

Nrf2-ARE 介导的黄酮类化合物抗氧化 应激的研究进展

Advances in Nrf2-ARE-mediated flavonoids against oxidative stress

李 涛¹ 邓放明¹ 覃 思¹ 吴艳阳¹ 单 杨² 李绮丽³

LI Tao¹ DENG Fang-ming¹ QIN Si¹ WU Yan-yang¹ SHAN Yang² LI Qi-li³

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南省农业科学院, 湖南 长沙 410125;

3. 湖南省农业科学院农产品加工研究所, 湖南 长沙 410125)

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha, Hunan 410128, China;

2. Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410125, China; 3. Hunan Agricultural Product

Processing Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410125, China)

摘要:氧化应激与人体健康密切相关,而黄酮类化合物因能激活人体内调节众多抗氧化基因表达的关键性防御通道——Nrf2-ARE 信号通道,对抗氧化应激有着十分显著的作用。文章介绍了 Nrf2-ARE 信号通道的激活、调控 Nrf2-ARE 激活的相关信号通路、受 Nrf2-ARE 调控的下游基因以及 Nrf2-ARE 介导的黄酮类化合物对炎症和凋亡反应的影响,同时对 Nrf2-ARE 介导的八大类主要黄酮类化合物在抗氧化应激方面的研究进行综述,并提出现阶段研究存在的主要科学问题及解决策略,以期对黄酮类化合物在预防和治疗氧化应激相关性疾病等领域研究提供参考。

关键词:黄酮类化合物; Nrf2-ARE; 氧化应激

Abstract: Oxidative stress has very close relationship with human health, and human organs violated by oxidative stress is likely to cause a series of physical diseases, such as headache, muscle aches, arthritis, atherosclerosis, diabetes, heart disease, cancer and neurodegenerative problem. However the flavonoids which widely exist in fruits, vegetables and other plant foods have a very significant role in the fight against oxidative stress, this is largely because it can activate the Nrf2-ARE which is the critical defense signaling pathway and regulating many antioxidant gene expression. In this paper, introduced the activation of Nrf2-ARE signaling pathway, the related signaling pathways of regulating Nrf2-ARE activation, the down-

stream genes regulated by Nrf2-ARE, and the influence of the Nrf2-ARE applied to inflammatory and apoptosis reaction. Meanwhile reviewed the research progress of eight kinds of flavonoids on the Nrf2-ARE signaling pathway and put forward the main scientific problems and solution strategy of the present study to provide reference for study of flavonoids in the field of prevention and treatment of oxidative stress-related diseases.

Keywords: flavonoids; Nrf2-ARE; oxidative stress

黄酮类化合物是广泛存在于水果、蔬菜等植物性食物中的一类多酚化合物,具有抗氧化、抗炎症、抗肿瘤、治疗心血管疾病和骨质疏松等多种生物活性。过去对于黄酮类化合物抗氧化活性的研究主要集中在如何有效清除过量自由基方面,而现在越来越多的研究证明黄酮类化合物不仅仅是通过捕获与中和自由基实现抗氧化,而更多是通过作用于细胞信号通路、激活体内转录因子、启动下游保护性基因的表达等来实现氧化应激与抗氧化的平衡调节,从而维持人体内环境的稳定,预防疾病,保护机体正常功能。

氧化应激是指机体在遭受各种有害刺激时(如外源体、病原体、促炎性细胞因子等),由于活性氧自由基(ROS)和活性氮自由基(RNS)等高活性分子过量生成,从而将氧化与抗氧化之间的平衡打破,导致细胞内抗氧化防御系统受损。若机体长时间处于氧化应激状态,最终将会导致肿瘤、细胞凋亡、组织坏死甚至死亡,因此氧化应激被认为是导致人类衰老的一个重要因素。许多疾病的发生或发展也在一定程度上与氧化应激损伤有关。

核因子 NF-E2 相关因子(nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2)是调节胞内众多抗氧化基因表达的关键性因子,其与抗氧化反应元件(antioxidant response element,

基金项目:湖南省自然科学基金青年人才培养联合基金(编号:14JJ6067)

作者简介:李涛,男,湖南农业大学在读博士研究生。

通讯作者:李绮丽(1986—),女,湖南省农业科学院助理研究员,博士。E-mail: 358671780@qq.com

邓放明(1962—),男,湖南农业大学教授,博士。

E-mail: fmdenghnau@sina.com

收稿日期:2016-03-02

ARE)共同构成的 Nrf2-ARE 信号通路是细胞抵御氧化应激的重要通路。因此,本文就近年来黄酮类化合物介导的 Nrf2-ARE 抗氧化应激的研究进展作一总结,以期黄酮类化合物在预防和治疗氧化应激相关性等疾病等领域的研究提供参考。

1 黄酮类化合物

黄酮类化合物的基本化学结构是黄烷核,由 15 个碳原子以 C₆-C₃-C₆ 的结构形成骨架,主要为 2 个芳香环(A 环和 B 环)通过一个中央三碳链连接而成,中央三碳链往往也形成杂环(C 环)。根据三碳链的氧化程度、B 环(苯基)连接的位置(2 位或 3 位)以及三碳链是否与 B 环构成环状结构等特点,黄酮类化合物可分为黄酮醇类(flavonols)、二氢黄酮醇类(dihydroflavonol)、黄烷醇类(flavanols)、黄酮类(flavones)、二氢黄酮类(dihydroflavone)、异黄酮类(isoflavones)、二氢异黄酮类(dihydroisoflavone)、花色苷(anthocyanidins)八大类^[1](见表 1)。

2 Nrf2-ARE 信号通道

Nrf2-ARE 信号通道被认为是细胞抵抗氧化应激最重要的通道之一,其对抗氧化功能的调节可以从 Nrf2-ARE 的激活、调控 Nrf2-ARE 激活的相关信号通路、受 Nrf2-ARE 调控的下游基因三个方面进行介绍。

