

自身代谢缓解甲氨蝶呤对小鼠体内成熟卵母细胞副作用的研究

刘美君¹ 田宁^{1*} 于吉¹ 马万云^{2*}

(¹沈阳师范大学物理科学与技术学院, 沈阳 110034; ²清华大学物理系, 北京 100084)

摘要 甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)作为抗叶酸代谢类药物, 在临床上应用广泛。其副作用之一表现为损伤卵母细胞质量。那么, 对于有妊娠需求的女性服药者, 停药后多久才适合受孕呢? 该文结合双光子荧光成像与三维重构技术研究此问题。通过单次腹腔注射生理盐水及5 mg/kg MTX建立了对照组和MTX组小鼠, 随后建立了MTX注射后代谢5、10、15、20、25及30天组小鼠。研究发现, 小鼠体内成熟卵母细胞的纺锤体正常形态比率与染色体正常空间排布比率, 分别于代谢15天和25天后, 显著高于MTX组, 并恢复至对照组水平。表征卵母细胞功能的体外受精率、二细胞胚胎率及囊胚率, 发现分别于代谢15、20、25天后, 恢复至对照组水平。该文结果表明, 自身代谢可恢复MTX所引起的卵母细胞质量受损及功能下降, 所需时间约为小鼠的5个生理周期, 即25天。

关键词 自身代谢; 甲氨蝶呤; 双光子成像; 小鼠体内成熟卵母细胞

Study on Self-Metabolism Alleviating Side-Effects of Methotrexate on the Mouse *in-Vivo* Matured Oocytes

LIU Meijun¹, TIAN Ning^{1*}, YU Ji¹, MA Wanyun^{2*}

(¹Physical Science and Technical College, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China;

²Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract MTX (methotrexate), an anti-folate drug, has been widely used in clinic. One of the side-effects of MTX is to reduce the quality of oocytes. So, how long it may take for the female patients with pregnancy needs to get pregnant after stopping taking MTX? In this paper, two-photon fluorescence imaging and three-dimensional reconstruction were combined to force on this issue. The model of mice in the control and MTX groups were established by intraperitoneally injecting physiological saline and 5 mg/kg MTX, and then the mice in the self-metabolism groups were established via metabolism lasting for five, 10, 15, 20, 25 and 30 days after MTX injection. It was found that the rate of normal spindle morphology and the rate of normal chromosome arrangement in the mouse *in-vivo* matured oocytes were significantly higher than those in the MTX group and returned to the levels of the control group after 15 and 25 days of metabolism, respectively. The *in-vitro* fertilization rate, two-cell embryo rate and blastocyst rate, which were used to characterized the function of oocytes, returned to the levels in the control group after 15, 20 and 25 days of metabolism, respectively. It indicated that self-metabolism could recover the MTX-

收稿日期: 2020-11-10 接受日期: 2020-12-15

国家自然科学基金(批准号: 11804235)和沈阳市中青年科技创新人才支持计划(批准号: RC200213)资助的课题

*通讯作者。Tel: 024-86575015, E-mail: tiann517@aliyun.com; Tel: 010-62788938-169, E-mail: mawu@tsinghua.edu.cn

Received: November 10, 2020 Accepted: December 15, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.11804235) and the Support Plan for Young and Middle-Aged Scientific and Technological Innovation Talents of Shenyang City (Grant No.RC200213)

*Corresponding authors. Tel: +86-24-86575015, E-mail: tiann517@aliyun.com; Tel: +86-10-62788938-169, E-mail: mawu@tsinghua.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5461>

induced quality impairment and functional decline of oocytes, and the recovery time was about five physiological cycles of mice, namely 25 days.

Keywords self-metabolism; methotrexate; two-photon imaging; mouse *in-vivo* matured oocyte

甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)具有干扰叶酸及一碳基团代谢的功能^[1-2], 在临床上应用广泛。最初, MTX主要治疗恶性肿瘤, 随后拓展到治疗类风湿性关节炎、异位妊娠等轻症疾病^[1,3-5]。虽然MTX的疗效很好, 然而其副作用仍不可忽视。其不良反应除常见的口腔、肠道黏膜损伤、骨髓抑制外^[6], 还包括卵母细胞内染色体排列异常及纺锤体形态异常^[7]。

