[8] Harrison R M，Yin J. Particulate matter in the atmosphere：which particle properties are important for its effects on health [J]. Sci Total Environ，2000，249 (1-3)：85-101.

[9] 杨春雪，阚海东，陈仁杰. 我国大气细颗粒物水平、成分、来源及污染特征 [J]. 环境与健康杂志，2011，28 (8)：735-738.

[10] Morfeld P，Taeger D，Mitura H，*et al.* Cross-sectional study on respiratory morbidity in workers after exposure to synthetic amorphous silica at five German production plants：exposure assessment and exposure estimates [J]. J Occup Environ Med，2014，56 (1)：72-78.

[11] Morteza M M，Hossein K，Amirhossein M，*et al.* Designing，construction，assessment，and efficiency of local exhaust ventilation in controlling crystalline silica dust and particles，and formaldehyde in a foundry industry plant [J]. Arh High Rada Toksikol，2013，64 (1)：123-131.

[12] He M，Ichinose T，Kobayashi M，*et al.* Differences in allergic inflammatory responses between urban PM2.5 and fine particle derived from desert-dust in murine lungs [J]. Toxicol Appl Pharmacol，2016，297 (7)：41-55.

莱菔硫烷对汞致大鼠肾 Nrf2、HO-1、γ-GCS、Gpx-1 的 mRNA 和蛋白表达影响

Effect of sulforaphane on expression of mRNA and protein of Nrf2、HO-1、γ-GCS and Gpx-1 in kidney of rats induced by mercury

郭美欣，徐兆发，李鸿鹏，杨天瑶，奉姝，刘巍

（中国医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室，辽宁 沈阳　110122）

摘要：将 Wistar 大鼠分 5 组，分别为对照组、低汞组、中汞组、高汞组、莱菔硫烷（SFN）干预组，连续处理 3 d，测定肾皮质中汞含量、肾细胞 ROS 水平和凋亡率，测定肾皮质 Nrf2、HO-1、γ-GCS、Gpx-1 的 mRNA 和蛋白表达水平。结果显示，SFN 可降低 ROS 及凋亡率水平，并可使肾皮质 mRNA 和蛋白表达均升高。提示莱菔硫烷可拮抗汞所致大鼠肾脏氧化损伤。

关键词：汞；莱菔硫烷；Nrf2；氧化应激；肾损伤

中图分类号：R994.3　　**文献标识码**：B

文章编号：1002-221X(2016)05-0365-04

DOI：10.13631/j.cnki.zggyyx.2016.05.016

汞是一种以多种形式广泛存在于环境中的有毒重金属[1]，能够诱导机体产生自由基，可以对组织细胞造成氧化损伤[2,3]。进入体内后，无机汞与血浆中蛋白质结合或者进入红细胞内，蓄积在其他器官，其中肾脏是汞的主要靶器官。活性氧簇（reactive oxygen species，ROS）对肾损伤发挥关键作用。Nrf2（NF-E2-related factor2）是细胞调节抗氧化应激反应的重要转录因子，是机体抗氧化防御应答机制的核心。核转录因子 Nrf2 是细胞调节抗氧化应激反应的重要转录因子，正常生理条件下它与胞浆蛋白 Keap 1（Kelch-like ECH associated protein 1）结合，处于相对抑制状态。氧化应激条件下，Nrf2 从 Keap1 上被释放，转运至细胞核内，与抗氧化反应元件 ARE 结合，启动抗氧化反应元件（antioxidant responsive element，ARE）调控Ⅱ相解毒酶及其下游抗氧化酶基因表达，增强细胞抗氧化应激的能力[4,5]。莱菔硫烷（sulforaphane，SFN）是从十字花科植物中提取出来的一种异硫氰酸盐，它是一种Ⅱ相解毒酶，具有抗癌、抗炎症、抗凋亡和抗氧化损伤等生物学效应[6]。本研究拟通过对不同剂量汞染毒后，大鼠肾细胞 ROS 水平及凋亡率，肾皮质 Nrf2、HO-1、γ-GCS、Gpx-1 的 mRNA 和蛋白表达的测定，研究汞对肾的毒性机制及莱菔硫烷对汞所致肾损伤的保护作用。

