

慢病毒介导的TPX2沉默对人宫颈癌HeLa细胞 凋亡和侵袭的影响及机制

常海平* 杨彩容 赵荣伟 张 龙 任 杰

(内蒙古医科大学附属医院妇产科, 呼和浩特 010050)

摘要 该文的目的是研究慢病毒介导的Xklp2靶蛋白(targeting protein for Xklp2, *TPX2*)沉默对人宫颈癌HeLa细胞凋亡、侵袭的影响及机制。构建4种载有*TPX2*-shRNA的重组慢病毒及其阴性对照, 将5种重组慢病毒分别稳定感染人宫颈癌HeLa细胞, 利用实时荧光定量PCR和Western blot筛选出*TPX2*沉默效果最佳的一组HeLa细胞作为干扰组进行后续实验。采用Transwell基底膜侵袭实验测定各组细胞的侵袭能力。采用流式细胞术检测各组细胞的凋亡情况。Western blot检测*TPX2*-shRNA转染前后细胞凋亡及侵袭相关蛋白质Bcl-2、Bax、Caspase-3、MMP9、TIMP-1及nm23-H1水平。结果显示, 筛选出的RNA干扰慢病毒载体LV-*TPX2*-shRNA-1可有效抑制HeLa细胞*TPX2*的表达; 与对照组相比, 干扰组的HeLa细胞凋亡率明显增加($P<0.01$); 穿过Transwell小室基底膜细胞明显减少($P<0.01$)。HeLa细胞感染LV-*TPX2*-shRNA-1能下调凋亡相关蛋白Bcl-2的表达水平, 上调Caspase-3及Bax的表达水平($P<0.05$); 上调侵袭相关蛋白nm23-H1及TIMP-1水平, 下调MMP9水平($P<0.05$)。以上结果表明, 沉默*TPX2*表达能增加宫颈癌细胞的凋亡, 可能与其上调Caspase-3及Bax水平, 下调Bcl-2水平有关; 沉默*TPX2*表达能抑制宫颈癌细胞侵袭能力, 可能与其上调TIMP-1及nm23-H1水平, 下调MMP9的水平有关。

关键词 宫颈癌; *TPX2*-shRNA; 慢病毒; 细胞凋亡; 细胞侵袭

The Effect of Silencing *TPX2* Gene Expression Mediated by Lentiviral on Apoptosis and Invasion in Human Cervical Cancer HeLa Cells and Its Mechanism

Chang Haiping*, Yang Cairong, Zhao Rongwei, Zhang Long, Ren Jie

(The Department of Obstetrics and Gynecology, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010050, China)

Abstract This article was aimed to investigate the effect of silencing *TPX2* expression mediated by lentiviral on apoptosis and invasion in human cervical cancer HeLa cells and its mechanism. The four lentivirus expression vectors carried *TPX2*-shRNA and the negative control were constructed. The recombinant lentivirus carried *TPX2*-shRNA1/2/3/4 and *TPX2*-NC-shRNA were infected into HeLa cells, respectively. The expression levels of *TPX2* mRNA and protein in HeLa cells were determined by Real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot, respectively. The recombinant lentivirus was chosen with the best silence effect for the following function experiment. Effect of *TPX2*-shRNA on cell invasion in HeLa cells was detected using Transwell basement

收稿日期: 2017-06-03 接受日期: 2017-09-07

国家自然科学基金(批准号: 81360385)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0471-6636648, E-mail: haipingchang@163.com

Received: June 3, 2017 Accepted: September 7, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81360385)

*Corresponding author. Tel: +86-471-6636648, E-mail: haipingchang@163.com

网络出版时间: 2017-10-30 11:56:46

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171030.1156.006.html>

membrane invasion experimen. Effect of *TPX2*-shRNA on apoptosis in HeLa cells was detected by flow cytometry (FCM). The changes of Bcl-2, Bax, Caspase-3, MMP9, TIMP-1 and nm23-H1 protein levels were detected by Western blot. The result showed that optimizing and selecting recombinant lentivirus named LV-*TPX2*-shRNA-1 could effectively inhibit *TPX2* expression in HeLa cells, then LV-*TPX2*-shRNA-1 was selected for follow-up experiments. In the group of *TPX2*-shRNA-1, the apoptosis rate was significantly more than those in the control group ($P<0.01$), cells through the basement membrane of transwell chamber were significantly decreased compared to those in the control group ($P<0.01$). Silencing *TPX2* expression could up-regulate the levels of Caspase-3, Bax, nm23-H1 and TIMP-1, down-regulate the levels of Bcl-2 and MMP9 in HeLa cells ($P<0.05$). In conclusion, silencing *TPX2* expression could increase the apoptosis, which might be related to the up-regulation of the Caspase-3 and Bax, down-regulation of the Bcl-2 in HeLa cells. Silencing *TPX2* expression could inhibit the invasion in HeLa cells which might be related to the up-regulation of the nm23-H1 and TIMP-1 levels, down-regulation of the MMP9 levels in HeLa cells.

