

## 论著

## 染料木黄酮对星形胶质细胞氧化损伤中 Nrf2/ARE 通路相关因子表达的调节作用

侯成成,麻微微,肖荣,周新,余焕玲,苑林宏,席元第,丁娟,封锦芳  
(首都医科大学公共卫生与家庭医学院,北京 100069)

**摘要:**目的 研究染料木黄酮(Gen)对 $\beta$ 淀粉样肽25-35(A $\beta$ 25-35)介导的星形胶质细胞氧化损伤中 Nrf2/ARE 通路相关因子的调节作用。方法 以星形胶质细胞(C6细胞系)作为研究对象,用A $\beta$ 25-35染毒制备氧化损伤模型。实验共分4组:对照组、A $\beta$ 组(A $\beta$ 模型组)、Gen干预组(Gen + A $\beta$ 组)及Gen组(Gen单独处理组);采用RT-PCR方法和Western Blot方法检测星形胶质细胞核因子E2相关因子2(Nrf2)、血红素加氧酶(HO-1)、 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶催化亚单位(GCLC)及锰超氧化物歧化酶(MnSOD)基因和蛋白的表达。结果 与A $\beta$ 组比较,Gen干预组和Gen组星形胶质细胞Nrf2、HO-1、GCLC及MnSOD基因和蛋白表达水平显著上调( $P < 0.05$ )。结论 染料木黄酮可能通过调控Nrf2/ARE通路来拮抗A $\beta$ 25-35介导的星形胶质细胞氧化损伤作用。

**关键词:**染料木黄酮;  $\beta$ 淀粉样肽25-35; Nrf2/ARE通路; 星形胶质细胞; 基因表达; 调节

**中图分类号:**R151.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2013)01-0001-05

### Accommodation of genistein to the Nrf2/ARE pathway related factors on the oxidative damage in astrocytes

Hou Chengcheng, Ma Weiwei, Xiao Rong, Zhou Xin, Yu Huanling, Yuan Linghong,  
Xi Yuandi, Ding Juan, Feng Jinfang

(School of Public Health and Family Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

**Abstract: Objective** The aim of this study was to investigate the effects of genistein (GEN) on the Nrf2/ARE pathway related factors during protection of oxidative damage induced by  $\beta$ -amyloid peptides (A $\beta$ 25-35) in astrocytes (C6 cells). **Methods** Astrocytes was cultured for 48hrs. A $\beta$ 25-35 (25 $\mu$ mol/L) was used to establish oxidative damage model in astrocytes. Four groups are control group, A $\beta$  group, Gen-treated group (Gen + A $\beta$  group) and Gen group (solo-Gen group). Gen (50  $\mu$ mol/L) was applied 2 hrs prior to the addition of A $\beta$ 25-35. After 24 hrs pretreatment, cells were harvested for assays. The mRNA and protein expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), catalytic subunit of glutamate-cysteine ligase (GCLC) and manganese superoxide dismutase (MnSOD) in astrocytes were tested by RT-PCR and Western Bolt. **Results** Comparing with A $\beta$  group, the mRNA and protein expression of Nrf2, HO-1, GCLC and MnSOD significantly increased in Gen-treated group and Gen group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Genistein could inhibit the oxidative damage induced by A $\beta$ 25-35 in astrocytes through regulating Nrf2/ARE pathway related factors.

