

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.18.005

少弱精子症患者精子候选差异蛋白 Trx 2、TrxR 1 的验证 及在少精、弱精子症中的表达研究*

斯依提·阿木提¹ 蒋丹丹² 毛吾兰·买买提依明³段 玲⁴ 童卓云¹ 白生宾⁵ 阿地力江·伊明^{1Δ}

(1 新疆医科大学基础医学院人体解剖学教研室 新疆 乌鲁木齐 830011;

2 乌鲁木齐市妇幼保健院生殖健康与不孕症科 新疆 乌鲁木齐 830001;

3 新疆医科大学基础医学院生理学教研室 新疆 乌鲁木齐 830011;

4 新疆医科大学第一附属医院产前诊断中心科室 新疆 乌鲁木齐 830054;

5 新疆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室 新疆 乌鲁木齐 830011))

摘要 目的:根据 TMT 技术筛选少弱精子症患者精子差异蛋白的结果,选取硫氧还蛋白 2(thioredoxin 2, Trx 2)、硫氧还蛋白还原酶 1(thioredoxin reductase 1, TrxR 1)进行验证,探讨二者在少精、弱精和少弱精子症中的表达变化及其意义。**方法:**收集 105 例少精子症组(O 组)、150 例弱精子症组(A 组)、50 例少弱精子症组(OA 组)和 106 例正常精液男性(N 组)精液,分离出精子,对少弱精子症进行串联质谱标签(Tandem Mass Tag, TMT)技术蛋白质组学分析,根据少弱精子症组的精子差异蛋白结果选取 Trx 2、TrxR 1,通过免疫荧光和免疫印迹方法检测其在 O 组、A 组、OA 组的表达情况。**结果:**TMT 技术蛋白质组学结果显示 Trx 2 为上调差异蛋白(为 N 组的 1.31 倍),TrxR 1 为下调差异蛋白(为 N 组的 0.82 倍)。免疫荧光和免疫印迹结果显示 O 组、A 组、OA 组 Trx 2 表达显著高于 N 组($P<0.05$),O 组、OA 组 TrxR 1 的表达显著低于 N 组($P<0.05$)。二者在 OA 组的结果与蛋白质组学结果一致。**结论:**Trx 2、TrxR 1 可能在少精、弱精及少弱精子症的发生中起着重要的作用,并有望成为少弱精子症患者精子的候选标志物及治疗靶点。

关键词:少弱精子症;硫氧还蛋白 2;硫氧还蛋白还原酶 1

中图分类号:R-33;R698.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)18-3423-05

Verification of Candidate Differential Sperm Proteins Trx-2 and TrxR-1 in Oligoasthenospermia and Their Expression in the Oligospermia and Asthenospermia*

SIYITI·A-muti¹, JIANG Dan-dan², MAIMAITIYIMING·Mao-wulan³,DUAN Ling⁴, TONG Zhuo-yun¹, BAI Sheng-bin⁵, ADILJIANG·YI-ming^{1Δ}

(1 Department of Human Anatomy, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830011, China;

2 Urumqi Maternal and Child Health Hospital, Urumqi, Xinjiang, 830001, China;

3 Department of Human Biology, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830011, China; 4 Experimentation Room of Prenatal Diagnoses, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830054, China; 5 Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830011, China)

ABSTRACT Objective: According to the results of TMT screening of sperm differential proteins in oligoasthenospermia patients, thioredoxin 2 (Trx 2) and thioredoxin reductase 1 (TrxR 1) were selected to verify their expression and significances in oligospermia, asthenospermia and oligoasthenospermia. **Methods:** Sperms were collected from 105 cases of oligospermia (O group), 150 cases of asthenospermia (A group), 50 cases of oligoasthenospermia group (OA group) and 106 cases of normal semen men group (N group) and separated for proteomic analysis by Tandem Mass Tag (TMT). Trx 2 and TrxR 1 were selected according to the results of differential proteins and detected their expression by immunofluorescence and Western blotting. **Results:** The proteomic results of sperm TMT showed that Trx 2 was up-regulated differential protein (1.31 times higher than that in group N), and TrxR 1 was down-regulated differential protein (0.82 times higher than that in group N). Immunofluorescence and Western blotting results showed that Trx 2 in group O, group A, group OA were significantly higher than that in the group N ($P<0.05$), while the expression of TrxR 1 in group O and group OA were significantly lower than that in the group N ($P<0.05$), which was consistent with the screening results. **Conclusions:** Trx 2 and

