

人新基因 SPINK13 的克隆和表达分析

沈佳怡¹,何四明¹,王艺潼¹,吴紫薇¹,吴志宏^{1,2}

(1. 浙江科技学院 生物与化学工程学院,杭州 310023;2. 德国基尔大学 医学院皮肤学研究所,德国 基尔 24105)

摘要: 丝氨酸蛋白酶抑制剂 Kazal 型 (serine protease inhibitors Kazal-type, SPINKs) 能够调控激肽释放酶相关蛋白酶 (kallikrein-related peptidases, KLKs) 的活性,与皮肤炎症相关疾病密切相关。SPINK5 基因的功能缺失会导致内瑟顿综合征的发生。【目的】为深入了解 SPINKs 在皮肤屏障功能中的作用,采用生物学手段对其进行探究。【方法】采用互补脱氧核糖核酸 (complementary deoxyribonucleic acid, cDNA) 末端快速扩增技术 (rapid-amplification of cDNA ends, RACE) 及结合生物信息学获得全长序列,再通过逆转录聚合酶链式反应技术 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 分析基因在不同组织的表达情况。【结果】发现了一个 SPINKs 新成员,即 SPINK13 (在核苷酸序列数据库 (GenBank) 登记号为 OM275352)。SPINK13 含有 1 个典型的 Kazal 功能单元,在肺部组织中高度表达,在皮肤和结肠中也有表达;在皮肤中,角质形成细胞是产生 SPINK13 的源泉;在皮肤肿瘤患者中,SPINK13 的表达异常,在癌前病变患者皮肤中表达不编码蛋白的剪接体 SPINK13-v3 (在 GenBank 登记号为 OM275354),而在鳞状细胞癌和基底细胞癌患者皮肤中表达不编码蛋白的剪接体 SPINK13-v2 (在 GenBank 登记号为 OM275353)。【结论】SPINK13 基因与皮肤肿瘤发生发展有一定的相关性,新发现的剪接体 SPINK13-v2 和 SPINK13-v3 有望成为诊断皮肤肿瘤的标志物。

关键词: 丝氨酸蛋白酶抑制剂 Kazal 型 13;角质形成细胞;皮肤肿瘤

中图分类号: Q812

文献标志码: A

文章编号: 1671-8798(2023)01-0007-07

Molecular cloning and expression analysis of a new human gene SPINK13

SHEN Jiayi¹, HE Siming¹, WANG Yitong¹, WU Ziwei¹, WU Zhihong^{1,2}

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China; 2. Department of Dermatology, University-Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, 24105 Kiel, Germany)

Abstract: The serine protease inhibitors Kazal-type (SPINKs) family regulates the activity of kallikrein-related peptidases (KLKs) and correlates with skin inflammation-related diseases. The afuction of the SPINK5 gene can cause Netherton syndrome. [Objective] To better understand the barrier function of the SPINKs in the skin, we adopted biological methods to research it. [Method] We adopted the technology of rapid-amplification of cDNA (complementary deoxyribonucleic acid) ends, and combined it with bioinformatics to obtain the full-length

收稿日期: 2022-01-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81673048, 81972922)

通信作者: 吴志宏 (1966—), 男, 浙江省温州人, 研究员, 博士, 主要从事天然免疫和抗菌肽研究。E-mail: zhihong.wu@zust.edu.cn。

sequence. The expression of genes in different tissues was analyzed by virtue of the technology of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). [Result] A novel member was discovered, namely SPINK13 (GenBank accession number: OM275352). It is shown that SPINK13 encodes one typical Kazal domain, highly expressed in the lung tissue, as well as expressed in the skin and the colon; in the skin, SPINK13 is generated by keratinocytes; among patients with skin tumors, the expression of SPINK13 is abnormal; SPINK13-v3, a splicing variant that does not encode protein, is expressed in the skin of the patient with precancerous lesion (GenBank accession number: OM275354), while SPINK13-v2 (GenBank accession number: OM275353), a splicing variant that does not encode protein, is expressed in the skin of the patient with squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. [Conclusion] SPINK13 gene has a certain correlation with the occurrence and development of skin tumor, and the newly discovered splicing variants SPINK13-v2 and SPINK13-v3 are expected to become markers for the diagnosis of skin tumor.

