

论著·基础研究

UBE3C 对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖和侵袭能力的影响

徐华丽, 刘文雪, 沈方倩, 席晓薇

上海交通大学附属第一人民医院妇产科, 上海 200080

[摘要] **目的**·探讨泛素连接酶 E3C (ubiquitin protein ligase E3C, UBE3C) 对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、侵袭能力的影响。**方法**·Western blotting 法检测 UBE3C 蛋白在不同卵巢癌细胞株和正常卵巢上皮细胞中的表达。选择卵巢癌 SKOV3 细胞株转染 si-UBE3C 下调 UBE3C 表达, 转染 ex-UBE3C 质粒上调 UBE3C 表达。CCK-8 法、平板克隆实验检测细胞增殖能力的变化, 细胞划痕、Transwell 侵袭实验检测细胞迁移、侵袭能力的变化, 并检测增殖、转移相关蛋白 β -catenin、c-Myc 的表达。**结果**·UBE3C 在卵巢癌细胞株中的表达显著高于正常卵巢上皮细胞。si-UBE3C 转染 SKOV3 细胞沉默 UBE3C 表达, 细胞增殖能力下降, 迁移及侵袭能力减弱, β -catenin、c-Myc 蛋白表达下调。ex-UBE3C 转染后 UBE3C 过表达, SKOV3 细胞增殖、迁移、侵袭能力增强, 且 β -catenin、c-Myc 蛋白表达水平升高。**结论**·UBE3C 可能通过上调 β -catenin 及 c-Myc 蛋白表达, 增强卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖、侵袭能力。

[关键词] 泛素连接酶 E3 (UBE3C); 卵巢癌; 细胞增殖; 迁移; 侵袭

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.06.005 **[中图分类号]** R737.31 **[文献标志码]** A

Effects of UBE3C on proliferation and invasion in ovarian cancer SKOV3 cells

XU Hua-li, LIU Wen-xue, SHEN Fang-qian, XI Xiao-wei

Department of Obstetrics and Gynecology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080

[Abstract] **Objective**·To explore the effects of ubiquitin protein ligase E3C (UBE3C) on proliferation and invasion in epithelial ovarian cancer SKOV3 cells. **Methods**·Western blotting was used to detect the expression difference of UBE3C in epithelial ovarian cancer cell lines and normal ovarian cell lines. SKOV3 cells were transfected with si-UBE3C to knockdown UBE3C protein level, while ex-UBE3C plasmid was used to upregulate the expression of UBE3C. Cell proliferation was measured by CCK-8 assay and colony formation assay. Wound healing assay and Transwell assay were performed to investigate the effect of UBE3C on migration and invasion. Protein levels of β -catenin and c-Myc were also detected in different groups, which were closely related to proliferation and invasion. **Results**·UBE3C was highly expressed in epithelial ovarian cancer cell lines. UBE3C was successfully silenced with si-UBE3C transfection in SKOV3 cells. Inhibition of UBE3C significantly weakened the abilities of cell proliferation, migration and invasion. A reduction of β -catenin and c-Myc protein levels was also accompanied by UBE3C knockdown. Overexpression of UBE3C with ex-UBE3C plasmid promoted the abilities of proliferation, migration and invasion. Enhanced expression levels of β -catenin and c-Myc were also verified. **Conclusion**·UBE3C promotes proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer SKOV3 cells. This might be to do with upregulation of β -catenin and c-Myc protein levels.

[Key words] ubiquitin protein ligase E3C (UBE3C); ovarian cancer; cell proliferation; migration; invasion

卵巢癌是位居女性生殖系统恶性肿瘤中的“头号杀手”, 发病机制不明, 近年来死亡率居高不下^[1]。早期诊断困难且易浸润转移的特点是卵巢癌发病率及病死率高的主要原因^[2]。因此, 探究卵巢癌细胞增殖、转移的机制可能为卵巢癌的诊治提供新思路。泛素连接酶是泛素-蛋白酶系统中的关键因子, 能介导底物识别, 决定泛素化修饰的特异性^[3-5]。泛素连接酶 E3C (ubiquitin protein ligase E3C, UBE3C) 是泛素连接酶 HECT (homologous to E6AP

