

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.01298

临床型乳房炎奶牛与健康奶牛嗜中性粒细胞差异蛋白质组的表达分析

刘开东^{1,2}, 柳楠¹, 杜立新³, 魏彩虹³, 张莉³, 路国彬³, 赵福平³, 刘积凤¹

1. 青岛农业大学动物科技学院, 青岛 266109;
2. 青岛市畜牧兽医研究所, 青岛 266100;
3. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 国家畜禽分子遗传育种中心, 北京 100193

摘要: 嗜中性粒细胞是防止病原入侵的第一道防线, 且已有研究表明嗜中性粒细胞在奶牛乳腺免疫中发挥着关键作用。文章运用双向凝胶电泳方法对临床型乳房炎奶牛与健康奶牛嗜中性粒细胞差异表达蛋白质组进行分析, 成功获得分辨率较高、重复性较好的奶牛嗜中性粒细胞双向电泳凝胶图谱, 并通过 MALDI-TOF MS 鉴定获得差异表达的蛋白质 7 种, 主要涉及细胞代谢、氧化应激、炎症反应等相关蛋白通路。实验获得的临床型乳房炎奶牛与健康奶牛嗜中性粒细胞差异表达蛋白有望为今后奶牛乳房炎的抗病育种研究提供理论依据。

关键词: 奶牛; 嗜中性粒细胞; 双向电泳; 蛋白质组学

Differential expression analysis of proteins in neutrophils between clinical mastitis and healthy dairy cows

LIU Kai-Dong^{1,2}, LIU Nan¹, DU Li-Xin³, WEI Cai-Hong³, ZHANG Li³, LU Guo-Bin³, ZHAO Fu-Ping³, LIU Ji-Feng¹

1. College of Animal Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;
2. Qingdao Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Qingdao 266100, China;
3. National Center for Molecular Genetics and Breeding of Animal, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: Neutrophils provide the first line of defense against invading pathogens and have been reported to play a key role in bovine mammary immune. To examine the differential expression of proteins in neutrophils between clinical mastitis and healthy dairy cows, a 2-dimensional electrophoresis gel map with high repeatability was constructed for bovine neutrophils. From this map, seven differentially expressed proteins were identified by MALDI-TOF MS, which are believed to be involved in pathways such as cell metabolism, oxidative stress, and inflammatory reaction. The differentially expressed proteins identified in this study may provide the basis for bovine mastitis resistance breeding research.

