

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.06.039

· 专论与综述 ·

基于模式生物斑马鱼 Nrf2 的相关研究进展 *

刘 毅¹ 李 丽^{1Δ} 程 磊^{2Δ} 吴 琮¹ 李炳生³

(1 哈尔滨工业大学 生命科学与技术学院 黑龙江 哈尔滨 150080; 2 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所农业部淡水水产生物技术与遗传育种重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150070; 3 哈尔滨工业大学 基础与交叉科学研究院 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要: Nrf2/ARE 信号通路是大多数生物体内抗氧化应激反应、抵抗内外界刺激的关键通路,在抗炎、免疫、抗肿瘤、抗凋亡、神经保护等方面起着重要的作用。斑马鱼作为一种常见的模式动物,广泛地应用于发育生物学、遗传学和毒理学等研究领域。研究表明转录因子 NF-E2 相关因子 2(NF-E2-related factor 2, Nrf2)不仅在哺乳动物体内存在,也在斑马鱼体内存在并且高度保守,并在抗氧化应激反应中发挥着重要作用。本文通过对斑马鱼 Nrf2 的结构、生物学功能及其信号通路等方面的最新研究进行阐述,以期 Nrf2 及其信号通路引发的相关疾病的预防和治疗提供新的思路。

关键词: 斑马鱼; Nrf2; 胚胎发育; 氧化应激; Nrf2/ARE 信号通路

中图分类号: Q291; Q959.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)06-1181-04

Research Progress of Model Organism Zebrafish Nrf2*

LIU Yi¹, LI Li^{1Δ}, CHENG Lei^{2Δ}, WU Qiong¹, LI Bing-sheng³

(1 Life Science and Technology College, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang, 150080, China;

2 The Ministry of Agriculture Key Laboratory of Freshwater Aquatic Biotechnology and Breeding, Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin, Heilongjiang, 150070, China;

3 Academy of Fundamental and Interdisciplinary Sciences, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang, 150080, China)

ABSTRACT: The signal pathway of Nrf2 / ARE is the critical pathway of most organisms in antioxidant stress reaction and resistance to external stimuli. It plays an important role in anti-inflammatory, immune, anti-tumor, anti-apoptotic, nerve protection and other areas. As a common mode of animals, zebrafish is widely used in developmental biology, genetics, toxicology and other research fields. The research shows that the transcription factor NF-E2 related factor 2 not only exists in mammals, but also exists in zebrafish and it is highly conservative and plays an important role in antioxidant stress reaction. This article aims to describe the latest research progress on the structure and function and signal pathway of Nrf2, with the purpose of giving insights into the prevention and therapy of disease caused by Nrf2 / ARE signal pathway.

Key words: Zebrafish; Nrf2; Embryonic development; Oxidative stress; Nrf2 / ARE signal pathway

Chinese Library Classification(CLC): Q291; Q959.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)06-1181-04

前言

氧化应激反应产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS)或亲电子试剂能够直接或间接的影响体内蛋白质、脂质、核酸等物质的生理功能,从而引发相关疾病。为了应对氧化损伤产生的不良反应,机体形成了一套复杂的应答系统,当机体受到氧化损伤时,能诱导相关的抗氧化基因表达一系列保护性蛋白,以缓解机体所受损害^[1,2]。转录因子 NF-E2 相关因子 2 (NF-E2-related factor 2, Nrf2) 是机体氧化应激应答系统中的关键因子,受 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (Kelch-like

ECH-associated protein 1, Keap1)的调控,通过与抗氧化反应元件 ARE (anti-oxidant response element, ARE)相互作用,来调控下游相关抗氧化基因的表达^[3,4]。Nrf2 系统是非常重要的细胞防御系统之一,由于其广泛的应答特性,近年来已成为生物医学领域的研究热点。在正常情况下, Nrf2 调控系统在抗炎、免疫、抗肿瘤、抗凋亡、神经保护等方面发挥着重要的生物学功能,目前研究表明,在很多疾病发生时, Nrf2 及其信号通路系统会出现紊乱,因此 Nrf2 也成为人们备受关注的药物作用靶点^[5-7]。