1　材料与方法

1.1　实验动物、试剂及仪器

实验动物 Wistar 大鼠由中国医科大学实验动物中心提供，氯化汞（$HgCl_2$，≥99.9%，上海试剂二厂），莱菔硫烷（SFN，≥99.9%，TRC 公司），DCFH-DA（美国 Sigma 公司），Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒（南京凯基生物科技有限公司），Real-Time PCR 试剂盒（TaKaRa 生物科技有限公司），兔抗大鼠多克隆抗体、山羊抗大鼠多克隆抗体（Santa Cruz 公司）。ECL 显影试剂盒（PerkinElmer 公司），F732 型测汞仪（上海华光仪器仪表厂），FACSCAN 流式细胞仪（美国 Becton Dickison 公司），EPS-300 电泳仪（上海天能科技有限公司），VE-186 转印电泳槽（上海天能科技有限公司），GDS-8000 电泳凝胶成像分析系统（美国 UVP 公司）。

1.2　方法

1.2.1　实验分组　将 Wistar 大鼠按体重随机分为对照组、低汞组、中汞组、高汞组、SFN 干预组，每组 8 只。对照组和低、中、高汞组大鼠分别皮下注射生理盐水，SFN 干预组皮下注射 2 mg/kg SFN；2 h 后，对照组大鼠腹腔注射生理盐水，其他 4 组大鼠分别腹腔注射 0.6、1.2、2.4、2.4 mg/kg $HgCl_2$。连续处理 3 d，注射容量均为 5 ml/kg。每组取其中 4 只大鼠进行肾皮质汞含量及肾皮质细胞 ROS 与细胞凋亡率的测定，另 4 只大鼠进行肾皮质 Nrf2、HO-1、γ-GCS、Gpx-1 蛋白及 mRNA 表达水平的测定。

1.2.2　大鼠肾皮质汞含量及肾皮质细胞 ROS 与细胞凋亡率

收稿日期：2016-01-27；**修回日期**：2016-08-14

作者简介：郭美欣（1990—），女，硕士研究生，研究方向：重金属中毒机理与防治。

通讯作者：徐兆发，教授，博士生导师，E-mail：zfxu@mail.cmu.edu.cn。

的测定　最后一次染毒 24 h 后，大鼠乙醚麻醉、处死，于冰浴切取肾脏，取 100 mg 肾皮质，采用冷原子吸收法[7]测定大鼠肾皮质中汞含量；另切取大鼠肾皮质 100 mg，参照 Villalba 等[8]的方法制备成单细胞悬液，采用流式细胞仪 DCFH-DA 荧光法检测细胞内 ROS 水平[9]，用 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒检测细胞凋亡率。

1.2.3　Western Blot 检测大鼠肾皮质 Nrf2、HO-1、γ-GCS、Gpx-1 蛋白表达　取肾皮质 100 mg，用 PMSF 与 RIPA Buffer 以 1∶100 混合构成的裂解液提取蛋白。应用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。采用电泳、转膜将变性后的蛋白转移到 PVDF 膜上。一抗兔抗大鼠 Nrf2、HO-1、γ-GCS 多克隆抗体（1∶500 稀释），山羊抗大鼠 Gpx-1 多克隆抗体（1∶500 稀释），4 ℃封闭过夜，TBS-T 洗膜，二抗山羊抗兔 Nrf2、HO-1、γ-GCS 多克隆抗体（1∶4 000稀释），兔抗山羊 Gpx-1 多克隆抗体（1∶4 000稀释），室温孵育 2 h，洗膜后用增强化学发光试剂（ECL）显影液检测底物表达，结果经化学发光凝胶成像分析仪拍照。用 Scion Image 4.03 软件进行灰度分析，以目的蛋白灰度值与 β-actin 蛋白灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达率。

