

## NRF2 调控铁死亡及对宰后牛肉色泽稳定性的影响

路芳芳, 李彩云, 李爱霞, 朱梨花, 张玉斌\*, 张丽  
(甘肃农业大学食品科学与工程学院 兰州 730070)

**摘要** 为探究宰后成熟过程中 NRF2 对铁死亡及肉色稳定性的影响, 以牛背最长肌为研究对象, 采用 0.9% 生理盐水、0.5 mmol/L ML385、1 mmol/L tBHQ 注射处理, 4 ℃ 条件下分别成熟 0, 24, 72, 168 h, 分析成熟期间 NRF2 表达量、铁稳态变化、铁死亡相关蛋白表达、脂质氧化、线粒体膜电位、肉色等相关指标。结果表明, 在成熟期间, ML385 处理组的 NRF2 表达量及 mRNA 水平显著低于对照组, 而 tBHQ 组结果相反, 表明 ML385 与 tBHQ 对 NRF2 有明显的抑制和激活作用。与对照组相比, ML385 组的铁沉积水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), FPN1、SLC7A11、PRDX6 蛋白表达水平均显著下调 ( $P < 0.05$ )。成熟完成后, Fe<sup>2+</sup> 含量、MDA、b\* 分别增加了 10.56%, 16.67%, 53.78%, tBHQ 组比对照组分别降低了 8.39%, 21.76%, 30.26%。ML385 组的线粒体膜电位、pH 值、Mb 含量、GPX4、MRA 及 NADH 氧化酶活性与 a\* 值比对照组分别降低了 5.31%, 3.62%, 7.45%, 28.32%, 24.10%, 2.76%, 12.1%, tBHQ 组比对照组分别增加了 15.96%, 1.11%, 30.73%, 8.69%, 3.96%, 7.39%, 5.68%。而对于 L\* 值, ML385 组、tBHQ 组均大于对照组。综上, 宰后成熟期间, NRF2 通过维持肌肉组织铁稳态, 抑制脂质过氧化, 影响线粒体膜电位来调节铁死亡, 进而影响 Mb 含量及 MRA, 改善肉色稳定性。

**关键词** NRF2; 铁死亡; 铁稳态; 脂质过氧化; 肉色稳定性

**文章编号** 1009-7848(2026)01-0069-14 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2026.01.007

肉色是牛肉的一个重要感官属性, 与消费者对食品接受程度和购买决定尤其相关<sup>[1]</sup>。动物在宰后成熟期间, 机体转变为无氧呼吸, 使 pH 值下降, 各种离子稳态失衡, 过氧化物积累, 诱导细胞死亡, 肉色等宏观品质发生改变, 直接影响牛肉的新鲜度<sup>[2]</sup>。铁死亡是一种铁依赖的细胞死亡过程, 其主要特征与目前已知的细胞死亡机制不同, 主要体现为亚铁离子、脂质过氧化产物的积累和线粒体独特的形态变化<sup>[3]</sup>。肌肉中亚铁离子的累积和转化不仅会影响肌肉颜色的稳定性, 导致肌肉失去新鲜、饱满的红色, 过量的亚铁离子还可以通过芬顿等反应产生自由基, 催化进一步的氧化反应<sup>[4]</sup>。牛肉中至少有 40% 的肌肉纤维类型含有大量的铁离子通常被称为红肌<sup>[5]</sup>。机体内大量铁和活性氧 (ROS) 的积累导致半胱氨酸的合成减弱, 铁离子和含二硫键配体之间的配位消耗谷胱甘肽 (GSH) 并释放花生四烯酸 (ARA), 从而抑制半胱

氨酸或谷氨酸反向转运系统 (xCT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 的活性, 使铁死亡发生<sup>[6-7]</sup>, 而 GSH 是参与铁死亡过程的关键代谢物, 其含量降低, 增加了 GSH (氧化形式) 和 ARA 的浓度, 表明铁死亡过程增强。

研究表明, 铁死亡的机制与抗氧化应激途径核因子 E 相关因子 2 (NRF2) 有关<sup>[8]</sup>。核因子 NRF2 在细胞抗氧化能力中起至关重要的作用, 它可以激活多种抗氧化酶和相关代谢酶的表达, 保护细胞免受氧化应激的损害<sup>[9]</sup>。NRF2/GPX4 途径也是铁死亡的重要通路之一。细胞应激后, NRF2 与 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelchlike ECH-associated protein 1, Keap1) 结合形成的复合物发生解离, 由细胞质入核并与 DNA 上的元件作用, 启动包括 GPX4、xCT 在内的一系列基因的转录, 由此拮抗铁死亡过程<sup>[10]</sup>。Lu 等<sup>[11]</sup>的研究也表明 NRF2 对铁死亡具有拮抗作用, 而 Keap1 过表达诱导的 NRF2 下调可靶向抑制 GSH 合成。过表达 NRF2 可提高谷胱甘肽合成酶, 从而促进 GSH 的从头合成和催化 GSH 的生成, 提高 GSH 的水平<sup>[12-14]</sup>。抑制 GPX4 诱导的铁死亡可被 NRF2 过表达逆转<sup>[15]</sup>。Gong 等<sup>[16]</sup>发现海藻糖通过激活 NRF2/HO-1 通路维持细胞铁池稳定, 抑制铁死亡。NRF2 在维持氧

**收稿日期:** 2024-12-16

**基金项目:** 国家自然科学基金地区科学基金项目 (32360610);  
国家“十四五”重点研发计划课题子项目 (2021 YFD2100503-2-2)

**第一作者:** 路芳芳, 女, 硕士

**通信作者:** 张玉斌 E-mail: gsauzyb@163.com

化还原稳态及对铁死亡的调节中起重要作用,而宰后牛肉品质与氧化-还原稳态密切相关,说明 NRF2 作为一种关键因子,对宰后成熟过程中肉品质的形成有重要影响。

前期对牛肉代谢组学的研究发现,机体内主要通过参与能量、铁死亡、细胞凋亡和氧化状态等代谢途径来影响牛肉品质<sup>[7]</sup>。Liu 等<sup>[18]</sup>探讨了牛肉在冷藏过程中铁蛋白依赖的细胞自噬对铁死亡的促进作用,结果表明,铁蛋白通过释放游离铁,诱导 ROS 积累,抑制 GSH-GPX4 途径,诱发铁死亡。而在 Cui 等<sup>[9]</sup>的研究中,白藜芦醇可以上调 NRF2 及下游蛋白的表达,使肉色稳定性提高。通过靶向 NRF2 调节脂质过氧化和铁死亡来改善肉品质的方法是可行的。

综上,推测通过调节 NRF2 的活性或改善肌肉组织脂质过氧化以及铁稳态,影响宰后肌肉组织铁死亡,进而可以改善肉品质。然而,目前关于 NRF2 的研究报道较少。本试验主要研究 NRF2 在牛肉宰后成熟过程中的变化,对铁死亡的调控作用以及对肉色稳定性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

黄牛 6 头,甘肃伊牧兰肉类加工有限公司,平均年龄 12 月龄,质量(300±20)kg,饲养条件相同,健康无病害,经过屠宰分割后取背最长肌,在 0~4℃条件下运回实验室进行后续试验。

tBHQ、ML385,麦克林化学试剂有限公司;MDA、组织线粒体提取试剂盒,索莱宝科技有限公司;GPX4 活性检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒,南京建成生物工程研究所;MRA 检测试剂盒,上海晶抗生物工程有限公司;NRF2、PRDX6、SLC7A11、FPN1 抗体,上海源叶生物科技有限公司;RNAsolid™ 固定液,武汉塞维尔有限公司。其它试剂均为分析纯级。

### 1.2 仪器与设备

CR-400 便携式色差仪,日本 Konica Minolta 公司;便携式 pH 计,上海玖荣实业有限公司;HWS26 型电热恒温水浴锅,上海一恒科技有限公司;H-1750R 高速冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器有限公司;BP121S 电子天平,德国赛多利斯集

团;Spectramax M 型酶标仪,美国美谷分子仪器有限公司;FSH-2A 高速均质机,常州越新仪器制造有限公司;722N 可见分光光度计,上海仪电有限公司;ETC811 型 PCR 仪,北京东胜创新生物科技有限公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 原料处理 黄牛按商业屠宰流程屠宰后,立即取背最长肌,切成每块约(100±5)g 的肉块,随机分为 3 组,肉液比为 1:10 注射处理:1)对照组:质量分数 0.9% NaCl;2)tBHQ 组:1 mmol/L 的 tBHQ;3)ML385 组:0.5 mmol/L 的 ML385;注射完毕的肉块充分按摩使其均匀吸收,后模拟市场零售,在 4℃分别成熟 0,24,72,168 h,立即测定色度、pH 值,其余肉样用液氮速冻,放入-80℃冰箱待用。

