

## 卵巢癌细胞中 RNF123 对 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白稳定性的调控作用

韩云,吴爱民,陈燕,周红

(南通市第一人民医院妇产科,江苏 南通 226001)

**[摘要]** 目的:研究卵巢癌细胞中 RNF123 对 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白稳定性的调控作用。方法:流式细胞分析仪测定血清饥饿释放过程中 SKOV3 细胞的周期分布情况,利用 Western blot 检测该过程中干扰 RNF123 前后 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白的表达水平。在 SKOV3 细胞中转染 siCtrl 和 siRNF123,Western blot 检测 p27<sup>Kip1</sup> 的半衰期。结果:SKOV3 细胞血清饥饿 48 h,SKOV3 细胞周期阻滞在 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期,而血清释放后 S 期显著增加。在此过程中,p27<sup>Kip1</sup> 表达下调。转染 siRNF123 组相较于 siCtrl 组,p27<sup>Kip1</sup> 蛋白水平增高。降低 RNF123 表达后,p27<sup>Kip1</sup> 的半衰期延迟。结论:在卵巢癌细胞中降低 RNF123 的表达能抑制 p27<sup>Kip1</sup> 的降解。

**[关键词]** 卵巢癌细胞;RNF123;p27<sup>Kip1</sup>;半衰期

**[中图分类号]** R737.31

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)05-666-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20150513

## The role of RNF123 in regulating protein stability of p27<sup>Kip1</sup> in epithelial ovarian cancer cells

Han Yun, Wu Aimin, Chen Yan, Zhou Hong

(Department of Obstetrics and Gynecology, the First People's Hospital of Nantong, Nantong 226001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the role of RNF123 in regulating protein stability of p27<sup>Kip1</sup>. **Methods:** Distribution of cell cycle was detected by flow cytometer in SKOV3 cells, after treatment with serum starvation and release for synchronization purpose. Western blot was used to test the protein level of p27<sup>Kip1</sup> of both siCtrl cells and siRNF123 cells. SKOV3 cells were transfected with siCtrl and siRNF123, western blot was used to analyze half-life of p27<sup>Kip1</sup>. **Results:** After serum deprivation for 48 h, SKOV3 cells were arrested in the G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> phase, then serum releasing stimulated the proliferation of G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> to S phase, and the expression of p27<sup>Kip1</sup> was decreased during the progress. Moreover, the level of p27<sup>Kip1</sup> was higher in siRNF123 cells than that in siCtrl cells. After decreasing p27<sup>Kip1</sup> expression, half-life of p27<sup>Kip1</sup> was delayed. **Conclusion:** Our results suggest that down-regulated RNF123 can inhibit the degradation of p27<sup>Kip1</sup>.

**[Key words]** ovarian cancer cells; RNF123; p27<sup>Kip1</sup>; half life

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(05): 666-669]

RNF123 是 RING 连接酶家族成员之一,也是 Kip1 泛素促进复合物 (Kip1 ubiquitination promoting complex, KPC) 的亚基之一,已有研究报道它可以介导多个分子的降解过程<sup>[1]</sup>。p27<sup>Kip1</sup> 是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白之一,其在卵巢癌等多种肿瘤中发挥阻滞细胞周期的作用<sup>[2]</sup>。在 S/G<sub>2</sub> 期胞核中 cyclin E-CDK2 使 p27<sup>Kip1</sup> 的 Thr187 位磷酸化,SCFskp2 使其泛素化,最后蛋白酶体降解<sup>[3]</sup>。在细胞周期 G<sub>1</sub> 期,有丝分裂信号刺激 p27<sup>Kip1</sup> 发生 Ser10 位磷酸化,借助 Jab1/CRM1 发生出核运输<sup>[4]</sup>;然后在胞质中能够被 E3 泛素酶复合物 KPC 泛素化,进而经由蛋白酶体降解<sup>[5]</sup>。本研究检测了卵巢癌细胞中是否也存在 RNF123 对 p27 的调节作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人组织来源卵巢癌细胞株 SKOV3 细胞(中国科学院细胞库上海保藏中心),胎牛血清(Gibco 公司,美国),1640 细胞干粉培养基(Sigma 公司,美国),HEPES(上海华美生物工程公司)。