1.2.4　Real-time PCR 测定大鼠肾皮质 Nrf2、HO-1、γ-GCS、Gpx-1 mRNA 表达　取大鼠肾皮质 100 mg，按照 TaKaRa 试剂盒说明书提取总 RNA，按照 Real-time PCR 试剂盒说明书进行逆转录进而得到 cDNA，以逆转录产物为模板扩增检测 Nrf2、HO-1、γ-GCS 和 Gpx-1 基因的表达，β-actin 为参照基因，基因引物由 TaKaRa 公司设计提供，见表 1。

表 1　目的基因 cDNA 引物

cDNA	引物
Nrf2	(F)：5'-GAGACGGCCATGACTGAT-3'
	(R)：5'-GTGAGGGGATCGATGAGTAA-3'
HO-1	(F)：5'-AAGAGGCTAAGACCGCCTTC-3'
	(R)：5'-GCATAAATTCCCACTGCCAC-3'
γ-GCS	(F)：5'-TCTGACACGTAGCCTCGGTAAA-3'
	(R)：5'-TTGGCCACTATCTGCCCAA-3'
Gpx-1	(F)：5'-TGAGAAGTGCGAGGTGAATG-3'
	(R)：5'-AACACCGTCTGGACCTACCA-3'
β-actin	(F)：5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'
	(R)：5'-GACTCATCGTCTCCTGCTTGCTG-3'

PCR 的反应条件为 95 ℃、30 s 的预变性，95 ℃、5 s 的变性，60 ℃、20 s 复性，扩增 40 个循环。反应结束后，根据 Real-time PCR 的扩增曲线和溶解曲线，进行标准曲线的制作，以 β-actin 作为参照基因，计算目的基因的相对表达量。

1.3　统计学分析

实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPSS 17.0 软件单因素方差分析（One-Way ANOVA）进行组间差异的假设检验，两组间比较用 q 检验（students-newmankeuls，SNK），检验水准 $\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　大鼠肾皮质汞含量和肾细胞 ROS 水平及细胞凋亡率

与对照组相比，随着染汞剂量的增加，各染毒组大鼠肾皮质中汞含量显著升高（$P<0.01$）；低汞组大鼠肾细胞内 ROS 平均荧光强度明显升高（$P<0.05$），中汞组、高汞组则显著升高（$P<0.01$）；各组中大鼠肾细胞内细胞凋亡水平显著升高（$P<0.01$）。与高汞组比较，SFN 干预组肾皮质汞含量差异无统计学意义（$P>0.05$）；而 SFN 干预组大鼠肾细胞内 ROS 水平明显低于高汞组（$P<0.01$），肾细胞凋亡率亦低于高汞组（$P<0.05$）。见表 2。

表 2　大鼠肾皮质汞含量、肾细胞 ROS 水平及细胞凋亡率（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

组别	肾皮质汞含量(μg/g)	ROS(%)	细胞凋亡率(%)
对照组	1.865±0.615	106.507±13.990	6.083±0.665
低汞组	47.745±5.715**	128.700±10.200*	8.817±0.382**
中汞组	70.905±9.113**	249.965±22.570**	17.700±1.108**
高汞组	90.932±7.986**	407.957±34.700**	31.250±4.662**
SFN 干预组	90.652±1.877	227.103±24.270##	18.970±1.811#

注：与对照组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与高汞组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$。

2.2　大鼠肾皮质 Nrf2、HO-1、γ-GCS 和 Gpx-1 的 mRNA 表达

大鼠肾皮质 Nrf2、HO-1、γ-GCS 表达水平随染汞剂量的升高逐渐上调，而 Gpx-1 表达水平逐渐下调。与对照组相比，各染汞组大鼠肾皮质 Nrf2、HO-1、γ-GCS mRNA 的表达均升高（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），Gpx-1 的 mRNA 表达下降（$P<0.05$）。与高汞组比较，SFN 干预组大鼠肾皮质 Nrf2、HO-1、γ-GCS 和 Gpx-1 的 mRNA 表达均显著升高（$P<0.01$）。见表 3。

