

## 基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.003269

# XL413 通过抑制 DNA 复制诱导细胞凋亡来抑制结肠癌细胞增殖

李 倩,胡 蓉,袁 平

(中山大学附属第六医院广东省结直肠盆底疾病研究重点实验室、广东省胃肠病学研究所,  
中山大学附属第六医院生物医学创新研究院,广州 510655)

**【摘要】目的:**探讨抑制细胞分裂周期蛋白7(cell division cycle 7, CDC7)的药物XL413对结直肠癌细胞的影响及其作用机制。**方法:**在多个结直肠癌细胞系中分别加入生理盐水和不同浓度的XL413处理72 h,用细胞活力检测试剂盒(cell counting Kit-8, CCK-8)检测细胞在450 nm处的吸光度值并计算细胞存活率和XL413的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)值;Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡;克隆形成实验检测细胞的再生能力;RNA-seq检测XL413对细胞转录组的影响;qRT-PCR法检测凋亡相关基因的mRNA表达量;Western blot检测DNA解旋微小染色体维持蛋白(minichromosome maintenance protein, MCM)复合体成员MCM2的磷酸化以及凋亡相关蛋白的表达水平。**结果:**与对照组相比,XL413处理组结直肠癌细胞的增殖、迁移、集落形成能力均下降( $P=0.0015$ );细胞早期和晚期凋亡比例增高( $P=0.0006$ );在基因转录表达水平上,XL413处理组的细胞凋亡标志B细胞淋巴瘤基因(B-cell lymphoma-2, BCL2)/BCL2相关X基因(BCL2 associated X, BAX)的比值下降( $P=0.0087$ );在蛋白水平上,XL413抑制DNA解旋相关蛋白MCM2的磷酸化,从而抑制细胞DNA复制,同时促进凋亡相关蛋白的表达增高。**结论:**XL413可以通过降低DNA解旋相关蛋白MCM2的磷酸化阻碍DNA的复制,诱导结直肠癌细胞凋亡。该研究为XL413未来用于结直肠癌治疗提供了一定的理论依据。

**【关键词】**XL413;结直肠癌细胞;半抑制浓度;DNA复制;凋亡

**【中图分类号】**R34

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2023-03-30

## XL413 inhibits colon cancer cell proliferation by inhibiting DNA replication and inducing cell apoptosis

Li Qian, Hu Rong, Yuan Ping

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Colorectal and Pelvic Floor Diseases, The Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong Institute of Gastroenterology, Biomedical Innovation Center, The Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University)

**【Abstract】****Objective:** To investigate the effect of XL413, a drug inhibiting cell division cycle 7(CDC7), on colorectal cancer cells and its mechanism of action. **Methods:** Multiple colorectal cancer cell lines were treated with normal saline and XL413 at different concentrations for 72 hours. CCK-8 assay was used to measure the absorbance of cells at 450 nm and calculate cell viability and the half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of XL413; Annexin V-FITC/PI double staining was used to measure cell apoptosis; colony formation assay was used to observe the regenerative ability of cells; RNA-seq was used to observe the effect of XL413 on cell transcriptome; qRT-PCR was used to measure the relative mRNA expression levels of apoptosis-related genes; Western blot was used to measure the phosphorylation level of minichromosome maintenance protein 2(MCM2), a member of the DNA unwinding minichromosome maintenance protein complex family, and the expression levels of apoptosis-related proteins. **Results:** Compared with the control group, the XL413 treatment group had significant reductions in the abilities of colorectal cancer cell proliferation, migration, and colony formation ( $P=0.0015$ ) and a significant increase in the proportion of cells in the early and late stages of apoptosis ( $P=0.0006$ ). As for the transcriptional expression level of genes, the XL413 treatment group had a significant reduction in the ratio of the cell apoptosis markers B-cell lymphoma-2(Bcl-2) to Bcl-2-associated X ( $P=0.0087$ ), and at the protein level, XL413 inhibited the phosphorylation of the DNA unwinding-related protein MCM2 and thus DNA replication and promoted the increase in the expression of apoptosis-related proteins. **Conclusion:** XL413 can inhibit DNA replication by reducing the phosphorylation of the DNA unwinding-related protein

MCM2 and induce the apoptosis of colorectal cancer cells. The study provides a theoretical basis for the application of XL413 in the treatment of colorectal cancer in the future.

