

泌尿生殖医学基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002019

电离辐照损伤小鼠睾丸组织的比较蛋白质组学分析

罗芳芳¹, 李 敏², 唐 莉², 易辉燕², 何森泉², 王继生¹

(1. 西南医科大学药学院药剂学教研室, 泸州 646000;

2. 绵阳市第三人民医院、四川省精神卫生中心药品调剂科, 绵阳 621000)

【摘要】目的:运用生物信息学方法分析电离辐照损伤小鼠的睾丸组织, 提取出小鼠辐照组与正常组睾丸组织比较后的差异表达蛋白质, 分析其功能和生物学过程。**方法:**建立小鼠电离辐照损伤模型。运用比较蛋白质组学方法、iTRAQ 联合 LC-MS/MS 检测技术筛选出差异表达蛋白质, 进一步利用 David、Uniport 数据库对差异蛋白进行 GO、KEGG 富集分析。**结果:**通过比较小鼠辐照组与正常组睾丸组织共鉴定出蛋白质 1633 个, 包含差异蛋白 128 个, 其中 28 个表达上调, 100 个表达下调。GO 分析显示差异蛋白主要涉及氧化还原过程、精子发生、ATP 代谢等生物学过程。KEGG 分析显示主要分布在帕金森氏病、氧化磷酸化、代谢途径等 21 条信号通路中。**结论:**利用生物信息学方法对电离辐照损伤小鼠睾丸组织的蛋白质信息进行挖掘, 为进一步研究电离辐照对睾丸组织的辐射损伤机制及寻找生物标志物提供参考。

【关键词】电离辐照; 睾丸; 蛋白质组学; iTRAQ**【中图分类号】**R318; Q811.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-10-11

A comparative proteomic analysis of mouse testicular tissue injured by ionizing radiation

Luo Fangfang¹, Li Min², Tang Li², Yi Huiyan², He Miaoquan², Wang Jisheng¹

(1. Teaching and Research Section of Pharmaceutics School of Pharmacy, Southwest Medical University;

2. Department of Drug Dispensing, Mianyang Third People's Hospital, Sichuan Mental Health Center)

【Abstract】Objective: To investigate the differentially expressed proteins between mouse testicular tissue with ionizing radiation injury and normal testicular tissue using bioinformatics methods and the functions and biological processes of these proteins. **Methods:** A mouse model of ionizing radiation injury was established. Comparative proteomic methods, isobaric tags for relative and absolute quantitation, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry were used to screen out differentially expressed proteins, and then David and Uniport databases were used for gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) enrichment analyses of differentially expressed proteins. **Results:** A total of 1633 proteins were identified in mouse testicular tissue with ionizing radiation injury and normal testicular tissue, with 128 differentially expressed proteins in total, among which 28 were upregulated and 100 were downregulated. GO analysis showed that the differentially expressed proteins were mainly involved in biological processes such as oxidation-reduction process, spermatogenesis, and ATP metabolism. KEGG analysis showed that these proteins were mainly distributed in 21 signaling pathways including Parkinson's disease, oxidative phosphorylation, and metabolic pathways, etc. **Conclusion:** The bioinformatics method is used for data mining of proteins in mouse testicular tissue with ionizing radiation injury and normal testicular tissue, which provides a reference for further research on the mechanism of ionizing radiation in inducing testicular tissue injury and new biomarkers.

【Key words】ionizing radiation; testis; proteomics; isobaric tags for relative and absolute quantitation

辐射损伤是指由电离辐射所致的急性、迟发性或慢性的机体组织损害。电离辐射(如 X 线、质子、

中子、 α 或 β 粒子、 γ 射线)^[1]可直接或通过继发反应损害组织。大剂量辐射可在数天内产生可见的身体效应。小剂量所致的 DNA 变化可使被照射者产生慢性疾病,使他们的后代发生遗传学缺陷。随着电离辐射在医疗、卫生、航天科技、能源等行业的广泛应用,其对环境 and 人体健康的危害性越来越受到人们的重视。尤其是近年来男性生殖功能下降和不育

作者介绍: 罗芳芳, Email: 95498473@qq.com,

研究方向: 药剂学与临床药学。

通信作者: 王继生, Email: 24475434@qq.com,

基金项目: 四川省科技厅资助项目(编号: 2014JY0058)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190315.1452.002.html>

(2019-03-18)

