

· 基础研究 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.13.003

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20240328.1717.016\(2024-03-29\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20240328.1717.016(2024-03-29))

胶质瘤 U251 干细胞通过 FOXO3a/ β -catenin 通路调控 TMZ 耐药性的研究^{*}

王政¹, 周艳玲², 许可³, 莫菁莲^{4△}

(1. 海南医学院生物技术与生物化学实验室, 海口 571101; 2. 海口市第四人民医院儿科, 海口 571100; 3. 海南医学院热带医学院, 海口 571101; 4. 海南省人民医院药学部, 海口 570311)

[摘要] **目的** 探讨胶质瘤 U251 干细胞是否通过 FOXO3a/ β -catenin 通路调控其对替莫唑胺(TMZ)的耐药性。**方法** U251 干细胞分为 TMZ 组(100 μ mol/L TMZ 处理细胞)和对照组, Western blot 及实时荧光定量逆转录-PCR(qRT-PCR)实验检测两组 TMZ 作用下 FOXO3a、 β -catenin、Nestin、CD133、Sox2 表达情况。干细胞成球实验验证 U251 干细胞对 TMZ 的耐受情况。将 FOXO3a/ β -catenin 干扰序列嵌入慢病毒 pHY-LV-KD1.1 表达载体构建重组病毒载体 pHY-FOXO3a-KD、pHY- β -catenin-KD 并转染 U251 干细胞, 在 TMZ 作用下检测干细胞克隆球数量的变化, 观察敲低 FOXO3a、 β -catenin 对 U251 干细胞特性及耐药性的影响。**结果** Western blot 及 qRT-PCR 结果显示, 与对照组比较, TMZ 组 FOXO3a、 β -catenin、Nestin、CD133、Sox2 蛋白表达水平升高, Nestin、CD133、Sox2 mRNA 表达水平升高($P < 0.05$)。克隆形成实验结果显示, TMZ 处理 5 d 后存活下来的细胞多为干细胞, 说明 U251 干细胞可较好地耐受 TMZ。敲低 FOXO3a、 β -catenin 可导致 U251 干细胞群数量减少, 说明其对 TMZ 耐药性减弱。**结论** FOXO3a/ β -catenin 通路可调控 U251 干细胞特性及 TMZ 耐药性。

[关键词] 胶质瘤; U251 干细胞; FOXO3a/ β -catenin; 替莫唑胺; 耐药性

[中图分类号] R739.41 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2024)13-1935-06

Study on glioma U251 stem cells regulate TMZ drug resistance through FOXO3a/ β -catenin pathway^{*}

WANG Zheng¹, ZHOU Yanling², XU Ke³, MO Jinglian^{4△}

(1. Laboratory of Biotechnology and Biochemistry, Hainan Medical College, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Department of Pediatrics, Haikou Municipal Fourth People's Hospital, Haikou, Hainan 571100, China; 3. School of Tropical Medicine, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571101, China; 4. Department of Pharmacy, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou, Hainan 570311, China)

[Abstract] **Objective** To explore whether or not the glioma U251 stem cell regulates its resistance to TMZ by the FOXO3a/ β -catenin pathway. **Methods** The U251 stem cells were divided into the TMZ group (100 μ mol/L TMZ treated cells) and the control group. The Western blot and real-time quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) were used to detect the expression levels of FOXO3a, β -catenin, Nestin, CD133 and Sox2 under the TMZ action in the two groups. The stem cell pelletization experiment was used to verify the resistance of U251 stem cell on TMZ. Recombinant viral vectors pHY-FOXO3a, pHY- β -catenin-KD and PHy- β -Catenin-KD were constructed by embedding FOXO3a/ β -catenin interference sequences into lentivirus pHY-LV-KD1.1 expression vector and transfected into U251 stem cells. The change of stem cell clone pellets number was measured under TMZ action. The effects of knockdown FOXO3a and β -catenin on the characteristics and drug resistance of U251 stem cells were observed. **Results** The Western blot and qRT-PCR results showed that compared with the control group, the expression levels of FOXO3a, β -catenin, Nestin, CD133 and Sox2 protein in the TMZ group were increased, the Nestin, CD133, Sox2 mRNA expression levels were in-