Keywords cervical cancer; *TPX2*-shRNA; lentivirus; cell apoptosis; cell invasion

Xklp2靶蛋白(targeting protein for Xklp2, *TPX2*)是一种受细胞周期严格调控的微管相关蛋白,对细胞有丝分裂过程中纺锤体的形成及稳定性的维持具有极其重要作用^[1]。*TPX2*的表达异常与人类恶性肿瘤的发生发展具有极其重要的关系^[2]。本课题组前期研究证实,*TPX2*在宫颈癌组织中表达率明显增高,其表达强度与肿瘤的分期、病理分级、淋巴结转移密切相关^[3]。为进一步研究*TPX2*在宫颈癌发生发展中的作用,本实验借助慢病毒介导的RNAi重组载体,对*TPX2*基因进行RNA干扰,筛选出了稳定沉默*TPX2*基因的宫颈癌细胞株,研究*TPX2*基因对宫颈癌细胞凋亡及侵袭的影响并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂

人宫颈癌HeLa细胞株为本实验室保存;限制性内切核酸酶Agel、EcoR I和连接试剂盒购自NEB公司;慢病毒载体Pglv2U6Puro和包装质粒pGag/Pol、pRev、pVSV-G购自上海吉玛基因化学有限公司;逆转录试剂盒、质粒提取试剂盒购自Qiagen公司;RNA抽提试剂Trizol、转染试剂Lipofectamine 2000

购自Invitrogen公司;Real-time fluorescent quantitative PCR试剂盒、cDNA逆转录试剂盒购自Fermentas公司;细胞总蛋白抽提试剂盒BCA、蛋白质定量试剂盒、兔抗人*TPX2*抗体购自Abcam公司;Transwell小室购自Corning公司;Matrigel Basement Membrane Matrix购自BD公司;Caspase-3、Bcl-2、Bax、nm23-H1、MMP9、TIMP-1抗体均购自Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 *TPX2*-shRNA重组慢病毒载体及稳转细胞株的构建与筛选 以*TPX2*为靶点,成功构建了LV-*TPX2*-shRNA1/2/3/4及阴性对照(LV-NC)共5种重组慢病毒载体,并在HeLa细胞中筛选出稳转细胞株,实时荧光定量PCR和Western blot分别检测各组细胞*TPX2* mRNA和蛋白的沉默效果^[4]。筛选出沉默效果最佳的LV-*TPX2*-shRNA-1组做后续功能实验。遂设置空白对照组(Blank):未感染慢病毒载体的HeLa细胞;阴性对照组(LV-NC):感染阴性对照病毒的HeLa细胞;干扰组(LV-*TPX2*-shRNA-1):稳定感染LV-*TPX2*-shRNA-1病毒的HeLa细胞,进行后续功能实验。*TPX2*-shRNA-1及阴性对照核苷酸序列见表1。

1.2.2 流式细胞术(FCM)检测*TPX2*沉默前后HeLa细

表1 *TPX2*-shRNA-1及阴性对照核苷酸序列表

Table 1 *TPX2*-shRNA-1 and NC oligonucleotide sequence list

引物名称 Primer name	序列 Sequence
<i>TPX2</i> -shRNA-1	Forward: 5'-AAT TCA AAA AGC CTC AGA GAA GAT CTC TTA GCT CGA GCT AAG AGA TCT TCT CTG AGG C-3' Reverse: 5'-AAT TCA AAA AGC CTC AGA GAA GAT CTC TTA GCT CGA GCT AAG AGA TCT TCT CTG AGG C-3'
NC	Forward: 5'-CCG GTT CTC CGA ACG TGT CAC GTC TCG AGA CGT GAC ACG TTC GGA GAA TTT TTG-3' Reverse: 5'-AAT TCA AAA ATT CTC CGA ACG TGT CAC GTC TCG AGA CGT GAC ACG TTC GGA GAA-3'

