

# Klotho 基因沉默对肾小管上皮细胞草酸钙晶体粘附的影响\*

阿力木·热合曼 邹安庆 刘若天 贺毅 陈策 郜乐 杨奇 木拉提·马合木提

(新疆医科大学第二附属医院泌尿外科, 新疆 乌鲁木齐 830036)

**【摘要】** 目的 探讨短发夹 RNA(shRNA)稳定转染方法沉默 Klotho 基因对草酸钙晶体诱导人肾小管上皮细胞氧化应激及粘附的影响。方法 肾小管上皮细胞分为 Ctrl、shRNA-NC、shRNA-Klotho、COM、shRNA-Klotho+COM 组。ELISA 检测 5 组氧化应激指标谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、血红素氧合酶 1(HO-1)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)水平。Western blot 检测 5 组 Klotho 蛋白水平。AlexaFluor-488-标记钙检测草酸钙晶体的黏附。结果 与 Ctrl 组相比, shRNA-Klotho 组 GSH、SOD、HO-1 含量均显著降低( $P < 0.05$ ), 而 MDA 及 ROS 含量显著增高( $P < 0.05$ )。与 Ctrl 组相比, shRNA-Klotho 组 Klotho 蛋白表达水平下调( $P < 0.05$ ); 与其他组相比, shRNA-Klotho+COM 组 Klotho 蛋白表达水平下调最为明显( $P < 0.05$ )。与 COM 组相比, shRNA-Klotho+COM 组草酸钙晶体黏附增加了 123.47% ( $P < 0.05$ )。结论 沉默 Klotho 基因可加重草酸钙诱导的人肾小管上皮细胞氧化应激, 并使草酸钙晶体对肾小管上皮细胞的黏附增加。

**【关键词】** Klotho; 肾小管上皮细胞; 草酸钙; 氧化应激

**【中图分类号】** R329.2+8 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2023.04.004

## Effect of Klotho Gene Silencing on calcium oxalate crystal adhesion of renal tubular epithelial cells

ALIMU Rehehan, ZOU Anqing, LIU Ruotian, HE Yi, CHEN Ce, GAO Le, YANG Qi, MULATI Mahemuti

(Department of Urology, The Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effects of short hairpin RNA (shRNA) stable transfection and Klotho Gene Silencing on oxidative stress and adhesion of human renal tubular epithelial cells induced by calcium oxalate crystal. **Methods** Renal tubular epithelial cells were divided into Ctrl group, shRNA NC group, shRNA Klotho group, Com group and shRNA Klotho + com group. The expression of Klotho was detected by Western blot. The levels of GSH, SOD, HO-1, CAT and MDA were detected by ELISA. Alexafluor-488-labeled calcium was used to detect the adhesion of calcium oxalate crystals. **Results** Compared with Ctrl group, the expression of Klotho mRNA and protein in shRNA Klotho group were down regulated ( $P < 0.05$ ). Compared with other groups, the expression levels of Klotho mRNA and protein decreased most significantly in shRNA Klotho + com group ( $P < 0.05$ ). The contents of GSH, SOD and HO-1 in shRNA Klotho group were significantly lower than those in Ctrl group ( $P < 0.05$ ). The contents of MDA and ROS increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with com group, the adhesion of calcium oxalate crystals in shRNA Klotho + com group increased by 123.47% ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Silencing Klotho Gene can aggravate the oxidative stress of human renal tubular epithelial cells induced by calcium oxalate and increase the adhesion of calcium oxalate crystals to renal tubular epithelial cells.

**【Key words】** Klotho; Human renal tubular epithelial cells; Calcium oxalate; Oxidative stress

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760128)

通讯作者: 木拉提·马合木提, E-mail: mekit@126.com

引用本文: 阿力木·热合曼, 邹安庆, 刘若天, 等. Klotho 基因沉默对肾小管上皮细胞草酸钙晶体粘附的影响[J]. 西部医学, 2023, 35(4): 485-489.

DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2023.04.004

泌尿系结石是一种世界范围性疾病,发病率有逐年上升的趋势,其成分以草酸钙(Calcium oxalate, CaOx)为主<sup>[1-2]</sup>。近来许多研究表明,尿液中过量的草酸或 CaOx 晶体可导致肾小管上皮细胞氧化应激损伤,产生大量的自由基,主要是活性氧(reactive oxygen species, ROS),对 CaOx 结石的形成起着重要作用<sup>[3-4]</sup>。Klotho 是一种发挥多种生物学作用的蛋白,包括抗衰老、抗炎、抗凋亡及抗氧化应激等<sup>[5-6]</sup>。目前,关于 Klotho 在人肾小管上皮细胞(human renal proximal tubular epithelial cells, HKC)对草酸钙晶体氧化应激/损伤的相关报道较少,且作用机制尚不明确。本研究利用 shRNA 沉默 *Klotho* 基因,旨在研究下调 *Klotho* 基因的表达时,草酸钙晶体对 HKC 氧化应激损伤及粘附的影响,探讨其可能的机制。

## 1 材料与方法

1.1 材料 HKC 细胞株购自 American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA), Lipofectamine™ 3000 和 OPTI-MEM 培养基(Invitrogen 公司, USA), ECL 发光液(Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA), Trizol (Takara, Japan), iScript cDNA 合成试剂盒(Bio-Rad, Hercules, CA, USA), GSH ELISA Kit、SOD ELISA Kit、HO-1 ELISA Kit 购自上海酶联生物科技有限公司, CAT ELISA Kit(上海盈公生物科技有限公司), MDA ELISA Kit(武汉华美生物工程有限公司), 活性氧检测试剂盒(碧云天生物技术研究所), Alexa Fluor-488IgG、Thermo 草酸钙单晶(COM)购自 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA), Klotho shRNA Lentiviral Particles (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), 由上海吉凯基因化学技术有限公司构建。

### 1.2 方法

1.2.1 实验分组 采用含 10% 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)的 DMEM/F12 培养基培养细胞,并于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育。细胞分为 Ctrl 组、shRNA-NC 组、shRNA-Klotho 组、COM 组、shRNA-Klotho+COM 组。

1.2.2 Klotho 敲低稳转细胞株的构建 病毒转染:转染前 24 h,向 24 孔板中每孔接种 0.5×10<sup>5</sup> 个细胞,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜。将完全培养基和聚凝胺(hexadimethrine bromide, Polybrene)混合,混合后浓度为 8 μg/mL。将 24 孔板中的培养基替换为每孔 0.5 mL 的 Polybrene-培养基混合物,按照 Lipofectamine 3000 操作说明进行 shRNA 的转染,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养;待细胞长满后,按照 1:3 的比例对细胞进行传代处理,培养 48 h 后用

于后续实验。

1.2.3 ELISA 检测 GSH、SOD、HO-1、CAT、MDA 与 ROS 水平 ELISA 法取对数生长期的转染细胞接种于 96 孔培养板中,24 h 贴壁后进行 GSH、SOD、HO-1、CAT、MDA 与 ROS 检测。实验严格按照 ELISA 试剂盒检测说明进行。

1.2.4 Western blot 检测蛋白水平 将对数生长期的细胞制备为细胞悬液(约为 1×10<sup>6</sup> 细胞/mL)按实验分组接种于 6 孔板中,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每 20 μL 细胞沉淀加入 200 μL 添加了苯甲基磺酰氟(Phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)的 RIPA,冰浴 30 min,4 °C 12000~16000 g 离心 5 min,抽提细胞总蛋白。转膜完成后,观察膜上的蛋白。将膜置于自封袋中,加入一抗,4 °C 过夜。加入二抗,封闭袋口,室温下孵育 1 h。等体积混合化学发光试剂 A 液和 B 液,将膜蛋白面向下与此混合液充分接触。用 Tanon 6600 发光成像工作站进行图像采集。

1.2.5 ROS 测定 取对数生长期细胞以 1×10<sup>4</sup> cells/孔接种于 96 孔板,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,按照分组情况向孔板内加入含 COM(100 μg/mL)的完全培养基孵育 72 h。按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA(2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate, 活性氧荧光探针),使其终浓度为 10 μmol/L,将各组细胞弃去上清液,每孔内添加 100 μL DCFH-DA 的无血清培养基重悬细胞,转移至细胞培养箱孵育 20 min,孵育结束后,用无血清培养液洗涤细胞 3 次,以除去未进入细胞内的 DCFH-DA,随后使用酶标仪在 525 nm 测定 OD 值。

