

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00190

食管癌细胞抗失巢凋亡基因 *UBCH7* 的发现与鉴定

杨扬^{1,2}, 王博石², 汪晓敏², 张钰², 王明荣², 贾雪梅¹

1. 安徽医科大学组织胚胎学教研室, 合肥 230032;
2. 中国医学科学院北京协和医学院 肿瘤医院肿瘤研究所, 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021

摘要: 失巢凋亡(Anoikis)是细胞失去与细胞外基质(Extra-cellular matrix, ECM)粘附时发生的特殊形式的凋亡, 是机体维持组织稳态的关键机制之一。抗失巢凋亡能力的获得是肿瘤细胞发生远处转移的前提条件之一。为了鉴定与食管癌细胞抗失巢凋亡相关的基因, 文章首先构建食管癌细胞系的逆转录病毒文库, 感染对失巢凋亡敏感的 NIH3T3 细胞, 利用感染病毒 cDNA 文库的混合细胞系进行软琼脂集落形成实验, 挑取在悬浮条件下仍可生长成为较大集落的细胞单克隆(潜在具有抗失巢凋亡能力的细胞), 通过逆转录病毒载体特异的引物 PCR 扩增失巢凋亡抗性克隆基因组中的插入 cDNA 片段, 以此获得食管癌细胞系 cDNA 文库中潜在的具有失巢凋亡抗性的基因。经测序发现其中一个失巢凋亡克隆中整合的 cDNA 片段包括人 *UBCH7/UBE2L3* 基因全长的编码序列(开放阅读框)。利用携带 pMSCV-UBCH7 的逆转录病毒感染 NIH3T3 细胞进行验证, 结果显示细胞失巢凋亡抗性增强, 并且在具有高转移潜能的食管癌细胞系 MLuC1 中下调 *UBCH7* 表达可减弱其失巢凋亡抗性。这些结果表明, *UBCH7/UBE2L3* 是一个与食管癌失巢凋亡抗性相关的基因。

关键词: 失巢凋亡; 食管癌(ESCC); 逆转录病毒 cDNA 文库筛选; *UBCH7*

Screening and identification of anoikis-resistant gene *UBCH7* in esophageal cancer cells

YANG Yang^{1,2}, WANG Bo-Shi², WANG Xiao-Min², ZHANG Yu², WANG Ming-Rong², JIA Xue-Mei¹

1. Department of Histology and Embryology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;
2. State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute (Hospital), Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China

Abstract: Anoikis is a kind of programmed cell death induced by loss of extracellular matrix (ECM) adhesion, which is one of key factors for homeostasis. Resistance to anoikis is required for tumor cell metastasis. We have previously shown several anoikis-resistance genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). In order to find novel anoikis-resistant genes in ESCC, we constructed retroviral cDNA library using total RNA from ESCC cell lines. NIH 3T3 cells, which are

收稿日期: 2011-10-18; 修回日期: 2011-12-10

基金项目: 国家高技术研究发展规划(863 计划)项目(编号: 2009AA022706)和中国医学科学院分子肿瘤学国家重点实验室开放基金(编号: SKL-KF-2011-01)资助

作者简介: 杨扬, 硕士研究生, 专业方向: 人体解剖与组织胚胎学。E-mail: yang95618373@163.com

通讯作者: 贾雪梅, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤遗传学。E-mail: jiaxueme@126.com

王明荣, 教授, 博士生导师, 研究方向: 癌变分子机理及肿瘤分子标志。E-mail: wangmr2015@126.com

网络出版时间: 2012-1-11 14:35:52

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120111.1435.005.html>

sensitive to anoikis, were infected with the library constructed. The cells were cultured in soft agar, and the clones which can survive in detached states were selected. The cDNAs inserted into the anoikis-resistant NIH3T3 clones were amplified using retroviral specific primers. Sequencing analysis showed that a cDNA fragment inserted into the anoikis-resistant clone contains full coding sequence (ORF) of human *UBCH7/UBE2L3* gene. By infection with retrovirus encoding *UBCH7* ORF (pMSCV-UBCH7), forced expression of *UBCH7* increased the anoikis-resistance of NIH3T3 cells. More importantly, knockdown of *UBCH7* expression by siRNA transfection reduced the anoikis-resistant ability of esophageal cancer MLC1 cells. The data suggest that *UBCH7/UBE2L3* gene would be involved in anoikis-resistance in ESCC.

