神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000945

Peroxiredoxin 6 在脑缺血再灌注损伤中的抗氧化和抗凋亡作用

姜蓓蓓，谭　丽，姚　辉，喻姗姗，赵　涌，王顺和
（重庆医科大学基础医学院病理教研室，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：探讨 Peroxiredoxin 6(Prdx6)在脑缺血再灌注损伤中的影响及相关机制。**方法**：采用中脑动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion，MCAO)模型诱导 SD 大鼠左侧脑皮质缺血再灌注，将大鼠随机(n=16)分为假手术组、MCAO 组、Scramble 组和 Prdx6-siRNA 组；前两组均不进行侧脑室注射，其中 Sham 组仅做手术切口，不插入线栓，MCAO 组进行手术造模；后 2 组分别侧脑室注射 8 μl 的乱序Prdx6-siRNA 和 Prdx6-siRNA 再手术建模。测定各组神经功能学评分、脑含水量和脑梗死体积；HE 和亚甲蓝染色法检测大脑皮质缺血再灌注区神经元的损伤情况；免疫印迹法检测脑组织中 Prdx6 及 Caspase3 蛋白的表达水平；最后，检测 SOD、MDA 活性并用 TUNLE 染色法探讨相关氧化、凋亡机制。**结果**：Prdx6-siRNA 组与 MCAO 组相比，神经功能学评分、缺血侧脑含水量和脑梗死体积均明显增加(P=0.000)；HE 和亚甲蓝染色显示脑缺血区神经元损伤进一步加重(P=0.000)；SOD 活性进一步降低(P=0.000)，MDA 含量进一步增加(P=0.000)；TUNLE 染色阳性细胞率(P=0.000)和 Caspase3 蛋白表达水平(P<0.01)均进一步增高。而 Scramble 组与 MCAO 组比以上各指标均无明显统计学差异。**结论**：Prdx6 在脑缺血再灌注损伤中起保护作用，此作用与其抗氧化和抗凋亡机制有关。

【关键词】Prdx6-siRNA；脑缺血再灌注；氧化应激；抗凋亡
【中图分类号】R364.1+7；R363.2+2；R361+.3　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-01-07

Antioxidant and antiapoptotic effects of Peroxiredoxin 6 in cerebral ischemia/reperfusion injury

Jiang Beibei, Tan Li, Yao Hui, Yu Shanshan, ZhaoYong, Wang Shunhe
(*Teaching and Research Section of Pathology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the influence of Peroxiredoxin 6(Prdx6) on cerebral ischemia/-reperfusion(I/R) injury and its mechanism. ***Methods***: The middle cerebral artery occlusion(MCAO) model was used to induce SD rats' cerebral I/R on the left side. Rats(n=16) were randomly divided into Sham group, MCAO group, Scramble group and Prdx6-siRNA group; the former two groups did not receive lateral ventricle injection; Sham group only had surgery incision and line plug was not inserted; MCAO group received surgery; the latter two groups were respectively injected with 8 μl out-of-order Prdx6-siRNA and Prdx6-siRNA in lateral ventricle before surgery. In every group, nerve function score, brain water content and cerebral infarct volume were measured; HE and methylene blue staining method were used to detect the rats' brain cortex neurons after I/R injury. The expressions of Prdx6 and Caspase3 protein were detected by Western blot. SOD and MDA activities were assayed and TUNLE staining was used to detect the related mechanism of apoptosis and oxidation. ***Results***: The neurological function score, lateral ischemic cerebral water content and cerebral infarction volume were significantly increased(P=0.000) in Prdx6- siRNA group than in MCAO group; HE and methylene blue staining showed further aggravate cerebral ischemic neuronal damage in Prdx6-siRNA group than in MCAO group(P=0.000); SOD activity was further reduced(P=0.000) and MDA content was increased(P=0.000) in Prdx6-siRNA group than in MCAO group. TUNLE staining positive cells rate(P=0.000) and Caspase3 protein expression levels(P<0.01) were further increased in Prdx6-siRNA group than in MCAO group. There was no significant statistical difference in the above indicators between Scramble and MCAO groups. ***Conclusion***: Prdx6 has the protective effect on cerebral I/R injury, which relates with antioxidant and antiapoptotic mechanisms.

