



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2018.11.008  
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2018.11.008  
Chinese Journal of General Surgery, 2018, 27(11):1417-1423.

• 基础研究 •

# 下调泛素蛋白连接酶 E3A 表达对三阴性乳腺癌细胞生物学行为的影响

谢少利<sup>1</sup>, 王碧娟<sup>2</sup>, 刘家有<sup>3</sup>, 李金穗<sup>1</sup>, 赵小波<sup>1</sup>, 邓世山<sup>3</sup>, 侯令密<sup>1</sup>

(1. 川北医学院附属医院 甲状腺乳腺外科, 四川 南充 637000; 2. 川北医学院第二附属医院 内科, 四川 南充 637000; 3. 川北医学院解剖学教研室, 四川 南充 637000)

## 摘要

**目的:** 探讨降低泛素蛋白连接酶 E3A (UBE3A) 的表达对三阴性乳腺癌细胞生物学行为的影响。

**方法:** 采用慢病毒载体分别将构建的 3 条 UBE3A shRNA 序列转染人三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231, 检测干扰效率后, 筛选出干扰效率最高的序列用于实验。分别采用 CCK8 法、Transwell 小室实验、流式细胞术观察 MDA-MB-231 细胞经所选用的 UBE3A shRNA 序列转染后侵袭能力、增殖能力与细胞周期的变化, 以转染阴性对照组序列和无处理的 MDA-MB-231 细胞作为阴性对照及空白对照。

**结果:** 成功构建 UBE3A shRNA 慢病毒表达载体并筛选出干扰率最高的 UBE3A shRNA 序列 (UBE3A 基因和蛋白表达抑制率分别为 89.5%、45.3%)。与空白对照组细胞比较, 下调 UBE3A 的 MDA-MB-231 细胞的增殖、侵袭能力均明显降低, 且细胞周期出现明显的 S 期阻滞 (均  $P < 0.05$ ); 阴性对照组细胞各项观察指标无统计学差异 (均  $P > 0.05$ )。

**结论:** 下调 UBE3A 表达能诱导三阴性乳腺癌细胞的细胞周期阻滞, 从而抑制其增殖与侵袭能力, 提示 UBE3A 在三阴性乳腺癌细胞的恶性生物学行为中发挥了重要作用。

## 关键词

三阴性乳腺癌; 泛素蛋白连接酶类; RNA 干扰; 细胞周期  
中图分类号: R737.9

## Effects of down-regulating expression of ubiquitin-protein ligase E3A on biological behaviors in three negative breast cancer cells

XIE Shaoli<sup>1</sup>, WANG Bijuan<sup>2</sup>, LIU Jiayou<sup>3</sup>, LI Jinsui<sup>1</sup>, ZHAO Xiaobo<sup>1</sup>, DENG Shishan<sup>3</sup>, HOU Lingmi<sup>1</sup>

(1. Department of Thyroid and Breast Surgery, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Department of Internal Medicine, the Second Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 3. Department of Anatomy, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

## Abstract

**Objective:** To investigate the effects of down-regulating the expression of ubiquitin-protein ligase E3A (UBE3A) on the biological behaviors in three negative breast cancer (TNBC) cells.

**Methods:** Three constructed UBE3A shRNA sequences were respectively transfected into the human TNBC

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (81172496); 川北医学院课题资助项目 (CBY16-A-YB14); 四川省南充市校科技战略合作项目 (18SXHZ0555)。

**收稿日期:** 2018-08-03; **修订日期:** 2018-10-13。

**作者简介:** 谢少利, 川北医学院附属医院主治医师, 主要从事甲状腺及乳腺疾病基础与临床方面的研究 (王碧娟为共同第一作者)。

**通信作者:** 侯令密, Email: southwestbreast1@163.com; 邓世山, Email: dssgeneral@163.com

MDA-MB-231 cells through lentiviral vectors, and the shRNA sequence with highest interference efficiency was selected for experiments after interference efficiency tests. In MDA-MB-231 cells after transfected with the selected UBE3A shRNA sequence, the changes in proliferation, invasion and cell cycle were determined by CCK-8 assay, Transwell invasion assay and flow cytometry respectively, using the MDA-MB-231 cells without any treatment and transfected with a scrambled sequence as blank control and negative control.