表 1 黄酮类化合物的代表物质及来源[†]

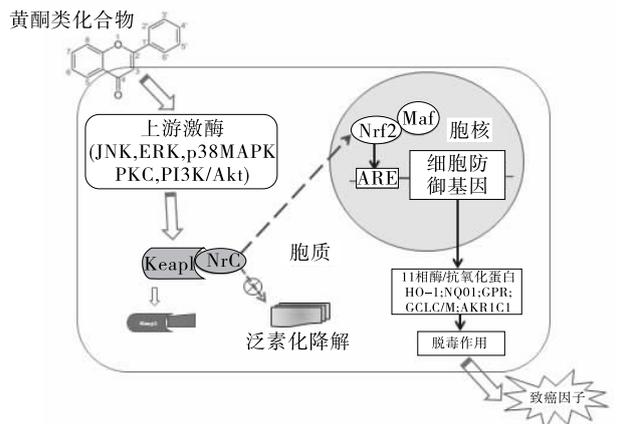
Table 1 Structure and representative of flavonoids

类型	代表物质	食物来源
黄酮醇类	槲皮素	八角莲、红旱莲、银杏
	山奈酚	山奈、槐树
二氢黄酮醇类	二氢槲皮素	八角莲、红旱莲、银杏叶
	表儿茶素	葡萄、茶叶、莲子
黄烷醇类	原花青素 B ₁	莲蓬、莲子
	无色矢车菊素	番石榴、白饭豆
黄酮类	芹菜素	芫花
	木犀草素	金银花
	黄芩素	黄芩
	川陈皮素	橘皮
二氢黄酮类	橙皮苷	橘皮
	甘草苷	甘草
	葛根素	葛根
异黄酮类	大豆素	葛根
	鱼藤酮	苦檀子、昆明鸡血藤根
二氢异黄酮类	紫檀素	广豆根
	高丽槐素	高丽槐
花色苷类	矢车菊素	樱桃、桑葚
	飞燕草素	紫甘薯、蓝莓
	天竺葵素	红萝卜

[†] 表儿茶素及原花青素 B₁ 属黄烷-3-醇类;无色矢车菊素属黄烷-3,4-二醇类。

2.1 Nrf2-ARE 的激活

Nrf2-ARE 是近年新发现的机体抵抗内外界氧化和化学反应等刺激的防御性转导通路。该通路在体内的运行是从 Nrf2 的激活开始的,而激活的本质是与其在细胞质中的结合蛋白 Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1)分离从而进入细胞核内发挥其转录因子的作用。正常生理条件下,Nrf2 在细胞质中与 Keap1 结合处于非活性、易降解的状态。当受到内外界氧化应激、亲电或化学物质刺激时 Nrf2 被激活,目前国际上公认的 Nrf2 的活化方式主要有两种:一种是使得 Keap1 的 IVR 区两处的半胱氨酸(Cysteine)残基 Cys273 和 Cys288 发生突变,从而导致依赖 Keap1 的 Nrf2 的泛素化降解程度降低,在细胞内的稳定性增加;另一种则是通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、蛋白激酶 C(PKC)等多条蛋白激酶途径直接对 Nrf2 磷酸化的方式促使其与 Keap1 分离。激活的 Nrf2 进入细胞核,与小 Maf 等一些 bZIP 小分子蛋白形成异二聚体^[2]。在成功识别抗氧化反应元件 ARE 后与之结合,并启动其下游的 II 相解毒酶、抗氧化蛋白、蛋白酶体、分子伴侣等基因转录和表达以抵抗内外界的有害刺激(见图 1)。



HO-1. 血红素氧合酶 1 NQO1. 醌氧化还原酶 1 GPx. 谷胱甘肽过氧化物酶 GCLC/M. γ 谷氨酰半胱氨酸合成酶 AKR1C1. 醛固酮类还原酶家族 1 成员 C1

图 1 Nrf2 介导的黄酮类化合物对细胞的抗氧化保护作用

Figure 1 The antioxidative effect of Nrf2-mediated on flavonoids

2.2 调控 Nrf2-ARE 激活的相关信号通路

研究^[3]证实,PKC、PI3K、MAPKs 这 3 条信号通路是调控 Nrf2-ARE 信号通路激活的主要途径。PKC 可以直接磷酸化 Nrf2 40 位丝氨酸,使其与 Keap1 解离,从而激活 Nrf2; PI3K 可以促进 Nrf2 的核转位,使其在细胞核中聚集,并与 ARE 结合从而激活下游信号通路;MAPKs 通路中各种分子包括 ERK、JNK 和 p38 也参与 Nrf2 的调节。Hu Yuan-yuan 等^[4]研究发现,ERK 和 JNK 能促进 ARE 介导的效应,Nrf2 被 p38 磷酸化则可加强 Keap1/Nrf2 结合,抑制 Nrf2 活性。国际上对黄酮类物质调控 Nrf2 信号通道的激活已有部分研究成果。Yang J H 等^[5]发现鼠李素能够促进 ERK1/2、PKC

和 MAPK 的磷酸化水平,从而提高了肝癌细胞中 Nrf2、HO-1 和 GCL 的蛋白表达。Zhai Xiao-han 等^[6]发现金雀异黄酮能有效提高 GCLC 和 HO-1 的 mRNA 和蛋白质,同时 ERK1/2 和 PKC 抑制剂能直接影响 Nrf2 的表达,而 SiNrf2 会明显降低氧化还原酶的表达水平。Lee SE 等^[7]研究发现 siRNA 及 PKC- δ 和 p38 MAPK 抑制剂能显著阻断漆黄素诱导的脐静脉内皮细胞中 Nrf2 介导的 HO-1 的表达。