表 3　各组大鼠肾皮质 Nrf2、HO-1、γ-GCS 和 Gpx-1 的 mRNA 表达（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

组别	Nrf2	HO-1	γ-GCS	Gpx-1
对照组	1.000±0.077	1.000±0.047	1.000±0.083	1.000±0.108
低汞组	1.456±0.177*	1.190±0.089*	1.208±0.065**	0.970±0.060
中汞组	1.693±0.407	1.487±0.197*	1.533±0.203**	0.817±0.054
高汞组	1.953±0.290**	2.095±0.065**	2.040±0.085**	0.615±0.373*
SFN 干预组	2.532±0.218##	2.407±0.219##	2.633±0.255##	0.872±0.062##

注：与对照组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与高汞组比较，##$P<0.01$。

2.3　大鼠肾皮质 Nrf2、HO-1、γ-GCS 和 Gpx-1 的蛋白表达

与对照组比较，大鼠肾皮质 Nrf2、HO-1、γ-GCS 蛋白表达均明显升高（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），Gpx-1 的蛋白表达降低（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。与高汞组比较，SFN 干预组大鼠肾皮质 Nrf2、HO-1、γ-GCS 和 Gpx-1 的蛋白表达均显著升高（$P<0.01$）。见表 4。

表 4　各组大鼠肾皮质 Nrf2、HO-1、γ-GCS 和 Gpx-1 蛋白表达（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

组别	Nrf2	HO-1	γ-GCS	Gpx-1
对照组	0.440±0.060	0.550±0.086	0.498±0.768	0.698±0.118
低汞组	0.670±0.100*	0.910±0.111**	0.628±0.066	0.513±0.065
中汞组	0.780±0.110**	1.356±0.113**	0.766±0.101**	0.421±0.055*
高汞组	0.910±0.090**	1.736±0.116**	0.916±0.050**	0.381±0.084**
SFN 干预组	1.100±0.080##	1.978±0.111##	1.195±0.156##	0.485±0.059##

注：与对照组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与高汞组比较，##$P<0.01$。

3　讨论

汞是一种普遍存在的环境污染物，排放的汞可以在生态系统中存在数年，对全球环境造成影响[10,11]。各种形态的汞都会对机体造成损伤，其中，无机汞进入人体后主要对肾脏造成损伤。目前研究表明，汞所致肾损伤的主要原因是产生自由基和氧化损伤[12,13]。本实验结果显示，高汞组大鼠肾细胞内 ROS 与细胞凋亡率明显高于对照组，差异具有统计学意义（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），且随着染毒剂量的升高，肾细胞内 ROS 平均荧光强度呈显著上升趋势。提示高染汞可以对肾脏造成氧化损伤。本实验高汞组与 SFN 干预组之间肾皮质汞含量差异无统计学意义（$P>0.05$），提示 SFN 对汞的分布和排泄影响意义不大。正常情况下，细胞会产生一定数量的 ROS，在调节细胞生长、基因调控等方面发挥重要的作用，同时机体内的 ROS 清除系统可以保持组织细胞内氧化平衡。当汞离子进入机体后主要与巯基（—SH）结合，在此过程中 C—Hg 键断裂产生自由基，导致膜发生脂质过氧化作用。ROS 水平失衡，可以导致细胞损伤，也可导致细胞凋亡[5]。

