

OVCA2在胰腺癌发生发展中的作用机制研究

魏婷¹ 欧阳雯滢² 王洁² 陈洁² 林语嫣³ 钱佳孜³ 吕建新⁴ 杜苗苗⁴ 桂善颖^{2*}

(¹杭州医学院公共卫生学院, 杭州 310053; ²杭州医学院基础与法医学院, 杭州 310053;

³温州医科大学检验医学与生命科学学院教育部检验医学重点实验室, 温州 325035;

⁴杭州医学院检验与生物工程学院, 杭州 310053)

摘要 该研究旨在探讨OVCA2对胰腺癌细胞发生发展中的作用及调控机制。通过生信分析OVCA2在胰腺癌中的表达及预后的相关性, 结合免疫组化验证OVCA2在癌症中的表达水平; 利用细胞计数和集落形成实验研究OVCA2对胰腺癌细胞增殖影响, 细胞凋亡实验检测OVCA2对胰腺癌细胞凋亡影响及细胞周期实验检测OVCA2对周期的作用; 通过免疫荧光的共定位分析及细胞亚定位研究OVCA2定位; 利用线粒体功能实验检测OVCA2对线粒体功能的效应; 通过IP测序及转录组学分析OVCA2代谢变化, 通过Western blot验证信号通路蛋白变化。结果表明, OVCA2在多种癌症中低表达, 但这只与胰腺癌预后相关; 过表达OVCA2后, 胰腺癌细胞的增殖、集落形成能力显著降低, 凋亡的比率显著上升, 而敲低的细胞系表型结果与之相反; OVCA2在线粒体中定位于线粒体外膜且OVCA2过表达抑制胰腺癌细胞的线粒体功能, 包括细胞氧呼吸能力、ATP生成能力、超级复合体组装能力、mtDNA拷贝数和mRNA转录能力等; VCA2过表达显著增强胰腺癌细胞的氧化压力, 如ROS水平及NADP⁺/NADPH比率; OVCA2敲低则获得相反结果; 而IP测序分析显示, 过表达OVCA2上调TNF信号通路, 下调Wnt信号通路; 转录组学显示OVCA2敲低增强线粒体功能且下调TNF信号通路, 而Western blot验证了OVCA2调节TNF、Wnt信号通路促进细胞凋亡。这些结果表明胰腺癌细胞中OVCA2高表达抑制癌细胞存活, 促进体内ROS的过度蓄积, 进一步通过促进TNF等信号通路中凋亡蛋白的表达促进细胞凋亡, 从而促进癌细胞的死亡, 而OVCA2的低表达通过抑制TNF信号通路诱导的细胞凋亡, 维持细胞内OXPHOS功能及促进肿瘤的发生, 明确OVCA2在调控胰腺癌中的机制, 提示通过增强OVCA2的表达发挥抑癌作用可能成为胰腺癌治疗的新策略。

关键词 OVCA2; OXPHOS; 胰腺癌; 凋亡; TNF信号通路

Mechanistic Study on the Role of OVCA2 in the Development and Progression of Pancreatic Cancer

WEI Ting¹, OUYANG Wenhui², WANG Jie², CHEN Jie², LIN Yuyan³, QIAN Jiazi³,

LYU Jianxin⁴, DU Miaomiao⁴, GUI Shanying^{2*}

(¹School of Public Health, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China; ²School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China; ³Key Laboratory of Laboratory Medicine, Ministry of Education, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, College of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; ⁴School of Laboratory Medicine and Bioengineering, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China)

收稿日期: 2025-01-25

接受日期: 2025-04-17

国家自然科学基金(批准号: 82203825、82102474)和浙江省自然科学基金(批准号: LQ22H070006)资助的课题

*通信作者。Tel: 17768363696, E-mail: shanying.gui@hmc.edu.cn

Received: January 25, 2025

Accepted: April 17, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82203825, 82102474) and the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.LQ22H070006)

*Corresponding author. Tel: +86-17768363696, E-mail: shanying.gui@hmc.edu.cn

Abstract This study investigates the role and regulatory mechanisms of OVCA2 in pancreatic cancer, a disease with rapid progression and poor prognosis. OVCA2 expression and its prognostic significance were analyzed via immunohistochemistry. The effects of OVCA2 on cell proliferation, apoptosis, and mitochondrial function were examined through colony formation, flow cytometry, and mitochondrial function assays. OVCA2 localization was determined via immunofluorescence. IP sequencing and transcriptomic analyses explored molecular changes and validated by Western blot. OVCA2 expression is low in multiple cancers but specifically correlates with pancreatic cancer prognosis. OVCA2 overexpression reduced proliferation and colony formation, while increasing apoptosis. OVCA2 localized to the outer mitochondrial membrane and inhibited mitochondrial function, reducing oxygen respiration, ATP production, and mtDNA levels, while increasing ROS and oxidative stress markers. OVCA2 knock-down had the opposite effect. IP-seq revealed OVCA2 overexpression upregulated the TNF signaling pathway and downregulated Wnt/ β -catenin signaling, findings confirmed by transcriptomics and Western blot. High expression of OVCA2 in pancreatic cancer cells inhibits cancer cell survival by promoting excessive accumulation of ROS (reactive oxygen species) *in vivo*. This process further enhances cell apoptosis through the activation of TNF signaling pathways, ultimately leading to cancer cell death. Conversely, low expression of OVCA2 suppresses TNF signaling pathway-induced apoptosis, maintains intracellular OXPHOS (oxidative phosphorylation) function, and promotes tumorigenesis. The elucidation of OVCA2's regulatory mechanism in pancreatic cancer suggests that enhancing OVCA2 expression could represent a novel therapeutic strategy for the treatment of this malignancy.

Keywords OVCA2; OXPHOS; pancreatic cancer; apoptosis; TNF signaling

胰腺癌(pancreatic cancer)是发病隐匿、预后差的恶性肿瘤^[1],其缺乏特异性症状和指标使得早期诊断胰腺癌成为难题。近年来,人类在胰腺癌的分子生物学研究上取得了一定进展,但胰腺癌发生的分子机制仍有待研究。线粒体是细胞代谢的中心枢纽,与信号通路紧密相连^[2]。氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)是保证线粒体功能的重要部分,有研究表明,线粒体OXPHOS通路中的特定组分在多种恶性肿瘤中呈现异常表达,促进癌症发展,成为潜在的癌症治疗靶点^[3]。

细胞凋亡维持细胞稳定,其分为外部途径和内部途径,外部途径由肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)与细胞表面死亡受体结合所触发^[4]。该结合促使死亡诱导信号复合物(death-inducing signaling complex, DISC)形成,进而募集并激活caspase-8,最终激活caspases-3/7,导致细胞凋亡^[5]。内在途径中应激信号导致细胞质Bcl-2相关X蛋白(BCL2-associated X protein, Bax)/Bcl-2同源拮抗剂杀手(BCL2 killer 1, BAK)聚集,形成同源二聚体^[6]。Bax/BAK复合物通过孔的形成导致线粒体膜通透,并导致细胞色素C(cytochrome c, Cyt c)释放到细胞质中形成凋亡小体^[7],最终激活半胱天冬caspases-3/7,导致细胞凋亡^[8]。TNF信号通

路中,TNF- α 通过结合TNFR1和TNFR2发挥不同作用:TNF- α 与TNFR1结合后形成TRADD复合体,触发外源性凋亡^[9];同时激活Bid/Bax等促凋亡蛋白诱导内源性凋亡^[10]。TNF- α 与TNFR2结合后主要募集TRAF家族蛋白,通过激活NF- κ B等关键信号通路,在调控细胞存活、增殖和炎症反应中发挥重要作用^[11]。Wnt信号通路分为经典和非经典通路。经典通路(Wnt/ β -catenin)通过稳定 β -catenin促进抗凋亡基因表达^[12];其抑制则增强凋亡敏感性^[13]。非经典通路(Wnt/PCP和Wnt/ Ca^{2+})主要调控细胞迁移和凋亡^[14-15]。

而大量文章报道,TNF信号通路既可通过促进Wnt/ β -catenin信号通路促进细胞的恶性转化^[16-18],又可通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路抑制细胞增殖促进细胞凋亡,抑制细胞恶性转化^[19-21]。即TNF信号通路与Wnt/ β -catenin信号通路通过协同或拮抗作用促进或抑制细胞的恶性转化。

OVCA1和OVCA2是在多种肿瘤中发现的定位在17p13.3的肿瘤抑制位点,在人体中广泛表达,分别编码443个和227个氨基酸的蛋白质,虽然同属相同肿瘤抑制位点,但在基因结构方面差异显著。OVCA2转录本包含一个独特的外显子,而OVCA1有转录本的3'-UTR,因而没有共享编码序列。研究表明,这两个基因的表达量降低有助于肿瘤的发生,