鼠抗人 p27<sup>Kip1</sup> 单克隆抗体、兔抗人 cyclin A 多克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国),鼠抗人 RNF123 单克隆抗体(Abcam 公司,英国),鼠抗人 β-actin 单克隆抗体、鼠抗人 Ub 单克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 RNF123 siRNAs 构建

根据 GenBank 中 RNF123 的核苷酸序列(No.

NM\_022064.3)设计针对 RNF123 的寡核苷酸序列,靶序列引物 siRNA1 sense:5'-CCAUCAGCCUCUCU-UUCAA-3',anti-sense:5'-UUGAAAGAGAGGCUGAU-CC-3'。siRNA2 sense:5'-GCCUACAGAUCCAUAUAC-CU-3',anti-sense:5'-AGGUAUUGGAUCUGUAGGC-3'。siRNA3 sense:5'-CGCUACUAUUGGGAUGAAU-3',anti-sense:5'-AUUCAUCCCAAUAGUAGC-G-3'。靶向小干扰由美国 Invitrogen 公司合成。

### 1.2.2 siRNAs 转染

细胞接种在培养板中,待密度融合 60%左右转染细胞。准备 siRNA-Lipofectamine 2000 复合物,用 250  $\mu$ L 基础培养基稀释 sictrl 和 siRNF123,用 2 $\times$ 250  $\mu$ L 基础培养基稀释 Lipofectamine 2000 试剂 4  $\mu$ L,分别轻轻混匀,在室温下静置 5 min。将 siRNF123 和 sictrl 与转染试剂分别混匀,室温下孵育 20 min,形成 siRNA-脂质体转染复合物;同时更换细胞培养基为基培。20 min 后将转染复合物加入相应细胞培养液中,4~6 h 换无双抗完全培养基。转染 48 h 收集细胞蛋白或细胞。

### 1.2.3 流式细胞分析

收集处于生长期的 SKOV3 细胞,用含 10%胎牛血清的培养基配成 5 $\times$ 10<sup>4</sup> 个/mL 细胞悬液接种于培养瓶中,细胞贴壁后,用含 0.1%胎牛血清的培养基饥饿细胞 48 h 使细胞周期同步化,然后更换新鲜完全培养基继续培养 0、4、8、12 和 24 h 后分别收集细胞。用 0.25%胰蛋白酶消化,PBS 洗 3 次,70%乙醇固定至少 24 h,PBS 洗 2 次,1% Triton-PBS 通透 10 min,RNase-PBS 避光孵育 15 min,避光用 PI(50  $\mu$ g/mL)进行 DNA 染色 20 min,流式细胞仪分析细胞的周期分布。

### 1.2.4 蛋白质半衰期的测定

处于对数生长期的细胞,密度达 40%~50%时转染干扰。G1 组细胞在转染干扰 24 h 后血清饥饿 24 h,调整细胞同步化,G2 组细胞转染干扰 48 h。2 组细胞同时加入蛋白合成抑制剂放线菌酮(CHX),分别于 2、4 和 6 h 收集细胞蛋白,Western blot 检测蛋白的表达情况。

### 1.3 统计学方法

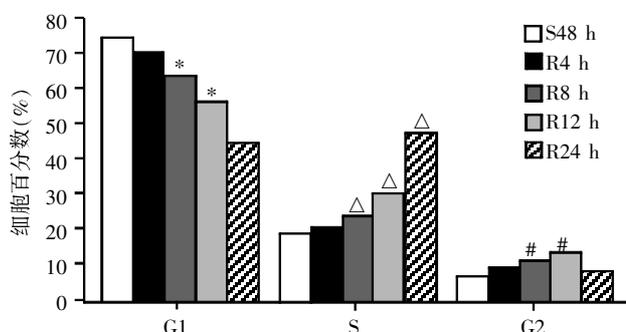
数据采用 SPSS15.0 统计软件进行分析,采用重复测量方差分析, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血清饥饿释放过程中 p27Kip1 的表达变化

