

# 瑞马唑仑通过Keap1/Nrf2信号通路减轻大鼠神经元氧糖剥夺 - 复氧复糖损伤

仇伯珏<sup>1</sup>, 李玲玉<sup>2</sup>, 张恩惠<sup>2</sup>, 孙晓丽<sup>1</sup>, 段梅<sup>1</sup>, 王士雷<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>青岛大学, 山东 青岛

<sup>2</sup>青岛大学附属医院麻醉科, 山东 青岛

收稿日期: 2023年1月3日; 录用日期: 2023年1月28日; 发布日期: 2023年2月6日

## 摘要

目的: 探讨瑞马唑仑是否通过激活Keap1/Nrf2通路减轻海马神经元氧糖剥夺 - 复氧复糖损伤的功能。方法: 取SD大鼠鼠海马神经元培养至第8天, 采用随机数字表法分为5组: 对照组(C组)、模型组(M组)、氧糖剥夺 - 复氧复糖+瑞马唑仑组(R组)、氧糖剥夺 - 复氧复糖 + 瑞马唑仑 + 二甲基亚砷组(V组)、氧糖剥夺 - 复氧复糖 + 瑞马唑仑 + 鸦胆子苦醇组(B组), 缺氧6 h后复氧20 h建立缺氧复氧模型, 瑞马唑仑于复氧时加入, 终浓度100  $\mu$ M, 鸦胆子苦醇及二甲基亚砷在缺氧前4 h加入, 鸦胆子苦醇终浓度为500 nM, 二甲基亚砷浓度<0.1%。复氧结束后检测CCK8细胞活性, 细胞凋亡率, ROS水平, Nrf2、Keap1、Bcl2、Bax蛋白水平, 免疫荧光检测Nrf2核转位及线粒体形态。结果: 与C组比较, M组细胞活力降低, 凋亡率及ROS活性升高, Bax蛋白水平升高, Nrf2、Keap1、Bcl2蛋白水平降低, Nrf2核转位增加, 线粒体碎片化程度加重; 与M组比较, R组的细胞活力升高, 细胞凋亡率及ROS活性降低, Bax蛋白水平降低, Nrf2、Keap1、Bcl2蛋白水平升高, Nrf2核转位增加, 线粒体碎片化程度减轻; V组与R组间无统计学差异; 与V组比较, B组细胞活力降低, 凋亡率及ROS活性升高, Bax蛋白水平升高, Nrf2、Keap1、Bcl2蛋白水平降低, Nrf2核转位减少, 线粒体碎片化程度加重。结论: 瑞马唑仑可激活Keap1/Nrf2通路, 减少ROS蓄积及线粒体损伤, 进而减少细胞凋亡, 减轻大鼠海马神经元氧糖剥夺 - 复氧复糖损伤。

## 关键词

Nrf2, 瑞马唑仑, 氧糖剥夺 - 复氧复糖损伤, 脑保护

## Remimazolam Alleviates Neuronal Oxygen Glucose Deprivation/Re-Oxygenation Injury in Rats by Keap1/Nrf2 Signaling Pathway

\*通讯作者 Email: wshlei@aliyun.com

Bojue Qiu<sup>1</sup>, Lingyu Li<sup>2</sup>, Enhui Zhang<sup>2</sup>, Xiaoli Sun<sup>1</sup>, Mei Duan<sup>1</sup>, Shilei Wang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Qingdao University, Qingdao Shandong

<sup>2</sup>Department of Anesthesiology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: Jan. 3<sup>rd</sup>, 2023; accepted: Jan. 28<sup>th</sup>, 2023; published: Feb. 6<sup>th</sup>, 2023

