

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.15.007

UBE2T 基因对结直肠细胞增殖和凋亡的影响 *

刘瑞廷¹ 侯亚莉² 白继荣³ 王国荣¹ 邱冷健¹ 阎立昆¹ 李小军¹ 王小强¹

(1 陕西省人民医院普外一科 陕西 西安 710068; 2 陕西省人民医院内镜中心 陕西 西安 710068;

3 美国奈内布拉斯加大学医学中心病理系 美国内布拉斯加州 奥马哈 NE 68198-5840 美国)

摘要 目的:探讨人类泛素结合酶 E2T(Ubiquitin-conjugating enzyme E2T, UBE2T)基因对结肠细胞增殖和凋亡的影响。方法:体外培养人正常结肠粘膜细胞 FHC, 采用将 UBE2T 基因慢病毒质粒转染至 FHC 细胞 48 h 后, 通过 MTT 法检测细胞增殖情况, western blotting 检测细胞中增殖相关蛋白 UBE2T 蛋白、Ki67、促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 流式细胞术检测细胞凋亡率。结果:与转染空质粒的 FHC 细胞相比, UBE2T 基因慢病毒质粒转染 FHC 细胞 48 h 后, 细胞增殖能力显著上调($P<0.05$), UBE2T 蛋白明显增加, Ki67 的表达明显增加($P<0.05$), 细胞凋亡率显著降低($P<0.05$), 且 Bax 的表达明显下调而 Bcl-2 的表达上调($P<0.05$)。结论:UBE2T 基因能够促进正常结肠粘膜细胞的增殖, 并抑制其凋亡。

关键词: UBE2T; 结直肠癌; 增殖; 凋亡

中图分类号: R735.35; R735.37 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)15-2834-05

Effect of UBE2T Gene on the Proliferation and Apoptosis of Colorectal Cells*

LIU Rui-ting¹, HOU Ya-li², BAI Ji-rong³, WANG Guo-rong¹, QIU Leng-jian¹, YAN Li-kun¹, LI Xiao-jun¹, WANG Xiao-qiang¹

(1 Department of General Surgery, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China;

2 Department of Endoscopy, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China;

3 Department of Pathology, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-5840, USA)

ABSTRACT Objective: To explore the effects of UBE2T (Ubiquitin-conjugating enzyme E2T) gene on the apoptosis of colorectal cells. **Methods:** Normal colorectal mucosal cells FHC were cultured in vitro and transfected by UBE2T lentivirus plasmid for 48 h, MTT was used to detect the cell proliferation; the UBE2T protein, the proliferation-associated protein Ki67, the pro-apoptotic protein Bax and the anti-apoptotic protein Bcl-2 in cells were detected by Western Blotting; the apoptosis rate of cells was evaluated by Flow cytometry (FCM). **Results:** Compared with FHC cells transfected with empty plasmid, the proliferation ability of FHC cell transfected by UBE2T lentivirus plasmid was obviously upregulated ($P<0.05$), the expression of UBE2T protein and Ki67 protein were significantly increased, the apoptosis rate was obviously decreased, the expression of Bax protein was significantly decreased and the expression of Bcl-2 protein was obviously increased ($P<0.05$). **Conclusions:** UBE2T gene promoted the proliferation and inhibited the apoptosis of normal colorectal cells FHC.

Key words: UBE2T; Colorectal cancer; Proliferation; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R735.35; R735.37 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)15-2834-05

前言

结直肠癌是当今人类胃肠道系统中常见的恶性肿瘤。据统计,全球每年新发结直肠癌病例约 800 万人,且此数据呈每年增加趋势^[1]。目前,大肠癌的确切发病机理尚未完全阐明。临床上,结直肠癌多给予以化学治疗为主的综合治疗方案。泛素化途径是体内普遍存在的重要生命活动之一,细胞可通过此种修饰方式调控某些底物蛋白或使其直接发挥其生物活性^[2,3]。

