DOI:10.16016/j.2097-0927.202205141

转录组学测序揭示 WNK2 促进体外培养卵巢癌细胞 ROS 产生

李凤杰[1],贾永琴[1],王延洲[1],杜秀蓉[1],曹兰琴[2],周 丹[1],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];410008 长沙,中南大学湘雅医院妇科[2]

[**摘要**] **目的** 转录组学测序分析 WNK2 在卵巢癌中调控的生物、代谢过程。**方法** 在卵巢癌细胞 SKOV3 中,使用 siRNA 干扰 WNK2,分为 siNC 和 siWNK2 2 组,每组设置 3 个重复。siRNA 转染 SKOV3 细胞 48 h 后收集细胞提取总 RNA。验证 SKOV3 细胞中的 WNK2 成功敲降后,将总 RNA 样品进行转录组学测序及生物信息分析,筛选 padj<0.01,fold change>1,FPKM>500 范围内的基因,即 siNC 与 siWNK2 两组间的差异基因,从而获取在 SKOV3 细胞中被 WNK2 调控的基因。进一步通过 DisGeNET 和 DO(disease ontology)富集分析得出差异基因与疾病间的关系;GO 功能富集分析差异基因调控的细胞功能和代谢过程。通过 RT-qPCR 验证活性氧(reactive oxygen species, ROS)通路中 10 个差异基因表达变化是否与测序结果一致,并探究过表达、敲降 WNK2 后对卵巢癌细胞 ROS 产生的影响。**结果** DisGeNET 以及 DO 富集分析表明 WNK2 敲降后,siNC 和 siWNK2 两组的差异基因与多种恶性肿瘤密切相关($P<0.05$)。GO 功能富集分析表明差异基因富集于 ROS 代谢过程、凋亡信号通路、泛素连接酶复合物形成、线粒体膜蛋白复合物形成、生长因子结合和转录激活因子活性等生物过程($P<0.05$)。在所有富集通路中,ROS 代谢相关的生物过程数量最多且差异最为显著($P<0.001$)。RT-qPCR 验证 WNK2 敲降后 ROS 通路中 9 个差异基因表达变化与测序结果一致,1 个基因(PDGFB)与测序结果相反,1 个基因在两组中无明显变化。在卵巢癌细胞 SKOV3 和 CAOV3 中敲降 WNK2 后,ROS 产生下降;过表达 WNK2 后,卵巢癌细胞的 ROS 产生增多。**结论** WNK2 可能通过促进 ROS 代谢过程调控卵巢癌的恶性进程。

[**关键词**] 卵巢癌;RNA-seq;ROS 代谢;GO 富集

[**中图法分类号**] R341; R 394.3; R737.31 [**文献标志码**] A

Transcriptomic sequencing reveals that WNK2 promotes reactive oxygen species production in ovarian cancer cells

LI Fengjie[1], JIA Yongqin[1], WANG Yanzhou[1], DU Xiurong[1], CAO Lanqin[2], ZHOU Dan[1], LIANG Zhiqing[1]

[1]Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Department of Obstetrics and Gynecology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan Province, 410008, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the biological and metabolic roles of WNK2 in regulation of ovarian cancer based on transcriptome sequencing technology. **Methods** Ovarian cancer SKOV3 cells were divided into experimental group and control group, with 3 replicates in each group. The expression of WNK2 was knocked down with transfection of siRNA targeting WNK2 in SKOV3 cells. Then the total RNA was extracted and prepared for transcriptome sequencing and bioinformatics analysis after 48 h of transfection. The differential genes between siNC and siWNK2 were screened out in the range of padj <0.01, fold change >1, and FPKM >500 to obtain the genes under the regulation of WNK2. DisGeNET and disease ontology (DO)

[**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/)

enrichment analysis was used to analyze the relationship of the diseases and differentially expressed genes (DEGs). GO enrichment analysis was adopted to analyze the cellular functions and metabolic processes in which the DEGs were enriched. Finally, RT-qPCR was used to examine whether the 10 differential proteins in the reactive oxygen species (ROS) pathway were regulated by WNK2. The influence of WNK2 overexpression and knockdown on the ROS metabolic process of ovarian cancer cells was determined. **Results** The DisGeNET and DO enrichment analysis showed the obtained DEGs were closely related with malignant tumors ($P<0.05$). GO functional enrichment analysis showed the obtained DEGs were enriched in biological processes such as ROS metabolism, apoptosis signaling pathway, formation of ubiquitin ligase complex and mitochondrial membrane protein complex, growth factor binding, and transcription activator activity and so on ($P<0.05$). Among these enriched pathways, ROS related pathways were the most numerous and significant ($P<0.001$). The results of RT-qPCR indicated that the changes in 9 DEGs were consistent with the sequencing results after WNK2 was knocked down, and one gene (PDGFB) was contrary to the sequencing results, and one gene had no significant change between the 2 groups. Knockdown of WNK2 in SKOV3 and CAOV3 cells resulted in decreased production of ROS, whereas overexpression of WNK2 increased the production. **Conclusion** WNK2 probably promotes ovarian cancer malignancy by inducing ROS metabolism.

