DOI: 10.16016/j.1000-5404.201909114

2019 年度重庆市出版专项资金资助栏目论文

低氧对小鼠生精小管的损伤作用及对精母细胞凋亡的诱导作用

殷 骏,柳君泽,倪 兵,唐中伟,高志奇,赵 力,张梦洁,陈德伟,何文娟,廖卫公 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)高原军事医学系:病理生理学教研室,极端环境医学教育部重点实验室,全军高原医学重点实验室

[摘要] **目的** 探讨低氧暴露下小鼠生精小管病理损伤情况以及低氧对小鼠精母细胞(GC-2spd,GC-2)细胞凋亡的影响。**方法** 40 只 3 周龄雄性 Balb/c 小鼠按照 Excel Random 函数随机分为常氧组、低氧 15、30、60 d 组,低氧各组小鼠分别暴露于模拟海拔 6 000 m 低压舱中减压 15、30、60 d,常氧组在平原(海拔 300 m)喂养,减压结束后取睾丸组织,HE 和 TUNEL 染色检测睾丸生精小管的病理损伤;将体外培养的 GC-2spd 细胞,随机分为低氧组和常氧组,低氧组细胞置 1%氧和 5%二氧化碳低氧培养箱中培养 48、60 和 72 h,常氧组置 21%氧和 5%二氧化碳培养箱中培养 48、60 和 72 h。采用流式细胞技术、TUNEL 检测法、培养液上清乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)活性测定和培养液 caspase-3/8/9 活性测定等方法来检测 GC-2 细胞凋亡情况。**结果** 低氧 15、30、60 d 组小鼠睾丸生精小管生精细胞凋亡率分别为(37.2±5.4)%、(66.3±6.4)%、(73.5±8.2)%,均显著高于常氧组凋亡率(4.6±1.4)%, $P<0.01$,流式细胞术检测低张性缺氧(低氧)48、60、72 h 组细胞凋亡率为(15.43±1.47)%、(44.10±14.10)%、(63.36±12.74)%,显著高于常氧 48、60、72 h 组细胞的凋亡率(4.18±1.40)%、(5.45%±2.30)%、(14.47±8.21)%,($P<0.01$),TUNEL 法显示低氧 48、60、72 h 组凋亡细胞数/视野(200×)为 22±3、55±5、82±12,显著高于常氧 48、60、72 h 组 5±1、8±2、15±4($P<0.01$),低氧 48 h 组 LDH 值(1.28±0.18)U/mL 显著高于常氧 48 h 组(0.48±0.09)U/mL($P<0.01$),低氧 48 h 组 caspase-3/8/9 值分别为 12.20±0.42、2.73±0.60、10.90±0.40,显著高于常氧 48 h 组 7.67±0.45、16.20±0.56、7.03±0.25,($P<0.01$)。**结论** 低氧对小鼠生精小管的损伤可能是通过诱导精母细胞凋亡产生。

[关键词] 凋亡;低氧;精母细胞

[中图法分类号] R321.1; R329.28; R364.4 [文献标志码] A

Hypoxia causes seminiferous tubule damage by inducing apoptosis of spermatocytes in mice

YIN Jun, LIU Junze, NI Bing, TANG Zhongwei, GAO Zhiqi, ZHAO Li, ZHANG Mengjie, CHEN Dewei, HE Wenjuan, LIAO Weigong Department of Pathophysiology, Key Laboratory of Extreme Environmental Medicine of Ministry of Education, Key Laboratory of High Altitude Medicine of PLA, Faculty of High Altitude Military Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] Objective To investigate the damage of seminiferous tubules in mice exposed to hypoxia and the effects of hypoxia on apoptosis of mouse spermatocytes in the seminiferous tubules. Methods Forty 3-week-old male Balb/c mice were randomly assigned into a normoxia group (housed in a normoxic condition at an altitude of 300 m) and 3 hypoxia groups exposed to hypoxia for 15, 30 or 60 d in a hypobaric chamber simulating the condition at an altitude of 6 000 m. After hypoxic exposures, the mice were euthanized and the

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81701855)