胞凋亡的变化 将成功构建的3组细胞: 空白对照组(Blank)、阴性对照组(LV-NC)及干扰组(LV-TPX2-shRNA-1)培养72 h后, 用不含EDTA的胰蛋白酶消化细胞, 离心收集细胞, 微量离心机2 000 r/min离心5 min, 弃培养基。用冷PBS洗涤细胞2遍(2 000 r/min离心5 min), 收集细胞。用400 μ L的binding buffer重悬细胞。在细胞悬液中避光加入5 μ L AnnexinV-FITC染液, 4 $^{\circ}$ C反应15 min。反应后再避光加入10 μ L的PI混匀, 4 $^{\circ}$ C反应5 min。在1 h内用FCM检测。

1.2.3 Transwell小室基底膜侵袭实验检测TPX2沉默前后HeLa细胞侵袭能力的变化 将冻存于-20 $^{\circ}$ C的BD matrigel置于4 $^{\circ}$ C融化开, 和无血清培养基按1:4稀释, 加入Transwell上室各30 μ L, 在37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育过夜。收集各组细胞, 血球计数板计数, 使细胞密度为 10^4 /mL, 向Transwell上室每孔加入100 μ L细胞悬液。24孔板下室中加入500 μ L含15% FBS的DMEM培养基, 正常培养48 h。弃去滤膜上、下室的培养液, 用棉球擦去上表面未侵袭的细胞, 向下室加入500 μ L PBS, 轻轻敲打PBS达到清洗滤膜下表面的作用, 重复一次。然后向下室加入4%多聚甲醛500 μ L, 使滤膜下表面浸在其中固定细胞, 固定20 min, 弃去固定液, 倒置Transwell小室, 使滤膜下表面朝上, 自然风干。风干后直接在倒置的Transwell小室的滤膜下表面滴上数滴结晶紫染液, 作用30 min; PBS清洗1遍, 并在倒置显微镜下观察拍照计数。

1.2.4 Western blot检测TPX2基因沉默前后HeLa细胞中凋亡及侵袭相关蛋白质的水平 在收取的各组细胞沉淀中加入细胞裂解液, 10 000 r/min离心10 min, 取30 μ L上清, 加入10 μ L 4 $\times$ SDS loading buffer, 100 $^{\circ}$ C加热处理10 min。12 000 r/min离心1 min, 取上清上样。BCA蛋白试剂盒测定样品蛋白含量。样品使用8% SDS-PAGE电泳分离, 每孔上样量为20 μ g。条件为浓缩胶电泳80 V 30 min, 分离胶电泳120 V 70 min。转膜至PVDF膜, 电压为80 V, 用时90 min。封闭液

封闭转印膜1 h。加入稀释好的一抗, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。用1 $\times$ PBST洗涤3次, 每次10 min。加入稀释好的二抗, 室温孵育1 h。用1 $\times$ PBST洗涤3次, 每次10 min。用ECL底物进行化学发光检测, 并对X光片曝光。经显影定影处理后, 胶片用扫描仪扫描, 并使用Gel-Pro analyzer软件进行灰度分析定量。

1.2.5 统计学分析 用SPSS 15.0统计软件, 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

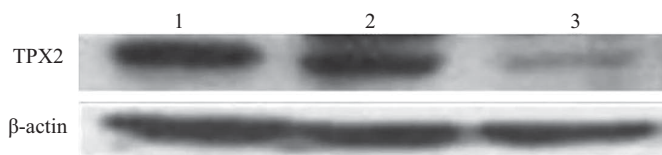
2 结果

2.1 TPX2-shRNA-1重组慢病毒载体及稳转细胞株的构建与筛选

测序结果证实, 5种慢病毒载体均包装成功, 采用0.4 μ g/mL嘌呤霉素成功筛选出TPX2沉默细胞株。实时荧光定量PCR显示, 感染LV-TPX2-shRNA-1的HeLa细胞, TPX2 mRNA相对水平为(0.21 $\pm$ 0.07), 与空白对照组(1.08 $\pm$ 0.07)与阴性对照组(1.04 $\pm$ 0.06)相比较均有统计学意义($P<0.01$)。Western blot结果显示, 感染LV-TPX2-shRNA-1的HeLa细胞, TPX2蛋白质相对水平为0.19 $\pm$ 0.28, 与空白对照组(0.64 $\pm$ 0.03)及阴性组(0.68 $\pm$ 0.66)比较有统计学意义($P<0.01$), 其蛋白质水平表达下调(69.11% $\pm$ 0.05%)。而空白组与阴性组比较无统计学差异($P>0.05$)(图1)。