[**Key words**] ovarian cancer; RNA-seq; ROS metabolism; GO enrichment

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

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤,其病死率位居妇科恶性肿瘤之首。2020 年全球新发病例超过 30 万,20 万患者病死[1]。卵巢癌被称为“沉默杀手”,主要因为卵巢深居盆腔,早期卵巢癌症状隐匿,约 70%的患者确诊时已为晚期。晚期卵巢癌患者预后差,5 年生存率<40%[2]。肿瘤细胞减灭术和以紫杉醇、卡铂为主的化疗是卵巢癌的传统治疗方法,但是>75%的患者会发生耐药[3]。尽管靶向和免疫治疗已经兴起,然而近年卵巢癌患者 5 年生存率并无明显改善(仍在 35%~40%之间);无进展生存期(progression-free-survival, PFS)仅 12~18 个月[4-5]。居高不下的病死率促使研究人员不断探寻有效的卵巢癌治疗靶点。

WNK2 是近 20 年才被发现的一个具有双螺旋、PXXP、SH3 结构域的细胞质蛋白[6]。人 WNK2 主要在心脏、大脑和结肠中表达。其异常可能涉及多种疾病的发生发展,如戈登综合征、颅内出血及肿瘤等疾病[7-9]。近年来,WNK2 被发现在多种肿瘤进展中起着重要调控作用。如启动子异常高甲基化导致人脑胶质瘤、脑膜瘤、胃癌和结肠癌中的 WNK2 水平显著降低,进而促进了肿瘤的增殖以及细胞的迁移和运动。研究进一步证明 WNK2 通过调控 MEK1/ERK1/2, Rac1 通路抑制胶质瘤细胞生长[10-12]。在宫颈癌中,WNK2 通过调控 ERK 通路抑制了肿瘤细胞的增殖和侵袭[13]。然而不同于报道的其他肿瘤,我们前期研究证明 WNK2 在卵巢癌中高表达,并能促进卵巢癌细胞增殖、侵袭等恶性生物学行为。磷酸化质谱测序进一步发现 WNK2 调控卵巢癌细胞骨架形成等生物学过程。因此 WNK2 在卵巢癌发展中很可能扮演重要促癌角色[14-15]。

RNA-Seq 作为新兴测序技术,较其他测序技术具有明显的优势。其能检测所有的转录本,包括编码 RNA (mRNA)和非编码 RNA (ncRNA),如 microRNA、长链非编码 RNA (lncRNA)、核糖体 RNA (rRNA)和转移 RNA (tRNA)[16]。转录组测序不仅能发现新的基因,其生成的数据加速了对可变剪接基因、融合基因、突变/SNP、等位基因特异性表达和生物标志物的了解,并且在研究导致卵巢癌耐药的新机制上发挥了充分的作用[17]。

为了更全面地探究 WNK2 在卵巢癌中调控的分子机制。本研究通过 RNA-Seq 测序获取 WNK2 在体外培养卵巢癌细胞中调控的转录本信息,并通过 DisGeNET、DO、GO、KEGG 富集分析 WNK2 参与的生物和代谢等过程,为 WNK2 在卵巢癌中扮演的角色提供了更有力的证据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂和实验仪器

人卵巢癌细胞株 SKOV3、CAOV3 购于 ATCC 官网;细胞培养试剂购于衍庆生物技术有限公司;RNA 提取试剂 TRIzol、RT-PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司;ROS 检测试剂盒购于索莱宝公司。研究中的转染试

剂是赛默飞品牌的 lipo3000。BX53 荧光显微镜购自日本奥林巴斯公司;Bio-Rad PCR 仪 CFX96 购自美国伯乐公司。si-WNK2 由广州锐博生物公司设计,序列为:CAAGGACAATGGAGCCATA。WNK2 过表达质粒由上海吉凯生物技术有限公司构建。

1.2 *实验方法*

1.2.1 细胞株及细胞培养 人卵巢癌细胞 SKOV3 和 CAOV3 培养于湿润、37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中,培养基用 DMEM(Gibico, 美国)和 10%的胎牛血清配制。

1.2.2 si-RNA 将 SKOV3 和 CAOV3 细胞铺板于 6 孔板中,24 h 后细胞密度保持 70%左右进行转染。两个 EP 管中分别加入 500 μL optimem 和 20 μmol/L siRNA (5 μL si-WNK2 或 si-NC)或 5 μL 的 lipo3000。轻轻摇晃混匀后,静置 5 min。将 EP 管中的 si-RNA 和转染试剂混合,常温下静置 20 min 后加入细胞培养孔中。3 个培养孔作为实验组转染 si-WNK2,另外 3 个孔作为对照组转染 si-NC。

1.2.3 质粒转染 将 SKOV3 和 CAOV3 细胞铺板于 6 孔板中,24 h 后细胞密度大约保持 70%左右进行质粒转染。转染前将培养基换成无血清培养基。两个 EP 管中分别加入 500 μL optimem 和 3 μg 质粒或 5 μL lipo 3 000,轻轻摇晃混匀后,静置 5 min。将 EP 管中的质粒和转染试剂混合,常温下静置 20 min 后加入细胞培养孔中,转染 6 h 后细胞换液。

1.2.4 RT-qPCR 细胞转染 48 h 后,6 孔板中的细胞用 PBS 清洗 2 次,按照试剂使用说明书提取 RNA。吸取部分 WNK2 敲降实验组和 NC 对照组的 RNA 进行 RT-qPCR。取 1 μg 的 RNA 进行反转录,合成 cDNA 后,用无酶水稀释 5 倍。取 4 μL cDNA, 5 μL SYBG 和 1 μL 引物进行 RNA 检测,验证 WNK2 的敲降效果以及差异基因的转录水平变化。本研究中的所有引物由擎科生物公司合成,引物序列如表 1 所示。

1.2.5 RNA-seq 测序 前期研究发现 WNK2 在卵巢癌细胞 SKOV3 中表达最高,因此 SKOV3 细胞中的 WNK2 被成功敲降后,将实验组和对照组的 RNA 送至诺和致源生物科技有限公司进行 RNA-seq 测序分析。公司在测序之前,通过琼脂糖凝胶电泳,$D(260)/D(280)$ 及 $D(260)/D(230)$ 的比值等检测,确保 RNA 样品符合质检。通过文库构建和上机测序,对基因表达进行定量分析,再用 DESeq2 筛选 WNK2 干扰前后表达水平显著差异的基因。差异基因筛选标准是 $|\log2(\text{Fold Change})|>0$ 且 padj<0.05。