**Results:** The lentiviral vectors with UBE3A shRNA expression were successfully constructed and the UBE3A shRNA sequence with highest interference efficiency was picked up (the inhibitory rate was 89.5% for UBE3A gene and 45.3% for UBE3A protein). Compared with the cells in blank control group, the proliferative and invasion abilities were significantly decreased with significant S-phase cell cycle arrest in MDA-MB-231 cells with UBE3A down-regulation (all  $P < 0.05$ ); all the observed indexes in cells of negative control group showed no significant changes (all  $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** Down-regulating UBE3A expression can induce cell cycle arrest in TNBC cells and thereby inhibit their proliferation and invasion abilities, and suggests that UBE3A expression plays an important role in the malignant biological behaviors of TNBC cells.

**Key words** Triple Negative Breast Neoplasms; Ubiquitin-Protein Ligases; RNA Interference; Cell Cycle

**CLC number:** R737.9

三阴性乳腺癌 (three negative breast cancer, TNBC) 是乳腺癌分子分型中的一种特殊亚型, 因其特殊的生物学特性, 导致三阴性乳腺癌具有进展快、预后差等特点。因为缺乏内分泌治疗和靶向治疗的特异性位点, 所以除了化疗临床上尚无有效的综合治疗手段。蛋白质是生命功能的执行者, 正常机体蛋白质的产生与降解维持着动态平衡。其产生受基因调控, 其降解主要通过两种途径, 即溶酶体途径和泛素-蛋白酶体系统途径 (ubiquitin proteasome system, UPS), 后者因为特异性的泛素蛋白连接酶 E3 (UBE3), 导致其降解蛋白质具有高度选择性<sup>[1-2]</sup>, 正因为如此, 有越来越多的药物针对 UPS 系统作为治疗靶标<sup>[2-4]</sup>。UBE3A 为 UBE3 酶之一, 前期实验<sup>[5-9]</sup>发现, UBE3 在乳腺癌组织中比癌旁组织中高表达, 说明 UBE3A 在乳腺癌发生发展中具有促进作用。本实验通过对 shRNA 下调 UBE3A 观察三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 的生物学行为, 旨在进一步研究三阴性乳腺癌发生、发展的机制, 并期待为临床治疗和研究提供新靶点和新方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与分组

人三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231, 购于中国科学院细胞总库。将细胞分为干扰组 (转染含 UBE3A shRNA 片段的慢病毒, 包括 3 种干

扰序列, 选择干扰效率最高的干扰序列行后续实验)、空白对照组 (无任何处理)、阴性对照组 (转染含阴性对照 shRNA 序列的慢病毒)。

### 1.2 主要实验仪器

流式细胞仪购于美国 BD 公司; 倒置显微镜、荧光显微镜等购于德国 Leica; 酶标仪、SDS-PAGE 电泳仪、转膜仪、成像仪、PCR 仪购于美国 Bio-Rad 公司; CO<sub>2</sub> 细胞培养箱购于德国 Heraeus。

### 1.3 实验主要试剂

RPMI-1640 培养基、胎牛血清购于美国 HyClone 公司; UBE3A siRNAs 片段、Negative siRNA 片段、GV-115 中国上海吉凯基因化学技术有限公司, 脂质体 Lipo-2000、Trans IT 购于美国 Invitrogen; 逆转录试剂盒、PCR 引物购于美国 Thermo; Western blot 相关试剂购于中国碧云天公司; 兔抗人 UBE3A 单克隆抗体 (货号: ab126765)、兔抗人  $\beta$ -actin (货号: ab8227) 多克隆抗体购于美国 Abcam; Transwell 小室购于美国 Millipore; Matrigel 购于美国 BD。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 构建及鉴定慢病毒质粒载体** 通过 Genbank 查询人 UBE3A 基因 (NM-130839) 序列, 针对人 UBE3A 基因按 RNA 干扰序列设计原则, 设计的 3 个 RNA 干扰序列与阴性对照序列见表 1。使用 AgeI, EcoRI 内切酶在酶切反应体系中于相应酶切位点进行酶切反应, 利用 T4 DNA 连接酶进行连接反应。在制备新鲜大肠杆菌感受态细

胞内进行转化, 提取大肠杆菌质粒并将 PCR 扩增, 将 PCR 阳性克隆进行测序, 测序序列正确的重组质粒才可以进行扩增及后续实验。

表 1 设计的 shRNA 序列  
Table 1 The designed shRNA sequences

序列名称	序列信息
干扰序列 1	GAA TAC TCA AGC AAA GAA A
干扰序列 2	TAC ATC TCA TAC TTG CTT T
干扰序列 3	GAC ATT TCA GCA ACT TAT T
阴性对照	TTC TCC GAA CGT GTC ACG T

