

# 褪黑素对大鼠急性脊髓损伤后 Nrf2-ARE 信号通路的影响

苗金红 理阳 汪鑫 朱海洋 钟斌 李鹏辉 苏一帆 徐玉生

**【摘要】 目的** 观察褪黑素(MT)对大鼠急性脊髓损伤后血红素氧化酶-1(HO-1)、磷酸酰胺腺嘌呤二核苷酸醌氧化还原酶-1(NQO-1)、红细胞衍生的核因子 2 相关因子 2(Nrf2)表达的影响,探讨褪黑素在 Nrf2-ARE 信号通路中的作用机制。**方法** 采用随机数字表法将 72 只成年 SD 大鼠分为对照组、损伤组及褪黑素组,每组 24 只。采用改良 Allen's 法将损伤组及褪黑素组大鼠制成 T<sub>11</sub>-T<sub>12</sub> 脊髓损伤模型,并分别在脊髓损伤 10 min 后腹腔注射等量无水乙醇或 MT 制剂;对照组仅行椎板切除暴露 T<sub>11</sub>-T<sub>12</sub> 节段,不损伤脊髓神经。各组分别于制模后 6 h、12 h、24 h 时随机选取 6 只大鼠处死,提取 T<sub>11</sub>-T<sub>12</sub> 节段脊髓标本。采用 HE 染色法观察脊髓损伤及炎性反应情况;采用免疫荧光法检测 HO-1、NQO-1 及 Nrf2 蛋白表达;采用 RT-PCR 法检测大鼠脊髓组织中 HO-1、NQO-1、Nrf2 mRNA 表达。**结果** 对照组脊髓神经元细胞形态正常,无水肿及坏死,无明显出血点;损伤组脊髓可见出血灶,炎性细胞明显增多,部分神经元水肿、坏死;褪黑素组脊髓出血灶较损伤组明显减小,神经元水肿程度亦相对较轻。在制模后 12 h、24 h 时发现褪黑素组脊髓 HO-1、NQO-1 及 Nrf2 mRNA 表达水平均显著强于损伤组及对照组(均  $P < 0.05$ ),损伤组脊髓 HO-1、NQO-1 及 Nrf2 mRNA 表达水平亦显著强于对照组(均  $P < 0.05$ )。免疫荧光结果显示,褪黑素组脊髓切片中 HO-1、NQO-1、Nrf2 阳性细胞数量最多,损伤组次之,对照组最少,各组间差异均具有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。**结论** 褪黑素可促进急性脊髓损伤大鼠脊髓中 HO-1、NQO-1 及 Nrf2 表达,其作用机制可能与激活 Nrf2-ARE 信号通路有关。

**【关键词】** 脊髓损伤; 褪黑素; Nrf2-ARE 信号通路

**基金项目:**河南省国际科技合作项目(134300510005)

**Effects of melatonin on the Nrf2-ARE signaling pathway after spinal cord injury** Miao Jinhong, Li Yang, Wang Xin, Zhu Haiyang, Zhong Bin, Li Penghui, Su Yifan, Xu Yusheng. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China  
Corresponding author: Xu Yusheng, Email: ysxu@zzu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To observe the effects of melatonin (MT) on the expression of heme oxygenase-1 (HO-1), phosphorylated adenine dinucleotide quinone oxidoreductase-1 (NQO-1) and nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2), so as to explore the mechanism of MT's action in the Nrf2-ARE signaling pathway. **Methods** A total of 72 Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control group, an injury group and a melatonin group, each of 24. T<sub>11</sub>-T<sub>12</sub> acute SCI was induced in the injury and melatonin groups using the modified Allen's method. Ten minutes after the injury, equal amounts of absolute ethyl alcohol and melatonin were intraperitoneally injected into the rats in the injury and melatonin groups. For the control group, the vertebral plate was cut to expose the T<sub>11</sub>-T<sub>12</sub> spinal cord without any injury of the nerves. Six rats from each group were randomly selected for sacrifice at 6, 12 and 24 hours after the operation, and T<sub>11</sub>-T<sub>12</sub> spinal cord specimens were collected. The spinal cord injury and inflammatory response were observed using haematoxylin eosin staining. The expression of HO-1, NQO-1 and Nrf2 was examined using immunofluorescence, while the expression of HO-1, NQO-1 and Nrf2 protein and mRNA were detected using RT-PCRs. **Results** The neuronal cells in the spinal cords of the control rats were of normal shape, without edema, necrosis or obvious hemorrhagic foci. Hemorrhagic foci, significantly more inflammatory cells and some spinal cord neurons with edema and necrosis were observed in the injury group. However, significantly fewer hemorrhagic spots and cells with edema were found in the melatonin group compared with the injury group. The average expression of HO-1, NQO-1 and Nrf2 protein and mRNA was significantly higher in the melatonin group than in the other two groups. The levels in the injury group were also significantly higher than in the control group 12 and 24 hours after the experiments. Immunofluorescence showed that the greatest number of cells with HO-1, NQO-1 and Nrf2 was found in

