

• 论著 • 原始研究 •

莱菔硫烷对气道黏蛋白 MUC5AC 表达的调控作用



林晓萍, 曾奕明

福建医科大学附属第二医院呼吸内科(福建泉州 362000)

【摘要】 目的 研究莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)对气道黏蛋白5AC(mucin 5AC, MUC5AC)表达的调控作用并探讨可能的机制。方法 体外培养人气道上皮细胞A549细胞,分别使用吡啶醇肉豆蔻酸乙酯(PMA)和过氧化氢(H₂O₂)刺激A549细胞诱导黏液高分泌模型,使用核因子相关因子2(Nrf2)信号通路的强诱导剂莱菔硫烷为干预因素,实验分为空白对照组(不加任何刺激)、黏液高表达组(PMA组和H₂O₂组)及莱菔硫烷干预组(SFN+PMA组;SFN+H₂O₂组)。莱菔硫烷预先处理30分钟后分别予PMA、H₂O₂干预24小时,分别采用Real time PCR和Western blot方法检测A549细胞MUC5AC、Nrf2及其下游抗氧化基因血红素加氧酶1(HO-1)、醌氧化还原酶1(NQO1)和谷氨酰半胱氨酸合成酶催化亚单位(GCLC)的mRNA含量及蛋白表达水平。结果 与阴性对照组相比,PMA组和H₂O₂组MUC5AC mRNA和蛋白水平显著升高(P 均 <0.05)。给予莱菔硫烷处理后,MUC5AC的表达明显降低($P<0.05$),而Nrf2及其下游抗氧化基因HO-1表达水平较对照组和黏液高表达模型组升高(P 均 <0.05)。结论 莱菔硫烷明显抑制PMA及H₂O₂诱导的气道黏蛋白MUC5AC基因转录及蛋白合成分泌,可能通过Nrf2/HO-1信号通路参与调控气道黏液高分泌。

【关键词】 莱菔硫烷;黏蛋白;MUC5AC;Nrf2信号通路;血红素加氧酶-1

Role of sulforaphane in the MUC5AC mucin production of A549 cell

LIN Xiaoping, ZENG Yiming

Department of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou, 362000, P.R.China

Corresponding author: ZENG Yiming, Email: zeng_yi_ming@126.com

【Abstract】 Objective To explore the role of sulforaphane (SFN) on the regulation of airway mucin 5AC mucin expression in the airway epithelial cell line (A549), and the underlying mechanism. **Methods** The experiments were performed in culture of PMA and H₂O₂ induced A549 in vitro. A549 cells divided into three groups: the control group, the model group (PMA and H₂O₂) and the intervention groups (SFN+PMA; SFN+H₂O₂). The intervention group's cells were pretreated with SFN for 30 mins before exposure to stimuli (PMA or H₂O₂). The MUC5AC, Nrf2 and the antioxidant gene HO-1, NQO1, GCLC mRNA levels were analyzed by real time-PCR, and protein production was assayed by western blot. **Results** Compared with the control group, expression of MUC5AC mucin was increased after being stimulated by PMA or H₂O₂ ($P<0.05$), but it was significantly inhibited by SFN ($P<0.05$). SFN induced the expression of Nrf2 gene and the antioxidant gene HO-1 (compared with the control and model groups, $P<0.05$). **Conclusion** Sulforaphane involves the airway mucous hypersecretion induced by PMA and H₂O₂, and Nrf2/HO-1 signaling pathway may play an important role in mucin MUC5AC regulation.

【Key words】 Sulforaphane; Mucus; MUC5AC; Nrf2 signaling pathway; Heme oxygenase-1

DOI: 10.7507/1672-2531.201605024

基金项目:福建省自然科学基金(编号:2013J01289);福建省卫生厅青年科研课题(编号:40935);福建省泉州市科技项目(编号:2013Z55);福建医科大学附属第二医院青年苗圃基金(编号:2012MP37)

通信作者:曾奕明, Email: zeng_yi_ming@126.com

气道黏液过度分泌是慢性阻塞性肺疾病、支气管哮喘、支气管扩张症及肺囊性纤维化等慢性气道炎症性疾病发病、死亡的常见原因^[1-4],目前仍缺乏有效的治疗手段。因此,深入探索气道黏液高分泌

的发病机制及对应的调控措施具有重要的临床意义。研究发现氧化应激在黏蛋白基因表达调控中具有重要作用^[5,6],作为细胞抗氧化应激反应的调节中枢之一的核因子相关因子2(Nuclear factor-E2 related factor 2, Nrf2)亦在气道黏蛋白表达调控中发挥重要作用^[7-10]。莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)是一种异硫氰酸盐,广泛存在于西兰花等十字花科植物中,是蔬菜中所发现的抗癌效果最好的植物活性物质,也是一种抗氧化剂,是Nrf2重要的激活剂^[11-15]。因此,我们推测莱菔硫烷参与调控气道黏蛋白MUC5AC表达,并可能通过Nrf2信号通路发挥作用。