收稿日期: 2012-04-10; 修回日期: 2012-05-30

基金项目: 国家科学支撑计划项目(编号: 2006BAD04A01-31)资助

作者简介: 刘开东, 硕士研究生, 专业方向: 动物分子遗传育种。Tel: 15269277158, E-mail: kdliu0323@126.com

通讯作者: 柳楠, 博士, 教授, 研究方向: 羊遗传育种。E-mail: nanliu@sina.com

杜立新, 博士, 教授, 研究方向: 动物遗传育种与生物技术。E-mail: lxdu@263.net

网络出版时间: 2012-8-23 10:14:23

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120823.1014.002.html>

Keywords: dairy cows; neutrophils; two-dimensional electrophoresis; proteomics

奶牛乳房炎是危害奶牛养殖业最常见的疾病之一, 给奶牛生产造成巨大的经济损失。大量研究表明, 奶牛乳房炎的发生与乳腺的免疫密切相关^[1-2], 而嗜中性粒细胞在奶牛乳腺免疫中发挥着关键作用, 其表面一些受体蛋白的表达与乳房炎抗性相关, 已有研究表明 *C5a*、*C3a*、*LPS*、*IL-1*、*IL-2*、*IL-8* 及 *CD14* 均对应于嗜中性粒细胞表面的特殊受体, 通过与嗜中性粒细胞结合调控乳腺炎症反应^[3]。深入了解嗜中性粒细胞蛋白质组学研究可以帮助我们揭示嗜中性粒细胞发挥其生物学功能的潜在分子机理, 发现和治疗感染性疾病的生物学标记。随着蛋白质组学技术的迅速发展, 细胞蛋白质组学分析呈现出简单、快速、敏感和特异性的趋势, 现在可以针对某种特定的信号通路对各种不同的细胞系或不同生理状态下的细胞进行蛋白质组学的研究^[4]。目前 Lippolis 等^[5]已应用一维电泳-反向高效液相色谱-电喷雾串联质谱技术对奶牛嗜中性粒细胞蛋白质组进行了研究, 共鉴定出 250 个蛋白, 对我们更好的理解奶牛 PMN 的生物学功能提供了一个全景蛋白图谱。然而目前对于健康奶牛和患乳房炎奶牛的嗜中性粒细胞比较蛋白质组学的研究国内外未见报道。本研究通过 2-D 电泳技术分离健康和临床型乳房炎奶牛嗜中性粒细胞的蛋白, 肽指纹图谱技术对差异蛋白点进行鉴定, 以期寻找乳房炎的分子诊断和标记辅助选择的标志蛋白, 为奶牛乳房炎的抗病育种提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

从北京某牛场选取体况相近的临床型乳房炎奶牛和健康奶牛各 15 头。每头牛采奶样 50 mL, 在北京奶牛中心进行体细胞数检测, 健康奶牛标准体细胞数小于 20 万/mL, 临床型乳房炎奶牛标准体细胞数大于 100 万/mL, 并伴有红、肿、热、痛等症状。每头牛采血 10 mL, 在 4℃ 条件下, 迅速带回实验室进行处理。

1.2 方法

1.2.1 样品制备

取 2 mL EDTA 抗凝血, 1 500 r/min 水平离心 15 min。先吸取上层血浆, 离心获得无血小板血浆 (PPP) 用以重悬粗提的白细胞。再吸取富含白细胞的“云雾细胞层”, 放入另一试管, 再加入 2 mL Hanks 液, 混匀。缓慢加于预置 8 mL 75% Percoll 液 (密度为 1.090) 和 1 mL PPP 的硅化试管 (PPP 在上层), 注意保持两液界面的完整性。2 000 r/min 水平离心 20 min。取位于分离液界面上的白色层带, 以吸管小心移入另一预置的 4 mL 60% Percoll 液 (密度为 1.079) 的试管中, 2 000 r/min 水平离心 20 min。弃去上清, 加入 3 mL PBS 洗涤细胞 3 次。应用台盼蓝染色鉴定, 分离到的细胞中嗜中性粒细胞比率大于 90%~95%, 其余少量污染物主要为嗜酸性粒细胞。加入 ReadyPrep Protein Extraction kit (TOTAL PROTEIN) 裂解液抽提总蛋白, 分别将 15 头健康奶牛蛋白提取液混池, 15 头乳房炎奶牛蛋白提取液混池, 应用 RC DC protein assay kit 对蛋白质浓度进行测定, 分装储存在液氮中保存备用。

1.2.2 双向电泳

使用 pH3-10 的 IPG 宽胶条进行双向凝胶电泳, 取分装的样品用 RC DC protein assay kit (BIO-RAD) 测定浓度后, 聚焦盘中均匀加入含 200 μg 蛋白质样品的水化上样缓冲液 (7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 1% ASB-14, 40 mmol/L Tris base, 0.2% (w/v) 两性电解质, 1% TBP, 0.001% 溴酚蓝) 350 μL。揭去 IPG 胶条表面的保护层, 将胶条胶面朝下置入聚焦盘的相应聚焦槽内, 并在胶条上缓慢滴加一层矿物油, 防止胶条水化过程中液体的蒸发。最后将聚焦盘置于 PROTEAN® IEF Cell (BIO-RAD) 电泳仪中进行等电聚焦。

等电聚焦结束后, 将 IPG 胶条取出, 分别与 10 mL 平衡 A 液 (50 mmol/L Tris-HCl pH8.8, 6 mmol/L 尿素, 30% 甘油, 0.2% DTT, 痕量溴酚蓝) 和 10 mL 平衡液 B 液 (50 mmol/L Tris-HCl pH8.8, 6 mmol/L 尿素, 30% 甘油, 3% 碘乙酰胺, 痕量溴酚蓝) 各平衡 15 min。