**作者介绍:**李倩,Email:17382377582@163.com,  
研究方向:分子医学。

**通信作者:**袁平,Email:yuanp8@mail.sysu.edu.cn。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(编号:81773156)。

**优先出版:**<https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1046.R.20230717.1539.010.html>

(2023-07-18)

**【Key words】**XL413; colorectal cancer cell; half-maximal inhibitory concentration; DNA replication; apoptosis

结直肠癌是世界上第三大最常见的癌症,也是癌症相关死亡率的第二大原因。中国的结肠癌发病率在全球排在第八位,直肠癌发病率全球排在第三位<sup>[1]</sup>,结直肠癌的发病率和死亡率在中国分别排在第二位和第五位,占比 23.7% 和 10.9%<sup>[2]</sup>。结直肠癌的五年生存率为 55.95%<sup>[3]</sup>,因此还需进一步研究出更好的治疗方法改善结直肠癌的治疗水平。为了解决结直肠癌化疗抗性的问题及提高结直肠癌的治疗效果<sup>[4-5]</sup>,新药筛选十分必要。结直肠癌目前占比最大的是微卫星稳定型(microsatellite stability, MSS 型)结直肠癌,其中代表的肿瘤细胞类型是 SW480 和 SW620<sup>[6]</sup>。本文主要通过初步筛选 FDA 药物库中药物找到 XL413<sup>[7]</sup>,再用 XL413 作用于结肠癌细胞系得到该药对于结肠癌细胞系的抑制及促凋亡作用,进一步通过 RNA-seq 实验探究 XL413 对结肠癌细胞转录表达网络的影响,初步揭示 XL413 抑制结肠癌细胞的内在机制。这些研究结果对以后 XL413 老药新用于结直肠癌临床治疗可以提供一定理论基础。

XL413 是一种口服生物可利用的细胞周期相关 CDC7 激酶抑制剂,具有潜在的抗肿瘤活性。有研究报道 XL413 目前可以用于新型冠状病毒肺炎的治疗<sup>[8]</sup>。CDC7 是一种在多种肿瘤细胞中过表达的丝氨酸-苏氨酸激酶,通过激活复制的起始,在 DNA 复制的启动中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。CDC7 激酶抑制剂与 CDC7 结合并抑制其活性,可能导致高表达 CDC7 的肿瘤细胞抑制 DNA 复制和有丝分裂,诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖<sup>[7, 10]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验细胞

人源结肠癌细胞系 SW480、SW620 由中山大学附属第六医院提供,本实验室保管。SW620 细胞培养在添加 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中,SW480 细胞系培养在添加 10% 胎牛血清的 1640 培养基中,放置在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中。

### 1.2 主要试剂

XL413(陶氏生化);DMEM 培养基、MEM 培养基和胰酶(Corning);胎牛血清(ExCell);Trizol(Ambion);DMSO(Sigma);CCK-8(APE × Bio);逆转录试剂盒(TransGen);Real Time PCR 试剂盒(TransGen);Annexin V-FITC/PI apoptosis kit(联科生物);MCM2 抗体(220635, 正能生物);p-MCM2 抗体(R26319, 正能生物);Bax 抗体(200958, 正能生物);BCL2 抗

体(正能生物)Caspase3 抗体(9662, Cell Signaling Technology);Caspase9 抗体(10380-1, Proteintech);Cleaved-Caspase3 抗体(正能生物);Cleaved-Caspase9 抗体(381238, 正能生物)。

### 1.3 研究方法

1.3.1 MTT 法初筛 FDA 药物库 用 200 μL DMSO 溶液将 1.2 mg 药物溶解,然后梯度稀释到初始浓度的 1/10 000 倍,在 96 孔板中每孔接种 5 × 10<sup>3</sup> HCT116 细胞,添加 100 μL 含有 10% 胎牛血清的完全培养基 DMEM。细胞经过 24 h 后贴壁,然后用多通道移液枪在每孔中加入 2.5 μL 不同药物,每天通过显微镜观察细胞生长状况并拍照记录,加药 72 h 后每个孔添加 12.5 μL 的 MTT 溶液(5 mg/mL),放入 37 °C 培养箱内处理 3 h,3 h 后弃掉培养液和 MTT 溶液,小心不要吸走底部紫色沉淀,加入 65 μL DMSO 溶解沉淀,轻微摇晃 96 孔板,用锡箔纸包裹 96 孔板避光,使用酶标仪测量每个孔在 540 nm 处的吸光度值,吸光度值读取需要在 1 h 内完成。选取吸光度值较小的药物作为初筛对结直肠癌细胞系有抑制作用的药物进行后续研究。所有的生物学实验都做 3 次重复。

1.3.2 CCK-8 法测定半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>) 在 96 孔板中每孔接种 5 × 10<sup>3</sup> 不同种类结直肠癌细胞,添加 100 μL 含有 10% 胎牛血清的完全培养基,每个药物浓度做 3 个复孔,一共做 8 个浓度,一列加入相同浓度的 DMSO 作为阴性对照,另做 3 孔无细胞培养基空白对照。在药物处理 72 h 后,每个孔添加 10 μL CCK-8 溶液,注意不要将气泡引入孔中,放在 37 °C 培养箱内孵育 4 h,利用酶标仪测量各个孔在 450 nm 处的吸光度值,在读取平板前可以设置在摇床上温柔晃匀 1 min。吸光度值数据导入在 Excel 中,将每个孔数据与阴性对照组及空白对照组做除将数据标准化,然后在 Graph-Pad Prism 中用药物浓度对数值和对应吸光度计算出药物的 IC<sub>50</sub> 值并作曲线图。所有的生物学实验都做 3 次重复。

