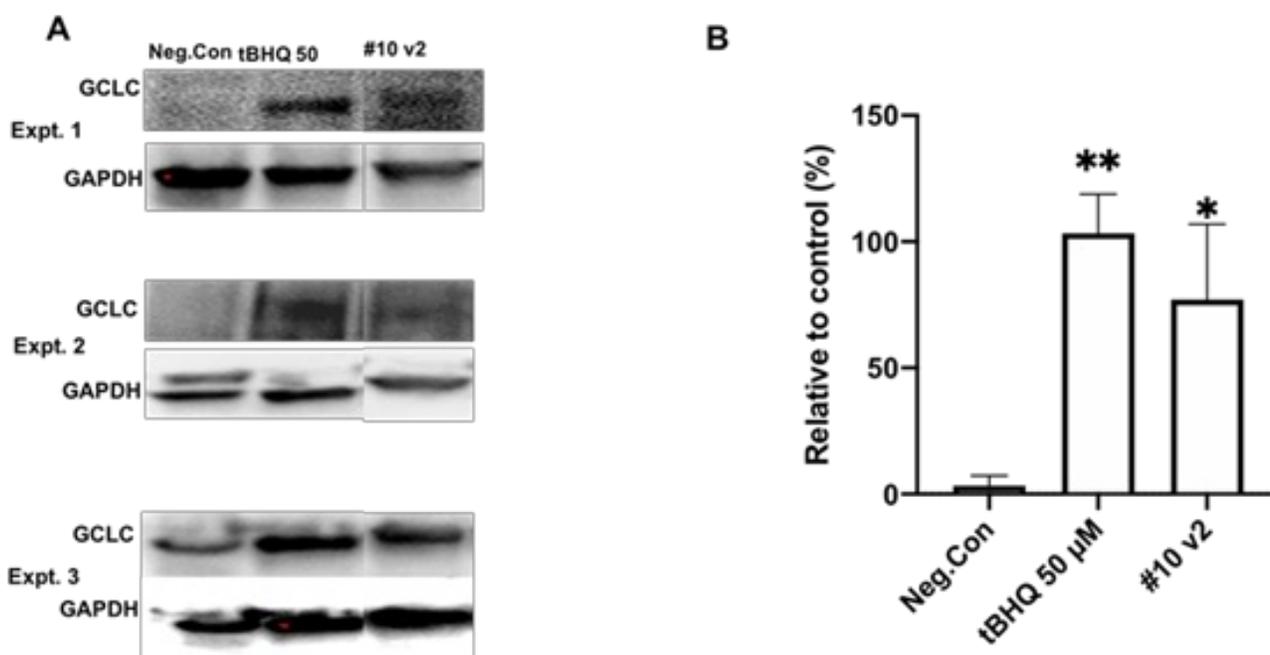


图 11:

Western 印迹分析 GCLC 蛋白表达。将 HEGP2 细胞培养在 T75 细胞培养瓶中，处理 24 小时。(A) GCLC 蛋白表达水平， $n=3$  次实验。(B) 数据由 ImageJ 分析并输入 Graphpad Prism 9。与阴性对照 (仅使用培养基的细胞) 相比，\* $p < 0.05$ ，\*\*  $p < 0.01$ 。

