

下调泛素结合酶 E2 异构体-1 对子宫内膜癌细胞的增殖及凋亡的影响

洪小山, 侯明敏, 文斌, 张华明, 黎玉涵, 罗喜平

(广东省妇幼保健院, 广东 广州 510010)

摘要: [目的] 研究下调泛素结合酶 E2 异构体-1 (ubiquitin binding enzyme E2 isomer-1, UEV1) 对子宫内膜癌细胞的增殖及凋亡的影响。[方法] 经过细胞培养和细胞转染将 Ishikawa 细胞分为空白组、下调 UEV1 组及上调 UEV1 组。采用聚合酶链反应检测各组 UEV1 表达; 细胞增殖检测各组细胞增殖能力; 采用 Transwell 检测各组细胞侵袭; 采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率; 蛋白质印迹法检测各组活化转录因子 6 (activated transcription factor 6, ATF6)、C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP)、原癌基因 (cell-myc, C-myc) 及细胞增殖因子-67 (Ki-67) 蛋白相对表达。[结果] 与空白组、上调 UEV1 组相比, 下调 UEV1 组 UEV1 表达量降低 ($F=5.699, P<0.001$), 72h 细胞增殖率降低 ($F=9.202, 14.433, 17.391$, 均 $P<0.001$), 72h 细胞凋亡率增高 ($F=9.134, 22.101, 17.797$, 均 $P<0.001$)。与空白组、上调 UEV1 组相比, 下调 UEV1 组 ATF6、Caspase-3 表达量增高, C-myc、Ki-67 表达量降低 ($F=7.888, 6.971, 11.233, 10.129$, 均 $P<0.001$)。[结论] 下调 UEV1 通过调控 ATF6、CHOP、C-myc 及 Ki-67 抑制子宫内膜癌细胞的增殖与侵袭, 促进细胞凋亡, 为子宫内膜癌的靶向治疗提供新的策略具有重要参考价值。

关键词: 泛素结合酶 E2 异构体-1; 子宫内膜癌; 增殖; 凋亡

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X (2021) 03-0206-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2021.03.B010

Effect of Down-regulation of UEV1 on Proliferation and Apoptosis of Endometrial Cancer Cells

HONG Xiao-shan, HOU Ming-min, WEN Bin, ZHANG Hua-ming, LI Yu-han, LUO Xi-ping
(Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 510010, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of down-regulation of ubiquitin binding enzyme E2 isomer-1 (UEV1) on the proliferation and apoptosis of endometrial cancer cells. [Methods] Human endometrial carcinoma Ishikawa cells were transfected with UEV1 NC (blank group), UEV1 mimic (UEV1 up-regulation group) or UEV1 inhibitor (UEV1 down-regulation group). The expression of UEV1 was quantitatively detected by PCR, cell proliferation was detected by the MTT method, the invasion of cells was detected by the Transwell assay, the expressions of activated transcription factor 6 (ATF6), C/EBP homologous protein (CHOP), proto-oncogene (C-myc) and cell proliferation factor-67 (Ki-67) protein were detected by the Western blot. [Results] Compared with the blank group and the UEV1 up-regulation group, the expression of UEV1 in the UEV1 down-regulation group decreased ($F=5.699, P<0.001$), the proliferation rate decreased at 24, 48 and 72h after culture ($F=9.202, 14.433, 17.391$, all $P<0.001$) and cell apoptosis rate increased at 24, 48 and 72h ($F=9.134, 22.101, 17.797$, all $P<0.001$). Compared with the blank group and the UEV1 up-regulation group, the expression levels of ATF6 and Caspase-3 in the UEV1 down-regulation group increased, while the expression levels of C-myc and Ki-67 decreased ($F=7.888, 6.971, 11.233, 10.129$, all $P<0.001$). [Conclusion] Down regulating UEV1 can inhibit the proliferation and invasion of endometrial cancer cells and promote cell apoptosis by regulating ATF6, chop, c-myc and Ki-67, which may provide new strategies for targeted treatment of endometrial cancer.