1.3.3 克隆形成实验 在 6 孔板中接种 2 × 10<sup>3</sup> 个细胞,用含有 10% 胎牛血清的完全培养基培养 24 h 后更换细胞培养液,在实验组中加入不同浓度的 XL413,对照组维持不变,放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。培养基每 3 天更换一次,直到第 10 天时,用 1 mL 结晶紫甲醇染液固定染色 30 min,然后回收染液,用细水流沿 6 孔板孔壁小心冲洗掉残留染液,在桌面倒置晾干,晾干后手机拍照,照片使用 Photoshop 扣图为圆形视野,调节图片亮度与对比度,用 Image J 软件对细胞集落个数进行计数,然后绘制统计图。所有生物学实验都做 3 次重复。

1.3.4 流式细胞法测细胞凋亡 在 6 孔板培养板中按(1~5) × 10<sup>4</sup> 个/孔的密度接种细胞。过夜细胞贴壁后,分别加入 IC<sub>50</sub> 值一半浓度的 XL413,对照组加入磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)。48 h 后,未加药处理细胞用 PBS 清洗 1 遍,加入 0.25% 浓度的胰蛋白酶,放在 37 °C 培养箱中,消化至细胞之间形成间隙细胞边缘变圆即可加入

培养基终止消化,用移液枪轻轻吹吸细胞悬液吹落贴壁细胞并吹散形成细胞悬液,收集细胞悬液到 15 mL 离心管中,1 100 r/min 离心 5 min 后弃掉上清液,用预冷的 PBS 离心洗涤细胞 2 次,弃上清液。用灭菌水稀释 5 × Binding Buffer 成为 1 × 工作液,加入 500 μL Apoptosis Positive Control Solution 重悬细胞沉淀,在冰上静置 30 min。用预冷的 PBS 离心洗涤,弃上清液。加入 500 μL 预冷 1 × Binding Buffer 重悬细胞沉淀,并加入未经事先处理的相同数量活细胞与之混合。加入预冷 1 × Binding Buffer 补充溶液至 1.5 mL,等体积分成三管,其中一管作为空白对照管,另外两管为单染管。单染管一管加入 5 μL Annexin V-FITC,另一管加入 10 μL PI,室温遮光孵育 5 min。设置 2 个单染管作为补偿曝光对照。加药处理细胞按照上述方法收集,加入 500 μL Apoptosis Positive Control Solution 重新悬浮细胞沉淀,每管添加 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI。涡旋震荡混匀后,室温遮光孵育 5 min。使用流式细胞仪器上样分析。在流式细胞仪器上,通过 FITC 荧光检测通道检测 Annexin V-FITC(Ex=488 nm, Em=530 nm) 和通过 PI 荧光检测通道(Ex=535 nm, Em=615 nm) 检测 PI。所有的生物学实验都做 3 次重复。使用 FlowJo® 软件分析不同细胞凋亡阶段的细胞百分比。

**1.3.5 RNA-seq 实验** 提取 XL413 处理和未处理的 SW620 细胞的 RNA,送部分到测序公司测序,剩余 RNA 逆转录为 cDNA 做 RT-PCR 实验。所有的生物学实验都做 3 次重复。

**1.3.6 Western blot 实验** 将 SW620 和 SW480 细胞按照每孔

1 × 10<sup>6</sup> 个细胞接种于 6 孔板中,细胞贴壁后加入药物 XL413 处理 72 h,吸去细胞培养液,用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次,加入 100 μL 含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液,收集细胞提取蛋白,取上清液做 BCA,内参调齐后在蛋白中加入上样缓冲液,煮沸 5 min 使蛋白变性,SDS-PAGE 分离蛋白,将蛋白转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,分别加入 MCM2、p-MCM2、Bax、BCL2、Caspase3、Caspase9、Cleaved-Caspase3、Cleaved-Caspase9—抗 4 °C 过夜孵育,回收—抗,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入对应二抗孵育 1 h,TBST 洗膜 4 次,每次 5 min,ECL 显影曝光,所有的生物学实验都做 3 次重复。

#### 1.4 统计学处理

采用 IBM SPSS Statistics 25.0 进行统计学分析。数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用 Graph-Pad Prism 软件作图。两独立样本均值比较采用 *t* 检验;细胞增殖曲线间的比较采用双因素方差分析。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结 果

