恶性肿瘤的诊断与治疗 文章编号：0253-3626（2011）05-0520-04

宫颈癌 HeLa 细胞抑癌蛋白 FBW7 调控机制研究

孙 迪，沈 宜，谢莹珊，隆 霜
（重庆医科大学基础医学院干细胞与组织工程研究室，重庆 400016）

【摘 要】目的：观察 MAPK 信号通路阻断剂 UO-126 对人类宫颈癌细胞株 HeLa 细胞周期素 E（cyclin E）及 F- 盒和含蛋白 7 的 WD 重复结构域 FBW7 表达的影响。方法：采用 RT-PCR、Western blot 检测 UO-126 阻断 MAPK 信号通路前后 cyclin E 和 FBW7 mRNA 及蛋白表达情况。结果：RT-PCR 及 Western blot 结果显示，UO-126 作用后 HeLa 细胞 cyclin E mRNA 表达水平无明显变化，cyclin E 蛋白表达水平明显下降，FBW7 mRNA 及蛋白表达水平较未处理 HeLa 细胞均明显增高。结论：宫颈癌 HeLa 细胞中 FBW7 异常表达与 MAPK 信号通路激活密切相关。UO-126 阻断 MAPK 信号通路可下调 cyclin E 表达，上调 FBW7 表达。

【关键词】UO-126；MAPK；宫颈癌细胞株（HeLa 细胞）；细胞周期素 E；FBW7；
【中国图书分类法分类号】R730.23 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-11-03

Study on the regulatory mechanism of tumor suppressor protein FBW7 in cervical cancer HeLa cells

SUN Di, SHEN Yi, XIE Ying-shan, LONG Shuang
(*Department of Pathophysiology, Institute of Stem Cell and Tissue Engineering, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of UO-126, a MAPK inhibitor, on the expression of cyclin E and F-box and WD repeat domain-containing protein 7 (FBW7) of human cervical cancer cell line (HeLa cells). *Methods*: The mRNA and protein expression of cyclin E and FBW7 were detected by RT-PCR and Western blot before and after MAPK signal was blocked by UO-126, a MAPK inhibitor. *Results*: RT-PCR and Western blot exhibited that cyclin E mRNA expression had no significant changes and cyclin E protein had significantly decreased after HeLa cells were treated with UO-126, and FBW7 mRNA and protein expression had significantly increased after HeLa cells were treated

作者介绍：孙 迪（1983-），女，硕士，研究方向：肿瘤免疫。
通信作者：沈 宜，女，教授，Email：shenyicq@163.com。
基金项目：重庆市渝中区科委资助项目（编号：2009）。

pathway in the malignant behavior of human ovarian cancer cell SKOV3[J]. Tumor Biology, 2010, 31(1): 59-67.

[6] Kiyokawa E, Matsuda M. Regulation of focal adhesion and cell migration by ANKRD28-DOCK180 interaction[J]. Cell Adhesion & Migration, 2009, 3: 281-284.

[7] Nishihara H, Tanaka S, Tsuda M, et al. Molecular and immunohistochemical analysis of signaling adaptor protein Crk in human cancers[J]. Cancer Letters, 2002, 180: 55-61.

[8] Rodrigues S P, Fathers K E, Chan G, et al. Crk Ⅰ and Crk Ⅱ funtion as key signaling integrators for migration and invasion of cancer cells[J]. Mol Cancer Res, 2005, 3(4): 183-194.

[9] Jarzynka M J, Hu B, Hui K M, et al. ELMO1 and Dock180, a bipartite Rac1 guanine nucleotide exchange factor, promote human glioma cell invasion[J]. Cancer Res, 2007, 67(15): 7203-7211.

[10] Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign and malignant human pancreatic tissues[J]. Hum Pathol, 1990, 21(6): 607-612.

[11] Linghu H, Tsuda M, Makino Y, et al. Involvement of adaptor protein Crk in malignant feature of human ovarian cancer cell line MCAS[J]. Oncogene, 2006, 25: 3547-3556.

[12] Valle A M, Beuvin M, Boyer B. Activation of Rac1 by paxillin-Crk-DOCK180 signaling complex is antagonized by Rap1 in migrating NBT-II cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(43): 44940-44946.

[13] Gu J, Sumida Y, Sanzen N, et al. Laminin-10/11 and fibronectin differentially regulate integrin-dependent Rho and Rac activation via p130 (Cas)-CrkII-DOCK180 pathway[J]. J Biol Chem, 2001, 276(29): 27090-27097.

