

## 一种基于抗氧化反应元件的抗氧化药物筛选模型的制备

刘 阳<sup>1</sup>, 陈剑清<sup>1</sup>, 舒特俊<sup>1</sup>, 吕正兵<sup>1</sup>, 张耀洲<sup>1,2\*</sup>

1. 浙江理工大学生命科学学院 生物化学研究所, 浙江 杭州 310018

2. 天津国际生物医药联合研究院, 天津 300457

**摘要:** **目的** 利用抗氧化反应元件(ARE)调控荧光素酶(Luc)报告基因的表达水平, 建立抗氧化药物筛选细胞模型。**方法** 构建由 ARE 调控 Luc 表达的重组质粒载体 pARE-Luc-Neo, 使用 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染剂将重组质粒转染人胚肾上皮 Hek293 细胞, 通过 G418 进行筛选, 使用稀释法挑选阳性单克隆细胞, 经抗氧化蛋白诱导剂 TBHQ 诱导, 检测细胞中 Luc 的活性, 筛选 Luc 高活性的单克隆细胞株。利用白藜芦醇和姜黄素评价阳性克隆的筛选效果, 观察 5 个中药单体穿心莲内酯、隐丹参酮、水飞蓟素、苦参碱和虎杖苷在不同浓度(0、3.125、6.25、12.5、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$ )时对 Luc 表达水平的影响。**结果** 通过检测 Luc 活性, 筛选获得 Hek293-ARE, 该细胞中的 Luc 的表达水平受 ARE 调控, 且在一定范围内与诱导剂的浓度呈相关性。穿心莲内酯、隐丹参酮与水飞蓟素有较好的诱导效果。**结论** 建立的抗氧化药物细胞筛选模型可有效地、高通量地用于抗氧化药物的初步筛选。

**关键词:** 抗氧化药物; 药物筛选; 抗氧化作用元件; 细胞模型; 荧光素酶报告基因

**中图分类号:** R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)15-2112-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.15.016

## Establishment of a drug screening model based on anti-oxidative response element

LIU Yang<sup>1</sup>, CHEN Jian-qing<sup>1</sup>, SHU Te-jun<sup>1</sup>, LV Zheng-bing<sup>1</sup>, ZHANG Yao-zhou<sup>1,2</sup>

1. Institute of Biochemistry, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

2. Tianjin International Joint Academy of Biotechnology and Medicine, Tianjin 300457, China

**Abstract:** **Objective** To establish a cell model for anti-oxidative drug screening by using anti-oxidative response element (ARE) to regulate the expression level of luciferase (Luc) reporter gene. **Methods** The recombinant plasmid vector pARE-Luc-Neo, expressed by ARE-regulated Luc reporter gene, was constructed. The recombinant plasmid vector was transfected into human embryonic kidney epithelial cells (Hek293 cells) using FuGENE<sup>®</sup> HD transfection reagent. The positive cells were screened by G418, and the positive monoclonal cells were selected using the dilution method. The monoclonal cell lines with high activity of Luc reporter gene in response to anti-oxidative protein inducer TBHQ were obtained using the Luc activity detection. The screening effect of the positive clones was evaluated by resveratrol and curcumin. The effects of andrographolide, cryptotanshinone, silymarin, matrine, and polydatin at different concentration (0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100  $\mu\text{mol/L}$ ) on Luc expression level were observed. **Results** The Hek293-ARE cells were obtained by detecting the Luc reporter gene activity, the Luc reporter gene expression was regulated by ARE, meanwhile there exists a dose-response relationship between the expression level and the concentration of the inducer within a certain range. The andrographolide, cryptotanshinone, and silymarin have significant induction effects. **Conclusion** The cell model for anti-oxidative drug screening is established successfully and could be effectively and high-throughput for the preliminary screening of anti-oxidative drugs.