[通信作者] 廖卫公,weigongl@yahoo.com

testicular tissues were examined for pathological changes in the seminiferous tubules using HE and TUNEL staining. A mouse spermatocyte-derived cell line, GC-2spd, was also cultured in a normoxic condition or a hypoxic condition (1% O_2 and 5% CO_2) for 48, 60, or 72 h, and the cell apoptosis was detected using flow cytometry and TUNEL staining and by examining LDH, caspase-3, caspase-8, and caspase-9 levels in the culture medium. **Results** The apoptotic rates of the spermatocytes in the testicular seminiferous tubules of the mice increased significantly after hypoxic exposure for 15, 30 and 60 d [(37.2±5.4)%, (66.3±6.4)%, and (73.5±8.2)%, respectively] as compared with the apoptosis rate of (4.6±1.4)% in the normoxia group ($P<0.01$). In cultured GC-2spd cells, hypoxic exposure for 48, 60 and 72 h also significantly increased the cell apoptotic rate to (15.43±1.47)%, (44.10±14.10)% and (63.36±12.74)%, as compared with the rates of (4.18±1.40)%, (5.45%±2.30)%, and (14.47±8.21)% in the normoxia group, respectively ($P<0.01$). Microscopically, the numbers of apoptotic spermatocytes per field were 22±3, 55±5, and 82±12 in the hypoxia group at 48, 60 and 72 h, respectively, significantly greater than those in the normoxia group (5±1, 8±2, and 15±4, respectively; $P<0.01$). The absolute value of LDH activity in cultured GC-2spd cells at 48 h was significantly higher in the hypoxia group than in the normoxia group (1.28±0.18 *vs* 0.48±0.09, $P<0.01$); the values of caspase-3/8/9 in the hypoxia group at 48 h were 12.20±0.40, 22.73±0.60, and 10.90±0.40, respectively, significantly higher than those in the normoxia group (7.67±0.45, 16.20±0.56, and 7.03±0.25, respectively, $P<0.01$). **Conclusion** Exposure to hypoxia simulating the condition at an altitude of 6 000 m for 15 d can cause decreased spermatogenesis and increased apoptosis of the spermatogenic cells in mice, suggesting that spermatocyte apoptosis is one of the mechanisms by which hypobaric hypoxia reduces spermatogenesis.

[**Key words**] apoptosis; hypoxia; spermatocyte

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81701855). Corresponding author: LIAO Weigong, E-mail: weigongl@yahoo.com

高原低氧环境对人体健康有负面影响。以往有关高原环境对人体健康影响研究多集中于心、脑、肺和血液系统等,而低氧环境对男性生殖功能的影响关注相对较少,并且低氧对男性生殖功能的负面影响主要集中在睾丸生精上皮脱落,精子生成数量减少。近年来随着人类在青藏线周边活动大大增加和生活水平提高后,人们对生殖健康质量尤其重视。

大量研究报道了低氧环境诱导人、大鼠等的生精上皮精母细胞脱落及凋亡[1-4]。国内有研究人员用低压舱模拟海拔 5 000 m 高原实验,发现在所有生精细胞中,精母细胞对低氧最为敏感[5],这表明低氧阻滞精子生成的中心环节是精母细胞凋亡。以上这些文献均从在体的角度来探讨低氧诱导精子浓度减少,无法排除下丘脑-垂体-性腺轴这一神经分泌和间质细胞及支持细胞旁分泌对精母细胞凋亡的影响。所以我们想进一步阐释低氧环境与精母细胞凋亡之间的直接关系。本文旨在模拟 1%氧浓度缺氧环境下离体培养小鼠精母细胞,探讨低氧引起的精母细胞凋亡是否由低氧直接诱导,并深入观察低氧环境引起精母细胞凋亡现象。

1 材料与方法

1.1 实验材料

高糖 DMEM(HYCLONE)、0.25% 胰蛋白酶(HYCLONE)、胎牛血清(HYCLONE)、小鼠精母细胞株(中原生物)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(C1063,碧云天)、一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(C1086,碧云天)、乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(C0017,碧云天),乳酸脱氢酶(M002,南京建成),caspase-3 活性检测试剂盒(C1116,碧云天),caspase-8 活性检测试剂盒(C1152,碧云天),caspase-9 活性检测试剂盒(C1158,碧云天)

1.2 动物建模、取材及 HE 染色

将来源于陆军军医大学基础医学院比较动物学实验室的 SPF 级别 3 周龄成年雄性 Balb/c 小鼠随机分成 4 个组:常氧组、低氧 15 d 组、低氧 30 d 组和低氧 60 d 组,每组 10 只。将低氧组小鼠暴露在模拟海拔 6 000 m 低压氧舱分别饲养 15、30、60 d,将常氧组小鼠放置到海拔 300 m 平原环境饲养。