流式细胞分析结果显示,血清饥饿 48 h 使细

胞周期同步,生长受阻,2 组细胞均停滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,正常浓度血清刺激 2 组细胞增殖,细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期比例随时间逐渐下降,S 期比例逐渐上升(图 1),差异有统计学意义。在血清饥饿释放过程中,检测 p27<sup>Kip1</sup> 的蛋白表达。Western blot 结果显示,在转染 sictrl 组细胞血清饥饿释放过程中,8 h 时 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白轻微降低,到 24 h 时蛋白表达显著降低(图 2A,  $P < 0.05$ ),差异有统计学意义。而细胞周期蛋白 cyclin A 表达显著增加。siRNF123 组中,8 h 时 p27<sup>Kip1</sup> 表达下降,但 12 和 24 h 时,p27<sup>Kip1</sup> 蛋白仍有明显表达(图 2B)。RNF123 的 siRNAs 干扰效率如图 2B 所示。



R: 血清饥饿;S: 血清释放。与 G1 期 S48 h 相比,\* $P < 0.05$ ;与 S 期 S48 h 相比,<sup>^</sup> $P < 0.05$ ;与 G2 期 S48 h 相比,# $P < 0.05$ 。

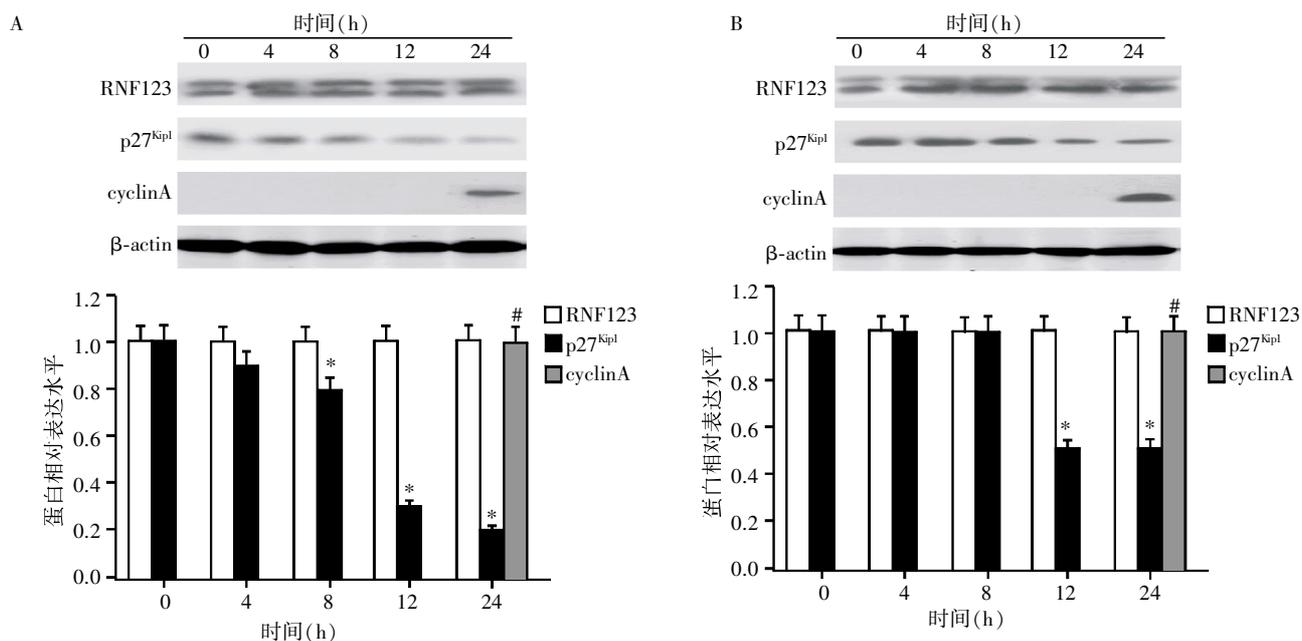
图 1 血清饥饿释放过程中 SKOV3 细胞周期的分布  
Figure 1 Distribution of SKOV3 cells during the serum-starvation and release cycle