Keywords: SPINK13; keratinocytes; skin tumor

激肽释放酶相关蛋白酶(kallikrein-related peptidases, KLKs)是一类丝氨酸蛋白酶,包含 15 个成员^[1],具有胰蛋白酶活性和胰凝乳蛋白酶活性^[2]。其中,KLK5 和 KLK7 的作用在于调节丝聚蛋白(filaggrin, FLG)的降解与天然保湿因子的形成及皮肤正常的生理脱屑^[3-4]。KLK8 和 KLK14 通过介导丝氨酸蛋白酶参与调节皮肤表皮屏障的形成^[5-6]。此外,一种合成的 KLK1 抑制剂被证明可以抑制乳腺癌细胞的侵袭,这表明 KLKs 可以被用于靶向抗癌治疗^[7-8]。

KLKs 的活性通常由相应的丝氨酸蛋白酶抑制剂 Kazal 型(serine protease inhibitor Kazal-type, SPINKs)控制^[9-10]。目前,关于 KLKs 蛋白的鉴定和功能分析已相对完整,而对抑制剂 SPINKs 的了解却非常有限。SPINK5 基因的突变会导致皮肤内瑟顿综合征发生^[11-12],并且 KLK5 和 SPINK5 的相对表达是口腔鳞状细胞癌中一个重要的预后标志物^[13-14]。沉默 SPINK7 能够抑制白细胞介素-22(interleukin-22, IL-22)诱导的细胞增殖和炎症应答反应,其机制可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路有关,这为银屑病的诊断提供了新的标志物和治疗靶点^[15]。SPINK9 既是 KLK5 的选择性抑制剂,又是一种大肠杆菌选择性抗菌肽^[16-17]。SPINK9 诱导嘌呤能型 2(Purinergic2, P2)受体的激活可以触发多种细胞信号通路,促进细胞迁移,加速创伤愈合^[18]。然而,目前关于 SPINKs 对 KLKs 动态调控的协调性知之甚少,原因在于 SPINKs 成员的鉴定仍待完善。

迄今为止,已经发现的人体 KLKs 蛋白成员有 15 个,而其中明确对 KLKs 有抑制作用的 SPINKs 成员只有 SPINK5、SPINK6 和 SPINK9^[19]。我们发现了一个 SPINKs 的新成员,即 SPINK13。同时,在皮肤肿瘤患者组织中,发现了两个 SPINK13 的新剪接体,即 SPINK13-v2 和 SPINK13-v3。SPINK13 的发现,可能有助于更好地理解 SPINKs/KLKs 调控皮肤屏障功能的途径,以及与皮肤肿瘤发生和发展的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

脱氧核糖核酸酶 I (DNase I)及核糖核酸酶 H(RNase H)均购自德国罗氏公司;总核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)抽提试剂盒(TRIZOL™)、胎牛血清、青霉素及链霉素均购自美国赛默飞公司;逆转录酶(superscript II RNase H-reverse transcriptase)购自美国英杰生命技术有限公司;互补脱氧核糖核酸(complementary deoxyribonucleic acid, cDNA)扩增试剂盒(SMART™ RACE cDNA Amplification Kit)购自北京宝日医生物技术有限公司;培养基(EpiLife™)购自德国西格玛公司。

1.2 方 法

1.2.1 RNA 的制备

使用试剂盒提取出癌症患者皮肤组织(来自德国基尔大学医学院皮肤学研究所)中的总 RNA。其他试验所需的总 RNA 无特别说明均购于美国英杰生命技术有限公司,所有样品均保存在 -80°C 冰箱。

1.2.2 生物信息学分析

利用美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information,NCBI)的开放阅读框查找器及保守结构域数据库对测序获得的 cDNA 序列的开放阅读框及保守功能结构域进行分析。通过欧洲生物信息学研究所数据库(<http://www.ensembl.org>)比对寻找 SPINKs 在其他模式动物的同源性基因;采用欧洲核苷酸数据库(<http://www.ebi.ac.uk/embl/>)比对序列相似性,并用比对软件 GeneDoc 编辑处理;使用信号肽预测网站(<http://www.cbs.dtu.dk>)判断信号肽序列;采用蛋白结构域鉴定分析工具(<http://www.smart.ox.ac.uk>)分析蛋白功能单元;利用分子进化遗传分析软件 MEGA 4.0 进行进化树分析。