2.3 受 Nrf2-ARE 调控的下游基因

Nrf2-ARE 之所以重要是因为其激活后能够启动下游多种保护性基因的表达,这些基因表达的蛋白主要可分为以下几类:Ⅱ相解毒酶、氧化还原酶类、转运蛋白等。Ⅱ相解毒酶包括醌氧化还原酶 1(NQO1)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)、还原型谷胱甘肽(GSH)、UDP 糖基转移酶(UGT)、醛酮还原酶(AKR)等。氧化还原酶包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、谷氨酸半胱氨酸连接酶(GCL)、硫氧还蛋白(Trx)、硫氧还蛋白还原酶(TrxR)、过氧化物还蛋白(Prx)、血红素氧合酶 1(HO-1)等。转运蛋白如多药耐药蛋白(MRP)等。Espinosa C 等^[8]研究发现将白茶黄酮物质与阿霉素结合,可以显著提高 Nrf2、GST、NQO1 和 HO-1 的表达水平,但同时会降低 CAT、SOD 和 GR 的活性与表达。Krajka-KuZniak V 等^[9]将山楂提取的黄酮类物质作用于正常肝细胞和肝癌细胞中,发现其能通过对 Nrf2 的调控来提高两种细胞中 GSTA、GSTP、GSTM、GSTT、NAD(P)H、NQO1 和 HO-1 等下游基因 mRNA 及蛋白质的表达。

3 Nrf2-ARE 介导的黄酮类化合物炎症和凋亡反应的影响

3.1 对炎症反应的影响

炎症反应和氧化应激关系紧密。Nrf2-ARE 介导的细胞防御功能基因不但能抵御氧化应激,同时对于促炎基因的表达也能起到抑制作用^[10]。在炎症引起的组织损伤早期阶段,Nrf2 调节的抗氧化细胞保护酶的上调,如 HO-1 的上调会促进衍生代谢产物(如 CO、胆绿素、胆红素等)的产生,而这些衍生代谢物的产生又可以抑制促炎因子(如细胞因子、趋化因子、细胞粘附分子、基质金属蛋白酶、NO、COX-2 和 iNOS 等)的产生,从而发挥抗炎症的作用^[11]。Sun GY 等^[12]将槲皮素作用于 BV-2 小鼠小胶质细胞发现,槲皮素能通过上调 Nrf2 诱导的 HO-1 蛋白的表达来抑制脂多糖(LPS)诱导 NO 的产生,从而使小鼠避免内毒素休克。Wang Rui 等^[13]发现在小鼠巨噬细胞中甘草中提取的黄酮类物质甘草素(liquiritigenin)和异甘草素(isoliquiritin)能通过抑制 iNOS 和 COX-2 的 mRNA 和蛋白的表达来抵御 LPS 诱导的炎症反应,进一步研究表明这是由于其能激活 Nrf2 介导的抗氧化酶与脱毒酶包括 UGT1A1、NQO1、HO-1 的表达。

3.2 对细胞凋亡的影响

Nrf2 信号通路是调控细胞对抗外来异物和氧化损伤的关键通路,更多的研究^[14-17]开始证实其在细胞凋亡中也发

挥着一定的作用。对于正常细胞,抗氧化信号通道的激活可以增强下游抗氧化蛋白和脱毒酶的表达,从而阻止细胞诱变为突变细胞;还能够通过抑制各种炎症信号通道来阻止突变细胞演变为良性瘤细胞甚至恶性瘤细胞。对于癌细胞,能够通过激活细胞凋亡通道或者调节细胞周期来抑制癌细胞。Nrf2 能够通过提高细胞内 GSH 水平来调节对凋亡信号的敏感性。GSH 可使凋亡蛋白 bax 的表达下降,而促进抗凋亡蛋白 bcl-2 的表达,说明 GSH 在机体内可能是通过清除自由基,调节与凋亡相关基因 bax/bcl-2 的比值来减少细胞凋亡,Niture 等^[14-16]发现 Nrf2 的过度表达可以提高 Bcl-xl 和 Bcl-2 蛋白的表达,从而抑制细胞凋亡提高存活率。另外,研究^[17]还发现 keap1 与凋亡相关蛋白 PGAM5、FAC1、p26 和 SQSTM1 均有关,其中 PGAM5 与 Keap1 结合是调节 Nrf2 通路和凋亡的直接作用者。Hu Rong 等^[18]发现木蝴蝶素 A 能够激活 caspase-3 和 caspase-9,降低 Bcl-2 蛋白并提高 Bax 蛋白的表达。另外,木蝴蝶素 A 也能提高 Nrf2 的表达使其转移到细胞核。Hseu YC 等^[19]发现用卡瓦胡椒素 B 处理细胞,会导致细胞凋亡,这与 DNA 碎片化,线粒体功能障碍,细胞色素 C 释放,caspase-3 和 caspase-9 活化,以及 Bcl-2/Bax 调节异常有关。同时发现通过上调 Nrf2/HO-1 的表达也可导致细胞的凋亡。

4 黄酮类化合物对 Nrf2-ARE 抗氧化信号通道的调控

过去对于天然产物抗氧化活性的研究,主要集中在对自由基如 DPPH 法^[20]、ABTS 法^[21]、 $\cdot O_2^-$ ^[22] 和 $\cdot OH$ ^[23] 等的有效清除能力方面,而近几年对于氧化应激的产生机制以及天然产物作用于氧化应激信号通道的研究受到越来越多学者的关注,因此,就主要的八大类黄酮化合物对 Nrf2-ARE 抗氧化信号通道的调控机制进行总结。

4.1 黄酮醇类和二氢黄酮醇类

黄酮醇类较广泛地分布于双子叶植物的根茎、花、叶和果实中,其中以槲皮素最为常见。二氢黄酮醇类在双子叶植物如豆科、蔷薇科植物中的分布也较普遍,同时也存在于裸子植物、单子叶植物姜科的少数植物中。二氢黄酮醇是黄酮醇的还原产物,常与相应的黄酮醇类共存于同一种植物体中,如满山红叶中既有槲皮素又有其还原产物二氢槲皮素。