1.2.6 富集分析及验证 为了得到 WNK2 在卵巢癌中调控的代谢过程,cluster Profiler 软件对差异基因集进行 DO 通路富集分析和 GO 功能富集分析。根据富集分析结果进行验证。

1.2.7 ROS 检测 WNK2 敲降或过表达 48 h 后,检测卵巢癌细胞中的 ROS 水平。使用无血清培养基将荧光探针稀释 1 000 倍,再将孔板中的培养基换成荧光探针稀释液,37 ℃孵育 30 min。使用无血清培养基充分清洗未进入细胞的荧光探针,荧光显微镜下拍照。

表 1 RT-qPCR 引物序列与产物长度

基因名称	引物名称	序列(5′-3′)	产物长度/bp
*VAV*1	VAV1-正义	TCTGCCCAAGATGGAGGTGTTTCA	108
	VAV1-反义	TTCGTGAGCTCCACAATGTCTCCA;	
*DDIT*4	DDIT4-正义	AGGGGTTTGACCGCTCCA	99
	DDIT4-反义	CCAGGTAAGCCGTGTCTTCC	
*SESN*2	SESN2-正义	AAGACCCTACTTTCGGA	159
	SESN2-反义	CTGCCTGGAACTTCTCAT	
*CYR*61	CYR61-正义	CTCCCTGTTTTTGGAATGGA	241
	CYR61-反义	TGGTCTTGCTGCATTTCTTG	
*GADD*45*A*	GADD45A-正义	TTTGCAATATGACTTTGGAGGA	72
	GADD45A-反义	CATCCCCCACCTTATCCAT	
*KLF*4	KLF4-正义	ACCTACACAAAGAGTTCCCATC	136
	KLF4-反义	TGTGTTTACGGTAGTGCCTG	
*CDKN*1	CDKN1-正义	GCAGACCAGCATGACAGATTT	70
	CDKN1-反义	GGATTAGGGCTTCCTCTTGGA	
*DDAH*2	DDAH2-正义	GGTCGATGGAGTCCGCAAAG	100
	DDAH2-反义	GGTGAAGAGAACGTCAGTGC	
PDGFB	CDKN1-正义	AATTCAAGCACACGCATGAC	87
	CDKN1-反义	ATAACCCTGCCCACACACTC	
*Romo*1	CDKN1-正义	CTGTCTCAGGATCGGAATGCG	114
	CDKN1-反义	CATCGGATGCCCATCCCAATG	

1.3 统计学方法

本研究的统计学分析借助于软件 SPSS 22.0 完成,t 检验用于检测两组样品均值,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

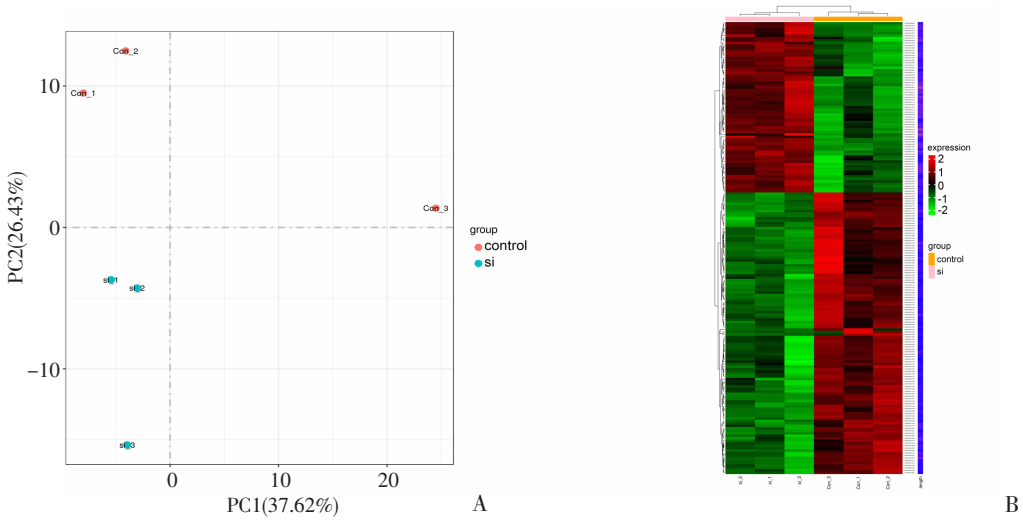
2 结果

2.1 主成分分析及聚类热图

为了评估样本组间差异及组内重复情况,本研究对所有样本的基因表达值(fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments,FPKM)进行主成分分析(principal component analysis,PCA)。结果所示,组间样本分散,组内样本聚在一起(图 1A)。所有进行聚类分析的基因阈值为 padj<0.05。图 1B 为差异表达基因聚类热图,图中横坐标为样品名,纵坐标为差异基因 FPKM 归一化后的数值,颜色越红,表达量越高;越绿,表达量越低。结果显示组内样品聚在一起,样品重复性较好。