**Key words:** anti-oxidative drug; drug screening; anti-oxidative response element; cell model; luciferase reporter gene

氧化应激产生的活性氧(ROS)直接或间接地损伤细胞内蛋白质、脂质、核酸等大分子物质的生理功能, 是癌症、心脑血管缺血、糖尿病、动脉粥样硬

化、衰老、帕金森病等众多疾病发生的病理生理基础<sup>[1]</sup>。为了减轻体内有毒代谢物质及外来有毒物质对人体的危害, 研发高效、低毒的抗氧化药物十分

收稿日期: 2013-02-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863”项目(2011AA100603); “重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09102301)

作者简介: 刘 阳(1989—), 女, 硕士, 主要研究方向为生物化学与分子生物学及生物工程制药。

Tel: 13830927657 E-mail: 13820927657@163.com

\*通信作者 张耀洲(1964—) Tel: 18622114888 E-mail: yaozhou@chinagene.com

重要。Keap-Nrf2-ARE 抗氧化信号通路是迄今为止发现的最重要的内源性抗氧化应激通路,其通过调节下游的抗氧化酶及 II 相解毒酶等蛋白的表达而发挥抗氧化作用<sup>[2-6]</sup>。在抗氧化酶与 II 相解毒酶基因上游启动区有一非常保守的基因调控序列,称为抗氧化反应元件(ARE)。核因子 NF-E<sub>2</sub> 相关因子(Nrf2)是 ARE 的激活因子,在生理状态下与胞浆蛋白伴侣分子 Keap1 以二聚体的形式存在于细胞浆中,使保护细胞的酶类和抗氧化物处于基础表达水平,细胞处于稳定状态。在氧化应激源作用下,Nrf2 与 Keap1 解偶联后,Nrf2 转位入细胞核,与 ARE 相结合,启动 ARE 调控的抗氧化酶及 II 相解毒酶基因表达,增加细胞对氧化应激的抗性<sup>[7-11]</sup>。

众多的药物活性成分可以促进 Nrf2 和 Keap1 解聚,从而使 Nrf2 能够进入细胞核,发挥抗氧化作用,或者绕过 Nrf2 直接与 ARE 特异结合,激活其下游抗氧化酶和 II 相解毒酶基因的表达,且其表达量与作用程度呈剂量效应关系<sup>[12-15]</sup>。因此,本实验将 ARE 置于 pGL4.17 载体荧光素酶(luciferase, Luc)报告基因的上游,构建 pARE-Luc-Neo 重组真核表达载体转染 Hek293 细胞,从而建立由 ARE 调控 Luc 表达水平的抗氧化药物筛选细胞模型,为高效筛选抗氧化候选药物提供新的筛选技术。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

叔丁基对苯二酚(TBHQ)、白藜芦醇(质量分数>99%,批号 38K5202)、姜黄素(质量分数>94%,批号 53K3562),Sigma 公司;穿心莲内酯(质量分数>98.7%,批号 110797-201108)、隐丹参酮(质量分数>98.7%,批号 110852-200806)、水飞蓟素(质量分数>98%,批号 110856-2000604)、苦参碱(质量分数>98%,批号 110805-200508)和虎杖苷(质量分数>98%,批号 110575-200502),中国药品生物制品检定所;二甲基亚砜(DMSO)、抗性筛选试剂 G418, Solarbio 公司;质粒提取纯化试剂盒,北京全式金生物科技有限公司;DNA ladder maker 及各种限制性内切酶, Fermentas 公司;T4 DNA Ligase 及其相关试剂,东洋纺(上海)生物科技有限公司;琼脂糖凝胶, Ausable 公司;DMEM 培养基, Thermo 公司;0.25%乙二胺四乙酸(EDTA)-胰蛋白酶, Invitrogen 公司;胎牛血清(FBS), PAA 公司;FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂, Roche 公司;Steady-Glo<sup>®</sup> 荧光素酶检测试剂盒, Promega 公司。

### 1.2 细胞

人胚肾上皮细胞 Hek293 细胞由本实验保存。

### 1.3 仪器

倒置相差荧光显微镜,日本 Nikon 公司;CO<sub>2</sub> 细胞培养箱, RS Biotech 公司;细胞培养板、培养瓶,美国 Corning 公司;生物安全柜,海尔公司;全波长多功能酶标仪, Thermo 公司。