1.3.2 肉色测定 采用 CR-410 色差仪测定  $L^*$  值(亮度)、 $a^*$  值(红色度)和  $b^*$  值(黄色度)。肉样随机取 3 个点,取平均值(色差仪先用色板校准后将测量孔对准确定待测肉表面并压紧,测量,读取数值)。分别测定在 0,24,72,168 h 肉样的  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  值。

1.3.3 pH 值测定 使用前先校准 pH 计,随机选取肉块上 3 个位置,沿肌纤维方向插入 pH 计,待读数稳定后记录,每次使用后去离子水冲洗干净。3 次记录的平均数即为 pH 值。

1.3.4 酶活测定 NADH 氧化酶、GPX4、MRA、MDA、 $Fe^{2+}$  含量采用市售试剂盒说明书方法测定。

1.3.5 普鲁士蓝铁染色 参考 Chen 等<sup>[20]</sup>的方法并略有改动,取石蜡切片,常规脱蜡后,加 Perls 染液(现配现用)染色 20 min,水洗,核固红试剂染核 10 min,水洗,脱水后封片,用光镜观察肌肉组织蓝色颗粒。

1.3.6 线粒体膜电位 先用组织线粒体提取试剂盒提取线粒体。取 0.1 g 新鲜动物组织样本,用 PBS 洗涤干净,用剪刀尽可能剪碎,用冷 PBS 洗涤 2 次,用 1 000×g 离心 5 min;随后加入 500~1 000 μL 冷的试剂 A,置冰上 10 min,用 Dounce 匀浆器匀浆 30~40 次,然后在 4℃,500×g 条件下离心 5 min。弃沉淀,收集上清在 4℃,1 000×g 条件下离心 10 min。弃沉淀,收集上清在 4℃,2 000×g 条件下离心 10 min。弃沉淀,收集上清在 4℃,11 000×g

离心 20 min。弃上清,留沉淀加入 500  $\mu$ L 冷的试剂 B,混匀,在 4  $^{\circ}$ C,11 000 $\times$ g 离心 20 min。弃上清,沉淀即为线粒体。

使用 JC-1 试剂盒按照说明书方法测定  $\Delta\Psi_m$ 。检测单体和聚集体的激发波长分别为 490 nm 和 525 nm,发射波长分别为 530 nm 和 590 nm,单体激发波长与聚集体激发波长之比即可表示膜电位。

1.3.7 蛋白免疫印迹 (Western blotting) 参考 Chen 等<sup>[21]</sup>的方法提取组织样本中的蛋白质,SDS-PAGE 电泳后将蛋白质转移 PVDF (0.45  $\mu$ m)膜上。加封闭液在室温,摇床上养护 30 min 后倒掉,4  $^{\circ}$ C 加入一抗孵育过夜:NRF2 抗体(稀释比例 1:1 000)、PRDX6 抗体(稀释比例 1:1 000)、SLC7A11 抗体(稀释比例 1:1 000)、FPN1 抗体(稀释比例 1:1 000)、Actin 抗体(稀释比例 1:5 000)。一抗回收,加二抗于孵育槽中摇床孵育 30 min。结束则用

TBST 溶液洗脱,随后将 PVDF 膜置于化学发光成像仪中进行曝光成像,运用 AIWBwell<sup>TM</sup> 软件对所得条带进行分析。

1.3.8 RT-PCR 分析 测定方法参照 Xu 等<sup>[22]</sup>。使用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 收集肌肉样品中的总 RNA,并使用琼脂糖凝胶电泳验证其完整性。利用 SuperScript III(Invitrogen)制备 cDNA。RT-PCR 反应采用 SYBR Green Master Mix (Invitrogen)在 StepOne Real-Time PCR 系统 (Applied Biosystems, USA)上进行。分别用目的基因和内参基因引物扩增样品。条件为:95  $^{\circ}$ C 初始变性 30 s;95  $^{\circ}$ C 持续 15 s,40 个循环;60  $^{\circ}$ C 持续 30 s。将 NRF2、PRDX6、SLC7A11、FPN1 的基因表达与内参基因  $\beta$ -肌动蛋白的基因表达进行比较。所有分析取 3 个重复的平均值,并使用阴性对照样本进行背景校正。被测基因的相对表达通过  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算。所有使用的引物如表 1 所示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称		序列(5'-3')
NRF2	Forward	TCGTCGGGGAGCCTCAAA
	Reverse	TCAATCAAATCCATGTCCTGCT
PRDX6	Forward	ATGGTCCTCCACCCCT
	Reverse	CCAGTCCCCGAGACTT
SLC7A11	Forward	GGCACCGTCATCGGATCAG
	Reverse	CTCCACAGGCAGACCAGAAAA
FPN1	Forward	CACCACAGGATATGCTTACACTCAGG
	Reverse	GAGAACAGACCAGTCCGAACAAGG

1.3.9 数据处理与统计分析 所有试验均做 3 次平行,采用 Origin 2018 绘图,SPSS 25.0 软件进行显著性分析( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

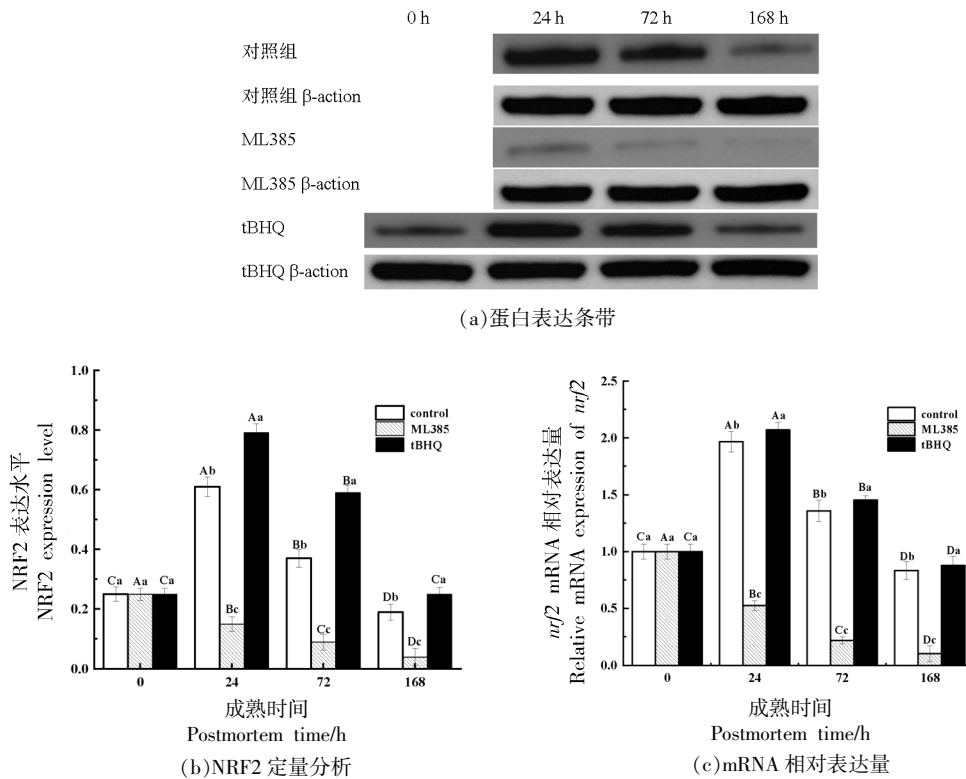
### 2.1 宰后成熟过程 NRF2 的变化

NRF2 是一种在细胞防御、抗氧化应激和细胞生存等方面发挥关键作用的转录因子。核心功能是调节细胞内的氧化应激反应,帮助细胞清除过多的活性氧,从而保护细胞免受氧化损伤,也是调节铁死亡的关键因子<sup>[8]</sup>。如图 1 所示,随着成熟时间的延长,NRF2 呈先升高后降低的趋势,在 24 h