黏蛋白MUC5AC(mucin 5AC)是一种分泌型蛋白,是气道黏液毯凝胶形成蛋白的主要成分^[1]; 卞啉醇肉豆蔻酸乙酯(phorbol myristate acetate, PMA)是二酰基甘油的类似物,大量研究已证明PMA是黏蛋白MUC5AC的强促分泌剂^[16,17]; 过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)是一种强氧化剂,是诱导氧化应激的主要活性物质。因此,本研究分别使用PMA和H₂O₂刺激人气道上皮细胞A549来建立黏蛋白MUC5AC高表达模型,以探讨莱菔硫烷在气道黏蛋白MUC5AC表达中的调控作用及可能的作用机制,为临床开发抑制气道黏液高分泌的新药提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

1.1.1 细胞株 人气道上皮细胞A549株购自中国科学院上海细胞库,复苏后的第3代到第10代细胞用于实验。

1.1.2 主要材料与试剂 培养基和胎牛血清购自Gibco公司,PMA购自Enzo公司,莱菔硫烷购自sigma公司,Trizol购自Invitrogen公司,逆转录试剂盒和Real time PCR试剂盒均购自TAKARA公司,引物由上海生工公司合成,BCA蛋白定量试剂盒、鼠抗人MUC5AC单克隆抗体购自Thermo公司,抗人Nrf2、HO-1、GCLC和NQO1单克隆抗体

购自abcam公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞培养 人气道上皮细胞A549使用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素的RPMI-1640培育基,置于37℃、5%CO₂的培育箱中培养,根据细胞生长情况,每2~3天换液1次,每4~5天以1:3比例传代1次。

1.2.2 细胞分组 对数生长期的A549细胞融合度达90%左右时,换用无血清的培养基培养过夜(以让各组细胞MUC5AC的表达处于较低水平),再进行后续干预。实验共分为3大组:①对照组:在新鲜无血清培养基中继续培养;②黏液高表达组:分别予不同浓度PMA(10~150 nM)和H₂O₂(0~150 μM)刺激A549细胞24小时,提取细胞总RNA,real time PCR法测定MUC5AC mRNA表达水平,挑选出最佳的刺激浓度;③莱菔硫烷干预组(SFN+PMA组,SFN+H₂O₂组):不同浓度莱菔硫烷(5~40 μM)预处理细胞30分钟后,继续加入PMA或H₂O₂刺激细胞。以上各组均培育24小时后,收集细胞进行后续检测。

1.2.3 实时荧光定量PCR 采用Trizol法分别提取各组细胞的总RNA,经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定后,分别测定RNA在260 nm和280 nm的吸光度值,确保比值介于1.8~2.0。取1 μg总RNA,按照TAKARA逆转录试剂盒操作说明将RNA逆转录为cDNA,后进行PCR扩增,每个样本设3个复孔。反应程序:95℃变性30秒,95℃变性5秒,60℃退火32秒,40个循环,溶解曲线分析:95℃15秒,60℃1分钟,95℃15秒。调整基线,以空白管不出现阳性为准,以与基线的交点的循环次数为Ct值。使用GADPH mRNA作为内参,采用2^{-ΔΔCt}法确定靶基因的mRNA的相对表达量,以空白对照组作为校正样本(引物序列详见表1)。

1.2.4 Western blot 实验 离心收集各组细胞,使用蛋白裂解液于冰上提取细胞总蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度。每组样本分别取30 μg总蛋白,经8%~10%聚丙烯酰胺的梯度SDS-PAGE电泳分

表1 实时荧光定量PCR的引物序列

名称	上游系列	下游系列
GADPH	TGCCACTCCTCCACCTTTG	CGAACCCCTGTGTGCTGT
MUC5AC	TACTCGCTCGAGGGCAACA	TGCAGTGCAGGGTCACATTC
Nrf2	AAACCAGTGGATCTGCCAAC	ACGTAGCCGAAGAAACCTCA
HO-1	ATGGCCTCCCTGTACCACATC	TGTTGCGCTCAATCTCCTCT
NQO1	GTTGCCTGAAAAATGGGAG	AAAAACCACCAGTGCCAGT
GCLC	TCTCTAATAAAGAGATGAGCAACATGC	TTGACGATAGATAAAGAGATCTACGAA