^{*} 基金项目: 2021 年海南省自然科学基金面上项目(821MS043)。 [△] 通信作者, E-mail: 13876907879@163.com。

creased ($P<0.05$). The clone formation experiment results showed that the majority of survival cells on 5 d after TMZ treatment were the stem cells, indicating that the U251 stem cells could better tolerate TMZ. Knocking down FOXO3a and β -catenin could reduce the U251 stem cell populations number, indicating that its resistance to TMZ was weakened. **Conclusion** The FOXO3a/ β -catenin pathway could regulates the characteristics of U251 stem cell and TMZ resistance.

[Key words] glioma; U251 stem cell; FOXO3a/ β -catenin; temozolomide; drug resistance

胶质瘤是一种常见的脑肿瘤,世界卫生组织按恶性程度将其分为 I ~ IV 级,IV 级为多形性恶性胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme,GBM),是最主要的原发性脑部肿瘤^[1-3],治疗手段主要包括手术治疗、放疗和采用烷基化药物化疗。替莫唑胺(temozolomide,TMZ)是被用于 GBM 治疗的标准化疗药物,其联合手术治疗和放疗可以在一定程度上提高 GBM 患者的总生存时间和无进展生存时间。尽管治疗水平不断提高,但 GBM 的临床治疗效果仍不理想,中位生存时间不超过 15 个月,且在过去的 40 余年,患者的生存时间没有明显延长,其主要原因是 GBM 会快速复发,产生较强的耐药性,并伴随细胞表型发生变化^[4-6]。目前认为 GBM 中肿瘤干细胞的存在是导致 GBM 产生 TMZ 化学耐药的重要原因^[7]。

肿瘤干细胞中的主流学说——等级模型(hierarchical model)学说认为,恶性肿瘤的发生、发展主要依赖一群与正常成体干细胞有类似生物学特性的肿瘤细胞群。这种特殊的细胞群存在于肿瘤中,且数量十分稀少,其拥有无限增殖的能力,尤其是具备自我更新及分化的能力^[8]。研究表明,GBM 干细胞与 TMZ 耐药有密切的联系^[9]。这群肿瘤干细胞主要表达 CD133、Nestin、Sox2 等正常神经干细胞通常表达的干细胞标记物^[10-15]。已有研究证实,FOXO3a 和 β -catenin 在 GBM 干细胞 TMZ 耐药中起关键作用^[16-18],但其耐药性机制到目前仍不明确。因此,本研究旨在探讨胶质瘤 U251 干细胞是否通过 FOXO3a/ β -catenin 通路调控 TMZ 耐药性,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

胶质瘤 U251 干细胞购自中国科学院细胞库,在 37 ℃、加湿、5% CO₂ 的环境下,采用 DMEM 培养基(英国 Gibco 公司)培养,培养基中添加 10% 胎牛血清(武汉普诺赛生命科技有限公司)、100 μ g/mL 链霉素(成都化夏化学试剂有限公司)和 1 U/mL 青霉素(成都化夏化学试剂有限公司)、胰蛋白酶(成都化夏化学试剂有限公司)。

1.1.2 试剂

FOXO3a 抗体(ab70315,美国 Abcam 公司), β -catenin 抗体(8480,美国 Cell Signaling Technology 公司),Nestin 抗体(ab22035,美国 Abcam 公司),CD133 抗体(ab278053,美国 Abcam 公司),Sox2 抗体(ab92494,美国 Abcam 公司)。

1.2 方法

1.2.1 干细胞培养

U251 干细胞于 DMEM 培养基中培养,每隔 2 d 更换 1 次培养基,每次加入培养基体积是第 1 次的 1/3,培养 6 d 后,当细胞增殖到 80% 时使用胰蛋白酶消化并传代培养进行后续实验。

