

核桃青皮提取物对 CNE-2 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

陈 辰, 胡丽霞*

(武汉市第一医院, 湖北 武汉 430000)

摘要: **目的** 研究核桃青皮提取物对 CNE-2 细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**方法** 将 miR-564 组、miR-NC 组、anti-miR-564 组 (转染 anti-miR-564 后用核桃青皮提取物处理)、anti-miR-NC 组 (转染 miR-NC 后用核桃青皮提取物处理) 用脂质体法转染至 CNE-2 细胞, 部分组用核桃青皮提取物 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理。采用 MTT 法检测核桃青皮提取物 (20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理后对 CNE-2 细胞的抑制率, 伤口愈合测定法、Transwell 法检测细胞的迁移和侵袭, Western blot 检测靶向 Klp2 靶蛋白 (TPX2)、细胞周期素 D1 (CyclinD1)、p21、p27、MMP-2、MMP-9、MMP-14 蛋白表达, qRT-PCR 法检测 miR-564、TPX2 mRNA 表达; 双荧光素酶报告基因检测实验检测细胞的荧光活性。**结果** 与 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较, 核桃青皮提取物对 CNE-2 细胞的抑制率增强, 下调 CyclinD1 蛋白表达, 上调 p21、p27 蛋白表达, 抑制 CNE-2 细胞迁移和侵袭, 下调 MMP-2、MMP-9、MMP-14 蛋白表达, 上调 miR-564 表达, 下调 TPX2 的表达, 均呈浓度依赖性。miR-564 可抑制野生型 TPX2 的 CNE-2 细胞荧光活性, 其过表达可明显提高 CNE-2 细胞抑制率, 抑制细胞迁移和侵袭, 下调 CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达, 上调 p21 蛋白表达。抑制 miR-564 表达可减轻核桃青皮提取物对 CNE-2 细胞增殖、迁移、侵袭的作用, 以及对 CyclinD1、p21、MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响。**结论** 核桃青皮提取物可抑制鼻咽癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 其机制可能与调控 miR-564/TPX2 通路有关。

关键词: 核桃青皮提取物; 呈浓度依赖性; 增殖; 迁移; 侵袭; miR-564/TPX2 通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)03-0956-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.03.050

核桃 *Juglans regia* L. 归于桃属植物, 广泛分布于世界各地, 不仅使用干种子 (坚果), 还使用绿色核桃、贝壳、树皮、绿壳和叶子, 这些已用于化妆品和制药行业^[1]。核桃在传统医学中广泛用于治疗皮肤炎性反应、多汗症、溃疡及止泻、抗蠕虫、防腐和收敛等^[2], 在一些欧洲国家, 干核桃叶用于制备输液^[3]。核桃青皮又称青龙衣, 是植物核桃未成熟果实的外果皮, 其为核桃果实收获后的废弃物, 原料来源丰富。核桃在多种癌中均具有一定的抗癌功能, 但其在鼻咽癌中的功能及机制尚未完全清楚。虽已有大量研究验证 miRNA 在鼻咽癌中具有调控功能, 但其中 miR-564 与鼻咽癌进展中的关系知之甚少。本研究拟以鼻咽癌细胞系 CNE-2 为研究对象, 观察核桃青皮提取物对鼻咽癌细胞增殖、迁移、侵袭及 miR-564、TPX2 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 核桃 (产地四川广元)。人鼻咽癌细胞系 CNE-2 (中国科学院上海细胞库)。DMEM 培养基 (美国 Thermo 公司); 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司); MTT (北京康为世纪生物科技有限公司); 胰蛋白酶 (美国 Selleck 公司); 反转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); PVDF 膜 (瑞士 Roche 公司); SDS-PAGE 试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); ECL 发光液 (上海碧云天生物技术有限公司); 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (美国