Nrf2 系统在脊椎类动物之间高度保守,在模式动物斑马鱼的细胞防御过程中也发挥着重要的作用, Nrf2 基因敲除小

* 基金项目:国家自然科学基金项目(11474076);新教师基金项目(20132302120069);农业部淡水水产生物技术与遗传育种重点实验室开放课题(FBB2015-03)

作者简介:刘毅(1992-),硕士研究生,研究方向:发育生物学, E-mail: liuyi1992hit@163.com

Δ 通讯作者:李丽,博士,副教授,研究方向:发育生物学, E-mail: lilili@hit.edu.cn

程磊,博士,副研究员,研究方向:鱼类遗传育种, E-mail: chenglei1982@126.com

(收稿日期:2017-03-30 接受日期:2017-04-23)

鼠和斑马鱼在环境应答中出现异常,导致细胞对外来异物、致癌物质、氧化应激等刺激的敏感度增加,引起肿瘤、神经损伤、心脑血管损伤、自身免疫异常等。因此,保证 Nrf2 系统对环境应答的正常运行,对生物体维持正常发育及其活动有着重要的意义。

1 Nrf2 和 Keap1 的结构基础

最近研究发现,在斑马鱼体内存在着一套双重的 Nrf2 和 Keap1 基因,通过对两者结构和功能的系统阐述,使对 Nrf2 信号通路有更深入的了解。

1.1 Nrf2 的结构和功能

Nrf2 是一种含亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZip)结构的转录因子,属 CNC(Cap-n-collar, CNC)调节蛋白家族。Nrf2 在大部分生物体内普遍存在,属于高度保守的持家基因,Nrf2 含有 6 个同源结构域,包括 Neh1-6 域^[8,9]。

Neh1 结构域包含 1 个碱性亮氨酸拉链结构,与 sMaf 蛋白(small MAF proteins)发生相互作用^[10,11],促进 DNA 与其形成异二聚体后识别并结合 ARE,启动目标基因的转录,该域还含有核定位信号(nuclear localization signal, NLS)和核输出信号(nuclear export signal, NES),参与调控 Nrf2 的核转位和降解;N 末端的 Neh2 域是与 Keap1 的 Kelch 区相结合的结构域,Neh2 域在调节 Nrf2 的活性中扮演着重要作用;C 末端的 Neh3 域具有双重角色,不仅有活化转录的作用,也在影响蛋白质的稳定性方面发挥着作用;Neh4 和 Neh5 是富含酸性氨基酸残基的两个转录激活域,都可以和转录共激活因子 CBP (CREB-binding protein)结合,促进基因的转录;Neh6 域是富有大量丝氨酸残基的结构域,有关报道 Neh6 域包含降解决定子,促进自身(即使在氧化应激的条件下)Nrf2 的降解,但目前尚未了解其发生机制。

斑马鱼体内转录因子 NF_E2 相关因子(NF_E2-related factor, Nrf)家族包括 Nfe2、Nrf1a、Nrf1b、Nrf2a、Nrf2b 和 Nrf3 等 6 个基因^[12]。其中 Nrf2b 是近两年新发现的一个基因,Nrf2a 和 Nrf2b 属 Nrf2 同源基因,分别位于斑马鱼的 9 号和 6 号染色体^[13]。与 Nrf2a 相比,Nrf2b 缺少 Neh4 激活域,这也可能是造成斑马鱼成鱼组织中 Nrf2a 的转录水平明显高于 Nrf2b 的原因^[13]。

1.2 Keap1 的结构和功能

Keap1 是 Nrf2 在细胞质中的结合蛋白,与肌动蛋白相结合并锚定于胞浆中,包括 5 个区域,分为 N 端结构域(NTR)、干预区(IVR)、BTB 区、双甘氨酸重复区(DGR)和 C 端结构域(CTR)^[14,15]。IVR 区富含半胱氨酸残基,氧化剂、亲电子性物质等可与 Keap1 在 IVR 区发生相互作用,同时 IVR 区参与泛素化连接酶的形成,促进 Nrf2 的稳定^[15];Keap1 二聚体化与 BTB 区有关,该域内某些 Ser 位点的突变可影响 Keap1 二聚化,干扰 Keap1 与 Nrf2 的结合^[16];DGR 区含有 6 个双甘氨酸重复序列是 Keap1 与 Nrf2 的结合区^[17]。