1.2.6 草酸钙晶体黏附试验 AlexaFluor-488-标记草酸钙晶体将 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 和 0.5 mmol/L Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 在缓冲液(90 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L NaCl, 0.11 μg/mL AlexaFluor-488IgG)中混合,2000 g 离心 5 min 收集草酸钙晶体,弃去上清,使用甲醇重悬沉淀,2000 g 离心 5 min,弃上清,于室温下空气干燥过夜。取对数生长期细胞以 1×10<sup>6</sup> cells/孔接种于 6 孔板,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,直至细胞 60% 融合后,每组细胞加入 200 μg/mL AlexaFluor-488COM 孵育 60 min。孵育完成后使用磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)轻轻洗去游离的 COM,清洗完成后使用 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚)染核,于荧光显微镜下观察摄片,随后每孔加入 2 mL HCl (5 mol/L)溶解草酸钙晶体,使用原子吸收光谱仪检测 Ca<sup>2+</sup> 含量。

1.3 统计学分析 使用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用 one-way

ANOVA 和 Tukey's 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 Klotho 沉默稳转细胞株的成功构建 与 Ctrl 组及 shRNA-NC 相比, shRNA-Klotho 组 Klotho 蛋白的表达量均被有效抑制, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 1。提示构建的重组慢病毒载体 shRNA-Klotho 具有显著的沉默效能。

2.2 shRNA 沉默 Klotho 后肾小管上皮细胞氧化应激相关指标的表达 使用 COM 孵育 HKC 细胞后, 各组氧化应激关键蛋白 GSH、SOD、HO-1、CAT 的表达下降, MDA 与 ROS 的表达上升 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。提示细胞内氧化应激反应发生。

表 1 各组氧化应激关键蛋白 GSH、SOD、HO-1、CAT 的表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of the expression of key proteins for oxidative stress among different groups

组别	GSH	SOD	HO-1	CAT	MDA	ROS
Ctrl 组	10.41±1.82	20.49±1.35	116.12±6.67	4.32±0.46	11.30±1.76	7.20±0.64
shRNA-NC 组	6.61±1.72 <sup>①</sup>	18.91±1.94	94.30±21.79	3.37±0.59	12.08±1.96	7.48±0.47
shRNA-Klotho 组	4.20±0.51 <sup>①</sup>	15.40±2.08 <sup>①</sup>	83.47±13.57 <sup>①</sup>	2.15±0.38 <sup>①</sup>	18.45±3.80	10.01±1.46
COM 组	4.08±0.43 <sup>①</sup>	9.78±1.23 <sup>①</sup>	65.55±15.32	1.45±0.12 <sup>①</sup>	38.36±7.73 <sup>①</sup>	16.87±1.54 <sup>①</sup>
shRNA-Klotho+COM 组	2.12±0.41 <sup>①</sup>	5.38±0.61 <sup>①</sup>	43.41±7.35 <sup>①</sup>	0.91±0.16 <sup>①</sup>	45.77±6.33 <sup>①</sup>	25.37±5.47 <sup>①</sup>

注: 与 Ctrl 组相比, ①  $P < 0.05$

2.3 shRNA 沉默 Klotho 后各组肾小管上皮细胞 Klotho 蛋白表达情况 使用 COM 孵育人肾小管上皮细胞细胞后, 各组肾小管上皮细胞 Klotho 蛋白的表达出现明显的差异, shRNA-Klotho+COM 组较 COM 组 Klotho 蛋白表达水平显著下降 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

2.4 shRNA 沉默 Klotho 后肾小管上皮细胞 COM 的黏附增加 使用 COM 孵育 HKC 细胞后, COM 与 HKC 细胞发生黏附反应, 沉默 Klotho 基因会使 COM 的黏附增加 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