代重山等^[24]以人正常肝细胞 LO₂ 细胞为研究对象,通过加入槲皮素后可明显改善喹烯酮诱导的氧化应激、DNA 损伤、线粒体膜电位下降以及细胞凋亡,并在不同程度上激活 p-JNK、p-p38 MAPK、p-ERK、Nrf2、HO-1 的表达;进一步通过使用 MAPKs 家族抑制剂 SB203580(p38 MAPK 抑制剂)、PD98059(ERK 抑制剂)、SP60025(JNK 抑制剂)单独或联合槲皮素预处理,可在不同程度上加剧喹烯酮诱导的凋亡,同时明显抑制了槲皮素诱导的 Nrf2、HO-1 的激活,说明槲皮素可通过激活 MAPK/Nrf2 信号通路上调 HO-1 表达改善喹烯酮致 LO₂ 细胞的氧化应激及遗传毒性。邓明等^[25]用槲皮素处理乙醇(100 mmol/L)孵育的人原代肝细胞时发现,作用 24 h 后可使 Nrf2 的核转位表达明显升高,并进一步

提高下游 HO-1 基因的表达,使得乙醇孵育所致的细胞 GSH 耗竭、丙二醛(MDA)升高及胞内门冬氨酸转氨酶(AST)与乳酸脱氢酶(LDH)的释放明显减轻。Kim JS 等^[26]发现槲皮素衍生物能通过激活 ERK 和 PI3K-Akt 信号通道提高 HO-1 和 Nrf2 的表达。Carrasco-Pozo C 等^[27]将槲皮素作用于小鼠和人结肠癌细胞,发现槲皮素能抑制 NF- κ B 通道的激活并提高 Nrf2 的转录活性。

Liang Lu 等^[28]发现二氢槲皮素能通过激活 ERK1/2、Akt、JNK 这 3 条信号通路来促进 Nrf2 的核转位,并进一步与抗氧化反应元件(ARE)的增强子序列结合来提高 Nrf2 的转录活性,进而提高下游基因 HO-1、NQO1 的表达从而发挥抗氧化作用。Manigandan K 等^[29]在研究 1,2-二甲基胍(DMH)诱导的小鼠结肠癌时发现,二氢槲皮素能够提高 Nrf2 的表达来促进抗氧化途径,同时它还能通过下调调节因子 TNF- α 、COX-2、 β -catenin 和 Cyclin-D1 等的水平来抑制 NF- κ B 和 Wnt 通路。两者作用的结合使得二氢槲皮素能成为一种有效的天然成分,为结肠癌的防治提供新的途径。

4.2 黄烷醇类

黄烷醇类在苹果、葡萄、红葡萄酒、莲子、莲蓬、茶和可可粉中的含量十分丰富。黄烷醇类化合物主要包括两类:第一类为天然黄烷-3-醇类,其衍生物称为儿茶素类,包括黄烷-3-醇单元构成的低聚体和多聚体,少数 3 位糖苷及没食子酸酯等,如儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、原花青素 B₁~B₄ 等;第二类为黄烷-3,4-二醇类,其衍生物被称为无色花色素类,如无色矢车菊素、无色天竺葵素等。

黄烷醇类可以通过 Nrf2 介导的抗氧化、解毒作用来对机体内各个器官进行保护。Rodríguez-Ramiro 等^[30]在使用原花青素 B₂(PB2)对 Caco-2 细胞进行处理后发现,肠抗氧化解毒作用最为重要的谷胱甘肽 S-转移酶 P1(GSTP1)的活性和表达呈显著升高。这是因为 PB2 能通过激活 ERKs 和 p38 MAPK 从而促进 Nrf2 的核转移、Nrf2 在核中的积累和与 ARE 的结合,使得 GSTP1 以及其他酶大量表达进而发挥抗氧化作用。江蓓等^[31]在对葡萄籽原花青素(GSP)的研究中也有类似的结论,他们发现 GSP 可通过 Nrf2 调节糖尿病大鼠肾组织谷胱甘肽 S-转移酶 μ 亚型(GSTM)的表达,从而对肾起保护作用。对表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)的研究^[32]发现,Nrf2/HO-1 信号通路是 EGCG 阻止顺铂引起肾毒的主要途径。Nair 等^[33]也发现 EGCG 与莱菔硫烷的结合能调节前列腺癌细胞中 Nrf2 介导的基因表达。Tsai 等^[34]通过测定 Nrf2 核转位、NADPH 氧化产物及 Nrf2 下游的多种保护性基因的表达,从而判定 EGCG 对 Nrf2-ARE 抗氧化途径的影响。

4.3 黄酮类和二氢黄酮类

黄酮类指的是狭义的黄酮,即 2-苯基色原酮(2-苯基苯并 γ 吡喃酮)类,二氢黄酮又名黄烷酮,是黄酮类 C₂₋₃ 位的双键氢化后的衍生物。黄酮类广泛分布于被子植物中,如芸香科枳实、金橘、宽皮橘中的川陈皮素,菊科野菊花中的木犀草素、伞形科芹菜中的芹菜素等,另外在玄参科、苦苣苔科及豆