Keywords: anoikis; esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); retroviral cDNA library screen; *UBCH7*

失巢凋亡(Anoikis)是细胞在失去与基质的黏附时发生的一种特殊形式的凋亡,正常的上皮细胞、内皮细胞以及成纤维细胞等在脱离细胞外基质后会发​​生失巢凋亡。相反,多数肿瘤细胞对失巢凋亡并不敏感,它们在脱离细胞外基质后仍可存活并增殖,继而突破原发灶周围的组织屏障侵入循环系统,随血液和淋巴液流动,粘附于适宜的继发器官,存活并形成转移灶^[1,2]。因此,肿瘤细胞抵抗失巢凋亡的能力与其转移潜能密切相关^[3]。细胞体外培养时需要附着于培养皿壁生长,培养皿壁为细胞提供类似于细胞外基质的粘附信号,而如果细胞失去培养皿壁的支持,处于悬浮状态的细胞将失去这种粘附信号,模拟细胞失去细胞外基质的状态。因此,体外实验常用软琼脂或Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) PolyHEMA使体外培养的细胞保持悬浮状态来研究细胞的基质非依赖性生长(Anchorage-independent growth)和细胞的失巢凋亡抗性。

失巢凋亡的分子机制与其他凋亡途径有共同之处,但亦存在自身特点。目前已发现的与失巢凋亡调节相关的基因包括癌基因*Src*、*Ras*、*EGFR*,抑癌基因*p53*、*Bcl-2*、*Bcl-xL*、*Bim*等*Bcl-2*家族成员,以及*Integrins*、*ILK*、*FAK*、*TrkB*、*Bmf*等分子。同时,失巢凋亡抵抗涉及多条不同的信号传导通路,而且具有组织来源的特异性,其中PI3K-Akt和MEK-Erk最为常见^[4,5],但总体而言,肿瘤细胞抵抗失巢凋亡的分子机制还远未阐明。

本课题组近年来相继鉴定出多个与食管癌细胞失巢凋亡抗性密切相关的基因,包括*CTTN*^[6]、*SKP2*^[7]和*CRT*^[8]等,并对这些基因在体内外的功能作用及其分子机制进行了深入研究。同时,我们发现尽管这些基因都可参与ESCC细胞失巢凋亡抗性

的调节,但它们是通过不同的信号通路发挥作用,这些结果显示ESCC细胞中存在复杂的信号网络以适应宿主微环境,从而赋予ESCC细胞更强的转移潜能。为系统地分离、鉴定失巢凋亡抗性基因,进一步揭示与ESCC细胞失巢凋亡相关的分子机制,本研究采用高通量的功能筛选技术,在食管癌cDNA文库中筛选抗失巢凋亡基因。最终经过验证,我们发现*UBCH7*基因是一个新的与食管癌失巢凋亡抗性相关的基因。

1 材料和方法

1.1 细胞系培养与转染

人类食管癌细胞系 YES2、KYSE30、KYSE 150、KYSE 180、KYSE450 由日本东京大学 Shimada 教授惠赠; EC9706、MLuC1 由本实验室构建; NIH3T3、293T 细胞购买自北京协和医学院基础所细胞中心。YES2、KYSE30、KYSE 150、KYSE 180、KYSE450、EC9706 细胞由含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基(Invitrogen 公司)培养, NIH3T3、293T 细胞由含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基(Invitrogen 公司)培养。siRNA 的细胞转染使用 Lipofectamine 2000 (Incitrogen 公司),质粒的细胞转染使用 Neofectin (BioLab 公司),均按照试剂盒说明书操作。

1.2 RNA 提取与全长 cDNA 文库的构建

使用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司)提取食管癌细胞系(YSE2、KYSE30、KYSE150、KYSE180、KYSE450、EC9706)的总 RNA; 使用 CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction Kit(Clontech 公司)按说明书步骤构建食管癌细胞系全长cDNA文库,并将cDNA文库进而构建于经实验室改造过的

含有 *Sfi* A 和 *Sfi* B 酶切序列的 pMSCV-neo 病毒载体中。使用 Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega 公司) 提取食管癌全长 cDNA 文库质粒。

1.3 逆转录病毒 cDNA 文库的构建与靶细胞感染

采用 MMLV(eco) 逆转录病毒包装系统 (Clontech 公司), 包装逆转录病毒文库时在 10 mm 培养皿中培养 293T 细胞, 当达到 95% 汇合度时, 将 4 μ g pMSCV-cDNA 文库质粒、4 μ g pVPack-GP 质粒、4 μ g pVPack-Eco 质粒共转染 293T 细胞 (对照组将 pMSCV-GFP 质粒与 pVPack-GP 质粒、pVPack-Eco 质粒共转染 293T 细胞)。转染后的 48 h、72 h 分别收取 293T 细胞的培养上清 (含包装成功的 MMLV 逆转录病毒颗粒) 感染 NIH3T3 细胞。24 h 后用含 500

μ g/mL 的培养基筛选 NIH3T3 细胞, 14 d 后未经病毒感染的对照 NIH3T3 细胞已经全部死亡, 感染组剩余的细胞为感染阳性的细胞。

1.4 利用软琼脂集落筛选失巢凋亡抗性的细胞克隆

底层琼脂: 0.5% Agar; 上层琼脂: 0.33% Agar。将感染食管癌逆转录病毒文库的 NIH3T3 细胞以 10^5 细胞/皿悬浮生长于两层琼脂之间, 21 d 后挑取软琼脂中形成集落的细胞克隆, 在细胞培养瓶中贴壁扩大培养。