抗氧化反应元件或亲电子剂在体内负责抑制氧化损伤，对维持细胞内氧化还原平衡起到关键的作用。在氧化应激源的作用下，Nrf2 与 Keap1 解偶联后转移入核，与 Maf 蛋白以异二聚体的形式结合后识别抗氧化反应元件 ARE，与其启动子位点结合，启动 ARE 调控的Ⅱ相解毒酶及其下游抗氧化酶基因的表达[6,14]，HO-1 是 Nrf2 调控的下游抗氧化物酶之一，作为氧化应激蛋白有很强的间接抗氧化能力。HO-1 可以通过血红素降解成为一氧化碳、铁和胆红素，而且这些物质对细胞新陈代谢、抑制氧化应激有至关重要的作用[15,16]。γ-GCS 是体内还原型谷胱甘肽合成的限速酶，为内源性抗氧化分子，在细胞抵御氧化应激，维持细胞内氧化平衡中有重要作用。GSH 被认为是机体抗氧化的决定性因素[17]，GSH 失调可能带来多种损伤。在本次实验中随着染汞剂量的增加，各组大鼠肾皮质 Nrf2、HO-1、γ-GCS 的 mRNA 及蛋白表达均上调，推测染汞导致细胞内发生氧化应激，激活 Nrf2 基因和蛋白表达，最终导致细胞内抗氧化物质增加。本研究结果发现，随着汞染毒剂量的增加，Gpx-1 的 mRNA 和蛋白的表达呈现下降趋势。Gpx-1 是体内重要的自由基清除剂和抗氧化剂[18]，由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸结合而成，是一种非蛋白巯基化合物，其活性基团是半胱氨酸上的巯基，可以与汞结合，降低 Gpx-1 的 mRNA 和蛋白的表达水平。

SFN 被认为是一种间接抗氧化剂，能够清除自由基，减轻氧化应激对组织细胞的损伤[19]。众多研究表明，SFN 发挥抗氧化作用与激活 Nrf2 信号通路有关[14,20]，SFN 可以修饰巯基破坏的 Keap 1 与 Nrf2 复合物，解离后的 Nrf2 进入细胞核中，与 ARE 结合，激活抗氧化物酶，进而发挥保护作用。SFN 与高汞组比较 Nrf2、HO-1、γ-GCS 和 Gpx-1 的 mRNA 和蛋白的表达均明显升高（$P<0.01$），表明 SFN 通过激活 Nrf2 通路对汞致大鼠肾损伤发挥保护作用。

综上所述，此实验结果表明汞激活 Nrf2 及其下游靶基因 HO-1、γ-GCS 并抑制抗氧化物酶 Gpx-1 诱发氧化应激，SFN 对肾脏具有保护作用。

参考文献：

[1] Finster M E，Raymond M R，Scofield M A，*et al*. Mercury-impacted scrap metal：Source and nature of the mercury［J］. J Environ Manage，2015，161：303-308.

[2] 郑徽. 汞的毒性效应及作用机制研究进展［J］. 卫生研究，2006，35（5）：663-666.

[3] Martinez，Caroline S，Escobar，*et al*. Chronic exposure to low doses of mercury impairs sperm quality and induces oxidative stress in rats［J］. Journal of Toxicology and Environmental Health，Part A：Current Issues，2014，77（1-3）：143-154.

[4] Mithen R，Faulkner K，Magrath R，*et al*. Development of isothiocyanate enriched broccoli，and its enhanced ability to induce phase 2 detoxification enzymes in mammalian cells［J］. Theor Appl Genet，2003，106（4）：727-734.

[5] Circu M L M，Aw T Y. Reactive oxygen species，cellular redox systems and apoptosis［J］. Free Radic Bio Med，2010，48（6）：749-762.

[6] Turpaev K T. Keap1-Nrf2 signaling pathway：mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles［J］. Biochemistry，2013，78（2）：111-126.

[7] 赵达维，高京敏，李庭俊，等. 冷原子吸收光谱法测定尿汞规范研究——酸性氯化亚锡还原法［J］. 工业卫生与职业病，1990，16（4）：237-239.