1.2.2 实验分组及 TMZ 量效设计

U251 干细胞分为 TMZ 组和对照组。将对数生长期的 U251 干细胞接种到 96 孔板(1×10/孔)中,于 37 ℃ 细胞培养箱培养 24 h,然后吸去旧培养基,TMZ 组分别加入 0、10、20、50、100、200 μ mol/L TMZ 的 DMEM 培养基处理 30 min,每组设置 3 个复孔,同时用不含 TMZ 的 DMEM 培养基处理对照组,培养 48 h 后弃去培养基,向每孔加入新鲜培养基及 0.5% MTT 溶液,在 37 ℃ 孵育 4 h,再加入二甲基亚砜,置于摇床上低速振荡使结晶物充分溶解,在 490 nm 波长下用酶标仪测量每个孔的吸光度值,计算 IC₅₀ 值。

1.2.3 Western blot

取适量蛋白质样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离蛋白后停止电泳,取出凝胶,置于转膜专用支架中将凝胶中的蛋白质转移到聚偏二氟乙烯膜上形成印记。将膜置于 BlottoA 中,室温密封 2 h。分别加入 FOXO3a(1 : 2 000)、 β -catenin(1 : 2 000)、Nestin(1 : 4 000)、CD133(1 : 1 000)、Sox2(1 : 1 000)单克隆抗体,4 ℃ 摇动孵育过夜。将膜置于 1×TBST 溶液中,摇动漂洗 5 min,共 4 次。将膜置于含有辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(H+L)二抗(1 : 800)的 BlottoA 中,室温摇动孵育 1.5 h。将膜置于 1×TBST 溶液中,摇动漂洗 5 min,共 4 次。ECL 法显像,用化学发光成像分析系统捕获膜并分析每个蛋白质带的吸光度值。该方法计算每个样品的蛋白质波段吸光度值和对应值 GAPDH(内参)比值,

得到校正后的蛋白质波段吸光度值,以对照组进行标准化,并绘制代表蛋白表达的柱状图,检测 FOXO3a、 β -catenin、Nestin、CD133、Sox2 蛋白相对表达水平。

1.2.4 实时荧光定量逆转录-PCR(qRT-PCR)实验

收集 U251 干细胞,利用 TRIzol 试剂盒提取总 RNA。采用逆转录体系合成 cDNA,PCR 扩增程序如下:27 ℃ 5 min,45 ℃ 55 min,83 ℃ 5 min。利用 qRT-PCR 试剂盒检测 Nestin、CD133、Sox2 mRNA 表达水平,以 β -actin 为内参。

1.2.5 干细胞培养及成球实验

U251 干细胞用无血清神经干细胞培养基以 3×10^6 /mL 铺入 60 mm 培养皿中培养形成肿瘤球。将肿瘤球细胞消化并稀释成 1 个细胞/ μ L 单细胞悬液进行铺板(96 孔板),每孔终细胞数控制在 1~120 个,7 d 后计算球体的形成数。成球后用 96 孔板中肿瘤球重复该方法进行次级干细胞克隆球形成实验。

1.2.6 慢病毒载体构建与转染实验

构建干扰序列,FOXO3a 为正向 5'-GCT CTT GGT GGA TCA TCA A-3', β -catenin 为正向 5'-AAC AGT CTT ACC TGG ACT CTG-3',并将合成后的序列分别克隆进 pHY-LV-KD1.1 表达载体(本

实验室保存)产生重组载体 pHY-FOXO3a-KD 和 pHY- β -catenin-KD。同时,设计 1 条无关序列作为阴性对照(NC)。通过反慢病毒包装系统和病毒动力慢病毒表达系统(美国 Invitrogen 公司)对慢病毒进行包装并转染 U251 干细胞^[6],观察敲低 FOXO3a、 β -catenin 对 U251 干细胞特性及 TMZ 耐药性的影响。

