

DJ-1 通过 Nrf2 信号通路减轻大鼠脑缺血-再灌注引起的氧化应激损伤

李莉¹, 彭莉², 朱进², 巫静娴², 赵涌²

重庆医科大学¹病理学教研室,²神经科学研究中心//重庆医科大学神经科学重点实验室, 重庆 400016

摘要:目的 探讨DJ-1(Park7)在脑缺血再灌注损伤中的抗氧化作用及相关机制。方法 构建SD大鼠脑缺血再灌注损伤模型,将SD大鼠随机分为假手术组、MCAO组、Scramble组和DJ-1 siRNA组、NC组和Overexpression组。通过DJ-1 siRNA干扰片段干扰DJ-1的表达,以及DJ-1过表达腺相关病毒载体过表达DJ-1的表达。通过测定MCAO/R后各组神经功能学评分和脑含水量,同时应用HE和Nissl染色法评估脑组织的形态学变化和皮层梗死区神经元的损伤情况,评价DJ-1对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用。用超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)分析脑组织氧化应激状态。免疫印迹法检测脑组织中DJ-1、Nrf2、HO-1以及NQO1的表达水平,以及免疫荧光染色法观察Nrf2的表达及核转位情况,探讨DJ-1减轻大鼠脑缺血再灌注氧化应激损伤的可能机制。结果 与MCAO组相比,DJ-1 siRNA组的神经功能学评分($P<0.001$)、脑含水量($P<0.001$)均明显增加;HE和Nissl染色显示脑缺血区神经元损伤进一步加重;SOD含量进一步降低,MDA含量进一步增加($P<0.001$);干扰DJ-1后,其蛋白水平明显降低($P=0.003$),同时Nrf2及其下游的HO-1和NQO1也明显降低($P<0.001$)。而过表达DJ-1以后,其DJ-1($P=0.006$)、Nrf2($P=0.006$)及其下游的HO-1($P=0.004$)和NQO1明显增加($P=0.014$)。结论 DJ-1作为体内重要的神经保护因子,可以减少大鼠脑缺血再灌注氧化应激损伤,并可能是通过激活Nrf2信号通路来实现的。

关键词: DJ-1; Nrf2信号通路; 脑缺血-再灌注; 氧化应激

DJ-1 alleviates oxidative stress injury by activating the Nrf2 pathway in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury

LI Li¹, PENG Li², ZHU Jin², WU Jingxian², ZHAO Yong²

¹Department of Pathology, ²Institute of Neuroscience//Key Laboratory of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To investigate the antioxidant effect of DJ-1 (Park7) in rats with cerebral ischemia/reperfusion (IR) injury and its potential mechanism. **Methods** A total of 108 SD rats were randomly divided into sham-operated group, middle cerebral artery occlusion (MCAO) group, Scramble group, DJ-1 siRNA group, negative control (NC) group and DJ-1 overexpression group. Except for those in the sham group, all the rats were subjected to MCAO to establish models of cerebral IR injury. In DJ-1 siRNA and DJ-1 overexpression group, a DJ-1 siRNA and an adeno-associated virus vector carrying DJ-1 gene was injected into the lateral ventricle of the rats, respectively. In each group, neurological scores and brain water content were determined after the operation, and pathological changes of the brain tissue and neuronal injury in the cortical infarction area were assessed using HE and Nissl staining. Oxidative stress in the brain tissues was analyzed by detecting superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA). The expression levels of DJ-1, Nrf2, Ho-1 and NQO1 in the brain tissue were detected with Western blotting, and the expression and nucleation of Nrf2 was determined by immunofluorescence staining. **Results** Compared with those in MCAO group, the neurological scores ($P<0.001$) and brain water content ($P<0.001$) were significantly increased in DJ-1 siRNA group. Intracerebral injection of DJ-1 siRNA following MCAO obviously aggravated neuron injury in cerebral ischemia region, further reduced SOD activity and increased MDA content ($P<0.001$), and significantly lowered the expression levels of Nrf2 and its downstream proteins HO-1 and NQO1 ($P<0.001$). Intracerebral injection of the adenoviral vector for DJ-1 ($P=0.003$) overexpression significantly upregulated the levels of Nrf2 ($P=0.006$) and its downstream proteins HO-1 ($P=0.004$) and NQO1 ($P=0.014$). **Conclusion** As an important neuroprotective factor, DJ-1 alleviates oxidative stress induced by cerebral IR injury in rats by activating the Nrf2 pathway.

Keywords: DJ-1; Nrf2 pathway; cerebral ischemia-reperfusion; oxidative stress

脑缺血再灌注损伤的发生发展是一个复杂的病理生理过程,其中,氧化应激反应与脑缺血再灌注损伤继发性神经细胞死亡密切相关^[1-2]。机体内源性抗氧化系统的激活对脑缺血再灌注损伤后神经细胞的存活有至

关重要的作用^[3-4]。DJ-1(又称PARK7,或者park7),是通过进化选择的多功能蛋白之一,在抗氧化应激、抗凋亡以及信号转导、基因转录、分子伴侣等多方面发挥重要的作用,具高度保守性,在原核细胞和真核细胞中均有表达。DJ-1蛋白以同源二聚体的形式存在,单体呈螺旋片层螺旋的三明治结构,属于Thij/PfpI家族^[5-6]。近年来,人们发现DJ-1依靠其良好的抗氧化作用在保护神经细胞方面发挥重要功能^[7-8]。DJ-1与帕金森疾病的发病机制密切相关,DJ-1在帕金森疾病中能够保护神经

收稿日期:2020-10-21

基金项目:国家自然科学基金(81271460)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81271460).