* 基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(81360409);新疆维吾尔自治区"十三五"重点学科(高原学科)项目(2050205)

作者简介:斯依提·阿木提(1989-),男,硕士,从事男性生殖疾病的基础研究与转化,E-mail: 18099486440@163.com

Δ 通讯作者:阿地力江·伊明(1968-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:生殖疾病的基础研究与转化,E-mail: adljym@126.com

(收稿日期:2019-03-28 接受日期:2019-04-25)

TrxR 1 may play important roles in the pathogenesis of oligospermia, asthenospermia and oligoasthenospermia, and may become candidate markers and therapeutic targets for the oligoasthenospermia patients.

Key words: Oligoasthenozoospermia; Trx 2; TrxR 1

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R698.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)18-3423-05

前言

根据世界卫生组织《人类精液检查与处理实验室手册》(第五版)关于精液质量的诊断标准,当精子浓度 $<15 \times 10^6/\text{mL}$ 时称为少精子症,当前向运动精子率 $<32\%$ 或前向运动+非前向运动精子率 $<40\%$ 时称为弱精子症,当两者同时发生称之为少弱精子症^[1]。根据 WHO 资料显示,育龄夫妇中受到不育不孕困扰的约占 20%,其中男性因素占 40%~60%^[2],其中少、弱精子症是男性不育的重要原因之一^[3]。不育男性的数量不断增加,其发病机制复杂,影响因素较多,也给临床治疗带来了困难。

氧化系统及抗氧化系统的损伤是导致少弱精子症的重要因素之一。在人类精子中,氧化应激可使精子活力降低、数量减少、受精率下降^[4]。硫氧还蛋白/硫氧还蛋白还原酶(Trx/TrxR)系统在防御氧化应激中起重要作用^[5]。因此,本研究根据少弱精子症 TMT 技术筛选差异蛋白的结果,并参考相关文献,选取抗氧化系统 Trx 2、TrxR 1 对蛋白质组学结果进行了验证,并从氧化应激的角度对男性不育的发病机制进行探讨,现具体报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择 2017 年 7 月至 2018 年 4 月在新疆医科大学第一附属医院生殖医学中心就诊的男性,符合少精子症、弱精子症和少弱精子症诊断条件的患者(年龄在 21-50 岁)及正常精液男性,排除患有生殖道感染、性传播疾病、输精管堵塞、肿瘤、外伤手术及糖尿病等疾病的男性。受试者采用手淫法将精液收集到无菌容器中,立即送检,置于 37℃ 恒温水浴箱中,液化后按《WHO 人类精液检查与处理实验室手册》(第五版)的标准进行检测,收集四组的精液标本,经过离心后得到精子,制备精子涂片、提取精子蛋白备用。

1.2 主要仪器与试剂

WLJY-9000 型彩色精子质量检测系统(北京伟力公司),DYY-8C 电泳仪(方正公司),FE 0723 凝胶成像仪(Santa Clara 公司),Nikon ECLIPSE 80i 显微镜(尼康公司),兔抗人抗体 Trx 2、TrxR 1(Proteintech 公司),细胞裂解液(碧云天生物技术公司),BCA 蛋白定量试剂盒(聚合美生物科技有限公司),SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(索莱宝科技有限公司),超敏 ECL 化学发光试剂盒(新赛美生物科技有限公司),Cy3 标记山羊抗兔 IgG(H+L)(碧云天生物技术公司),DAPI 染色液(碧云天生物技术公司),牛血清白蛋白(Biofrox 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 TMT 技术筛选少弱精子症差异表达蛋白 30 例 OA 组和 30 例 N 组人精子样品加入裂解液后,通过 bradford 法定量蛋白质,每样品取 100 μg 蛋白质,加入胰蛋白酶,37℃

水浴 24h 后使用 TMT 标记试剂盒对酶解得到的肽段进行同位素标记。使用强阳离子交换色谱柱对样品进行 HPLC 预分离,之后用 C18 反相色谱柱除盐,使用 Q-Exactive 质谱仪检测 16 个预分离的组分的肽段信号,并用 PD(Proteome Discoverer 1.4, thermo)软件进行定量分析,选取 $P < 0.05$, ratio ≥ 1.2 或 ratio ≤ 0.833 的蛋白为差异蛋白。

