

Nrf2通路活化在胆红素脑病新生大鼠海马神经元损伤中的作用*

刘龙宾, 唐丽霞, 林新祝, 李雅丹

厦门大学附属妇女儿童医院(厦门市妇幼保健院) 新生儿科(厦门 361003)

【摘要】目的 探讨核因子NF-E2相关因子(nuclear factor-erythroid 2-related factor, Nrf2)通路活化对胆红素脑病新生大鼠海马神经元损伤的影响。**方法** 将新生SD大鼠随机分为对照组、模型组和Nrf2激活剂丁基对苯二酚(*tert*-Butylhydroquinone, TBHQ)组, 每组20只。经小脑延髓池注射胆红素溶液, 建立新生大鼠胆红素脑病模型, 观察大鼠神经行为变化, 并测定脑组织含水量; 采用尼式(Nissl)染色观察海马神经元损伤; TUNEL染色观察海马神经元凋亡情况; 比色法检测海马组织Caspase-3活性; 化学法检测海马组织丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性; qRT-PCR和Western blot检测海马组织Nrf2和血红素氧合酶1(heme oxygenase-1, HO-1)mRNA和蛋白表达水平。**结果** 小脑延髓池注射胆红素后模型组和TBHQ组幼鼠出现不同程度神经异常行为表现, 而对照组幼鼠无明显神经异常行为。与对照组比较, 模型组幼鼠神经元损伤严重, 脑组织含水量以及海马神经元凋亡水平、Caspase-3活性以及MDA含量升高($P<0.01$), 而SOD活性、GSH含量以及Nrf2和HO-1 mRNA和蛋白表达水平降低($P<0.05$); 与模型组比较, TBHQ组幼鼠神经元损伤得到改善, 脑组织含水量、海马神经元凋亡水平、Caspase-3活性以及MDA含量均降低($P<0.01$), 而SOD活性、GSH含量以及Nrf2和HO-1 mRNA和蛋白表达水平升高($P<0.05$)。**结论** Nrf2通路活化能改善胆红素脑病新生大鼠海马神经元损伤, 抑制神经元凋亡和机体氧化反应。

【关键词】 胆红素脑病 海马神经元损伤 Nrf2通路 细胞凋亡

The Role of Nrf2 Pathway Activation in Hippocampal Neuron Injury of Neonatal Rats with Bilirubin Encephalopathy LIU Long-bin, TANG Li-xia, LIN Xin-zhu, LI Ya-dan. Department of Neonatology, Affiliated Women and Children's Hospital of Xiamen University/Xiamen City Women and Children's Hospital, Xiamen 361003, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) pathway activation on hippocampal neuron damage in neonatal rats with bilirubin encephalopathy. **Methods** Neonatal rats were randomly assigned to a control group (Control), a model group (Model) and an Nrf2 activator TBHQ (*tert*-Butylhydroquinone) group (TBHQ), with 20 rats in each group. Bilirubin solution was injected through the cerebellomedullary cistern to establish the neonatal rat model of bilirubin encephalopathy. Neurobehavioral changes were observed in rats and the water content of the brain tissue was measured. Nissl staining was done to observe the damage of hippocampal neurons. TUNEL staining was used to observe the apoptosis of hippocampal neurons. Colorimetric analysis was done to determine the Caspase-3 activity in the hippocampus. The content of malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in the hippocampus were examined by chemical analysis. qRT-PCR and Western blot were done to measure the expression of Nrf2 and heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA and proteins in the hippocampus. **Results** After injection of bilirubin into the cerebellomedullary cistern, the young rats in the Model group and the TBHQ group showed different degrees of neurological abnormalities, while those in the control group showed no significant neurobehavioral abnormalities. Compared with the Control group, the Model group had severe neuronal damage, and the water content of brain tissue, the apoptosis of hippocampal neurons, the activity of Caspase-3 and the content of MDA content significantly increased ($P<0.01$), while the SOD activity, GSH content, the expression of Nrf2 and HO-1 mRNA and proteins significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the Model group, neuronal damage was improved in the TBHQ group, and the water content of brain tissue, apoptosis of hippocampal neurons, activity of Caspase-3 and MDA content were all significantly reduced ($P<0.01$), while SOD activity, GSH content and the expression of Nrf2 and HO-1 mRNA and proteins were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** Activation of the Nrf2 pathway can improve hippocampal neuronal damage in neonatal rats with bilirubin encephalopathy and inhibit neuronal apoptosis and the oxidation reaction.

