

## 蟾酥活性成分下调极光激酶表达并促进肝癌细胞周期阻滞的机制研究

王佳宝<sup>1</sup>, 徐忠伟<sup>2</sup>, 王志美<sup>1</sup>, 代二庆<sup>3\*</sup>, 徐瑞成<sup>2,4\*</sup>

1. 锦州医科大学 中国人民武装警察部队后勤学院附属医院 研究生培养基地, 天津 300162

2. 中国人民武装警察部队后勤学院, 天津 300309

3. 中国人民武装警察部队后勤学院附属医院 军人医疗保健中心, 天津 300162

4. 天津市职业与环境危害生物标志物重点实验室, 天津 300309

**摘要:**目的 探讨极光激酶(AURK)在肝癌中的作用,以及蟾酥活性成分华蟾毒配基和蟾蜍灵下调 AURK 表达和抑制肝癌 HepG2 细胞增殖的机制。方法 Kaplan-Meier 生存函数法分析极光激酶 A(AURKA)和极光激酶 B(AURKB) mRNA 表达水平与肝癌患者生存期的关系;MTT 法检测 HepG2 细胞增殖,流式细胞术检测细胞周期变化,蛋白免疫印迹法检测 AURKA、AURKB、Xklp2 靶向蛋白(TPX2)、染色体结构维持蛋白 2(SMC2)、DNA 拓扑异构酶 2(TOP2A)和细胞周期蛋白依赖性激酶 1(CDK1)的表达水平。结果 Kaplan-Meier 生存分析显示 AURKA 和 AURKB mRNA 表达水平与肝癌患者生存期呈现显著负相关;华蟾毒配基和蟾蜍灵可抑制 HepG2 细胞生长,抑制效应呈现时间和浓度依赖性;华蟾毒配基和蟾蜍灵均引起细胞周期 G<sub>2</sub>/M 期阻滞,下调 AURKA、AURKB、TPX2、SMC2、TOP2A 和 CDK1 蛋白表达( $P < 0.05$ )。

**结论** AURKA 和 AURKB mRNA 表达水平与患者生存期呈现显著负相关。华蟾毒配基和蟾蜍灵能有效促使 AURKA 和 AURKB 表达下调,调控有丝分裂相关分子,引起 HepG2 细胞周期阻滞,从而抑制其增殖。

**关键词:** 蟾酥;华蟾毒配基;蟾蜍灵;HepG2 细胞;极光激酶 A;极光激酶 B;肝癌

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)18-3796-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.18.020

## Mechanism of active ingredients of *Venenum Bufonis* in down-regulating expression of aurora kinase and promoting cell cycle arrest in human liver cancer HepG2 cells

WANG Jia-bao<sup>1</sup>, XU Zhong-wei<sup>2</sup>, WANG Zhi-mei<sup>1</sup>, DAI Er-qing<sup>3</sup>, XU Rui-cheng<sup>2,4</sup>

1. The Postgraduate Culture Base of Jinzhou Medical University, The Affiliated Hospital of Logistics University of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

2. Logistics University of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China

3. The Affiliated Hospital of Logistics University of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

4. Key Laboratory for Biomarkers of Occupational and Environmental Hazard, Tianjin 300309, China

**Abstract: Objective** To investigate the function of aurora kinase (AURK) in liver cancer and the mechanism of cinobufagin and bufalin-induced liver cancer HepG2 cells growth inhibition by down-regulating AURK family. **Methods** Kaplan-Meier survival method analyzed the relationship between mRNA expression levels of AURKA and AURKB and survival periods. The viability and cell cycle of HepG2 cells were detected by MTT method and flow cytometry. Western blotting analyzed the expression levels of spindle-associated protein AURKA, AURKB, TPX2, SMC2, TOP2A, and cyclin-dependent kinase CDK1. **Results** Kaplan-Meier survival analysis presented a significantly negative correlation between mRNA expression levels of AURKA and AURKB and survival periods. Cinobufagin and bufalin inhibited the growth of HepG2 cells in a time- and dose-dependent manner, and induced the cell cycle G<sub>2</sub>/M phase arrest. They all down-regulated the expression of AURKA, AURKB, TPX2, SMC2, TOP2A, and CDK1 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** There is a significantly negative correlation between mRNA expression levels of AURKA and AURKB and survival