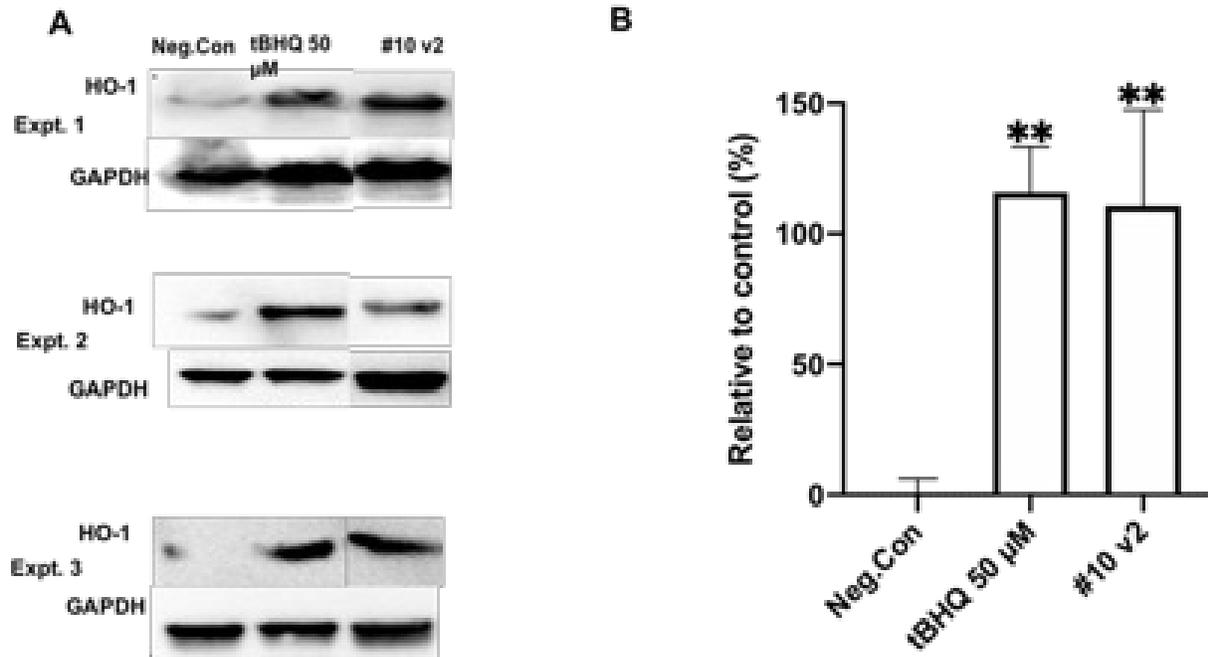


图 12:

通过 Western 印迹分析检测 HO-1 蛋白表达。将 HEGP2 细胞培养在 T75 细胞培养瓶中，处理 24 小时。(A) HO-1 蛋白表达水平，n=3 个实验。(B) 数据由 ImageJ 分析并输入 Graphpad Prism 9。与阴性对照（仅使用培养基的细胞）相比，\*p<0.05，\*\* p<0.01。

总之，与对照组相比，暴露于 ARS 的细胞显示出 GCLC 和 HO-1 的上调，这意味着它们正在提高这些蛋白质的生成速度。

GCLC 表达的增加是细胞对抗氧化应激和维持氧化还原平衡的适应性反应的一部分。GCLC 催化二肽--γ-谷氨酰半胱氨酸的形成，而γ-谷氨酰半胱氨酸是随后合成 GSH 的前体。由于 GSH 在中和氧化应激，解毒有害物质和保护细胞免受氧化应激伤害方面发挥着重要作用，因此在氧化应激增加时，

GCLC 的上调可能会作为一种保护机制，增强细胞的抗氧化能力，促进细胞存活。

HO-1 的上调可被视为对各种细胞应激源的保护性和适应性反应，其中包括氧化应激是细胞防御应激机制的一部分，有助于维持细胞平衡，促进细胞在挑战性条件下存活。

# 氧化还原信号分子在 FEK4 细胞中的功能

(人类原代包皮成纤维细胞)

## 1- 方法

### 细胞培养和 MTT 检测

FEK4 细胞培养 48 小时，15% 血清培养基过夜。用 PBS 冲洗，用 4% 多聚甲醛固定 10 分钟，用 0.1% triton 通透 15 分钟，用 2% BSA 封闭 45 分钟，用 Nrf2 多克隆抗体 (1:100) 在 0.1% BSA 溶液中 4 °C 培养过夜，然后用 Alexa fluor plus 488 (1:2000) 在 0.1% BSA 溶液中染色 45 分钟，成像前滴一滴 DAPI。

人类原代皮肤成纤维细胞 FEK4 在第 0 天播种。培养 48 小时后，更换培养基，并在培养基中以 1:1 的稀释比例加入氧化还原信号分子。在有 RSM 存在的条件下培养 24 小时后，固定细胞并用 Nrf2 抗体和核标记物 DAPI 进行免疫细胞化学分析。

