

· 基础研究 ·

ANLN在肝内胆管癌中的表达及对胆管癌细胞增殖的影响

李仁宝^{1,2}, 余书勇², 钱晓峰¹¹南京医科大学第一附属医院肝胆外科, 江苏 南京 210029; ²海南省肿瘤医院肝胆外科, 海南 海口 570100

[摘要] **目的:**探讨ANLN基因在肝内胆管癌组织中的表达情况以及在胆管癌细胞增殖中的作用及机制。**方法:**收集手术切除的40例肝内胆管癌患者癌组织及癌旁组织,采用RT-PCR、Western blot以及免疫组化的方法检测组织中ANLN mRNA和蛋白表达水平,比较ANLN在肝内胆管癌组织与癌旁组织中的表达差异,分析其与肿瘤分期及肿瘤大小的关系。使用小干扰RNA建立ANLN低表达HUCCT1细胞系,行CCK8、平板克隆以及流式细胞检测观察ANLN对胆管癌细胞体外增殖能力的影响。行String软件预测与ANLN相关的蛋白,行RT-PCR、Western blot方法检测两者间的相关性以及周期蛋白CyclinD1表达差异。**结果:**Western blot和RT-PCR显示ANLN在肝内胆管癌组织中高表达。临床数据分析显示ANLN的表达与肝内胆管癌患者的肿瘤大小及TNM分期密切相关,并且ANLN表达高的患者预后较差。利用小干扰RNA(siRNA)下调ANLN能有效抑制胆管癌细胞的增殖能力。Western blot实验证明下调ANLN导致周期蛋白Cyclin D1、Cyclin A表达明显减少。String预测ANLN与TPX2相关,经Western blot和RT-PCR得到验证。**结论:**ANLN可能通过TPX2调节肝内胆管癌细胞的增殖能力,促进肝内胆管癌的发展,这可为肝内胆管癌的治疗提供新靶点。

[关键词] 肝内胆管癌; ANLN; TPX2; 增殖**[中图分类号]** R735.8**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)01-026-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20190105

Expression of ANLN in intrahepatic cholangiocarcinoma and its effect on proliferation of cholangiocarcinoma cells

Li Renbao^{1,2}, Yu Shuyong², Qian Xiaofeng¹¹Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliate Hospital of NMU, Nanjing 210029; ²Department of Hepatobiliary Surgery, Hainan Cancer Hospital, Hankou 570100, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of ANLN in intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) and explored the function of ANLN in proliferation of ICC *in vivo*. **Methods:** We used the Western blot and real-time PCR (RT-PCR) to quantify the expression of ANLN in cancerous tissues and adjacent tissues of 40 patients with ICC. The differences in the expression of ANLN in ICC and the adjacent tissues of cancer were compared, and its relationship with tumor staging and tumor size was analyzed. ANLN low expression HUCCT1 cell lines were established using small interference RNA (siRNA). The cell proliferation was investigated by cell counting kit-8 assay (CCK-8), colony formation and cell cycle arrest. In addition, the proteins that regulate ANLN expression in CCA were selected by using String, and the relationship between them was verified by Western blot and RT-PCR. **Results:** The results of Western blot and RT-PCR revealed that ANLN was highly expressed in ICC tissues. Clinical data analysis showed that the expression of ANLN was closely related to the tumor size and TNM stage in patients with cholangiocarcinoma, and the prognosis of patients with high ANLN expression was poor. The reduction of ANLN by siRNA could effectively inhibit the proliferation ability of cholangiocarcinoma cells. Western blot showed that the reduction of ANLN led to a significant decrease in the expressions of periodic protein cyclin D1 and cyclin A. String showed that TPX2 may play a major role in the regulation of ANLN expression, Western blot and RT-PCR further validated the positive relationship between ANLN and TPX2. **Conclusion:** ANLN regulates the proliferation of cholangiocarcinoma cells, which promotes the development of ICC and provides a new target for the treatment of ICC.