1.2.3 细胞培养

人包皮角质形成细胞按 Choi 等^[20]的方法制备。表皮标本使用胰蛋白酶处理后,在含有体积分数为 10%胎牛血清(含 $10\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 青霉素和 $0.1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 链霉素)的 EpiLife™ 培养基中培养。当细胞融合度达到 75%时,进行细胞传代。

1.2.4 cDNA 末端快速扩增技术

使用 TRIzol™ 试剂盒从人包皮角质形成细胞中提取总 RNA。取 $3\text{ }\mu\text{g}$ 总 RNA 用于 5'端 RACE 和 3'端 RACE 第一链 cDNA 的合成。根据预测的外显子核苷酸序列设计基因特异性引物进行 cDNA 末端快速扩增技术,其中 5'端 RACE 基因特异性引物为 5'-ACACTC ATTCTGGAAAGTGTGCCATTT-GAGC-3',3'端 RACE 基因特异性引物为 5'-CGATGTAAA ATGTATATCCCACTGGACCCTGA-3',按照操作说明进行扩增。50 μL 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)总反应体系为:cDNA 1 μL 、通用引物 2 μL 、特异性引物 2 μL 、反应缓冲液 5 μL 、混合型聚合酶 1 μL ,剩余体积使用双蒸水补足。扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 3 min,循环 5 次;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,70 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 3 min,循环 5 次;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 3 min,循环 25 次;最后 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。再以 0.5 μL 的产物作为第二轮巢氏 PCR 的模板进行扩增,其中 5'端 RACE 巢氏引物为 5'-GGTGCTGTCACATTGGGGCAGTCTG-3',3'端 RACE 巢氏引物为 5'-ATGCAGACTG CCCCAAT-GTGACAGCA-3'。PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s,70 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 3 min,循环 30 次;最后在 70 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经凝胶电泳割胶纯化后,克隆到 pGEM-T 载体中并进行测序。

1.2.5 逆转录酶聚合酶链反应

使用 TRIzol™ 试剂盒从人包皮角质形成细胞中提取总 RNA。以 RNA 作为模板,使用逆转录酶将其反转录成 cDNA 用于 PCR 扩增。根据引物设计原则设计 SPINK13 特异性引物进行 PCR 扩增,其中 SPINK13-RT-F 序列为 5'-CATATTCAGCCACCTCATCCAG-3',SPINK13-RT-R 序列为 5'-AAG-CAAGTGTAGTTACTCTGGTACCC-3'。选取甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyd-e-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)为内参基因,按照操作说明进行 PCR 扩增。50 μL PCR 扩增的总反应体系为:cDNA 2 μL 、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)4 μL 、引物各 2 μL 、反应缓冲液 5 μL 、混合型聚合酶 1 μL ,剩余体积使用双蒸水补足。PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 45 s,循环 5 次;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s,66 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,循环 5 次;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s,64 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,循环 32 次。使用琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物并进行割胶测序。

2 结果与讨论

2.1 人 SPINK13 的 cDNA 全长克隆和表达分析

人 SPINK13 分子的鉴定结果如图 1 所示。SPINKs 位于人染色体 5q32(图 1(a)),为了探寻新的

SPINKs 成员,我们将 SPINK9 的功能单元 Kazal 序列使用 tBLASTN 算法在人类基因组数据中查询,以搜索潜在的同源序列。搜索结果发现,在已知基因 SPINK5 和 SPINK7 之间有一个同源序列,包含 2 个外显子。在数据库中提取序列并进行比对后,发现该序列与小鼠 SPINK13 基因高度同源,将该同源序列暂定为新基因 SPINK13。

根据数据库中的序列,设计两组特异性引物(图 1(b))进行 cDNA 末端快速扩增。在 5'端 RACE 试验中,扩增产物的条带大小约为 700 碱基对(base pair,bp);在 3'端 RACE 的试验中,扩增产物的条带大小约为 350 bp。将 5'端 RACE 和 3'端 RACE 结果进行对接得到 SPINK13 cDNA 全长序列(图 1(c))。SPINK13 cDNA 全长 1 022 bp,其中包含一个 285 bp 的开放阅读框。将该序列在 GenBank(核苷酸序列数据库)进行登记,获得登记号为 OM275352。