### 细胞活力

MTT (3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四氮唑) 检测法是评估体外细胞活力和增殖的常用方法。简言之，在标准条件 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 下，在培养基中培养细胞 (存在或不存在 RSM)，直到细胞达到所需的融合度。移除培养基，细胞用 PBS 冲洗。向每个细胞中加入 MTT 溶液，37°C 孵育 2-4 小时。新陈代谢活跃的细胞会将 MTT 还原为甲臜。小心吸出 MTT 溶液，用二甲基亚砷 (DMSO) 代替以溶解甲臜晶体，然后用移液管上下移动以混合。混合后，用微孔板阅读器在 570 纳米波长处测量各孔的吸光度。吸光度与存活细胞的数量相关。对收集到的数据进行分析，以确定和计算存活率。

### 谷胱甘肽测定

细胞在常规培养基中培养，直至达到汇合。取出培养基，换上含有 RSM 的新鲜培养基，按 1:1 的比例加入 50M 的丁硫亚砷 (BSO)。BSO 是一种众所周知的  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶抑制剂，而  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶是合成 GSH 的第一步。培养 24 小时后，使用 Bio-Rad (布拉德福德检测法) 进行谷胱甘肽检测。布拉德福德蛋白质测定法是一种简单而准确的比色法，用于测定溶液中蛋白质 (本例中为谷胱甘肽) 的浓度。当染料与蛋白质结合时，它会转化为稳定的非质子化蓝色形式 (A<sub>max</sub>= 595nm)。使用分光光度计或微孔板阅读器在 595 纳米波长处检测的就是这种蓝色的蛋白质染料形式。

### Nrf2 激活/核转位

人原代皮肤成纤维细胞 FEK4 在标准条件 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 下播种并在培养基中培养。细胞达到所需汇合度后，在培养基中以 1:1 的稀释率加入 RSM。培养 24 小时后，移去培养基，用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞，并用甲醛固定。用 Triton X-100 使固定的细胞通透，并用 BSA 阻断非特异性结合位点。细胞与一抗 (抗-Nrf2) 孵育，然后用 PBS 冲洗，再与二抗 (抗-Nrf2) 孵育。细胞还用 DAPI 染色，以进行核定位。用装载介质将培养细胞装载到显微载玻片上，然后用荧光显微镜观察染色细胞。

## 2- 结果和结论

### 细胞存活力

MTT 检测法获得的数据显示，与未处理的对照组相比，用氧化还原信号分子以所用稀释比例对细胞进行过夜处理，并没有降低处理过的细胞的存活力 (图 13)。

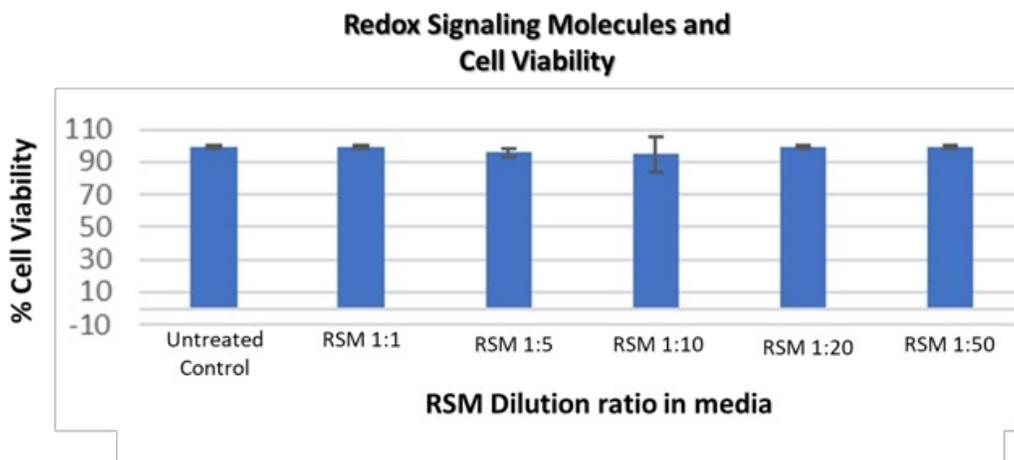


图 13: 用不同浓度氧化还原信号分子处理的细胞与未处理对照 (Ctrl) (设为 100%) 相比的细胞存活率百分比表示的数据。数据为至少 3 次独立实验的平均值 (n=3) +/- 误差条显示的标准偏差。