离,后电转至 PVDF 膜上,经 5% 脱脂牛奶封闭 1 小时,分别加入抗 MUC5AC、Nrf2、HO-1、NQO1 和 GLCC 的一抗 4 ℃ 孵育过夜,洗膜后,相应辣根过氧化物酶标记的 II 抗 (1 : 6 000) 室温孵育 2 小时,彻底洗涤后使用 ECL 发光试剂盒显影,最后利用密度面积积分分析结果,与内参照 GADPH 进行对比。

1.3 研究指标

细胞处理结束后,提取各组细胞总 RNA,采用 real time PCR 法检测 A549 细胞 MUC5AC、Nrf2 及其下游抗氧化基因血红素氧化酶 1 (Heme oxygenase 1, HO-1)、NADP (H) 醌氧化还原酶 [NADP (H) : quinine oxidoreductase, NQO1] 和谷氨酰半胱氨酸合成酶催化亚单位 (glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC) 的 mRNA 表达;同时,提取细胞总蛋白,采用 Western blot 法检测上述基因蛋白表达情况。

1.4 统计分析

各组检测数据均以均数±标准差 ($\bar{X} \pm SD$) 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度莱菔硫烷对 PMA 诱导 A549 细胞表达 MUC5AC 的影响

2.1.1 建立 PMA 诱导的气道黏蛋白高表达模型
不同浓度 (10 ~ 150 nM) PMA 均可刺激 A549 细胞 MUC5AC mRNA 表达,以 50 nM 为著。50 nM PMA 组中 MUC5AC mRNA 水平及蛋白相对含量分别为 1.875 ± 0.366 和 5.026 ± 2.525 ,明显高于空白对照组 ($P < 0.05$) (图 1)。因此,后续实验 PMA 组的干预浓度为 50 nM。

2.1.2 莱菔硫烷明显抑制 PMA 诱导 A549 细胞 MUC5AC 表达 分别使用 5 μM 、10 μM 、20 μM 和 40 μM 的莱菔硫烷预先处理 A549 细胞 30 分钟后,加入 50 nM PMA 继续刺激 24 小时,MUC5AC mRNA 表达量分别为 1.572 ± 0.035 、 0.368 ± 0.056 、 1.129 ± 0.141 和 0.809 ± 0.227 ,均低于 PMA 组 ($P < 0.05$),说明不同浓度莱菔硫烷均能显著抑制 PMA 诱导的 MUC5AC 表达,以 10 μM 莱菔硫烷的抑制效果最强 (图 2a)。SFN (10 μM) + PMA 组 MUC5AC 蛋白表达量为 0.882 ± 0.104 ,显著低于 50 nM PMA 组 MUC5AC 蛋白表达量 1.875 ± 0.366 ($P < 0.05$) (图 2b)。结果显示莱菔硫烷能抑制 PMA 诱导的

MUC5AC mRNA 水平和蛋白表达。

2.2 不同浓度莱菔硫烷对 H₂O₂ 诱导 A549 细胞表达 MUC5AC 的影响

2.2.1 建立 H₂O₂ 诱导的气道黏蛋白高表达模型 不同浓度 (10 ~ 150 nM) H₂O₂ 均可刺激 A549 细胞 MUC5AC mRNA 表达,以 25 μM 为著。25 μM H₂O₂ 组中 MUC5AC mRNA 水平及蛋白相对含量分别为 4.101 ± 1.927 和 1.559 ± 0.192 ,高于空白对照组