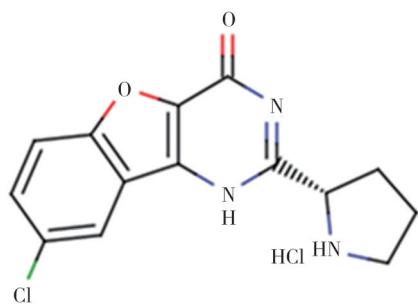
### 2.1 FDA 药物库筛选出 XL413

为了初筛治疗结直肠癌的潜在药物,分别使用 80 种 FDA 批准的药物(表 1)处理 HCT116 细胞 72 h,然后采用 MTT 细胞增殖检测方法检测各药物对 HCT116 细胞的抑制作用,筛选出 XL413(图 1)对结肠癌细胞有初步抑制作用,可用于后续研究。

表 1 FDA 批准药物列表

Drug name									
Oseltamivir phosphate	Fluvastatin sodium salt	Dacogen	Ondansetron hydrochloride	Azelastine hydrochloride	Imipenem	Sorafenib	Esmolol hydrochloride	Xylazine hydrochloride	Cyanidin-3-O-glucoside chloride
Ambrisentan	Gemifloxacin mesylate	Regadenoson	Cabozantinib (XLI84, BMS-907351)	Ataluren (PTCI24)	Chidamide	Raltegravir (MK-0518)	Fingolimod (FTY720)	Macitentan	PeraMpanel
Vismodegib (GDC-0449)	LY2584702 tosylate	Ivacaftor (VX-770)	MK-4305 (Suvorexant)	Trans-Translast	Tizoxanide	Nimorazole	XL413-hydrochloride	Apatinib	Apixaban
Lurasidone hydrochloride	K-Ras(G12C) Inhibitor 6	Vortioxetine (Lu AA21004)	Camostat mesilate	Dapaglitlozin	Cevimeline hydrochloride	Pirfenidone	Glycopyrrolate	S-Ruxolitinib	Pixantrone dimaleate
Pimecrolimus	Rimonabant	Oxyclozanide	CM 346 (Obenoxazine)	CAL-101 (Idelalisib, GS-1101)	BQCA	Selexipag (NS-304)	Nalmefene hydrochloride	Flupirtine maleate	Metoprolol Succinate (ToprolX)
Tandutinib (MLN518)	Dapiprazole Hydrochloride	Higenamine Hydrochloride	Enalaprilat Dihydrate	SKL2001 HBr	Lappaconite	Eluxadoline	PF-CBP1 Hydrochloride	Nelfinavir Mesylate	Polyphyllin B
Octenidine	Silver sulfadiazine	Sulfisomidine	Lomerizine hydrochloride	Ospemifene	Sodium picosulfate	Valsartan	Darunavir	Guanabenz Acetate	Eslicarbazepine Acetate
Alibendol	Cetilistat	Troxipide	Pikamiione	Fluocinonide	Piribedil	Trimeprazine tartrate	Tabersonine	Tofacitinib (CP-690550, Tasocitinib)	Benorilate

注:红色方框为 XL413

图 1 XL413 药物化学结构( $C_{14}H_{13}Cl_2N_3O_2$ , MW=326.18)

