

· 基础研究 ·

## Nrf2 在脓毒症大鼠肝组织中的表达及姜黄素的干预作用

李晶菁, 张霞, 陈瑜, 蔡丹磊, 黄中伟<sup>△</sup>

(南通大学附属医院急诊科, 江苏南通 226001)

**摘要:**目的 探讨核因子相关因子 2(Nrf2)在脓毒症发生、发展中的可能作用机制及其在脓毒症急性肝损伤(ALI)中的作用,以及姜黄素对 Nrf2 表达的影响,为临床防治脓毒症提供理论依据。**方法** 将 72 只 SD 雄性大鼠随机分成 3 组,即对照组、实验组、干预组,3 组按术后 6、12、24、48 h 时间点分成不同亚组。实验组和干预组接受盲肠结扎穿孔(CLP)法处理制备脓毒症急性肝损伤(ALI)大鼠模型,干预组大鼠制模后 1 h 按 100 mg/kg 剂量腹腔内注射姜黄素。采用免疫印迹法检测各组肝组织中 Nrf2 蛋白的表达情况;采用心脏采血测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT);并行 HE 染色观察肝组织的病理变化。**结果** ALT 值:实验组较对照组 ALT 值显著升高( $P < 0.05$ );干预组较实验组明显改善( $P < 0.05$ )。Nrf2 表达:对照组大鼠肝组织中含有 Nrf2;实验组自 6 h 始逐渐上调但 12 h 后又下调,较对照组 Nrf2 蛋白水平明显下降( $P < 0.05$ );干预组自 6 h 时间点始逐渐上调至 24 h 又呈下调趋势,较实验组明显升高( $P < 0.05$ )。病理改变:对照组大鼠肝脏结构未见明显异常改变,实验组肝组织大量炎症细胞聚集、细胞肿胀,姜黄素干预后组织明显改善。**结论** 实验组脓毒症大鼠 Nrf2 表达较对照组下调,提示 Nrf2 直接参与了脓毒症的发生和发展过程,且严重感染的打击损害了机体内源性保护系统,Nrf2 表达下降,机体抗氧化应激反应和自然免疫反应抑制,加重了脓毒症氧化应激引起的 ALI。姜黄素在脓毒症时可增加肝组织 Nrf2 水平,增强肝内总抗氧化能力,缓解氧化应激,对脓毒症 ALI 具有保护作用。

**关键词:**姜黄素;脓毒症;核因子相关因子 2

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.24.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)24-2873-04

## The expression of Nrf2 in the sepsis-affected rats' livers and the intervention effects of curcumin

Li Jingjing, Zhang Xia, Chen Yu, Cai Danlei, Huang Zhongwei<sup>△</sup>

(Department of Emergency, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

**Abstract: Objective** To investigate the possible mechanism of Nrf2 in sepsis development and its effect in the septic acute liver injury, and derive the effect of curcumin on Nrf2 expression, which provide theoretical basis for clinical prevention and treatment of sepsis. **Methods** Divided putting 72 male Sprague-Dawley rats into 3 groups: control group, experimental group and intervention group. After operation, 3 groups were further divided into subgroups 6 hours later, 12 hours later, 24 hours later and 48 hours later respectively. The septic rats model with acute liver injury was reproduced by method of cecal ligation and puncture(CLP). The experimental group and the intervention group took CLP. The rats in the intervention group were rejected with curcumin in the abdomen at a dosage of 100 mg/kg an hour after operation. Detected the expression of Nrf2 in the livers of each group used Western blot and measure alanine aminotransferase(ALT) in serum by drawing the rats' heart blood; observed the pathological changes in the liver with HE coloration. **Results** ALT: the values of ALT in the experimental group was significantly increased compared with the control group( $P < 0.05$ ); while in the intervention group, it was markedly improved compared with the experimental group( $P < 0.05$ ). The expression of Nrf2: Nrf2 exists in control group rat's hepatic tissue. In the experimental group, it was progressively increased since the 6 h time point and decreased after the 12 h time point which shown significant decreased compared with the control group( $P < 0.05$ ). In the intervention group, it was gradually increased since the 6 h time point and decreased after the 24 h time point which was obviously higher than the experimental group( $P < 0.05$ ). Pathological changes: There was no obvious abnormalities in the control group rats' liver structure, while a lot of inflammatory cells gather and liver cells swell in the experimental group. It was obvious improved after curcumin intervention. **Conclusion** As Nrf2 is generally lower in the experimental group than in the comparative group, it shows that Nrf2 directly participates in the occurrence and development of sepsis, while severe infection blow damages the endogenous protection system. Decreased activity of Nrf2 causes significantly inhibition of anti-oxidative stress and natural immune response, which may exacerbate acute liver injury by oxidative stress in sepsis. In case of sepsis, curcumin may increase the level of Nrf2 and the antioxidant enzyme's activity in the hepatic tissues, enhancing the general antioxidant ability and alleviating the oxidative stress which points out that curcumin prevents the septic acute liver injury.