症发病率逐步增多,它已成为威胁人类遗传健康的重要因素。

睾丸是男性最重要的性器官,制造精子、分泌雄激素,在男性生育功能的研究中占有重要地位^[2]。睾丸内有大量弯曲的精曲小管,其间含有间质细胞。精子的产生主要在精曲小管,易受温度、化学毒物、电离辐射等多种因素的影响,引起生精细胞超微结构损伤^[3],精子产生功能障碍。辐射诱导的雄性生殖细胞毒性,可造成机体出现生育力下降甚至不育^[4]。本实验采取生物信息学方法来研究电离辐射损伤机制,通过对辐照组和正常组小鼠睾丸组织的差异蛋白质信息进行挖掘,以期在蛋白质水平对辐照损伤后机体病理生理学功能改变情况进行较为全面的解析,为临床治疗及诊断提供理论基础和备选分子靶标。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 实验动物 选择清洁级昆明种雄性小鼠 20 只,体重为 (20 ± 2) g,从陆军军医大学实验动物中心购买,生产许可证号为:SCXK(军)2012-0011。将实验小鼠在昼夜比为 1:1 的环境下循环饲养,实验室保持室内温度 22℃~26℃,湿度 44%~65%。给予所有小鼠正常饮食、饮水,饲养 1 周以适应环境。该实验已经通过绵阳市第三人民医院伦理委员会审核通过,均遵守实验动物管理规范照料和使用原则。

1.1.2 主要实验试剂 iTRAQ 标记试剂盒(美国 ABSCIEX 公司),BCA 试剂盒(中国碧云天公司),H₂O(LCMS 级别)(美国热电公司),蛋白裂解液(美国 Bio-rad 公司),胰酶(美国 PROMEGA 公司),DTT(美国 Bio-rad 公司),Cocktail 蛋白酶抑制剂(德国 MERCK 公司),乙腈(德国 MERCK 公司),C18Cartridge(菲洛门公司),碘代乙酰胺(美国 Bio-rad 公司),十二烷基磺酸钠(美国 Bio-rad 公司),甲酸铵(美国 SIGMA 公司)。

1.1.3 主要实验仪器 高效液相色谱仪(LC-6AD 型,日本岛津),TRIPLE TOF5600 质谱仪配套软件(美国 ABSCIEX 公司),可见紫外分光光度计(WFZUV-2100 型,尤尼柯),-20℃低温冰箱(W-YL270 型,中科美菱),-80℃超低温冰箱(902-ULTS 型,美国 Thermo Fisher),低温冷冻干燥器(RVT4104 型,美国 Thermo Fisher),台式高速冷冻离心机(Eppendorf 5430R 型,Aallegria),真空离心浓缩仪(RVC 2-33 IR 型,德国 Christ),SpeedVac 真空离心机(SPD2010 型,美国 Thermo Savant),纯化仪(GE Healthcare)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 将实验小鼠随机分为空白组和辐照组(ionizing radiation,IR),每组 10 只,辐照前每天给予所有小鼠

正常饮食、饮水。

1.2.2 建立电离辐射损伤模型 IR 组小鼠常规饲养 7 d 后,将小鼠置于自制的纸盒内,给予 60Co γ 射线全身辐照,照射 1 次。辐照条件为⁶⁰Co 5 Gy,辐照率为 1.73 Gy/min。照射后 IR 组和空白组继续给予正常饮食、饮水。

1.2.3 标本收集 在辐照完成 7 d 后,用 3.5%水合氯醛麻醉小鼠,在无菌条件下解剖,取出小鼠睾丸组织,用 0.9%灭菌生理盐水反复灌注清洗后,迅速放置于液氮速冻,-80℃冰箱保存。实验结束后,用脱颈椎法处死小鼠。

1.2.4 睾丸组织蛋白质的提取、定量 在裂解缓冲液中加入 1 μ L 蛋白酶抑制剂、5 μ L 磷酸酶抑制剂和 10 μ L PMSF 至混合均匀后,分装于 2 支冰上预冷玻璃匀浆器中。取冻存的小鼠睾丸组织,空白组与 IR 组分别每 3 只小鼠为 1 组。每只取 1 个睾丸组织,PBS 清洗,按组别放入玻璃匀浆器中,加预冷的裂解缓冲液裂解,手动充分研磨,至均质匀浆。冰上超声破碎,功率为 80 W,超声 0.8 s,关闭 0.8 s,共 3 min。加入 5 倍体积预冷丙酮混匀,静置于-20℃环境沉淀 4 h,8 000 r/min,4℃,离心 5 min,弃上清液,取沉淀,反复操作,至沉淀变为白色。