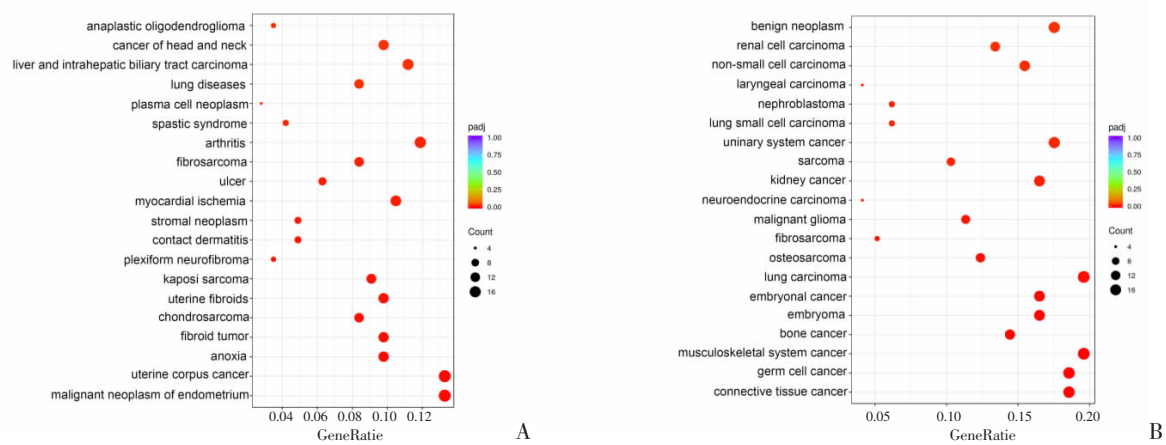
2.2 富集分析

2.2.1 DisGeNET 及 DO 富集分析 为了探究 WNK2 调控的基因与哪些疾病关系密切,本研究进行了 DisGeNET 和 DO 富集分析。DisGeNET 富集分析表明 WNK2 影响的差异基因与子宫内膜癌、宫体癌、头颈癌、肝癌、胆道癌等恶性肿瘤相关(图 2A),DO 富集分析显示差异基因与结缔组织、生殖细胞、泌尿系统、肌肉骨骼系统等恶性肿瘤相关(图 2B)。



A:主成分分析; B:差异表达基因聚类热图

图 1 主成分分析及聚类热图



A:DisGeNET 富集分析; B:Do 富集分析

图 2 差异基因疾病富集分析

2.2.2　GO 功能富集　　本研究进一步将差异基因进行 GO 功能富集分析,结果显示 WNK2 的敲降引起多个代谢过程相关基因表达下降,其中 ROS 代谢、线粒体蛋白复合物、凋亡等过程是差异基因富集最明显的 GO 功能,并且 ROS 代谢是差异基因富集最为显著的过程(图 3)。表 2 是 ROS 代谢相关过程中的差异基因信息。

2.2.3　GO 功能富集　　WNK2 正调控的差异基因富集于 ROS 代谢过程、凋亡信号通路、内质网应激中 RNA 聚合酶Ⅱ的转录调控、细胞黏附调控等生物过程。细胞组成上参与泛素连接酶复合物、线粒体膜蛋白复合物、细胞色素复合物等的形成。并参与生长因子结合、转录激活因子活性、中性氨基酸跨膜转运蛋白活性等分子功能(图 4)。

2.2.4　差异基因的 PPI 网络图　　String 数据库构建差异蛋白互作网络图,如图 5 所示,差异基因间有着丰富的相互作用,其中与ROS相关的CDKN1、GADD45A、KLF4、CYR61、ROMO1 蛋白位于蛋白网络中心位置。

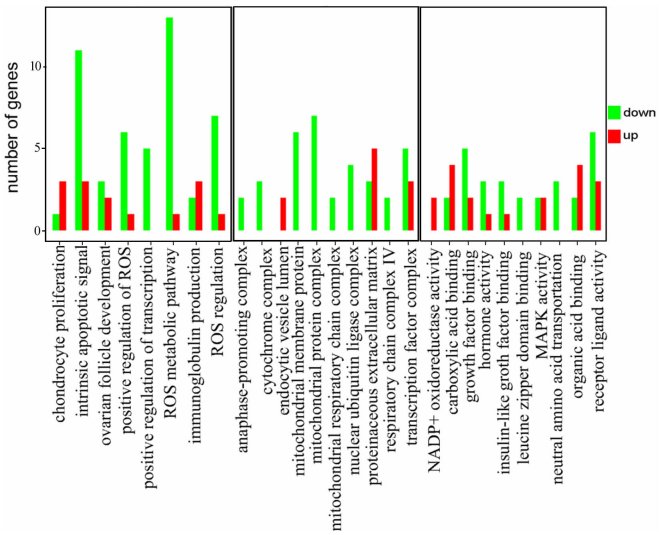
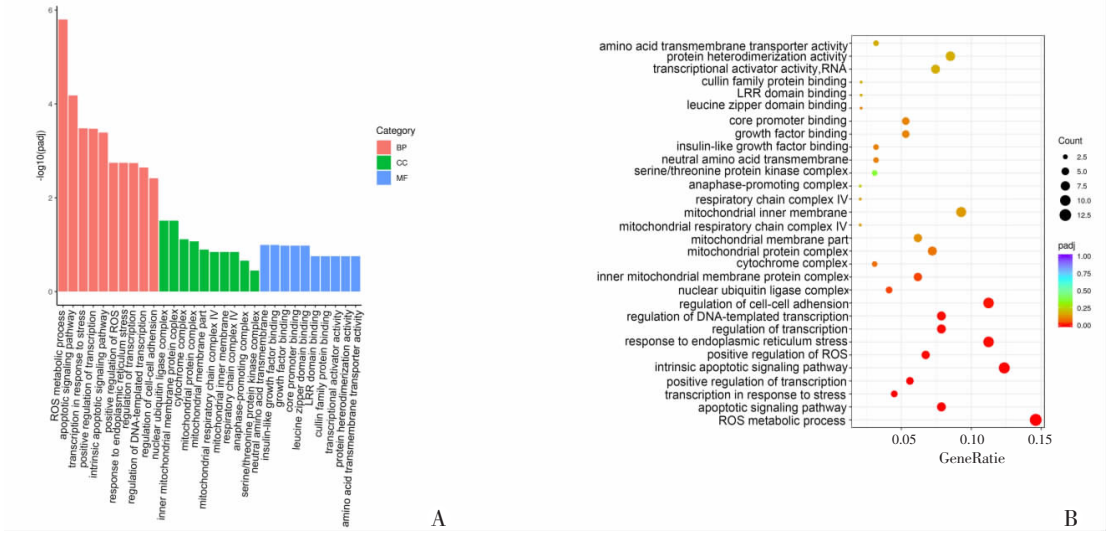