**Key words:** Genistein;  $\beta$ -amyloid peptide 25-35; Nrf2/ARE pathway; astrocytes; gene expression; regulation

星形胶质细胞的氧化损伤加重了大脑病理性老化,从而导致大脑功能损伤及出现阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)样症状<sup>[1]</sup>。目前,研究显

示, $\beta$ 淀粉样肽( $\beta$ -amyloid peptides, A $\beta$ )在脑中广泛沉积可诱导产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),并造成氧化还原平衡体系紊乱,由此引发的氧化应激反应在星形胶质细胞损伤机制中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。研究资料表明,膳食成分中的染料木黄酮(genistein, Gen)具有抗氧化损伤作用,在预防神经退行性疾病中具有重要意义<sup>[3-4]</sup>。近年来,核转录因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)在调控氧化应激中所起到的作用受到广泛关注。Nrf2可与抗氧化物反应元件(antioxidant response elements, ARE)相互作用并形

收稿日期:2012-08-01

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划;2010AA023003);国家自然科学基金(30972470);北京市自然科学基金(7102015)

作者简介:侯成成 女 硕士生 研究方向为植物化学物与神经保护作用 E-mail:hcc001002@163.com

通信作者:肖荣 女 教授 研究方向为植物化学物与神经保护作用 E-mail:xiaor22@ccmu.edu.cn

成 Nrf2/ARE 通路,其活性与多种抗氧化酶的表达有关,在拮抗氧化应激过程中发挥关键的调控作用<sup>[5-6]</sup>。那么,Gen 是否能够通过激活 Nrf2/ARE 通路上调其下游的抗氧化蛋白酶表达,从而抑制氧化损伤的发生呢?本研究应用 A $\beta$ 25-35 建立星形胶质细胞氧化损伤模型,采用 Gen 进行预处理,研究其对星形胶质细胞中 Nrf2/ARE 通路上相关因子表达的调节作用,探讨 Gen 在拮抗 A $\beta$  介导的星形胶质细胞氧化损伤中对 Nrf2/ARE 通路的影响,为揭示 Gen 可有效改善神经退行性疾病氧化损伤作用,提供科学的实验数据和理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 仪器和试剂

仪器:凝胶成像分析系统(美国 Alpha Innotech 公司)、梯度 PCR 仪、电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)等。试剂:Gen、A $\beta$ 25-35、二甲基亚砜(DMSO)(均购自美国 SIGMA 公司),四甲基偶氮唑蓝(MTT,北京索莱宝科技有限公司),Nrf2 兔多克隆抗体、 $\beta$ -actin 兔多克隆抗体(均购自美国 SANTA CRUZ 公司),HO-1 兔多克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司),GCLC 兔多克隆抗体(美国 ABCAM 公司),MnSOD 小鼠多克隆抗体(美国 R&D 公司)等。试剂配制:Gen( $\geq 98\%$  HPLC),25 mg Gen 溶于 250  $\mu$ l DMSO 中配成 Gen 储备液,取 Gen 储备液 8  $\mu$ l 溶于 3 992  $\mu$ l DMEM 中即为 50  $\mu$ mol/L 应用液,Gen 储备液及应用液均 -20  $^{\circ}$ C 保存;A $\beta$ 25-35( $\geq 97\%$  HPLC),1 mg A $\beta$ 25-35 溶于 1 551  $\mu$ l 无菌去离子水中充分溶解,置于 37  $^{\circ}$ C 老化 7 d,适当分装后 -20  $^{\circ}$ C 保存。

### 1.2 细胞培养

选用 C6 细胞系(来源于大鼠星形胶质瘤细胞,细胞形态、结构和功能上与星形胶质细胞相似)进行实验研究<sup>[7]</sup>。细胞使用含 10% 胎牛血清及 10 U/L 青链霉素的 DMEM,于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。

### 1.3 MTT 法检测细胞活力

96 孔板传代培养星形胶质细胞 48 h,经 Gen(分别为 12.5、25、50、100、200  $\mu$ mol/L)预处理 2h、染毒 A $\beta$ 25-35(25  $\mu$ mol/L)24 h 后,加入 MTT 20  $\mu$ l (5 mg/ml),于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h,弃去液体,每孔加入 200  $\mu$ l DMSO,放置 10 min,混匀,于  $\lambda = 570$  nm 的条件下用酶标仪测定吸光度。

### 1.4 细胞分组与处理

星形胶质细胞传代培养 48 h 后加入 Gen(50  $\mu$ mol/L)预处理,2 h 后加入 A $\beta$ 25-35(25  $\mu$ mol/L,