## 2 方法

### 2.1 重组质粒载体 pARE-Luc-Neo 的构建、筛选及鉴定

根据文献报道的 ARE 序列 5'-CTCAGCCTTCC-AAATCGCAGTCACAGTGACTCAGCAGAA-3'<sup>[16]</sup>,设计重组质粒载体中的调控序列为 5 个 ARE 元件串联序列,两两之间以 CCC 相连,其 5'端和 3'端分别设计 Sac I 和 Bgl II 酶切位点,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,目的序列片段总长为 219 bp。目的序列片段与载体 pGL4.17 均经 Sac I 和 Bgl II 双酶切后,用 T4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 *Escherichia coli* TG1 感受态细胞,挑取单菌落,扩增培养,抽提重组质粒 DNA,进行双酶切鉴定及测序鉴定,筛选重组质粒载体 pARE-Luc-Neo。

### 2.2 Hek293 细胞培养及转染

Hek293 细胞用含有 10% FBS 的 DMEM 培养基,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,每 2~3 d 传代 1 次。转染前 1 d,将对数生长期 Hek293 细胞用 0.25% EDTA-胰蛋白酶消化后接种于 6 孔细胞培养板中,每孔  $3 \times 10^5$  个,待细胞贴壁 80%左右,使用 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染试剂将重组质粒载体 pARE-Luc-Neo 转染于 Hek293 细胞,具体操作参照转染试剂使用说明书。

### 2.3 细胞模型的制备

细胞转染 24 h 后,用胰酶消化,接种于新的 6 孔细胞培养板中,加入终质量浓度为 800 μg/mL 的 G418(预实验发现该培养条件下 Hek293 细胞全部死亡所需的 G418 最低质量浓度为 700 μg/mL,因此确定实验质量浓度为 800 μg/mL)进行阳性筛选,作为实验组;将未转染质粒的细胞设为对照组。待对照组细胞全部死亡后,将实验组存活细胞扩增培养,使用稀释法<sup>[17]</sup>挑选阳性单克隆细胞,共挑选出 26 株单克隆细胞。将各单克隆细胞逐步扩大至 24 孔板、6 孔板、25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中,待各克隆细胞在培养瓶中贴壁 80%左右、胰酶消化后接种于白色 96 孔细胞培养板中,每孔细胞数约  $5 \times 10^4$  个,

24 h 后加入终浓度为 25  $\mu\text{mol/L}$  的 TBHQ(用 DMSO 助溶, DMSO 的终体积分数为 0.1%), 并设立空白对照组。于 37  $^{\circ}\text{C}$  诱导筛选 24 h 后, 加入 Steady-Glo<sup>®</sup> 荧光素酶检测试剂, 应用全波长多功能酶标仪中的 Luminometric 功能检测细胞中 Luc 的表达量(相对 Luc 活性)。将 Luc 高表达的单克隆细胞株, 确定为用于抗氧化药物筛选的细胞模型, 拟名为 Hek239-ARE。

## 2.4 细胞模型验证

Hek239-ARE 细胞扩增培养后, 接种于白色 96 孔细胞培养板中, 每孔细胞数约  $5 \times 10^4$  个, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h, 加入用 DMEM 培养基稀释的不同浓度的白藜芦醇 (3.125、6.25、12.5、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 和姜黄素 (3.125、6.25、12.5、25、50  $\mu\text{mol/L}$ ), 白藜芦醇与姜黄素用 DMSO 助溶 (DMSO 终体积分数 0.1%), 于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h。每个浓度 5 个复孔, 并设立空白对照组。检测细胞中 Luc 的活性。

## 2.5 细胞模型的应用

将 Hek-293 细胞接种于白色 96 孔细胞培养板中, 每孔细胞约为  $5 \times 10^4$  个, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h, 加入用 DMEM 培养基稀释成不同浓度 (0、3.125、6.25、12.5、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 的穿心莲内酯、隐丹参酮、水飞蓟素、苦参碱和虎杖苷溶液, 每个浓度 5 个复孔, 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 24 h 后, 检测细胞中 Luc 的活性。