达到最大值,这可能是由于宰后肌肉组织的生理代谢机能遭到破坏,糖原的有氧氧化过程中断,导致氧化应激产生。这种氧化应激会激活 NRF2 信号通路,上调抗氧化酶基因的表达,从而增强抗氧化能力。本研究结果显示,ML385 处理组的 NRF2 表达量显著低于对照组( $P < 0.01$ ),tBHQ 处理组则显著高于对照组,表明 ML385 与 tBHQ 对 NRF2 有明显的抑制与激活作用,可以继续后续试验。

### 2.2 宰后成熟过程中铁代谢的变化

2.2.1 宰后成熟过程中  $Fe^{2+}$  的变化 铁参与线粒体能量传递过程,细胞中铁以稳定的  $Fe^{3+}$  形式储存在铁蛋白中或不稳定铁池中。当细胞中铁过载



注:不同大写字母表示同一处理不同时间点之间差异显著( $P<0.05$ ),不同小写字母表示同一成熟时间点不同处理之间差异显著( $P<0.05$ ),下同。

图 1 NRF2 蛋白表达变化

Fig.1 Changes in NRF2 protein expression

时,大量铁离子被转运出细胞,使得肌肉内游离铁含量过高,而游离铁具有高化学反应性,通过芬顿反应生成大量的 ROS,当 ROS 产生的量超出机体内抗氧化系统的清除能力时,就会导致脂质过氧化堆积,从而诱导铁死亡发生<sup>[23-24]</sup>。在动物屠宰后,高铁肌红蛋白含量逐渐升高,而在肌肉中 MMB 是血红素辅基中  $Fe^{2+}$  氧化为  $Fe^{3+}$  的结果。由图 2 可知,随着时间的延长,ML385 处理组的  $Fe^{2+}$  显著高于对照组( $P<0.05$ ),tBHQ 处理组则相反。表明宰后初期 72 h 内  $Fe^{2+}$  增多,伴随着铁死亡过程,在 72 h 之后,铁死亡进程减弱。这是由于抑制 NRF2 之后,游离的  $Fe^{2+}$  增多,产生 Fenton 反应,使得肌肉体内脂质过氧化进一步增加,加速了铁死亡进程。而激活 NRF2 之后,减轻了脂质过氧化作用,从而减弱了铁死亡进程。Duan 等<sup>[25]</sup>的研究中,通过沉默 *NRF2* 基因后,ROS、MDA 和  $Fe^{2+}$  的表达增加,谷胱甘肽、线粒体膜电位降低,表明 NRF2 通过改善线粒体功能障碍并减轻海马细胞铁死亡,

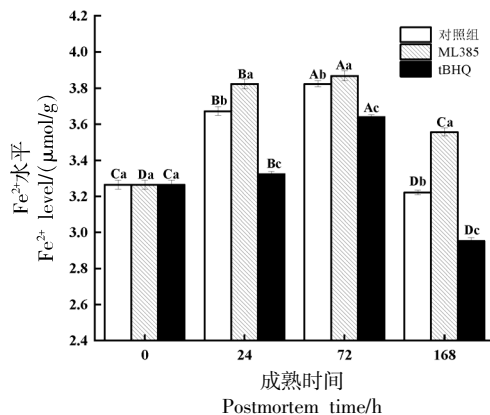


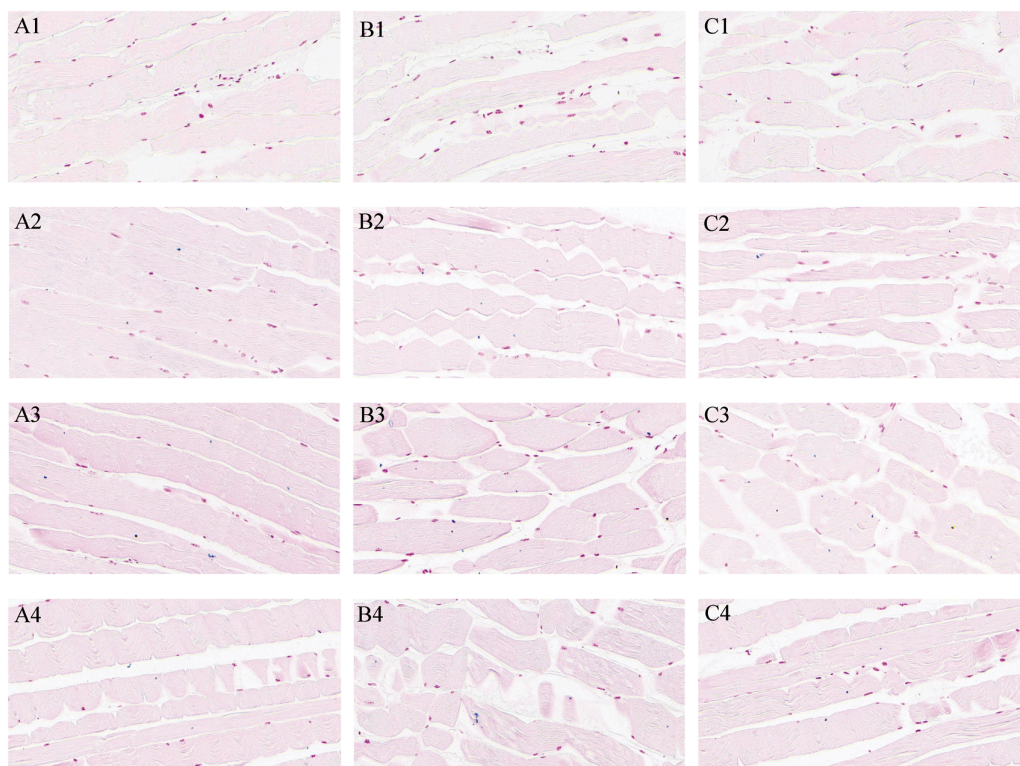
Fig.2 Changes in  $Fe^{2+}$  levels

这与本研究研究结果一致。综上,NRF2 通过调控铁代谢平衡来调控铁死亡过程,进而改善肉色。

2.2.2 宰后成熟过程中肌肉组织铁沉积的变化  
铁沉积可直观地显示组织中的铁含量。由图 3 可知,随着时间的延长,各组铁离子沉积呈先升高后

降低的趋势(蓝点由少变多),在 72 h 时,铁离子沉积最大。且与对照组相比,ML385 处理组的铁离子沉积显著增加( $P<0.05$ ),tBHQ 处理组显著减少( $P<0.05$ )。与上述  $Fe^{2+}$  结果对应相似。这种铁沉积现象可能会促进活性氧(ROS)的积累,进而破坏

组织细胞的抗氧化防御机制,造成功能障碍以及脂质过氧化,形成一种恶性循环,导致氧化应激损伤,进一步加剧铁死亡。说明抑制 NRF2 处理可以加剧铁沉积,造成氧化损伤,从而降低肉色稳定性。



注:A1~A4 分别是对照组 0,24,72,168 h 的铁沉积图片;B1~B4 分别是 ML385 处理组 0,24,72,168 h 的铁沉积图片;C1~C4 分别是 tBHQ 处理组 0,24,72,168 h 的铁沉积图片。

图 3 铁离子沉积改变

Fig.3 Changes in iron deposition

**2.2.3 宰后成熟过程中 FPN1 蛋白及 mRNA 水平的变化** FPN1 是新发现的一种铁运输蛋白,主要分布于神经细胞的细胞膜上,当细胞内铁过载时,FPN1 就负责将铁离子转运出细胞,使其以游离铁的形式存在,FPN1 的功能下调就会引起相应组织内铁的积累,进而引起氧化损伤,破坏细胞抗氧化机制。如图 4 所示,ML385 组、tBHQ 组和对照组的 FPN1 蛋白表达量均呈先升高后降低的趋势,在 72 h 表达量最高,而 tBHQ 处理组显著高于对照组( $P<0.05$ ),ML385 处理组则相反。这与上述  $Fe^{2+}$  含量及铁离子沉积结果对应相似。并且 FPN1 mRNA 水平也与蛋白表达相似,表明宰后肌肉组

织内 NRF2 通过影响 FPN1 的表达量及 mRNA 水平而影响铁死亡进程,进一步影响肉色稳定性。

### 2.3 宰后成熟过程中铁死亡关键蛋白的变化

NRF2 长期以来一直被认为是抗氧化系统中必不可少的转录因子,而 NRF2 所靶向的一系列氧化还原相关基因(如 *GPX4*、*PRDX6* 等)是铁死亡的关键介质。