### 2.2 下调 RNF123 表达对卵巢癌细胞中 p27<sup>Kip1</sup> 的蛋白稳定性的影响

先前的研究结果和上面的实验结果显示,RNF123 能够参与促进胞浆中 p27<sup>Kip1</sup> 的降解过程。为了进一步证实上面的结论,检验了 RNF123 对 p27<sup>Kip1</sup> 半衰期的影响。图 3A 所示,G1 组细胞转染 siRNF123 后,p27<sup>Kip1</sup> 的降解速度比 sictrl 组明显降低。而 G2 组,转染干扰前后 p27<sup>Kip1</sup> 的降解速度无明显差异(图 3B)。此外,Western blot 方法检测不同处理组细胞中总泛素的表达水平,结果显示在 G1 期细胞中,干扰 RNF123 泛素的水平部分下降;而 S 期细胞中泛素在降低 RNF123 水平后,泛素表达水平没有对照组明显。

## 3 讨论

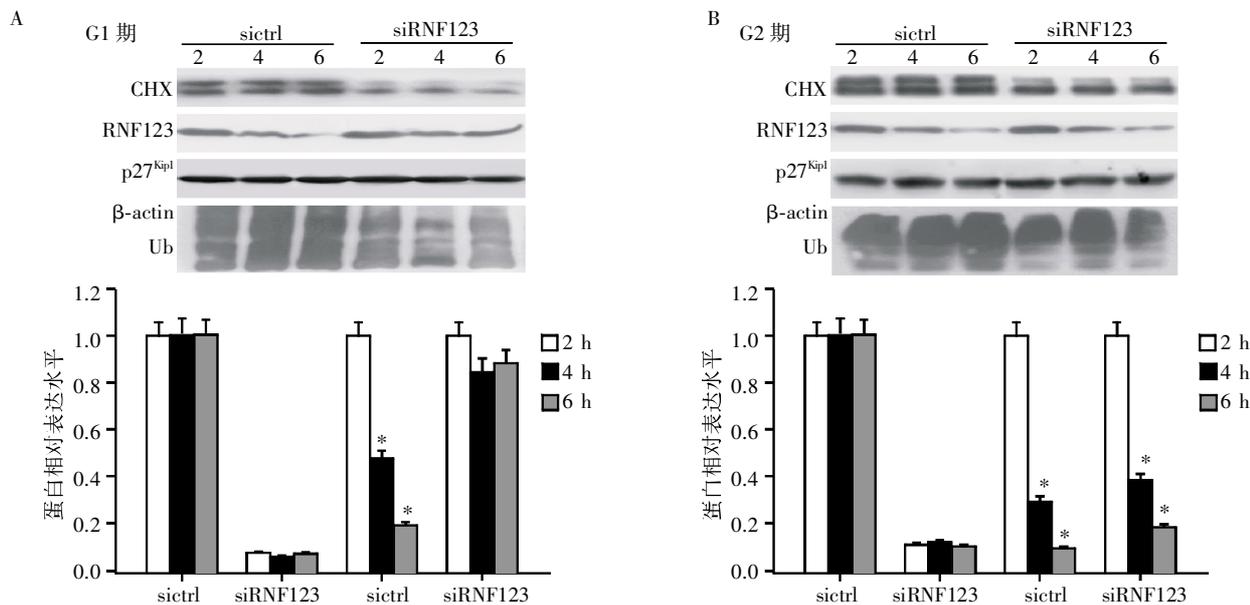
细胞周期依赖性激酶抑制蛋白 p27<sup>Kip1</sup> 是一种重要的细胞周期调节蛋白,其大部分调节主要是翻译后修饰,即磷酸化,能够影响其蛋白稳定性。值得