作者简介:李莉,主治医师,E-mail: 443157498@qq.com

通信作者:赵涌,教授,博士生导师,E-mail: zhaoyong668@cqmu.edu.cn

元免受氧化应激损伤^[9-10]。最近, DJ-1 在缺血性脑卒中的保护作用受到了广泛的研究, 但具体的机制仍不清楚。转录因子 NF-E2 相关因子 2 (Nrf2) 是转录因子家族成员之一, 它通过与抗氧化反应元件 (ARE) 结合作为机体抗氧化防御系统的主调节器^[11-13]。

我们之前的研究也已经证实, Nrf2/ARE 作为体内重要的抗氧化信号通路, 上调 Nrf2 可以一定程度保护缺血后神经损伤。DJ-1 作为抗氧化蛋白, 在 Nrf2 活性调控中发挥重要作用^[14-15]。然而, DJ-1 是通过上调 Nrf2 发挥抗氧化保护作用还是通过调节 Nrf2 的亚细胞定位, 促进 Nrf2 核转移, 激活其抗氧化功能, 目前尚未有研究报道。本研究旨在探讨 DJ-1 在脑缺血再灌注氧化应激损伤中的作用及其相关调控机制, 为进一步防治脑缺血再灌注氧化应激损伤提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂

DJ-1 干扰片段及其乱序片段均合成于上海吉玛公司。兔抗 DJ-1 单克隆抗体 (1:2000, Abcam)、兔抗 Nrf2 多克隆抗体 (1:200, Santa Cruz)、兔抗 Nrf2 单克隆抗体 (1:50, Abcam)、兔抗 HO-1 单克隆抗体 (1:500, Cell Signaling Technology)、兔抗 NQO1 单克隆抗体 (1:500, Abcam)、 β -actin 抗体 (Proteintech)、二抗山羊抗兔 IgG 和二抗山羊抗鼠 IgG (碧云天)。PVDF 膜和化学发光液 ECL (Millipore)、RIPA 裂解液 (强) 和 1% PMSF (碧云天)、SOD 和 MD 检测试剂盒 (南京建成)。

1.2 实验动物及分组

成年雄性 SPF 级 Sprague-Dawley 大鼠 108 只, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 体质量 250~280 g。将所有大鼠随机分为假手术组 (Sham 组, 18 只)、脑缺血再灌注模型组 (MCAO 组, 30 只)、乱序 siRNA+MCAO 组 (Scramble 组, 18 只)、DJ-1 siRNA+MCAO 组 (DJ-1 siRNA 组, 18 只)、对照 AAV+MCAO 组 (NC 组, 12 只)、DJ-1 AAV+MCAO 组 (Overexpression 组, 12 只)。其中 Sham 组仅做手术切口, 不插入线栓; MCAO 组进行手术造模; Scramble 组和 DJ-1 siRNA 组分别侧脑室注射 10 μ L 的乱序 siRNA 和 DJ-1 siRNA 再手术建模; NC 组和 Overexpression 组分别侧脑室注射 2 μ L 的对照 AAV 和 DJ-1 AAV 再手术建模。

所有实验均重庆医科大学医学研究动物伦理委员会授权, 并按照《实验动物的护理和使用指南》进行操作。所选择的动物品种、等级、数量、规格合适。实验中善待动物, 给予麻醉和镇痛处理, 实验后给予安乐死, 死后动物无害化处理, 没有对环境带来危害, 实验符合动物实验研究伦理标准。

1.3 中脑动脉栓塞 (MCAO) 模型的建立

将 SD 大鼠麻醉后按既往文献报道^[9]的方法进行中

脑动脉栓塞 (MCAO) 模型构建。用 3.5% 水合氯醛腹腔注射麻醉 (350 mg/kg) 大鼠。将大鼠仰卧位固定, 消毒, 颈部正中切口, 按照解剖结构依次分离出颈总动脉 (CCA)、颈内动脉 (ICA) 及颈外动脉 (ECA)。结扎颈总动脉近心端和颈外动脉, 动脉夹暂时夹闭颈内动脉。在颈内动脉远心端剪一小口, 插入尼龙线栓, 当线栓越过颈总动脉分叉处, 继续进线约 18~20 mm, 可明显感到阻力时, 说明线栓已经到位。1 h 后, 缓慢拔出线栓, 恢复血流灌注。Sham 组仅做手术切口并不插入线栓。

1.4 大鼠侧脑室注射干扰片段

MCAO 模型前 24 进行左侧侧脑室注射 siRNA 片段, 其干扰 DJ-1 的 siRNA 片段碱基序列 sense: 5-CCCAUUGGCUAAGGACAAATT-3; antisense: 5-UUUGUCCUAGCCAAUGGGTT-3, 乱序的 siRNA 片段碱基序列: sense: 5-UUCUCCGAACGUGUCACGUT-3; antisense: 5-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3, 大鼠腹腔麻醉后用脑立体定位仪固定, 以其大脑前沟缝为基准, 向后 1 mm、向左 2 mm 定位左侧侧脑室。钻孔, 微量针吸取 10 μ L 片段, 进针, 进针深度为 3.5 mm, 缓慢注射后再留针 10 min。Sham 组和 MCAO 组均只定位及颅骨钻孔, 不注射片段。

1.5 大鼠左侧脑皮质注射 DJ-1 过表达腺相关病毒载体

MCAO 模型前 1 月进行左侧侧脑室注射 DJ-1 过表达的腺相关病毒 (AAV) 载体和不包含序列的腺相关病毒 (对照) 载体。CDS 序列 (NM001277249) 被用于在大鼠体内过表达 DJ-1 基因。大鼠腹腔麻醉后用脑立体定位仪固定, 以其大脑前沟缝为基准, 向前 1.0 mm、向左 2.0 mm 和向后 3.0 mm、向左 1.5 mm 两处定位左侧脑皮质。钻孔, 微量针吸取 2 μ L 腺相关病毒, 进针, 进针深度为 1.2 mm, 缓慢注射后再留针 10 min。

1.6 神经功能评分

再灌注 24 h 后, 参照 Longa^[9] 的 5 级 4 分为评分标准: 0 分: 无明显的神经功能缺损; 1 分: 大鼠不能完全伸右前肢; 2 分: 行走时向对侧打圈; 3 分: 行走时向对侧倾倒; 4 分: 不能自发行走, 意识丧失。