取材当天,人进入低压舱,减压到达指定海拔高度后平衡0.5 h开始取材。取小鼠左侧睾丸放70%乙醇中固定48 h,石蜡切片、HE染色。

1.3 TUNEL检测曲精小管生精细胞和GC-2细胞凋亡

石蜡切片进行抗原修复:柠檬酸盐缓冲液中95 ℃孵育15 min,室温冷却20 min;石蜡切片和细胞爬片分别用PBS清洗25 s;4 ℃预冷的4%多聚甲醛固定30 min;PBS洗1次,0.1% Triton X-100的PBS孵育2 min;PBS洗2次,37 ℃、TUNEL检测液孵育1 h;PBS洗3次;DAPI染色15 min;PBS洗3次;封片,激光共聚焦显微镜检测(200倍)。

按5×10^5/mL接种GC-2细胞至35 mm培养板,样品孔放至直径为10 mm盖玻片,常氧组细胞放至37 ℃、5%CO_2、21%O_2培养箱中分别孵育48、60和72 h;低氧组细胞放37 ℃、5%CO_2、1%O_2培养箱中分别孵育48、60和72 h;TUNEL和DAPI双染检测GC-2细胞凋亡步骤同石蜡切片。

1.4 睾丸组织和GC-2细胞caspase-3/8/9值测定

按0、10、20、50、100和200 μmol/L 4-硝基苯胺(p-nitroaniline, pNA)标准品测定D(405)作标准曲线;睾丸组织匀浆和消化细胞后分别加入caspase 3/8/9裂解液;4 ℃,18 000×g离心10 min;检测体系如下:样品孔为检测缓冲液70 μL/孔+样品20 μL/孔+Ac-DEVD-pNA(2 mmol/L)/Ac-IETD-pNA(2 mmol/L)/ Ac-LEHD-pNA (2 mmol/L) 10 μL/孔,空白对照孔为检测缓冲液90 μL/孔+Ac-DEVD-pNA(2 mmol/L)/Ac-IETD-pNA(2 mmol)/Ac-LEHD-pNA(2 mmol/L) 10 μL/孔;37 ℃避光孵育16 h,测定D(405),样品的D(405)扣除空白对照的D(405),即为样品中caspase-3/8/9催化产生的pNA产生的吸光度,通过标准曲线的对比就可以计算出样品中催化产生了多少量的pNA。

1.5 睾丸组织和GC-2细胞LDH活力测定

睾丸组织匀浆并对各组设置反应体系:15 μL匀浆液+300 μL LDH检测工作液(TE0151,北京雷根生物),设置酶标仪参数:37 ℃、延迟时间90 s、检测时间180 s,测定D(340)并记录待测样品吸光度升高速率。组织LDH(U/L)=样品吸光度升高速率×3 376。

各细胞培养孔分组如下:无细胞的培养液孔(背景空白对照孔)、常氧处理的对照细胞孔(样品对照孔)、常氧处理的用于后续裂解的细胞孔(样品最大酶活性对照孔)、低氧处理的细胞孔(低氧处理样品孔),处理结束前1 h,“样品最大酶活性对照孔”中加入LDH释放试剂,然后继续孵育到处理结束;400×g离心5 min,按120 μL/孔转移上清至96孔板,按60 μL/孔加入LDH检测液(C0016,碧云天);室温避光孵育30 min,测定D(490)。LDH相对值=(低氧处理样品吸光度-样品对照孔吸光度)/(细胞最大酶活性的吸光度-样品对照孔吸光度)×100%,测得的各组吸光度均应减去背景空白对照孔吸光度。按照0、6.5、12.5、25、50、100 U/mL稀释乳酸脱氢酶(M002,南京建成)测定D(490),作LDH标准曲线并计算样品LDH值。

1.6 流式细胞术检测生精细胞百分比和GC-2细胞凋亡率

在低氧暴露时间结束后,用200 mg/L胶原酶消化睾丸组织30 min后,用40 μm滤器过滤2次去除支持细胞聚集物和组织碎片,500×g离心10 min;清洗细胞两次并用70%乙醇固定生精细胞,用25 mg/L的溴化乙啶(Sigma)染色,流式细胞仪分析样本(BD生物,San Jose,加利福尼亚州,美国),激发波长488 nm。