[Key words] intrahepatic cholangiocarcinoma; ANLN; TPX2; proliferation

[Acta Univ Med Nanjing, 2019, 39(01):026-031]

肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)是一种起源于左右肝管汇合部以上胆管上皮细胞的恶性肿瘤,发病率约占胆管癌(cholangiocarcinoma, CCA)的8%,是仅次于肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的原发性肝脏恶性肿瘤^[1-2]。基于ICC的发病机制和生物学特性与肝外胆管癌和肝细胞癌不同,美国癌症联合委员会(AJCC)在2010年发布的第7版TNM分期系统中将ICC作为独立的胆道肿瘤进行分期和讨论^[3]。目前手术切除是公认的首选治疗手段,然而即便行根治性切除,ICC患者的5年无瘤生存率与5年总体生存率分别仅2%~39%和5%~56%^[4-5]。由于ICC起病相对隐匿,无明显临床表现,约2/3的患者在就诊时已处于晚期,失去了根治性手术的机会,据报道这部分缺乏有效治疗手段的患者生存期仅3个月^[6]。因此,对于ICC恶性进展密切相关的基因功能以及调控机制的深入研究有助于为ICC的个性化治疗和靶向药物使用提供帮助。

ANLN基因编码的Anillin蛋白是一种高度保守的肌动蛋白结合蛋白,主要在细胞有丝分裂中起重要作用^[7]。ANLN作为高度保守的多结构域蛋白,在胞质分裂过程中起到重要枢纽作用^[8]。近来研究证明ANLN在肿瘤的生长增殖中发挥重要作用。在乳腺癌中ANLN高表达患者预后不良,而ANLN的敲减导致衰老细胞增加,肿瘤细胞出现多核形态以及G2/M期阻滞^[9-10]。在另一项人非小细胞肺癌细胞中的研究发现,ANLN敲减导致细胞增殖和多核细胞数目明显抑制^[11]。然而,ANLN与ICC相关研究目前仍是空白,其具体作用机制和临床肿瘤学特征尚不明确。

因此,本课题组综合使用肿瘤基因组图谱(TCGA)分析ANLN的表达情况、String等预测ANLN的相关蛋白,结合本中心现有ICC组织标本,明确ANLN与ICC的临床相关性。通过体外功能实验以及通路验证明确ANLN在ICC中的作用机制。

1 对象和方法

1.1 对象

本研究使用的40对ICC标本及癌旁组织均取材于2009—2016年收治于南京医科大学第一附属医院行ICC根治术且术后病理诊断明确的患者。所有患者术前均未进行放化疗,术后病理根据美国癌症联合委员会的标准由2名病理科专家独立诊断。所有组织标本离体后立即保存于液氮中,进入肿瘤

组织库。所有受试者及家属已被告知并签署知情同意书,且该研究获得南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准。术后随访由南京医科大学第一附属医院肝胆中心随访人员负责,随访重点为患者术后结局(存活、复发、死亡)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

通过在线软件 FireBrowse (<http://firebrowse.org/>)分析ANLN在TCGA数据库中各肿瘤组织的表达情况,通过在线软件String10.0(<https://string-db.org/cgi/input.pl>)预测分析ANLN可能的相关蛋白。

1.2.2 实时定量PCR

按试剂盒步骤提取总RNA,测定浓度及纯度,逆转录为cDNA后应用ABI7500定量PCR仪进行实时定量PCR实验,在避光条件下,将0.2 μL上游引物,0.2 μL下游引物,5 μL SYBR Green,以及3.6 μL无RNA酶的ddH₂O,与cDNA溶液1 μL配制成10 μL体系。经第一阶段95℃5min;第二阶段95℃30s,55℃30s,72℃60s,持续40个循环;第三阶段72℃7min的反应后,检测荧光。β-actin为内参,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (C_t代表循环阈值)表示ANLN基因在胆管癌组织中的相对表达量。引物序列见表1,实验重复3次。

表1 PCR引物序列

Table 1 The primer sequence of target gene

基因名	引物序列(5'→3')
ANLN	F: AGTAAGTGGGATCGAAGCCT
	R: CTCAAGGACTCGAATTTCTCCA
β-actin	F: GCATCGTCAC CAACTGGGAC
	R: ACCTGGCCGT CAGGCAGCTC