逆转录病毒 cDNA 文库筛选实验的总流程见图 1。

1.5 细胞基因组 DNA 提取与外源 cDNA 的 PCR 扩增

利用基因组 DNA 提取试剂盒 (Qiagen 公司) 提取抗失巢凋亡细胞的基因组 DNA, 用病毒特异引物 (pMSCV 5' 引物: CCCTTGAACCTCCTCGTTCG

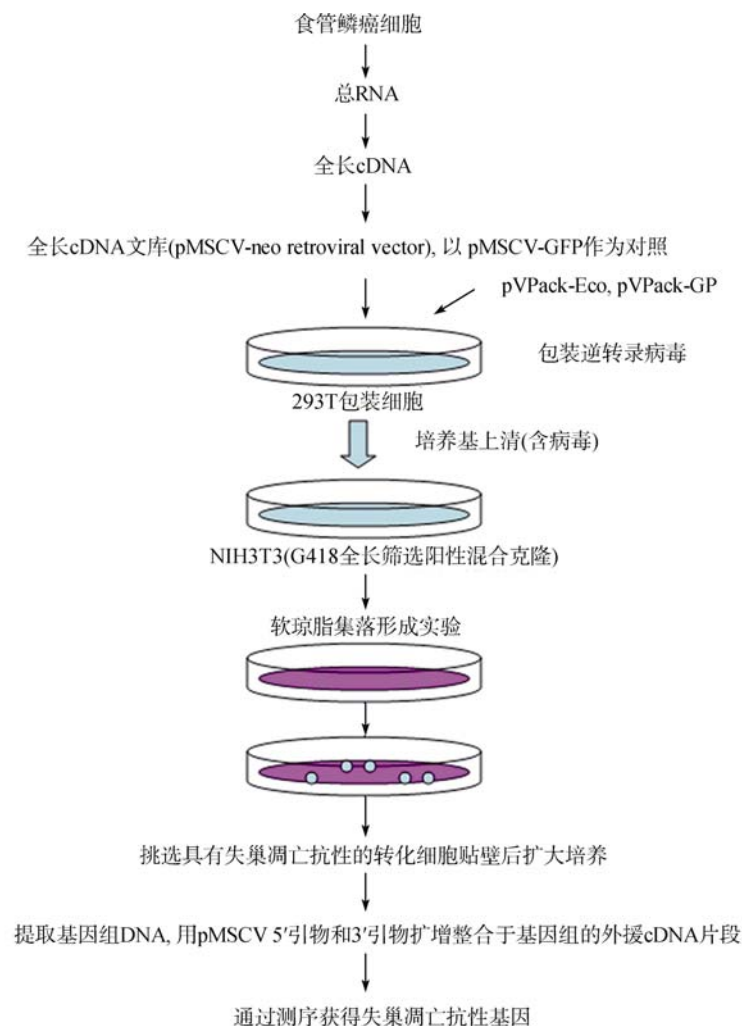


图 1 逆转录病毒 cDNA 文库筛选失巢凋亡抗性基因流程图

ACC; pMSCV 3' 引物: GAGACGTGCTACTTCCA TTTGTC) 从中扩增整合于细胞基因组 DNA 中的外源 cDNA 序列。用 PrimeSTAR DNA 聚合酶(TaKaRa 公司)进行 PCR 扩增, 条件为: 95 变性 10 s, 55 复性 5 s, 72 延伸 5 min, 30 个循环后 72 再延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 用凝胶回收纯化试剂盒(Promega 公司)切胶回收 DNA 条带, 经 pEASY-Blunt 载体(北京 Transgene 公司)分子克隆后进行 DNA 测序。