## Abstract

**Objective:** To investigate the activation effect of Remimazolam on Keap1/Nrf2 pathway and its function in reducing Oxygen glucose deprivation/re-oxygenation injury of hippocampal neurons. **Methods:** Rat hippocampal neurons were cultured to the 8th day, and were divided into 5 groups by random number table method: control group (group C), oxygen glucose deprivation/re-oxygenation group (group M), oxygen glucose deprivation/re-oxygenation + Remimazolam group (group R), oxygen glucose deprivation/re-oxygenation + Remimazolam + dimethyl sulfoxide group (group V), oxygen glucose deprivation/re-oxygenation + Remimazolam + brusatol group (group B). The oxygen glucose deprivation/re-oxygenation model was established by the method of reoxygenation for 20 h after 6 h of oxygen. Remimazolam was added during reoxygenation at a final concentration of 100  $\mu$ M, bruscoxol and dimethyl sulfoxide were added 4 h before hypoxia, and bruscoxol was added at the end of hypoxia. The concentration was 500 nM, and the dimethyl sulfoxide concentration was <0.1%. After reoxygenation, CCK8 cell activity, apoptosis rate, ROS level, Nrf2, Keap1, Bcl2, Bax protein levels were detected. Mitochondrial morphology and Nrf2 nuclear translocation was detected by immunofluorescence. **Results:** Compared with the C group, the M group had decreased cell viability, increased apoptosis rate and ROS activity, increased Bax protein level, decreased Nrf2, Keap1, Bcl2 protein levels, increased mitochondrial fragmentation and increased Nrf2 nuclear translocation; Compared with the M group, the cell viability in the R group increased, the apoptosis rate and ROS activity decreased, the Bax protein level decreased, the Nrf2, Keap1, Bcl2 protein levels increased, and the nuclear translocation of Nrf2 increased and the degree of mitochondrial fragmentation decreased; There was no statistical difference between group V and group R; compared with group V, group B had decreased cell viability, increased apoptosis rate and ROS activity, increased Bax protein level, and decreased Nrf2, Keap1, Bcl2 protein levels, reduced Nrf2 nuclear translocation and increased mitochondrial fragmentation. **Conclusion:** Remimazolam can activate the Keap1/Nrf2 pathway, reduce the accumulation of ROS and mitochondrial damage, reducing apoptosis and reducing the damage of oxygen sugar deprivation-rehydro-saccharide in rat hippocampal neurons.

## Keywords

Nrf2, Remimazolam, Oxygen Glucose Deprivation/Re-Oxygenation Injury, Brain Protection

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

缺血器官与组织的再灌注对于生存非常重要，但再灌注往往带来更严重的损伤，被称为缺血再灌注损伤。ROS 积累带来的氧化应激是其主要病理过程[1]，Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (Keap1)/核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)作为抗氧化应激的经典通路可保护脑缺血再灌注损伤。目前已有研究显示丙泊酚、

咪达唑仑均可激活 Keap1/Nrf2 信号通路[2] [3] [4], Lu 等人及 Sun 等人的研究认为丙泊酚可激活 Nrf2 减轻心肌损伤及小胶质细胞的损伤, 而任等人的研究则显示, 同为苯二氮卓类药物的咪达唑仑则激活 Nrf2 并降低了 HK-2 细胞的缺氧/复氧损伤。

作为苯二氮卓类药物的新成员, 瑞马唑仑有着广阔的应用前景, 并已展现其器官保护的功能。采用原代海马神经元建立氧糖剥夺 - 复氧复糖模型, 评价瑞马唑仑是否通过激活 Keap1/Nrf2 信号通路减轻脑缺血再灌注损伤。

## 2. 材料与方法

**海马神经元分离与培养** 本研究所涉及动物实验已取得青岛大学动物实验伦理委员会批准。取出生一天的 SD 大鼠乳鼠, 于冰上断头取脑, 钝性分离海马, 剪碎后置于 37℃ 的胰酶中消化 20 min, 中止消化后离心, 使用 80% DMEM/F12 (BI 公司, 以色列) 及 20% FBS (普诺赛公司, 中国) 配制的种植液重悬细胞, 按  $1 \times 10^6$  每孔种植在六孔板中, 6 h 后使用 PBS 冲洗并换成由 95% Neurobasal-A (GIBCO 公司, 美国)、2% B27、1% 丙酮酸钠、1% L-谷氨酰胺配制而成的神经元培养液。此后 3 天换一次液, 至 7~8 天细胞突触生长旺盛, 胞体圆润时进行处理。