1.7 脑含水量测定

再灌注 24 h 后, 将大鼠处死后断头取脑, 去掉小脑和脑干, 分离出整个大脑, 称质量得湿重。120 $^{\circ}$ C 恒温干燥箱烘干至重量恒定, 称重得干重。脑含水量 = (湿重 - 干重) / 湿重 \times 100%。

1.8 石蜡切片制备

再灌注 24 h 后, 将大鼠麻醉后用 4% 多聚甲醛进行心脑灌注, 四肢和躯干僵直后, 快速断头取脑, 将大脑置于 4% 甲醛中固定。脑组织做冠状切块, 将带有脑皮质梗死区的脑块常规脱水后包埋。制作厚度为 5 μ m 的石蜡切片。

1.9 HE 染色和Nissl 染色

HE 染色:脱蜡,进入苏木精染室温下染色 10 min,自来水冲洗,盐酸酒精分化 10 s,饱和碳酸锂返蓝 3 min,反复洗涤。伊红复染,水洗,脱水,透明,封片。Nissl 染色:脱蜡,进入 10%亚甲蓝溶液室温下染色 20 min,蒸馏水洗涤,95%酒精分化,脱水,透明,封片。置于普通光学显微镜观察拍片,计数完整神经元数。

1.10 MDA 和 SOD 测定

再灌注 24 h 后,生理盐水灌注后断头取脑,分离出大脑皮质缺血区域,称重后放入玻璃匀浆器中,加入 9 倍量预冷的生理盐水,匀浆充分后 2000 r/min 低温离心 15 min,取上清液。按试剂盒说明书操作并计算。组织中的 MDA 含量计算公式:组织中的 MDA 含量(nmol/mg prot)=(测定管吸光度-测定空白管吸光度)/(标准管吸光度-标准测定管吸光度)×标准品浓度(10 nmol/mL)÷待测样本蛋白浓度(mg prot/mL)。组织匀浆中 SOD 活力计算公式:组织匀浆中 SOD 活力(U/mgprot)=(对照管吸光度-测定管吸光度)/对照管吸光度÷50%×反应液总体积/取样量(mL)÷组织蛋白含量(mg prot/mL)。

1.11 Western blot 检测

再灌注 24 h 后,快速断头取脑,提取组织总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。根据所测蛋白浓度计算上样量。配胶 SDS 凝胶、上样、电泳、切胶、转膜、封闭后,加入稀释好的目的蛋白一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜后,加入稀释好的目的蛋白的二抗,室温孵育 2 h, TBST 洗膜后, ECL 化学发光检测。运用 ImageJ 软件分析,目的蛋白的相对表达量 = 目的蛋白条带吸光度值/内参 β -actin 条带吸光度值。

1.12 免疫荧光染色

再灌注 24 h 后,快速断头取脑,将大脑脱水后制作成冰冻切片。将冰冻切片用预冷 4%多聚甲醛固定 20 min, PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。滴加封闭血清(5%

FBS+0.01% Triton X-100 溶于 PBS), 37 °C 孵育 60 min。封闭完成后,加入稀释好的 Nrf2(1:50, Abcam), 4 °C 湿盒过夜, PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。避光加入红色荧光二抗(1:200), 37 °C 孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。含 DAPI 的防荧光淬灭封片剂封片, 荧光显微镜下观察。

1.13 统计学分析

实验结果用均数±标准差表示,采用 Prism 软件进行统计学分析。组间比较用单因素方差分析,并结合 Tukey's 检验分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 干扰 DJ-1 加重脑缺血再灌注后神经功能缺损和脑水肿

大鼠脑 MCAO 模型后进行神经功能学评分。Sham 组无神经功能缺损,评分为 0 分。与 Sham 组相比, MCAO 组大鼠神经功能学评分增加 ($P < 0.001$), 干扰 DJ-1 后,大鼠神经功能学评分进一步增加 ($P < 0.001$)。同样,与 Sham 组相比, MCAO 组大鼠脑含水量增加 ($P < 0.001$), 与 MCAO 组相比, DJ-1 siRNA 组的脑含水量显著加重 ($P < 0.001$, 图 1)。

2.2 干扰 DJ-1 加重脑 I/R 后神经细胞损伤

HE 染色结果显示, Sham 组中大鼠脑组织结构完整,排列规则紧密。与 Sham 组比较, MCAO 组和 Scramble 组脑组织水肿疏松、细胞排列紊乱,神经元出现坏死、核固缩 ($P < 0.001$)。而 DJ-1 siRNA 组脑组织水肿更加严重,大量空泡形成,大多数细胞出现核碎裂、核固缩,核溶解,完整细胞数量明显减少 ($P < 0.001$)。Nissl 染色结果显示, sham 组神经细胞结构清晰,在胞质中尼氏小体均匀分布,呈蓝色颗粒状; MCAO 组和 Scramble 组脑组织水肿疏松,神经元胞浆浓缩,核固缩,尼氏体染色不清,完整神经元数量减少 ($P < 0.001$); 干扰

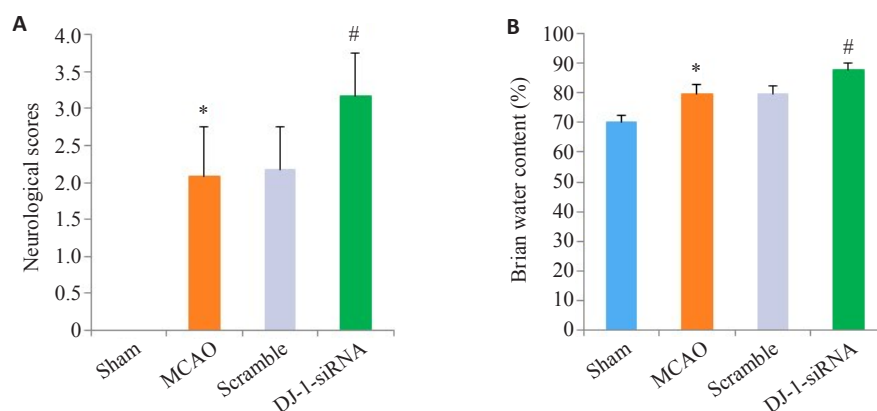


图1 干扰DJ-1基因对神经功能缺损和脑水肿的影响

Fig.1 Effect of DJ-1 interference on neurological deficit scores and brain water content ($n=6$).