两种 Keap1 都可与 Nrf2 结合并抑制 Nrf2 的活性,然而在亲电子试剂 DEM 等诱导剂处理下,应答能力却有所区别,Kobayashi M^[21]等利用这一特性,将 Nrf2 激动剂分成 6 类。哺乳类动物 Keap1 在 273、288 位点均有重要的功能性半胱氨酸残基,而斑马鱼 Keap1a 和 Keap1b 分别在 288、273 位点有一个功能性半胱氨酸残基^[14,18,19]。利用斑马鱼两种 Keap1 不同位点的半

胱氨酸残基,分别对 273 和 288 位点进行点变异,点变异后两个 Keap1 都失去对 Nrf2 的抑制能力。这一结果证明了 Keap1 的 Cys273 和 288 位点的重要性,与小鼠的实验结果相吻合,并通过 MS 解析发现这两个氨基酸是 15d-PGJ₂ (15-脱氧- Δ 12,14-前列腺素 J₂)的结合位点,首次从遗传学的角度证明不同的 Nrf2 激动剂是通过与 Keap1 不同位点的半胱氨酸残基反应,并激活 Nrf2/ARE 的信号通路^[21]。

2 Nrf2 的表达和调控

斑马鱼 Nrf2 及其同源基因在不同时期、不同组织的表达量具有显著差异,阐述 Nrf2a 与 Nrf2b 的表达量与调控方式的内在联系。

2.1 Nrf2a 和 Nrf2b 表达的差异性

斑马鱼胚胎 Nrf2a 和 Nrf2b 在不同的发育时期表达量有显著性差异^[12,13]。Nrf2a 在斑马鱼胚胎发育初期表达量很低,随着发育时间推迟,表达量逐渐上升;Nrf2b 在斑马鱼胚胎发育初期的表达水平较高,且在鱼卵孵化后的表达量有显著性降低。值得注意的是,Nrf2b 在斑马鱼早期胚胎发育的各个时期都处于高度表达状态。

然而,在斑马鱼成鱼组织中 Nrf2a 的表达量明显高于 Nrf2b。两者的表达部位也有所差别,Nrf2a 表达最高的组织是鳃,在卵巢中表达最低,而 Nrf2b 在卵巢中表达最高,在眼部表达最低。由此推测,Nrf2a 可能在成鱼大多数组织的抗氧化损伤防护中发挥着重要作用,而 Nrf2b 可能在调控斑马鱼早期胚胎和子代发育、遗传等方面发挥着作用。

2.2 Nrf2a 和 Nrf2b 的基因调控

Nrf2a 与 Nrf2b 的表达是否互有影响,Mark E.Hahn 等^[13]通过 Nrf2a 敲低实验,检测 Nrf2b 的表达。研究发现实验组 Nrf2b 表达量下调,通过有机物 tBHQ(Tertiary butylhydroquinone)的诱导实验组 Nrf2b 的表达量又恢复到原有水平。用同样的实验方法通过 Nrf2b 敲低实验,检测 Nrf2a 在胚胎不同时期的表达,结果显示 Nrf2a 的表达几乎没有受到影响。上述研究表明在转录水平至少部分 Nrf2b 受 Nrf2a 的调控。

Nrf2a 和 Nrf2b 所调控的下游基因也有所差别。通过显微注射的方式分别对 Nrf2a 和 Nrf2b 进行基因敲低^[22,23],通过基因芯片表达谱的检测^[24],发现只有少部分基因是由两个转录因子共同调控,说明 Nrf2a 与 Nrf2b 在斑马鱼胚胎时期调控下游基因的差异性很大。

有机物质、亲电子物质刺激可诱导 Nrf2a 的表达,Nrf2a 的表达又可促进下游编码抗氧化蛋白和 II 相解毒酶的表达,以达到保护机体的作用。Mark E.Hahn 等利用斑马鱼胚胎作模型,用有机物质处理胚胎,诱导 Nrf2a 的表达或利用显微注射技术将 Nrf2a 的 mRNA 注射到斑马鱼胚胎,然后检测相应抗氧化靶基因如 nqo1、sod、gstp1、hsp70 等,基因表达量显著增加^[25,26]。表明 Nrf2a 是编码抗氧化蛋白和 II 相解毒酶的主要调控者。