**1.4.2 包装含目的片段的慢病毒** 于 5% 的 CO<sub>2</sub> 孵箱培养用于包装慢病毒的 239T、MDA-MB-231 细胞。当细胞密度达 60%~70% 时将细胞培养基更换为无血清的 1640 培养基; 并分别加入预先混匀的 LV-UBE3A-shRNA 载体 20 μg, pHelper 2.0 载体 10 μg、pHelper 1.0 载体 15 μg 和 Lipo2000 转染溶液进行细胞转染。收集转染 48 h 后的培养 293T 细胞的上清液, 于 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 收集含目的片段的慢病毒, 并采用荧光法测病毒滴度测定以确保后续实验的准确性。

**1.4.3 感染目的细胞** 取处于对数生长期且生长状态良好的 MDA-MB-231 细胞、制成细胞悬液; 调整细胞浓度, 培养 24 h; 待细胞融合度达到约 20%~30% 时, 加入适宜量含目的片段的慢病毒, 培养 12 h 后更换培养基; 于荧光显微镜下观察感染 72 h 后细胞 GFP 的表达情况, 与普通光学显微镜下比较, 荧光率 >90% 者, 可用于后续实验。

**1.4.4 筛选最佳干扰片段** 使用 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA。同时逆转录为 cDNA, 检测各组细胞 UBE3A 基因相对表达水平, 利用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 UBE3A 相对表达水平, 筛选干扰效率最高的干扰片段。

**1.4.5 Western blot 检测蛋白表达** 各组细胞转染 72 h 后, 提取各组细胞总蛋白并进行蛋白定量, 计算含 20 μg 蛋白的溶液的体积为上样量, 按常规进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、洗膜、封闭, 加入一抗 4 °C 过夜, 再次洗膜后孵育二抗 1 h, BeyoECL Plus 试剂盒显色及成像, 以 β-actin 为内对照, 使用凝胶图像软件 Image Lab 数据分析。

**1.4.6 CCK8 法检测 UBE3A 细胞增殖** 分别于转染 24、48、72 h 后每孔加入 CCK8 试剂 10 μL,

于培养箱中孵育 1 h, 使用酶标仪选择 450 nm 波长测定吸光度值, 根据吸光度值分析细胞增值情况; 每次取 5 个复孔, 重复 3 次。

**1.4.7 Transwell 小室侵袭实验检测细胞侵袭能力** 取生长良好处于对数期的细胞, 消化后调整细胞密度至 2 × 10<sup>4</sup>/mL; 取细胞悬液 200 μL 加入 Transwell 上室, 下室加入 500 μL 含 10% 的 FBS 培养基, 常规培养 24 h, 后用 1% 的结晶紫染色微孔膜下室的细胞 10 min, PBS 轻轻冲洗干净后稍微晾干, 于倒置显微镜观察。每组 10 个高倍视野观察通过 Transwell 小室的 MDA-MB-231 细胞数量, 以反映肿瘤细胞的体外侵袭能力的大小。

**1.4.8 流式细胞术检测细胞周期情况** 取生长良好的各组细胞, 制成单个细胞悬液; 离心收集细胞, 加入 3 mL 预冷 (-20 °C) 70% 乙醇到细胞沉淀中, 重悬细胞, 于 4 °C 固定过夜; 再次离心收集细胞, 用 PBS 洗细胞 2 次后离心收集细胞, 加入 500 μL PBS 含 50 μg/mL PI、100 μg/mL RNase A、0.2% Triton X-100, 于 4 °C 避光孵育 30 min; 调整细胞密度, 设置参数, 上机检测。

## 1.5 统计学处理

计量资料采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析, 组间采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义; 使用 Graphpad 7 对结果进行绘图。

## 2 结果

### 2.1 shRNA 载体阳性克隆测序结果

将设计合成的 UBE3A 靶点序列在基因组数据库进行对比, 未发现该序列与其它编码同源, 且重组质粒经过测序分析验证, 与预期序列相符。

### 2.2 慢病毒转染效率

根据同一视野下白光和荧光细胞数目如图 1, 干扰组转染率均在 95% 以上, 可进行后续基因功能实验。

### 2.3 最有效干扰片段的筛选

慢病毒转染细胞 48 h 后, 提取各组细胞总 RNA, 应用 qRT-PCR 检测 UBE3A 及内参基因 GAPDH 的 mRNA, 获得各组细胞的扩增曲线及各组细胞 UBE3A 及 GAPDH 的 Ct 值, 利用溶解曲线判断 PCR 产物的特异性。以 GAPDH 进行标化,