C-terminus) 家族一员, 最早被发现在肝癌中有高突变率, 其 HECT 结构域的突变促进原发性肝癌的发展^[6]。目前, 已知 UBE3C 与肾透明细胞癌、黑色素瘤、乳腺癌等多种恶性肿瘤的发生、发展密切相关, 其可能在翻译后水平调节相关信号转导通路关键因子的表达水平, 影响细胞生理功能^[7-10]。然而对于 UBE3C 与卵巢癌的关系, 目前尚无相关研究。本研究旨在观察 UBE3C 对卵巢癌细胞增殖、侵袭的影响, 进一步明确 UBE3C 在卵巢癌发展中作用及机制。

[基金项目] 上海市科学技术委员会课题 (15411952300) (Foundation of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality, 15411952300)。

[作者简介] 徐华丽 (1990—), 女, 硕士生; 电子信箱: xuhualisjtu@126.com。

[通信作者] 席晓薇, 电子信箱: xixiaowei1966@126.com。



1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

兔单克隆抗体 UBE3C、c-Myc (Abcam, 美国), β -catenin、GAPDH (Cell Signaling Technology, 美国), 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) si-UBE3C、si-Con (上海吉玛制药技术有限公司), 质粒 GV230 ex-UBE3C、空白 vector (上海吉凯基因化学技术有限公司), CCK-8 试剂盒 (Dojindo, 日本), Matrigel 基质胶 (BD, 美国), Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 美国), RIPA 裂解液及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), 胎牛血清 (FBS) (Gibco, 美国), DMEM/F12 培养基 (Hyclone, 美国), 人卵巢癌细胞株 Hey、Ho8910、SKOV3、永生化卵巢浆液性囊腺瘤细胞株 MCV152、卵巢正常永生化细胞株 Moody (上海市第一人民医院妇产科研究室保存)。

1.2 细胞培养与转染

所有细胞株均用 10%FBS、DMEM/F12 培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。取对数生长期的 SKOV3 细胞接种至 6 孔板, 待细胞融合度达 80% 进行转染。采用脂质体转染剂 Lipofectamine 2000 将 si-Con、si-UBE3C、空白 vector、ex-UBE3C 分别转染至 SKOV3 细胞中。转染 6 h 后, 更换为 10%FBS、DMEM/F12 培养基, 继续置于培养箱培养供后续实验。

1.3 Western blotting 检测 UBE3C、 β -catenin 及 c-Myc 的蛋白表达

取对数生长期的不同卵巢癌细胞株, 细胞转染 48 h 提取总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度, 每组上样量 40 μ g, 计算上样体积。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 转膜至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 4 °C 孵育一抗过夜, TBST 洗膜 3 次, 抗兔二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 化学发光法 (ECL) 显影, ImageJ 软件分析条带灰度值, 计算蛋白的相对表达量。

1.4 CCK-8 实验

SKOV3 细胞转染 24 h, 胰酶消化后重悬计数, 按 4×10^4 细胞/mL 分别接种 100 μ L 至 96 孔板, 每组 5 个复孔。分别培养 6、24、48、72、96 h, 加入 CCK-8 10 μ L,

37 °C 培养箱培养 2 h 后检测 450 nm 处吸光度 [$D(450 \text{ nm})$]。

1.5 平板克隆实验

SKOV3 细胞转染 24 h, 消化计数, 每组 400 细胞/孔接种于 6 孔板, 置于完全培养基, 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 10 d, PBS 洗 2 次, 甲醇固定 20 min, 结晶紫染色计数克隆数。

1.6 细胞划痕实验

SKOV3 细胞转染 24 h, 细胞融合度达 90%, 转至 6 孔板, 培养 24 h 后, 用 100 μ L 枪头在孔板中线处划痕。加入 1% FBS 培养基, 培养 0、48 h 时倒置显微镜下拍照。

1.7 Transwell 侵袭实验

将 Matrigel 胶 1:7 稀释铺于 Transwell 小室, SKOV3 细胞转染 24 h, 消化计数, 用无血清培养基重悬, 以 1×10^5 细胞/孔接种至上室, 下室加入 600 μ L 完全培养基, 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h。小室 PBS 洗 2 次, 甲醇固定 20 min, 结晶紫染色, 光学显微镜下计数侵袭细胞数。

