

防己茯苓汤对阿霉素性肾病综合征大鼠血清学指标及肾组织病变的影响

刘影, 杨长游, 陈丹镭, 何好晴, 邹丽宜*, 黄遵楠* (广东医科大学东莞市计算机辅助药物设计重点实验室, 广东东莞 523808)

摘要: **目的** 观察防己茯苓汤对阿霉素性肾病综合征(NS)大鼠血清学指标及肾组织病变的影响。**方法** 采用一次尾静脉注射阿霉素构建大鼠NS模型,再随机分为模型组、防己茯苓汤临床剂量组、防己茯苓汤高剂量组、泼尼松组、临床剂量防己茯苓汤联合泼尼松组(联合组),分别给药6周。给药结束后检测尿蛋白含量、血清白蛋白、总蛋白、尿素氮和肌酐水平,并观察肾组织病理改变。**结果** 与模型组相比,各给药组尿蛋白含量、血清肌酐和尿素氮水平降低($P<0.01$ 或 0.05),血清白蛋白含量升高,肾脏病理损伤改善,其中以泼尼松组和高剂量组最明显。**结论** 防己茯苓汤对NS大鼠有较好治疗作用,可能与受损的肾小球基底膜修复有关。

关键词: 防己茯苓汤; 肾病综合征; 阿霉素; 大鼠

中图分类号: R 285

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2023) 05-0509-06

Effect of Tetrandra and Poria decoction on serological indicators and renal tissue lesions of rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome

LIU Ying, YANG Chang-you, CHEN Dan-lei, HE Hao-qing, ZOU Li-yi*, HUANG Zun-nan* (Dongguan Key Laboratory of Computer Aided Drug Design, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Tetrandra and Poria decoction (TPD) on serological indicators and renal tissue lesions of rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome (NS). **Methods** Rat models of NS were established by tail intravenous injection of doxorubicin. NS rats were randomly divided into model group, clinical dose TPD group, high-dose TPD group, prednisone group, and clinical dose TPD + prednisone group (combined group), and treated with corresponding agent for 6 weeks. After administration, the levels of urine protein, serum albumin, total protein, urea nitrogen, and creatinine, and renal pathological changes were detected. **Results** Compared with the model group, the levels of urine protein excretion, serum creatinine and urea nitrogen were decreased ($P<0.01$ or 0.05), whereas the levels of serum albumin increased and renal pathology was improved in each treatment group, especially in prednisone and high-dose TPD groups. **Conclusion** TPD can be effective for NS rats, which may be related to the repair of glomerular basement membrane.

Key words: Tetrandra and Poria decoction; nephrotic syndrome; adriamycin; rat

慢性肾病主要由肾病综合征(NS)发展而来^[1]。NS是一组以大量蛋白尿和低蛋白血症为主要症状的临床症候群^[2]。肾脏滤过屏障受损是发生蛋白尿,导致低蛋白血症的根本原因^[3]。防己茯苓汤出自《金匮要略》,临床上广泛用于治疗肾脏疾病^[4],但其具体作用机制仍未完全阐明^[5]。本研究通过建立大鼠疾病模型后用组织学的方法进行机制分析,初步探究防己茯苓汤对

激素副作用的改善情况,以期后续相关研究及指导临床用药提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性SPF级6周龄大鼠48只,体质量为 (220 ± 20) g,购于广州南方医科大学实验动物科技发展有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(粤)

收稿日期: 2022-12-29

基金项目: 广东省科技创新战略专项(pdjh2021a0217),广东医科大学大学生创新实验项目(ZYDS003)

作者简介: 刘影(1997-),女,在读硕士研究生, E-mail: liu.y21@qq.com

杨长游(2003-),男,在读本科生, E-mail: 1731298469@qq.com

通信作者: 黄遵楠(1972-),男,教授, E-mail: zn_huang@gdmu.edu.cn

邹丽宜(1975-),女,副教授, E-mail: zouliyi@gdmu.edu.cn

2016-0041。大鼠饲养于广东医科大学动物实验中心,动物实验环境许可证号:SYXK(粤)2019-0213。本研究涉及的动物实验所有操作均获得广东医科大学动物伦理委员会审核批准(No. 20200520)。屏障系统内温度为20~25℃,日温差≤4℃,湿度40%~70%,每日光照12h,光暗循环,实验期间大鼠自由摄食饮水。