pMSCV-neo 逆转录病毒载体的结构以及从抗性克隆基因组 DNA 中扩增外源 cDNA 片段原理见图 2。

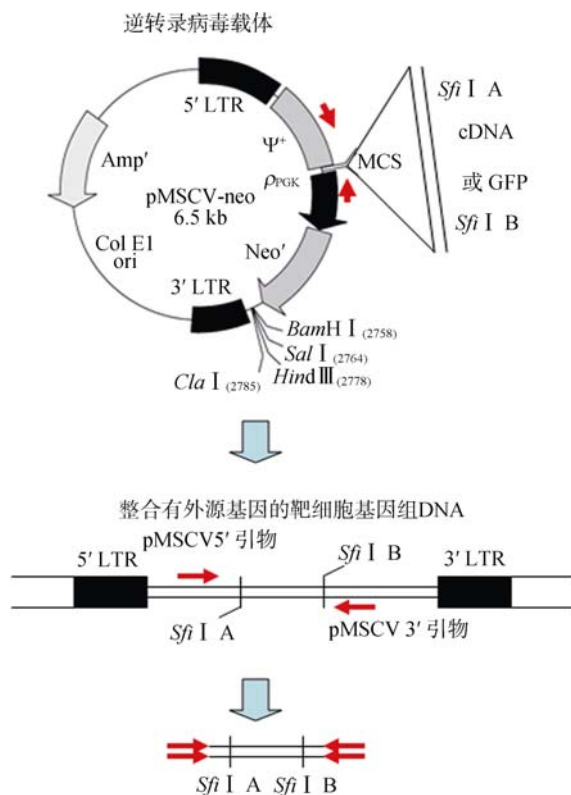


图 2 逆转录病毒载体 pMSCV-neo 结构图及整合外源基因 PCR 扩增示意图

1.6 *UBCH7* 逆转录病毒表达载体、siRNA 与抗体

UBCH7 全长 cDNA 由 PCR 扩增后连接 pMSCV 载体构建成 *UBCH7* 逆转录病毒表达载体, 逆转录病毒包装及靶细胞感染过程见上(1.3 节)。针对目的基因设计 siRNA 干扰序列:

Nonsilencing siRNA: 5'-TTCTCCGAACGTGT CACGT-3';

UBCH7 siRNA-1: 5'-GGTTGATGAAGCTAATT A-3';

UBCH7 siRNA-2: 5'-GGCAGTTACTAACTTTC TA-3'。

UBCH7 抗体(AP2117b)购自百奇生物科技有限公司。

1.7 细胞失巢凋亡检测

siRNA 或质粒转染 MuCL1 细胞 48 h 后, 将细胞接种于 PolyHEMA 包被的平皿中, 诱导细胞悬浮生长 16 h, 收获细胞进行失巢凋亡的检测。使用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒(欣博盛公司)对待测细胞染色, 通过流式细胞仪检测细胞凋亡比例。

1.8 Western blotting

取等量蛋白样品(10~100 μ g, 根据所检测蛋白在细胞中的丰度及所用抗体灵敏度而定), 加入上样缓冲液, 沸水浴中变性 5 min, 冰上冷却后瞬时离心, 上样。先以 80 V 电压电泳至染料前沿到达分离胶与积层胶交界时, 将电压调整为 100 V, 电泳至染料到达分离胶下沿。采用半干式电转仪将蛋白从分离胶转移至 PVDF 膜。裁剪与凝胶大小相同的 Whatman 3M 滤纸和 PVDF 膜(北京普利莱基因技术公司)。PVDF 膜先在甲醇中浸泡 10 s, 然后在 ddH₂O 浸泡 5 min 后再转至转膜缓冲液中浸泡; 分离胶在转膜缓冲液中浸泡大概 10 min; 滤纸用转膜缓冲液浸湿, 按从阳极到阴极的顺序依次加滤纸-PVDF 膜-分离胶-滤纸, 以 12 V 恒压转移 2 h。将 PVDF 膜放入封闭液中(TBST/5% 脱脂奶粉), 室温封闭 1 h。加入一抗(用封闭液稀释), 4 $^{\circ}$ C 过夜杂交。用 TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min。加入二抗(1:5000 稀释), 室温孵育 1 h。用 TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 再用 TBS 漂洗 1 次。将 ECL(北京普利莱基因技术公司)的 A 液和 B 液等量混合, 均匀地滴在 PVDF 膜上, 室温孵育 1 min。沥尽多余的液体, 用保鲜膜覆盖, 显影。

1.9 统计学检验

对照组与实验组的差异显著性检验: 重复 3 次实验后进行 *t* 检验(由 GraphPad Prism 5 软件进行统计学计算与作图)。

2 结果与分析

2.1 食管癌细胞系逆转录病毒 cDNA 文库的构建与功能筛选

为高通量筛选食管癌的抗失巢凋亡基因, 本研

究设计并进行了逆转录病毒 cDNA 文库功能筛选实验。分别使用 pMSCV-GFP 和 pMSCV-cDNAs 质粒作为对照组和实验组,按图 1 的流程筛选到多个失巢凋亡抗性的克隆(图 3A)。

2.2 抗失巢凋亡克隆的鉴定

将获得的失巢凋亡抗性克隆扩大培养,发现大部分克隆与感染 pMSCV-GFP 的 NIH3T3 细胞形态有明显差别(图 3B),提取其基因组 DNA。利用逆转录病毒特异性的 pMSCV5'和 pMSCV3'引物扩增基因组中的外源插入基因,结果显示亲本 NIH3T3 细胞组未扩增出产物,感染 pMSCV-GFP 靶细胞组特异地扩增了 GFP cDNA,证明了病毒引物的特异性

(图 4)。从文库筛选后的细胞中,扩增出各种长度的 cDNA。经测序和数据库比对,从一个失巢凋亡抗性细胞中克隆到了人 *UBCH7/UBE2L3* 基因(GENE ID: 7332)。