低氧处理结束后收集细胞上清液,胰酶消化和PBS洗1次。按100 μL/管加入10×Binding buffer(0.1 mol/L HEPES+1.4 mol/LNaCl+25 mmol/L$CaCl_2$),混匀;配制各管反应体系:对照组:①10 μL 10×Binding buffer;②FITC单标组:5 μL AnnexinV-FITC+5 μL 10×Binding buffer;③PI单标组:5 μL PI+5 μL 10×Binding buffer;混匀并避光孵育15 min;按400 μL/管加入10×Binding buffer;流式细胞术检测细胞凋亡。

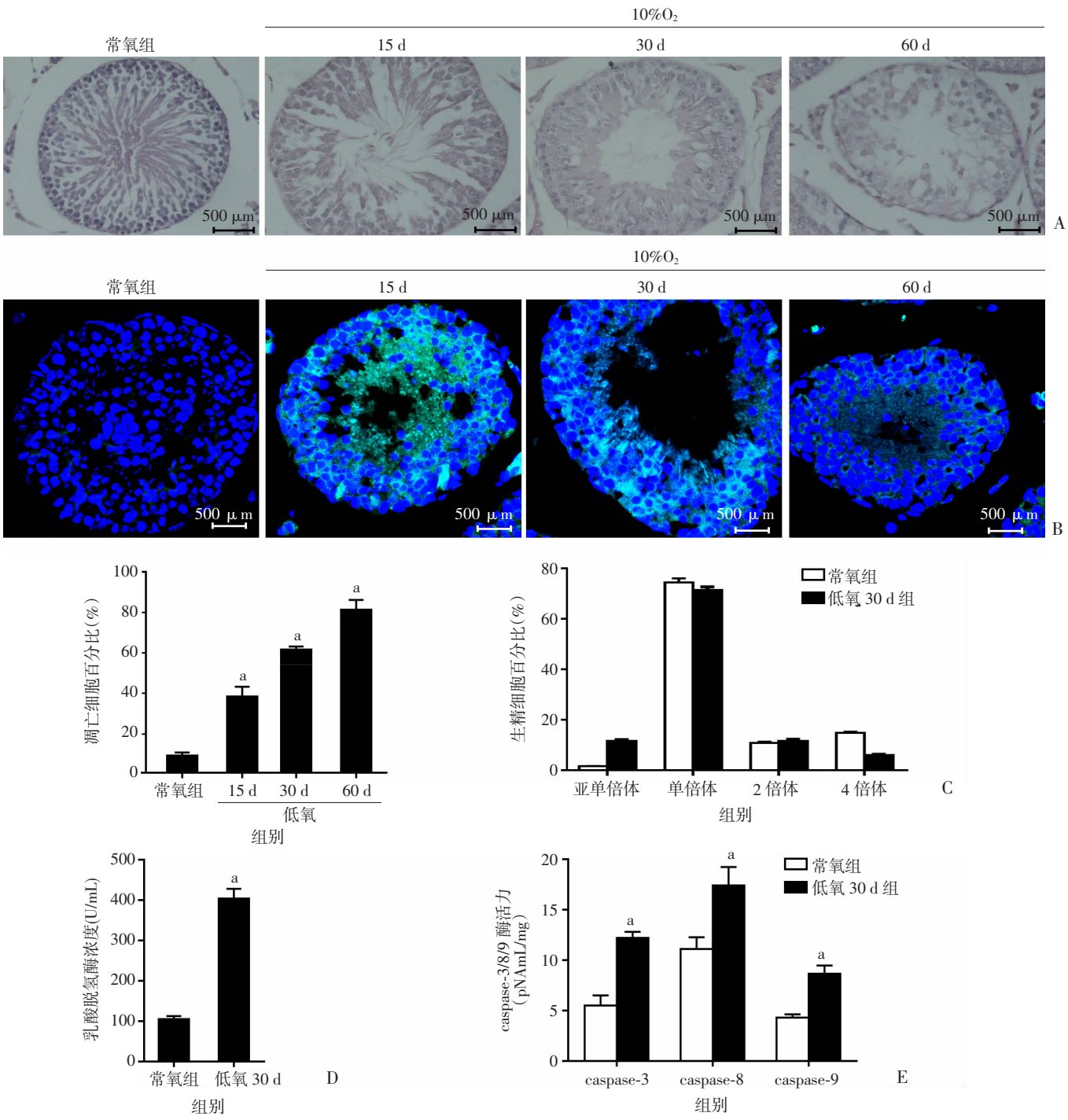
1.7 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件,数据均以$\bar{x}\pm s$表示,所有实验至少重复3次。本实验设计中常氧组和低氧组之间比较采用单因素方差分析,不同时间的常氧组和低氧组比较采用双因素方差分析,双因素方差分析后多重比较采用LSD法。