the melatonin group, followed by the injury group and then the control group, with significant differences among all 3 groups. **Conclusion** Melatonin can promote the expression of HO-1, NQO-1 and Nrf2 in rats with acute spinal cord injury, which might be related with its activating the Nrf2-ARE signaling pathway.

**【Key words】** Spinal cord injury; Melatonin; Nrf2-ARE signaling pathway

**Fund program:** The International Science and Technology Cooperation Projects of Henan Province (grant 134300510005)

急性脊髓损伤(acute spinal cord injury, ASCI)是指因各种因素导致的急性脊髓损害,表现为脊髓损伤节段及以下出现各种运动、感觉及括约肌功能障碍等改变,其治疗一直是临床难点。近年来研究发现,褪黑素(melatonin, MT)对于 ASCI 不仅具有抗炎、镇痛、调节免疫、减少神经细胞凋亡、促进神经营养因子分泌等作用,还具有氧化应激作用<sup>[1-4]</sup>。

红细胞衍生的核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)-抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)信号通路是近年来新发现的机体抵抗内、外界氧化和化学等刺激的防御性传导通路,广泛存在于组织细胞中,对维持机体内环境稳定具有重要作用。大量研究证实:Nrf2-ARE 信号通路对由脂质过氧化、谷胱甘肽缺乏、线粒体电子传递链断裂等多种原因所致的神经损伤具有保护作用<sup>[5-7]</sup>。本实验应用改良 Allen's 法建立 ASCI 模型,并观察 MT 对大鼠 ASCI 后脊髓组织中 Nrf2-ARE 信号通路的激活作用,以初步探讨 MT 在 ASCI 后的作用机制。

## 材料与方 法

### 一、实验动物及主要试剂

选取成年雄性无特定病原体级(specific pathogen free, SPF)健康大鼠 72 只,体重(220±20)g,于河南省实验动物中心采购,大鼠许可证号为:SCXK(豫)2010-0002。上述实验大鼠于通风、温度及湿度适宜的动物房内饲养,每日光照及黑暗时间均为 12 h,不限制饮水及进食,术前适应性喂养 1 周。Transzol 试剂、RT 试剂盒、PCR 试剂盒、Maker 购于北京全式金生物技术有限公司,兔抗鼠血红素氧化酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)、磷酸酰胺腺嘌呤二核苷酸醌氧化还原酶 1(NADPH:quinone oxidoreductase-1, NQO-1)、红细胞衍生核因子 2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)抗体均购于北京博奥森生物技术有限公司, DAB 试剂盒、SP9002 免疫组化试剂盒购于北京中杉生物技术有限公司。褪黑素、焦碳酸二乙酯(diethypyrocarbonate, DEPC)、溴化乙锭(ethidium bromide, EB)购于美国 SIGMA 公司。

### 二、分组及处理

采用随机数字表法将上述 72 只大鼠分为对照组、

损伤组及褪黑素组,每组 24 只大鼠。对照组、损伤组、褪黑素组大鼠分别按 400 mg/kg 体重腹腔注射 10%水合氯醛,待麻醉成功后术区备皮,将大鼠俯卧位固定于操作台上。常规消毒铺巾,取后正中切口,咬除棘突和椎板后,暴露 T<sub>11</sub>-T<sub>12</sub> 节段脊髓神经。对照组大鼠缝合后不再给予特殊处理,损伤组、褪黑素组大鼠则用 5 g 砝码自距硬膜 15 cm 高度处沿导管垂直落下制成大鼠 SCI 模型,制模成功大鼠均出现后肢瘫痪、尿潴留、进食减少等情况。术毕用生理盐水冲洗术野,消毒后常规缝合切口,每 4 小时帮助大鼠排小便 1 次。在造模成功后 10 min 时,损伤组及褪黑素组大鼠分别按每千克体重 100 mg 腹腔注射无水乙醇或 MT 制剂(浓度为 4 mg/ml,由无水乙醇配制)。