收稿日期: 2017-05-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81673651, 81273552, 81273745); 武警后勤学院博士启动金项目(WHB201501)

作者简介: 王佳宝(1989—), 男, 在读硕士, 研究方向为中西医结合临床。Tel: 18678322412 E-mail: eaglejb@163.com

\*通信作者 代二庆(1969—), 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为中西医结合临床。Tel: 13502136445 E-mail: 13502136445@163.com  
徐瑞成(1968—), 男, 硕士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为细胞信号转导。Tel: (022)84876451 E-mail: xu\_rc@sohu.com

periods. Cinobufagin and bufalin could induce HepG2 cells growth inhibition and cell cycle arrest by down-regulating the expression of AURKA and AURKB and other mitosis-regulating proteins.

**Key words:** *Venenum Bufonis*; cinobufagin; bufalin; HepG2 cells; AURKA; AURKB; liver cancer

蟾蜍制剂作为传统中药在临床上用于治疗原发性肝癌,可改善患者生存质量,提高免疫力。其活性成分华蟾毒配基(cinobufagin)和蟾蜍灵(bufalin)均属于外源性强心苷类固醇类药物,作为钠钾泵的天然抑制剂,均具有良好的抗肿瘤活性。外源性强心苷类药物还包括植物来源的洋地黄毒苷(digitoxin)、哇巴因(ouabain)以及半合成药物 UNBS1450 等<sup>[1]</sup>。强心苷类药物可通过抑制钠钾泵活性导致离子失衡,提高细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度,促进细胞内活性氧簇的产生,抑制细胞增殖,激活细胞凋亡及坏死相关信号通路,使抑癌基因去甲基化等多方面诱导肿瘤细胞死亡<sup>[2-4]</sup>。极光激酶(aurora kinase, AURK)是一类丝/苏氨酸激酶,它可以通过干扰中心体、纺锤体以及染色体的功能影响细胞的有丝分裂。本课题组前期研究发现,哇巴因可通过调节 AURK 引起染色体紊乱,从而抑制肝癌细胞增殖<sup>[5]</sup>。华蟾毒配基和蟾蜍灵作为传统中药蟾酥的有效活性成分,在抗肿瘤方面有巨大的潜力,故本研究以人肝癌 HepG2 细胞为靶细胞,探讨华蟾毒配基和蟾蜍灵通过干扰 AURK 家族蛋白及细胞分裂调控相关蛋白的表达抑制 HepG2 细胞增殖的机制。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人肝癌 HepG2 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所。

### 1.2 药品与试剂

华蟾毒配基(批号 070F0342V)和蟾蜍灵(批号 066D0187F)为美国 Sigma-Aldrich 公司产品,用二甲基亚砜(DMSO)溶解成浓度为 0.01 mol/L 的母液,于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存,实验时用无血清培养基稀释至所需浓度。

H-DMEM 培养基为美国 Gibco 公司产品;胎牛血清购自 SeraPro 公司;噻唑蓝(MTT)、碘化丙啶(PI)和 DMSO 等为北京索莱宝公司产品;一抗(兔抗人)AURKA、AURKB 和细胞周期蛋白依赖性激酶 1(CDK1)抗体购自英国 Abcam 公司,Xklp2 靶向蛋白(TPX2)、DNA 拓扑异构酶 2(TOP2A)和染色体结构维持蛋白 2(SMC2)抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司, $\beta$ -actin 抗体购自金

斯瑞生物科技有限公司;二抗(羊抗兔)购自美国 SeraCare 公司;ECL 化学发光试剂购自美国 Millipore 公司。

### 1.3 仪器

Power Pac Basic 电泳仪(美国伯乐公司);M2 型全波长酶标仪(美国 MD 公司);FC500 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司);JY96-11N 型超声细胞破碎仪(宁波新艺超声设备有限公司);AI600 型化学发光成像系统(美国通用电气公司)。