使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析各基因的Ct值， $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值即为基因的相对表达量。以空白对照组为参考比较，其中阴性对照组差异无统计学意义（ $t=1.861$ ， $P=0.136$ ）；3个干扰组差异均有统计学意义（干扰序列1： $t=18.907$ ， $P=0.000046$ ；干扰序列2：t=0.196， $P=0.00000517$ ；干扰序列3： $t=71.925$ ， $P=0.00000293$ ），其中，干扰序列3的干扰效率较高，达89.5%，故采用干扰序列3序列进行后续实验（图2）。

干扰序列3： $t=71.925$ ， $P=0.00000293$ ），其中，干扰序列3的干扰效率较高，达89.5%，故采用干扰序列3序列进行后续实验（图2）。

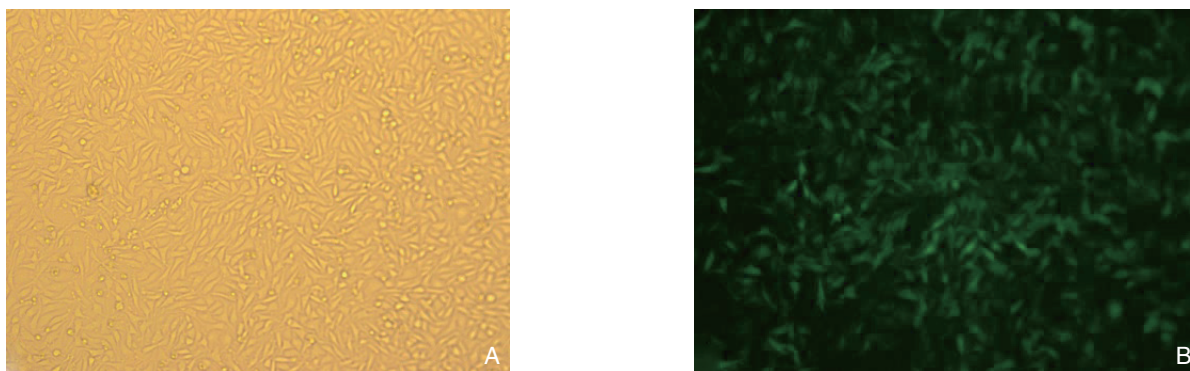


图1 慢病毒转染 48 h 后的 MDA-MB-231 细胞（同一视野， $\times 50$ ） A：普通光学显微镜下；B：荧光显微镜下

Figure 1 MDA-MB-231 cells 48 h after lentiviral transfection (the same field of view,  $\times 50$ ) A: Under light microscope; B: Under fluorescence microscope

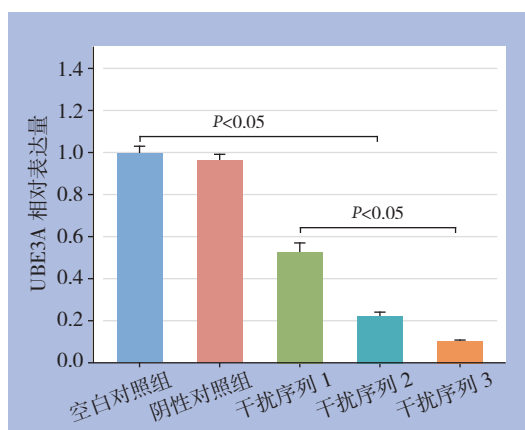


图2 各组 MDA-MB-231 细胞 UBE3A mRNA 相对表达量

Figure 2 The relative mRNA expression levels in each group of cells

#### 2.4 干扰后 UBE3A 蛋白的相对表达水平

病毒感染细胞 72 h 后，提取各组细胞总蛋白，检测 UBE3A 蛋白的相对表达水平，结果见图 3，以 Image J 进行灰度分析和标化。阴性对照组与空白对照组差异无统计学意义（均  $P > 0.05$ ），干扰组与空白对照组比较，差异有统计学意义（ $t=14.488$ ， $P=0.010$ ），其相对表达量为 54.7%，抑制率为 45.3%，可进行后续实验。