OVCA1和OVCA2被作为候选的肿瘤抑制基因且都隶属丝氨酸水解酶(serine hydrolase, SH)家族^[22]。目前,针对OVCA1在肿瘤中的作用及调控机制,已有大量研究报道,而OVCA2的研究诸多关键层面存在大量空白,OVCA2在细胞生长和凋亡过程中扮演着重要角色。OVCA2能够抑制细胞的生长及促进细胞凋亡,这一特性使其在肿瘤抑制方面展现出独特的作用,为抑制癌细胞的生长和扩散提供了重要的生物学机制^[23]。同时,OVCA2被纳入人类线粒体高可信度蛋白质组“MitoCoP”中^[24],被验证定位于线粒体中,可能在调控线粒体相关的功能扰乱肿瘤演变过程中发挥着重要的作用,但其具体影响和调控机制尚不明确。因此,本文旨在通过构建OVCA2过表达及敲低模型,深入探究OVCA2在线粒体功能影响及在胰腺癌发生发展中的作用及相关调控机制,为诊断和治疗提供一定依据。

1 材料和方法

1.1 生信数据库

通过HPA、UALCAN、GEPIA数据库,对OVCA2在多种癌症中的表达进行分析,比较OVCA2高表达水平和低表达水平对癌症患者预后结果的影响,探究OVCA2表达与癌症患者预后的关系。

1.2 细胞系及其培养

人类PDAC细胞AsPC-1、MIA PaCa-2和人胚肾细胞293T由温州医科大学提供。所有细胞培养于含10%胎牛血清培养基中,使用脂质体3000转染试剂构建过表达及敲低细胞模型。过表达组包括了空载体转染对照组(vector group, Vector)和目的基因过表达组(overexpression group, OE);敲低组包括了OVCA2对照组(control group, Ctrl)以及两个特异性shRNA转染的基因敲低组(knockdown group, KD1/KD2)

1.3 蛋白质免疫印迹(Western blot, WB)

收集细胞沉淀,用含PMSF的RIPA裂解液裂解细胞,4℃、14 000 ×g离心10 min,留上清为细胞蛋白。BCA测量蛋白浓度,电泳,转膜。室温下用含5%奶粉的封闭液封闭1~2 h、4℃一抗孵育16~18 h(所有抗体均为1:1 000);TBST洗涤、二抗37℃孵育2 h(所有抗体为1:2 000)、TBST洗涤后,显影。OVCA2(14943-1-AP)、β-actin(66009-1-Ig)、Bax(60267-1-Ig)、cleaved-caspase-3(66470)抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司;线粒体超级复合体抗体来购于英国Abcam公司;TNF-α(TSC52746)、Bcl-

2(sc-7382)、HSP60(sc-376261)购于美国Santa Cruz公司;Cyt c(710629)购于美国ThermoFisher Scientific公司;β-catenin(AWA11933)购于长沙艾碧维生物科技有限公司;Wnt(89780)购于武汉爱博泰克生物科技有限公司;其余抗体均来自美国Cell Signaling Technology公司。

1.4 流式细胞计数及集落形成

细胞长至60%~70%,使用胰蛋白酶37℃消化3 min。常温500 ×g离心3 min后,留沉淀。加入2 mL PBS,计数,使用无糖无谷培养基将葡萄糖粉末和谷氨酰胺粉末按照分子质量配制为5 mmol/L葡萄糖、4 mmol/L谷氨酰胺(正常培养基浓度)培养基,以3×10⁴个/孔细胞密度进行铺板,连续计数5天,统计分析;集落形成实验按照每孔1×10³个的细胞密度接种于6孔板中,14天后,拍照分析。

1.5 细胞凋亡周期

细胞凋亡:细胞饥饿6~8 h,37℃、500 ×g离心3 min收集上清及细胞,AnnexinV-APC和AAD室温避光染色5 min,流式上机。细胞周期:细胞长至60%~70%,胰蛋白酶37℃消化3 min,37℃、500 ×g离心3 min,收集1×10⁶个细胞,加入500 μL DNA染色液及5 μL通透溶液,室温避光孵育30 min,流式细胞仪检测。

1.6 免疫荧光染色(immunofluorescence, IF)

24孔板中放入细胞爬片,按照2×10⁴个/孔的细胞密度进行铺板,待其长至70%,Hanks缓冲液洗涤细胞,4%多聚甲醛避光室温固定15 min,洗涤,Triton X-100室温避光孵育15 min,室温下用5%奶粉配制的封闭液封闭1~2 h,4℃一抗孵育16~18 h,室温二抗孵育2 h,玻片滴加抗荧光淬灭封片液(含DAPI),激光共聚焦显微镜拍照。

1.7 线粒体亚定位实验

收集4个10 cm培养皿的细胞,室温下500 ×g离心3 min后留沉淀,提取线粒体。分四份分别加入蛋白酶K、TritonX-100、蛋白酶K及TritonX-100、不加入任何试剂;再加入PMSF,BCA法测量蛋白浓度,95℃金属浴变性,Western blot检测。

1.8 耗氧率测定

打开Oxygraph-2k仪器,洗仓,向仓内加入2.5 mL平衡液,待检测仓内氧气消耗曲线(红色)的平衡在数值为0左右,仓内氧气含量曲线(蓝色)平衡在200左右达到仪器平衡,收集细胞,仓内吸取平衡液重悬

细胞, 细胞悬液加入仓内, 对相应数值进行标记。洗仓, ddH₂O清洗3次, 75%乙醇清洗3次, 无水乙醇清洗15 min, 最后仓内加满75%乙醇, 关闭仪器。

1.9 三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)测定

利用稳定转染构建过表达组以及瞬时转染构建基因敲低组[瞬转敲低组包括: 对照组(control group, Ctrl)和两个SiRNA敲低组(small interfering rna-knockdown group, Si-1/Si-2), 收集细胞沉淀, 加入200 μ L PBS重悬, 各管均加入ATP释放液、ddH₂O, 样品管加细胞悬液, 空白管加入PBS; 标准品管加ATP标准品。4 $^{\circ}$ C、10 000 $\times$ g离心1 min, 留上清, 避光处加入ATP工作液, 加入96孔白板上, 酶标仪选择自发荧光进行检测, 使用BCA校正。

1.10 实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)实验

Trizol法提取细胞RNA, 用逆转录试剂盒HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper, Vazyme)逆转录成cDNA后, 以cDNA为模板, β -actin为内参, 检测相应基因的相对表达量。qPCR程序为: 95 $^{\circ}$ C预变性30 s; 95 $^{\circ}$ C变性10 s, 60 $^{\circ}$ C退火/延伸30 s, 40个循环, 按照2^{- $\Delta\Delta$ Ct}相对定量方法计算OVCA2的相对表达水平。

1.11 非变性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳(blue native page, BNG)

收集细胞沉淀, 利用洋地黄皂苷(#300410, Sigma公司)或者十二烷基-D-麦芽糖苷(A610424-0001, 生工生物工程股份有限公司)提取蛋白, BCA测定蛋白浓度, 利用蠕动泵配制按照自下而上的浓度配制由低到高的非变性胶, 电泳外槽注入阳极液, 内槽注入阴极液。全程需要在冰上完成。电泳条件为: 45 V、50 min; 完成后, 程序换为180 V、110 min; 完成后按照前文蛋白质免疫印迹步骤转膜。

1.12 活性氧(reactive oxygen species, ROS)测定

收集细胞沉淀, 基础培养基DMEM预热37 $^{\circ}$ C, 加入500 μ L重悬, 常温500 $\times$ g离心3 min弃上清, 保留细胞沉淀, 加入MitoSOX工作液重悬细胞, 置于37 $^{\circ}$ C细胞孵箱中, 避光孵育10 min。HBSS(37 $^{\circ}$ C预热)洗3次。100 μ L HBSS重悬, 流式上机检测。

1.13 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸/还原型(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate⁺/restore form, NADP⁺/NADPH)检测

收集细胞沉淀, 加入提取液, 常温500 $\times$ g离心3 min留上清, 分为两份。一份金属浴加热60 $^{\circ}$ C、

30 min, 为样品中NADPH浓度, 另一份直接检测, 为NADPH总量浓度, 37 $^{\circ}$ C避光孵育20 min。酶标仪检测波长在450 nm处的吸光度(D)值, 使用BCA校正。

1.14 免疫共沉淀测序(co-immunoprecipitation sequencing, CoIP-Seq)

