·论著·

NUAK2对卵巢浆液性癌细胞增殖和凋亡的调控作用

张文娟[1],孟海[2],高丹丹[1],周静祎[1],张静[1]
(锦州医科大学附属第一医院 1.妇产科;2.病理科,辽宁 锦州 121203)

摘要 目的 探讨NUAK家族SNF1样激酶2(NUAK2)在卵巢浆液性癌中的表达特征及其对细胞增殖和凋亡的调控作用。**方法** 选取2019年6月至2022年12月于我院确诊的57例卵巢浆液性癌患者作为观察组,同时选取57例卵巢浆液性囊腺瘤患者作为对照组。应用GEPIA数据库观察NUAK2在卵巢浆液性癌中的表达趋势。采用免疫组织化学法检测NUAK2、增殖细胞核抗原(PCNA)和B细胞淋巴瘤相关X抗原(BAX)的表达。选择人卵巢浆液性癌细胞系(SKOV3)和人卵巢表面上皮细胞系(HOSEpiC),采用Western blotting检测NUAK2的表达,将SKOV3细胞转染siRNA-NUAK2质粒建立si-NUAK2组,并设立空载体转染(EV)组和空白对照(NC)组,采用Western blotting检测NUAK2、PCNA和BAX的表达,CCK-8法检测细胞增殖活性,流式细胞术检测凋亡情况。**结果** GEPIA数据库显示NUAK2在卵巢癌中的表达有增高趋势($P<0.05$)。组织学实验显示观察组NUAK2的阳性率明显高于对照组,NUAK2在不同病变分级和不同肿瘤最大径的比较中差异有统计学意义($P<0.05$),卵巢浆液性癌中NUAK2和PCNA呈正相关($P<0.05$),和BAX呈负相关($P<0.05$)。体外细胞培养实验显示SKOV3细胞中NUAK2的表达量明显高于HOSEpiC细胞($P<0.05$)。si-NUAK2组细胞增殖活性和PCNA表达明显低于EV组和NC组($P<0.05$),si-NUAK2组凋亡率和BAX明显高于EV组和NC组($P<0.05$)。**结论** NUAK2在卵巢浆液性癌中高表达,通过促进细胞增殖、抑制凋亡发挥生物学作用。

关键词 卵巢浆液性癌; NUAK家族SNF1样激酶2; 增殖; 凋亡; 临床特征
中图分类号 R73 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2025)05-0419-06
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20250519.1526.030
DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2025.05.007

Regulatory role of NUAK2 in proliferation and apoptosis of ovarian serous carcinoma cells

ZHANG Wenjuan[1], MENG Hai[2], GAO Dandan[1], ZHOU Jingyi[1], ZHANG Jing[1]
(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121203, China; 2. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121203, China)

Abstract Objective To elucidate the expression characteristics of the NUAK family SNF1-like kinase 2 (NUAK2) in ovarian serous carcinoma and determine its regulatory roles in cell proliferation and apoptosis. **Methods** Fifty-seven patients with ovarian serous carcinoma (observation group) and 57 patients with ovarian serous cystadenoma (control group) were selected from June 2019 to December 2022. The GEPIA database was used to assess the expression patterns of NUAK2 in ovarian serous carcinoma. Immunohistochemistry was used to detect the expression of NUAK2, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and B-cell lymphoma-associated X antigen (BAX). Western blotting was performed to evaluate the expression of NUAK2 in the human ovarian serous carcinoma cell lines (SKOV3) and the human ovarian surface epithelial cell lines (HOSEpiC). SKOV3 cells were transfected with the siRNA-NUAK2 plasmid to establish the si-NUAK2 group, or with the empty transfection vector (EV) or a blank solution (NC) to establish control groups. Western blotting was subsequently used to detect the expression of NUAK2, PCNA, and BAX. The CCK-8 method was used to assess cell proliferation activity, and flow cytometry was used to quantify apoptosis. **Results** The GEPIA database analysis showed a significant increasing trend in the expression of NUAK2 in ovarian cancer ($P<0.05$). Immunohistochemical analysis revealed a significantly higher NUAK2 positive rate in ovarian serous carcinoma tissue than that in the control group. Moreover, significant differences in the expression of NUAK2 were observed across different lesion grades and maximum tumor diameters ($P<0.05$). A significant positive correlation was found between NUAK2 and PCNA ($P<0.05$), whereas a significant negative correlation was observed between NUAK2 and BAX ($P<0.05$) in ovarian serous carcinoma. In vitro cell culture experiments showed that the expression level of NUAK2 was significantly higher in SKOV3 cells than that in HOSEpiC cells ($P<0.05$). The si-NUAK2 group exhibited significantly lower cell proliferation activity and PCNA expression and significantly higher apoptosis rate and BAX expression than those in the EV and NC groups ($P<0.05$). **Conclusion** NUAK2 is overexpressed in ovarian