采用 Bradford 法测定试验样品的蛋白质浓度:①根据朗伯比尔定律绘制标准品 BSA 的标准曲线,0.2 μ g/ μ L 蛋白标准也按 0.2、4、6、8、10 μ L 加至 96 孔板,每孔加纯水至最终体积为 20 μ L;②取实验样品稀释至可检测浓度范围,每管各取 20 μ L;③每孔加入 180 μ L BCA 工作液,混合,室温静置 10 min;④采用酶标仪于 595nm 波长处检测得到样品稀释液的吸光度,再运用 BSA 标准曲线计算得到样品蛋白质浓度。

1.2.5 睾丸组织蛋白质的还原烷基化及酶切、蛋白标记、SCX 分级 参照本课题组所建立起的实验方法^[6]。

1.2.6 质谱鉴定 将空白组与 IR 组里分别提取出的样本,3 个样本为 1 组,分别进样 3 次。各组样品用 Q-TOF(质谱 TOF MS 参数 m/z :350~1 500;accumulation time:0.25 s)进行 iTRAQ 标记样品的质谱信息的检测,获得 iTRAQ 标记肽段的序列,再根据肽指纹图谱鉴定出相应蛋白质。两 iTRAQ 离子的峰面积比值可以反映样品中多肽和蛋白质的相对含量。

1.3 统计学处理

实验数据进行 log₂ 转换之后,分别采用 Perseus 1.5.5.3 的 Significance A 方法进行差异蛋白筛选,以 $P < 0.05$ 且 $FC > 1.5$ 或 $FC < 0.667$ 进行差异蛋白筛选。筛选到的差异蛋白共同上调和共同下调蛋白作为最终的候选差异蛋白进行功能分析。

2 结果

2.1 蛋白质鉴定结果

经重庆医科大学生命科学院 iTRAQ 技术平台进行蛋白质组学测定,共鉴定出蛋白质 1 633 个,包含差异蛋白 128

个,其中 28 个高表达,100 个低表达。差异蛋白火山图如图 1 所示,X 轴是平均比值取 $\log_2$,Y 轴是 One Sample t test 计算得到的 P 值取 $-\log_{10}$ 。图中红色表示 IR 组较空白组表达上调的蛋白点,绿色表示表达下调的蛋白点,中间灰色的表示 2 组间无差异的蛋白点。表 1 和表 2 分别列出了 IR 组小鼠对比正常组小鼠睾丸组织差异表达上调和下调显著性前 10 位的蛋白质。

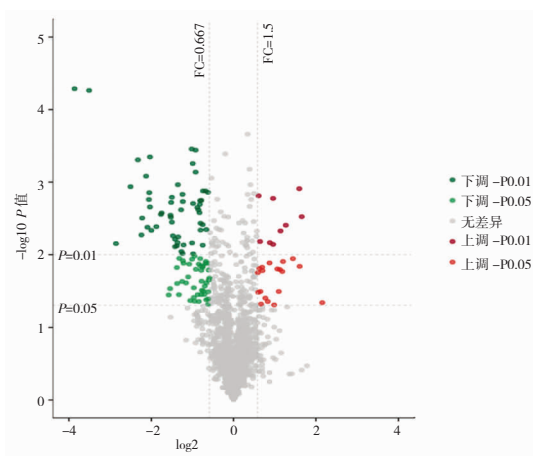


图 1 差异表达蛋白质火山图

2.2 GO 功能分析

运用 GO 在线工具对筛选出的 128 个差异蛋白质分别从生物过程、细胞组分和分子功能 3 方面进行功能注释和 Level 2 水平上的统计,结果显示如图 2 所示。采用 DAVID 6.8 对 IR 组与空白组睾丸组织中差异蛋白进行 GO 功能富集分析,分析结果前 10 位如图 3 所示。差异蛋白参与的生物过程中,显著富集的功能条目主要有氧化还原过程、精子发生、雄配子的产生、有性繁殖、多生物繁殖过程、ATP 代谢和生殖过程等;细胞组分类别富集到的功能条目主要有胞外体、细胞外囊泡、细胞外的细胞器、线粒体内膜等。分子功能类别富集到的功能条目主要有氧化还原酶活性、聚(A)RNA 结合、RNA 结合、氢离子跨膜转运活性、mRNA 结合等。