根据课题组前期研究结果确定<sup>[4]</sup>)染毒 24 h 建立细胞氧化损伤模型,后收集细胞备检,细胞密度约为 10<sup>6</sup>/ml。实验共分 4 组:对照组、A $\beta$  组、Gen 干预组及 Gen 组。

### 1.5 RT-PCR 分析

引物序列为 primer 5.0 软件设计,上海生工生物工程技术有限公司合成。Nrf2、HO-1、GCLC、MnSOD 及  $\beta$ -actin 基因的引物序列、退火温度及片段长度见表 1。总 RNA 的提取:①每组细胞加 1ml 的 TRIzol 试剂,冰浴上操作使组织匀浆化;②将匀浆样品在室温放置 5 min,加入 0.2 ml 氯仿,用力振荡后常温放置 2 min,然后高速冷冻 4  $^{\circ}$ C 12 000  $\times$  g 离心 15 min;③将水样层转移到一个干净的试管中,加入 0.5 ml 异丙醇,室温放置 10 min,然后高速冷冻 4  $^{\circ}$ C 12 000  $\times$  g 离心 10 min;④移去上层悬液,用 75% 的乙醇洗涤 RNA 沉淀,轻弹混匀样品后高速冷冻 4  $^{\circ}$ C 12 000  $\times$  g 离心 5 min;⑤弃去上清,室温干燥至半透明状,并以 1% DEPC 水 20  $\mu$ l 溶解 RNA。反转录和扩增:取 1  $\mu$ g 总 RNA,70  $^{\circ}$ C 10 min 后放置冰上。配置 20  $\mu$ l 逆转录反应体系,反转录形成 cDNA;以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获取 PCR 扩增产物,经 2% 琼脂糖凝胶电泳(90 V,50 min),电泳完毕后,取出凝胶在紫外灯下观察结果并照相。结果用 Fluor Chem FC2 凝胶成像系统软件进行半定量分析,以  $\beta$ -actin 作为内参照,用目的基因与相应的  $\beta$ -actin 条带平均光密度比值表示目的基因 mRNA 的相对表达量。

表 1 Nrf2、HO-1、GCLC、MnSOD 及  $\beta$ -actin 基因的引物序列、退火温度及片段长度

Table 1 Primers for Nrf2, HO-1, GCLC, MnSOD and  $\beta$ -actin and the annealing temperature and fragment length

基因	引物序列(5'-3')	退火温度( $^{\circ}$ C)	长度(bp)
Nrf2	TGTGGAGCTCTCCATTTACGG GCTTTTGCCCTAAGCTCATCT	60	312
HO-1	ATAGAGCGAAACAAGCAGAACC TTAGCCTCTTCTGTCAACCCTGT	60	419
GCLC	TGGAGACCAGAGTATGGGAGTT GATGGTGTGTTCTTGTCTTGA	60	368
MnSOD	TGACCTGCCTTACGACTATGG AACTCTCCTTTGGGTTCTCCA	60	264
$\beta$ -actin	TCAGGTCATCACTATCGGCAAT AAAGAAAGGGTGTAACGCA	60	348

### 1.6 Western Blot 分析

每组细胞加裂解液提取总蛋白,二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度后,加变性缓冲液煮沸 5 min 变性,-20  $^{\circ}$ C 保存。10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),60 V 湿转 2 h,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,Nrf2 抗体(1:200)4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜缓冲液

(TBST)漂洗(10 min × 3次),碱性磷酸酶标记 IgG (1:1 000)室温孵育 1 h, TBST 漂洗(10 min × 3次),碱性磷酸酶法显色。内参照  $\beta$ -actin 蛋白及 HO-1、MnSOD 蛋白测定:一抗分别为  $\beta$ -actin 抗体(1:1 000)、HO-1 抗体(1:1 000)、GCLC 抗体(1:500)、MnSOD 抗体(1:1 000);二抗均为 1:5 000;其余步骤同 Nrf2。结果用 Fluor Chem FC2 凝胶成像分析系统(美国)分析扫描结果,测定各条带光密度值,目的蛋白相对表达量为目的条带与内参  $\beta$ -actin 的光密度比值。