### 三、HO-1 mRNA、Nrf2 mRNA 及 NQO-1 mRNA 检测

于制模后 6 h、12 h 及 24 h 时每组各随机取 6 只大鼠,注射过量麻醉药物处死后取 T<sub>11</sub>-T<sub>12</sub> 节段脊髓组织并提取总 mRNA。查询 GenBank 数据库可知,大鼠 HO-1 上游引物序列为 5'-CACGCATATACCCGCTACCT-3',下游引物序列为 5'-AAGGCGTCTTAGCCTCTTC-3',扩增产物长度为 237 bp。大鼠 Nrf2 上游引物序列为 5'-GAGACGGCCATGACTGAT-3',下游引物序列为 5'-TGAGGGACCGATGAGTA-3',扩增产物长度为 206 bp。大鼠 NQO-1 上游引物序列为 5'-GTTAGTCCCTCAGC-CATTGTT-3',下游引物序列为 5'-GTTAGTCCCTCAGC-CATTGTTT-3',扩增产物长度为 126 bp。内参 GAPDH 上游引物序列为 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3',下游引物序列为 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3',扩增产物长度为 496 bp。各组大鼠脊髓组织用 1 ml Trizol 分别提取总 RNA,用紫外分光光度仪测定其浓度和纯度,按 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 方法进行反转录。PCR 反应条件如下:94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 共 31 个循环。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,采用紫外凝胶成像系统及 Gel-Pro Analyzer 4.0 版软件分别进行成像和积分光密度分析,试验共重复 3 次,将各组目标基因积分光密度值与对应内参 GAPDH 积分光密度值的比值作为该目标基因的相对表达量。

### 四、HE 染色及免疫荧光染色

于制模后 24 h 时每组各随机取 6 只大鼠,注射过量麻醉药物处死后取 T<sub>11</sub>-T<sub>12</sub> 节段脊髓组织,距损伤部

位上、下各保留 0.5 cm,常规脱水石蜡包埋取横断面。每只大鼠脊髓从上至下连续切 6 张切片,分别标记为 1~6 号,片厚 3 μm。1 号切片进行 HE 染色并观察脊髓损伤程度及病理变化。HE 染色步骤如下:切片脱蜡至水;苏木素染色 3 min;水洗,经 1%盐酸酒精分色 10 s;水洗,经 1%伊红染色 10 min;水洗,梯度酒精脱水;二甲苯透明,中性树胶封片;显微镜观察并照相。免疫荧光染色步骤如下:切片脱蜡至水,经磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗 3 次(3×5 min);柠檬酸抗原修复 10 min,自然冷却;PBS 浸泡 5 min,共 3 次(3×5 min);3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭内源性过氧化物酶,室温 20 min;PBS 浸泡 5 min,共 3 次(3×5 min);滴加山羊血清每片 50 μl,室温封闭内源性生物素 20 min;甩除勿洗,分别滴加一抗(Nrf2/NQO1/HO-1 1:100)每片 50 μl,4℃过夜。PBS 浸泡 5 min,共 3 次(3×5 min);滴加荧光素标记二抗(Cy3 抗兔 1:300)每片 50 μl,37℃作用 2 h。PBS 浸泡 5 min,共 3 次(3×5 min);置于荧光显微镜下采集图像,观察 HO-1、NQO-1 及 Nrf2 表达情况。

五、统计学方法

所得计量数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 20.0 版统计学软件包进行数据分析,应用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验比较 3 组大鼠脊髓组织中 HO-1、NQO-1、Nrf2 mRNA 及蛋白表达水平差异, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