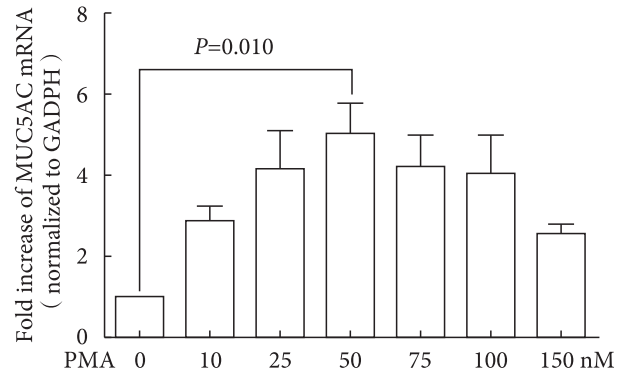


图 1 不同浓度PMA诱导A549细胞表达MUC5AC

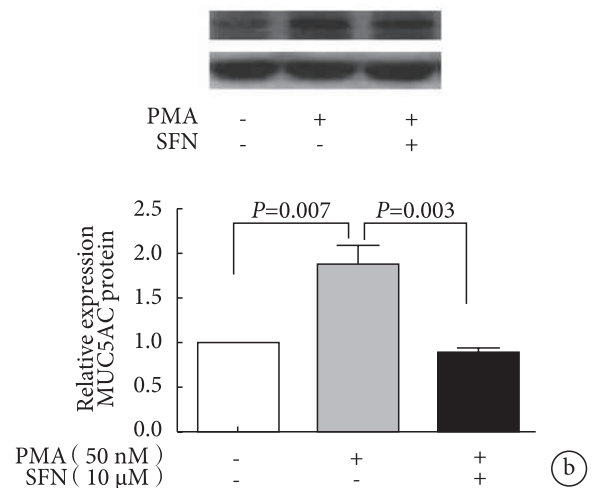
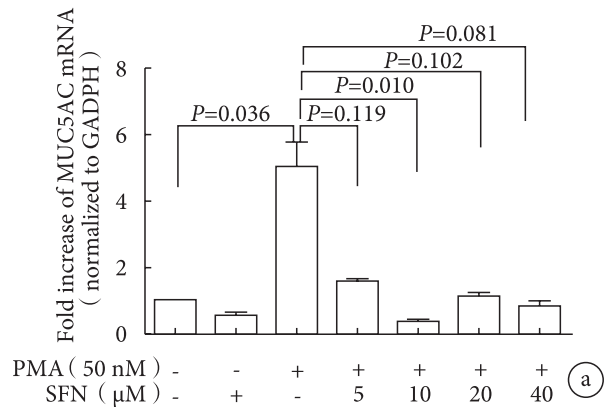


图 2 不同浓度莱菔硫烷对PMA诱导A549细胞表达 MUC5AC mRNA和蛋白的影响

($P < 0.05$) (图 3)。因此, 后续实验 H_2O_2 组的干预浓度为 $25 \mu M$ 。

2.2.2 莱菔硫烷抑制 H_2O_2 诱导 A549 细胞 MUC5AC 表达 同 2.1.2 分别使用 $5 \mu M$ 、 $10 \mu M$ 、 $20 \mu M$ 和 $40 \mu M$ 的莱菔硫烷预先处理 A549 细胞 30 分钟后, 加入 $25 \mu M H_2O_2$ 继续刺激 24 小时, MUC5AC mRNA 表达量分别为 1.344 ± 0.288 、 0.537 ± 0.381 、 1.097 ± 0.186 和 0.713 ± 0.092 , 均低于 H_2O_2 组, 说明不同浓度莱菔硫烷均能抑制 H_2O_2 诱导的 MUC5AC 表达, 仍以 $10 \mu M$ 莱菔硫烷的抑制效果最强 (图 4a)。SFN ($10 \mu M$) + H_2O_2 组 MUC5AC 蛋白表达量为 0.779 ± 0.079 , 显著低于 $25 \mu M H_2O_2$ 组 MUC5AC 蛋白表达量 1.559 ± 0.192 ($P < 0.05$) (图 4b)。结果显示莱菔硫烷亦能抑制 H_2O_2 诱导的 MUC5AC mRNA 水平和蛋白表达。

2.3 莱菔硫烷对 Nrf2 信号通路及其下游抗氧化基因表达的影响

莱菔硫烷刺激 PMA 组和 H_2O_2 组 A549 细胞 Nrf2 及其下游抗氧化酶 HO-1 的基因转录及蛋白表达, 但对 GCLC 和 NQO1 表达无影响 (图 5 ~ 6)。

SFN+PMA 组 Nrf2 mRNA 水平及蛋白相对含量分别为 1.785 ± 0.115 和 2.45 ± 0.04 , 均明显高于 PMA 组的 1.08 ± 0.02 和 1.090 ± 0.307 , 以及阴性对照组 (P 均 < 0.05); SFN+PMA 组 Nrf2 下游抗氧化基因 HO-1、NQO1 和 GCLC mRNA 水平分别为 1.214 ± 0.530 、 0.819 ± 0.349 和 0.575 ± 0.124 , 与 PMA 组的 0.690 ± 0.424 、 0.547 ± 0.418 和 0.594 ± 0.289 相比, P 值分别为 0.013 、 0.552 和 0.921 (图 5)。

SFN+ H_2O_2 组 Nrf2 mRNA 水平及蛋白相对含量分别为 1.901 ± 0.514 和 2.40 ± 0.11 , 同样均明显高于 H_2O_2 组的 1.044 ± 0.007 和 1.327 ± 0.342 , 以及阴性对照组 (P 均 < 0.05); SFN+ H_2O_2 组 Nrf2 下游抗氧化基因 HO-1、NQO1 和 GCLC mRNA 水平分别为 1.670 ± 0.389 、 0.996 ± 0.242 和 0.715 ± 0.134 , 与 H_2O_2 组的 0.658 ± 0.452 、 0.996 ± 0.242 和 1.190 ± 0.100 相比, P 值分别为 0.042 、 0.433 和 0.219 (图 6)。