【Key words】 Bilirubin encephalopathy Hippocampal neuronal injury Nrf2 pathway Apoptosis

高胆红素血症是新生儿的常见病, 是由血清高水平的非结合胆红素(unconjugated bilirubin, UCB)引起的^[1]。血液中高浓度的UCB容易穿过血脑屏障并损害神经元,

导致神经功能障碍甚至死亡^[2]。在哺乳动物中, 胆红素在生理浓度下主要起抗氧化作用^[3]。但在某些情况下, 高水平的UCB会引起严重的不良反应, 其中最易受损的部位是中枢神经系统, 会产生多种神经功能缺损, 临床也称为

* 厦门市科技计划重大专项基金项目(No. 3502Z20171006)资助

胆红素脑病^[4]。但胆红素诱导的脑部区域细胞损伤的分子机制尚不清楚。氧化应激(oxidative stress, OS)与多种神经系统疾病的发展相关。过多的UCB通过破坏细胞和线粒体膜、诱导髓磷脂碱性蛋白的丢失、产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)导致氧化性DNA氧化损伤并激活Caspase-3, 促进细胞凋亡^[5]。尽管UCB诱导的神经毒性机制尚不十分清楚, 但UCB诱导的氧化应激和细胞凋亡可能会造成相当严重的神经损伤^[6]。核因子NF-E2相关因子(nuclear factor erythroid 2-related factor, Nrf2)是OS的主要细胞传感器, 主要对细胞氧化还原状态的变化产生反应。Nrf2激活的一个主要特征是胞质中Nrf2游离至细胞核中诱导其靶基因如血红素氧合酶1(heme oxygenase, HO-1)表达上调。研究发现, Nrf2通过抗氧化机制保护小胶质细胞免受脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的神经炎症和神经毒性^[7]。但Nrf2是否对胆红素诱导的神经损伤也具有保护作用还未有研究报道。因此, 本研究通过构建胆红素脑病新生大鼠模型, 探讨Nrf2通路活性对胆红素诱导的神经元损伤的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级SD成年健康大鼠30只, 7~8周龄, 体质量(250±30)g, 购自湖南省动物实验中心, 动物合格证编号: SCXK(湘)2019-0023。按照雌雄比例1:1合笼饲养, 确定雌鼠怀孕后立刻单笼饲养, 足月自然分娩后, 新生大鼠由母鼠喂养至7d。动物实验按照我国《实验动物福利伦理审查指南(GB/T 35892-2018)》要求, 规范落实实验动物福利伦理。

1.2 主要试剂和仪器

胆红素(纯度>98%, 易溶于氯仿、苯、酸水溶液等)购自美国Sigma公司; Nrf2激活剂特丁基对苯二酚(tert-Butylhydroquinone, TBHQ)(纯度>98%, 易溶于DMSO, 溶解度56.66 mg/mL)购自美国Med Chem Express公司; Caspase-3活性检测试剂盒(比色法)、丙二醛(MDA)检测试剂盒、还原型谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒和超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒均购自北京雷根生物技术有限公司; Nissl染色液购自北京索莱宝科技有限公司; 逆转录试剂盒和荧光定量PCR试剂盒均购自大连宝生物工程公司; 细胞核蛋白抽提试剂盒、TUNEL细胞凋亡检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 兔抗人HO-1抗体和Histone 3H抗体购自美国Cell Signaling Technology公司; 兔抗人Nrf2抗体和 β -actin抗体均购自英国Abcam公司; BX51显微镜购