Nrf2b 具有抑制某些基因表达的功能,将 Nrf2b 基因敲低后,检测到 p53、细胞周期蛋白 G1、血红素加氧酶 1 的表达量增加。Mark E.Hahn 等通过向斑马鱼胚胎注射 Nrf2b 的 mRNA 以及 GFP 构建 ARE 启动子报告系统的实验表明,对照组有 61 % 的相关基因表达,而实验组只有 11 % 的相关基因表达。这一

实验也支持了 Nrf2b 是斑马鱼胚胎发育时期的负调控因子。

3 Nrf2 参与抗氧化防御系统

3.1 Keap1-Nrf2/ARE 信号通路

Keap1-Nrf2/ARE 信号通路是机体抗氧化应激和异生物质损伤最重要的防御机制之一^[27]。研究表明,Nrf2 的 Neh2 结构域含有 ETGE、DLG 两个与胞浆蛋白 Keap1 的结合位点^[17,28]。一个 Neh2 域可以通过 ETGE、DLG 两个结合位点分别与 Keap1 相互作用,其中 ETGE 比 DLG 结合 Keap1 的亲合力更强^[29,30]。正常条件下,Nrf2 与 Keap1 在细胞质中相结合,当受到亲电子物质或其它氧化物质刺激时,生物体内氧化还原平衡被打破,Keap1 的部分半胱氨酸残基被修饰,E3 泛素连接酶构象改变从而导致 Nrf2 的游离,随后进入了细胞核,与 sMaf 形成二聚体后与 ARE 结合,启动相关靶基因的表达^[10]。当氧化还原恢复到原来状态,Nrf2 与 ARE 进行解离,输出到胞质,进行泛素化后降解,体内的 Nrf2 水平恢复到正常水平。在斑马鱼体内,无论 Keap1 还是 Nrf2 都具有同源基因,但它们相互作用的精确机制尚未被研究清楚。

Keap1 和 Nrf2 的入核机制在学术界也颇有争议。Keap1 蛋白一直被认为是胞浆蛋白,只在细胞质中存在并与 Nrf2 相结合,对 Nrf2 进行泛素化使其降解,阻止其进入细胞核。但最近相关研究表明,Keap1 在 LMB (莱普霉素 B,一种核输出信号抑制剂)的刺激下,Keap1 能够在细胞核内聚积^[31,32]。目前,人们只发现 Nrf2 具有核定位信号,尚未发现 Keap1 存在核定位信号,因此也有研究者认为 Nrf2 在进入细胞核内行使功能的同时将 Keap1 带入细胞核。所以 Keap1 是否存在入核机制也有待更深入的研究,为研究 Keap1 与 Nrf2 之间相互作用的机制奠定基础。

3.2 Nrf2 通路 AhR 通路的交叉

芳香族化合物受体 AhR (Aryl hydrocarbon receptor, AhR) 蛋白,属于超家族转录因子。AhR 存在两个亚型 AhR1 和 AhR2,而 AhR2 只在鱼类中表达。正常情况下,大部分 AhR 存在于细胞质,但在外界环境因素下如 2,3,7,8-TCDD (2,3,7,8-四氯-二苯并-对-二恶英) 等物质的刺激下,AhR 与配体 TCDD 结合后,可以从细胞质转运至细胞核,并与 AhR 的核转运蛋白 (AhR nuclear transportor, ARNT) 结合形成异二聚体,激活下游相应基因表达,引起机体反应^[33-35]。Mark E.Hahn 等研究发现,斑马鱼的 Nrf2 与 AhR2 可形成信号串扰机制^[13]。当胚胎暴露在 AhR 的强效激动剂 TCDD 时,Nrf2b 被诱导表达,直接证明了在胚胎发育时期 AhR2 和 Nrf2b 信号通路之间存在串扰机制。Nrf2a 也以不同的方式与 AhR 之间存在信号串扰。在 TCDD 的作用下,Nrf2a 的表达尽管没有上调,但是在 AhR2 的表达被抑制后,Nrf2a 的表达显著降低。由此推测,AhR2 在斑马鱼胚胎发育过程中可能对维持 Nrf2a 的基础水平和诱导 Nrf2b 的表达有着直接作用。