**分组与处理** 将培养成熟的海马神经元分为 5 组: 对照组(C 组)、氧糖剥夺 - 复氧复糖组(OGD/R 组)、氧糖剥夺 - 复氧复糖 + 瑞马唑仑组(R 组)、氧糖剥夺 - 复氧复糖 + 瑞马唑仑 + 二甲基亚砜组(V 组)、氧糖剥夺 - 复氧复糖 + 瑞马唑仑 + 鸦胆子苦醇组(B 组)。C 组不做特殊处理; OGD/R 组于 R 组将培养液弃掉, PBS 冲洗后加入无糖 EBSS 缓冲液, 置于三气培养箱中处理 6 h, 再次更换为神经元培养液, 在常规二氧化碳培养箱中进行 20 h 的复氧, R 组在复氧后在培养液中加入瑞马唑仑(终浓度 100  $\mu$ M); V 组在缺氧前于培养液中加入 DMSO (终浓度 < 0.1%) 预处理 4 h, 其余处理同 R 组; B 组则于培养液中加入 Nrf2 的抑制剂鸦胆子苦醇(MCE 公司, 美国) (终浓度 500 nM) 进行 4 h 的预处理, 其余处理同 R 组。

**CCK-8 检测细胞活力** 将海马神经元按  $1 \times 10^4$  每孔的密度接种于 96 孔板内, 培养至第 8 天, 按分组处理后每孔加入 100  $\mu$ l 的 Neurobasal-A + 10  $\mu$ l 的 CCK-8 溶液, 于 37℃ 避光孵育 90 min。使用酶标仪测定各孔于 450 nm 的 OD 值, 细胞活力 = (OD 目的 - OD 空白) / OD 对照  $\times$  100%。

**Western Blot 法检测 Nrf2、Keap1、Bcl2、Bax 蛋白表达水平** PBS 冲洗细胞, 用含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液于冰上裂解细胞 30 min, 收集后 12000 g 低温离心 15 min, 使用 BCA 法测定蛋白浓度, 并加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液 100℃ 加热 5 min, 使蛋白充分变性。上样至 10% SDS-PAGE 胶电泳并转印至 0.45PVDF 膜上, 使用无蛋白快速封闭液封闭后, 清洗并加入 Nrf2 一抗(1:3000, proteintech 公司, 美国)、Keap1 一抗(1:8000, proteintech 公司, 美国)、Bcl2 一抗(1:1000, Abcam 公司, 美国)、Bax 一抗(1:2000, Abcam 公司, 美国) 4℃ 孵育过夜, TBST 冲洗后加入辣根过氧化酶标记二抗(1:8000, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 中国) 室温孵育 1 h, 使用 ECL 发光液显影, 使用  $\beta$ -actin (1:2000, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 中国) 作为内参, 并使用 ImageJ 量化条带灰度。

**免疫荧光检测 Nrf2 核转位** 多聚赖氨酸包被无菌细胞爬片, 置入 12 孔板并接种海马神经元悬液, 培养 7 天后随机分组并按上述分组方法处理, 处理结束后使用 PBS 冲洗细胞, 加入 4% 多聚甲醛室温 15 min 固定, 再次冲洗后使用 0.1% 曲拉通  $\times$  100 室温孵育 10 min 通透细胞膜。5% 正常山羊血清室温封闭 1 h, 加入 Nrf2 一抗(1:100, proteintech, 美国) 4℃ 孵育过夜。结束孵育前复温 45 min, 冲洗后加入 CY3 荧光二抗(1:100, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 中国), 室温孵育 1 h, pbs 冲洗后使用含 DAPI 的抗荧光淬灭封片液封片。使用共聚焦显微镜观察拍照。