## 2.6 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析, 采用单因素方差分析组间差异。

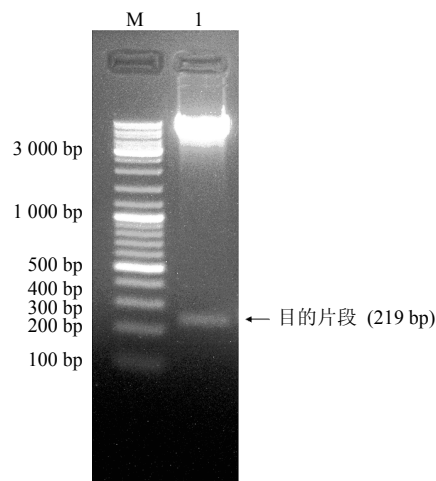
## 3 结果

### 3.1 重组质粒载体 pARE-Luc-Neo 的鉴定

pARE-Luc-Neo 重组质粒载体经 Sac I 和 Bgl II 双酶切后, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 见图 1。可见, 在 200~300 bp 间有一明显条带, 3 000 bp 上方有一条明显条带, 与预期条带大小相符。表明 ARE 片段已成功插入到 pGL4.17 载体 Luc 的上游, 并且序列正确。

### 3.2 细胞模型验证

白藜芦醇和姜黄素对 Hek293-ARE 的 Luc 的表达有良好的诱导效果。随着白藜芦醇浓度的升高, Luc 表达水平呈先上升后下降的趋势, 浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  时, 诱导效果最好, 与空白对照组相比较差异显著 ( $P < 0.01$ )。结果见图 2。随着姜黄素浓度的升高, Luc 表达水平也呈现先升后降的趋势, 浓度为 12.5  $\mu\text{mol/L}$  时, 诱导效果最好, 与空白对照组

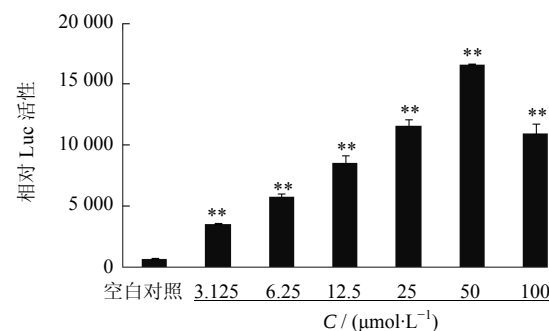


M-DNA 分子标记 1-Sac I/Bgl II 酶切重组质粒

M-DNA Ladder Marker 1-Recombinant plasmid DNA digested with Sac I/Bgl II

图 1 pARE-Luc-Neo 重组质粒载体双酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid vector pARE-Luc-Neo by restriction enzyme digestion



与空白对照组比较: \*\* $P < 0.01$ , 图 3 同

\*\* $P < 0.01$  vs blank control group, same as Fig. 3

图 2 白藜芦醇对 Luc 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 2 Effect of resveratrol on Luc expression ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

相比较差异显著 ( $P < 0.01$ ), 但其浓度达 50  $\mu\text{mol/L}$  时, Luc 表达水平低于空白对照组, 可能是高浓度姜黄素对细胞有一定的毒性, 影响细胞 Luc 的表达。结果见图 3。

### 3.3 细胞模型的应用

随着给药浓度增加, 穿心莲内酯、水飞蓟素、隐丹参酮对 Luc 表达水平的诱导作用呈先上升后下降趋势, 在一定浓度内诱导作用与浓度呈相关性, 其中穿心莲内酯与水飞蓟素浓度为 25  $\mu\text{mol/L}$ 、隐丹参酮浓度为 12.5  $\mu\text{mol/L}$  时, 对 Luc 表达的诱导效果最好, 与空白对照组相比较差异显著 ( $P < 0.01$ )。虎杖苷和苦参碱对 Luc 表达的诱导作用不显著。结