4 结语

作为一种模式生物,首先由于具有易饲养,生殖周期短,繁殖能力强,结构简单,为大规模的筛选实验提供了有利的条件,另外由于幼鱼期个体透明,与人类基因有着极大的相似性等特点,广泛地应用于生物学领域。

通过对斑马鱼两种 Nrf2 结构和功能的对比和解析,发现两种 Nrf2 在多方面存在差异,表现在基因的表达调控、Nrf2/ARE 信号通路、与 AhR 信号通路的串扰等方面^[36-38]。有趣的是斑马鱼有两套双重的并且有功能的 Nrf2 和 Keap1 基因,通过两者之间结构和功能的比对研究,对研究普遍存在大多数生物体内的 Nrf2 各个结构域重要功能位点提供了新材料、新思路^[39]。使我们从分子角度更好的理解 Nrf2 应答系统对细胞压力的防护作用及对脊椎动物发育的调控方式,对于阐明 Nrf2 信号通路对不同氧化应激反应的确切调控机制、Nrf2/ARE 信号通路与人类不同疾病之间的相关性以及 Nrf2 与其它信号通路的串扰机制,对于我们如何治疗癌症、心血管、免疫类、神经性疾病及临床靶向药物的研发等有非常重要的意义,使 Nrf2 系统更好的发挥作用,从而达到预防与治疗 Nrf2 相关疾病的目的^[40-44]。

参考文献 (References)

- [1] Wang L, Gallagher EP. Role of Nrf2 antioxidant defense in mitigating cadmium-induced oxidative stress in the olfactory system of zebrafish [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2013, 266(2): 177-186
- [2] Zeng L, Zheng JL, Wang YH, et al. The role of Nrf2/Keap1 signaling in inorganic mercury induced oxidative stress in the liver of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* [J]. Ecotoxicology & Environmental Safety, 2016, 132: 345-352
- [3] Fuse Y, Nguyen VT, Kobayashi M. Nrf2-dependent protection against acute sodium arsenite toxicity in zebrafish [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2016, 305: 136-142
- [4] Chatterjee N, Tian M, Spirohn K, et al. Keap1-Independent Regulation of Nrf2 Activity by Protein Acetylation and a BET Bromodomain Protein[J]. PLoS genetics, 2016, 12: e1006072
- [5] Magesh S, Chen Y, Hu L. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents[J]. Medicinal Research Reviews, 2012, 32(4): 687-726
- [6] 潘晓菲, 谭初兵, 时丽丽, 等. Nrf2/ARE 信号通路及其相关药物研究进展[J]. 药物评价研究, 2013(1): 54-58
Pan Xiao-fei, Tan Chu-bing, Shi Li-li, et al. Advances in study Nrf2 / ARE signal pathway and its relevant drugs [J]. Drug Evaluation Research, 2013(1): 54-58
- [7] Gao B, Doan A, Hybertson BM. The clinical potential of influencing Nrf2 signaling in degenerative and immunological disorders [J]. Clinical pharmacology: advances and applications, 2014, 6(1): 19-34
- [8] Kobayashi M, Itoh K, Suzuki T, et al. Identification of the interactive interface and phylogenetic conservation of the Nrf2-Keap1 system: Conserved regulation of cytoprotective genes[J]. Genes to Cells, 2002, 7(8): 807-820
- [9] Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain [J]. Genes and Development, 1999, 13(1): 76-86
- [10] Takagi Y, Kobayashi M, Li L, et al. MafT, a new member of the small Maf protein family in zebrafish [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 320(1): 62-69
- [11] Kimura M, Yamamoto T, Zhang J, et al. Additions and Corrections: Molecular basis distinguishing the DNA binding profile of Nrf2-Maf