Subject words: ubiquitin binding enzyme E2 isomer-1; endometrial cancer; proliferation; apoptosis

子宫内膜癌(endometrial cancer, EC)是一种起源

于子宫内膜的女性生殖道系统常见的恶性肿瘤^[1]。

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(A2018059)

通信作者: 罗喜平, 主任医师, 硕士; 广东省妇幼保健院妇科, 广东省广州市番禺兴南大道 521 号 (510010); E-mail: 2488692399@qq.com

收稿日期: 2020-04-14; **修回日期:** 2020-10-14

子宫内膜癌的发病原因目前仍不明确, 但现有的研究显示子宫内膜癌的发病受多种因素的影响, 如多囊卵巢综合征、长期单用雌激素补充、功能性卵巢巢

瘤治疗等外源性或内源性因素刺激雌激素分泌,导致子宫内膜增生^[2-3]。子宫内膜癌必须采用综合性治疗手段,主要治疗方法是以手术治疗为主,术后根据临床组织学分级及病理分期辅以放化疗^[4]。一旦当肿瘤细胞处于进展期或具有恶性倾向的组织病理学特征时,子宫内膜癌的死亡率最高,同时也错过了手术治疗的最佳时期。早期诊断为子宫内膜癌的治疗及改善预后具有重要意义。

泛素结合酶 E2 异构体-1(ubiquitin binding enzyme E2 isomer-1,UEV1)具有调节转录功能,是泛素结合酶(ubiquitin binding enzyme,UVE)基因家族中一员,报道显示 UEV1 在胰腺癌和胃癌等多种恶性肿瘤过表达,UEV1 过表达可促进肿瘤细胞的增殖、侵袭、减少细胞凋亡,将 UEV1 作为胰腺癌进行靶向治疗具有可行性^[5]。UEV1 作为细胞癌基因 FOS (cellular oncogene FOS,C-FOS)启动子的反式作用因子,C-FOS 表达与子宫内膜癌转移存在关联参与细胞内信号的传导^[6],因此 UEV1 过表达与子宫内膜癌发病密切相关^[7]。活化转录因子 6(activated transcription factor 6,ATF6)、C/EBP 同源蛋白(C/EBP homologous protein,CHOP)、原癌基因(cell-myc,C-myc)及细胞增殖因子-67(Ki-67)是公认的参与肿瘤细胞增殖、侵袭和凋亡的蛋白,在子宫内膜癌也均呈异常表达。本文分析下调 UEV1 对子宫内膜癌细胞的增殖及凋亡的影响,同时检测上述蛋白的变化,为 UEV1 能否作为靶向治疗子宫内膜癌提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞株、设备与试剂

人子宫内膜癌细胞系 Ishikawa 细胞上海复祥生物科技有限公司。

设备:Facscalibur 型流式细胞仪 (美国 BD 公司)、Cytotflex 型流式细胞仪 (美国贝克曼公司)、7500 型荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction,PCR) 仪 (美国 ABI 公司)、CX33 型显微镜 (日本奥林巴斯公司)、低温冰箱 (日本三洋公司)、37XB 型倒置显微镜 (上海豫光仪器有限公司)、Heraeos1.0r 型低温高速离心机(德国贺力氏公司)。

试剂:Lipofectamine 2000 转染试剂 (美国 Gibco 公司)、Trizol(美国 Gibco 公司)、兔抗人 UEV1、兔抗人 ATF6、兔抗人 CHOP、兔抗人 C-myc、Ki-67 及兔抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)一抗(北京康为世纪生物科技有限公司)、RPMI-1640 培养液(美国 Gibco 公司)、胎牛血清(杭州四季青)、细胞增殖(methyl thiazoyl terazolium,MTT)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)、蛋白质印迹法检测试剂盒(美国默克公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