2 结果

2.1 低氧对小鼠生精小管病理损伤的影响

本课题组通过模拟海拔6 000 m低氧环境并先后暴露小鼠15、30和60 d。HE染色观察发现,与常氧组比较,低氧30 d组小鼠生精小管腔中生精细胞出现大面积脱落并出现空腔;TUNEL检测结果表明,与常氧对照组相比,低氧15 d后凋亡生精细胞显著增加,且差异具有显著性($P<0.01$),并呈低氧暴露时间依赖性增加(图1A和图1B);此外,低氧30 d组小鼠精母细胞占生精细胞百分比较常氧对照组显著降低($P<0.01$);与常氧组相比,低氧30 d组小鼠睾丸组织乳酸脱氢酶和caspase-3/8/9显著下降($P<0.01$)。

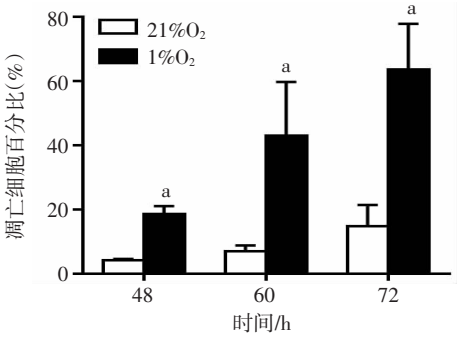


A: HE 染色观察生精小管结构变化;B: TUNEL 法染色观察曲精小管生精细胞凋亡;C: 流式细胞术检测不同生精细胞占比;D: 酶标法检测低氧 30 d 组小鼠睾丸 LDH 活力;E: 酶标法检测低氧 30 d 组小鼠睾丸 caspase-3/8/9 活力 a:$P<0.01$,与常氧组比较

图 1 模拟高原 6 000 m 低氧对小鼠睾丸生精小管病理损伤的影响 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

2.2 低氧对小鼠精母细胞(GC-2 细胞)凋亡率的影响

本课题组建立了 1%O_2 暴露下的 GC-2 细胞凋亡模型,流式细胞术结果表明,分别与 21%O_2 暴露 48、60、72 h 组比较,1%O_2 氧暴露 48、60、72 h 组 GC-2 细胞凋亡率分别显著升高,且差异具有显著性($P<0.01$),见图 2。激光共聚焦观察发现(200×),分别与 21%O_2 暴露 48、60、72 h 组比较,1%O_2 氧暴露 48、60、72 h 组凋亡 GC-2 细胞数/视野分别显著增多,见图 3。