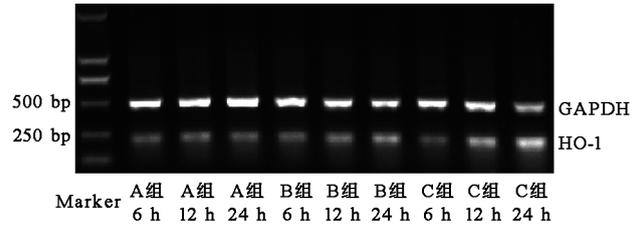
结 果

一、制模后不同时间点各组大鼠脊髓 HO-1、NQO-1、Nrf2 mRNA 表达比较

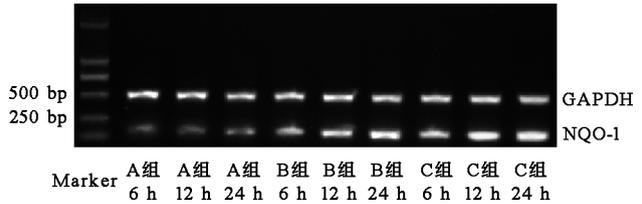
在制模后 6 h 时发现对照组、损伤组、褪黑素组脊髓 HO-1、NQO-1 及 Nrf2 mRNA 表达水平组间差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ );在制模后 12 h,24 h 时发现各组大鼠脊髓 HO-1、NQO-1 及 Nrf2 mRNA 表达水平组间差异均具有统计学意义(均  $P < 0.05$ );进一步比较发现,上述时间点褪黑素组脊髓 HO-1、NQO-1 及 Nrf2 mRNA 表达水平均显著强于损伤组及对照组(均  $P < 0.05$ ),损伤组脊髓 HO-1、NQO-1 及 Nrf2 mRNA 表达水平亦显著强于对照组(均  $P < 0.05$ ),具体情况见图 1~3 及表 1~3。

二、各组大鼠脊髓 HE 染色情况分析

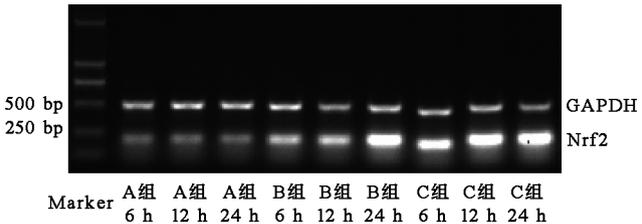
通过观察各组大鼠脊髓 HE 染色切片发现,对照组脊髓组织神经元细胞形态正常,无水肿及坏死,无明显出血点;损伤组脊髓组织可见出血灶,炎性细胞明显增生,部分神经元水肿、坏死;褪黑素组脊髓组织出血灶较损伤组明显减小,神经元水肿程度亦相对较轻。具体情况见图 4。



注:A 组为对照组,B 组为损伤组,C 组为褪黑素组  
图 1 术后不同时间点各组大鼠受损脊髓 HO-1 PCR 分析



注:A 组为对照组,B 组为损伤组,C 组为褪黑素组  
图 2 术后不同时间点各组大鼠受损脊髓 NQO-1 PCR 分析



注:A 组为对照组,B 组为损伤组,C 组为褪黑素组  
图 3 术后不同时间点各组大鼠受损脊髓 Nrf2 PCR 分析

表 1 术后不同时间点各组大鼠脊髓 HO-1 mRNA 表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	制模后 6 h	制模后 12 h	制模后 24 h
对照组	6	0.29±0.15	0.35±0.13	0.36±0.08
损伤组	6	0.42±0.07	0.67±0.23 <sup>a</sup>	0.79±0.24 <sup>a</sup>
褪黑素组	6	0.45±0.05	0.92±0.16 <sup>ab</sup>	1.13±0.22 <sup>ab</sup>

注:与对照组同时时间点比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与损伤组同时时间点比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

表 2 术后不同时间点各组大鼠脊髓 NQO-1 mRNA 表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	制模后 6 h	制模后 12 h	制模后 24 h
对照组	6	0.41±0.12	0.45±0.10	0.48±0.09
损伤组	6	0.58±0.17	0.87±0.17 <sup>a</sup>	1.12±0.29 <sup>a</sup>
褪黑素组	6	0.75±0.10	0.90±0.20 <sup>ab</sup>	1.00±0.27 <sup>ab</sup>

注:与对照组同时时间点比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与损伤组同时时间点比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

表 3 术后不同时间点各组大鼠脊髓 Nrf2 mRNA 表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

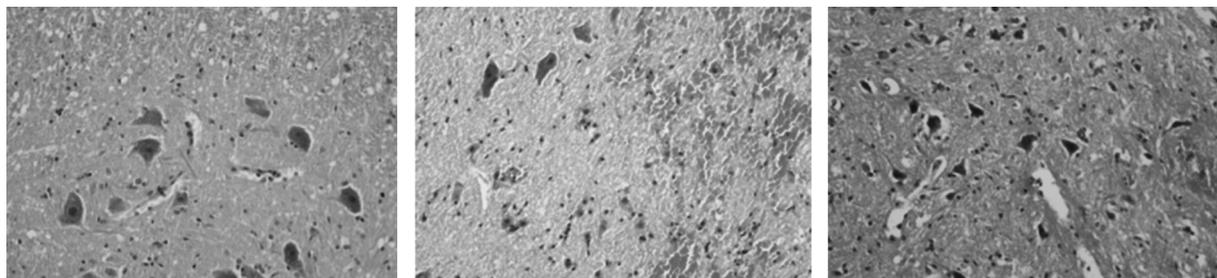
组别	只数	制模后 6 h	制模后 12 h	制模后 24 h
对照组	6	0.47±0.14	0.51±0.12	0.57±0.15
损伤组	6	0.58±0.03	0.94±0.14 <sup>a</sup>	1.14±0.22 <sup>a</sup>
褪黑素组	6	0.72±0.26	1.06±0.20 <sup>ab</sup>	1.26±0.19 <sup>ab</sup>