科植物中也存在较多;二氢黄酮类在被子植物中分布也较普遍,如芸香科橘皮中的橙皮苷、蔷薇科甘草中的甘草苷等,另外在姜科、菊科、杜鹃花科和豆科中也分布较多。

吴广等^[35]选用芹菜素作用于小鼠巨噬细胞 RAW 264.7,发现其能降低胞浆内核转录因子 Nrf2 含量,并增高其在细胞核内水平,同时采用 si RNA 干扰 Nrf2 表达后 HO-1 表达量呈明显降低。任冬梅等^[36]发现木犀草素能剂量依赖性增强 ARE 的荧光强度,上调 Nrf2 及其下游基因 HO-1、NQO1、GCLM 的 mRNA 和蛋白表达,降低内源性 ROS 水平;采用木犀草素和 H₂O₂ 协同处理细胞,可表现出很好的保护作用。Zhang Zai-jun 等^[37]将黄芩素作用于 PC12 细胞能明显提高 Nrf2 和 HO-1 的表达,抑制剂能有效阻断 PKC、PI3K 和 AKT 的磷酸化。Kang CH 等^[38]发现 5-羟基-3,6,7,8,3'-4'-六甲氧基黄酮能通过抑制 NF- κ B 的活性来下调 iNOS 的表达,同时也能激活 Nrf2 从而增加 HO-1 的表达。Lakshmi A 等^[39]研究发现,将橘皮素作用于 DMBA 诱导的胸腺癌细胞老鼠能显著降低脂质过氧化、炎症细胞因子和 DNA 损伤,并有效调节 Nrf2/keap1 及下游蛋白表达的正常化。Hsiao PC 等^[40]研究发现川陈皮素能通过抑制胞外 ERK 激酶的活性来诱导急性髓系白血病耐药细胞的 G0/G1 期的阻滞,以及通过调控 caspase-8、caspase-9 来诱导细胞凋亡。Wu Pei-shan 等^[41]发现木犀草素和芹黄素均能激活 MAPK 和 Nrf2 信号通道,其中木犀草素由于具有更高的 MAPK、Nrf2 和 UPR 激活能力及 ROS 清除能力,故能比芹菜素发挥更强大的细胞保护效应。Hong Yan 等^[42]对橙皮苷的研究得出,橙皮苷能通过激活 Nrf2/Akt 信号通道和抑制 RAGE/NF- κ B 信号通道从而抵御氧化应激和炎症。

4.4 异黄酮类和二氢异黄酮类

异黄酮类为具有 3-苯基色原酮基本骨架的化合物,与黄酮相比其 B 环位置连接不同,如豆科植物葛根中的葛根素、大豆苷及大豆素都是异黄酮衍生物。二氢异黄酮类可看作是异黄酮类 C₂ 与 C₃ 双键被还原成单键的一类化合物。如豆科植物高丽槐中的高丽槐素,广豆根中的紫檀素就属于二氢异黄酮的衍生物。

黎荣等^[43]研究了葛根素对 6-羟多巴胺(6-OHDA)致帕金森病(PD)大鼠黑质组织中 Nrf2/ARE 信号通路的影响,发现葛根素能有效地增加 PD 大鼠黑质中 GSH-Px、SOD 活性,同时降低丙二醛(MDA)含量(P<0.01);葛根素低、中、高剂量组能明显上调黑质 COX mRNA 水平,显著增加 Nrf2、Keap1 蛋白表达。Ma Jie-qiong 等^[44]发现葛根素能有效提高 SOD、CAT 和 GPx 的活性以及 GSH 的水平,同时也能降低 DNA 损伤并增加 NQO1、GST 和 HO-1 的表达。Zhang Jing 等^[45]研究发现葛根素能减弱血管性痴呆大鼠认知功能障碍和氧化应激引起的慢性缺血,在分子水平上可上调 Nrf2、FoxO1、FoxO3 和 FoxO4 转录因子的表达。Li Cheng-chong 等^[46]发现葛根素能通过调节 PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通道引起 GSH 的上调和 Nrf2 的核转位,PI3K 和 GSK-3 β 抑制剂能有效阻断 ERK1/2、JNK、MAPK 的磷酸化激活。

4.5 花色素类

花色素类是一类以离子形式存在的色原烯的衍生物,与其他黄酮类化合物不同的是分子中含氧正离子。自然状态下,花色素常与各种单糖形成苷的形式,故又称花色苷,由于具有吸光性而表现出蓝、红、紫等色彩。目前已知的花色素有近百种,较为常见的花色素有 6 种,即矢车菊素(cyaniding)、飞燕草素(delphinidin)、天竺葵素(pelargonidin)、牵牛色素(petunidin)、芍药色素(peonidin)和锦葵色素(malvidin)。

花色素不但能作用于 PI3K/Akt 和 NF- κ B 途径,抑制环氧化酶(COX-2)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达,实现抗炎作用,还能通过 Nrf2/ARE 信号通路,调节 II 相抗氧化酶的表达实现抗氧化,最终实现预防癌变的作用。Shih 等^[47]发现矢车菊素,飞燕草色素,锦葵色素不仅可以激活 Nrf2 作用于 ARE,诱导 II 相抗氧化蛋白谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、醌氧化还原酶 1(NQO1)等的表达,从而抑制半胱天冬酶-3(Caspase-3)的活性。而且能抑制 LPS,IFN- γ 诱导的 NF- κ B 的活化,通过作用 PI3K 和 MAPKs 途径,抑制前列腺素 E(PGE2)和一氧化氮的产生。Jeong 等^[48]在研究黑大豆种子种皮中提取的花青素在小鼠小神经胶质细胞 BV2 中的作用时发现其能显著降低 LPS 诱导的促炎症调解基因 COX-2、iNOS 和肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素(IL-1 β)的表达。不仅如此,花青素还能通过对 ERK、JNK、p38MAPK 和 Akt 的负调节来达到抑制 NF- κ B 的作用。

花青素还能通过 ERK、JNK、p38-MAPK 介导的 Caspase 的活化来促使肿瘤细胞凋亡来发挥抗肿瘤的作用。Yan 等以 TNF- α 诱导的小鼠血管平滑肌细胞(VSMCs)为模型,发现矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(C3G)能促使其细胞凋亡并抑制其转移。C3G 不但能明显增强 caspase-3、caspase-9 和 Bax 并抑制 Bcl-2 的表达从而促进 VSMCs 的凋亡,并呈浓度依赖性的方式。同时 C3G 还能通过抑制 MMP-2、MMP-9 的表达和活性来减少肿瘤新血管的形成,从而防止其扩散转移^[49]。

