

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.29.045

SPANX 蛋白的研究进展及其与男性生育力的相关性*

傅瑶 王行明 汤瑞玲 徐芳 范立青[△]

(中南大学基础医学院生殖与干细胞工程研究所 湖南长沙 410078)

摘要: 男性不育症病因十分复杂,遗传、环境、内分泌等许多因素都会导致男性不育。而现今临床上多依据精液常规分析对男性不育做出诊断和治疗,但仅依赖精液常规参数存在一定局限性。探寻男性生育力的潜在生物标志分子是当前男性不育的迫切需求。精子 X 染色体核结合精子蛋白(The sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome, SPANX)是在精子中表达的一类小分子蛋白,SPANX 蛋白家族基因定位在 X 染色体上,它随精子的成熟而迁徙,参与精子结构的形成,在精子成熟的不同时期,蛋白定位和蛋白表达均存在差异。在精液参数正常的不育男性和自发弱精症的男性中,SPANX 表达下调;同时在活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)阴性的精子中,SPANXC 表达降低,在 DNA 碎片率低的精子中,SPANX 表达增高;这些表明 SPANX 与男性生育力存在一定的相关性,但其与生育力的影响极其相关机制还需要进一步的研究。

关键词: SPANX; 男性生育力; DNA 碎片

中图分类号: Q492; R697 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)29-5793-04

The Advances of SPANX and Its Correlation with Male Fertility*

FU Yao, WANG Xing-ming, TANG Rui-ling, XU Fang, FAN Li-qing[△]

(Institute of Reproduction and Stem Cell Engineering, Central South University, Changsha, Hunan, 410078, China)

ABSTRACT: The aetiology of male infertility is complicated, multi-factors including genetic, environment and endocrine will lead to male infertility and the conventional analysis of sperm are the base of clinical diagnosis and treatment which is insufficient. The research of biomarkers of male infertility is in urgent need. The sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome (SPANX) are the protein family express in sperm and the SPANX gene locate on X chromosome and the SPANX immigrate along with the maturation of sperm and involved in the formation of sperm structure. During the different episode of sperm maturation, the location and expression of SPANX is different. The SPANX has a significantly lower expression in norm-parameter infertile men and idiopathic asthenozoospermia. And the expression of SPANX decreases in active oxygen species-negative (ROS-) group, but the SPANX overexpress in the low sperm DNA fragmentation group. The research indicated that SPANX has relevance to male fertility, but the mechanism of the relation needs further research.

Key words: SPANX; Male fertility; DNA fragmentation

Chinese Library Classification(CLC): Q492; R697 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)29-5793-04

前言

男性不育是成因复杂,发病率日益增高的病种。随着环境质量的下降,生活方式的改变,男性不育的问题日趋严重。不育症指的是有正常性生活且未避孕却未能于 1 年内成功妊娠^[1]。目前对男性不育的发生原因作用机制了解依然不够彻底,有些男性不育的原因仍不能确定。男性不育的病因包括:不良生活方式、环境污染、性激素分泌功能紊乱、代谢紊乱、遗传因素、精索静脉曲张隐睾射精障碍和梗阻等,同时仍有 30%~40% 的不育男性为特发性不育,其病因依然不能确定^[2,3]。影响男性生育力的主要因素有:基因^[4],如精子 DNA 异常^[4]、Y 染色体上基因变异拷贝数变化^[6],无精子症的相关易感位点^[7,8];内分泌,如

性激素分泌异常;环境,如感染^[9]、重金属超标^[10];不良生活方式,如烟酒成瘾^[11]等等,且男性生育力并受到各个因素之间的相互作用的调节^[12]。

临床上多依据精液常规分析作为男性不育诊断和辅助生殖治疗方式选择的基础,根据于少弱畸形精子症的不同严重程度,选择 IUI (宫腔内人工授精, Intrauterine insemination) 或 IVF-ET (体外受精-胚胎移植, in vitro fertilization-embryo transfer) 或 ICSI (卵细胞胞浆内单精子注射, Intracytoplasmic sperm injection) 治疗方式。但仅仅依赖常规精液参数的诊断对于辅助生殖技术的指导意义存在局限性,一方面存在许多精液参数正常,却不育的患者。另一方面,许多可育男性的精液参数却存在异常。IVF 受精失败的患者,主要与精子功能障碍有关如少精

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31472054)

