DOI:10.16016/j.2097-0927.202110107

基于磷酸化修饰组学分析 WNK2 调控卵巢癌细胞骨架形成

李凤杰[1],贾永琴[1],梁 振[1],胡 彬[2],贺思敏[3],王延洲[1],杨泽宇[4],梁志清[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院妇产科[1];410031 长沙,中南大学生命科学学院分子生物学研究中心[2];410028 长沙,中南大学湘雅公共卫生学院[3];400013 重庆,重庆市人民医院甲状腺乳腺外科[4]

[摘要] **目的** 通过蛋白质磷酸化修饰组学质谱测序,分析蛋白激酶 WNK2 在卵巢癌细胞中调控的生物过程。**方法** 用 WNK2 干扰慢病毒感染 SKOV3 细胞系,药筛获得稳转细胞株,提取总蛋白进行蛋白质磷酸化修饰组学质谱测序,根据生物信息学分析干扰 WNK2 前后 SKOV3 细胞中蛋白质磷酸化水平的变化,筛选磷酸化差异蛋白,KEGG 及 GO 富集分析获取差异蛋白在卵巢癌细胞中调控的生物学过程并进行实验验证。**结果** 通过生物信息学分析磷酸化修饰组学质谱数据,结果显示干扰 WNK2 后,SKOV3 细胞中共有 745 个蛋白磷酸化水平显著下降,其中包含 1 078 个磷酸化修饰位点发生变化,328 个蛋白磷酸化水平显著上升,共 415 个磷酸化修饰位点发生变化。将磷酸化水平发生变化的差异蛋白进行 KEGG、GO 富集分析,发现 WNK2 主要参与了细胞骨架形成、信号传导、细胞组成、激酶活性调控等生物过程。干扰或过表达 WNK2 后,利用鬼笔环肽进行细胞骨架染色,结果显示,干扰 WNK2 后,细胞骨架断裂,排列紊乱;过表达 WNK2 后,细胞骨架重排增强。**结论** WNK2 通过调控 vimentin 等蛋白的磷酸化水平参与卵巢癌细胞骨架形成过程。

[关键词] 卵巢癌;WNK2;磷酸化修饰;vimentin;细胞骨架

[中图法分类号] R345;R394.3;R737.31 [文献标志码] A

Analysis of WNK2 regulating cytoskeleton formation in ovarian cancer cells based on phosphorylation modification sequencing

LI Fengjie[1], JIA Yongqin[1], LIANG Zhen[1], HU Bin[2], HE Simin[3], WANG Yanzhou[1], YANG Zeyu[4], LIANG Zhiqing[1]

[1]Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Center of Molecular Biology, School of Life Sciences of Central South University, Changsha, Hunan Province, 410031; [3]Xiangya School of Public Health, Central South University, Changsha, Hunan Province, 410028; [4]Department of Thyroid and Breast Surgery, Chongqing People's Hospital, Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] Objective To analyze the biological processes regulated by protein kinase WNK2 in ovarian cancer cells based on protein phosphorylation modified mass spectrometry. Methods Ovarian cancer cell line SKOV3 was transfected with lentiviral vector to knockdown WNK2 and the obtained cells were further screened by drug screening. Then the total protein was extracted for protein phosphorylation modification mass spectrometry analysis. Bioinformatics analysis was adopted to detect the phosphorylation changes before and after WNK2 knockdown, and differential proteins were screened out. Gene Ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis were employed to explore the functions of differentially phosphorylated proteins, and experiments were performed to verify the biological processes regulated by

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2019YFC1005202)

[通信作者] 梁志清,E-mail:zhi_qingliang@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

WNK2. **Results** Phosphorylation modified mass spectrometry indicated that WNK2 knockdown significantly decreased the phosphorylation of 745 proteins with 1 078 altered protein sites, and increased the phosphorylation of 328 proteins with 415 altered protein sites. KEGG and GO enrichment analyses showed WNK2 influences biological processes such as cytoskeleton organization, signal transduction, cell composition, and regulation of kinase activity. Phalloidin staining indicated after WNK2 knockdown resulted in broken and disordered cytoskeleton, while its overexpression promoted cytoskeleton remodeling. **Conclusion** WNK2 is involved in the cytoskeleton formation in ovarian cancer cells by regulating the phosphorylation of vimentin and other proteins.

[**Key words**] ovarian cancer; WNK2; phosphorylation modification; vimentin; cytoskeleton

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1005202). Corresponding author: LIANG Zhiqing, E-mail: zhi_qingliang@163.com

卵巢癌(ovarian cancer,OC)是一种常见的妇科恶性肿瘤,其发病率仅较子宫体癌低,位于第2位。2020年全球有313 959例女性患卵巢癌,其中207 252例病死[1]。由于早期诊断困难,易复发且耐药,其病死率在妇科恶性肿瘤中列首位[2]。手术和化疗是卵巢癌的传统治疗手段。即使手术技巧和化疗方案不断改进,其5年生存率仍低于50%。为改善这一现状,研究人员一直致力于探寻能有效提高卵巢癌患者生存率的治疗方法。

蛋白的翻译后修饰在蛋白功能的调节中发挥着至关重要的作用。蛋白激酶作为最大的与进化相关蛋白家族,通过磷酸化其下游目的蛋白的特定氨基酸位点,进而调控包括细胞生长、分化、增殖和凋亡等一系列复杂的生物过程[3]。其异常引起了包括肿瘤在内的多种疾病,因此,激酶成为治疗肿瘤等多种疾病的重要靶点。丝氨酸/苏氨酸激酶(serine threonine kinase,STK)作为调节细胞生物过程的最大一组激酶,是潜力巨大的治疗癌症的靶点,MAPK、MER、AKT等激酶在内的STK在包括卵巢癌等多种肿瘤中过度活化。国内外STK抑制剂治疗卵巢癌的多项研究已成为研究热点。但是现有STK抑制剂的副作用较大且效果不理想[4-5]。探寻有效的STK治疗靶点或许能给卵巢癌患者带来新的生机。