## 谷胱甘肽测定

与对照组相比, 暴露于氧化还原信号分子一夜的细胞显示细胞内 GSH 水平增加了 40% (与未处理的对照组相比增加了 2.3 倍)。

仅用 BSO 处理细胞会使细胞内 GSH 水平降至未处理对照成纤维细胞的 0.5 倍。

然而, 在经 BSO 处理的细胞中, 氧化还原信号分子有能力将细胞内 GSH 水平恢复到未处理对照成纤维细胞的 0.8 倍。已知 BSO 是 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的抑制剂, 而 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶是合成 GSH 的第一步。加入氧化还原信号分子后, 培养细胞中 GSH 的生成得以恢复 (图 14)。

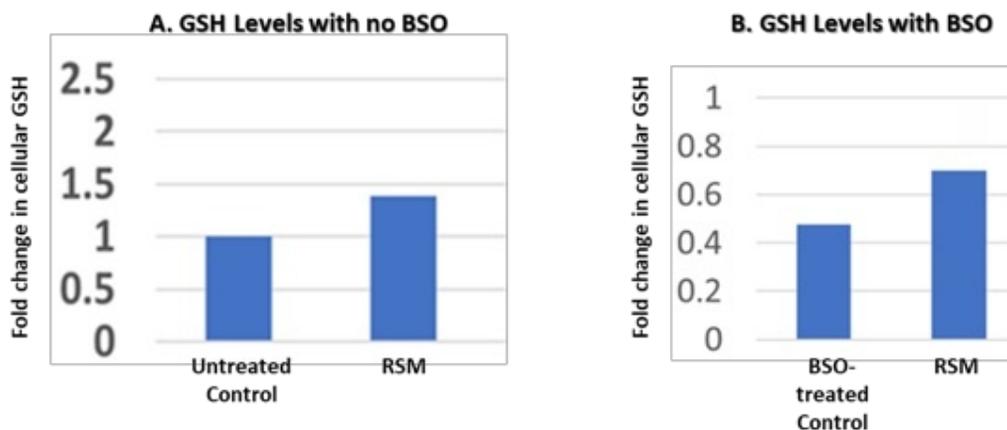


图 14: A. 与未经处理的细胞 (对照组) 相比, 暴露于氧化还原信号分子 (配方 1) 的细胞的谷胱甘肽 (GSH) 水平。B. 与经丁硫磺酰亚胺 (BSO) 和氧化还原信号分子处理的细胞相比, 经丁硫磺酰亚胺 (BSO) 和氧化还原信号分子处理的细胞的 GSH 表达量有所增加。数据校准为每毫克蛋白质中 GSH 的纳摩尔数, 然后绘制为与未经处理的对照 (Ctrl) 相比 GSH 的折叠变化 (任意设定为 1)。数据为至少 3 次独立实验 (n=3) 的平均值 +/- 误差条显示的标准偏差。