注:与对照组同时时间点比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与损伤组同时时间点比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

### 三、各组大鼠脊髓 HO-1、NQO-1 及 Nrf2 阳性细胞比较

通过观察各组大鼠免疫荧光切片发现, HO-1、NQO-1、Nrf2 在神经细胞胞质中分布较多, 其阳性细胞

呈红色。HO-1、NQO-1 及 Nrf2 阳性细胞计数从多到少均依次为褪黑素组、损伤组及对照组, 各阳性细胞计数组间差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 具体见图 5~7 及表 4。

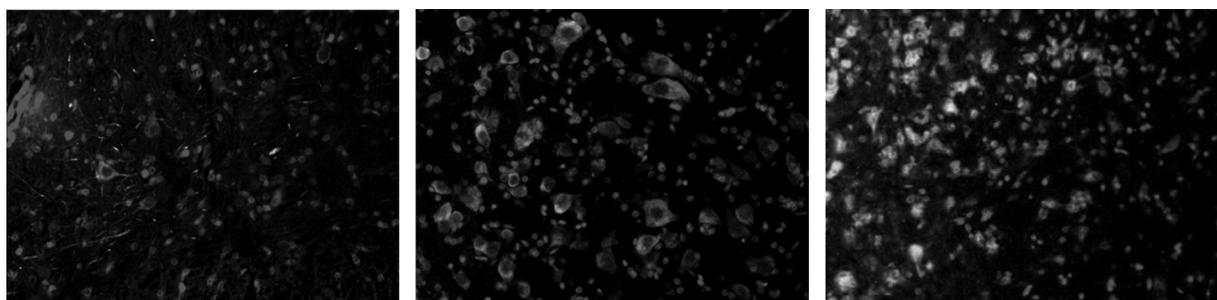


对照组

损伤组

褪黑素组

图 4 制模后 24 h 时各组大鼠脊髓病理学观察比较 (HE 染色, ×400)



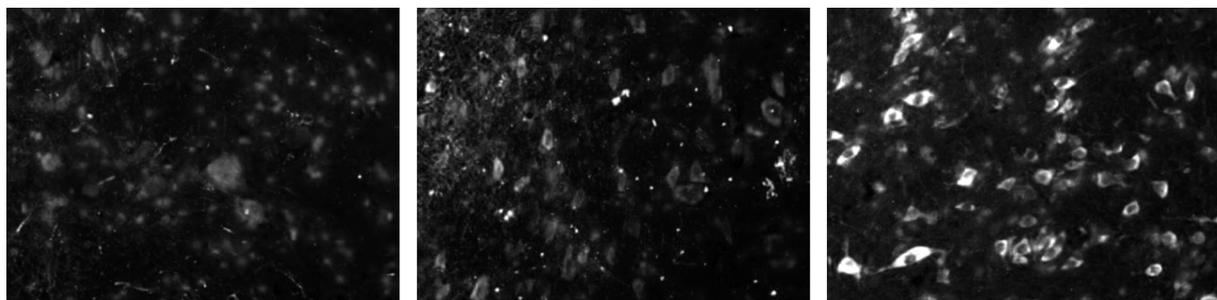
对照组

损伤组

褪黑素组

注: HO-1 阳性细胞在免疫荧光下呈红色

图 5 制模后 24 h 时各组大鼠脊髓 HO-1 阳性细胞表达 (免疫荧光显色, ×200)