WNK(with no lysine kinases)激酶是近20余年才被发现的一类STK,其特征是结构域Ⅱ中缺乏赖氨酸。此前研究发现,激酶结构域Ⅱ中的赖氨酸是结合腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)的位点,此赖氨酸突变会导致激酶活性的散失。而WNK激酶的赖氨酸缺失不仅没有影响WNK激酶的活性,反而有研究表明该激酶调控多种生物过程[6]。WNK激酶通过调节Wnt、MEKK2/3、β-catenin、TGF-β、PI3K-AKT、NF-κB和AKT5信号传导途径促进肿瘤发生发展[7-9]。WNK2是位于染色体9q22.31上的一个具有多个结构域的细胞质蛋白,其相对分子质量为243×10^3[10]。在结肠癌、胰腺癌、脑膜瘤等肿瘤发生发展中起着举足轻重的作用。研究人员不仅在多种肿瘤中发现表观遗传学修饰导致的WNK2沉默,而且该激酶可以抑制细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases,ERK)等重要通路影响肿瘤细胞的恶性生物学行为[11-13]。然而,其在卵巢癌中的功能和调控机制研究仍为空白。为了探究该激酶在卵巢癌中的作用,本研究借助蛋白质磷酸化修饰组学质谱技术,分析WNK2在卵巢癌中调控的靶标及生物过程,从而为卵巢癌的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

人卵巢癌细胞株SKOV3购自ATCC官网;RPMI-DMEM细胞培养基,胎牛血清购自Gibico公司;双抗(链霉素+青霉素)购自重庆衍庆生物技术有限公司;WNK2、vimentin、p-vimentin一抗购自Abcam公司;抗兔二抗自于CST公司;TRIzol试剂购自TaKaRa公司;RIPA、Cocktail、Loading buffer等购自碧云天公司;RT-PCR试剂盒购自诺维赞公司;转染试剂lipo3000由赛默飞世尔科技有限公司提供;sh-WNK2由广州锐博生物科技有限公司构建合成,序列为CAAGGACAATG-GAGCCATA;慢病毒由擎科生物技术有限公司包装合成;WNK2过表达质粒由上海吉凯基因科技有限公司提供。

1.2 实验仪器

荧光显微镜为日本东京生产的奥林巴斯BX53;Bio-Rad PCR仪CFX96产于美国伯乐公司;VILBER荧光化学发光成像系统购自博康美华生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 配置完全培养基:在 DMEM 中加入 10%的胎牛血清、1%双抗(链霉素+青霉素)。用于培养卵巢癌细胞株 SKOV3、CAOV3。并且保证细胞培养箱是恒温 37 ℃、CO_2 比例为 5%的湿润环境。

1.3.2 si-RNA 转染 CAOV3、SKOV3 细胞培养于 6 孔板中,培养 24 h 后细胞密度约为 50%。分别取 5 μL siRNA (20 μmol/L)或 5 μL Lipo3000 加入 500 μL 的 Optimem 培养基中,轻轻混匀静置 5 min 后,将转染试剂和 siRNA 混合,静置 20 min 后,将混合液加入 6 孔板中。

1.3.3 质粒转染 CAOV3、SKOV3 细胞培养于 6 孔板中,培养 24 h 后细胞密度约为 50%,换无血清培养基。分别取 3 μg 质粒或 5 μL lipo3 000 加入 500 μL 的 optimem 培养基中,轻轻混匀静置 5 min 后,将转染试剂和质粒混合,静置 20 min 后,将混合液加入 6 孔板中,6 h 后换完全培养基培养。

1.3.4 建立稳定转染株 将慢病毒加入 6 孔板培养的 SKOV3 细胞中,保证 MOI 大于 30。48 h 后换加入 2 μg/mL 嘌呤霉素的新鲜培养基进行药筛。24 h 后,细胞出现死亡。随后将嘌呤霉素浓度调至 1 μg/mL。待细胞生长约 14 d 左右,对照组和 *WNK2* 敲低的稳转株建成,荧光显微镜下观察感染效率>90%。

1.3.5 RT-qPCR 用 TRIzol 试剂提取 RNA 后进行逆转录和 RNA 检测。PCR 扩增步骤如下:95 ℃ 3 min,95 ℃ 10 s,57 ℃ 30 s(39 个循环),65 ℃ 5 s,95 ℃ 0.5 s。*WNK2* 和 *GAPDH* 的引物由擎科生物技术有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列与产物长度

基因名称	引物序列(5′-3′)	产物长度/bp
WNK2	上游:5′-TGGTTCATCATCTGTCCG-3′	149
	下游:5′-AAGCTGGGTTGTTCCTT-3′	
GAPDH	上游:5′-AGCCACATCGCTCAGACAC-3′	91
	下游:5′-TTAAAAGCAGCCCTGGTGAC-3′	

1.3.6 Western blot 蛋白样品定量后,取 40 μg 总蛋白进行电泳(浓缩胶:恒压 80 V,分离胶:恒压 130 V)。待蛋白样品跑至最底部,提前用甲醇活化 PVDF 膜,采用湿转方法将蛋白转至 PVDF 膜上。5%脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 2 h 后,4 ℃,孵育 1 抗(1∶1 000)过夜。次日,用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。再于室温下孵育二抗 1 h。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,最后显影。GAPDH 作为内参。根据条带灰度值,对目的蛋白的表达进行定量分析。

1.3.7 磷酸化修饰组学测序分析 磷酸化修饰组学测序及生物信息学分析均由杭州景杰生物科技股份有限公司完成。

1.3.8 细胞骨架染色 细胞转染过表达质粒 48 h 后,用罗丹明标记鬼笔环肽进行细胞骨架染色。PBS 清洗细胞 2 次,甲醇固定细胞 10 min。接着 Triton X-100 透化处理细胞 5 min,室温避光孵育鬼笔环肽 30 min,最后用 DAPI 染细胞核 3 min。每步间隙用 PBS 清洗细胞 3 次,每次 10 min。最后荧光显微镜下进行拍摄。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,两个样品均值比较采用 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 干扰 *WNK2* 的稳转细胞株建立