## 2 方法

### 2.1 生存分析

AURKA 和 AURKB 的 mRNA 表达水平数据下载自癌症基因信息数据库(Cancer Genome Atlas/TCGA, <https://tcga-data.nci.nih.gov>)。实验选取 360 例开源原发性肝细胞癌患者 mRNA-seq 数据,以表达水平的上四分位数(第 75 百分位数)为分界点,将其分为低表达患者组和高表达患者组,按照 AURKA 和 AURKB mRNA 表达水平与生存期长短关系执行 Kaplan-Meier 生存函数法分析。

### 2.2 MTT 法检测细胞增殖活性

取对数生长期 HepG2 细胞制成  $1 \times 10^5/\text{mL}$  细胞悬浮液,每孔 100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板,每组 5 个复孔。同时设 5 个仅含培养基孔为空白组。常规培养过夜,待细胞贴壁后,对照组补充 100  $\mu\text{L}$  含 10% 胎牛血清的 H-DMEM 培养基;药物组每孔加入 100  $\mu\text{L}$  含有不同浓度华蟾毒配基(0.001、0.01、0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$ )和蟾蜍灵(0.001、0.01、0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$ )的培养基,分别培养 24、48、72 h 后,加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 孵育 4 h,离心,弃上清,加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO,震荡 10 min,全波长酶标仪测定 490 nm 处吸光度(A)值。根据公式计算细胞增殖率及不同时间点药物的半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )值。实验独立重复 3 次。

$$\text{细胞增殖率} = (A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

### 2.3 流式细胞术检测细胞周期

接种  $1 \times 10^6$  个 HepG2 细胞于细胞培养皿,培养 24 h 后加药物干预,实验分为对照组、华蟾毒配基组(5  $\mu\text{mol/L}$ )、蟾蜍灵组(1  $\mu\text{mol/L}$ ),作用 24 h 后,收集细胞,PBS 洗 2 次,用 70%冰乙醇固定,上机前吸弃乙醇,PBS 洗 1 次,加入 100  $\mu\text{g/mL}$

RNase、40  $\mu\text{g/mL}$  PI 和 0.2% Triton X-100 避光孵育 30 min, 过 300 目筛, 流式细胞仪检测细胞周期, Flowjo 软件分析数据。实验独立重复 3 次。

## 2.4 Western blotting 法检测相关蛋白表达

**2.4.1 总蛋白提取** 接种  $1 \times 10^6$  个 HepG2 细胞于细胞培养皿, 待细胞融合至 80% 时, 加入药物干预, 分为对照组、华蟾毒配基组 (5  $\mu\text{mol/L}$ )、蟾蜍灵组 (1  $\mu\text{mol/L}$ ), 分别孵育 6、12、24 h, 收集细胞, PBS 洗 2 次, 加入 300  $\mu\text{L}$  RIPA 裂解液 [50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、150 mmol/L NaCl、1% Triton X-100、0.1% SDS、1% sodium deoxycholate、10 mmol/L NaF] 与  $1 \times$  酶抑制剂混合液, 冰上裂解 30 min, 以工作 5 s、间隔 1 s 的频率于 4  $^{\circ}\text{C}$  超声 8 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清即得总蛋白,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

**2.4.2 蛋白表达量测定** BCA 定量法测定蛋白质量浓度, 以 50  $\mu\text{g}$  总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 半干转膜法转移至 NC 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入 1:1 000 稀释的兔抗人 AURKA、AURKB、TPX2、SMC2、TOP2A、CDK1 抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗膜 4 次, 每次 10 min, 加入 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 4 次, 每次 10 min, ECL 孵育 1 min, 曝光, Scion Image 软件进行灰度值分析, 以目的蛋白与  $\beta$ -actin 的灰度比值为相对表达量。实验独立重复 3 次。

## 2.5 统计学方法

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, SPSS 13.0 软件进行分析处理。两组数据间比较采用  $t$  检验, 多组数据比较采用多因素方差分析, 生存分析采用对数秩和检验。