A: Neurological deficit scores. B: Brain water content. * $P < 0.05$ vs Sham group; # $P < 0.05$ vs MCAO group.

DJ-1后,脑组织结构更加疏松,神经元萎缩,核固缩、碎裂,完整神经元数量极少,尼氏体也几乎消失殆尽($P<0.001$)。

2.3 干扰DJ-1加重脑I/R后脑组织氧化应激水平

MDA和SOD用于评价脑I/R后脑组织氧化应激水平,如图2所示,与Sham组相比,MCAO组MDA含量

明显增加,而SOD活性显著降低($P<0.001$)。Scramble组和MCAO组的SOD和MDA无统计学差异。与MCAO组比,DJ-1 siRNA组的MDA含量进一步增加,而SOD活性进一步降低($P<0.001$)。

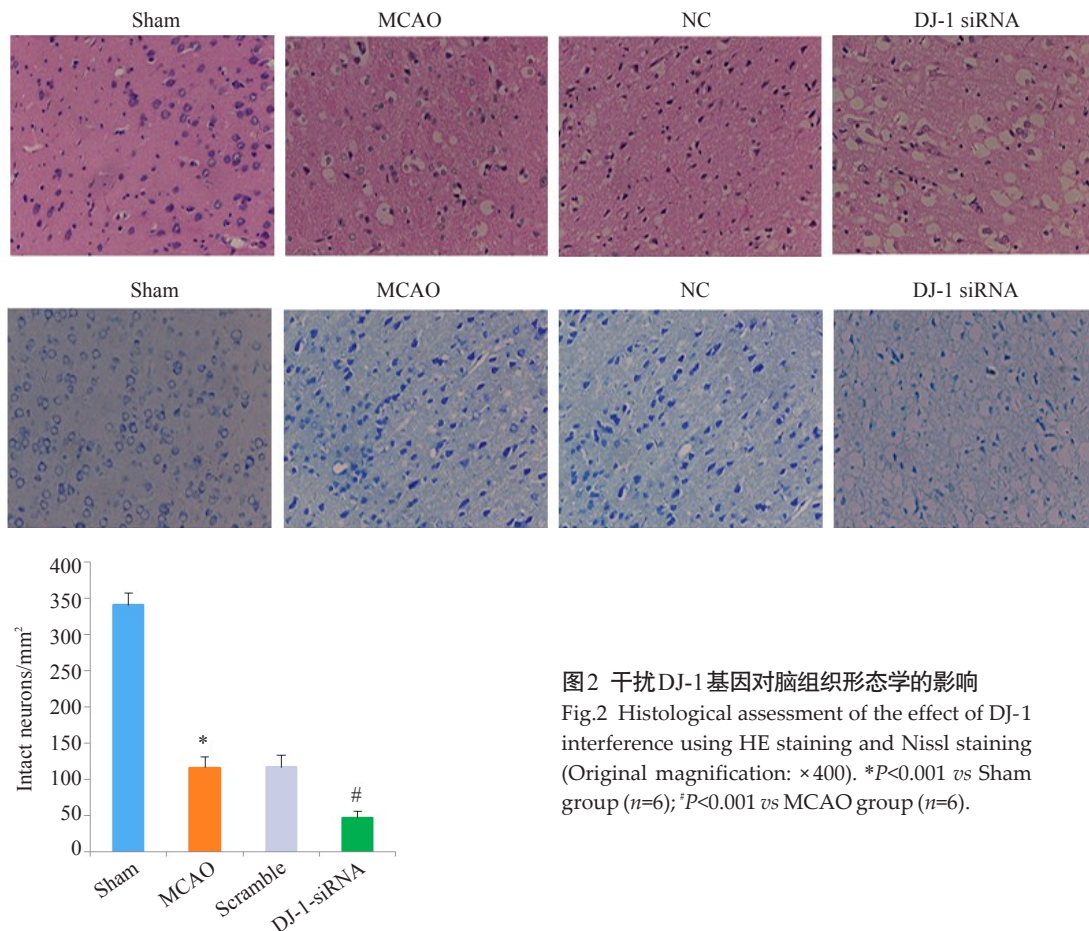


图2 干扰DJ-1基因对脑组织形态学的影响
Fig.2 Histological assessment of the effect of DJ-1 interference using HE staining and Nissl staining (Original magnification: $\times 400$). * $P<0.001$ vs Sham group ($n=6$); # $P<0.001$ vs MCAO group ($n=6$).

2.4 DJ-1促进脑I/R后Nrf2的表达

与Sham组相比,MCAO组的DJ-1表达明显增加,干扰DJ-1后,DJ-1蛋白表达明显下调($P=0.003$,图3A,C)。与Sham组相比,MCAO组的Nrf2蛋白水平明显增加,与MCAO组相比,DJ-1 siRNA组的Nrf2蛋白水平明显降低($P<0.001$)。与MCAO组相比,Overexpression组的DJ-1表达明显增加($P=0.006$,图3B,E)。同样,过表达DJ-1后,Nrf2蛋白水平明显增加($P=0.006$)。

2.5 DJ-1明显降低脑I/R后Nrf2入核

与Sham组相比,MCAO组的Nrf2表达明显增加,与MCAO组相比,DJ-1 siRNA组的Nrf2表达明显降低($P<0.001$,图4)。与Sham组相比,MCAO组的Nrf2表达以及入核明显增加,与MCAO组相比,Overexpression组的Nrf2表达以及入核明显增加($P<0.001$,图4C)。