近年来, 无论是肿瘤还是类风湿性关节炎等疾病均日益年轻化。因此既要治愈患者, 也要保证其生活质量。对于年轻女性患者, 还要考虑其生育质量。所以女性服用MTX治愈后的受孕问题值得关注。我们的工作发现, MTX的常用解毒剂亚叶酸钙可以缓解MTX引起的生殖毒性^[8]。此外, 自身代谢也是常见的清除药物对有机体毒副作用的方式。而且, 自身代谢去除药物毒性存在显著优点, 即有机体无需服用额外药物。因为额外药物的摄入难免会引起不可预知的负面作用。那么MTX停药后多久机体才能代谢掉MTX对生殖系统的不良作用呢? 因此, 本文监测了卵母细胞质量及功能随停药时间的变化, 以期解决该问题。

1 材料与方法

1.1 实验动物及处理

7~8周龄ICR雌性小鼠随机分为两组, 对照组中小鼠腹腔注射生理盐水, MTX组小鼠单次腹腔注射每千克体重5 mg的MTX (5 mg/kg)。小鼠经单次注射MTX (5 mg/kg)过后, 第5、10、15、20、25、30天提取体内成熟的卵母细胞, 并依次命名为代谢5天组、10天组、15天组、20天组、25天组及30天组。

1.2 卵母细胞采集及形态分析

各实验组小鼠, 腹腔注射孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) 5 IU/只, 48 h后注射人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG 5 IU/只, 15 h后脱颈椎处死[经北京大学动物福利与伦理委员会批准(LA2009-020)]。无菌摘取完整卵巢及输卵管, 置于预温37 °C的人输卵管培养液(human tubular fluid, HTF)中, 体视显微镜下分离卵巢及输卵管周围脂肪组织, 无菌针头划

开输卵管膨大处, 释放出卵丘-卵母细胞复合体及裸卵, 并于0.05%透明质酸酶中孵育5 min, 以去除颗粒细胞。由此获得各实验组小鼠体内成熟的卵母细胞。显微镜采集卵母细胞图像, 然后沿正交的四个方向测量卵母细胞直径及透明带厚度, 并计算卵母细胞直径及透明带厚度的平均值。

1.3 体外受精

ICR雄性小鼠脱颈椎处死, 摘除附睾尾部, 置于HTF微滴中。挤压附睾尾部, 释放精子。随后, 精子获能90 min。将获能的精子加入到各组卵丘-卵母细胞复合体微滴中, 置于37 °C培养箱内孵育6 h。清洗后, 将卵母细胞移入钾补充单纯优化培养基(K⁺-modified simplex optimized medium, KSOM)中继续培养96 h, 随后统计体外受精率、二细胞胚胎率及囊胚率。受精率(二细胞胚胎率、囊胚率)为受精卵数目(二细胞胚胎数目、囊胚数目)与体外受精卵母细胞总数之比。

1.4 荧光染色与成像

将各组体内成熟的卵母细胞置于4%多聚甲醛中固定30 min。PBS清洗后, 0.5% Triton X-100(Merk)打孔30 min, 2%山羊血清(Zymed)室温封闭30 min, 置于1:100稀释的一抗 α -tubulin [Epitomics (EPR16772) (ab179484)]中, 4 °C湿盒孵育过夜。清洗后, 在二抗羊抗兔IgG(Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove)中孵育30 min, PBS清洗, 置于荧光三抗1:50稀释的量子点585标记的链霉卵白素(QD585, Invitrogen; Q10111MP)中, 37 °C孵育1 h。PBS清洗后, 5 μ g/mL Hoechst 33342(Leiden)复染细胞核15 min, 经清洗后, 用于荧光成像。

本文利用双光子荧光显微镜采集体内成熟卵母细胞中染色体及纺锤体的荧光图像。该双光子系统由Bio-rad MRC 1024扫描成像单元与Nikon TE300倒置显微镜组合而成。激光源为二极管泵浦(Millennia, 10 W, Spectra-Physics)的锁模飞秒脉冲掺钛蓝宝石激光器(Tsunami, Spectra-Physics)。波长设为730 nm, 可同时采集标记纺锤体的QD585及标记染色体的Hoechst 33342的荧光图像。数值孔径为1.4的100 $\times$ 油镜用于成像, 纵向步长设为0.5 μ m, XY平