将 cDNA 序列与基因组序列进行比对,发现 SPINK13 基因由 6 个外显子组成(图 1(d)),1 号外显子与 2 号外显子为非编码区,3 号外显子至 6 号外显子为开放阅读框。分析 SPINK13 蛋白结构域发现,它由 94 个氨基酸残基组成,其中残基 1~24 为信号肽,残基 4~26 为跨膜结构域,残基 47~93 是典型 Kazal 域。综上所述,SPINK13 编码的是包含 1 个典型的 Kazal 功能单元(图 1(e))的丝氨酸蛋白酶抑制剂。

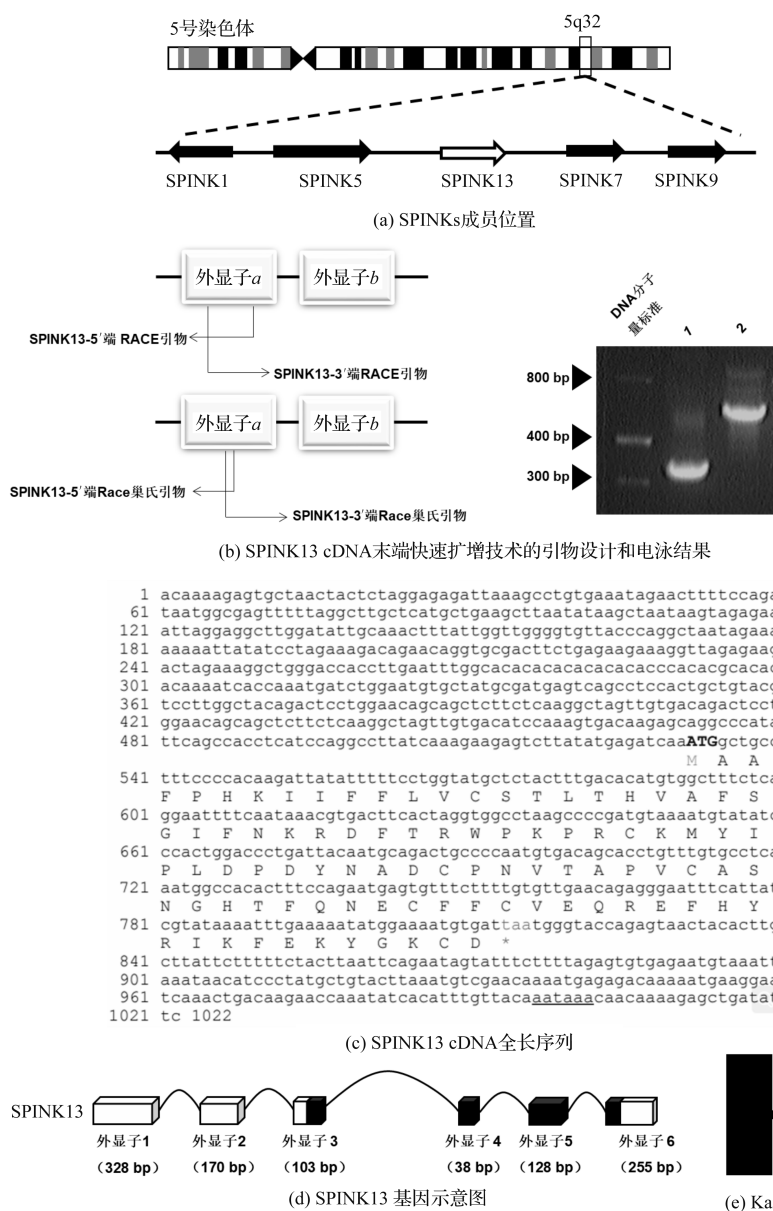


图 1 人 SPINK13 分子的鉴定结果

Fig. 1 Molecular identification results of human SPINK13

为初步判断 SPINK13 的蛋白功能,从蛋白数据库中提取已知的哺乳动物 SPINK13 的 Kazal 功能单元序列,进行序列比对和进化树分析。序列比对如图 2 所示,结果显示人(*Homo sapiens*)与倭黑猩猩(*Pan paniscus*)、黑猩猩(*Pan troglodytes*)、小家鼠(*Mus musculus*)及褐家鼠(*Rattus norvegicus*)的 SPINK13 的蛋白同源性在 78%~98%,且 Kazal 功能单元高度保守,都具有形成 3 个二硫键的 6 个半胱氨酸残基,相邻两个半胱氨酸残基间的氨基酸残基数量也相同。哺乳动物 SPINK13 蛋白的进化树分析如图 3 所示,其结果也显示 SPINK13 蛋白与物种进化的一致性。这个结果表明,物种间 SPINK13 的蛋白功能存在保守性。