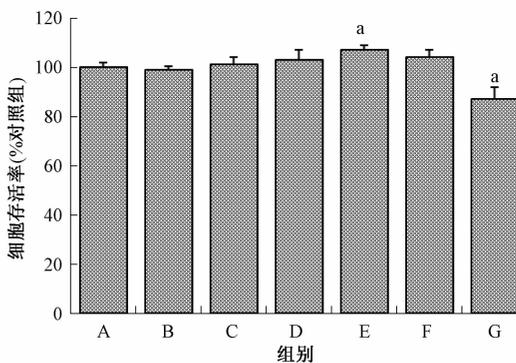
### 1.7 统计学处理

用 SPSS 13.0 统计软件包进行数据录入和单因素方差分析(ANOVA),组间比较采用 LSD 法, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。实验数据均用 means  $\pm$  s 表示。

## 2 结果

### 2.1 确定染料木黄酮的作用浓度

图 1 可见,与对照组相比,Gen 组(200  $\mu\text{mol/L}$ )星形胶质细胞活力降低,Gen 组(50  $\mu\text{mol/L}$ )星形胶质细胞活力增强,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。由图 2 可见,与  $A\beta$  组相比,Gen 干预组(分别为 12.5、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$ )星形胶质细胞活力增强,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),显示出 Gen 能够拮抗  $A\beta$ 25-35 的毒性作用。综合以上两个实验结果,最终确定 50  $\mu\text{mol/L}$  Gen 浓度用于下一步实验。



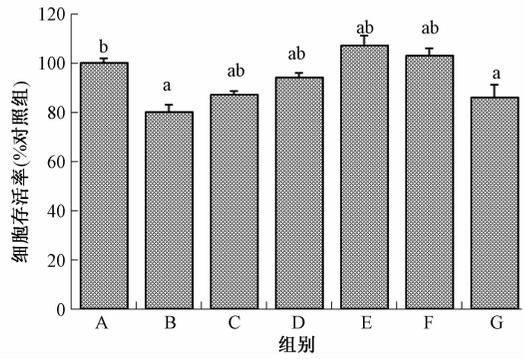
A: Control; B: Gen 6.25  $\mu\text{mol/L}$ ; C: Gen 12.5  $\mu\text{mol/L}$ ; D: Gen 25  $\mu\text{mol/L}$ ; E: Gen 50  $\mu\text{mol/L}$ ; F: Gen 100  $\mu\text{mol/L}$ ; G: Gen 200  $\mu\text{mol/L}$ 。a: 与对照组相比  $P < 0.05$ 。

图 1 不同染料木黄酮单独处理组星形胶质细胞活力情况

Figure 1 Cell viability of astrocytes in different solo-Gen groups

### 2.2 染料木黄酮对 $A\beta$ 介导的星形胶质细胞 Nrf2 基因表达的影响

图 3 可见,与对照组比较, $A\beta$  组 Nrf2 基因表达下调差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),与  $A\beta$  组比较,Gen 干预组和 Gen 组 Nrf2 基因表达上调差异有统



A: Control; B:  $A\beta$ 25-35; C: Gen 12.5  $\mu\text{mol/L}$  +  $A\beta$ ;