自日本OLYMPUS; RM2235切片机购自德国Leica; Mk3酶标仪购自芬兰雷达; LightCycler 480荧光定量PCR仪购自瑞士罗氏公司。

1.3 方法

1.3.1 动物造模及分组 将出生7d的60只新生幼鼠, 按照随机数字表法分成对照组、模型组和Nrf2激活剂TBHQ组(TBHQ组), 每组20只。常规麻醉幼鼠, 先用微量注射器从小脑延髓池抽取20 μ L脑脊液, 防止颅内高压。然后再用微量注射器向模型组和TBHQ组幼鼠小脑延髓池中注射20 μ L胆红素溶液(20 μ g/g)^[8], 对照组注射20 μ L生理盐水。TBHQ组幼鼠在注射胆红素前1d和1h分别给予腹腔注射20 mg/kg TBHQ^[9]。

1.3.2 神经行为学观察 在造模后0~6h、9~12h、21~24h观察幼鼠一般情况和神经行为改变。一般情况主要包括幼鼠的精神状态、呼吸、心率、运动情况。神经行为改变包括是否出现吃奶困难、俯伏、侧卧、转圈、爬行不稳和四肢颤动等。

1.3.3 脑组织含水量检测 造模24h后, 每组各取8只幼鼠, 断头取脑组织称重, 然后置于电热恒温干燥箱中干燥24h至恒重, 称干重。脑组织含水量(%)=(湿重-干重)/湿重 \times 100%。

1.3.4 Nissl染色观察海马神经元损伤 造模24h后, 常规麻醉幼鼠, 剪开胸部, 暴露心脏, 剪开右心耳, 将预备的生理盐水注入左心室灌流至肺部灰白, 然后用多聚甲醛灌流至小鼠僵硬。断头取脑, 分离海马区, 置于多聚甲醛固定24h后, 常规方法进行石蜡包埋, 用切片机将石蜡块切成10 μ m厚度的薄片。脱蜡入水, 加入甲基紫染色液染色15 min, 蒸馏水冲洗后, 加入Nissl Differentiation分化8 s, 消除染色。用无水乙醇脱水, 二甲苯充分透明后, 中性树脂封片, 在显微镜下拍照观察, 使用Image J软件统计切片组织中尼氏小体数量, 根据海马区尼氏小体数量来判断神经元损伤情况。

1.3.5 TUNEL染色观察海马神经元凋亡情况 取上述实验中制备的海马区石蜡切片, 二甲苯脱蜡, 浓度梯度乙醇水合后, 用PBS冲洗3次。加入20 μ g/mL蛋白酶K工作液覆盖切片, 置于37 $^{\circ}$ C反应20 min, PBS冲洗3次。加入100 μ L TdT反应混合物覆盖切片, 37 $^{\circ}$ C反应1 h, PBS漂洗2次。然后将石蜡切片浸入含3% H_2O_2 的封闭液中5 min, PBS漂洗2次。加入辣根过氧化物酶标记的链霉素亲和素复合物室温孵育30 min, PBS漂洗2次。滴加二氨基联苯胺(DAB)溶解液显色至浅棕色后, 用去离子水冲洗, 封固玻片, 在光学显微镜下观察染色, 细胞核呈棕色为阳性细

胞,即凋亡细胞。每组切片观察5个随机视野,每个视野计数100个细胞,细胞凋亡率(%)=阳性细胞数量/总细胞数量。

1.3.6 比色法检测海马组织Caspase-3活性 取10 mg大鼠海马区组织,加入200 μ L裂解液中,冰浴匀浆裂解后,4 $^{\circ}$ C 16 000 \times g离心10 min取上清。根据Caspase-3活性检测试剂盒说明书,取10~15 μ L待测样品上清加入96孔板反应体系(100 μ L),孵育至肉眼可见溶液颜色发生变化,即可上酶标仪检测405 nm波长处吸光度值(A_{405} 值),再根据标准曲线计算Caspase-3活性。