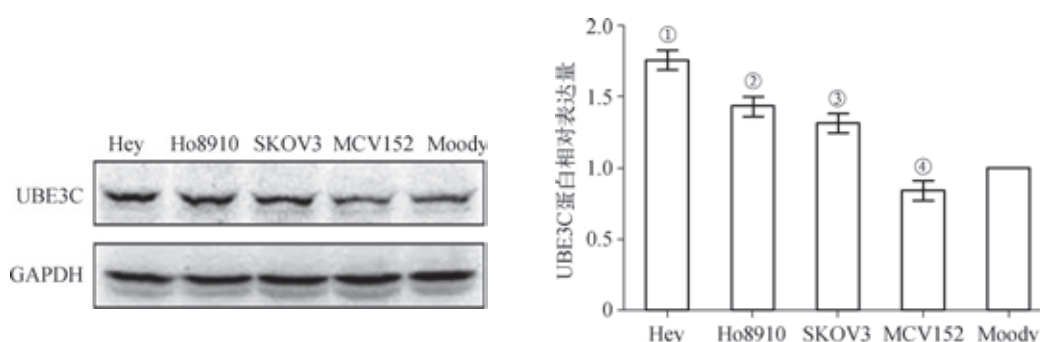
1.8 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行数据分析。每组实验至少重复 3 次, 定量数据结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异分析采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 UBE3C 在不同卵巢癌细胞株中的表达

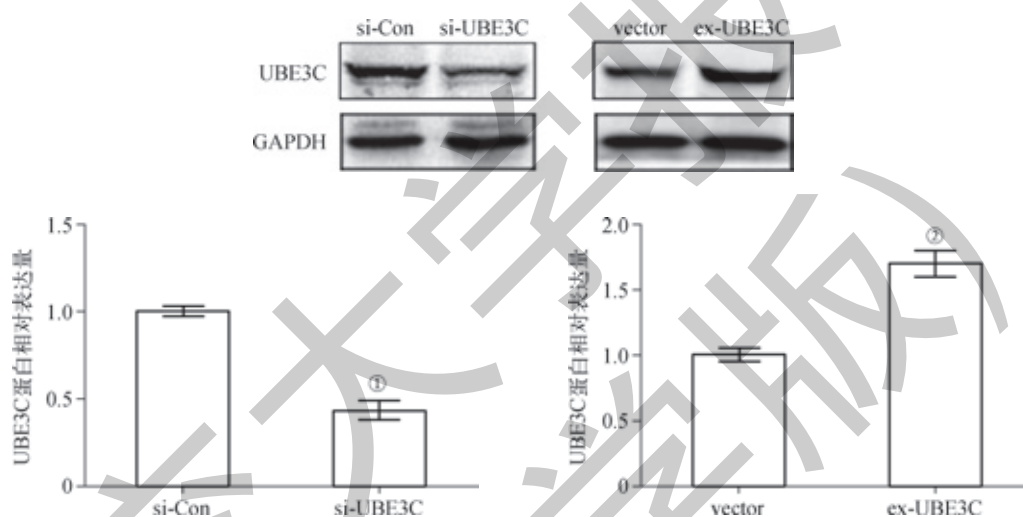
Western blotting 结果显示: UBE3C 蛋白在卵巢癌细胞株 Hey、Ho8910、SKOV3 中的表达均高于在卵巢正常永生化细胞 Moody 中的表达 ($P < 0.05$); UBE3C 蛋白在永生化卵巢浆液性囊腺瘤细胞株 MCV152 中的表达与 Moody 组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.065$) (图 1)。选择 UBE3C 高表达的 SKOV3 细胞株转染 siRNA 或过表达质粒, 转染 24 h 后, si-UBE3C 干扰组与 si-Con 组比较, UBE3C 蛋白表达水平显著降低, UBE3C 表达受抑制 ($P = 0.000$); ex-UBE3C 过表达组中 SKOV3 细胞 UBE3C 蛋白水平明显高于 vector 组 ($P = 0.000$) (图 2)。



