

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.06.006

## PRDX2 在乙醇致雄性小鼠生殖损害中的机制研究 \*

李 丽 宗道宽 尹 萍 陈媛媛 李 凯 蔡 靛 路 璐 张武文 童国庆<sup>△</sup>

(上海中医药大学附属曙光医院 上海 200120)

**摘要 目的:**探讨过氧化氧化还原蛋白 2(PRDX2)在乙醇所致的雄性小鼠生殖损害中的作用机制。**方法:**以雄性昆明小鼠为研究对象,分为对照组及模型组,分别以蒸馏水和乙醇灌胃处理 12 周,采集血清用于激素水平测定;收集精子,一部分用于精液分析,另一部分用于 Q-PCR 检测 PRDX2、BCL-2、BAX、Caspase3 的 mRNA 表达,Western blot 检测 PRDX2、BCL-2、BAX、Caspase3 和 Cleaved-Caspase3 的蛋白表达,免疫荧光法鉴定 PRDX2 的表达;统计分析研究结果。**结果:**与对照组比较,模型组小鼠的精子活率降低,雌激素水平升高而雄激素水平降低( $P<0.05$ );模型组小鼠的 PRDX2、BCL-2 蛋白及 mRNA 水平较对照组均降低( $P<0.05$ ),免疫荧光显示 PRDX2 可在精子中表达,且模型组小鼠精子的荧光强度明显减低;在 BAX 及 Caspase3 mRNA 的表达上,模型组高于对照组( $P<0.05$ ),模型组小鼠的 BAX 及 Cleaved-Caspase3 的蛋白表达亦高于对照组( $P<0.05$ );Pearson 相关系数分析显示 PRDX2 与 BCL-2 呈正相关、与 BAX、Caspase3 呈负相关,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论:**乙醇造成精子 PRDX2 表达降低,间接诱导精子发生凋亡,影响精子的生成和发育,损害雄性小鼠的生殖功能。

**关键词:**PRDX2;乙醇;细胞凋亡;生殖损害

中图分类号:R-33;R322.64;R595.6 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2020)06-1028-05

## Mechanism of PRDX2 in Reproductive Damage Induced by Ethanol in Male Mice\*

LI Li, ZONG Dao-kuan, YIN Ping, CHEN Yuan-yuan, LI Kai, CAI Liang, LU Lu, ZHANG Wu-wen, TONG Guo-qing<sup>△</sup>

(Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200120, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the mechanism of peroxiredoxin 2 (PRDX2) in ethanol-induced reproductive damage in male mice. **Methods:** Male Kunming mice were divided into control group and model group. The control group was treated with distilled water and the model group was treated with ethanol for 12 weeks. Serum was collected for hormone level determination. Sperm was collected, one part was used for semen analysis, the other part was used for Q-PCR detecting the mRNA expressions of PRDX2, BCL-2, BAX and Caspase3, Western blot detecting the protein expressions of PRDX2, BCL-2, BAX, Caspase3 and Cleaved-Caspase3 and Immunofluorescence staining identifying the expression of PRDX2. Statistical analysis results. **Results:** Compared with the control group, the sperm motility and the androgen level of the model group decreased, the estrogen level increased( $P<0.05$ ). Compared with the control group, the PRDX2 and BCL-2 protein and mRNA levels of the model group were significantly decreased ( $P<0.05$ ). Immunofluorescence showed that PRDX2 could be expressed in sperm, and the fluorescence intensity of sperm in model group was significantly reduced. BAX and Caspase3 mRNA of the model group were significantly higher than that of the control group ( $P<0.05$ ). The BAX and Cleaved-Caspase3 protein levels of the model group were significantly increased ( $P<0.05$ ). Pearson correlation coefficient analysis showed that PRDX2 was positively correlated with BCL-2 and negatively correlated with BAX and Caspase3 ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Ethanol causes the decrease of sperm PRDX2 expression, indirectly induces sperm apoptosis, affects sperm production and development, and impairs the reproductive function of male mice.

**Key words:** Peroxiredoxin2; Ethanol; Apoptosis; Reproductive damage

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R322.64; R595.6 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2020)06-1028-05

### 前言

不孕症的发生,有 50%是男性因素造成的。受社会、环境等

多种因素影响,男性生育能力有逐年降低趋势,而精子质量异常是男性生育力减低的主要因素之一<sup>[1]</sup>。精子的发生是一个精密的生物学过程,由精原干细胞的增殖分化、精母细胞的减数

\* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81571442);国家自然科学基金面上项目(81170571);

上海中医药大学预算内项目(2016YSN47);曙光医院四明基金项目

作者简介:李丽(1990-),女,博士研究生,主要研究方向:生殖内分泌,电话:15226550830,E-mail:1044354100@qq.com

<sup>△</sup> 通讯作者:童国庆,男,博士,主任医师,主要研究方向:生殖内分泌,E-mail:drivftongguoqing@hotmail.com

(收稿日期:2019-09-05 接受日期:2019-09-28)