然后移至预先灌注的 7%~20% 梯度 SDS-PAGE 凝胶顶端, 使胶面完全接触, 在凝胶的上方加入 0.5% 低熔点琼脂糖封胶液, 将凝胶移至垂直电泳槽内。起始电流 10 mA, 待样品完全走出 IPG(BIO-RAD) 胶条, 加大电流至 20 mA 毫安, 待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时停止电泳。取出凝胶, 切角做记号。对 2-DE 胶进行硝酸银染色。为保证重复性, 每组分别进行 3 次双向电泳。

1.2.3 凝胶图像分析

电泳图像经过 powerlook 2100XL(UMAX) 扫描后, 用 PDQuest 2DE 7.0 软件进行背景消减、斑点检测、自动匹配, 标记差异表达的蛋白斑点。

1.2.4 质谱鉴定

建立差异蛋白质表达谱后, 在图像上找到对应的差异点, 切出蛋白点后进行脱色、胶内胰酶酶切和肽段提取; 然后用 MALDI-TOF MS 进行肽质量指纹谱(Peptide mass fingerprinting, PMF) 分析。实验利用 FEFLEXTM III 型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(Bruker-Franzen Bremen)测定。

2 结果与分析

2.1 嗜中性粒细胞全蛋白质的表达检测

应用 Lorry 法对样品进行蛋白定量、2-DE 分离

和胶体银染后结果如图 1 所示。图谱用 PDQuest7.0 软件系统进行蛋白点的自动检测匹配和统计分析, 检测到乳房炎奶牛中性粒蛋白质硝酸银染色图谱 268 ± 16 个蛋白质点, 健康奶牛蛋白质样 259 ± 12 个蛋白质点, 中性粒蛋白质硝酸银染色图谱中有 19 个蛋白质点存在差异表达(蛋白质差异表达量在 2 倍以上), 5 个蛋白质点特异表达, 其中乳房炎嗜中性粒细胞中蛋白差异表达上调的蛋白点 14 个, 特异表达上调蛋白质点 4 个, 明显下调的蛋白点有 5 个, 特异表达下调蛋白质点 1 个。

2.2 蛋白质的鉴定

从健康奶牛与患病奶牛中, 选取了丰度较高、分辨清楚且在各个组中均有相同变化 15 个差异表达(差异大于 2 倍)的蛋白质点及 1 个特异表达的蛋白质点, 进行 MALDI-TOF-MS 分析, 利用 Mascot 查询软件搜索。共获得 8 个肽质量指纹图, 对应于 7 种蛋白质如图 1 所示, 结果见表 1, 其中蛋白质质谱图以蛋白点 2 为例见图 2。