收集细胞沉淀, 加入细胞裂解液, 常温500 $\times$ g离心3 min取上清。TBS清洗磁珠3次, 保留部分上清做对照, 剩余均分两份分别加入IgG和V5磁珠, 4 $^{\circ}$ C翻转混合仪孵育过夜, 弃上清, 加入TBS洗3次加入80 μ L的1 $\times$ 上样缓冲液, 95 $^{\circ}$ C金属浴变性, 后续按照按照蛋白质免疫印迹步骤完成。

1.15 统计学方法

数据均采用GraphPad Prism进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM)表示; 两独立样本统计学结果采用独立样本t检验比较; 多组样本的统计学结果采用单因素方差分析比较。P<0.05表示差异具有统计学意义。

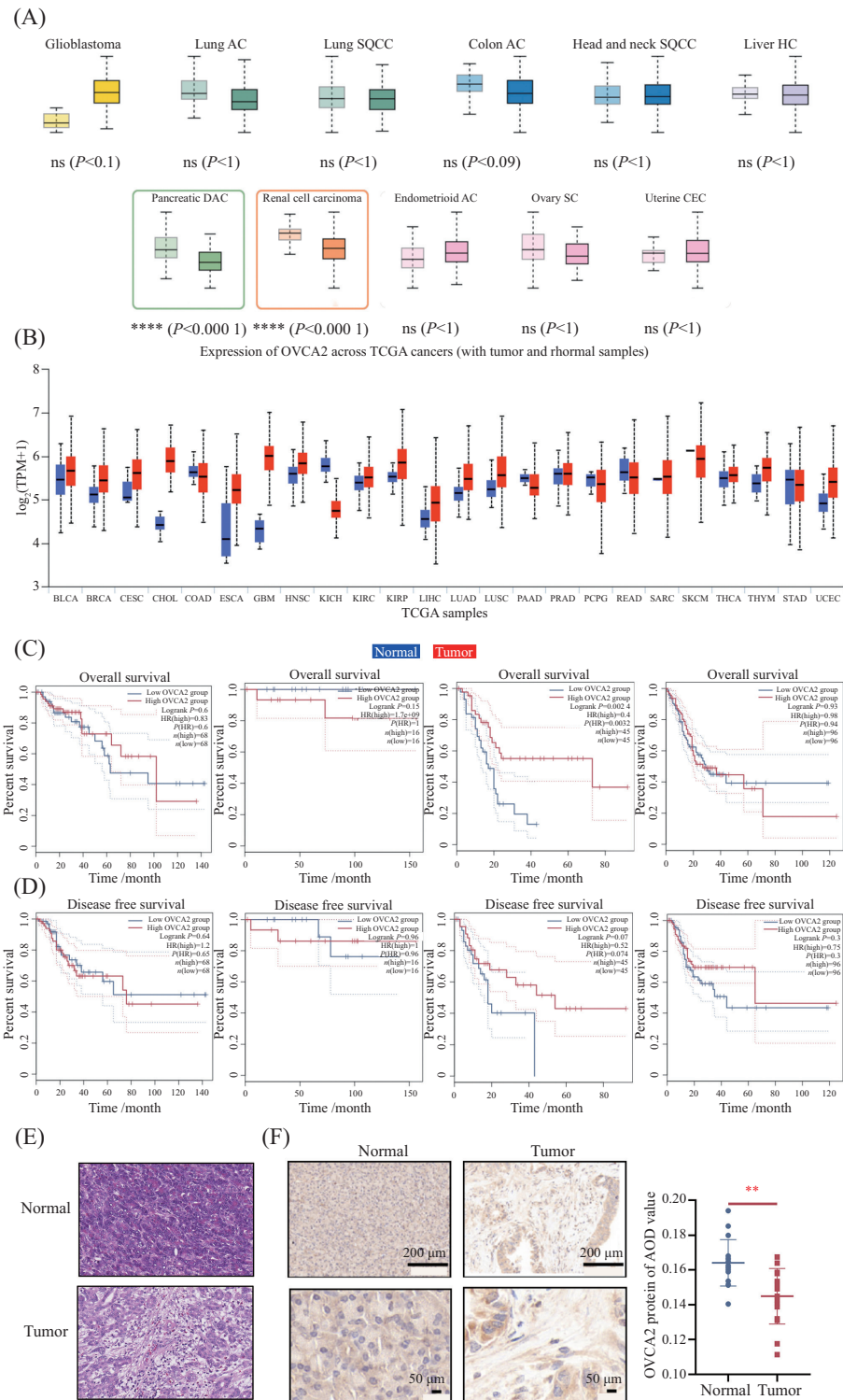
2 结果

2.1 OVCA2在胰腺癌中低表达与预后相关

OVCA2对于肿瘤的功能作用仍不明确, 对其进行分析, HPA数据库显示, 与正常胰腺组织比较, OVCA2-mRNA在胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)和肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)中的表达量显著降低, UALCAN数据库显示OVCA2-mRNA在结肠腺癌(colon adenocarcinoma, COAD)、肾嫌色细胞癌(kidney chromophobe, KICH)、胰腺癌(pancreatic adenocarcinoma, PAAD)及胃癌(stomach adenocarcinoma, STAD)中表达量呈现降低趋势(图1A和图1B), GEPIA数据库显示, OVCA2 mRNA水平只与PAAD生存率密切相关(图1C和图1D), 具有较高OVCA2 mRNA水平的患者生存率相比较低OVCA2 mRNA水平的患者更高, 同时, HPA数据库显示, PDAC患者的癌组织染色强度低于正常胰腺组织(图1E), 免疫组化进一步验证OVCA2在胰腺癌组织中低表达(图1F)。综上所述, 我们认为OVCA2在胰腺癌中低表达且低表达与不良预后相关。