2.6 DJ-1促进脑I/R后HO-1和NQO1的表达

与Sham组相比,脑I/R损伤后HO-1和NQO1的蛋

白水平明显上调($P<0.001$)。干扰DJ-1可以抑制HO-1和NQO1的蛋白水平。用DJ-1过表达腺相关病毒过表达DJ-1后,与MCAO组相比,Overexpression组的HO-1($P<0.004$)和NQO1($P=0.014$)的蛋白水平明显增加(图4)。

3 讨论

脑缺血再灌注损伤触发的氧化应激反应可损害神经元,导致其死亡或凋亡^[16-17]。氧化应激通过对神经元死亡-生存机制的调节,成为脑缺血再灌注损伤关键病理生理环节^[1-2]。在本研究中,我们通过构建大鼠脑MCAO模型模拟大鼠脑缺血再灌注损伤,发现缺血再灌注损伤后,出现大鼠神经功能缺失,以及脑水肿和神经元死亡。同时,MDA含量增加,SOD活性降低。这些结果表明脑缺血再灌注损伤触发的氧化应激反应是神经元损伤或死亡的关键原因。因此,寻找抵抗脑缺血再灌注氧化应激损伤的关键分子是本研究的目的。DJ-1是具

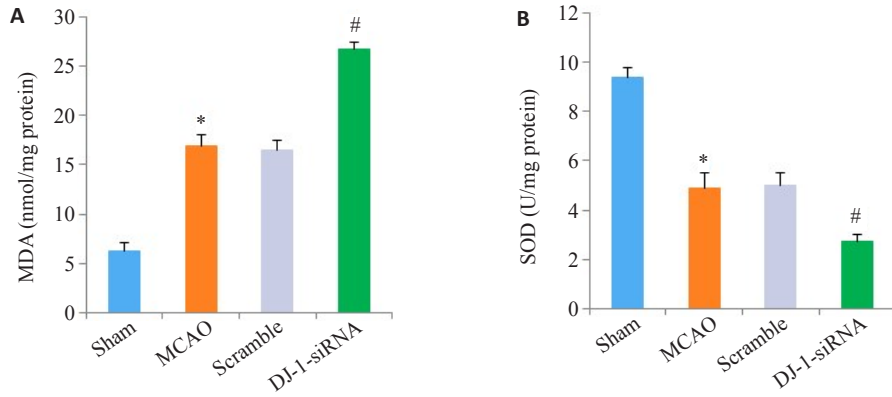


图3 干扰DJ-1基因对MDA含量和SOD活性的影响

Fig.3 Effects of DJ-1 interference on MDA content (A) and SOD activity (B). *P<0.001 vs Sham group (n=6); #P<0.001 vs MCAO group (n=6).

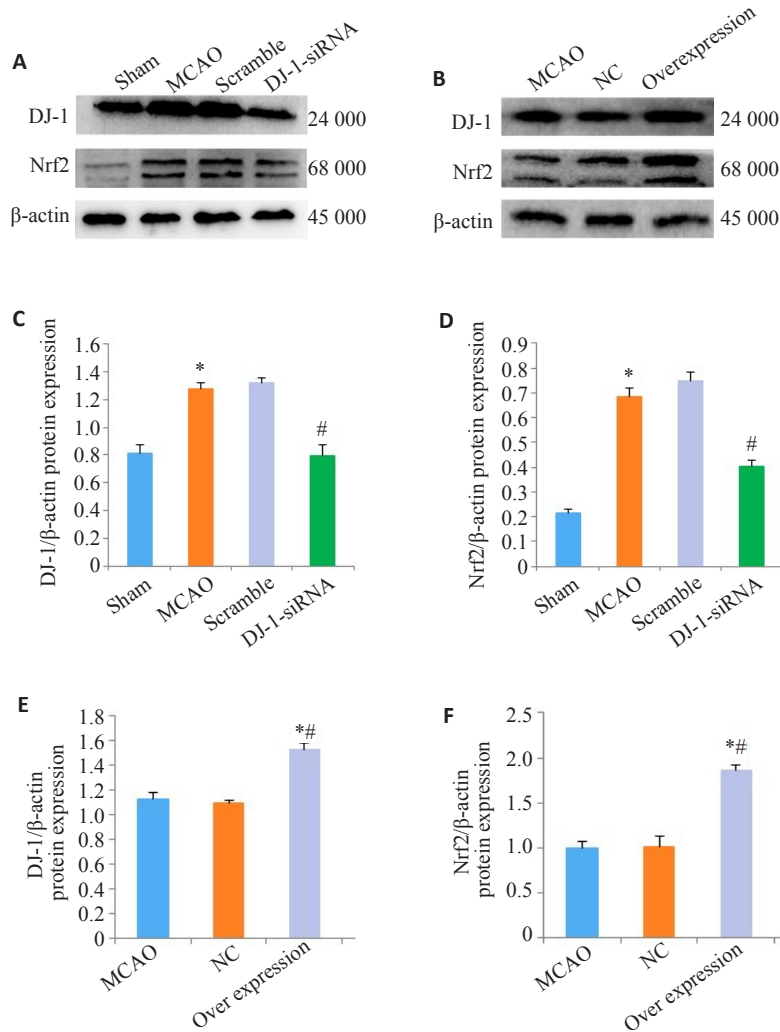


图4 DJ-1对Nrf2表达的影响

Fig.4 Effects of DJ-1 overexpression on expression of Nrf2. A, B: Western blotting of DJ-1 and Nrf2. C, E: Relative expression level of DJ-1 protein. D, F: Relative expression level of Nrf2 protein. *P<0.001 vs Sham group; #P<0.001 vs MCAO group; ##P<0.001 vs MCAO group.