注: ① $P=0.006$, ② $P=0.065$, ③ $P=0.003$, ④ $P=0.022$, 与 Moody 细胞比较。

图1 Moody细胞和卵巢癌细胞中UBE3C的表达水平

Fig 1 Expression of UBE3C in Moody and ovarian cancer cells



注: 转染后 UBE3C 的蛋白表达, ① $P=0.000$, 与 si-Con 组比较; ② $P=0.000$, 与空白 vector 组比较。

图2 转染后 UBE3C 的沉默及过表达

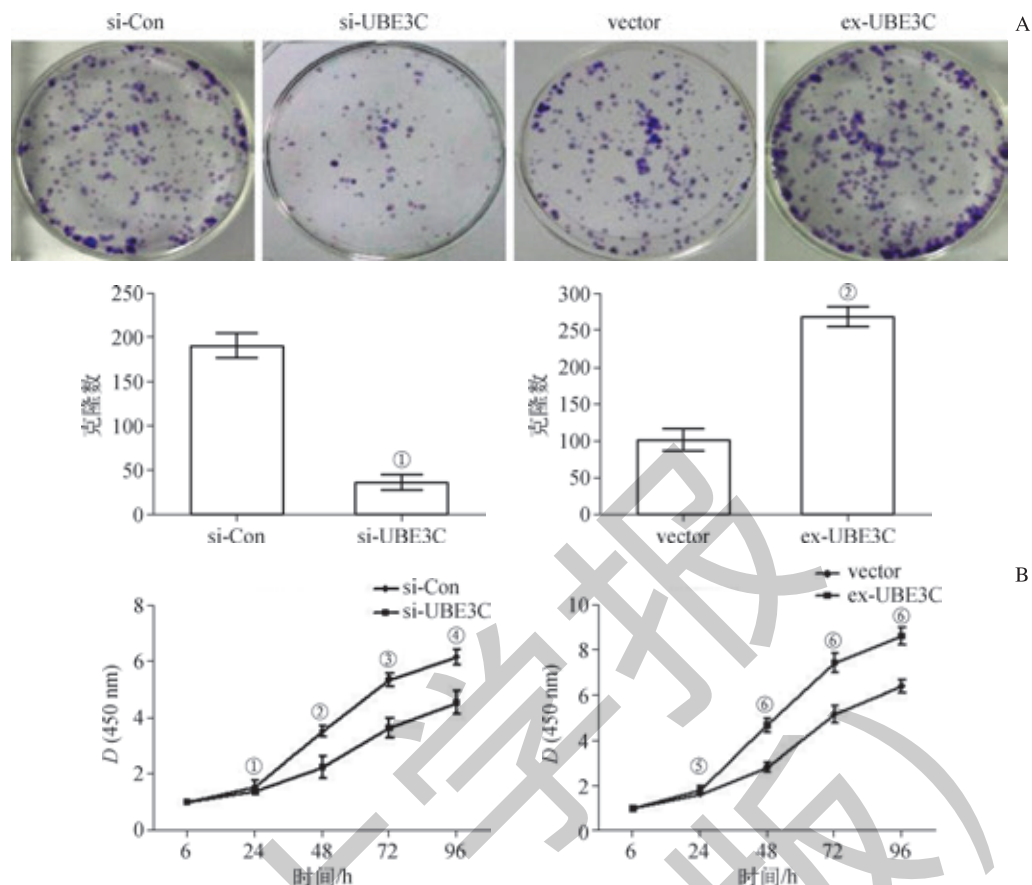
Fig 2 Knockdown and overexpression of UBE3C after transfection

2.2 UBE3C 对 SKOV3 细胞增殖能力的影响

平板克隆实验结果显示, si-UBE3C 转染 SKOV3 细胞沉默 UBE3C 的表达后, 克隆形成数目 (36.25 ± 8.38) 显著低于 si-Con 对照组 (191 ± 14.45), 而 ex-UBE3C 转染上调 UBE3C 的表达后, 克隆形成数目 (268.50 ± 14.62) 较 vector 组 (101.50 ± 13.96) 明显增多, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。CCK-8 实验结果显示, 96 孔板 SKOV3 细胞培养 24 h, UBE3C 干扰组及过表达组与对照组相比, 细胞增殖能力并无明显变化; 培养 48 h 后, si-UBE3C 组细胞增殖能力显著低于 si-Con 组, ex-UBE3C 组细胞增殖能力较 vector 组显著增强, 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 3)。