1.2 材料与试剂

防己茯苓汤中相应药物由东莞国药集团中药饮片有限公司(中国广东)提供,批号和产地如下:甘草20200701,产自甘肃;防己20201001,产自安徽;黄芪20201202,产自甘肃;桂枝20210402,产自广西;茯苓20210703,产自安徽。醋酸泼尼松片,5mg/片,购于浙江仙琚制药股份有限公司,批号200746。盐酸阿霉素制剂,25mg/瓶,购于北京索莱宝科技有限公司,批号117Q020。大鼠尿蛋白、血清肌酐、血清尿素氮、血清白蛋白、血清总蛋白等相关试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.3 防己茯苓汤的制备

称取防己9g,黄芪9g,桂枝9g,甘草6g,茯苓18g,加水1000mL浸泡30min,然后先用武火煎煮20min再用文火煎煮30min,将药液过滤后倒入容器中,再向中药滤渣中倒入500mL水并用文火煎煮20min,将两次滤液合并后倒入圆底烧瓶中,使用旋蒸仪除去多余水分,得到质量浓度为1.53g/L的溶液^[6],暂存于4℃冰箱,后续用于动物胃内灌药。

1.4 阿霉素肾病大鼠模型制备

大鼠正常饲养1周后,根据Bertani等^[7]的方法进行阿霉素诱导大鼠NS模型,将48只SPF级雄性大鼠,按照体质量对等分组法分为造模处理组(40只):对大鼠采用一次性尾静脉注射阿霉素(6mg/kg);空白组(8只):采取同样操作注射等量生理盐水。每日观察大鼠精神状态并登记体质量。造模2周后,收集大鼠24h尿液并测定尿蛋白含量。以造模处理组大鼠24h尿蛋白定量较空白组大鼠升高作为模型成功建立标准^[8-9]。

1.5 实验分组

造模完成后,成功建模大鼠37只,随机分成5组,按对应组别给予药物灌胃。实验结束时模型组死亡2只,临床剂量组死亡2只,高剂量组、联合组各死亡1只,泼尼松组和空白组未有大鼠死亡。最终各组纳入大鼠数目为:空白组($n=8$)、模型组($n=6$)、临床剂量组($n=6$)、高剂量组($n=6$)、泼尼松组($n=7$)、联合组($n=6$)。

1.6 药物干预方法

根据临床经验和文献,将临床上患者的用药剂量按照相关系数换算后定为临床剂量组的大鼠给药剂量^[5,10]。各组给药剂量如下:临床剂量组每只每天灌胃剂量为5.1mg/kg;高剂量组每只每天灌胃剂量为15.3mg/kg;泼尼松组每只每天灌胃剂量为6mg/kg;联合组每只每天灌胃防己茯苓汤(5.1mg/kg)和泼尼松(6mg/kg);空白组及模型组同步给予等量生理盐水,所有灌胃液体量均按10mL/kg给予。每天灌胃1次连续进行6周,观察大鼠精神状态并登记体质量。于第3、6周末收集大鼠24h尿液,检测尿蛋白含量。

1.7 动物取材

最后一次给药后,所有大鼠禁食不禁水12h,采用10%水合氯醛腹腔注射麻醉,心脏取血后离心收集上清液,保存于-80℃,用于检测血清白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、尿素氮(BUN)和肌酐(Scr)等血清生化指标。随后摘除大鼠肾及肝脏,称取质量,计算脏器指数,公式如下:脏器指数=(组织质量mg/大鼠体质量g)×100%,最后取左肾固定于4%多聚甲醛,制作石蜡组织切片。

1.8 肾组织病理及组织计量学分析

将固定好的组织标本按照软组织切片常规方法切成50~70nm切片,HE、PAS染色后光镜下观察并评价组织病理改变情况和药物治疗效果,用Image Pro Plus软件计算100×视野镜下肾小球数量及肾小球平均实际面积。

1.9 统计学处理

采用GraphPad Prism软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析及 q 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阿霉素尾静脉注射建立大鼠NS模型