2.3 *UBCH7* 在 NIH3T3 细胞和食管癌细胞系中的失巢凋亡抗性的验证

为验证逆转录病毒文库功能筛选实验的准确性,在 NIH3T3 中高表达 *UBCH7* 基因,发现可显著增强 NIH3T3 细胞失巢凋亡抗性(图 5)。

与此同时,以具有高转移潜能、高失巢凋亡抗性、且高表达 *UBCH7* 蛋白的 MLC1 食管癌细胞系作为模型^[9,19],利用两个特异性 siRNA 序列敲降

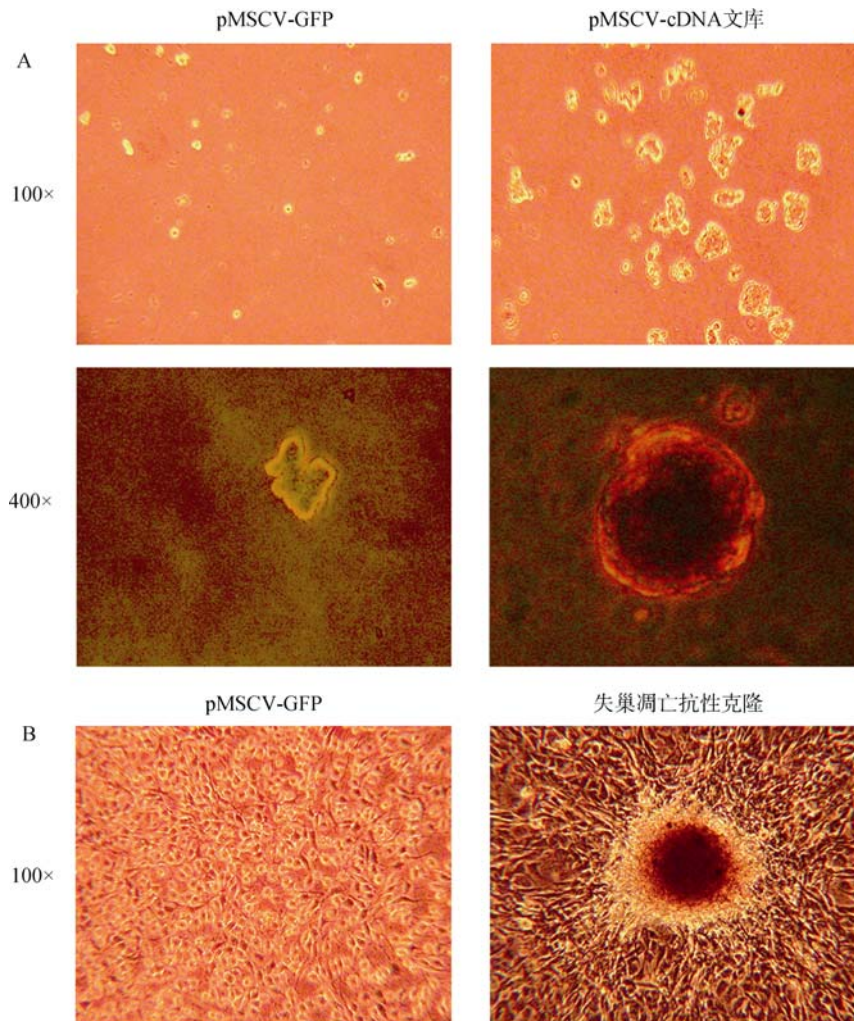


图 3 筛选后形成失巢凋亡抗性克隆集落

A: 软琼脂集落中悬浮 21 d 后,逆转录病毒文库感染的 NIH3T3 细胞中形成多个具有失巢凋亡抗性的细胞集落; B: 贴壁扩大培养具有失巢凋亡抗性的细胞克隆与感染 pMSCV-GFP 的 NIH3T3 细胞。

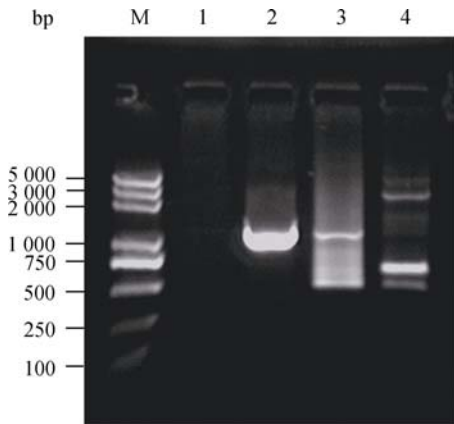


图 4 病毒特异引物扩增产物电泳图
M :Trans2000 plus DNA marker; 1 :亲本 NIH3T3 细胞基因组 DNA; 2 :感染 pMSCV-GFP 靶细胞基因组 DNA; 3 :感染 pMSCV-cDNA 的靶细胞基因组 DNA; 4 :感染 pMSCV-cDNA 并经过软琼脂生长筛选后的抗失巢凋亡混合克隆基因组 DNA。分别以上述 DNA 为模版, 用病毒特异的 pMSCV5' 和 pMSCV3' 引物进行 PCR 扩增。