**Key words:** curcumin; sepsis; Nrf2

脓毒症(Sepsis)是由感染因素引起的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),是一个涉及大量局部和全身性反应的复杂病理过程,发病机制复杂,

临床治疗困难。目前,脓毒症发病率及病死率仍居高不下,尚缺乏一有效的靶向干预目标治疗脓毒症。深入研究脓毒症的发病机制及其相应治疗措施对于改善脓毒症的临床治疗效果、

降低病死率有积极意义。脓毒症的本质是炎症介质的失控释放和炎症反应紊乱<sup>[1]</sup>,伴有显著的氧化应激并与器官损伤和死亡率相关<sup>[2]</sup>。核因子相关因子 2(NFE2-related factor 2, Nrf2)是内源性抗氧化系统的核心转录调节因子<sup>[3]</sup>,是氧化应激的感受器。由于目前 Nrf2 在脓毒症中的研究大多是通过基因敲除技术实现的,其在脓毒症中具体作用机制还待明确。本实验通过构建脓毒症急性肝损伤(acute liver injury, ALI)动物模型,诱导 Nrf2 表达,应用姜黄素(curcumin)治疗干预,探讨 Nrf2 在脓毒症大鼠肝中的表达规律,初步分析 Nrf2 在脓毒症发生、发展中的可能作用机制及其在脓毒症 ALI 中的作用;通过观测姜黄素干预后 Nrf2 的表达变化,探讨姜黄素对脓毒症 ALI 的干预作用及可能机制,为临床防治脓毒症提供理论依据。

## 1 材料与与方法

**1.1 动物模型的建立** 72 只健康雄性 SD 大鼠,清洁级,体重(260±20)g,由南通大学实验动物中心提供。随机分为 3 组,即对照组、实验组、干预组,每组 24 只,3 组按术后 6、12、24、48 h 时间点分成不同亚组,每亚组 6 只大鼠。实验组和干预组采用盲肠结扎穿孔术(CLP)法制备脓毒症 ALI 大鼠模型,CLP 模型的标准步骤主要参考文献[4-5]介绍的 CLP 造模方法并予以改良。本实验结果显示,实验组模型光镜观察大鼠肝细胞水肿、嗜酸性变及脂肪变性,肝血窦充血、炎症细胞浸润,反映肝细胞损伤及其损伤程度肝功能敏感指标血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)明显升高,实验组制模后出现了过度炎症反应,有明显的脓毒症表现,制模一段时间后出现大鼠器官功能障碍和死亡,模拟了临床上严重脓毒症的发病过程,与文献报道符合,表明成功制备脓毒症 ALI 模型。对照组以同样方法开腹,分离盲肠远端与大肠的系膜后关腹。在 CLP 术后 1 h 干预组按 100 mg/kg 剂量腹腔内注射姜黄素,实验组及对照组予以等量生理盐水。姜黄素液由姜黄素按 50 mg/mL 浓度溶于二甲基亚砷配制而成。

**1.2 标本采集** 分别于制模后 6、12、24、48 h 将大鼠麻醉,左侧第 3、4 肋间心尖搏动最强处针刺入采血,分离血清,测定肝功能,同时打开腹腔分离肝脏组织,一部分于-80℃冰箱冻存,用 Western blot 法检测 Nrf2 蛋白表达情况;另外一部分 10%中性甲醛固定,石蜡包埋、切片、行苏木精-伊红(HE)染色,然后在光学显微镜下观察肝脏组织病理学改变。

**1.3 组织匀浆制备** 制备 10%肝组织匀浆:取 0.5~1 g 的组织块在冰冷生理盐水中漂洗,滤纸拭干后称重,剪碎组织块,放入小烧杯内,取 9 倍组织块重量的 0.86%的冷生理盐水,其中 2/3 直接倒于烧杯内,与组织块混匀后倒入匀浆管中,再将剩余的 1/3 冷生理盐水冲洗残留在烧杯中的碎组织块一起倒入匀浆管,充分匀浆 8~10 min。将制备好的匀浆用离心机 2 000 r/min 离心 15 min,留上清液去沉淀,-80℃冰箱保存备用。