1.3.2 免疫荧光 精子涂片经甲醇固定 10 min,自然风干后 PBS 洗 3 次 $\rightarrow$ 5%BSA 封闭 30 min $\rightarrow$ 兔抗人 Trx 2(1:50)、TrxR 1(1:50)抗体湿盒内 4℃ 孵育过夜 $\rightarrow$ PBS 洗 6 次 $\rightarrow$ Cy3 标记山羊抗兔 IgG(H+L)37℃ 孵育 2.5h $\rightarrow$ PBS 洗 6 次 $\rightarrow$ DAPI 染核 10 min $\rightarrow$ PBS 洗 3 次 $\rightarrow$ 封片后荧光显微镜下 2h 内观察并采集图像。

1.3.3 免疫印迹实验(Western-blot) 两组精子经 RIPA 裂解液提取蛋白,测定蛋白浓度,后与 5 $\times$ 上样缓冲液混合沸水煮 10 min 使之变性。根据目的蛋白的分子量,配置分离胶及浓缩胶,并且上样开始电泳,80V,30 min 后样本浓缩到分离胶中,并将电压改为 120V,持续 90 min。用甲醇激活的 PVDF 膜进行转膜 2h,5%脱脂牛奶封闭 2h,根据目的蛋白条带大小切膜后用兔抗人 Trx 2(1:300)、TrxR 1(1:300)抗体 4℃ 孵育过夜,第二天取出膜后 TBST 洗 3 次,二抗(1:6000)室温孵育 2h, TBST 洗 3 次,ECL 检测试剂盒 A 液和 B 液按 1:1 混匀滴入 PVDF 膜,用凝胶成像仪观察。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件包处理实验数据。计量资料用均值 $\pm$ 标准差进行统计描述,四组之间数据比较采用单因素方差分析(one way analysis of variance, one way ANOVA),进一步两组间比较采用 SNK-q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TMT 技术筛选少弱精子症差异蛋白 Trx2、TrxR 1 的表达

TMT 技术蛋白质组学筛选结果以 ratio ≥ 1.2 或 ≤ 0.833 为标准,Trx 2 是上调差异蛋白,为 N 组的 1.313 倍;TrxR 1 是下调蛋白,为 N 组的 0.817 倍。在少弱精子症差异蛋白结果中,Trx 2、TrxR 1 情况如表 1。

2.2 四组人精子中 Trx 2 表达的检测与验证

免疫荧光结果显示 Trx 2(红色荧光)定位在人精子尾部中段和主段。与 N 组比较,O 组、A 组、OA 组精子的尾部中段和主段 Trx 2 蛋白荧光强度明显增强($P < 0.05$)。Western-blot 实验结果显示与 N 组比较,O 组、A 组、OA 组精子 Trx 2 蛋白表达显著上调($P < 0.05$),见图 1、图 2、表 2。

2.3 四组人精子中 TrxR 1 表达的检测与验证

免疫荧光结果显示 TrxR 1(红色荧光)定位在人精子尾部中段和主段。与 N 组比较,O 组、OA 组精子的尾部中段和主段

TrxR 1 蛋白荧光强度明显减弱或缺失($P<0.05$)。Western-blot实验结果显示与 N 组比较,O 组、OA 组精子 TrxR 1 蛋白表达显著下调, ($P<0.05$), 见图 3、图 4、表 2。

表 1 Trx 2、TrxR 1 在少弱精症精子差异蛋白的结果

Table 1 Trx 2 and TrxR 1 results in differential protein in oligoasthenozoospermia

Accession	Description	Score	Coverage	Ratio
Q86VQ3	Thioredoxin domain-containing protein 2	169.8	0.3797	1.313
E9PIR7	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	41.98	0.2116	0.817