1.2.3 免疫印迹实验

收集培养细胞和组织,加入裂解液提取总蛋白,用BCA法行目标蛋白定量,上样量为10 μL,裂解物12 000 r/min离心5 min,取上清煮沸5 min使蛋白变性,而后上样电泳,再将蛋白转到PVDF膜上。将PVDV膜封闭后放进一抗:ANLN(1:800), Cyclin D1, Cyclin A(1:1 000), TPX2(1:1 000), GAPDH(1:2 000), 4℃过夜,二抗37℃孵育2 h,洗膜,行ECL法发光。通过凝胶分析系统ImageJ扫描目的条带和内参的灰度值。

1.2.4 免疫组织化学染色

将石蜡包埋的ICC样品切成4 μm厚切片,

37℃下干燥过夜,二甲苯脱蜡2次,持续10 min,并通过梯度乙醇再水化5次,持续5 min,3%过氧化氢15 min以阻断内源性过氧化物酶。切片在乙二胺四乙酸(EDTA)缓冲液(pH=8.0)中煮沸3 min以回收抗原。与10%正常山羊血清在室温下孵育30 min以减少非特异性反应。切片与抗ANLN一抗孵育过夜,再以室温的二抗孵育1 h。在室温下加入新鲜制备的DAB底物溶液5 min后检测信号。最后,切片用苏木精复染,脱水并固定。根据染色强度评分(无染色,0分;弱染色,1分;中度染色,2分;强染色,3分),按表达程度评分(<25%,1分;25%~<50%,2分;50%~<75%,3分;≥75%,4分)。最终免疫反应性评分(IRS)定义为强度评分×程度评分。

1.2.5 细胞培养与转染

胆管癌细胞株 HUCCT1 购于中科院上海细胞库,在CO₂浓度为5%、37℃恒温细胞培养箱中,以含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM培养基培养。取对数生长期的胆管癌细胞接种于6孔板中(约2×10⁶个/孔)继续培养24 h,确保细胞密度>80%后进行转染。转染步骤及剂量参照说明书。将转染 ANLN siRNA (GenePharma 公司,上海)的细胞作为实验组(si1、si2),转染 control siRNA 的细胞作为对照组(NC)。

1.2.6 CCK8 增殖实验

取对数生长期 siRNA 组和 NC 组 HUCCT1 细胞以1 000个/孔的密度接种在96孔板中,第2天细胞贴壁后,每组取5孔,于避光环境中按每孔配制90 μL无血清无双抗的培养基和10 μL CCK-8 混合液替换原培养基,于培养箱中孵育2 h后,用酶标仪测定450 nm处吸光度。每天检测1次,共计6 d。Graphpad Prism 软件根据所得吸光度数据绘制生长曲线。

1.2.7 细胞周期检测

取对数生长期 siRNA 组和 NC 组 HUCCT1 细胞, PBS 洗涤2遍,胰酶消化后放入离心管,1 000 r/min 离心5 min 弃去上清;加入1.5 mL 预冷 PBS,1 000 r/min 离心5 min,弃去上清;然后加入1.5 mL 预冷 PBS,轻轻震荡后加入3 mL 预冷无水乙醇,4℃固定30 min,1 000 r/min 离心5 min,弃去 PBS、无水乙醇和细胞悬液内的细胞碎片;吸除离心管内残余 PBS,加入200 μL PBS 和2 μL 的 RNA 酶(0.25 mg/mL);于室温、避光条件下加入0.5 mL 50 μg/mL 的碘化丙啶(PI)溶液染色30 min;流式细胞仪检测,检测前先轻摇试管,充分摇匀细胞,让流动室内充满鞘液,使喷嘴中心喷出单列细胞,形成细胞液柱;激光照射到

液柱上,激发细胞上的荧光染料产生荧光(488 nm 激发光源);经软件处理输出结果。

1.2.8 克隆形成实验

取对数生长期 siRNA 组和 NC 组 HUCCT1 细胞,胰酶消化离心重悬细胞;每组各取3个10 mL 的培养皿,分别接种500、1 000、2 000个细胞,晃动培养皿使细胞分散均匀。置于37℃含5% CO₂及湿度饱和的细胞培养箱中培养2~3周;观察细胞,肉眼能看到明显克隆时终止培养,弃上清,PBS 清洗2次,于冰甲醇中固定30 min,然后用 PBS 洗净培养皿,于结晶紫中染色30 min,PBS 洗涤,空气干燥;显微镜(低倍镜)观察,计数大于50个细胞的克隆数。