干扰 *WNK2* 的 SKOV3 稳转细胞株建成之后,荧光显微镜下观察到对照组和干扰组细胞均有绿色荧光(图 1),代表稳转株构建成功。

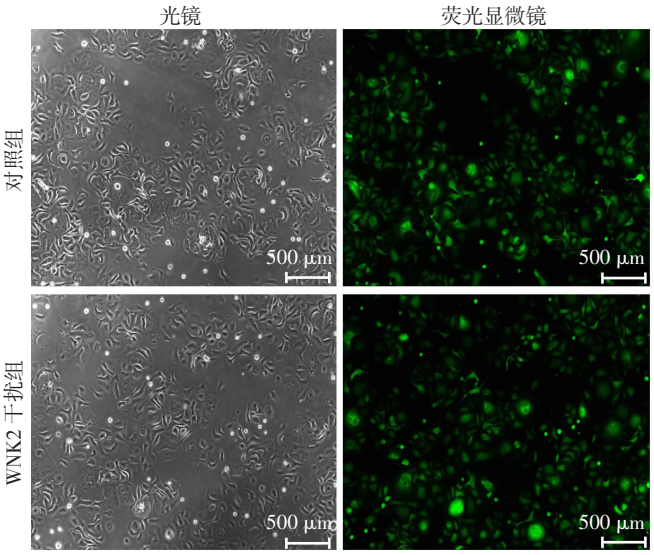
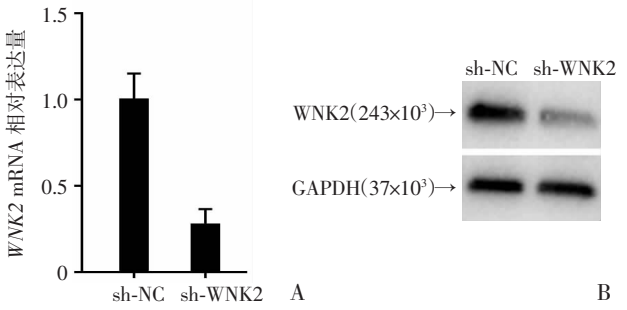


图 1 *WNK2* 干扰稳转株绿色荧光蛋白表达

2.2 mRNA 和蛋白水平验证 WNK2 的敲降效果

为了确保测序分析的有效性,采用 RT-qPCR 和 Western blot 实验检测样品中 WNK2 的敲降效果。如图 2 所示,实验组相比对照组,WNK2 被成功敲降。



A: RT-qPCR 检测 *WNK2* 在 mRNA 水平的敲降效果;
B: Western blot 检测 WNK2 在蛋白水平的敲降效果

图 2 稳转株中 WNK2 干扰效果的验证

质谱结果符合 HCD 碎裂方式和 trypsin 酶解的一般规律。大部分肽段由 7~20 个氨基酸组成。绝大多数谱图的一级质量误差在 10 以内,符合轨道阱质谱或飞行时间质谱的高精度特性。通过对肽段长度分布、母离子质量容差分布等指标质控来保证结果符合要求。本研究中质谱鉴定到的肽段长度分布符合质控要求。

2.3 数据质控

样品重复性检测:蛋白定量重复性分析采用了皮尔森相关性(Pearson's correlation coefficient)、相对标准差(RSD)和主成分分析(PCA),重复性分析结果表明样本符合统计学的一致性。

2.4 鉴定肽段和蛋白数总体情况

经过数据过滤后,质谱检测产生的总谱图数为 197 092 个;有效谱图数为 106 184 个;鉴定出 24 120 个肽段,15 688 个磷酸化修饰位点和 12 768 个修饰肽段的磷酸化发生变化,通过特异性肽段解析出了 4 246 个差异的磷酸化修饰蛋白。定量到 3 814 个差异的磷酸化修饰蛋白(图 3)。

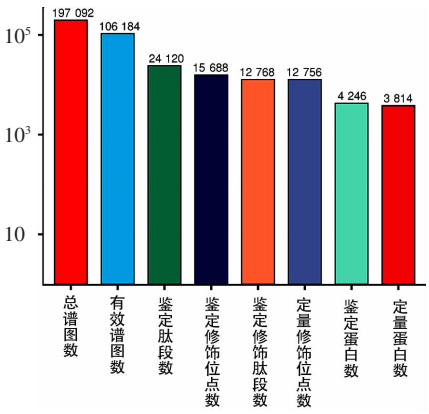


图 3 WNK2 干扰后差异肽段及蛋白数总体情况

鉴定出 WNK2 敲降后,1 078 个磷酸化修饰位点和 745 个磷酸化修饰蛋白的磷酸水平显著下降,415 个磷酸化磷酸化修饰位点和 328 个磷酸化修饰蛋白磷酸化水平显著上升(图 4)。