## 1.4 各项指标检测

**1.4.1 肝功能血清 ALT 测定** 采血、分离血清,全自动生化仪测定 ALT。

**1.4.2 肝组织中 Nrf2 蛋白水平测定** 取约 50 mg 冻存的肝组织碾碎、匀浆、离心,取上清液置于-80℃冰箱冻存备用。灌制聚丙烯酰胺凝胶,取制备好的蛋白样品进行垂直电泳,电泳后,取下凝胶,一块用于考马斯亮蓝染色,确认电泳效果和分子量标准;另一张用于电转印,将电转印好的膜进行杂交,最后化学发光与成像。用凝胶图像处理系统将结果扫描成电子图像,以条带分析软件 Quantity One 4.4.0 分析,计算出光密度值,用目标带与内参照  $\beta$ -actin 的光密度比值来衡量表达情况,

作为 Nrf2 蛋白的相对表达量。

**1.5 统计学处理** 所有计量数据采用  $\bar{x}\pm s$  表示,数据分析的统计学方法为具有一个重复测量因素的两因素方差分析,分析软件采用 Statav10.0 软件,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠不同时间点 ALT 的比较** (1)对照组与实验组比较:各时间点对照组肝功能 ALT 值基本正常,实验组较对照组 ALT 值显著升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 1。(2)干预组与实验组比较:干预组 ALT 值也升高,但较实验组明显改善,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 2。

表 1 对照组与实验组各时间点血清 ALT 值比较( $\bar{x}\pm s$ , U/L)

组别	6 h	12 h	24 h	48 h
对照组	43.34±1.15	44.47±2.02	45.65±1.41	46.03±1.42
实验组	87.23±4.11	122.75±5.40	184.15±5.31	262.44±6.97
$\chi^2$	454.33	8 708.31	4 084.38	1 444.88
$P$	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0

表 2 实验组与干预组各时间点血清 ALT 值比较( $\bar{x}\pm s$ , U/L)

组别	6 h	12 h	24 h	48 h
实验组	87.23±4.11	122.75±5.40	184.15±5.31	262.44±6.97
干预组	65.66±2.43	99.90±2.20	134.39±3.75	162.45±6.53
$\chi^2$	70.98	1 128.37	342.61	79.61
$P$	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0

## 2.2 各组大鼠不同时间点肝组织中 Nrf2 蛋白含量的比较

(1)对照组与实验组比较:正常大鼠肝组织中含有 Nrf2,各时间点实验组较对照组肝组织中 Nrf2 蛋白水平明显下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),实验组自 6 h 始逐渐上调,12 h 后又下调。见表 3、图 1。(2)干预组与实验组比较:干预组自 6 h 时间点始逐渐上调,至 24 h 又呈下调趋势,各时间点较实验组明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 4。

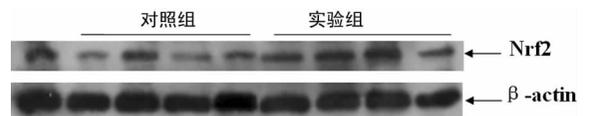


图 1 肝组织中 Nrf2 蛋白的相对表达量

表 3 对照组与实验组各时间点 Nrf2 蛋白比较(OD 比值,  $\bar{x}\pm s$ )

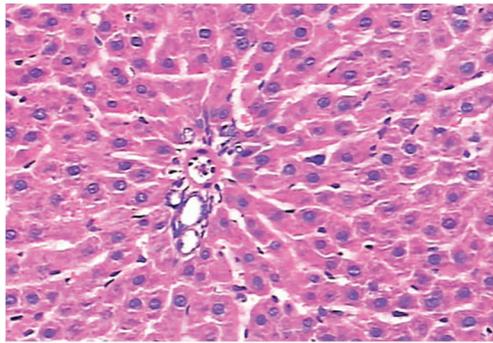
组别	6 h	12 h	24 h	48 h
对照组	0.59±0.02	0.60±0.02	0.61±0.02	0.61±0.01
实验组	0.25±0.01	0.50±0.01	0.10±0.01	0.20±0.02
$\chi^2$	1 447.07	1 648.29	2 859.74	134.04
$P$	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0