MLuC1 细胞中 *UBCH7*, 观察发现降调 *UBCH7* 表达后, 导致 MLuC1 细胞失巢凋亡抗性显著降低(图 6)。

3 讨论

获得功能(Gain of function)性的逆转录病毒 cDNA 文库筛选技术是一种针对某一特定表型, 筛选其相关基因的高通量技术, 其优点是可以一次性发现多个与某一表型相关的基因, 但缺点是与近来发展的基于 RNAi 的功能缺失(Loss of function)筛选技术相比假阳性率较高, 是否能够筛选到重要基因的随机性较大。尽管如此, 该技术操作相对简单, 费用低, 仍然被广泛应用, 并且藉此技术已发现了某些肿瘤相关的重要基因, 甚至是融合基因、异常的转录本或突变基因 [10, 11]。这些是基于 RNAi 的功能缺失筛选技术无法实现的。目前, 有研究将 cDNA 文库

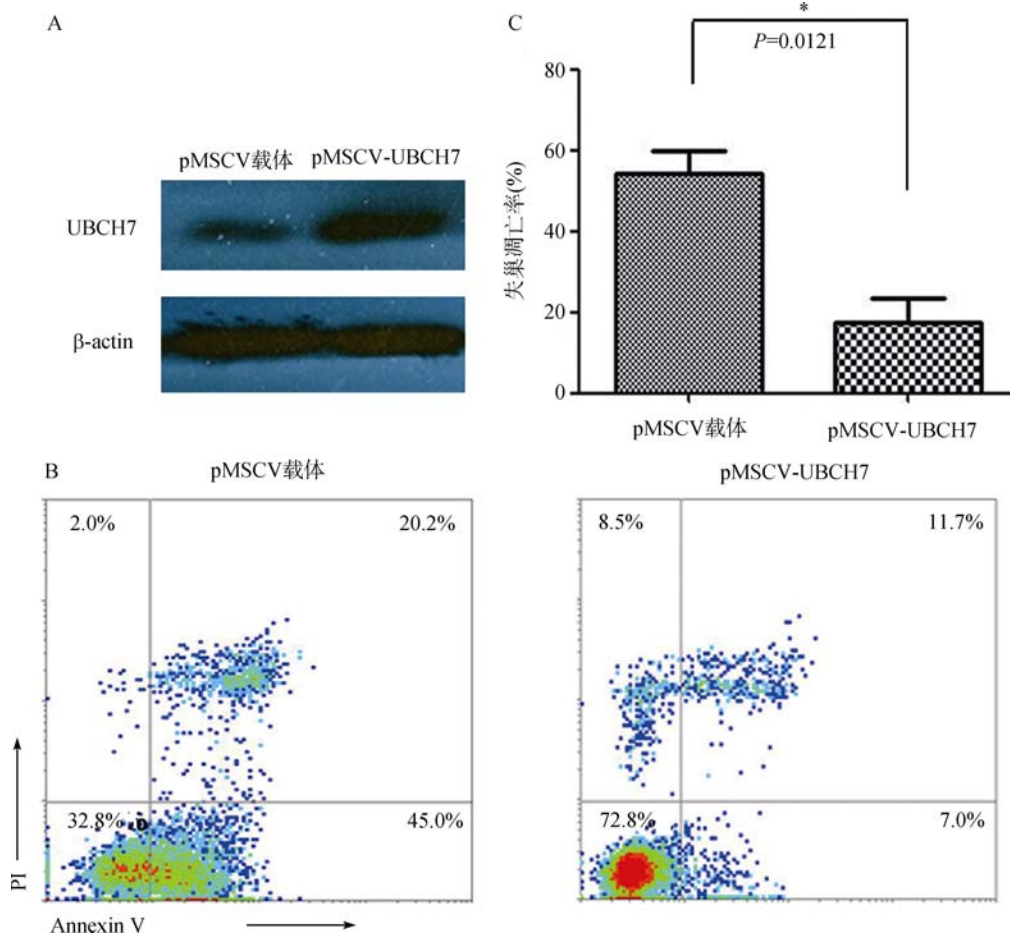


图 5 高表达 *UBCH7* 导致 NIH3T3 细胞失巢凋亡抗性增强
A : Western blotting 检测对照组与感染高表达 *UBCH7* 细胞的 *UBCH7* 蛋白表达水平; B : Annexin V-FITC/PI 双染检测对照组、*UBCH7* 高表达细胞的失巢凋亡水平; C : 3 次重复实验的失巢凋亡比例统计柱状图(* 表示 $P < 0.05$)。

