

UbcH10 基因沉默对肺癌 NCI-H226 细胞增殖及细胞周期的影响

赵黎明¹, 孙光远², 娄丽蓉³, 王良哲⁴, 方正¹, 修清玉^{1*}

1. 第二军医大学长征医院呼吸内科, 上海 200003
2. 第二军医大学长征医院胸心外科, 上海 200433
3. 浦东新区卫生局卫生监督所, 上海 200136
4. 第二军医大学长征医院病理科, 上海 200433

[摘要] **目的** 通过脂质体转染 siRNA 方法沉默人肺鳞癌细胞 NCI-H226 中 UbcH10 基因, 观察基因沉默后细胞增殖活性的变化及其对细胞周期的影响。 **方法** 设计 3 条针对 UbcH10 基因 CDS 区不同位点的 siRNA 序列并构建 shRNA 重组质粒, 脂质体法转染重组质粒至 NCI-H226 细胞。转染后 48 h, RT-PCR 和蛋白质免疫印迹法检测细胞内 UbcH10 mRNA 及蛋白含量。使用有效 siRNA 序列转染细胞, 转染后 24、48 h CCK-8 检测细胞活性。使用有效 siRNA 序列转染细胞, 转染后 48 h 收集细胞, 流式细胞术检测细胞周期。 **结果** 成功构建 shRNA 重组质粒并转染 NCI-H226 细胞。转染 siRNA 48 h 后, 3 组 NCI-H226 细胞中 UbcH10 基因的 mRNA 及蛋白含量均明显下降; 其中 2 号 siRNA 序列 (pshRNA2) 的沉默效果最好, UbcH10 基因剩余表达量为对照组的 14%。使用 pshRNA2 转染 NCI-H226 细胞 24、48 h, 细胞增殖活性降低, 与基因未干预组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。使用 pshRNA2 转染 NCI-H226 细胞 48 h, 细胞明显阻滞于 G₂ 期, 与基因未干预组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** UbcH10 基因沉默可显著抑制 NCI-H226 细胞增殖活性, 并使肺癌细胞阻滞于细胞 G₂ 期。

[关键词] UbcH10 基因; 肺肿瘤; 小分子干扰 RNA; 细胞增殖; 细胞周期

[中图分类号] R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)06-0608-05

Effect of UbcH10 gene silencing on cell proliferation and cell cycle of lung cancer cell line NCI-H226

ZHAO Li-ming¹, SUN Guang-yuan², LOU Li-rong³, WANG Liang-zhe⁴, FANG Zheng¹, XIU Qing-yu^{1*}

1. Department of Respiratory Disease, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
2. Department of Thoracic Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
3. Health Supervision Unit, Health Bureau of Shanghai Pudong New Area, Shanghai 200136, China
4. Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To use liposomal siRNA for silencing UbcH10 gene in human lung squamous carcinoma cell line NCI-H226 and to observe the changes of cell proliferation and cell cycle after silencing. **Methods** Three siRNA sequences targeting different sites of UbcH10 CDS were designed, and the shRNA recombinant plasmids were constructed. The recombinant plasmids were transfected into NCI-H226 cells via lipofectamine2000. UbcH10 mRNA and protein expression was examined by RT-PCR and Western blotting analysis 48 h after transfection, respectively. The viability of NCI-H226 cells was measured using CCK-8 at 24 and 48 h after transfection with the effective siRNA vector, and the cell cycle was detected by flow cytometry 48 h after transfection. **Results** The recombinant shRNA plasmids were successfully constructed and transfected into NCI-H226 cells. UbcH10 gene mRNA and protein were noticeably decreased in the three groups 48 h after transfection, with the inhibitory effect of No. 2 siRNA sequence (pshRNA2) being the strongest one (86%). The proliferative activity of NCI-H226 cells was significantly decreased 24 and 48 h after the transfection with the pshRNA2 compared with the control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, NCI-H226 cells were blocked in G₂ phase 48 h after the transfection with pshRNA2 ($P < 0.05$). **Conclusion** UbcH10 gene silencing can significantly inhibit the proliferative activity of NCI-H226 cells and block the cells in G₂ phase.