取出冻存的子宫内膜癌 Ishikawa 细胞,37℃火浴溶解均匀融化。将 Ishikawa 细胞在含 10%胎牛血清、100mg/ml 链霉素和 100U/ml 青霉素的 RPMI-1640 培养基内,37℃及 5%CO₂ 恒温培养箱内培养,隔天换液。细胞融合率达到 80%~90%用于实验。

1.2.2 细胞转染

将 Ishikawa 细胞置于 6 孔板中,1d 后进行转染。按是否转染,将细胞分为 3 组:空白组、上调 UEV1 组和下调 UEV1 组,每组设 3 个复孔。参照 Lipofectamine2000 操作说明书,将 UEV1 NC、UEV1 mimic、UEV1 inhibitor 与脂质体按比例混合,室温静置 20min。将之前铺好的培养板中培液弃去,PBS 清洗,置于 37℃ CO₂ 培养箱中培养 48h,收集细胞。

1.2.3 采用 PCR 检测 UEV1 表达

采用 Trizol 提取细胞 RNA,逆转录合成 cDNA,引物序列见 Table 1。反应条件:95℃ 15s,60℃ 1min,30 个循环,将 PCR 反应实验前 3~15 个循环荧光信号作为荧光本底信号,调节基线,采用 2^{-ΔΔCt} 分析 UEV1 表达。

1.2.4 MTT 检测细胞增殖能力

采用 MTT 检测细胞增殖能力,将细胞置于 96 孔板中,每孔 1500 细胞,每组细胞培养 24、48 和 72h 后,细胞培养终止前 4h 加入 20μl 5mg/ml MTT,孵育 4h 后吸去培养液,加入 100μl DMSO,震荡 5min,显微镜下观察细胞的增殖能力。每组设 3 个复孔。

Table 1 Sequence of primers

Gene	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGTATGGGATTC
UEV1	GGAATTCATATGGCTGCCGCGCG- GCACCAGAGAGGCATGTCTGGCA- CATCATGGGGTATTITTCGAA	CATGCCATGGGATCGAGCCATc- CACCATCACCATCACCATCATG- GAGcACCCCCAGTTTCGAAAA

1.2.5 Transwell 检测细胞侵袭

细胞转染 48h 后, 胰酶消化, 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗 1~2 次, 将细胞密度调至 $\times 10^5$ 个/ml, 取 100 μ l 细胞悬液加入到 Transwell 小室中, 牛血清白蛋白重悬细胞, 24h 后乙醇固定 5min, 结晶紫进行染色, 倒置显微镜下计数穿膜的细胞。每组设 3 个复孔。

1.2.6 细胞凋亡率检测

将细胞转染质粒 24h 后, 用 0.25% 胰酶消化各组细胞约 5min, 细胞瓶表面呈现雾状, PBS 吹打, 4℃ 1200r/min 离心 5min, PBS 洗涤 2 次, 采用细胞过滤网过滤, 以流式细胞仪进行凋亡检测。

1.2.7 Western Blot 检测 UEV1、ATF6、CHOP、C-myc 及 Ki-67 蛋白表达

研磨各组细胞, 加入蛋白缓冲液, 提取蛋白, BCA 法定量分析。50 μ g 蛋白样品上样后 SDS-PAGE 电泳, 电转到 PVDF 膜, 在 TBST 中将 5% 脱脂奶粉避光封闭 1h, 洗涤后加入 UEV1、ATF6、CHOP、C-myc 及 Ki-67 一抗稀释溶液(1:1000), 4℃ 保存过夜, 洗涤后加入二抗, 温床中孵育 1h, 电化学发光(electrochemiluminescence, ECL), 采用软件分析检测的条带的相对灰度值为待测蛋白的相对表达, 内参蛋白采用 GAPDH。每组重复 3 次。

1.3 统计学处理

数据分析采用 SPSS20.0 统计软件, 计量数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)描述, 三组数据比较采用 *F* 检验, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 UEV1 表达比较