图 3　差异基因 GO 富集分析

表 2　ROS 代谢相关的 GO 富集分析

GO ID 号	代谢过程	校正 *P* 值	差异基因数	下调基因	上调基因
0072593	活性氧代谢过程	0.000162941	14	*SESN2/CYR61/GADD45A/KLF4/CDKN1/VAV1/PDGFB/ROMO1/DDAH2/DDIT4/ATP5IF1/CTGF/NOXA1*	*HSP90AA1*
2000379	活性氧代谢正向调控	0.004782767	7	*GADD45A/KLF4/CDKN1/PDGFB/ROMO1/DDAH2*	0
2000377	活性氧代谢调控	0.033299698	8	*GADD45A/KLF4/CDKN1/PDGFB/ROMO1/DDAH2/NOXA1*	*HSP90AA1*



A: GO 富集分析柱状图; B:GO 富集分析气泡图

图 4　WNK2 正调控的差异基因 GO 富集分析

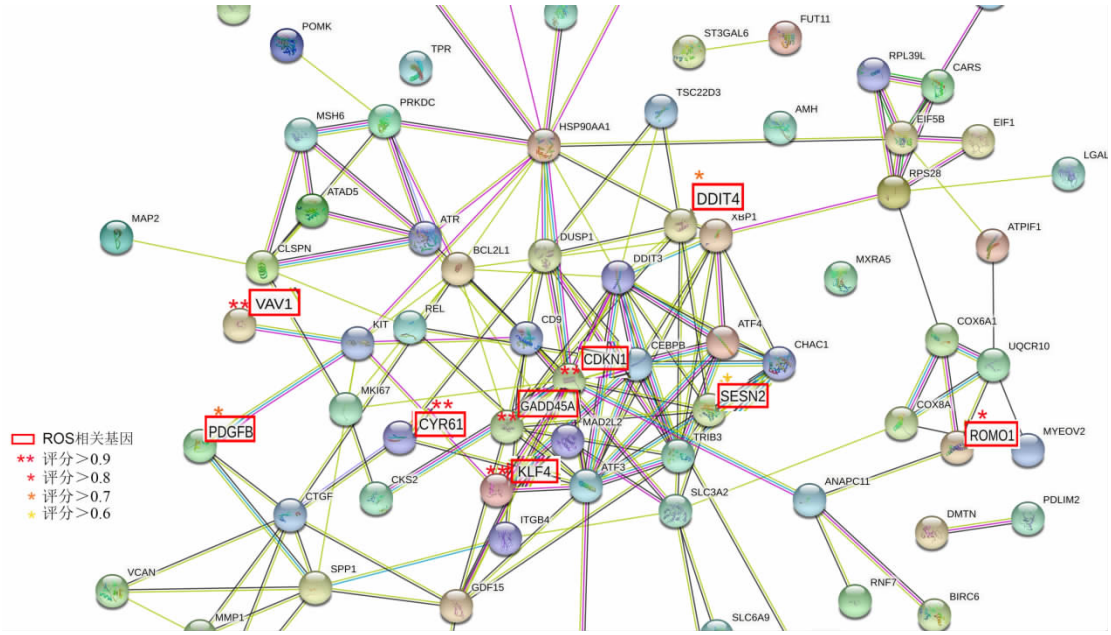


图 5　差异基因的 PPI 网络图

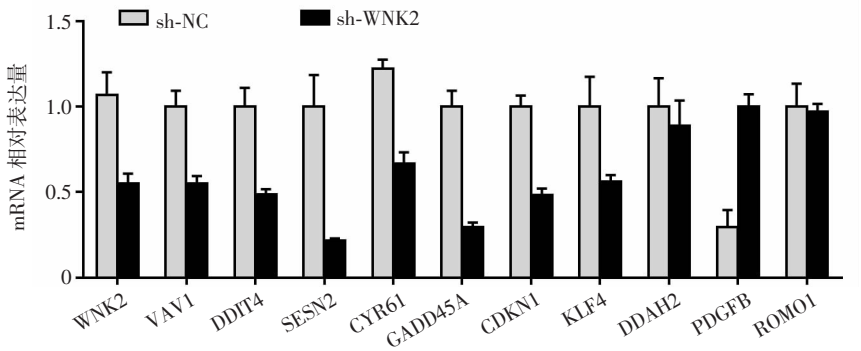


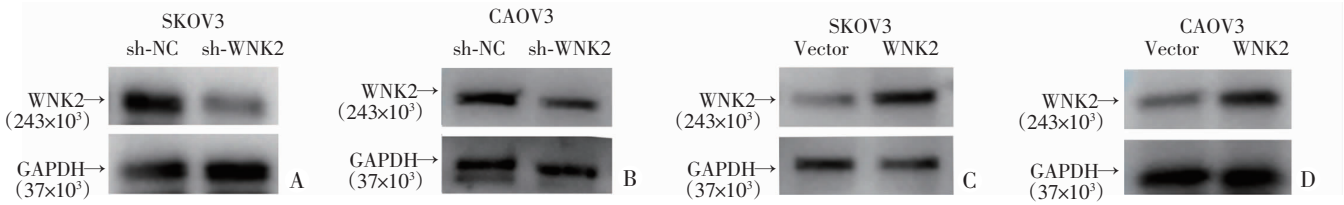
图 6　RT-qPCR 检测 WNK2 敲降后 SKOV3 细胞 ROS 代谢差异基因的变化