## Nrf2 转位至细胞核

图 15 显示，氧化还原信号分子能够促进 Nrf2 转位到细胞核（第 3 栏，水绿色）。

当细胞过夜暴露于处理过程中时，细胞核会着色。这些结果与氧化还原信号分子能提高细胞内 GSH 水平的强能力相符。

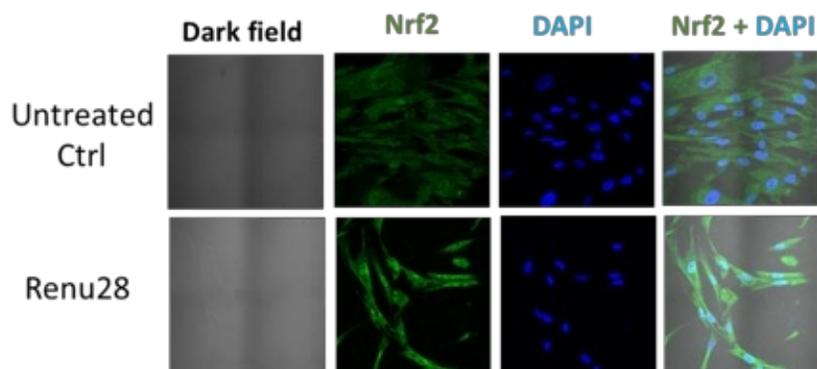


图 15: 用氧化还原信号分子 (RSM) 处理或未处理 (对照组, Ctrl) 的人原代皮肤成纤维细胞 FEK4 细胞的免疫荧光分析。

Nrf2 转位至细胞核。第 1 栏，免疫细胞化学法定位 NRF2 蛋白。

第 2 栏，用 DAPI 进行核染色。第 3 栏，NRF2 蛋白和 DAPI 的合并图像。数据代表 3 个独立实验的结果。平均荧光强度 (MFI)。用 ImageJ 软件量化 Nrf2 转位至细胞核的情况。

## RSM 和 Nrf2 - 结束语

对氧化还原信号分子 (RSM) 在 AREc32 和 HepG2 细胞以及 FEK4 细胞中的作用进行的研究，就其对保护细胞免受氧化应激的途径的影响得出了深刻的发现。实验让人们了解了 Nrf2 细胞对 RSM 的反应，还证明了 RSM 上调细胞谷胱甘肽生成的能力。

结果表明，V10 中含有的 RSM 能诱导 AREc32 和 HepG2 细胞中 Nrf2 通路发生轻微但明显的活化，有助于细胞抵御氧化应激。经独立实验室验证，不同批次样品的 Nrf2 激活效果一致，这增强了我们研究结果的可靠性。此外，对 Nrf2 调节的抗氧化潜能的研究发现，GCLC 和 HO-1 的表达增加，这表明细胞适应性反应增强了抗氧化能力 (43)。此外，我们的研究还扩展到了 FEK4 细胞，在这些细胞中，氧化还原信号分子没有显示出细胞毒性或对细胞活力的负面影响。

结果表明，RSM 能够在 BSO 处理后增加和/或恢复细胞内谷胱甘肽水平，并促进 Nrf2 转位至细胞核。这些观察结果表明，RSM 具有支持细胞健康和抗氧化防御机制的潜力。

从不同的细胞系和检测方法中获得的积极结果为氧化还原信号分子对细胞功能的多方面影响提供了一个全面的视角。这些发现将越来越多地有助于进一步了解氧化还原信号领域的知识，并为进一步研究揭示 RSM 对细胞应激反应的基本途径铺平道路。

这些研究表明一致和大有希望的结果，连接了 RSM 的作用与细胞复原力和抗氧化防御之间的关系。事实上，这项研究可能会为未来的研究奠定基础，并有可能开发出细胞健康和氧化应激管理的创新方法。

## 参考书目

1. Andrews NC, Erdjument-Bromage H, Davidson MB, Tempst P, Orkin SH. 红细胞转录因子 NF-E2 是一个造血特异性碱性亮氨酸拉链蛋白。Nature.1993 Apr 22;362(6422):722-8.Doi: 10.1038/362722a0.PMID: 8469283.
2. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW.NF-E2相关因子2 (Nrf2) 的分离, NF-E2相关因子2是一种类似于NF-E2的基本亮氨酸拉链转录激活因子, 能与 $\beta$ -球蛋白基因座控制区的串联NF-E2/ AP1重复结合。项目 Natl Acad Sci U S A. 1994 Oct 11;91(21):9926-30.DOI: 10.1073/pnas.91.21.9926.PMID: 7937919; PMCID: PMC44930.
3. Zgorzynska E, Dziedzic B, Walczewska A. An Overview of the Nrf2/ARE Pathway and Its Role in Neurodegenerative Diseases.2021 年 9 月 4 日; 22 (17) : 9592。PMID: 34502501; PMCID: PMC8431732.
4. 自由基、抗氧化剂和功能食品: 对人类健康的影响。Doi: 10.4103/0973- 7847.70902.PMID: 22228951; PMCID: PMC3249911.
5. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/nrf2>
6. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond.2020 Jul 6;21(13):4777. Doi: 10.3390/ijms21134777.PMID: 32640524; PMCID: PMC7369905.
7. Huang Y, Li W, Su ZY, Kong AN.Nrf2 通路的复杂性: 超越抗氧化反应。J Nutr Biochem.2015 Dec;26(12):1401-13. Doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.08.001.Epub 2015 Aug 8.PMID: 26419687; PMCID: PMC4785809.
8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9817#:~:text=Keap1>
9. Baird L, Yamamoto M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway.2020 Jun 15;40(13):e00099-20. DOI: 10.1128/MCB.00099-20.PMID: 32284348; PMCID: PMC7296212.
10. Yamamoto M, Kensler TW, Motohashi H..KEAP1-NRF2 系统: 基于硫醇的维持氧化还原平衡的传感器-执行器装置。Physiol Rev. 2018 Jul 1;98(3):1169-1203. Doi: 10.1152/physrev.00023.2017.PMID: 29717933; pmcid: pmc9762786.