## 3 讨论

目前研究表明, 肾结石是一种多因素参与、复杂的病理生理过程, 氧化应激、炎症反应、肾小管上皮细胞皮损伤等在肾结石发生、发展过程中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。当机体内草酸代谢平衡发生紊乱时会产生氧化活性物质或毒性物质, 最终导致肾小管上皮细胞凋亡/坏死, 致使草酸钙晶体黏附成石<sup>[8-9]</sup>。因此, 肾小管上皮细胞的氧化应激与肾结石的发生发展密切相关。Klotho 最初是作为一种抗衰老蛋白被发现, 人类 Klotho 基因均位于 13 号染色体。Klotho 基因的编码区含 5 个外显子和 4 个内含子, 其翻译产物 Klotho 蛋白具有膜型和分泌型 2 种亚型<sup>[10-11]</sup>; 其主要表达在肾脏、大脑的脉络丛、脑垂体、甲状旁腺、胰腺、卵巢、睾丸等组织中, 以肾脏远端小管上皮细胞的表达水平最

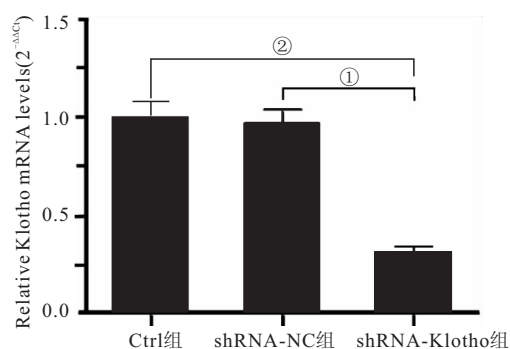


图 1 Klotho 蛋白表达量

Figure 1 Comparison of the expression of klotho protein among different groups

注: 与 shRNA-Klotho 组比较, ①  $P < 0.05$ ; 与 Ctrl 组比较, ②  $P < 0.05$ 。

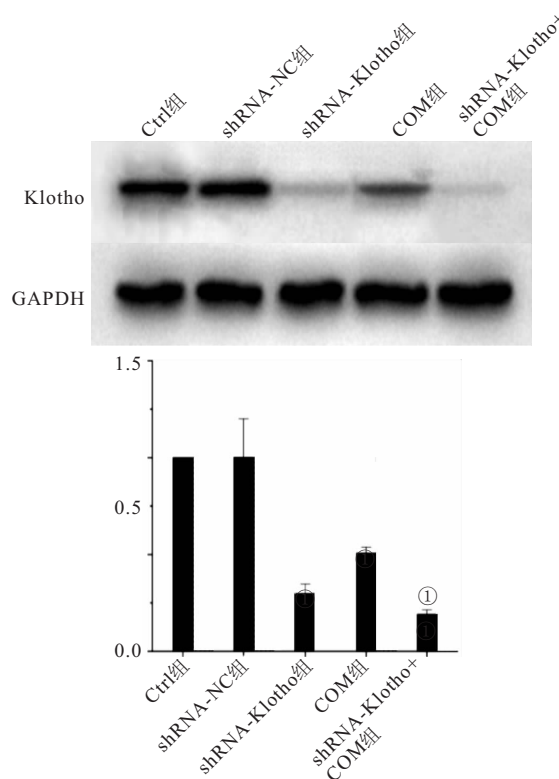


图 2 shRNA 沉默 Klotho 后各组肾小管上皮细胞 Klotho 蛋白表达情况

Figure 2 Comparison of the expression of klotho protein of HKC cells among different groups after shRNA silencing