2.2 OVCA2抑制胰腺癌增殖、促进胰腺癌凋亡

为了明确OVCA2对胰腺癌的影响, 利用胰腺癌细胞系(MIA PaCa-2和ASPC-1)进行了一系列体外实

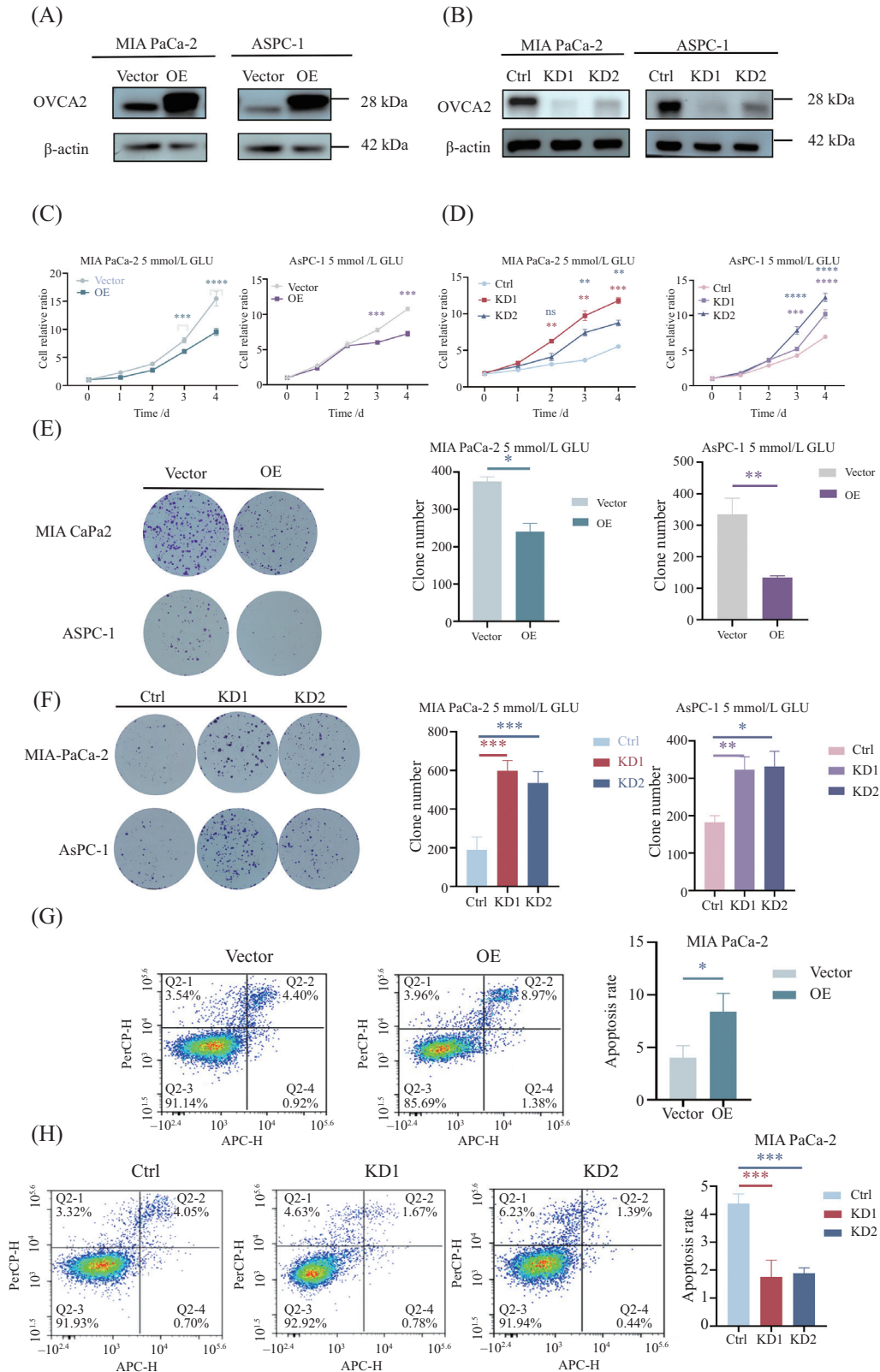


A, B: HPA, UALCAN数据库生成OVCA2在肿瘤中表达图(图1A中浅色Normal组, 深色为Tumor组; 图1B中蓝色为Normal组, 红色为Tumor组); C, D: GEPIA数据库生成OVCA2具有表达差异的总生存期图、疾病自由生存期图; E: HPA数据库显示OVCA2在肿瘤组织及正常肿瘤旁组织中的染色; F: 肿瘤旁组织($n=16$)或肿瘤组织($n=16$)免疫组化及分析图。^{ns} $P > 0.05$; ^{**} $P < 0.01$; ^{****} $P < 0.0001$ 。

A, B: expression in tumors based on HPA and UALCAN databases (light color represents the Normal group while dark color indicates the tumor group in figure 1A, blue bars denote the normal group and red bars represent the tumor group in figure 1B); C, D: survival analysis of OVCA2 expression using GEPIA, including overall survival and disease-free survival curves; E: OVCA2 staining in tumor tissues and adjacent normal tissues shown by the HPA database; F: immunohistochemical analysis and quantification of OVCA2 expression in tumor-adjacent tissues ($n=16$) and tumor tissues ($n=16$).
^{ns} $P > 0.05$; ^{**} $P < 0.01$; ^{****} $P < 0.0001$ 。

图1 OVCA2在胰腺癌中表达下调并与不良预后相关

Fig.1 OVCA2 is underexpressed in pancreatic cancer and correlates with bad prognosis

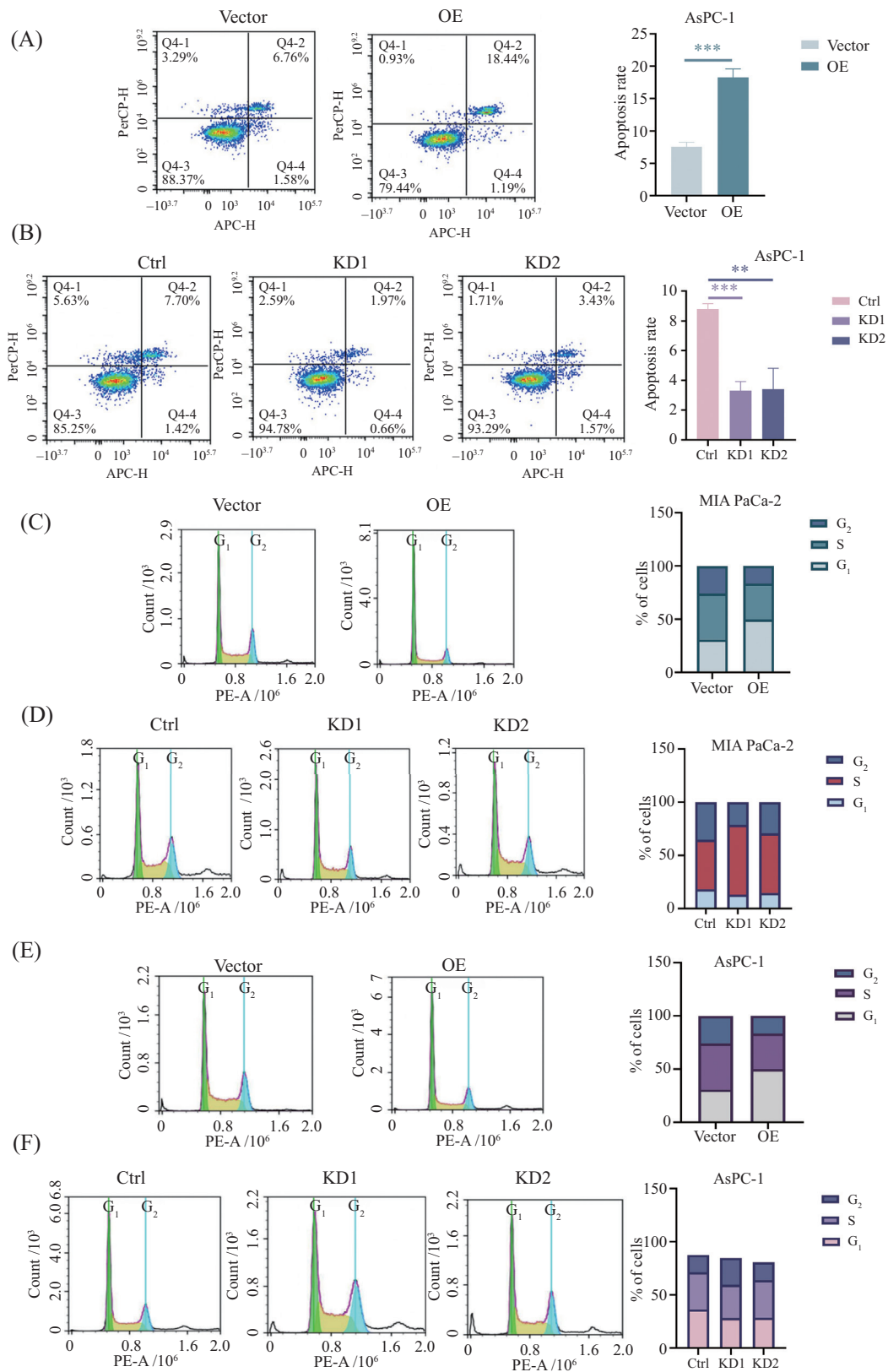


A, B: MIA PaCa-2过表达、敲低模型蛋白水平; C~F: MIA PaCa-2过表达、敲低细胞在5 mmol/L葡萄糖培养条件下获得的细胞计数结果(C、D)与细胞克隆结果(E、F); G、H: MIA PaCa-2过表达、敲低细胞凋亡结果。n $\geq$ 3; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.000 1; nsP>0.05。

A,B: protein levels in MIA PaCa-2 OVCA2-OE and -KD models; C-F: cell counting (C,D) and colony formation results (E,F) under 5 mmol/L glucose culture conditions for OVCA2-OE and -KD in MIA PaCa-2 cells; G,H: apoptosis analysis of OVCA2-OE and -KD cells. n $\geq$ 3; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.000 1; nsP>0.05.