**2.3 肝脏病理改变** 光镜 HE 染色实验组肝组织大量炎症细胞聚集、肝细胞肿胀,姜黄素干预后组织改变明显改善。对照组大鼠肝脏可见正常组织结构,未见明显异常改变(图 2)。实验组 6 h 亚组光镜下见肝血窦充血、炎症细胞浸润,肝细胞肿

胀、脂肪及嗜酸性变性,6 h 后呈进行性加重,镜下见肝组织细胞变性,结构紊乱,大量炎症细胞浸润(图 3)。干预组内可见细胞水肿、肝窦充血、炎症细胞浸润及组织结构紊乱等改变,但较实验组减轻(图 4)。

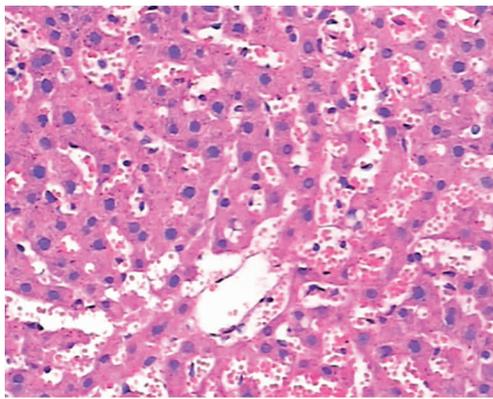
表 4 实验组和干预组各时间点 Nrf2 蛋白比较(OD 比值,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	6 h	12 h	24 h	48 h
实验组	0.25±0.01	0.50±0.01	0.10±0.01	0.20±0.02
干预组	0.52±0.01	0.90±0.02	0.88±0.01	0.30±0.01
$\chi^2$	1 052.19	104.78	7 734.57	2 291.06
P	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0



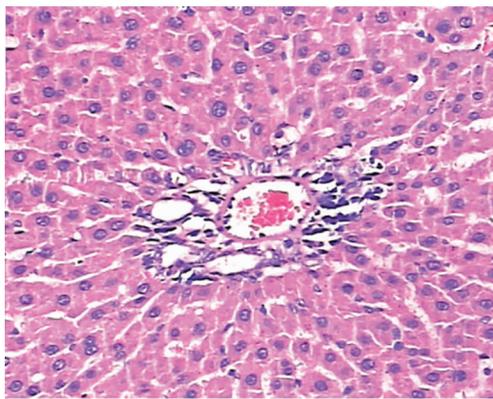
对照组 (×200)

图 2 正常大鼠肝脏光学显微镜下影像学表现(HE, ×200)



实验组 12 h (×200)

图 3 实验组大鼠术后 12 h 肝脏光学显微镜下影像学表现(HE, ×200)



干预组 12 h (×200)

图 4 干预组大鼠术后 12 h 肝脏光学显微镜下影像学表现(HE, ×200)

