

TTK对膀胱癌细胞增殖、凋亡、侵袭及迁移的影响

刘锦裕^{1*} 谢建兵¹ 谢锦来¹ 晏湘山¹ 李永生²

(¹莆田学院附属医院泌尿外科, 莆田 351100; ²福建医科大学附属协和医院泌尿外科, 福州 350001)

摘要 该研究探讨了苏氨酸和酪氨酸激酶(threonine and tyrosine kinase, TTK)在膀胱癌中的表达情况及其在膀胱癌细胞增殖、凋亡、侵袭及迁移中的作用。采用qRT-PCR和免疫组织化学分别检测TTK mRNA和蛋白在癌旁正常组织、非肌层浸润性膀胱癌组织、肌层浸润性膀胱癌组织中的表达水平; 将TTK过表达质粒、TTK敲除质粒借助脂质体分别稳定转染膀胱癌HT-1376细胞; 用qRT-PCR和Western blot检测转染后TTK mRNA和蛋白的表达情况; 应用CCK法和EdU方法检测细胞增殖活性; 流式细胞术检测细胞周期分布及凋亡情况; transwell小室法检测细胞侵袭、迁移能力。结果显示: TTK mRNA和蛋白在癌旁正常组织、非肌层浸润性膀胱癌组织、肌层浸润性膀胱癌组织中的表达水平逐渐升高, 3者之间差异有统计学意义($P<0.05$); 过表达TTK后, HT-1376细胞增殖能力增强, 细胞凋亡减少, 细胞体外侵袭和迁移能力增强; 而敲除TTK后, HT-1376细胞生长受抑制, 细胞周期阻滞在G₀/G₁期, 细胞凋亡率增加, 细胞体外侵袭和迁移能力减弱。该研究结果提示, TTK的表达与膀胱癌的发生、发展有关; TTK能促进膀胱癌HT-1376细胞的增殖、侵袭、迁移, 并抑制细胞凋亡。

关键词 苏氨酸和酪氨酸激酶; 膀胱癌; 细胞增殖; 凋亡; 侵袭

Effects of TTK on Proliferation, Apoptosis, Invasion and Migration of Bladder Cancer Cells

LIU Jinyu^{1*}, XIE Jianbing¹, XIE Jinlai¹, YAN Xiangshan¹, LI Yongsheng²

(¹Department of Urology, the Affiliated Hospital of Putian University, Putian 351100, China;

²Union Clinical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

Abstract The aim of this study was to explore the expression of TTK (threonine and tyrosine kinase) in bladder cancer tissues and the effect of TTK on the proliferation, apoptosis, invasion and migration of bladder cancer cells. qRT-PCR and immunohistochemistry were adopted to detect the expression of TTK mRNA and protein in paracancerous tissues, non-muscle-invasive bladder cancer tissues, and muscle-invasive bladder cancer tissues. TTK overexpression plasmid and TTK knockout plasmid were separately transfected into bladder cancer HT-1376 cells by lipofectamine. qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression of TTK mRNA and protein after transfection; CCK and EdU assays were conducted to detect cell proliferation activity. Flow cytometry was used to detect cell cycle and apoptosis. The cell invasion and migration ability were determined by transwell assay. The results showed that the expression levels of TTK mRNA and protein in paracancerous tissues, non-muscle-invasive bladder cancer tissues, and muscle-invasive bladder cancer tissues gradually increased, and the differences

收稿日期: 2020-04-18

接受日期: 2020-06-15

福建省教育厅中青年教师教育科研项目(批准号: JAT190559)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0594-2730379, E-mail: 273097870@qq.com

Received: April 18, 2020

Accepted: June 15, 2020

This work was supported by Young and Middle-Aged Teacher Education Research Project of Fujian Province (Grant No. JAT190559)

*Corresponding author. Tel: +86-594-2730379, E-mail: 273097870@qq.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5327>

among the three groups were statistically significant ($P < 0.05$). After overexpressing TTK, the proliferation ability of HT-1376 cells was enhanced, the cell apoptosis rate was reduced, and the migration and invasion abilities of the cells were enhanced. After knocking out *TTK*, the proliferation of HT-1376 cells was reduced, the cell cycle was blocked at the G_0/G_1 phase, the cell apoptosis rate was increased, and the cell migration and invasion abilities were attenuated. The results of this study suggested that the expression of TTK is related to the progression of bladder cancer. TTK can promote the proliferation, invasion and migration of bladder cancer HT-1376 cells and induce cell apoptosis.

Keywords threonine and tyrosine kinase; bladder cancer; cell proliferation; apoptosis; invasion

膀胱癌是泌尿外科临床上最常见的肿瘤之一,在全球,膀胱癌的发病率在所有恶性肿瘤里排第十位,在我国,男性膀胱癌的发病率在所有恶性肿瘤里排在第八位,在女性中位居第十位之后。男女发病率比例约为4:1^[1]。膀胱癌是一种严重威胁人类健康的疾病。膀胱癌的治疗方法以手术为主,此外还有放化疗、免疫治疗、靶向治疗等治疗方法,尽管膀胱癌治疗方法多种多样,但膀胱癌的5年复发率及死亡率仍居高不下^[2]。因此,寻找新的膀胱癌治疗方法或基因靶点已是当前膀胱癌研究的重点。