作者简介:傅瑶(1992-),女,硕士研究生,研究方向:男性生育力,电话:13617315168, E-mail: guzi501@sina.com

△ 通讯作者:范立青,研究方向:男性生育力,发育生物学,电话:13974871287, E-mail: fanliqingszxx@sina.com

(收稿日期:2017-02-05 接受日期:2017-02-27)

子症,弱精子症和畸形精子症,但是有很多受精失败的患者,精液分析结果为正常^[12]。

男性生育力受到许多因素共同影响,在常规精子群体参数和形态参数外确实还存在许多决定男性生育能力的重要因素,其中,生物标志分子是精子生育能力最有希望的候选方向^[14]。

本文探讨了 X 染色体上迅速进化的 SPANX 蛋白家族基因,以及 SPANX 蛋白在精子成熟过程中复杂的时空定位与表达,及其与生育力的相关性。探索了 SPANX 作为男性生育力生物标志的潜在可能,为男性生育力的精准化个体化医疗,提供一个可能的思考方向。随着蛋白组学地广泛应用,对于 SPANX 的研究功能的日益增加,虽然仅有蛋白组学的研究无法充分验证 SPANX 的作用机制,但仍然为研究 SPANX 与生育力的相关性提供了极具启发性的方向。

1 SPANX:迅速进化的基因

精子 X 染色体核结合精子蛋白(The sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome, SPANX)基因定位在 X 染色体上,性染色体在生殖细胞的发育中起着十分关键的作用;对于男性来说,Y 染色体对男性不育的研究较为完善;但对有关 X 连锁基因的表达情况以及可能的影响的研究则相对缺乏。但 X 染色体上却有较多的睾丸特异性基因^[15];哺乳动物特异的一些基因尤其是 X 连锁的基因,经常在睾丸中特异性地转录^[16]。

SPANX 基因家族集中在 X 染色体上,编码 15-20 KDa 的小分子蛋白^[16];SPANX 蛋白基因定位在 X 染色体上,在人中,4 个 SPANXN 的基因组成串联重复序列定位在 X 染色体长臂 27 位,SPANXN 亚家族的 SPANX5 员定位在 X 染色体短臂 11 位^[18]。SPANX 基因含有两个外显子与一个内含子,内含子由 650 个碱基对组成,包含一个逆转录的长末端重复序列^[19]。

SPANX 蛋白是高速进化和扩增的基因,自然选择对它的进化有较强烈的影响^[18]。SPANX 基因的编码序列进化远远快于内含子和 5 端非编码序列的进化。同义和非同义的编码位点的进化机率之间有很强的相关性,二者相比非编码序列突变速率加快了两倍或更多^[18,20]。但是,SPANX 对男性生育力影响的相关机制十分复杂,还有待进一步研究,Hansen 等对 SPANX 基因家族的变异拷贝数 copy number variation (CNV)进行了研究,在对 67 名可育男性,50 名少精子症患者和 50 名无精子症患者的 SPANXA-E 和 SPANXB 分别进行芯片检测,发现各组均存在变异,但可育和不育男性的平均 CNV 没有差异^[21]。

2 SPANX 蛋白的定位与精子成熟过程中的时空表达

SPANX 蛋白家族是一类 15-20 kb 的小分子蛋白,精子中 SPANX 蛋白经常以二聚体或和其他蛋白结合的形式存在^[18];对于 SPANX 蛋白的定位,存在一定的争议。SPANX 蛋白在成熟精子细胞,以及一些黑色素瘤和白血病的肿瘤中有表达,SPANX 蛋白的过表达与前列腺癌的发育可能存在相关性^[17],在 40 % 的正常前列腺组织和前列腺癌的组织中,SPANX 蛋白均有表达,但是正常组织中,SPANX 只表达在核上,但在癌组织中,SPANX 在胞质中也有表达^[22]。SPANX 蛋白家族有两个

亚家族,SPANX-A/D 和 SPANXN(expression)。对 SPANXN 内含子的分类分析发现,SPANXN 是始祖形式,SPANXA/D 亚家族是从它进化而来^[18]。