【Key words】Prdx6-siRNA; cerebral ischemia/reperfusion; oxidative stress; antiapoptotic

作者介绍：姜蓓蓓，Email：984696669@qq.com，研究方向：脑血管疾病。
通信作者：王顺和，Email：410469883@qq.com。
基金项目：国家自然科学基金面上资助项目(编号：81271460)；国家自然科学基金青年资助项目(编号：81301125)。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1010.036.html (2016-05-13)

脑缺血再灌注损伤是在缺血基础上再灌注进一步导致的，以不同程度的细胞凋亡、坏死为主[1]，但其发生机制仍未完全阐明。半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶（Caspase）依赖途径和非 Caspase 依赖途径是脑缺血后神经元凋亡的主要过程，Caspase3 在各种程序启动的凋亡中起最后枢纽作用[2]。

Peroxiredoxin 6（Prdx6）是抗氧化蛋白超家族中唯一以谷胱甘肽和抗坏血酸作为电子供体的，并具有非硒依赖性谷胱甘肽过氧化物酶（non-Se glutathione peroxidase，NSGPx）和非钙离子依赖性 PLA2活性（calcium-independent phospholipidase A2，iPLA2）的双重功能。研究已表明 Prdx6 在阿尔兹海默病[3]和帕金森[4]疾病中具有强大的抗氧化应激作用，在急性运动轴索型神经病患者的脊髓运动神经元中表达下降[5]。但 Prdx6 在脑缺血再灌注损伤中的相关研究极少见报道。以往对 Prdx6 作用机制的研究涉及的大多是其过氧化物酶活性，但随着本实验对 Prdx6 在脑缺血再灌注损伤中作用及其机制的深入研究，发现其发挥保护作用的机制不仅仅与其抗氧化相关，还涉及到其抗凋亡作用。

本实验通过体内实验研究 Prdx6 在脑缺血再灌注损伤中的作用，以探讨 Prdx6 在该损伤中起作用的相关机制，为进一步治疗缺血性脑损伤等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

Prdx6-siRNA 及其乱序片段均购自上海吉玛公司，溶于 DEPC 水制成约 2μg/μl 的终浓度备用。兔抗鼠 Prdx6 单克隆抗体、兔抗鼠 Caspase3 多克隆抗体、β-actin 抗体和二抗山羊抗兔 IgG 分别购自 Abcam、中杉金桥、碧云天和北京博奥森公司，PVDF 膜、化学发光液 ECL 购自 Millpore 公司。RIPA 裂解液（强）、1%PMSF 和 1%磷酸酶抑制剂混合物Ⅱ型均购自碧云天，TUNLE 试剂盒（In situ Cell Death Detection Kit，POD）购自德国 Roche 公司，超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）和丙二醛（malondialdehyde，MDA）活性试剂盒均购自南京建成，其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物及分组

成年健康雄性 SPF 级 Sprague-Dawley 大鼠 64 只（由重庆医科大学实验动物中心提供），体质量 270~320 g，随机分为假手术组（Sham 组）、脑缺血再灌注模型组（MCAO 组）、乱序 Prdx6-siRNA+MCAO 组（Scramble 组）和 Prdx6-siRNA+MCAO 组（Prdx6 -siRNA 组），每组各 16 只。

1.3 大鼠侧脑室注射给药及中脑动脉栓塞（MCAO）模型的建立

Prdx6-siRNA 片段碱基序列 sense（5'-3'）：CUUCCACGAUUUCCUAGGATT；antisense（5'-3'）：UCCUAGGAAAUCGUGGAAGTT，取 8 μl 进行侧脑室注射给药：大鼠腹腔麻醉后用立体定位仪固定，以其前囟门为基准，向后 1 mm、左 2 mm，定位为侧脑室，最后向下进针 3.5 mm，缓慢注射后再留针约 5 min 使其充分吸收。假手术组和 MCAO 组均只定位及颅骨钻孔，不注射；Scramble 组同前方法注射 8 μl 乱序 Prdx6-siRNA。24 h 后将各大鼠麻醉后按文献方法[6-7]进行 MCAO 造模。Sham 组仅做手术切口并不插入线栓。