苏氨酸和酪氨酸激酶(threonine and tyrosine kinase, TTK)是蛋白激酶家族的主要成员之一,也被称为单极纺锤体1(monopolar spindle 1, Mps1),能够磷酸化丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸^[3]。它是有丝分裂纺锤体装配检查点(spindle assembly checkpoint, SAC)的主要成分,同时也作为主要调控者参与细胞周期多个方面的调控,能激活SAC并检测出错误的染色体以确保有丝分裂的顺利进行^[4-5]。近年来的研究发现,TTK在一些恶性肿瘤如乳腺癌^[6]、肝癌^[7]、肺癌^[8]等中的表达明显升高,能促进肿瘤细胞的增殖,且与肿瘤细胞的浸润和转移有关,但其表达是否与膀胱癌的进展有关,目前国内尚未有研究。本实验旨在研究TTK在膀胱癌组织和正常膀胱组织中的表达差异及其对膀胱癌细胞增殖、凋亡、侵袭及转移的影响,从而探讨TTK在膀胱癌发生、发展中的作用,为研发新的靶向药物提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

组织收集于2015年7月至2019年7月在莆田学院附属医院泌尿外科确诊为膀胱癌并进行手术的100例患者,其中男性70例,女性30例,年龄为35~78

岁,中位年龄为(52.5±7.4)岁。其中非肌层浸润性膀胱癌80例,肌层浸润性膀胱癌20例,取膀胱癌组织作为实验组,癌旁正常组织作为对照组(术后病理证实)。所取样本置于-80℃冰箱保存备用。人膀胱癌细胞HT-1376购于中国典型培养物保藏中心(武汉大学保藏中心)。本研究已通过莆田学院附属医院伦理委员会审核批准,并获得患者及家属知情同意。

1.2 主要试剂

免疫组织化学试剂盒购自中国福州迈新生物科技有限公司; Trizol、cDNA第一链合成试剂盒、转染试剂Lipofectamine 3000均购自美国Invitrogen公司; 引物由南京思普金科技有限公司合成; Western blot检测试剂盒、Annexin V-FITC试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司; TTK单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司; TTK过表达质粒、敲除质粒(TTKsi-1、TTKsi-2、TTKsi-3)购自江苏凯基生物技术有限公司; Transwell试剂盒购自美国Corning公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学 取非肌层浸润性膀胱癌组织、肌层浸润性膀胱癌组织和癌旁正常组织进行常规石蜡切片(连续切片3张),免疫组化步骤严格按照福州迈新免疫组化试剂盒说明书进行。结果判定方法见参考文献[9]。

1.3.2 qRT-PCR分析 用Trizol法提取总RNA,总cDNA的合成和PCR扩增参照试剂盒说明书进行。TTK引物序列:上游引物5'-CCG AGG ATT TAA GTG GCA GAG A-3',下游引物5'-CCC GAG TTA TCT GTA GTA TCA GCA-3';内参GAPDH引物序列:上游引物5'-TCA TTG ACC TCA ACT ACA TGG TTT-3',下游引物5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'。实验重复3次,各组织中TTK mRNA含量主要根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 大小判定。

1.3.3 细胞培养及转染 膀胱癌HT-1376细胞用含有10%胎牛血清的RPMI-1640培养液,于37℃、5%CO₂条件下培养。胰酶消化,培养2~3天传代。转染前24 h取对数生长长期的人膀胱癌HT-1376细胞,经胰酶消化后接种于6孔培养板,培养24 h后,用无血清的细胞培养液洗涤2次以备转染。将重组质粒通过Lipofectamine 3000阳离子脂质体介导分别转染至6孔板的HT-1376细胞中。转染72 h后收集细胞用于实验。根据转染质粒不同,实验分成过表达TTK组(HT-1376-TTK组)、过表达对照组(NC组)、敲除组(siTTK1组、siTTK2组、siTTK3组)、敲除对照组(siNC组)。

1.3.4 Western blot检测各组TTK蛋白的表达情况 以GAPDH为内参,实验步骤参照各试剂盒说明书,首先采用全蛋白抽提试剂盒提取各组细胞的总蛋白,用BCA检测法测定蛋白浓度,加入裂解液,制备SDS-PAGE凝胶,经电泳分离蛋白质,在恒压60 V下将蛋白质转移到PVDF膜上,用含5%脱脂牛奶的TBST缓冲液在室温下封闭1 h。然后加入TTK单抗(用TBST按1:500稀释)并在4℃冰箱孵育过夜,接下来将膜用TBST洗5次,再加入HRP标记的二抗在摇床上室温孵育1 h,洗涤后于暗室中显色,曝光显影。

1.3.5 CCK-8检测细胞增殖能力的变化 取对数生长长期的各组HT-1376细胞悬液(10⁵个/mL),接种于96孔板,培养1、2、3天,在3个时间点样本中分别加入10 μL的CCK-8溶液,继续在室温下培养4 h。用酶标仪在450 nm波长处检测每孔的光密度(D)值。实验重复3次,绘制生长曲线,以比较不同时间段3组细胞的生长情况。

1.3.6 EdU检测细胞增殖能力的变化 转染72 h后收集细胞,分组同上。按照EdU免疫荧光检测试剂盒说明书进行细胞染色,并于荧光显微镜下观察拍照,随机拍摄各组20个视野,分别计数EdU免疫荧光标记的增殖细胞数(绿色)与Hoechst33342标记的总细胞数目(蓝色),细胞增殖率=增殖细胞数目/总细胞数目×100%,实验重复3次。