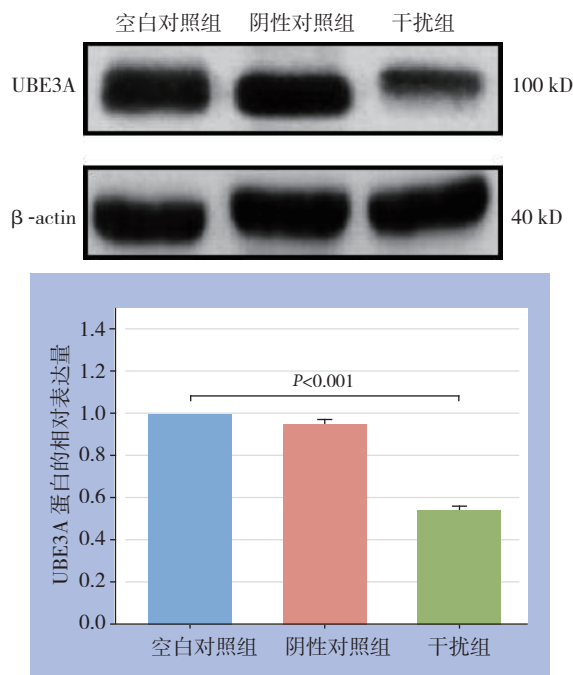


图3 Western blot 检测 UBE3A 蛋白的相对表达水平

Figure 3 The relative mRNA expression levels determined by Western blot

#### 2.5 Transwell 检测 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力

Transwell 实验结果显示，阴性对照组与空白对照组的侵袭细胞数差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ），干扰组与空白对照组相比，侵袭细胞数明显减少，差异有统计学意义（ $t=10.450$ ， $P=0.000$ ）（图 4）。

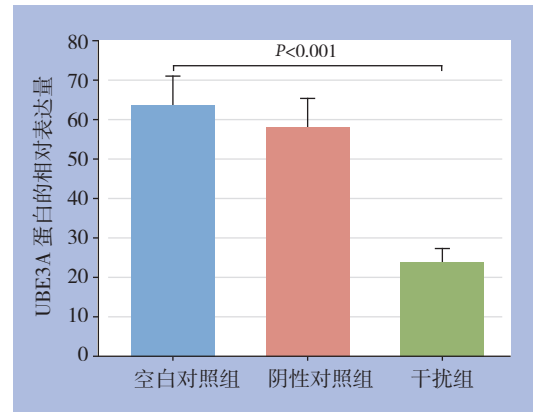
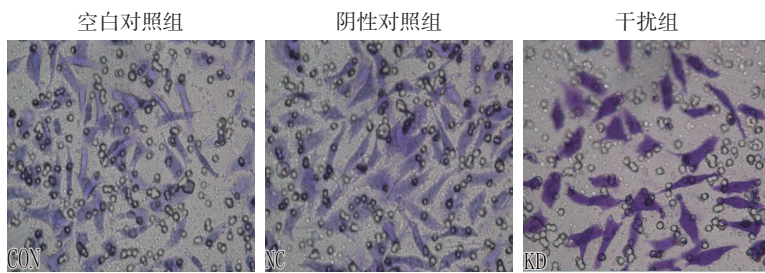


图 4 Transwell 检测各组细胞侵袭能力

Figure 4 Cell invasion abilities detected by Transwell assay

### 2.6 细胞增殖能力的变化

转染24、48、72 h后, 测各组450 nm处OD值, 阴性对照组与空白对照组相比, 各时间点差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$ ); 干扰组与空白对照组比较, 差异均有统计学意义 ( $t_{24\text{ h}} = 2.314$ ,  $P = 0.039$ ;  $t_{48\text{ h}} = 3.498$ ,  $P = 0.008$ ;  $t_{72\text{ h}} = 7.657$ ,  $P = 0.000$ ) (图5)。

### 2.7 细胞周期的变化

转染48 h后进行流式细胞术检测各组细胞周期, 3组细胞在各个周期差异均有统计学意义 ( $G_0/G_1$ 期:  $F = 243.712$ ,  $P = 0.000$ ;  $G_2/M$ 期:  $F = 29.804$ ,  $P = 0.001$ ; S期:  $F = 252.522$ ,  $P = 0.000$ )。其中阴性对照组与空白对照组在细胞周期各时期差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$ ); 干扰组与空白对照组比较, 各时期差异均有统