1.3.7 化学法检测海马组织MDA和GSH含量及SOD活性 取20 mg海马组织,按1:9比例加入4 $^{\circ}$ C生理盐水制备组织匀浆液,取上清。根据MDA、GSH和SOD检测试剂盒操作步骤,制备检测反应体系,用酶标仪检测各自对应波长处的吸光值,计算海马组织MDA和GSH含量及SOD活性。

1.3.8 qRT-PCR法检测Nrf2和HO-1 mRNA表达水平 取50 mg海马组织,加1 mL预冷的Trizol试剂充分研磨至匀浆,4 $^{\circ}$ C 12 000 \times g离心10 min取上清。经三氯甲烷、异丙醇抽提组织总RNA,按逆转录试剂盒说明书将总RNA逆转录成cDNA,再按荧光定量PCR试剂盒操作方法,以cDNA为模板进行扩增。PCR引物序列,Nrf2 forward: 5'-GACCTAAAGCACAGCCAACACAT-3', reversed: 5'-CTCAATCGGCTTGAATGTTTGTGTC-3'; HO-1 forward: 5'-TGTCCCAGGATTTGTCCGAG-3', reversed: 5'-ACTGGGTTCTGCTTGTTCGCT-3'; β -actin forward: 5'-ATGAAGTGTGACGTTACGC-3', reversed: 5'-CCTAGAAGCATTTCGCGTGCAC-3'。PCR扩增反应程序:预变性95 $^{\circ}$ C,10 min;40次循环95 $^{\circ}$ C,15 s,58 $^{\circ}$ C,30 s;72 $^{\circ}$ C延伸40 s。最后根据所得Ct值,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因mRNA的相对表达量。

1.3.9 Western blot法检测核蛋白Nrf2和全蛋白HO-1表达水平 取50 mg海马组织,液氮碾碎脑组织,加入

RIPA全蛋白裂解液或细胞核蛋白抽提液,冰浴裂解30 min后,4 $^{\circ}$ C 12 000 \times g离心20 min,取上清得到全蛋白或核蛋白溶液,利用BCA分析法对蛋白进行定量。取25 μ g蛋白,加入上样buffer后,沸水变性5 min,用10%SDS-PAGE分离蛋白质并转移到PVDF膜,然后在室温下用5%脱脂牛奶封闭1 h,然后用兔抗Nrf2(1:1 000)、兔抗HO-1(1:1 000)、 β -actin(1:2 000)和核内Histone 3H(1:1 000)抗体在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜,随后进行HRP结合二级抗体室温孵育1 h。使用ECL分析试剂显影,经曝光、定影后,对条带进行扫描分析。目的蛋白相对表达量=目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。

1.4 统计学方法

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。利用Shapiro-Wilk法正态分布检验,数据均符合正态分布。采用单因素方差分析组间差异,组间两两比较采用LSD- t 检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 幼鼠神经行为学观察及脑组织含水量比较

胆红素脑病新生大鼠造模后0~6 h各组幼鼠并未出现明显异常;9~12 h,对照组幼鼠无明显异常,模型组幼鼠开始出现活动减少、呼吸不稳、对外界刺激反应低下、俯伏等情况,而TBHQ组幼鼠的情况要略轻于模型组;21~24 h,对照组幼鼠无明显异常,而模型组幼鼠的神经性受损情况越来越严重,出现吃奶困难、尖叫、转圈、四肢颤动等情况,TBHQ组幼鼠的神经性受损情况明显轻于模型组。造模24 h后,与对照组比较,模型组大鼠脑组织含水量提高(84.52% \pm 3.44% vs. 64.53% \pm 2.58%, $P<0.01$);与模型组比较,TBHQ组大鼠脑组织含水量降低(72.18% \pm 3.07% vs. 84.52% \pm 3.44%, $P<0.01$)。