1.3 统计学方法

软件 SPSS22.0 用于统计学分析,作图软件为 Adobe Illustrator CS5。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立 *t* 检验分析两组间差异;免疫组化结果以阳性率表示,Pearson χ^2 检验分析临床样本 mRNA 表达量与临床资料之间的相关性。Kaplan-Meier 法分析样本 mRNA 表达量与预后的关系。采用 Pearson 相关分析检验 ANLN 与 TPX2 表达之间的相关性。所有实验均独立重复3次, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ANLN 在肝内胆管癌中高表达

ANLN 的表达已经被证实和多种肿瘤的发生发展相关。为了解 ANLN 在人类肿瘤中表达的总体情况,我们通过在线软件(FireBrowse)汇总 TCGA 数据库中相关数据发现,ANLN 在几乎所有在列的人类恶性肿瘤中皆为高表达(图1A)。进而我们分析了在本院收集的 ICC 组织和相应癌旁组织中 ANLN 的表达情况,通过 qPCR 验证发现在本院40例有完整随访记录以及病理明确诊断的 ICC 组织中,ANLN 表达量明显高于癌旁组织(图1B)。通过 PCR 结果选取表达差异最明显的4对 ICC 组织行 Western blot 检测,发现在蛋白水平上,肿瘤中 ANLN 表达也明显高于癌旁组织(图1C),其差异有统计学意义。进一步免疫组化染色结果也表明 ANLN 在 ICC 肿瘤组织中高表达(图1D)。

2.2 ANLN 高表达的患者预后较差

把 ANLN 的表达情况与 ICC 组织临床病理资料进行相关性分析(表2),根据 ANLN mRNA 的表达量是否高于中位数将其分为 ANLN 高表达及低表达

组。结果显示:在ICC标本中,ANLN在肿瘤 ≥ 5 cm、TNM分期III+IV期的肿瘤组织中呈高表达($P < 0.05$)。提示ANLN在胆管癌中可能作为促癌基因促进胆管癌的生长及转移。同时对本院ICC患者的随访结果进行分析显示,ICC患者中ANLN表达量高的患者预后较差(图2)。

2.3 敲低ANLN的表达可抑制胆管癌细胞增殖

为进一步研究ANLN在胆管癌中发挥的作用,我们选择HUCCT1胆管癌细胞株作为研究对象,进行siRNA敲低转染。CCK-8(图3A)、平板克隆(图3B)用来评价敲低ANLN对胆管癌细胞增殖能力的影响,其结果显示敲低ANLN表达后,肿瘤的克隆形成和增殖能力明显下降。接着通过流式细胞仪检测细胞周期变化,结果显示ANLN敲低明显增加肿瘤细胞G1/S期阻滞,且差异有统计学意义(图3C)。结果显示:在HUCCT1细胞中敲低ANLN后,细胞增