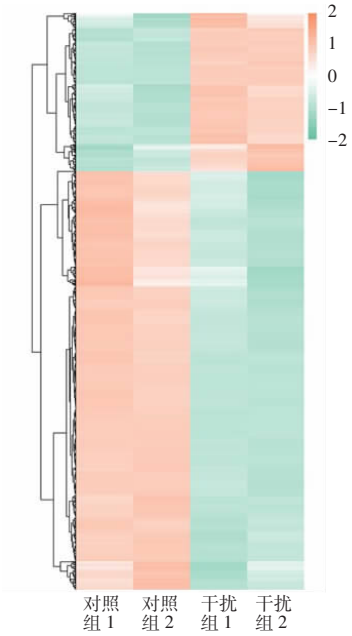


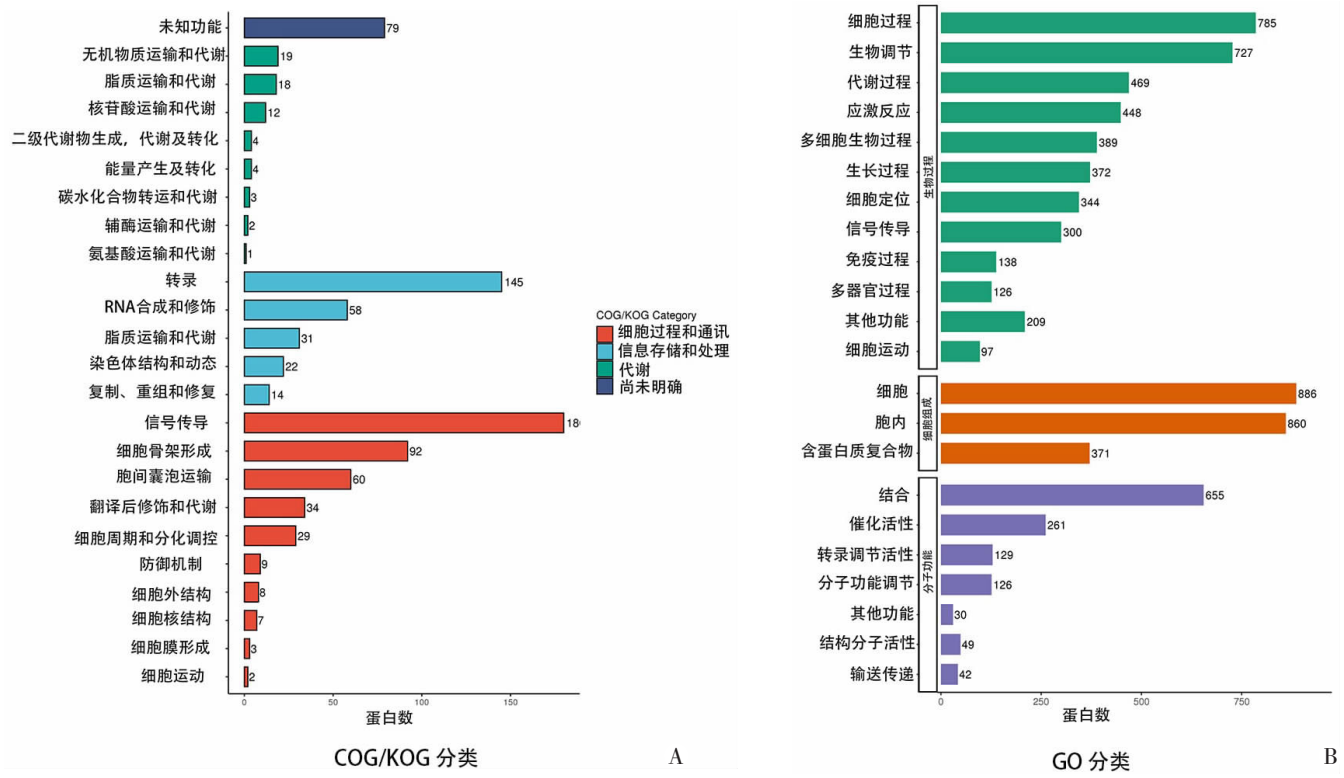
图 4 WNK2 干扰后磷酸化差异蛋白热图

2.5 差异蛋白功能分类

将差异表达蛋白进行功能分类统计,从不同角度阐释差异蛋白的生物学作用。如图 5A 所示,KOG 功能分类表明,差异表达蛋白主要参与转录、RNA 加工和修饰、信号传导、细胞骨架形成、胞间信号传递等过程。如图 5B 示,GO 分类表明,蛋白主要富集于细胞过程、生物调节、代谢过程、细胞组成、蛋白结合及催化等活动。亚细胞结构分类分析蛋白主要参与细胞核(62.36%)、细胞质(15.87%)构成。提示 WNK2 可能通过这些生物过程调控卵巢癌的发展。