人类泛素结合酶 E2T (Ubiquitin-conjugating enzyme E2T, UBE2T)属于泛素蛋白酶降解系统的成员之一^[2],参与体内重要

的细胞过程,如细胞信号传导以及细胞周期调控等^[4]。据文献报道,UBE2T 结合与 E3 泛素连接酶协同相关底物进行单泛素化^[5]。更重要的是,UBE2T 是细胞内范可尼 DNA 损伤修复过程中的关键调控因子,能够诱发自身泛素化从而促进肿瘤的发生发展^[6,7]。此外,在多种恶性肿瘤中,UBE2T 均呈过度表达^[8,9],但其是否在结直肠癌的发生过程起着作用尚不明确。细胞增殖和凋亡失衡是肿瘤发生发展的重要基础^[10]。因此,本研究采用人正常结肠细胞为研究对象,探讨了 UBE2T 基因对人正常结肠细胞增殖和凋亡的影响。

* 基金项目:陕西省国际科技合作与交流计划项目(2017KW-046)

作者简介:刘瑞廷(1982-),博士,副主任医师,研究方向:胃肠道肿瘤诊治的基础及临床研究, E-mail: fgpeter82Dr@163.com

(收稿日期:2018-12-08 接受日期:2018-12-30)

1 材料和方法

1.1 材料

人正常结直肠粘膜细胞 FHC 购自上海丰寿实业有限公司;胎牛血清为美国 Sigma 产品,DMEM 来源于 Adv Cell,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;UBE2T 基因慢病毒重组质粒由杭州弗德生物科技有限公司构建;冻存液为赛特美产品,购自武汉唐缘生物技术有限公司;MTT 试剂为美国 Sigma 产品,购自上海美轩生物科技有限公司;FITC Annexin V Apoptosis 为 BD(美国)产品。

1.2 MTT 法检测细胞增殖

收集对数生长期的结直肠粘膜细胞 FHC,制成单细胞悬液。从中抽取适量单细胞悬液至 10 mL 离心管中,加入新鲜培养液均匀混合,通过计数板调整细胞密度为 $5-8 \times 10^4$ 个/mL。将细胞均匀接种于 96 孔板中(100 μ L/孔),置于 5% CO₂, 37 °C 的培养箱中继续培养 24 小时。UBE2T 转染细胞继续培养 24 小时,然后每孔加入 10 μ L MTT 溶液,置于恒温培养箱中 4 小时,最后设置调零孔立即在酶标仪上检测 OD 值。

1.3 细胞转染

将对数生长期的细胞通过胰酶消化处理,均匀接种于 6 孔板中进行培养,细胞融合度达到 65%时,进行 UBE2T 基因慢病毒重组质粒转染。倒掉旧培养液,加入 1 mL UBE2T 病毒液,于 37 °C 恒温箱中孵育 12 h,再次加入病毒液。之后弃掉旧的培养液,加入新鲜的培养液,并加入稀释的嘌呤霉素(最终浓度为 2 μ M/mL)进行稳定转染细胞株筛选。恒温箱中孵育 24 h 后再次更换新鲜的培养液,重新加入稀释的嘌呤霉素,稳定存活下来的即是转染成功的结直肠细胞 SW620。

1.4 蛋白印迹(WB)检测蛋白表达

用细胞刮刮取贴壁细胞,离心后弃上清。加入适量裂解液,于冰上反复吹打 2 min。吹打完后,以 12000 $\times$ g 的转速离心 10 min,吸出上清。获取细胞裂解物,根据检测蛋白的位置选择合适的裂解 buffer,通过 BCA 法蛋白定量,电泳分离蛋白质。转膜:根据不同的检测目的和待测蛋白的特性,依据相应蛋白的条件进行转膜,UBE2T、Ki67、Bax 和 Bcl-2 蛋白均选用 80 v 的恒定电压电泳 1 h,然后再调电压为 120 v 电泳 30 min。封闭:用含 TBST 的脱脂牛奶(5 g 溶于 100 mL TBST 中)封闭 2 h。一抗孵育过夜,二抗孵育:孵育条件一般为室温 1-2 h。最后在凝胶成像系统中显色成像并在 Alphamager220 软件上扫描灰度值。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