1.3.7 流式细胞术检测各组HT-1376细胞周期及细胞凋亡情况 转染72 h后用胰酶消化收集各组细胞,消化后离心,弃上清,用PBS冲洗并重新混匀,离心后收集细胞。再加入Annexin V和PI染色,然后用流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡的情况。细胞周期分析指标: G₀/G₁期细胞比例=(G₀/G₁)/(G₀/G₁+S+G₂/M);

S+G₂/M期细胞比例,即细胞增殖指数=(G₂/M+S)/(G₀/G₁+S+G₂/M)。细胞增殖指数越大,细胞增殖能力越强。

1.3.8 Transwell实验检测细胞侵袭及迁移能力 体外细胞侵袭实验: 将从-20℃取出的Matrigel置于4℃溶化,用细胞培养基稀释混匀,铺于PVPF微孔滤膜上。于37℃孵育120 min,使Matrigel聚合成胶,取对数生长期的各组HT-1376细胞,消化稀释制成浓度为10⁵个/mL的细胞悬液。在上室微孔中加入上述各组细胞悬液100 μL,下室加入500 μL含20% FBS的培养基。置于37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h,用棉签擦去基质胶和上室内的细胞,移去transwell,倒置,风干,加入500 μL 0.1%结晶紫,将小室置于其中,使膜浸没在染料中,置于37℃恒温箱30 min后取出,用PBS清洗,每孔取3个视野拍照(放大倍数为200×),并计数。体外细胞迁移实验: 取对数生长长期细胞,消化稀释制成浓度为10⁵个/mL的细胞悬液。在上室微孔中加入上述各组细胞悬液100 μL,下室加入500 μL含20% FBS的培养基。培养、染色、计数方法同侵袭实验。计算各组穿膜细胞数目作为评价肿瘤细胞侵袭和迁移能力强弱的指标。

1.3.9 统计分析 用SPSS 18.0软件进行统计分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料多样本比较采用单因素方差分析,两样本比较用t检验,计数资料比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TTK在膀胱癌组织中的表达水平升高

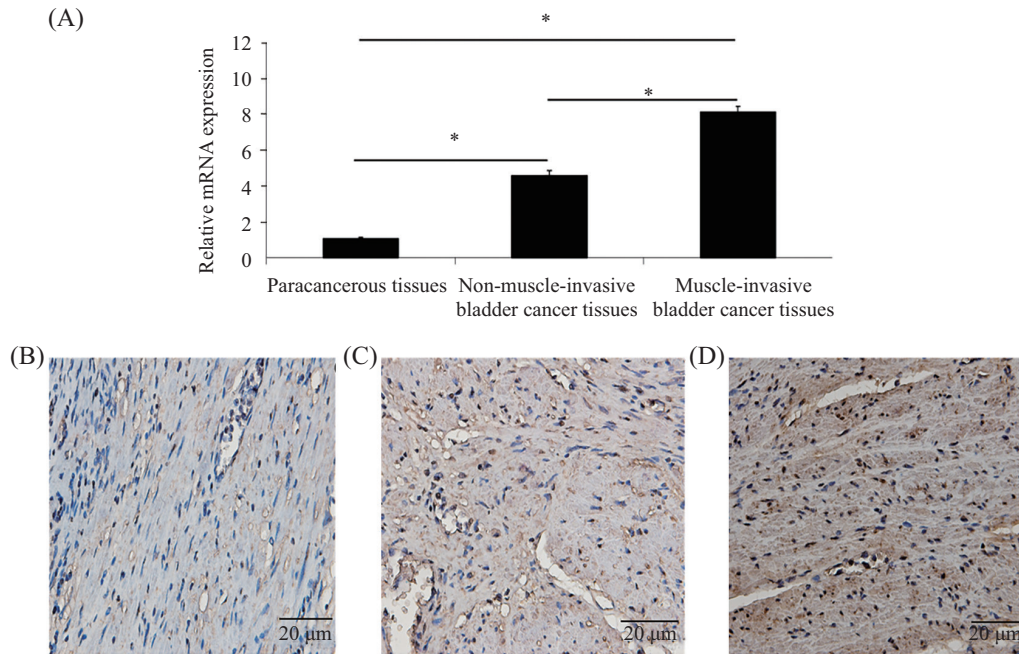
qRT-PCR结果(图1A)显示,TTK mRNA在癌旁组织、非肌层浸润性膀胱癌组织、肌层浸润性膀胱癌组织中的表达水平逐渐升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。免疫组织化学结果(图1B~图1D)显示,TTK在肌层浸润性膀胱癌组织中高表达,在非肌层浸润性膀胱癌组织中的表达水平有所降低,而在癌旁正常组织中低表达或不表达。在100例癌旁正常组织中,TTK蛋白表达阳性者20例,阳性率只有20%;在100例膀胱癌组织中,TTK蛋白表达阳性者68例,阳性率为68%,2组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。其中80例非肌层浸润性膀胱癌组织中有50例阳性,阳性率为62.5%;20例浸润性膀胱癌组织中有18例阳性,阳性率达90%,2组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。qRT-PCR结果与免疫组织化学结果一致,TTK mRNA表达水平