5 黄酮类化合物研究存在的科学问题及解决策略

氧化应激与人体健康有着极为密切的关系,可以说人体内几乎所有的器官都会受到氧化应激的侵害,从而引发一系列的身体不适与疾病,如全身乏力、肌肉酸痛、头痛、关节炎、动脉粥样硬化、心脏病、糖尿病、癌症,以及阿尔兹海默症、帕金森病等神经退化性问题。Nrf2-ARE 信号通路的发现为实现人体对氧化应激的有效防御和保护提供了新的方向,也使其成为近些年来抗氧化领域人们争相研究的热点。不仅如此,Nrf2-ARE 信号通路也已成为抗癌化学疗法的新靶点,利用生物技术干扰或对其抑制剂的研发和使用将有可能改善化疗药物的治疗效果,为癌症的治疗提供一种新途径;通过对该通路的调节,还可以起到减少细胞凋亡、减少器官损伤和延缓衰老等多方面的作用^[50]。

目前大量的研究^[33-35]已经证明黄酮类化合物对人体具有显著的化学预防作用。随着后基因组时代的到来和黄酮类化合物的迅速发展,越来越多的研究集中在其营养基因组学的功能研究领域,但目前仍然存在许多问题亟待研究解决。

5.1 存在的科学问题

5.1.1 对人体生理功能调节作用缺乏营养基因组学的理论依据 中国在饮食、中药、食品加工等方面应用黄酮类物质拥有悠久的历史,然而由于中国基础研究起步较晚,对以黄酮类物质为代表的植物化合物对人体产生的各种生理功能的机理研究不够重视,而传统的中药学理论和经验也很难对这些作用机理进行解释并提供充足的试验数据加以证明,更谈不上从营养基因组学的角度去研究、阐述基因和功能的关系。因此从营养基因组学的角度出发来研究黄酮类化合物对人体的化学预防作用机理,显得十分迫切和重要。

5.1.2 黄酮类化合物食品、药品进入人体后与肠道微生物菌群的相互作用关系 肠道微生物是人体代谢的重要参与者,它们不仅为人体代谢过程提供底物、酶和能量,而且微生物的许多代谢产物能对人的某些生理功能起到调节和促进作用,同时肠道黏膜表面与微生物的共同作用为人体提供了重要的免疫屏障。由于人体的肠道微生物种群数量庞大,种类繁多,肠道微生物与各类营养成分之间相互作用关系也异常的错综复杂,因此,一直以来人们也没有将这类伴随人类共同进化的共生体列入食品安全、营养和功能评价的范畴。因此如何在营养功能评价的同时考虑肠道微生物的作用和影响已经成为人们面临的新问题。

5.2 解决策略

(1) 利用先进的分子生物技术为黄酮类化合物对人体生理功能调节作用提供理论和试验依据。随着第二代高通量测序技术的成熟和普及,借助基因芯片、转录组测序等先进的测序手段来分析黄酮类化合物对人类全基因组表达变化的影响,从而找出其对人体多种疾病相关基因表达的影响。利用蛋白免疫印迹(western blotting)、细胞因子测定技术(elisa)研究黄酮类化合物对人体细胞中抗氧化酶、炎症和细胞凋亡相关蛋白的表达以及炎症细胞因子产生的影响;利用报告基因检测(luciferase reporter gene assay)和凝胶迁移测试(EMSA)来研究黄酮类化合物对抗氧化通道中转录因子 Nrf2、炎症通道中转录因子 NF- κ B,AP-1 及细胞凋亡相关转录因子活性的影响,从转录调控水平来进一步阐述其作用机理。以上技术的应用可全面阐述黄酮类化合物的食品保健功能及对癌症等慢性疾病的化学预防作用机理,从而为其在食品、医药等领域的进一步应用打好理论基础。

(2) 不同人群由于膳食习惯的不同,对于营养成分的摄入有很大不同,由此引起的肠道微生物菌群组成、结构与功能也会存在较大差异。不过随着宏基因组学、宏转录组学等技术的发展,肠道微生物的生理功能逐渐在基因层面得到发掘和证实。同时借助营养基因组学、药物动力学以及食品微

生物学等多个学科的先进技术,如利用基于 16 sRNA 的实时定量荧光聚合酶链反应技术(real timeqPCR)、荧光原位杂交(FISH)及变性梯度凝胶电泳(DGGE)等方法来对黄酮类化合物及其它营养成分对肠道微生物种群及数量的影响变化进行统计和分析,并从中筛选出主要的益生菌、有害菌的菌群生长情况变化,进而从多个层面把握食品营养成分对人体的安全性、功能性的作用和影响。