收集处于对数生长期的 UBE2T 基因转染细胞,倒掉培养液,用冷的 PBS 冲洗瓶底 3 次,适量胰蛋白酶消化细胞。稀释细胞使密度为 0.5×10^6 个/mL 的细胞进行离心 10 min,弃掉上清液。加入 Annexin-V-FITC 标记液于 1 mL 的缓冲液中,之后再加入 PI 试剂 20 μ L,混匀。取 100 μ L 配好的混合液加入单悬液细胞中,室温下孵育 15 min。立即在流式细胞仪上进行检测。左下象限显示活细胞;右下象限为晚调细胞;左上象限为非活细胞,即坏死细胞;右上象限为早调细胞。本实验中凋亡细胞记右上象限和右下象限细胞。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。所有实验均独立重

复至少 3 次,实验数据采用(Mean $\pm$ SD)表示,组间比较运用 t 检验或单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 UBE2T 基因转染后人正常结直肠粘膜细胞中 UBE2T 蛋白的表达情况

为了验证 UBE2T 基因转染是否成功,我们通过 western blotting 检测人正常结直肠粘膜细胞中 UBE2T 蛋白的表达情况。结果显示:UBE2T 基因转染结肠细胞后,结肠细胞中 UBE2T 蛋白明显高于空质粒转染对照组(图 1, $P < 0.05$)。

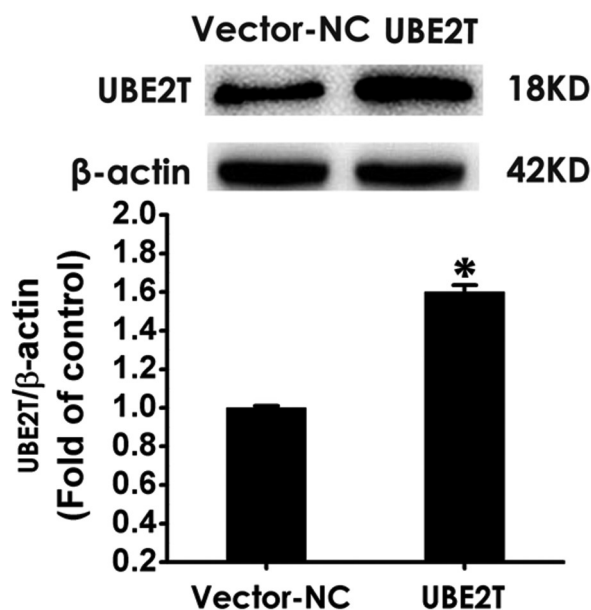


图 1 结肠细胞中 UBE2T 蛋白的表达情况

Fig.1 The expression of UBE2T protein in colorectal cells

2.2 UBE2T 对人正常结直肠粘膜细胞增殖的影响

为了检测 UBE2T 基因对人正常结直肠粘膜细胞增殖的影响,我们将 UBE2T 基因慢病毒质粒转染至结肠细胞 48 h 后,通过 MTT 法检测结肠细胞的增殖情况,结果显示 UBE2T 基因转染结肠细胞后,结肠细胞活力明显高于空质粒对照组(图 2, $P < 0.05$)。

