

. 实验研究 .

下调 TTK 表达改善胶质母细胞瘤裸鼠的生存预后

冒 平 王乙铝 王 拓 杜昌旺 王茂德

【摘要】目的 探讨苏氨酸/酪氨酸激酶(TTK)在胶质母细胞瘤(GBM)中的表达变化及其作用。**方法** 计算机检索TCGA数据库,利用生物信息学技术分析GBM组织TTK的表达水平及其与病人生存预后的关系。免疫组化染色分析我院生物样本库中60例脑胶质瘤组织的TTK表达水平。体外培养U251细胞,慢病毒转染构建TTK低表达细胞系,利用Alarma blue试剂盒测定细胞增殖能力,细胞克隆形成实验检测细胞克隆形成能力,流式细胞技术检测细胞凋亡和细胞周期。将不同TTK表达水平的U251细胞接种裸鼠构建移植瘤模型,分析TTK表达水平与移植瘤模型生存期的关系。**结果** 生信分析结果显示,GBM组织TTK表达水平明显高于低级别胶质瘤及正常脑组织($P<0.05$),TTK低表达GBM病人的总生存期更长($P<0.05$)。我院60例胶质瘤中,高级别胶质瘤TTK高表达率(69.0%,29/42)明显高于低级别胶质瘤(16.7%,3/18; $P<0.05$)。下调TTK表达明显抑制U251细胞增殖、促进细胞凋亡($P<0.05$)。TTK低表达裸鼠移植瘤模型的生存期明显延长($P<0.05$)。**结论** GBM组织TTK呈高水平表达,具有促进细胞增殖及抑制细胞凋亡的作用,与GBM的不良预后相关。

【关键词】 胶质母细胞瘤;苏氨酸/酪氨酸激酶(TTK);裸鼠;细胞增殖;生存预后

【文章编号】 1009-153X(2022)10-0841-07 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41

Down-regulation of TTK improves the survival prognoses of nude mice bearing intracranial glioblastoma xenografts

MAO Ping, WANG Yi-chang, WANG Tuo, DU Chang-wang, WANG Mao-de. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression and role of threonine/tyrosine kinase (TTK) in glioblastoma (GBM). **Methods** The TCGA database was searched by computer, and the expression level of TTK in GBM tissues and its relationship with the prognosis of patients were analyzed by bioinformatics methods. Immunohistochemical staining was used to analyze the expression of TTK in 60 glioma tissues obtained from our hospital biobank. U251 cells were cultured in vitro and transfected with lentivirus to construct TTK low expression cell line. Alarma blue kit was used to detect cell proliferation, cell clone formation assay was used to detect cell clone formation, and flow cytometry was used to detect cell apoptosis and cell cycle. U251 cells with different TTK expression levels were transplanted into nude mice to establish xenograft tumor models, and the relationship between TTK expression levels and the survival of xenograft tumor models was analyzed. **Results** The results of bioinformatics analysis showed that the expression level of TTK in GBM tissues was significantly higher than that in low-grade glioma and normal brain tissues ($P<0.05$), and the overall survival time of GBM patients with low TTK expression was significantly longer ($P<0.05$). Of 60 glioma obtained from our hospital biobank, the high expression rate of TTK in high-grade gliomas (69.0%, 29/42) was significantly higher than that in low-grade gliomas (16.7%, 3/18; $P<0.05$). Down-regulation of TTK expression significantly inhibited the proliferation and promoted apoptosis of U251 cells ($P<0.05$). The survival time of TTK low expression xenograft model of nude mice was significantly prolonged ($P<0.05$). **Conclusions** The high level of TTK expression in GBM tissue can promote cell proliferation and inhibit cell apoptosis, which is related to the poor prognosis of GBM.

【Key words】 Glioblastoma; Threonine/tyrosine kinase (TTK); Cell proliferation; Survival prognosis; Nude mice

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是成人中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤,具有侵袭性强、预后差等特点^[1]。目前,GBM即使接受“手术+替莫唑胺同步放化疗+辅助化疗”的标准治疗方案,或“手术+替莫唑胺同步放化疗+辅助化疗+电场治疗”的

新型治疗方案,中位生存期仍不超过2年^[2-3]。研究表明,获得性放化疗抵抗是导致GBM复发和治疗失败的主要原因^[4]。近年来,越来越多的研究表明异常激活的蛋白激酶与多种肿瘤的耐药和复发密切相关^[5,6]。苏氨酸/酪氨酸激酶(threonine tyrosine kinase, TTK)是一种双重特异性激酶,过度激活会产生大量的有丝分裂异常纺锤体,促进肿瘤的发生^[7],TTK高表达与胃癌^[8]、胰腺癌^[9]、乳腺癌^[10]、肝癌^[11]和前列腺癌^[12]等多种恶性肿瘤的发生、发展和不良预后有关。本研究探讨TTK在GBM中的表达变化及其作用。

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2022.10.013
基金项目:国家自然科学基金(82072781)
作者单位:710061 西安,西安交通大学第一附属医院神经外科(冒平、王乙铝、王 拓、杜昌旺、王茂德)