[Key words] UbcH10 gene; lung neoplasms; small interfering RNA; cell proliferation; cell cycle

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(6): 608-612]

[收稿日期] 2012-05-03

[接受日期] 2012-05-21

[基金项目] 上海市卫生局局级课题(20090122)。Supported by Project of Shanghai Municipal Health Bureau (20090122)。

[作者简介] 赵黎明, 博士, 讲师, 主治医师。E-mail: 1976zlm@163.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81885321, E-mail: xiu_qingyu@126.com

UbcH10 是遍在蛋白质结合酶 E2C (ubiquitin-conjugating enzyme, E2C, UBE2C) 基因家族成员, 是遍在蛋白质/蛋白酶体-蛋白质降解 (UPP) 途径的关键成员之一。该途径中, 遍在蛋白质活化酶 (E1) 首先激活遍在蛋白质分子, 而后把遍在蛋白质移至遍在蛋白质结合酶上, E2 结合遍在蛋白质蛋白连接酶 (E3) 并把遍在蛋白质转移到底物蛋白上使其遍在蛋白质化, 或把遍在蛋白质移至 E3 再使底物遍在蛋白质化, 而后 26S 蛋白酶体识别、降解底物, UPP 途径广泛参与细胞增殖、分化、凋亡和细胞周期调控等诸多生物学进程^[1-2]。本实验拟通过 RNA 干扰方法在肺癌 NCI-H226 细胞中沉默 UbcH10 基因, 并观察基因沉默后 NCI-H226 细胞增殖活性变化, 以及基因沉默对于细胞周期的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人肺鳞癌细胞 NCI-H226 购于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与生物学研究所; F12K 培养液、胎牛血清、脂质体 Lipofectamine2000, 0.25% 胰蛋白酶及 TRIzol 购于 Invitrogen 公司; pshRNA vector 购于美国 System Biosciences 公司; 限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I、定量 PCR 仪检测试剂盒、感受态细胞、MLV 反转录试剂盒及荧光定量试剂盒等购于 TaKaRa 公司; CCK-8 细胞活性检测试剂盒为日本同仁化学研究所产品; 质粒提取试剂盒购于 Qiagen 公司; UbcH10

一抗购于 R&D 公司; 细胞蛋白提取试剂盒及 ECL 发光试剂盒均购于 Pierce 公司; 细胞培养箱为日本三洋公司产品; 移液器、离心机为 Eppendorf 公司产品; 超净台购于江苏苏净集团有限公司; 定量 PCR 仪为 TaKaRa 公司产品; 流式细胞仪购于美国 BD 公司; 电泳仪及垂直电泳设备均购于 Bio-Rad 公司。

1.2 UbcH10 基因的 shRNA 重组质粒的构建及 NCI-H226 细胞转染 根据 UbcH10 (NM_007019.2) 基因信息, 用在线 siRNA 序列设计软件, 设计 3 条针对其 CDS 区的 siRNA 序列并合成 shRNA 序列 (表 1), 分别在序列两端连入酶切位点 *Bam*H I 及 *Eco*R I, 交由上海英骏生物技术有限公司合成。将上述寡核苷酸退火形成双链, 连接到线性化载体, 转化涂布 LB 平板, 37°C 过夜培养, 通过 Amp 抗性和 PCR 方法筛选阳性质粒, 对重组质粒进行测序分析。对于测序正确的 shRNA 重组表达载体, 扩增其对应的转化菌株, 进行无内毒素质粒 DNA 提取。提取方法和步骤严格按照 Qiagen 公司无内毒素质粒抽提试剂盒进行。挑选生长状况良好的 P3 代 NCI-H226 细胞, 取对数生长期细胞, 使用胰酶消化的方法制备细胞悬液, 使用完全培养基 (F12+10% FBS) 调整细胞密度为 1×10^5 个/ml, 将细胞接种到 6 孔板, 每孔接种 2 ml, 37°C、5% CO₂ 条件下过夜培养。细胞培养 24 h 后, 进行质粒转染, 转染步骤和方法严格按照 Lipofectamine2000 说明书进行。转染后 48 h, 荧光显微镜下观察细胞转染效率。