[14] Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPase in cell biology[J]. Nature, 2002, 420: 629-635.

[15] Schmidt A, Hall A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch[J]. Genes Dev, 2002, 16: 1587-1609.

[16] Takino T, Nakada M, Miyamori H, et al. CrkI adapter protein modulates cell migration and invasion in glioblastoma[J]. Cancer Res, 2003, 63(9): 2335-2337.

（责任编辑：冉明会）

with UO-126. *Conclusion*: The abnormal expression of FBW7 is closely related to the activation of MAPK signaling pathway in cervical cancer HeLa cells. Cyclin E is decreased and FBW7 is increased after UO-126 blocks the MAPK signaling pathway.
【Key words】UO-126; MAPK; cervical cancer HeLa cells; cyclin E; FBW7

机体细胞蛋白质降解途径主要有两条，一条是溶酶体途径，另一条比较重要的是泛素蛋白酶体途径。FBW7 是泛素蛋白酶体途径的重要组成部分之一，它主要介导与细胞周期进程、应激反应、抗原呈递、信号转导等相关短寿命蛋白的泛素化降解。新近研究表明 FBW7 是一种肿瘤抑制因子，在多种肿瘤细胞中都发现了 FBW7 的缺失和突变[1-5]。细胞周期素 E（cyclin E）在调控细胞周期 G_1/S 期的进程中发挥重要作用，其主要是通过FBW7 介导的泛素蛋白酶体途径进行降解[6,7]。FBW7 缺失或突变所致的肿瘤发生发展过程中，FBW7 对 cyclin E 蛋白泛素化降解异常，导致 cyclin E 表达增高，细胞周期进程加快，这可能是宫颈癌的发病机制之一。前期研究发现 cyclin E 异常表达与 Ras 信号通路激活有关，MAPK 信号通路是 Ras 下游主要的信号传递途径，在此基础上，我们进一步观察 HeLa 细胞 MAPK 信号通路与 cyclin E 和 FBW7 之间的关系，希望为宫颈癌发病机制的研究及 FBW7 的靶向诊治提供新的思路和线索。

1 材料和方法

1.1 材料

UO-126，预染 Marker，鼠抗人 GAPDH 抗体，聚偏二氟乙烯（PVDF）膜，细胞裂解液 RIPA，苯甲基磺酰氟（PMSF），Bradford 蛋白浓度测定试剂盒（碧云天生物技术研究所）；逆转录试剂盒（TOYOBO 公司）；聚合酶链反应（PCR）扩增试剂盒（天根生化科技有限公司）；鼠抗人 cyclin E 抗体，兔抗人 Cdc4（FBW7）抗体（Santa Crus 公司），辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG，辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG，磷酸盐缓冲液（PBS）（北京中杉金桥）；低温超速离心机（美国 Sigma 公司）；PCR 仪，琼脂糖凝胶电泳装置（北京市六一仪器厂）；电泳槽、半干转仪、ECL 化学发光成像系统（美国 Bio-Rad 公司）。人宫颈癌 HeLa 细胞株，本教研室保存，复苏后使用。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 检测 cyclin E 及 FBW7 mRNA 表达 取 1×10^6 个/L 的对数生长期的 HeLa 细胞悬液接种于培养瓶中，待细胞贴壁后，加入终浓度为 10 μmol/L 的 UO-126[8]溶液，同时设置细胞对照组，继续置培养箱中分别培养 12、24、48 h，用 Trizol 法分别提取 UO-126 作用前后 Hela 细胞总 RNA。经10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定，测样品 A_{260}/A_{280} 比值后，做RT-PCR。cyclin E 基因上游引物 5'-TTCTTGAGCAACACCCTC-3'，下游引物 5'-TCCATCTGTCACATACGC-3'，产物长度 260 bp。FBW7 基因上游引物 5'-GTGGGACATACAGGTGGA-3'，下游引物 5'-CAACGCACAGTGGAAGTA-3'，产物长度 146 bp。以 GAPDH 为内参照，其上游引物 5'-GAGCCAAAAGGGTCATCATCTC-3'，下游引物 5'-AAAGGTGGAGGAGTGGGTGTC-3'，产物长度 542 bp。按照两步法试剂盒的操作步骤分别进行逆转录反应和多聚酶链反应。cyclin E 逆转录反应条件为 42℃ 20 min，99℃ 5 min，4℃ 5 min；PCR 反应条件为 94℃ 3 min，循环 1 次，94℃ 30 s，49℃ 30 s，72℃ 1 min，循环 30 次，72℃延伸 5 min 结束反应。FBW7 逆转录反应条件为 42℃ 20 min，99℃ 5 min，4℃ 5 min；PCR 反应条件为 94℃ 3 min，循环 1 次，94℃ 30 s，49℃ 30 s，72℃ 1 min，循环 30 次，72℃延伸 5 min 结束反应。GAPDH 逆转录反应条件为 42℃ 20 min，99℃ 5 min，4℃ 5 min；PCR 反应条件为 94℃ 3 min，循环 1 次，94℃ 30 s，59℃ 30 s，72℃ 1 min，循环 30 次，72℃延伸 5 min 结束反应。各取 5 μl 做 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳，使用 Quantity One 图像分析系统分析结果，目标 mRNA 的表达量使用内参照 GAPDH 进行较正。