造模1周内,与正常大鼠相比,阿霉素处理的大鼠体质量差异无统计学意义($P>0.05$);造模进行到第2周时,造模处理组的大鼠体质量明显低于空白组($P<0.01$),见图1;同时出现采食量减少、疲劳、消瘦、脱毛等异常情况,部分大鼠有明显的腹泻。造模期间大鼠未出现死亡情况,造模不合格大鼠3只。阿霉素造模2周后,造模处理组24h尿蛋白明显高于空白组($P<0.01$),表明NS大鼠模型建立成功,见图2。

2.2 防己茯苓汤对阿霉素性NS大鼠尿蛋白的影响

造模2周末(即给药0周),与空白组相比,模型

组、临床剂量组、高剂量组、泼尼松组和联合组的24 h尿蛋白明显升高($P<0.01$),但各组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。给药第3周及6周末,与模型组相比,临床剂量组、高剂量组、泼尼松组和联合组大鼠24 h尿蛋白排泄明显降低($P<0.01$),见表1。

表1 防己茯苓汤对阿霉素性NS大鼠24 h尿蛋白定量的影响(mg/24 h, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药0周	给药3周	给药6周
空白组	8	3.21±1.08	4.58±1.36	5.65±1.18
模型组	6	14.00±3.92 ^a	36.47±4.96 ^a	60.96±9.11 ^a
临床剂量组	6	12.06±2.05 ^a	19.93±5.05 ^{ab}	31.12±4.68 ^{ab}
高剂量组	6	12.54±2.47 ^a	17.33±4.70 ^{ab}	28.15±6.01 ^{ab}
泼尼松组	7	13.33±4.19 ^a	18.88±5.62 ^{ab}	27.97±9.77 ^{ab}
联合组	6	12.04±3.66 ^a	18.05±5.34 ^{ab}	29.28±9.26 ^{ab}

与空白组比较:^a $P<0.01$;与模型组比较:^b $P<0.01$

2.3 防己茯苓汤对阿霉素性NS大鼠血清学指标的影响

给药6周后,与空白组相比,模型组大鼠血Scr和BUN水平明显升高,血TP和ALB水平明显降低($P<0.01$)。与模型组相比,高剂量组和泼尼松组大鼠血Scr和BUN显著降低,血TP和ALB显著升高($P<0.05$

或0.01);临床剂量组和联合组血Scr和BUN显著降低,联合组血ALB显著升高($P<0.05$ 或0.01),见图3。

2.4 防己茯苓汤对阿霉素NS大鼠肝肾脏器指数的影响

与空白组相比,模型组肝脏指数和肾脏指数降低($P<0.01$);与模型组比较,各给药组肝脏指数和肾脏指数均升高($P<0.01$)。而各给药组肝脏指数和肾脏指数与空白组相比差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。

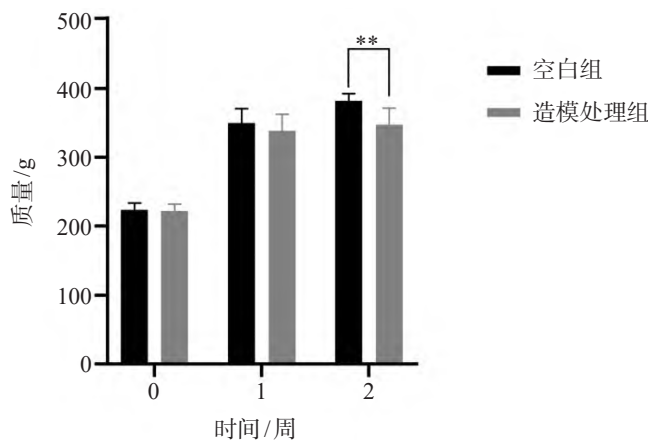
表2 防己茯苓汤对阿霉素NS大鼠肝肾脏器指数的影响(mg/g, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	肝脏指数	肾脏指数
空白组	8	30.00±2.62	4.66±0.25
模型组	6	21.44±1.17 ^a	3.60±0.12 ^a
临床剂量组	6	31.92±3.61 ^b	4.53±0.55 ^b
高剂量组	6	29.79±2.34 ^b	4.37±0.35 ^b
泼尼松组	7	32.77±4.92 ^b	4.65±0.23 ^b
联合组	6	35.31±8.22 ^b	4.36±0.65 ^b