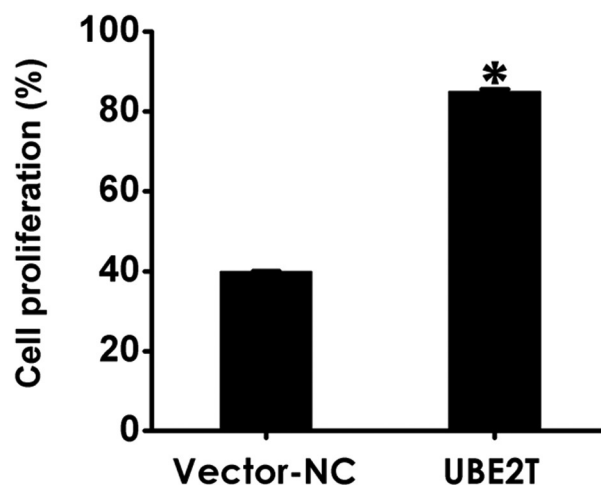


图 2 UBE2T 基因对结肠细胞增殖的影响

Fig.2 Effect of UBE2T gene on the cell proliferation in colorectal cells

2.3 UBE2T 基因表达上调增加人正常结直肠粘膜细胞增殖相关蛋白 Ki67 的表达

将 UBE2T 基因慢病毒质粒转染至结肠细胞 48 h 后,细胞中 Ki67 蛋白明显高于空质粒对照组(图 3, $P<0.05$)。

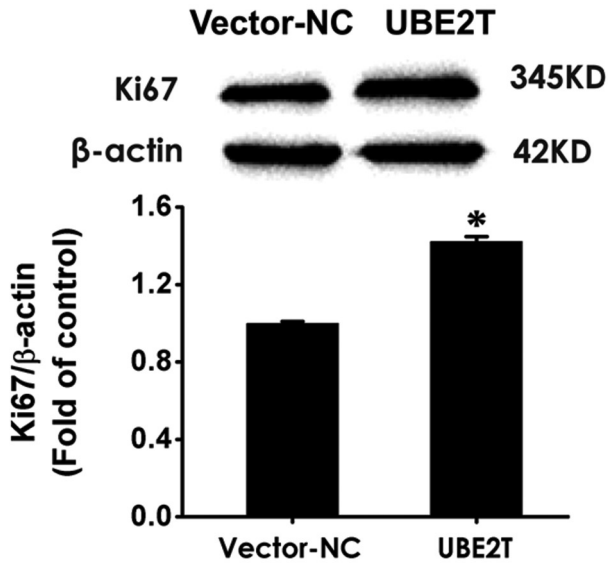


图3 UBE2T 基因表达上调对人正常结直肠粘膜细胞中增殖相关蛋白 Ki67 表达的影响

Fig.3 Effect of UBE2T gene upregulation on the proliferation-associated protein Ki67 in the colorectal cells

2.4 UBE2T 基因表达上调抑制人正常结直肠粘膜细胞凋亡

UBE2T 基因转染结肠细胞 48 h 后,结肠细胞凋亡率明显低于空质粒对照组(图 4, $P<0.05$)。

2.5 UBE2T 基因表达上调减少人正常结直肠粘膜细胞中促凋亡蛋白 Bax 的表达

UBE2T 基因转染结肠细胞 48 h 后,细胞中促凋亡蛋白 Bax 的表达显著低于空质粒对照组(图 5, $P<0.05$)。

2.6 UBE2T 基因表达上调增加人正常结直肠粘膜细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达

为了进一步明确 UBE2T 基因对结肠细胞凋亡情况的影响,UBE2T 基因转染结肠细胞 48 h 后,我们检测了结肠细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。结果显示,UBE2T 基因转染结肠细胞 48 h 后,细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达显著增加(图 6, $P<0.05$)。以上结果提示 UBE2T 基因表达上调可促进结肠细胞凋亡。

3 讨论

结直肠癌即结肠癌和直肠癌,是指结直肠粘膜上皮在某些致癌因素刺激下发生的恶性病变,其发病与生活方式或遗传等密切相关,早期无或症状不显,仅消化不良、大便潜血等,是胃肠道系统发生率极高的恶性肿瘤之一^[1]。目前,随着人民生活水平的提高,尤其是饮食结构的改变,其发病率呈逐年上升趋势^[2]。泛素化修饰在细胞凋亡、分化以及 DNA 损伤过程中发挥