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 U251 细胞系购自南京拜睿生物科技有限公司。胎牛血清、DMEM/F12 培养基购自美国 Gibco 公司, Accutase 细胞消化液、细胞凋亡试剂盒、细胞周期试剂盒购自美国 Sigma 公司, 细胞 RNA 提取试剂盒、反转录 PCR 试剂盒、实时定量 PCR 试剂盒、Alarma blue 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司, ECL 化学发光试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司, 抗 TTK 抗体、抗 β -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记 (HRP) 的山羊抗兔二抗、山羊抗鼠 IgG 二抗购自英国 Abcam 公司, NuPAGE Bis-Tris 蛋白质电泳凝胶购自美国 Thermo Fisher 公司, GFP-shTTK 慢病毒包装颗粒购自美国 ORIGene 公司, 结晶紫试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司, DAB 试剂盒购自美国 Vector 公司。

1.2 生信分析 利用 TCGA GBM 数据库分析 538 种人类蛋白激酶编码基因的差异性表达, 生存曲线分析分析 671 例胶质瘤 TTK 表达水平与病人生存预后的关系。

1.2.1 数据获取和处理 从 TCGA 官网数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov>)下载胶质瘤组织转录组数据, 共获得 671 例胶质瘤的基因表达及临床信息。利用 R 语言(R version 4.04)将人类基因组注释文件与 counts 数据合并处理, 形成 TCGA GBM 基因表达矩阵。

1.2.2 基因差异性表达分析 对比分析 538 种人类蛋白激酶编码基因的表达水平, 发现 GBM 差异性高表达的目标蛋白激酶编码基因, 绘制基因表达曲线; 进一步分析各亚型 GBM 及正常脑组织 TTK 表达水平。

1.2.3 生存曲线分析 利用 GEPIA2 生信分析官网(<http://gepia2.cancer-pku.cn/>), 分析目标蛋白激酶编码基因在低级别胶质瘤(low-grade glioma, LGG)和 GBM 中的差异性表达及临床预后的关系, 绘制生存曲线。

1.3 免疫组化染色 利用我院生物样本库建立的 60 例脑胶质瘤组织芯片进行 TTK 免疫组化染色分析。60 例中, 男 34 例, 女 26 例; WHO 分级 I 级 8 例, II 级 10 例, III 级 19 例, IV 级 23 例。染色步骤: 常规脱蜡及水化组织芯片; 应用免疫组化抗原修复液(柠檬酸法)修复 20 min, 每隔 5 min 煮沸一次, 自然冷却至室温, 蒸馏水浸泡 10 min; 每张切片加入 50 μ l 过氧化物阻断液, 室温孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次; 加入 10%

正常山羊血清室温孵育 1 h, 去除血清, 加入一抗(1:200)4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗涤 2 次; 加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000)室温孵育 1 h, PBS 洗涤 2 次; 加入 DAB 辣根过氧化物酶溶液室温孵育 3~5 min, 光镜下观察切片染色情况, 流水冲洗以终止染色; 苏木素复染, PBS 洗涤; 乙醇溶液脱水, 滴加中性树胶封片, 显微镜下观察。免疫组化染色结果由 2 名实验员依据德国免疫组化标准评分^[13]。阳性细胞比率评分: 无阳性细胞为 0 分, 阳性细胞比率 <10% 为 1 分, 11%~50% 为 2 分, 51%~80% 为 3 分, >80% 为 4 分。染色强度评分: 无染色为 0 分, 弱染色为 1 分, 中度染色为 2 分, 强染色为 3 分。阳性细胞比率评分与染色强度评分乘积 <5 分为低表达, ≥ 5 分为高表达。

1.4 细胞实验

1.4.1 细胞培养 U251 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中培养, 每 3 d 换液一次; Accutase 细胞消化液分离细胞, 800 转/min 离心, 弃上清并重悬细胞, 完成细胞传代。常规冻存细胞, 保证充足细胞储备。

1.4.2 慢病毒转染细胞 制备单细胞悬液, 以 1×10^5 个/孔密度接种于 6 孔培养板孵育 8 h。待细胞完全贴壁后, 将 25 μ l shTTK 慢病毒溶液、4 μ l 聚凝胺与 4 ml DMEM/F12 培养基混匀, 加入 6 孔板中培养 24 h。荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)表达情况, 转染满意后, 800 转/min 离心 5 min, 收集沉淀并加入 5 ml 新鲜培养基重悬细胞继续培养。采用 qRT-qPCR 和免疫印迹法验证慢病毒转染效率。

1.4.3 细胞增殖实验 利用 Alarma blue 试剂盒测定细胞增殖能力。细胞重悬后以 200 μ l (1×10^3 个/孔)接种于 96 孔培养板, 加入 10% Alarma blue 试剂, 37 $^{\circ}$ C 孵育 8 h, 荧光分光光度计测定每孔读数。分组: shNT 组(RNA 干扰阴性对照组), shTTK #1 组(TTK 敲低组 1)和 shTTK #2 组(TTK 敲低组 2)。每个实验组设 3 个复孔, 绘制体外细胞增殖曲线。