2.2.5　RT-qPCR 验证转录组测序结果　　GO 功能分析表明差异基因富集最明显的是 ROS 代谢过程,并且 PPI 网络图显示 ROS 相关蛋白均位于核心位置。本研究组用 RT-qPCR 验证 ROS 代谢过程的基因 *SESN*2、*CYR*61、*GADD*45*A*、*KLF*4、*CDKN*1、*VAV*1、*PDGFB*、*ROMO*1、*DDAH*2、*DDIT*4 是否被 WNK2 调控,结果显示(图 6),WNK2 敲降引起大部分 ROS 代谢过程的基因如 *SESN*2、*CYR*61、*GADD*45*A*、*KLF*4、*CDKN*1、*VAV*1、*DDIT*4 的下调,推测 WNK2 极可能影响卵巢癌细胞的 ROS 代谢过程。

2.2.6　WNK2 对卵巢癌细胞 ROS 代谢的影响　　为了检测 WNK2 是否影响卵巢癌细胞的 ROS 生成,本研究组在卵巢癌细胞系 CAOV3 和 SKOV3 中过表达和敲降 WNK2 后检测 ROS 的变化(图 7、8)。结果显示 WNK2 过表达后,卵巢癌细胞 SKOV3、CAOV3 中的 ROS 生成增多;WNK2 敲降后,卵巢癌细胞 SKOV3、CAOV3 中的 ROS 生成减少。

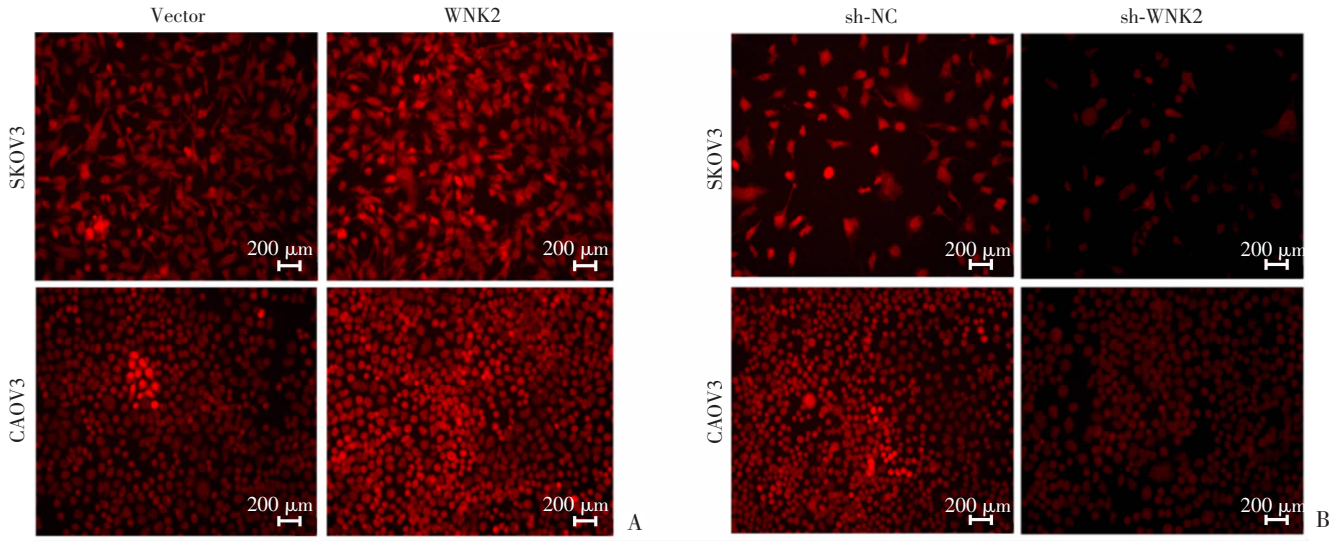
3　讨论

卵巢癌是病死率最高的妇科恶性肿瘤,目前治疗方法难以提高其 5 年生存率,寻找有效诊治卵巢癌的分子靶点是迫在眉睫的任务。作为近 20 余年新发现的蛋白,WNK2 能调控多种肿瘤的恶性进展。本课题组前期证明 WNK2 促进卵巢癌细胞的恶性行为[14-15],为进一步挖掘该激酶在卵巢癌中扮演的角色,本研究利用转录组测序探究 WNK2 在卵巢癌中调控的生物和代谢过程。



A: SKOV3 细胞中 WNK2 的敲降效果;B:CAOV3 细胞中 WNK2 的敲降效果;C:SKOV3 细胞中 WNK2 的过表达效果;D:CAOV3 细胞中 WNK2 的过表达效果