2.2 重组慢病毒LV-TPX2-shRNA-1感染HeLa细胞前后细胞凋亡的变化

用流式细胞术测定空白对照组(Blank)、阴性对照组(LV-NC)及干扰组(LV-TPX2-shRNA-1)细胞凋亡情况。结果显示, 干扰组(LV-TPX2-shRNA-1)细胞的凋亡率为38.6% $\pm$ 1.28%, 阴性对照组的(LV-NC)细胞的凋亡率为23.27% $\pm$ 3.5%, 空白对照组(Blank)组细胞的凋亡率为22.46% $\pm$ 3.70%, 干扰组与空白对照组及阴性对照组比较细胞凋亡率均明显增加($P<0.05$)。阴性对照组(LV-NC)和空白对照组(Blank)



1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: 干扰组。

1: blank group; 2: LV-NC group; 3: LV-TPX2-shRNA-1 group.

图1 Western blot检测重组慢病毒LV-TPX2-shRNA-1感染HeLa细胞前后TPX2蛋白质水平

Fig.1 Effect of LV-TPX2-shRNA-1 on the level of TPX2 protein in HeLa cells detected by Western blot

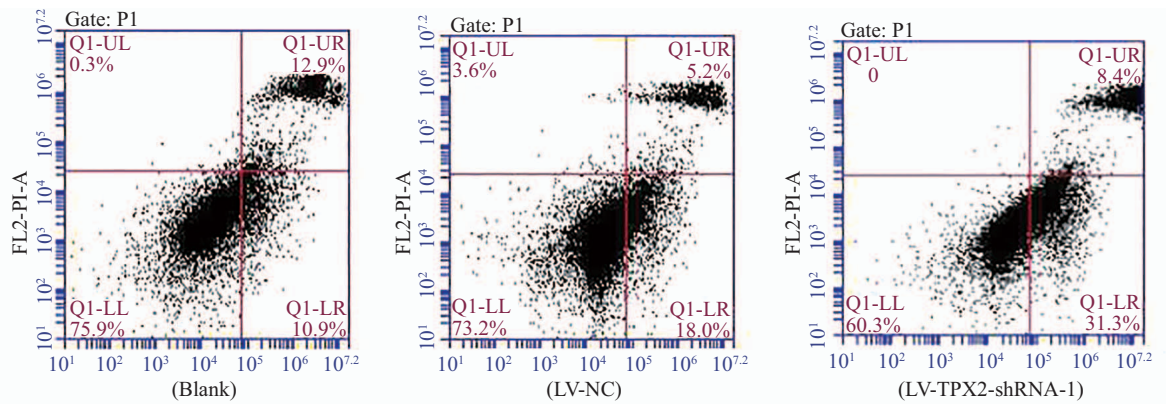


图2 流式细胞术检测 $TPX2$ -shRNA-1对HeLa细胞凋亡的影响

Fig.2 Effect of $TPX2$ -shRNA-1 on apoptosis in HeLa cells detected by FCM

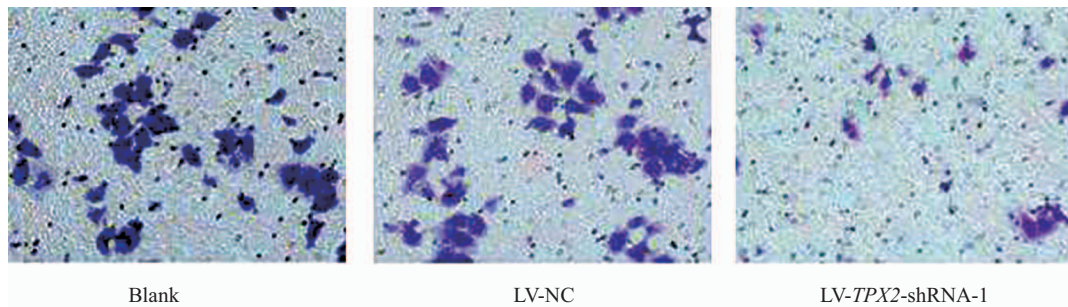


图3 Transwell基底膜侵袭实验检测 $TPX2$ 对HeLa细胞侵袭的影响(40×)

Fig.3 Effect of $TPX2$ on cell invasion in HeLa cells detected by Transwell (40×)

相比较,无统计学差异($P>0.05$)(图2)。

2.3 重组慢病毒LV- $TPX2$ -shRNA-1对HeLa细胞侵袭的影响

应用Transwell小室基底膜侵袭实验法测定空白对照组(Blank)、阴性对照组(LV-NC)及干扰组(LV- $TPX2$ -shRNA-1)细胞侵袭情况,结果显示,干扰组(LV- $TPX2$ -shRNA-1)侵袭穿过基底膜细胞数为 15.00 ± 3.00 个,低于阴性对照组(LV-NC) 39.00 ± 3.65 个及空白对照组(Blank) 38.33 ± 2.51 个($P<0.05$)。空白对照组(Blank)与阴性对照组(LV-NC)比较,无统计学差异($P>0.05$)(图3)。