1.4.4 细胞克隆形成实验 以 1×10^3 个/孔接种于 6 孔培养板。分组: shNT 组(RNA 干扰阴性对照组), shTTK #1 组(TTK 敲低组 1)和 shTTK #2 组(TTK 敲低组 2)。每个实验组设 3 个复孔。37 $^{\circ}$ C 孵育, 每隔 3 d 换液一次, 14 d 后 PBS 洗涤细胞, 每孔加入 1 ml 4% 多聚甲醛固定 45 min, PBS 洗涤后每孔加入结晶紫溶液 1 ml 染色 20 min, PBS 洗涤后荧光显微镜下拍照并计数。

1.4.5 细胞凋亡与周期实验 分组: shNT 组(RNA 干

扰阴性对照组),shTTK 组(TTK 敲低组)。细胞凋亡实验:收集、重悬细胞于 24 孔培养板,初始接种浓度为 1×10^6 个/孔;空白对照组内加入等体积 PBS 液;预冷 4 ℃ PBS 洗涤细胞 2 次(800 转/min 离心 5 min,弃 PBS 液);依次加入 500 μ l Annexin V 结合缓冲液+5 μ l Annexin V-FITC 液+5 μ l PI 液混匀,室温避光染色 10 min,1 h 内流式细胞仪检测细胞凋亡率。细胞周期实验:收集、重悬细胞并接种于 24 孔培养板,初始接种浓度为 1×10^6 个/孔;空白对照组内加入等体积 PBS 液;预冷 4 ℃ PBS 洗涤细胞 2 次(800 转/min 离心 5 min,弃 PBS 液);预冷 70%乙醇固定细胞,4 ℃ 冰箱过夜;离心并弃去乙醇液,4 ℃ 预冷 PBS 洗涤细胞;加入 500 μ l PI+100 μ g/ml RNaseA 液混匀;室温避光染色 30 min,流式细胞仪检测细胞周期。

1.4.6 实时定量荧光 PCR(qRT-qPCR) 采用细胞 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,Nanodrop 2000 紫外分光光度计测定 RNA 浓度;采用反转录 PCR 试剂盒进行反转录,合成 cDNA。PCR 扩增 cDNA:每孔加入 2.5 μ l cDNA、0.5 μ l 正向引物(0.5 μ mol/L)、0.5 μ l 反向引物(0.5 μ mol/L)、1.5 μ l DNase/RNase-free 蒸馏水和 5 μ l SYBR Green 试剂;94 ℃ 预加热 2 min,40 个循环(94 ℃、30 s,60 ℃、30 s,72 ℃、40 s)。以 GAPDH 作为内参。引物序列:TTK 正义链 5'-TCAT-GCCCATTGGAAGAGTC-3',反义链 5'-CCACTTG-GTTTAGATCCAGGC-3';GAPDH 正义链 5'-GGAGC-GAGATCCCTCCAAAT-3',反义链 5'-GGCTGTT-GTCATACTTCTCATGG-3'。