基金项目: 辽宁省科学技术计划联合计划(2023-MSLH-056)
作者简介: 张文娟(1982-),女,副主任医师,硕士.
通信作者: 张静,E-mail:zhangj1@jzmu.edu.cn
收稿日期: 2024-03-26
网络出版时间: 2025-05-20 12:57:19

serous carcinoma and promotes tumor progression by enhancing cell proliferation and suppressing apoptosis.

Keywords　ovarian serous carcinoma; NUAK family SNF1-like kinase 2; proliferation; apoptosis; clinical characteristics

卵巢癌是妇科常见的恶性肿瘤，严重威胁女性健康和生命。虽然研究[1]发现多种癌基因的活化是疾病发生和进展的重要原因，但并未从根本上阐明卵巢浆液性癌的发生机制，其启动基因及调控机制仍是学者研究的热点[2]。NUAK家族SNF1样激酶2（NUAK family SNF1-like kinase 2，NUAK2）为AMPK催化亚家族的第4个成员，在中波紫外线辐射角质细胞时发现，对细胞增殖及分化均有影响[3]。目前研究[4-5]发现NUAK2在正常人体不同组织和器官中的表达存在明显差异，作用方式完全不同，且与肿瘤的发生发展相关。本研究探讨了NUAK2在卵巢浆液性癌中的表达特征，分析其对细胞增殖和凋亡的调控作用，旨在为深入研究卵巢浆液性癌的发生和发展提供理论支持。

1　材料与方法

1.1　生物信息学分析

应用GEPIA数据库（http://gepia.cancer-pku.cn）预测NUAK2在卵巢癌中的表达趋势，分析426例卵巢癌和88例正常卵巢组织中NUAK2的表达差异，并预测其对预后评估的价值。

1.2　临床资料

选择2019年6月至2022年12月于锦州医科大学附属第一医院确诊为卵巢浆液性癌的57例患者作为观察组。纳入标准：（1）病变为首次发生，并行根治性手术治疗，术后病理切片经病理科副主任医师复诊证实，并明确病理分级；（2）临床资料、病理资料及随访资料完整。排除标准：（1）患有其他器官恶性肿瘤；（2）术前接受过放化疗；（3）病理镜下形态伴有其他异源性成分。随机选择同期于我院经病理确诊为卵巢浆液性囊腺瘤并行手术治疗的57例患者作为对照组。术后组织经病理医师取材，并留取石蜡包埋组织标本。本研究获得我院伦理委员会批准。

1.3　细胞系

人卵巢浆液性癌细胞系SKOV3和人卵巢表面上皮细胞系HOSEpiC均购自美国ATCC。应用DMEM高糖培养基（美国HyClone公司），在37 ℃、5%CO_2培养箱中培养。

1.4　实验方法

1.4.1　细胞培养：SKOV3细胞接种于12孔板，调整细胞密度至3×10^5/孔。将NUAK2的全序列亚克隆到pcDNA 3.1制备NUAK2干扰RNA质粒（siRNA-NUAK2，广州市锐博生物科技有限公司），应用lipofectamine 3000将siRNA-NUAK2转染到SKOV3细胞建立si-NUAK2组，并设立只转染载体的空载体转染（EV）组和未行任何干预的SKOV3细胞空白对照（NC）组。采用Western blotting检测NUAK2进行验证。