面振镜扫描速度约为1帧/秒(512×512)。一个三维像素的实际大小为0.072 μm×0.072 μm×0.5 μm。

1.5 染色体空间排布及纺锤体形态分析

双光子成像系统采集的染色体及纺锤体图像, 首先经中值滤波去除噪声, 随后进行盲去卷积操作, 最后进行荧光强度归一处理。经上述预处理后, 利用软件Amira 5.2三维分割出染色体及纺锤体图像, 进行三维重构, 从而多角度观察染色体空间排布及纺锤体形态。其中, 梭状与桶状纺锤体形态区分方法参照文献[9]。

1.6 统计分析

两组数据平均值之间的差异通过单因素方差分析比较。所有实验均独立重复三次。染色体空间排布比率、纺锤体形态比率、体外受精率、二细胞胚胎率及囊胚率的差异, 通过卡方检验实现。 $P<0.05$ 代表存在显著差异。

2 结果

2.1 卵母细胞形态随MTX代谢时间的变化

为评估卵母细胞形态, 我们测量了卵母细胞的直径、透明带厚度、卵胞质颜色(卵胞质颜色以胞质图像的平均灰度值来表征)。发现, 卵母细胞直径、透明带厚度及卵胞质灰度在对照组、MTX组及MTX注射后的5~30天代谢组之间, 无显著差别(表1)。即单次腹腔注射5 mg/kg MTX未引起卵母细胞形态的明显变化。

2.2 体内成熟的卵母细胞中染色体空间排布随MTX代谢时间的变化

MTX可以干扰一碳基团代谢, 从而影响DNA

及RNA的合成与表观修饰^[1-2]。染色体是DNA的主要载体。成熟的卵母细胞, 即为处于第二次减数分裂中期的卵母细胞, 其染色体整齐地排列在赤道板上。实验发现, 对照组小鼠体内成熟卵母细胞的染色体正常排布比率约为87.6%, 排列不整齐的比率约为9.3%, 其他排布比率约为3.1%。MTX组的这三个比率依次为65.4%、19.2%和15.4%。在MTX组基础上, 建立的代谢5天组、10天组、15天组、20天组、25天组及30天组体内成熟卵母细胞的染色体排布情况(正常排布比率/排列不齐比率/其他排布比率)分别为69%/14.4%/16.6%、81.9%/14.5%/3.6%、83.6%/9.7%/6.7%、82.5%/14.0%/3.5%、86.2%/9.0%/4.8%、88.1%/8.2%/3.7%(表2)。可见, MTX注射25日后, 即小鼠经历了五个生理周期后, 染色体排布情况已经明显区别于MTX组情况, 并已经与对照组无显著差别。

2.3 纺锤体形态随MTX代谢时间的变化

纺锤体是一种细胞分裂时期出现的临时细胞器, 其形成对卵母细胞成熟、染色体排布与分离非常重要, 其形态通常呈中间宽两头窄的梭状。前文结果我们看到, 染色体空间排布随MTX注射后代谢时间延长而变化, 考虑到纺锤体对染色体空间排布的重要性, 我们又观察了各实验组中的纺锤体。各实验组纺锤体均定位于胞质皮质区, 而纺锤体形态大致可分为三类, 即梭状、桶状及其他。结果显示, 对照组、MTX组、代谢5天组、10天组、15天组、20天组、25天组及30天组体内成熟卵母细胞中纺锤体形态情况(梭状/桶状/其他)为87.1%/12.9%/0%、54.7%/40.3%/5.0%、60.3%/35.7%/3.9%、

表1 各实验组卵母细胞形态比较
Table 1 Comparison of oocyte morphology between the experimental groups

类别 Types	对照组 (n=62) Control group (n=62)	MTX组 (n=59) MTX group (n=59)	代谢5天组 (n=64) Metabolic 5-day group (n=64)	代谢10天组 (n=66) Metabolic 10-day group (n=66)	代谢15天组 (n=54) Metabolic 15-day group (n=54)	代谢20天组 (n=64) Metabolic 20-day group (n=64)	代谢25天组 (n=67) Metabolic 25-day group (n=67)	代谢30天 组(n=59) Metabolic 30-day group (n=59)
Oocyte diameter /μm	82.80±2.60	84.30±3.10	83.60±2.20	84.10±2.80	82.50±2.10	83.80±2.40	84.20±2.90	84.00±2.50
Thickness of the zona pellucida /μm	8.10±0.26	7.90±0.31	8.40±0.19	8.20±0.24	7.80±0.33	8.30±0.27	8.00±0.22	8.00±0.24
Gray value of oocyte cytoplasm	135±22	137±20	142±26	129±24	134±19	146±23	138±30	131±23

每次实验重复的每组小鼠数目为2只。
The number of mice for each group in each repetition is two.