Promega 公司); Matrigel 基质胶、Transwell 小室 (美国 Corning 公司)。

1.2 方法

1.2.1 核桃青皮提取物制备 将核桃剥去核桃青皮, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干, 粉碎至 90 目筛, 按照粉料比 1:15 用无水甲醇在 65 $^{\circ}\text{C}$ 下回流提取 3 次, 减压浓缩提取液至膏状, 即得, 配制成 100 mg/mL , 再稀释至 20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2.2 细胞培养与分组 将 CNE-2 细胞用 DMEM 培养基 (10% 胎牛血清+1% 青链霉素) 培养, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养、传代, 随机分为对照组和核桃青皮提取物组 (0、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 与对数增殖期的 CNE-2 细胞共培养 48 h, 选取 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞作为核桃青皮提取物组。采用脂质体法将 miR-564 mimics、miR-NC 转染 CNE-2 细胞, 作为 miR-564 组、miR-NC 组; 将 anti-miR-564、anti-miR-NC 转染 CNE-2 细胞, 再用 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 核桃青皮提取物处理后, 作为核桃青皮提取物+anti-miR-564 组、核桃青皮提取物+anti-miR-NC 组。

1.2.3 MTT 法检测细胞抑制率 将细胞密度调至 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$, 加入 MTT 溶液 (5 g/L) 和 DMSO (0.5 g/L) 反应, 结束后在 490 nm 波长下检测吸光度 (A), 计算细胞抑制率, 公式为细胞抑制率 = $[1 - A_{490\text{样品}}/A_{490\text{对照}}] \times 100\%$ 。

1.2.4 Western blot 检测 TPX2、CyclinD1、p21、p27、

收稿日期: 2020-07-21

作者简介: 陈 辰 (1988—), 男, 硕士, 主管药师, 研究方向为信息药学。Tel: 13986155605, E-mail: 3287495831@qq.com

* 通信作者: 胡丽霞 (1981—), 女, 硕士, 副主任中药师, 研究方向为临床中药学。Tel: 18696132384

MMP-2、MMP-9、MMP-14 蛋白表达 将细胞充分裂解后提取总蛋白,作为蛋白电泳的上样模板,电泳结束后用转膜仪将蛋白转移至 PVDF 膜,一抗(兔单克隆 TPX2、CyclinD1、p21、p27、MMP-2、MMP-9、MMP-14 抗体,1:500~1:2 000)稀释液孵育(4℃)过夜,二抗(辣根过氧化物酶标记的二抗,1:500)稀释液(37℃)孵育1 h,采用电化学发光试剂盒对膜进行显影曝光。

1.2.5 细胞迁移、侵袭测定 采用伤口愈合测定法评估细胞迁移。细胞在6孔板中培养,每孔 5×10^4 个,达到90%~95%汇合后以无菌塑料微量移液器吸头刮擦单层细胞,在标准条件下培养24 h。培养结束后,在显微镜观察伤口恢复情况,计算划痕愈合率。

采用 Transwell 实验检测细胞的迁移和侵袭。先将细胞用不含血清的培养基培养12 h,密度调至 1.0×10^5 个/mL,取100 μ L 涂抹到小室的聚碳酸酯膜上表面,再取600 μ L 含血清的培养基置入小室(表面涂抹一层基质胶),在37℃下培养12 h,缓缓移出小室,拭去膜上表面的多余细胞,甲醇固定,结晶紫染色,将膜下表面朝上置于载玻片进行封片,在显微镜下计数,取平均值。

1.2.6 qRT-PCR 检测 miR-564、TPX2 mRNA 表达 提取总 RNA,合成 cDNA,在-20℃下保存,作为 qRT-PCR 实验模板。以 U6、GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法检测 miR-564、TPX2 mRNA 表达。

1.2.7 双荧光素酶报告基因检测 通过在线靶基因预测 miRcode 预测 miR-564 的潜在结合靶标,将预测到的 TPX2-3 UTR 互补结合位点[委托深圳华大基因设计合成 TPX2-3 UTR WT(含有结合位点的 TPX2-3 UTR 片段)]和 TPX2-3 UTR MUT(不含有结合位点的 TPX2-3 UTR 片段)克隆

至荧光素酶报告载体 psiCHECK2,构建荧光素酶报告基因载体质粒。按双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书要求操作,记录萤火虫和海肾的荧光素酶发光强度,以两者比值表示细胞荧光活性。