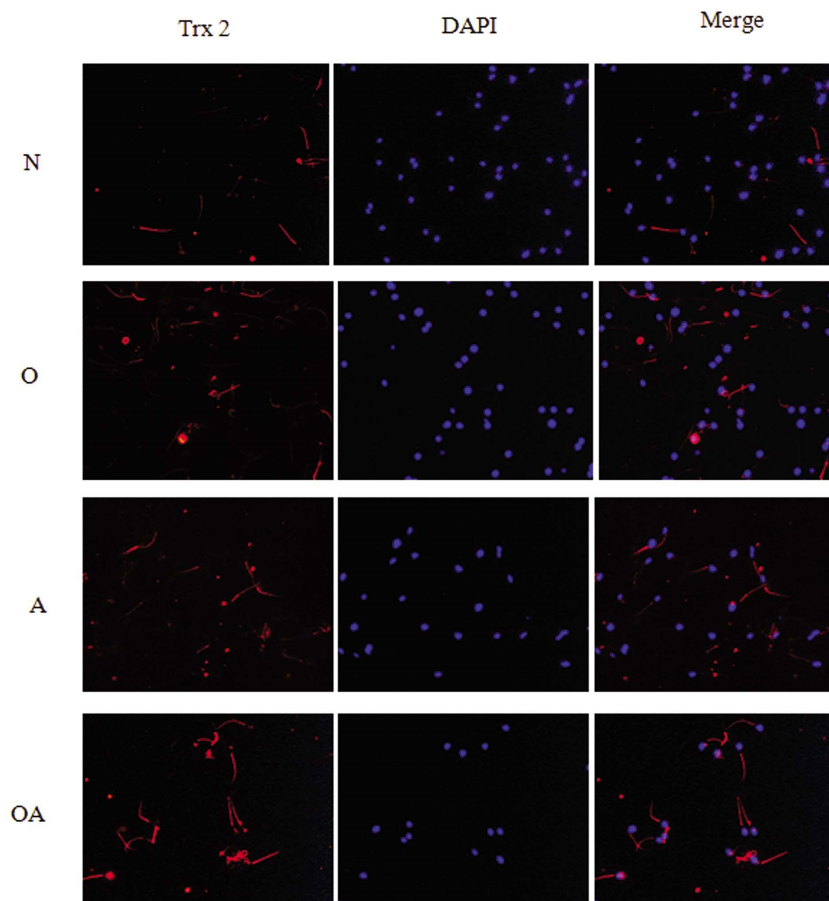


图 1 免疫荧光检测四组人精子中 Trx 2 的表达

Fig.1 Immunofluorescence detection of Trx 2 expression in four groups of sperm

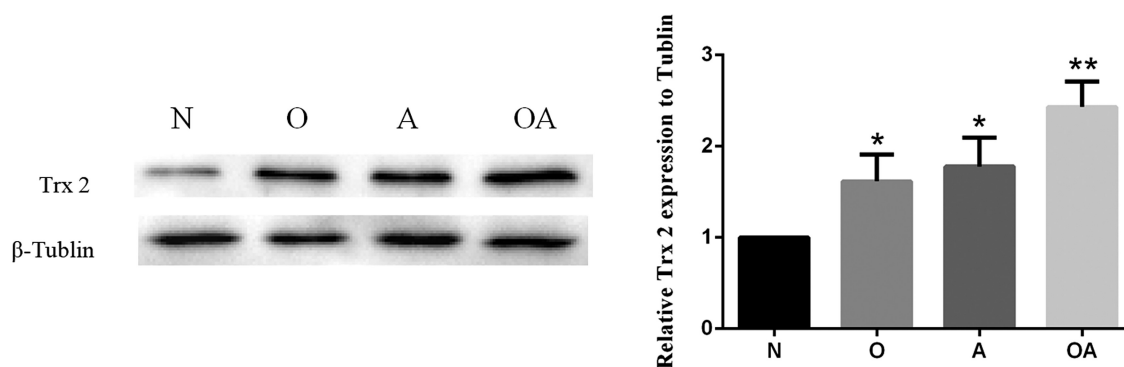


图 2 免疫印迹检测四组人精子中 Trx 2 的表达

Fig.2 Western blot detection of Trx 2 expression in four groups of sperm

3 讨论

随着男性不育发病率的增加,对患者的身心健康及生活质

量有严重的影响,也越来越受到国内外学者的重视,对其研究也不断深入。男性不育的病因复杂,比较肯定的影响因素包括生殖道感染、免疫因素、精索静脉曲张、内分泌因素、全身性疾