图2 OVCA2抑制胰腺癌增殖、促进胰腺癌凋亡

Fig.2 OVCA2 inhibits pancreatic cancer proliferation and promotes apoptosis

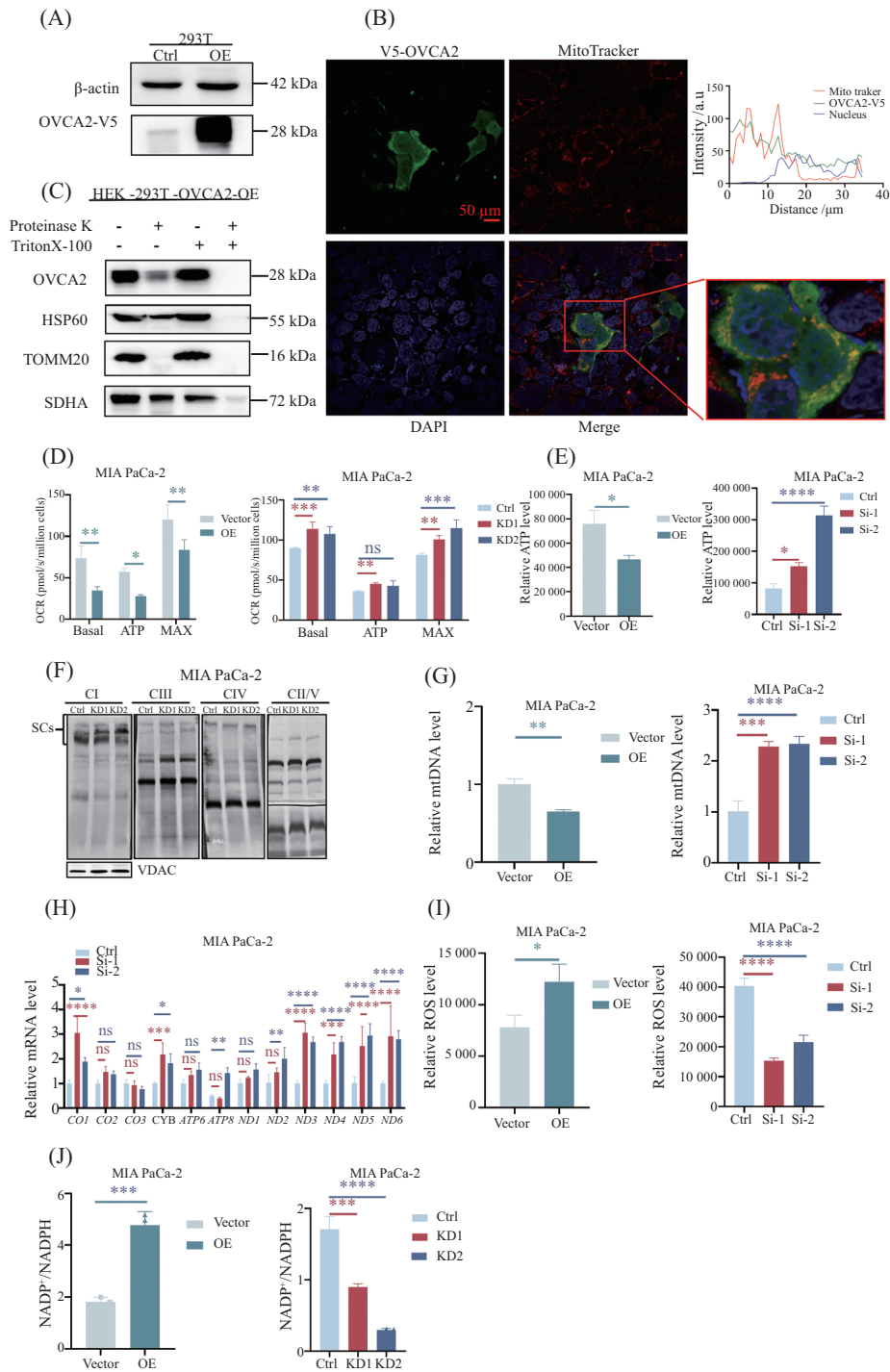


A、B: AsPC-1 OE、KD细胞凋亡结果。C~F: MIA PaCa-2、AsPC-1 OE、KD细胞的细胞周期结果。n≥3; **P<0.01; ***P<0.001。

A,B: apoptosis results of AsPC-1 OE and KD cells. C-F: cell cycle results of MIA PaCa-2 and AsPC-1 OE/KD cells. n≥3; **P<0.01; ***P<0.001.

图3 OVCA2不影响细胞周期

Fig.3 OVCA2 does not affect cell cycle



A: 293T OVCA2过表达细胞模型验证; B: OVCA2在293T细胞中的免疫荧光共定位分析结果; C: 蛋白酶K和TritonX-100处理后WB定位分析HSP60、TOM20、SDHA蛋白分别为线粒体基质、线粒体外膜、线粒体内膜的参考蛋白水平; D: 氧气消耗率; Basal: 只有内源底物的基础呼吸; ATP: 存在ATP合成酶抑制剂oligomycin的情况下的呼吸; MAX: 存在解偶联剂FCCP(5 μmol/L)的情况下的呼吸; E: 相对ATP水平; F: 超级复合体水平; G: 相对mtDNA水平; H: 相对mRNA水平; I: 相对ROS水平; J: 相对NADP⁺/NADPH水平。n≥3; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001; nsP>0.05。

A: validation of 293T OVCA2-OE model; B: immunofluorescence co-localization analysis of OVCA2 in 293T cells; C: WB analysis after proteinase K and TritonX-100 treatment, with HSP60, TOM20, and SDHA serving as markers for mitochondrial matrix, outer membrane, and inner membrane, respectively; D: oxygen consumption rate; Basal: only basal respiration of endogenous substrates; ATP: respiration in the presence of oligomycin, an ATP synthase inhibitor; MAX: respiration in the presence of uncoupling agent FCCP (5 μmol/L); E: relative ATP levels; F: supercomplex levels in KD cells; G: relative mtDNA levels; H: relative mRNA levels in KD cells; I: relative ROS levels; J: relative NADP⁺/NADPH levels. n≥3; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001; nsP>0.05.

图4 OVCA2抑制线粒体功能
Fig.4 OVCA2 inhibits mitochondrial function

验(图2A和图2B)。通过细胞计数实验(图2C和图2D)和平板克隆实验(图2E和图2F)发现OVCA2过表达可以抑制胰腺癌细胞的增殖能力,而OVCA2敲低则获得相反结果。流式细胞仪结果显示,OVCA2过表达促进细胞凋亡(图2G和图2H,图3A和图3B),而OVCA2敲低细胞则抑制细胞凋亡。细胞周期结果显示OVCA2对细胞周期的影响无显著性差异(图3C~图3F)。

2.3 OVCA2抑制线粒体功能

通过免疫荧光共定位和WB分析发现OVCA2主要定位于线粒体外膜(图4A~图4C)。对线粒体功能检测,通过OCR发现OVCA2过表达抑制胰腺癌细胞的氧呼吸能力,OVCA2敲低则得到相反结果(图4D和图5A)。对ATP检测发现OVCA2过表达能够抑制PDAC细胞的ATP生成能力,而敲低则获得相反结果(图4E和图5B)。利用BNG发现OVCA2敲低提升细胞的超级复合体水平(图4F和图5C)。以上结果显示OVCA2过表达抑制OXPHOS功能,敲低则获得相反结果。mtRNA转录水平、mtDNA拷贝数的改变是改变OXPHOS功能的重要因素。利用qPCR检测,发现过表达抑制mtDNA的复制(图4G和图5D),敲低则促进了mtDNA拷贝数的复制、mtRNA的转录(图4G、图4H、图5D和图5E)。ROS是细胞代谢中的正常产物及氧化还原的信使,参与调控凋亡相关信号通路和癌症发生发展中的关键信号转导,对ROS含量进行检测,发现OVCA2蛋白过表达促进细胞内ROS蓄积量,而OVCA2敲低则获得相反结果(图4I和图5F)。NADP⁺/NADPH水平检测发现OVCA2过表达降低细胞的NADP⁺/NADPH的值,而OVCA2敲低则获得相反结果(图4J和图5G)。综上所述,OVCA2通过抑制细胞的氧化磷酸化功能抑制线粒体功能。

2.4 OVCA2过表达上调TNF信号通路

研究细胞内蛋白与目标蛋白OVCA2间的相互作用。对OVCA2进行免疫沉淀后进行质谱分析,对捕获蛋白进行差异分析(图6A),火山图展示了与OVCA2结合的差异表达蛋白,包括显著上调和下调的蛋白(图6B)。为了寻找这些差异蛋白引起的功能改变及寻找信号通路进行富集分析,上调通路富集到以TNF等为主的信号通路,而下调通路富集到以DNA修复等为主的信号通路(图6C)。而TNF信号通路能够诱发炎症及细胞凋亡,结合OVCA2诱导细胞凋亡,对TNF信号通路中的凋亡蛋白进行分析,发现TNF信号通路中以DNM1L为代表的一系列与促凋

亡相关蛋白表达水平增加(图6D),以GSK3B为代表的一系列与抑制凋亡相关的蛋白表达水平降低(图6E),Wnt/ β -catenin信号通路中以TNK为代表的一系列促进Wnt/ β -catenin通路的蛋白表达水平降低(图6F),以MDK为代表的一系列抑制Wnt/ β -catenin信号通路蛋白表达水平增加(图6G)。