1.2.2 Western blot 检测 cyclin E 及 FBW7 蛋白表达 HeLa 细胞培养及药物处理分组同 1.2.1，PBS 洗 3 次，每瓶细胞各加入 200 μl 细胞裂解液 RIPA 和 2 μl PMSF，置冰上充分裂解，将裂解物移至不同 EP 管中，4℃，12 000 g 离心 30 min，收集上清液，Bradford 法蛋白定量。采用 50 g/L 的浓缩胶、120 g/L 的分离胶，各按 60 μg 蛋白量体积上样，进行蛋白凝胶电泳，蛋白质转膜，加入鼠抗人 cyclin E 一抗（1:500），兔抗人 FBW7 一抗（1:500），常规封闭，4℃过夜。加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠二抗（1:2 000），辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗（1:2 000），室温结合 2 h。加入显色剂，显影定影后ECL 发光系统观察结果，目标蛋白的表达量使用内参照 GAPDH进行较正，采用 Quantity One 软件对图像进行光密度分析。

1.3 统计学处理

用 SPSS 10.0 统计软件包作数据处理，所有数据均用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，统计方法为随机区组设计方差分析，$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测 cyclin E mRNA 结果显示

经统计学分析发现，UO-126 各处理组与未处理组相比，cyclin E mRNA 水平的表达随作用时间的延长无明显变化（图 1），差异无统计学意义（$F=2.62$，$P>0.05$）。

2.2 Western blot 检测 cyclin E 蛋白表达结果显示

根据蛋白定量结果计算含 60 μg 蛋白量的体积进行上样，cyclin E/GAPDH 灰度比值依次为 0.377 6 ± 0.006 0、0.316 0 ± 0.004 7、0.227 5 ± 0.005 5、0.174 9 ± 0.002 6，UO-126 作用后 cyclin E 在 53 kD 处的蛋白表达量随作用时

E及 FBW7 表达变化，RT-PCR 及 Western blot 结果揭示，与对照组 HeLa 细胞相比，cyclin E mRNA 表达无明显变化，cyclin E 蛋白表达下降，FBW7 mRNA 及蛋白表达随时间梯度均依次递增。由此可见 HeLa 细胞 cyclin E 及 FBW7 的表达均受 MAPK 信号通路的调控，两者均位于 MAPK 信号通路的下游。

综上所述，宫颈癌中 cyclin E 及 FBW7 的异常表达可能与 MAPK 信号通路的激活密切相关。UO-126 阻断 MAPK 信号通路可能是通过上调 FBW7 的表达，使 cyclin E 蛋白泛素化降解加快，cyclin E 表达降低，从而抑制宫颈癌的发生发展。希望通过对 MAPK 信号通路与 cyclin E、FBW7 之间关系的探寻，为宫颈癌发病机制的研究及预治措施的探索提供更多的依据和线索。

参 考 文 献

[1] Willmarth N E, Albertson D G, Ethier S P.Chromosomalinstability and lack of cyclin E regulation in hCdc4 mutanthuman breast cancer cells[J].Breast Cancer Res, 2004, 6(5):R531-539.

[2] Cassia R, Moreno-Bueno G, Rodriguez-Perales S, et al.Cyclin E gene (CCNE) amplification and hCDC4 mutations in endometrial carcinoma[J].Pathol, 2003, 201(4):589-595.

[3] Kwak E L, Moberg K H, Wahrer D C, et al.Infrequent mutations of Archipelago (hAGO, hCDC4, Fbw7) in primary ovarian cancer[J].Gynecol Oncol, 2005, 98(1):124-128.

[4] Calhoun E S, Jones J B, Ashfaq R, et al.BRAF and FBXW7 (CDC4, FBW7, AGO, SEL10) mutations in distinct subsets of pancreatic cancer: potential therapeutic targets[J].Pathol, 2003, 163(4):1255-1260.