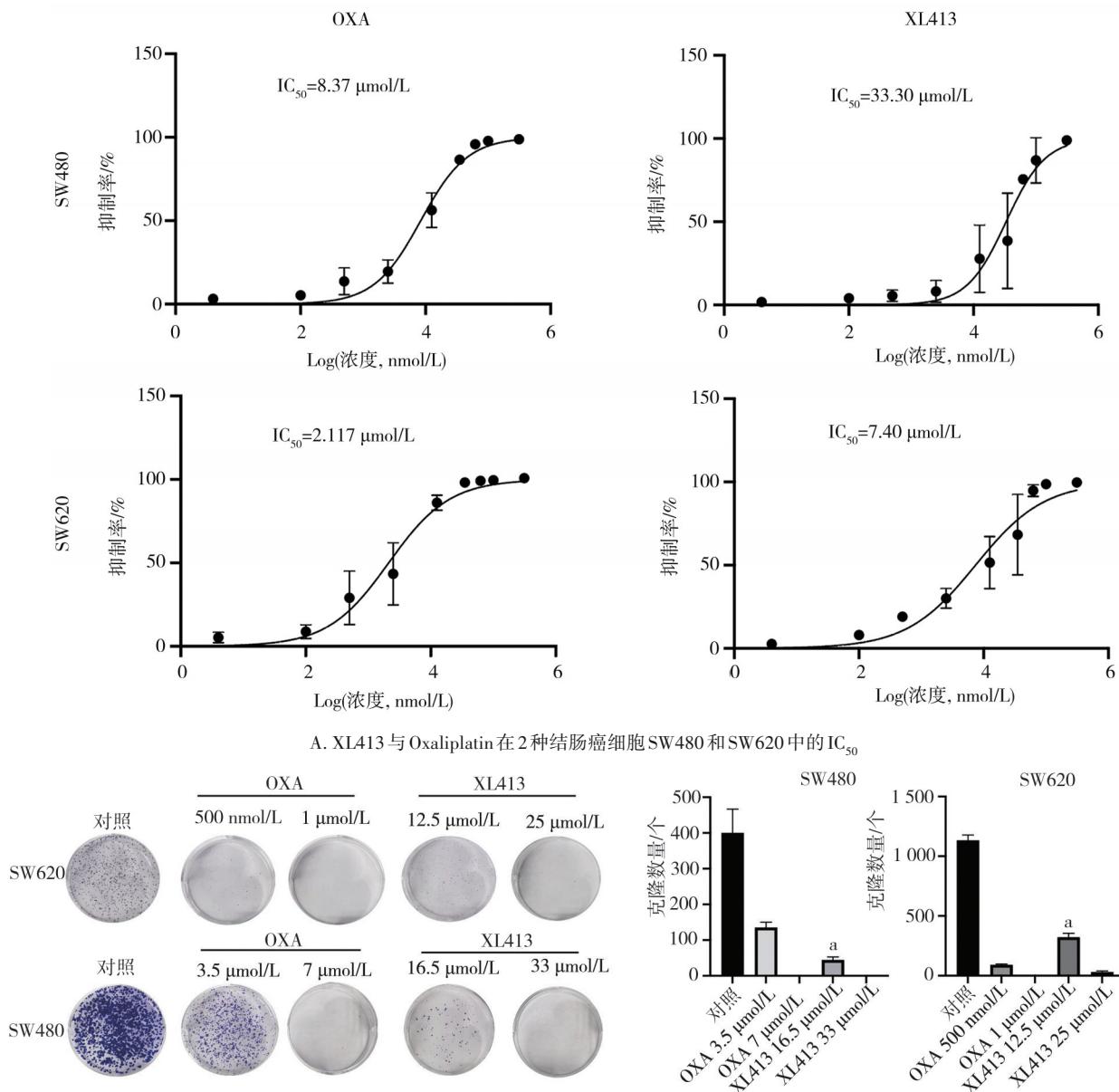
## 2.2 XL413 能抑制结肠癌细胞的增殖

为了研究 XL413 是否确实具有抑制结直肠癌细胞增殖

的能力,通过 CCK-8 法测定经 XL413 处理 72 h 的 2 种结直肠癌细胞系 SW620 和 SW480 的存活情况,计算得到结直肠癌常用化疗药物 Oxaliplatin 和 XL413 分别在 SW620 和 SW480 细胞系中的  $IC_{50}$  值,Oxaliplatin 和 XL413 在 SW620 中的  $IC_{50}$  值分别为  $2.117 \mu\text{mol/L}$  和  $7.4 \mu\text{mol/L}$ ;在 SW480 中的  $IC_{50}$  值分别为  $8.370 \mu\text{mol/L}$  和  $33.303 \mu\text{mol/L}$ (图 2A)。接下来通过克隆形成实验再次证实 XL413 具有抑制结直肠癌细胞增殖的能力。随着药物浓度的升高,结直肠癌细胞系 SW620 和 SW480 形成的克隆明显减少( $P=0.0015$ )(图 2B)。