随着膀胱癌的进展而升高,提示了TTK的高表达与膀胱癌的发生、发展密切相关。

2.2 细胞转染效果检测

将各重组质粒转染至HT-1376细胞后,应用qRT-PCR检测各组TTK mRNA表达情况。结果如图2A所示,

过表达TTK后,HT-1376-TTK组TTK mRNA表达水平较对照组明显升高($P<0.05$)。敲除TTK后,siTTK1组、siTTK2组、siTTK3组TTK mRNA表达水平均低于对照组($P<0.05$),其中siTTK1组敲除效果最好,因此后续实验均选择siTTK1组进行实验。Western blot实验继

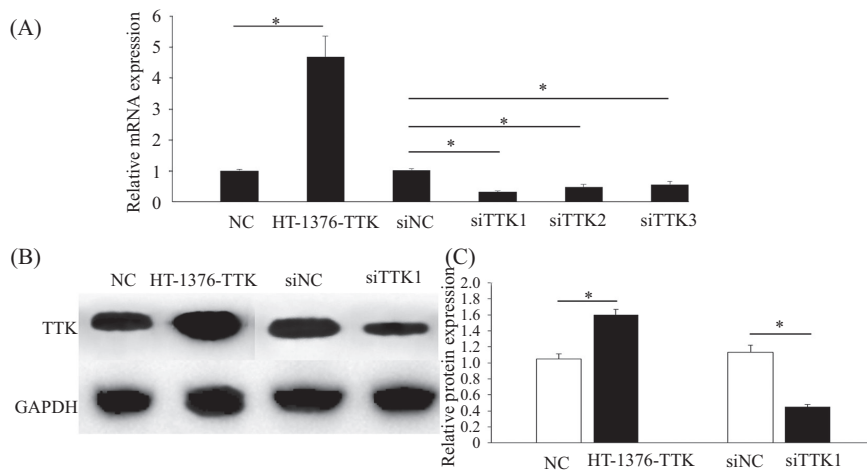


A: TTK mRNA在膀胱癌组织中的表达情况; * $P<0.05$; B-D: 免疫组织化学法检测TTK蛋白在癌旁正常组织、非肌层浸润性膀胱癌组织、肌层浸润性膀胱癌组织中的表达情况。

A: the expression of TTK mRNA in bladder cancer tissues; * $P<0.05$; B-D: immunohistochemical method was used to detect the expression of TTK protein in paracancerous tissues, non-muscle-invasive bladder cancer tissues, and muscle-invasive bladder cancer tissues.

图1 TTK mRNA和蛋白在膀胱癌组织中的表达情况

Fig.1 The expression of TTK mRNA and protein in bladder cancer tissues



A: 转染后TTK mRNA在膀胱癌细胞中的表达情况; B、C: 转染后TTK蛋白在膀胱癌细胞中的表达情况。* $P<0.05$ 。

A: the expression of TTK mRNA in bladder cancer cells after transfection; B,C: the expression of TTK protein in bladder cancer cells after transfection. * $P<0.05$ 。

图2 转染后TTK mRNA和蛋白的表达情况

Fig.2 TTK mRNA and protein expression after transfection

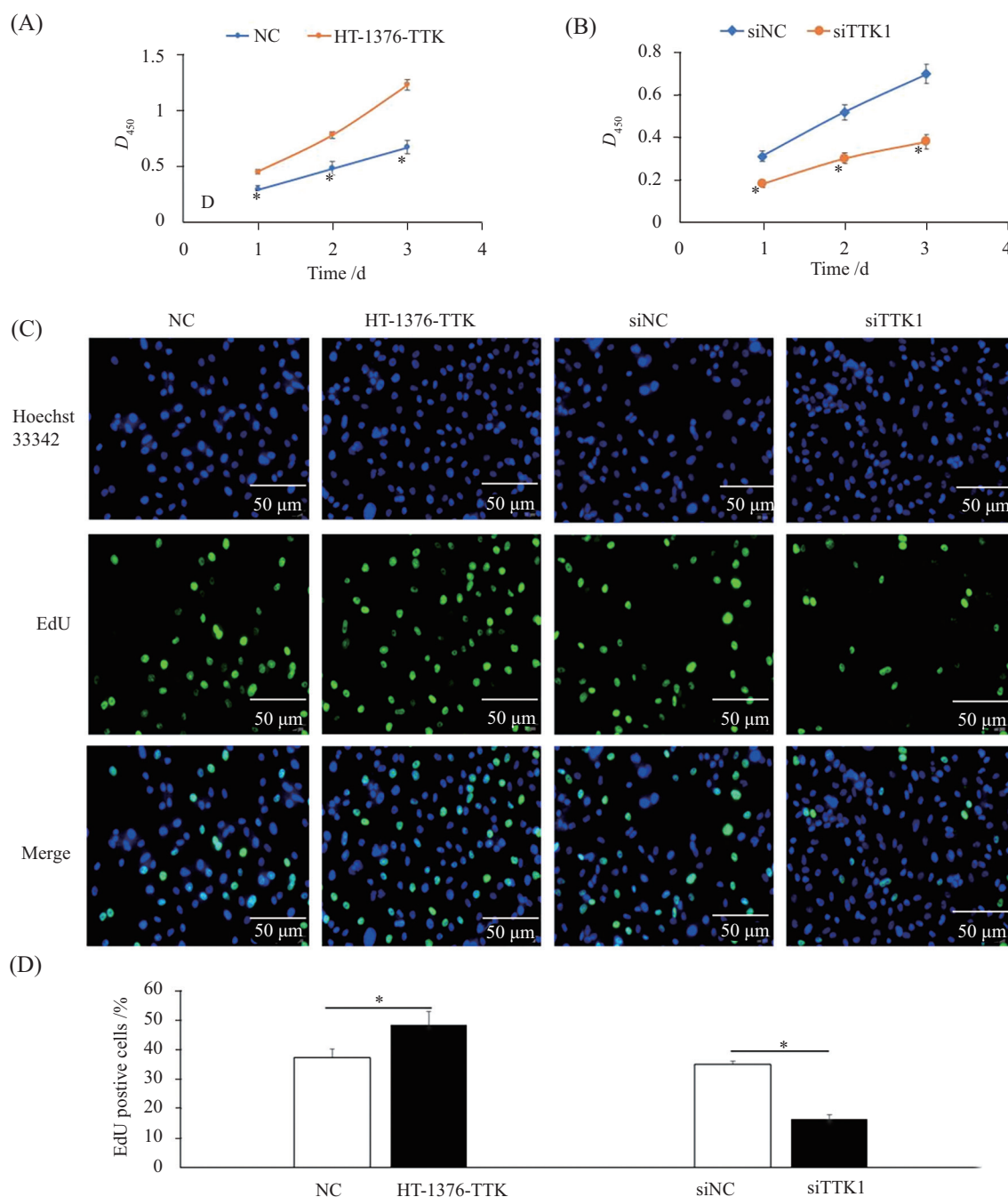
续验证了TTK蛋白过表达和敲除效果, HT-1376-TTK组TTK蛋白表达水平较对照组明显升高($P<0.05$)。siTTK1组TTK蛋白表达水平明显低于对照组($P<0.05$) (图2B和图2C)。