与空白组相比, 上调 UEV1 组 UEV1 表达增高, 下调 UEV1 组 UEV1 表达降低(均 $P<0.05$), 提示上调 UEV1 组及下调 UEV1 组转染实验成功。与上调 UEV1 组相比, 下调 UEV1 组 UEV1 表达降低($t=11.250$, 均 $P<0.001$)(Figure 1, Table 2)。

2.2 各组不同时间的细胞增殖率比较

与空白组相比, 上调 UEV1 组不同时间的细胞增殖率增高, 下调 UEV1 组不同时间的细胞增殖率降低(均 $P<0.05$)。与上

调 UEV1 组相比, 下调 UEV1 组不同时间的细胞增殖率降低($t=6.135, 9.622, 11.590$, 均 $P<0.001$)(Table 3)。

2.3 各组细胞侵袭情况比较

下调 UEV1 组细胞侵袭数(120.4 ± 14.5 个)低于空白组细胞侵袭数(201.5 ± 17.5 个)以及上调 UEV1 组细胞侵袭数(331.5 ± 22.4 个)($F=37.526, P<0.001$); 空白组细胞侵袭数(201.5 ± 17.5 个)低于上调 UEV1 组细胞侵袭数(331.5 ± 22.4 个), 差异具有统计学意义($t=14.460, P<0.001$)(Figure 3)。

2.4 各组不同时间的细胞凋亡率比较

与空白组相比, 上调 UEV1 组细胞凋亡率降低, 下调 UEV1 组细胞凋亡率增高(均 $P<0.05$)。与上调 UEV1 组相比, 下调 UEV1 组细胞凋亡率增高($t=6.089, 13.320, 11.860$, 均 $P<0.001$)(Figure 3, Table 4)。

2.5 下调 UEV1 对细胞 ATF6、CHOP、C-myc 及 Ki-67 蛋白表达比较

与空白组相比, 上调 UEV1 组 ATF6、Caspase-3 表达降低, C-myc、Ki-67 表达增高, 下调 UEV1 组 ATF6、Caspase-3 表达增高, C-myc、Ki-67 表达降低,

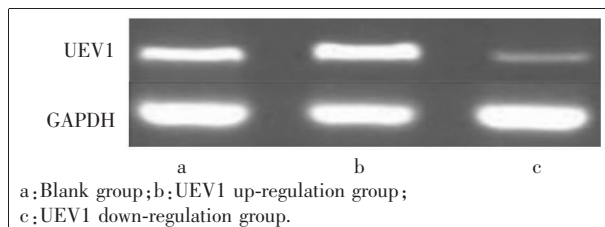


Figure 1 Expression of UEV1 in each group

Table 2 Comparison of UEV1 expression in each group

Group	UEV1
Blank group	1.15 $\pm$ 0.37
UEV1 up-regulation group	1.92 $\pm$ 0.41*
UEV1 down-regulation group	0.41 $\pm$ 0.11**
<i>F</i>	5.699
<i>P</i>	0.001

Note: *, Compared with Blank group, $P<0.05$; **, Compared with UEV1 up-regulation group, $P<0.05$.

Table 3 Comparison of cell proliferation rate in different time(%)

Group	Cell proliferation		
	24h	48h	72h
Blank group	10.36 $\pm$ 2.18	12.13 $\pm$ 3.31	14.52 $\pm$ 4.57
UEV1 up-regulation group	18.84 $\pm$ 5.24*	26.53 $\pm$ 6.61*	41.58 $\pm$ 10.43*
UEV1 down-regulation group	8.25 $\pm$ 1.53**	6.18 $\pm$ 1.02**	3.25 $\pm$ 0.72**
<i>F</i>	9.202	14.433	17.391
<i>P</i>	0.001	0.001	0.001

Note: *, Compared with Blank group, $P<0.05$; **, Compared with UEV1 up-regulation group, $P<0.05$.