[8] Villalba M，Martínez-Serrano A. NMDA-induced increase in［Ca^{2+}］i and $45Ca^{2+}$ uptake in acutely dissociated brain cells derived from adult rats［J］. Brain Res，1992，570（1-2）：347-353.

[9] Jin W，Wang J，Xu S，*et al*. Radioprotective effect on $HepG_2$ cells of low concentrations of cobalt chloride：induction of hypoxia-inducidble factor-1 alpha and clearance of reactive oxygen species［J］. J Radiat Res，2013，54（2）：203-209.

[10] Karlsson K，Viklander M. Heavy metal concentrations and toxicity in water and sediment from storm water ponds and sedimentation tanks［J］. J Hazard Mater，2010，178（1-3）：612-618.

[11] Clifton JC Ⅱ. Mercury exposure and public health［J］. Pediatr Clin North Am，2007，54（2）：237-269.

[12] 刘巍，徐兆发，杨海波，等. 茶多酚对氯化汞染毒大鼠急性肾损伤的影响［J］. 环境与健康杂志，2010，27（11）：966-969.

[13] 陶艳艳，王青兰，袁继丽，等. 维生素 E 抑制汞诱导大鼠肾间质纤维化的抗氧化作用机制［J］. 中西医结合学报，2011，9（2）：201-208.

（下转第 379 页）

3　讨论

为了进一步减少煤矿井下工伤事故的发生，我们特对煤矿井下工伤进行了分析，为预防煤矿井下工伤事故提供科学依据。

关于煤矿井下工伤事故危险因素的研究，以往国内外均有研究报道。1997 年，林泽炎[9]认为煤矿人为事故的发生主要由煤矿工人的冒险行为决定，并且建立预测煤矿人为事故发生可能性的数学模型。近十年来，井下工人的人格、性格、心理因素对工伤事故的影响成为研究者的研究热点[1,2]。同时井下工人体能的状况也得到了重视，认为体能下降导致的工作倦怠也是发生工伤事故的危险因素[6,10]。另外，有学者研究认为用工性质、工作持续时间和工作经验等也是工伤事故的危险因素[3]。这些研究中每个单项研究纳入的研究因素较少，且多为单因素对照研究。因为各危险因素之间是相互关联、相互影响的，单因素分析不能确定独立危险因素。因而，本研究中纳入了 11 个研究因素，并采用 Logistic 回归对 11 项指标进行了多因素分析，以确定煤矿井下工伤事故独立危险因素。

本次调查结果显示，上岗前 12 h 内饮酒、工龄、外向或者神经质性格、班次、工种及工作持续时间有统计学意义，表明班前 12 h 内饮酒、工龄≤5 年、外向或者神经质性格、早班（6：00—14：00）、采煤和掘进工种、工作持续时间>8 h为煤矿井下工伤事故的独立危险因素。通过 Logistic 回归分析，之前普遍认可的 9 个危险因素中只有工龄、是否为外向或者神经质性格、班次、工作持续时间 4 个危险因素差异有统计学意义，与以往的研究相同[1~3,5]；而年龄、文化程度、用工性质、是否有班中餐或半年内负性生活事件的数量 5 个危险因素差异无统计学意义，与以往的研究结果不同[1~4,6]。本研究中新纳入的 2 个危险因素工种和上岗前 12 h 内饮酒的差异均有统计学意义。饮酒可使人兴奋、冲动，导致违章作业，也可使人麻醉、注意力下降、反应迟钝，这无疑会增加工伤发生的风险。工龄≤5 年的工人易发生工伤事故，可能与工作时间较短、井下工作经验不足有关[11]。本结果显示外向或者神经质性格是煤矿井下工伤事故的一个危险因素，与以往研究结果一致[2]。煤矿井下早班工人一般要在凌晨 3：00—4：00 起床才能保证按时（6 时）到达工作面，这种作息时间可能会影响到工人的精力，产生疲劳，造成事故[11]。煤矿井下各工种中，采煤和掘进工的工作最复杂、生产环境最差，容易发生各种事故[11]。通过以上独立危险因素分析，可以得出井下工人发生工伤事故的两个主要原因为过度疲劳和饮酒，外向或神经质性格容易发生冒险行为而增加人为事故的风险[9]，在采煤和掘进两个工种中尤为明显。