表 1 siRNA 的目标序列及 shRNA 序列

Tab 1 siRNA target sequence and shRNA sequence

siRNA	Target sequence (5'-3')	pshRNA	pshRNA sequence (5'-3')
siRNA1	GGGATTTCTGCCTTCCCTG	pshRNA 1	Forward: GATCCGGGATTTCTGCCTTCCCTGCTTCTCTGTC AGACAGGGAAGGCAGAAATCCCTTTTTG Reverse: AATTCAAAAAGGGATTTCTGCCTTCCCTGCTCTG ACAGGAAGCAGGGAAGGCAGAAATCCCG
siRNA2	GACCTGAGGTATAAGCTCT	pshRNA 2	Forward: GATCCGACCTGAGGTATAAGCTCTTCTCTGTC AGAAGAGCTTATACCTCAGGTCTTTTTG Reverse: AATTCAAAAAGACCTGAGGTATAAGCTCTTCTG ACAGGAAGAGAGCTTATACCTCAGGTCG
siRNA3	GTTCTCAGCCCTGCTAT	pshRNA 3	Forward: GATCCGTTCTCAGCCCTGCTATCTTCTCTGTC AGAATAGCAGGGCGTGAGGAACCTTTTTG Reverse: AATTCAAAAAGTTCTCAGCCCTGCTATTCTG ACAGGAAGATAGCAGGGCGTGAGGAACG
Negative	GAAGCCAGATCCAGCTTCC	pshRNA-Neg	Forward: GATCCGAAGCCAGATCCAGCTTCCCTTCTCT GTCAGAGGAAGCTGGATCTGGCTTCTTTTTG Reverse: AATTCAAAAAGAAGCCAGATCCAGCTTCTCTCTG ACAGGAAGGAAGCTGGATCTGGCTTCCG

1.3 UbcH10 基因及蛋白含量检测 使用 Real Time-PCR 方法检测转染后 NCI-H226 细胞 UbcH10 mRNA 含量, 方法如下: 收集转染质粒后 48 h 的 NCI-H226 细胞, TRIzol 法提取总 RNA, 取 1 μg RNA 反转录制备 cDNA, 然后进行 PCR 检测。

PCR 检测引物序列: UbcH10-forward primer 5'-ACC CTC ATG ATG TCT GGC GAT AAA-3', UbcH10- reverse primer 5'-GTG ATA GCA GGG CGT GAG GAA CTT-3'; β-actin-forward primer 5'-CCT GTA CGC CAA CAC AGT GC-3', β-actin-

reverse primer 5'-ATA CTC CTG CTT GCT GAT CC-3'。PCR 的反应体系为 20 μ l: TaKaRa SYBR Premix Ex Taq 10 μ l, 上、下游引物各 0.4 μ l, cDNA 模板 2 μ l, 去离子水补足至 20 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 10 min; 60 $^{\circ}$ C, 20 min; 72 $^{\circ}$ C, 20 min, 共 40 个循环。数据分析以 β -actin mRNA 作为对照, 通过 Ct 值进行数据分析。相对定量结果则通过 Δ Ct 来进行解释, 目的基因相对于内参基因的表达量为 $2^{-\Delta Ct}$ 。

UbcH10 蛋白含量采用蛋白质免疫印迹法检测, 方法如下: 收集转染后 48 h 的 NCI-H226 细胞, 加入细胞裂解液 (50 mmol/L pH 8.0 Tris, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 100 mmol/L phenylmethylsulfonyl uoride, 1 mg/ml leupeptin, 1 mg/ml aprotinin, and 1 mol/L dithiothreitol) 提取总蛋白, BCA 法检测总蛋白浓度。在 10% SDS-PAGE 中将蛋白分离并转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭, 常温 2 h, 加入 TBST 稀释后的一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 取出后洗膜, 再加入二抗, 孵育 2 h, 再洗膜, 进行 ECL 显色。采用相关图像分析软件进行条带光密度扫描分析。UbcH10 蛋白表达的相对强度 = 目的条带的灰度值/ β -actin 条带的灰度值。