[5] Song J H, Schnittke N, Zaat A, et al.FBXW7 mutation in adult T-cell and B-cell acute lymphocytic leukemias[J].Leuk Res, 2008, 32(11):1751-1755.

[6] Ekholm-Reed S, Spruck C H, Sangfelt O, et al.Mutation of hCDC4 leads to cell cycle deregulation of cyclin E in cancer[J].Cancer Res, 2004, 64(3):795-800.

[7] Sangfelt O, Cepeda D, Malyukova A, et al.Both SCF (Cdc4alpha) and SCF (Cdc4gamma) are required for cyclin E turnover in cell lines that do not overexpress cyclin E[J].Cell Cycle, 2008, 7(8):1075-1082.

[8] Kasahara K, Nakayama Y, Nakazato Y, et al.Src signaling regulates completion of abscission in cytokinesis through ERK/MAPK activation at the midbody[J].Biol.Chem, 2007, 282(8):5327-5339.

[9] Nakayama K I, Nakayama K.Ubiquitin ligases:cell-cycle control and cancer[J].Nature Rev Cancer, 2006, 6(5):369-381.

[10] Spruck C H, Strohmaier H, Sangfelt O, et al.hCDC4 gene mutations in endometrial cancer[J].Cancer Res, 2002, 62(16):4535-4539.

[11] Kimura T, Gotoh M, Nakamura Y, et al.hCDC4b, a regulator of cyclin E, as a direct transcriptional target of p53[J].Cancer Sci, 2003, 94(5):431-436.

[12] Welcker M, Orian A, Grim J E, et al.A nucleolar isoform of the Fbw7 ubiquitin ligase regulates c-Myc and cell size[J].Curr Biol, 2004, 14(20):1852-1857.

[13] Ye X, Nalepa G, Welcker M, et al.Recognition of phosphodegron motifs in human cyclin E by the SCF Fbw7 ubiquitin ligase[J].Biol.Chem, 2004, 279(48):50110-50119.

[14] Bonetti P, Davoli T, Sironi C, et al.Nucleophosmin and its AML-associated mutant regulate c-Myc turnover through Fbw7 gamma[J].Cell Biol, 2008, 182(1):19-26.

[15] Nateri A S, Riera-Sans L, Da Costa C, et al.The ubiquitin ligase SCF Fbw7 antagonizes apoptotic JNK signaling[J].Sci, 2004, 303(5662):1374-1378.

[16] Anzi S, Finkin S, Shaulian E.Transcriptional repression of c-Jun's E3 ubiquitin ligases contributes to c-Jun induction by UV[J].Cell Signal, 2008, 20(5):862-871.

[17] O'Neil J, Grim J, Strack P, et al.FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors[J].Exp Med, 2007, 204(8):1813-1824.

[18] Kitagawa K, Hiramatsu Y, Uchida C, et al.Fbw7 promotes ubiquitin-dependent degradation of c-Myb:involvement of GSK3-mediated phosphorylation of Thr-572 in mouse c-Myb[J].Oncogene, 2009, 28(25):2393-2405.

[19] Mao J H, Perez-Losada J, Wu D, et al.Fbxw7/Cdc4 is a p53-dependent, haploinsufficient tumour suppressor gene[J].Nature, 2004, 432(7018):775-779.

[20] Wei Z, Deanna M K.Fbw7 Isoform Interation Contributes to Cyclin E Proteolysis[J].Cancer Res, 2006, 4(12):935-943.

[21] Grim J E, Gustafson M P, Hirata R K, et al.Isoform-and cell cycle-dependent substrate degradation by the Fbw7 ubiquitin ligase[J].Cell Biol, 2008, 181(6):913-920.

[22] Nash P, Tang X, Orlicky S, et al.Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication[J].Nature, 2001, 414(2853):514-521.

[23] Moberg K H, Bell D W, Wahrer D C, et al.Archipelago regulates Cyclin E levels in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines[J].Nature, 2001, 413:311-316.

[24] Susanna E R, Spruck C H, Spruck R, et al.Mutation of hCDC4 Leads to Cell Cycle Deregulation of Cyclin E in cancer[J].Cancer Rescarch, 2004, 64(3):795-800.

[25] Minella A C, Clurman B E.Mechanisms of tumor suppression by the SCF (Fbw7) [J].Cell Cycle, 2005, 4(10):1356-1359.

（责任编辑：冉明会）