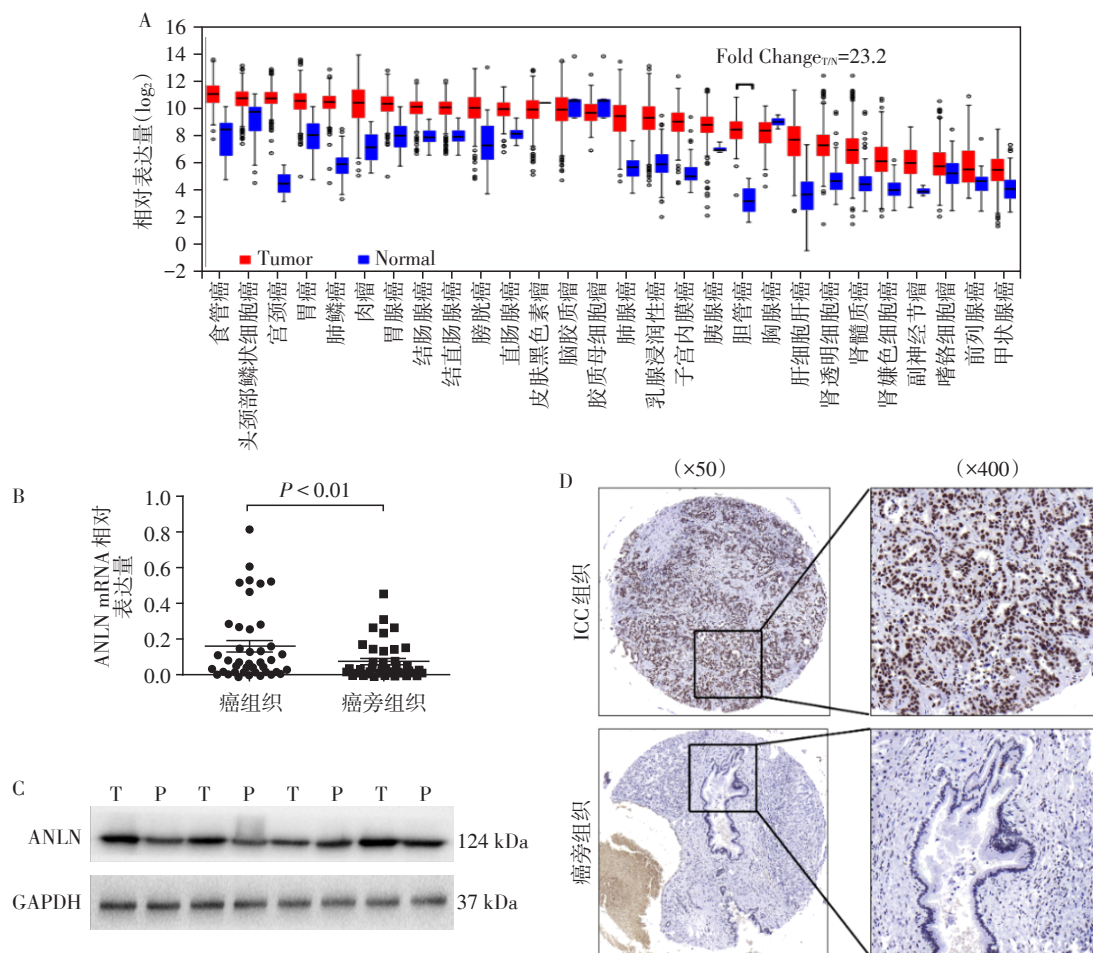
殖能力明显受到抑制。

2.4 ANLN对胆管癌细胞增殖的影响

通过String在线软件预测ANLN与TPX2存在相互作用关系(图4A)。经Western blot验证,发现ANLN敲低后,HUCCT1细胞中TPX2的表达也相应降低,与细胞周期相关的关键蛋白Cyclin D1、Cyclin A也相应降低(图4B)。为进一步明确ANLN与TPX2的相关性,我们对40例ICC肿瘤组织行qPCR检测,发现ANLN与TPX2存在正相关关系(图4C)。

3 讨论

ICC是原发性肝癌的一种,在病理形态学上,ICC可分为肿块型、管周浸润型和管内型3种亚型,其中肿块型最为常见,其比例 $>85\%$,各亚型存在不同的生长方式、影像学特点、生物学特性和疾病预后^[12]。此外,ICC存在起源、生物学特性和恶变机制



A:通过FireBrowse分析显示肿瘤中ANLN的表达水平明显高于相应正常组织表达;B:40对ICC患者肿瘤样本中ANLN mRNA水平表达明显高于相应癌旁组织;C:选取4对ICC患者肿瘤组织标本,行Western bolt检测ANLN蛋白表达(T:癌组织;P:癌旁组织);D:免疫组化染色结果提示ANLN在ICC肿瘤组织中表现为核内高表达。

图1 ANLN在肝内胆管癌中高表达
Figure 1 The high expression of ANLN detected in ICC

表2 肝内胆管癌患者ANLN表达与临床病理特征相关性分析
Table 2 Association between ANLN expression and clinicopathological parameters in 40 ICC specimens [n(%)]

临床参数	例数	ANLN		P值
		高表达	低表达	
性别				0.203
女	22	13(59.1)	9(40.9)	
男	18	7(38.9)	11(61.1)	
年龄(岁)				0.182
<60	19	8(42.1)	11(57.9)	
≥60	21	12(57.1)	9(42.9)	
肿瘤数目				0.518
1	24	11(45.8)	13(54.2)	
>1	16	9(56.2)	7(43.8)	
肿瘤大小(cm)				0.011
<5	22	7(31.8)	15(68.2)	
≥5	18	13(72.2)	5(27.8)	
病理分级				0.743
I+II	25	12(48.0)	13(52.0)	
III+IV	15	8(53.3)	7(46.7)	
静脉侵犯				0.735
无	27	14(51.9)	13(48.1)	
有	13	6(46.2)	7(53.8)	
TNM肿瘤分期				0.003
I+II	15	3(20.0)	12(80.0)	
III+IV	25	17(68.0)	8(32.0)	