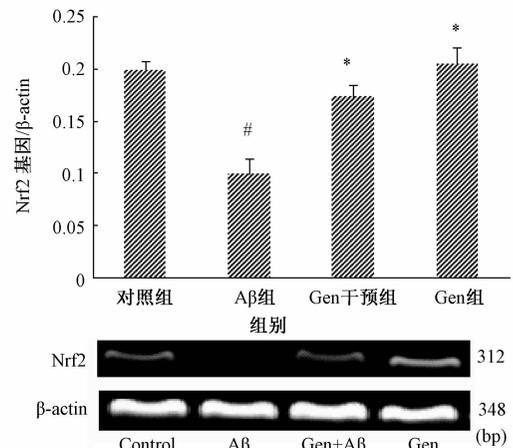
D: Gen 25  $\mu\text{mol/L}$  +  $A\beta$ ; E: Gen 50  $\mu\text{mol/L}$  +  $A\beta$ ;

F: Gen 100  $\mu\text{mol/L}$  +  $A\beta$ ; G: Gen 200  $\mu\text{mol/L}$  +  $A\beta$ 。

a: 与对照组相比  $P < 0.05$ ; b: 与  $A\beta$ 25-35 组相比  $P < 0.05$ 。

图 2 不同染料木黄酮干预组细胞活力情况( $n = 4$ )

Figure 2 Cell viability of astrocytes in different Gen-treated groups( $n = 4$ )



注:电泳图为 Nrf2 基因与内参基因  $\beta$ -actin 的琼脂糖凝胶电泳图。

#: 与对照组相比  $P < 0.05$ ;

\*: 与  $A\beta$ 25-35 组相比  $P < 0.05$ 。

图 3 染料木黄酮对  $A\beta$ 25-35 诱导的星形胶质细胞 Nrf2 基因表达的影响( $n = 4$ )

Figure 3 The effect of Gen on the expression of Nrf2 mRNA induced by  $A\beta$ 25-35 in astrocytes( $n = 4$ )

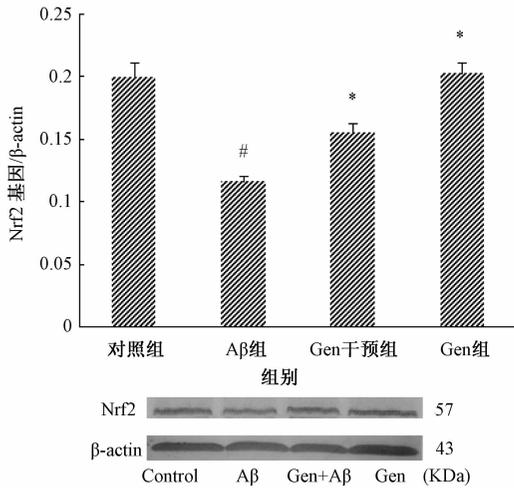
计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.3 染料木黄酮对 $A\beta$ 诱导的星形胶质细胞 Nrf2 蛋白表达的影响

图 4 可见,与对照组比较, $A\beta$  组 Nrf2 蛋白表达下调差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与  $A\beta$  组比较,Gen 干预组和 Gen 组 Nrf2 蛋白表达上调。

### 2.4 染料木黄酮对 $A\beta$ 诱导的星形胶质细胞 HO-1、GCLC 及 MnSOD 基因表达的影响

图 5 可见,与对照组比较, $A\beta$  组 HO-1、GCLC 及 MnSOD 基因表达下调差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),与  $A\beta$  组比较,Gen 干预组和 Gen 组 HO-1、GCLC 及 MnSOD 基因表达上调差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