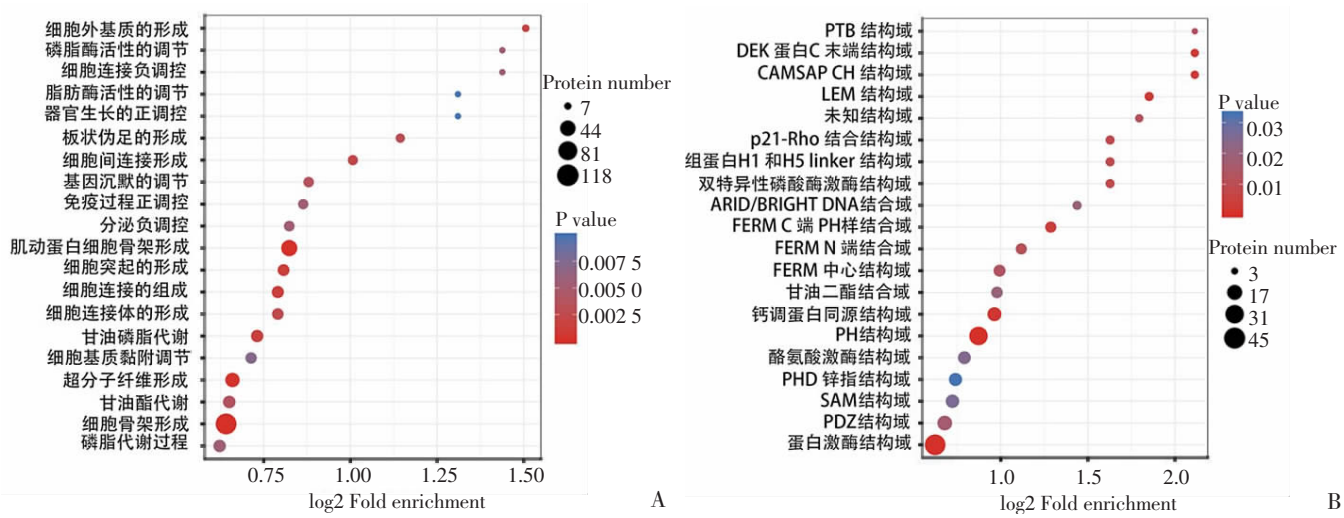
2.6 差异表达蛋白功能富集分析

通过富集分析发现差异表达蛋白有显著性的富集趋势,对进行差异蛋白显著富集的功能分类(图 6)。在生物过程中,差异蛋白主要富集在细胞骨架、超分子纤维形成等过程;并且主要参与胞质区、细胞壁超结构纤维、超结构聚合物、细胞结合、黏附连接处的形成;在分子功能方面,差异蛋白主要富集在骨架蛋白间的结合、Ras-GTPase 结合、肌动蛋白结合等生物过程,并主要参与激酶结构域、PH 域等结构域的形成。



A:差异蛋白功能 COG/KOG 分类;B:差异蛋白功能 GO 分类

图 5 差异蛋白功能分类



A:差异表达蛋白富集的生物过程;B:差异表达蛋白富集的结构域

图 6 磷酸化质谱测序差异表达蛋白富集分析

2.7 聚类分析

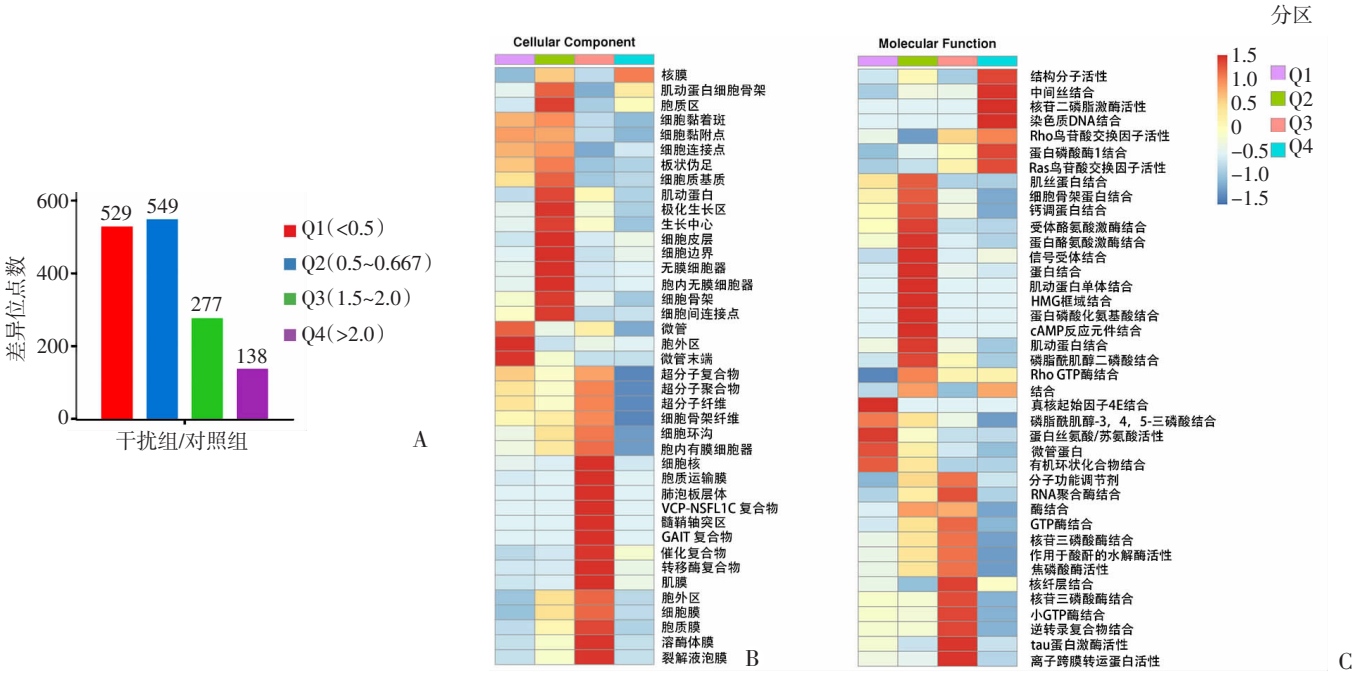
为了找出差异蛋白功能的相关性将差异表达的蛋白,根据其磷酸化差异表达倍数大小分成了 4 个部分,即 Q1~Q4(图 7A)。分别对不同 Q 组的差异蛋白进行分子功能、细胞组成的富集,并进行聚类分析。

结果显示 Q1 区的蛋白主要富集于细胞微管、细胞外区的形成。Q2 区的蛋白富集于胞质区、细胞极化生长区、细胞生长中心、细胞骨架,细胞间连接点等的形成。Q3 区的蛋白富集于细胞核、细胞质运输膜、转移酶复合物、细胞质膜、细胞器膜等的形成(图 7B)。

分子功能聚类分析表明 Q1 区的差异蛋白主要参与真核起始因子结合、磷脂酰肌醇三磷酸结合、丝氨酸/苏氨酸激酶活性等分子过程。Q2 区的蛋白富集于肌丝蛋白结合、骨架蛋白结合、cAMP 反应元件结合等过程。Q3 区的蛋白主要参与 RNA 聚合酶结合、GTP 酶结合、核苷三磷酸酶结合、逆转录复合物结合等包括遗传物质复制在内的一系列生理活动。Q4 区蛋白通过影响染色质 DNA 结合、蛋白磷酸酶 1 结合、Rho、Ras 鸟苷酸交换因子活性等过程,参与了细胞功能的调控(图 7C)。