1.3 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,2组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用独立样本方差分析和 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 核桃青皮提取物对 CNE-2 细胞增殖的影响 与对照组比较,20 μ g/mL 组细胞抑制率升高,CyclinD1 蛋白表达降低,p21、p27 蛋白表达升高($P < 0.05$);与20 μ g/mL 组比较,40 μ g/mL 组细胞抑制率升高,CyclinD1 蛋白表达降低,p21、p27 蛋白表达升高($P < 0.05$);与40 μ g/mL 组比较,80 μ g/mL 组细胞抑制率升高,CyclinD1 蛋白表达降低,p21、p27 蛋白表达升高($P < 0.05$),见图1、表1。

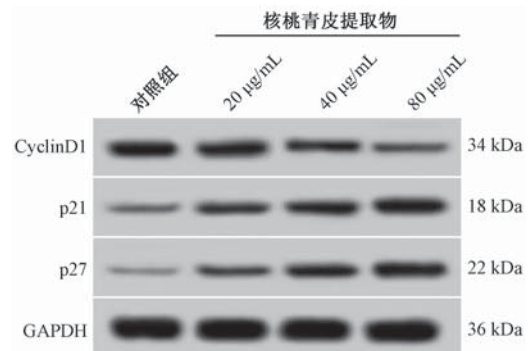


图1 各组 CNE-2 细胞增殖相关蛋白表达

表1 核桃青皮提取物对 CNE-2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	抑制率/%	CyclinD1 蛋白表达	p21 蛋白表达	p27 蛋白表达
对照组	0.00±0.01	0.82±0.04	0.25±0.03	0.21±0.03
核桃青皮提取物 20 μ g/mL 组	19.56±2.17*	0.71±0.05*	0.39±0.04*	0.34±0.03*
核桃青皮提取物 40 μ g/mL 组	45.72±5.68**	0.59±0.04**	0.57±0.05**	0.51±0.05**
核桃青皮提取物 80 μ g/mL 组	69.49±7.24*** Δ	0.28±0.03*** Δ	0.76±0.06*** Δ	0.69±0.06*** Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与核桃青皮提取物 20 μ g/mL 组比较,** $P < 0.05$;与核桃青皮提取物 40 μ g/mL 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.2 核桃青皮提取物对 CNE-2 细胞迁移、侵袭的影响 与对照组比较,20 μ g/mL 组细胞划痕愈合率、迁移数和侵袭数、MMP-2、MMP-9、MMP-14 蛋白表达均降低($P < 0.05$);与20 μ g/mL 组比较,40 μ g/mL 组细胞划痕愈合

率、迁移数和侵袭数、MMP-2、MMP-9、MMP-14 蛋白表达均降低($P < 0.05$);与40 μ g/mL 组比较,80 μ g/mL 组细胞划痕愈合率、迁移数和侵袭数、MMP-2、MMP-9、MMP-14 蛋白表达均降低($P < 0.05$),见图2、表2。