分裂和精子形成 3 个阶段组成,而此过程会受相关基因和神经-内分泌等的复杂调节。那么深入研究精子质量异常的发生机制,可为新的治疗策略提供佐证。

酒精作为公认的致畸剂,可对心脑血管及消化系统等方面产生负面影响,而长期过量饮酒又可造成性腺中毒。有报道称约有 42% 的男性不育症患者饮酒,这表明酒精是男性不育的影响因素<sup>[2]</sup>。酒精可降低睾酮水平,并且可通过直接作用于睾丸组织或间接通过下丘脑-垂体-性腺轴来降低精液参数水平,有明确的生殖毒性<sup>[3]</sup>。为提高男性健康的生育意识及生活质量,研究酒精对男性的生殖损害具深远意义。

过氧化氧化还原蛋白(Peroxiredoxins, PRDX)家族是一类在对抗活性氧以及细胞抗氧化过程中发挥关键作用的蛋白质。6 种 PRDX 蛋白在哺乳动物细胞可分为:保守的 2-半胱氨酸亚群和非典型的 2-半胱氨酸亚群。PRDX 在清除活性氧的过程中,自身也被氧化,随后可以通过合成新的蛋白质或在硫氧还蛋白及其他氧化还原剂的作用下再次恢复功能。其中 PRDX2 是 6 个 PRDX 因子中恢复抗氧化功能最快的<sup>[4]</sup>。但 PRDX2 的抗氧化作用与男性精子生成的关系尚不明确,为明确 PRDX2 在乙醇致雄性小鼠生殖损害中的表达情况及其作用机制,本研究通过分子生物学实验及统计学分析对其可能的作用机制进行初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

7~12 周龄健康雄性昆明小鼠 30 只,体重 25 g~30 g。自由饮食水,全价饲料喂养。动物房温度、湿度分别维持在 20℃、70%左右,12 小时光照、12 小时黑暗条件下饲养。适应性喂养 1 周后,按体重随机分为 2 组:对照组(灌服蒸馏水)、模型组(灌服 30%乙醇)。各组灌胃剂量均为 0.2 mL/10 g,每天 1 次。每周称体重 1 次,根据体重随时调整灌胃量。实验时间为 12 周。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 精子计数及活动率** 剖腹取小鼠双侧附睾,使其置于提前 37℃预热的 PBS 中,剪碎,于 37℃孵育 10 min,制成精子悬液,取上浮的精子悬液,放入 MAKLER® 计数板内,计数 5 个中方格内精子数,包括位于顶部和右侧最外侧线的那些精子,而下侧和左侧的精子被排除在外,记为 R,然后按公式  $R \times 50000 = \text{精子数量(百万/mL)}$ ,推算出每侧附睾精子悬液中精子的数量。

在高倍镜下计数 200 个精子中活动精子数,计算活动率。结果判定方法:精子运动活泼,呈直线运动为活动良好;运动较活泼但方向不定,不成直线运动为活动一般;精子运动迟缓,原地转动或摆动为活动不良;原地静止不动为静止精子。

**1.2.2 血清激素水平测定** 小鼠麻醉后心脏取血,室温静置 2 h,于 4℃条件下 3000 rpm 离心 10 min,吸取血清,-80℃低温冰箱保存备用。于上海中医药大学附属曙光医院生殖中心检测血清雌激素和雄激素水平。

**1.2.3 Q-PCR 法检测两组精子 PRDX2、BCL-2、BAX 和 Caspase3 的 mRNA 表达** 提取总 RNA,琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 纯度及完整性,用紫外分光光度计分别测定 OD260 与 OD280,OD260/OD280 比值在 1.8~2.0 之间,表明提取的 RNA

纯度较高,污染很少,可于后续逆转录反应。引物由上海生工合成,引物序列见表 1。产物于 Stepone plus PCR 仪上进行实时荧光定量 PCR 检测。

表 1 Q-PCR 引物序列

Table 1 Quantitative polymerase chain reaction primer sequences

| Gene     | Primer sequence 5'-3'           |
|----------|---------------------------------|
| PRDX2    | F: 5'-GATGGTGCCTTCAAGGAAATCA-3' |
|          | R: 5'-CCGTGGGGCAAACAAAAGTG-3'   |
| BCL-2    | F: 5'-ACTTCTCTCGTCGTACCGT-3'    |
|          | R: 5'-ACAATCCTCCCCAGTTCAC-3'    |
| BAX      | F: 5'-AGACAGGGGCCTTTTGTGCTAC-3' |
|          | R: 5'-AATTCGCCGGAGACACTCG-3'    |
| Caspase3 | F: 5'-ACTGATGAGGAGATGGCTTGC-3'  |
|          | R: 5'-GGACTGGATGAACCACGACC-3'   |
| GAPDH    | F: 5'-AATGGATTGACGCATTGGT-3'    |
|          | R: 5'-TTTGCCTGGTACGTGTTGAT-3'   |