2.2 海马组织神经元损伤观察

如图1所示,对照组大鼠海马区细胞排列紧密,层次

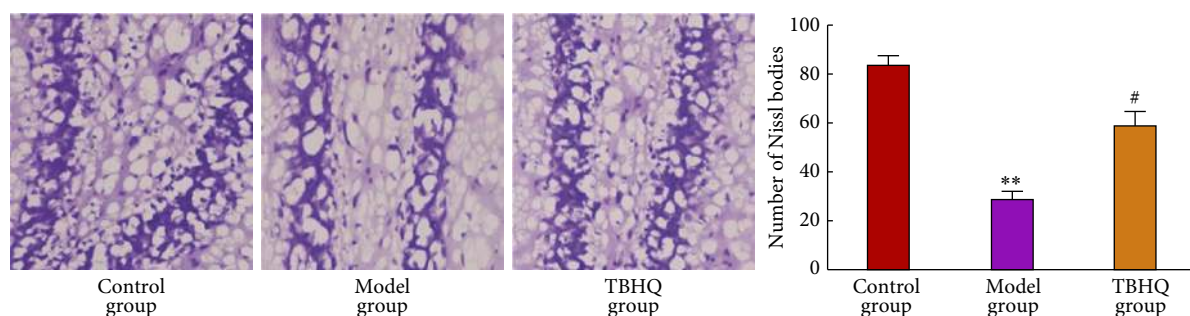


图1 Nissl染色观察海马组织神经元损伤($n=12$)。 $\times 400$

Fig 1 Nissl staining was done to observe neuronal damage in hippocampus ($n=12$). $\times 400$

** $P<0.01$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. model group.

清晰, 神经元胞质内有大量紫蓝色尼氏体; 与对照组比较, 模型组大鼠海马区细胞排列稀疏紊乱, 紫蓝色变浅, 尼氏体数量减少($P<0.01$); 与模型组比较, TBHQ组大鼠海马区细胞排列稀疏, 尼氏体数量增多($P<0.05$)。

2.3 海马组织神经元凋亡情况

如图2所示, 与对照组比较, 模型组大鼠海马区细胞凋亡率和Caspase-3活性升高($P<0.01$); 与模型组比较,

TBHQ组大鼠海马区细胞凋亡率和Caspase-3活性降低($P<0.01$)。

2.4 海马组织MDA、GSH和SOD活性变化

如表1所示, 与对照组比较, 模型组大鼠海马组织MDA含量升高($P<0.05$), 而GSH含量和SOD活性降低($P<0.05$); 与模型组比较, TBHQ组大鼠海马组织MDA含量降低($P<0.01$), 而GSH含量和SOD活性增加($P<0.05$)。