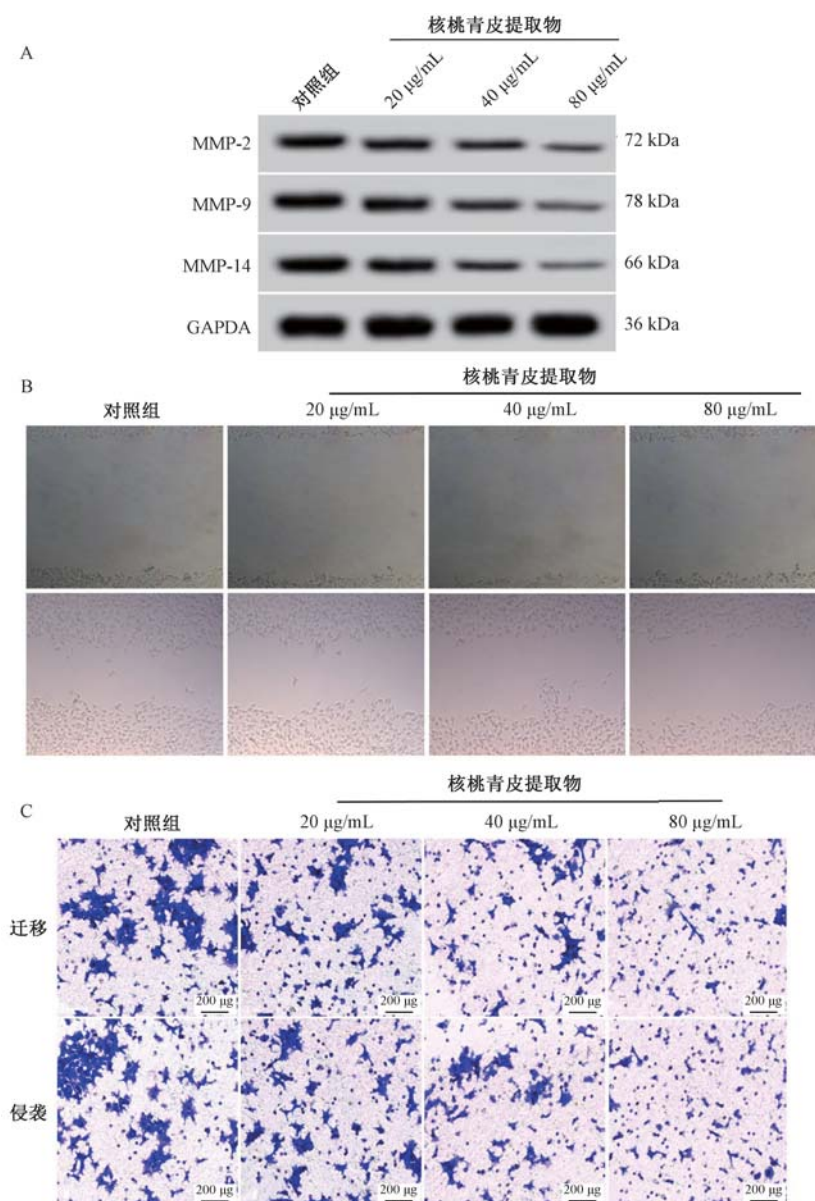
表2 核桃青皮提取物对 CNE-2 细胞迁移、侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	划痕愈合率/%	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个	MMP-2 蛋白表达	MMP-9 蛋白表达	MMP-14 蛋白表达
对照组	59.32±5.21	121.48±12.46	110.54±10.27	0.79±0.05	0.81±0.06	0.85±0.06
核桃青皮提取物 20 μ g/mL 组	45.26±4.01*	100.79±9.53*	85.69±7.29*	0.66±0.04*	0.68±0.05*	0.63±0.05*
核桃青皮提取物 40 μ g/mL 组	31.22±3.17**	79.56±7.25**	64.37±6.48**	0.52±0.05**	0.43±0.04**	0.46±0.04**
核桃青皮提取物 80 μ g/mL 组	19.67±1.85*** Δ	61.53±7.05*** Δ	47.52±4.38*** Δ	0.31±0.03*** Δ	0.26±0.03*** Δ	0.21±0.03*** Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与核桃青皮提取物 20 μ g/mL 组比较,** $P < 0.05$;与核桃青皮提取物 40 μ g/mL 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.3 核桃青皮提取物对 miR-564、TPX2 表达的影响 与对照组比较,20 μ g/mL 组 miR-564 表达升高,TPX2 mRNA、蛋白表达均降低($P < 0.05$);与20 μ g/mL 组比较,40 μ g/mL 组

miR-564 表达升高,TPX2 mRNA、蛋白表达均降低($P < 0.05$);与40 μ g/mL 组比较,80 μ g/mL 组 miR-564 表达升高,TPX2 mRNA、蛋白表达均降低($P < 0.05$),见图3、表3。



注：A 为迁移、侵袭相关蛋白表达，B 为划痕，C 为 Transwell 检测 CNE-2 细胞迁移、侵袭。

图 2 各组 CNE-2 细胞迁移、侵袭



图 3 各组 TPX2 蛋白表达

2.4 miR-564 靶向调控 TPX2 表达 miR-564 与 TPX2 3' UTR 存在的结合位点见图 4A。miR-564 可抑制 WT-TPX2 细胞荧光活性 ($P < 0.05$)，而不影响 MUT-TPX2 细胞的荧光活性，见图 4B，并且能负向调控 TPX2 表达 ($P < 0.05$)，见表 4~5。