1.4 神经功能评分

各组大鼠术毕清醒后即按 Zea-longa 评分法[7]进行神经功能评分，0 分：无神经损伤症状；1 分：提尾时右前肢内收，不能完全伸展；2 分：自发行走时向对侧转圈；3 分：行走时向右侧倾倒；4 分：不能自发行走，无意识。

1.5 脑含水量及 TTC 测定

脑缺血再灌注 24 h，各组取 3 只大鼠处死后断头取脑，去掉嗅球、小脑和低位脑干，均匀分离左右大脑半球。滤纸吸干精确称重标记后 80 ℃烘干至重量恒定（即干质量）。脑组织含水量=（湿质量-干质量）/湿质量 × 100%；各组另取3 只大鼠同前方法取脑后制成 2 mm 厚的冠状脑片，并迅速放入 2% TTC 溶液（PBS 配制）避光染色约 30 min，再 4%多聚甲醛固定，此时梗死区呈白色，正常组织呈玫红色。拍照后用 Image-Pro Plus 软件计算脑梗死率：脑梗死率（%）=梗死区体积/全脑总体积 × 100%。

1.6 蛋白质提取及 Western blot

脑缺血再灌注 24 h[8]，各组取 6 只大鼠麻醉后经心尖处插管，用生理盐水进行心脑灌注。随即分出左侧大脑皮质，每 100 g 组织加 1 ml RIPA 裂解液（强，含 1% PMSF 和 1%磷酸酶抑制剂混合物Ⅱ型）置冰上充分匀浆。4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min 后，取上清再次同条件离心 5 min，储存于-80 ℃备用。用 BCA 法测蛋白浓度后将蛋白变性，用 10% SDS-聚丙烯酰氨凝胶分离后电泳转到 PVDF 膜（0.4 μm），再用 5%脱脂牛奶封闭，Prdx6 抗体（1:1 000）、Caspase3 抗体（1:100）和 β-actin 抗体（1:1 000）4 ℃孵育过夜，二抗（1:3 000）孵 1.5 h 后，化学发光液 ECL 曝光显影，ImageJ 软件进行灰度分析。

1.7 石蜡切片的制备

脑缺血再灌注后 24 h，各组取 4 只大鼠进行心脑灌注后，快速取脑并置于 10%甲醛中固定。脑组织做冠状切块，常规脱水后石蜡包埋。切片厚度 20 μm，捞片、贴片，60 ℃温箱内过夜烤干备用。

1.8 HE 染色及亚甲基蓝化学染色

每组取 6 张石蜡切片 60 ℃烘 40 min 后，经过二甲苯和梯度酒精常规脱蜡，用蒸馏水浸泡 5 min。每组取 3 张进行 HE 染色：①苏木精染 10 min 后，自来水洗 3 min；②1%盐酸

表 1 Prdx6 对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能评分、脑含水量及梗死体积的影响（$\bar{x}\pm s$）

Tab.1 Effect of Prdx6 on behavior scores,cerebral water content and infarction volume of cerebral I/R injury in rats（$\bar{x}\pm s$）

组别	行为学评分（n=16）	同侧脑含水量（百分比，n=3）	对侧脑含水量（百分比，n=3）	脑梗死体积（百分比，n=3）
Sham组	0.000 0±0.000 0	0.746 8±0.006 7[a]	0.746 3±0.010 8	0.000 0±0.000 0
MCAO组	2.312 5±0.602 1	0.783 9±0.008 1[d]	0.764 1±0.015 5	0.279 6±0.004 9
Scramble组	2.312 5±0.704 2	0.774 0±0.011 2[c]	0.766 6±0.008 6	0.276 9±0.008 8
Prdx6-siRNA组	3.937 5±0.928 7[b]	0.861 5±0.012 5[be]	0.764 5±0.007 5	0.335 4±0.006 1[b]
F 值	97.567	74.027	2.208	1 979.754
P 值	0.000	0.000	0.165	0.000

注：a，P<0.01；b：P=0.000 vs. MCAO 组；c：P<0.05；d：P<0.01；e：P=0.000 vs. Sham 组

酒精分化 10 s 后迅速用自来水冲洗 3 min；③饱和碳酸锂溶液反蓝 3 min，自来水清洗 3 min；④伊红染 10 s 后快速梯度酒精脱水。每组余下 3 张用亚甲蓝染色：⑤10%亚甲蓝溶液染 20 min 后，蒸馏水洗 3 min；⑥95%乙醇分色片刻后，梯度酒精脱水各 1 min。最后，各染色均用二甲苯透明和中性树胶封片，置于光镜下观察脑缺血区并拍片，计算其阳性细胞率。