## 3 结果

### 3.1 AURKA、AURKB mRNA 表达水平与肝癌患者生存期相关性

如图 1 所示, AURKA 高表达患者组 ( $n=90$ ) 生存期显著低于低表达患者组 ( $n=270$ ), 中位生存期分别为 1 397、2 116 d ( $\chi^2=4.659$ ,  $P<0.05$ ); AURKB 高表达患者组 ( $n=90$ ) 生存期也显著低于低表达患者组 ( $n=270$ ), 中位生存期分别为 757、2 116 d ( $\chi^2=10.17$ ,  $P<0.05$ )。AURKA、AURKB mRNA 表达水平与肝癌患者生存期呈现明显负相关, 即 AURKA 和 AURKB 表达量越高, 肝癌患者生存期越短。

### 3.2 华蟾毒配基和蟾蜍灵对 HepG2 细胞增殖活性的影响

如图 2 所示, 不同浓度华蟾毒配基和蟾蜍灵对肝癌细胞增殖有明显的抑制作用, 且呈现浓度依赖性 ( $P<0.05$ ,  $R^2>0.8$ ), 随时间的增加, 抑制作用更加明显。华蟾毒配基作用 HepG2 细胞 24、48、72 h 的  $\text{IC}_{50}$  分别为 4.943、0.596 和 0.044  $\mu\text{mol/L}$ ; 蟾蜍灵作用 HepG2 细胞 24、48、72 h 的  $\text{IC}_{50}$  分别为 1.296、0.146、0.015  $\mu\text{mol/L}$ 。因此, 后续实验中, 选取 5  $\mu\text{mol/L}$  华蟾毒配基和 1  $\mu\text{mol/L}$  蟾蜍灵分析其对 HepG2 细胞生长抑制作用的机制。

### 3.3 华蟾毒配基和蟾蜍灵对 HepG2 细胞周期的影响

如图 3 所示, 对照组  $\text{G}_2/\text{M}$  期细胞比例为  $(11.93 \pm 0.83)\%$ , 华蟾毒配基组为  $(30.95 \pm 4.30)\%$ , 蟾蜍灵组为  $(31.47 \pm 2.55)\%$ ; 对照组 S 期细胞比例为  $(41.52 \pm 1.18)\%$ , 华蟾毒配基组为  $(51.55 \pm 3.90)\%$ , 蟾蜍灵组为  $(42.55 \pm 2.31)\%$ 。结果显示华蟾毒配基和蟾蜍灵均可使 HepG2 细胞周期阻滞

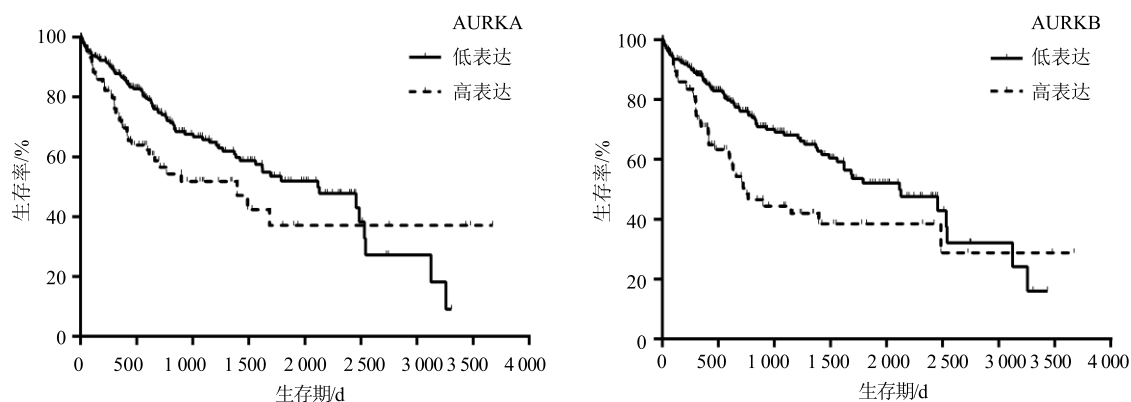
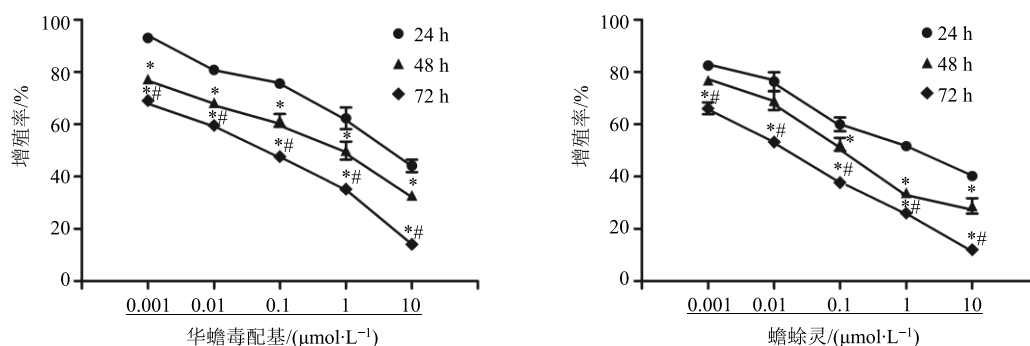