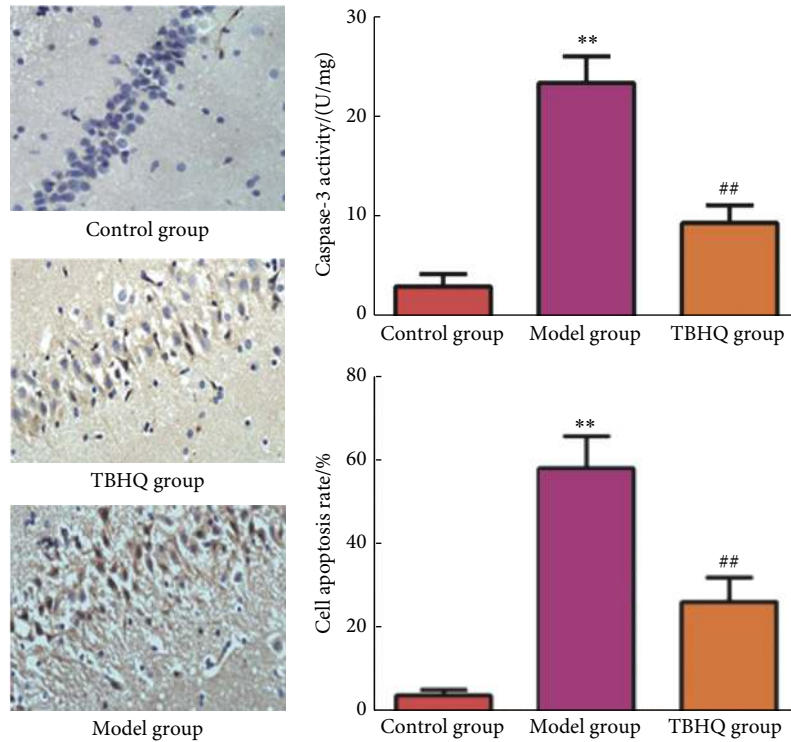


图 2 各组海马组织TUNEL染色和Caspase-3活性比较 (n=12)

Fig 2 TUNEL staining was done for comparison of Caspase-3 activity in the hippocampus tissue of each group (n=12)

A: TUNEL staining to observe neuron apoptosis in the hippocampus (x200); B: Comparison of Caspase-3 activity in the hippocampus. ** $P<0.01$, vs. control group; ## $P<0.01$, vs. model group.

表 1 各组海马组织MDA、GSH含量和SOD活性比较 (n=12)

Table 1 Comparison of the content of MDA and GSH and the activity of SOD in the hippocampus of each group (n=12)

Group	GSH/($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	MDA/(nmol/mg)	SOD/(U/mg)
Control	15.75 \pm 4.02	1.65 \pm 0.57	5.21 \pm 0.54
Model	7.24 \pm 3.26*	5.39 \pm 0.81*	1.12 \pm 0.30**
TBHQ	25.46 \pm 8.57#	3.07 \pm 1.04##	3.03 \pm 0.62##
F	7.46	15.55	49.21
P	0.0236	0.0042	0.0002

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, vs. model group.

2.5 海马组织Nrf2和HO-1 mRNA和蛋白表达水平变化

与对照组比较, 模型组大鼠海马区组织Nrf2和HO-1 mRNA表达水平以及核蛋白Nrf2和全蛋白HO-1表达水平

均降低($P<0.05$); 与模型组比较, TBHQ组大鼠海马区组织Nrf2和HO-1 mRNA表达水平以及核蛋白Nrf2和全蛋白HO-1表达水平增加($P<0.01$)。见图3。

3 讨论

OS参与诱导多种决定细胞命运的细胞信号转导途径。在生理条件下, 活性氧的产生和消除之间的平衡维持了氧化还原敏感信号蛋白的正常功能。通常, 氧化还原稳态确保细胞对内源性和外源性刺激做出适当反应。然而, 当氧化还原稳态被扰乱时, OS可能导致异常的细胞死亡并促使疾病发展^[10]。研究已经证明OS参与了神经细胞SH-SY5Y中UCB介导的细胞死亡^[11]。临床研究发现^[12], 在复发性喘息和儿童哮喘患者中, 炎症脂质介质和OS副