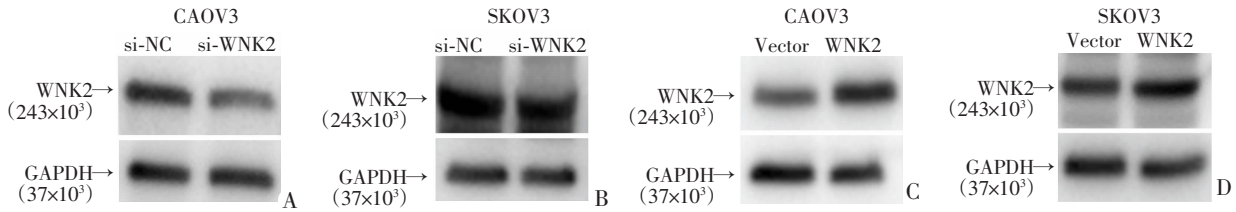
2.8 鬼笔环肽细胞骨架染色

富集分析表明磷酸化差异蛋白主要参与细胞骨架的形成,故用罗丹明标记鬼笔环肽验证 WNK2 过表达对细胞骨架形成的影响。Western blot 验证了在卵巢癌细胞系 CAOV3 和 SKOV3 中,WNK2 被成功干扰和过表达(图 8)。WNK2 结果显示,干扰 WNK2 后,卵巢癌细胞 CAOV3、SKOV3 细胞骨架断裂,排列杂乱无章。过表达 WNK2 引起细胞骨架重构,骨架排列有序(图 9)。细胞骨架的荧光染色表明了 WNK2 可能通过调节细胞骨架影响卵巢癌的发展。



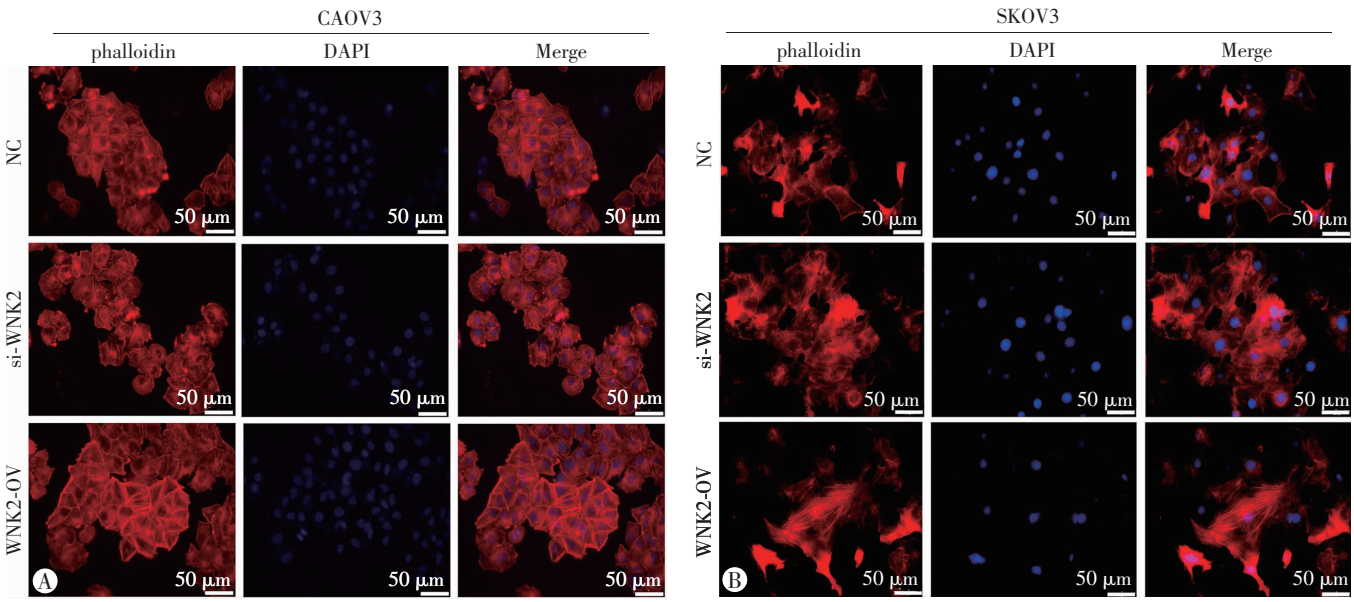
A:差异倍数分组(Q1~Q4);B:差异蛋白细胞组成聚类分析;C:差异蛋白分子功能聚类分析

图 7 磷酸化质谱测序差异蛋白的聚类分析



A:WNK2 在 CAOV3 细胞中被成功敲降;B:WNK2 在 SKOV3 细胞中被成功敲降;C:WNK2 在 CAOV3 细胞中过表达;D:WNK2 在 SKOV3 细胞中过表达

图 8 Western blot 验证 CAOV3、SKOV3 中 WNK2 敲降和过表达的效果

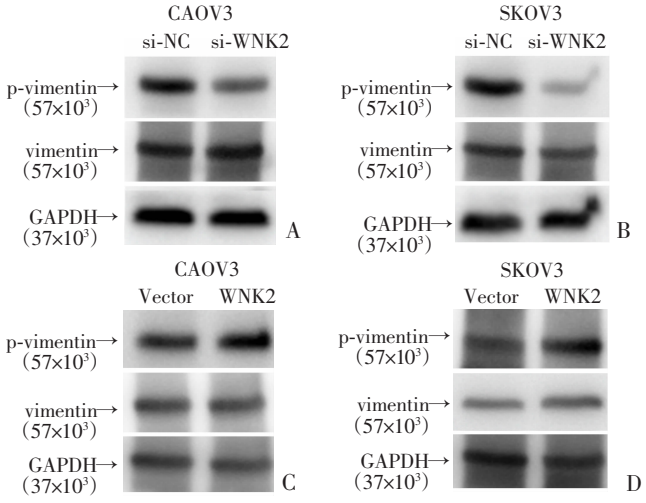


A:敲降或过表达 WNK2 对 CAOV3 细胞骨架的影响;B 敲降或过表达 WNK2 对 SKOV3 细胞骨架的影响

图 9 鬼笔环肽染色探究 WNK2 对 CAOV3、SKOV3 细胞骨架的影响

2.9 细胞骨架蛋白磷酸化水平变化

如图 10 所示,Western blot 实验证明 WNK2 的敲降导致了 vimentin 位点的磷酸化降低。WNK2 的过表达引起 vimentin 位点的磷酸化增强。因此 WNK2 可能调控细胞骨架蛋白的磷酸化影响卵巢癌细胞的恶性生物学行为。