图1 AURKA 和 AURKB 的 mRNA 表达水平与肝细胞癌患者生存期相关性分析

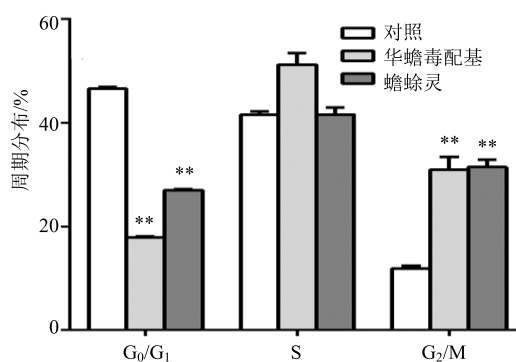
Fig. 1 mRNA expression levels of AURKA and AURKB and survival analysis of liver cancer patients



与同浓度下 24 h 组比较: \* $P < 0.05$ ; 与同浓度下 48 h 组比较: # $P < 0.05$   
\* $P < 0.05$  vs 24 h group at same concentration; # $P < 0.05$  vs 48 h group at same concentration

图 2 华蟾毒配基和蟾蜍灵对 HepG2 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effect of cinobufagin and bufalin on proliferation of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$   
\*\* $P < 0.01$  vs control group

图 3 华蟾毒配基和蟾蜍灵对 HepG2 细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of cinobufagin and bufalin on cell cycle of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

于  $G_2/M$  期, 差异显著 ( $P < 0.01$ )。

### 3.4 华蟾毒配基和蟾蜍灵对 HepG2 细胞 AURKA、AURKB、TPX2、SMC2、TOP2A 和 CDK1 蛋白表达的影响

如图 4 所示, 华蟾毒配基作用于 HepG2 细胞 6 h 后, TPX2、TOP2A 和 CDK1 蛋白的表达显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 作用 12、24 h 后, AURKA、AURKB、TPX2、SMC2、TOP2A 和 CDK1 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ )。蟾蜍灵作用于 HepG2 细胞 6 h 后, TPX2、SMC2、CDK1 及 AURKB 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ); 作用 12 h 后, AURKA、AURKB、TPX2、SMC2 和 CDK1 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 作用 24 h 后, TOP2A、AURKA、AURKB、TPX2、SMC2 和 CDK1 蛋白表达显著降