1.4.2　Western blotting：以β-actin为内参，检测NUAK2（1 ∶ 2 500）、增殖细胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen，PCNA）（1 ∶ 2 000）和B细胞淋巴瘤相关X抗原（Bcl-2 associated X protein，BAX）（1 ∶ 3 000）的表达，应用ImageJ V1.8.0软件计算各蛋白与条带灰度值，实验重复3次。

1.4.3　CCK-8法：CCK-8试剂盒购自生工生物工程（上海）股份有限公司。将SKOV3细胞细胞系制备成细胞悬液，接种于96孔板，细胞密度约为3.0×10^3/孔，每组接种5个复孔，在37 ℃培养箱内培养。其间分别在24、48、72和96 h时分别加入CCK-8试剂10 μL，于1 h后应用酶标仪（美国赛默飞世尔科技公司）测定各孔在450 nm处的光密度（optical density，OD）值。分析时每组去掉1个最高值和1个最低值，实验重复3次。

1.4.4　流式细胞术检测：应用美国BC公司生产的流式细胞仪检测si-NUAK2组、EV组和NC组的凋亡率，实验重复3次。

1.4.5　免疫组织化学检测：应用免疫组织化学EnVision法[5]检测NUAK2、PCNA和BAX（一抗均购自武汉三鹰生物技术有限公司）的表达，DAB显色。NUAK2和BAX阳性部位是细胞质，PCNA阳性部位是细胞核。先在低倍镜下筛选3个热点区，然后高倍镜下观察和计数。应用二维评定法评定阳性细胞：0分，<5%；1分，5%~<25%；2分，25%~<50%；3分，50%~<75%；4分，≥75%。着色强度：0分，无着色；1分，淡黄色；2分，黄色；3分，棕褐色。两者相乘为最

终评分。以0~4分为阴性，5~12分为阳性。

1.5　统计学分析

采用SAS6.12进行统计学处理，符合正态分布的计量资料以$\bar{x} \pm s$表示，2组间比较行t检验。多组间比较采用方差分析，计数资料以率（%）表示，组间比较采用χ^2检验。相关性分析应用线性相关分析。$P<0.05$为差异有统计学意义。

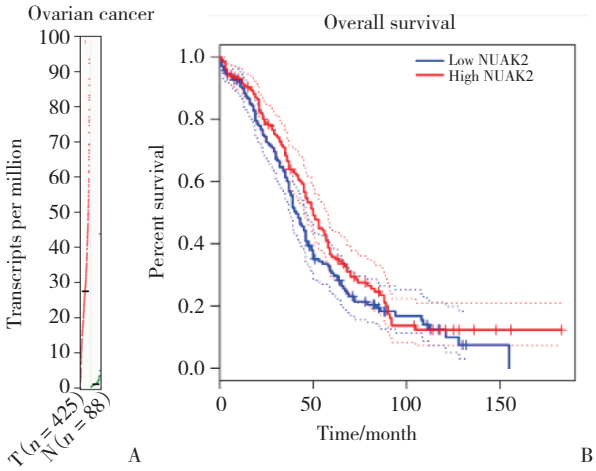
2　结果

2.1　生物信息学分析结果

对GEPIA数据库中426例卵巢癌和88例正常对照组织中NUAK2的表达趋势进行预测，发现其在卵巢癌中具有高表达趋势（$P<0.05$），但是未预测到NUAK2表达与预后的关系（$P>0.05$）。见图1。

2.2　2组一般资料比较

观察组患者年龄31~83岁，平均年龄（55.6 ± 6.8）岁；体重指数（body mass index，BMI）15.1~30.2 kg/m^2，平均BMI（20.23 ± 1.03）kg/m^2；有吸烟史者9例，无吸烟史者48例；有饮酒史者10例，无饮酒史者47例。对照组患者年龄26~79岁，平均年龄（53.6 ± 7.9）岁；BMI 15.6~30.6 kg/m^2，平均BMI（20.01 ± 1.05）kg/m^2；有吸烟史者6例，无吸烟史者51例；有饮酒史者9例，无饮酒史者48例。2组年龄、BMI、吸烟史及饮酒史比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。