2.3 TTK对膀胱癌HT-1376细胞增殖能力的影响

应用CCK法检测各组细胞的增殖能力, 分别在

1、2、3天3个时间点检测。发现过表达TTK后, 3个时间点HT-1376细胞的增殖能力较对照组均逐渐升高($P<0.05$, 图3A), 而敲除TTK后, HT-1376细胞增殖能力较对照组逐渐减弱($P<0.05$, 图3B)。

为进一步验证CCK结果, 同时采用EdU免疫荧光标记法检测各组细胞增殖能力。结果发现, 过表达



A、B: CCK检测TTK对膀胱癌细胞增殖能力的影响。* $P<0.05$; C、D: EdU检测TTK对膀胱癌细胞增殖能力的影响。* $P<0.05$ 。

A,B: the effect of TTK on the proliferation of bladder cancer cells was detected by CCK assay; C,D: the effect of TTK on the proliferation of bladder cancer cells was detected by EdU assay. * $P<0.05$.

图3 TTK对膀胱癌细胞增殖能力的影响

Fig.3 The effect of TTK on the proliferation of bladder cancer cells

TTK后细胞增殖数目占总细胞数目的比例较对照组明显升高, 敲除 *TTK* 后细胞增殖数目占总细胞数目的比例较对照组明显下降 ($P < 0.05$, 图3C和图3D)。

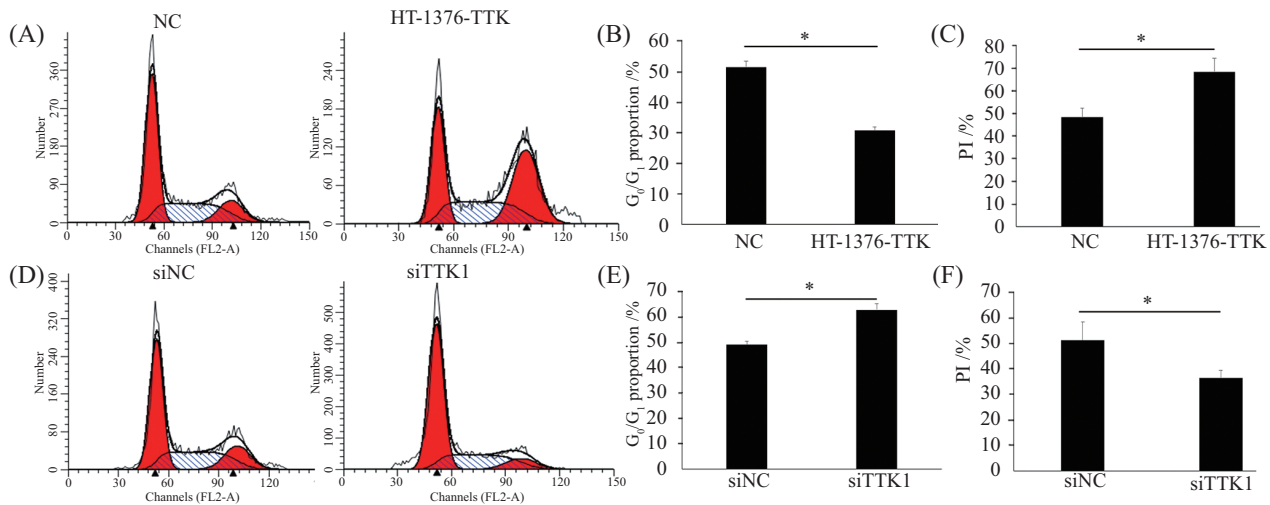
2.4 TTK对膀胱癌细胞细胞周期的影响

用流式细胞术对各组细胞进行细胞周期的检测, 结果显示, HT-1376-TTK组 G_0/G_1 期细胞比例低

于NC组, 增殖指数则明显高于NC组, 增殖能力增强 ($P < 0.05$) (图4A~图4C), 而 siTTK1 组 G_0/G_1 期细胞比例高于 siNC 组 ($P < 0.05$), 细胞增殖周期阻滞于 G_0/G_1 期, 且细胞增殖指数明显低于 siNC 组 (图4D~图4F)。