**1.2.4 免疫荧光法测定两组精子 PRDX2 表达** 将精子置于 4%多聚甲醛中固定 30 min,PBS 清洗后于 0.5% Triton-X100 中继续通透 30 min,PBS 清洗,于 37℃中在 5% BSA 中封闭 1 h,PDRX2—抗封闭过夜。翌日,37℃中孵育二抗,PBS 清洗,DAPI 染 10 min,PBS 清洗,封片待检。

**1.2.5 Western blot 法检测精子 PRDX2、BCL-2、BAX、Caspase3 和 Cleaved-Caspase3 蛋白表达** 于冰上裂解,提取精子总蛋白,适当稀释提取的上清液,考马斯亮蓝测定提取液的蛋白浓度,确保每个蛋白样品的上样量一致。配制 SDS-聚丙烯酰胺凝胶,进行凝胶电泳,20 V 恒压转膜,脱脂奶粉封闭 2 h,一抗孵育过夜;翌日,二抗室温震荡封闭 2 h,Image Quant LAS 4000 化学发光成像分析仪检测抗体特异性结合条带、显影,以 GAPDH 为内参,进行半定量分析。

### 1.3 统计学方法

应用 SPSS21.0 软件进行统计学处理。计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,比较采用独立样本的 t 检验,Pearson 相关系数分析相关性,以  $P < 0.05$  作为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组小鼠精液参数的比较

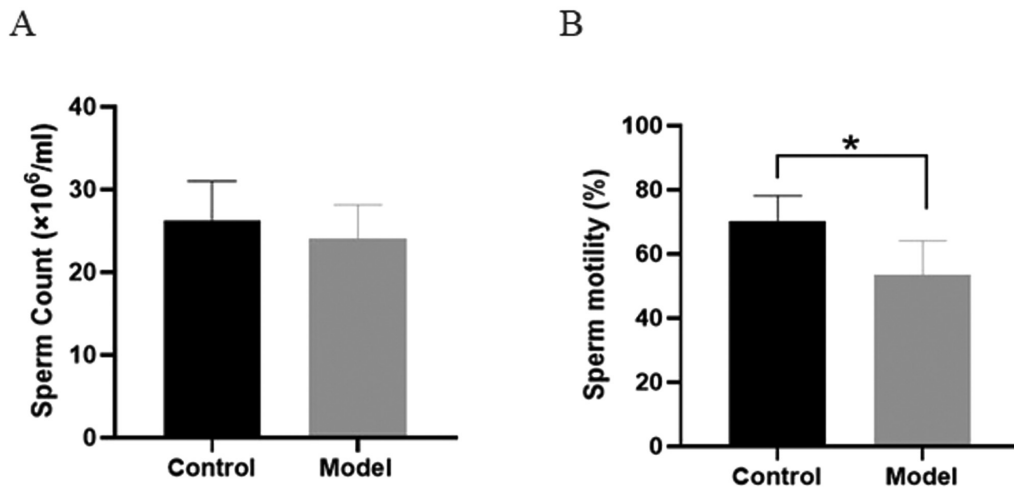
对照组与模型组小鼠相比,精子密度的差异无统计学意义( $P > 0.05$ );但与对照组比较,模型组小鼠的精子活动率显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1。

### 2.2 两组小鼠血清激素的比较

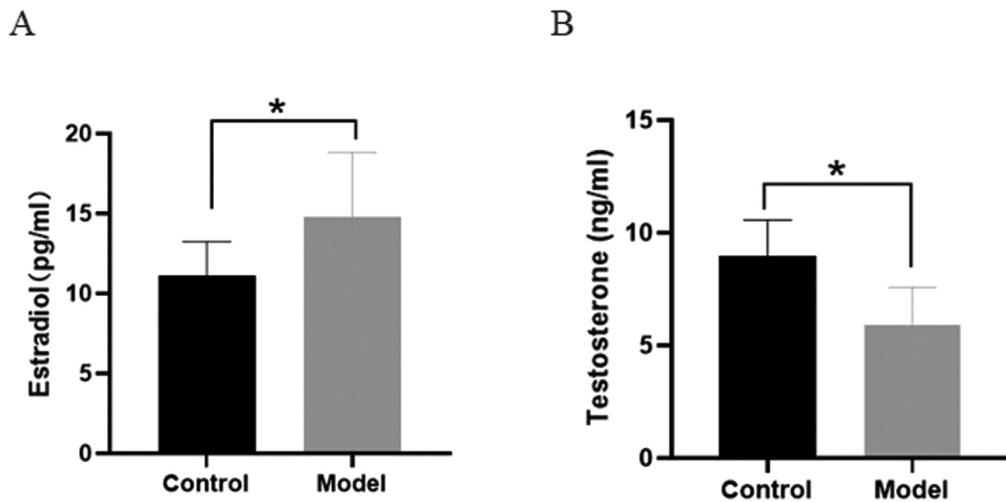
与对照组比较,模型组小鼠的雌激素水平显著升高,而雄激素水平则降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2。