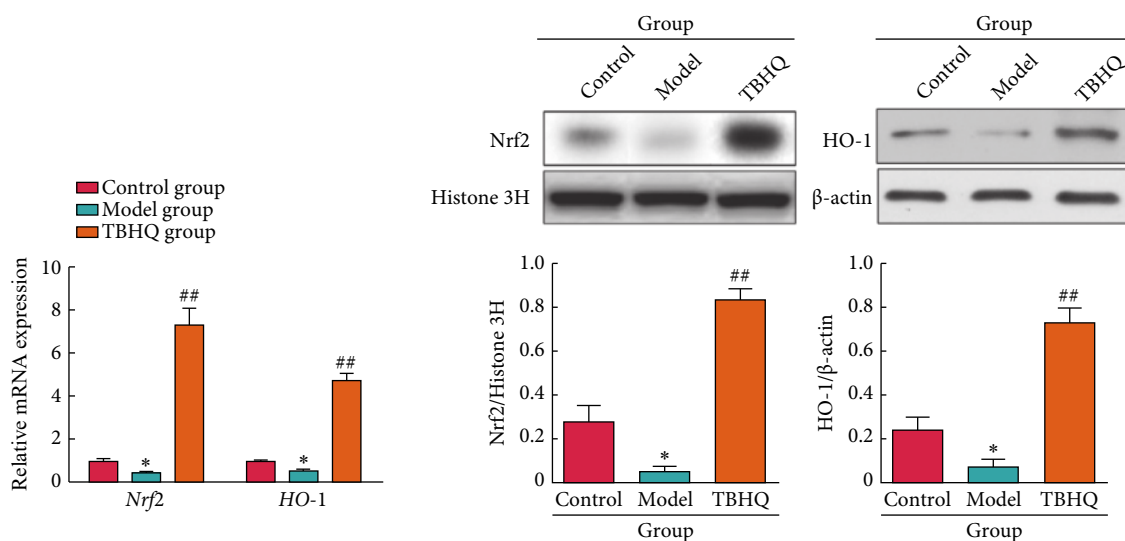


图 3 各组海马组织Nrf2和HO-1 mRNA和蛋白表达水平 (n=12)

Fig 3 The mRNA and protein expression levels of Nrf2 and HO-1 in hippocampus of each group (n=12)

A: qRT-PCR was done to examine the expression levels of *Nrf2* and *HO-1* mRNA; B: Western blot was done to examine the expression levels of nuclear protein Nrf2 and whole protein HO-1. * $P < 0.05$, vs. control group; ## $P < 0.01$, vs. model group.

产物与UCB呈负相关,UCB能通过炎症脂质和氧化应激影响复发性喘息和儿童哮喘疾病的发展。表明OS是UCB诱导疾病过程中的重要途径。本研究结果发现在胆红素处理后,脑组织中检测到MDA升高、SOD降低、海马区神经元损伤、细胞凋亡率增加,说明胆红素在体内能诱导新生大鼠脑组织OS和脑损伤,与之前的研究结果一致。

Nrf2信号途径代表了细胞对OS的主要反应,并且由于Nrf2信号通路可上调细胞保护酶,这引起了人们的广泛关注,成为对抗神经系统疾病的潜在靶标^[13]。研究表明,全反式维甲酸可降低神经母细胞瘤细胞中Nrf2的活性,抑制HO-1表达,降低GSH水平^[14]。HO-1作为抗氧化酶能严格调节细胞内ROS水平。在人结肠癌细胞中,Nrf2呈依赖方式促进ROS的产生,诱导HO-1的表达^[15]。这些数据表明Nrf2/HO-1和GSH在氧化应激过程中的抗氧化作用。本研究结果表明,胆红素处理后,幼鼠大脑Nrf2 mRNA及细胞核中Nrf2蛋白表达量降低,抑制下游GSH合成,抗氧化剂酶HO-1表达减少。说明暴露于胆红素的脑组织神经细胞的抗氧化反应基因被抑制,细胞氧化还原状态失衡,进而导致脑损伤。为了确认Nrf2通路活化对胆红素诱导的幼鼠脑损伤的作用,我们在胆红素脑病幼鼠模型中加入了Nrf2激活剂TBHQ进行预处理,重复了相同指标检测。结果发现,TBHQ能抑制模型组大鼠脑组织MDA活性、促进SOD活性,抑制海马区神经元损伤和细胞凋亡率。研究发现^[16],Nrf2激活通过不依赖线粒体的ROS产生减轻了顺铂诱导的氧化应激和细胞