2.5 miR-564 过表达对 CNE-2 细胞增殖、迁移、侵袭的影响 与 miR-NC 组比较，miR-564 组 miR-564 表达、细胞抑制率升高，划痕愈合率、细胞迁移数、侵袭数降低，CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达减少，p21 蛋白表达增加 ($P < 0.05$)，见图 5、表 6。

2.6 抑制 miR-564 表达逆转 CNE-2 细胞增殖、迁移、侵袭 与对照组比较，核桃青皮提取物组 miR-564 表达、细胞抑制率、p21 蛋白表达升高，TPX2 蛋白表达、划痕愈合率、细胞迁移量、侵袭量及 CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)；与核桃青皮提取物 + anti-miR-NC 组比较，核桃青皮提取物 + anti-miR-564 组 miR-564 表达、细胞抑制率、p21 蛋白表达降低，TPX2 蛋白表达、划痕愈合率、细胞迁移量、侵袭量及 CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达量均升高 ($P < 0.05$)，见图 6、表 7。

表 3 核桃青皮提取物对 miR-564、TPX2 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	miR-564 表达	TPX2 mRNA 表达	TPX2 蛋白表达
对照组	0.98±0.08	1.05±0.07	0.71±0.05
核桃青皮提取物 20 μg/mL 组	1.68±0.15 *	0.74±0.06 *	0.53±0.04 *
核桃青皮提取物 40 μg/mL 组	2.74±0.21 * [#]	0.52±0.05 * [#]	0.41±0.04 * [#]
核桃青皮提取物 80 μg/mL 组	3.35±0.28 * ^{#Δ}	0.33±0.03 * ^{#Δ}	0.22±0.03 * ^{#Δ}

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与核桃青皮提取物 20 μg/mL 组比较,[#] $P<0.05$;与核桃青皮提取物 40 μg/mL 组比较,^Δ $P<0.05$ 。

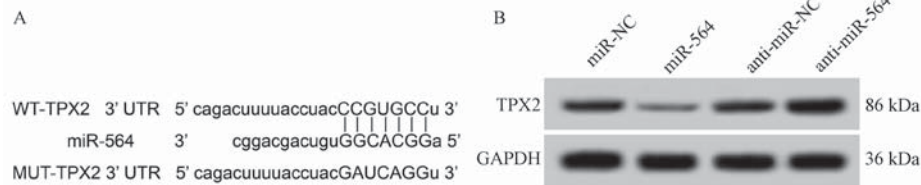


图 4 各组 TPX2 表达

表 4 双荧光素酶报告实验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	WT-TPX2	MUT-TPX2
miR-NC 组	1.03±0.09	1.01±0.08
miR-564 组	0.35±0.04 *	0.98±0.09

注:与 miR-NC 组比较,* $P<0.05$ 。

表 5 miR-564 对 TPX2 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	TPX2 表达
miR-NC 组	0.68±0.06
miR-564 组	0.25±0.03 *
anti-miR-NC 组	0.64±0.05
anti-miR-564 组	0.97±0.08 [#]

注:与 miR-NC 组比较,* $P<0.05$;与 anti-miR-NC 组比较,[#] $P<0.05$ 。

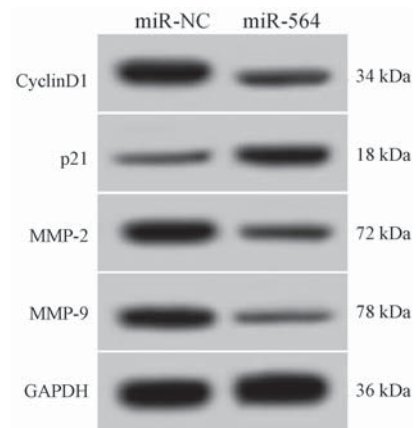


图 5 各组 CNE-2 细胞增殖、迁移、侵袭相关蛋白表达 (I)

表 6 miR-564 过表达对 CNE-2 细胞增殖、迁移、侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	miR-564	划痕愈合率/%	抑制率/%	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个	CyclinD1 蛋白表达	p21 蛋白表达	MMP-2 蛋白表达	MMP-9 蛋白表达
miR-NC	1.01±0.09	57.21±5.23	8.64±3.06	106.58±10.34	94.67±8.92	0.81±0.07	0.28±0.03	0.74±0.07	0.71±0.06
miR-564	2.95±0.26 *	29.58±2.41 *	47.56±4.23 *	53.89±5.27 *	41.38±4.25 *	0.35±0.04 *	0.64±0.07 *	0.35±0.04 *	0.28±0.03 *