1.9 细胞凋亡率的测定及细胞计数

每组取 5 张石蜡切片按 TUNLE 试剂盒说明书操作后，高倍光镜下观察脑缺血区具有完整细胞膜且胞核清晰呈棕色者即为凋亡细胞。计数并取平均值计算：细胞凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数×100%。

1.10 测定 SOD 和 MDA 活性

于-80 ℃取出已提取的脑皮质蛋白，按质量体积比 1:9 加入预冷的生理盐水匀浆充分，低温下 2 000 r/min 离心 15 min 后取上清液，按试剂盒说明书操作并计算。

1.11 统计学处理

采用 SPSS 18.0(Chicoga,IL,USA)软件统计数据，实验结果以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间差异比较采用单因素方差分析，多组间两两比较采用 LSD-t 检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 一般情况和神经功能评分

实验中各组 SD 大鼠死亡率无明显差异。除 Sham 组外各组均出现明显的神经功能损伤，表现为行走时右侧肢体偏瘫，向右侧旋转打圈或倾倒，提空悬尾时，右前肢屈曲、内收、紧贴胸壁，对侧反应降低，同侧无反应。行为学评分显示与 MCAO 组相比，Scramble 组无统计学差异，而 Prdx6-siRNA组评分明显加重（P=0.000，表 1），存在统计学差异。

2.2 脑含水量和脑梗死范围的变化

与 MCAO 组相比，Scramble 组各指标均无明显差异，Prdx6-siRNA 组的缺血侧脑含水量显著加重（P=0.000，表 1）和脑梗死范围增大（P=0.000，表 1 和图 1），而对侧脑含水量无统计学差异。

A. Sham 组 B. MCAO 组 C. Scramble 组 D. Prdx6-siRNA 组

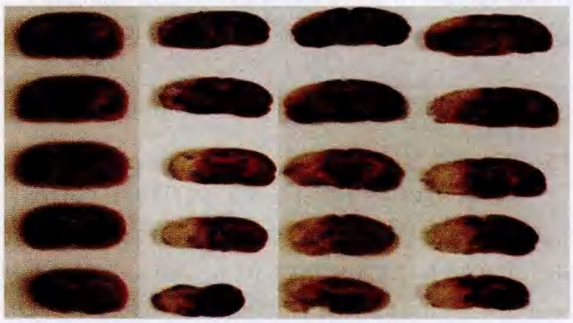


图 1 Prdx6 对脑缺血再灌注损伤中梗死体积的影响

Fig.1 Effect of Prdx6 on infarction volume of cerebral I/R injury in rats

2.3 SOD 的活性和 MDA 含量的变化

如表 2 所示，与 Sham 组比，MCAO 组 SOD 活性明显降低（P=0.000）而 MDA 含量明显增加（P=0.000）。Scramble 组和 MCAO 组之间无统计学差异。与 MCAO 组比，Prdx6-siRNA组的 SOD 活性明显降低（P=0.000）而 MDA 含量明显增加（P=0.000）。

表 2 Prdx6 对于各组 SOD 活性和 MDA 含量的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.2 Effect of Prdx6 on SOD activity and MDA content in cerebral I/R injury rats（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	SOD（U/mg protein）	MDA（nmol/mg protein）
Sham 组	165.015 0±6.163 0[a]	244.783 1±22.323 3[a]
MCAO 组	134.284 7±6.251 4[c]	413.895 6±29.353 3[c]
Scramble 组	135.950 6±7.065 5[b]	431.164 5±34.655 2[c]
Prdx6-siRNA 组	104.172 8±5.346 9[ac]	652.181 9±35.570 1[ac]
F 值	47.632	87.617
P 值	0.000	0.000

注：a，P=0.000 vs. MCAO 组；b：P<0.01；c：P=0.000 vs. Sham 组

2.4 组织学检测结果

HE和亚甲蓝染色后，Sham 组未见明显病理改变（表 3和图 2A、E）而其余 3 组均可见大脑皮质缺血区组织细胞水肿，大量神经元细胞核固缩呈凋亡前或凋亡改变，少量残存的细