图 7 Western blot 检测 CAOV3、SKOV3 中 WNK2 被成功敲降和过表达



A: WNK2 过表达后卵巢癌细胞 ROS 的变化; B:WNK2 敲降后卵巢癌细胞 ROS 的变化

图 8 免疫荧光检测 WNK2 对卵巢癌细胞中 ROS 形成的影响

转录组测序检测包括编码 RNA (mRNA)和非编码 RNA (ncRNA)在内的所有转录本信息,能更全面地了解 WNK2 在卵巢癌中调控的生物和代谢过程。鉴于 SKOV3 细胞中 WNK2 表达最高[14],因此用 si-RNA 将卵巢癌细胞系 SKOV3 中的 WNK2 敲降后,提取总的 RNA 进行转录组测序,并分析 WNK2 在卵巢癌细胞中调控的所有转录信息。通过对差异基因进行 DisGeNET、DO 和 GO 富集,获取 WNK2 在卵巢癌细胞中调控的生物功能和代谢过程。分析表明差异基因与子宫内膜癌、宫体癌、头颈癌、肝癌、胆道癌以及结缔组织、生殖细胞、泌尿系统、肌肉骨骼系统等恶性肿瘤密切相关。GO 功能富集分析表明差异蛋白富集于 ROS 代谢过程、凋亡信号通路和细胞黏附等生物过程。细胞组成上 WNK2 调控的蛋白参与泛素连接酶复合物、线粒体膜蛋白复合物以及细胞色素复合物等的形成。众所周知,ROS 代谢过程是促发肿瘤,引起肿瘤进展的一个重要因素[18]。凋亡和细胞黏附也与肿瘤细胞生长和侵袭两大恶性行为密不可分。泛素连接酶影响各种蛋白酶解,在细胞各种生命活动中起着至关重要的调控作用[19]。线粒体作为供能细胞器,影响细胞分化、生长、凋亡、信号传递等过程[20]。线粒体膜蛋白复合物作为线粒体的重要组成成分,细胞色素复合物作为呼吸链的一部分,均调控包括细胞凋亡,细胞周期和细胞增殖在内的多种生物学过程[21]。

ROS 代谢是差异基因富集最为显著的过程,ROS 相关蛋白均位于 PPI 蛋白网络中心位置。WNK2 敲降后,该生物过程绝大部分差异基因转录水平下降,RNA-seq 测序结果可信。其中 PDGFB 和 ROMO1 转录水平未下降。我们推测可能是因为检测方法不同造成的差异。RNA-seq 测序是通过检测基因全长定量,而 qPCR 检测则是通过引物扩增基因特定区域,因此定量基因表达时,难以避免产生差异。此外,两株经典的卵巢癌细胞系 SKOV3 和 CAOV3 验证实验表明 WNK2 促进卵巢癌细胞 ROS 产生。ROS 通过激活癌基因影响肿瘤发生发展中几乎所有过程,它通过损伤 DNA,促使肿瘤发生,还通过影响血管生成、上皮间充质转变、细胞黏附等过程,促进肿瘤细胞的增殖、侵袭[22]。卵巢癌是由输卵管上皮细胞长期暴露于 ROS

演变而来的,高水平的 ROS 是导致卵巢癌恶性进程的重要原因[23-24]。CYR61、VAV1、PDGFB、DDIT4 促进 ROS 的产生和积聚,SESN2 则抑制 ROS 的产生。KLF4 在不同情况下既可促进也可抑制 ROS 的产生[25-32],这代表 WNK2 促进卵巢癌细胞 ROS 是多种因素共同促进 ROS 产生和积聚增加的结果。研究发现,ROS 能促进 GADD45A、CDKN1 的表达[33-34],那么 GADD45A、CDKN1 的变化是由 WNK2 还是由 ROS 的改变引起的呢? 后续需设计实验研究具体原因。

综上所述,本研究通过 RNA-seq 测序和活性氧检测证明了 WNK2 促进卵巢癌细胞 SKOV3 和 CAOV3 中 ROS 形成,为 WNK2 在卵巢癌中扮演的重要角色提供了更多的证据,也为下一步 WNK2 发展为卵巢癌新的治疗靶点提供了思路。

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] KUROKI L, GUNTUPALLI S R. Treatment of epithelial ovarian cancer[J]. BMJ, 2020, 371: m3773. DOI: 10.1136/bmj.m3773.

[3] GADDUCCI A, GUARNERI V, PECCATORI F A, *et al*. Current strategies for the targeted treatment of high-grade serous epithelial ovarian cancer and relevance of BRCA mutational status[J]. J Ovarian Res, 2019, 12(1): 9. DOI: 10.1186/s13048-019-0484-6.

[4] MCGEE J, PEART T M, FOLEY N, *et al*. Direct genetics referral pathway for high-grade serous ovarian cancer patients: the "opout" process[J]. J Oncol, 2019, 2019: 6029097. DOI: 10.1155/2019/6029097.

[5] LHEUREUX S, BRAUNSTEIN M, OZA A M. Epithelial ovarian cancer: evolution of management in the era of precision medicine[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(4): 280-304. DOI: 10.3322/caac.21559.

[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] ANGLANI F, SALVIATI L, CASSINA M, *et al*. Genotype-phenotype correlation in Gordon's syndrome: report of two cases carrying novel heterozygous mutations[J]. J Nephrol, 2022, 35(3): 859-862. DOI: 10.1007/s40620-021-01083-1.

[8] YOSHIDA T, KATO K, YOKOI K, *et al*. Association of genetic variants with hemorrhagic stroke in Japanese individuals[J]. Int J Mol Med, 2010, 25(4): 649-656. DOI: 10.3892/ijmm_00000388.

[9] HE S H, PHAM M H, PEASE M, *et al*. A review of epigenetic and gene expression alterations associated with intracranial meningiomas[J]. Neurosurg Focus, 2013, 35(6): E5. DOI: 10.3171/2013.10.FOCUS13360.

[10] MONIZ S, MATOS P, JORDAN P. WNK_2 modulates MEK1 activity through the Rho GTPase pathway[J]. Cell Signal, 2008, 20(10): 1762-1768. DOI: 10.1016/j.cellsig.2008.06.002.

[11] DU J, LIANG Y, LI J, *et al*. Correction to: LINC00858 knockdown inhibits gastric cancer cell growth and induces apoptosis through reducing WNK_2 promoter methylation[J]. Cell Oncol (Dordr), 2021, 44(1): 235. DOI: 10.1007/s13402-020-00574-w.

[12] WU J B, MENG X M, GAO R, *et al*. Long non-coding RNA LINC00858 inhibits colon cancer cell apoptosis, autophagy, and senescence by activating WNK_2 promoter methylation[J]. Exp Cell Res, 2020, 396(1): 112214. DOI: 10.1016/j.yexcr.2020.112214.

[13] MONIZ S, VERÍSSIMO F, MATOS P, *et al*. Protein kinase WNK_2 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.