3 讨论

3.1 临床型乳房炎奶牛嗜中性粒细胞中表达量下调的相关蛋白质

载脂蛋白 AI(APOA1) 具有抗内毒素、抗病毒以及调节急性相反应中的嗜中性粒细胞的功能, 在机

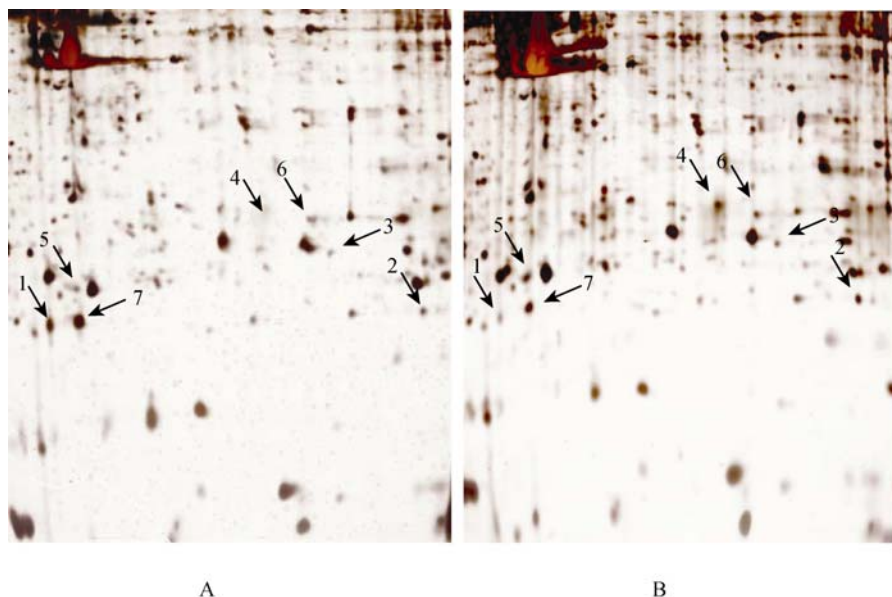


图 1 健康奶牛和临床型乳房炎奶牛嗜中性粒细胞蛋白质 2-DE 图谱
A: 健康奶牛 2-DE 图谱; B: 临床型乳房炎奶牛 2-DE 图谱。

表 1 MALDI-TOF MS 鉴定嗜中性粒细胞差异表达的蛋白点

序号	蛋白名称	登记号	分值	分子量/Da	匹配率	表达水平 (乳房炎/健康奶牛)
1	载脂蛋白A1	gi 245563	347	28415	78%	↓
2	胶转蛋白 2	gi 61888874	233	22583	87%	↑
3	磷酸丙糖异构酶 1	gi 61888856	213	26901	73%	↑
4	过氧化还原酶 6	gi 27807167	147	25108	60%	↑
5	I 型 β -转化生长因子受体	gi 149584431	90	55259	26%	↑
6	超氧化物歧化酶	gi 88853816	65	24794	25%	↑
7	C4 结合蛋白	gi 76677514	77	22393	50%	↓