成熟精子中大部分 SPANX 定位在精子头部和中段;而在精子细胞中,SPANX 则定位在质膜上^[8,14,17,23]。SPANX 蛋白在精子形态发生中出现,迁徙至精子头部的底部。通过免疫荧光发现 SPANX-N 蛋白在所有的哺乳动物中表达,定位在减数分裂后精子细胞,但在所有射出的精子中均存在,且定位在顶体区域,在成年人的一些非生殖组织和一些癌症中也有比较低的表达。SPANX-A/D 蛋白则定位在核膜上^[16]。SPANXA/D 是人类特有的高度特异性的蛋白。SPANXA/d 蛋白只在减数分裂后的细胞中出现^[16];Hominoid-specific 在成熟的精子和肿瘤中均有表达;SPANXA/D 家族包含 5 个成员 SPANX-A1, -A2, -B, -C, 和 -D^[16,19]。SPANX-A1, -A2, -C, -D 蛋白由 97 个氨基酸组成,SPANX A1 是精子特异结构的生物标志物,SPANX-B 则由 103 个氨基酸组成^[23],SPANXC 只在一小部分群体中表达^[20]。

SPANX 蛋白在精子中的定位、表达与精子成熟过程息息相关,且有待进一步的研究。SPANX 蛋白在精子细胞核皱缩时存在特异的形态学上的变化,并且被固定在精子细胞核膜的非顶体区域^[20];SPANX-A/D 蛋白最先发现是在早期高尔基体期的圆形精子的顶体形成时期,随着核的压缩,SPANX-A/D 蛋白从核顶体后方的核区域逐渐向核底部迁移。在成熟精子细胞中,SPANX-A/D 蛋白与残余核膜结合存在于剩余的胞质中^[23]。SPANX-A/D 不仅随着精子的成熟由精子顶体尾部逐渐迁移至残余核膜,且只在在精子细胞和成熟精子的亚群中才有表达,射出精子中只有 50 % 的精子表达 SPANX-A/D^[19],这表明 SPANX-A/D 在精子核中存在精密复杂的时空表达模式。大量精子细胞,SPANX 蛋白不表达,但在成熟精子中 SPANX 蛋白大量存在^[23]。

3 SPANX 与生育力的相关性

SPANX 结合在精子内陷处,SPANX 抗体能识别射出精子中的精子内陷和胞质小滴。精子内陷对应精子核中有浓缩染色体核表面和囊泡的凹陷。核囊泡来源于精母细胞和精子细胞的核。精子内陷的出现通常与哺乳动物的生育力下降相关,然而生育力与精子核上大体积的内陷之间的联系依然存在争议^[18]。SPANX 蛋白的时空表达变化提示它与精子成熟过程紧密相关,同时,它也与男性生育力存在一定相关性,不育男性和弱精男性中,SPANX 的表达下调。通过 MALDI-TOF/TOF 分析,相比可育男性精液标本,SPANX 蛋白在精液参数正常的不育男性的精液标本表达下调^[24]。自发性弱精症是导致男性不育和精子活力下降的重要因素。对正常精子和弱精症精子的细胞裂解物的富含磷酸盐的碎片进行 UPLC-MS 电泳,发现 SPANXB 表达下调。相比活力正常的正常的精子,自发性弱精症患者的精子 SPANXB 的蛋白表达下调^[25]。

精子生育力的生物标志物能从分子水平反映精子生育力,也能揭示单个精子的生育潜能。关于 SPANX 的蛋白组学的结果提示其可能为潜在的反映精子生育力的生物标志物。而现在的临床诊断多是对精子的群体参数进行分析,对于精子个体的

生育潜能缺乏必要的诊断和评估手段,但在 ICSI 中只应用单个精子进行注射,因此需要能对精子个体进行生育力评估的生物标志物。

但是由于男性生育力说到多因素的综合调控。因此,单一的生物标志物并不能代表精子的生育潜能,而是需要综合多个生物标志物来精准预测精子生育力。同时因为精子代谢、运动、顶体反应、精卵识别和结合等过程涉及的蛋白质种类与数目均十分庞大,必须借助蛋白组学的方法才能更加高效地分析精子中蛋白的表达情况。