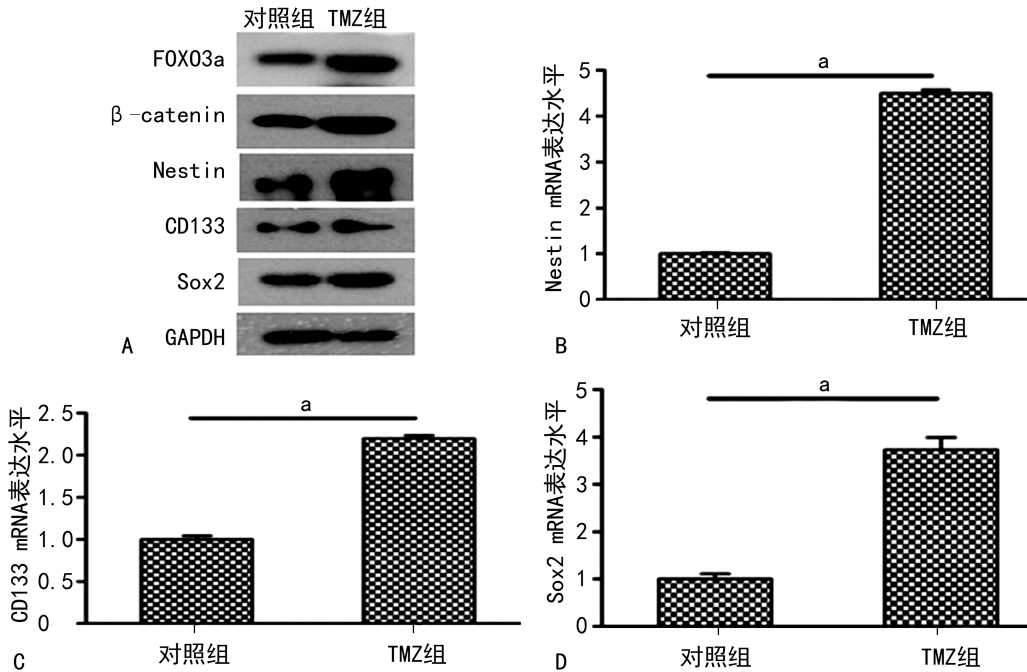
1.3 统计学处理

采用 SPSS26.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Western blot 及 qRT-PCR 实验

TMZ 的中位 IC₅₀ 值为 106.2(95%CI:83.98~153.1) μ mol/L,故后续实验采用 100 μ mol/L TMZ 处理细胞。TMZ 处理 U251 干细胞后会有大量细胞死亡,而处理 5 d 后,细胞存活率趋于稳定,因此,TMZ 仅处理 U251 干细胞 5 d。Western blot 及 qRT-PCR 结果显示,与对照组比较,TMZ 组 FOXO3a、 β -catenin、Nestin、CD133、Sox2 蛋白表达水平升高,Nestin、CD133、Sox2 mRNA 表达水平升高($P<0.05$),见图 1。



A: Western blot 检测两组 FOXO3a、 β -catenin、Nestin、CD133、Sox2 蛋白表达情况;B:两组 Nestin mRNA 表达水平比较;C:两组 CD133 mRNA 表达水平比较;D:两组 Sox2 mRNA 表达水平比较;*: $P<0.05$ 。