**免疫荧光标记 TOM20 检测线粒体形态** 多聚赖氨酸包被无菌细胞爬片, 植入 12 孔板并接种海马神经

元悬液, 培养 7 天后随机分组并按照上述分组方法处理, 后使用 PBS 冲洗细胞, 加入 4% 多聚甲醛室温 15 min 固定, 再次冲洗后使用 0.1% 曲拉通  $\times 100$  室温孵育 10 min 通透细胞膜。5% 正常山羊血清室温封闭 1 h, 加入 TOM20 一抗(1:100, proteintech, 美国) 4℃ 孵育过夜, 复温 45 min 后结束孵育, 冲洗后加入 FITC 荧光二抗(1:100, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 中国), 室温孵育 1 h, pbs 冲洗后使用含 DAPI 的抗荧光淬灭封片液封片。使用共聚焦显微镜观察拍照。

**流式细胞术检测细胞凋亡** 细胞培养至第 8 天, PBS 冲洗细胞, 消化, 使用 PBS 重悬后计数  $3\sim 5 \times 10^5$  细胞, 再次离心将其悬浮于 100  $\mu$ l 的流式试剂盒 1 $\times$ buffer 中, 加入染料, 室温避光 15 min, 后加入 400  $\mu$ l 的 1 $\times$ buffer 终止反应, 冰上避光静置等待上机。使用 flowjo V10 软件进行分析。

**DCFH-DA 法检测 ROS 活性** 细胞培养至第 8 天, 处理结束后, 使用培养液以 1:1000 稀释 DCFH-DA 至 10  $\mu$ M, 替换原有培养液, 37℃ 避光孵育 20 min, PBS 冲洗两次后再次更换为普通神经元培养液。使用共聚焦显微镜观察并拍照。

**统计与分析** 使用 SPSS 25.0 进行数据分析, 正态分布数据使用均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 时有统计学意义。

### 3. 结果

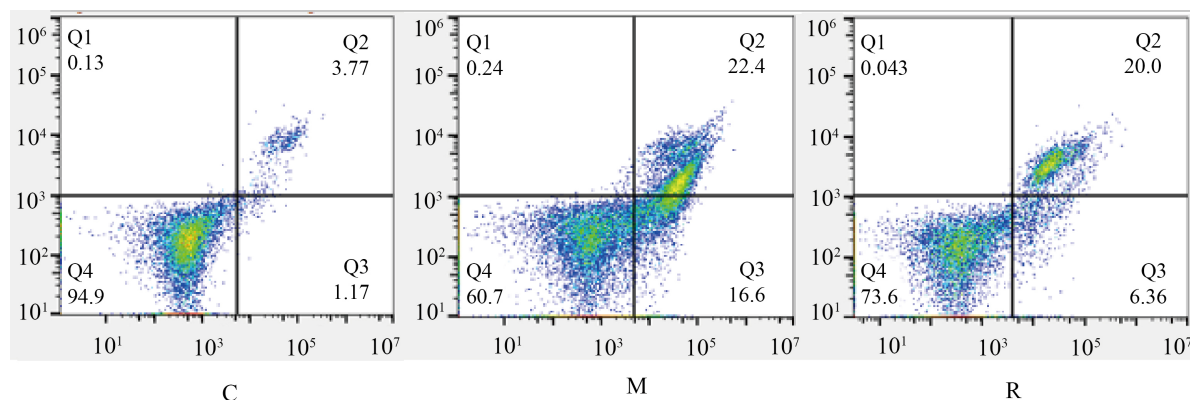
与 C 组比较 M 组细胞活力下降, 细胞凋亡率增加(p < 0.05); 与 M 组比较, R 组的细胞活力升高, 细胞凋亡率降低(p < 0.05); V 组相对于 R 组变化无统计学意义; 与 V 组相比较, B 组细胞活力降低, 细胞凋亡率升高(p < 0.05)。见图 1、表 1。