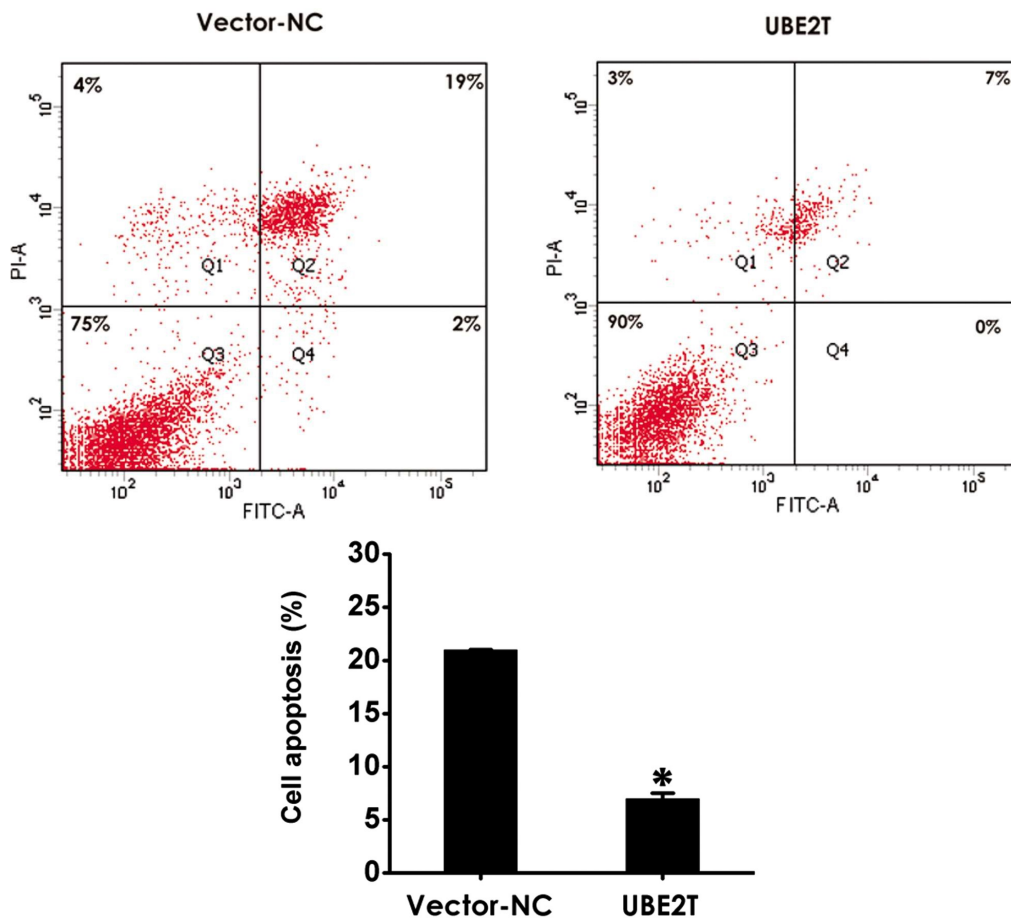


图4 UBE2T 基因表达上调对人正常结直肠粘膜细胞凋亡率的影响

Fig.4 Effect of UBE2T gene upregulation on the cell apoptosis rate of colorectal cells

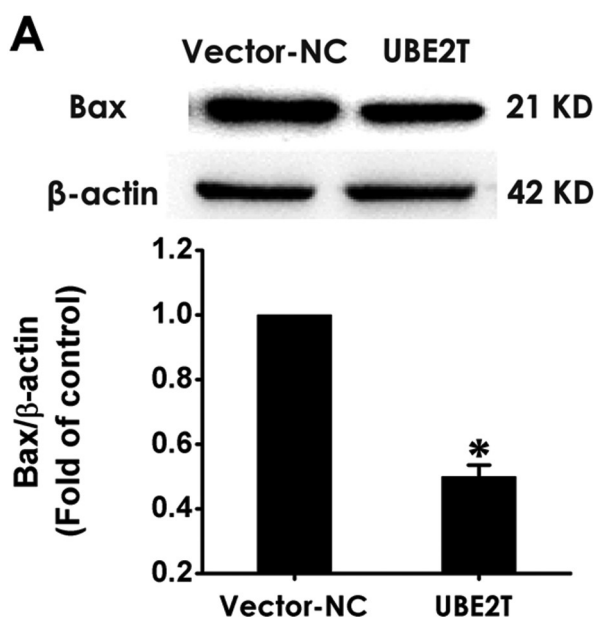


图5 UBE2T 基因表达上调对人正常结肠直肠粘膜细胞 Bax 蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of UBE2T gene upregulation on the expression of Bax protein in the colorectal cells