**2.3.1 SLC7A11 表达水平** GSH 是 GPX4 必需的合成底物,它的合成受到胱氨酸/谷氨酸逆向转运体 SystemXc-(SLC7A11)的调节,当 SLC7A11 受到抑制时,GSH 合成减少,导致 GPX4 失活,最终导致脂质过氧化和铁死亡<sup>[8,24]</sup>。本研究显示,随着

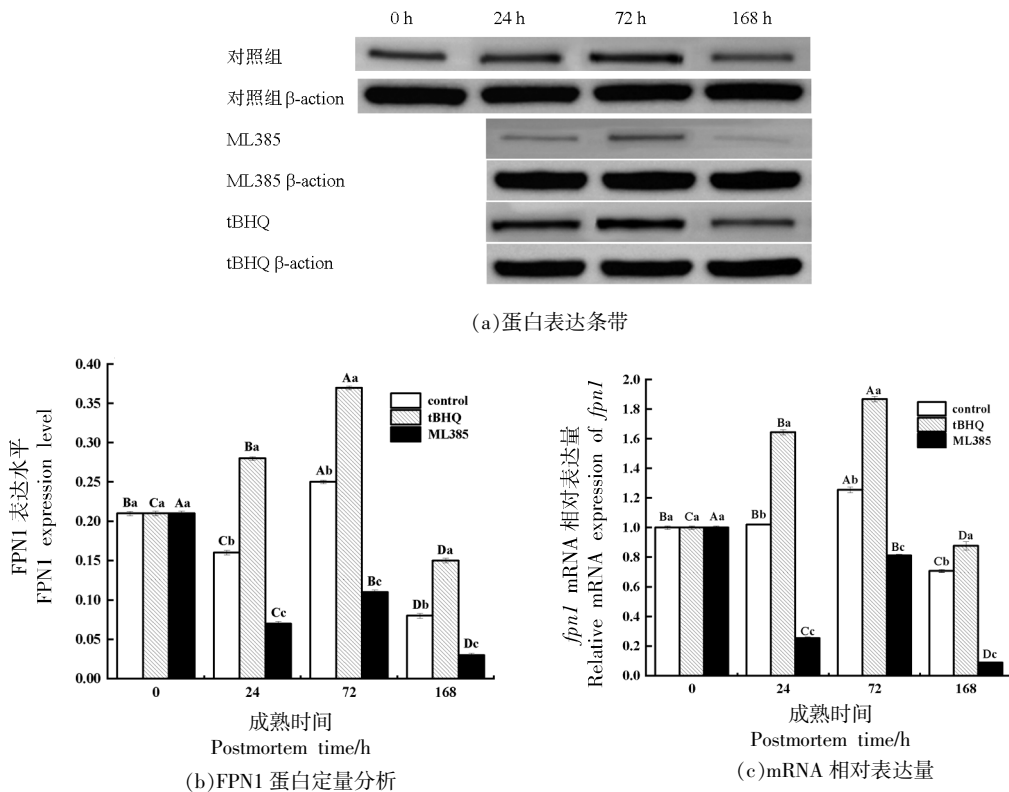
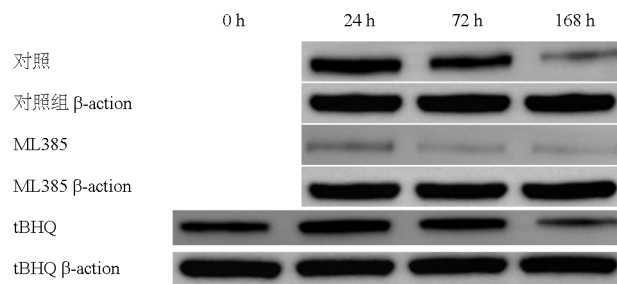


图4 FPN1 蛋白表达变化

Fig.4 Changes in FPN1 protein expression

时间的延长, 各组的 SLC7A11 先升高后降低, ML385 处理显著降低了肌肉组织的 SLC7A11 表达量及 mRNA 水平 ( $P < 0.05$ )。SLC7A11 的减少表明胱氨酸转运异常, 导致 GSH 合成受限, 同时, GSH 耗竭进一步抑制 GPX4 活性, 导致脂质过氧化物水平增加, 最终导致铁死亡的发生<sup>[25-26]</sup>。Wu 等<sup>[27]</sup>的研究表明在氟化物诱导斑马鱼过程中,  $Fe^{2+}$  含量增加的同时, 铁代谢相关基因表达 (*SLC7A11* 和 *GPX4*) 降低, 并最终导致斑马鱼细胞中的铁死亡。与本研究结果一致。Zhang 等<sup>[26]</sup>研究表明 NRF2

可促进溶质转运蛋白 SLC7A11 至胞膜上, 促进谷氨酰胺入胞生成 GPX4 来抑制脂质过氧化产生过多的活性氧, 抵抗肝细胞铁死亡来改善肝损伤<sup>[28]</sup>。有研究表明 NRF2 过表达通过激活细胞中的 SLC7A11/FSP1/CoQ10 通路来减轻 LPS 诱导的铁死亡, NRF2 过表达使得 SLC7A11 mRNA 和蛋白水平升高, 铁、MDA 和 4-HNE 水平降低, GPX4 和 GSH 水平较高, NADH 水平较低<sup>[29]</sup>。表明宰后成熟过程中 NRF2 可以调节 SLC7A11 的蛋白表达及其 mRNA 水平, 进而影响铁死亡进程。



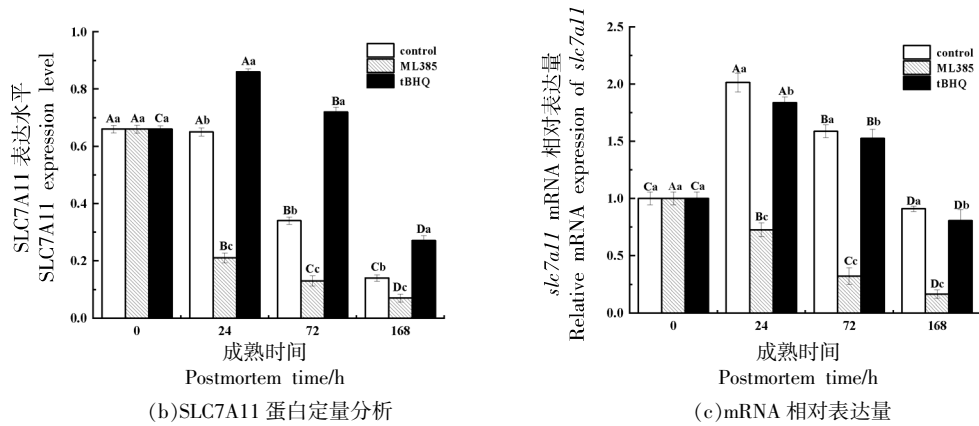


图 5 SLC7A11 蛋白表达变化

Fig.5 Changes in SLC7A11 protein expression

2.3.2 PRDX6 表达水平 PRDX6 是一种氧化还原酶,调节 ROS 稳态,同时也是 NRF2 下游的抗氧化基因靶标。研究表明,PRDX6 调节与铁和脂质代谢相关的途径,PRDX6 的缺失增加了铁死亡的易感性,并可能增加其它类型的坏死细胞死亡<sup>[30]</sup>。如图 6 所示,随着时间延长,PRDX6 的表达量及 mRNA 水平均先升高后降低,且 ML385 处

理组始终低于对照组,tBHQ 组则显著高于对照组 ( $P<0.05$ )。Bhavana 等<sup>[31]</sup>的研究中,NRF2 激活剂萝卜硫素 (SFN) 以剂量依赖的方式增强 PRDX6、GSH 的表达,并逆转了 NRF2 对这些抗氧化剂的失调作用。Tonelli 等<sup>[32]</sup>的研究中也表明 NRF2 通路的激活导致 GSH、Hem 加氧酶 1(HO-1)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、过氧化氢酶(CAT)、超氧