2.5 TTK对膀胱癌细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果如图5A和图5B所示, HT-

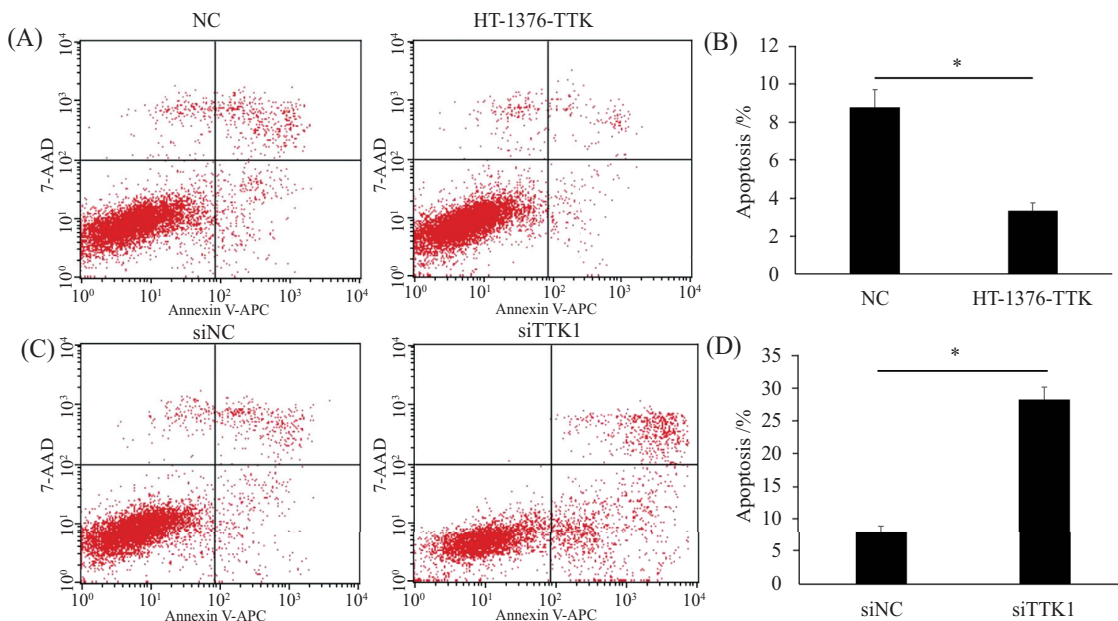


A~C: 流式细胞术检测过表达TTK对HT-1376细胞周期的影响; D~F: 流式细胞术检测敲除TTK对HT-1376细胞周期的影响。* $P < 0.05$ 。

A-C: the effect of TTK overexpression on the cell cycle of HT-1376 cells was detected by flow cytometry; D-F: the effect of TTK knockout on the cell cycle of HT-1376 cells was detected by flow cytometry. * $P < 0.05$.