胞膜不完整，完整无损伤的神经元数量明显减少（表 3 和图 2B、C、F、G、I、J），而 MCAO 组与 Scramble 组之间无明显统计学差异。与 MCAO 组相比，Prdx6-siRNA 组脑皮质缺血区域神经元结构明显破裂，细胞坏死增多，完整神经元较MCAO组明显减少（P=0.000，表 3 和图 2D、H、I、J）。

表 3 各组 HE 染色和亚甲蓝染色结果（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3 Results of HE staining and methylene blue staining in each group（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组 别	HE染色阳性细胞率	亚甲蓝染色阳性细胞率
Sham组	0.900 8 ± 0.023 6[a]	0.867 6 ± 0.016 1[a]
MCAO组	0.445 0 ± 0.026 2[b]	0.559 6 ± 0.030 4[b]
Scramble组	0.387 6 ± 0.067 3[b]	0.495 0 ± 0.034 4[b]
Prdx6-siRNA组	0.255 3 ± 0.018 8[ab]	0.262 4 ± 0.028 6[ab]
F 值	154.180	234.432
P 值	0.000	0.000

注：a，P=0.000 vs. MCAO 组；b：P=0.000 vs. Sham 组

2.5 TUNLE 染色

各组 TUNLE 差异有统计学意义（F=132.101，P=0.000）。Sham 组未见明显凋亡细胞，非凋亡细胞的核呈蓝色；与 Sham组(9.793 6 ± 2.338 3)比，MCAO 组(2.483 1 ± 6 2.250 4)和 Scramble组(22.816 0 ± 4.342 7)细胞凋亡率明显增加（P=0.000，图 3B、C），缺血区可见凋亡细胞核明显固缩，颗粒深染为棕褐色或棕黄色、细胞质成棕黄色，而后两组比无统计学差异；与 MCAO 组比，Prdx6-siRNA 组(45.959 0 ± 2.388 8)细胞凋亡率明显增加（P=0.000，图 3D），细胞质和细胞核染色变深。

2.6 脑缺血再灌注后 Prdx6 及 Caspase3 蛋白的表达

脑缺血再灌注后 24 h，Prdx6 及 Caspase3 蛋白含量变化为：除 Sham 组外，余 3 组均明显增高；与 MCAO 组相比，Prdx6-siRNA 组 Prdx6 明显降低（P=0.000，表 4 和图 4）而 Caspase3 显著增加（P<0.01，表 4 和图 4）；MCAO 组和 Scramble 组之间差异无统计意义。

表 4 各组 Prdx6 和 Caspase3 的表达情况（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.4 Expression of Prdx6 and Caspase3 in each group（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组 别	Prdx6	Caspase3
Sham组	0.068 6 ± 0.005 2[b]	0.317 2 ± 0.060 2[b]
MCAO组	0.270 8 ± 0.006 6[c]	0.598 2 ± 0.046 1[c]
Scramble组	0.271 8 ± 0.009 7[c]	0.595 2 ± 0.031 4[c]
Prdx6-siRNA组	0.156 3 ± 0.023 9[bc]	0.812 2 ± 0.067 1[abc]
F 值	158.783	43.939
P 值	0.000	0.000