A: 转染 siCtrl 的细胞; B: 转染 siRNF123 的细胞。与 0 h p27<sup>Kip1</sup> 蛋白表达水平相比, \**P* < 0.05; 与 0 h cyclin A 蛋白表达水平相比, #*P* < 0.05 (*n*=3)。

图 2 血清饥饿释放过程中 RNF123 和 p27<sup>Kip1</sup> 的表达水平

Figure 2 The protein levels of RNF123 and p27<sup>Kip1</sup> during the serum-starvation and release cycle



A: 处于 G1 期的 SKOV3 细胞中 p27<sup>Kip1</sup> 的半衰期; B: 处于 G2 期的 SKOV3 细胞中 p27<sup>Kip1</sup> 的半衰期。与 2 h siCtrl 组 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白表达水平相比, \**P* < 0.05 (*n*=3)。

图 3 降低 RNF123 的表达延长 p27<sup>Kip1</sup> 的半衰期

Figure 3 Reducing RNF123 protein level can extend half-life of p27<sup>Kip1</sup>

注意的是,这种修饰会因细胞所处的周期的不同而不同。在细胞周期 G1 期,有丝分裂信号刺激 p27<sup>Kip1</sup> 发生 Ser10 位磷酸化,借助 Jab1/CRM1 发生出核运输<sup>[4,6]</sup>;然后在胞质中能够被一种未确定的 E3 泛素酶复合物泛素化,进而经由蛋白酶体降解<sup>[5]</sup>。而在 S 期和 G2 期,胞核中 cyclin E-CDK2 使 p27<sup>Kip1</sup> 的

Thr187 位磷酸化,SCFskp2 使其泛素化,蛋白酶体途径降解<sup>[3,7-8]</sup>。

Kamura 等<sup>[5]</sup>发现 E3 复合体的组成,命名为 KPC,它由 RNF123(也称 KPC1)和 KPC2 两个亚基组成。RNF123 是催化亚基,其羧基端环指结构域能够与胞质 p27<sup>Kip1</sup> 相互作用,促进 p27<sup>Kip1</sup> 的泛素化<sup>[9-11]</sup>。

KPC2 发挥衔接蛋白的作用,参与多聚泛素化 p27<sup>Kip1</sup> 与 26S 蛋白酶体的传递<sup>[12]</sup>。本研究显示干扰 RNF123 表达后,血清释放过程中降低的 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白水平有所提高(图 2)。这可能是因为 RNF123 的降低,减少了 KPC 与 p27<sup>Kip1</sup> 的相互作用,削弱了对 p27<sup>Kip1</sup> 的泛素化修饰,而使其降解减少,蛋白水平提高。此外,本研究利用 CHX 抑制蛋白质的合成,降低 RNF123 表达后,p27<sup>Kip1</sup> 的半衰期推迟(图 3)。这一结果与细胞所处的细胞周期有密切关系。G1 期细胞在干扰 RNF123 后 p27<sup>Kip1</sup> 的半衰期与对照组相比时间延长,而 G2 期细胞干扰 RNF123 后半衰期与对照组相比没有显著变化。这一结果与 RNF123 的胞质定位有关,也与 p27<sup>Kip1</sup> 的出核转运有关。在 G1 期,p27<sup>Kip1</sup> 发生出核转运,在胞质中与 KPC 结合而降解;而 S 期,p27<sup>Kip1</sup> 在胞核中被 SCF-skp2 泛素化降解,这也是图 3 泛素水平表达差异的原因。因此 p27<sup>Kip1</sup> 的细胞定位对于 KPC 所介导的降解是必要条件。