结果显示, 莱菔硫烷通过激活 A549 细胞 Nrf2 及其下游抗氧化酶 HO-1 的基因转录及蛋白表达发挥抑制 PMA 诱导黏蛋白 MUC5AC 表达的作用。

3 讨论

莱菔硫烷是一种异硫氰酸盐, 广泛存在于西兰花等十字花科植物中, 是蔬菜中所发现的抗癌效果最好的植物活性物质, 也是一种抗氧化剂, 是 Nrf2 重要的激活剂, 通过激活 Nrf2/ARE 通路显著抑制

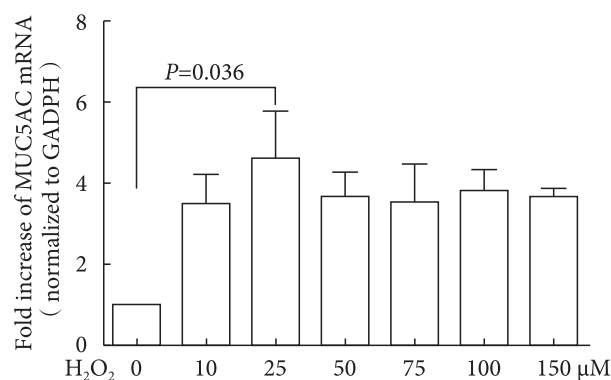


图 3 不同浓度 H_2O_2 诱导 A549 细胞表达 MUC5AC

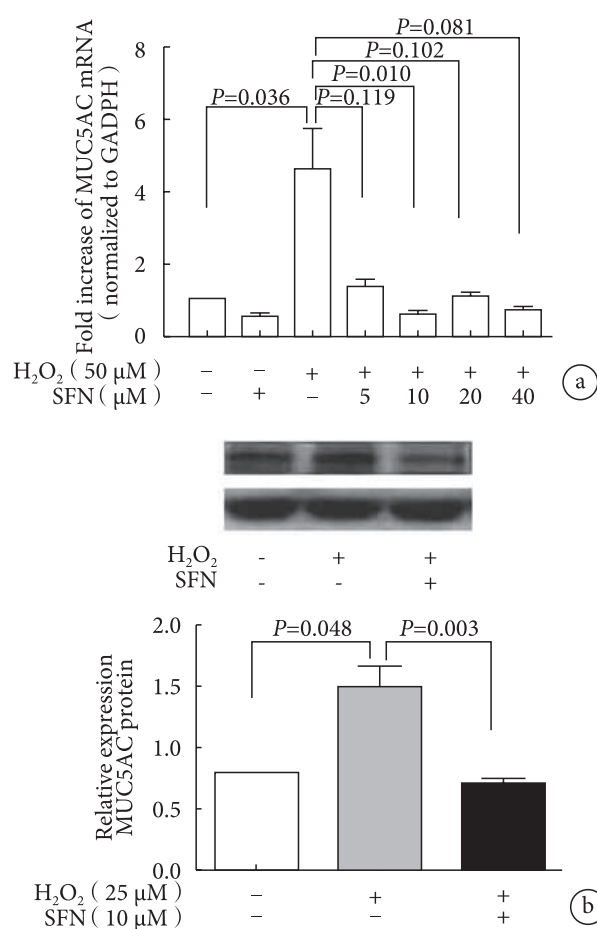


图 4 不同浓度莱菔硫烷对 H_2O_2 诱导 A549 细胞表达 MUC5AC mRNA 和蛋白的影响

炎症介质 IL-6 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 的释放, 减轻脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤模型的炎症反应^[18]; 显著降低哮喘患者的气道高反应性、气道阻力, 增加小气道管径, 改善气道陷闭^[19]; 它还能通过激活该通路增强小鼠肺泡巨噬细胞清除细菌的能力, 有助于预防细菌感染诱发的慢性阻塞性肺疾病的急性发作^[20]; 同时还能保护肺纤维化和发挥抗肿瘤作用^[13-15]。但对于莱菔硫烷是否参与调控气道黏液高