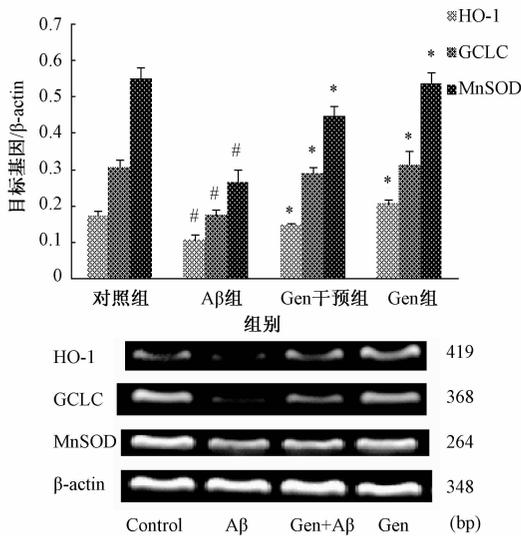


注:电泳图为 Nrf2 蛋白与内参蛋白 β-actin 的 SDS-PAGE 电泳图。

#:与对照组相比  $P < 0.05$ ; \*:与 Aβ25-35 组相比  $P < 0.05$ 。

图 4 染料木黄酮对 Aβ25-35 诱导的星形胶质细胞 Nrf2 蛋白表达的影响 ( $n = 4$ )

Figure 4 The effect of Gen on the expression of Nrf2 induced by Aβ25-35 in astrocytes ( $n = 4$ )



注:电泳图为 HO-1、GCLC、MnSOD 基因与内参蛋白 β-actin 的琼脂糖凝胶电泳图。

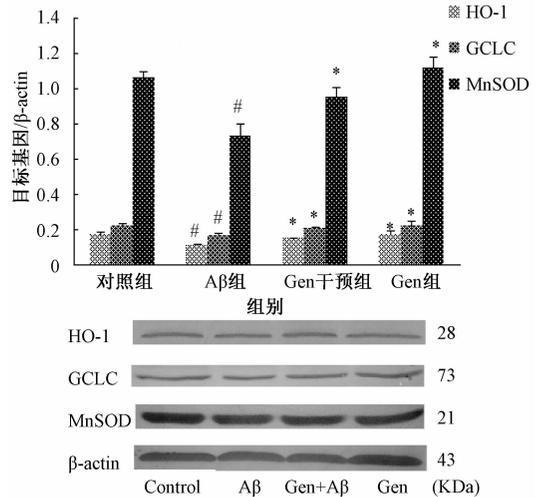
#:与对照组相比  $P < 0.05$ ; \*:与 Aβ25-35 组相比  $P < 0.05$ 。

图 5 染料木黄酮对 Aβ25-35 诱导的星形胶质细胞 HO-1、GCLC 及 MnSOD 基因表达的影响 ( $n = 4$ )

Figure 5 The effect of Gen on the expression of HO-1, GCLC and MnSOD mRNA induced by Aβ25-35 in astrocytes ( $n = 4$ )

## 2.5 染料木黄酮对 Aβ 诱导的星形胶质细胞 HO-1、GCLC 及 MnSOD 蛋白表达的影响

图 6 可见,与对照组比较,Aβ 组 HO-1、GCLC 及 MnSOD 蛋白表达下调差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与 Aβ 组比较,Gen 干预组和 Gen 组 HO-1、GCLC 及 MnSOD 蛋白表达上调,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。



注:电泳图为 HO-1、GCLC、MnSOD 蛋白与内参蛋白 β-actin 的 SDS-PAGE 电泳图。

#:与对照组相比  $P < 0.05$ ; \*:与 Aβ25-35 组相比  $P < 0.05$ 。

图 6 染料木黄酮对 Aβ25-35 诱导的星形胶质细胞 HO-1、GCLC 及 MnSOD 蛋白表达的影响 ( $n = 4$ )

Figure 6 The effect of Gen on the expression of HO-1, GCLC and MnSOD induced by Aβ25-35 in astrocytes ( $n = 4$ )

## 3 讨论

越来越多的证据表明,氧化应激在大脑老化和神经退行性疾病(包括 AD)发生与发展进程中有重要作用<sup>[8]</sup>。目前认为,脑内 Aβ 沉积引起的氧化应激是 AD 的重要致病因素之一<sup>[9]</sup>。Aβ 不仅能够引起细胞氧化应激,也可以作为氧化应激的产物来加重神经细胞氧化损伤<sup>[10]</sup>。近两年的研究结果表明,由 Aβ 形成的环状纤维束存在于激活的星形胶质细胞中,可能与 AD 的病理过程相关<sup>[11]</sup>。