- heterodimer from that of Maf homodimer [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(17): 10644-10653
- [12] Williams LM, Timme-Laragy AR, Goldstone JV, et al. Developmental Expression of the Nfe2-Related Factor (Nrf) Transcription Factor Family in the Zebrafish, *Danio rerio* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e79574
- [13] Timme-Laragy A R, Karchner S I, Franks D G, et al. Nrf2b, novel zebrafish paralog of oxidant-responsive transcription factor NF-E2-related factor 2 (NRF2)[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(7): 4609-4627
- [14] Li L, Kobayashi M, Kaneko H, et al. Molecular evolution of Keap1: Two Keap1 molecules with distinctive intervening region structures are conserved among fish [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(6): 3248-3255
- [15] Abiko Y, Mizokawa M, Kumagai Y. Activation of the Kelch-like ECH-Associated Protein 1 (Keap1)/ NF- E2-Related Factor 2 (Nrf2) Pathway through Covalent Modification of the 2-Alkenal Group of Aliphatic Electrophiles in *Coriandrum sativum* L [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62: 10936-10944
- [16] Chauhan N, Chaunsali L, Deshmukh P, et al. Department of Biophysics, National Institute of Mental Health and Neuro Sciences (NIMHANS), Bangalore 560029, India. Analysis of dimerization of BTB-IVR domains of Keap1 and its interaction with Cul3, by molecular modeling[J]. *Bioinformatics*, 2013, 9(9): 450-455
- [17] Canning P, Sorrell F, Bullock A. Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2 [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, 88: 101-107
- [18] Lu M, Yuan Z, Jiang Y, et al. A systematic molecular dynamics approach to the study of peptide Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors and its application to p62 peptides[J]. *Molecular Biosystems*, 2016, 12: 1378-1387
- [19] Zhang DD, Hannink M. Distinct Cysteine Residues in Keap1 Are Required for Keap1-Dependent Ubiquitination of Nrf2 and for Stabilization of Nrf2 by Chemopreventive Agents and Oxidative Stress[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23(22): 8137-8151
- [20] Li Y, Paonessa JD, Zhang Y. Mechanism of chemical activation of Nrf2[J]. *PLoS one*, 2012, 7(4): e35122
- [21] Kobayashi M, Li L, Iwamoto N, et al. The Antioxidant Defense System Keap1-Nrf2 Comprises a Multiple Sensing Mechanism for Responding to a Wide Range of Chemical Compounds [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2009, 29(2): 493-502
- [22] Thomas JK, Janz DM. Embryo Microinjection of Selenomethionine Reduces Hatchability and Modifies Oxidant Responsive Gene Expression in Zebrafish[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26520
- [23] Timme-Laragy AR, Karchner SI, Hahn ME. Gene knockdown by morpholino-modified oligonucleotides in the zebrafish (*Danio rerio*) model: applications for developmental toxicology [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 889: 51-71
- [24] 马文丽, 滕牧洲. 走近医学研究领域中的基因芯片技术[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2014, (6): 361-365
- Ma Wen-li, Teng Mu-zhou. A brief introduction of the gene chip in modern medical research [J]. *Journal of Molecular Diagnosis and Therapy*, 2014, (6): 361-365