A:在 CAOV3 细胞中 WNK2 的敲降引起 p-vimentin(Ser 56)磷酸水平下降;B:在 SKOV3 细胞中 WNK2 的敲降引起 p-vimentin(Ser 56)磷酸水平下降;C:在 CAOV3 细胞中 WNK2 的过表达引起 p-vimentin(Ser 56)磷酸水平上升;D:在 SKOV3 细胞中 WNK2 的过表达引起 p-vimentin(Ser 56)磷酸水平上升

图 10 Western blot 验证 WNK2 对 p-vimentin(Ser 56)磷酸水平的影响

3 讨论

由于卵巢癌恶性程度较高且进展迅速,大部分患者就诊时已是晚期[14]。为了改善这一现状,研究人员不断探寻新的治疗方法,但其病死率仍无明显改善。因此,研究卵巢癌的发病机制,寻找有效的治疗靶点,仍旧是国内外研究的热点问题。

WNK2 是 WNK 激酶家族的一员,属于 STK,它广泛表达于人体的多个组织器官。研究表明,WNK2 的表观遗传沉默引起了脑膜瘤、肝癌等的发展,且进一步证明该激酶通过影响信号通路,如 ERK-MAPK、Wnt/β-catenin 通路的活化,影响肿瘤细胞的功能[15-16]。经过不断的探索,WNK2 有望成为多个肿瘤的治疗靶点,然而面对卵巢癌的治疗现状,WNK2 是否有潜力成为卵巢癌治疗靶点?针对这些问题,本课题组展开了研究。

本研究将卵巢癌细胞系 SKOV3 中的 WNK2 成功干扰后,进行蛋白质磷酸化修饰组学质谱分析。分析鉴定出 24 120 个肽段,15 688 个蛋白磷酸化修饰位点和 12 768 个修饰肽段的磷酸化发生变化,解析出了 4 246 个,定量到 3 814 个差异的磷酸化修饰蛋白。其中,1 078 个蛋白磷酸化修饰位点和 745 个磷酸化修饰蛋白的磷酸水平显著下降,415 个蛋白磷酸化修饰位点和 328 个磷酸化修饰蛋白磷酸化水平显著上升。GO 分类和 KOG 功能分类表明,磷酸化差异蛋白主要富集于细胞过程、生物调节等过程。参与转录、RNA

加工和修饰、信号传导、细胞骨架形成、细胞间信号传递等活动。富集分析表明,WNK2 敲降后,参与细胞骨架形成、超分子纤维等细胞成分形成和激酶结构域,PH 域等形成的蛋白磷酸化水平降低。聚类分析表明,磷酸化差异蛋白组成细胞骨架、细胞生长中心、细胞间连接点等结构的形成。这些结构与肿瘤细胞的增殖和肿瘤恶性进程密不可分[17-19]。分子功能聚类分析表明,磷酸化差异蛋白参与肌丝蛋白结合、骨架蛋白结合、真核起始因子结合、磷脂酰肌醇三磷酸结合、逆转录复合物结合等包括遗传物质复制在内的一系列生理过程。这些分子功能与细胞肿瘤的发展密切相关[20-22]。

富集分析表明 WNK2 调控的磷酸化差异蛋白主要参与细胞骨架形成。研究表明细胞骨架的重建与细胞的增殖、侵袭等功能密不可分[23]。细胞骨架可通过影响细胞周期、细胞形态发生和细胞迁移,在肿瘤细胞的发生发展中起着至关重要的作用[24]。波形蛋白 vimentin 是调节细胞骨架形成的关键蛋白,该蛋白通过影响微管生长和肌动蛋白细胞骨架重组来调节细胞迁移。Vimentin 的功能受复杂的磷酸化修饰调节[25-26],例如,vimentin 位点的磷酸化增强促进了细胞的侵袭[27]。为了探索 WNK2 对卵巢癌细胞的影响,本研究用罗丹明标记鬼笔环肽进行肿瘤细胞骨架染色。实验结果显示,WNK2 干扰导致细胞骨架断裂;WNK2 过表达促进细胞骨架重排。Western blot 实验进一步证实 WNK2 促进调控细胞骨架形成的 vimentin 位点的磷酸化。因此推断 WNK2 可能通过影响细胞骨架的形成,调控卵巢癌细胞的增殖和侵袭。

综上所述,通过蛋白质磷酸化修饰组学质谱技术,发现 WNK2 影响的磷酸化差异蛋白富集于细胞骨架形成、遗传物质复制、肿瘤发生发展、肿瘤细胞生长,侵袭等生物学过程。细胞骨架染色及相关蛋白磷酸化实验表明,WNK2 可能通过影响细胞骨架的形成,调控卵巢癌细胞的恶性生物学行为。因此,WNK2 可能为卵巢癌的治疗提供新的思路。

参考文献:

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al*. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.

[2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30. DOI: 10.3322/caac.21590.

[3] LAHIRY P, TORKAMANI A, SCHORK N J, *et al*. Kinase mutations in human disease: interpreting genotype-phenotype relationships[J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(1): 60-74. DOI: 10.1038/nrg2707.

[4] MAOZ A, CICCONE M A, MATSUZAKI S, *et al*. Emerging serine-threonine kinase inhibitors for treating ovarian cancer[J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2019, 24(4): 239-253. DOI: 10.1080/14728214.2019.1696773.