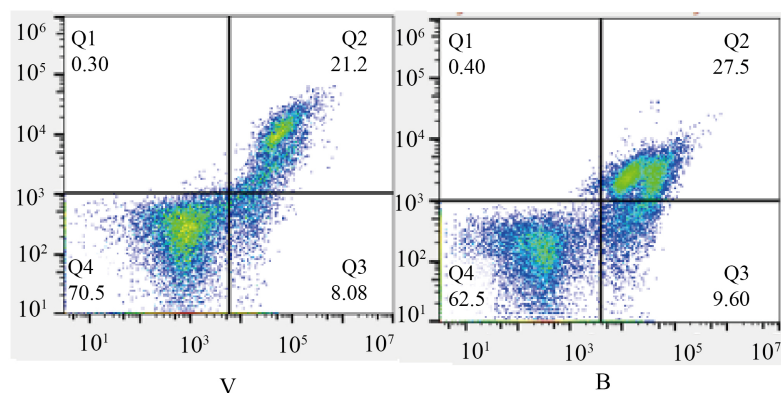
**Table 1.** Comparison of cell viability ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ ) and apoptosis rate ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ ) in five groups of rat hippocampal neurons

**表 1.** 五组大鼠海马神经元细胞活力( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )与细胞凋亡率比较( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	细胞活力(%)	细胞凋亡率(%)
C 组	100 $\pm$ 6.14	4.94 $\pm$ 0.07
M 组	21.25 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>	39.27 $\pm$ 1.62 <sup>a</sup>
R 组	37.74 $\pm$ 1.62 <sup>b</sup>	27.64 $\pm$ 1.19 <sup>b</sup>
V 组	35.67 $\pm$ 2.58	28.40 $\pm$ 0.81
B 组	24.62 $\pm$ 1.95 <sup>c</sup>	36.67 $\pm$ 0.59 <sup>c</sup>

注: 与 C 组进行比较, <sup>a</sup>p < 0.05, 与 M 组进行比较, <sup>b</sup>p < 0.05, 与 V 组进行比较, <sup>c</sup>p < 0.05。

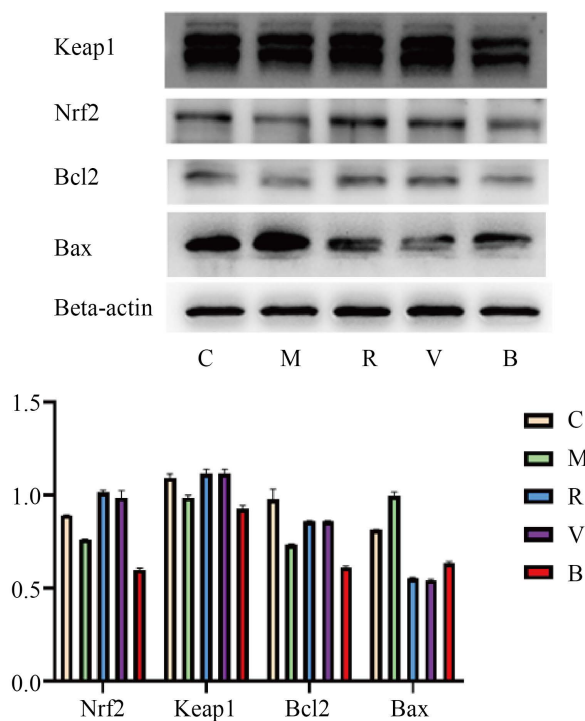




**Figure 1.** Apoptosis rate of hippocampal neurons in each group; Q2 is late apoptosis, Q3 is early apoptosis, and combined is the total apoptosis rate