- [25] Timme-Laragy AR, Van Tiem LA, Linney EA, et al. Antioxidant Responses and NRF2 in Synergistic Developmental Toxicity of PAHs in Zebrafish[J]. *Toxicological Sciences*, 2009, 109(2): 217-227
- [26] Nakajima H, Nakajima-Takagi Y, Tsujita T, et al. Tissue-restricted expression of Nrf2 and its target genes in zebrafish with gene-specific variations in the induction profiles[J]. *PLoS one*, 2011, 6(10): e26884
- [27] Lau A, Whitman SA, Jaramillo MC, et al. Arsenic-Mediated Activation of the Nrf2-Keap1 Antioxidant Pathway [J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2013, 27(2): 99-105
- [28] Tsujita T, Li L, Nakajima H, et al. Nitro-fatty acids and cyclopentenone prostaglandins share strategies to activate the Keap1-Nrf2 system: A study using green fluorescent protein transgenic zebrafish[J]. *Genes to Cells*, 2011, 16(1): 46-57
- [29] Li W, Kong A. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response[J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2009, 48(2): 91-104
- [30] Suzuki T, Yamamoto M. Molecular basis of the Keap1 Nrf2 system [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2015, 88: 93-100
- [31] Karapetian RN, Evstafieva AG, Abaeva IS, et al. Nuclear Oncoprotein Prothymosin alpha is a Partner of Keap1: Implications for Expression of Oxidative Stress-Protecting Genes [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(3): 1089-1099
- [32] Velichkova M, Hasson T. Keap1 Regulates the Oxidation-Sensitive Shuttling of Nrf2 into and out of the Nucleus via a Crm1-Dependent Nuclear Export Mechanism[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(11): 4501-4513
- [33] 伍会健, 庞朋沙, 过倩萍. 细胞内 AhR 信号转导通路的机制研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(13): 2567-2570
- Wu Hui-jian, Pang Peng-sha, Guo Qian-ping. Biological Role of AhR signaling Pathway[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2010, 10(13): 2567-2570
- [34] Rousseau ME, Sant KE, Borden LR, et al. Regulation of Ahr signaling by Nrf2 during development: Effects of Nrf2a deficiency on PCB126 embryotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 2015, 167: 157-171
- [35] Yeager RL, Reisman SA, Aleksunes LM, Klaassen CD. Introducing the "TCDD-Inducible AhR-Nrf2 Gene Battery" [J]. *Toxicological Sciences*, 2009, 111(2): 238-246
- [36] Hahn ME, McArthur AG, Karchner SI, et al. The transcriptional response to oxidative stress during vertebrate development: effects of tert-butylhydroquinone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin [J]. *PLoS one*, 2014, 9(11): e113158
- [37] Nakahara T, Mitoma C, Hashimoto-Hachiya A, et al. Antioxidant *Opuntia ficus-indica* Extract Activates AHR-NRF2 Signaling and Upregulates Filaggrin and Loricrin Expression in Human Keratinocytes[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2015, 18(10): 1143-1149
- [38] Lanham KA, Plavicki J, Peterson RE, et al. Cardiac myocyte-specific AHR activation phenocopies TCDD-induced toxicity in zebrafish[J]. *Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology*, 2014, 141(1): 141-154
- [39] Griffin A, Krasniak C, Baraban SC. Advancing epilepsy treatment through personalized genetic zebrafish models [J]. *Progress in brain research*, 2016, 226: 195-207