计学意义 (均 $P < 0.05$ ), 干扰UBE3A后, MDA-MB-231细胞大多数处于S期 (图6)。

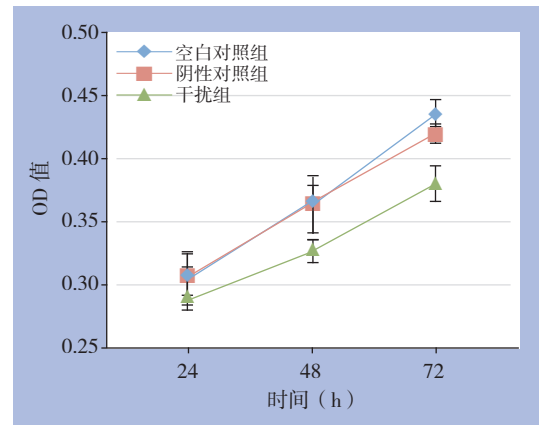


图 5 各组细胞各时间点 OD 值

Figure 5 OD values of each group of cells at different time points

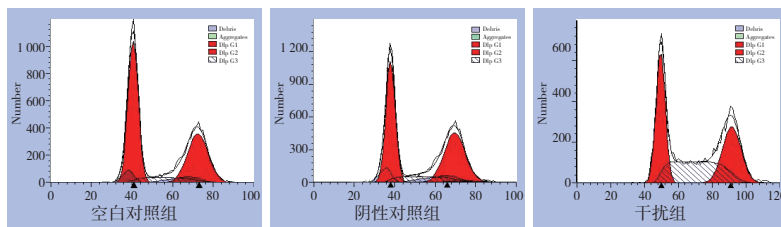
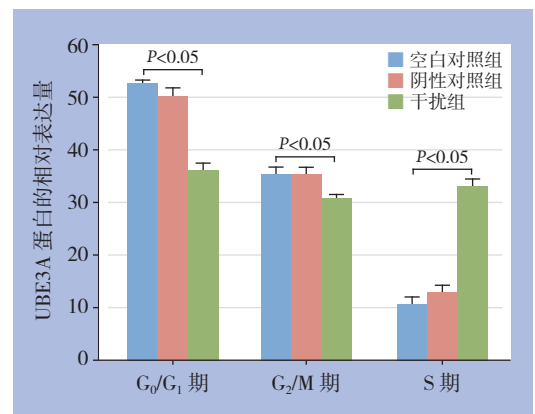


图 6 流式细胞术检测各组细胞周期

Figure 6 Cell cycles of each group of cells examined by flow cytometry



## 3 讨论

蛋白质是生命功能的执行者, 正常机体蛋白

质的产生与降解维持着动态平衡。其产生受基因调控, 其降解主要通过两种途径, 即溶酶体途径和UPS, 后者具有高度选择性<sup>[2]</sup>, 正因为如此, 有越

来越多的药物针对UPS系统作为治疗靶标<sup>[3-4, 10]</sup>, 比如bortezomib和carfilzomib靶向药物。UPS由泛素(UB)、泛素活化酶E1、泛素结合酶E2、泛素蛋白连接酶E3、泛素延长酶E4、去泛素化酶DUB(DUB)和26S的蛋白酶体组成。到目前为止, 发现少数几种E1酶, 约30种的E2酶, 约600种E3酶<sup>[11]</sup>。在UPS中由于E3酶独特的结构和功能域, 决定了其介导的靶蛋白降解反应的高度选择性与特异性。UBE3A又称E6-AP(E6 associated protein, E6-AP), 属于含有HECT结构的E3泛素蛋白连接酶家族成员。UBE3A基因可编码5种mRNA, 最终编码3种同分异构体的蛋白亚型<sup>[11]</sup>。每一种亚型的具体功能现在还不完全清楚。目前的研究<sup>[12-13]</sup>表明, UBE3A蛋白定位在细胞核中, 作为甾醇类激素受体的共激活因子调节下游基因的转录参与天使综合征(Angelic Syndrome, AS), 研究<sup>[5, 14-19]</sup>证实, 细胞内大量的基因编码的蛋白质如P53、c-myc、P27等可通过UBE3A介导的泛素-蛋白酶体系统降解, 从而促进肿瘤的发生发展。

本次选取乳腺癌细胞株MDA-MB-231来源于三阴性乳腺癌患者, 恶性程度较高, 具有较强的侵袭能力。本实验首先以UBE3A基因为靶标, 按照RNAi原则设计出3条siRNA和1条阴性对照, 按照小干扰片段设计合成shRNA表达载体, 同时使用慢病毒介导转染至MDA-MB-231细胞, 以此来增加转染效率。

细胞的增殖是活细胞在行使各种生理功能时重要的生物学特征之一, 是生物体新陈代谢的表现, 是生物体遗传、分裂繁殖、生长、发育的基础<sup>[20]</sup>。细胞的增殖周期即指细胞从一次分裂结束开始生长, 到下一次分裂结束所经历的整个过程, 可分为间期和分裂期。间期又可分为G<sub>0</sub>期(休眠期)、G<sub>1</sub>期(DNA合成前期)、S期(DNA合成期)、G<sub>2</sub>期(DNA合成后期)。因此如果阻断某些蛋白的合成如组蛋白、微管蛋白等, 细胞将停止间期而不能进入有丝分裂, 从而影响细胞周期<sup>[20]</sup>。