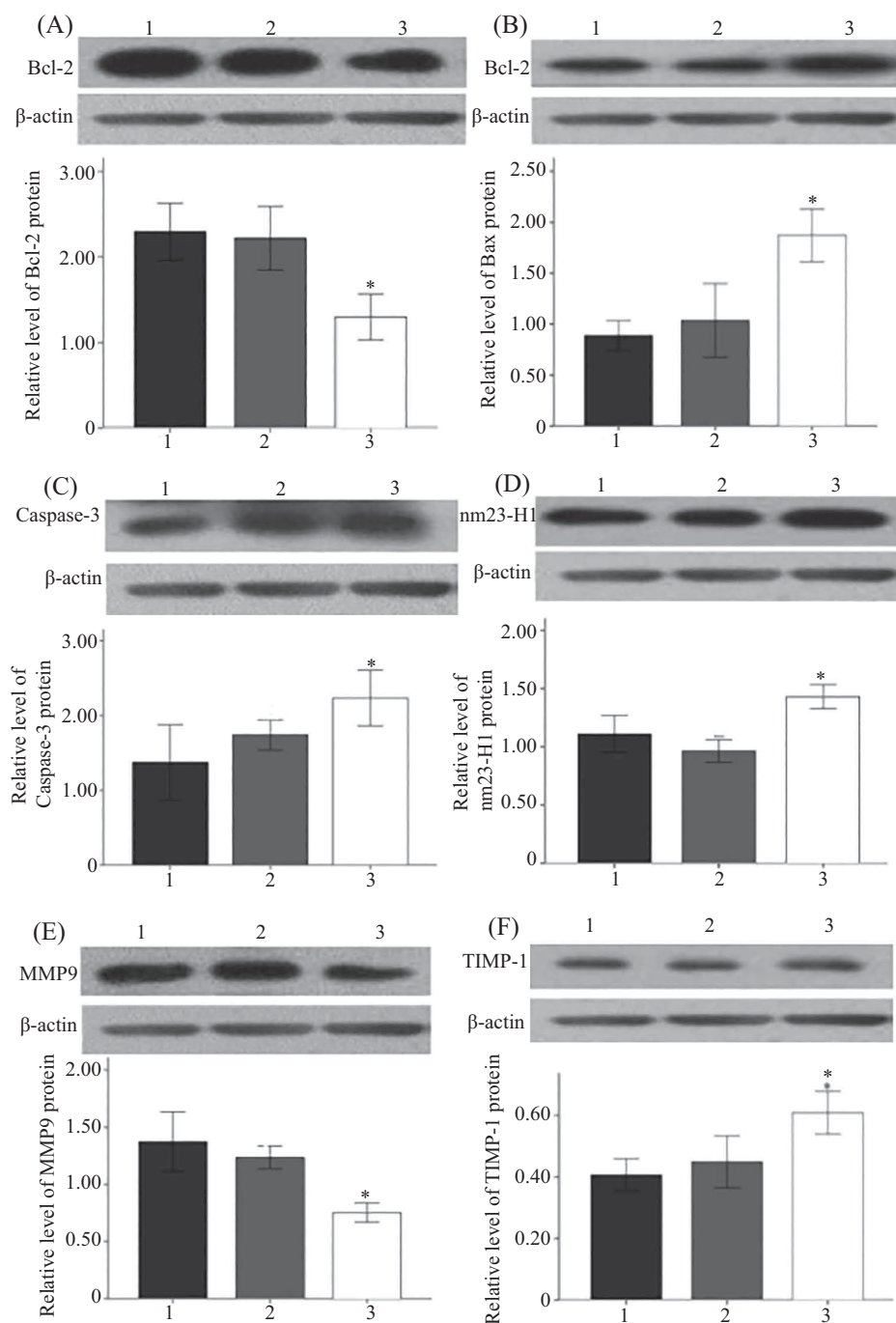
2.4 重组慢病毒LV- $TPX2$ -shRNA-1感染HeLa细胞前后凋亡及侵袭相关蛋白质水平的变化