**图 1.** 各组海马神经元凋亡率, Q2 为晚期凋亡, Q3 为早期凋亡, 合为总凋亡率

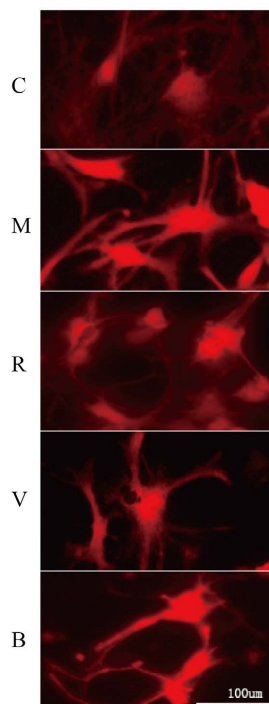
与 C 组比较, OGD/R 组 Nrf2、Keap1、Bcl2 蛋白水平下降, Bax 蛋白水平升高( $p < 0.05$ ); 与 M 组比较, M 组 Nrf2、Keap1、Bcl2 蛋白水平升高, Bax 蛋白水平降低( $p < 0.05$ ); V 组与 R 组无统计学差异; 与 V 组比较, B 组 Nrf2、Keap1、Bcl2 蛋白水平下降, Bax 蛋白水平升高( $p < 0.05$ )。见图 2。



**Figure 2.** WB bands and their relative gray levels of Nrf2, Keap1, Bcl2, and Bax in each group

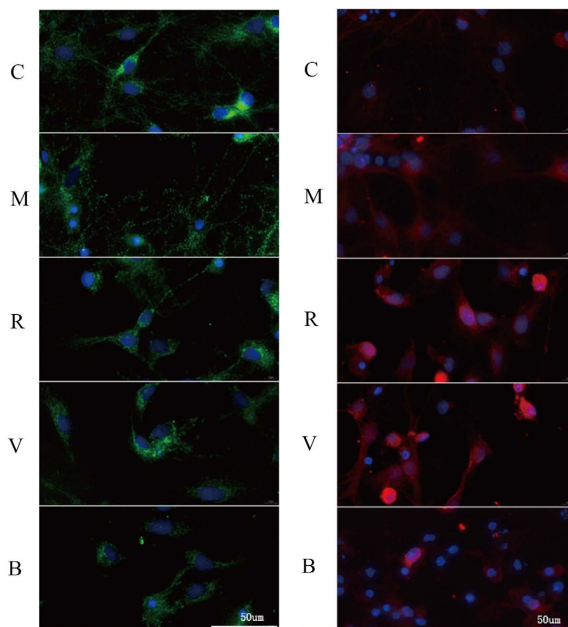
**图 2.** 各组 Nrf2、Keap1、Bcl2 及 Bax 的 WB 条带及其相对灰度

C 组的 ROS 染色荧光适中, M 组荧光显著增强, R 组与 V 组的 ROS 荧光较 M 组减弱, B 组 ROS 荧光强度较 R、V 组增强。见图 3。



**Figure 3.** ROS activity of neurons in five groups (DCFH-DA method). Note: Red fluorescence intensity reflects the level of ROS activity in each group

**图 3.** 五组神经元 ROS 活性(DCFH-DA 法)。注：红色荧光强度反映各组细胞内 ROS 活性高低



注：蓝色区域为着色细胞核，绿色为线粒体外膜，核内红点为发生核转位的 Nrf2，蓝色区域内的红色密度反映 Nrf2 核转位水平

**Figure 4.** Confocal observation of mitochondrial morphology and nuclear translocation of Nrf2 in neurons of each group

**图 4.** 共聚焦观察各组神经元线粒体形态及 Nrf2 核转位情况

各组可见蓝染的细胞核, 使用绿色标记的 TOM20 作为线粒体外膜转运蛋白, 其数量及分布显示线粒体的数量及碎片化程度, 何健相对于 C, M 组线粒体数量减少, 碎片化增多; 相对于 M 组, R 组线粒体数量增多, 碎片化程度减轻, V 组较 R 组无显著变化, B 组较 V 组, 线粒体数量减少, 碎片化程度加剧。见图 4。