参考文献

- [1] MARCELLO Iriti, ELENA Maria Varoni. Chemopreventive Potential of Flavonoids in Oral Squamous Cell Carcinoma in Human Studies[J]. *Nutrients*, 2013, 5: 2 564-2 576.
- [2] 戈孟雪, 屈强, 周宏灏. 调控 Nrf2-Keap1-ARE 信号通路的中药有效成分研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2015, 20(6): 707-712.
- [3] NGUYEN T, SHERRATT P J, PIEKETT C B. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element[J]. *Annual Revi. Pharmacol Toxicol*, 2003(43): 233-236.
- [4] HU Yuan-yuan, HOU Zuo-xu, LIU Dong-yang, et al. Tartary buckwheat flavonoids protect hepatic cells against high glucose-induced oxidative stress and insulin resistance via MAPK signaling pathways[J]. *Food & Function*, 2016, 7: 1 523-1 536.
- [5] YANG JH, SHIN BY, HAN JY, et al. Isorhamnetin protects against oxidative stress by activating Nrf2 and inducing the expression of its target genes[J]. *Toxicol Appl. Pharmacol*, 2014, 274(2): 293-301.
- [6] ZHAI Xiao-han, LIN Mu-sen, ZHANG Feng, et al. Dietary flavonoid genistein induces Nrf2 and phase II detoxification gene expression via ERKs and PKC pathways and protects against oxidative stress in Caco-2 cells[J]. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2013, 57(2): 249-259.
- [7] LEE S E, JEONG SI, YANG H, et al. Fisetin induces Nrf2-mediated HO-1 expression through PKC- δ and p38 in human umbilical vein endothelial cells[J]. *J. Cell Biochem.*, 2011, 112(9): 2 352-2 360.
- [8] ESPINOSA C, PEREZ-LLAMAS F, GUARDIOLA FA, et al. Molecular mechanisms by which white tea prevents oxidative stress[J]. *J. Physiol. Biochem.*, 2014, 70(4): 891-900.
- [9] KRAJKA-KUZNIAK V, PALUSZCZAK J, OSZMIANSKI J, et al. Hawthorn (*Crataegus oxyacantha* L.) bark extract regulates antioxidant response element (ARE)-mediated enzyme expression via Nrf2 pathway activation in normal hepatocyte cell line[J]. *Phytother Res.*, 2014, 28(4): 593-602.
- [10] KIM J, CHA Y N, SURH Y J. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders[J]. *Mutat Res.*, 2010, 690: 12-23.
- [11] 覃思, 蒋立文, 侯德兴. 膳食多酚生理功能的营养基因组学研究现状与展望[J]. *中国食品学报*, 2011, 11(9): 155-169.
- [12] SUN G Y, CHEN Zi-hong, JASMER K J, et al. Quercetin attenuates inflammatory responses in BV-2 microglial cells: role of mapks on the nrf2 pathway and induction of heme oxygenase-1[J]. *PLoS One*, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0141509.
- [13] WANG Rui, ZHANG Cheng-yue, BAI Li-ping, et al. Flavonoids derived from liquorice suppress murine macrophage activation by up-regulating heme oxygenase-1 independent of Nrf2 activation[J]. *International Immunopharmacology*. 2015, 28(2): 917-924.
- [14] NITURE S K, JAISWAL A K. Inhibitor of Nrf2 (INrf2 or Keap1) protein degrades Bcl-xL via phosphoglycerate mutase 5 and controls cellular apoptosis[J]. *J. Biol. Chem.*, 2011, 286(52): 44 542-44 556.
- [15] NITURE S K, JAISWAL A K. Nrf2 protein up-regulates anti-apoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis[J]. *J. Biol. Chem.*, 2012, 287(13): 9 873-9 886.
- [16] NITURE S K, JAISWAL A K. Nrf2-induced antiapoptotic Bcl-xL protein enhances cell survival and drug resistance[J]. *Free Radic. Biol. Med.*, 2013, 57: 119-131.
- [17] STEPKOWSKI T M, KRUSZEWSKI M K. Molecular cross-talk between the NRF2/KEAP1 signaling pathway, autophagy, and apoptosis[J]. *Free Radic. Biol. Med.*, 2011, 50(9): 1 186-1 195.
- [18] HU Rong, CHEN Nan, YAO Jing, et al. The role of Nrf2 and apoptotic signaling pathways in oroxylin A-mediated responses in HCT-116 colorectal adenocarcinoma cells and xenograft tumors[J]. *Anticancer Drugs*, 2012, 23(6): 651-658.
- [19] HSEU Y C, LEE M S, WU Chi-wei, et al. The chalconeflavokawain B induces G2/M cell-cycle arrest and apoptosis in human oral carcinoma HSC-3 cells through the intracellular ROS generation and downregulation of the Akt/p38 MAPK signaling pathway[J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60(9): 2 385-2 397.
- [20] REIS L C, CARNEIRO L M, BRANCO C R, et al. Comparison of conventional microwave and focused microwave-assisted extraction to enhance the efficiency of the extraction of antioxidant flavonols from jocote pomace (*Spondias purpurea* L.)[J]. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 2015, 70: 160-169.
- [21] PAI T V, SAWANT S Y, GHATAK A A, et al. Characterization of Indian beers: chemical composition and antioxidant potential[J]. *J. Food Sci. Technol.*, 2015, 52(3): 1 414-1 423.
- [22] ZENGIN G, UYSAL A, GUNES E, et al. Survey of phytochemical composition and biological effects of three extracts from a wild plant (*Cotoneaster nummularia* Fisch. et Mey.): a potential source for functional food ingredients and drug formulations[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): 1-13.
- [23] ABBASI A M, SHAH M H, LI T, et al. Ethnomedicinal values, phenolic contents and antioxidant properties of wild culinary vegetables[J]. *J. Ethnopharmacol*, 2015, 162: 333-345.
- [24] 代重山, 李道稳, 汤树生, 等. 槲皮素通过激活 MAPK/Nrf2 信号通路上调 HO-1 表达改善喹烯酮致 LO2 细胞的氧化应激及遗传毒性[C]//中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学分会第十一届会员代表大会暨第十三次学术讨论会与中国毒理学会兽医毒理专业委员会第五次学术研讨会论文集. 长沙: 中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学分会, 2015: 114-115.
- [25] 邓玥, 揭琴丰, 郝丽萍, 等. 槲皮素通过促进 Nrf2 转位拮抗人