### 2.3 PRDX2 在两组精子中的表达

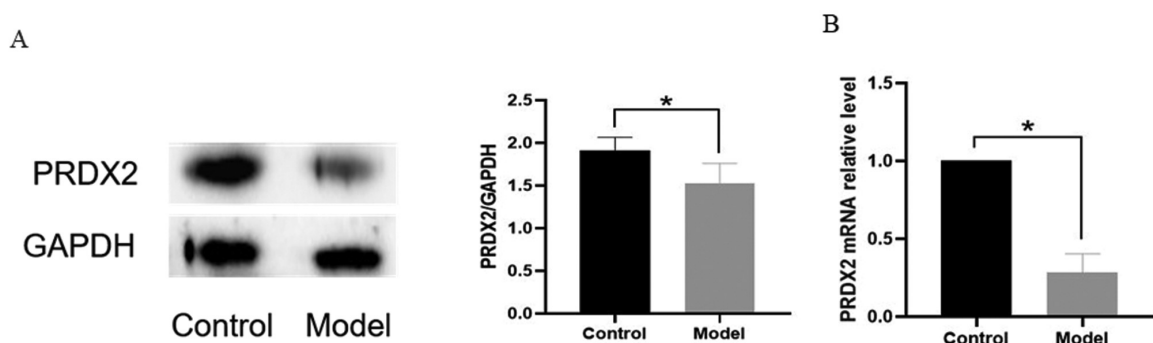
通过 Western blot 及 Q-PCR 检测分析发现,与对照组相比,模型组小鼠的 PRDX2 蛋白及 mRNA 水平均显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 3。免疫荧光检测结果显示,PRDX2 可在精子中表达,且对照组小鼠精子的荧光强度明显高于模型组,见图 4。

图1 两组小鼠精子密度及活动率的比较 (\* $P<0.05$ )Fig.1 Comparison of sperm density and activity rate in the two groups (\* $P<0.05$ )

Note: (A) Sperm count in the control and model groups. (B) Sperm motility in the control and model groups.

图2 两组小鼠雌激素和雄激素的比较 (\* $P<0.05$ )Fig.2 Comparison of estrogen and androgen in the two groups (\* $P<0.05$ )

Note: (A) Estrogen levels in the two groups. (B) Testosterone levels in the two groups.

图3 PRDX2在两组精子中蛋白及mRNA的表达 (\* $P<0.05$ )Fig.3 PRDX2 protein and mRNA expression of sperm in the two groups (\* $P<0.05$ )

Note: (A) PRDX2 protein expression in the two groups. (B) Relative expression of PRDX2 mRNA in the two groups.

#### 2.4 凋亡相关指标在两组精子中的表达

与对照组相比,模型组小鼠的 BCL-2 蛋白及 mRNA 表达均显著降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );但在 BAX 及 Caspase3 mRNA 的表达上,模型组显著高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );同时模型组小鼠的 BAX 及 Cleaved-Caspase3 的

蛋白表达亦高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 5。

#### 2.5 PRDX2 与凋亡相关指标的相关性分析

通过 Pearson 相关系数分析 PRDX2 与凋亡指标的相关性,结果可见 PRDX2 与 BCL-2 呈正相关,差异有统计学意义( $P<0.05$ );PRDX2 与 BAX, Caspase3 呈负相关,差异有统计学