与空白组比较:^a $P<0.01$;与模型组比较:^b $P<0.01$

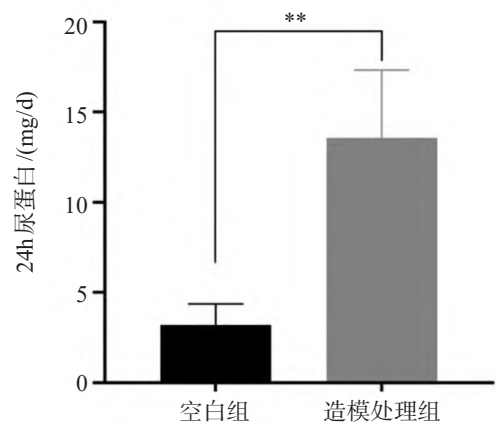
2.5 防己茯苓汤对阿霉素性NS大鼠肾脏组织病理的影响

肉眼观察:空白组大鼠肾脏包膜完整光滑,质地柔



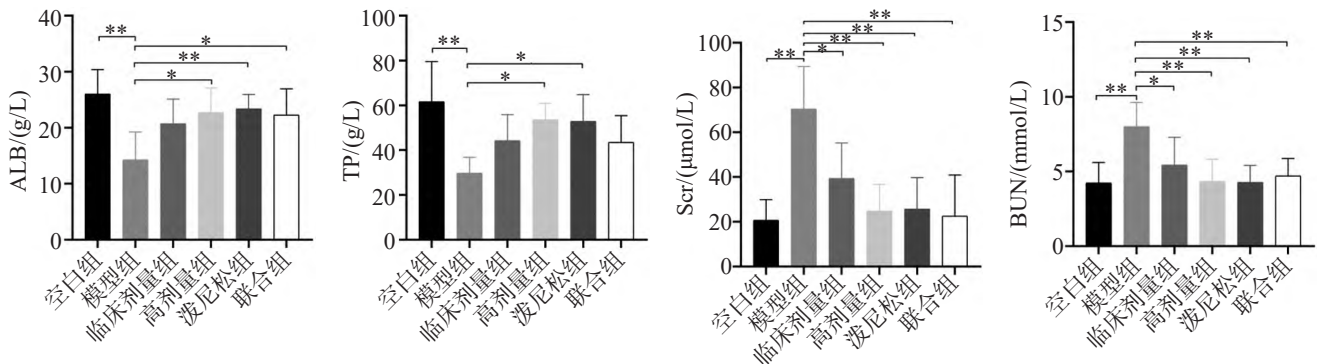
空白组与造模处理组比较: ** $P<0.01$

图1 阿霉素尾静脉注射建立大鼠NS模型大鼠体质量的变化



空白组与造模处理组比较: ** $P<0.01$

图2 阿霉素尾静脉注射建立大鼠NS模型大鼠尿蛋白变化



* $P<0.05$, ** $P<0.01$

图3 防己茯苓汤对阿霉素性NS大鼠血清学指标的影响

软;模型组大鼠肾脏颜色灰白,质地较硬,体积较空白组相比有所减小。HE染色光镜下观察:空白组大鼠肾脏组织异常病理变化,肾脏组织结构清晰,肾小管和肾小球体积形态无异常;与空白组相比,模型组大鼠肾组织水肿充血,表现出肾小球毛细血管变性粘连、系膜扩张、系膜基质堆积等肾小球损害,并伴有肾小管肿胀、管腔狭窄和间质结构破坏,可见组织碎片管型;与模型组相比,各治疗组肾组织病理情况均有改善;高剂量组、泼尼松组及联合组大鼠肾组织水肿情况改善明显,肾小球毛细血管和系膜病变相对轻微,肾小管肿胀显著减轻,管腔大小相对正常,间质结构较完整,少见组织碎片管型,见图4。PAS染色光镜下观察:与空白组相比,模型组大鼠肾小球基底膜明显变薄,并出现节段性脱落;与模型组相比,各治疗组大鼠基底膜受损情况均有所改善,结