1.4 CCK-8 检测细胞活性 取对数生长期 NCI-H226 细胞, 胰酶消化法制备细胞悬液, 使用完全培养液调整细胞密度至 1×10^5 个/ml, 接种细胞到 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μ l, 接种后正常条件培养 24 h, 然后使用有效 siRNA 序列转染 NCI-H226 细胞。转染后 24、48 h, CCK-8 检测细胞活性: 每孔加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内继续培养 4 h, 用酶标仪测定 450 nm 处的光密度并记录结果。

1.5 细胞周期检测 取对数生长期 NCI-H226 细胞, 胰酶消化法制备细胞悬液, 使用完全培养液调整细胞密度至 5×10^4 个/ml, 接种细胞到 6 孔培养板, 每孔 2 ml, 接种后正常条件培养 24 h, 然后使用有效 siRNA 序列转染 NCI-H226 细胞, 转染后 48 h, 收集细胞, 进行细胞周期检测。用 d-PBS 洗涤细胞 2 次 (1000 $\times g$, 离心 5 min) 收集细胞沉淀; 加入 500 μ l 缓冲液重悬细胞沉淀; 加入 5 μ l 碘化丙啶混匀, 在室温下避光反应 5 min 后, 立即用流式细胞仪进行检测。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件分析结果, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用析因分析进行组间差异及组内差异比较。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 shRNA 重组质粒构建及细胞转染 成功构建

shRNA 重组质粒, 经序列分析, 克隆序列与设计序列完全一致。细胞转染后荧光照片显示, 转染后 48 h, 细胞的转染效率大约为 90% (图 1)。

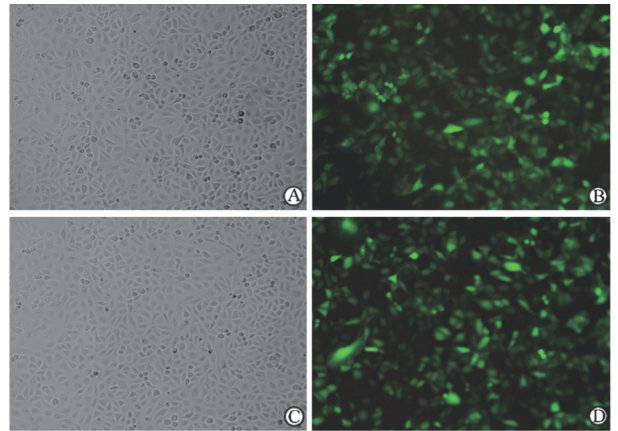


图 1 NCI-H226 细胞 siRNA 转染效率检测

Fig 1 Efficiency test of siRNA transfection of NCI-H226 cells A, B: NCI-H226 + pshRNA-Neg; C, D: NCI-H226 + pshRNA2. Original magnification: $\times 200$

2.2 shRNA 重组质粒沉默 UbcH10 基因效率检测

2.2.1 Real Time-PCR 检测 UbcH10 mRNA 含量 统计结果 (图 2) 显示, 转染 shRNA 重组质粒的细胞中 UbcH10 mRNA 含量较空白对照组降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而转染阴性质粒的细胞中 UbcH10 mRNA 含量与空白组相比没有变化 ($P > 0.05$)。3 条 siRNA 序列中, siRNA2 对 UbcH10 基因的沉默效果最好, 基因剩余表达量为对照组的 14%。

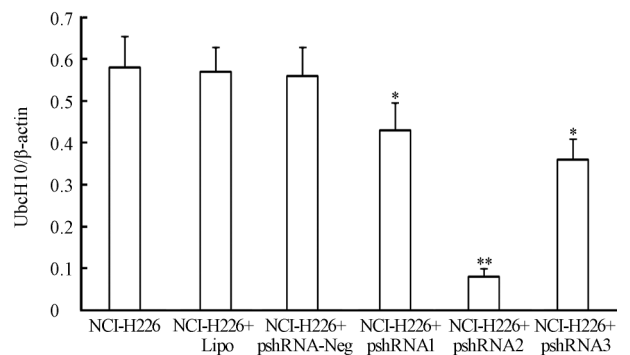


图 2 转染 siRNA 后 NCI-H226 细胞 UbcH10 mRNA 含量检测

Fig 2 Detection of UbcH10 mRNA contents in NCI-H226 cells transfected with siRNA

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NCI-H226 group; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.2.2 蛋白质免疫印迹法检测 UbcH10 蛋白的表达 提取各组细胞的总蛋白, 蛋白质免疫印迹法检测各组细胞中 UbcH10 相对含量, 以目的条带的灰度值/ β -actin 条带的灰度值作为 UbcH10 蛋白表达