着关键作用^[13]。有文献报道,泛素化修饰相关酶的结构或功能异常会导致一些抑癌蛋白或癌蛋白降解失调,从而促进肿瘤的发生^[14]。人类泛素结合酶 UBE2T (Ubiquitin-conjugating enzyme E2T) 基因属于泛素蛋白酶降解系统成员之一,在人体多种组织中具有广泛的表达^[9]。生理情况下,泛素结合酶 UBE2T 参与调节细胞内多种重要细胞活动^[13]。有研究证明 UBE2T 无论是活性位点突变型和都定位在细胞核中,细胞核是 DNA 复制和转录的场所,提示 UBE2T 参与调控 DNA 的转录和复制^[15]。此外,大量文献表明 UBE2T 基因过度表达能够促进多种肿瘤的发生发展,如肺癌、前列腺癌等^[6]。有研究者发现 UBE2T 能够通过抑制乳腺癌中的 BRCA1 (抑癌基因) 基因的表达而促进乳腺癌细胞的转移、侵袭^[16]。本研究中,我们从凋亡和增殖的角度探讨了 UBE2T 基因在结肠癌发生中可能的作用。

肿瘤特征一般包括增殖的永生化和程序性凋亡受到抑制^[17]。已有文献报道细胞凋亡和细胞增殖平衡被打破是许多重大疾病,尤其是肿瘤发生发展的重要基础^[18]。人体通过细胞凋亡清除多余的和已完成使命的细胞,保证了机体的正常发育^[18]。同时,人体通过细胞凋亡清除衰老和病变的细胞保证了机体的健康^[17]。反之,细胞凋亡和增殖内环境稳态失衡导致内环境稳态失衡能促进的肿瘤发生发展^[15]。Ki67 亦称为 MKI-67,是一种位于细胞核内的一种非组蛋白,在细胞的增殖过程中不可或缺,最初由德国 Gerdes 等在研究霍奇金淋巴瘤细胞系核抗原的时候发现^[19]。Ki67 在细胞增殖的各期(G1, S, G2 和 M)中均有表达,与细胞的分裂周期紧密相关^[19]。此外,ki67 为判断肿瘤细胞活跃程度的一个常用指标,与肿瘤的分化程度、转移及预后紧密相关^[20]。Bcl-2 家族在细胞的凋亡过程中发挥着重要的作用,分为两大类,一类是抗凋亡,如 Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-W 等;另一类是促凋亡,如 Bax、Bcl-XS、Bid 等^[21]。Bcl-2 通过调控谷胱甘肽 GSH 而抑制细胞凋亡,Bax 通过调控一些离子或分子诱导

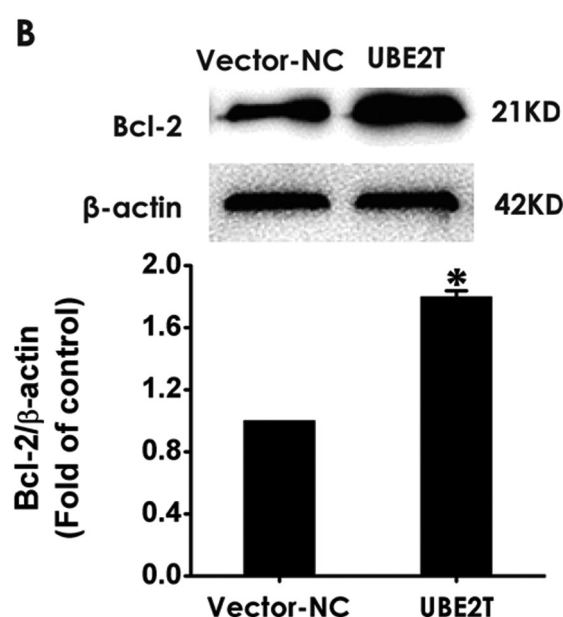


图6 UBE2T 基因表达上调对人正常结肠直肠粘膜细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of UBE2T gene upregulation on the Bcl-2 protein expression in the colorectal cells