## 2.3 XL413 能促进结肠癌细胞的凋亡

为了研究 XL413 是否具有促进结直肠癌细胞凋亡的能



注:a, 与对照组相比,  $P=0.000$

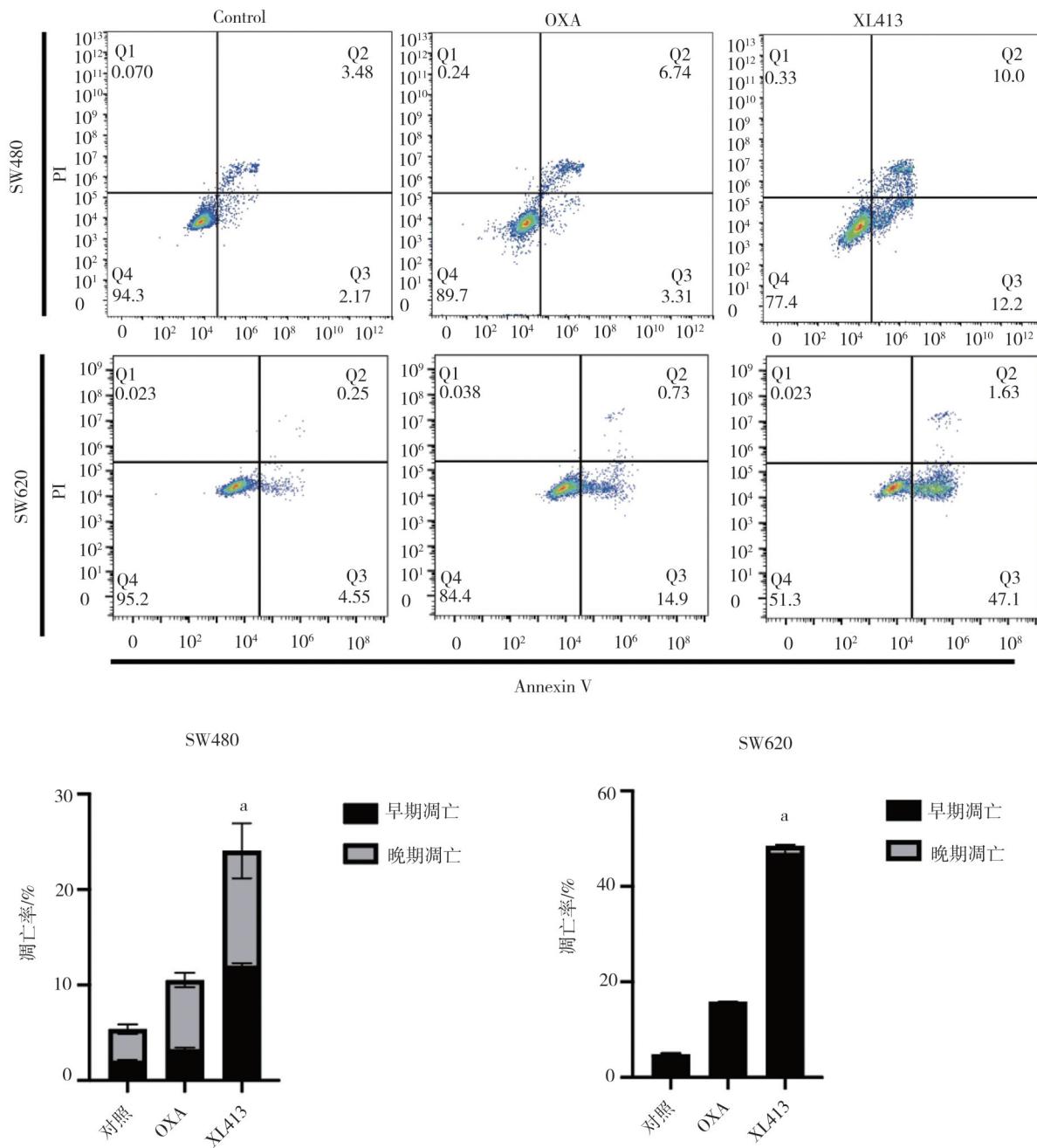
图 2 XL413 抑制结直肠癌细胞的增殖

力,通过流式细胞术分析经 Oxaliplatin 和 XL413 处理 72 h 的 SW620 和 SW480 的凋亡情况,XL413 能使 SW480 和 SW620 细胞的凋亡数量相比于对照组提高 6 倍和 9 倍( $P=0.000\text{6}$ ) (图 3)。

#### 2.4 XL413 显著抑制 DNA 复制相关通路基因表达,并诱导细胞凋亡相关基因以及蛋白表达变化

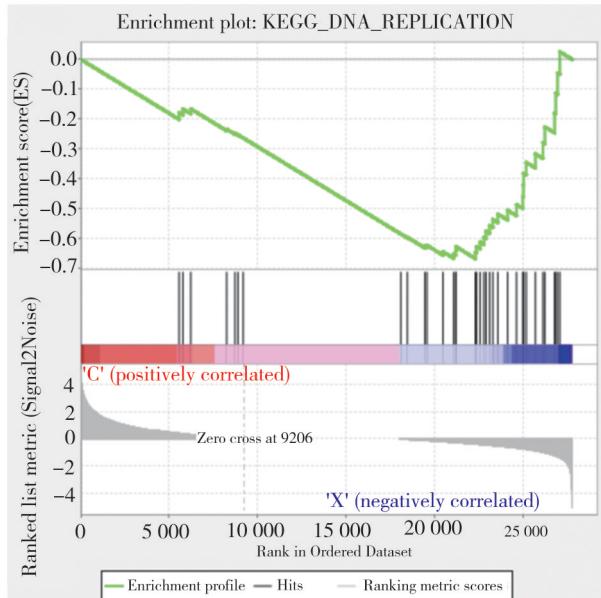
为了研究 XL413 是否影响结肠癌细胞转录组相关基因的表达,通过 RNA-seq 分析 XL413 处理 72 h 的 SW620 细胞转录组基因表达情况,经过 XL413 处理的 SW620 细胞转录

组基因有 1 347 个基因上调,1 303 个基因下调;通过 GSEA 分析发现 XL413 能显著抑制 DNA 复制相关通路基因表达(图 4A),导致 DNA 解旋蛋白 MCM2 磷酸化受到抑制(图 4B),凋亡相关基因 *BCL2/BAX* 的表达下降( $P=0.0087$ ) (图 4C),抑制凋亡蛋白 BCL2 和促进凋亡蛋白 BAX 的比例降低,检测到多种活化的剪切 Caspase 蛋白,Cleaved-Caspase3、Cleaved-Caspase9 蛋白的表达在 XL413 处理组中升高(图 4D),说明 XL413 处理结肠癌细胞可以通过抑制 DNA 复制相关蛋白来抑制细胞增殖,从而诱发细胞凋亡。