注: ↓表示该蛋白在乳房炎奶牛中表达量下调; ↑表示该蛋白在乳房炎奶牛中表达量上调。

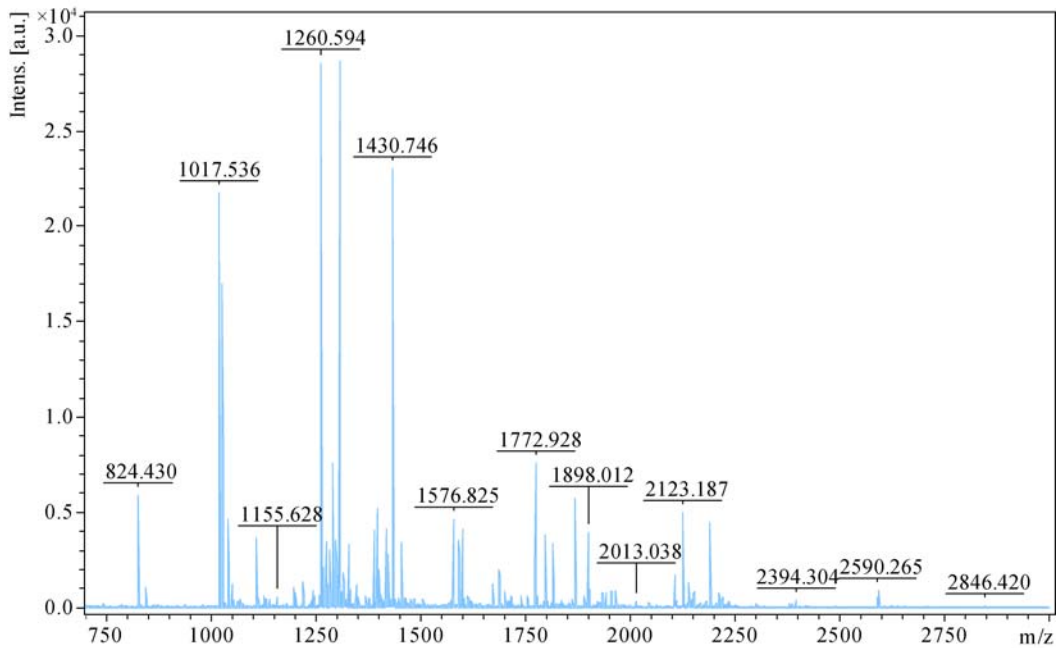


图 2 蛋白质点 2 的 MALDI-TOF MS 分析

体非特异性免疫系统中起到重要作用^[6-8]。Oikawa 等^[9]在病牛血清中检测到 *APOA1* 的表达量下调, 而王建峰等^[10]通过二向电泳等技术表明载脂蛋白 AI 在乳房炎乳腺组织中表达下调。本研究中 *APOA1* 在临床型乳房炎奶牛嗜中性粒细胞中表达量下调, 与负急性期蛋白的结论相一致, 这可能是在乳房炎发生过程中, *APOA1* 具有结合病原菌释放的内毒素(LPS), 消除炎症反应, 调节急性相反应中的嗜中性粒细胞的功能。

C4 结合蛋白(C4BP)是一个急性期蛋白, 重要的补体抑制因子。其与 C4 结合后, 将直接抑制补体系统经典途径和凝集素途径的激活, 同时抑制天然免疫反应。本研究表明其在临床型乳房炎嗜中性粒

胞中表达量明显下调, 可能是引起奶牛乳房炎的重要因素之一。

3.2 临床型乳房炎奶牛嗜中性粒细胞中表达量上调的相关蛋白质

超氧化物歧化酶(SOD)是线粒体的一种抗氧化酶类, 具有清除机体内所产生的超氧阴离子的作用, 在体内充当着内源性细胞防御系统的角色^[11]。Kleczkowski 等^[12]研究证明在金黄色葡萄球菌, 链球菌, 和大肠杆菌引起的临床型乳房炎中, 血清中 SOD 表达量下调且差异显著。此外, SOD 可作为嗜中性粒细胞引起炎症的有效抑制因子, 减少嗜中性粒细胞释放的自由基造成的氧化损伤^[13]。

SOD在临床型乳房炎奶牛嗜中性粒细胞中表达量变化,表明其可能参与了清除乳房炎发生过程中产生的过氧化物游离基,减少自由基氧化损伤,消除炎症的过程。

型 β -转化生长因子受体(TGF- β R1),是细胞膜上TGF β 信号通路必需的 I 型特异受体。TGF β 现被认为是一种强效免疫抑制因子,高水平的TGF β 能抑制免疫细胞(CIM⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞、DC细胞、B细胞)等的增生和活性^[14]。转染TGF β 基因到大鼠妊娠期和哺乳期的乳腺中,与野生型大鼠相比,前者乳蛋白合成减少,产乳量下降,分泌上皮细胞的生存能力下降^[15]。型 β -转化生长因子受体在乳房炎奶牛嗜中性粒细胞中表达量变化,可能是通过影响TGF β 信号通路参与了奶牛乳房炎发生过程中的免疫抑制。

胶转蛋白 2(TAGLN2)属于钙结合蛋白家族,在细胞信号传导途径中起着非常重要的作用。Merchan等^[16, 17]将LPS注入鳄鱼体内,发现白细胞中TAGLN2的表达量显著上升(7.54倍)而在B细胞慢性淋巴细胞白血病及B细胞伯基特氏淋巴瘤细胞中检测到TAGLN2表达量分别上调11.8倍和6.3倍,其表达量与细胞增殖相关。Nagase等^[18]发现TAGLN2在外周血白细胞中表达,并推测TAGLN2可能具有重要的免疫功能。本研究表明,在临床型乳房炎奶牛嗜中性粒细胞中TAGLN2表达量上调,推测TAGLN2在奶牛乳房炎发生过程中可能具有重要的免疫功能。

过氧化还原酶 6(PRX6)是具有谷胱甘肽过氧化物酶和磷脂酶A₂双重酶活性的蛋白,在机体抗氧化防御系统中起着重要的作用^[19]。有研究证实PRX6与多种疾病密切相关,在乳腺癌细胞株、肺恶性间皮瘤、鳞状细胞癌以及早衰细胞中表达量均上调^[20-23],而且PRX6可能参与了中性粒白细胞NADPH氧化酶的激活,阻止了红细胞溶血产物中高铁血红蛋白的形成^[24]。本研究鉴定的PRX6在乳房炎嗜中性粒细胞的表达高于正常组,提示在乳房炎疾病也存在氧化应激这一病理过程,而抗氧化剂酶在这一过程中起着重要作用,保护细胞免受内外环境的氧化应激。