细胞凋亡^[22]。因此,Bcl-2 水平的升高和 Bax 的降低表明细胞对凋亡的抵抗性增强。本研究中,我们通过 UBE2T 重组质粒转染和嘌呤霉素共处理筛选出稳定高表达 UBE2T 基因的结肠细胞,发现 UBE2T 基因明显促进结肠细胞的增殖。同时,UBE2T 基因表达上调可抑制结肠细胞凋亡,降低促凋亡蛋白 Bax 的表达并增加抗凋亡蛋白 Bcl-2。因此,UBE2T 基因表达上调能够抑制正常结肠直肠粘膜细胞凋亡并促进其增殖。

由于 UBE2T 是一种新发现的泛素偶联酶^[23],我们将进一步深入探讨 UBE2T 基因是否通过与细胞内某些物质结合而促进某些癌蛋白表达或抑制某些抑癌蛋白表达,从而对结肠细胞增殖和凋亡形成影响,以明确 UBE2T 促进结肠细胞增殖和抑制结肠细胞凋亡的具体机制。

参考文献 (References)

- [1] Brenner H, Stock C, Hoffmeister M. Effect of screening sigmoidoscopy and screening colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies [J]. *BMJ*, 2014, 348(2467): 1-12
- [2] Bodnar NO, Kim KH, Ji Z, et al. Structure of the Cdc48 ATPase with its ubiquitin-binding cofactor Ufd1-Npl4 [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2018, 25(7): 616-622
- [3] Kleiger G, Mayor T. Perilous journey: a tour of the ubiquitin-proteasome system[J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(6): 352-359
- [4] Perez-Pena J, Corrales-Sanchez V, Amir E, et al. Ubiquitin-conjugating enzyme E2T (UBE2T) and denticleless protein homolog (DTL) are linked to poor outcome in breast and lung cancers [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17530
- [5] Yu H, Xiang P, Pan Q, et al. Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2T is an Independent Prognostic Factor and Promotes Gastric Cancer Progression[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(9): 11723-11732