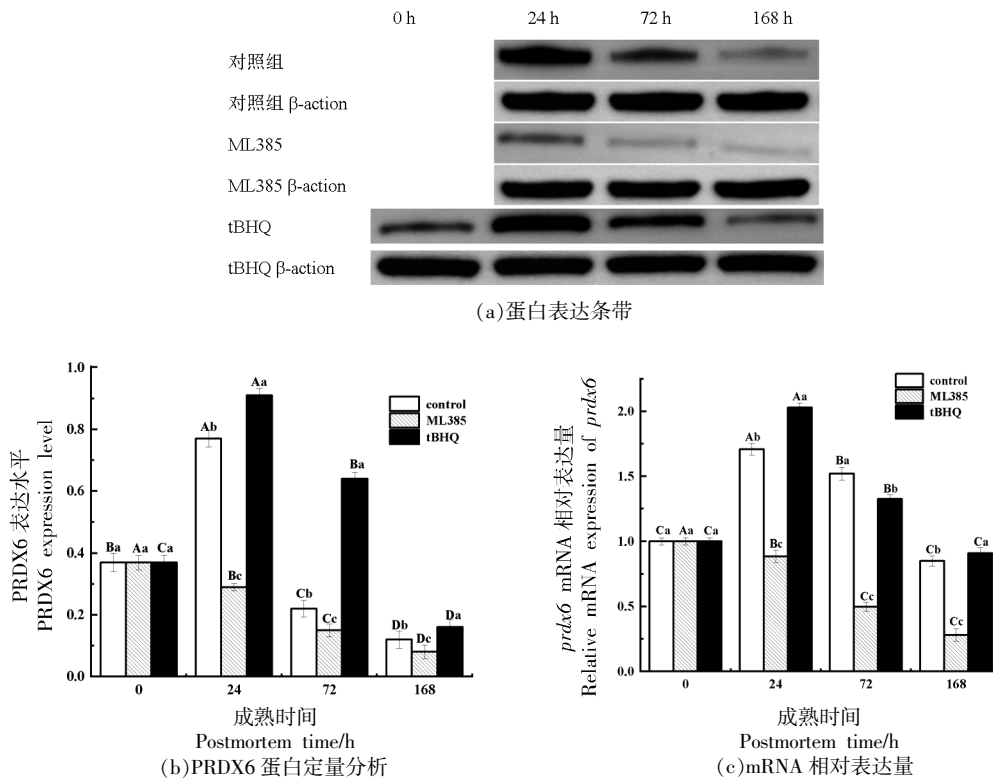


图 6 PRDX6 蛋白表达变化

Fig.6 Changes in PRDX6 protein expression

化物歧化酶(SOD)和过氧化物氧化蛋白(Prdx)的产生。均与本研究结果一致。表明宰后机体内, NRF2 可以调节 PRDX6 蛋白表达及 mRNA 水平, 从而影响铁死亡进程。

## 2.4 宰后成熟过程中氧化特性的变化

**2.4.1 宰后成熟过程中脂质氧化的改变** 脂质过氧化水平升高是铁死亡最关键的指标之一<sup>[2]</sup>。而 MDA 是肉类贮藏过程中脂质氧化次级产物中最丰富且具有代表性的活性醛类之一, 来源于多种不饱和脂肪酸, 具有较强的诱导蛋白氧化变性能力, 是脂质氧化应激的标志<sup>[33]</sup>。因此 MDA 水平能够反映细胞铁死亡发生程度。如图 7 所示, 随着成熟时间的延长, 对照组、ML385 组、tBHQ 组的 MDA 水平均逐渐上升, 且 ML385 组显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。这可能是因为宰后肌肉处于缺氧状态, 且 ML385 处理后抑制了 NRF2 表达, 破坏了氧化还原系统平衡, 其脂质过氧化增加, 进而导致线粒体肿胀, 功能损伤, 加快了铁死亡进程。Li 等<sup>[19]</sup>研究白藜芦醇饲料对抗氧化性能的影响时, 发现提高 NRF2 表达量的同时, MDA 降低, 且  $a^*$  值升高。陈腊梅等<sup>[33]</sup>研究表明, 脂质氧化主要通过介导 Mb 氧化对色泽产生影响, MDA 作为脂质氧化的代表性活性醛, 其浓度越大, 脂质氧化程度越高, 色泽稳定性越低。这与本研究结果一致。综上,

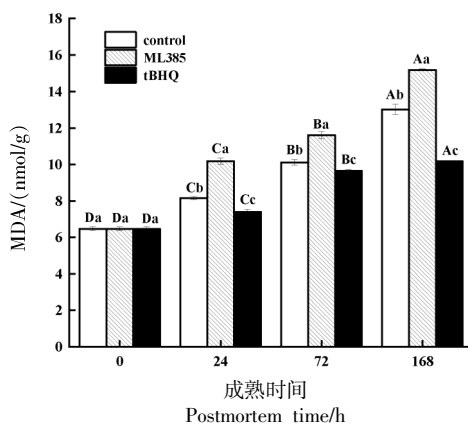


图 7 MDA 含量变化

Fig.7 MDA content changes

NRF2 通过调节 MDA 来改善铁死亡, 使得肉色稳定性增加。

**2.4.2 宰后成熟过程中 GPX4 的改变** GPX4 是生物体内抗氧化系统关键酶, 也是铁死亡调控的核心限速酶。其能够通过将有毒的脂质过氧化物 (PUFA-OOH) 直接还原为无毒的脂质醇 (PUFA-OH), 从而阻断  $Fe^{2+}$  催化的 ROS 生成, 减轻对细胞膜的损伤<sup>[24]</sup>。GPX4 活性降低, 加速氧化进程, 最终触发铁死亡。如图 8 所示, 随着宰后成熟时间的延长, ML385 组、tBHQ 组和对照组的 GPX4 活性均呈现逐渐降低的趋势, 而 ML385 处理组显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 分别降低 26.77%, 32.78%, 28.31%; 与 2.3.1 节 SLC7A11 表达结果一致。这可能是因为 NRF2 被认为是调节细胞氧化还原状态的重要靶点, 它可以易位到细胞核中, 激活抗氧化反应元件, 进而诱导抗氧化酶的表达。GPX4 是一种脂质修复酶, 也是 NRF2 的下游靶点。抑制 NRF2 表达后, 系统抗氧化和清除自由基的能力变弱, 使得脂质过氧化增加, GPX4 的活性降低, 进而增加了铁死亡进程。Shin 等<sup>[34]</sup>发现抑制 GPX4 可诱导铁死亡, 然而 NRF2 的过表达逆转了这一过程, 这与本研究结果一致。综上, 本研究中, 抑制 NRF2 而降低 GPX4 活性来加快铁死亡进程, 降低肉色稳定性。

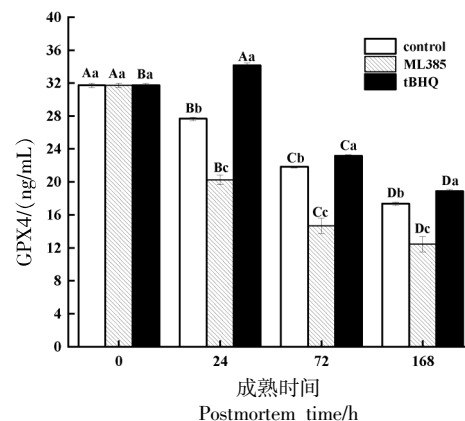


图 8 GPX4 活性变化

Fig.8 GPX4 activity changes

## 2.5 宰后成熟过程中线粒体膜电位的变化

铁死亡会使细胞产生区别于其它细胞死亡方式(如凋亡、自噬、坏死)的特征性改变, 主要表现

为线粒体形态的变化, 包括线粒体体积变小, 膜密度增加, 嵴减少或消失, 外膜破裂等<sup>[17]</sup>, 线粒体皱缩、膜破裂等形态改变会伴随线粒体膜通透性增

加,膜电位消失从而产生线粒体障碍。因此,线粒体形态和膜电位是判断铁死亡发生的重要指标。线粒体在出现铁死亡早期膜电位升高,而铁死亡晚期线膜电位下降的现象,最终线粒体膜破裂。如图 9 所示,随着时间的延长,对照组、ML385 组与 tBHQ 组的线粒体膜电位均呈逐渐下降的趋势。ML385 组的线粒体膜电位在成熟过程中始终显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ),而 tBHQ 组则相反。Holmström 等<sup>[35]</sup>的研究中,敲除 NRF2 会使线粒体膜电位降低;相反,激活 NRF2 会使线粒体膜电位升高,表明 NRF2 促进线粒体中的能量产生,这与本研究结果一致。综上,抑制 NRF2 会使线粒体膜电位丧失,线粒体损伤加重,加快铁死亡进程,肉色稳定性下降。