- 肝细胞酒精性氧化损伤[J]. 营养学报, 2010, 32(6): 532-535.
- [26] KIM J S, SONG H J, KO S K, et al. Quercetin-3-O-beta-D-glucurono pyranoside (QGC)-induced HO-1 expression through ERK and PI3K activation in cultured feline esophageal epithelial cells[J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(2): 85-92.
- [27] CARRASCO-POZO C, CASTILLO R L, BELTRAN C, et al. Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage: role of NF- κ B and Nrf2[J]. *J. Nutr. Biochem.*, 2016, 27: 289-298.
- [28] LIANG Lu, GAO Chang, LUO Meng, et al. Dihydroquercetin (DHQ) induced HO-1 and NQO1 expression against oxidative stress through the Nrf2-dependent antioxidant pathway[J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61(11): 2755-2761.
- [29] MANIGANDAN K, MANIMARAN D, JAYARAJ R L, et al. Taxifolin curbs NF- κ B-mediated Wnt/ β -catenin signaling via up-regulating Nrf2 pathway in experimental colon carcinogenesis[J]. *Biochimie*, 2015, 119: 103-112.
- [30] ILDEFONSO R R, SONIA R, LAURA B, et al. Procyanidin B2 induces Nrf2 translocation and glutathione S-transferase P1 expression via ERKs and p38-MAPK pathways and protect human colonic cells against oxidative stress[J]. *European Journal of Nutrition*, 2012, 51(7): 881-892.
- [31] 江蓓, 李保应, 甄军晖, 等. 葡萄籽原花青素通过 Nrf2 调节糖尿病大鼠肾组织 GSTM 的表达[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(8): 1596-1591.
- [32] SAHIN K, TUZCU M, GENCOGLU H, et al. Epigallocatechin-3-gallate activates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats[J]. *Life Science*, 2010, 87(7/8): 240-245.
- [33] NAIR S, BARVE A, KHOR T O, et al. Regulation of Nrf2- and AP-1-mediated gene expression by epigallocatechin-3-gallate and sulforaphane in prostate of Nrf2-knockout or C57BL/6J mice and PC-3 AP-1 human prostate cancer cells[J]. *Acta. Pharmacologica Sinica*, 2010, 31(9): 1223-1240.
- [34] TSAI P Y, KA S M, CHANG Jia-ming, et al. Epigallocatechin-3-gallate prevents lupus nephritis development in mice via enhancing the Nrf2 antioxidant pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. *Free Radic. Biol. Med.*, 2011, 51(3): 744-754.
- [35] 吴广, 符平, 周玉生, 等. 芹菜素抑制脂多糖诱导小鼠巨噬细胞分泌炎症介质的分子机制[J]. *中国免疫学杂志*, 2015(6): 753-756.
- [36] 陈洪忠, 李海珍, 任冬梅. 木犀草素对 EA.hy926 细胞 Nrf2 信号通路的激活作用及 H₂O₂ 致氧化损伤的保护作用[J]. *山东大学学报: 医学版*, 2014(11): 6-10.
- [37] ZHANG Zai-jun, CUI Wei, LI Guo-hui, et al. Baicalein protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity through activation of Keap1/Nrf2/HO-1 and involving PKC and PI3K/AKT signaling pathways[J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60(33): 8171-8182.
- [38] KANG C H, KIM M J, SEO M J, et al. 5-Hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone inhibits nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia via NF- κ B suppression and Nrf2-dependent heme oxygenase-1 induction[J]. *Food Chem. Toxicol.*, 2013, 57: 119-125.
- [39] LAKSHMI A, SUBRAMANIAN S P. Tangeretin ameliorates oxidative stress in the renal tissues of rats with experimental breast cancer induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene[J]. *Toxicol Lett.*, 2014, 229(2): 333-348.
- [40] HSIAO P C, Lee W J, YANG S F, et al. Nobiletin suppresses the proliferation and induces apoptosis involving MAPKs and caspase-8/-9/-3 signals in human acute myeloid leukemia cells[J]. *Tumour Biol.*, 2014, 35(12): 11903-11911.
- [41] WU Pei-shan, YEN Jui-hung, KOU Mei-chun, et al. Luteolin and apigenin attenuate 4-hydroxy-2-nonenal-mediated cell death through modulation of UPR, Nrf2-ARE and MAPK pathways in PC12 cells[J]. *PLoS One*, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0130599.
- [42] HONG Yan, AN Zhong-ping. Hesperidin attenuates learning and memory deficits in APP/PS1 mice through activation of Akt/Nrf2 signaling and inhibition of RAGE/NF- κ B signaling[J]. *Arch. Pharm. Res.*, 2015, doi: 10.1007/s12272-015-0662-z.
- [43] 黎荣, 徐灵源, 梁韬, 等. 葛根素对 6-羟多巴胺所致帕金森病大鼠黑质组织 Nrf2/ARE 通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, (19)6: 230-233.
- [44] MA Jie-qiong, DING Jie, XIAO Zheng-hua, et al. Puerarin ameliorates carbon tetrachloride-induced oxidative DNA damage and inflammation in mouse kidney through ERK/Nrf2/ARE pathway[J]. *Food Chem. Toxicol.*, 2014, 71: 264-271.
- [45] ZHANG Jing, GUO Wen-shi, TIAN Bu-xian, et al. Puerarin attenuates cognitive dysfunction and oxidative stress in vascular dementia rats induced by chronic ischemia[J]. *Int. J. ClinExp-Pathol*, 2015, 8(5): 4695-4704.
- [46] LI Cheng-chong, PAN Zhi, XU Tian-jiao, et al. Puerarin induces the upregulation of glutathione levels and nuclear translocation of Nrf2 through PI3K/Akt/GSK-3 β signaling events in PC12 cells exposed to lead[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2014, 46: 1-9.
- [47] SHIN P H, YEH C T, YEN G C. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(23): 9427-9435.
- [48] JEONG J W, LEE W S, SHIN S C, et al. Anthocyanins down-regulate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglial cells by suppressing the NF- κ B and Akt/MAPKs signaling pathways[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(1): 1502-1515.
- [49] YAN Xue-rui, WU Lin, LI Bin, et al. Cyanidin-3-O-glucoside induces apoptosis and inhibits migration of tumor necrosis factor- α treated rat aortic smooth muscle cells[J]. *Cardiovascular Toxicology*, 2015, doi: 10.1007/s12012-015-9333-z.
- [50] 崔侯, 马海英, 孔力. Nrf2/ARE 通路参与机体抗氧化机制的研究进展[J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2011, 37(1): 187-190.