的相对含量。结果(图 3)显示 pshRNA 重组质粒转染细胞后,UbcH10 蛋白条带较空白对照组明显减弱 ($P < 0.05$),而阴性对照组的细胞与空白组相比,UbcH10 蛋白表达没有明显变化 ($P > 0.05$),并且 siRNA2 抑制蛋白表达的效果最好。

2.3 基因沉默后 NCI-H226 细胞增殖活性检测 使用最有效序列 siRNA2 (pshRNA2) 转染 NCI-H226 细胞,转染后 24、48 h 使用 CCK-8 检测细胞活性。检测结果(图 4)显示,UbcH10 沉默能够抑制 NCI-H226 细胞增殖活性,与对照组细胞相比较,转染后 24 h,细胞增殖活性降低了 35% ($P < 0.05$),转染后 48 h,细胞增殖活性降低了 46% ($P < 0.01$)。

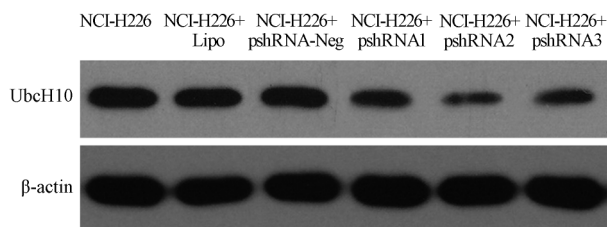


图 3 转染 siRNA 后 NCI-H226 细胞 UbcH10 蛋白含量检测

Fig 3 Detection of UbcH10 protein contents in NCI-H226 cells transfected with siRNA

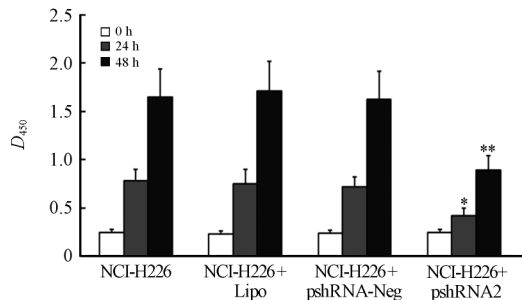


图 4 转染 siRNA 后 NCI-H226 细胞增殖活性检测

Fig 4 Cell proliferation assay of NCI-H226 cells transfected with siRNA

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NCI-H226 group; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.4 基因沉默后 NCI-H226 细胞周期检测 使用最有效序列 siRNA2 (pshRNA2) 转染 NCI-H226 细胞,转染后 48 h 收集细胞,使用流式细胞术检测细胞周期。检测结果(图 5)显示,UbcH10 沉默能够使 NCI-H226 细胞明显阻滞于 G_2 期,与空白组相比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

1985 年以来,肺癌在全世界范围内成为发病率、病死率最高的肿瘤,在美国 5 年生存率仅为 15%,在发展中国家则不超过 8.9%^[3]。2007 年中国肿瘤发病