大豆异黄酮(SIF)是一类天然存在于大豆等植物中的多酚类化合物,其主要活性形式有染料木黄酮(Gen)、大豆素和黄豆黄素等。研究表明,Gen 具有较强的抗氧化作用<sup>[12]</sup>。近年来,SIF 和 Gen 对认知功能及中枢神经系统退行性疾病的保护作用被广泛关注<sup>[13-14]</sup>。课题组前期研究也表明,SIF 和 Gen 在整体或细胞水平上能够拮抗 Aβ 介导的大鼠氧化还原状态的改变及神经细胞的氧化损伤<sup>[4]</sup>,并认为 Gen 发挥的神经保护作用主要与其抗氧化作用密切相关<sup>[15]</sup>。那么,Gen 是通过何种途径发挥其抗氧化作用的呢?研究发现,Nrf2/ARE 通路是重要的内源性抗氧化损伤通路,其介导的神经保护作用存在于多种病理条件下,尤其存在于神经退行性疾病发生和发展中<sup>[16]</sup>。当机体受到 ROS 或外源性毒物攻击时,Nrf2 异位到核内与 ARE 结合,启动多种保护性基因的表达,包括抗氧化蛋白酶类基因及 II 相解毒酶基因等<sup>[17]</sup>。其中,抗氧化蛋白酶类作为

Nrf2 信号路径的主要调节蛋白,是维持机体氧化还原状态平衡的主要因素<sup>[18]</sup>。

血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 是血红素降解的限速酶,是受 Nrf2/ARE 通路调节的最重要的内源性抗氧化蛋白酶。有学者发现,糖尿病大鼠肾脏发生氧化应激损伤后,白藜芦醇可上调 Nrf2 基因及蛋白表达水平,HO-1 表达也明显增强<sup>[19]</sup>。γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ-irradiation glutamine homocysteine synthase, γ-GCS) 是谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 合成的限速酶,其催化亚单位 (catalytic subunit of glutamate-cysteine ligase, GCLC) 具有全酶的催化功能。增加 γ-GCS 的含量和活性,可以促进 GSH 的合成,增强组织细胞抗氧化应激的能力。研究发现,氟伐他汀(降脂药)可上调血管平滑肌细胞内 Nrf2 相关的抗氧化酶 HO-1 和 GCLC 的基因表达,但利用 RNA 干扰技术沉默 Nrf2 基因后,此上调基因表达的作用消失,并且药物对细胞氧化损伤的抑制作用也显著降低<sup>[20]</sup>,说明氟伐他汀确实是通过调控 Nrf2 通路来拮抗血管平滑肌细胞氧化损伤的。锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD) 是一种广泛存在于生物体内的金属蛋白酶,是 ROS 最有效的清除剂。研究证实,白藜芦醇可通过激活 Nrf2 通路来上调 MnSOD 表达,从而拮抗过氧化氢引发的大鼠肝脏原代细胞氧化损伤<sup>[18]</sup>。本研究结果表明,Gen 可通过上调星形胶质细胞内 Nrf2 及其下游抗氧化蛋白酶 HO-1、GCLC、MnSOD 基因及蛋白水平的表达 ( $P < 0.05$ ),从而拮抗 Aβ<sub>25-35</sub> 诱发的细胞氧化损伤,与上述研究结果的变化趋势一致。

综上所述,Gen 可能是通过激活 Nrf2/ARE 信号通路,上调其下游的抗氧化蛋白酶表达来拮抗 Aβ<sub>25-35</sub> 介导的星形胶质细胞氧化损伤,从而达到抗氧化神经保护作用。