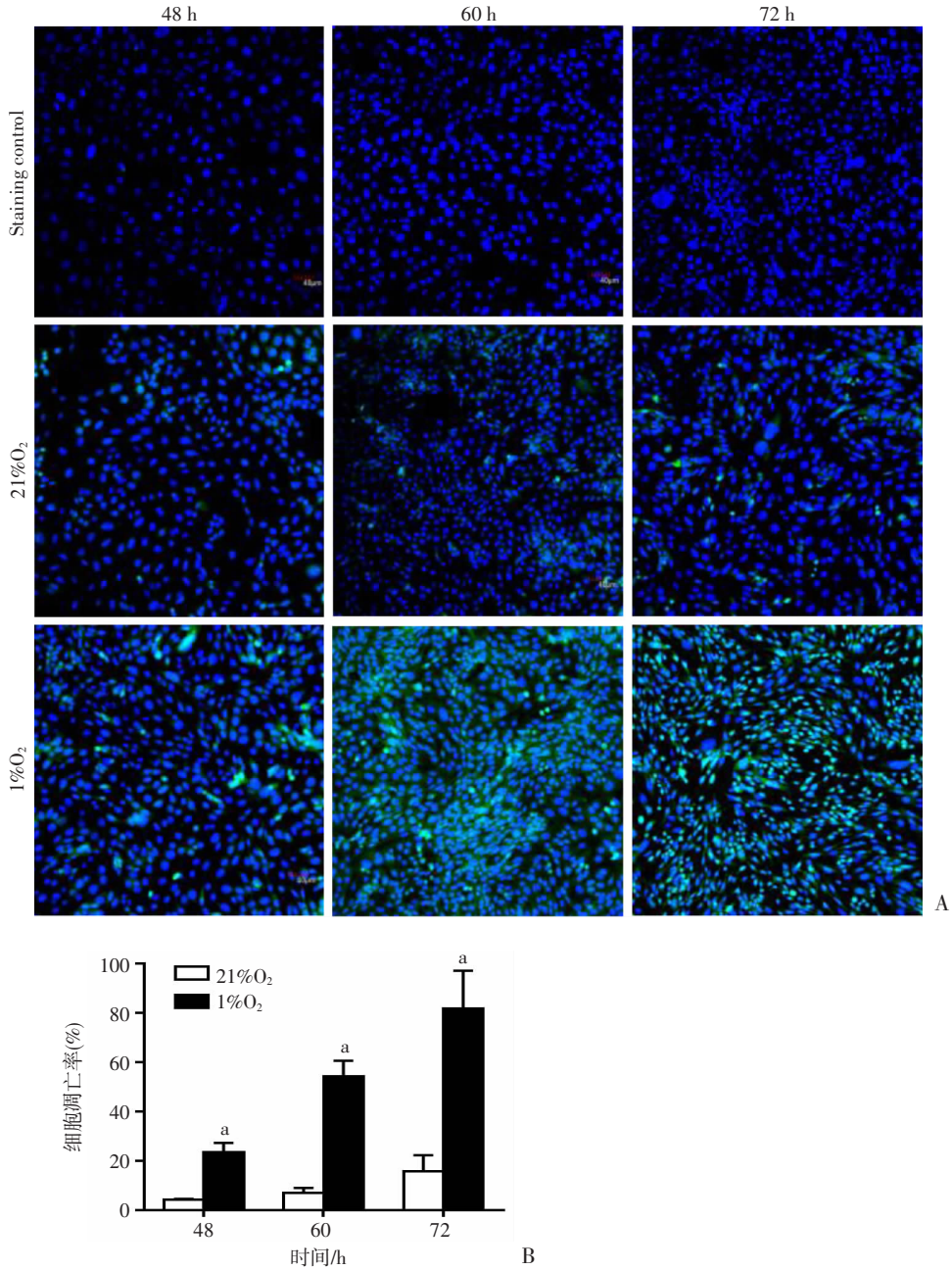


a:$P<0.01$,与 21%O_2 比较

图 2 低氧对 GC-2 细胞凋亡率的影响 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

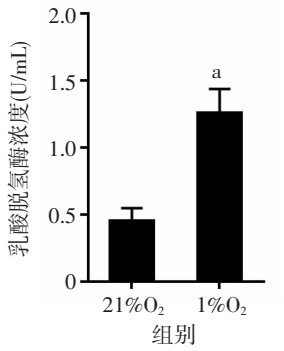
2.3 低氧对 GC-2 细胞培养上清中 LDH 的影响

细胞膜破坏是细胞凋亡起始环节,细胞膜破坏后,细胞质内的酶特别是酶活性较为稳定的乳酸脱氢酶(lactic acid dehydrogenase, LDH)释放到培养液里,通过检测从质膜破裂的细胞中释放到培养液中的 LDH 的活性,就可以实现对细胞毒性的定量分析。结果表明,与 21%O_2 暴露 48 h 组比较,1%O_2 暴露 48 h 组 GC-2 细胞培养液中 LDH 值显著升高且差异具有显著性($P<0.01$,图 4)。



A:TUNEL 法染色观察 GC-2 细胞凋亡(×200);B:半定量分析($n=3$, $\bar{x}\pm s$) a:$P<0.01$,与 21%O_2 比较