和死亡汇总数据表明:肺癌是我国发病率、死亡率均居第一位的恶性肿瘤^[4]。因此,探索肺癌的发病机制、寻找新的治疗方法对广大人民群众的健康和生命有非常重要的意义。

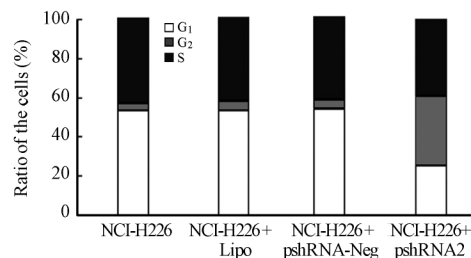


图 5 转染 siRNA 后 NCI-H226 细胞周期检测

Fig 5 Cell cycle assay of NCI-H226 cells transfected with siRNA

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种新型基因阻断技术,属转录后水平的基因调控方式^[5]。RNAi 与传统基因阻断技术相比,具有效率高、靶向性好、使用范围广以及操作简单等优点。目前有多种途径实现 RNAi^[6],如化学合成、体外转录及重组质粒法;与其他方法相比较,重组质粒法具有易扩增、易转染及易保存等优点,同时,质粒上携带的绿色荧光蛋白等标志物作为转染效率判定物操作简单可靠。本实验采用重组质粒途径在 NCI-H226 细胞中对 UbcH10 基因进行沉默,即将 siRNA 对应的 DNA 双链序列(shRNA)克隆入载体内,位于 H1 启动子后,得到重组质粒;将重组质粒转染细胞后,H1 即会引导 shRNA 在细胞内高效表达,shRNA 经 Dicer 酶切后形成 siRNA,最终达到对目的基因的沉默。

UbcH10 是遍在蛋白质结合酶基因家族成员之一,是遍在蛋白质化蛋白降解途径中的关键成员。不同的生物种属中有不同的遍在蛋白质结合酶,包括人 E2 蛋白(UBE2C),小鼠(mE2-C)、蟾蜍(UbcX)和裂殖酵母(Ubc4)等多种 E2 蛋白被发现。依据 E3 不同,遍在蛋白质化途径主要分为两种:依赖 SCF 的遍在蛋白质化途径和依赖 APC 的遍在蛋白质化途径,前者主要参与 G_1/S 期调控因子(如 Cyclin D、Cyclin E 等)的遍在蛋白质化降解而后者主要参与 G_2/M 期的姊妹染色体分离、纺锤丝解聚、胞质分裂、细胞退出有丝分裂和重新进入 G_1 期等。UPP 途径是细胞周期、DNA 转录/修复、细胞凋亡、血管生成和细胞生长相关蛋白转录后降解的主要方式^[7]。在 UPP 途径中,E2 与 E3 蛋白的特定配对组合决定被其遍在蛋白质化降解的底物的特异性,其目标底物蛋白包括 p53、MDM2、p21、p27、

Rb、Cyclin A、Cyclin B1、Cyclin E、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 等。迄今为止,已有多项研究证实 E3 蛋白与肿瘤形成密切相关,而 E2 蛋白的肿瘤相关性在近期才被加以关注。Okamoto 等^[8]以定量 RT-PCR 等方法筛选 17 种 E2 家族蛋白 mRNA 在不同部位正常组织、肿瘤组织以及肿瘤细胞系的表达情况,发现 UbcH10 在肺、胃、子宫和膀胱组织肿瘤中表达高于对照正常组织。Wagner 等^[9]亦发现 UbcH10 在多种来源的肿瘤细胞系中表达增加。继此之后,研究者发现 UbcH10 在乳腺癌^[10]、卵巢癌^[11]、甲状腺癌^[12]、食管腺癌^[13]、结直肠癌^[14-15]、淋巴瘤^[16]和肝细胞癌^[17]、前列腺癌^[18]组织中均出现过度表达。高表达 UbcH10 的转基因鼠易诱发肺癌并可以产生多种自发性的肿瘤,UbcH10 是一种可以导致基因组不稳定以及肿瘤易感性增加的原癌基因^[19]。

本实验通过构建 UbcH10 基因的 shRNA,脂质体瞬时转染人肺鳞癌细胞株 NCI-H226,通过 mRNA 及蛋白含量检测证实,可以在 NCI-H226 细胞中有效沉默 UbcH10 基因。细胞增殖活性检测结果则说明,UbcH10 基因沉默可以抑制 NCI-H226 细胞增殖活性,同时,可使 NCI-H226 细胞周期在 G₂ 期发生阻滞。以上结果说明,通过干扰沉默 UbcH10 基因的表达,可以抑制 NCI-H226 细胞的肿瘤恶性增殖活性。