构相对完整,基底膜厚度接近空白组,见图5。

2.6 防己茯苓汤对阿霉素性NS大鼠肾脏组织计量学的影响

各组大鼠的平均肾小球数差异无统计学意义($P>0.05$)。与空白组相比,模型组大鼠的病变肾小球数显著增多($P<0.01$);与模型组相比,各治疗组病变肾小球数明显下降($P<0.01$),其中高剂量组最接近空白组。模型组大鼠肾小球面积与空白组相比明显升高($P<0.01$),与光镜下肾小球水肿充血的病理改变相符;与模型组相比,临床剂量组、泼尼松组和联合组肾小球面积明显降低($P<0.05$ 或 0.01),见图6。

3 讨论

防己茯苓汤由防己、茯苓、甘草、黄芪、桂枝五味

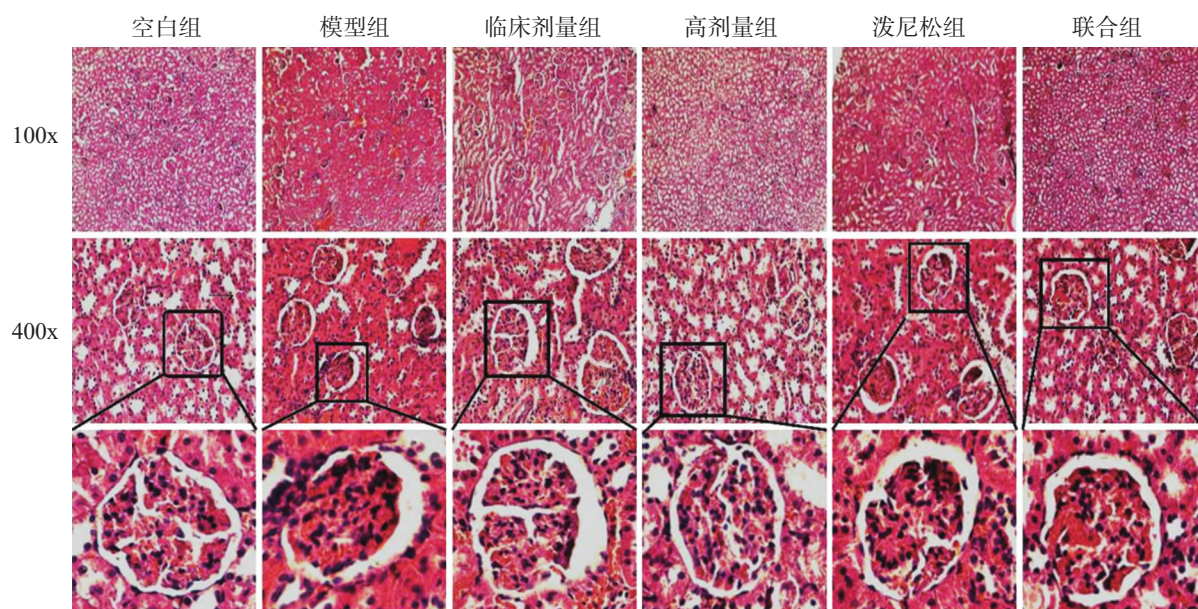


图4 防己茯苓汤对阿霉素NS大鼠肾脏组织病理的影响(HE染色)