图4 流式细胞术检测细胞周期变化

Fig.4 The change of cell cycle was explored by flow cytometry

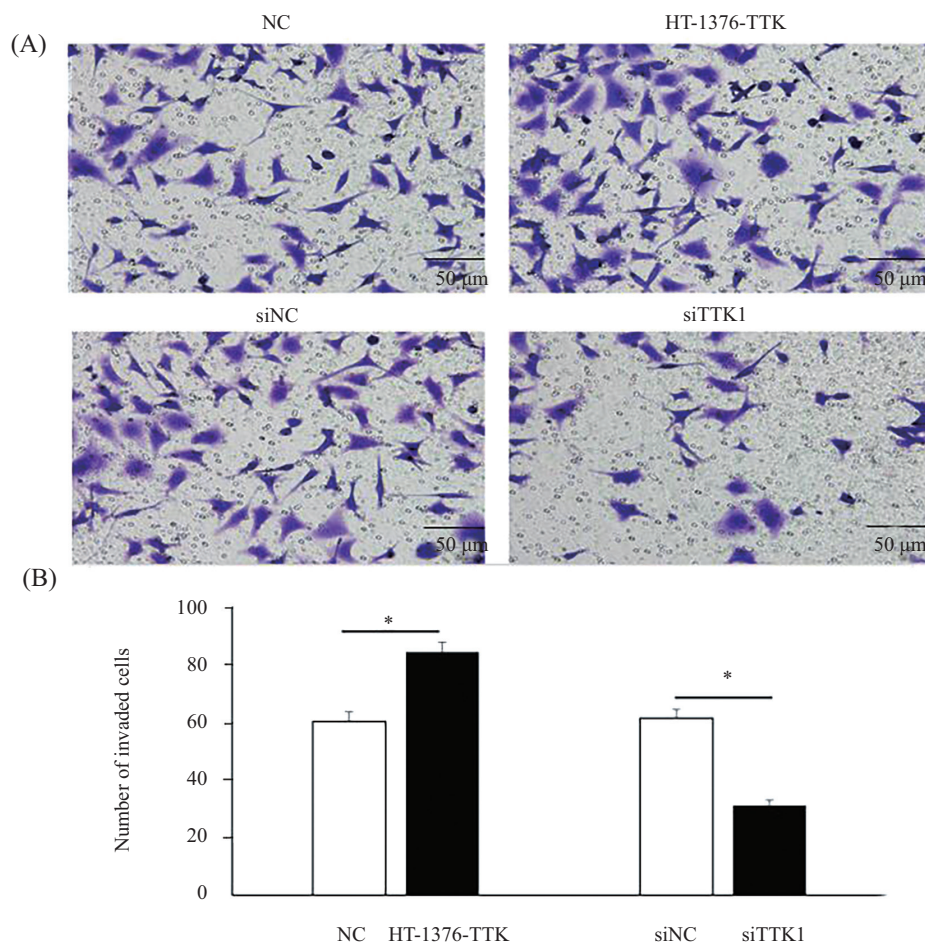


A, B: 流式细胞术检测过表达TTK对HT-1376细胞凋亡的影响; C, D: 流式细胞术检测敲除TTK对HT-1376细胞凋亡的影响。* $P < 0.05$ 。

A,B: the effect of TTK overexpression on the cell apoptosis of HT-1376 cells was detected by flow cytometry; C,D: the effect of TTK knockout on the cell apoptosis of HT-1376 cells was detected by flow cytometry. * $P < 0.05$.

图5 流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率

Fig.5 Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of each group



A、B: 转染后HT-1376 细胞侵袭能力的变化。* $P < 0.05$ 。

A,B: changes in the invasion ability of HT-1376 cells after transfection. * $P < 0.05$.

图6 Transwell小室法检测膀胱癌细胞侵袭能力

Fig.6 The invasion ability of bladder cancer cell was detected by transwell assay

1376-TTK组细胞凋亡率比例低于NC组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 而siTTK1组细胞凋亡率明显高于siNC组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图5C和图5D)。

2.6 TTK对细胞侵袭和迁移能力的影响

在细胞侵袭实验中, HT-1376-TTK组穿膜细胞数高于NC组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), siTTK1组穿膜细胞数明显低于siNC组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图6)。

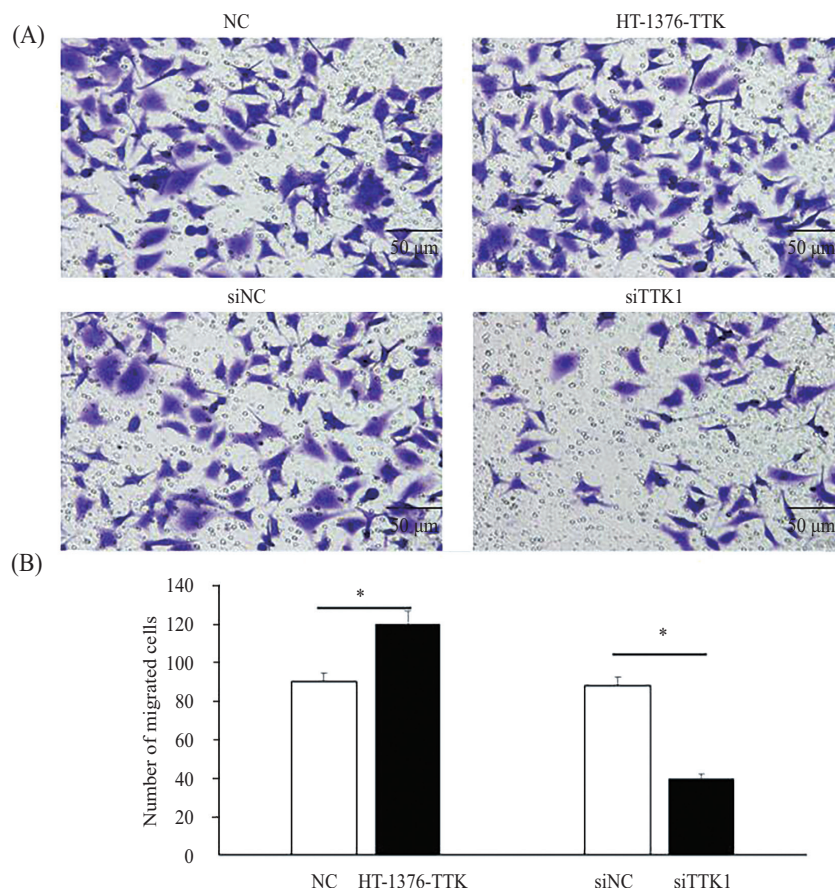
在细胞迁移实验中, HT-1376-TTK组穿膜细胞数高于NC组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), siTTK1组穿膜细胞数明显低于siNC组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图7)。

3 讨论

细胞周期是细胞生命活动中一个高度有序的运转过程, 一旦发生紊乱, 就会引起不受控制的细

胞增殖, 细胞周期调控在这一过程中起着调节和监视的作用^[10]。恶性肿瘤的主要特征就是细胞增殖失控, 其发生的主要机制是细胞周期发生紊乱。许多细胞周期调控基因与恶性肿瘤的发生、发展密切相关^[11-12]。

TTK是SAC的重要组成部分, 在细胞分裂中起着至关重要的作用^[13], 只有在纺锤体和染色体正确配对结合后, 有丝分裂才能进入后期。TTK的异常表达会影响SAC的功能, 导致错误的染色体分离和非整倍体的形成, 进而可能导致细胞凋亡^[5]。ZHANG等^[14]研究发现, 结肠癌组织中TTK的表达高于癌旁正常组织, 低分化结肠癌组织的TTK表达水平高于高分化结肠癌组织, TTK表达与结肠癌患者预后呈负相关。本实验发现, TTK在癌旁正常组织中低表达或不表达, 在非肌层浸润性膀胱癌中的表达升高, 在肌层浸润性膀胱癌中的表达进一步升



A、B: 转染后HT-1376 细胞迁移能力的变化。* $P<0.05$ 。

A,B: changes in the migration ability of HT-1376 cells after transfection. * $P<0.05$.