的明显异质性,对治疗方式的选择及其预后具有重要影响。随着靶向治疗和个性化治疗的日益成熟,针对ICC疾病发生发展过程中的关键基因研究能为精准治疗提供可参考的依据。

ANLN最初被认为是一种肌动蛋白结合蛋白,位于染色体7p14.2,编码1125个氨基酸,包括1个保守的N端肌动蛋白和肌球蛋白结合区域、C端PH结构域,在胞质分裂中有重要作用^[13]。同时ANLN

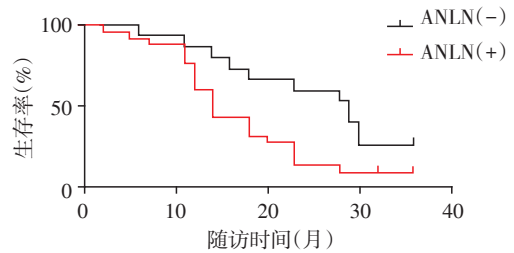


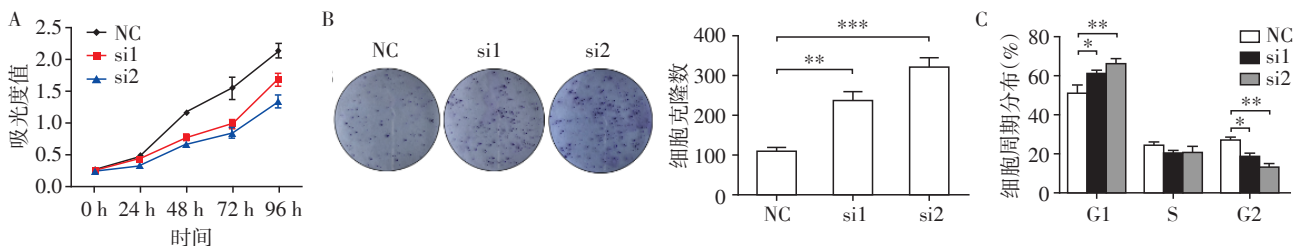
图2 ANLN高表达的患者预后较差

Figure 2 Upregulation of ANLN is associated with a poor prognosis in human ICC

与微管结构也存在密切联系。研究发现,ANLN在多种肿瘤中皆为高表达,尤其是在胰腺癌、乳腺癌、肺癌中表达显著^[7,14-15]。同时,过去相关研究发现ANLN的其他作用,包括调节肿瘤增殖、迁移以及参与多种调控通路影响恶性肿瘤的发生发展。所以它已被认为是几种对肿瘤预后有意义的特征基因之一。

Xklp2靶蛋白TPX2在细胞有丝分裂过程中具有重要作用,能够促进纺锤体微管形成,DNA损伤修复^[16-17]。以往大量研究证实:TPX2在多种肿瘤组织中高表达,例如胰腺癌、结肠癌等,并与肿瘤的分级、分期和淋巴结转移状态呈正相关,抑制TPX2表达可抑制肿瘤细胞生长^[18-19]。我们通过String在线软件预测ANLN与TPX2存在关联,实验结果证明ANLN与TPX2可能存在调控作用,这种联系也许与两者皆参与微管形成相关,其具体相互作用机制需要进一步研究证明。

本研究发现ANLN在ICC组织和细胞系中显著高表达,且ANLN高表达与ICC患者较差的预后密切相关。通过siRNA敲低ANLN在HUCCT1细胞中的表达,细胞增殖能力明显受抑制。同时,研究结果提示ANLN可能通过TPX2调节ICC的增殖能力,其具体相关机制还需要进一步研究。以上发现证明,ANLN在肝内胆管癌中扮演着促癌基因角色,可能主要参与肝内胆管细胞肿瘤的增殖能力。