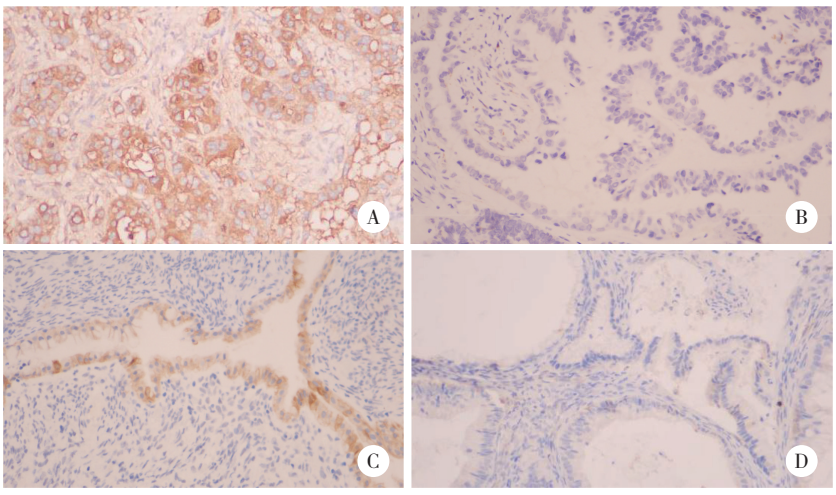
A，prediction of NUAK2 in ovarian cancer and normal control tissues；B，prognostic trend prediction of NUAK2 in ovarian cancer.

图1　GEPIA数据库的生物信息学分析结果

Fig.1　Results of bioinformatics analysis in GEPIA database

2.3　2组NUAK2阳性表达比较

应用免疫组织化学法检测2组NUAK2的表达水平，结果显示，观察组有35例（361.40%）NUAK2呈阳性，对照组有5例（8.77%）呈阳性，观察组阳性率明显高于对照组（χ^2=34.662 2，$P<0.000\ 1$）。见图2。



A，positive expression of NUAK2 in ovarian serous carcinoma；B，negative expression of NUAK2 in ovarian serous carcinoma；C，positive expression of NUAK2 in serous cystadenomas；D，negative expression of NUAK2 in serous cystadenomas.

图2　卵巢浆液性癌和浆液性囊腺瘤中NUAK2的表达　×200

Fig.2　Expression of NUAK2 in ovarian serous carcinoma and serous cystadenoma　×200

2.4　NUAK2在卵巢浆液性癌患者不同临床病理特征中表达的比较

NUAK2表达阳性率与卵巢浆液性癌病变级别及肿瘤最大径相关，差异有统计学意义（$P<0.05$），而与年龄、BMI、有无吸烟史、饮酒史、脉管癌栓、淋巴结转移及是否伴双侧卵巢累犯不相关（$P>0.05$）。见表1。

表1　卵巢浆液性癌临床病理特征与NUAK2表达的结果

Tab.1　Relationship between the clinicopathological characteritics and NUAK2 expression clinical data in ovarian serous carcinoma

Clinicopathological characteristics	n	NUAK2 [n(%)]		χ^2	P
		+	−		
Age					
≥60 years	23	14(60.87)	9(39.13)	0.004 6	0.945 7
<60 years	34	21(61.76)	13(38.24)		
BMI					
≤20 kg/m^2	28	16(57.14)	12(42.86)	0.421 5	0.516 2
>20 kg/m^2	29	19(65.52)	10(34.48)		
Smoking history					
No	48	29(60.42)	19(39.58)	0.124 9	0.723 8
Yes	9	6(66.67)	3(33.33)		
Drinking history					
No	47	27(57.45)	20(42.55)	1.769 7	0.183 4
Yes	10	8(80.00)	2(20.00)		
Bilateral ovarian involvement					
No	34	21(61.76)	13(38.24)	0.004 6	0.945 7
Yes	23	14(60.87)	9(39.13)		
Vascular cancer thrombus					
No	43	25(58.14)	18(41.86)	0.787 0	0.375 0
Yes	14	10(71.43)	4(28.57)		
Lymph node metastasis					
No	42	27(64.29)	15(35.71)	0.559 4	0.454 5
Yes	15	8(53.33)	7(46.67)		
Lesion grading					
Low	8	2(25.00)	6(75.00)	5.203 8	0.022 5
High	49	33(67.35)	16(32.65)		
Maximum diameter of tumor					
<8 cm	29	9(31.03)	20(68.97)	22.973 9	<0.000 1
≥8 cm	28	26(92.86)	2(7.14)		