2.5 OVCA2敲低下调TNF信号通路

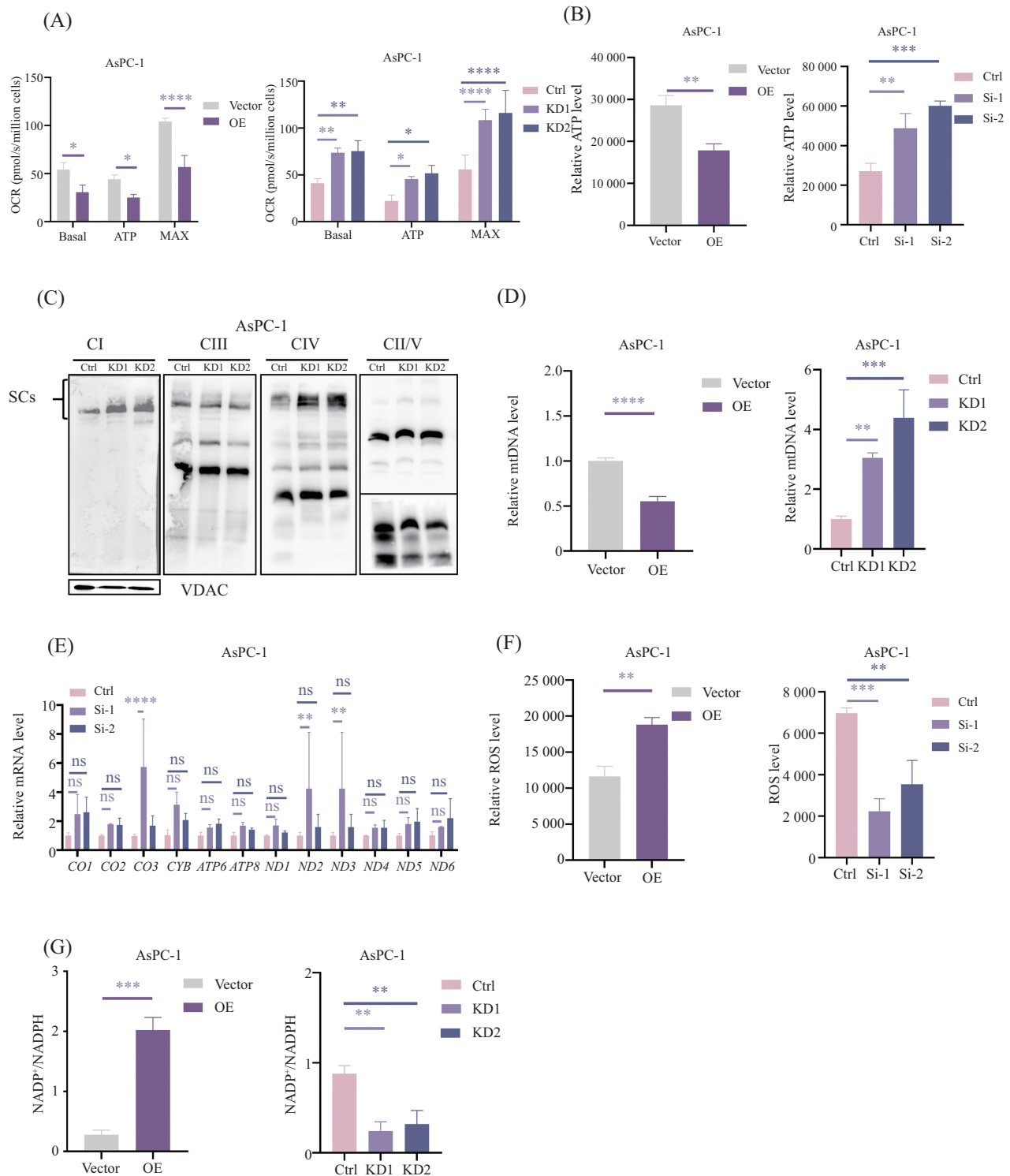
为了明确OVCA2基因如何调控细胞行为,基因表达谱显示OVCA2敲低后细胞主成分发生改变(图7A),火山图显示两敲低组与对照组的差异基因(differential expression genes, DEGs, 图7B)。取两敲低组差异基因交集获得共同差异基因(图7C),正如预期的那样,mRNA水平显示与之前qPCR结果保持一致性(图7D)。OVCA2 KEGG富集分析发现OVCA2敲低后富集到的上调信号通路是以MAPK等为主的信号通路(图7E),OVCA2敲低富集到的下调信号通路是以TNF等为主的信号通路(图7F),对敲低组TNF信号通路基因进行分析,发现OVCA2敲低后,胰腺癌细胞内促凋亡相关基因水平显著下降(图7G)。

2.6 OVCA2促进TNF信号通路介导胰腺癌细胞凋亡

结合OVCA2过表达后的IP测序分析、OVCA2敲低后的转录组学分析及前期细胞凋亡结果,对凋亡通路的相关蛋白进行WB检测,发现OVCA2过表达促进凋亡通路相关蛋白Bax、cleaved-caspase-3表达水平增加,抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平下降(图8A和图8C),Wnt/ β -catenin通路蛋白表达水平下降(图8E和图8F),而OVCA2敲低细胞中凋亡通路相关蛋白Bax、cleaved-caspase-3表达水平降低,抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平增加(图8B和图8D)。综上,这表明OVCA2通过增强TNF信号通路及抑制Wnt/ β -catenin信号通路促进癌细胞凋亡。

3 讨论

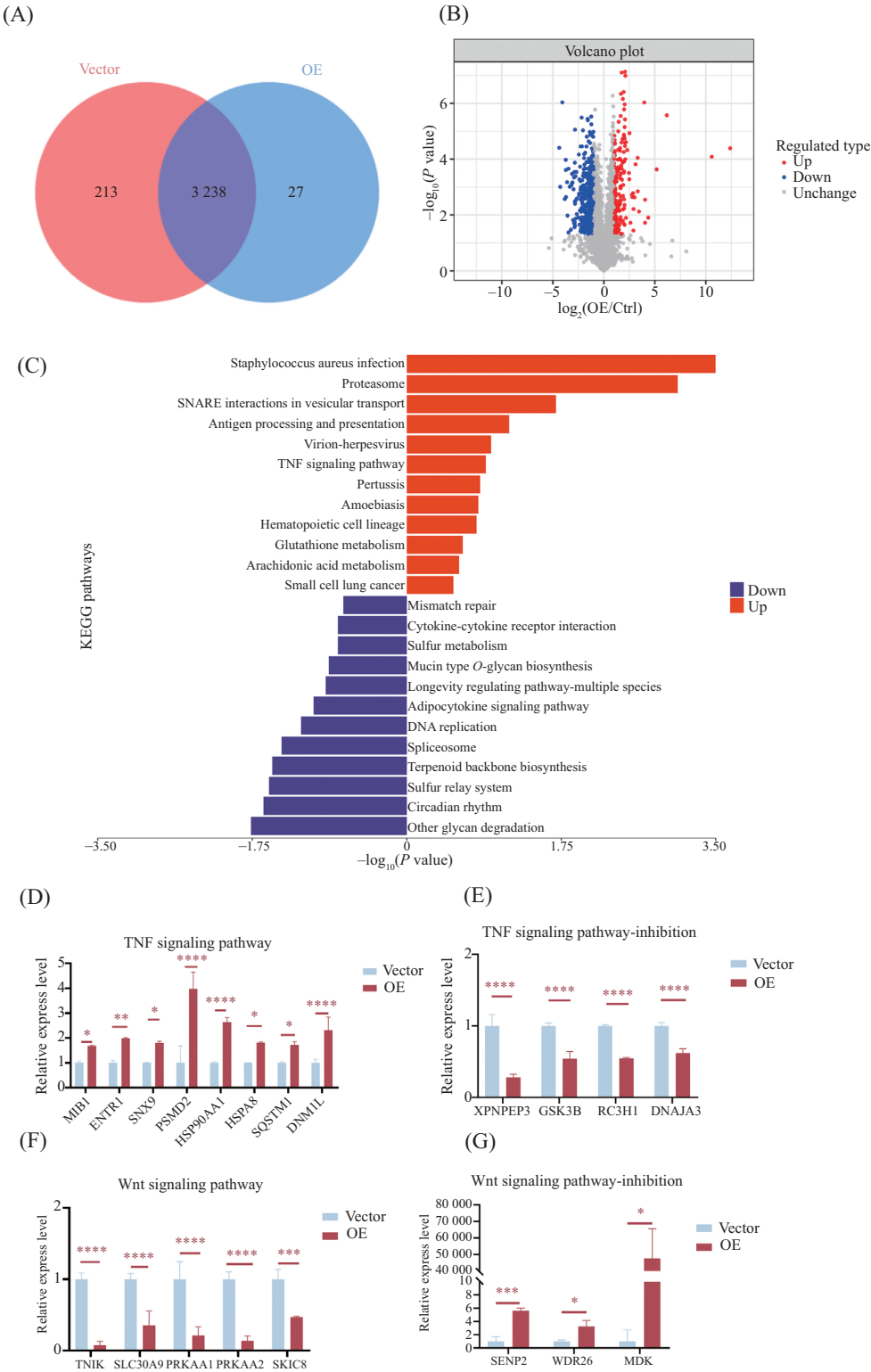
胰腺癌是最具有侵袭性的恶性肿瘤之一,预后极差^[25]。目前胰腺癌患者仍旧缺乏有效的治疗方法。在本研究中,对定位于线粒体外膜的蛋白OVCA2进行全面研究,以揭示其功能及其在胰腺癌细胞发生发展中的作用。线粒体通过OXPHOS促进癌症进展:OXPHOS代谢促进癌细胞的永生^[26],氧化抑制因子的缺失促进胰腺癌的氧化磷酸化,从而促进胰腺癌的转移^[27]。综上,线粒体OXPHOS及代谢对于癌细