A: CCK8检测细胞增殖能力;B: 平板克隆检测细胞的增殖能力;C: 使用流式细胞仪检测细胞周期。两组比较,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001。

图3 敲低ANLN的表达可抑制胆管癌细胞增殖

Figure 3 Knockdown of ANLN can inhibit the proliferation of CCA cells



A:使用在线软件String预测提示ANLN与TPX2存在相关性;B:通过Western blot检查ANLN、TPX2、Cyclin D1、Cyclin A表达。使用GAPDH作为内部对照进行每种蛋白质的定量;C:ICC肿瘤中ANLN与TPX2表达之间的相关性。

图4 ANLN对胆管癌细胞增殖的影响

Figure 4 Effects of ANLN on proliferation of CCA cells

[参考文献]

- [1] Khan SA, Taylor-Robinson SD, Toledano MB, et al. Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and pancreatic tumours [J]. *J Hepatol*, 2002, 37(6): 806-813
- [2] Khan SA, Toledano MB, Taylor-Robinson SD. Epidemiology, risk factors, and pathogenesis of cholangiocarcinoma [J]. *HPB(Oxford)*, 2008, 10(2): 77-82
- [3] Esnaola NF, Meyer JE, Karachristos A, et al. Evaluation and management of intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Cancer*, 2016, 122(9): 1349-1369
- [4] Mavros MN, Economopoulos KP, Alexiou VG, et al. Treatment and prognosis for patients with intrahepatic cholangiocarcinoma: systematic review and meta-analysis [J]. *JAMA Surg*, 2014, 149(6): 565-574
- [5] Nathan H, Pawlik TM, Wolfgang CL, et al. Trends in survival after surgery for cholangiocarcinoma: a 30-year population-based SEER database analysis [J]. *J Gastrointest Surg*, 2007, 11(11): 1488-1496
- [6] Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, et al. Cholangiocarcinoma [J]. *Lancet*, 2005, 366(9493): 1303-1314
- [7] Piekny AJ, Maddox AS. The myriad roles of anillin during cytokinesis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(9): 881-891
- [8] Oegema K, Savoian MS, Mitchison TJ, et al. Functional analysis of a human homologue of the *Drosophila* actin binding protein anillin suggests a role in cytokinesis [J]. *J Cell Biol*, 2000, 150(3): 539-552
- [9] den Hollander P, Savage MI, Brown PH. Targeted therapy for breast cancer prevention [J]. *Front Oncol*, 2013, 3: 250
- [10] Labrie F. Drug insight: breast cancer prevention and tissue-targeted hormone replacement therapy [J]. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2007, 3(8): 584-593
- [11] Suzuki C, Daigo Y, Ishikawa N, et al. ANLN plays a critical role in human lung carcinogenesis through the activation of RHOA and by involvement in the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(24): 11314-11325
- [12] Yamasaki S. Intrahepatic cholangiocarcinoma: macroscopic type and stage classification [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2003, 10(4): 288-291
- [13] Wu JQ, Kuhn JR, Kovar DR, et al. Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis [J]. *Dev Cell*, 2003, 5(5): 723-734
- [14] Olakowski M, Tyszkiewicz T, Jarzab M, et al. NBL1 and anillin (ANLN) genes over-expression in pancreatic carcinoma [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2009, 47(2): 249-255
- [15] Hall PA, Todd CB, Hyland PL, et al. The septin-binding protein anillin is overexpressed in diverse human tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(19 Pt 1): 6780-6786
- [16] Wiczorek M, Bechstedt S, Chaaban S, et al. Microtubule-associated proteins control the kinetics of microtubule nucleation [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(7): 907-916
- [17] Giubettini M, Asteriti IA, Scrofani J, et al. Control of Aurora-A stability through interaction with TPX2 [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 1): 113-122
- [18] Miwa T, Kokuryo T, Yokoyama Y, et al. Therapeutic potential of targeting protein for Xklp2 silencing for pancreatic cancer [J]. *Cancer Med*, 2015, 4(7): 1091-1100
- [19] Wei P, Zhang N, Xu Y, et al. TPX2 is a novel prognostic marker for the growth and metastasis of colon cancer [J]. *J Transl Med*, 2013, 11: 313

[收稿日期] 2018-09-28