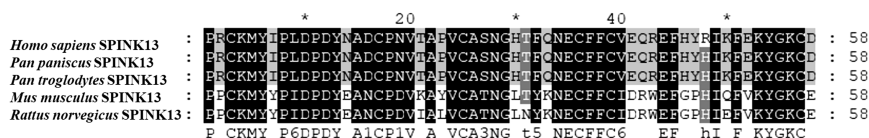


图 2 哺乳动物 SPINK13 蛋白 Kazal 功能单元序列比对

Fig. 2 Sequence alignment of Kazal functional units of mammalian SPINK13 protein

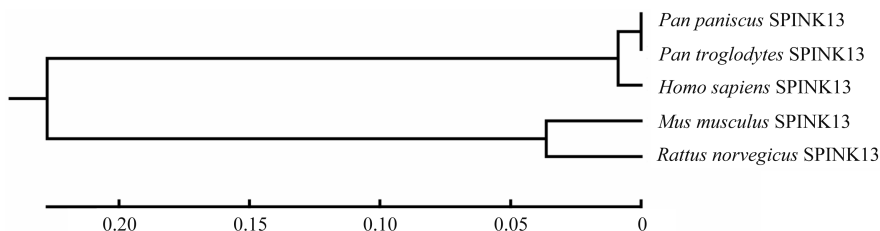


图 3 哺乳动物 SPINK13 蛋白的进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of mammalian SPINK13 proteins

2.2 SPINK13 在人体组织中的表达

为了探究 SPINK13 在人体组织中的表达情况,我们使用逆转录酶聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)进行检测,使用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参。所得结果使用图像处理软件 Image J 进行灰度值分析,将分析后的灰度值使用数据处理绘图软件 GraphPad Prism 7.0 作图。SPINK13 在人体组织中的表达如图 4 所示,SPINK13 在肺部组织中表达丰度最高,在皮肤和结肠组织中表达丰度较低,在其他组织如脾脏、胸腺、内上皮、小肠、骨髓、嗜中性粒细胞、扁桃体、舌头、胃、支气管上皮细胞、喉、咽、结肠、鼻腔上皮细胞、淋巴、息肉、皮肤、肺、气管上皮细胞、唾液腺、肾、子宫、角质形成细胞中表达丰度极低。

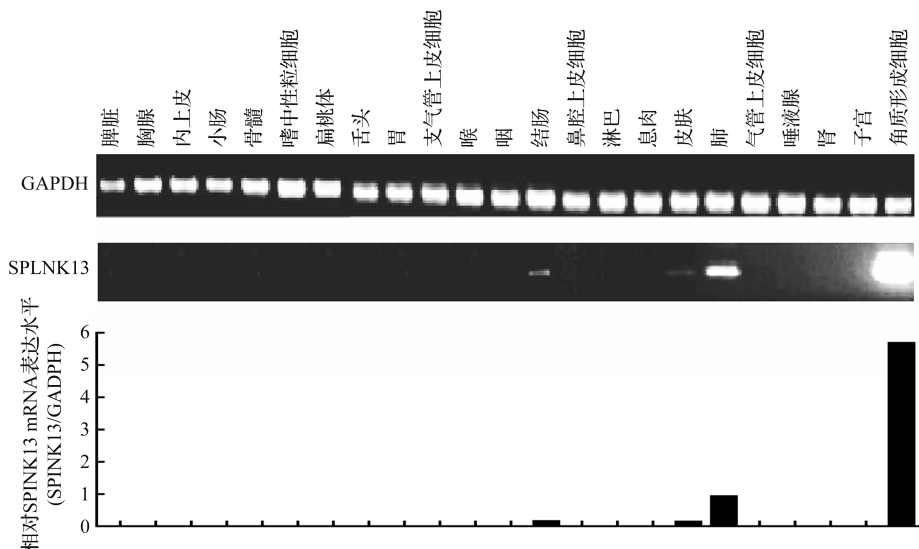


图 4 SPINK13 在人体组织中的表达

Fig. 4 Expression of SPINK13 in human tissues

与上述人 SPINK13 的多组织表达不同的是, Ma 等^[21]发现小鼠 SPINK13 只在附睾中特异表达, 控制精子顶体的完整性和成熟度。检索基因表达数据库, 人 SPINK13 在睾丸中高丰度表达, 但在附睾中表达情况还有待证实。人与小鼠 SPINK13 的组织表达显著差异, 可能预示着二者功能的差异。