由本次调查还可以看出井下工伤的特点为受伤类型以压砸伤多见（45.00%），受伤人群以 35～44 岁的壮年居多（45.56%），并且具有一定的季节性，以第三季度占有比重最大（41.39%）。

本研究样本虽然来自多个矿井，但这些矿井均属一个集团，有一定的局限性，有待以后多单位联合、进一步研究。

参考文献：

[1] 褚建平，蔡云生，常向东，等. 煤矿工人工伤事故与人格、心理健康因素的研究［J］. 中国健康心理学杂志，2011，19（6）：664-665.

[2] 廖家喜，汪涛，杨朝晖，等. 煤矿井下矿工工伤事故与人格、心理因素的研究［J］. 重庆医学，2014，43（4）：417-418.

[3] Muzaffar Saeher，Cummings Kristin，Hobbs Gerald，*et al*. Factors associated with fatal mining injuries among contractors and operators［J］. Journal of Occupational and Environmental Medicine，2013，55（11）：1337-1344.

[4] 秦天榜，王会中. 657 起煤矿井下工伤与饮食关系的分析［J］. 职业卫生与病伤，1997，12（1）：17-18.

[5] 陈国元，杨磊，刘卫末，等. 煤矿职工工伤事故发生时间分布规律的探讨［J］. 劳动医学，1999，16（2）：73-75.

[6] 邓明明，孙林岩，孙林辉，等. 煤矿工人异常心理、工作倦怠与事故倾性研究［J］. 人类工效学，2014，20（1）：26-30.

[7] 王朝龙，刘国礼，陈天义，等. 煤矿井下作业工人职业伤害流行病学调查分析［J］. 安徽预防医学杂志，2012，18（2）：100-102.

[8] GB6441—86，企业职工伤亡事故分类［S］.

[9] 林泽炎，吴宗之. 煤矿人为事故发生可能性预测数学模型研究［J］. 中国安全科学学报，1997，7（1）：27-30.

[10] 邢娟娟，刘卫东，张建伟. 中国煤矿工人体能负荷疲劳与工伤事故［J］. 铁道劳动安全卫生与环保，1996，23（4）：315.

[11] 许建强，黄鑫，孙永东，等. 煤矿井下工人颅脑创伤流行病学调查［J］. 中国煤炭工业医学杂志，2010，13（1）：115-117.

（上接第 367 页）

[14] 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）：678-726.

[15] Chapple S J，Puszyk W M，Mann G E. Keap1-Nrf2 regulated redox signaling in utero：Priming of disease susceptibility in offspring［J］. Free Radic Biol Med，2015，88：212-220.

[16] Pan H，He M，Liu R，*et al*. Sulforaphane protects rodent retinas against ischemia-reperfusion injury through the activation of the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway［J］. PLoS One，2014，9（12）：114186.

[17] Townsed D M，Twe K D，Tapiero H. The importance of glutathionein human disease［J］. Biomed Phalmacother，2003，57（3-4）：145-155.

[18] 杨红文，金丹. 哺乳动物 Gpx 基因家族进化选择和功能分歧研究［J］. 重庆师范大学学报，2012，29（2）：30-35.

[19] Carlos E，Mariel C. Protect effect of sulforaphane against oxidative stress：Recent advance［J］. Experimental and Toxicologic Pathology，2014（64）：503-508.

[20] Cui Wenpeng，Bai Yang. Prevention of diabetic nephropathy by sulforaphane：possible role of Nrf2 up regulation and activation［J］. Oxidative Medicine and Cellular Longevity，2012；2012：821936.