11. Matsumaru D, Motohashi H.健康老化和长寿中的 KEAP1-NRF2 系统》。抗氧化剂 (巴塞尔)。Doi: 10.3390/antiox10121929.PMID: 34943032; PMCID: PMC8750203.
12. Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD.Nrf2在癌症中的双重作用。DOI: 10.1016/j.phrs.2008.09.003.Epub 2008 Sep 13.PMID: 18838122; PMCID: PMC2652397.
13. Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. The Keap1- 癌症中的 Nrf2 系统: 应激反应和合成代谢。Front Oncol.2012 Dec 26;2:200. doi: 10.3389/ fonc.2012.00200.PMID: 23272301; PMCID: PMC3530133.
14. Huang Y, Li W, Su ZY, Kong AN.Nrf2 通路的复杂性: 超越抗氧化反应。J Nutr Biochem.2015 Dec;26(12):1401-13. Doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.08.001.Epub 2015 Aug 8.PMID: 26419687; PMCID: PMC4785809.
15. Cheng D, Wu R, Guo Y, Kong AN.Keap1-Nrf2信号传 导的调控: 表观遗传学的作用。Curr Opin Toxicol.2016 Dec;1:134-138. Doi: 10.1016/j.cotox.2016.10.008.Epub 2016 Nov 5.PMID: 29057383; PMCID: PMC5645054.
16. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA.Nrf2的转录调控。 Antioxid Redox Signal.2018 Dec 10;29(17):1727-1745. Doi: 10.1089/ars.2017.7342.Epub 2017 Oct 20.PMID: 28899199; PMCID: PMC6208165.
17. Sihvola V, Levonen AL.Keap1 作为抗氧化反应的氧化还 原传感器。2017 Mar 1;617:94-100. Doi: 10.1016/j.abb.2016.10.010.Epub 2016 Oct 18. PMID: 27769838.
18. Robledinos-Antón N, Fernández-Ginés R, Manda G、Cuadrado A. NRF2 的激活剂和抑制剂: 临床开发 潜力综述。氧化医学细胞 Longev.2019 Jul 14;2019:9372182. doi: 10.1155/2019/9372182.PMID: 31396308; PMCID: PMC6664516.
19. Li R, Jia Z, Zhu H.Nrf2 信号的调控。React Oxyg Species (Apex).2019 Nov;8(24):312-322.PMID: 31692987; PMCID: PMC6830569.
20. Kopacz A, Kloska D, Forman HJ, Jozkowicz A, Grochoj-Przeczek A. Beyond repression of Nrf2: An update on Keap1.Free Radic Biol Med.DOI: 10.1016/j.

From Pb-Induced ROS Injury in Leaves and Roots of Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.).Doi: 10.3389/fpls.2020.00412.PMID: 32351527; PMCID: PMC7176022.