2.3 SPINK13 在肿瘤皮肤中的表达

为进一步了解 SPINK13 与皮肤分化的相关性, 对一些皮肤肿瘤患者的病变组织进行 RT-PCR 分析。SPINK13 在肿瘤皮肤中的表达如图 5 所示, SPINK13 在癌前病变患者的健康组织 *a* 中正常表达, 但在病变组织 *b* 中没有表达或出现 2 种转录本, 一种为正常 SPINK13 转录本, 另一种为 SPINK13 新剪接体 SPINK13-v3(条带大小约为 400 bp, 在 GenBank 注册登记号为 OM275354); 在鳞状细胞癌患者中, SPINK13 在患者的健康组织 *a* 中正常表达或不表达, 多数病变组织 *b* 出现 3 种转录本, 第一种为正常 SPINK13 转录本, 第二种为 SPINK13 新剪接体 SPINK13-v2(条带大小约为 300 bp, 在 GenBank 注册登记号为 OM275353), 此外病变组织 *b* 还存在第三种与 SPINK13 无关的转录本(条带大小约为 250 bp); 在基底细胞癌患者中, SPINK13 在多数患者的健康组织 *a* 中正常表达, 多数病变组织 *b* 出现不表达或出现 2 种转录本, 即正常 SPINK13 转录本和新剪接体 SPINK13-v2。经蛋白开放阅读框分析, 两个新的剪接体都不编码蛋白, SPINK13 及其剪接体基因示意图如图 6。

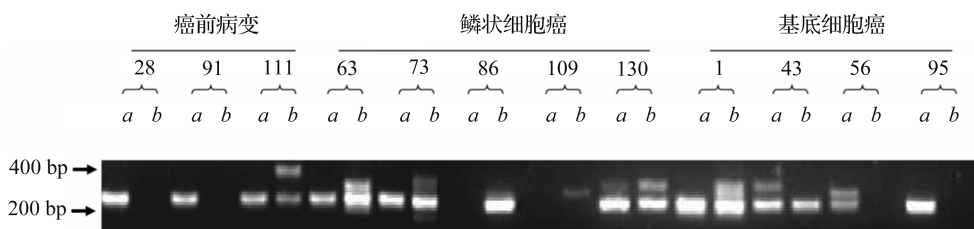


图 5 SPINK13 在肿瘤皮肤中的表达

Fig. 5 Expression of SPINK13 in tumor skin

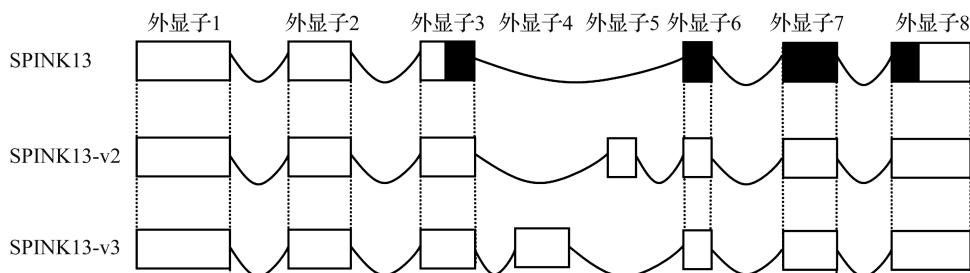


图 6 SPINK13 及其剪接体基因示意图

Fig. 6 Schematic diagram of the Spink13 gene and its splicing variants

3 结 语

本研究在皮肤角质形成细胞中发现了 SPINKs 的一个新成员, 即 SPINK13。SPINK13 编码的是包含 1 个典型的 Kazal 功能单元的丝氨酸蛋白酶抑制剂。SPINK13 具有组织表达特异性, 在肺部组织中高度表达, 在结肠和皮肤中也有表达; 角质形成细胞是皮肤产生 SPINK13 的源泉; SPINK13 在肿瘤患者皮肤中表达异常, 在癌前病变患者皮肤中表达不编码蛋白的剪接体 SPINK13-v3, 在鳞状细胞癌和基底细胞癌患者皮肤中表达不编码蛋白的剪接体 SPINK13-v2。上述结果说明 SPINK13 基因与皮肤肿瘤发生发展有一定的相关性, 新发现的剪接体 SPINK13-v2 和 SPINK13-v3 有望成为诊断皮肤肿瘤的标志物。

参考文献:

- [1] PAOLO C T D, DIAMANDIS E P, PRASSAS I. The role of kallikreins in inflammatory skin disorders and their potential as therapeutic targets[J]. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 2021, 58(1): 13.