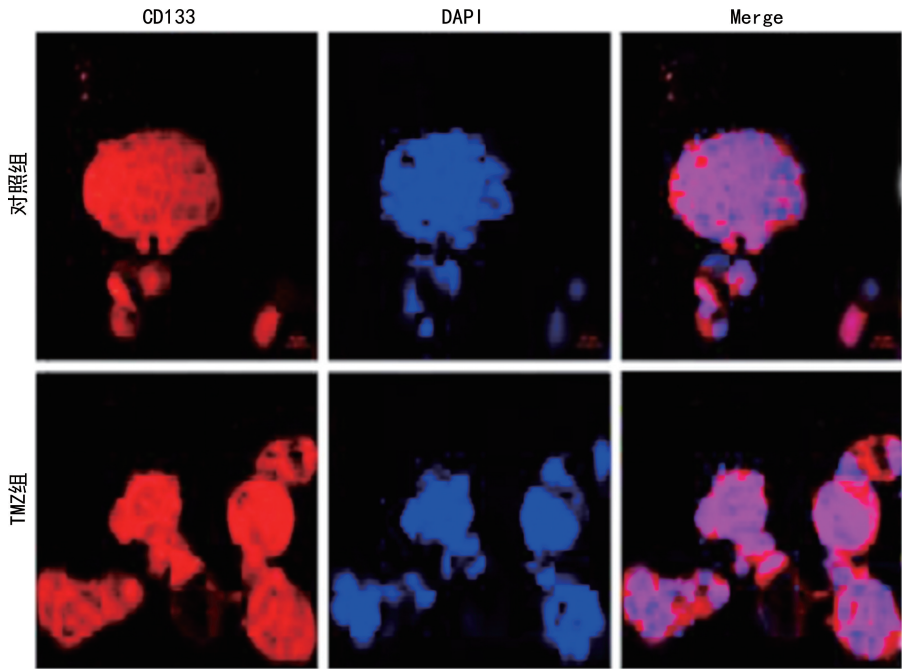
图 1 Western blot 及 qRT-PCR 实验

2.2 U251 干细胞球克隆形成实验

克隆形成实验结果显示,TMZ 处理 5 d 后存活下来的细胞多为干细胞,说明 U251 干细胞可较好地耐受 TMZ,见图 2。

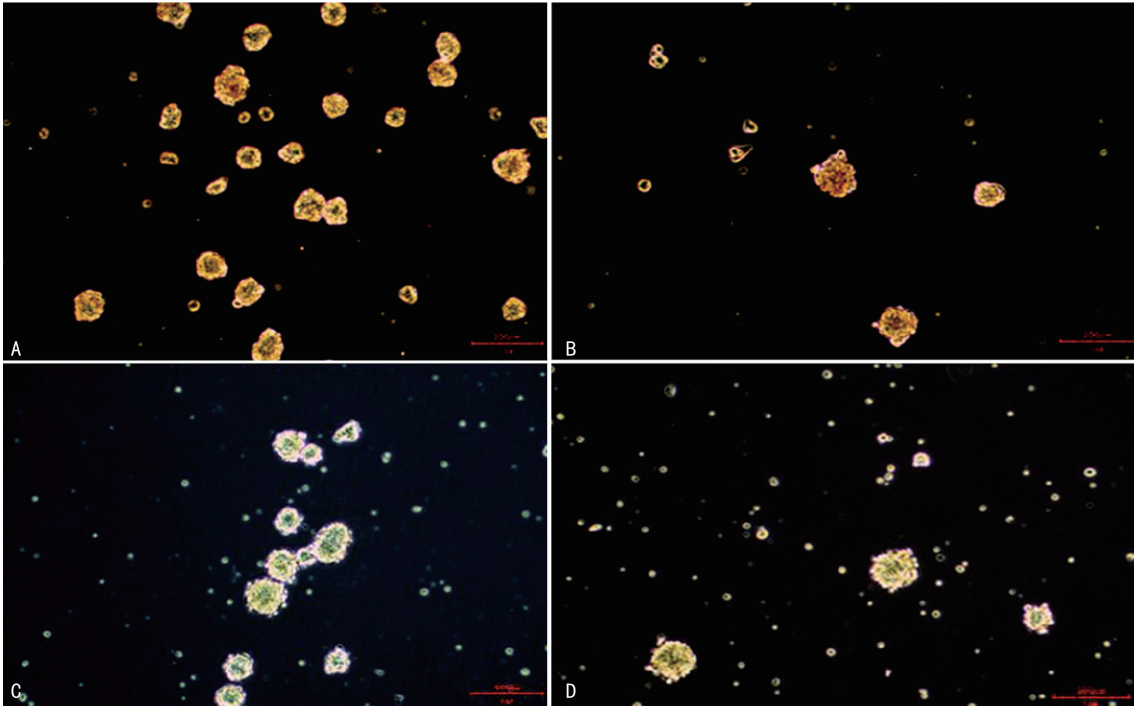
2.3 敲低 FOXO3a、 β -catenin 对 U251 干细胞特性及 TMZ 耐药性的影响