表2 各实验组中染色体空间排布比较

Table 2 Comparison of chromosome arrangement between the experimental groups

类别 Types	对照组 (n=156) Control group (n=156)	MTX组 (n=137) MTX group (n=137)	代谢5天组 (n=126) Metabolic 5-day group (n=126)	代谢10天 组(n=166) Metabolic 10- day group (n=166)	代谢15天 组(n=134) Metabolic 15- day group (n=134)	代谢20天 组(n=114) Metabolic 20- day group (n=114)	代谢25天组 (n=167) Metabolic 25- day group (n=167)	代谢30天 组(n=134) Metabolic 30- day group (n=134)
The rate of normal chromosomal arrangement	(87.6±1.6)%	(65.4±2.4)%*	(69±2.8)%*	(81.9±1.9)% [#]	(83.6±2.2)% [#]	(82.5±1.7)% [#]	(86.2±1.5)% [#]	(88.1±1.3)% [#]
The rate of irregular chromosomal arrangement	(9.3±2.1)%	(19.2±1.9)%*	(14.4±3.1)%	(14.5±2.6)%	(9.7±1.8)% [#]	(14.0±2.6)%	(9.0±1.6)% [#]	(8.2±1.8)% [#]
Others	(3.1±1.7)%	(15.4±2.3)%*	(16.6±2.2)%*	(3.6±1.8)% [#]	(6.7±2.0)% [#]	(3.5±2.3)% [#]	(4.8±1.6)% [#]	(3.7±1.7)% [#]

每次实验重复的每组小鼠数目为4~5只; *代表与对照组相比存在显著差异; [#]代表与MTX组相比存在显著差异; n代表卵母细胞数目。

The number of mice for each group in each repetition is 4-5. *There are significant differences compared with the control group. [#]There are significant differences compared with the MTX group. n stands for the number of oocytes.

表3 各实验组中纺锤体形态比较

Table 3 Comparison of spindle morphology between the experimental groups

类别 Types	对照组 (n=156) Control group (n=156)	MTX组 (n=137) MTX group (n=137)	代谢5天组 (n=126) Metabolic 5-day group (n=126)	代谢10天组 (n=166) Metabolic 10- day group (n=166)	代谢15天组 (n=134) Metabolic 15- day group (n=134)	代谢20天组 (n=114) Metabolic 20- day group (n=114)	代谢25天组 (n=167) Metabolic 25- day group (n=167)	代谢30天组 (n=134) Metabolic 30- day group (n=134)
The rate of the bicone-shaped spindle	(87.1±2.6)%	(54.7±2.8)%*	(60.3±3.0)%*	(75.3±1.6)%* [#]	(80.6±2.7)% [#]	(84.2±2.2)% [#]	(87.4±1.9)% [#]	(89.2±2.5)% [#]
The rate of the barrel-shaped spindle	(12.9±2.6)%	(40.3±2.1)%*	(35.7±2.6)%*	(23.5±1.9)%* [#]	(18.6±2.4)% [#]	(15.8±2.2)% [#]	(12.6±1.9)% [#]	(10.8±2.5)% [#]
Others	0%	(5.0±1.9)%*	(3.9±1.1)%*	(1.2±1.1)% [#]	(0.7±0.3)% [#]	0%	0%	0%

每次实验重复的每组小鼠数目为4~5只; *代表与对照组相比存在显著差异; [#]代表与MTX组相比存在显著差异; n代表卵母细胞数目。

The number of mice for each group in each repetition is 4-5. *There are significant differences compared with the control group. [#]There are significant differences compared with the MTX group. n stands for the number of oocytes.