低 ( $P < 0.01$ )。

## 4 讨论

蟾酥活性成分华蟾毒配基和蟾蜍灵均属强心苷类药物, 是  $Na^+, K^+$ -ATPase (NKA) 的天然抑制因子, 除了蟾酥活性成分, 强心苷类药物包括植物来源的地高辛、哇巴因等<sup>[1]</sup>。流行病学研究显示, 地高辛可显著降低心衰的乳腺癌术后患者 5 年内病死率<sup>[6]</sup>。强心苷类药物对肝癌、胃癌以及结肠癌等均有良好的疗效<sup>[2]</sup>。以牛角瓜提取物为原料制成的半合成强心苷类药物 UNBS1450 在欧洲已经进入了临床试验研究阶段<sup>[7]</sup>。课题组前期研究发现, 华蟾毒配基能够有效抑制 NKA 活性, 引起细胞内  $Na^+$  滞留, 进而使细胞膜电压门控  $Ca^{2+}$  通道激活以及  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  交换器启动, 导致细胞内  $Ca^{2+}$  持续升高, 继而抑制细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 通路<sup>[8]</sup>。蟾蜍灵可使胃癌细胞细胞核染色质凝缩、碎裂, 造成 DNA 损伤, 使胞浆 RNA 量下降, 发挥细胞毒性作用, 进而抑制胃癌细胞生长<sup>[9]</sup>。AURK 家族蛋白在有丝分裂中调控中心体与着丝粒的功能, 并影响纺锤体的形成。AURKA 调节有丝分裂早期中心体成熟分离, 参与建立双级纺锤体<sup>[10]</sup>, 其功能的有效发挥离不开周期蛋白 B 与 CDK1 复合物 (Cyclin B-CDK1) 的正常作用。Cyclin B-CDK1 是细胞顺利进入 M 期的重要基础<sup>[11]</sup>, 并且活化的 Cyclin B-CDK1 可以使蛋白磷酸酶 1 (PP1) 失活, 而 PP1 可抑制 AURKA 活性<sup>[12]</sup>。AURKA 功能的发挥同时也离不开 TPX2 的协助, TPX2 通过协助 AURKA 共定位到微管, 亦可激发 AURKA 的活性。AURKB 能够调节有丝分裂晚期胞质分裂<sup>[13]</sup>。多数肿瘤细胞中,

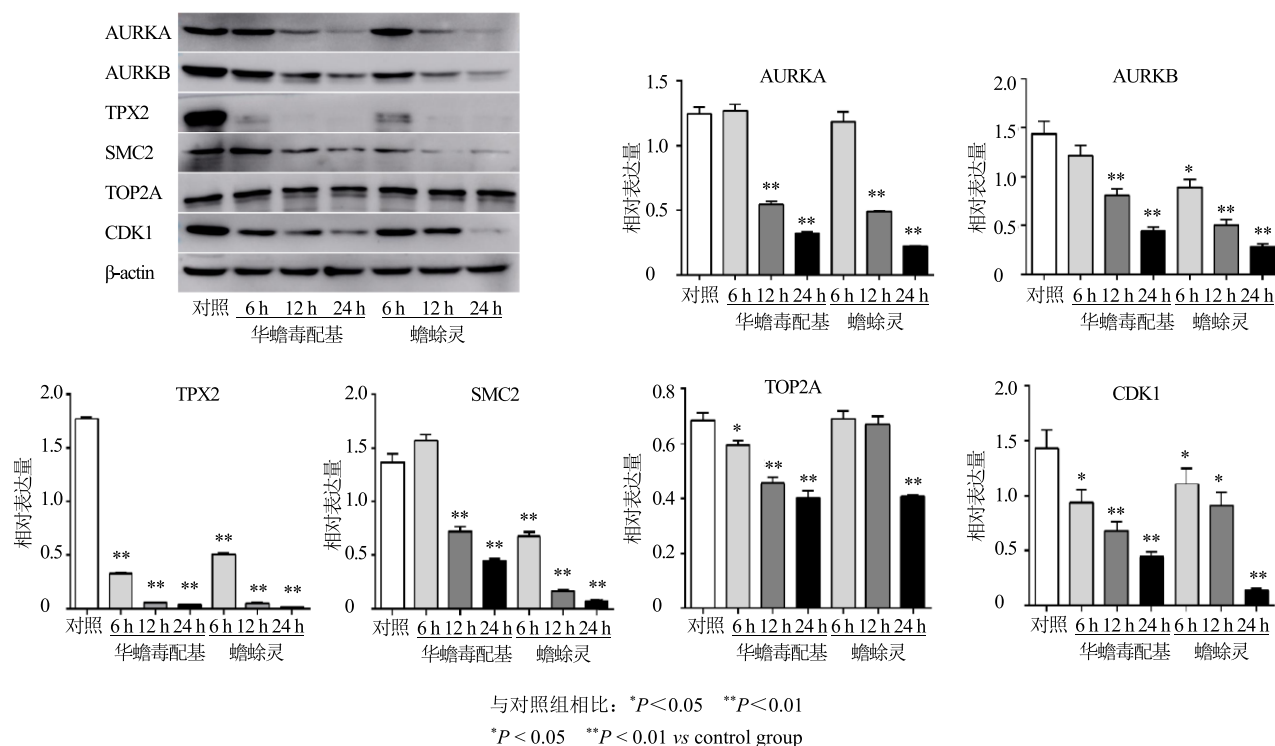


图 4 华蟾毒配基和蟾蜍灵对 HepG2 细胞 AURKA、AURKB、TPX2、SMC2、TOP2A 和 CDK1 蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effects of cinobufagin and bufalin on expression levels of AURKA, AURKB, TPX2, SMC2, TOP2A, and CDK1 in HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