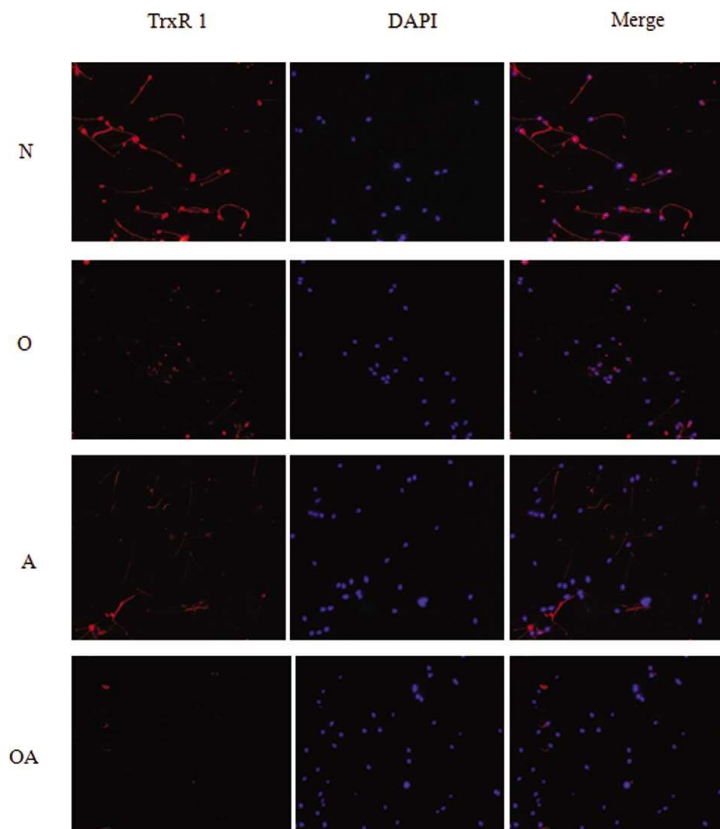


图 3 免疫荧光检测四组人精子中 TrxR 1 的表达

Fig.3 Immunofluorescence detection of TrxR 1 expression in four groups of sperm

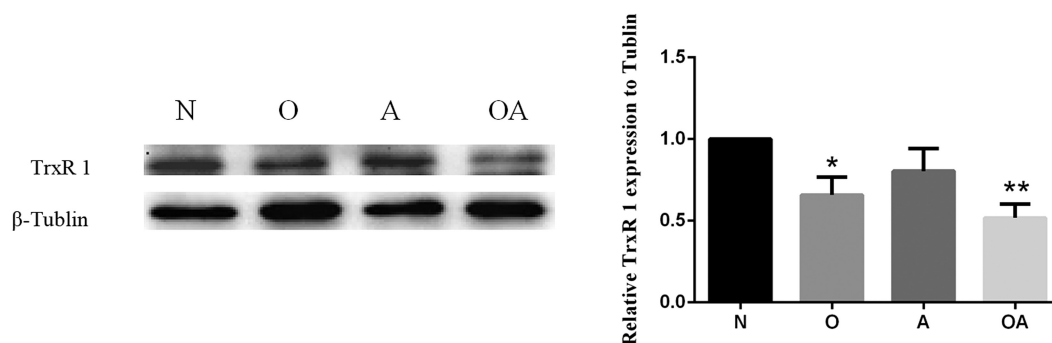


图 4 免疫印迹检测四组人精子中 TrxR 1 的表达

Fig.4 Western blot detection of TrxR 1 expression in four groups of sperm

表 2 免疫荧光检测四组人精子中 Trx 2、TrxR 1 表达

Table 2 Immunofluorescence detection of Trx 2 and TrxR 1 expression in four groups of human sperm

	Trx 2	TrxR 1
Group N	65.59± 7.63	64.00± 9.50
Group O	78.83± 8.07*	30.17± 5.68*
Group A	79.15± 9.62*	56.25± 4.47
Group OA	84.45± 7.66*	12.79± 1.90*

Note:compared with N group, * $P<0.05$.