2.3 UBE3C 对 SKOV3 细胞迁移及侵袭能力的影响

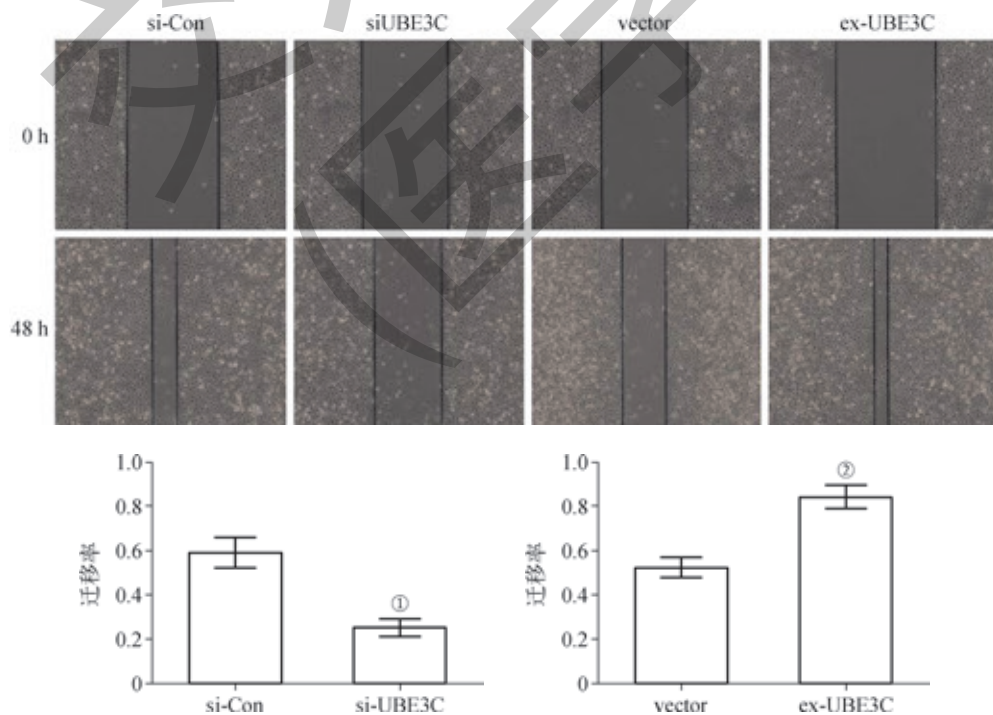
划痕实验结果表明, siUBE3C 转染组划痕 48 h 后, SKOV3 细胞迁移速率 (0.25 ± 0.04) 明显低于对照组 (0.59 ± 0.07), UBE3C 过表达组细胞的迁移速率 (0.84 ± 0.05) 显著高于空白 vector 组 (0.52 ± 0.04), 差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 4)。Transwell 侵袭实验结果显示, si-UBE3C 转染组穿膜细胞数为 (29.75 ± 7.89) 个, 与 si-Con 组的 (111.00 ± 10.10) 个相比, SKOV3 穿透细胞外基质能力降低, 穿过并黏附于聚碳酸酯膜的细胞数目减少 ($P < 0.05$); ex-UBE3C 转染组穿膜细胞数 (208.75 ± 12.45) 个, 显著高于 vector 对照组的 (119.50 ± 15.72) 个, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 5)。



注: A. 平板克隆实验 (^① $P=0.000$, 与 si-Con 组比较; ^② $P=0.000$, 与空白 vector 组比较); B. CCK-8 实验 (^⑤ $P=0.269$, ^⑥ $P=0.001$, ^⑦ $P=0.000$, ^⑧ $P=0.001$, 与 si-Con 组比较; ^③ $P=0.082$, ^④ $P=0.000$, 与空白 vector 组比较)。