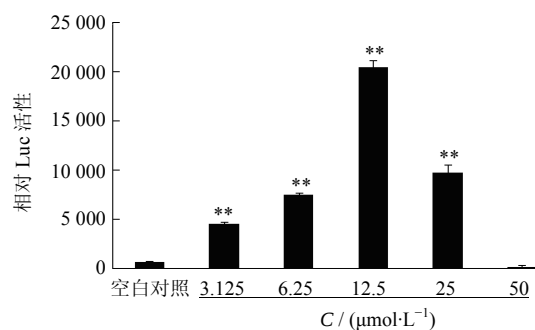


图3 姜黄素诱导 Luc 表达的剂量效应关系 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 3 Dose-dependent relationship of Luc expression induced by curcumin ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

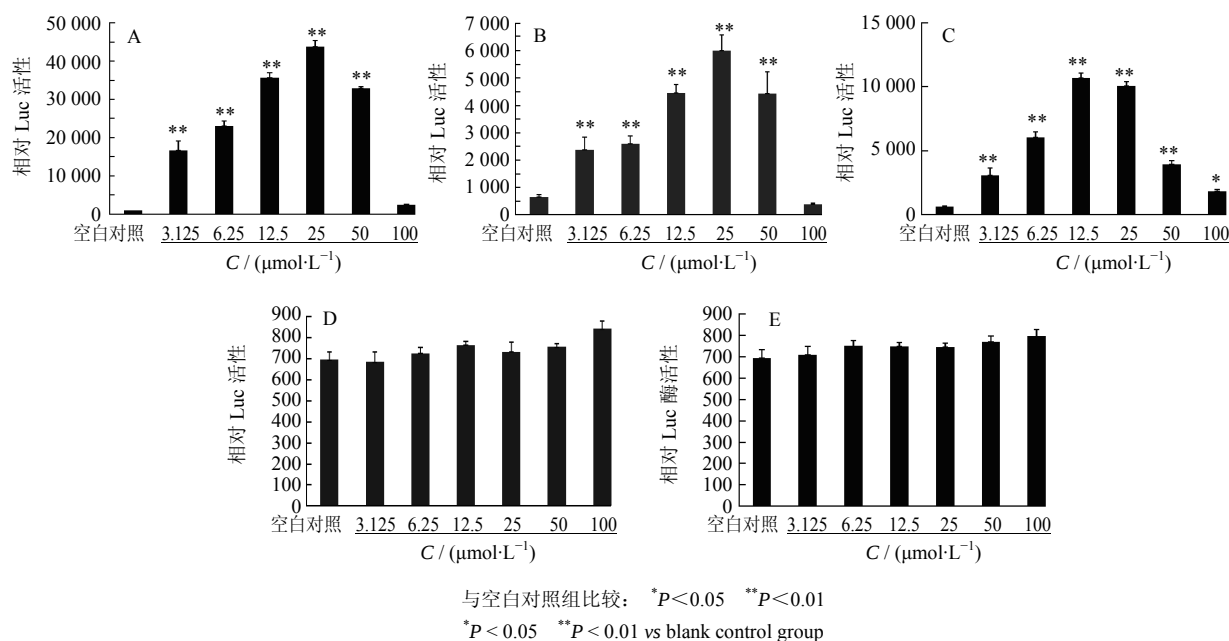


图4 穿心莲内酯 (A)、水飞蓟素 (B)、隐丹参酮 (C)、虎杖苷 (D) 和苦参碱 (E) 对 Luc 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 4 Effects of andrographolide (A), silymarin (B), cryptotanshinone (C), polydatin (D), and matrine (E) on Luc expression ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

转染试剂将该载体转入 Hek293 细胞, 经过 G418 抗性筛选, 初步获得阳性细胞。由于每个细胞的转染效果不一样, 质粒转入细胞后的结果也不一样, 因此为获得来自于同一祖先、遗传性状一致的细胞株, 采用有限稀释法将初步得到的阳性细胞单克隆化, 获得阳性单克隆细胞株。TBHQ 是抗氧化蛋白强诱导剂, 它通过激活 Nrf2 蛋白, 促进 Nrf2 的核转位, 增加其与 ARE 的结合, 从而调节抗氧化蛋白基因的表达<sup>[18-19]</sup>。各单克隆细胞株经 TBHQ 诱导作用后, 检测细胞中 Luc 的活性, 筛选出 Luc 高表达的 Hek293-ARE 细胞株, 作为筛选细胞模型, 提高