- freeradbiomed.2020.03.023.Epub 2020 Mar 28.PMID: 32234331; pmcid: pmc7732858.
21. Baird L, Yamamoto M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway.2020 Jun 15;40(13):e00099-20. DOI: 10.1128/MCB.00099-20.PMID: 32284348; PMCID: PMC7296212.
  22. Houghton CA, Fassett RG, Coombes JS. 绿藻素和其他营养基因组 Nrf2 激活剂: 临床医生的期望能否与现实相匹配? Oxid Med Cell Longev.2016;2016:7857186. doi: 10.1155/2016/7857186.Epub 2016 Jan 6.PMID: 26881038; PMCID: PMC4736808.
  23. Alanazi AM, Mostafa GA, Al-Badr AA. 谷胱甘肽。 Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol.2015;40:43-158. doi: 10.1016/bs.podrm.2015.02.001.Epub 2015 Mar 31.PMID : 26051685.
  24. Shayne C. Gad. 谷胱甘肽编辑: Philip Wexler. 毒理学百科全书》(第四版)。学术出版社。2024.第 1001-1002 页。ISBN 9780323854344. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00478-4>.
  25. Santacroce G、Gentile A、Soriano S、Novelli A、Lenti MV、Di Sabatino A. 《谷胱甘肽: 药理学方面以及对非酒精性脂肪肝临床应用的影响》。前沿医学(洛桑)。DOI: 10.3389/fmed.2023.1124275.PMID: 37035339; PMCID: PMC10075255。
  26. Pizzorno J. Glutathione! Integr Med (Encinitas).2014 Feb;13(1):8-12.PMID: 26770075; PMCID: PMC4684116.
  27. Lee DH, Jacobs DR Jr. Hormesis and public health: can glutathione depletion and mitochondrial dysfunction due to very low-dose chronic exposure to persistent organic pollutants be mitigated? J Epidemiol Community Health. 2015 Mar;69(3):294-300. doi: 10.1136/jech-2014-203861.电子版 2014 年 9 月 30 日。PMID: 25271248.
  28. Khan M, Samrana S, Zhang Y, Malik Z, Khan MD, Zhu S. Reduced Glutathione Protects Subcellular Compartments

- Radic Biol Med.2009 Feb 15;46(4):443-53. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.040.Epub 2008 Nov 5.PMID: 19028565; pmcid: pmc2634824.
30. Franklin CC, Backos DS, Mohar I, White CC, Forman HJ, Kavanagh TJ.谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基和修饰亚基的结构、功能和翻译后调控。Mol Aspects Med.doi: 10.1016/j.mam.2008.08.009.Epub 2008 Sep 6.PMID: 18812186; PMCID: PMC2714364.
31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2729>
32. A.G. Osman, A.G. Chittiboyina, I.A. Khan.第三章 - 膳食植物化学物质通过诱导第二阶段和抗氧化酶对癌症发展的细胞保护作用。编辑: J.C. Fishbein、J.M. Heilman。分子毒理学 进展》。爱思唯尔。第 10 卷。2016。第 99-137 页。ISSN 1872-0854.ISBN 9780128047002。  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804700-2.00003-9>。
33. Araujo JA、Zhang M、Yin F.血红素加氧酶-1、氧化、炎症和动脉粥样硬化。Front Pharmacol.doi: 10.3389/fphar.2012.00119.PMID: 22833723; PMCID: PMC3400084.
34. Campbell NK、Fitzgerald HK、Dunne A.《抗氧化剂血氧合酶 1 对炎症的调节》。Nat Rev Immunol.DOI: 10.1038/s41577-020-00491-X.Epub 2021 Jan 29.PMID: 33514947.
35. Forman HJ, Ursini F, Maiorino M. 氧化还原信号传导机制概述。J Mol Cell Cardiol.2014 Aug;73:2-9. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.018.Epub 2014 Feb 8.PMID: 24512843; PMCID: PMC4048798.
36. Lee MY, Griendling KK.氧化还原信号、血管功能和高血压。抗氧化氧化还原信号》。2008 Doi: 10.1089/ars.2007.1986.PMID: 18321201; PMCID: PMC2828811.
37. Zhang J, Grek C, Ye ZW, Manevich Y, Tew KD, Townsend DM.Adv Cancer Res. 2014;122:143-75. Doi: 10.1016/B978-0-12-420117-0.00004-9.PMID: 24974181; PMCID: PMC5079281.
38. Sinenko SA, Starkova TY, Kuzmin AA, Tomilin AN.干细胞中活性氧的生理信号功能: 从苍蝇到人类。Doi: 10.3389/fcell.2021.714370.PMID: 34422833; pmcid: pmc8377544.