注:与 miR-NC 组比较,* $P<0.05$ 。

表 7 抑制 miR-564 表达逆转 CNE-2 细胞增殖、迁移、侵袭 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	miR-564	TPX2 蛋白	划痕愈合率/%	抑制率/%	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个	CyclinD1 蛋白表达	p21 蛋白表达	MMP-2 蛋白表达	MMP-9 蛋白表达
对照组	1.01±0.08	0.75±0.07	57.21±5.42	4.37±0.56	115.96±11.43	91.56±9.07	0.84±0.04	0.24±0.03	0.80±0.05	0.83±0.05
核桃青皮提取物组	2.64±0.21 *	0.41±0.04 *	23.22±2.01 *	58.62±5.67 *	54.87±5.69 *	42.69±4.55 *	0.43±0.05 *	0.64±0.06 *	0.37±0.03 *	0.35±0.03 *
核桃青皮提取物+anti-miR-NC 组	2.71±0.25	0.36±0.04	20.14±2.68	54.28±5.33	50.38±5.73	38.47±4.28	0.41±0.04	0.68±0.06	0.38±0.03	0.33±0.04
核桃青皮提取物+anti-miR-564 组	1.73±0.18 [#]	0.63±0.05 [#]	43.69±4.22 [#]	16.83±1.53 [#]	81.93±8.24 [#]	72.64±7.22 [#]	0.72±0.07 [#]	0.37±0.04 [#]	0.68±0.07 [#]	0.72±0.07 [#]

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与核桃青皮提取物+anti-miR-NC 组比较,[#] $P<0.05$ 。

3 讨论

核桃种子(核桃)、绿壳和叶子中甲醇和石油醚提取物具有对肾癌细胞和结直肠癌细胞相同的抗增殖活性^[4]。核桃青皮提取物通过调节凋亡相关基因的表达,以剂量和时间依赖的方式抑制前列腺癌细胞增殖并诱导细胞凋亡,表明核桃青皮提取物中存在活性化合物,是抗癌药物的候选来源^[5]。核桃青皮提取物呈浓度依赖性抑制结直肠癌细

胞的增殖、迁移和侵袭;抗增殖和抗迁移侵袭功能与抑制增殖相关蛋白 CyclinD1,促进 p21、p27 的表达和抑制迁移侵袭相关蛋白 MMP-2、MMP-9、MMP-14 的蛋白表达密切相关。

miR-564 在人骨肉瘤细胞和组织中下调,且 miR-564 的过表达抑制癌细胞增殖并诱导细胞凋亡,Akt 被鉴定为 miR-564 的直接靶标,受 miR-564 的负向调控,表明 miR-

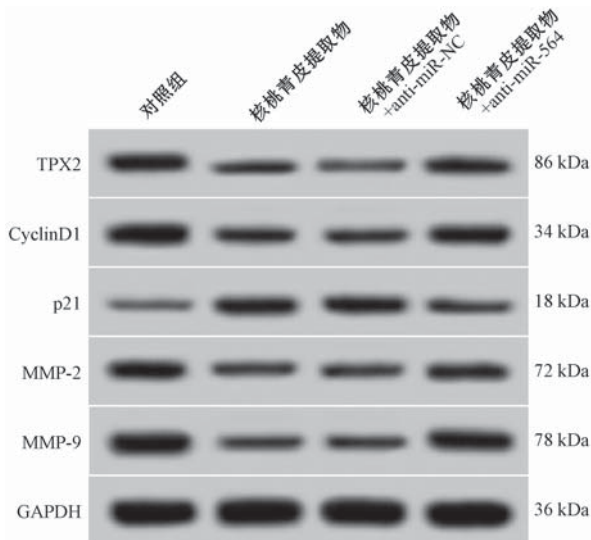


图 6 各组 CNE-2 细胞增殖、迁移、侵袭相关蛋白表达 (II)