2.5　卵巢浆液性癌中NUAK2与PCNA、BAX的相关性

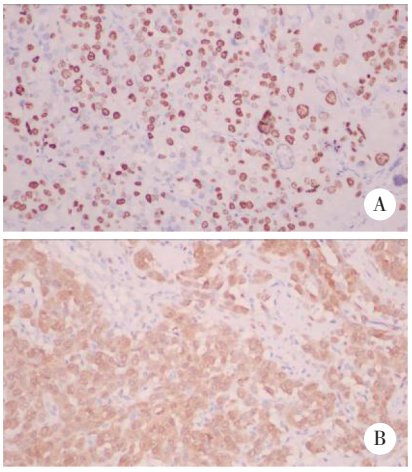
浆液性癌中，PCNA和BAX均有31例(54.39%)呈阳性表达。线性相关分析结果显示，NUAK2与PCNA呈正相关($r = 0.68$，$P < 0.000\ 1$)，而NUAK2和BAX呈负相关($r = -0.54$，$P < 0.000\ 1$)。见图3。

2.6　不同细胞系中NUAK2表达的比较

采用Western blotting检测不同细胞系中NUAK2的表达，结果显示，SKOV3细胞中NUAK2的表达(2.02 ± 0.08)明显高于HOSEpiC细胞(1.43 ± 0.09，$t = 8.191\ 2$，$P = 0.001\ 2$)。见图4。

2.7　SKOV3细胞转染效果的验证

转染SKOV3细胞后应用Western blotting检测NUAK2的表达，结果显示，si-NUAK2组中NUAK2的表达(0.88 ± 0.08)明显低于EV组(2.03 ± 0.06)和NC



A，expression of PCNA in ovarian serous carcinoma；B，expression of BAX in ovarian serous carcinoma.

图3　PCNA和BAX的阳性表达

Fig.3　Positive expression of PCNA and BAX

组(2.02 ± 0.08,F = 250.532 3,P < 0.000 1),证实转染成功。见图5。

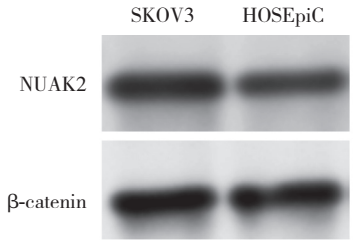


图4　不同细胞系中NUAK2表达的比较

Fig.4　Comparison of the expression of NUAK2 in different cell lines

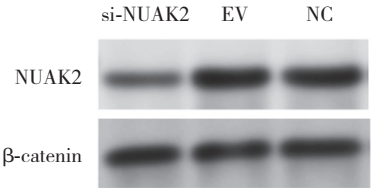


图5　各组SKOV3细胞中NUAK2的表达比较

Fig.5　Comparision of the expression of NUAK2 in SKOV3 cells in different groups

2.8　各组SKOV3细胞PCNA和BAX的表达水平

Western blotting检测结果显示,si-NUAK2组中PCNA的表达(0.91 ± 0.08)明显低于EV组(1.86 ± 0.07)和NC组(1.92 ± 0.09,F = 142.935 3,P < 0.000 1),si-NUAK2组中BAX的表达(2.36 ± 0.25)明显高于EV组(1.86 ± 0.07)和NC组(1.92 ± 0.09,F = 8.700 2,P = 0.016 9)。见图6。

2.9　CCK-8法检测结果

CCK-8法检测结果显示,si-NUAK2组细胞在72 h的OD值(0.74 ± 0.08)明显低于EV组(1.05 ± 0.07)和NC组(1.00 ± 0.05,F = 19.195 4,P = 0.002 5),si-NUAK2组细胞在96 h的OD值(1.20 ± 0.10)明显低于EV组(1.73 ± 0.06)和NC组(1.62 ± 0.07,F = 41.658 3,P = 0.000 3)。而在24 h和48 h时各组OD值差异无统计学意义(P > 0.05)。