图 3 低氧暴露不同时间的 GC-2 细胞凋亡变化

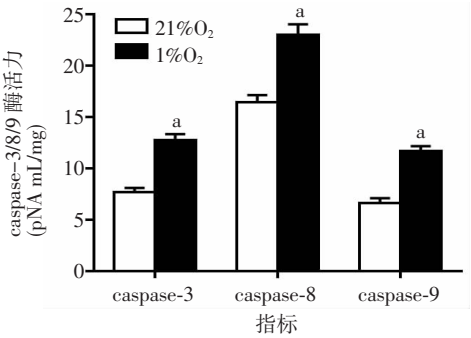


a:$P<0.01$,与 21%O_2 比较

图 4 低氧对 GC-2 细胞 LDH 活性影响 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

2.4 低氧对 GC-2 细胞 caspase-3/8/9 影响

细胞凋亡途径分为外源性凋亡途径和内源性凋亡途径,其中外源性凋亡途径下游关键分子 caspase-8 和内源性凋亡途径下游关键分子 caspase-9 汇合并激活 caspase-3,产生凋亡。结果表明,与 21%O_2 暴露 48 h 组比较,1%O_2 暴露 48 h 组 GC-2 细胞培养液中 caspase-3/8/9 酶活力显著升高且差异具有显著性($P<0.01$)。见图 5。



a:$P<0.01$,与 21%O_2 比较

图 5 低氧对 GC-2 细胞凋亡关键分子 caspase-3/8/9 活性影响

3 讨论

精子发生过程本身所需氧耗量大,并且缺氧环境能刺激机体优先保证心脑血液供应,改变全身血流分布,所以高原长期低氧环境导致睾丸内部氧分压持续降低,睾丸的缺氧程度尤其严重,国外相关研究也表明低氧能诱导动物睾丸生精上皮脱落,生精细胞凋亡增多[6-8],并且低张性缺氧导致生精细胞中脂质过氧化物升高,破坏细胞膜进而损伤细胞[9],那么低氧诱导生殖细胞凋亡是否是缺氧直接作用的结果,而不是通过旁分泌与神经分泌调控下丘脑-垂体-性腺轴分泌 LH(促黄体生成素)与 FSH(卵泡刺激素)而分别作用于间质细胞及支持细胞间接调控生殖细胞凋亡。我们查阅相关文献报道甚少。本研究采用模拟低氧环境下睾丸内部 1%氧浓度培养 GC-2 细胞,检测 GC-2 细胞凋亡率、凋亡细胞数/视野、LDH 活性与 caspase-3/8/9 变化。

文献[10]报道低氧引起精细胞破坏、生精小管基底膜折叠和生精小管腔间隙增大,进而抑制精子生成。我们模拟海拔 6 000 m 低氧暴露小鼠 15 d 后,发现生精上皮出现脱落,并伴有生精细胞凋亡明显增多,这与文献报道一致。此外,文献[11]报道低氧通过氧化应激进而激活生精细胞的凋亡途径,最终抑制精子生成;但是在本研究中并未进行相关探索,所以关于低氧抑制精子生成的机制还有待进一步探讨。

根据流式细胞术检测发现低氧暴露 48 h 后,GC-2 细胞凋亡率[(15.43±1.47)%]显著高于常氧 48 h 组(4.18±1.4%,$P<0.01$),并且 48 h 相对于 60 h 与 72 h 来说,坏死的 GC-2 细胞并不多,此外,TUNEL 实验结果也证实低氧暴露 48 h 组凋亡 GC-2 细胞数/视野也显著高于常氧 48 h 组,所以我们采用低氧 48 h 来刺激 GC-2 细胞并检测细胞培养液中 caspase-3/8/9 和乳酸脱氢酶变化。低氧诱导 GC-2 细胞凋亡的机制可能是由于低氧激活了胞外死亡受体凋亡途径,诱导产生了由 pro-caspase-8 与 FADD(fas-associated death domain)组装的死亡诱导信号复合物(DISC),进而断裂 pro-caspase-8 和激活了 caspase-8,以及 caspase-8 下游的效应分子如 caspase-3/6/7,细胞出现 DNA 浓缩和凋亡[12];此外,低氧还可能激活了 GC-2 细胞线粒体凋亡途径,线粒体外膜释放细胞色素 c(cyt-C)并激活 caspase-9,以及 caspase-9 下游的效应分子如 caspase-3[13];我们的结果表明 1%氧暴露 48 h 后 GC-2 细胞 caspase-3/8/9 均显著高于 21%氧组,这表明低氧激活了 GC-2 细胞死亡受体凋亡途径和线粒体凋亡途径。而且,细胞培养液上清 LDH 检测结果表明 1%氧暴露 48 h 组精母细胞 LDH 值为 1.28±0.18,显著高于常氧 48 h 组 LDH 值(0.48±0.09, $P<0.01$),这表明低氧环境诱导小鼠精母细胞凋亡后,细胞膜通透性增大,乳酸脱氢酶大量释放进入培养液。高原低氧对精母细胞凋亡的影响和机制还不清楚,国内外相关研究甚少。我们的实验结果提示 1%氧浓度处理小鼠精母细胞 48、60 和 72 h 后,精母细胞凋亡率、凋亡精母细胞数/视野均显著升高,1%氧浓度处理小鼠精母细胞 48 h 后,培养液上清中 LDH 活性显著升高,细胞凋亡途径下游关键分子 caspase-3/8/9 活力明显增加。低氧诱导精母细胞凋亡的机制值得进一步探讨。