2.3 KEGG 通路分析

将 IR 组和空白组小鼠睾丸组织鉴定到的差异蛋白进行 KEGG PATHWAY 分析发现,共有 57 个差异表达蛋白,参与了 21 条生物信号通路,其中表达上调的蛋白有 13 个,表达下调的有 44 个。差异蛋白富集明显的 10 条信号通路结果如图 4 所示,从图中可以看出差异蛋白主要富集在帕金森病、亨廷顿病、氧化磷酸化、阿尔茨海默病、非酒精性脂肪肝、糖酵解途径、抗生素生物合成、代谢途径等相关的信号通路中。

表 1 上调显著性前 10 位的差异表达蛋白列表

蛋白代码	基因名	蛋白名称	中文名称	P 值	Log2FC
Q542H7	Fabp4	Fabp4 protein	脂肪酸结合蛋白 4	4.56E-02	2.157 943 2
Q91X72	Hpx	Hemopexin	血红素结合蛋白	2.98E-03	1.658 575 1
B2MWM9	Calr	Calreticulin	钙网蛋白	1.44E-02	1.603 668 4
Q642L7	Rps27a	MCG13441	MCG13441	1.22E-03	1.595 306 2
P16125	Ldhd	L-lactate dehydrogenase B chain	乳酸脱氢酶 B 链	1.13E-02	1.437 144 1
Q5EBQ2	Pebp1	MCG7941, isoform CRA_f	MCG7941, 同种型 CRA_f	3.91E-03	1.268 669 0
Q3U7Z6	Pgam1	Phosphoglycerate mutase	磷酸甘油酸变位酶	1.24E-02	1.197 048 4
Q99LX0	Park7	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	deglycase DJ-1 蛋白/核酸	1.71E-02	1.186 380 4
Q5SS40	Ywhae	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide, isoform CRA_c	酪氨酸 3-单加氧酶/色氨酸 5-单加氧酶活化蛋白,ε 多肽,同种型 CRA_c	4.68E-03	1.140 332 1
P24472	Gsta4	Glutathione S-transferase A4	谷胱甘肽 S-转移酶 A4	1.60E-02	1.118 393 0

表 2 下调显著性前 10 位的差异表达蛋白列表

蛋白代码	基因名	蛋白名称	中文名称	P 值	Log2FC
A1L3T6	Akap4	A kinase (PRKA) anchor protein 4	A 激酶锚定蛋白 4	5.14E-05	-3.861 476 6
O54962	Banf1	Barrier-to-autointegration factor	屏障自整合因子 1	5.43E-05	-3.513 079 3
Q9QZL9	Dkk1	Dickkopf-like protein 1	头样蛋白 1	7.03E-03	-2.855 070 3
Q9CXS4	Cenpv	Centromere protein V	着丝粒蛋白 V	1.15E-03	-2.506 267 4
Q545M2	Spa17	Sperm surface protein Sp17	精子表面蛋白 Sp17	4.95E-04	-2.326 398 9
Q925H1	Atad3	ATPase family AAA domain-containing protein 3	ATP 酶家族 AAA 结构域蛋白 3	5.32E-03	-2.242 300 9
Q9QZ82	Cyp11a1	Cholesterol side-chain cleavage enzyme, mitochondrial	线粒体胆固醇侧链裂解酶	3.14E-03	-2.225 801 2
Q60930	Vdac2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	电压依赖性阴离子选择性通道蛋白 2	8.27E-04	-2.129 523 8
Q9DAE2	Rbm12	RNA-binding motif protein, X-linked-like 2	RNA 结合基序蛋白,X 连锁样 2	4.17E-03	-2.095 645 5
Q3TX38	Vdac3	Uncharacterized protein	未表征的蛋白质	1.73E-03	-2.062 565 8