有神经保护作用的重要抗氧化蛋白之一,既往对其的功能及机制的研究多集中在帕金森等慢性神经退行性疾病上。虽然,DJ-1在脑缺血再灌注氧化应激损伤方面的功能及机制尚不清楚。但我们由理由推测DJ-1可能是

抵抗脑缺血再灌注氧化应激损伤的关键分子。有研究表明,DJ-1在缺血刺激下会诱导其表达水平增高^[18]。预实验结果及相关文献[19]显示脑缺血再灌注损伤后24h时DJ-1蛋白表达最高,因此本研究选取这一时间点来研究

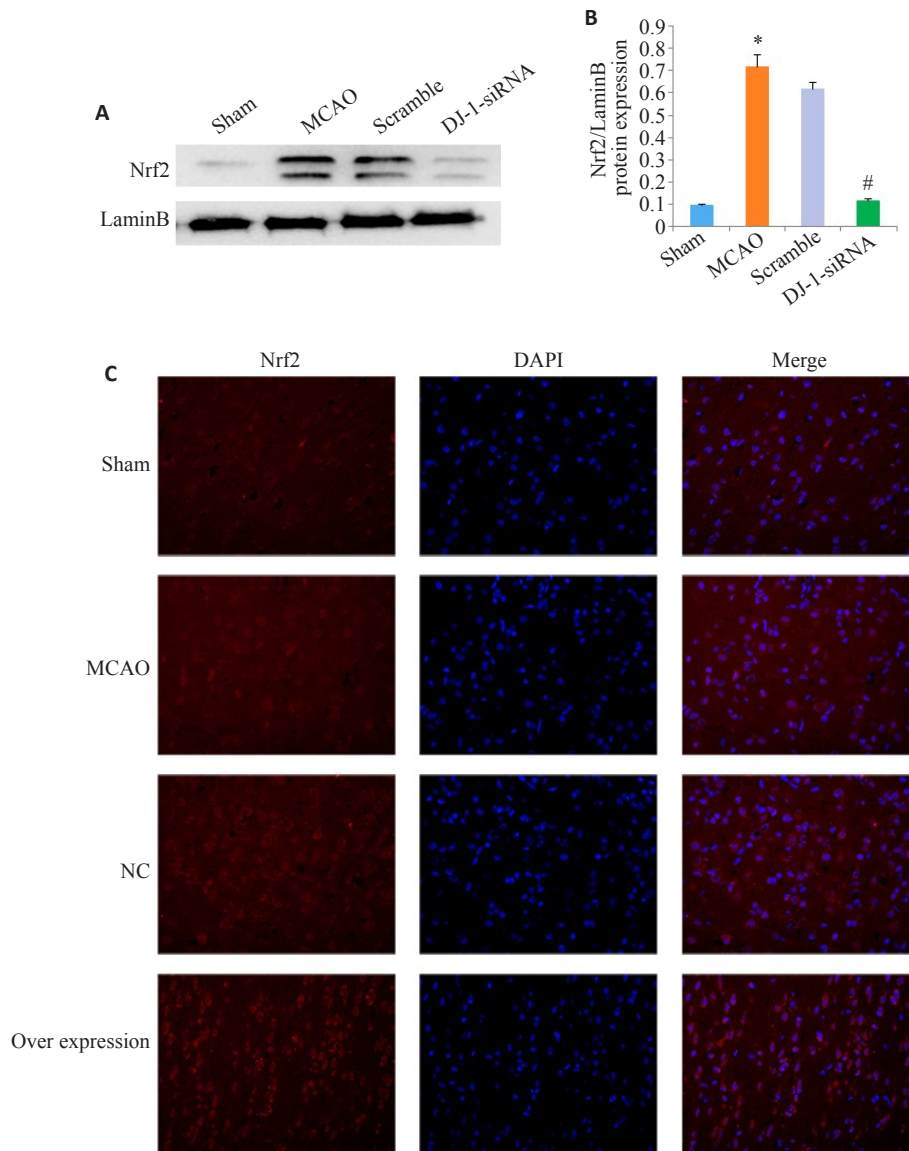


图5 DJ-1对Nrf2入核的影响

Fig.5 Effect of DJ-1 expression on Nrf2 transfer into the nucleus. **A:** Western blotting of Nrf2 in the nucleus. **B:** Relative expression level of Nrf2 in the nucleus. **C:** Immunocytochemistry (Original magnification: $\times 400$). * $P < 0.001$ vs Sham group ($n=6$); # $P < 0.001$ vs MCAO group ($n=6$).

DJ-1在脑缺血再灌注损伤中的功能及相关机制。

为了探讨DJ-1在脑缺血再灌注损伤中的神经保护作用。本研究应用小分子干扰RNA(siRNA)技术干扰DJ-1的表达。siRNA因其特异性、高效性在科学研究中广泛使用^[20-21]。在我们的研究中,DJ-1 siRNA处理后,脑缺血再灌注损伤所引起的神经行为学损伤加重,证实了DJ-1在缺血性脑卒中的神经保护作用。脑缺血再灌注损伤后会触发机体氧化应激反应发生。SOD和MDA的含量是衡量脑组织氧化应激的重要指标,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。脑缺血再灌注损伤后,脑组织SOD含量降低,MDA含量增加,且干扰DJ-1后两者改变增加更显著。这些结果表明DJ-1能够减轻脑缺血再灌注氧化

应激损伤。

Nrf2是转录因子家族成员之一,是调控机体氧化应激反应的一个关键核转录因子^[22-23]。在我们之前的研究中,均证实在脑缺血再灌注损伤中Nrf2发挥了重要的神经保护作用。DJ-1和Nrf2同抗氧化应激的关键分子,两者之间的关系需要进一步去研究。Clements等发现,DJ-1能够影响Nrf2的稳定性和转录功能^[24]。DJ-1通过抑制Nrf2泛素化,阻止其与Keap1的结合,促进Nrf2向细胞核的转运^[25-26]。因此,DJ-1可能作为Nrf2的上游信号分子,在Nrf2活性调控扮演着重要的角色^[14]。并且,DJ-1将通过怎样的方式来调控Nrf2还有待进一步明确。