- [6] Wen M, Kwon Y, Wang Y, et al. Elevated expression of UBE2T exhibits oncogenic properties in human prostate cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(28): 25226-25239
- [7] Hu W, Xiao L, Cao C, et al. UBE2T promotes nasopharyngeal carcinoma cell proliferation, invasion, and metastasis by activating the AKT/GSK3 β /beta-catenin pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(12): 15161-15172
- [8] Zhou X M, Sun R, Luo D H, et al. Upregulated TRIM29 promotes proliferation and metastasis of nasopharyngeal carcinoma via PTEN/AKT/mTOR signal pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(12): 13634-13650
- [9] Gong Y Q, Peng D, Ning X H, et al. UBE2T silencing suppresses proliferation and induces cell cycle arrest and apoptosis in bladder cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(6): 4485-4492
- [10] Chen Q, Kang J, Fu C. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2018, 3: 18
- [11] Zhang J, Zhang H Y, Li J, et al. The elevated NLR, PLR and PLT may predict the prognosis of patients with colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(40): 68837-68846
- [12] Su S, Hong F, Liang Y, et al. Lgr5 Methylation in Cancer Stem Cell Differentiation and Prognosis-Prediction in Colorectal Cancer [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143513
- [13] Zhang Y, Zhou X, Huang P. Fanconi anemia and ubiquitination [J]. *J Genet Genomics*, 2007, 34(7): 573-580
- [14] Kelsall I R, Langenick J, MacKay C, et al. The Fanconi anaemia components UBE2T and FANCM are functionally linked to nucleotide excision repair[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36970
- [15] Grosse J, Warnke E, Wehland M, et al. Mechanisms of apoptosis in irradiated and sunitinib-treated follicular thyroid cancer cells [J]. *Apoptosis*, 2014, 19(3): 480-490
- [16] Ueki T, Park JH, Nishidate T, et al. Ubiquitination and Downregulation of BRCA1 by Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2T Overexpression in Human Breast Cancer Cells [J]. *Cancer Research*, 2009, 69(22): 8752-8760
- [17] Kumar N, Srivastava S, Burek M, et al. Assessment of estradiol-induced gene regulation and proliferation in an immortalized mouse immature Sertoli cell line[J]. *Life Sciences*, 2016, 148: 268-278
- [18] Wei Y, Shen X, Li L, et al. TM4SF1 inhibits apoptosis and promotes proliferation, migration and invasion in human gastric cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5): 6081-6088
- [19] Gerdes J, Dallenbach F, Lennert K, et al. Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67 [J]. *Hematological Oncology*, 2015, 2(4): 365-371
- [20] Gonzalez-Ramirez R A, Barboza-Quintana O, Flores-Gutierrez J P, et al. Perfil de expresion de Ki67 en lesiones melanociticas palmo-plantares: estudio de casos y controles [J]. *Cir Cir*, 2018, 86(3): 250-254
- [21] Zhong W, Jin W, Xu S, et al. Pioglitazone Induces Cardiomyocyte Apoptosis and Inhibits Cardiomyocyte Hypertrophy Via VEGFR-2 Signaling Pathway[J]. *Arq Bras Cardiol*, 2018, 111(2): 162-169
- [22] You B R, Park W H. Zebularine-induced apoptosis in Calu-6 lung cancer cells is influenced by ROS and GSH level changes [J]. *Tumor Biology*, 2013, 34(2): 1145-1153
- [23] Gong YQ, Gong YQ, Peng D, et al. UBE2T silencing suppresses proliferation and induces cell cycle arrest and apoptosis in bladder cancer cells[J]. *Oncology Letters*, 2016, 12(6): 4485-4492

(上接第 2821 页)

- [20] Zhong H, Liu M, Ji Y, et al. Genipin Reverses HFD-Induced Liver Damage and Inhibits UCP2-Mediated Pyroptosis in Mice [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(5): 1885-1897
- [21] 赵群, 邹圣强, 章晋辉, 等. 老年脓毒血症患者淋巴细胞水平的变化[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(15): 3704-3706
- [22] Delano MJ, Ward PA. Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(1): 23-31
- [23] Gigliotti JC, Okusa MD. The spleen: the forgotten organ in acute kidney injury of critical illness [J]. *Nephron Clin Pract*, 2014, 127(1-4): 153-157
- [24] Boomer JS, To K, Chang KC, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure [J]. *JAMA*, 2011, 306(23): 2594-2605
- [25] 周荣, 丁晓莉, 刘良明, 等. 脂多糖致脓毒血症大鼠血管内皮细胞凋亡的实验观察[J]. *微循环学杂志*, 2015, 25(4): 7-10
- [26] Brahmadam P, Inoue S, Unsinger J, et al. Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis[J]. *J Leukoc Biol*, 2010, 88(2): 233-240
- [27] Wesche-Soldato DE, Chung CS, Lomas-Neira J, et al. In vivo delivery of caspase-8 or Fas siRNA improves the survival of septic mice[J]. *Blood*, 2005, 106(7): 2295-2301
- [28] Matsuda N, Teramae H, Yamamoto S, et al. Increased death receptor pathway of apoptotic signaling in septic mouse aorta: effect of systemic delivery of FADD siRNA [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298(1): H92-101
- [29] Ahmadi M, Abdolmohammadi-Vahid S, Ghaebi M, et al. Regulatory T cells improve pregnancy rate in RIF patients after additional IVIG treatment[J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2017, 63(6): 350-359
- [30] Yoon SJ, Kim SJ, Lee SM. Overexpression of HO-1 Contributes to Sepsis-Induced Immunosuppression by Modulating the Th1/Th2 Balance and Regulatory T-Cell Function [J]. *J Infect Dis*, 2017, 215(10): 1608-1618