AURK 家族蛋白都处于高表达状态, 有效抑制其表达对于抑制肿瘤细胞增殖有值得探索的潜力<sup>[14]</sup>。尤其是原发性肝癌患者远期生存时间与 AURK 家族蛋白表达呈显著负相关, 蛋白表达水平越高, 患者生存时间越短。因此, AURK 家族很可能可作为原发性肝癌化学治疗的潜在靶点。

本实验结果证实, 华蟾毒配基和蟾蜍灵均可引起 HepG2 细胞 G<sub>2</sub>/M 期阻滞, 并下调 AURKA、AURKB、TPX2、SMC2、TOP2A 和 CDK1 的表达, 进一步诱发纺锤体组装以及中心体分离障碍, 并导致有丝分裂末期胞质无法正常分离, 加重 G<sub>2</sub>/M 期阻滞。这可能与华蟾毒配基和蟾蜍灵可以抑制 MAPK 通路有关。并且有研究证实 AURKA 是 MAPK 通路下游的 1 个直接靶基因<sup>[15]</sup>。另一方面 MAPK 通路的活化可以促使 Cyclin B 上调<sup>[16]</sup>。Cyclin B-CDK1 又通过抑制 PP1 促进 AURKA 活性。所以 CDK1 的低表达不仅解释了肝癌细胞 G<sub>2</sub>/M 期阻滞, 而且是影响 AURKA 活性的原因。实验发现 TPX2 的表达下调在华蟾毒配基和蟾蜍灵干预 HepG2 细胞 6 h 后便出现, 而 AURKA 的表达直到

12 h 才下调, 故推测华蟾毒配基和蟾蜍灵也可能是通过抑制 TPX2 的表达来下调 AURKA 表达, 从而无法实现 AURKA 与 TPX2 的共定位, 导致纺锤体构建障碍, 引起周期阻滞<sup>[17]</sup>。由于华蟾毒配基和蟾蜍灵通过下调 AURKA 与 Cyclin B-CDK1 表达, 将肝癌细胞阻滞于有丝分裂前期, 所以作为促进有丝分裂后期胞质分离的 AURKB 表达也将出现下调, 实验中也已证实。SMC2 是凝缩蛋白的重要组成部分, 在有丝分裂后期, 其对姐妹染色单体的分离至关重要<sup>[18]</sup>。TOP2A 是许多抗癌药物的分子靶点<sup>[19]</sup>, 其表达下调抑制了染色体凝聚, 可造成染色体组装形成障碍。由此推断华蟾毒配基和蟾蜍灵可能是通过抑制 MAPK 通路, 并下调 AURKA、AURKB、TPX2、SMC2、TOP2A 和 CDK1 表达, 使染色体组装以及中心体形成障碍, 姐妹染色单体和胞质无法正常分离, 细胞不能通过 G<sub>2</sub>/M 期和纺锤体检测点, 导致细胞周期停滞于 G<sub>2</sub>/M 期, 进而抑制肝癌细胞增殖。

综上, AURKA、AURKB mRNA 的表达水平可用于判断肝癌预后, 有助于临床上选择治疗肝癌的

最优方案。而本实验发现华蟾毒配基和蟾蜍灵均能够有效下调 AURKA 和 AURKB 在 HepG2 细胞中的表达,诱发中心体分离障碍及胞质分离障碍,并调控细胞分裂相关基因的表达,加重肝癌细胞 G<sub>2</sub>/M 期阻滞,抑制其增殖。因此,作为抗肿瘤药物,蟾酥通过抑制细胞有丝分裂发挥了良好的肿瘤抑制作用。在后续实验中,将通过对 AURK 的双向调控,观察蟾酥活性成分经 MAPK 通路,以 AURK 家族蛋白为关键靶点调控肝癌细胞增殖的机制。