A: 氧气消耗率。Basal: 只有内源底物的基础呼吸; ATP: 存在ATP合成酶抑制剂oligomycin的情况下的呼吸; MAX: 存在解偶联剂FCCP(5 μ mol/L)的情况下的呼吸。B: 相对ATP水平。C: 超级复合体水平。D: 相对mtDNA水平。E: 相对mRNA水平。F: 相对ROS水平。G: 相对NADP⁺/NADPH水平。 $n \geq 3$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$; ns $P > 0.05$ 。

A: oxygen consumption rate. Basal: only basal respiration of endogenous substrates; ATP: respiration in the presence of oligomycin, an ATP synthase inhibitor; MAX: respiration in the presence of uncoupling agent FCCP (5 μ mol/L). B: relative ATP levels. C: supercomplex levels in KD cells. D: relative mtDNA levels. E: relative mRNA levels in KD cells. F: relative ROS levels. G: relative NADP⁺/NADPH levels. $n \geq 3$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$; ns $P > 0.05$.

图5 OVCA2抑制线粒体功能
Fig.5 OVCA2 inhibits mitochondrial function

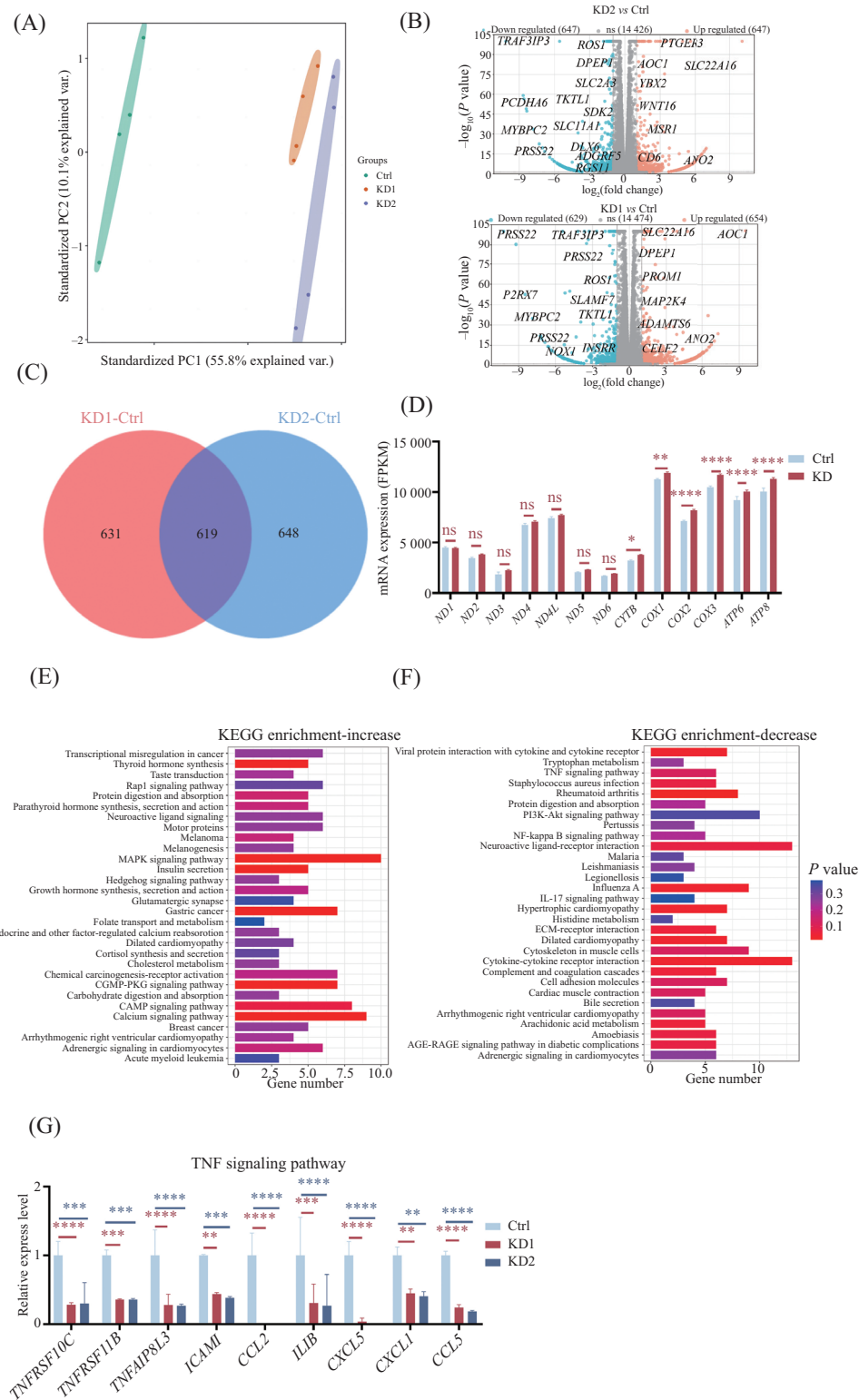


A: 对照组、过表达组蛋白交集; B: 火山图显示对照组、过表达组交集结果中的差异表达蛋白; C: 差异表达蛋白交集上调、下调富集分析; D: TNF 信号通路上调蛋白的相对表达水平; E: 抑制TNF信号通路下调蛋白的相对表达水平; F: Wnt/ β -catenin信号通路下调蛋白; G: 抑制Wnt/ β -catenin信号通路上调蛋白。 $n \geq 3$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。

A: overlap of proteins in control and OVCA2-OE groups; B: Volcano plot of differentially expressed proteins; C: enrichment analysis of upregulated and downregulated proteins; D,E: relative protein levels in the TNF signaling pathway: upregulated proteins (D) and downregulated TNF signaling pathway inhibitory proteins (E); F,G: relative protein levels in the Wnt/ β -catenin signaling pathway: downregulated proteins (F) and upregulated Wnt/ β -catenin signaling pathway inhibitory proteins (G). $n \geq 3$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。