病、从事高温和放射职业、吸烟、饮酒和药物因素等,这些因素均对精子的发生、成熟和运动等造成一定的影响^[6-8]。其发病机制包括基因突变、生殖激素水平异常、氧化应激、微量元素异常等^[9-11]。其中,活性氧(Reactive oxygen species,ROS)可以通过破

坏精子膜脂质、DNA 和线粒体引起精子损伤,这是造成精子质量下降的一个重要因素^[12]。

蛋白质组学能够从整体的角度分析精子中蛋白质的组成和表达水平,从而揭示一系列生命活动,如精子发生、成熟、

获能、运动等^[13]。蛋白质组学可以从众多的差异蛋白中筛选出可能有意义的蛋白,而对这些蛋白进行验证是筛选目的蛋白的第一步^[14]。本研究根据差异蛋白分析结果,并通过大量的文献研究,选取抗氧化系统 Trx 2/TrxR 1 对蛋白质组学结果进行验证。

Trx/TrxR 系统存在于人类精子中,在防御精子的氧化应激中起重要作用。Trx 是重要的还原剂,分为 Trx 1 和 Trx 2,与 TrxR 组成 Trx /TrxR 系统,可还原烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH),在还原二硫键和检测氧化还原信号中起重要作用^[15-17]。Trx /TrxR 通过 NADPH 还原抗氧化蛋白,而后者可将超氧化物、过氧化氢等转变为 H₂O,从而清除 ROS,避免精子损伤^[18,19]。许多研究已证实,当存在氧化应激时,血清或血浆中 Trx 明显升高,是氧化应激的标志^[20-22]。并且研究显示虽 Trx 水平显著升高,但其活性明显下降^[23]。本研究中,少弱精子症 TMT 技术蛋白质组学筛查结果显示,Trx 2 为上调的差异蛋白,并且通过免疫荧光和免疫印迹方法验证了这一结果。表明 Trx 2 可作为少弱精子症的候选蛋白标志物,并进一步扩大验证,同时发现,在少精子症、弱精子症患者精子中,Trx 2 也呈显著上调,提示在少、弱精子症患者精子中,Trx 2 作为抗氧化损伤的重要物质,其表达量代偿的增高可以在一定程度上减轻氧化应激的程度。

TrxR 通过催化 NADPH 将 Trx 上的 -S₂ 还原成 (-SH)₂ 来维持 Trx 的还原性,分为 TrxR 1、TrxR 2、TrxR 3 三种^[24]。目前关于 TrxR 的研究主要集中在其与肿瘤的发生关系上^[25-27],其含量的降低能够引起肝癌的发生^[28]。有研究表明,TrxR 在弱精子症中含量减少,精子 ROS 含量增加,精子凋亡增加、未成熟精子数量增多^[29]。TrxR 1 被认为是控制细胞氧化还原状态、抗氧化防御及细胞氧化还原调节的重要酶^[30,31]。本研究中,少弱精子症 TMT 技术蛋白质组学筛查结果显示,TrxR 1 为下调的差异蛋白,并且通过免疫荧光和免疫印迹方法验证了这一结果。氧化状态的 Trx 可被 TrxR 还原从而发挥其抗氧化作用,而本研究中,TrxR 1 含量的下降可使 Trx 的还原活性减低,抗氧化作用减弱,这与上述的 Trx 的水平虽增高,但活性减低的结论相一致,并表明 TrxR 1 可作为少弱精子症患者蛋白候选标志物,并进一步扩大验证。与此同时可见,TrxR 1 在少精子症中呈下调表达更显著,其机制可能与 TrxR 1 的低表达导致精子氧化应激水平升高、凋亡水平增加相关。而在弱精子症患者精子中,表达虽然明显下调,但经统计学处理后,无统计学意义($P>0.05$),具体可能和验证样本含量相关,尚待进一步研究。

综上所述,本研究通过蛋白质组学筛查并获得少弱精子症患者精子差异蛋白后,在开展生物信息学分析的基础上,以 Trx/TrxR 系统的失衡导致精子中清除 ROS 能力下降,进而可导致精子损伤作为切入点,通过对差异蛋白 Trx 2 和 TrxR 1 的验证,初步得出上述两个指标可成为少弱精子症的候选蛋白标志物,并结合在少精子症、弱精子症患者精子中表达含量的检测,提出其在少精、弱精及少弱精子症的发生发展中发挥着重要作用,可能是导致精子质量总体下降的关键因素之一,但其具体机制,仍需在扩大验证的基础上进行深入的研究。