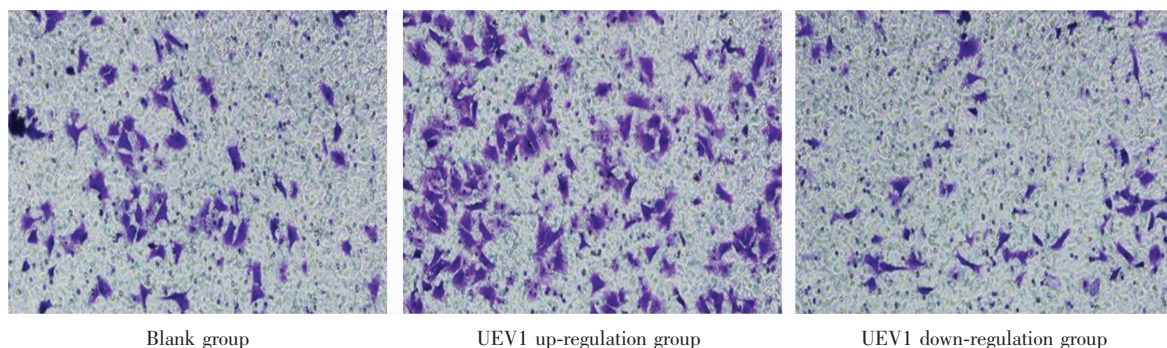


Figure 2 Cell invasion under the microscope in each group($\times 200$)

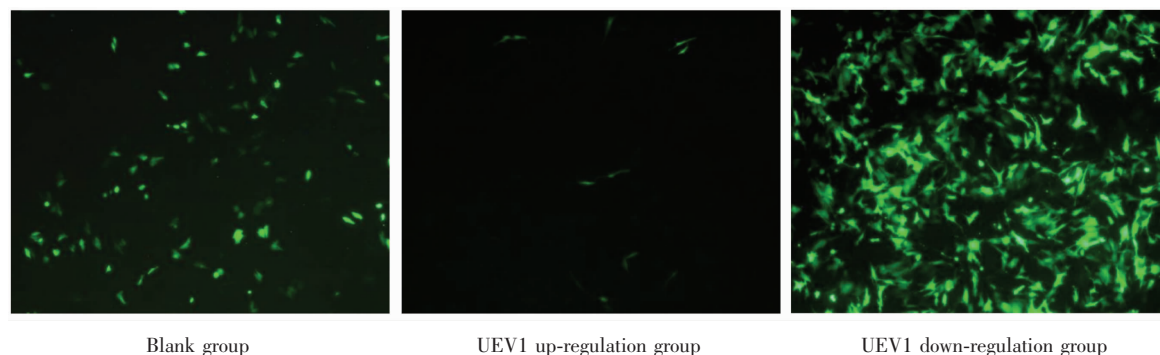


Figure 3 Apoptosis under the microscope in each group($\times 200$)

Table 4 Comparison of apoptosis rate in different time(%)

Group	Cell proliferation		
	24h	48h	72h
Blank group	10.36 $\pm$ 2.18	12.13 $\pm$ 3.31	14.52 $\pm$ 4.57
UEV1 up-regulation group	18.84 $\pm$ 5.24*	26.53 $\pm$ 6.61*	41.58 $\pm$ 10.43*
UEV1 down-regulation group	8.25 $\pm$ 1.53*#	6.18 $\pm$ 1.02*#	3.25 $\pm$ 0.72*#
F	9.202	14.433	17.391
P	0.001	0.001	0.001

Note: *, Compared with Blank group, $P < 0.05$; #, Compared with UEV1 up-regulation group, $P < 0.05$.