3.1 氧自由基对精子的影响

ROS 是精子发育获能过程中必需的成分,ROS 过高与精子发育功能生育力的异常相关^[26]。正常生理浓度的 ROS 是精子成熟超激活获能,透明带结合,顶体反应,精卵结合所必需的^[27]。活性氧自由基对精子的存活及运动均能造成影响,过高浓度的自由基会从周围化合价稳定的分子结构中夺取电子。活性氧自由基能诱导谷胱甘肽化,硝化酪氨酸和二酪氨酸的形成等蛋白质修饰^[28],改变精子蛋白功能。超生理浓度 ROS 对精子密度精子活力形态均有不利影响^[29]。畸形精子症与过多的 ROS 相关^[30],和正常供精者相比,少弱畸精症和少弱精症患者 ROS 浓度更高^[30],30 %-80 % 的男性亚生育力的成因是精子氧化压力造成的损害^[32]。活性氧自由基能致脂质过氧化,DNA 损伤;精子是高度特化的细胞,细胞质含量极少,缺乏相应的抗氧化物质。精子细胞质中含有的抗氧化物有限,且质膜中富含易受脂质过氧化影响的不饱和脂肪酸,尤其容易受到氧自由基的损害,脂质过氧化会使膜通透性增加,导致对鞭毛运动必需的 ATP 外流^[33]。

3.2 DNA 碎片对精子的影响

精子的 DNA 通过高度折叠来避免受到周围不利环境的损害,但是精子 DNA 仍会因为氧化压力、染色质包装过程中的改变、凋亡而受到损伤;其中,氧化应激压力是造成 DNA 损伤的重要原因^[34]。DNA 碎片是男性不育的重要原因^[35],精子 DNA 损伤是男性不育的重要诊断指标^[36]。人类射出精子是一群异质的细胞群体,群体内精子存在不同成熟程度不同功能特点,有能够获能和顶体反应的活动精子群体,和不动的凋亡标记的精子群体^[36]。在射出精子中,有 DNA 碎片的精子和有原始凋亡标记的精子之间存在很高的相关性^[38]。10 % 的可育男性和 20 % -25 % 的不育男性中精子 DNA 损伤较高^[39]。尽管对不育男性进行的 DNA 的完整性的常规检测仍存在争议^[40],但 DNA 损失的检测被认为可以作为精子功能评估的独立指标。

3.3 SPANX 蛋白与氧自由基及 DNA 碎片的相关性

SPANX 蛋白在精子成熟过程中,结合在核膜与胞质中,SPANXC 蛋白的表达可能与精子内的氧化应激水平相关。Hamanda 将 20 名供精者和 32 名不育男性的精液标本分成活性氧自由基阳性和阴性两组,进行差异蛋白质组学。SPANXC 在活性氧自由基阴性的群体中表达量较低^[41]。SPANX 蛋白也与 DNA 的碎片率相关,Intasqui 对 24 名正常男性和 34 名精液参数异常的男性的精液标本进行电泳和质谱分析,发现 SPANX 蛋白和精子活动性与 DNA 碎片率的异常相关^[43]。在 DNA 碎片较低的精子中,SPANXA/D 的大部分蛋白过表达。使

用彗星电泳分析精子 DNA 碎片,对高 DNA 碎片组和低 DNA 碎片组进行二维电泳,在精子 DNA 碎片较低的群体中,SPANXA、SPANXB、SPANXC、SPANXD 过表达^[42]。但仅有蛋白组学的研究还不足以探究清楚 SPANX 与氧化自由基和 DNA 碎片的相关性,尤其是氧自由基、DNA 碎片与 SPANX 三者之间的关系,比如氧化自由基会导致 DNA 碎片的产生,这在 Hamanda 与 Intasqui 的研究存在一定的矛盾,可能的原因在于,1)ROS 并不是导致 DNA 碎片的唯一因素,2)二者的实验分组中均为单一地分析 ROS 或 DNA 与精子蛋白表达的关系,比如并没有 ROS 阴性组中进一步区分 DNA 碎片高组和 DNA 碎片低组。

4 结论与展望

SPANX 在不同生育力的群体中存在差异表达,与氧自由基、DNA 碎片程度这些影响精子活力、生育力的因素存在相关性,这些都让 SPANX 蛋白成为了潜在的生育力标志物。但现今,对于 SPANX 对生育力的影响及其相关机制,还需进一步的研究。

SPANX 蛋白因其与肿瘤的密切相关而广泛被关注,但是其与生育力的研究却十分有限。SPANX 蛋白作为睾丸组织中高表达的一类蛋白,在宏观水平,与不育症及弱精症均有表达均下降^[24]。在分子水平,SPANX 蛋白结合在残余核膜上,与精子成熟、精子结构的形成,影响精子功能的氧自由基水平、DNA 碎片率均存在相关性^[24]。