1.4.7 免疫印迹法 收集并裂解细胞,得到纯化蛋白

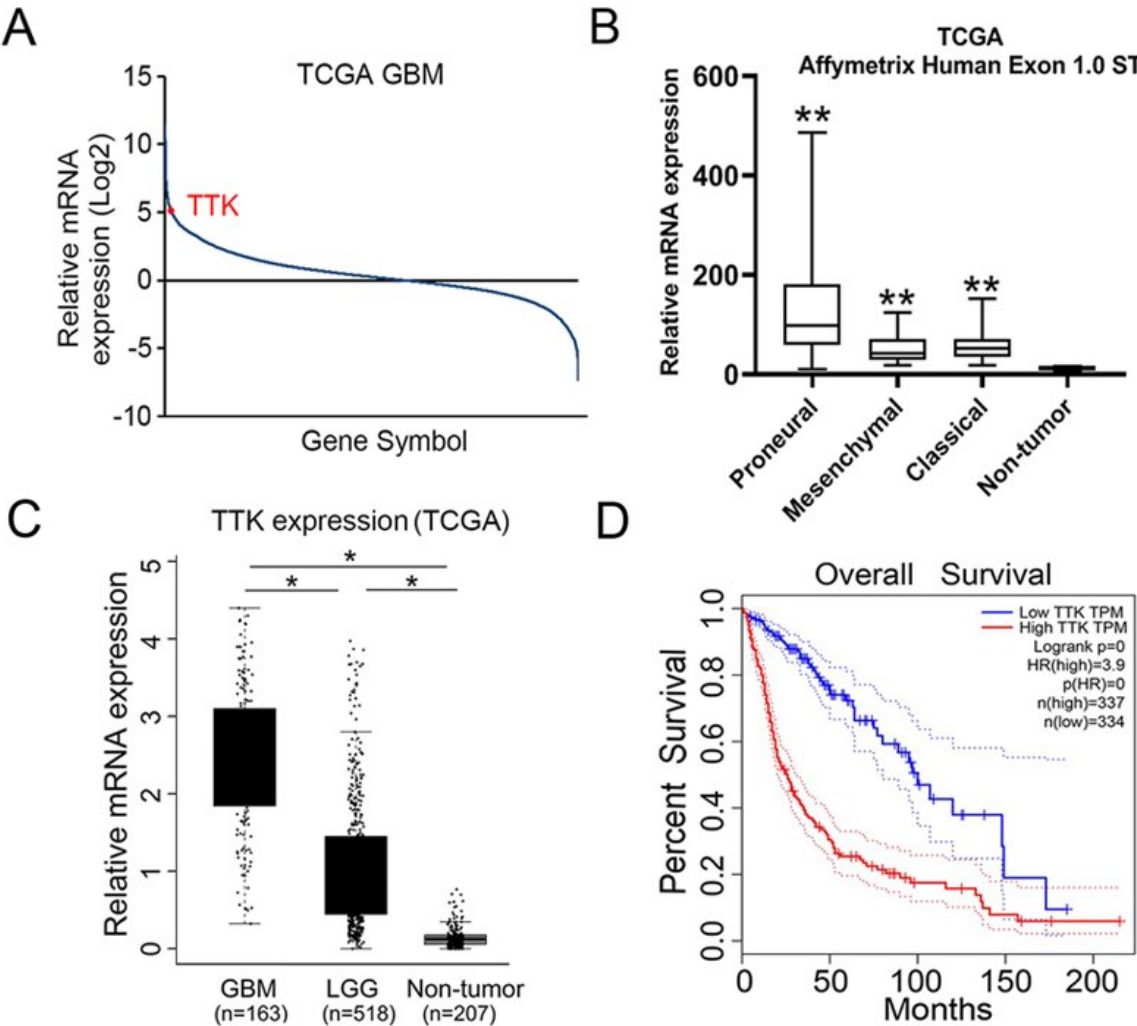


图1 GBM组织TTK表达的生信分析

A. GBM组织人类蛋白激酶差异表达分析(TCGA数据库);B. GBM亚型及正常脑组织的TTK表达水平(TCGA数据库);C. 脑胶质瘤与正常脑组织TTK的表达水平(TCGA数据库);D. 生存曲线分析TTK表达水平与脑胶质瘤生存预后的关系(TCGA数据库);GBM. 胶质母细胞瘤;* $P<0.05$,** $P<0.01$

样本;将提纯的 10 μg 蛋白样本加入 Bis-Tris 蛋白质电泳凝胶孔内,在电压 100 V 的条件下电泳 30 min,在 30 V 条件下室温转膜 1 h;加入 5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,TBST 液反复漂洗 3 次;加入一抗目标蛋白 4 ℃孵育过夜;加入二抗蛋白后室温孵育 1 h;TBST 液反复漂洗 3 次,按 ECL 化学发光试剂盒使用说明进行显色处理,X 线曝光后,常规显影、定影。使用 Image J 对结果进行量化,以β-actin 为内参。

1.5 裸鼠体内成瘤实验 分组:shNT 组(RNA 干扰阴性对照组),shTTK #1 组(TTK 敲低组 1),shTTK #2 组(TTK 敲低组 2)。选取 6 周龄 30 只裸鼠进行脑肿瘤原位成瘤实验,每组 10 只。将细胞重悬为单细胞悬液,调整细胞浓度为 2×10⁶ 个/ml,取 10 μl 细胞悬液于无菌 EP 管内,冰盒上保存。腹腔注射 0.05 ml 氯胺酮(100 mg/ml)及甲苯噻嗪(100 mg/ml)混合液麻醉裸鼠,利用立体定向仪固定裸鼠门齿及双侧乳突;微量注射器吸取 6 μl 细胞悬液,固定并调零注射系统,注射速度设定为 0.5 μl/min。碘伏消毒后,切开裸鼠头皮,暴露骨膜,于矢状缝右侧前、外各 2mm 颅骨微型磨钻钻孔,直达硬脑膜;将微量注射器沿骨空垂直刺入裸鼠右额叶内,深度距颅骨外板约 3.5 mm;

开启注射系统,于裸鼠右额叶内注入混悬细胞。注射完毕后,缓慢退出注射器,每分钟拔出 1 mm,直至完全退出,骨蜡封堵骨孔,缝合头皮并消毒。将裸鼠置于 30 ℃恒温加热板上,待麻醉恢复后,分笼饲养。每日观察并记录裸鼠情况,出现消瘦、弓背、癫痫及活动障碍等症状认为裸鼠脑内已成瘤,当出现严重消瘦(体重下降超过 40%)、瘫痪、持续性癫痫、无力摄食或饮水等严重症状认为裸鼠处于濒死状态^[14]。安乐法处死裸鼠(腹腔内注射氯胺酮及甲苯噻嗪+颈椎脱位法),Kaplan-Meier 法绘制生存曲线。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件分析;定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示;采用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验;Kaplan-Meier 法绘制生存曲线;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生信分析结果 538 种人类蛋白激酶编码基因中,TTK 是 GBM 表达水平最高的蛋白激酶之一(图 1A)。GBM 亚型^[15]分析表明,TTK 在原神经型(Pro-neural)、间质型(Mesenchymal)及经典型(Classical)GBM 中的表达水平均明显高于正常脑组织(图