注：a，P<0.01；b：P=0.000 vs. MCAO 组；c：P=0.000 vs. Sham组

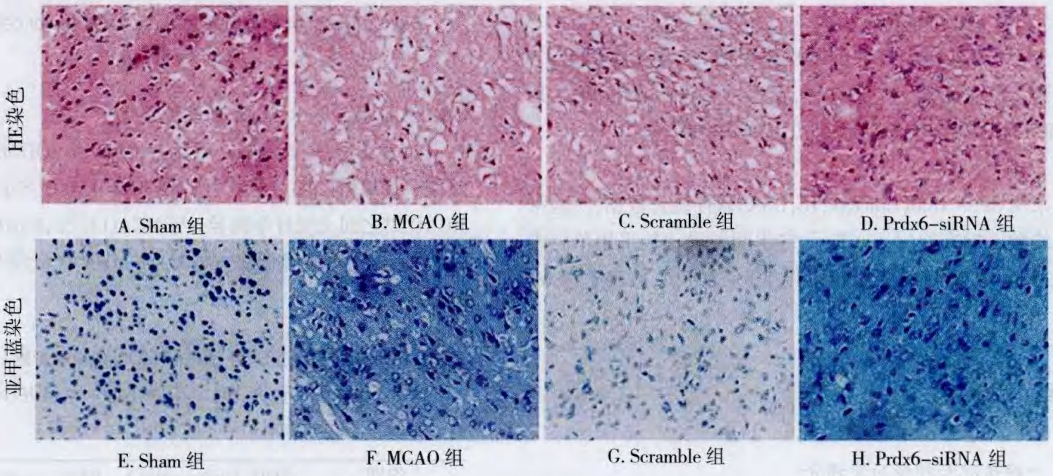


图 2 各组 HE 染色(上图)和亚甲蓝染色(下图)结果(n=3，400×)

Fig.2 Result of HE staining (above) and methylene blue staining (below) in each group(n=3，400×)

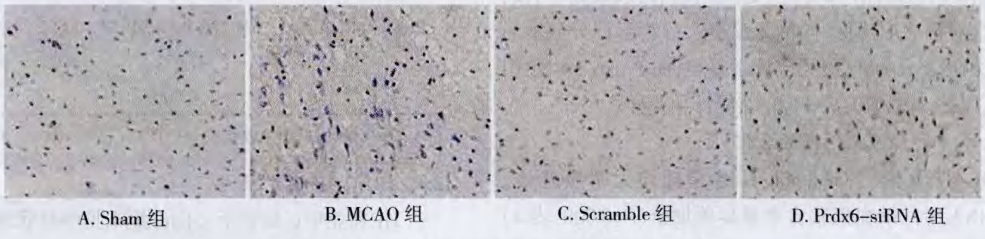


图 3 各组 TUNLE 染色结果（n=5，400×）

Fig.3 Detection of TUNLE staining in each group（n=5，400×）

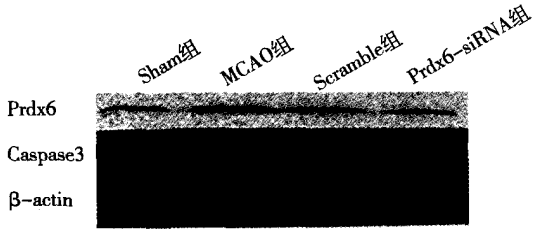


图 4 各组 Prdx6 和 Caspase3 的表达情况

Fig.4 Expression of Prdx6 and Caspase3 in each group

3 讨 论

本实验选用常用的 MCAO 模型[6-7]构建脑缺血再灌注后，除了神经功能学评分、脑含水量和脑梗死体积测定外，还采用了 HE 和亚甲蓝染色对模型进行评价；辅以 SOD 和 MDA 检测相关抗氧化性，TUNLE 染色及 Caspase3 蛋白表达共同检测细胞凋亡情况。此外，经预实验结果及相关文献[8]显示脑缺血再灌注损伤后 24 h 时 Prdx6 蛋白表达最高，因此实验中采用了脑缺血 1 h 再灌注 24 h 的时间点来研究 Prdx6 蛋白的表达及其相关机制。

脑缺血再灌注加重了脑组织的结构损伤和功能障碍，产生的自由基可损害神经元，发生过氧化反应，导致其死亡或凋亡[9]。有研究表明减少细胞凋亡对脑缺血再灌注损伤有保护作用[10]。通过本实验结果亦显示：大鼠脑缺血再灌注 24 h 时，TUNLE 染色显示脑缺血区出现大量细胞凋亡且 Caspase3 蛋白表达增高；SOD 活性降低，MDA 含量增高，而 SOD 能清除机体内自由基，体内 MDA 含量不但直接反映脂质过氧化反应的水平和程度，而且间接反映机体清除自由基的能力。可见，细胞凋亡和氧化应激都是参与脑缺血再灌注损伤的重要机制。