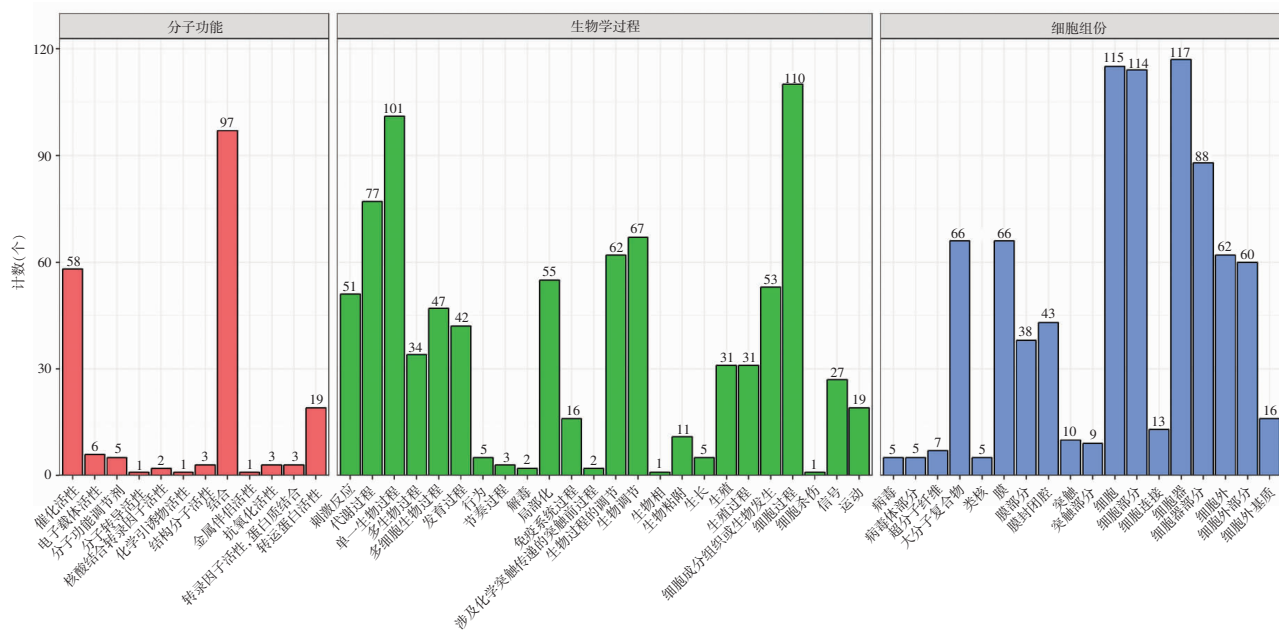


图2 基于 GO 注释的差异蛋白分类统计结果

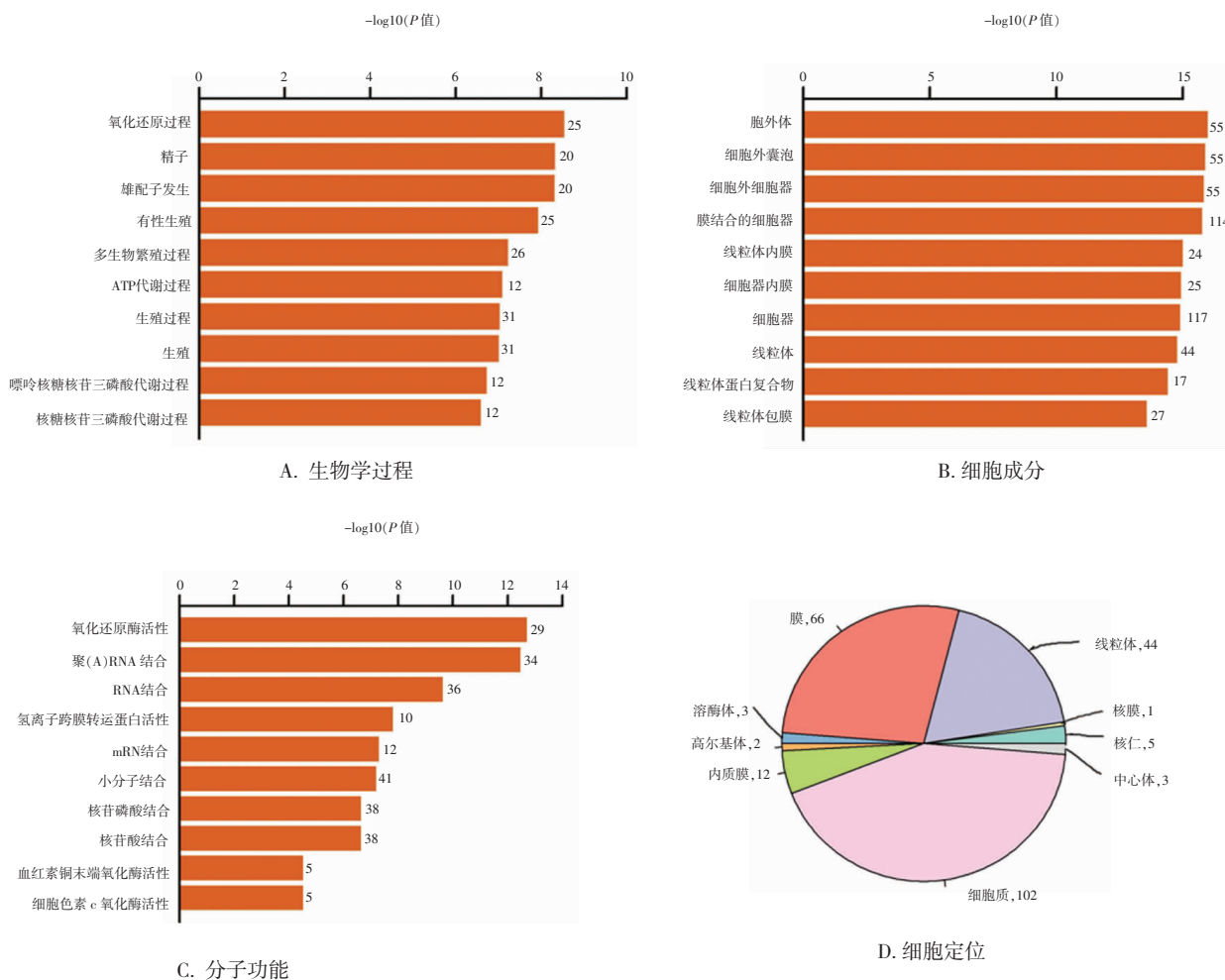


图3 IR 组与空白组小鼠睾丸差异蛋白的 GO 功能富集分析 (前 10 位)

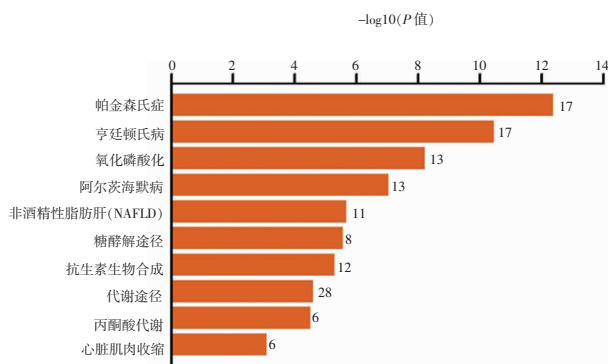


图 4 IR 组与空白组小鼠睾丸差异蛋白的 KEGG 富集分析 (前 10 位)

3 讨论

辐射对于动物机体的损伤机制目前尚不明确,涉及多个蛋白和信号通路。深入研究电离辐照后睾丸组织差异蛋白的生物学信息,可以从中寻找有价值的研究方向。本实验利用蛋白质组学方法、iTRAQ 联合 LC-MS/MS 检测技术筛选出 IR 组与正常组小鼠睾丸组织比较后的差异表达蛋白质,进一步利用 David、Uniport 数据库对差异蛋白进行 GO 分析和 KEGG 富集分析。

蛋白质组学研究方法与生物信息学技术结合使用,用于筛选各种疾病标志物,解释细胞在各种不同因素下的生理和病理机制^[7]。iTRAQ 技术利用多种同位素试剂标记蛋白多肽 N 末端或赖氨酸侧链基团,经高精度质谱仪串联分析,可同时比较多达 8 种样品之间的蛋白表达量,是近年来定量蛋白质组学常用的高通量筛选技术,它能够系统地研究组织或细胞中尽可能多的蛋白质,最多可鉴定 6 000 种。通过这些技术手段,本研究筛选出了对于本实验条件最为敏感的、最具生物意义和研究价值的蛋白质。