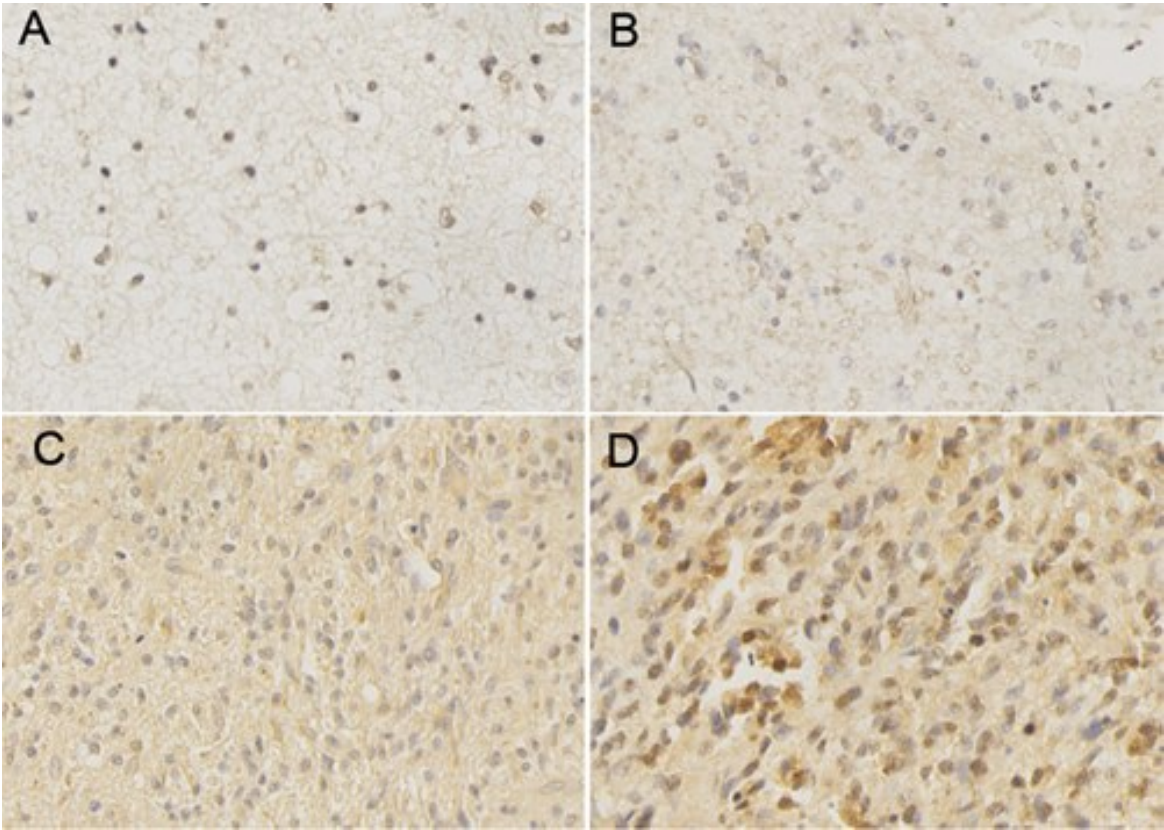


图 2 不同级别脑胶质瘤 TTK 表达的免疫组化染色(×200)
A. WHO 分级 I 级胶质瘤低表达;B. WHO 分级 II 级胶质瘤低表达;C. WHO 分级 III 级胶质瘤高表达;D. WHO 分级 IV 级胶质瘤高表达

1B)。GBM 组织 TTK 的表达水平明显高于 LGG 及正常脑组织(图 1C)。671 例脑胶质瘤病人中,TTK 低表达病人的总生存期更长(图 1D)。

2.2 我院胶质瘤病例 TTK 表达结果 60 例中,低表达 28 例(WHO 分级 I 级 7 例,II 级 8 例 III 级 8 例,IV 级 5 例),高表达 32 例(WHO 分级 I 级 1 例、II 级 2 例,III 级 11 例,IV 级 18 例;图 2)。高级别胶质瘤 TTK 高表达率(69.0%, 29/42)明显高于 LGG(16.7%, 3/18; $P<0.05$)。

2.3 下调 TTK 表达抑制 U251 细胞增殖、促进细胞凋亡 与 shNT 组相比,shTTK #1 组和 shTTK #2 组 U251 细胞 TTK mRNA 和蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$, 图 3),细胞增殖及克隆形成能力均明显降低

($P<0.05$, 图 4);而 shTTK #1 组和 shTTK #2 组之间无统计学差异($P>0.05$;图 4)。与 shNT 组相比($7.69\pm 0.39\%$),shTTK 组细胞凋亡率($21.79\pm 2.35\%$)明显增高($P<0.05$),G1 期细胞比例明显增高($P<0.05$;图 5),S 期细胞比例明显降低($P<0.05$;图 5)。