- [14] 关涛,赵建,牛勃. 抗叶酸代谢药 MTX 诱导神经管畸形动物模型及其对基因组稳定性的影响[C].山西医科大学, 2011
Guan Tao, Zhao Jie, Niu Bo. Impact of Anti-folate drug MTX on the Development of Neural Tube Defects in Mice and genomic instability [C]. Shan Xi Medical University, 2011
- [15] Price E M, Cotton A M, Peñaherrera M S, et al. Different measures of "genome-wide" DNA methylation exhibit unique properties in placental and somatic tissues [J]. Epigenetics Official Journal of the Dna Methylation Society, 2012, 7(7): 652-663
- [16] 张敏, 权力, 陈晓丽, 等. 神经管畸形神经组织 DNA 的基因组甲基化水平液相色谱——串联质谱(LC-MS/MS)定量检测[C]. 全国小儿神经学术会议暨北大国际小儿神经论坛, 2011
Zhang Min, Quan Li, Chen Xiao-li et al. The quantification of global DNA methylation in neuro-tissue of neural tube defects by LC-MS/MS [C]. The national pediatric academic conferences and Peking University international pediatric nerve forum, 2011
- [17] 贾小慧, 陆素琴, 白云, 等. 孕妇生化代谢指标与胎儿神经管畸形的相关研究[J]. 中国妇幼健康研究, 2014, 25(1): 69-71
Jia Xiao-hui, Lu Su-qin, Bai Yun, et al. Correlation study of biochemical metabolic indexes of pregnant women and fetal neural tube defects [J]. China women's and children's health research, 2014, 25(1): 69-71
- [18] 张勤, 薛鹏, 白宝玲, 等. 质谱检测叶酸缺乏人胚肾细胞中低组蛋白 H3 赖氨酸 79 甲基化修饰 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(23): 4420-4424
Zhang Qin, Xue Peng, Bai Bao-ling, et al. Low Histone H3 Lysine 79 Methylation in Folic Acid Deficiency HEK-293 Cells by Mass Spectrometry [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014, 14 (23): 4420-4424
- [19] 朱一剑, 李新生, 马明福, 等. 重庆地区孕中期妇女叶酸认知度、维生素 B₁₂ 与神经管畸形的相关性研究[J]. 现代预防医学, 2014, 41(6)
Zhu Yi-jian, Li Xin-sheng, Ma Fu-ming, et al. Study on the correlation between the level of awareness on folic acid and vitamin B₁₂, and neural tube defects among women at middle stages of pregnancy in Chongqing[J]. Modern Preventive Medicine, 2014, 41(6)
- [20] 武笋荔. SMURF 基因与神经管畸形的相关性研究及 miRNA 对神经管畸形发生初探[D]. 复旦大学, 2012
Wu Song-li. The correlation between SMURF gene and neural tube defects, and the initial exploring the function of miRNA in the development of neural tube defects[D]. Fudan University, 2012
- [21] Price E M, Peñaherrera M S, Portales-Casamar E, et al. Profiling placental and fetal DNA methylation in human neural tube defects[J]. Epigenetics & Chromatin, 2016, 9(1): 1-14
- [22] Rochtus A, Jansen K, Van G C, et al. Nutri-epigenomic Studies Related to Neural Tube Defects: Does Folate Affect Neural Tube Closure Via Changes in DNA Methylation? [J]. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2015, 15(13): 1095-102
- [23] Milewski R C, Chi N C, Li J, et al. Identification of minimal enhancer elements sufficient for Pax3 expression in neural crest and implication of Tead2 as a regulator of Pax3 [J]. Development, 2004, 131(4): 829-37
- [24] Molloy A M, Kirke P, Hillary I, et al. Maternal serum folate and vitamin B₁₂ concentrations in pregnancy associated with neural tube defects[J]. Minerva Ginecologica, 1985, 60(7): 660-665
- [25] Agger K, Cloos P A, Christensen J, et al. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development[J]. Nature, 2007, 449(449): 731-734
- [26] Skinner M K. Environmental epigenomics and disease susceptibility [J]. Nature Reviews Genetics, 2011, 12(7): 620-622
- [27] Schübeler D. Function and information content of DNA methylation [J]. Nature, 2015, 517(7534): 321-326
- [28] Imbard A, Benoist J F, Blom H J. Neural tube defects, folic acid and methylation [J]. International Journal of Environmental Research & Public Health, 2013, 10(9): 4352-4389
- [29] Padmanabhan N, Jia D, Geary-Joo C, et al. Mutation in Folate Metabolism Causes Epigenetic Instability and Transgenerational Effects on Development[J]. Cell, 2013, 155(1): 81-93
- [30] Liu Z, Wang Z, Li Y, et al. Association of genomic instability, and the methylation status of imprinted genes and mismatch-repair genes, with neural tube defects [J]. European Journal of Human Genetics Ejhg, 2012, 20(5): 516-20
- [31] Wu L, Wang L, Shangguan S, et al. Altered methylation of IGF2 DMR0 is associated with neural tube defects[J]. Molecular & Cellular Biochemistry, 2013, 380(1-2): 33-42

(上接第 1184 页)

- [40] Hahn ME, Timme-Laragy AR, Karchner SI, et al. Nrf2 and Nrf2-related proteins in development and developmental toxicity: Insights from studies in zebrafish (Danio rerio) [J]. Free radical biology & medicine, 2015, 88(Pt B): 275-289
- [41] Uruno A, Yagishita Y, Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system and diabetes mellitus [J]. Archives of biochemistry and biophysics, 2015, 566: 76-84
- [42] Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism [J]. Frontiers in oncology, 2012, 2: 201-213
- [43] Bhakkiyalakshmi E, Sireesh D, Rajaguru P, et al. The emerging role of redox-sensitive Nrf2-Keap1 pathway in diabetes [J]. Pharmacological research, 2015, 91: 104-114
- [44] Johnston-Carey HK, Pomatto LCD, Davies KJA. The Immunoproteasome in oxidative stress, aging, and disease[J]. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 2015, 51: 268-281