综上所述,我们研究发现,模拟海拔 6 000 m 低氧环境暴露小鼠 15 d 后,睾丸生精小管出现病损,生精细胞凋亡增加,模拟 1% O_2 诱导小鼠精母细胞凋亡率、凋亡精母细胞数/视野及培养上清中乳酸脱氢酶活

性均显著升高。

参考文献:

[1] ZHENG S J, LIU Y S, LI P, *et al*. Short-term high-altitude exposure (3 600 m) alters the type distribution of sperm deformity[J]. High Alt Med Biol, 2019, 20(2): 198-202. DOI: 10.1089/ham.2018.0133.

[2] HE J, CUI J H, WANG R, *et al*. Exposure to hypoxia at high altitude (5 380 m) for 1 year induces reversible effects on Semen quality and serum reproductive hormone levels in young male adults[J]. High Alt Med Biol, 2015, 16(3): 216-222. DOI: 10.1089/ham.2014.1046.

[3] COFRÉ E, PERALTA O A, RAGGI A, *et al*. Ram Semen deterioration by short-term exposure to high altitude is prevented by improvement of antioxidant status[J]. Animal, 2018, 12(5): 1007-1014. DOI: 10.1017/S1751731117002452.

[4] ZHAO Y L, LU X L, CHENG Z P, *et al*. Comparative proteomic analysis of Tibetan pig spermatozoa at high and low altitudes[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 569. DOI: 10.1186/s12864-019-5873-0.

[5] LIAO W G, CAI M C, CHEN J, *et al*. Hypobaric hypoxia causes deleterious effects on spermatogenesis in rats[J]. Reproduction, 2010, 139(6): 1031-1038. DOI: 10.1530/REP-09-0557.

[6] HUNG Y C, PAN T L, HU W L. Roles of reactive oxygen species in anticancer therapy with Salvia miltiorrhiza bunge[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 5293284. DOI: 10.1155/2016/5293284.

[7] GHANDEHARI-ALAVIJEH R, TAVALAEE M, ZOHRABI D, *et al*. Hypoxia pathway has more impact than inflammation pathway on etiology of infertile men with varicocele[J]. Andrologia, 2019, 51(2): e13189. DOI: 10.1111/and.13189.

[8] TORRES M, LAGUNA-BARRAZA R, DALMASES M, *et al*. Male fertility is reduced by chronic intermittent hypoxia mimicking sleep apnea in mice[J]. Sleep, 2014, 37(11): 1757-1765. DOI: 10.5665/sleep.4166.

[9] AGARWAL A, BUI A D. Oxidation-reduction potential as a new marker for oxidative stress: Correlation to male infertility[J]. Investig Clin Urol, 2017, 58(6): 385-399. DOI: 10.4111/icu.2017.58.6.385.

[10] JANKOVIC VELICKOVIC L, STEFANOVIC V. Hypoxia and spermatogenesis[J]. Int Urol Nephrol, 2014, 46(5): 887-894. DOI: 10.1007/s11255-013-0601-1.

[11] ZEPEDA A B, FIGUEROA C A, CALAF G M, *et al*. Male reproductive system and antioxidants in oxidative stress induced by hypobaric hypoxia[J]. Andrologia, 2014, 46(1): 1-8. DOI: 10.1111/and.12039.

[12] IVANISENKO N V, LAVRIK I N. Mechanisms of procaspase-8 activation in the extrinsic programmed cell death pathway[J]. Mol Biol (Mosk), 2019, 53(5): 830-837. DOI: 10.1134/S0026898419050094.

[13] WYATT J, MÜLLER M M, TAVASSOLI M. Cancer treatment Goes viral: using viral proteins to induce tumour-specific cell death[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(12): E1975. DOI: 10.3390/cancers11121975.

(**收稿**:2019-09-16;**修回**:2019-11-15)

(编辑 黄 超)