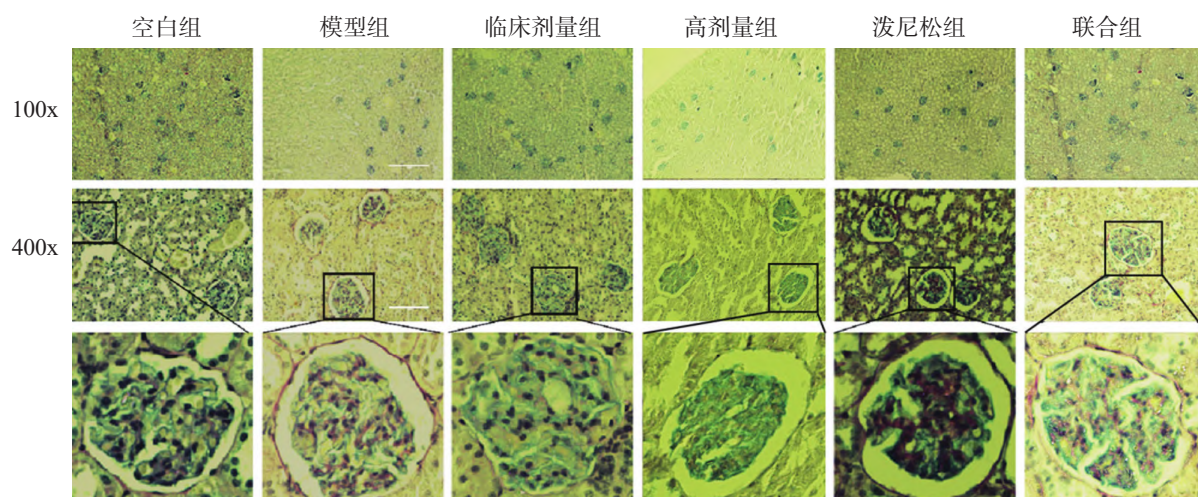


图5 防己茯苓汤对阿霉素NS大鼠肾脏组织病理的影响(PAS染色)

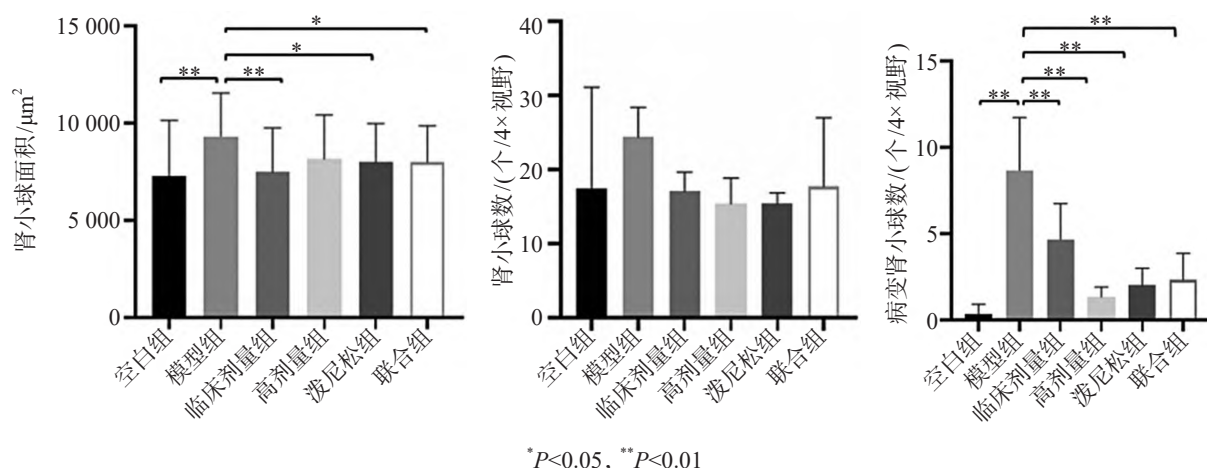


图6 防己茯苓汤对阿霉素性NS大鼠肾脏组织计量学的影响

中草药组成,是传统中医药中治疗肾脏疾病的一剂复方,临床上已经有应用防己茯苓汤治疗各种肾脏疾病的案例,但目前国内外文献尚未对防己茯苓汤治疗NS的作用机制有明确说明。本实验利用阿霉素诱导的大鼠肾病综合征模型探究了防己茯苓汤对NS的作用及机制。

本研究发现,与模型组相比,临床剂量组和高剂量组均能显著性降低NS大鼠的尿蛋白、血Scr和BUN水平,提高血TP和ALB水平($P<0.05$),改善低蛋白血症和肾功能损伤。防己茯苓汤中的主药之一黄芪具有补中益气之功^[11],其提取物黄芪甲苷(AS-IV)具有抗氧化应激^[12]、抗炎^[13]、促进血管生成的作用,通过调节足细胞骨架蛋白及相关通路减轻足细胞损伤,进而改善肾滤过屏障功能,降低尿蛋白及肌酐清除率,抑制肾脏间质的纤维化和肾小球的增生硬化^[14]。因此,防己茯苓汤可能是通过改善受损的肾滤过屏障来发挥NS治疗作用的。