Prdx6 广泛分布于几乎所有器官中，肺中表达最高，其次即为脑和肝等[11]。Prdx6 具有单个保守的半胱氨酸残基，可以 GSH 作为给电子体催化过氧化物还原，维持机体平衡，减少细胞凋亡。大量研究表明 Prdx6 具有抗氧化和抗凋亡作用：在肺上皮细胞中，Prdx6 过表达可抗氧化损伤和抑制细胞凋亡[12]，低表达可增加细胞对氧化剂敏感性并出现凋亡皱缩[13]，小干涉 RNA 抑制其活性时可诱导细胞凋亡[13]；与野生型鼠比，Prdx6 基因敲除鼠更易发生心脏缺血再灌注损伤[14]；Prdx6 能保护糖尿病鼠视网膜神经细胞免受活性氧诱导的细胞凋亡[15]。本实验中通过Prdx6-siRNA 组与 MCAO 组相比可知，Prdx6 对脑缺血再灌注损伤具有明显保护作用，该作用也与其能增强抗氧化活性和减轻细胞凋亡的相关表达有关。

血管缺血再灌注损伤时活性氧过度产生，超过了机体抗氧化防御系统的清除能力，导致细胞衰老和凋亡[16]。肝脏缺血再灌注损伤中，溶酶体 Prdx6 转运到线粒体中表达可减轻线粒体的功能障碍[17]。线粒体在细胞凋亡过程中起中心作用，可持续产生过氧化物阴离子，后者被 SOD 分解为 H_2O_2。而 H_2O_2 可使脂质过氧化[18]，还可使凋亡信号调控激酶 1 磷酸化活性增高，而与该酶相关的通路在氧化应激导致的细胞凋亡中起着关键作用[19]。Prdx6 具有 NSGPx，氧化应激时还原状态 Prdx6 的半胱氨酸残基将可逆的氧化为次磺酸形式，从而清除 H_2O_2；Prdx6-iPLA2 活性可以还原磷脂氢过氧化物，降解脂质氢过氧化物[20]，二者共同调节磷脂循环并抵抗自由基所致的细胞凋亡[21]。本实验结果显示 Prdx6 可显著增加脑缺血再灌注损伤中的抗氧化活性并减少细胞凋亡损伤，因此，Prdx6 在脑缺血再灌注损伤中很可能涉及到的抗细胞凋亡机制有：①抑制线粒体途径：线粒体激活后可释放细胞色素 c，引发 Caspase 依赖性或非 Caspase 依赖性凋亡；②抑制氧化应激引起的细胞凋亡途径：活性氧可导致细胞膜的膜脂质过氧化损伤，同时引起线粒体膜电位变化，从而在凋亡中起重要作用[17]，且其为主要途径。这些途径通过激活下游信号转导通路的 Caspase3，启动细胞凋亡[22]。Caspase3 又称死亡蛋白酶，是介导多种凋亡途径的共同下游效应部分即细胞凋亡的必经之路，其活化是凋亡进入不可逆阶段的标志[23]。而 Prdx6 也很可能是通过在线粒体中表达以减轻其功能障碍，同时清除 H_2O_2，降解脂质过氧化物来发挥在脑缺血再灌注损伤中的保护作用的。

本实验结果表明，脑缺血再灌注损伤中干扰 Prdx6 后，各染色显示缺血区神经元损伤和细胞凋亡进一步加重，Caspase3 的蛋白表达增加；同时，SOD 活性进一步降低和 MDA 含量进一步增加。实验证实了 Prdx6 能够明显减轻脑缺血再灌注损伤；Prdx6 能够增强清除自由基、降低脂质过氧化物的能力，抑制细胞凋亡，即其抗凋亡作用主要是通过其抑制其氧化作用引起的细胞凋亡途径来完的，即具有抗氧

化和抗凋亡的保护作用。但今后实验还需更深入地研究 Prdx6 在脑缺血再灌注损伤中抗氧化与抗凋亡作用的相关信号通路。

参 考 文 献

[1] 张业贵，赵 健，丁艳霞，等. 丹参与电针对脑缺血再灌注损伤大鼠 GFAP 和 iNOS 表达的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学，2014，19(2)：127-132.

[2] Ginet V，Puyal J，Clarke PG，et al. Enhancement of autophagic flux after neonatal Cerebral hypoxia-ischemia and its region-specific relationship to apoptotic mechanisms[J]. Am J Pathol，2009，175(5)：1962-1974.