75.3%/23.5%/1.2%、80.6%/18.6%/0.7%、84.2%/15.8%/0%、87.4%/12.6%/0%、89.2%/10.8%/0%(表3)。可见, MTX注射15日后, 纺锤体形态已恢复至对照组情况, 即梭状比率, 桶状比率已经与对照组之间无显著差别。

2.4 体外受精能力随MTX代谢时间的变化

本文利用体外受精比率及胚胎体外发育情况来反映卵母细胞的功能情况(表4)。对照组的体外受精率约为80.6%, 二细胞胚胎率约为72.0%, 囊胚率约为46.2%。MTX组的体外受精率约为58.1%, 二细胞胚胎率约为47.7%, 囊胚率约为22.1%。代谢5天组、10天组、15天组、20天组、25天组及30天

组的体外受精率分别约为64.6%、71.8%、74.7%、76.8%、79.2%、81.2%, 二细胞胚胎率分别约为57.3%、62.8%、65.9%、69.6%、71.4%、74.1%, 囊胚率分别约为31.7%、37.2%、39.6%、40.6%、46.8%、45.9%。可见, 代谢15天后, 体外受精率与对照组已经无显著差别; 代谢20天后, 二细胞胚胎率与对照组之间无显著差别; 代谢25天后, 囊胚率与对照组之间无显著差别。

3 讨论

MTX作为抗叶酸代谢类药物, 其药理功能为通过干扰DNA及RNA的合成与表观修饰, 抑制细胞增殖,

表4 各实验组体外受精率、二细胞胚胎率及囊胚率的比较

Table 4 Comparison of <i>in-vitro</i> fertilization rate, two-cell embryo rate and blastocyst rate between the experimental groups								
类别	对照组	MTX组	代谢5天组	代谢10天组	代谢15天组	代谢20天组	代谢25天组	代谢30天组
Types	(n=93)	(n=86)	(n=82)	(n=78)	(n=91)	(n=69)	(n=77)	(n=85)
	Control group	MTX group	Metabolic 5-day group	Metabolic 10-day group	Metabolic 15-day group	Metabolic 20-day group	Metabolic 25-day group	Metabolic 30-day group
	(n=93)	(n=86)	(n=82)	(n=78)	(n=91)	(n=69)	(n=77)	(n=85)
<i>In-vitro</i> fertilization rate	(80.6±3.1)%	(58.1±3.9)%*	(64.6±3.2)%*	(71.8±3.6)%**	(74.7±2.9)% [#]	(76.8±2.7)% [#]	(79.2±2.9)% [#]	(81.2±2.9)% [#]
Two-cell embryo rate	(72.0±2.9)%	(47.7±4.2)%*	(57.3±2.9)%**	(62.8±3.2)%**	(65.9±2.6)%**	(69.6±2.8)% [#]	(71.4±3.0)% [#]	(74.1±2.8)% [#]
Blastocyst rate	(46.2±2.7)%	(22.1±3.4)%*	(31.7±3.0)%**	(37.2±3.3)%**	(39.6±2.8)%**	(40.6±2.7)%**	(46.8±3.1)% [#]	(45.9±2.7)% [#]

每次实验重复的每组小鼠数目为3只; *代表与对照组相比存在显著差异; [#]代表与MTX组相比存在显著差异; *n*代表卵母细胞数目。
The number of mice for each group in each repetition is three. *There are significant differences compared with the control group. [#]There are significant differences compared with the MTX group. *n* stands for the number of oocytes.

从而起到抗癌、抗炎的功能, 同时还会对快速分裂的细胞(如肠道黏膜、口腔黏膜等)引起毒副作用^[1-6]。我们以前的研究还发现, MTX还会引起生殖系统异常, 表现为MTX可引起成熟卵母细胞的染色体排列异常、纺锤体形态异常等^[7]。药物进入有机体后必然会发生有机体内的吸收、分布及排泄等代谢过程。MTX进入人体后, 多数以原型经肾脏等器官排出体外, 只有少数经肝肠循环存储在肝脏和胆汁中发挥其药效^[10-11]。存留在体内的MTX会改变其化学结构形成发挥药效作用的络合物, 随着有机体不断地代谢循环, 存留在有机体内的药物浓度会逐渐降低, 其药效及毒性也逐渐消失。这可能是本文发现的小鼠经多个生理周期后, MTX所引起的异常逐渐消失的原因。具体地, 我们看到, 经过自身代谢25天后, 即5个生理周期后(小鼠生理周期约为5天), 染色体空间排布恢复正常; 经过15天(3个生理周期)后, 纺锤体形态恢复正常。可见, 自身代谢使纺锤体形态恢复正常的时间更短, 而使染色体空间排布恢复正常的时间更长。染色体的运动、分离及空间排布是通过纺锤丝的组装与去组装实现的^[12]。纺锤体的形态、结构及空间定位与染色体的空间分布密切相关^[13-14]。纺锤体形态正常, 染色体分离及排布才会正常。因此, 这可能是本文所观察到纺锤体形态先恢复, 随后染色体空间排布恢复正常的原因。