实验中PAS染色切片结果显示,与空白组相比,模型组大鼠肾小球基底膜明显变薄和脱落,而防己茯苓汤各治疗组大鼠肾小球基底膜损伤情况出现显著改善。HE染色病理切片也显示防己茯苓汤高剂量组较模型组更能改善肾小球病变,减轻炎症浸润,其病变肾小球数明显低于模型组($P<0.05$)。这或许说明,防己茯苓汤治疗NS的作用机制之一是修复被破坏的基底膜等基本结构。防己与茯苓是防己茯苓汤的主要成分,具有良好的抗炎、免疫调节、利尿和抗肾衰等功能^[15]。从防己中提取出的粉防己碱能通过阻断钙依赖性calpain-1信号减轻足细胞损伤,降低蛋白尿和减轻肾脏病理损害^[15];茯苓提取物茯苓聚糖(Pachyman)作用于大鼠原始型抗肾小球基底膜可产生抗肾炎作用^[16]。因此,防己茯苓汤可能通过修复受损的肾小球

基底膜等结构进而改善滤过屏障的功能。

糖皮质激素(GC)是目前NS的一线治疗用药,但长期使用激素会使类固醇抵抗或类固醇依赖现象频繁出现,经常导致免疫功能障碍和复杂性感染^[17]。为了进一步探究防己茯苓汤与激素副作用的关系,我们在实验中设计了临床剂量的防己茯苓汤和泼尼松合用的联合组,结果发现联合组的平均肾小球数和Scr指标优于泼尼松组,大鼠肾组织水肿情况改善也更明显,这表明防己茯苓汤可以一定程度上改善激素带来的副作用。但是,联合组在血TP指标上的表现不及泼尼松组,与实验设计预测结果有出入,提示防己茯苓汤与激素联用可能会降低激素的疗效,也可能与动物个体差异有关。相关研究认为,糖皮质激素信号主要依赖于糖皮质激素受体(GR)介导的转录和蛋白质合成,通过反式激活和反式抑制的方式影响基因表达^[18]。天然中医药化合物能够通过反式阻遏的方式在发挥抗炎的同时减弱GC的不良反应,是选择性GR调节剂的更好替代物^[19-20]。防己茯苓汤中黄芪甲苷IV成分在体内外均被证实能直接与GR结合,并激活GR介导的抗炎信号通路^[21],从而在避免激素副作用的同时发挥治疗作用。实验中设置联合组,只是想要初步探究复方与激素合用能否减轻激素副作用,临床剂量防己茯苓汤与激素的联合组设置已经能达到初步探究的目的,因此没有设计高剂量联合组。根据本文初步探究后的结果分析,重点探究防己茯苓汤与激素副作用关系的研究确有一定价值,有待后续实验深入探讨。

综上所述,防己茯苓汤对肾病综合征具有良好的治疗效果,其作用机制可能与修复受损的肾小球基底膜等肾滤过屏障结构有关。另外,防己茯苓汤可以在一定程度上减轻激素副作用,是潜在的激素辅助药物。

参考文献:

- [1] 姜楠. 强的松联合环磷酰胺冲击治疗难治性肾病综合征的临床观察 [J]. 中国医药指南, 2022, 20(36): 76-78.
- [2] WANG C-S, GREENBAUM L A. Nephrotic syndrome [J]. *Pediatr Clin North Am*, 2019, 66(1): 73-85.
- [3] 杜世豪, 张子惠, 谢群玲, 等. 曲杞芪苈对肾病综合征大鼠的治疗作用及机制 [J]. 烟台大学学报, 2021, 34(3): 323-329.
- [4] 翟昌明, 鲁放, 马重阳, 等. 叶天士对仲景防己类方的继承与发展 [J]. 环球中医药, 2020, 13(2): 289-292.
- [5] 刘玲. 防己茯苓汤治疗肾病综合征体会 [J]. 中国民族民间医药, 2010, 19 (22): 188.
- [6] 李宏妍. 防己茯苓汤煎膏剂的制备工艺与质量标准研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2011.
- [7] BERTANI T, POGGI A, POZZONI R, et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: Sequence of pathologic events [J]. *Lab Invest*, 1982, 46(1): 16-23.
- [8] 蔡荔. 复方青龙衣胶囊对阿霉素肾病大鼠蛋白尿及氧化应激的影响 [D]. 哈尔滨: 黑龙江省中医药科学院, 2020.
- [9] 包玉龙, 杨瑞, 刘禾, 等. 阿霉素大鼠肾病综合征模型最佳剂量的筛选 [J]. 动物医学进展, 2018, 39(5): 61-63.
- [10] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用药量换算 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2010, 401(5): 52-53.
- [11] 李婉雯, 刘洋, 李婉露, 等. 中医药干预膜性肾病的临床与机制研究进展 [J]. 中国医药导报, 2023, 20(12): 44-47.
- [12] LI L, HOU X, XU R, et al. Research review on the pharmacological effects of astragaloside IV [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2017, 31(1): 17-36.
- [13] 李娜, 于萍, 周菲菲, 等. 黄芪甲苷对家兔子宫内膜炎模型治疗效果的评估 [J]. 北京中医药, 2019, 38(10): 1004-1006.
- [14] 黄利霞, 李忻, 张舒, 等. 黄芪甲苷对链脲佐菌素诱导糖尿病肾病大鼠的作用机制 [J]. 北京中医药, 2023, 42(4): 403-407.
- [15] DING Y, TANG X, WANG Y, et al. Tetrandrine alleviates podocyte injury via calcium-dependent calpain-1 signaling blockade [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1): 296.
- [16] HATTORI T, HAYASHI K, NAGAO T, et al. Studies on antinephritic effects of plant components (3): Effect of pachyman, a main component of *Poria cocos* Wolf on original-type anti-GBM nephritis in rats and its mechanisms [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1992, 59(1): 89-96.
- [17] HOSSEINIYAN KHATIBI S M, ARDALAN M, ABEDIAZAR S, et al. The impact of steroids on the injured podocytes in nephrotic syndrome [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2020, 196: 105490.
- [18] ZHAO X, HWANG D Y, KAO H Y. The role of glucocorticoid receptors in podocytes and nephrotic syndrome [J]. *Nucl Receptor Res*, 2018, 5: 101323.
- [19] LI L, BONNETON F, CHEN X Y, et al. Botanical compounds and their regulation of nuclear receptor action: The case of traditional Chinese medicine [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 401: 221-237.
- [20] SUNDAHL N, BRIDELANCE J, LIBERT C, et al. Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 152: 28-41.
- [21] LIU H S, SHI H L, HUANG F, et al. Astragaloside IV inhibits microglia activation via glucocorticoid receptor mediated signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19137.

(上接第 508 页)

- [10] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [11] XU R, QIN R, XIE H, et al. Genome editing with type II-CRISPR-Cas9 systems from *Neisseria meningitidis* in rice [J]. *Plant Biotechnol J*, 2022, 20(2): 350-359.
- [12] REDMAN M, KING A, WATSON C, et al. What is CRISPR/Cas9? [J]. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, 2016, 101(4): 213-215.
- [13] CHENG D, ZHANG L, LIANG X. SIRT1 targeted by miR-211-5p regulated proliferation and apoptosis of Dex-treated growth plate chondrocytes via mediating SOX2 [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2023, 50(1): 50-58.
- [14] NEMETH Z, PATONAI A, SIMON-SZABÓ L, et al. Interplay of vitamin D and SIRT1 in tissue-specific metabolism-potential roles in prevention and treatment of non-communicable diseases including cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6154.
- [15] LIU B, LEI M, HU T, et al. Inhibitory effects of SRT1720 on the apoptosis of rabbit chondrocytes by activating SIRT1 via p53/bax and NF-kappaB/PGC-1alpha pathways [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2016, 36(3): 350-355.
- [16] CHOI Y, YANAGAWA Y, KIM S, et al. Involvement of SIRT1-AMPK signaling in the protective action of indole-3-carbinol against hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet [J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24(7): 1393-1400.
- [17] YIN L, XU L, CHEN B, et al. SRT1720 plays a role in oxidative stress and the senescence of human trophoblast HTR8/SVneo cells induced by D-galactose through the SIRT1/FOXO3a/ROS signalling pathway [J]. *Reprod Toxicol*, 2022, 111: 1-10.
- [18] ENACHE O M, RENDO V, ABDUSAMAD M, et al. Cas9 activates the p53 pathway and selects for p53-inactivating mutations [J]. *Nat Genet*, 2020, 52(7): 662-668.