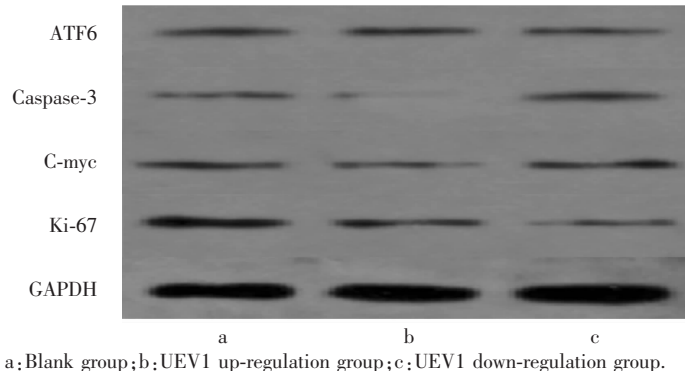


Figure 4 ATF6, CHOP, C-myc and Ki-67 protein expression

差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与上调 UEV1 组相比, 下调 UEV1 组 ATF6、Caspase-3 表达量增高, C-myc、Ki-67 表达量降低, 差异均具有统计学意义($t=4.385$ 、 4.647 、 7.488 、 6.753 , 均 $P < 0.001$)(Figure 4, Table 5)。

3 讨论

子宫内膜癌的临床症状容易及时发现, 因此就诊时往往多处于早期阶段, 其恶性程度较低, 而且高分化子宫内膜样腺癌居多, 早期患者的生存率较高, 预后较好^[8-9]。无孕激素拮抗下雌激素长期低水平刺激是导致子宫内膜癌变的主要因素^[10-11]。相关研究表明^[12], 代谢综合征是子宫内膜癌发病的高危因素, 其发病的共同病理生理基础是高胰岛素血症与胰岛素抵抗。当机体出现高胰岛素血症与胰岛素抵抗时, 循环中的高水平胰岛素能够增强雌激素活性, 两者联合促进子宫内膜细胞的增殖, 提高子宫内膜癌的发病风

Table 5 Comparison of ATF6, CHOP, C-myc and Ki-67 protein expression by down-regulating UEV1

Group	ATF6	Caspase-3	C-myc	Ki-67
Blank group	0.27±0.07	0.29±0.08	0.31±0.09	0.29±0.08
UEV1 up-regulation group	0.21±0.08*	0.23±0.07*	0.39±0.11*	0.38±0.10*
UEV1 down-regulation group	0.41±0.12**	0.46±0.14**	0.12±0.03**	0.15±0.04**
F	7.888	6.971	11.233	10.129
P	0.001	0.001	0.001	0.001

Note: *: Compared with Blank group, $P < 0.05$; **: Compared with UEV1 up-regulation group, $P < 0.05$.

险^[13-14]。UEV1 具有调节转录功能,是 UVE 基因家族中一员,其过表达可能与肿瘤的发生密切相关^[15]。UEV1 作为癌基因 C-FOS 启动子的反式作用因子,C-FOS 表达与子宫内膜癌转移存在关联参与细胞内信号的传导^[6]。

在人类肿瘤永生细胞中,UEV1 表达增高,UEV1 剪接变体之一 UEV1A 是参与 DNA 损伤修复过程的泛素结合酶 Ubc13 的辅因子^[16]。本文研究显示,与空白组、上调 UEV1 组相比,下调 UEV1 组 UEV1 表达降低,提示下调 UEV1 组 UEV1 的表达降低,转染实验成功。与空白组、上调 UEV1 组相比,下调 UEV1 组细胞增殖率降低,凋亡率增高,提示当下调 UEV1 表达时,子宫内膜癌细胞不仅增殖率降低,而且凋亡率增高。Hu 等^[17]相关研究发现 UEV1A 参与乳腺癌的转移和侵袭过程,可见 UEV1A 在肿瘤的发生过程中起重要作用。UEV1 作为癌基因 C-FOS 启动子的反式作用因子,参与细胞内信号的传导。Ubc13 与 UEV1A 形成二聚体,催化 K63 泛素链的形成,参与核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路的激活,调控相关靶基因的转录^[18]。