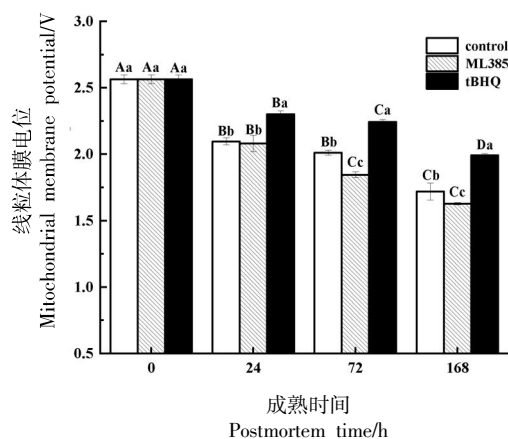


图 9 线粒体膜电位的变化

Fig.9 Changes in mitochondrial membrane potential

## 2.6 宰后成熟过程中 pH 值的变化

Gagaoua 等<sup>[36]</sup>研究表明,pH 值对所有肌肉的颜色变化都有显著影响。由于肌肉 pH 值的降低伴随着肌纤维结构和细丝排列的改变,可能会改变肌肉表面的光散射,从而影响仪器测量的色差。如图 10 所示,3 个处理组的 pH 值在 24 h 内显著下降 ( $P < 0.05$ ),72 h 有所回升,这可能是因为糖酵解潜在在 24 h 有所降低,宰后由于缺氧,糖酵解成为了细胞主要提供能量的途径,该过程会产生 ATP,以及生成丙酮酸及乳酸,并且 ATP 水解产生的磷酸以及乳酸的积累会促使 pH 值下降。而 pH 值在 72 h 回升可能是由于随着成熟时间延长,部分酸性物质被逐渐分解。故而本研究结果表明,宰后 NRF2 可以通过调节 pH 值来改善肉色稳定性。

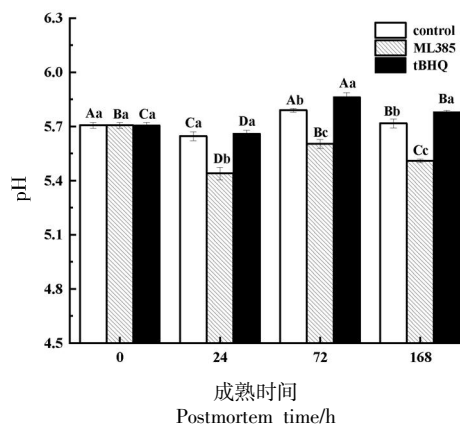


图 10 pH 值的变化

Fig.10 Changes in pH value

## 2.7 宰后成熟过程中肉色 ( $a^*$ 、 $b^*$ 、 $L^*$ ) 的变化

肉色是肉品新鲜度最直观的表现因素,它可以直接影响消费者的购买力。肌红蛋白中血红素铁的氧化还原状态控制着肉的颜色。由表 2 可知,ML385 组、tBHQ 组和对照组的  $a^*$ 、 $b^*$ 、 $L^*$  值均在 72 h 前呈上升趋势后相对稳定。72 h 前 tBHQ 组的  $a^*$  值显著高于 ML385 组,而  $b^*$  值和  $L^*$  值显著低于 ML385 组,72 h 之后则相反。这可能是因为 tBHQ 可以激活抗氧化系统,增强牛肉肌肉抗氧化酶活性,降低脂质氧化,促进线粒体的呼吸作用,促进 NADH 的生成,MRA 消耗加速 MMb 转化为 OMb。然而随着肌体继续成熟,线粒体大量消耗氧气,造成肌肉局部缺氧,使得 Mb 氧化还原受阻,氧化的

MMb 难以被还原,导致肉色稳定性下降。

## 2.8 宰后成熟过程中 Mb 的变化

Mb 是肌浆中的蛋白质,宰后胴体中 Mb 的含量及氧化状态决定肉的呈色。由图 11 可知,ML385 组、tBHQ 组和对照组的 Mb 含量均随着成熟时间的延长而逐渐降低,且 ML385 组显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。在 168 h 时,ML385 组、tBHQ 组和对照组的 Mb 含量分别降低了 38.72%、43.29%、19.89% 左右。而 Mb 含量的变化是多方面的。辛可启等<sup>[37]</sup>测定后成熟期间牦牛肉 Mb 含量的变化,呈持续下降的趋势,且在 168 h 时,随着成熟时间的延长,Mb 均下降为 0 h 的 41.55% 左右,这与本研究结果一致。有研究表明<sup>[37]</sup>,氧含量及线粒体稳态

表2  $a^*$ 、 $b^*$ 、 $L^*$  值的变化  
Table 2 Changes in  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$  value

指标	处理方式	成熟时间/h			
		0	24	72	168
$L^*$	对照组	26.50 ± 0.06 <sup>Da</sup>	34.49 ± 0.05 <sup>Cc</sup>	35.29 ± 0.16 <sup>Bc</sup>	35.68 ± 0.10 <sup>Aa</sup>
	ML385	26.50 ± 0.06 <sup>Da</sup>	38.29 ± 0.01 <sup>Aa</sup>	37.45 ± 0.06 <sup>Ba</sup>	35.76 ± 0.12 <sup>Cb</sup>
	tBHQ	26.50 ± 0.06 <sup>Da</sup>	36.92 ± 0.09 <sup>Ab</sup>	38.29 ± 0.01 <sup>Aa</sup>	35.72 ± 0.19 <sup>Bb</sup>
$a^*$	对照组	12.97 ± 0.30 <sup>Da</sup>	18.97 ± 0.44 <sup>Aa</sup>	16.68 ± 0.18 <sup>Bc</sup>	14.52 ± 0.18 <sup>Ca</sup>
	ML385	12.97 ± 0.30 <sup>Ca</sup>	15.00 ± 0.08 <sup>Bc</sup>	16.07 ± 0.07 <sup>Ab</sup>	12.76 ± 0.45 <sup>Cc</sup>
	tBHQ	12.97 ± 0.30 <sup>Ca</sup>	16.13 ± 0.33 <sup>Ab</sup>	17.12 ± 0.26 <sup>Aa</sup>	15.34 ± 1.37 <sup>Bb</sup>
$b^*$	对照组	1.28 ± 0.18 <sup>Da</sup>	5.48 ± 0.24 <sup>Bb</sup>	6.73 ± 0.17 <sup>Aa</sup>	4.01 ± 0.13 <sup>Cc</sup>
	ML385	1.28 ± 0.18 <sup>Ca</sup>	6.59 ± 0.18 <sup>Aa</sup>	6.77 ± 0.24 <sup>Aa</sup>	6.17 ± 0.15 <sup>Ba</sup>
	tBHQ	1.28 ± 0.18 <sup>Da</sup>	4.48 ± 0.29 <sup>Cc</sup>	6.72 ± 0.13 <sup>Aa</sup>	5.22 ± 0.04 <sup>Bb</sup>

注: A~D 表示同一处理不同时间点之间差异显著 ( $P < 0.05$ ); a~d 表示同一成熟时间点不同处理之间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

显著调节 Mb 表达,而随着贮藏时间的延长,氧气逐渐减少,致使肌细胞铁稳态失衡,线粒体功能受损,脂质过氧化积累,使得铁死亡加剧,诱发 Mb 蛋白变性,Mb 的初级结构发生改变。最终导致其检测含量降低。本研究中用 ML385 处理宰后肌肉,抑制了 NRF2 的表达,抗氧化系统平衡被破坏,说明抑制 NRF2 的表达可以显著降低 Mb 含量,进而使得肉色稳定性降低。

## 2.9 宰后成熟过程中 MRA 的变化

MRA 是 MetMb 还原过程中的关键酶。在生物体内,借助 NADH 的辅助作用,能够将 MetMb 还原成 OxyMb,从而增强肉色稳定性。本研究中 MRA 变化如图 12 所示,随着成熟时间的延长,MRA 活性下降,而对照组与 tBHQ 处理组在后期

趋于稳定,ML385 处理组 MRA 趋于直线下降。在整个成熟过程中,对照组的 MRA 活性降低 26.51%左右,ML385 组降低 44.22%左右,tBHQ 降低 23.59%左右。目前的报道尚未见 ML385 对 MRA 的作用。有研究表明,MMb 在宰后肌体内含量较低,主要是因为 NADH 辅助 MMb 还原酶将 MMb 还原为 DMb,而在宰后肌肉中,MMb 还原酶是维持肉色稳定性的重要内部因素<sup>[37-38]</sup>。因此,推测这可能是由于抑制 NRF2 活性后,宰后肌肉组织 NADH 氧化酶活性降低,NADH 含量下降,氧化过程产生,进而影响 Mb 卟啉环上  $Fe^{3+}$  自由基跃变,使得 MRA 活性下降。表明宰后机体内 NRF2 通过调节铁水平来调控 Mb 变化,进而影响肉色稳定性。