敲低 FOXO3a、 β -catenin 可导致 U251 干细胞群数量减少,说明其对 TMZ 耐药性减弱,见图 3。



红色代表该细胞群表达 CD133;蓝色代表细胞核已染色;Merge 代表 CD133 和 DAPI 显色结果的重叠。

图 2 U251 干细胞球克隆形成实验



A:FOXO3a 正常时,TMZ 处理 U251 干细胞克隆形成的结果;B:FOXO3a 敲低时,TMZ 处理 U251 干细胞克隆形成的结果;C:β-catenin 正常时,TMZ 处理 U251 干细胞克隆形成的结果;D:β-catenin 敲低时,TMZ 处理 U251 干细胞克隆形成的结果。

图 3 敲低 FOXO3a、β-catenin 对 U251 干细胞特性及 TMZ 耐药性的影响

3 讨 论

GBM 是一种侵袭性较强的恶性肿瘤,患者生存时间一般为 12~15 个月,常规治疗手段是手术切除并结合相应的放疗或辅助化疗。TMZ 是一类口服烷化剂,血脑屏障穿透性强,可提供病灶局部血药浓度,作用于肿瘤细胞的蛋白质、核酸等位置,适用于肿瘤细胞各个时期,自 1999 年首次获得美国食品与药品监督管理局批准用于治疗难治性成人间变性星形细

胞瘤以来,于 2005 年应用于新诊断的成人 GBM 治疗,是 GBM 治疗的标准化疗药物。然而,在治疗过程中,多数 GBM 患者会出现 TMZ 耐药性,有研究表明,患者初始对 TMZ 的治疗有效,甚至完全缓解,但 GBM 会快速复发、产生很强的耐药性^[19-21]。可选的替代化疗药物十分有限,因此急需针对肿瘤细胞的耐药性做更深入的研究。目前研究发现,TMZ 耐药性机制的发生与某些

关键基因的异常表达有密切相关,针对关键基因进行靶向治疗可以有效提高 TMZ 的化疗敏感性,改善预后。但由于 GBM 具有异质性,耐药性基因往往存在多个,并在表达中相互影响,因此针对肿瘤基因的通路机制研究尤为重要。 β -catenin 通路是细胞重要的通路之一^[22-25],参与细胞增殖、分化及凋亡,但该通路在 GBM 中的研究较少。且有研究发现,在肿瘤干细胞中存在 GBM 实体肿瘤^[1],同时存在 Nestin、CD133、Sox2 这些正常神经干细胞表达的标记物,但肿瘤干细胞 TMZ 耐药性的相关研究较少。基于此,本研究利用 Nestin、CD133、Sox2 参与耐药基因 FOXO3a/ β -catenin 通路调节,发现这些因子在调控基因表达和细胞分化中发挥关键作用。

本研究发现,U251 干细胞经过 TMZ 处理后,肿瘤干细胞出现一过性大量凋亡,但很快又趋于稳定,且相关基因 FOXO3a 和核 β -catenin 蛋白表达明显上调,伴随明显变化的还有 Nestin、CD133、Sox2 mRNA 水平升高。同时,U251 干细胞成球实验进一步验证发现,肿瘤干细胞可较好地耐受 TMZ。这一结果表明 U251 肿瘤干细胞可以耐受 TMZ,且通过 TMZ 的筛选,肿瘤干细胞很可能被富集而成为 TMZ 耐受细胞,该现象与 XU 等^[16]发现 FOXO3a 可以调控 β -catenin 入核使得 GBM 肿瘤细胞获得耐药性这一现象一致。该情况是否是导致 GBM 复发的重要诱因,这将对后续研究提供新思路。此外,本研究采用敲低 FOXO3a、 β -catenin 表达的方式进一步验证,结果发现 TMZ 处理的 U251 干细胞群耐药性可以随着 FOXO3a、 β -catenin 表达水平的改变而发生变化。这一现象表明 FOXO3a/ β -catenin 通路可以改变肿瘤干细胞的 TMZ 耐药性。