本实验通过慢病毒介导转染, 成功下调乳腺癌细胞MDA-MB-231 UBE3A基因及蛋白的表达。下调UBE3A后乳腺癌细胞的增殖能力较空白组及阴性对照组受到抑制, 这也应证了前期Zhou等<sup>[7]</sup>和侯令密等<sup>[8-9]</sup>的研究结果, 且下调UBE3A表达后的乳腺癌细胞与对照组相比较, 多的处于S期, 即DNA合成期。换言之, 下调UBE3A的细胞无法正

常进入分裂期, 从而显示出较低的增值能力。同时在Transwell小室侵袭实验中显示, 下调UBE3A表达后, 细胞的侵袭能力降低。这可能是因为UBE3A作为UPS中关键酶之一降解细胞周期相关的蛋白, 参与了基因的调控, 抑制了DNA的合成, 从而使下调UBE3A后的乳腺癌细胞较多的处于S期, 显示出较低的增值能力<sup>[21-22]</sup>; 还可能是因为下调UBE3A后乳腺癌细胞内某些信号通路发生改变<sup>[23-24]</sup>, 或者某些抑癌基因未受到UBE3A介导的蛋白降解<sup>[5, 21, 25]</sup>, 致使乳腺癌细胞侵袭能力减弱。

总之, 下调UBE3A表达后, 三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231细胞的增殖能力、细胞周期以及细胞的侵袭能力等生物学行为发生变化, 提示UBE3A在三阴性乳腺癌细胞中扮演着重要角色, 其可能是三阴性乳腺癌治疗的一个潜在靶标。当然其具体参与机制还有待进一步的研究。

下调UBE3A表达后, 三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231的增殖能力降低、侵袭能力降低以及细胞周期发生变化, 提示UBE3A在三阴性乳腺癌细胞中扮演着重要角色, 其可能是乳腺癌治疗的一个潜在靶标。

## 参考文献

- [1] Shi D, Grossman SR. Ubiquitin becomes ubiquitous in cancer: emerging roles of ubiquitin ligases and deubiquitinases in tumorigenesis and as therapeutic targets[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(8):737-747.
- [2] Meiners S, Evankovich J, Mallampalli RK. The ubiquitin proteasome system as a potential therapeutic target for systemic sclerosis[J]. *Transl Res*, 2018, 198:17-28. doi: 10.1016/j.trsl.2018.03.003.
- [3] Soave CL, Guerin T, Liu J, et al. Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer treatment: discovering novel inhibitors from nature and drug repurposing[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2017, 36(4):717-736. doi: 10.1007/s10555-017-9705-x.
- [4] Hyer ML, Milhollen MA, Ciavarrri J, et al. A small-molecule inhibitor of the ubiquitin activating enzyme for cancer treatment[J]. *Nat Med*, 2018, 24(2):186-193. doi: 10.1038/nm.4474.
- [5] Deng S, Zhou H, Xiong R, et al. Over-expression of genes and proteins of ubiquitin specific peptidases (USPs) and proteasome subunits (PSs) in breast cancer tissue observed by the methods of RFDD-PCR and proteomics[J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2007, 104(1):21-30. doi: 10.1007/s10549-006-9393-7.
- [6] Deng S, Wang J, Hou L, et al. Annexin A1, A2, A4 and A5 play important roles in breast cancer, pancreatic cancer and laryngeal