图 3 UBE3C 对 SKOV3 细胞增殖能力的影响

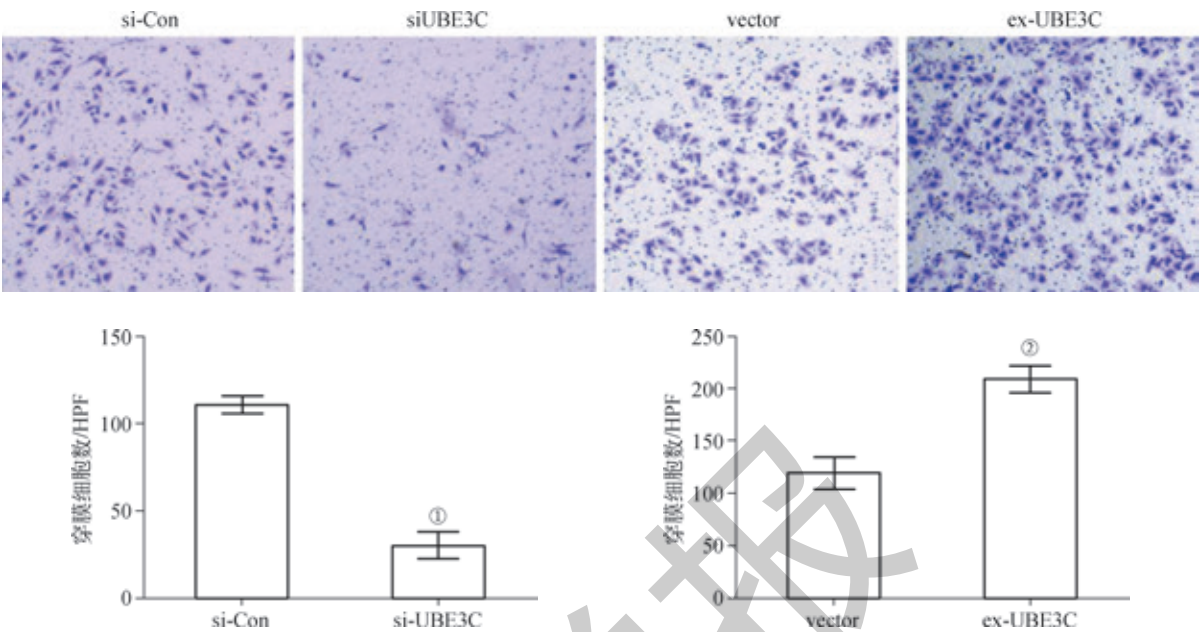
Fig 3 Effects of UBE3C on proliferation in SKOV3 cells



注: ^① $P=0.002$, 与 si-Con 组比较; ^② $P=0.001$, 与空白 vector 组比较。

图 4 划痕实验检测 UBE3C 对 SKOV3 细胞迁移能力的影响

Fig 4 Effects of UBE3C on migration in SKOV3 cells by wound healing assay



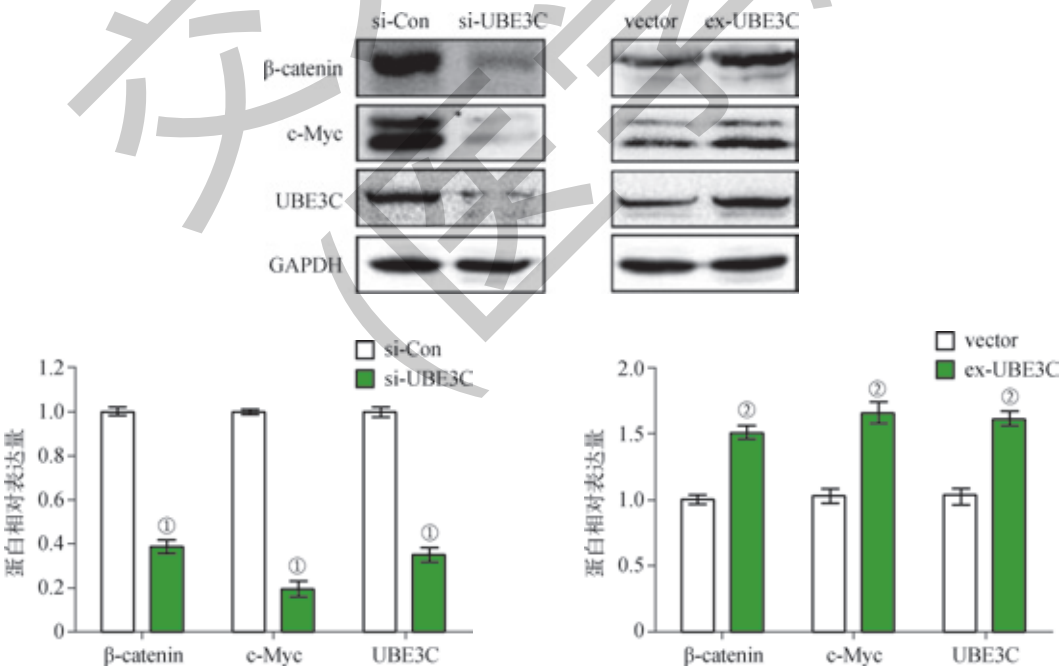
注: ① $P=0.000$, 与 si-Con 组比较; ② $P=0.000$, 与空白 vector 组比较。HPF 表示高倍镜视野。