2.4 下调 TTK 表达延长 GBM 裸鼠生存期 与 shNT 组相比,shTTK #1 组和 shTTK #2 组裸鼠生存期明显延长($P<0.05$, 图 6),而 shTTK #1 组和 shTTK #2 组之间无统计学差异($P>0.05$;图 6)。

3 讨论

近年来,研究表明异常激活的蛋白激酶与肿瘤发生、发展、治疗抵抗及复发密切相关^[5,6,16]。TTK 是

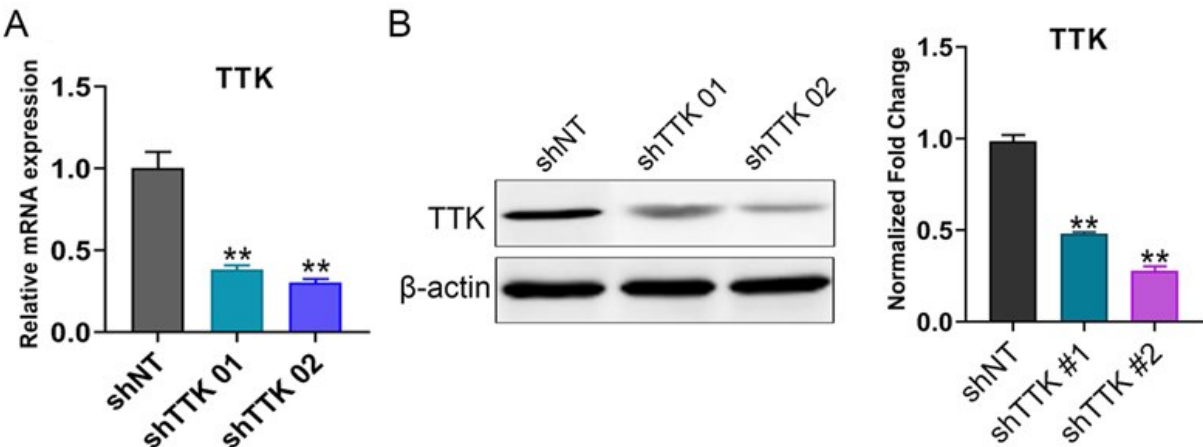


图3 shRNA 干扰对U251 细胞TTK 表达的抑制效果
A. TTK mRNA 表达水平;B. TTK 蛋白质表达水平;shNT. RNA 干扰阴性对照;shTTK. TTK RNA 干扰序列;** $P<0.01$

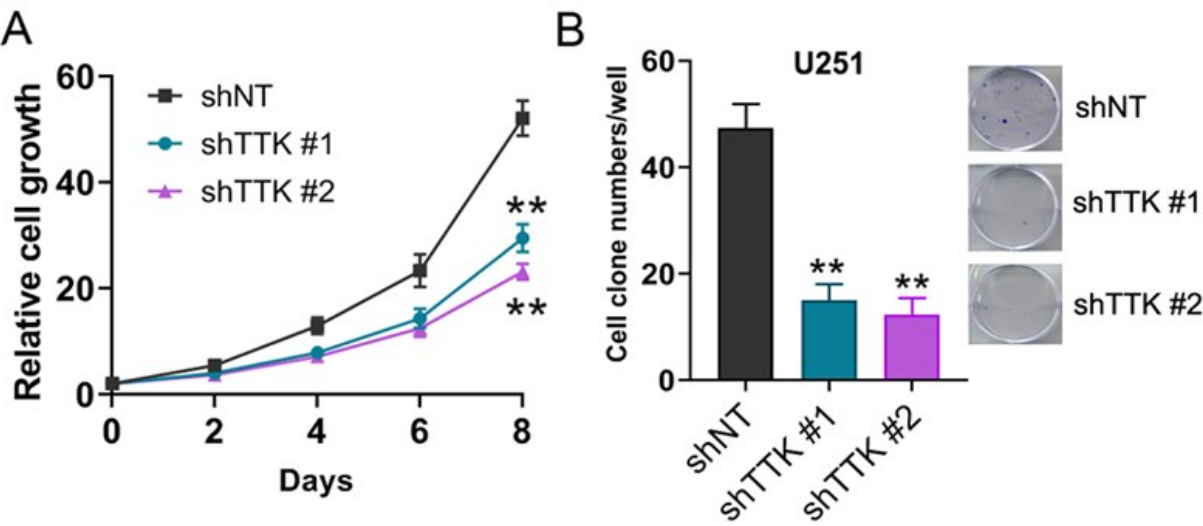


图4 下调TTK 表达对U251 细胞增殖及克隆形成的影响
A. 下调TTK 表达对U251 细胞增殖的影响;B. 下调TTK 表达对U251 细胞克隆形成的影响;shNT. RNA 干扰阴性对照;shTTK. TTK RNA 干扰序列;** $P<0.01$