注: 与 COM 组相比, ①  $P < 0.05$

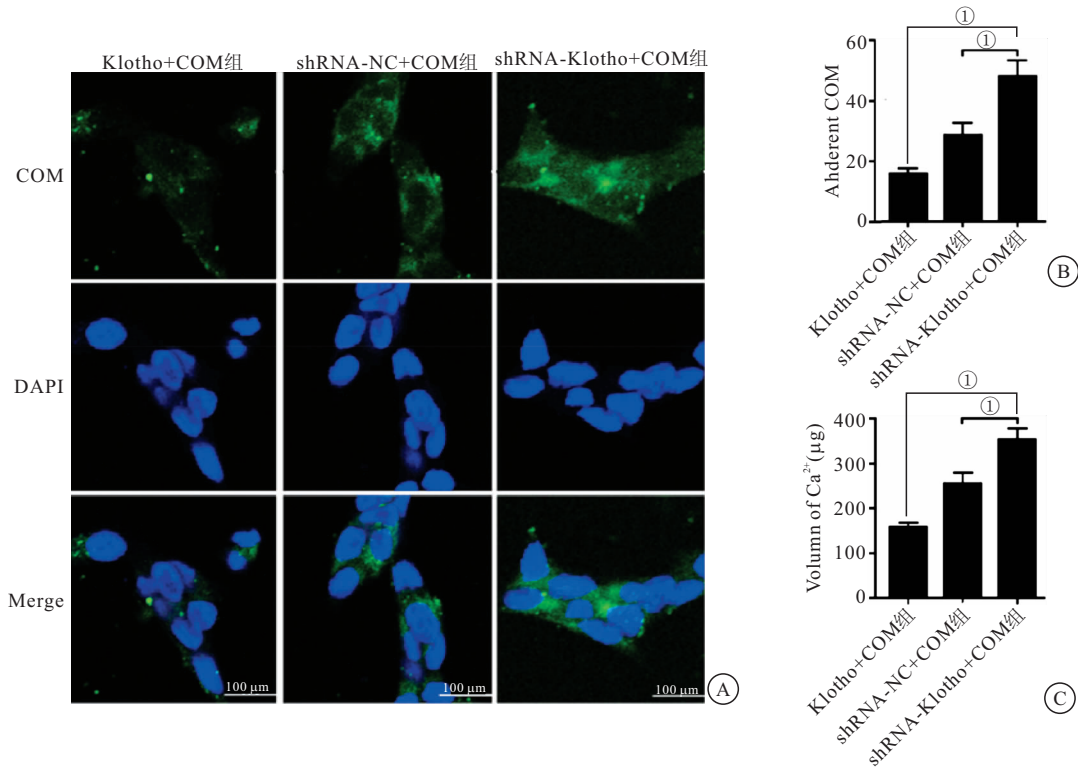


图 3 shRNA 沉默 Klotho 后肾小管上皮细胞 COM 的黏附对比

Figure 3 Comparison of the COM adhesion of HKC cells among different groups after shRNA silencing

注:与 Klotho+COM 组、shRNA-NC+COM 组比较,①P<0.05

高<sup>[12-13]</sup>。虽然 Klotho 作为抗衰老物质引起广泛重视,但近年来研究发现 Klotho 蛋白除抗衰老作用外,还具有抗氧化应激、抑制炎症、抗凋亡以及抗组织纤维化等作用,是一种具有多种生物学功能的一种蛋白质<sup>[14-15]</sup>。

近年来,氧化应激在肾结石形成中的作用受到越来越多的关注<sup>[16-17]</sup>。氧化应激诱导的肾脏损伤可能是肾脏中较高浓度草酸促进 CaOx 晶体沉积的关键因素<sup>[18-19]</sup>。为了深入了解 Klotho 在肾小管上皮细胞中的作用,本研究采用短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 稳定转染方法沉默 Klotho,检测草酸钙晶体对肾小管上皮细胞氧化损伤程度及草酸钙晶体粘附率的影响。

MDA 是细胞脂质氧化应激的重要产物之一,是组织细胞受到自由基侵害时间间接证据。ROS 的急剧增加会对细胞结构造成严重损害,是氧化应激反应的表现。GSH、SOD、CAT、HO-1 是细胞抗氧化应激体系中重要的抗氧化酶,可对抗与阻断因氧自由基对细胞造成的损害,并及时修复受损细胞<sup>[20]</sup>。本研究结果表明,shRNA 沉默 Klotho 表达降低了肾小管上皮细胞氧化应激相关指标的含量水平,增加 MDA 及 ROS 含量,进一步加重了肾小管上皮细胞氧化应激反应及损伤,提示 Klotho 可以影响 COM 诱导的 HKC 细胞