- [2] MELLA C, FIGUEROA C D, OTTH C, et al. Involvement of kallikrein-related peptidases in nervous system disorders[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2020, 14(1):166.
- [3] FORTUGNO P, FURIO L, TESON M, et al. The 420K LEKTI variant alters LEKTI proteolytic activation and results in protease deregulation; implications for atopic dermatitis[J]. *Human Molecular Genetics*, 2012, 21(19):4190.
- [4] KIM J, KIM M G, JEONG S H, et al. STAT3 maintains skin barrier integrity by modulating SPINK5 and KLK5 expression in keratinocytes[J]. *Experimental Dermatology*, 2022, 31(2):223.
- [5] YAMAMOTO M, MIYAI M, MATSUMOTO Y, et al. Kallikrein-related peptidase-7 regulates caspase-14 maturation during keratinocyte terminal differentiation by generating an intermediate form[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(39):32829.
- [6] DE VEER S J, FURIO L, HARRIS J M, et al. Proteases: common culprits in human skin disorders[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2014, 20(3):176.
- [7] WOLF W C, EVANS D M, CHAO L, et al. A synthetic tissue kallikrein inhibitor suppresses cancer cell invasiveness[J]. *The American Journal of Pathology*, 2001, 159(5):1800.
- [8] BOYUKOZER F B, TANOGLU E G, OZEN M, et al. Kallikrein gene family as biomarkers for recurrent prostate cancer[J]. *Croatian Medical Journal*, 2020, 61(5):453.
- [9] PRASSAS I, EISSA A, PODA G, et al. Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015, 14(10):198.
- [10] RAWLINGS A V. Molecular basis for stratum corneum maturation and moisturization[J]. *British Journal of Dermatology*, 2014, 171(3):19.
- [11] DESCARGUES P, DERAISON C, BONNART C, et al. Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity[J]. *Nature Genetics*, 2005, 37(1):59.
- [12] CHAVANAS S, BODEMER C, ROCHAT A, et al. Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome[J]. *Nature Genetics*, 2000, 25(2):141.
- [13] ALVES M G, KODAMA M H, DA SILVA E Z M, et al. Relative expression of KLK5 to LEKTI is associated with aggressiveness of oral squamous cell carcinoma[J]. *Translational Oncology*, 2021, 14(1):100970.
- [14] 胡榜利, 利基林, 谢明智. SPINK 家族成员在肿瘤发病中的研究进展[J]. *微创医学*, 2019, 14(2):3.
- [15] 张鼎伟, 张燕飞, 汪炜, 等. SPINK7 对 IL-22 介导的角质细胞异常增殖及炎症应答的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(1):5.
- [16] REDELFS L, FISCHER J, WEBER C, et al. The serine protease inhibitor of Kazal-type 9 (SPINK9) is expressed in lichen simplex chronicus, actinic keratosis and squamous cell carcinoma[J]. *Archives of Dermatological Research*, 2016, 308(2):135.
- [17] WU Z, WU Y, FISCHER J, et al. Skin-derived SPINK9 kills escherichia coli[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2019, 139(5):1138.
- [18] SPERRHACHE M, FISCHER J, WU Z, et al. SPINK9 stimulates metalloprotease/EGFR-dependent keratinocyte migration via purinergic receptor activation[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2014, 134(6):1645.
- [19] 郑戎秉, 李旦, 沈佳怡, 等. 人源 SPINK6 在大肠杆菌中的表达优化[J]. *浙江科技学院学报*, 2020, 32(6):7.
- [20] CHOI M, PARK M, LEE S, et al. Establishment of Nrf2-deficient HaCaT and immortalized primary human foreskin keratinocytes and characterization of their responses to ROS-induced cytotoxicity[J]. *Toxicology in Vitro*, 2019, 61:104602.
- [21] MA L, YU H, NI Z, et al. Spink13, an epididymis-specific gene of the Kazal-type serine protease inhibitor (SPINK) family, is essential for the acrosomal integrity and male fertility[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(14):10154.