SPANX 蛋白在精子成熟过程,随着顶体形成,核浓缩等精子生理过程,不断迁徙^[17],SPANX 存在的时间,空间定位很有可能参与到精子结构的组成。SPANX 表达量的高低也很能反应精子的氧化应激水平,DNA 完整性。精子生育力受到多重因素地共同影响,SPANX 对精子生育力的影响,也可能并不是单纯的作用,而是涉及到不同时间阶段,不同细胞定位,不同组织结构、不同表达量的时空调控网络,对这一调控的理解需要更进一步的不同分子水平的研究。

本文对 SPANX 最新的研究成果进行分析后,推测 SPANX 蛋白可能与精子氧化应激的过程相关,从而进一步与精子的生育力相关。这为后续对精子 SPANX 蛋白的继续研究提供了新的切入点。SPANX 蛋白与生育力的相关性,可能让其成为新的精子生育力的生物标志物,提示精子生育力受影响的原因。这将能对临床上传统的常规精液分析方法进行补充和推进,为临床上更好地诊断男性不育的病因也有一定的裨益,为男性不育的精准化诊断和治疗疾病提供了新的思路。

参考文献(References)

- [1] Trost L W, Nehra A. Guideline-based management of male infertility: Why do we need it?[J]. Indian J Urol, 2011, 27(1): 49-57
- [2] 郭继梅,吕玲,宫玉环. 男性不育的病因及治疗新进展[J]. 医学综述, 2013, 19(22): 4138-4140
- Guo Ji-mei, Lv Ling, Gong Yu-huan. Advances in Cause and Treatment of Male Infertility [J]. Med Recapitulate, 2013, 19 (22): 4138-4140
- [3] Kolesnikova L I, Kolesnikov S I, Kurashova N A, et al. Causes and