内质网应激是与细胞凋亡有关的机制,氧化应激、缺氧、药物等可诱导细胞内质网应激,能够引起内质网胞核和胞浆之间的信号转导。ATF6 在内质网应激发生时可迅速被活化内质网穿膜蛋白,诱导内质网应激元件基因表达,促进癌细胞凋亡^[19]。Caspase-3 以酶原的形式存在细胞内,是凋亡级联反应的下游执行因子^[20]。C-myc 与肿瘤的发生、细胞生长调控密切相关,其通过基因高度扩增与过表达或重排参与肿瘤的形成过程^[21]。Ki-67 蛋白在子宫内膜癌细胞中呈异常表达,阳性表达率明显增高,增加子宫内膜细胞癌转移或侵袭风险^[22]。本文研究结果显示,与空白组相比,上调 UEV1 组 ATF6、Caspase-3 表达降低,C-myc、Ki-67 表达增高,下调 UEV1 组 ATF6、

Caspase-3 表达增高,C-myc、Ki-67 表达降低。与上调 UEV1 组相比,下调 UEV1 组 ATF6、Caspase-3 表达增高,C-myc 和 Ki-67 表达降低,提示下调 UEV1 抑制子宫内膜癌细胞的增殖与侵袭,促进细胞的凋亡可能与调控 ATF6、CHOP、C-myc 和 Ki-67 相关,但目前尚无直

接文献显示 UEV1 如何调控上述癌相关基因表达,因此进一步研究有必要分析 UEV1 与 ATF6、CHOP、C-myc 及 Ki-67 的关系。

综上所述,下调 UEV1 通过调控 ATF6、CHOP、C-myc 及 Ki-67 抑制子宫内膜癌细胞的增殖与侵袭,促进细胞凋亡,为子宫内膜癌的靶向治疗提供新的策略具有重要参考价值。

参考文献:

- [1] Braun MM, Overbeek-Wager EA, Grumbo RJ. Diagnosis and management of endometrial cancer[J]. Am Fam Physician, 2016, 93(6): 468-474.
- [2] Lee YC, Lheureux S, Oza AM. Treatment strategies for endometrial cancer: current practice and perspective[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2017, 29(1): 47-58.
- [3] Passarelllo K, Kurian S, Villanueva V. Endometrial cancer: an overview of pathophysiology, management, and care[J]. Semin Oncol Nurs, 2019, 35(2): 157-165.
- [4] 赵轩宇, 孔为民, 商若天, 等. 子宫内膜癌 1971 年临床分期与 FIGO2009 年手术病理分期比较[J]. 肿瘤学杂志, 2019, 25(1): 51-54.
Zhao XY, Kong WM, Shang RT, et al. Comparison of clinical staging and surgical/pathological staging for endometrial carcinoma[J]. Journal of Chinese Oncology, 2019, 25(1): 51-54.
- [5] Zheng N, Shabek N. Ubiquitin ligases: structure, function, and regulation[J]. Annu Rev Biochem, 2017, 86(6): 129-157.
- [6] Zhao T, Tang X, Umeshappa CS, et al. Simulated microgravity promotes cell apoptosis through suppressing UEV1A/TICAM/TRAF/NF- κ B-regulated anti-apoptosis and p53/PCNA- and ATM/ATR-Chk1/2- controlled DNA-damage response pathways[J]. J Cell Biochem, 2016, 117(9): 2138-2148.
- [7] Liu Y, Zhao R, Chi S, et al. UBE2C is upregulated by estrogen and promotes epithelial-mesenchymal transition via p53 in endometrial cancer.[J]. Mol Cancer Res, 2020, 18