综上所述,FOXO3a/ β -catenin 通路存在通过调控 GBM 干细胞群使得肿瘤细胞获得耐药性的可能。这一研究结果将对后续针对 GBM TMZ 耐药性机制的研究及 GBM 耐药基因相关性研究提供新思路。但本研究也存在不足,未通过实验发现 FOXO3a/ β -catenin 通路具体是通过何种途径使肿瘤细胞获得耐药性,后续可深入探讨。

参考文献

- [1] STILES C D, ROWITCH D H. Glioma stem cells: a midterm exam [J]. *Neuron*, 2008, 58 (6):832-846.
- [2] 卓胜华,羊良旺,陈申波,等. 脑胶质瘤中 miR-29b-3p 核心靶基因的鉴定与分析[J]. *海南医学院学报*, 2022, 28(4):258-262.
- [3] HIRSCHLER L, SOLLMANN N, SCHMITZ-ABECASSIS B, et al. Advanced MR techniques for preoperative glioma characterization: part 1 [J]. *J Magn Reson Imaging*, 2023, 57(6):1655-1675.
- [4] SHI J, ZHANG P, DONG X, et al. METTL3 knockdown promotes temozolomide sensitivity of glioma stem cells via decreasing MGMT and APNG mRNA stability[J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1):22.
- [5] ECKERDT F, PLATANIAS L C. Emerging role of glioma stem cells in mechanisms of therapy resistance[J]. *Cancers*, 2023, 15(13):3458.
- [6] RANJAN T, SENGUPTA S, GLANTZ M J, et al. Cancer stem cell assay-guided chemotherapy improves survival of patients with recurrent glioblastoma in a randomized trial[J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4(5):101025.
- [7] RECH F, DUFFAU H. Beyond avoiding hemiplegia after glioma surgery: the need to map complex movement in awake patient to preserve cognition[J]. *Cancers*, 2023, 15(5):1528.
- [8] LI R Q, CHEN L, JI Q, et al. Macrophage membrane-coated nanoparticles sensitize glioblastoma to radiation by suppressing proneural-mesenchymal transformation in glioma stem cells[J]. *Adv Funct Mater*, 2023, 33(37):2213292.
- [9] LI H, JIANG Y, HU J, et al. The U2AF65/circ-NCAPG/RREB1 feedback loop promotes malignant phenotypes of glioma stem cells through activating the TGF- β pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(1):23.
- [10] DOUALLE C, GOUJU J, NOUARI Y, et al. Differentiated cells obtained from glioblastoma cell lines are an easy and robust model for mesenchymal glioblastoma stem cells studies [J]. *Am J Cancer Res*, 2023, 13(4):1425-1442.
- [11] QIN Z, LIANG W, ZHANG Z, et al. Activated KRAS reprograms neural progenitor cells to glioma stem cell-like phenotype[J]. *Int J Oncol*, 2023, 63(1):88.
- [12] HAN Y P, LIN H W, LI H. Cancer stem cells in tumours of the central nervous system in children: a comprehensive review[J]. *Cancers*, 2023, 15(12):3154.
- [13] LI X, CHEN G, LIU B, et al. PLK1 inhibition promotes apoptosis and DNA damage in glioma stem cells by regulating the nuclear translocation of YBX1 [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9 (1):68.
- [14] XU L, DUAN H, ZOU Y, et al. Xihuang Pill destabilized CD133/EGFR/Akt/mTOR cas-

cade reduces stemness enrichment of glioblastoma via the down-regulation of SOX2 [J]. *Phytomedicine*,2023,114:154764.

[15] CHICO M A, MESAS C, DOELLO K, et al. Cancer stem cells in sarcomas: in vitro isolation and role as prognostic markers: a systematic review[J]. *Cancers*,2023,15(9):2449.

[16] XU K, ZHANG Z, PEI H, et al. FOXO3a induces temozolomide resistance in glioblastoma cells via the regulation of β -catenin nuclear accumulation[J]. *Oncol Rep*,2017,37(4):2391-2397.