[14] LI F J, LIANG Z, JIA Y Q, *et al*. microRNA-324-3p suppresses the aggressive ovarian cancer by targeting WNK_2/RAS pathway[J]. Bioengineered, 2022, 13(5): 12030-12044. DOI: 10.1080/21655979.2022.2056314.

[15] 李凤杰, 贾永琴, 梁振, 等. 基于磷酸化修饰组学分析 WNK2 调控卵巢癌细胞骨架形成[J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(6): 513-521. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202110107.
LI F J, JIA Y Q, LIANG Z, *et al*. Analysis of WNK_2 regulating cytoskeleton formation in ovarian cancer cells based on phosphorylation modification sequencing[J]. J Army Med Univ, 2022, 44(6): 513-521. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202110107.

[16] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(1): 57-63. DOI: 10.1038/nrg2484.

[17] WANG J L, DEAN D C, HORNICEK F J, *et al*. RNA sequencing (RNA-Seq) and its application in ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2019, 152(1): 194-201. DOI: 10.1016/j.ygyno.2018.10.002.

[18] CHIO I I C, TUVESON D A. ROS in cancer: the burning question[J]. Trends Mol Med, 2017, 23(5): 411-429. DOI: 10.1016/j.molmed.2017.03.004.

[19] ZHENG N, SHABEK N. Ubiquitin ligases: structure, function, and regulation[J]. Annu Rev Biochem, 2017, 86: 129-157. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060815-014922.

[20] PUROHIT P K, SAINI N. Mitochondrial microRNA (MitomiRs) in cancer and complex mitochondrial diseases: current status and future perspectives[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(4): 1405-1421. DOI: 10.1007/s00018-020-03670-0.

[21] WITUS S R, STEWART M D, KLEVIT R E. The BRCA1/BARD1 ubiquitin ligase and its substrates[J]. Biochem J, 2021, 478(18): 3467-3483. DOI: 10.1042/BCJ20200864.

[22] SAED G M, DIAMOND M P, FLETCHER N M. Updates of the role of oxidative stress in the pathogenesis of ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2017, 145(3): 595-602. DOI: 10.1016/j.ygyno.2017.02.033.

[23] KOBAYASHI H, IMANAKA S, SHIGETOMI H. Revisiting therapeutic strategies for ovarian cancer by focusing on redox homeostasis[J]. Oncol Lett, 2022, 23(3): 80. DOI: 10.3892/ol.2022.13200.

[24] 马骏, 王育. 活性氧与上皮性卵巢癌转移的相关性研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2011, 27(11): 862-865.
MA J, WANG Y. The relationship between reactive oxygen species and metastasis of epithelial ovarian cancer[J]. Chin J Pract Gynecol Obstet, 2011, 27(11): 862-865.

[25] BORKHAM-KAMPHORST E, SCHAFFRATH C, VAN DE LEUR E, *et al*. The anti-fibrotic effects of CCN_1/CYR61 in primary portal myofibroblasts are mediated through induction of reactive oxygen species resulting in cellular senescence, apoptosis and attenuated TGF-β signaling[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(5): 902-914. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.01.023.

[26] CHEN C C, KIM K H, LAU L F. The matricellular protein CCN_1 suppresses hepatocarcinogenesis by inhibiting compensatory proliferation[J]. Oncogene, 2016, 35(10): 1314-1323. DOI: 10.1038/onc.2015.190.

[27] ZHAO T M, BENARD V, BOHL B P, *et al*. The molecular basis for adhesion-mediated suppression of reactive oxygen species generation by human neutrophils[J]. J Clin Invest, 2003, 112(11): 1732-1740. DOI: 10.1172/JCI19108.

[28] LU Q B, WAN M Y, WANG P Y, *et al*. Chicoric acid prevents PDGF-BB-induced VSMC dedifferentiation, proliferation and migration by suppressing ROS/NFκB/mTOR/P70S6K signaling cascade[J]. Redox Biol, 2018, 14: 656-668. DOI: 10.1016/j.redox.2017.11.012.

[29] LI Z L, ZHAO Q W, LU Y J, *et al*. DDIT4 S-nitrosylation aids p38-MAPK signaling complex assembly to promote hepatic reactive oxygen species production[J]. Adv Sci (Weinh), 2021, 8(18): e2101957. DOI: 10.1002/advs.202101957.

[30] SHIN J, BAE J, PARK S, *et al*. mTOR-dependent role of Sestrin2 in regulating tumor progression of human endometrial cancer[J]. Cancers, 2020, 12(9): 2515. DOI: 10.3390/cancers12092515.

[31] BORKHAM-KAMPHORST E, SCHAFFRATH C, VAN DE LEUR E, *et al*. The anti-fibrotic effects of CCN_1/CYR61 in primary portal myofibroblasts are mediated through induction of reactive oxygen species resulting in cellular senescence, apoptosis and attenuated TGF-β signaling[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(5): 902-914. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.01.023.

[32] BLUM A, MOSTOW K, JACKETT K, *et al*. KLF_4 regulates metabolic homeostasis in response to stress[J]. Cells, 2021, 10(4): 830. DOI: 10.3390/cells10040830.

[33] QI L, WANG Y Y, SU S Q, *et al*. Sodium selenite inhibits cervical cancer growth via ROS mediated AMPK/FOXO3a/GADD45a axis[J]. Chem Biol Interact, 2022, 367: 110171. DOI: 10.1016/j.cbi.2022.110171.

[34] ZHOU X Y, ZHANG J, LI Y, *et al*. Advanced oxidation protein products induce G1/G0-phase arrest in ovarian granulosa cells via the ROS-JNK/p38 MAPK-p21 pathway in premature ovarian insufficiency[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6634718. DOI: 10.1155/2021/6634718.

(收稿:2022-05-26;修回:2022-07-20)

(编辑 张艺霖)