- (2):204–215.
- [8] 李美月,姜素,王颖梅,等.双膦酸盐类药物在子宫内膜癌中的研究进展[J]. 中华妇产科杂志,2019,54(7):497–500.
Li MY, Jiang S, Wang YM, et al. Research progress of bisphosphonates in endometrial cancer[J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2019, 54(7):497–500.
 - [9] 蒋芳,任彤,成宁海,等.子宫内膜癌骨转移的临床病理特点及预后分析[J]. 中华妇产科杂志,2019,54(7):452–457.
Jiang F, Ren T, Cheng NH, et al. Clinicopathological characteristics and prognosis analysis of endometrial cancer bone metastasis [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2019, 54(7):452–457.
 - [10] Rodriguez AC, Blanchard Z, Maurer KA, et al. Estrogen signaling in endometrial cancer: a key oncogenic pathway with several open questions[J]. Horm Cancer, 2019, 10(2–3):51–63.
 - [11] Blanchard Z, Vahrenkamp JM, Berrett KC, et al. Estrogen-independent molecular actions of mutant estrogen receptor 1 in endometrial cancer[J]. Genome Res, 2019, 29(9):1429–1441.
 - [12] Yang X, Wang J. The role of metabolic syndrome in endometrial cancer: a review[J]. Front Oncol, 2019, 9(8):744.
 - [13] Cohen CW, Fontaine KR, Arend RC, et al. A ketogenic diet reduces central obesity and serum insulin in women with ovarian or endometrial cancer[J]. J Nutr, 2018, 148(8):1253–1260.
 - [14] Busch EL, Crous-Bou M, Prescott J, et al. Adiponectin, leptin, and insulin-pathway receptors as endometrial cancer subtyping markers[J]. Horm Cancer, 2018, 9(1):33–39.
 - [15] Pasupala N, Morrow ME, Que LT, et al. OTUB1 non-catalytically stabilizes the E2 ubiquitin-conjugating enzyme UBE2E1 by preventing its autoubiquitination[J]. J Biol Chem, 2018, 293(47):18285–18295.
 - [16] Wu Z, Neufeld H, Torlakovic E, et al. UEV1A-UBC13 promotes colorectal cancer metastasis through regulating CXCL1 expression via NF- κ B activation[J]. Oncotarget, 2018, 9(22):15952–15967.
 - [17] Hu L, Xu J, Xie X, et al. Oligomerization-primed coiled-coil domain interaction with UBC13 confers processivity to TRAF6 ubiquitin ligase activity [J]. Nat Commun, 2017, 8(1):814.
 - [18] Wu Z, Shen S, Zhang Z, et al. Ubiquitin-conjugating enzyme complex UEV1A-UBC13 promotes breast cancer metastasis through nuclear factor- κ B mediated matrix metalloproteinase-1 gene regulation[J]. Breast Cancer Res, 2014, 16(4):R75.
 - [19] 潘高峰,李国云,季雪良,等.慢性 HBV 感染者外周血 ATF6 水平检测及其临床意义[J]. 临床肝胆病杂志,2019, 35(9):1946–1949.
Pan GF, Li GY, Ji XL, et al. Detection of peripheral blood ATF6 level in patients with chronic HBV infection and its clinical significance[J]. Journal of Clinical Hepatology, 2019, 35(9):1946–1949.
 - [20] 刘畅,田兴,蒋志强,等.Bax-Caspase-3 融合基因过表达对 MGC-803 胃癌细胞增殖、凋亡和迁移的影响[J]. 中华普通外科杂志,2019,34(6):542–543.
Liu C, Tian X, Jiang ZQ, et al. Effect of Bax-Caspase-3 fusion gene overexpression on proliferation, apoptosis and migration of MGC-803 gastric cancer cells[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2019, 34(6):542–543.
 - [21] 黄文亭,郭蕾,郑波,等.c-myc 蛋白表达水平与 c-myc 基因易位相关性分析及其临床应用[J]. 临床与实验病理学杂志,2016,32(10):1110–1112,1117.
Huang WT, Guo L, Zheng B, et al. Correlation analysis of c-myc protein expression level and c-myc gene translocation and its clinical application[J]. Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2016, 32(10):1110–1112,1117.
 - [22] 夏良兵. 子宫内膜癌组织中的 p53 及 Ki-67 蛋白的表达及与临床病理特征的关系分析[J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(5):857–859.
Xia LB. Expression of p53 and Ki-67 protein in endometrial cancer tissue and analysis of its relationship with clinicopathological characteristics[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2019, 23(5):857–859.