凋亡。同时,TBHQ处理后,胆红素诱导幼鼠的脑组织Nrf2和下游GSH和HO-1的表达量明显升高。这些结果说明,Nrf2激活剂处理后,Nrf2在细胞核中高表达,进而通过调控OS稳态,缓解胆红素诱导的脑损伤,抑制细胞凋亡。

综上所述,本研究报道了Nrf2通路活化通过抗氧化反应缓解胆红素诱导的新生大鼠脑组织神经损伤,抑制细胞凋亡,这可能与Nrf2活化、增加其下游GSH和HO-1含量有关。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] HEGYI T, CHEFITZ D, WELLER A, *et al.* Unbound bilirubin measurements in term and late-preterm infants. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2020, 4: 1-7.
- [2] AMINI N, VOUSOOGHI N, SOLEIMANI M, *et al.* A new rat model of neonatal bilirubin encephalopathy (kernicterus). *J Pharmacol Toxicol*, 2017, 84: 44-50.
- [3] 刘利东, 马粹欣, 林琪英, 等. 血清胆红素在肺癌患者中的抗氧化作用. *实用医学杂志*, 2018, 10: 1716-1719.
- [4] 赖芳芳, 张丙宏. 胆红素对新生儿神经系统影响的研究进展. *医学综述*, 2018, 24(9): 1704-1708.
- [5] MANCUSO C. Bilirubin and brain: A pharmacological approach. *Neuropharmacology*, 2017, 118: 113-123.
- [6] PAZAR A, KOLGAZI M, MEMISOGLU A, *et al.* The neuroprotective and anti-apoptotic effects of melatonin on hemolytic hyperbilirubinemia-induced oxidative brain damage. *J Pineal Res*, 2016, 60(1): 74-83.

- [7] VELAGAPUDI R, EL-BAKOUSH A, OLAJIDE O A. Activation of Nrf2 pathway contributes to neuroprotection by the dietary flavonoid tiliroside. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(10): 8103–8123.
- [8] 文凤, 樊萍, 隆令, 等. 胆红素脑病SD乳鼠模型中脑水通道蛋白-4表达发生变化. *中国生物化学与分子生物学报*, 2019, 35(12): 1384–1391.
- [9] ZHANG J, TUCKER L D, DONG Y, *et al*. Tert-butylhydroquinone post-treatment attenuates neonatal hypoxic-ischemic brain damage in rats. *Neurochem Int*, 2018, 116: 1–12.
- [10] TRACHOOTHAM D, LU W, OGASAWARA M A, *et al*. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(8): 1343–1374.
- [11] QAI SIYA M, CODA ZABETTA C D, BELLAROSA C, *et al*. Bilirubin mediated oxidative stress involves antioxidant response activation via Nrf2 pathway. *Cell Signal*, 2014, 26(3): 512–520.
- [12] TURI K N, MCKENNAN C, GEBRETSADIK T, *et al*. Unconjugated bilirubin is associated with protection from early-life wheeze and childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2021, 148(1): 128–138.
- [13] ZHANG M, AN C, GAO Y, *et al*. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Prog Neurobiol*, 2013, 100: 30–47.
- [14] FURFARO A L, PIRAS S, DOMENICOTTI C, *et al*. Role of Nrf2, HO-1 and GSH in neuroblastoma cell resistance to bortezomib. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0152465[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152465>.
- [15] MIN K, LEE J T, JOE E, *et al*. An IκBα phosphorylation inhibitor induces heme oxygenase-1(HO-1) expression through the activation of reactive oxygen species (ROS)-Nrf2-ARE signaling and ROS-PI3K/Akt signaling in an NF-κB-independent mechanism. *Cell Signal*, 2011, 23(9): 1505–1513.
- [16] ZHANG W, XIONG H, PANG J, *et al*. Nrf2 activation protects auditory hair cells from cisplatin-induced ototoxicity independent on mitochondrial ROS production. *Toxicol Lett*, 2020, 331: 1–10.

(2020-09-18收稿, 2021-08-06修回)

编辑 汤洁