各组可见蓝染细胞核及红色标记的 Nrf2, C 组核内红染颗粒较少, 示 Nrf2 核转位少, M 组中 Nrf2 核转位增加; 而相较于 M 组, R 组与 V 组的 Nrf2 核转位增加, B 组细胞的 Nrf2 核转位较 V 组降低。见图 4。

## 4. 讨论

本研究参照相关文献[5], 将培养至第 8 天的海马神经元置于无糖 EBSS 环境中, 三气培养箱培养 6 h, 更换回正常培养液, 在二氧化碳培养箱中进行 20 h 复氧复糖的方法制备海马神经元氧糖剥夺 - 复氧复糖损伤模型。结果表明, 与 C 组比较, M 组的细胞活力降低, 凋亡率及活性氧水平升高, 提示模型制备成功。

已有研究表明瑞马唑仑在浓度为约 100  $\mu\text{M}$  时即表现出其激活苯二氮卓受体及保护器官损伤的功能[6] [7]。为探究瑞马唑仑对 Keap1/Nrf2 通路的作用, 本研究使用鸦胆子苦醇作为抑制剂[8], 以鸦胆子苦醇 500 nM 浓度预处理 4 h, 瑞马唑仑 100  $\mu\text{M}$  的终浓度于复氧复糖时加入的方法, 与 M 组比较, R 组细胞活力升高, 凋亡率及活性氧水平降低, 提示瑞马唑仑的后处理减轻了海马神经元的氧糖剥夺 - 复氧复糖损伤, 同时, 相较 R 组, B 组细胞 Nrf2 水平降低, 活力降低, 凋亡率及活性氧水平升高, 提示瑞马唑仑激活 Keap1/Nrf2 通路, 而鸦胆子苦醇成功抑制 Keap1/Nrf2 通路水平。

脑缺血再灌注损伤指在脑中中断的血流恢复时, 脑会受到比缺血时更严重的损伤。已有研究显示, 该过程涉及到活性氧、钙超载等诸多机制[9]。尤其 ROS 引起的氧化应激损伤在缺血再灌注损伤中发挥重要作用[10], Heiko Bugger 等人认为, ROS 通过诱导 mPTP 长时间开放的方式导致 ROS 的进一步爆发, 不仅造成线粒体的肿胀破裂, 也引起核酸、蛋白质的广泛损伤, 同时, ROS 的爆发还可以在线粒体之间传递。

Keap1/Nrf2 是经典的抗氧化应激通路, 在氧化应激损伤的应对中占据中心地位, Keap1 承担着氧化应激感受器的任务, 和 Nrf2 结合并锚定于细胞骨架中, 并通过泛素化 Nrf2 调控着下游保护性基因表达的平衡[11]。当受到 ROS 蓄积或其他刺激时, Nrf2 与 Keap1 解离, Nrf2 发生核转位, 进而调控相关基因表达。Bcl2 蛋白家族在组织稳态的维持中发挥重要的作用, 在凋亡过程中, Bcl2 作为重要的抗凋亡蛋白受到抑制, 同时 Bax、Caspase-3 的表达明显增强, 而 Bax 线粒体低聚体形成导致细胞不可逆的死亡[12] [13]。本研究结果显示, 与 M 组比较, R 组 Nrf2 及 Bcl2 表达增加, 而 Bax 表达降低, 而使用的鸦胆子苦醇的 B 组, Nrf2 表达水平降低, 同时瑞马唑仑的保护作用也受到一定程度的抵消, 提示瑞马唑仑通过激活 Keap1/Nrf2 通路发挥了减轻氧糖剥夺 - 复氧复糖损伤的作用。

线粒体作为细胞重要的代谢场所, 其状态与细胞命运密切相关。线粒体位于不断地分裂与融合中, 成为线粒体动力学。然而, 线粒体的过度分裂乃至碎片化被认为是细胞凋亡的早期信号, 该过程可能与能量供应不足有关, 线粒体的碎片化还会导致细胞色素 C 被释放进入胞质, 引发凋亡。