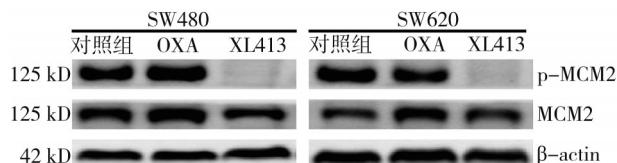


注:a,与对照组相比, $P=0.000\text{6}$

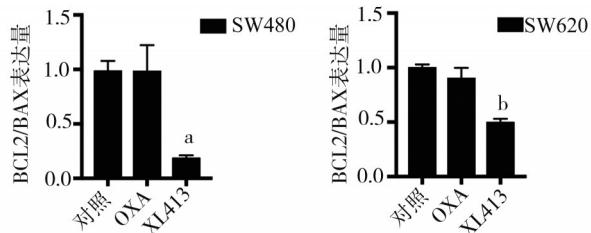
图 3 XL413 能显著诱导 2 种结肠癌细胞 SW480 和 SW620 的凋亡(OXA 为阳性对照药物)



A. GSEA 图显示 XL413 能抑制 SW620 细胞的 DNA 复制相关通路

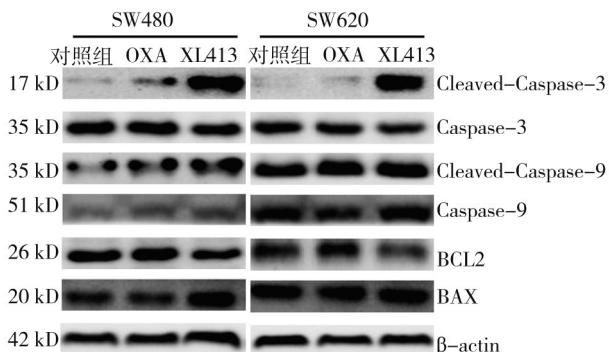


B. Western blot 图显示 XL413 处理可以抑制 DNA 复制相关蛋白 MCM2 的磷酸化



注:a,与对照组相比, $P=0.000$ ;b,与对照组相比, $P=0.008$

C. RT-PCR 实验显示 XL413 处理导致 SW480 和 SW620 细胞 BCL2/BAX 基因表达水平降低



D. Western blot 图显示 XL413 处理可以诱导结肠癌细胞 SW480 和 SW620 凋亡相关蛋白表达改变

图 4 XL413 显著抑制 DNA 复制相关通路基因表达发生改变，并诱导细胞凋亡相关基因以及蛋白表达变化

### 3 讨 论

结直肠癌的传统治疗方法包括手术切除、放疗和化疗。在治疗性手术切除后,用细胞毒性药物辅助化疗被推荐为标准的临床治疗策略<sup>[11]</sup>。20%~30%的新诊断患者存在不可切除的转移性结直肠癌。此外,40%~50%的患者在手术切除后出现疾病复发或发展为转移性结直肠癌,通常转移至肝脏或肺部<sup>[12]</sup>。这些患者的治疗方式主要为化疗。标准化疗方案主要基于5-氟尿嘧啶(5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU)、奥沙利铂(Oxaliplatin)以及一系列免疫制剂<sup>[11]</sup>。不过,仅有部分患者能在5-FU和Oxaliplatin治疗中获益,而免疫制剂仅对MSI-high型结直肠癌患者有效,对占比更多的MSS结直肠癌患者则疗效不佳<sup>[13]</sup>。同时,5-FU和Oxaliplatin的治疗会促使结直肠癌细胞逐渐发展出耐药性,也限制了它们的长期应用<sup>[14]</sup>,因此患者急需新的后备药物。

本研究发现CDC7激酶抑制剂XL413能有效抑制肿瘤细胞的DNA复制和有丝分裂,通过对XL413处理的SW620细胞的转录组分析发现可显著抑制DNA复制相关基因的表达,通过Western blot实验发现XL413对DNA解旋相关促进DNA复制的MCM2蛋白的磷酸化具有显著抑制效果,从一系列表观细胞实验也可以验证XL413对细胞有丝分裂的抑制从而抑制肿瘤细胞的增殖。通过XL413对细胞DNA复制及对增殖的抑制,推测XL413是通过诱导肿瘤细胞凋亡来达到抑制肿瘤细胞增殖的目的,本研究发现在细胞水平上XL413处理的结肠癌细胞的凋亡比例显著高于对照组,通过检测凋亡相关基因BCL2/BAX,发现XL413处理的结肠癌细胞BCL2/BAX水平显著降低,通过检测凋亡相关Caspase蛋白,发现多种活化的剪切Caspase蛋白Cleaved-Caspase3、Cleaved-Caspase9的表达在XL413处理组中升高,BCL2/BAX蛋白水平也显著降低,说明XL413确实可以诱导肿瘤细胞发生凋亡,后续还会进一步探索XL413是如何通过抑制肿瘤细胞DNA复制来诱发肿瘤细胞凋亡的分子机制。