#### 参考文献

- [1] Mijatovic T, Van Quaquebeke E, Delest B, *et al.* Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1776(1): 32-57.
- [2] Slingerland M, Cerella C, Guchelaar H J, *et al.* Cardiac glycosides in cancer therapy: From preclinical investigations towards clinical trials [J]. *Invest New Drugs*, 2013, 31(4): 1087-1094.
- [3] Radogna F, Cerella C, Gaigneaux A, *et al.* Cell type-dependent ROS and mitophagy response leads to apoptosis or necroptosis in neuroblastoma [J]. *Oncogene*, 2016, 35(29): 3839-3853.
- [4] Raynal N J, Lee J T, Wang Y, *et al.* Targeting calcium signaling induces epigenetic reactivation of tumor suppressor genes in cancer [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(6): 1494-1505.
- [5] Xu Z, Wang F, Fan F, *et al.* Quantitative proteomics reveals that the inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity affects s-phase progression leading to a chromosome segregation disorder by attenuating the aurora a function in hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(11): 4594-4602.
- [6] Stenkvist B, Bengtsson E, Eriksson O, *et al.* Cardiac glycosides and breast cancer [J]. *Lancet*, 1979, doi: 10.1016/S0140-6736(79)90996-6.
- [7] Cerella C, Muller F, Gaigneaux A, *et al.* Early downregulation of Mcl-1 regulates apoptosis triggered by cardiac glycoside UNBS1450 [J]. *Cell Death Dis*, 2015, doi: 10.1038/cddis.2015.134.
- [8] 高默杰, 徐忠伟, 王凤梅, 等. 哇巴因和华蟾毒配基通过调节 ERK 信号通路诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的研究 [J]. 中国药房, 2010, 21(27): 2500-2503.
- [9] 陈小义, 徐瑞成, 陈莉, 等. 蟾蜍灵对人胃癌细胞系 MGC-803 的细胞毒作用 [J]. 中草药, 2000, 31(12): 920-922.
- [10] Barretta M L, Spano D, D'Ambrosio C, *et al.* Aurora-A recruitment and centrosomal maturation are regulated by a Golgi-activated pool of Src during G2 [J]. *Nat Commun*, 2016, doi: 10.1038/ncomms11727.
- [11] Bao Y, Mukai K, Hishiki T, *et al.* Energy management by enhanced glycolysis in G1-phase in human colon cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11(9): 973-985.
- [12] Barr A R, Gergely F. Aurora-A: The maker and breaker of spindle poles [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(17): 2987-2996.
- [13] Malumbres M. Physiological relevance of cell cycle kinases [J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(3): 973-1007.
- [14] Bertolin G, Sizaire F, Herbomel G, *et al.* A FRET biosensor reveals spatiotemporal activation and functions of aurora kinase A in living cells [J]. *Nat Commun*, 2016, doi: 10.1038/ncomms12674.
- [15] Furukawa T, Kanai N, Shiwa H O, *et al.* AURKA is one of the downstream targets of MAPK1/ERK2 in pancreatic cancer [J]. *Oncogene*, 2006, 25(35): 4831-4839.
- [16] Dangi S, Chen F M, Shapiro P. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in G2 phase delays mitotic entry through p21CIP1 [J]. *Cell Prolif*, 2006, 39(4): 261-279.
- [17] Glover D M. Aurora A on the mitotic spindle is activated by the way it holds its partner [J]. *Mol Cell*, 2003, 12(4): 797-799.
- [18] Davalos V, Suarez-Lopez L, Castano J, *et al.* Human SMC2 protein, a core subunit of human condensin complex, is a novel transcriptional target of the WNT signaling pathway and a new therapeutic target [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(52): 43472-43481.
- [19] Tubbs R, Barlow W E, Budd G T, *et al.* Outcome of patients with early-stage breast cancer treated with doxorubicin-based adjuvant chemotherapy as a function of HER2 and TOP2A status [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(24): 3881-3886.