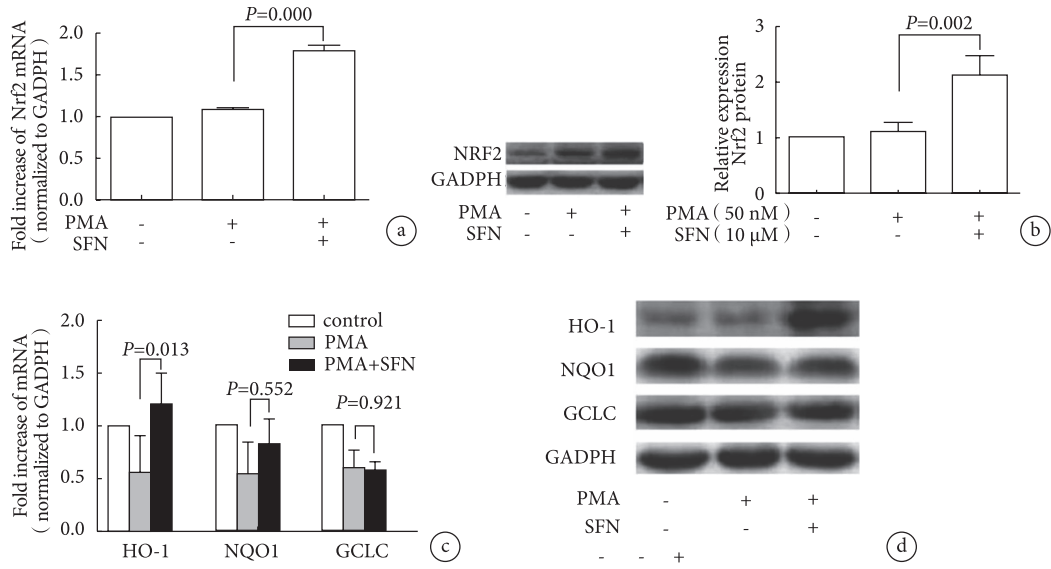


图5 莱菔硫烷对PMA组Nrf2信号通路及其下游抗氧化基因表达的影响

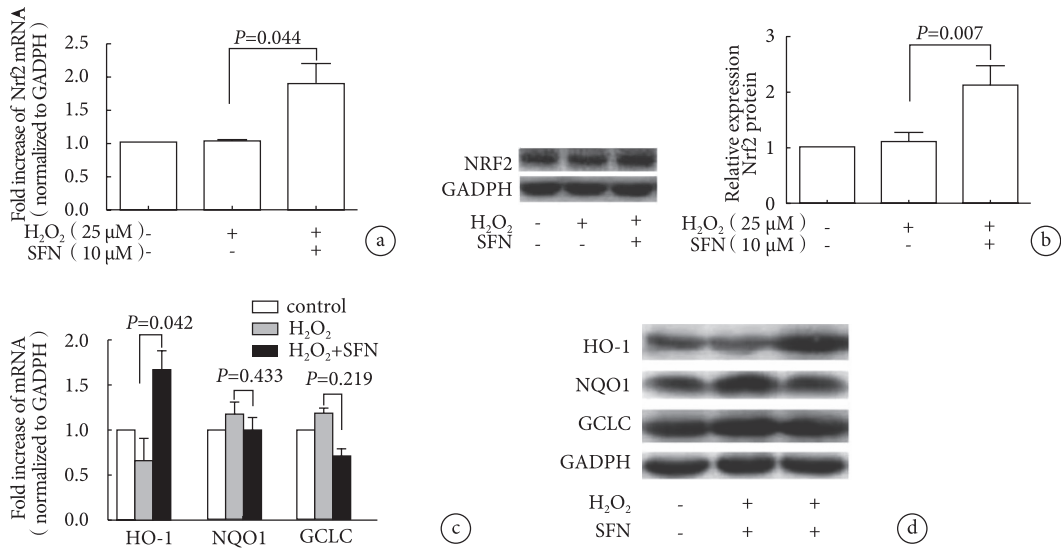


图6 莱菔硫烷对H₂O₂组Nrf2信号通路及其下游抗氧化基因表达的影响

分泌尚未有相关报道。

黏蛋白 MUC5AC 是气道黏液的主要成分, 多种因子均可诱导气道黏蛋白 MUC5AC 表达上调, 包括吡啶醇肉豆蔻酸乙酸酯 (PMA)、铜绿假单胞菌及其胞壁成分脂多糖 (LPS)、中性粒细胞弹性蛋白酶 (NE)、表皮生长因子 (EGF)、香烟烟雾等, 其中, 大量研究证明 PMA 是气道黏液 MUC5AC 的强力诱导剂^[16, 17]; 过氧化氢 (H₂O₂) 是一种强氧化剂, 不仅是诱导氧化应激的主要活性物质, 也有研究证实它能诱导 NCI-H292 细胞 MUC5AC 表达^[21, 22], 因此, 本研究分别使用黏液强促分泌剂 PMA 和氧化应激代表物质 H₂O₂ 刺激人气道上皮细胞 A549 来建立黏蛋白 MUC5AC 高表达模型, 采用实时荧光定量