果见图 4。

#### 4 讨论

本实验以 Keap1-Nrf2-ARE 抗氧化信号通路为基础, 将该通路中的 ARE 以 5 倍串联的方式插入到 pGL4.17 载体 Luc 上游的多克隆位点, 构建由 ARE 调控 Luc 表达的重组质粒载体 pARE-Luc-Neo。与其他报告基因相比, 以 Luc 基因作为报告基因, 灵敏度高, 检测线性范围广, 可用于高通量药物筛选。对 Luc 进行检测时产生的荧光信号强度与酶浓度呈正比, 可作定量测定指标, 检测结果可直接反应 Luc 的表达水平和活性强弱。

本实验中使用低毒的 FuGENE<sup>®</sup> HD 非脂质体

了筛选的灵敏度。

白藜芦醇通过显著上调 Nrf2 蛋白与靶基因 NAD(P)H: 醌氧化还原酶 1、γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶和血红素氧合酶-1 的表达发挥抗氧化作用<sup>[20-21]</sup>。姜黄素则通过解离 Nrf2-Keap1 复合体, 促使 Nrf2 与 ARE 结合, 从而增加血红素氧合酶-1 的表达发挥抗氧化作用<sup>[22-23]</sup>。白藜芦醇与姜黄素均可通过 ARE 特异地诱导抗氧化酶的表达, 故选取这 2 个化合物对所建立的模型进行验证, 结果表明 Hek293-ARE 细胞经白藜芦醇与姜黄素诱导处理后, Luc 的表达水平与在一定浓度范围内的诱导剂有量效关系且诱导作用

明显,从而验证模型的有效性。本实验选取穿心莲内酯、隐丹参酮、水飞蓟素、苦参碱和虎杖苷5种中药单体,观察其对ARE调控Luc表达的诱导作用,结果表明穿心莲内酯、隐丹参酮和水飞蓟素具有良好的诱导作用,且在一定浓度范围内与诱导剂呈量效关系。表明该抗氧化药物筛选细胞模型可用于具有抗氧化活性候选药物的初步筛选。

本实验发现白藜芦醇对Luc表达的诱导作用显著,而白藜芦醇与葡萄糖结合的产物虎杖苷的诱导作用不显著,经分析认为可能由于葡萄糖基团的存在,影响了虎杖苷分子的性质,使其不能有效地激活Keap1-Nrf2-ARE信号通路,从而影响了其药理作用。