图7 Transwell小室法检测膀胱癌细胞迁移能力

Fig.7 The migration ability of bladder cancer cell was detected by transwell assay

高, 这提示TTK的异常表达与膀胱癌的发生、发展密切相关, 这与ZHANG等^[14]的研究结果一致。

TSAI等^[3]研究发现, TTK是一种潜在的致癌基因, 能促进肺癌细胞增殖、浸润、转移。CHEN等^[5]研究发现, TTK的表达与前列腺癌的进展有关, 敲除TTK可抑制前列腺癌细胞的增殖、侵袭和转移, 并诱导细胞凋亡。本实验通过过表达和敲除TTK, 发现过表达TTK可促进膀胱癌细胞的增殖、侵袭、迁移, 并抑制细胞凋亡, 而敲除TTK则可抑制膀胱癌细胞的增殖、侵袭、迁移, 并诱导细胞的凋亡。这与文献报道结果一致。

综上所述, TTK的高表达与膀胱癌发生、发展有关。过表达TTK能促进膀胱癌HT-1376细胞的增殖、侵袭、迁移, 并抑制细胞凋亡, 而敲除TTK则可抑制膀胱癌HT-1376细胞的增殖、侵袭、迁移, 并诱导细胞凋亡。膀胱癌的治疗或许可以通过抑制TTK基因的表达来实现, TTK可能是膀胱癌潜在的

治疗靶点。本实验的不足是尚未对TTK影响膀胱癌细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移的分子机制进行研究, 这将是本课题下一步研究的重点。

参考文献 (References)

- [1] 王宁, 刘硕, 杨雷, 等. 2018全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志(WANG N, LIU S, YANG L, et al. Interpretation on the report of Global Cancer Statistics 2018 [J]. J Multidiscip Cancer Manag, 2019, 5(1): 87-97.
- [2] MOHAMMED AA, EL-TANNI H, EL-KHATIB H M, et al. Urinary bladder cancer: biomarkers and target therapy, new era for more attention [J]. Oncol Rev, 2016, 10(2): 86-92.
- [3] TSAI Y M, WU K L, CHANG Y Y, et al. Upregulation of Thr/Tyr kinase increases the cancer progression by neurotensin and dihydropyrimidinase-like 3 in lung cancer [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1-17.
- [4] FOIJER F, XIE S Z, SIMON J E, et al. Chromosome instability induced by Mps1 and p53 mutation generates aggressive lymphomas exhibiting aneuploidy-induced stress [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(37): 13427-32.
- [5] CHEN S, WANG J, WANG L, et al. Silencing TTK expression

- inhibits the proliferation and progression of prostate cancer [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 385(1): 1-26.
- [6] MAIA A R, DEMAN J, BOON U, et al. Inhibition of the spindle assembly checkpoint kinase TTK enhances the efficacy of docetaxel in a triple-negative breast cancer model [J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(10): 2180-92.
- [7] MIAO R, WU Y, ZHANG H, et al. Utility of the dual-specificity protein kinase TTK as a therapeutic target for intrahepatic spread of liver cancer [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33121.
- [8] DU L, ZHAO Z, SURAKAR M, et al. LMO1 functions as an oncogene by regulating TTK expression and correlates with neuroendocrine differentiation of lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(51): 29601-18.
- [9] WEI W F, ZHOU C F, WU X G, et al. MicroRNA-221-3p, a TWIST2 target, promotes cervical cancer metastasis by directly targeting THBS2 [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(12): 3220.
- [10] LI X, XU P, WANG C, et al. Synergistic effects of the immune checkpoint inhibitor CTLA-4 combined with the growth inhibitor lycorine in a mouse model of renal cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(13): 21177-86.
- [11] ZHANG Z, SHEN M, ZHOU G. Upregulation of CDCA5 promotes gastric cancer malignant progression via influencing cyclin E1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(2): 482-9.
- [12] 顾朝辉, 于顺利, 田凤艳, 等. 细胞分裂周期相关蛋白5在膀胱癌组织的表达及其临床意义 [J]. *中华实验外科杂志* (GU C H, YU S L, TIAN F Y, et al. The expression and clinical significance of cell division cycle associated 5 in bladder cancer tissues [J]. *Chin J Exp Surg*), 2019, 36(9): 1672-4.
- [13] YU Z C, HUANG Y F, SHIEH S Y. Requirement for human Mps1/TTK in oxidative DNA damage repair and cell survival through MDM2 phosphorylation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(3): 1133-50.
- [14] ZHANG L, JIANG B, ZHU N, et al. Mitotic checkpoint kinase Mps1/TTK predicts prognosis of colon cancer patients and regulates tumor proliferation and differentiation via PKC α /ERK1/2 and PI3K/Akt pathway [J]. *Med Oncol*, 2019, 37(1): 5.