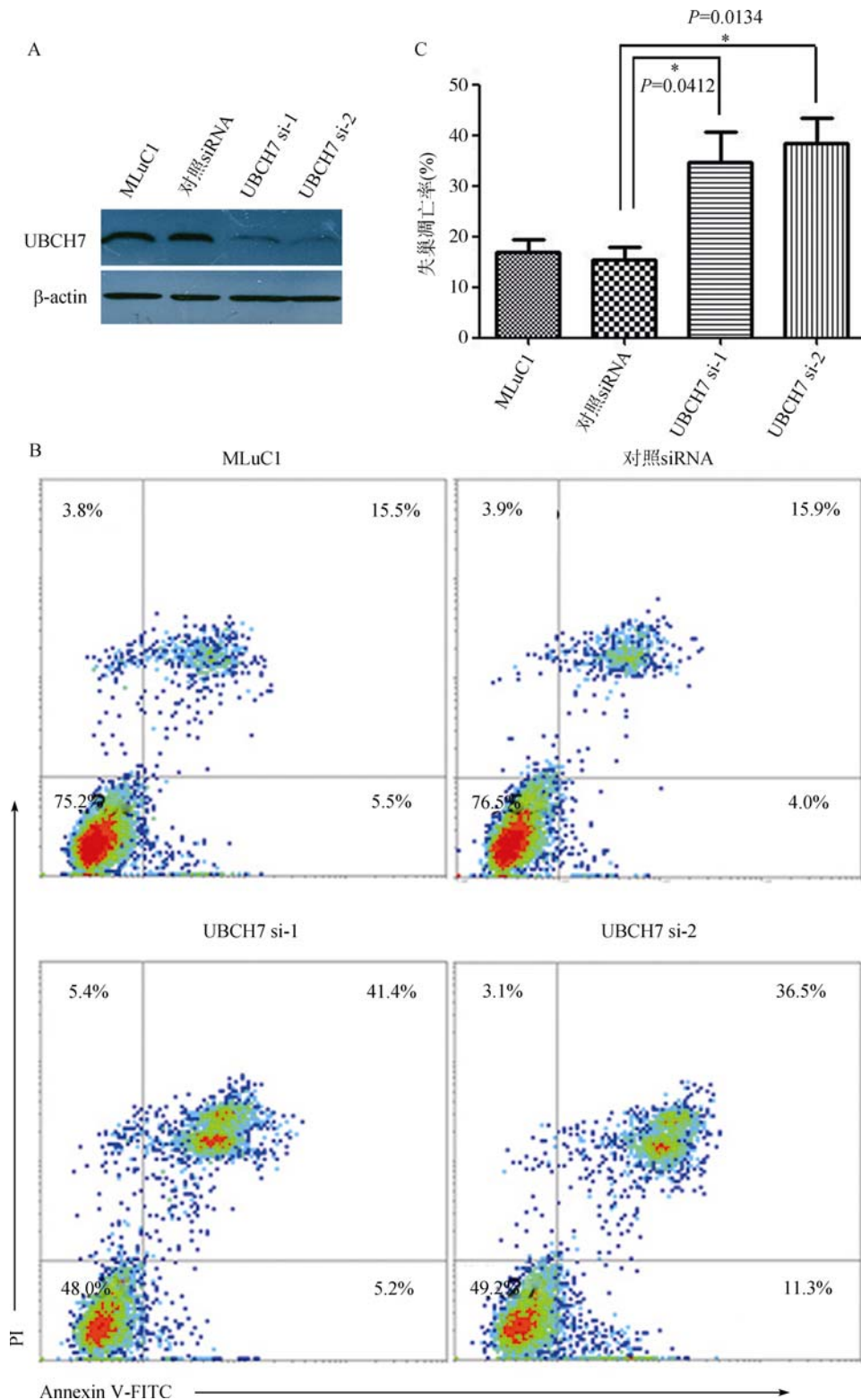


图 6 降调 UBCH7 表达导致 MLCu1 细胞失巢凋亡抗性降低

A :Western blotting 检测亲本 MLCu1、对照 siRNA(Nonsilencing)组、UCBH7-siRNA 转染组中 UCBH7 表达水平; B :Annexin V-FITC/PI 双染检测亲本 MLCu1、对照 siRNA(Nonsilencing)组、UCBH7-siRNA 转染组的失巢凋亡水平; C : 3 次重复实验的失巢凋亡比例统计柱状图(* 表示 $P < 0.05$)。