意义( $P<0.05$ ),见表 2。

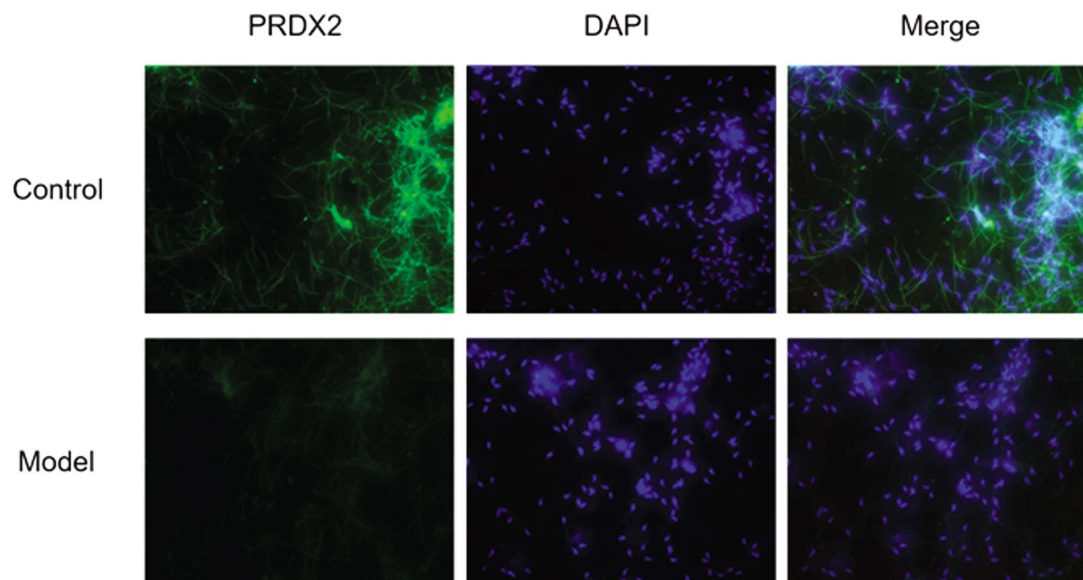


图 4 PRDX2 在两组小鼠精子中的表达 ( $\times 200$ )

Fig.4 PRDX2 expression of sperm in the two groups ( $\times 200$ )

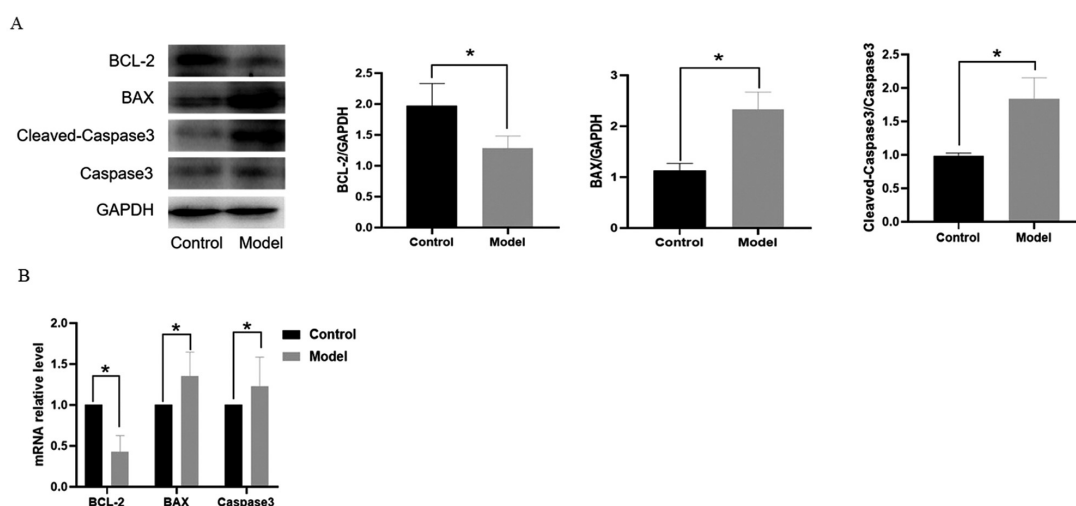


图 5 凋亡相关指标在两组精子中的表达

Fig.5 Apoptosis-related indicators expression of sperm in the two groups ( $*P<0.05$ )

Note: (A) BCL-2, BAX and Caspase3 protein expression in the two groups. (B) Relative expression of BCL-2, BAX and Caspase3 mRNA in the two groups.

表 2 PRDX2 与 BCL-2、BAX 和 Caspase3 的相关性分析

Table 2 Correlation analysis between PRDX2 and BCL-2, BAX, Caspase3

| PRDX2 | BCL-2   |        | BAX     |        | Caspase3 |        |
|-------|---------|--------|---------|--------|----------|--------|
|       | R Value | P      | R Value | P      | R Value  | P      |
|       | 0.612   | 0.034* | -0.661  | 0.019* | -0.662   | 0.019* |

Note:  $*P<0.05$ .

### 3 讨论

乙醇或乙醇的代谢产物乙醛对男性生殖功能有毒性作用,会导致生殖功能的下降<sup>[9]</sup>。本研究再次证实乙醇能够影响雄性小鼠的生殖能力,用乙醇处理雄性小鼠 12 周后,虽然精子密度变化不显著,但精子活动率明显减低,睾酮水平下降,雌激素水平升高。雄性动物的睾丸既是生精器官又是内分泌器官,乙醇

一方面能够损伤睾丸间质细胞及支持细胞,降低睾丸内睾酮水平,干扰精子生成的微环境,直接影响精子的生成和发育<sup>[6,7]</sup>。另一方面乙醇对下丘脑-垂体-性腺轴产生影响,干扰激素的生成与释放,间接影响精子的生成和发育<sup>[8]</sup>。也有研究认为乙醇的摄入会引起消化系统紊乱而造成某些维生素的缺乏,影响生精上皮产生精子的功能,但需进一步的组织病理学研究以明确其机制<sup>[9]</sup>。