Western blot方法检测空白对照组(Blank)、阴性对照组(LV-NC)及干扰组(LV- $TPX2$ -shRNA-1)细胞中各蛋白的表达,结果显示, LV- $TPX2$ -shRNA-1组细胞中Bcl-2及MMP9蛋白均明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。LV- $TPX2$ -shRNA-1组细胞中Bax、Caspase-3、TIMP-1及nm23-H1蛋白明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)(图4)。

3 讨论

$TPX2$ 是一种受细胞周期严格调控的核增殖相关蛋白质,对细胞有丝分裂过程中纺锤体的形成及稳定性的维持具有极其重要作用^[1,5]。体内、外实验表明, $TPX2$ 基因的过表达能导致细胞中心体扩增,出现DNA多倍体及异倍体^[2]。 $TPX2$ 基因的异常表达与人类许多恶性肿瘤的发生、发展关系密切。有研究证实, $TPX2$ 基因在胰腺癌、肺鳞癌、宫颈癌、食管癌、膀胱癌及乳腺癌等多种肿瘤中都存在过表达现象,其表达强度与肿瘤的恶性程度相关^[6-11]。本课题组前期研究也证实, $TPX2$ 在宫颈癌组织中表达率明显增高,其表达强度与肿瘤的分期、病理分级、淋巴结转移密切相关^[8]。

本研究主要探讨 $TPX2$ 对宫颈癌细胞凋亡及侵袭的影响,以 $TPX2$ 基因为靶点,设计并合成4组对应于目标shRNA的双链DNA发卡结构,构建4种载有 $TPX2$ -shRNA的重组慢病毒及其阴性对照,将5种重组慢病毒分别稳定感染人宫颈癌HeLa细胞,利用实时荧光定量PCR和Western blot筛选出 $TPX2$ 沉默效果最佳的一组HeLa细胞作为干扰组进行后续实



A: Bcl-2蛋白质在各组HeLa细胞中的表达; B: Bax蛋白质在各组HeLa细胞中的表达; C: Caspase-3蛋白质在各组HeLa细胞中的表达; D: nm23-H1蛋白质在各组HeLa细胞中的表达; E: MMP9蛋白质在各组HeLa细胞中的表达; F: TIMP-1蛋白质在各组HeLa细胞中的表达。1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: 干扰组。* $P < 0.05$, 与1和2组比较。

A: the levels of Bcl-2 protein in HeLa cells in various groups; B: the levels of Bax protein in HeLa cells in various groups; C: the levels of Caspase-3 protein in HeLa cells in various groups; D: the levels of nm23-H1 protein in HeLa cells in various groups; E: the levels of MMP9 protein in HeLa cells in various groups; F: the levels of TIMP-1 protein in HeLa cells in various groups. 1: Blank group; 2: LV-NC group; 3: LV-TPX2-shRNA-1 group. * $P < 0.05$ vs 1 and 2 groups.

图4 各组HeLa细胞中凋亡及侵袭相关蛋白质水平

Fig.4 The levels of proteins associated apoptosis and invasion in HeLa cells in various groups

验。实时荧光定量PCR和Western blot实验显示, 筛选出的RNA干扰慢病毒载体LV-TPX2-shRNA-1可有效抑制HeLa细胞TPX2的表达, TPX2 mRNA和蛋白

质的水平明显受到抑制, 表明RNA干扰慢病毒载体LV-TPX2-shRNA-1构建成功。FCM检测各组细胞的凋亡情况显示, HeLa细胞感染慢病毒载体LV-TPX2-