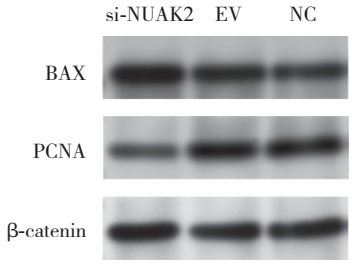


图6　各组SKOV3细胞PCNA和BAX表达的比较

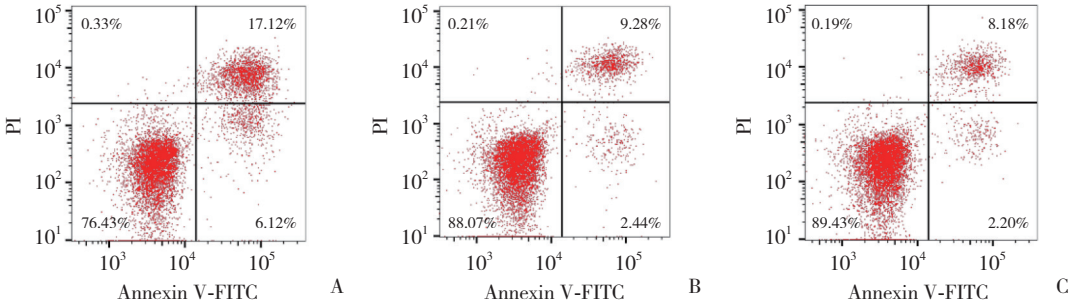
Fig.6　Comparision of the expressions of PCNA and BAX in SKOV3 cells in different groups

2.10　流式细胞术检测结果

结果显示,si-NUAK2组的细胞凋亡率(24.97% ± 1.50%)明显高于EV组(11.09% ± 0.56%)和NC组(10.20% ± 1.02%,F = 54.750 3,P = 0.000 1)。见图7。

3　讨论

卵巢浆液性癌的形成与基因调控密切相关[6]。*NUAK2*是一种调控基因,含编码7个外显子的mRNA,其作用与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的活性有关,参与恶性上皮源性肿瘤的发生、发展、增殖、侵袭及转移[7]。NUAK2表达异常可以促进早期肿瘤病灶的形成,并且具有抗凋亡作用,可以促进肿瘤细胞的上皮–间质转化,下调同质型肿瘤细胞间的黏附力。研究[8-10]发现在宫颈鳞癌细胞中沉默*NUAK2*可以上调*CYFIP2*的表达,进而抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和上皮–间质转化,认为*NUAK2*既具有靶基因的作用,又能作为上游因子调控下游靶基因,调控肿瘤的形成和进展。



A,si-NUAK2 group;B,EV group;C,NC group.

图7　各组SKOV3细胞凋亡率的比较

Fig.7　Comparison of apoptosis rates of SKOV3 cells in different groups

本研究组织学及体外细胞学实验结果显示，NUAK2在卵巢浆液性癌中的表达升高，提示NUAK2在卵巢浆液性癌的形成中具有重要促进作用，NUAK2高表达能够促进卵巢浆液性癌形成。NUAK2可以引起肿瘤细胞的活化，使肿瘤细胞呈进展状态，表现为失控性增生、向局部周围组织侵袭和向远隔器官迁移[11]。本研究发现NUAK2能促进卵巢浆液性癌细胞的增殖、抑制凋亡，证实了NUAK2调控肿瘤的具体生物学作用。NUAK2的异常表达能促进肿瘤形成和进展。目前有研究发现HTH01-015和WZ4003是NUAK2的抑制剂[12]，为进一步研究NUAK2的机制提供重要依据。本研究发现NUAK2阳性表达率与卵巢浆液性癌患者不同病变级别及不同肿瘤最大径相关，提示NUAK2是病变进展相关的重要因子。由于病变级别及肿瘤最大径与肿瘤生物学行为和患者术后生存时间相关，因此NUAK2的表达程度可能是判断肿瘤生物学行为和预后的指标，但是生物信息学分析结果尚不支持NUAK2对预后判断的明确意义，需要后续研究开展随访或进行多中心研究，通过生存分析结果证实。本研究的局限性是未探讨NUAK2调控卵巢浆液性癌的侵袭和迁移，同时对其预后判断的价值也未进行全面分析，后续可以围绕其对肿瘤和生物学特性的综合作用，进行大样本的生存分析研究，以期更好地阐明其对肿瘤生物学特性的影响，并明确其对预后的判断价值。