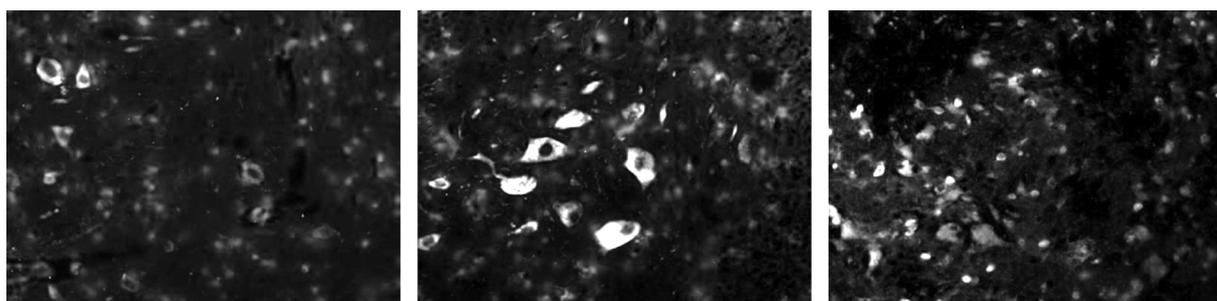
对照组

损伤组

褪黑素组

注: NQO-1 阳性细胞在免疫荧光下呈红色

图 6 制模后 24 h 时各组大鼠脊髓 NQO-1 阳性细胞表达 (免疫荧光显色, ×200)



对照组

损伤组

褪黑素组

注: Nrf2 阳性细胞在免疫荧光下呈红色

图 7 制模后 24 h 时各组大鼠脊髓 Nrf2 阳性细胞表达 (免疫荧光显色, ×200)

表 4 制模后 24 h 时各组大鼠脊髓 Nrf2、NQO-1 及 HO-1 阳性细胞数比较(个/每高倍镜视野,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	Nrf2	NQO-1	HO-1
对照组	6	11.00±1.41	8.25±2.22	6.00±1.41
损伤组	6	21.50±5.69 <sup>a</sup>	24.00±2.94 <sup>a</sup>	28.75±3.30 <sup>a</sup>
褪黑素组	6	31.75±5.85 <sup>ab</sup>	45.00±5.23 <sup>ab</sup>	47.75±3.30 <sup>ab</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与损伤组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

## 讨 论

ASCI 包括原发性脊髓损伤和继发性脊髓损伤<sup>[8]</sup>。继发性损伤始于 ASCI 后数分钟,可持续数小时或数天,能干扰存活神经细胞轴突,导致脊髓神经细胞发生不可逆坏死或崩解。继发性急性脊髓损伤机制复杂,如炎症反应、自由基作用、细胞膜脂质过氧化、兴奋性氨基酸毒性作用、钙超载、细胞凋亡等,从而使损伤区域扩大、神经细胞崩解坏死,故如何避免和减轻继发性脊髓损伤具有重要临床意义<sup>[9]</sup>。

相关研究发现在 Nrf2-ARE 通路中,ARE 是位于一些保护性基因上游调节区的一个 DNA 启动子结合序列,而 Nrf2 是这一序列的激活因子,当活化的 Nrf2 进入细胞核与 Maf 蛋白结合成异二聚体后再与 ARE 序列结合,使受 ARE 调控的基因开始转录,从而启动 II 相解毒酶、抗氧化酶等保护性基因表达。ARE 与 Nrf2 的这种结合不仅需要其与 Maf 蛋白结合形成二聚体,更重要的是 Nrf2 对氧化还原敏感,因此它们之间的这种结合具有高度专一性,这使得该通路成为机体抗氧化等防御机制中的重要通路。Nrf2 是属于帽和领 (cap-‘n’-collar,CNC) 家族的一类具有碱性亮氨酸拉链结构的转录因子。Nrf2 蛋白由 605 个氨基酸构成并形成 6 个高度保守的结构域,分别为 Neh1-6 (Nrf2-ECH homology)。其中 Neh1 是 CNC-bZIP 特征结构域,Nrf2 通过该结构域与转录伴侣分子-小分子 Maf 蛋白结合,形成二聚体并进一步与 DNA 结合促进下游因子转录,Neh2 结构域是 Nrf2 的负向调控域,亦即 Nrf2 通过 Neh2 与细胞质内的 Keap1 蛋白 (Keap1-like ECH associated protein 1) 结合处于失活状态,Neh3 结构域位于 Nrf2 C 端的最末端,能与转录协同激活分子 CHD6 蛋白相结合,促进 ARE 调控基因的转录与表达<sup>[10-12]</sup>。

当细胞受到活性氧刺激后,Nrf2 会与 Keap1 解偶联,活化后 Nrf2 进入细胞核与 Maf 蛋白结合成异二聚体后再与 ARE 结合,激活靶基因表达,调控 II 相代谢酶、抗氧化酶或药物转运体的转录活性,从而发挥抗氧化损伤作用<sup>[13-14]</sup>。本实验结果显示制模后 12 h, 24 h 时褪黑素组脊髓 Nrf2 表达较损伤组及对照组明显增强,说明褪黑素可促进 ASCI 大鼠 Nrf2 表达。