图 5 Transwell 侵袭实验检测 UBE3C 对 SKOV3 细胞侵袭能力的影响
Fig 5 Effects of UBE3C on invasion in SKOV3 cells by Transwell assay

2.4 UBE3C 对 SKOV3 细胞 β -catenin 及 c-Myc 蛋白表达的影响

转染 siRNA 或过表达质粒后, Western blotting 检测各组 UBE3C、 β -catenin 及 c-Myc 的蛋白表达水平。结果显

示, si-UBE3C 沉默 UBE3C 表达后, β -catenin 及 c-Myc 蛋白水平显著下降, UBE3C 过表达组 β -catenin 及 c-Myc 蛋白水平显著高于 vector 对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。



注: ① $P=0.000$, 与 si-Con 组比较; ② $P=0.000$, 与空白 vector 组比较。

图 6 UBE3C 对 β -catenin 和 c-Myc 蛋白表达的调控作用
Fig 6 Expression of β -catenin and c-Myc regulated by UBE3C

3 讨论

泛素化修饰是近年来研究热点。泛素连接酶 E3 直接介导泛素与底物的特异性结合, 可能参与调控细胞周期、转录等相关信号通路^[11-14]。泛素连接酶主要分为 HECT 及 RING (Really Interesting New Gene) 2 类。UBE3C 是 HECT 家族的成员之一, 有 IQ motif 与 HECT domain 这 2 个结构域, 是由 1 083 个氨基酸组成的相对分子质量为 124 000 的蛋白, 其基因定位于人染色体 7q36.3^[6]。IQ 结构域介导底物的特异性识别, HECT 结构域与泛素结合酶 E2 连接并将泛素转移至底物。UBE3C 主要催化 K48、K29 位赖氨酸的多聚泛素化^[15-16]。研究发现, *UBE3C* 基因单核苷酸变异是与肝癌相关的遗传变异位点, UBE3C 高表达能促进肝癌细胞的增殖、迁移、侵袭^[6]。UBE3C 能直接激活 Wnt/ β -catenin 通路, 上调 c-Myc 和 cyclin-D1 的表达, 促进肾透明细胞癌的发生^[9]。并且, UBE3C 的高表达与乳腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤等多种肿瘤的发生和发展密切相关^[7-8, 10]。

为进一步明确 UBE3C 与卵巢癌的关系, 本研究检测不同卵巢癌细胞株中 UBE3C 的表达。结果显示 UBE3C 在 Ho8910、SKOV3、Hey 等 3 种卵巢癌细胞株中高表达, 在良性永生化卵巢浆液性囊腺瘤细胞株 MCV152 及卵巢正常永生化细胞株 Moody 中低表达。本研究进一步验证了 siRNA 或质粒转染 SKOV3 细胞 UBE3C 的干扰或过表达效率。用 si-UBE3C 转染 SKOV3 细胞沉默 UBE3C 的表达后, 发现 SKOV3 细胞的增殖能力下降, 克隆形成数量减少; ex-UBE3C 过表达组结果与之相反。划痕实验中,

对照组 SKOV3 细胞的迁移距离明显大于 si-UBE3C 干扰组; UBE3C 过表达后, SKOV3 细胞的迁移速度显著加快。Transwell 侵袭实验中, 沉默 UBE3C 的表达能减少穿透细胞外基质并黏附于膜底的细胞数, UBE3C 过表达组的穿膜黏附细胞数较 vector 对照组显著增加。可见, UBE3C 的表达异常可改变卵巢癌细胞的生物学行为, 使其具有更强的增殖能力及侵袭性。

国内外多项研究发现 β -catenin 与 c-Myc 在卵巢癌细胞中有异常表达, 且其高表达可能与卵巢癌细胞无限增殖、易早期转移、化疗耐药等特点相关^[17-18]。Wen 等^[9]发现 UBE3C 过表达能促进 β -catenin 在核内积聚, 从而上调靶基因 *c-Myc* 和 *cyclin-D1* 的表达。c-Myc 异常表达能调节细胞增殖、分化状态, 并与肿瘤细胞侵袭能力相关。为进一步明确 UBE3C 与 β -catenin、c-Myc 的关系, 我们用 si-UBE3C 转染 SKOV3 细胞后, Western blotting 检测 β -catenin 与 c-Myc 的蛋白表达, 结果发现 UBE3C 沉默后 β -catenin 及 c-Myc 蛋白表达均下调, 而增加外源性 UBE3C 的表达能逆转以上趋势。因此, 我们提出假设: UBE3C 在卵巢癌 SKOV3 细胞中异常激活可能影响 β -catenin 上游关键因子翻译后水平多聚泛素化修饰, 从而导致细胞内 β -catenin 积聚, 上调下游靶基因 *c-Myc* 的表达从而促进卵巢癌细胞的增殖、转移。