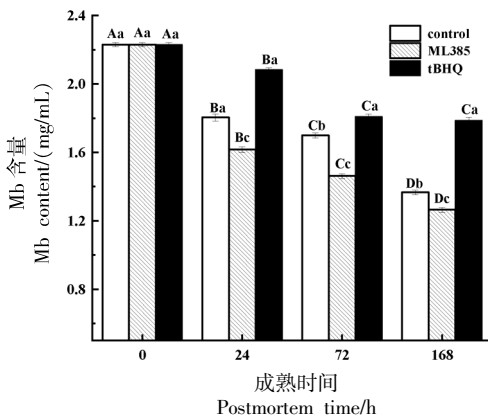


图 11 Mb 含量的变化

Fig.11 Changes in Mb content

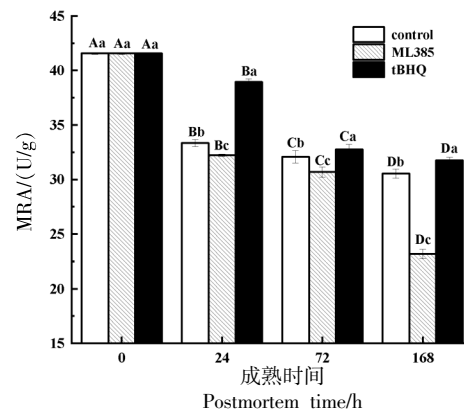


图 12 MRA 活性的变化

Fig.12 Changes in MRA activity

## 2.10 NADH 氧化酶的变化

NADH 是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的还原态,是 MMb 还原过程中重要的辅酶,为 MMb 提供电子从而促使其还原。有研究表明 NADH 的含量可反映组织细胞中氧化还原和能量变化状态<sup>[4]</sup>。如图 13 所示,随着成熟时间的延长,NADH 氧化酶呈逐渐降低的趋势( $P<0.05$ ),而 ML385 处理组下降的更为迅速,与对照组相比,ML385 处理后机体内 NADH 氧化酶显著降低,分别降低了 24.06%, 14.51%, 9.46% 左右。这与 Esteras 等<sup>[39]</sup>研究敲除 NRF2,降低了 NADH 的表达结果一致。这可能是由于 ML385 处理抑制了 NRF2 表达,使得氧化系统机能降低,从而引起线粒体结构损伤,加速 NADH 含量的降低。同时线粒体呼吸功能受到严重影响,导致氧化磷酸化过程受阻,在成熟后期,用于 MMb 还原的电子供体逐渐减少,也对线粒体 MMb 还原能力造成一定影响,表明宰后成熟过程中,NRF2 间接调控 NADH 氧化酶的表达,进而影响线粒体铁死亡和肉色稳定性。

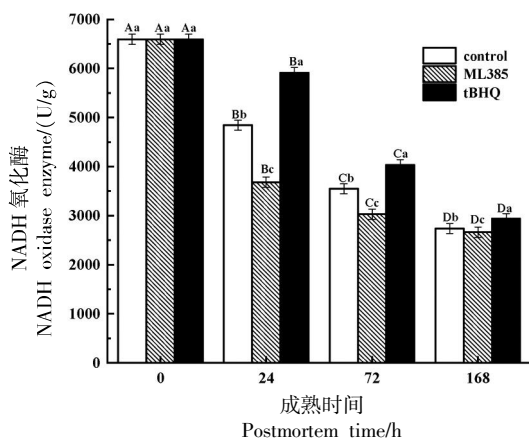


图 13 NADH 氧化酶的变化

Fig.13 Changes in NADH oxidase enzyme activity

## 3 结论

综上所述,ML385 处理能够抑制宰后成熟过程中 NRF2 的活性,显著提高铁离子的积累,下调铁死亡相关蛋白 FPN1、SLC7A11、PRDX6 的表达水平及其 mRNA 水平;抑制了 MDA 水平、GPX4 的活性,使得线粒体膜电位显著下降。同时,ML385 处理组的 pH 值、 $a^*$ 、Mb 含量、MRA、NADH 氧化酶活性始终小于对照组, $b^*$  值、 $L^*$  值显著高于对照组。

于此推断,NRF2 一方面可能通过下调 FPN1 蛋白及 mRNA 水平,调节宰后机体内引起的铁稳态失衡,进而调节肉色。另一方面,NRF2 可能通过调节 FPN1/SLC7A11/PRDX6 轴缓解铁稳态失衡,从而调节宰后肌肉组织 MDA 含量及脂质过氧化水平,改善线粒体功能,有效抵抗肌肉组织铁死亡,进而改善宰后肌肉组织肉色稳定性。

## 参 考 文 献

- [1] WE S T, OU L C, LUO M R, et al. Optimization of food expectations using product color and appearance[J]. Food Quality and Preference, 2012(1): 23.
- [2] 郝丹妮,屠晓航,郭诗雨,等.宰后肌肉成熟过程中铁死亡的发生及其与生鲜肉品质关系的研究进展[J].食品科学,2024,45(21):331-343.
- [3] HAO D N, TU X H, GUO S Y, et al. Research progress in ferroptosis during postmortem aging of muscle and its relationship with the quality of fresh meat[J]. Food Science, 2024, 45(21): 331-343.
- [4] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of non-apoptotic cell death[J]. Cell, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [5] 陈骋. 脂质氧化和抗氧化因子对牦牛肉肌红蛋白稳定性及高铁肌红蛋白还原能力的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
- [6] CHEN C. Effects of lipid oxidation and antioxidant factors on color stability and metmyoglobin reducing ability of yak muscle[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2016.
- [7] LIU J, LIU D H, ZHANG A R, et al. Haem-mediated protein oxidation affects water-holding capacity of beef during refrigerated storage[J]. Food Chemistry: X, 2022, 14: 100304.
- [8] LU J, LIU D H, WU X, et al. TMT quantitative proteomics analysis reveals the effects of transport stress on iron metabolism in the liver of chicken[J]. Animals, 2022, 12(1): 52.
- [9] YANG J, MA S Y, XU R, et al. Smart biomimetic metal organic frameworks based on ROS-ferroptosis-glycolysis regulation for enhanced tumor chemo-immunotherapy[J]. Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society, 2021, 334: 21-33.