我们观察到干扰DJ-1能够降低脑组织Nrf2的表达并阻止了Nrf2的核积累。同样,免疫荧光染色结果提

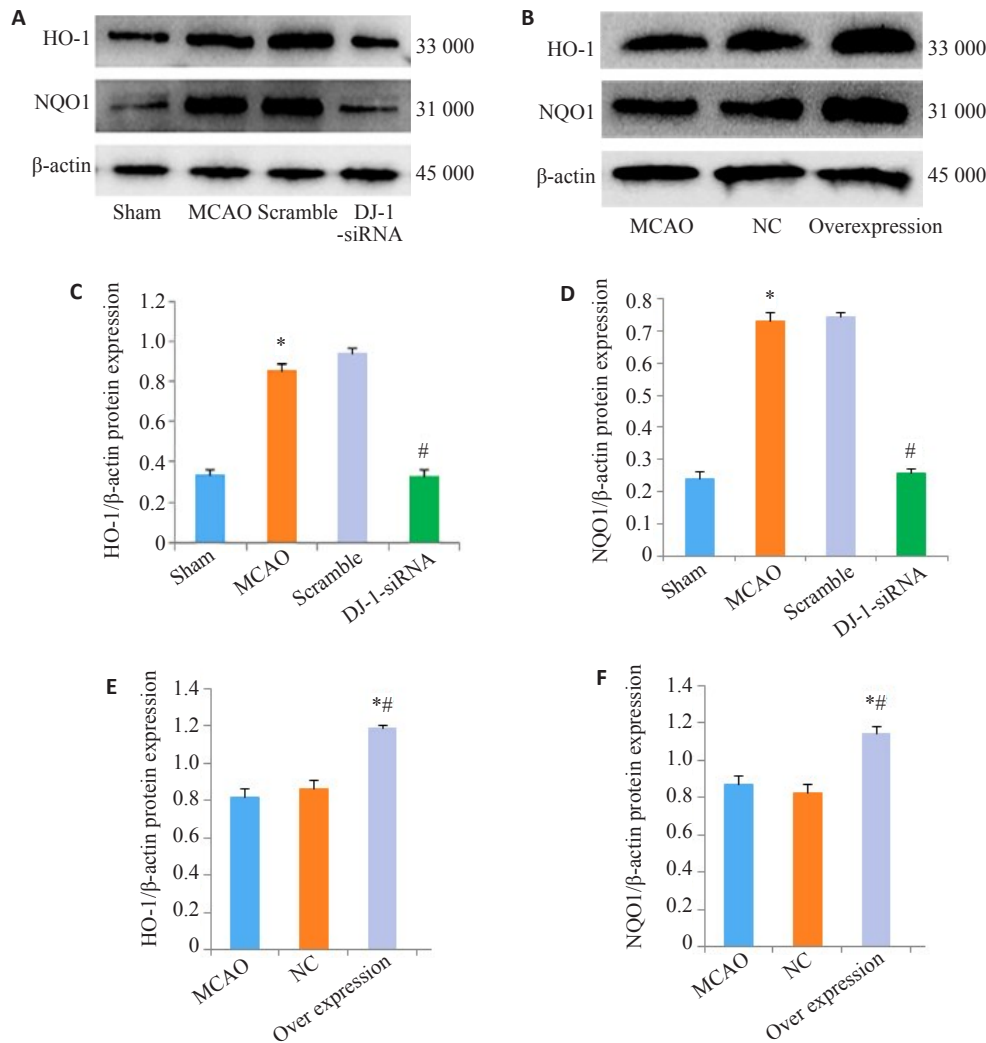


图6 DJ-1对HO-1和NQO1表达的影响

Fig.6 Effect of DJ-1 expression on expression of HO-1 and NQO1. **A, B:** Western blotting of HO-1 and NQO1. **C, E:** Relative expression level of HO-1 protein; **D, F:** Relative expression level of NQO1 protein. * $P < 0.001$ vs Sham group; # $P < 0.001$ vs MCAO group; *# $P < 0.001$ vs MCAO group ($n=6$).

示过表达DJ-1促进了Nrf2的表达和核累计。这些结果表明,DJ-1可能是通过上调Nrf2的表达并促进Nrf2向细胞核的转运,来调控机体氧化应激反应。

正常情况下,Nrf2与细胞浆中的Keap1蛋白相结合,使Nrf2的活性受到抑制。当受到氧化应激反应刺激时,Nrf2转移至细胞核内与抗氧化反应元件(ARE)结合,介导抗氧化酶基因的转录激活,如:血红素加氧酶-1(HO-1)、醌氧化还原酶1(NQO1)谷胱甘肽S-转移酶(GST)家族等^[27-28]。Nrf2通常是通过Nrf2/ARE途径调节phaseII解毒酶和抗氧化酶(如HO-1、NQO1等)表达的中枢信号开关^[29-30]。那么,DJ-1诱导的核转运的Nrf2可能与ARE结合,并通过转录激活下游的抗氧化酶来对抗氧化应激引起的损伤。因此,我们检测了HO-1、NQO1的表达。我们发现干扰DJ-1后,HO-1和NQO1蛋白水平降低。过表达DJ-1明显上调HO-1和NQO1

蛋白水平。表明DJ-1能够通过正向调控Nrf2信号通路调节抗氧化酶HO-1和NQO1的表达。

综上所述,DJ-1作为体内重要的神经保护因子,可以减少MCAO后大鼠氧化应激损伤,并且这种保护功能可能与其对细胞重要的核转录因子Nrf2及下游信号通路的激活密切相关。

参考文献:

- [1] Su XT, Wang L, Ma SM, et al. Mechanisms of acupuncture in the regulation of oxidative stress in treating ischemic stroke[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020: 7875396.
- [2] Malko P, Jiang LH. TRPM2 channel-mediated cell death: an important mechanism linking oxidative stress-inducing pathological factors to associated pathological conditions[J]. *Redox Biol*, 2020, 37: 101755.
- [3] Chitimus DM, Popescu MR, Voiculescu SE, et al. Melatonin's impact