本研究的结果显示,用乙醇处理 12 周的小鼠精子的 BCL-2 的表达明显减低,而 BAX 和 Caspase3 的表达增高,且 Cleaved-Caspase3 也显著增高,说明乙醇可致小鼠精子发生凋亡,与王冰松的研究结果一致<sup>[10]</sup>。促凋亡蛋白 BAX 和抗凋亡蛋白 BCL-2 稳态失衡,Caspase 3 在正常情况下以酶原的形式存在,细胞发生凋亡时,Caspase 3 被活化成为 Cleaved-Caspase 3,共同发挥促进精子凋亡的作用。研究显示细胞凋亡的发生与氧化应激关系密切,增加的氧化应激可通过活性氧介导细胞凋亡,调节 Bcl-2 蛋白家族来发挥功能,控制线粒体膜的通透性,释放细胞色素 C,激活 Caspase 等,对细胞凋亡过程产生重要影响<sup>[11-13]</sup>。

无论急性还是慢性的乙醇摄入,均会增加睾丸的氧化应激水平<sup>[14]</sup>,而增加和延长的氧化应激水平又会阻碍精子的发生和发育<sup>[15]</sup>。一方面由于精子的质膜含有大量的多不饱和脂肪酸,而细胞质中氧化产物的清除酶含量却很低,使精子更易受到氧化应激诱导的损伤<sup>[16]</sup>。另一方面乙醇能够影响线粒体功能,而线粒体是氧化应激的靶标,也是氧化应激相关信号通路发挥作用的场所<sup>[17]</sup>,因此乙醇会增加氧化应激而对线粒体功能产生负面影响。这提示乙醇降低精子活力的机制可能与其对线粒体功能的影响相关。线粒体不仅是细胞进行电子传递、内呼吸、三羧酸循环和氧化磷酸化的场所,也是细胞凋亡信号转导途径中起关键调节作用的细胞器。细胞凋亡的研究也已从集中在细胞核的变化上转变到和线粒体的功能失调联系在一起,线粒体在为细胞提供能量的同时,若其生成的活性氧不能得到有效清除,则可以影响相关基因的表达,造成线粒体膜脂质过氧化,使线粒体膜的通透性增加,线粒体跨膜电位降低<sup>[18]</sup>。而跨膜电位的下降,则是细胞凋亡级联反应过程中发生较早的事件,发生在细胞核凋亡之前。由此,联系细胞凋亡与线粒体功能失调的关键基因则成为研究的重点。

PRDX2 是 PRDX 家族的重要成员,是一种抗氧化蛋白,它可通过调节 ROS 的平衡保护 DNA、脂质、蛋白免受氧化应激损伤,维持体内的氧化平衡,改善线粒体功能<sup>[19,20]</sup>。PRDX2 存在于哺乳动物的精子中并具有过氧化物酶活性<sup>[21]</sup>,在人类睾丸和附睾中的 PRDX2,呈现细胞特异性,是人类精子的潜在抗氧化保护剂<sup>[22,23]</sup>。本研究的结果显示,与对照组相比,用乙醇处理 12 周的小鼠精子的 PRDX2 表达明显减低,提示乙醇损害了精子正常的抗氧化能力,致使氧化应激失衡,从而影响雄性小鼠的精子质量。但 PRDX2 的降低与精子凋亡的发生是否存在关联还未可知,为验证 PRDX2 抗氧化能力的丢失是否会诱导细胞发生凋亡,本研究利用统计学 Pearson 相关系数,分析了 PRDX2 与凋亡相关指标的相关性,可见 PRDX2 与凋亡相关指标均存在关联,PRDX2 与 BCL-2 的表达成正相关,而与 BAX 和 Caspase3 的表达成负相关。说明乙醇造成精子 PRDX2 表达的降低,致使过氧化物的沉积,使得氧化应激失衡,氧化应激的失衡又可造成线粒体功能的损伤,从而诱导精子发生凋亡,影响精子的生成和发育,最终损害雄性小鼠的生殖功能。

本研究以 PRDX2 为切入点研究乙醇所致雄性小鼠生殖损害的作用机制,从实验水平及统计学分析中初步证明乙醇降低 PRDX2 的表达,影响线粒体功能,可间接诱导细胞凋亡的发生,但存在一定局限性,未进一步证实 PRDX2 的表达与细胞凋