内氧化应激反应。Khan<sup>[21]</sup> 研究发现,可引起正常肾小管上皮细胞产生 ROS,而 ROS 与氧化应激共同诱导炎症级联反应损伤肾小管上皮细胞,从而促进草酸钙晶体粘附、成核和生长,最终导致结石的形成<sup>[22-23]</sup>。这与本研究结果基本相同。ROS 的生成与氧化损伤作用与多种信号通路、细胞因子等调节有关,Klotho 的缺失加重了肾小管上皮细胞的损伤,这也从反向证明了 Klotho 的抗氧化作用。

草酸钙晶体粘附成石必须有粘附点,本研究通过 AlexaFluor-488 标记草酸钙晶体,使用原子吸收光谱仪检测 Ca<sup>2+</sup> 含量。在人肾小管上皮细胞细 shRNA 沉默 Klotho 并使用 COM 处理后发现,shRNA-Klotho 组较 Ctrl 组肾小管上皮细胞草酸钙晶体粘附显著增加,shRNA-Klotho 组是 Ctrl 组的 123.47% (P<0.05)。氧化应激诱导的肾小管上皮细胞损伤可能是促进 CaOx 晶体沉积的关键因素,这种情况在沉默 Klotho 组中尤为明显。本研究所涉及的范围仅为细胞水平的体外实验,需要进行体内实验进一步验证沉默 Klotho 基因可加重人肾小管上皮细胞因草酸诱导的氧化损伤机制,完善 Klotho 基因抗氧化损伤在泌尿系结石形成中的作用这一理论。