39. Schieber M, Chandel NS. 氧化还原信号转导和氧化应激中的 ROS 功能。Curr Biol. 62. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.PMID: 24845678; PMCID: PMC4055301.
40. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond.2020 Jul 6;21(13):4777. Doi: 10.3390/ijms21134777.PMID: 32640524; PMCID: PMC7369905.
41. K.M. Kim, S.H. Ki.第 28 章 - Nrf2: 肝脏疾病中氧化还原信号的关键调节器。责任编辑: Pablo Muriel.《肝脏病理生理学》。学术出版社。2017.第 355-374 页。ISBN 9780128042748.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804274-8.00028-X>.
42. nrf2 在氧化应激和毒性中的作用Annu Rev Pharmacol Toxicol.2013;53:401-26. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320.PMID: 23294312; PMCID: PMC4680839.
43. Vomund S, Schäfer A, Parnham MJ, Brüne B, von Knethen A. Nrf2, the Master Regulator of Anti-Oxidative Responses.Int J Mol Sci. 2017 Dec 20;18(12):2772. doi: 10.3390/ijms18122772.PMID: 29261130; PMCID: PMC5751370.
44. Kreß JKC、Jessen C、Hufnagel A、Schmitz W、Xavier da Silva TN、Ferreira Dos Santos A、Mosteo L、Goding CR、Friedmann Angeli JP、Meierjohann S. 综合应激反应效应因子 ATF4 是 NRF2 的强制性代谢活化剂。Doi: 10.1016/j.celrep.2023.112724.PMID: 37410595.
45. Zhang JC, Yao W, Dong C, Han M, Shirayama Y, Hashimoto K.Keap1-Nrf2信号通路赋予对无法逃避的电应激的恢复力和易感性。Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.2018 Dec;268(8):865-870. doi: 10.1007/s00406-017-0848-0.Epub 2017 Nov 8.PMID: 29119264.
46. Kerins MJ, Ooi A. The Roles of NRF2 in Modulating Cellular Iron Homeostasis.Antioxid Redox Signal.2018 Dec 10;29(17):1756-1773. Doi: 10.1089/ars.2017.7176.Epub 2017 Sep 21.PMID: 28793787; PMCID: PMC6208163.
47. Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, Park BK.Nrf2细胞防御途径: 依赖和不依赖 Keap1 的调节机制。《生化药理学》。2013 Mar 15;85(6):705-17. Doi: 10.1016/j.bcp.2012.11.016.Epub 2012 Dec 5.PMID: 23219527.

48. Petsouki E, Cabrera SNS, Heiss EH. AMPK 和 NRF2: 细胞稳态同一团队中的互动参与者? Free Radic Biol Med. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.07.014. Epub 2022 Jul 31. PMID: 35918013.
49. Calabrese EJ, Kozumbo WJ. 激素剂量反应机制: Nrf2 激活。 Doi: 10.1016/j.phrs.2021.105526. Epub 2021 Mar 2. PMID: 33667690.
50. Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, Marinari UM, Domenicotti C, Traverso N. Hormesis and Oxidative Distress: 活性氧的病理生理学与抗氧化剂调节和补充的未决问题》。《抗氧化剂》(巴塞尔)。 Doi: 10.3390/antiox11081613. PMID: 36009331; PMCID: PMC9405171.
51. Ngo V, Duennwald ML. Nrf2 与氧化应激: 人类疾病的机制和影响概览》。《抗氧化剂》(巴塞尔)。 2022年11月27日; 11 (12) : 2345。  
doi: 10.3390/antiox11122345. PMID: 36552553; PMCID: PMC9774434.
52. Zhao F, Ci X, Man X, Li J, Wei Z, Zhang S. Food-Derived Pharmacological Modulators of the Nrf2/ARE Pathway: 它们在疾病治疗中的作用。《分子》。 DOI: 10.3390/molecules26041016. PMID: 33671866; PMCID: PMC7918973.