通过 IR 组小鼠与正常组小鼠睾丸组织的比较,共鉴别出 1 633 个蛋白质,筛选出差异蛋白 128 个,其中 28 个表达上调,100 个表达下调。结果显示差异表达显著性上调的前 10 个蛋白质是 Fabp4、Hpx、Calr、Rps27a、Ldhh、Pebp1、Pgaml、Park7、Ywhae、Gsta4,显著性下调的前 10 个蛋白质是 Akap4、Banf1、Dkk1、Cenpv、Spa17、Atad3、Cyp11a1、Vdac2、Rbm12、Vdac3。本实验研究显示 Fabp4 在小鼠接受

电离辐照后的睾丸组织中出现了明显的上调,约为正常组的 2.15 倍。Fabp4 是由巨噬细胞和脂肪细胞分泌的一种脂肪因子,是脂肪酸结合蛋白家族中的一员,与新陈代谢综合征、炎症和动脉粥样硬化等疾病的发生密切相关^[8]。在这些疾病过程中,Fabp4 的功能受到影响,从而引起代谢异常和炎症反应^[9-12]。以往研究表明,Fabp4 对调节糖脂代谢及胰岛素抵抗形成起重要作用,已成为治疗 2 型糖尿病及其相关疾病的潜在靶标^[13]。同时它也被发现与临床肾功能不全有关,并被提出作为肾小球损害的生物标志物^[14]。Calr 是一种 Ca²⁺结合分子伴侣,是内质网的固有蛋白。以往研究显示,Calr 主要存在于大鼠睾丸组织精细胞顶体中^[15],与精子发生密切相关^[16],从而为男性不育症的研究提供了方向。Park7 基因编码 DJ-1 蛋白,属于肽酶 C56 蛋白质家族。以往研究发现其具有多种生物学功能,包括细胞的恶性转化、雄性精子成熟与受精、促进细胞增殖及抵抗氧化应激等^[17],它的缺失还将导致常染色体隐性遗传早发性帕金森症^[18]。本实验研究显示 Akap4、Banf1 在小鼠接受电离辐照后的睾丸组织中出现了明显下调,分别为正常组的 -3.86 倍、-3.51 倍。以往研究资料显示,Akap4 与弱精症密切相关^[19],可作为评估男性生育能力的生物标志物^[20]。Banf1 是一种丰富的、高度保守的 DNA 结合蛋白。它参与多种途径,包括有丝分裂、病毒感染、染色质、核组装、基因调控和 DNA 损伤反应。它与后生动物的早期发育和人体生理活动密切相关^[21]。Spa17 属于癌症/睾丸抗原家族,在哺乳动物精子和卵子之间的细胞融合过程中起关键作用。它也被发现是癌症免疫治疗的理想靶点,在肿瘤发生和耐药中发挥作用^[22]。

采用 DAVID 6.8 对本实验筛选出的 128 个差异蛋白质进行 GO 功能富集分析,发现差异蛋白参与的生物过程主要涉及氧化还原过程、精子发生、雄配子的产生、有性繁殖、ATP 代谢等;差异蛋白主要分布在胞外体、细胞外囊泡、细胞外的细胞器、线粒体内膜等区域,影响氧化还原酶活性、RNA 结合、氢离子跨膜转运活性等生物学过程。KEGG 信号通路富集分析显示,57 个差异表达蛋白质主要富集在帕金森病、氧化磷酸化、非酒精性脂肪肝、糖酵解途径、代谢途径等 21 条信号通路中。本实验数据显示线粒体细胞色素 c 氧化酶 5a 亚基、线粒体细胞色素 bc1 复合物 6 亚基、细胞色素 bc1 复合物 8 亚基、细

胞色素 c 氧化酶亚基 6c、线粒体三功能酶 α 亚基这几个差异蛋白都参与了 7 条信号通路,并且均为低表达,他们主要分布在膜、线粒体、线粒体内膜中,与机体 ATP 的合成密切相关。可通过进一步研究上述相关通路信息,来了解电离辐照对小鼠睾丸组织的损伤机制。

综上所述,本实验采用蛋白质组学方法对电离辐照损伤小鼠与正常小鼠睾丸组织比较的差异蛋白数据进行挖掘,站在整体观的角度对电离辐照损伤睾丸组织的生物学过程、细胞组分、分子功能等信息进行分析,从而为研究电离辐照对小鼠睾丸组织的损伤机制及相关生物标志物的筛选提供参考。