- [8] DODSON M, CASTRO-PORTUGUEZ R, ZHANG D. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis[J]. *Redox Biology*, 2019, 23: 101107.
- [9] DÄCHERT J, HERENFELD V, HABERMANN K, et al. Targeting ferroptosis in rhabdomyosarcoma cells[J]. *Int J Cancer*, 2020, 146(2): 510–520.
- [10] FAN Q R, CHANG H L, TIAN L F, et al. Methane saline suppresses ferroptosis via the Nrf2/HO-1 signaling pathway to ameliorate intestinal ischemia-reperfusion injury[J]. *Redox Report*, 2024, 29(1): 2373657.
- [11] LU J, ZHAO Y N, LIU M T, et al. Toward improved human health: Nrf2 plays a critical role in regulating ferroptosis[J]. *Food Funct*, 2021, 12(20): 9583–9606.
- [12] LIAN G J, GNANARPAKASAM J R, WANG T T, et al. Glutathione *de novo* synthesis but not recycling process coordinates with glutamine catabolism to control redox homeostasis and directs murine T cell differentiation[J]. *eLife*, 2018, 7: e36158.
- [13] SONG X H, LONG D X. Nrf2 and ferroptosis: A new research direction for neurodegenerative diseases[J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 267.
- [14] HE F, ANTONUCCI L, KARIN M. NRF2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41(4): 405–416.
- [15] SHIN D, KIM E H, LEE J, et al. Nrf2 inhibition reverses resistance to GPX4 inhibitor-induced ferroptosis in head and neck cancer[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 129: 454–462.
- [16] GONG F Y, GE T, LIU J, et al. Trehalose inhibits ferroptosis via NRF2/HO-1 pathway and promotes functional recovery in mice with spinal cord injury[J]. *Aging*, 2022, 14(7): 3216–3232.
- [17] LIU J, PAN C L, YUE H, et al. Proteomic and metabolomic analysis of ageing beef exudate to determine that iron metabolism enhances muscle protein and lipid oxidation[J]. *Food Chemistry: X*, 2023, 20(c): 101038.
- [18] LIU J, HU Z Y, MA Q, et al. Ferritin-dependent cellular autophagy pathway promotes ferroptosis in beef during cold storage[J]. *Food Chemistry*, 2023, 412: 135550.
- [19] CUI Y, QI J J, LI J Q, et al. Effects of dietary resveratrol supplementation in cattle on the antioxidative capacity and meat quality of beef steaks under high oxygen packaging[J]. *Meat Science*, 2024, 204: 109238.
- [20] CHEN G H, SONG C C, PANTOPOULOS K, et al. Mitochondrial oxidative stress-mediated Fe-induced ferroptosis via the NRF2-ARE pathway[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2022, 180: 95–107.
- [21] CHEN K C, CHEN C R, CHEN C Y, et al. Bicalutamide elicits renal damage by causing mitochondrial dysfunction via ROS damage and upregulation of HIF-1[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(9): 3400.
- [22] XU Y, LI Y, LI H Q, et al. The accumulations of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  by JNK and ERK are involved in biphasic effects induced by different levels of arsenite in human bronchial epithelial cells[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013, 266(2): 187–197.
- [23] JAKARIA M, BELAIDI A A, BUSH A I, et al. Ferroptosis as a mechanism of neurodegeneration in Alzheimer's disease[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2021, 159(5): 804–825.
- [24] 赵培均, 王田林, 谢珊珊, 等. 芝麻酚通过调节 SLC7A11/GPX4/ACSL4 轴抑制 A $\beta$ 1-42 诱导的 PC12 细胞铁死亡[J]. *食品科学*, 2025, 46(10): 139–146. ZHAO P J, WANG T L, XIE S S, et al. Sesamol inhibits A $\beta$ 1-42-induced ferroptosis by regulation of the SLC7A11/GPX4/ACSL4 axis in PC12 cells[J]. *Food Science*, 2025, 46(10): 139–146.
- [25] DUAN H F, YANG X, CAI S H, et al. Nrf2 mitigates sepsis-associated encephalopathy-induced hippocampus ferroptosis via modulating mitochondrial dynamic homeostasis[J]. *International Immunopharmacology*, 2024, 143(pt 1): 113331.
- [26] ZHANG Q, LUO C Y, LI Z K, et al. Astaxanthin activates the Nrf2/Keap1/HO-1 pathway to inhibit oxidative stress and ferroptosis, reducing triphenyl phosphate (TPhP)-induced neurodevelopmental toxicity[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2024, 271: 13.
- [27] WU Y J, ZHANG X L, CHEN J J, et al. Self-recovery study of fluoride-induced ferroptosis in the liver of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2022, 251: 106275.
- [28] 蔡华俊, 陈致岐, 胡文婷, 等. 鼠曲草总黄酮通过

- 激活 Nrf2/SLC7A11/GPX-4 信号通路抑制肝细胞铁死亡缓解对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤[J]. 南方医科大学学报, 2024, 44(11): 2201-2208.
- CAI H J, CHEN Z Q, HU W T, et al. Total flavonoids of *Salvia miltiorrhiza* alleviate acetaminophen-induced acute liver injury in mice by suppressing hepatocyte ferroptosis via activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Journal of Southern Medical University, 2024, 44(11): 2201-2208.
- [29] HUANG J, ZHAO Y, LUO X, et al. Dexmedetomidine inhibits ferroptosis and attenuates sepsis-induced acute kidney injury via activating the Nrf2/SLC7A11/FSP1/CoQ10 pathway[J]. Redox Report: Communications in Free Radical Research, 2024, 29(1): 2430929.
- [30] TORRES-VELARDE J M, ALLEN K N, SALVADOR-PASCUAL A, et al. Peroxiredoxin 6 suppresses ferroptosis in lung endothelial cells[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2024, 218: 82-93.
- [31] BHAVANA C, ERI K, DHIRENDRA P S. Sulforaphane-induced Klf9/Prdx6 axis acts as a molecular switch to control redox signaling and determines fate of cells[J]. Cells, 2019, 8(10): E1159.
- [32] TONELLI C, CHIO I I C, TUVESON D A. Transcriptional regulation by Nrf2[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2018, 29(17): 1727-1745.
- [33] 陈腊梅, 唐善虎, 李思宁, 等. 丙二醛氧化对牦牛肉肌浆蛋白理化特性及色泽稳定性的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(16): 113-120.
- CHEN L M, TANG S H, LI S N, et al. Effect of malondialdehyde oxidation on physicochemical properties and color stability of yak meat sarcoplasmic proteins[J]. Food Science, 2023, 44(16): 113-120.
- [34] SHIN D, KIM E H, LEE J, et al. Nrf2 inhibition reverses resistance to GPX4 inhibitor-induced ferroptosis in head and neck cancer[J]. Free Radical Biol Med, 2018(129): 454-462.
- [35] HOLMSTRÖM K M, BAIRD L, ZHANG Y, et al. Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration[J]. Biology Open, 2013, 2(8): 761-770.
- [36] GAGAOUA M, MONTEILS V, COUVREUR S, et al. Identification of biomarkers associated with the rearing practices, carcass characteristics, and beef quality: An integrative approach[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(37): 8264-8278.
- [37] 辛可启, 田凯, 余群力, 等. 低氧因子介导脯氨酰羟化酶对牦牛肉肉色稳定性的影响[J]. 农业机械学报, 2023, 54(3): 421-430.
- XIN K Q, TIAN K, YU Q L, et al. Effects of prolyl hydroxylase on stability of meat color by hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2023, 54(3): 421-430.
- [38] GENOVA M L, LENZA G. Functional role of mitochondrial respiratory super complexes[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1837(4): 427-443.
- [39] ESTERAS N, BLACKER T S, ZHEREBTSOV E A, et al. Nrf2 regulates glucose uptake and metabolism in neurons and astrocytes[J]. Redox Biology, 2023, 62: 102672.

## NRF2 Regulating Ferroptosis and Its Effect on Post-mortem Beef Color Stability

LU Fangfang, LI Caiyun, LI Aixia, ZHU Lihua, ZHANG Yubin\*, ZHANG Li  
(College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)

**Abstract** To investigate the effect of NRF2 on ferroptosis and beef color stability during post-mortem maturation, the longest dorsal muscle of cattle was used as the research object in this experiment. It was treated with 0.9% physiological saline, 0.5 mmol/L ML385, and 1 mmol/L tBHQ injection, and matured at 4 °C for 0, 24, 72, 168 hours, respectively. The expression level of NRF2, changes in iron homeostasis, expression of ferroptosis-related proteins, lipid oxidation, mitochondrial membrane potential, beef color, and other related indicators were analyzed. The research results showed that during the maturation period, the expression and mRNA levels of NRF2 in the ML385 treatment group were significantly lower than those in the control group, while the opposite was true in the tBHQ group, indicating that ML385 and tBHQ had significant inhibitory and activating effects on NRF2. Compared with the control group, the ML385 group

showed a significant increase in iron deposition levels ( $P<0.05$ ), and the protein expression levels of FPN1, SLC7A11, and PRDX6 were significantly downregulated ( $P<0.05$ ). After maturation, the contents of  $\text{Fe}^{2+}$ , MDA, and  $b^*$  increased by 10.56%, 16.67%, and 53.78%, respectively, while the tBHQ group decreased by 8.39%, 21.76%, and 30.26% compared with the control group. The mitochondrial membrane potential, pH, Mb content, GPX4, MRA, NADH oxidase activity, and  $a^*$  value in the ML385 group were significantly reduced by 5.31%, 3.62%, 7.45%, 28.32%, 24.10%, 2.76%, and 12.1% respectively compared with the control group, whereas those in the tBHQ group increased by 15.96%, 1.11%, 30.73%, 8.69%, 3.96%, 7.39%, and 5.68% respectively compared with the control group. For  $L^*$  values, both the ML385 group and tBHQ group were higher than the control group in summary, during the post-mortem maturation period, NRF2 regulates ferroptosis by maintaining muscle tissue iron homeostasis, inhibiting lipid peroxidation, and affecting mitochondrial membrane potential, thereby affecting Mb content and MRA to improve beef color stability.

**Keywords** NRF2; ferroptosis; iron homeostasis; lipid peroxidation; beef color stability