### 3 讨论

脓毒症是由各种严重烧伤、创伤、休克及外科大手术后常见并发症,也是引起多脏器功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)和脓毒性休克的重要原因<sup>[6]</sup>。迄今为止,严重脓毒症或脓毒性休克的病死率仍高达 50%左右,且呈逐年增长的趋势,故加强对脓毒症的研究无疑具有十分重要的理论价值和临床意义。尽管近年来有关脓毒症发病机制的研究已取得了较大进展,但其发病涉及诸多环节和机制,尚待明确。目前认为脓毒症时大量促炎因子和抗炎因子释放诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生,造成体内氧化-还原状态失衡,引起氧化性应激,最终导致组织细胞损伤<sup>[7]</sup>。肝脏是全身最大的网状内皮系统,脓毒症时摄取和聚集了大量的毒素,是最早出现能量代谢障碍的器官<sup>[4]</sup>,它主要通过启动膜脂质过氧化改变生物膜功能、与生物大分子共价结合及破坏酶的活性等在细胞因子(如 NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ )的共同作用下引起不同程度的肝损伤<sup>[8]</sup>。相比之下,肝细胞比其他细胞有更高的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)等抗氧化剂水平,从而具有更强的抗氧化功能,因此,构建脓毒症 ALI 动物模型对于研究脓毒症具有代表性,为探讨脓毒症的发病机制和防治措施提供依据。Nrf2 作为 CNC 家族(cap-'n'-cohar, CNC)转录因子家族成员,是氧化应激的感受器,是机体完整的内源性抗氧化系统的核心转录调节因子,是细胞内对抗氧化应激最重要的机制。正常状况下 Nrf2 与其抑制物 Kelch 样 ECH 相关蛋白(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)以异源二聚体的形式存在于细胞质,激活后二者分离,转位进入细胞核,与小 Maf 蛋白结合成异二聚体,激活靶基因的表达、调节抗氧化酶和蛋白的转录<sup>[9]</sup>。Nrf2 缺失或激活障碍,可加重氧化应激源的细胞毒性,导致细胞功能障碍、凋亡甚至死亡。在本实验对照组肝组织中可检测到 Nrf2 蛋白,提示正常肝组织存在 Nrf2 的表达。在实验组 Nrf2 表达明显降低,先逐渐上升,至 12 h 后又逐渐下调,提示猛烈的氧化应激反应可损害机体内源性保护系统,从而使核内 Nrf2 水平降低、转录调节活性下调。由于脓毒症时肝脏摄取并聚集了大量毒素,大量的毒素作用于炎症细胞诱导多种炎性介质的表达,使得在脓毒症早期 Nrf2 出核和入核反应增加,增加了 Nrf2 蛋白在肝组织中的表达,转录调节活性上调,细胞抗内源性损伤能力增强。但是,随着时间的延长,强烈的氧化应激反应产生大量 ROS,造成氧化-还原失衡,进一步损害组织和细胞,使 Nrf2 出核减少,转录活性下降,而引起抗氧化系统的破坏,抗氧化系统损害与氧化应激形成了恶性循环,最终导致严重的器官功能障碍。因此, Nrf2 在脓毒症中发挥了重要的抗氧化应激的作用,有可能成为脓毒症预防和治疗的靶标。结合本课题的研究和文献内容,对脓毒症的发病机制有了进一步的了解,至于其深入的作用机制,有待于进一步研究。

姜黄素是从姜科植物的根茎中提取的一种天然化合物。对姜黄素的研究发现,它具有广泛的生物活性,如抗氧化、抗癌、降血脂、抗菌以及抑制人类免疫缺陷病毒-1(human immunodeficiency virus-1, HIV-1)整合酶活性,而且毒性小<sup>[10-12]</sup>。姜黄素是一个对称分子结构,它由 2 个酚羟基, 2 个不饱和酮双键, 1 个中性活性亚甲基和 1 个  $\beta$ -二酮组成,其中酚羟基和  $\beta$ -二酮是其抗氧化活性部位<sup>[13]</sup>。酚羟基具有捕获和清除自由基的能力。姜黄素的不饱和羰基具有亲电性,可直接与 Keap1 的关键性半胱氨酸巯基作用,从而降低其与 Nrf2 的亲合力,释

放 Nrf2。本实验用姜黄素干预脓毒症大鼠, Nrf2 蛋白表达在干预组较实验组明显提高, 肝细胞肿胀及炎症渗出明显改善, 提示姜黄素发挥抗氧化应激作用可能与 Nrf2 信号转导途径有关, 且 Nrf2 对肝细胞具有保护作用。国外文献表明姜黄素能激活 Nrf2 核转位, 上调 Nrf2 水平并诱导其下游产物表达, 增加具有抗氧化功能的 II 相代谢酶的合成, 减轻细胞活性氧族/活性氮族 (reactive oxygen species/reactive nitrogen species, ROS/RNS) 水平, 发挥着广泛的细胞保护功能<sup>[3]</sup>。大量文章还提示姜黄素能抑制超氧阴离子、过氧化氢等多种自由基的产生, 并对它有很强的清除能力, 从而抑制自由基对机体的损伤; 姜黄素还可提高抗氧化酶 SOD、GSH 等活性, 降低缺血及炎症组织中的氧化产物, 减轻氧化应激反应。姜黄素在发挥抗氧化应激作用的同时, 通过过氧化物酶系统产生苯氧基团, 表现一定程度的促氧化作用, 后者协同氧化细胞内谷胱甘肽或烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, 在细胞摄入氧时产生 ROS。Sandur 等<sup>[14]</sup>证实姜黄素的这种双向作用与其在体内的药物浓度有关, 二者之间可以相互转化; Hatcher 等<sup>[15]</sup>也证实了同样的看法, 并进一步指出姜黄素是一个自由基清除剂和氢供体, 具有双重活性。以上研究为脓毒症的治疗提供了新的思路和实验依据。