[5] CICCONE M A, MAOZ A, CASABAR J K, *et al*. Clinical outcome of treatment with serine-threonine kinase inhibitors in recurrent epithelial ovarian cancer: a systematic review of literature[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2016, 25(7): 781-796. DOI: 10.1080/13543784.2016.1181748.

[6] XU B, ENGLISH J M, WILSBACHER J L, *et al*. WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II[J]. J Biol Chem, 2000, 275(22): 16795-16801. DOI: 10.1074/jbc.275.22.16795.

[7] GALLOLU KANKANAMALAGE S, KARRA A S, COBB M H. WNK pathways in cancer signaling networks[J]. Cell Commun Signal, 2018, 16(1): 72. DOI: 10.1186/s12964-018-0287-1.

[8] MONIZ S, JORDAN P. Emerging roles for WNK kinases in cancer[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(8): 1265-1276. DOI: 10.1007/s00018-010-0261-6.

[9] SATO A, SHIMIZU M, GOTO T, *et al*. WNK regulates Wnt signalling and β-Catenin levels by interfering with the interaction between β-Catenin and GID[J]. Commun Biol, 2020, 3(1): 1-10. DOI: 10.1038/s42003-020-01386-2.

[10] JUN P, HONG C, LAL A, *et al*. Epigenetic silencing of the kinase tumor suppressor WNK2 is tumor-type and tumor-gradespecific[J]. Neuro Oncol, 2009, 11(4): 414-422. DOI: 10.1215/15228517-2008-096.

[11] DUTRUEL C, BERGMANN F, ROOMAN I, *et al*. Early epigenetic downregulation of WNK2 kinase during pancreatic ductal adenocarcinoma development[J]. Oncogene, 2014, 33(26): 3401-3410. DOI: 10.1038/onc.2013.312.

[12] XU T, WU K, ZHANG L, *et al*. Long non-coding RNA LINC00858 exerts a tumor-promoting role in colon cancer via HNF4α and WNK2 regulation[J]. Cell Oncol (Dordr), 2020, 43(2): 297-310. DOI: 10.1007/s13402-019-00490-8.

[13] MONIZ S, MARTINHO O, PINTO F, *et al*. Loss of WNK2 expression by promoter gene methylation occurs in adult gliomas and triggers Rac1-mediated tumour cell invasiveness[J]. Hum Mol Genet, 2013, 22(1): 84-95. DOI: 10.1093/hmg/dds405.

[14] ZAMARAEV A V, VOLIK P I, SUKHIKH G T, *et al*. Long non-coding RNAs: a view to kill ovarian cancer[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021, 1876(1): 188584. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188584.

[15] MONIZ S, VERÍSSIMO F, MATOS P, *et al*. Protein kinase WNK2 inhibits cell proliferation by negatively modulating the activation of MEK1/ERK1/2[J]. Oncogene, 2007, 26(41): 6071-6081. DOI: 10.1038/sj.onc.1210706.

[16] SERYSHEVA E, BERHANE H, GRUMOLATO L, *et al*. Wnk kinases are positive regulators of canonical Wnt/β-catenin signalling[J]. EMBO Rep, 2013, 14(8): 718-725. DOI: 10.1038/embor.2013.88.

[17] ALVARADO-KRISTENSSON M, ROSSELLÓ C A. The biology of the nuclear envelope and its implications in cancer biology[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(10): 2586. DOI: 10.3390/ijms20102586.

[18] SHORT C A, SUAREZ-ZAYAS E A, GOMEZ T M. Cell adhesion and invasion mechanisms that guide developing axons[J]. Curr Opin Neurobiol, 2016, 39: 77-85. DOI: 10.1016/j.conb.2016.04.012.

[19] MA X D, DANG Y M, SHAO X W, *et al*. Ubiquitination and long non-coding RNAs regulate actin cytoskeleton regulators in cancer progression[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(12): 2997. DOI: 10.3390/ijms20122997.

[20] JUNG H, YOON S R, LIM J, *et al*. Dysregulation of rho GTPases in human cancers[J]. Cancers, 2020, 12(5): 1179. DOI: 10.3390/cancers12051179.

[21] ALLEN A, GAU D, FRANCOEUR P, *et al*. Actin-binding protein profilin1 promotes aggressiveness of clear-cell renal cell carcinoma cells[J]. J Biol Chem, 2020, 295(46): 15636-15649. DOI: 10.1074/jbc.ra120.013963.

[22] JIU Y, PERÄNEN J, SCHAIBLE N, *et al*. Vimentin intermediate filaments control actin stress fiber assembly through GEF-H1 and RhoA[J]. J Cell Sci, 2017, 130(5): 892-902. DOI: 10.1242/jcs.196881.

[23] YILMAZ M, CHRISTOFORI G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion[J]. Cancer Metast Rev, 2009, 28(1/2): 15-33. DOI: 10.1007/s10555-008-9169-0.

[24] HALL A. The cytoskeleton and cancer[J]. Cancer Metast Rev, 2009, 28(1/2): 5-14. DOI: 10.1007/s10555-008-9166-3.

[25] LANIER M H, KIM T, COOPER J A. CARMIL2 is a novel molecular connection between vimentin and actin essential for cell migration and invadopodia formation[J]. Mol Biol Cell, 2015, 26(25): 4577-4588. DOI: 10.1091/mbc.e15-08-0552.

[26] 潘燕, 韩婧, 张晔, 等. Vimentin 在肿瘤转移中的作用及药物研究进展[J]. 生理科学进展, 2010, 41(6): 413-416.
PAN Y, HAN J, ZHANG Y, *et al*. Role ofvimentin in tumor metastasis and drug research[J]. Prog Physiol Sci, 2010, 41(6): 413-416.

[27] LIAO G, WANG R, REZEY A C, *et al*. MicroRNA miR-509 regulates ERK1/2, the vimentin network, and focal adhesions by targeting Plk1[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 12635. DOI: 10.1038/s41598-018-30895-8.

(**收稿**:2021-10-19;**修回**:2021-12-08)

(编辑 王 红)