#### 4 结论

Klotho 基因沉默可加重人肾小管上皮细胞因草

酸诱导的氧化损伤,进一步加重草酸钙晶体在损伤的肾小管上皮细胞上黏附成石。

#### 【参考文献】

- [1] KHAN A. Prevalence, pathophysiological mechanisms and factors affecting urolithiasis[J]. *Int Urol Nephrol*, 2018, 50(5): 799-806.
- [2] 赵宇,陈忠敏. 草酸钙结石的研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2018, 31(5): 555-560.
- [3] ZHU J, WANG Q, LI C, *et al.* Inhibiting inflammation and modulating oxidative stress in oxalate-induced nephrolithiasis with the Nrf2 activator dimethyl fumarate[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 134: 9-22.
- [4] 王敬坤,郝志强,杨恒等. 氧自由基在纳米细菌致肾结石形成过程中的作用[J]. *吉林医学*, 2020, 41(9): 2053-2057.
- [5] KURO-O M. The Klotho proteins in health and disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(1): 27-44.
- [6] 王喆,姜埃利. Klotho 在急性肾损伤诊断和治疗的研究进展[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2021, 30(2): 159-164.
- [7] 梁雄发,卢小刚,陈东,等. 肾小管上皮细胞损伤促进草酸钙结石形成的研究进展[J]. *中华腔镜泌尿外科杂志(电子版)*, 2018, 12(4): 281-283.
- [8] KHAN S R, CANALES B K, DOMINGUEZ-GUTIERREZ P R. Randall's plaque and calcium oxalate stone formation: role for immunity and inflammation[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 17(6): 417-433.
- [9] ZHU W, ZHAO Z, CHOU F J, *et al.* The Protective Roles of Estrogen Receptor  $\beta$  in Renal Calcium Oxalate Crystal Formation via Reducing the Liver Oxalate Biosynthesis and Renal Oxidative Stress-Mediated Cell Injury[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 5305014.
- [10] LIM K, GROEN A, MOLOSTVOV G, *et al.*  $\alpha$ -Klotho Expression in Human Tissues[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(10): E1308-1318. doi: 10.1210/jc.2015-1800.
- [11] 刘蕾,朱锦明,李亚楠,等. 胎儿生长受限孕妇血清、胎盘组织中 Klotho 及 VEGFR2 蛋白的表达及其临床意义[J]. *实用医学杂志*, 2021, 37(3): 331-335.
- [12] KURO-O M, MATSUMURA Y, AIZAWA H, *et al.* Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing[J]. *Nature*, 1997, 390(6655): 45-51.
- [13] HU M C, SHI M, ZHANG J, *et al.* Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating  $\alpha$ Klotho[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(1): 79-90.
- [14] WANG Y, KURO-O M, SUN Z. Klotho gene delivery suppresses Nox2 expression and attenuates oxidative stress in rat aortic smooth muscle cells via the cAMP-PKA pathway[J]. *Aging Cell*, 2012, 11(3): 410-417.
- [15] SUGIURA H, YOSHIDA T, SHIOHIRA S, *et al.* Reduced Klotho expression level in kidney aggravates renal interstitial fibrosis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 302(10): F1252-1264. doi: 10.1152/ajprenal.00294.2011.
- [16] ABHISHEK A, BENITA S, KUMARI M, *et al.* Molecular analysis of oxalate-induced endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis in the pathogenesis of kidney stone disease[J]. *J Physiol Biochem*, 2017, 73(4): 561-573.
- [17] 叶涛,叶章群. 炎症和氧化应激反应与肾结石形成的研究进展[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2018, 39(9): 711-713.
- [18] JOSHI S, KHAN S R. Opportunities for future therapeutic interventions for hyperoxaluria: targeting oxidative stress[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, 23(5): 379-391.
- [19] CHAIYARIT S, THONGBOONKERD V. Mitochondrial Dysfunction and Kidney Stone Disease[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 566506. doi: 10.3389/fphys.2020.566506.
- [20] 王成材,郝鹏. 白藜芦醇对乙二醇所致大鼠肾结石形成的影响[J]. *黑龙江医药科学*, 2020, 43(1): 17-19.
- [21] KHAN S R. Reactive oxygen species as the molecular modulators of calcium oxalate kidney stone formation: evidence from clinical and experimental investigations[J]. *J Urol*, 2013, 189(3): 803-811.
- [22] ALBERT A, PAUL E, RAJAKUMAR S, *et al.* Oxidative stress and endoplasmic stress in calcium oxalate stone disease: the chicken or the egg? [J]. *Free Radic Res*, 2020, 54(4): 244-253. doi: 10.1080/10715762.2020.1751835
- [23] DUAN X, KONG Z, MAI X, *et al.* Autophagy inhibition attenuates hyperoxaluria-induced renal tubular oxidative injury and calcium oxalate crystal depositions in the rat kidney[J]. *Redox Biol*, 2018, 16: 414-425. doi: 10.1016/j.redox.2018.03.019
- (收稿日期: 2021-08-06; 修回日期: 2022-11-14; 编辑: 黎仕娟)
- (上接第 484 页)
- [14] SHAMLOO B, USLUER S. p21 in Cancer Research[J]. *Cancers*, 2019, 11(8): 1178.
- [15] MARHENKE S, BUITRAGO-MOLINA L E, ENDIG J, *et al.* p21 promotes sustained liver regeneration and hepatocarcinogenesis in chronic cholestatic liver injury[J]. *Gut*, 2014, 63(9): 1501-1512.
- [16] HERŮDKOVÁ J, PARUCH K, KHIRSARIYA P, *et al.* Chk1 Inhibitor SCH900776 Effectively Potentiates the Cytotoxic Effects of Platinum-Based Chemotherapeutic Drugs in Human Colon Cancer Cells[J]. *Neoplasia*, 2017, 19(10): 830-841.
- [17] DAABOUL H E, DAGHER C, TALEB R I, *et al.* The chemotherapeutic effect of  $\beta$ -2-himachalen-6-ol in chemically induced skin tumorigenesis[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 103: 443-452.
- [18] LING Z, GUAN H, YOU Z, *et al.* Aloperine executes antitumor effects through the induction of apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer in vitro and in vivo[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 2735-2743.
- [19] JIANG J H, PI J, JIN H, *et al.* Oridonin-induced mitochondria-dependent apoptosis in esophageal cancer cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and Ras/Raf pathways[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(3): 3736-3746.
- [20] AL-GHABKARI A, NARENDHAN A. In Vitro Characterization of a Potent p53-MDM2 Inhibitor, RG7112 in Neuroblastoma Cancer Cell Lines[J]. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 2019, 34(4): 252-257.
- (收稿日期: 2022-05-18; 修回日期: 2022-07-14; 编辑: 黎仕娟)