- Factors of Male Infertility[J]. Vestn Ross Akad Med Nauk, 2015, (5): 579-584
- [4] Zalata A, El-Samanoudy A Z, Shaalan D, et al. Seminal clusterin gene expression associated with seminal variables in fertile and infertile men[J]. J Urol, 2012, 188(4): 1260-1264
- [5] Selit I, Basha M, MaraeeA, et al. Sperm DNA and RNA abnormalities in fertile and oligoasthenoteratozoospermic smokers [J]. Andrologia, 2013, 45(1): 35-39
- [6] Lo G D, Chianese C, Sanchez-Curbelo J, et al. Clinical relevance of Y-linked CNV screening in male infertility: new insights based on the 8-year experience of a diagnostic genetic laboratory [J]. Eur J Hum Genet, 2014, 22(6): 754-761
- [7] Hu Z, Li Z, Yu J, et al. Association analysis identifies new risk loci for non-obstructive azoospermia in Chinese men[J]. Nat Commun, 2014, 5: 3857-3863
- [8] Hu Z, Xia Y, Guo X, et al. A genome-wide association study in Chinese men identifies three risk loci for non-obstructive azoospermia[J]. Nat Genet, 2012, 44(2): 183-186
- [9] Diao R, Fok K L, Chen H, et al. Deficient human beta-defensin 1 underlies male infertility associated with poor sperm motility and genital tract infection[J]. Sci Transl Med, 2014, 6(249): 108r-249r
- [10] Li C J, Yeh C Y, Chen R Y, et al. Biomonitoring of blood heavy metals and reproductive hormone level related to low semen quality [J]. J Hazard Mater, 2015, 300: 815-822
- [11] La Maestra S, De Flora S, Micale R T. Does second-hand smoke affect semen quality?[J]. Arch Toxicol, 2014, 88(6): 1187-1188
- [12] Mostafa T, Taymour M. TNF-alpha -308 polymorphisms and male infertility risk: A meta-analysis and systematic review [J]. J Adv Res, 2016, 7(2): 185-192
- [13] 刘德一, H W GordonBaker. 精子功能检测与男性不育诊治的新进展[J]. 中华男科学杂志, 2007, 13(2): 99-108
Liu De-yi, GordonBaker HW. Assessment of Human Sperm Function and Clinical Management of Male infertility[J]. National Journal Andrology, 2007, 13(2): 99-108
- [14] Zhu W B, Long X Y, Fan L Q. Male fecundity prognosis and infertility diagnosis in the era of personalised medicine[J]. Asian Journal of Andrology, 2010, 12(4): 463-467
- [15] Stouffs K, Lissens W. X chromosomal mutations and spermatogenic failure[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1822(12): 1864-1872
- [16] Maine E A, Westcott J W, Prechtl A M, et al. The cancer/testis antigens SPANX-A/C/D and CTAG2 promote breast cancer invasion[J]. Oncotarget, 2016, 7(12): 14708-14726
- [17] Salemi M, Calogero A E, Zaccarello G, et al. Expression of SPANX proteins in normal prostatic tissue and in prostate cancer [J]. Eur J Histochem, 2010, 54(3): e41
- [18] Kouprina N, Mullokanov M, Rogozin I B, et al. The SPANX gene family of cancer/testis-specific antigens: rapid evolution and amplification in African great apes and hominids[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(9): 3077-3082
- [19] Kouprina N, Noskov V N, Pavlicek A, et al. Evolutionary diversification of SPANX-N sperm protein gene structure and expression[J]. PLoS One, 2007, 2(4): e359
- [20] Westbrook V A, Schoppee P D, Vanage G R, et al. Hominoid-specific SPANXA/D genes demonstrate differential expression in individuals and protein localization to a distinct nuclear envelope domain during spermatid morphogenesis [J]. Mol Hum Reprod, 2006, 12 (11): 703-716
- [21] Hansen S, Eichler E E, Fullerton S M, et al. SPANX gene variation in fertile and infertile males[J]. Syst Biol Reprod Med, 2010, 55: 18-26
- [22] Salemi M, Calogero A E, Castiglione R, et al. Expression of SpanX proteins in normal testes and in testicular germ cell tumours [J]. Int J Androl, 2006, 29(2): 368-373
- [23] Salemi M, Calogero A E, Di Benedetto D, et al. Expression of SPANX proteins in human-ejaculated spermatozoa and sperm precursors[J]. Int J Androl, 2004, 27(3): 134-139
- [24] Xu W, Hu H, Wang Z, et al. Proteomic characteristics of spermatozoa in normozoospermic patients with infertility [J]. J Proteomics, 2012, 75(17): 5426-5436
- [25] Shen S, Wang J, Liang J, et al. Comparative proteomic study between human normal motility sperm and idiopathic asthenozoospermia[J]. World J Urol, 2013, 31(6): 1395-1401
- [26] Ko E Y, Sabanegh E J, Agarwal A. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity[J]. Fertil Steril, 2014, 102(6): 1518-1527
- [27] Agarwal A, Virk G, Ong C, et al. Effect of oxidative stress on male reproduction[J]. World J Mens Health, 2014, 32(1): 1-17
- [28] Morielli T, O'Flaherty C. Oxidative stress impairs function and increases redox protein modifications in human spermatozoa[J]. Reproduction, 2015, 149(1): 113-123
- [29] Agarwal A, Sharma R K, Sharma R, et al. Characterizing semen parameters and their association with reactive oxygen species in infertile men[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2014, 12: 33-43
- [30] Agarwal A, Tvrdá E, Sharma R. Relationship amongst teratozoospermia, seminal oxidative stress and male infertility [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2014, 12: 45-56
- [31] Agarwal A, Mulgund A, Sharma R, et al. Mechanisms of oligozoospermia: an oxidative stress perspective[J]. Syst Biol Reprod Med, 2014, 60(4): 206-216
- [32] Showell M G, Mackenzie-Proctor R, Brown J, et al. Antioxidants for male subfertility[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2014, 12: D7411
- [33] Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective[J]. Hum Reprod Update, 2008, 14(3): 243-258
- [34] Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility[J]. Reprod Biomed Online, 2014, 28(6): 684-703
- [35] Ashok A, Damayanthi D, Jacques H, et al. Proteomics, oxidative stress and male infertility [J]. Reprod BioMed Online, 2014, 29(1): 32-58
- [36] Lewis S E. Sperm DNA fragmentation and base oxidation [J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 791: 103-116
- [37] Sakkas D. Novel technologies for selecting the best sperm for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection [J]. Fertil Steril, 2013, 99(4): 1023-1029