- on antioxidative and anti-inflammatory reprogramming in homeostasis and disease[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(9): E1211.
- [4] Kletkiewicz H, Klimiuk M, Woźniak A, et al. How to improve the antioxidant defense in asphyxiated newborns-lessons from animal models[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(9): E898.
- [5] Hwang O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease [J]. *Exp Neurobiol*, 2013, 22(1): 11-7.
- [6] Puno MR, Patel NA, Møller SG, et al. Structure of Cu(I)-bound DJ-1 reveals a biscysteinate metal binding site at the homodimer interface: insights into mutational inactivation of DJ-1 in Parkinsonism[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(43): 15974-7.
- [7] Andreeva A, Bekkhozhin Z, Omertassova N, et al. The apparent deglycase activity of DJ-1 results from the conversion of free methylglyoxal present in fast equilibrium with hemithioacetals and hemiaminals[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(49): 18863-72.
- [8] Yang J, Kim KS, Iyirhiaro GO, et al. DJ-1 modulates the unfolded protein response and cell death via upregulation of ATF4 following ER stress[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 135.
- [9] Ahfeldt T, Ordureau A, Bell C, et al. Pathogenic pathways in early-onset autosomal recessive Parkinson's disease discovered using isogenic human dopaminergic neurons[J]. *Stem Cell Reports*, 2020, 14(1): 75-90.
- [10] Giangrasso DM, Furlong TM, Keefe KA. Characterization of striatum-mediated behavior and neurochemistry in the DJ-1 knockout rat model of Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2020, 134: 104673.
- [11] Li WJ, Sun K, Hu F, et al. Protective effects of natural compounds against oxidative stress in ischemic diseases and cancers *via* activating the Nrf2 signaling pathway: a mini review[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021, 35(3): e22658
- [12] Ahn YJ, Lim JW, Kim H. Docosahexaenoic acid induces expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase and heme oxygenase-1 through activation of Nrf2 in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(11): E1084.
- [13] Thanas C, Ziros PG, Chartoumpakis DV, et al. The Keap1/Nrf2 Signaling Pathway in the Thyroid-2020 Update [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(11): 1082.
- [14] Narasimhan KKS, Jayakumar D, Velusamy P, et al. Morinda citrifolia and its active principle scopoletin mitigate protein aggregation and neuronal apoptosis through augmenting the DJ-1/Nrf2/ARE signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 2761041.
- [15] Peng L, Zhao YP, Li YX, et al. Effect of DJ-1 on the neuroprotection of astrocytes subjected to cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2019, 97(2): 189-99.
- [16] Lin WJ, Kuang HY. Oxidative stress induces autophagy in response to multiple noxious stimuli in retinal ganglion cells[J]. *Autophagy*, 2014, 10(10): 1692-701.
- [17] Kimura-Ohba S, Yang Y. Oxidative DNA damage mediated by intranuclear MMP activity is associated with neuronal apoptosis in ischemic stroke[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 6927328.
- [18] Mullett SJ, Hamilton RL, Hinkle DA. DJ-1 immunoreactivity in human brain astrocytes is dependent on infarct presence and infarct age[J]. *Neuropathology*, 2009, 29(2): 125-31.
- [19] Yanagida T, Tsushima J, Kitamura Y, et al. Oxidative stress induction of DJ-1 protein in reactive astrocytes scavenges free radicals and reduces cell injury[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2(1): 36-42.
- [20] Zhao JH, Hua CL, Fang YY, et al. The dual edge of RNA silencing suppressors in the virus-host interactions[J]. *Curr Opin Virol*, 2016, 17: 39-44.
- [21] Wang JQ, Mi P, Lin G, et al. Imaging-guided delivery of RNAi for anticancer treatment[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 104: 44-60.
- [22] Jung KA, Kwak MK. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants [J]. *Molecules*, 2010, 15(10): 7266-91.
- [23] Piotrowska M, Swierczynski M, Fichna J, et al. The Nrf2 in the pathophysiology of the intestine: Molecular mechanisms and therapeutic implications for inflammatory bowel diseases [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 163: 105243.
- [24] Clements CM, McNally RS, Conti BJ, et al. DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(41): 15091-6.
- [25] Gan L, Johnson DA, Johnson JA. Keap1-Nrf2 activation in the presence and absence of DJ-1 [J]. *Eur J Neurosci*, 2010, 31(6): 967-77.
- [26] Cuevas S, Yang Y, Konkalmatt P, et al. Role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in the oxidative stress-dependent hypertension associated with the depletion of DJ-1 [J]. *Hypertension*, 2015, 65(6): 1251-7.
- [27] Ke BX, Zhang TM, An TY, et al. Soy isoflavones ameliorate the cognitive dysfunction of Goto-Kakizaki rats by activating the Nrf2-HO-1 signalling pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(21): 21344-54.
- [28] Waz S, Heeba GH, Hassanin SO, et al. Nephroprotective effect of exogenous hydrogen sulfide donor against cyclophosphamide-induced toxicity is mediated by Nrf2/HO-1/NF-κB signaling pathway[J]. *Life Sci*, 2021, 264: 118630.
- [29] Li N, Sun YR, He LB, et al. Amelioration by *Idesia polycarpa* maxim. var. *vestita* Diels. of oleic acid-induced nonalcoholic fatty liver in HepG2 cells through antioxidant and modulation of lipid metabolism[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020: 1208726.
- [30] Warpsinski G, Smith MJ, Srivastava S, et al. Nrf2-regulated redox signaling in brain endothelial cells adapted to physiological oxygen levels: Consequences for sulforaphane mediated protection against hypoxia-reoxygenation[J]. *Redox Biol*, 2020, 37: 101708.

(编辑:吴锦雅)