- carcinoma, alone and/or synergistically [J]. *Oncology Letters*, 2012, 5(1):107–112. doi: 10.3892/ol.2012.959.
- [7] Zhou X, Deng S, Liu H, et al. Knockdown of ubiquitin protein ligase E3A affects proliferation and invasion, and induces apoptosis of breast cancer cells through regulation of annexin A2[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(1):1107–1113. doi: 10.3892/mmr.2015.3549.
- [8] 侯令密, 谢少利, 陈茂山, 等. E6-AP基因在乳腺癌MDA-MB-231细胞中调节膜联蛋白A2的表达[J]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2016, 10(6):326–332. doi:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2016.06.002.
- Hou LM, Xie SL, Chen MS, et al. E6-AP gene regulates Annexin A2 expression in breast cancer MDA-MB-231 cells[J]. *Chinese Journal of Breast Disease: Electronic Version*, 2016, 10(6):326–332. doi:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2016.06.002.
- [9] 侯令密, 谢少利, 陈茂山, 等. E6相关蛋白调节膜联蛋白A2的表达对三阴性乳腺癌裸鼠移植瘤的影响[J]. *中华妇幼临床医学杂志:电子版*, 2016, 12(3):274–279. doi:10.3877/cma.j.issn.1673-5250.2016.03.005.
- Hou LM, Xie SL, Chen MS, et al. Influence of annexin A2 expression regulated by E6-associated protein on trip-negative breast cancer in nude mouse with transplantation tumor[J]. *Chinese Journal of Obstetrics & Gynecology and Pediatrics: Electronic Edition*, 2016, 12(3):274–279. doi:10.3877/cma.j.issn.1673-5250.2016.03.005.
- [10] Weathington NM, Mallampalli RK. Emerging therapies targeting the ubiquitin proteasome system in cancer[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(1):6–12. doi: 10.1172/JCI71602.
- [11] Singhmar P, Kumar A. Angelman syndrome protein UBE3A interacts with primary microcephaly protein ASPM, localizes to centrosomes and regulates chromosome segregation[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5):e20397. doi: 10.1371/journal.pone.0020397.
- [12] Greer PL, Hanayama R, Bloodgood BL, et al. The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc[J]. *Cell*, 2010, 140(5):704–716. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.026.
- [13] Krishnan V, Stoppel DC, Nong Y, et al. Autism gene Ube3a and seizures impair sociability by repressing VTA Cbln1[J]. *Nature*, 2017, 543(7646):507–512. doi: 10.1038/nature21678.
- [14] Ben Khalifa Y, Teissier S, Tan MK, et al. The human papillomavirus E6 oncogene represses a cell adhesion pathway and disrupts focal adhesion through degradation of TAp63 $\beta$  upon transformation[J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(9):e1002256. doi: 10.1371/journal.ppat.1002256.
- [15] Srinivasan S, Nawaz Z. E3 ubiquitin protein ligase, E6-associated protein (E6-AP) regulates PI3K-Akt signaling and prostate cell growth [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1809(2):119–127. doi: 10.1016/j.bbasm.2010.08.011.
- [16] Teissier S, Ben Khalifa Y, Mori M, et al. A new E6/P63 pathway, together with a strong E7/E2F mitotic pathway, modulates the transcriptome in cervical cancer cells[J]. *J Virol*, 2007, 81(17):9368–9376. doi: 10.1128/JVI.00427-07.
- [17] Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, et al. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(3):676–685. doi: 10.1002/jcb.22752.
- [18] Munakata T, Liang Y, Kim S, et al. Hepatitis C virus induces E6AP-dependent degradation of the retinoblastoma protein[J]. *PLoS Pathogens*, 2007, 3(9):1335–1347. doi: 10.1371/journal.ppat.0030139.
- [19] Kohli S, Bhardwaj A, Kumari R, et al. SIRT6 Is a Target of Regulation by UBE3A That Contributes to Liver Tumorigenesis in an ANXA2-Dependent Manner[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(3):645–658. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1692.
- [20] Santarosa M, Del Col L, Viel A, et al. BRCA1 modulates the expression of hnRNPA2B1 and KHSRP[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(23):4666–4673. doi: 10.4161/cc.9.23.14022.
- [21] Li Y, Huang J, Zeng B, et al. PSMD2 regulates breast cancer cell proliferation and cell cycle progression by modulating p21 and p27 proteasomal degradation[J]. *Cancer Lett*, 2018, 430:109–122. doi: 10.1016/j.canlet.2018.05.018.
- [22] Raghu D, Paul PJ, Gulati T, et al. E6AP promotes prostate cancer by reducing p27 expression[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(26):42939–42948. doi: 10.18632/oncotarget.17224.
- [23] Martínez-Noël G, Luck K, Kühnle S, et al. Network Analysis of UBE3A/E6AP-Associated Proteins Provides Connections to Several Distinct Cellular Processes[J]. *J Mol Biol*, 2018, 430(7):1024–1050. doi: 10.1016/j.jmb.2018.01.021.
- [24] Wu JS, Zhang PM, Sun LJ, et al. Liguisticum wallichii inhibits renal carcinoma progression by downregulating UBE3A and through suppression of NF- $\kappa$ B signaling[J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(4). doi: 10.4238/gmr15049023.
- [25] Sailer C, Offensperger F, Julier A, et al. Structural dynamics of the E6AP/UBE3A-E6-p53 enzyme-substrate complex[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):4441. doi: 10.1038/s41467-018-06953-0.

( 本文编辑 姜晖 )

本文引用格式: 谢少利, 王碧娟, 刘家有, 等. 下调泛素蛋白连接酶E3A表达对三阴性乳腺癌细胞生物学行为的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(11):1417–1423. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2018.11.008

Cite this article as: Xie SL, Wang BJ, Liu JY, et al. Effects of down-regulating expression of ubiquitin-protein ligase E3A on biological behaviors in three negative breast cancer cells[J]. *Chin J Gen Surg*, 2018, 27(11):1417–1423. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2018.11.008