PCR 及 Western blot 法检测 A549 细胞 MUC5AC 的基因转录及蛋白表达情况, 研究莱菔硫烷在气道黏蛋白 MUC5AC 表达中的作用。实验结果显示, 不同浓度的 PMA 和 H₂O₂ 均可显著上调 MUC5AC mRNA 及蛋白表达 (P 均 < 0.05)。而使用不同浓度莱菔硫烷干预后, 黏蛋白 MUC5AC mRNA 及蛋白表达水平均明显降低, 提示莱菔硫烷可抑制 PMA 和 H₂O₂ 诱导的气道黏蛋白 MUC5AC 基因和蛋白表达, 说明莱菔硫烷有抑制气道黏液高分泌的作用。

尽管学者们对黏蛋白合成的信号级联反应及相关通路做了许多研究, 但至今对黏蛋白过度表达的机制仍不十分清楚。近期的研究发现氧化应激在 MUC5AC 基因表达调控中具有重要作用: 如

Shao 等^[5]以及颜伏归等^[6]的研究表明 ROS 介导香烟烟雾、中性粒细胞弹性蛋白酶或 LPS 上调气道上皮细胞 MUC5AC 表达。Nrf2 是 CNC 亮氨酸拉链转录激活因子家族中活性最强的转录因子,是细胞调节抗氧化应激反应重要的转录因子,与抗氧化反应、抗炎反应及细胞保护作用等有关^[7-9]。在氧化应激作用下,Nrf2 与负性调节剂 Keap1 解耦联、转移入核,识别并结合抗氧化反应元件(ARE),启动下游抗氧化酶基因(HO-1、NQO1 和 GCLC 等)的转录及表达,增强细胞抗氧化应激的能力。本人前期实验研究发现 Nrf2 信号通路参与调控香烟烟雾诱导的气道黏蛋白 MUC5AC 的表达^[10],Qi 等^[23]的研究显示该通路参与调控中性粒细胞弹性蛋白酶诱导的人气道上皮细胞 MUC5AC 的表达。莱菔硫烷作为 Nrf2 强诱导剂,很有可能也是通过 Nrf2 信号通路发挥抑制黏液过表达作用。

本研究通过实时荧光定量 PCR 及 Western blot 法检测 Nrf2 及其下游抗氧化基因(HO-1、NQO1 和 GCLC)的 mRNA 及蛋白表达水平,了解该通路在莱菔硫烷抑制气道上皮细胞 MUC5AC 表达中的作用。结果显示,莱菔硫烷干预组 Nrf2 mRNA 及蛋白表达水平与黏液高表达模型组或对照组相比,均明显增加($P < 0.01$),说明莱菔硫烷通过诱导 Nrf2 发挥抑制 PMA 或 H₂O₂ 诱导的气道上皮细胞 MUC5AC 表达;而且,莱菔硫烷干预组 Nrf2 信号通路下游的抗氧化酶 HO-1 的 mRNA 及蛋白水平也明显升高($P < 0.05$),其他抗氧化酶 NQO1 和 GCLC mRNA 及蛋白水平下降,且 P 均 > 0.05 ,差异没有统计意义,提示莱菔硫烷通过诱导 A549 细胞 Nrf2 活化、正向调控其下游抗氧化酶 HO-1 表达,发挥抑制气道黏蛋白 MUC5AC 的表达。

本研究首次揭示了莱菔硫烷能抑制气道上皮细胞黏蛋白 MUC5AC 的表达,参与调控气道黏液高分泌,而且其可能是通过激活 Nrf2/ARE 信号通路,提高下游抗氧化酶 HO-1 蛋白表达而实现的。目前国内外莱菔硫烷的研究热点主要局限于抗肿瘤、抗氧化方面,本文首次揭示其在气道黏液调控方面的作用,具有一定的创新性和开拓性。但本研究仍有一定的局限性:仅从细胞生物学水平探讨莱菔硫烷在气道黏蛋白 MUC5AC 表达中的调控作用,缺乏体内动物数据,因此有待进一步研究才能更全面地揭示莱菔硫烷在气道黏液调控中的作用及机制。

总之,本研究显示莱菔硫烷参与调控气道黏液高分泌,其植物资源极其丰富,广泛存在于西兰花

等十字花科植物,对人体无明显不良反应,有利于开发新型药物抑制慢性气道炎症性疾病患者黏液高分泌,改善患者的预后,减轻患者的经济负担,具有较高的研究价值和广阔的开发前景。