药物筛选是药物发现过程中的重要环节,建立高效、灵敏、快速和高通量的筛选模型对药物筛选具有重要意义。本实验所建立的Hek293细胞系抗氧化药物筛选模型,具有活细胞的结构及其复杂功能,可真实反映药物在人机体内实际调节过程,不同于高度复杂的动物体系和器官培养模型,也不同于过于简单的分子模型。这种细胞模型不仅高效灵敏、快速简便,能够实现高通量、微量检测,而且能够较好地反映药物可能的作用机制。因此该模型的建立,为从天然药物中大规模快速筛选具有抗氧化作用的活性成分提供了一种有效的高通量筛选途径,并对抗氧化药物作用的机制研究具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] Matitim A C, Sanders R A, Watkins J B, *et al.* Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2003, 17(1): 24-38.
- [2] Petri S, Korner S, Kiaei M. Nrf2/ARE Signaling pathway: key mediator in oxidative stress and potential therapeutic target in ALS [J]. *Neurol Res Int*, 2012, 878030.
- [3] Krajka-Kuzniak V, Paluszczak J, Celewicz L, *et al.* Phloretamide, an apple phenolic compound, activates the Nrf2/ARE pathway in human hepatocytes [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 51: 202-209.
- [4] 李航, 段惠军. Nrf2/ARE 信号通路及其调控的抗氧化蛋白 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(3): 300-303.
- [5] Scapagnini G, Vasto S, Abraham N G. Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders [J]. *Mol Neurobiol*, 2011, 44(2): 192-201.
- [6] Muthusamy V R, Kannan S, Sadhaasivam K. Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(2): 366-376.
- [7] 钟敏. Nrf2-Keap1 抗氧化系统研究进展 [J]. *中国公共卫生*, 2006, 22(3): 360-361.
- [8] Lee J M, Johnson J A. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism [J]. *Biochem Mol*, 2004, 37: 139-143.
- [9] 蔡旗旗, 卢中秋. Keap-Nrf2/ARE 化学通路在抗氧化过程中的作用 [J]. *浙江医学*, 2010, 32(7): 1113-1116.
- [10] Liu C L, Chiu Y T, Hu M L. Fucoxanthin enhances HO-1 and NQO1 expression in murine hepatic BNL CL<sub>2</sub> cells through activation of the Nrf2/ARE system partially by its pro-oxidant activity [J]. *Agric Food Chem*, 2011, 59(20): 11344-11351.
- [11] Dinkova-Kostova A T, Wang X J. Induction of the Keap1/Nrf2/ARE pathway by oxidizable diphenols [J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 192(1/2): 101-106.
- [12] Sun Q, Meng Q T, Jiang Y, *et al.* Ginsenoside Rb<sub>1</sub> attenuates intestinal ischemia reperfusion induced renal injury by activating Nrf2/ARE pathway [J]. *Molecules*, 2012, 17(6): 7195-7205.
- [13] Purdom-Dickinson S E, Lin Y, Dwdek M, *et al.* Induction of antioxidant and detoxification response by oxidants in cardiomyocytes: evidence from gene expression profiling and activation of Nrf2 transcription factor [J]. *Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(1): 159-176.
- [14] Seo W Y, Goh A R, Ju S M, *et al.* Celastrol induces expression of heme oxygenase-1 through ROS/Nrf2/ARE signaling in the HaCaT cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(3): 535-540.
- [15] Lou H, Jing X, Ren D, *et al.* Eriodictyol protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neuron-like PC12 cell death through activation of Nrf2/ARE signaling pathway [J]. *Neurochem Int*, 2012, 61(2): 251-257.
- [16] Hara H, Ohta M, Ohta K, *et al.* Increase of antioxidative potential by tert-butylhydroquinone protects against cell death associated with 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress in neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *Mol Brain Res*, 2003, 119(2): 125-131.
- [17] R I 费雷谢尼. 动物细胞培养—基本技术指南 [M]. 第5版. 北京: 科学出版社, 2008.
- [18] Shen G, Jenog W S, Hu R. Regulation of Nrf2, NF-kappaB, and AP-1 signaling pathways by chemopreventive agents [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(11/12): 1648-1663.
- [19] Cheung K L, Yu S, Pan Z, *et al.* tBHQ-induced HO-1 expression is mediated by calcium through regulation of Nrf2

- p>binding to enhancer and polymerase II to promoter region of HO-1 [J].
- Chem Res Toxicol*
- , 2011, 24(5): 670- 676.
- [20] Ungvari Z, Bagi Z, Feher A, *et al.* Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(1): H18-H24.
- [21] Ren J, Fan C, Chen N, *et al.* Resveratrol pretreatment attenuates cerebral ischemic injury by upregulating expression of transcription factor Nrf2 and HO-1 in rats [J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(12): 2352-2362.
- [22] Balogun E, Hoque M, Gong P F, *et al.* Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element [J]. *Biochem J*, 2003, 371(3): 887-895.
- [23] Carmona-Ramirez I, Santamaria A, Tobon-Velasco J C, *et al.* Curcumin induces Nrf2 nuclear translocation and prevents glomerular hypertension, hyperfiltration, oxidant stress, and the decrease in antioxidant enzymes in 5/6 nephrectomized rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, doi: 10.1155/2012/269039, 2012.