磷酸丙糖异构酶 1(TPI)在糖酵解、脂肪酸合成、糖原再生和戊糖磷酸途径中发挥着重要作用,是一

种新陈代谢相关的酶,TPI的变化可能影响整个糖代谢过程。本研究显示TPI在临床型乳房炎奶牛嗜中性粒细胞中表达量上调,推测可能在乳房炎发生过程中,细胞原有的体内平衡被打破,为了建立新的平衡,机体需要启动各种防御措施,如清除自由基及合成渗透调节物质,这些过程均需要消耗额外的能量,TPI的变化可能有助于激活相关的能量代谢过程,提高奶牛的抗炎性,但是TPI在机体具体发挥何种作用及其作用机理需要进一步研究证实。

实验表明健康奶牛嗜中性粒细胞及患乳房炎奶牛嗜中性粒细胞的蛋白质表达确实存在差异。2005年,Lippolis等^[5]已应用一维电泳-反向高效液相色谱-电喷雾串联质谱技术对6头健康奶牛嗜中性粒细胞蛋白质组进行了研究,共鉴定出250个蛋白,其中包括与细胞信号转导、凋亡、吞噬及免疫等相关的蛋白,为我们深入理解奶牛嗜中性粒细胞的生物学功能提供了一个全景蛋白图谱。在此基础上本研究通过健康奶牛与患乳房炎奶牛双向电泳及质谱鉴定的方法寻找差异表达的蛋白质,共发现乳房炎奶牛268 \pm 16个差异蛋白质点,健康奶牛259 \pm 12个差异蛋白质点,鉴定出7种差异表达蛋白,其中过氧化还原酶6、C4结合蛋白、磷酸丙糖异构酶、超氧化物歧化酶在Lippolis的试验中均检测到。

本研究建立了临床型乳房炎和健康奶牛外周血嗜中性粒细胞的双向凝胶图谱,并结合质谱技术和生物信息学技术进行了差异蛋白质组学的研究。研究鉴定了与细胞代谢、氧化应激、炎症反应,信号转导相关的7个差异表达蛋白质,差异蛋白质组的研究有利于探索奶牛乳房炎抗性的分子机理,为疾病的治疗和诊断提供全面的信息,为奶牛乳房炎抗病育种提供理论依据。

参考文献(References):

- [1] Burton JL, Erskine RJ. Immunity and mastitis some new ideas for an old disease. *Vet Clin Food Anim*, 2003, 19(1): 1-45. DOI
- [2] Kehrl ME Jr, Harp JA. Immunity in the mammary gland. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract*, 2001, 17(3): 495-512. DOI