shRNA-1后,细胞凋亡率明显增加。为了进一步阐明其细胞凋亡的分子机制,本文检测了与细胞凋亡密切相关蛋白质Bcl-2、Caspase-3和Bax的水平。结果表明,HeLa细胞被有效沉默TPX2表达后,Caspase-3及Bax的水平升高,Bcl-2的水平发生下降现象,提示TPX2表达下调介导的细胞凋亡与Caspase-3和Bax蛋白的表达的上升及Bcl-2表达的下调密切相关。有研究者在肺腺癌上皮细胞沉默TPX2基因表达后,其凋亡率明显增加且Bcl-2表达降低,与本研究结果类似^[12]。Bcl-2、Bax及Caspase-3是细胞凋亡中最重要的调控基因,Bcl-2为细胞凋亡抑制因子,Bax为凋亡促进因子^[13],Caspase-3是细胞凋亡早期阶段激活的关键蛋白酶,在细胞凋亡过程中起中心环节作用,故也被称为死亡蛋白酶,是目前已知的凋亡最后执行因子^[14]。激活的Caspase-3可裂解相应的胞核内底物,使其失去对DNA修复功能,导致细胞转向凋亡。Caspase-3在正常宫颈上皮、CIN(宫颈上皮内瘤变,相当于宫颈癌前病变)及宫颈鳞癌中的阳性表达率呈逐渐递减趋势,提示Caspase-3的低表达与宫颈癌的发生有关,具有促进宫颈上皮细胞损伤恶性转化的作用^[15]。Bax在正常宫颈组织表达高于癌组织,提示正常宫颈组织通过促凋亡来机制来保护自身组织的异常增生,从而避免肿瘤的发生;在癌组织中低表达使得细胞增殖不能有效控制,细胞凋亡减少,异常细胞恶性转化致使肿瘤发生。Bcl-2和Bax形成同源或异源二聚体,调控细胞的凋亡过程。当Bax在细胞内超表达时,Bax/Bax同源二聚体的数量明显增多,细胞对死亡信号的反应性增强,启动凋亡,而当Bcl-2高表达时,则Bcl-2/Bax异源二聚体对抗其诱导凋亡的作用,使细胞存活期延长,因此,细胞内这两种对立蛋白间的比率关系是决定细胞存亡的关键。Bcl-2及Bax作为Caspase-3的上游调控因子,Bcl-2过表达可抑制Caspase-3的活化,阻断细胞凋亡过程,Bax过表达,可激活Caspase-3,启动Caspase-3级联反应,促进凋亡^[16]。细胞凋亡是维持器官正常发育和细胞数量动态平衡、清除衰老细胞及其他损伤细胞的一个关键过程,也是抑制细胞增殖的一个重要原因。本研究抑制TPX2基因的表达后,促进宫颈癌HeLa细胞凋亡的发生,同时也导致抗凋亡蛋白Caspase-3、Bcl-2表达下调,促凋亡蛋白Bax表达上调,表明下调TPX2基因表达可诱导凋亡发生,抑制细胞增殖,使下调TPX2参与宫颈癌的治疗成为一种

可能。TPX2在肿瘤细胞核中的高表达与肿瘤细胞的侵袭能力密切相关^[11]。因此提出通过降低TPX2的表达来达到降低肿瘤细胞侵袭能力的构想。为了阐明这个问题,我们采用Transwell小室基底膜侵袭实验研究TPX2对HeLa细胞侵袭能力的影响,结果发现,HeLa细胞感染慢病毒载体LV-TPX2-shRNA-1后,穿过Transwell小室基底膜细胞明显减少($P<0.01$),且上调了侵袭相关蛋白nm23-H1及TIMP-1的表达水平,下调了MMP9的表达水平($P<0.05$)。MMP9可以降解细胞外环境中的蛋白质、破坏肿瘤细胞侵袭的体内屏障,导致肿瘤细胞侵袭转移至其他部位^[17]。TIMP-1则是MMP-9的抑制物,可以抑制肿瘤的侵袭转移^[18]。nm23-H1是一种肿瘤转移抑制基因,其基因的蛋白产物酶参与体内三磷酸核苷的生成,在细胞分化中参与微管的集合以及G蛋白介导的信号传递过程,使肌球蛋白轻链磷酸化而抑制细胞迁移,诱导凋亡,抑制分化,影响细胞的活动、黏连和附着,从而抑制细胞的侵袭和转移^[19]。本文研究结果提示,在HeLa细胞有效沉默TPX2的表达后,细胞的侵袭能力显著降低,可能与nm23-H1及TIMP-1表达的上升和MMP9表达的下降相关。

总而言之,沉默TPX2表达能增加宫颈癌细胞的凋亡,可能与其上调Caspase-3及Bax水平,下调Bcl-2水平有关;沉默TPX2表达能抑制其侵袭能力,可能与其上调TIMP-1及nm23-H1水平,下调MMP9的水平有关。

参考文献 (References)

- 1 Perez de Castro I, Malumbres M. Mitotic stress and chromosomal instability in cancer: the case for TPX2. *Genes Cancer* 2012; 11: 721-30.
- 2 刘万伟, 李恩亮, 郭林泉. TPX2在细胞间期参与DNA损伤反应及其与肿瘤发生关系的研究进展. 广东医学(Liu Wanwei, Li Enliang, Guo Linquan. TPX2 involved in the DNA damage response in the interphase of the cell and its relationship with tumor research progress. *Guangdong Medical Journal*) 2016; 37(4): 1245-7.
- 3 常海平, 王敬芝, 田原, 徐杰, 程建新. TPX2在宫颈癌中的表达及意义. 基础医学与临床(Chang Haiping, Wang Jingzhi, Tian Yuan, Xu Jie, Cheng Jianxin. Expression of TPX2 in cervical carcinoma and its significance. *Basic and Clinical Medicine*) 2012; 32: 561-5.
- 4 常海平, 宋淑芳, 任杰. 靶向TPX2基因shRNA慢病毒载体的构建及鉴定. 基础医学与临床(Chang Haiping, Song Shufang, Ren Jie. Construction and identification of shRNA Lentiviral vector targeting TPX2 gene. *Basic and Clinical Medicine*) 2017; 37(7): 945-52.