本实验不足: (1) 本实验采用 CLP 改良模型, 未对实验动物病死率进行观察, 针对该模型的稳定性会在后续的实验予以进一步研究, 缺点主要是感染细菌的量难以控制。(2) 本实验中姜黄素的用药剂量参考于相关文献, 而对于给药的最佳剂量和方式尚需进一步研究确定。(3) 姜黄素对 Nrf2 表达影响的分子机制仍需进一步研究证实。尽管近年来关于脓毒症发病机制的研究取得一定进展, 但脓毒症、脓毒性休克、MODS 的临床疗效并未能取得预期成果。随着内源性系统保护因子 Nrf2 的出现, 通过增强子序列顺式作用对细胞具有最基本的抗氧化保护作用并诱导多种激酶表达<sup>[16-18]</sup>。因此, 临床上可以通过增强一些核因子的转录, 提高机体对抗多种不同的环境应激反应的能力<sup>[17-19]</sup>。对脓毒症的研究不仅仅限于分子水平, 可以延伸为基因对抗氧化系统各个环节的作用, 为 Nrf2/抗氧化反应原件 (antioxidant response element, ARE) 信号转导途径研究开辟了新的道路。对此通路全面、精确的了解, 将为脓毒症预防和治疗开辟新的途径。当然, 脓毒症是一个涉及多因素的复杂病理、生理过程, 不能孤立地探讨某个因素的作用, 还需要多层次、多方向、系统全面的研究, 才能弄清它的本质, 攻克这一世界难题。

#### 参考文献:

- [1] Nguyen HB, Rivers EP, Abrahamian FM, et al. Severe sepsis and septic shock; review of the literature and emergency department management guidelines[J]. *Ann Emerg Med*, 2006, 48(1):28-54.
- [2] Crimi E, Sica V, Slutsky AS, et al. Role of oxidative stress in experimental sepsis and multisystem organ dysfunction [J]. *Free Radical Res*, 2006, 40(7):665-672.
- [3] Kobayashim M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanism against electrophiles and reactive oxygen species [J]. *Adv Enzyme Regul*, 2006, 46(1):113-140.
- [4] Silliman CC, Curtis BR, Kopko PM, et al. Donor antibodies to HNA-3a implicated in TRALI reactions prime neutrophils and cause PMN-mediated damage to human pulmonary microvascular endothelial cells in a two-event in vitro model [J]. *Blood*, 2007, 109(4):1752-1755.
- [5] Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, et al. Cecal ligation and puncture [J]. *Shock*, 2005, 24(1):52-57.
- [6] Sakaguchi S, Furusawa S. Oxidative stress and septic shock; metabolic aspects of oxygen-derived free radicals generated in the liver during endotoxemia [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2006, 47(2):167-177.
- [7] Ware LB. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome [J]. *Seminars Respir Crit Care Med*, 2006, 27(4):337-349.
- [8] 光吉博则, 谷仁焯. 氧化应激的病理生理作用 [J]. *日本医学介绍*, 2007, 28(4):150-152.
- [9] Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2: INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(9):1304-1309.
- [10] Yaowared S, Yukihis N, Michihisa M. Effects of manganese complexes of curcumin and diacetylcurcumin on kainic acid-induced neurotoxic responses in the rat hippocampus [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(9):1732-1739.
- [11] 余美荣, 蒋福升, 丁志山. 姜黄素的研究进展 [J]. *中草药*, 2009, 40(5):828-831.
- [12] 湛辉, 张景辉, 刘文琪. 姜黄素抗血吸虫病肝纤维化及其机制的实验研究 [J]. *中草药*, 2009, 40(8):1274-1277.
- [13] 薛海鹏, 李湘洲, 旷春桃, 等. 姜黄素的抗氧化机制及其为先导物的抗氧化化合物研究进展 [J]. *食品科学*, 2010, 31(7):302-307.
- [14] Sandur SK, Ichikawa H, Pandey MK, et al. Role of prooxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane) [J]. *Free Rad Biol Med*, 2007, 43(4):568-580.
- [15] Hatcher H, Planalp R, Cho J, et al. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(11):1631-1652.
- [16] Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, et al. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival [J]. *Biol Chem*, 2003, 278(10):8135-8145.
- [17] Rangasamy T, Cho CY, Rajesh K, et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice [J]. *Clin Invest*, 2004, 114(9):1248-1259.
- [18] Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism [J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10(11):549-557.
- [19] Jain AK, Bloom DA, Jaiswal AK. Nuclear import and export signals in control of Nrf2 [J]. *Biol Chem*, 2005, 280(32):29158-29168.