[17] XU K, PEI H, ZHANG Z, et al. FOXO3a mediates glioma cell invasion by regulating MMP9 expression[J]. *Oncol Rep*,2016,36(5):3044-3050.

[18] HUANG W S, WANG J P, WANG T, et al. ShRNA-mediated gene silencing of β -catenin inhibits growth of human colon cancer cells [J]. *World J Gastroenterol*,2007,13(48):6581-6587.

[19] DOAN P, MUSA A, MURUGESAN A, et al. Glioblastoma multiforme stem cell cycle arrest by alkylaminophenol through the modulation of EGFR and CSC signaling pathways [J]. *Cells*,2020,9(3):681.

[20] KIM D S. Cancer stem cell plasticity in glioblastoma multiforme: a perspective on future directions in oncolytic virotherapy[J]. *Future Oncol*,2020,16(28):2251-2264.

[21] MONTEMURRO N, PAHWA B, TAYAL A, et al. Macrophages in recurrent glioblastoma as a prognostic factor in the synergistic system of the tumor microenvironment [J]. *Neurol Int*,2023,15(2):595-608.

[22] 王昕雯, 曹长春, 朱亮, 等. ERK5 抑制剂 XMD17-109 通过下调 ITPRIIP 表达抑制胶质瘤进展 [J]. *重庆医学*,2023,52(23):3546-3553.

[23] CHU C W, KO H J, CHOU C H, et al. Thioridazine enhances p62-mediated autophagy and apoptosis through wnt/ β -catenin signaling pathway in glioma cells[J]. *Int J Mol Sci*,2019,20(3):473.

[24] HUANG G Q, LIANG M, LIU H Y, et al. CircRNA hsa-circRNA-104348 promotes hepatocellular carcinoma progression through modulating miR-187-3P/RTKN2 axis and activating wnt/ β -catenin pathway [J]. *Cell Death Dis*,2020,11(12):1065.

[25] 陈锡贤, 孙海峰, 成江, 等. 脑神经胶质瘤细胞癌胚抗原相关细胞黏附分子 1 对替莫唑胺化疗敏感性的作用及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*,2023,33(4):27-32.

(收稿日期:2023-12-18 修回日期:2024-03-29)

(编辑:袁皓伟)

(上接第 1934 页)

[20] GONZALEZ-MATEO G T, AGUIRRE A R, LOUREIRO J, et al. Rapamycin protects from type- I peritoneal membrane failure inhibiting the angiogenesis, lymphangiogenesis, and endo-MT[J]. *Biomed Res Int*,2015,2015:989560.

[21] SHI Y, LI J, CHEN H, et al. Inhibition of EZH2 suppresses peritoneal angiogenesis by targeting a VEGFR2/ERK1/2/HIF-1 α -dependent signaling pathway[J]. *J Pathol*,2022,258(2):164-178.

[22] KABEI K, TATEISHI Y, SHIOTA M, et al. Effects of orally active hypoxia inducible factor alpha prolyl hydroxylase inhibitor, FG4592 on renal fibrogenic potential in mouse unilateral ureteral obstruction model [J]. *J Pharmacol Sci*,2020,142(3):93-100.

[23] PROVENZANO R, TUMLIN J, ZABANEH R, et al. Oral hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor roxadustat (FG-4592) for treatment of anemia in chronic kidney disease: a placebo-controlled study of pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles in hemodialysis patients[J]. *J Clin Pharmacol*,2020,60(11):1432-1440.

[24] LOCATELLI F, FISHBANE S, BLOCK G A, et al. Targeting hypoxia-inducible factors for the treatment of anemia in chronic kidney disease patients[J]. *Am J Nephrol*,2017,45(3):187-199.

[25] ZHENG F, ZHANG P, ZHAO M, et al. Effect of roxadustat on factors associated with renal fibrosis and efficacy[J]. *Comput Math Methods Med*,2022,2022:4764254.

(收稿日期:2023-10-25 修回日期:2024-03-29)

(编辑:张芃捷)