亡发生的直接作用机制。

## 参考文献(References)

- [1] McLachlan RI, de Kretser DM. Male infertility: the case for continued research[J]. MJA, 2001, 174: 116-117
- [2] Chia SE, Lim ST, Tay SK, et al. LimFactors associated with male infertility: a case control study of 218 infertile and 240 fertile men[J]. BJOG, 2000, 107: 55-61
- [3] Maneesh M, Dutta S, Chakrabarti A, et al. Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males[J]. Indian J Physiol Pharmacol, 2006, 50: 291-296
- [4] Neumann CA, Fang Q. Are peroxiredoxins tumor suppressors? [J]. Curr Opin Pharmacol, 2007, 7(4): 375-380
- [5] Muthusami KR, Chinnaswamy P. Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality [J]. Fertil Steril, 2005, 84: 919-924
- [6] Radhakrishnakartha H, Appu AP, Indira M. Ascorbic acid supplementation enhances recovery from ethanol induced inhibition of Leydig cell steroidogenesis than abstention in male guinea pigs [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 723: 73-79
- [7] Eid N, Kondo Y. Ethanol-induced mitophagy in rat Sertoli cells: Implications for male fertility[J]. Andrologia, 2018, 50(1): e12820
- [8] Frias J, Torres JM, Miranda MT, et al. Effects of acute alcohol intoxication on pituitary-gonadal axis hormones, pituitary-adrenal axis hormones, B-Endorphin and prolactin in human adults of both sexes[J]. Alcohol Alcohol, 2002, 37: 169-173
- [9] Purohit V, Bode JC, Bode C, et al. Alcohol, intestinal bacterial growth, intestinal permeability to endotoxin, and medical consequences: summary of a symposium[J]. Alcohol, 2008, 42: 349-361
- [10] 王冰松. 乙醇对雄性小鼠生殖力的影响[D]. 吉林大学, 2013
- [11] Lu WN, Zheng FP, Lai DW, et al. Xuezhikang reduced renal cell apoptosis in streptozocin-induced diabetic rats through regulation of Bcl-2 family[J]. Chin J Integr Med, 2016, 22(8): 611-618
- [12] Li W, Jiang B, Cao X, et al. Protective effect of lycopene on fluoride-induced ameloblasts apoptosis and dental fluorosis through oxidative stress-mediated Caspase pathways [J]. Chem Biol Interact, 2017, 261: 27-34
- [13] Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, et al. Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress[J]. Mol Med, 2015, 21: 109-22
- [14] Smits RM, Mackenzie-Proctor R, Yazdani A, et al. Antioxidants for male subfertility[J]. Urology A, 2019, 3: Cd007411
- [15] Dosumu OO, Akinola OB, Akang EN. Alcohol-induced testicular oxidative stress and cholesterol homeostasis in rats-the therapeutic potential of virgin coconut oil[J]. Middle East Fertil Society J, 2012, 17: 122-128
- [16] Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa[J]. Mol Reprod Dev, 1995, 42: 334-346
- [17] 谢锋. 乙醇对小鼠睾丸组织的氧化应激损伤及其对生精细胞中 Bcl-2/Bax 表达的影响[D]. 天津医科大学, 2011
- [18] Naghdi S, Slovinsky WS, Madesh M, et al. Mitochondrial fusion and Bid-mediated mitochondrial apoptosis are perturbed by alcohol with distinct dependence on its metabolism [J]. Cell Death Dis, 2018, 9 (10): 1028-1043

显减少, 应力纤维排列紊乱或者消失; B1 组、B2 组、B3 组 F-actin 分布减少, 应力纤维排列紊乱或者部分消失, 与 A 组相比, F-actin 的分布明显较多, 应力纤维排列较为整齐。可以判断, MT2A 能够抑制 F-actin 的解聚, 保护肺毛细血管内皮细胞骨架, 减少其通透性。因此我们猜测其可能有保护急性肺损伤的作用。

#### 4 结论

一定浓度的 LPS 能够对刺激肺毛细血管内皮细胞炎性因子 IL-6、TNF- $\alpha$  的释放, 造成细胞炎性损伤。同时, 也能够对肺毛细血管内皮细胞细胞骨架明显损伤, 证实 LPS 对肺毛细血管内皮细胞的损伤作用。通过实验证实, MT2A 能够减少炎性因子 IL-6、TNF- $\alpha$  释放, 同时对于肺毛细血管内皮细胞细胞骨架具有保护作用。所以我们认为 MT2A 能够对于 LPS 介导的肺损伤有保护作用。