评估卵母细胞质量最根本的判断标准是评估卵母细胞的功能好坏, 即卵母细胞受精能力及受精卵的发育情况。本文检测了MTX注射后, 卵母细胞体外受精率、二细胞胚胎率及囊胚率随代谢时间的变化, 依此评估卵母细胞功能的恢复情况。我们看

到, 代谢15天后, 体外受精率已基本恢复正常, 代谢20天后, 二细胞胚胎率恢复正常, 代谢25天后囊胚率已基本恢复正常。可见卵母细胞功能是逐步恢复的, 这与MTX随有机体不断代谢循环而逐渐降低其药效及毒性直至消失是一致的。

总结来看, 小鼠在注射MTX后, 经历25天(5个生理周期)代谢后, 其体内成熟卵母细胞的染色体排布、纺锤体形态、体外受精能力及胚胎发育潜能均恢复至正常对照组水平。本文结果为服用过MTX而治愈的女性患者备孕提供了重要的数据支持。

参考文献 (References)

[1] WU K F, LIANG W C, FENG L, et al. H19 mediates methotrexate resistance in colorectal cancer through activating Wnt/β-catenin pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 350(2): 312-7.

[2] KANAREK N, FREINKMAN E, CANTOR J, et al. Genome-wide CRISPR screen and metabolite profiling reveal a new mechanism of methotrexate sensitivity [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(13 supplement): 4988.

[3] GOSSELT H R, VAN ZELST B D, DE ROTTE M C F J, et al. Higher baseline global leukocyte DNA methylation is associated with MTX non-response in early RA patients [J]. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21(1): 157.

[4] VENA G A, CASSANO N, IANNONE F. Update on subcutaneous methotrexate for inflammatory arthritis and psoriasis [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2018, 14: 105-16.

[5] LI H, LIU Y, WEN S, et al. Evaluation of serum biomarkers and efficacy of MTX in women with ectopic pregnancy [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(3): 2902-8.

[6] WANG W, ZHOU H, LIU L. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: a systematic review [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 158: 502-16.

[7] TIAN N, LV D Y, YU J, et al. Methotrexate impaired *in-vivo* matured mouse oocyte quality and the possible mechanisms [J]. *BMC Mol Cell Biol*, 2020, 21(1): 51.

- [8] TIAN N, MA W Y. Antidotal effects of calcium folinate against high-dose methotrexate-induced damages to mouse matured oocytes [J]. *Acta Bioch Bioph Sin*, 2020, 52(1): 101-3.
- [9] TIAN N, YU J, ZHANG S, et al. Effects of methotrexate on the quality of oocyte maturation *in vitro* [J]. *Eur Biophys J Biophys*, 2018, 47(3): 249-60.
- [10] HENDERSON E S, ADAMSON R H, DENHAM C, et al. The metabolic fate of tritiated methotrexate I. Absorption, excretion, and distribution in mice, rats, dogs and monkeys [J]. *Cancer Res*, 1965, 25(7): 1008-17.
- [11] WANG L, MA L, LIN Y, et al. Leflunomide increases hepatic exposure to methotrexate and its metabolite by differentially regulating multidrug resistance-associated protein mrp2/3/4 transporters via peroxisome proliferator-activated receptor α activation [J]. *Mol Pharmacol*, 2018, 93(6): 563-74.
- [12] MAGIDSON V, O'CONNELL C B, LONCAREK J, et al. The spatial arrangement of chromosomes during prometaphase facilitates spindle assembly [J]. *Cell*, 2011, 146(4): 555-67.
- [13] GE S Q, WU Y L, ZHU J L, et al. Preliminary investigation of the effects of an FCF inhibitor interference with septin in the early stage embryos in mice [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(5): 4401-6.
- [14] REDDY S K, RAPE M, MARGANSKY W A, et al. Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation [J]. *Nature*, 2007, 446(7138): 921-5.