RNF123 是 KPC 复合体的重要组成部分。本研究显示了卵巢癌细胞中,干扰 RNF123 表达能够促进内源性胞浆 p27<sup>Kip1</sup> 的蛋白稳定。有研究表明胞浆 p27<sup>Kip1</sup> 可能具有肿瘤细胞增殖的能力<sup>[13-15]</sup>。因此,干扰 RNF123 是否会促进肿瘤细胞的生长,有待于进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Chaturvedi P,Khanna R,Parnaik VK. Ubiquitin ligase RNF123 mediates degradation of heterochromatin protein 1 $\alpha$  and  $\beta$  in lamin A/C knock-down cells [J]. PLoS One,2012,7(10):e47558-e47558
- [2] Radu M,Soprano DR,Soprano KJ. S10 phosphorylation of p27 mediates atRA induced growth arrest in ovarian carcinoma cell lines[J]. J Cell Physiol,2008,217(2):558-568
- [3] Iwahori S,Murata T,Kudoh A,et al. Phosphorylation of p27<sup>Kip1</sup> by Epstein-Barr virus protein kinase induces its degradation through SCFSkp2 ubiquitin ligase actions during viral lytic replication[J]. J Biol Chem,2009,284(28):18923-18931
- [4] Connor MK,Kotchetkov R,Cariou S,et al. CRM1/Ran-mediated nuclear export of p27(Kip1)involves a nuclear export signal and links p27 export and proteolysis[J]. Mol Biol Cell,2003,14(1):201-213
- [5] Kamura T,Hara T,Matsumoto M,et al. Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1)at G1 phase[J]. Nat Cell Biol,2004,6(12):1229-1235
- [6] Fei M,Hang Q,Hou S,et al. Adhesion to fibronectin induces p27(Kip1)nuclear accumulation through down-regulation of Jab1 and contributes to cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR)in RPMI 8,226 cells [J]. Mol Cell Biochem,2014,386(1-2):177-187
- [7] Xu SY,Wang F,Wei G,et al. S-phase kinase-associated protein 2 knockdown blocks colorectal cancer growth via regulation of both p27 and p16 expression[J]. Cancer Gene Ther,2013,20(12):690-694
- [8] Pavlides SC,Huang KT,Reid DA,et al. Inhibitors of SCF-Skp2/Cks1 E3 ligase block estrogen-induced growth stimulation and degradation of nuclear p27<sup>Kip1</sup>: therapeutic potential for endometrial cancer[J]. Gold LI Endocrinology,2013,154(11):4030-4045
- [9] Lu Y,Adegoke OA,Nepveu A,et al. USP19 deubiquitinating enzyme supports cell proliferation by stabilizing KPC1,a ubiquitin ligase for p27<sup>Kip1</sup> [J]. Mol Cell Biol,2009,29(2):547-558
- [10] Lu C,Huang X,Zhang X,et al. miR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development,apoptosis, and IL-12 production through targeting of p27<sup>Kip1</sup>,KPC1, and SOCS-1[J]. Blood,2011,117(16):4293-4303
- [11] Naparstek L,Carmeli Y,Navon-Venezia S,et al. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing Klebsiella pneumoniae [J]. J Antimicrob Chemother,2014 [Epub ahead of print]
- [12] Hara T,Kamura T,Kotoshiba S,et al. Role of the UBL-UBA protein KPC2 in degradation of p27 at G1 phase of the cell cycle[J]. Mol Cell Biol,2005,25(21):9292-9303
- [13] Serres MP,Zlotek-Zlotkiewicz E,Concha C,et al. Cytoplasmic p27 is oncogenic and cooperates with Ras both *in vivo* and *in vitro* [J]. Oncogene,2011,30(25):2846-2858
- [14] Kruck S,Merseburger AS,Hennenlotter J,et al. High cytoplasmic expression of p27 (Kip1)is associated with a worse cancer-specific survival in clear cell renal cell carcinoma[J]. BJU Int,2012,109(10):1565-1570
- [15] Chen G,Cheng Y,Zhang Z,et al. Prognostic significance of cytoplasmic p27 expression in human melanoma [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2011,20(10):2212-2221

[收稿日期] 2014-04-19