综上所述，NUAK2在卵巢浆液性癌中高表达，通过促进细胞增殖、抑制凋亡发挥生物学作用。基于NUAK2调控分子网络的研究，是后续实验的重要方向。

参考文献：

[1] WANG HZ, YE F, ZHOU CY, et al. High expression of ENPP1 in high-grade serous ovarian carcinoma predicts poor prognosis and as a molecular therapy target [J]. PLoS One, 2021, 16 (2): e0245733. DOI: 10.1371/journal.pone.0245733.

[2] ANGGOROWATI N, KURNIASARI CR, DAMAYANTI K, et al. Histochemical and immunohistochemical study of α-SMA, collagen, and PCNA in epithelial ovarian neoplasm [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18 (3): 667-671. DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.3.667.

[3] PRASAD V, CERIKAN B, STAHL Y, et al. Enhanced SARS-CoV-2 entry via UPR-dependent AMPK-related kinase NUAK2 [J]. Mol Cell, 2023, 83 (14): 2559-2577.e8. DOI: 10.1016/j.molcel.2023.06.020.

[4] VAN DE VIS RAJ, MOUSTAKAS A, VAN DER HEIDE LP. NUAK1 and NUAK2 fine-tune TGF-β signaling [J]. Cancers (Basel), 2021, 13 (13): 3377. DOI: 10.3390/cancers13133377.

[5] 邓敏，韩松灿，章银辉，等. DDIAS在结直肠癌中的表达及其临床意义[J]. 浙江医学，2024，46(24)：2649-2652.

[6] MURAWSKI M, JAGODZIŃSKI A, BIELAWSKA-POHL A, et al. Complexity of the genetic background of oncogenesis in ovarian cancer-genetic instability and clinical implications [J]. Cells, 2024, 13 (4): 345. DOI: 10.3390/cells13040345.

[7] DAI YJ, SHI WJ, QIU YR, et al. Circ_0000033 up-regulates NUAK2 by sequestering miR-378a-3p to promote breast tumorigenesis [J]. Environ Mol Mutagen, 2023, 64 (6): 359-370. DOI: 10.1002/em.22558.

[8] LI YX, SONG XH, LIU LP, et al. NUAK2 silencing inhibits the proliferation, migration and epithelial-to-mesenchymal transition of cervical cancer cells via upregulating CYFIP2 [J]. Mol Med Rep, 2021, 24 (5): 817. DOI: 10.3892/mmr.2021.12457.

[9] CHEN BR, WANG BY, XU XJ, et al. Upregulation of NUAK2: a novel prognostic marker in breast cancer [J]. Histol Histopathol, 2023, 38 (7): 811-822. DOI: 10.14670/HH-18-554.

[10] 葛彦锋，范昕，庄秀芬，等. NUAK家族在肿瘤中的双重作用[J]. 医学研究杂志，2022，51(11)：13-16，190. DOI：10.11969/j.issn.1673-548X.2022.11.004.

[11] FU WW, ZHAO MT, DRIVER LM, et al. NUAK family kinase 2 is a novel therapeutic target for prostate cancer [J]. Mol Carcinog, 2022, 61 (3): 334-345. DOI: 10.1002/mc.23374.

[12] GUO ZJ, GUO L. OTUD7B deubiquitinates and stabilizes YAP1 to upregulate NUAK2 expression, thus accelerating gastric cancer procession [J]. Dig Liver Dis, 2024, 56 (2): 352-362. DOI: 10.1016/j.dld.2023.06.026.

（编辑　于　溪）