- [3] Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res*, 2003, 34(5): 597–627. [DOI](#)
- [4] Wang XD, Zhao H, Roland A. Proteomics and leukocytes: An approach to understanding potential molecular mechanisms of inflammatory responses. *J Proteome Res*, 2004, 3(5): 921–929. [DOI](#)
- [5] Lippolis JD, Reinhard TA. Proteomic survey of bovine neutrophils. *Vet Immunol Immunop*, 2005, 103(1–2): 53–65. [DOI](#)
- [6] Ma J, Liao XL, Lou B, Wu MP. Role of apolipoprotein A-I in protecting against endotoxin toxicity. *Acta Biochem Biophys Sin*, 2004, 36(6): 419–424. [DOI](#)
- [7] Tominaga K, Saito S, Matsuura M, Nakano M. Lipopolysaccharide tolerance in murine peritoneal macrophages induces downregulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway through mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B cascades, but not lipopolysaccharide-incorporation steps. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1450(2): 130–144. [DOI](#)
- [8] Singh IP, Chopra AK, Coppenhaver DH, Ananatharamiah GM, Baron S. Lipoproteins account for part of the broad non-specific antiviral activity of human serum. *Antivir Res*, 1999, 42(3): 211–218. [DOI](#)
- [9] Oikawa S, Katoh N. Decreases in serum apolipoprotein B-100 and A-I concentrations in cows with milk fever and downer cows. *Can J Vet Res*, 2002, 66(1): 31–34. [DOI](#)
- [10] 王建锋, 赵兴绪, 张勇, 徐铁山. 健康奶牛与临床型乳腺炎奶牛乳腺核蛋白组差异表达分析. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(1): 105–111. [DOI](#)
- [11] Yasui K, Baba A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. *Inflamm Res*, 2006, 55(9): 359–363. [DOI](#)
- [12] Kleczkowski M, Klucinski W, Jakubowski T, Fabisiak M, Demebele K. Copper status and SOD activity in blood of cows affected with clinical mastitis. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2008, 52(3): 387–390. [DOI](#)
- [13] Xin Z, Waterman DF, Hemken RW, Harmon RJ. Effects of copper status on neutrophil function, superoxide dismutase, and copper distribution in steers. *J Dairy Sci*, 1991, 74(9): 3078–3085. [DOI](#)
- [14] Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15 and IL-17 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 657–679. [DOI](#)
- [15] Kordon EC, McKnight RA, Jhappan C, Hennighausen J, Merlino G, Smith GH. Ectopic TGF β 1 expression in the secretory mammary epithelium induces early senescence of the epithelial stem cell population. *Dev Biol*, 1995, 168(1): 47–61. [DOI](#)
- [16] Merchant M, Kinney C, Sanders P. Differential protein expression in alligator leukocytes in response to bacterial lipopolysaccharide injection. *Comp Biochem and Physiol*, 2009, 4(4): 300–304. [DOI](#)
- [17] Gez S, Crossett B, Christopherson RI. Differentially expressed cytosolic proteins in human leukemia and lymphoma cell lines correlate with lineages and functions. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1774(9): 1173–1183. [DOI](#)
- [18] Nagase T, Miyajima N, Tanaka A, Sazuka T, Seki N, Sato S, Tabata S, Ishikawa K, Kawarabayasi Y, Kotani H, Nomura N. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. III. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0081–KIAA0120) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1. *DNA Res*, 1995, 2(1): 37–43. [DOI](#)
- [19] Manevich Y, Fisher AB. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. *Free Radical Biol Medicine*, 2005, 38(11): 1422–1432. [DOI](#)
- [20] Kinnula VL, Lehtonen S, Sormunen R, Kaarteenaho-Wiik R, Kang SW, Rhee SG, Soini Y. Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V, and VI in malignant mesothelioma. *J Pathol*, 2002, 196(3): 316–323. [DOI](#)
- [21] Lehtonen ST, Svensk AM, Soini Y, Pääkkö P, Hirvikoski P, Kang SW, Säily M, Kinnula VL. Peroxiredoxins, a novel protein family in lung cancer. *Int J Cancer*, 2004, 111(4): 514–521. [DOI](#)
- [22] Dierick JF, Kalume DE, Wenders F, Salmon M, Dieu M, Raes M, Roepstorff P, Toussaint O. Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence. *FEBS Lett*, 2002, 531(3): 499–504. [DOI](#)
- [23] Leavey PJ, Gonzalez-Aller C, Thurman G, Kleinberg M, Rinckel L, Ambruso DW, Freeman S, Kuypers FA, Ambruso DR. A 29-kDa protein associated with p67phox expresses both peroxiredoxin and phospholipase A2 activity and enhances superoxide anion production by a cell-free system of NADPH oxidase activity. *J Biol Chem*, 2002, 277(47): 45181–45187. [DOI](#)
- [24] Stuhlmeier KM, Kao JJ, Wallbrandt P, Lindberg M, Hammarstrom B, Broell H, Paigen B. Antioxidant protein 2 prevents methemoglobin formation in erythrocyte hemolysates. *Eur J Biochem*, 2003, 270(2): 334–341. [DOI](#)