综上所述, 本实验结果表明 UBE3C 能上调 β -catenin 及 c-Myc 的表达, 促进卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖、侵袭; 然而, 对于 UBE3C 的直接作用靶点及具体调控机制还有待进一步研究。完善 UBE3C 在卵巢癌发生、转移中的分子作用机制, 可能为今后探索卵巢癌新的防治方法奠定基础。

参·考·文·献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] Bowtell DD, Bohm S, Ahmed AA, et al. Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(11): 668-679.
- [3] Clague MJ, Heride C, Urbe S. The demographics of the ubiquitin system[J]. Trends Cell Biol, 2015, 25(7): 417-426.
- [4] Berndsen CE, Wolberger C. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism[J]. Nat Struct Mol Biol, 2014, 21(4): 301-307.
- [5] Bernassola F, Karin M, Ciechanover A, et al. The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development[J]. Cancer Cell, 2008, 14(1): 10-21.
- [6] Jiang JH, Liu YF, Ke AW, et al. Clinical significance of the ubiquitin ligase UBE3C in hepatocellular carcinoma revealed by exome sequencing[J]. Hepatology, 2014, 59(6): 2216-2227.
- [7] Xiong J, Wei B, Ye Q, et al. MiR-30a-5p/UBE3C axis regulates breast cancer cell proliferation and migration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.03.069.
- [8] Tang L, Yi XM, Chen J, et al. Ubiquitin ligase UBE3C promotes melanoma progression by increasing epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(13): 15738-15746.
- [9] Wen JL, Wen XF, Li RB, et al. UBE3C promotes growth and metastasis of renal cell carcinoma via activating Wnt/ β -catenin pathway[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0115622.
- [10] Pan SJ, Zhan SK, Ji WZ, et al. Ubiquitin-protein ligase E3C promotes glioma progression by mediating the ubiquitination and degrading of Annexin A7[J]. Sci Rep, 2015, 5: 11066.
- [11] Teixeira LK, Reed SI. Ubiquitin ligases and cell cycle control[J]. Annu Rev Biochem, 2013, 82: 387-414.
- [12] Yu Y, Hayward GS. The ubiquitin E3 ligase RAUL negatively regulates type I interferon through ubiquitination of the transcription factors IRF7 and IRF3[J]. Immunity, 2010, 33(6): 863-877.
- [13] Besche HC, Sha Z, Kukushkin NV, et al. Autoubiquitination of the 26S proteasome on Rpn13 regulates breakdown of ubiquitin conjugates[J]. Embo J, 2014, 33(10): 1159-1176.
- [14] Chu BW, Kovary KM, Guillaume J, et al. The E3 ubiquitin ligase UBE3C enhances proteasome processivity by ubiquitinating partially proteolyzed substrates[J]. J Biol Chem, 2013, 288(48): 34575-34587.
- [15] Michel MA, Elliott PR, Swatek KN, et al. Assembly and specific recognition of k29- and k33-linked polyubiquitin[J]. Mol Cell, 2015, 58(1): 95-109.
- [16] Kristariyanto YA, Abdul Rehman SA, Campbell DG, et al. K29-selective ubiquitin binding domain reveals structural basis of specificity and heterotypic nature of k29 polyubiquitin[J]. Mol Cell, 2015, 58(1): 83-94.
- [17] Shang S, Hua F, Hu ZW. The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities[J]. Oncotarget, 2017, 8(20): 33972-33989.
- [18] Arend RC, Londono-Joshi AI, Straughn JM, Jr., et al. The Wnt/ β -catenin pathway in ovarian cancer: a review[J]. Gynecol Oncol, 2013, 131(3): 772-779.

[收稿日期] 2018-01-03

[本文编辑] 吴 洋