为进一步观察褪黑素对 Nrf2-ARE 通路的影响,本研究继续深入检测脊髓组织中 Nrf2-ARE 下游多种抗氧化、抗炎因子变化情况,如具有抗氧化功能的 NQO-1、具有抗炎作用的 HO-1 等。NQO-1 是一种黄素蛋白酶,能借助 NADH 或 NADPH 作为电子供体,催化醌类及其衍生物还原并降解其毒性,从而阻止它们进一步参与氧化还原反应及产生 ROS,使细胞在各种代谢引起的氧化应激反应中得到保护<sup>[15-16]</sup>。HO-1 是血红素降解的限速酶,应激、低氧、热休克、内毒素、细胞因子、血红素、重金属及氧化剂等多种因素均可诱导 HO-1 表达及增强其酶活性<sup>[17]</sup>。HO-1 主要通过两种方式发挥抗氧化作用,一方面 HO-1 能阻止游离血红素参与氧化反应,另一方面 HO-1 还可与其酶解产物 CO、胆红素等一同发挥抗氧化、扩张血管、改善组织微循环及抑制细胞凋亡等作用<sup>[18]</sup>。也有学者指出 HO-1 能增强星形细胞、巨噬细胞、胶质细胞内多种酶活性,从而抑制神经组织继发性损伤<sup>[19]</sup>。本实验结果显示制模后 12 h, 24 h 时褪黑素组 NQO-1、HO-1 表达均显著强于损伤组及对照组,上述时间点损伤组 NQO-1、HO-1 表达亦显著强于对照组,表明 ASCI 发生后机体 NQO-1、HO-1 表达增加,而褪黑素能进一步促进 NQO-1、HO-1 表达。

另外本研究通过 HE 染色观察到 ASCI 大鼠应用褪黑素后其脊髓炎症反应及局部水肿程度减轻,出血点及中性粒细胞聚集减少;并且 ASCI 可引起机体 Nrf2 表达增强,从而激活 Nrf2-ARE 信号通路并产生一系列防御性反应;另外褪黑素可促进 Nrf2-ARE 信号通路下游产物 NQO-1、HO-1 表达,从而发挥神经保护作用。

## 参 考 文 献

- [1] 徐玉生,李星晨,金伟林,等.褪黑素对急性脊髓损伤大鼠炎症反应的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2014,36(4):260-265. DOI:10.3760/cma.j.issn.02541424.2014.04.005.
- [2] Wu Q, Jing Y, Yuan X, et al. Melatonin treatment protects against acute spinal cord injury-induced disruption of blood spinal cord barrier in mice [J]. J Mol Neurosci, 2014, 54(4):714-722. DOI: 10.1007/s12031-014-0430-4.
- [3] Wilhelmsen M, Amirian I, Reiter RJ, et al. Analgesic effects of melatonin: a review of current evidence from experimental and clinical studies [J]. J Pineal Res, 2011, 51(3):270-277. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2011.00895.x.
- [4] Park S, Lee SK, Park K, et al. Beneficial effects of endogenous and exogenous melatonin on neural reconstruction and functional recovery in an animal model of spinal cord injury [J]. J Pineal Res, 2012, 52(1):107-119. DOI:10.1111/j.1600-079X.2011.00925.x.
- [5] Lee JM, Shih AY, Murphy TH, et al. NF-E2-related factor-2 mediates neuroprotection against mitochondrial complex I inhibitors and increased concentrations of intracellular calcium in primary cortical neurons [J]. J Biol Chem, 2003, 278(39):37948-37956. DOI: 10.1074/