参考文献(References)

[1] 世界卫生组织.人类精液检查与处理实验室手册.第5版.北京:人民

卫生出版社,2011: 17-20

- [2] Camargo M, Intasqui P, Camila B D L, et al. MALDI TOF Fingerprinting of Seminal Plasma Lipids in the Study of Human Male Infertility[J]. *Lipids*, 2014, 49(9): 943-956
- [3] 黄新飞. 益气助精颗粒治疗弱精子症的临床观察研究 [D]. 南京中医药大学, 2006
- [4] Nenkova G, Alexandrova. A review: oxidative stress and its role in reproduction [J]. *Advances in Bioscience & Biotechnology*, 2014, 4 (1): 37-43
- [5] Hong L, Chang Q X, Quan F L, et al. Thioredoxin 2 Offers Protection against Mitochondrial Oxidative Stress in H9c2 Cells and against Myocardial Hypertrophy Induced by Hyperglycemia [J]. *Int. J. Mol. Sci*, 2017, 18(9): 1958-1968
- [6] 欧阳斌, 耿强. 针刺治疗男性不育症的疗效及作用机制述评[J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(5): 520-522
- [7] 姜梦琦, 黄金花, 梁梦晨, 等. 弱精子症发病机制的研究进展[J]. *国际生殖健康 / 计划生育杂志*, 2018, 37(6): 498-503
- [8] 方茂霖, 方茂霖, 刘金冬, 等. 生殖道感染所致男性不育症的研究概况 [J]. *广西中医药大学学报*, 2013, 16(4): 66-68
- [9] Ahmad M K, Mahdi A A, Shukla K K, et al. Withania somnifera improves semen quality by regulating reproductive hormone levels and oxidative stress in seminal plasma of infertile males [J]. *Fertility & Sterility*, 2010, 94(3): 989-996
- [10] Ounis L, Zoghmar A, Coutton C, et al. Mutations of the aurora kinase C gene causing macrozoospermia are the most frequent genetic cause of male infertility in Algerian men [J]. *Asian Journal of Andrology*, 2015, 17(1): 68-73
- [11] Mohammad S K, Safeer Z, Mohammad S, et al. Assessment of the level of trace element zinc in seminal plasma of males and evaluation of its role in male infertility [J]. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 2011, 1(2): 93-96
- [12] Aitken R J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage [J]. *Mol Reprod Dev*, 2017, 84 (10): 1039-1052
- [13] 侯振, 付强, 黄愉淋, 等. 精子磷酸化蛋白质组学研究应用[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(4): 1842-1846
- [14] 高亮. 基于 iTRAQ 技术的结核性挛缩膀胱及狭窄输尿管组织蛋白质组学研究及差异蛋白验证[D]. 山西医科大学, 2017
- [15] Morielli T, O'Flaherty C. Oxidative stress impairs function and increases redox protein modifications in human spermatozoa [J]. *Reproduction*, 2014, 149(1): 113-123
- [16] Puga L M, Salvatierra D F, Verstraeten S V. Early response of glutathione- and thioredoxin-dependent antioxidant defense systems to T1 (I)- and T1 (III)-mediated oxidative stress in adherent pheochromocytoma (PC12adh) cells [J]. *Archives of Toxicology*, 2018, 92(3): 1-17
- [17] Ren X, Zou L, Lu J, et al. Selenocysteine in mammalian thioredoxin reductase and application of ebselen as a therapeutic [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 25(1): 238-247
- [18] Pericles Arruda Mitozo, Souza L F D, Loch-Neckel G, et al. A study of the relative importance of the peroxiredoxin-, catalase-, and glutathione-dependent systems in neural peroxide metabolism[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(1): 69-77

(下转第 3448 页)