有丝分裂过程中调控染色体精确分离的重要检查点蛋白,与细胞增殖密切相关^[17]。研究表明,异常激活的 TTK 可通过影响着丝粒定位和纺锤体组装检查点,导致染色体不稳定和有丝分裂的紊乱,促进恶性肿瘤细胞的生长和迁移^[18]。本研究发现 GBM 组织 TTK 呈高水平表达;特异性下调 TTK 表达明显抑制胶质瘤 U251 细胞增殖、克隆形成能力,促进细胞凋亡,延长胶质瘤裸鼠生存期。这提示 TTK 过表达促进 GBM 细胞增殖,与病人不良预后有关。

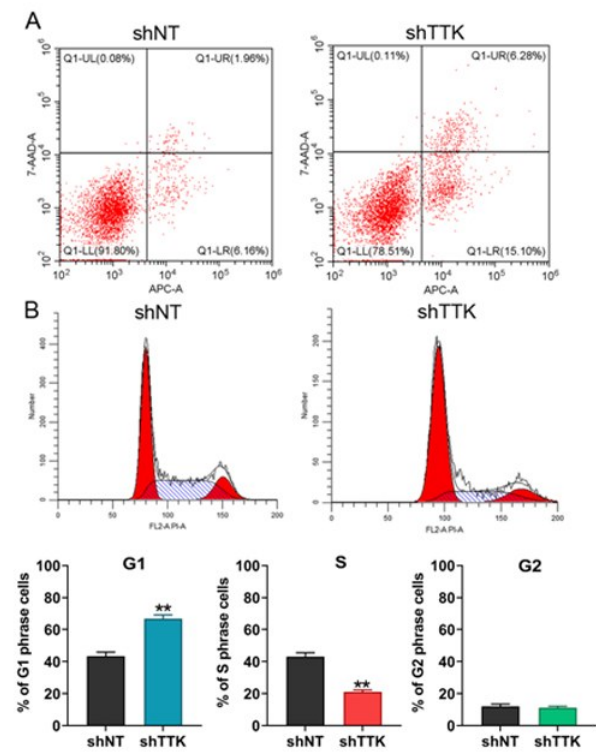


图 5 下调 TTK 表达对 U251 细胞周期的影响
shNT. RNA 干扰阴性对照; shTTK. TTK RNA 干扰序列 #1;
** $P<0.01$

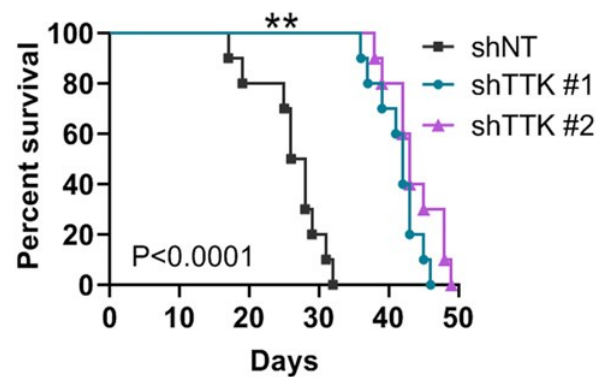


图 6 下调 TTK 表达对 U251 细胞移植瘤裸鼠生存期的影响
shNT. RNA 干扰阴性对照; shTTK. TTK RNA 干扰序列; ** $P<0.01$

研究表明,多种特异性蛋白激酶抑制剂可有效抑制体内外肿瘤细胞增殖^[19,20]。Stratford 等^[21]研究发现特异性 TTK 小分子抑制剂可通过调控纺锤体组装检查点,诱导细胞周期停滞,进而降低染色体稳定性并抑制胰腺癌细胞增殖。临床研究发现,两种新的 TTK 抑制剂 BAY 1161909 和 BAY 1217389 具有非常好的抗肿瘤活性^[22]。并且,这些特异性 TTK 小分子抑制剂在提高抗肿瘤药效的同时,可有效减少肿瘤的耐药性^[23]。研究表明,HLF 介导的 miR-132 可靶向抑制 TTK 的表达,从而抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移和治疗抵抗^[24]。我们的前期研究表明,线粒体裂变调节因子 2 (MTFR2) 是 TTK 最相关的基因之一,可通过激活 TTK 启动子增强 TTK 的转录,从而促进胶质瘤干细胞的增殖^[25]。然而,TTK 促进 GBM 细胞增殖的上下游分子调控机制仍有进一步研究。

综上所述,GBM 组织 TTK 呈高水平表达,具有促进细胞增殖及抑制细胞凋亡的作用,与 GBM 的不良预后相关。

【参考文献】

[1] 刘宝辉,孙 前,袁凡恩,等. 高级别胶质瘤的治疗进展 [J]. 中国临床神经外科杂志,2021,26(5):380-384.

[2] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial [J]. Lancet Oncol, 2009, 10(5): 459-466.

[3] Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, *et al.* Maintenance therapy with tumor-treating fields plus temozolomide vs temozolomide alone for glioblastoma: a randomized clinical trial [J]. JAMA, 2015, 314(23): 2535-2543.

[4] Goenka A, Tiek D, Song X, *et al.* The many facets of therapy resistance and tumor recurrence in glioblastoma [J]. Cells, 2021, 10(3): 484.

[5] Murugan AK. mTOR: role in cancer, metastasis and drug resistance [J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59: 92-111.