- 5 Iyer J, Tsai MY. A novel role for TPX2 as a scaffold and co-activator protein of the chromosomal passenger complex. *Cell Signal* 2012; 24(8): 1677-89.
- 6 Yan L, Li S, Xu C. Target protein for Xklp2 (*TPX2*), microtubule-related protein, contributes to malignant phenotype in bladder carcinoma. *Tumour Biol* 2013; 34(6): 4089-100.
- 7 Hsu PK, Chen HY, Yeh YC. TPX2 expression is associated with cell proliferation and patient outcome in esophageal squamous cell carcinoma. *J Gastroenterol* 2014; 49(8): 1231-40.
- 8 Chang H, Wang J, Tian Y. The TPX2 gene is a promising diagnostic and therapeutic target for cervical cancer. *Oncol Rep* 2012; 27(5): 1353-9.
- 9 Ma Y, Lin D, Sun W. Expression of targeting protein for xklp2 associated with both malignant transformation of respiratory epithelium and progression of squamous cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(4): 1121-7.
- 10 Warner SL, Stephens BJ, Nwokenkwo S. Validation of *TPX2* as a potential therapeutic target in pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2009; 15(21): 6519-28.
- 11 张春梅, 李 敏, 周仕娴. 乳腺癌组织中TPX2蛋白的表达及其临床意义. 临床与实验病理学杂志(Zhang Chunmei, Li Min, Zhou Shixian. Expression of TPX2 in breast cancer tissue and their clinical significances. *Clin Exp Pathol*) 2015; 31(5): 528-31.
- 12 刘 莹, 张 徽, 唐 熹. 短发夹RNA靶向沉默TPX2基因促进人肺腺癌A549细胞凋亡及其相关机制. 肿瘤(Liu Ying, Zhang Hui, Tang Xi. TPX 2 gene-targeted short hairpin RNA induces the apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells and its related mechanism. *Tumor*) 2011; 31(12): 1055-60.
- 13 黄 维, 陈洁仪, 黄俊勇, 周成勇. TRPM8对人脑胶质瘤细胞U251细胞凋亡和细胞增殖的影响. 热带医学杂志(Huang wei, Chen jieyi, Huang junyong, Zhou Chenyu. Effect of TRPM8 on proliferation and apoptosis of human brain gliomacell U251. *Journal of Tropical Medicine*) 2015; 15(2): 203-6.
- 14 Huang Q, Li F, Liu X. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell re-population during cancer radiotherapy. *Nat Med* 2011; 17: 860-6.
- 15 贾万钧, 曹学全, 甘梅富, 张亚斌. 宫颈病变中凋亡调控基因TRAIL及Caspase-3表达与HPV感染的相关性研究. 中华医院感染学杂志(Jia Wanjun, Cao Xuequan, Gan Meifu, Zhang Yabin. Relationship between expression of apoptosis regulatory genes of TRAIL and Caspase-3 in cervical lesions and HPV infection. *Chinese Journal of Nosocomiology*) 2011; 21(22): 4677-9.
- 16 Q Li, Guo YL, Z Li, Xu XY. The interference of picroside II on the expressions of Caspase-3 and PARP following cerebral ischemia reperfusion injury in rats. *Chin Pharmacol Bull* 2010; 26(3): 342-5.
- 17 董雅洁, 高维娟. bcl-2、bax、caspase-3在细胞凋亡中的作用及其关系. 中国老年学杂志(Dong Yajie, Gao Weijuan. The roles of BCL-2, bax and caspase-3 in the apoptosis and their relationships. *Chinese Journal of Gerontology*) 2012; 32(11): 4828-30.
- 18 Pytliak M, Vargová V, Mechírová V. Matrix metalloproteinases and their role in oncogenesis: a review. *Onkologie* 2012; 35: 49-53.
- 19 Hartsough MT, Morrison DK, Salerno M. Nm23-H1 metastasis suppressor phosphorylation of kinase suppressor of Ras via a histidine protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 32389-99.