- jbc. M 305204200.
- [6] Mizuno K, Kume T, Muto C, et al. Glutathione biosynthesis via activation of the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)-antioxidant-response element (ARE) pathway is essential for neuroprotective effects of sulforaphane and 6-(methylsulfinyl) hexylisothiocyanate [J]. *J Pharmacol Sci*, 2011, 115(3): 320-328. DOI: 10.1254/jphs.10257FP.
- [7] Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson DA, et al. Protection from mitochondrial complex II inhibition in vitro and in vivo by Nrf2-mediated transcription [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(1): 244-249. DOI: 10.1073/pnas.0408487101.
- [8] Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, et al. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury [J]. *Spine J*, 2004, 4(4): 451-464. DOI: 10.1016/j.spinee.2003.07.007.
- [9] Breslin K, Agrawal D. The use of methylprednisolone in acute spinal cord injury: a review of the evidence, controversies, and recommendations [J]. *Pediatr Emerg Care*, 2012, 28(11): 1238-1245. DOI: 10.1097/PEC.0b013e3182724434.
- [10] Zhu J, Wang H, Ji X, et al. Differential Nrf2 expression between glioma stem cells and non-stem-like cells in glioblastoma [J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(3): 693-698. DOI: 10.3892/ol.2013.1760.
- [11] Bai Y, Cui W, Xin Y, et al. Prevention by sulforaphane of diabetic cardiomyopathy is associated with up-regulation of Nrf2 expression and transcription activation [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, 57: 82-95. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.01.008.
- [12] Magesh S, Chen Y, Hu L. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents [J]. *Med Res Rev*, 2012, 32(4): 687-726. DOI: 10.1002/med.21257.
- [13] De Haan JB. Nrf2 activators as attractive therapeutics for diabetic neuropathy [J]. *Diabetes*, 2011, 60(11): 2683-2684. DOI: 10.2337/db11-1072.
- [14] McMahon M, Lamont DJ, Beattie KA, et al. Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(44): 18838-18843. DOI: 10.1073/pnas.1007387107.
- [15] Eizirik DL, Flodström M, Karlén AE, et al. The harmony of the spheres; inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells [J]. *Diabetologia*, 1996, 39(8): 875-890.
- [16] Kaspar JW, Jaiswal AK. Antioxidant-induced phosphorylation of tyrosine 486 leads to rapid nuclear export of Bach1 that allows Nrf2 to bind to the antioxidant response element and activate defensive gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(1): 153-162. DOI: 10.1074/jbc.M109.040022.
- [17] Maines MD, Ibrahim NG, Kappas A. Solubilization and partial purification of heme oxygenase from rat liver [J]. *J Biol Chem*, 1977, 252(16): 5900-5903.
- [18] Kongpetch S, Kukongviriyapan V, Prawan A, et al. Crucial role of heme oxygenase-1 on the sensitivity of cholangiocarcinoma cells to chemotherapeutic agents [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34994. DOI: 10.1371/journal.pone.0034994.
- [19] Zhang Z, Li M, Wang Y, et al. Higenamine promotes M2 macrophage activation and reduces Hmgb1 production through HO-1 induction in a murine model of spinal cord injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(2): 681-687. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.10.022.

(修回日期: 2017-02-27)  
(本文编辑: 易浩)

· 外刊撷英 ·

## Rheumatoid arthritis triple therapy compared with etanercept

**BACKGROUND AND OBJECTIVE** Among patients with rheumatoid arthritis (RA) treated with methyltrexate (MTX), it is estimated that 70% will need additional therapy. Previous studies have demonstrated that triple therapy (SSZ and HCQ added to MTX) was non-inferior to MTX, and that TNF inhibition produces similar results, to triple therapy. This study examined the difference in infectious disease and GI adverse events (AEs) between patients treated with triple therapy and those treated with a tumor necrosis factor inhibitor (etanercept).

**METHODS** Subjects were 353 patients with active RA despite treatment with MTX. The participants were randomized to triple therapy (T) with SSZ and HCQ added to MTX, or Etanercept added to MTX therapy (E). Those without improvement of 1.2 or greater on the DAS28-ESR at 24 weeks were switched in a blinded fashion to the other therapy. Both GI and infectious disease adverse events (AEs) were recorded for both groups.

**RESULTS** For both therapies, the majority of infectious AEs were non-serious, with a greater number occurring in the E group than in the T group ( $P = 0.02$ ), remaining significant after adjusting for comorbidities ( $P = 0.01$ ). No significant difference was found between groups for serious infectious disease AEs. For non-serious GI AEs, T therapy had a higher incidence ( $P = 0.02$ ), with no significant difference between the groups in serious GI AEs. Further, there was no significant difference between the treatment groups in the number of patients who switched treatment groups due to poor improvement in RA symptoms.

**CONCLUSION** This study of patients with active RA, treated with methyltrexate, found that there is no difference in treatment outcome, or serious adverse outcomes among those treated with triple therapy (SSZ + HCQ + MTX) and those treated with TNF-inhibitor therapy (MTX + Etanercept).

【摘自: Quach LT, Chang BH, Brophy MT, et al. Rheumatoid arthritis triple therapy compared with etanercept: difference in infectious and gastrointestinal adverse events. *Rheumatology*, 2017, 56(3): 378-383.】