尽管本研究通过构建神经元氧糖剥夺 - 复氧复糖模型探究了瑞马唑仑的保护效果及相关机制, 但需要注意的是, 本研究未使用动物模型, 对于生理状态下的处理效果的探究有所欠缺, 同时未涉及不同浓度下瑞马唑仑处理效果的探究, 这些均为本研究的局限性。

综上所述, 瑞马唑仑可激活 Keap1/Nrf2 通路, 减少 ROS 蓄积及线粒体损伤, 进而减少细胞凋亡, 减轻大鼠海马神经元氧糖剥夺 - 复氧复糖损伤。

## 基金项目

国家自然科学基金(81771415)。

## 参考文献

- [1] Xiang, M., Lu, Y., Xin, L., *et al.* (2021) Role of Oxidative Stress in Reperfusion Following Myocardial Ischemia and Its Treatments. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2021**, Article ID: 6614009. <https://doi.org/10.1155/2021/6614009>
- [2] Lu, Z., Liu, Z. and Fang, B. (2022) Propofol Protects Cardiomyocytes from Doxorubicin-Induced Toxic Injury by Activating the Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2/Glutathione Peroxidase 4 Signaling Pathways. *Bioengineered*, **13**, 9145-9155. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2036895>
- [3] Sun, X., Yin, Y., Kong, L., *et al.* (2019) The Effect of Propofol on Hypoxia-Modulated Expression of Heat Shock Proteins: Potential Mechanism in Modulating Blood-Brain Barrier Permeability. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **462**, 85-96. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03612-w>
- [4] 任帅帅, 孙倩, 刘春华. 咪达唑仑对低氧/复氧诱导的 HK-2 细胞凋亡及 Nrf2/HO-1 通路的影响[J]. 中国药师, 2021, 24(12): 2171-2175. <https://doi.org/10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2021.12.006>
- [5] 万晓燕, 于文刚, 赵芹, 等. Keap1/Nrf2 信号通路在丙泊酚减轻大鼠神经元氧糖剥夺-复氧复糖损伤中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2020, 40(11): 1353-1357.
- [6] Liu, X., Lin, S., Zhong, Y., *et al.* (2021) Remimazolam Protects against LPS-Induced Endotoxicity Improving Survival of Endotoxemia Mice. *Frontiers in Pharmacology*, **12**, Article ID: 739603. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.739603>
- [7] Fang, H., Zhang, Y., Wang, J., *et al.* (2021) Remimazolam Reduces Sepsis-Associated Acute Liver Injury by Activation of Peripheral Benzodiazepine Receptors and p38 Inhibition of Macrophages. *International Immunopharmacology*, **101**, Article ID: 108331. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108331>
- [8] Zhang, D.D. and Chapman, E. (2020) The Role of Natural Products in Revealing NRF2 Function. *Natural Product Reports*, **37**, 797-826. <https://doi.org/10.1039/c9np00061e>
- [9] Shen, L., Gan, Q., Yang, Y., *et al.* (2021) Mitophagy in Cerebral Ischemia and Ischemia/Reperfusion Injury. *Frontiers in Aging Neuroscience*, **13**, Article ID: 687246. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.687246>
- [10] Bugger, H. and Pfeil, K. (2020) Mitochondrial ROS in Myocardial Ischemia Reperfusion and Remodeling. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, **1866**, Article ID: 165768. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165768>
- [11] Baird, L. and Yamamoto, M. (2020) The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, **40**, e00099-20. <https://doi.org/10.1128/MCB.00099-20>
- [12] Korshunova, A.Y., Blagonravov, M.L., Neborak, E.V., *et al.* (2021) BCL2-Regulated Apoptotic Process in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, **47**, 23-36. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4781>
- [13] Spitz, A.Z. and Gavathiotis, E. (2022) Physiological and Pharmacological Modulation of BAX. *Trends in Pharmacological Sciences*, **43**, 206-220. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.11.001>