[3] Power JH，Asad S，Chataway TK，et al. Peroxiredoxin6 in human brain：molecular forms，cellular distribution and association with Alzheimer's disease pathology[J]. Acta Neuropathol，2008，115(6)：611-622.

[4] 张成林，李建远. 抗氧化蛋白 Peroxiredoxin 6 研究进展[J]. 医学研究杂志，2010，39(6)：121-123.

[5] 杨国锋，纪建国，魏晓珊，等. 急性运动轴索型神经病患者血清对培养脊髓运动神经元的影响-比较蛋白质组研究[J]. 中风与神经疾病杂志.2010，10(27)：871-874.

[6] Zhang YQ，Li H，Huang M，et al. Neuroprotective effects of Gualou Guizhi Decoction in vivo and in vitro[J]. J Ethnopharmacol，2014，158(Pt A)：76-84.

[7] Longa EZ，Weinstein PR，Carlson S，et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke，1989，20(1)：84-91.

[8] 高 杨，孙思斯，刘翌宇，等. 电针预处理通过上调 Peroxiredoxin6 减轻大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. 中华神经解剖学杂志，2014，30(5)：507-513.

[9] 赵安东，李玉亮，辛益妹，等. 银杏叶提取物对大鼠脑缺血再灌注氧化损伤的保护作用[J]. 空军医学杂志，2013，29(2)：93-95.

[10] Burguillos MA，Dejerborg T，Kavanagh E，et al. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity[J]. Nature，2011，472(7343)：319-324.

[11] Yamada Y，Limmon GV，Zheng D，et al. Major shifts in the spatio-temporal distribution of lung antioxidant enzymes during influenza pneumonia[J]. PLoS One，2012，7(2)：e31494.

[12] Manevich Y，Sweitzer T，Pak JH，et al. 1-Cys peroxiredoxin overexpression protects cells against phospholipid peroxiredoxin-mediated membrane damage[J]. Proc Natl Acad Sci USA.2002，99(18)：11599-11604.

[13] Pak JH，Manevich Y，Kim HS，et al. An antisense oligonucleotide to 1-Cys peroxiredoxin causes lipid peroxidation and apoptosis in lung epithelial cells[J]. J Biol Chem，2002，277(51)：49927-49934.

[14] Nagy N，Malik G，Fisher A B，et al. Targeted disruption of peroxiredoxin6 gene renders the heart vulnerable to ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol Heart Cire Physiol，2006，291(6)：H2636-H2640

[15] 戚 卉，吴雅臻. Peroxiredoxin6 在氧化损伤人视网膜色素上皮细胞中的表达[J]. 眼科新进展，2008，28(8)：578-581.

[16] Liu X，Kim CN，Yang J，et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts：requirement for dATP and cytochrome C[J]. Cell，1996，86(1)：147-157.

[17] Eismann T，Huber N，Shin T，et al. Peroxiredoxin-6 protects against mitochondrial dysfunction and liver injury during ischemia-reperfusion in mice[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol，2009，296(2)：G266-274.

[18] 程丽霞，隋国良，董砚虎. 糖尿病视网膜病变的研究进展[J]. 国外医学内分泌分册，1999，19(2)：73-75.

[19] Endtmann C，Ebrahimian T，Czech T，et al. Angiotensin Ⅱ impairs endothelial progenitor cell number and function in vitro and in vivo：implications for vascular regeneration[J]. Hypertension，2011，58(3)：394-403.

[20] Kasapoglu M，Ozben T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stressmarkers in aging[J]. Exp Gerontol，2001，36(2)：209-220.

[21] Rhee SG，Chae HZ，Kim K. Peroxiredoxins：a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling[J]. Free Radic Biol Med，2005，38(12)：1543-1552.

[22] Yuki H，Kondo T，Zhao QL，et al. A free radical initiator，2，2'-azobis(2-aminopropane) Dihydrochloride enhances hyperthermia-induced apoptosis in human uterine cervical cancer cell lines[J]. Free Radic Res，2003，37(6)：631-643.

[23] Zhang X，Ha T，Lu C，et al. Poly(I：C)therapy decreases cerebral ischemia/reperfusion injury via TLR3-mediated prevention of Fas/FADD interaction[J]. J Cell Mol Med，2015，19(3)：555-565.

（责任编辑：张辉洁）