[6] Ghosh S, Marrocco I, Yarden Y. Roles for receptor tyrosine kinases in tumor progression and implications for cancer treatment [J]. Adv Cancer Res, 2020, 147: 1-57.

[7] King JL, Zhang B, Li Y, *et al.* TTK promotes mesenchymal signaling via multiple mechanisms in triple negative breast cancer [J]. Oncogenesis, 2018, 7(9): 69.

[8] Huang H, Yang Y, Zhang W, *et al.* TTK regulates prolifera-

tion and apoptosis of gastric cancer cells through the Akt-mTOR pathway [J]. FEBS Open Bio, 2020, 10(8): 1542-1549.

[9] Kaistha BP, Honstein T, Müller V, *et al.* Key role of dual specificity kinase TTK in proliferation and survival of pancreatic cancer cells [J]. Br J Cancer, 2014, 111(9): 1780-1787.

[10] Chandler BC, Moubadder L, Ritter CL, *et al.* TTK inhibition radiosensitizes basal-like breast cancer through impaired homologous recombination [J]. J Clin Invest, 2020, 130(2): 958-973.

[11] Zhang H, Yao W, Zhang M, *et al.* TTK inhibitor promotes radiosensitivity of liver cancer cells through p21 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 550: 84-91.

[12] 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): 111669.

[13] Zhang N, Wei P, Gong A, *et al.* FoxM1 promotes β -catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis [J]. Cancer Cell, 2011, 20(4): 427-442.

[14] Wang J, Yang T, Xu G, *et al.* Cyclin-dependent kinase 2 promotes tumor proliferation and induces radio resistance in glioblastoma [J]. Transl Oncol, 2016, 9(6): 548-556.

[15] Wang Q, Hu B, Hu X, *et al.* Tumor evolution of glioma-intrinsic gene expression subtypes associates with immunological changes in the microenvironment [J]. Cancer Cell, 2017, 32(1): 42-56.

[16] Payne AW, Pant DK, Pan TC, *et al.* Ceramide kinase promotes tumor cell survival and mammary tumor recurrence [J]. Cancer Res, 2014, 74(21): 6352-6363.

[17] Liang XD, Dai YC, Li ZY, *et al.* Expression and function analysis of mitotic checkpoint genes identifies TTK as a potential therapeutic target for human hepatocellular carcinoma [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e97739.

[18] Pachis ST, Kops GJPL. Leader of the SAC: molecular mechanisms of Mps1/TTK regulation in mitosis [J]. Open Biol, 2018, 8(8): 180109.

[19] Karoulia Z, Gavathiotis E, Poulikakos PI. New perspectives for targeting RAF kinase in human cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(11): 676-691.

[20] Markham A, Keam SJ. Selumetinib: first approval [J]. Drugs, 2020, 80(9): 931-937.

[21] Stratford JK, Yan F, Hill RA, *et al.* Genetic and pharmacological inhibition of TTK impairs pancreatic cancer cell line growth by inducing lethal chromosomal instability [J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0174863.

[22] Uitdehaag JCM, de Man J, Willemssen-Seegers N, *et al.* Target residence time-guided optimization on TTK kinase results in inhibitors with potent anti-proliferative activity [J]. J Mol Biol, 2017, 429(14): 2211-2230.

[23] Schulze VK, Klar U, Kosemund D, *et al.* Treating cancer by spindle assembly checkpoint abrogation: discovery of two clinical candidates, BAY 1161909 and BAY 1217389, targeting MPS1 kinase [J]. J Med Chem, 2020, 63(15): 8025-8042.

[24] Chen S, Wang Y, Ni C, *et al.* HLF/miR-132/TTK axis regulates cell proliferation, metastasis and radiosensitivity of glioma cells [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 898-904.

[25] Wang J, Xie Y, Bai X, *et al.* Targeting dual specificity protein kinase TTK attenuates tumorigenesis of glioblastoma [J]. Oncotarget, 2018, 9(3): 3081-3088.

(2022-03-20 收稿, 2022-07-19 修回)

(上接第 840 页)

[11] Momtazmanesh S, Rezaei N. Long non-coding RNAs in diagnosis, treatment, prognosis, and progression of glioma: a state-of-the-art review [J]. Front Oncol, 2021, 11: 712786.

[12] Chen S, Deng X, Sheng H, *et al.* Noncoding RNAs in pediatric brain tumors: molecular functions and pathological implications [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 26: 417-431.

[13] Zhang L, He T, Yan Y, *et al.* Expression and clinical significance of the novel long noncoding RNA ZNF674-AS1 in human hepatocellular carcinoma [J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 3608914.

[14] 游伊梦, 刘彦权, 沈建箴. SOX9 在恶性肿瘤中的研究进展 [J]. 解放军医药杂志, 2021, 33(2): 111-116.

[15] Sun Y, Jing Y, Zhang Y. Serum lncRNA-ANRIL and SOX9 expression levels in glioma patients and their relationship with poor prognosis [J]. World J Surg Oncol, 2021, 19(1): 287.

(2022-07-27 收稿, 2022-08-26 修回)