## 参考文献

- [ 1 ] Simpson JE, Ince PG, Hynes LJ, et al. Population variation in oxidative stress and astrocyte DNA damage in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain[J]. *Neuropath Appl Neuro*,2010,36(1):25-40.
- [ 2 ] Butterfield DA, Reed T, Newman S F. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment[J]. *Free Radic Biol Med*,2007,43(5):658-677.
- [ 3 ] Zhao Y, Zhao B. Natural antioxidants in prevention and management of Alzheimer's disease [J]. *Front Biosci*, 2012, 1 (4):794-808.
- [ 4 ] Ma WW, Yuan LH, Yu HL, et al. Genistein as a neuroprotective antioxidant attenuates redox imbalance induced by β-amyloid peptides 25-35 in PC12 cells[J]. *Int J Neurosci*,2010,28(4):289-295.
- [ 5 ] Carlosenrioue GB, Mariel CO, Jose PC, et al. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: Recent advances [J]. *Exp Toxicol Pathol*,2012,64(5):503-508.
- [ 6 ] Wang X, Tao L, Hai C X. Redox-regulating role of insulin: The essence of insulin effect [J]. *Mol Cell Endocrinol*,2012,349(2):111-127.
- [ 7 ] Asanuma M, Miyazaki I, Diazcorrales FJ, et al. Neuroprotective effects of zonisamide target astrocyte [J]. 2010, *Ann Neurol*, 67 (2):239-249.
- [ 8 ] Zhu X W, Rudy J, Lee C H. The origin of oxidative stress in neurodegenerative disease: Mark Anthony Smith 1965 - 2010 [J]. *Free Radical Bio Med*,2011,51(2):248-249.
- [ 9 ] Chauhan V, Chauhan A. Oxidative stress in Alzheimer's disease [J]. *Pathophysiology*,2006,13(3):195-208.
- [ 10 ] Li M, Chen L, Lee DH, et al. The role of intracellular amyloid β in Alzheimer's disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2007, 83 (3):131-139.
- [ 11 ] Cristiian A, Lasagna R, Rakez K. Astrocytes contain amyloid-β annular protofibrils in Alzheimer's disease brains [J]. *FEBS Letters*,2011,585(19):3052-3057.
- [ 12 ] Ma WW, Xiang L, Yu H L, et al. Neuroprotection of soyabean isoflavone co-administration with folic acid Ragainst β-amyloid 1-40-induced neurotoxicity in rats [J]. *Brit J Nutr*,2009,102(4):502-505.
- [ 13 ] Caroline HV, Herve B, Jean MM, et al. Soy isoflavones as potential inhibitors of Alzheimer β-amyloid fibril aggregation in vitro [J]. *Food Res Int*,2010,43(8):2176-2178.
- [ 14 ] Bagheri M, Joghataei MT, Mohseni S, et al. Genistein ameliorates learning and memory deficits in amyloid β (1-40) rat model of Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2011, 95 (3):270-276.
- [ 15 ] Ding B J, Yuan LH, Yu H L, et al. Genistein and folic acid prevent oxidative injury induced by β-amyloid peptide [J]. *Basic Clin Pharmacol*,2011,108(5):333-340.
- [ 16 ] Joo HS, Seung WK, Yinchuan J, et al. Ethyl pyruvate-mediated Nrf2 activation and hemeoxygenase 1 induction in astrocytes confer protective effects via autocrine and paracrine mechanisms [J]. *Neurochem Int*,2012,61(1):89-99.
- [ 17 ] Kim SK, Yang J, Kim MR, et al. Increased expression of Nrf2-ARE-dependent anti-oxidant proteins in tamoxifen resistant breast cancer cells [J]. *Free Radic Biol Med*,2008,45(4):537-546.
- [ 18 ] Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: Activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes [J]. *Eur J Pharmacol*,2008,59(1-3):66-72.
- [ 19 ] Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling [J]. *Biochim Biophys Acta*,2011,1812(7):719-731.
- [ 20 ] Shin M, Ylichiro T, Hiroyuki W, et al. Fluvastatin protects vascular smooth muscle cells against oxidative stress through the Nrf2-dependent antioxidant pathway [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 213(2):377-384.