参 考 文 献

- [1] Singh VK, Romaine PL, Seed TM. Medical countermeasures for radiation exposure and related injuries: characterization of medicines, FDA-approval status and inclusion into the strategic national stockpile[J]. *Health Phys*, 2015, 108(6): 607–630.
- [2] 刘方娟. 小鼠睾丸糖基化蛋白质组学研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2016.
- [3] 作春云, 唐开发, 张杜平, 等. 多次低剂量 X 线照射对小鼠睾丸组织形态及生精细胞 P53 和 bcl-2 蛋白表达的影响[J]. *中国男科学杂志*, 2013, 28(1): 17–19.
- [4] Fukunaga H, Kaminaga K, Sato T, et al. Application of an ex vivo tissue model to investigate radiobiological effects on spermatogenesis[J]. *Radiat Res*, 2018, 189(6): 661–667.
- [5] Xie J, Wang N, Dong X, et al. Graphdiyne nanoparticles with high free radical scavenging activity for radiation protection[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018[Epub ahead of print]. DOI: 10.1021/acsami.8b00949.
- [6] 李 敏, 赵 领, 刘真宏, 等. 川芎提取物对电离辐照损伤实验小鼠脾脏组织细胞凋亡相关蛋白表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(11): 1544–1548.
- [7] 南岩东, 杨拴盈, 田应选, 等. 基于鸟枪法蛋白质组学和生物信息学技术对肺鳞癌表达蛋白质谱的分析[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2011, 32(1): 10–16, 27.
- [8] 田 臻, 张昌军, 刁红录. 脂肪酸结合蛋白研究进展[J]. *生命科学*, 2017, 29(2): 164–169.
- [9] Kralisch S, Fasshauer M. Adipocyte fatty acid binding protein: a novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease[J]. *Diabetologia*, 2013, 56(1): 10–21.
- [10] Kajimoto K, Takayanagi S, Sasaki S, et al. RNA interference-based silencing reveals the regulatory role of fatty acid-binding protein 4 in the production of IL-6 and vascular endothelial growth factor in 3T3-L1 adipocytes[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(11): 5629–5636.
- [11] Ohira H, Fujioka Y, Katagiri C, et al. Butyrate attenuates inflammation and lipolysis generated by the interaction of adipocytes and macrophages[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2013, 20(5): 425–424.
- [12] He Y, Li Y, Zhang S, et al. Radicicol, a heat shock protein 90 inhibitor, inhibits differentiation and adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 436(2): 169–174.
- [13] 张 丽, 皇甫建, 肖 瑞. 脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白与 2 型糖尿病及其相关疾病的研究进展[J]. *医学综述*, 2016, 22(10): 1941–1944.
- [14] Obajdin J, Cotter M, Snelling S, et al. Fatty-acid binding protein 4 (FABP4) as a potential preclinical biomarker of drug-induced kidney injury[J]. *Toxicological Sciences*, 2018, 166(2): 441–450.
- [15] Nakamura M, Michikawa Y, Baba T, et al. Calreticulin is present in the acrosome of spermatids of rat testis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 186(2): 668–673.
- [16] Nakamura M, Moriya M, Baba T, et al. An endoplasmic reticulum protein, calreticulin, is transported into the acrosome of rat sperm[J]. *Experimental Cell Research*, 1993, 205(1): 101–110.
- [17] 王志勇, 汤玲珍, 高天文. DJ-1 抗氧化应激功能研究进展[J]. *第二军医大学学报*, 2012, 33(1): 88–91.
- [18] 姜钰霞, 张 钊, 王真真, 等. 帕金森病相关基因 DJ-1 与氧化应激[J]. *神经药理学报*, 2016, 6(1): 58–64.
- [19] 周俊豪. CRISP2 蛋白在弱精症精液精子中表达下调的分子机制及其临床意义[D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
- [20] 张 科. 精子蛋白质 AKAP4、GAPDH 和 SPANX 与 A23187 诱发顶体反应率在人工授精中的临床应用价值[D]. 长沙: 中南大学, 2011.
- [21] Jamin A, Wiebe MS. Barrier to Autointegration Factor (BANF1): interwoven roles in nuclear structure, genome integrity, innate immunity, stress responses and progeria[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2015, 34: 61–68.
- [22] Chiriva-Internati M. Sperm protein 17: clinical relevance of a cancer/testis antigen, from contraception to cancer immunotherapy, and beyond[J]. *International Reviews of Immunology*, 2011, 30(2–3): 138–149.

(责任编辑: 张辉洁)