- [14] Musa N, Murthy S, Kissoon N. Pediatric sepsis and septic shock management in resource-limited settings[J]. Intensive Care Medicine, 2016, 42(12): 1-3
- [15] Lalgudi G S, Jayashree M. Dopamine in Pediatric Fluid-Refractory Septic Shock: Too Early to Sound the Death Knell?[J]. Critical Care Medicine, 2016, 44(2): e110
- [16] Murphy R A. Pediatric Sepsis Biomarker Risk Model-II: Redefining the Pediatric Sepsis Biomarker Risk Model with Septic Shock Phenotype[J]. Journal of Emergency Medicine, 2017, 52(2)
- [17] Leruste A, Rambaud J, Picard C, et al. Successful pediatric ECMO in a rare case of septic shock due to a community-acquired Legionella infection[J]. Med Mal Infect, 2017, 47(1): 68-70
- [18] Manzoli T F, Troster E J, Ferranti J F, et al. Prolonged suppression of monocytic human leukocyte antigen-DR expression correlates with mortality in pediatric septic patients in a pediatric tertiary Intensive Care Unit [J]. Journal of Critical Care, 2016, 33(4): 84-89
- [19] Darmaros L F, Delgado A F, Carvalho W B D, et al. Corticosteroids in septic shock: What should the decision in pediatrics be?[J]. Rev asoc med bras, 2016, 62(6): 482-484
- [20] Wong H R, Atkinson S J, Cvijanovich N Z, et al. Combining Prognostic and Predictive Enrichment Strategies to Identify Children With Septic Shock Responsive to Corticosteroids [J]. Critical Care Medicine, 2016, 44(10): e1000
- [21] Ramaswamy K N, Singhi S, Jayashree M, et al. Double-Blind Randomized Clinical Trial Comparing Dopamine and Epinephrine in Pediatric Fluid-Refractory Hypotensive Septic Shock [J]. Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies, 2016, 17(11): e502
- [22] O'Hearn K, McNally D, Choong K, et al. Steroids in fluid and/or vasoactive infusion dependent pediatric shock: study protocol for a randomized controlled trial[J]. Trials, 2016, 17(1): 238
- [23] Jibawi A, Cade D. Sepsis and septic shock [J]. Nature Reviews Disease Primers, 2016, 2: 16046
- [24] Poddar B, Gurjar M, Singh S, et al. Reduction in procalcitonin level and outcome in critically ill children with severe sepsis/septic shock-A pilot study[J]. Journal of Critical Care, 2016, 36(5): 230
- [25] Tuuri R E, Gehrig M G, Busch C E, et al. "Beat the Shock Clock"[J]. Clinical Pediatrics, 2016, 55
- [26] Goodwin M, Ito K, Gupta A H, et al. Protocolized care for early shock resuscitation[J]. Current Opinion in Critical Care, 2016, 22(5): 1
- [27] Tak R, Semmekrot B, Warris A, et al. Bacterial Tracheitis and Septic Shock[J]. Pediatric Infectious Disease Journal, 2016, 35(2): 226
- [28] Linnaeus M E, Notrica D M. Infected cystic hygroma resulting in septic shock and respiratory failure: A case report[J]. Journal of Pediatric Surgery Case Reports, 2016, 9(C): 19-22
- [29] Stortini B, Elwood C, Kielly M, et al. Septic Shock in a 12 Year Old With Recent Diagnosis of Ohvira [J]. Journal of Pediatric & Adolescent Gynecology, 2016, 29(2): 186
- [30] Stortini B, Elwood C, Kielly M, et al. Septic Shock in a 12 Year Old With Recent Diagnosis of Ohvira [J]. Journal of Pediatric & Adolescent Gynecology, 2016, 29(2): 186

(上接第 5796 页)

- [38] Greenstein B. The physiology of reproduction 2nd edition 1994 editors-in-chief: ernst knobii, jimmy D Neill: New York Raven Press[J]. Endocrine, 1995, 3(4): 313-324
- [39] O'Brien J, Zini A. Sperm DNA integrity and male infertility[J]. Urology, 2005, 65(1): 16-22
- [40] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Multiple gestation associated with infertility therapy: an American Society for Reproductive Medicine Practice Committee opinion[J]. Fertil Steril, 2012, 97(4): 825-834
- [41] Hamada A, Sharma R, du Plessis S S, et al. Two-dimensional differential in-gel electrophoresis-based proteomics of male gametes in relation to oxidative stress[J]. Fertil Steril, 2013, 99(5): 1216-1226
- [42] Intasqui P, Camargo M, Del G P, et al. Unraveling the sperm proteome and post-genomic pathways associated with sperm nuclear DNA fragmentation [J]. J Assist Reprod Genet, 2013, 30 (9): 1187-1202
- [43] Behrouzi B, Kenigsberg S, Alladin N, et al. Evaluation of potential protein biomarkers in patients with high sperm DNA damage[J]. Syst Biol Reprod Med, 2013, 59(3): 153-163