参考文献

- Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med*, 2010, 363(23): 2233-2247.
- Curran DR, Cohn L. Advances in mucous cell metaplasia: a plug for mucus as a therapeutic focus in chronic airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 42(3): 268-275.
- Cerveri I, Brusasco V. Revisited role for mucus hypersecretion in the pathogenesis of COPD. *Eur Respir Rev*, 2010, 19(116): 109-112.
- Jinnai M, Niimi A, Ueda T, et al. Induced sputum concentrations of mucin in patients with asthma and chronic cough. *Chest*, 2010, 137(5): 1122-1129.
- Shao MX, Nadel JA. Neutrophil elastase induces MUC5AC mucin production in human airway epithelial cells via a cascade involving protein kinase C, reactive oxygen species, and TNF- α -converting enzyme. *J Immunol*, 2005, 175(6): 4009-4016.
- Yan F, Li W, Jono H, et al. Reactive oxygen species regulate *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide-induced MUC5AC mucin expression via PKC-NADPH oxidase-ROS-TGF- α signaling pathways in human airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 366(2): 51351-51359.
- Al-Sawaf O, Clarner T, Fragoulis A, et al. Nrf2 in health and disease: current and future clinical implications. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 129(12): 989-999.
- Huang Y, Li W, Su ZY, et al. The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(12): 1401-1413.
- Lu MC, Ji JA, Jiang ZY, et al. The Keap1-Nrf2-ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target: An Update. *Med Res Rev*, 2016, 36(5): 924-963.
- Ying YH, Lin XP, Zhou HB, et al. Nuclear erythroid 2 p45-related factor-2 Nrf2 ameliorates cigarette smoking-induced mucus overproduction in airway epithelium and mouse lungs. *Microbes Infect*, 2014, 16(10): 855-863.
- Juge N, Mithen RF, Traka M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(9): 1105-1127.
- Myzak MC, Dashwood RH. Chemoprotection by sulforaphane: keep one eye beyond Keap1. *Cancer Lett*, 2006, 233(2): 208-218.
- Hong Y, Yan W, Chen S, et al. The role of Nrf2 signaling in the regulation of antioxidants and detoxifying enzymes after traumatic brain injury in rats and mice. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(11): 1421-1430.
- Kalpna Deepa Priya D, Gayathri R, Sakthisekaran D. Role of sulforaphane in the anti-initiating mechanism of lung carcinogenesis in vivo by modulating the metabolic activation and detoxification of benzo(a)pyrene. *Biomed Pharmacother*, 2011, 65(1): 9-16.
- Pekovic-Vaughan V, Gibbs J, Yoshitane H, et al. The circadian clock regulates rhythmic activation of the NRF2/glutathione-mediated antioxidant defense pathway to modulate pulmonary fibrosis. *Genes Dev*, 2014, 28(6): 548-560.

- 16 Hewson CA, Edbrooke MR, Johnston SL. PMA induces the MUC5AC respiratory mucin in human bronchial epithelial cells, via PKC, EGF/TGF- α , Ras/Raf, MEK, ERK and Sp1-dependent mechanisms. *J Mol Biol*, 2004, 344(3): 683-695.
- 17 Choi JH, Jin SW, Kim HG, *et al.* Saponins, especially platyconic acid A, from *Platycodon grandiflorum* reduce airway inflammation in ovalbumin-induced mice and PMA-exposed A549 cells. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(5): 1468-1476.
- 18 Qi T, Xu F, Yan X, *et al.* Sulforaphane exerts anti-inflammatory effects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through the Nrf2/ARE pathway. *Int J Mol Med*, 2016, 37(1): 182-188.
- 19 Brown RH, Reynolds C, Brooker A, *et al.* Sulforaphane improves the bronchoprotective response in asthmatics through Nrf2-mediated gene pathways. *Respir Res*, 2015, 16:106.
- 20 Harvey CJ, Thimmulappa RK, Sethi S, *et al.* Targeting Nrf2 signaling improves bacterial clearance by alveolar macrophages in patients with COPD and in a mouse model. *Sci Transl Med*, 2011, 3(78): 78ra32.
- 21 Yuan S, Hollinger M, Lachowicz-Scroggins ME, *et al.* Oxidation increases mucin polymer cross-links to stiffen airway mucus gels. *Sci Transl Med*, 2015, 7(276): 276ra27.
- 22 包爱华, 陈宇清, 张旻, 等. 臭氧氧化应激对小鼠急性过敏性气道炎症所致气道高反应性和黏液分泌的影响. *中华结核和呼吸病学杂志*, 2015, 53(4): 137-148.
- 23 Qi L, Xiangdong Z, Hongmei Y, *et al.* Regulation of neutrophil elastase-induced MUC5AC expression by nuclear factor erythroid-2 related factor 2 in human airway epithelial cells. *J Investig Med*, 2010, 58(5): 730-736.

收稿日期: 2016-05-10 修回日期: 2016-10-18

本文编辑: 樊斯斯、张永刚