近年来,寻找肿瘤相关的基因,并以此作为基因治疗的靶点,利用基因沉默技术干预基因表达来预防和治疗肿瘤,已成为肿瘤研究的重要方向之一。本实验通过脂质体转染途径沉默 UbcH10 基因来抑制 NCI-H226 细胞的活性,这不仅为肺癌的基因治疗提供了新的理论依据,也为以后的临床应用提供了可靠的实验依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Yu H, King R W, Peters J M, Kirschner M W. Identification of a novel ubiquitin-conjugating enzyme involved in mitotic cyclin degradation[J]. *Curr Biol*, 1996, 6: 455-466.
- [2] De Gramont A, Ganier O, Cohen-Fix O. Before and after the spindle assembly checkpoint—an APC/C point of view[J]. *Cell Cycle*, 2006, 5: 2168-2171.
- [3] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002[J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55: 74-108.
- [4] 陈万青, 张思维, 郑荣寿, 雷正龙, 李光琳, 邹小农, 等. 中国肿瘤登记地区 2007 年肿瘤发病和死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2011, 20: 162-169.
- [5] Pan K Z, Palter J E, Rogers A N, Olsen A, Chen D, Lithgow G J, et al. Inhibition of mRNA translation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Aging Cell*, 2007, 6: 111-119.
- [6] Shen W G. RNA interference and its current application in mammals[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2004, 117: 1084-1091.
- [7] Doherty F J, Dawson S, Mayer R J. The ubiquitin-proteasome pathway of intracellular proteolysis[J]. *Essays Biochem*, 2002, 38: 51-63.
- [8] Okamoto Y, Ozaki T, Miyazaki K, Aoyama M, Miyazaki M, Nakagawara A. UbcH10 is the cancer-related E2 ubiquitin-conjugating enzyme[J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 4167-4173.
- [9] Wagner K W, Sapinoso L M, El-Rifai W, Frierson H F, Butz N, Mestan J, et al. Overexpression, genomic amplification and therapeutic potential of inhibiting the UbcH10 ubiquitin conjugase in human carcinomas of diverse anatomic origin[J]. *Oncogene*, 2004, 23: 6621-6629.
- [10] Berlingieri M T, Pallante P, Sboner A, Barbareschi M, Bianco M, Ferraro A, et al. UbcH10 is overexpressed in malignant breast carcinomas[J]. *Eur J Cancer*, 2007, 43: 2729-2735.
- [11] Berlingieri M T, Pallante P, Guida M, Nappi C, Masciullo V, Scambia G, et al. UbcH10 expression may be a useful tool in the prognosis of ovarian carcinomas[J]. *Oncogene*, 2007, 26: 2136-2140.
- [12] Pallante P, Berlingieri M T, Troncone G, Kruhoffer M, Orntoft T F, Viglietto G, et al. UbcH10 overexpression may represent a marker of anaplastic thyroid carcinomas[J]. *Br J Cancer*, 2005, 93: 464-471.
- [13] Lin J, Raof D A, Wang Z, Lin M Y, Thomas D G, Greenson J K, et al. Expression and effect of inhibition of the ubiquitin-conjugating enzyme E2C on esophageal adenocarcinoma[J]. *Neoplasia*, 2006, 8: 1062-1071.
- [14] Fujita T, Ikeda H, Taira N, Hatoh S, Naito M, Doihara H. Overexpression of UbcH10 alternates the cell cycle profile and accelerate the tumor proliferation in colon cancer[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 87.
- [15] Chen S M, Jiang C Y, Wu J Y, Liu B, Chen Y J, Hu C J, et al. RNA interference-mediated silencing of UBCH10 gene inhibits colorectal cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37: 525-529.
- [16] Troncone G, Guerriero E, Pallante P, Berlingieri M T, Ferraro A, Del Vecchio L, et al. UbcH10 expression in human lymphomas[J]. *Histopathology*, 2009, 54: 731-740.
- [17] Ieta K, Ojima E, Tanaka F, Nakamura Y, Haraguchi N, Mimori K, et al. Identification of overexpressed genes in hepatocellular carcinoma, with special reference to ubiquitin-conjugating enzyme E2C gene expression[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121: 33-38.
- [18] Chen Z, Zhang C, Wu D, Chen H, Rorick A, Zhang X, et al. Phospho-MEDI-enhanced UBE2C locus looping drives castration-resistant prostate cancer growth[J]. *EMBO J*, 2011, 30: 2405-2419.
- [19] van Ree J H, Jeganathan K B, Malureanu L, van Deursen J M. Overexpression of the E2 ubiquitin-conjugating enzyme UbcH10 causes chromosome missegregation and tumor formation[J]. *J Cell Biol*, 2010, 188: 83-100.