- expression in human placenta[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2013, 26(4): 347-350
- [21] Choudhary GS, Al-Harbi S, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1219: 1-9
- [22] Wang X, Guo J, Fei E, et al. BAG5 protects against mitochondrial oxidative damage through regulating PINK1 degradation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86276
- [23] Corrêa TD, Jeger V, Pereira AJ, et al. Angiotensin II in septic shock: effects on tissue perfusion, organ function, and mitochondrial respiration in a porcine model of fecal peritonitis [J]. *Crit Care Med*, 2014, 42(8): e550-e559
- [24] 赵品, 高金鉴, 张亚军, 等. 乌司他丁对创伤性休克患者肝脏和凝血功能影响的回顾性研究[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2016, 37(4): 297-302, 318
- [25] 陶广华, 张随随, 朱玲钰, 等. 乌司他丁的药理作用机制及临床应用进展[J]. *中国药房*, 2017, 28(35): 5020-5023
- [26] 陈凤英, 廉明. 乌司他丁对猪心肺复苏后脑组织保护的研究 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2017, 26(11): 1279-1283
- [27] Ji M, Chen T, Wang B, et al. Effects of ulinastatin combined with mechanical ventilation on oxygen metabolism, inflammation and stress response and antioxidant capacity of ARDS [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(6): 4665-4670
- [28] Ren KW, Shen N, Tang JL, et al. Effects of ulinastatin on inflammatory response and cognitive function after hip arthroplasty for the elderly patients with femoral neck fracture [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(4): 1126-1132
- [29] Mizgerd JP, S kerrett SJ. Animal models of human pneumonia[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294 (3): 387-398
- [30] Reyes LF, Restrepo MI, Hinojosa CA, et al. A Non-Human Primate Model of Severe Pneumococcal Pneumonia [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (11): e0166092
- [31] Farooqui H, Jit M, Heymann DL, et al. Burden of Severe Pneumonia, Pneumococcal Pneumonia and Pneumonia Deaths in Indian States: Modelling Based Estimates[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129191

(上接第 3427 页)

- [19] Monica B, Bob B B. Evolution of the thioredoxin system as a step enabling adaptation to oxidative stress[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 9(5): 1-21
- [20] 李惠, 张建芳. 人类精液中的抗氧化防御系统[J]. *中国计划生育学杂志*, 2016, 24(12): 850-854
- [21] 马一嘉, 房辉, 李玉凯, 等. 2 型糖尿病患者血清 Trx、Txnip 与认知功能的相关性[J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(3): 59-63
- [22] Bhatt N M, Aon M A, Tocchetti C G, et al. Restoring redox balance enhances contractility in heart trabeculae from type 2 diabetic rats exposed to high glucose [J]. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2015, 308(4): H291-H302
- [23] Zhao Y, Sun Y, Ding Y, et al. GL-V9, a new synthetic flavonoid derivative, ameliorates DSS-induced colitis against oxidative stress by up-regulating Trx-1 expression via activation of AMPK/FOXO3a pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(28): 26291-26307
- [24] 孙文艳. 硫氧还蛋白还原酶研究进展 [J]. *国外医学 (医学地理分册)*, 2012, 26(4): 148-151
- [25] Cheng X, Holenya P, Can S, et al. A TrxR inhibiting gold (I) NHC complex induces apoptosis through ASK1-p38-MAPK signaling in pancreatic cancer cells[J]. *Molecular Cancer*, 2014, 13(1): 221-236
- [26] Luo Z, Yu L, Yang F, et al. Ruthenium polypyridyl complexes as inducer of ROS-mediated apoptosis in cancer cells by targeting thioredoxin reductase[J]. *Metallomics*, 2014, 6(8): 1480-1490
- [27] Li X, Fan X X, Jiang Z B, et al. Shikonin inhibits gefitinib-resistant non-small cell lung cancer by inhibiting TrxR and activating the EGFR proteasomal degradation pathway [J]. *Pharmacological Research*, 2016, 115: 45-55
- [28] 纪相芬, 王凯. 谷胱甘肽过氧化物酶和硫氧还蛋白还原酶与肝癌发病关系的研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2014, 22(8): 639-640
- [29] Moradi M N, Karimi J, Khodadadi I, et al. Evaluation of the p53 and Thioredoxin reductase in sperm from asthenozoospermic males in comparison to normozoospermic males [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 116(20): 123-128
- [30] 刘倩倩, 张磊, 曾慧慧. 硫氧还蛋白还原酶与肺癌的研究进展[J]. *癌症进展*, 2015(6): 586-588
- [31] 吴逸飞, 刘宝刚. 硫氧还蛋白还原酶 2 在恶性肿瘤中的研究进展 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2018, 154(2): 84-88