筛选技术下游与cDNA芯片等高通量技术联合使用(Xenoarray方法)使其筛选效率得到了进一步的提高^[12]。

UBE2L3 基因编码一个E2 泛素结合酶*UBCH7*, 在小鼠中的人类*UBCH7* 的同源基因*UBCM4* 纯合突变是胚胎致死的^[13]。*UBCH7* 对细胞周期具有调控作用, 其表达在细胞周期中呈动态性变化, 可调控细胞进入并通过S期^[14, 15]。作为E2 泛素结合酶, *UBCH7* 常与HECT型E3 泛素连接酶相互作用(如Parkin), 从而参与细胞信号通路调控^[16]。尤其*UBCH7* 可与E6-AP相互作用, 参与E6-AP介导的p53 蛋白降解^[17]。除E2 泛素结合酶的作用外, *UBCH7* 也起到共激活因子的作用。在细胞核中, *UBCH7* 还作为甾体类激素受体的共激活因子(Coactivator)调节下游基因转录^[18]。然而迄今为止, 尚未见到*UBCH7* 与失巢凋亡抗性之间关系的报道。本研究发现了一个与失巢凋亡有关的新基因, 为失巢凋亡的机制研究及肿瘤细胞失巢凋亡抗性机制的进一步揭示提供了新的线索。同时, 也为抑制肿瘤转移药物的研发提供了潜在的靶标。

参考文献(References):

- [1] Guadamillas MC, Cerezo A, Del Pozo MA. Overcoming anoikis - pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 19): 3189–3197. DOI
- [2] Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, Chiarugi P. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *J Pathol*, 2012, 226(2): 380–393. DOI
- [3] Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(4): 274–284. DOI
- [4] Chiarugi P, Giannoni E. Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(11): 1352–1364. DOI
- [5] Vachon PH. Integrin signaling, cell survival, and anoikis: distinctions, differences, and differentiation. *J Signal Transduct*, 2011, 2011(2011): 173–191. DOI
- [6] Luo ML, Shen XM, Zhang Y, Wei F, Xu X, Cai Y, Zhang X, Sun YT, Zhan QM, Wu M, Wang MR. Amplification and overexpression of *CTTN* (*EMSI*) contribute to the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by promoting cell migration and anoikis resistance. *Cancer Res*, 2006, 66(24): 11690–11699. DOI
- [7] Wang XC, Wu YP, Ye B, Lin DC, Feng YB, Zhang ZQ, Xu X, Han YL, Cai Y, Dong JT, Zhan QM, Wu M, Wang MR. Suppression of anoikis by *SKP2* amplification and overexpression promotes metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(1): 12–22. DOI
- [8] Du XL, Yang H, Liu SG, Luo ML, Hao JJ, Zhang Y, Lin DC, Xu X, Cai Y, Zhan QM, Wang MR. Calreticulin promotes cell motility and enhances resistance to anoikis through STAT3-CTTN-Akt pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 2009, 28(42): 3714–3722. DOI
- [9] Shen XM, Wu YP, Feng YB, Luo ML, Du XL, Zhang Y, Cai Y, Xu X, Han YL, Zhang X, Zhan QM, Wang MR. Interaction of MT1-MMP and laminin-5 γ 2 chain correlates with metastasis and invasiveness in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis*, 2007, 24(7): 541–550. DOI
- [10] Choi YL, Kaneda R, Wada T, Fujiwara SI, Soda M, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Mano H. Identification of a constitutively active mutant of JAK3 by retroviral expression screening. *Leuk Res*, 2007, 31(2): 203–209. DOI
- [11] Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara SI, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, Mano H. Identification of the transforming *EML4-ALK* fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 2007, 448(7153): 561–566. DOI
- [12] Martelli ML, Isella C, Mira A, Fu LM, Cantarella D, Medico E. Exploiting orthologue diversity for systematic detection of gain-of-function phenotypes. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 254. DOI
- [13] Harbers K, Müller U, Grams A, Li E, Jaenisch R, Franz T. Provirus integration into a gene encoding a ubiquitin-conjugating enzyme results in a placental defect and embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(22): 12412–12417. DOI
- [14] Whitcomb EA, Taylor A. Ubiquitin control of S phase: a new role for the ubiquitin conjugating enzyme, UbcH7. *Cell Div*, 2009, 4: 17. DOI
- [15] Whitcomb EA, Dudek EJ, Liu Q, Taylor A. Novel control of S phase of the cell cycle by ubiquitin-conjugating enzyme H7. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(1): 1–9. DOI
- [16] Wenzel DM, Lissounov A, Brzovic PS, Klevit RE. *UBCH7* reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. *Nature*, 2011, 474(7349): 105–108. DOI
- [17] Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, 1993, 75(3): 495–505. DOI
- [18] Verma S, Ismail A, Gao XH, Fu GL, Li XT, O'Malley BW, Nawaz Z. The ubiquitin-conjugating enzyme *UBCH7* acts as a coactivator for steroid hormone receptors. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(19): 8716–8726. DOI

- [19] 韩亚玲, 冯彦斌, 罗曼莉, 徐昕, 蔡岩, 王明荣. 人食管癌EC9706单克隆的分离培养及其生物学特性的研究. 遗传, 2007, 29(11): 1331–1335. [DOI](#)