#### 参考文献(References)

- [1] Hotchkiss R S, Swanson P E, Freeman B D, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction[J]. Crit Care Med, 1999, 27(7): 1230-1251
- [2] Berman R S, Frew J D, Martin W. Endotoxin-induced arterial endothelial barrier dysfunction assessed by an in vitro model[J]. Br J Pharmacol, 1993, 110(4): 1282-1284
- [3] Trepels T, Zeiher A M, Fichtlscherer S. The endothelium and inflammation[J]. Endothelium, 2006, 13(6): 423-429
- [4] Wang Y, Chen H, Li H, et al. Effect of angiopoietin-like protein 4 on rat pulmonary microvascular endothelial cells exposed to LPS[J]. Int J Mol Med, 2013, 32(3): 568-576
- [5] Freisinger E, Vasak M. Cadmium in metallothioneins[J]. Met Ions Life Sci, 2013, 11: 339-371
- [6] Takano H, Inoue K, Yanagisawa R, et al. Protective role of metallothionein in acute lung injury induced by bacterial endotoxin[J]. Thorax, 2004, 59(12): 1057-1062
- [7] Ashino T, Arima Y, Shioda S, et al. Effect of interleukin-6 neutralization on CYP3A11 and metallothionein-1/2 expressions in arthritic mouse liver[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 558(1-3): 199-207
- [8] Pedersen D S, Fredericia P M, Pedersen M O, et al. Metallic gold slows disease progression, reduces cell death and induces astrogliosis while simultaneously increasing stem cell responses in an EAE rat model of multiple sclerosis [J]. Histochem Cell Biol, 2012, 138(5): 787-802
- [9] Inoue K, Takano H, Shimada A, et al. Role of metallothionein in coagulatory disturbance and systemic inflammation induced by lipopolysaccharide in mice[J]. FASEB J, 2006, 20(3): 533-535
- [10] Takano H, Satoh M, Shimada A, et al. Cytoprotection by metallothionein against gastroduodenal mucosal injury caused by ethanol in mice[J]. Lab Invest, 2000, 80(3): 371-377
- [11] Mita M, Satoh M, Shimada A, et al. Metallothionein is a crucial protective factor against Helicobacter pylori-induced gastric erosive lesions in a mouse model [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294(4): G877-G884
- [12] Vasak M. Advances in metallothionein structure and functions [J]. J Trace Elem Med Biol, 2005, 19(1): 13-17
- [13] Takahashi S. Positive and negative regulators of the metallothionein gene (review)[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(1): 795-799
- [14] Liu Y, Liu H, Chen W, et al. EOLA1 protects lipopolysaccharide induced IL-6 production and apoptosis by regulation of MT2A in human umbilical vein endothelial cells[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 395(1-2): 45-51
- [15] Wolthuis E K, Vlaar A P, Choi G, et al. Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice[J]. Crit Care, 2009, 13(1): R1
- [16] Cosentino-Gomes D, Rocco-Machado N, Meyer-Fernandes J R. Cell signaling through protein kinase C oxidation and activation [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(9): 10697-10721
- [17] Bogatcheva N V, Verin A D. The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function [J]. Microvasc Res, 2008, 76(3): 202-207
- [18] Oikonomou N, Harokopos V, Zalevsky J, et al. Soluble TNF mediates the transition from pulmonary inflammation to fibrosis[J]. PLoS One, 2006, 1: e108
- [19] Roel M, Rubiolo J A, Temon E, et al. Crambescin C1 Exerts a Cytoprotective Effect on HepG2 Cells through Metallothionein Induction [J]. Mar Drugs, 2015, 13(8): 4633-4653
- [20] Lynes M A, Hidalgo J, Manso Y, et al. Metallothionein and stress combine to affect multiple organ systems [J]. Cell Stress Chaperones, 2014, 19(5): 605-611
- [21] Yang L, Wang J, Yang J, et al. Antioxidant metallothionein alleviates endoplasmic reticulum stress-induced myocardial apoptosis and contractile dysfunction[J]. Free Radic Res, 2015, 49(10): 1187-1198
- [22] Ma H, Su L, Yue H, et al. HMBOX1 interacts with MT2A to regulate autophagy and apoptosis in vascular endothelial cells [J]. Sci Rep, 2015, 5: 15121
- [23] Wu H, Zhou S, Kong L, et al. Metallothionein deletion exacerbates intermittent hypoxia-induced renal injury in mice [J]. Toxicol Lett, 2015, 232(2): 340-348
- [19] Kang DH, Lee DJ, Lee S, et al. Interaction of tankyrase and peroxiredoxin II is indispensable for the survival of colorectal cancer cells[J]. Nature Commun, 2017, 8(1): 40-54
- [20] Salzano S, Checconi P, Hanschmann EM, et al. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(33): 12157-12162
- [21] Manandhar G, Miranda-Vizuete A, Pedrajas JR, et al. Peroxiredoxin 2 and peroxidase enzymatic activity of mammalian spermatozoa[J]. Biol Reprod, 2009, 80(6): 1168-1177
- [22] Liu J, Wang W, Liu X, et al. Supplementation of cryopreservation medium with TAT-Peroxiredoxin 2 fusion protein improves human sperm quality and function[J]. Fertil Steril, 2018, 110(6): 1058-1066
- [23] Shi H, Liu J, Zhu P, et al. Expression of peroxiredoxins in the human testis, epididymis and spermatozoa and their role in preventing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage to spermatozoa [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2018, 56(3): 141-150

(上接第 1032 页)