作为FDA药物库<sup>[15]</sup>批准上市的药物,XL413的

安全性有一定保障。发现其新的适应证,实现老药新用能很大程度减少新药开发的时间和成本,使之尽快应用于临床。虽然 XL413 的 IC<sub>50</sub> 并没有优于 Oxaliplatin,但是其靶向特异性使之在今后药物联用的研究中有较多的施展空间<sup>[16-17]</sup>,有可能成为治疗结直肠癌的后备药物。

## 参 考 文 献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209–249.
- [2] Feng RM, Zong YN, Cao SM, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? [J]. Cancer Commun, 2019, 39(1):22.
- [3] Zeng HM, Chen WQ, Zheng RS, et al. Changing cancer survival in China during 2003–15: a pooled analysis of 17 population-based cancer registries[J]. Lancet Glob Health, 2018, 6(5):e555–e567.
- [4] Liu C, Zhao Y, Wang JN, et al. FoxO3 reverses 5-fluorouracil resistance in human colorectal cancer cells by inhibiting the Nrf2/TR1 signaling pathway[J]. Cancer Lett, 2020, 470:29–42.
- [5] Tong C, Qu K, Wang GR, et al. Knockdown of DNA-binding protein A enhances the chemotherapy sensitivity of colorectal cancer via suppressing the Wnt/β-catenin/Chk1 pathway[J]. Cell Biol Int, 2020, 44(10):2075–2085.
- [6] Motta R, Cabezas-Camarero S, Torres-Mattos C, et al. Immunotherapy in microsatellite instability metastatic colorectal cancer: current status and future perspectives[J]. J Clin Transl Res, 2021, 7(4):511–522.
- [7] Koltun ES, Tsuhako AL, Brown DS, et al. Discovery of XL413, a potent and selective CDC7 inhibitor[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22(11):3727–3731.
- [8] Pulakuntla S, Lokhande KB, Padmavathi P, et al. Mutational analysis in international isolates and drug repurposing against SARS-CoV-2 spike protein: molecular docking and simulation approach[J]. Virusdis-
- ease, 2021, 32(4):690–702.
- [9] Alver RC, Chadha GS, Gillespie PJ, et al. Reversal of DDK-mediated MCM phosphorylation by Rif1-PP1 regulates replication initiation and replisome stability independently of ATR/Chk1[J]. Cell Rep, 2017, 18(10):2508–2520.
- [10] Sasi NK, Tiwari K, Soon FF, et al. The potent Cdc7-Dbf4(DDK) kinase inhibitor XL413 has limited activity in many cancer cell lines and discovery of potential new DDK inhibitor scaffolds[J]. PLoS One, 2014, 9(11):e113300.
- [11] Gustavsson B, Carlsson G, Machover D, et al. A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer [J]. Clin Colorectal Cancer, 2015, 14(1):1–10.
- [12] Ron DA, Vera R, Labandeira CM, et al. Maintenance treatment in metastatic colorectal cancer: in search of the best strategy[J]. Clin Transl Oncol, 2020, 22(8):1205–1215.
- [13] Wang CK, Sandhu J, Ouyang C, et al. Clinical response to immunotherapy targeting programmed cell death receptor 1/programmed cell death ligand 1 in patients with treatment-resistant microsatellite stable colorectal cancer with and without liver metastases[J]. JAMA Netw Open, 2021, 4(8):e2118416.
- [14] Escalante PI, Quiñones LA, Contreras HR. Epithelial–mesenchymal transition and microRNAs in colorectal cancer chemoresistance to FOLFOX[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(1):75.
- [15] Cheung L, Yu DM, Neiron Z, et al. Identification of new MRP4 inhibitors from a library of FDA approved drugs using a high-throughput bioluminescence screen[J]. Biochem Pharmacol, 2015, 93(3):380–388.
- [16] Mitsuhashi W, Miyamoto K, Wada S. The complete genome sequence of the Alphaentomopoxvirus *Anomala cuprea* entomopoxvirus, including its terminal hairpin loop sequences, suggests a potentially unique mode of apoptosis inhibition and mode of DNA replication[J]. Virology, 2014(452/453):95–116.
- [17] Dale Rein I, Solberg Landsverk K, Micci F, et al. Replication-induced DNA damage after PARP inhibition causes G2 delay, and cell line-dependent apoptosis, necrosis and multinucleation[J]. Cell Cycle, 2015, 14(20):3248–3260.

(责任编辑:唐秋姗)