564 通过直接靶向 Akt 抑制糖酵解和细胞增殖^[6]。miR-564 的表达量与核桃青皮提取物的浓度呈正相关；过表达 miR-564 可抑制结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭，并调控增殖相关蛋白和迁移侵袭相关蛋白的表达，miR-564 可靶向 TPX2。

TPX2 在多种肿瘤中的表达发生异常，TPX2 在癌细胞和组织中表达增加^[7]。TPX2 在多种恶性肿瘤中表现出异常的升高，抑制 TPX2 不仅可抑制癌细胞的增殖、迁移和侵袭，甚至可增强化疗的面感性^[8]。TPX2 和 AURKA 的下调显示出抑制癌细胞侵袭的作用，揭示了 TPX2 促进结肠直肠癌腺瘤的恶性化进展^[9]。TPX2 在结肠直肠癌中有促进癌症恶化作用^[10-11]。TPX2 在结肠癌组织中过度表达，且与结肠癌的分期、转移及生存率显著相关，抑制 TPX2 在体外和体内均抑制结肠癌细胞的增殖和致肿瘤性，TPX2 敲低可减弱结肠癌细胞的迁移和侵袭能力，显示与 AKT 介导的 MMP2 活性在机制上相关，表明 TPX2 在促进人结肠癌的肿瘤发生和转移中起重要作用，并且具有成为新的预后生物标志物和治疗靶标^[12]。TPX2 的表达量与核桃青皮提取物的浓度呈负相关，且抑制 TPX2 具有与过表达 miR-564 相同的抑制鼻咽癌细胞增殖，促进凋亡的作用；过表达 TPX2 可逆转过表达 miR-564 对鼻咽癌细胞增殖抑制和凋亡促进的作用。

综上所述，核桃青皮提取物具有抑制鼻咽癌细胞增殖、迁移和侵袭，其机制可能与调节 miR-564/TPX2 表达密切相关，为核桃青皮提取物治疗鼻咽癌提供支持。

参考文献:

- [1] Oliveira I, Sousa A, Ferreira I, *et al.* Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(7): 2326-2331.
- [2] Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales [M]. *Tec Doc Lav*, 1999, 31(6): 418-419.
- [3] Amaral J, Seabra R M., Andrade P B, *et al.* Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves [J]. *Food Chem*, 2004, 88(3): 373-379.
- [4] Carvalho M, Ferreira P J, Mendes V S, *et al.* Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(1): 441-447.
- [5] Alshatwi A A, Hasan T N, Shafi G, *et al.* Validation of the antiproliferative effects of organic extracts from the green husk of *juglans regia* L. on PC-3 human prostate cancer cells by assessment of apoptosis-related genes [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 103026-103033.
- [6] Ru N, Zhang F, Liang J, *et al.* MiR-564 is down-regulated in osteosarcoma and inhibits the proliferation of osteosarcoma cells via targeting Akt[J]. *Gene*, 2018, 645: 163-169.
- [7] Asteriti I A, Rensen W M, Lindon C, *et al.* The Aurora-A/TPX2 complex; a novel oncogenic holoenzyme [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1806(2): 230-239.
- [8] 李美玲, 丁 晓, 陆海军. TPX2 及其调控基因在肿瘤形成中作用的研究进展[J]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2015, 9(23): 129-132.
- [9] Sillars H A H, Carvalho B, Tijssen M, *et al.* TPX2 and AURKA promote 20q amplicon-driven colorectal adenoma to carcinoma progression[J]. *Gut*, 2012, 61(11): 1568-1575.
- [10] 简 捷, 黄 缘, 刘利珍, 等. 靶向沉默 TPX2 基因可抑制人结肠癌 SW480 细胞的增殖和侵袭[J]. *肿瘤*, 2016, 36(6): 628-634.
- [11] 刘 洁, 李湘洲, 张居民, 等. TPX2 和 TP 在结肠直肠癌中的表达及临床意义[J]. *潍坊医学院学报*, 2013, 35(1): 38-41.
- [12] Wei P, Zhang N, Xu Y, *et al.* TPX2 is a novel prognostic marker for the growth and metastasis of colon cancer [J]. *J Translat Med*, 2013, 11: 313.