图6 OVCA2过表达上调TNF信号通路

Fig.6 OVCA2 overexpression upregulates the TNF signaling pathway

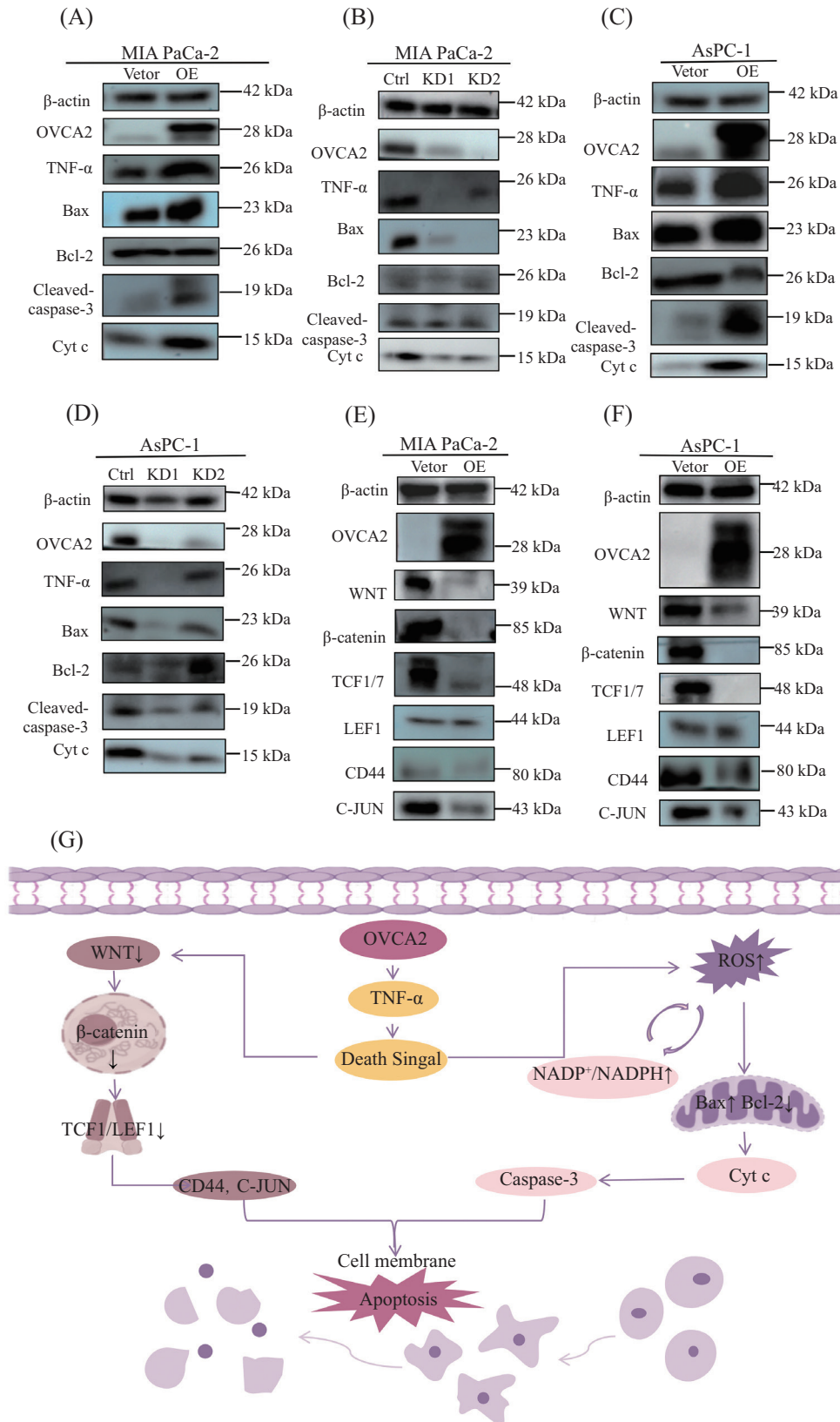


A: 主成分分析敲低和对照细胞主成分比较; B: 火山图结果敲低和对照细胞基因表达谱结果中的差异表达基因(DEGs); C: 两敲低组差异表基因交集; D: 相对mRNA水平表达分析; E: 差异表达基因交集上调基因集富集分析(GSEA); F: 差异表达基因交集下调基因集富集分析(GSEA); G: TNF信号通路基因表达相对水平。 $n \geq 3$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$; ns $P > 0.05$ 。

A: principal component analysis comparing KD and control cells; B: volcano plot of differentially expressed genes (DEGs) in KD and control cells; C: intersection of DEGs from two KD groups; D: relative mRNA expression levels; E,F: GSEA of upregulated (E) and downregulated (F) gene sets; G: relative expression levels of genes in the TNF signaling pathway. $n \geq 3$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$; ns $P > 0.05$.

图7 OVCA2敲低下调TNF信号通路

Fig.7 OVCA2 knockdown downregulates the TNF signaling pathway



A、B: MIA PaCa-2过表达、敲低细胞TNF介导的凋亡通路WB结果; C、D: AsPC-1过表达及敲低细胞TNF介导的凋亡通路WB结果; E、F: MIA PaCa-2、AsPC-1过表达细胞Wnt/ β -catenin通路WB结果; G: OVCA2机制图。

A-D: Western blot results of TNF-mediated apoptosis pathways in OVCA2-OE and -KD MIA PaCa-2 (A,B) and AsPC-1 (C,D) cells; E,F: Western blot results of Wnt/ β -catenin signaling pathway in OVCA2-OE MIA PaCa-2 (E) and AsPC-1 (F) cells. G: the figure of OVCA2 mechanism.

图8 OVCA2促进TNF信号通路介导凋亡

Fig.8 OVCA2 promotes TNF signaling-mediated apoptosis

胞的生存及发展中发挥重要作用,而OVCA2通过抑制线粒体OXPHOS功能而抑制胰腺癌的发展。

ROS是生物系统必不可少的分子,ROS与抗氧化系统动态平衡,维持细胞功能,而氧化还原稳态失衡与各种人类疾病有关^[28]。有研究表明,活性氧生成增加激活致癌信号,显著增强肿瘤细胞的存活能力、增殖潜能并导致DNA损伤和遗传不稳定性^[29]。低浓度ROS可以通过增强Akt/mTOR信号通路^[30],上调细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase 2, CDK2)的表达^[31]、诱导肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)的极化^[32]等促进细胞增殖并诱导正常细胞恶性转化。然而,ROS的过度累积能够引起DNA的突变和线粒体的损伤导致细胞代谢出现问题,并产生更多的ROS,形成恶性循环,最终导致氧化应激诱导的细胞凋亡和坏死,促进抗肿瘤信号转导^[33],而相关的信号通路和NAD⁺等诱导ROS大量积累触发泛凋亡^[34],而ROS被清除后,细胞的死亡被抑制,这也是肿瘤耐药机制之一^[35]。在胰腺癌细胞中,OVCA2敲低调控TNF- α 产生低浓度ROS水平时,NADP⁺/NADPH的值显著降低,帮助细胞抵抗氧化损伤,增强线粒体功能,抑制凋亡蛋白的产生,促进肿瘤细胞的存活从而促进细胞增殖并诱导正常细胞恶性转化;OVCA2过表达调控TNF- α 产生高浓度ROS水平时,NADP⁺/NADPH的值也显著增加,从而导致细胞氧化损伤,抑制线粒体功能,加快ROS的生成,促进ROS蓄积,从而促进凋亡蛋白的表达,诱导细胞凋亡。我们推测OVCA2在胰腺癌中抑制癌细胞存活的具体机制为在线粒体内:OVCA2蛋白激活细胞死亡信号后促进TNF- α 与TNFR1的结合,诱导ROS爆发和NADPH耗竭,而NADPH是抗氧化系统(如谷胱甘肽还原酶)的关键供氢体,其耗竭代表ROS清除能力减弱;ROS通过氧化修饰和信号转导影响Bcl-2家族蛋白的平衡,激活Bax并抑制Bcl-2,打破线粒体稳态;Bax寡聚化释放Cyt c激活caspase级联反应,最终驱动细胞凋亡。在细胞核内OVCA2抑制Wnt/ β -catenin信号通路中的Wnt, Wnt抑制 β -catenin发生核转移,降低其稳定性,抑制 β -catenin与TCF/LEF相互作用,抑制 β -catenin与TCF/LEF形成特定转录调控复合物,从而抑制一系列与细胞增殖、存活等相关靶基因的表达,如C-JUN、CD44等。最终,OVCA2通过协同调控TNF信号通路、线粒体功能、ROS生成、Bax/Bcl-2平衡、caspase级联反应以

及Wnt/ β -catenin信号通路,促进肿瘤细胞凋亡并抑制其生长,进而抑制肿瘤的进一步发展(图8G)。

胰腺癌抑癌基因目前主要发现了TP53、CDKN2A、SMAD4。CDKN2A抑制细胞周期进程发挥肿瘤抑制功能^[36];P53通过调节细胞分裂作为肿瘤抑制因子,TP53突变丧失肿瘤抑制功能,促进肿瘤进展^[37];SMAD4作为TGF- β 信号转导通路中的关键蛋白,参与经典的TGF- β /SMAD信号通路,通过诱导细胞周期阻滞和凋亡或者调节TGF- β 诱导的上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)状态等方式干扰肿瘤的发展^[38]。而我们的研究表明,作为一个有潜力的抑癌基因,OVCA2通过抑制线粒体OXPHOS功能诱导ROS爆发,促进肿瘤细胞的凋亡最终抑制胰腺癌进展。针对抑癌基因设计的治疗药物、特异性分子信号为预测患者的预后提供了希望,更深入的临床研究将支持更精确、更有效的治疗策略开发。

参考文献 (References)

- [1] CAI J, CHEN H, LU M, et al. Advances in the epidemiology of pancreatic cancer: trends, risk factors, screening, and prognosis [J]. Cancer Lett, 2021, 520: 1-11.
- [2] KONIG T, MCBRIDE H M. Mitochondrial-derived vesicles in metabolism, disease, and aging [J]. Cell Metab, 2024, 36(1): 21-35.
- [3] ROTH K G, MAMBETSARIEV I, KULKARNI P, et al. The mitochondrion as an emerging therapeutic target in cancer [J]. Trends Mol Med, 2020, 26(1): 119-34.
- [4] MA N, CHENG K, FENG Q, et al. Nanoscale organization of TRAIL trimers using DNA origami to promote clustering of death receptor and cancer cell apoptosis. [J]. Small, 2023, 19(23): e2206160.
- [5] HE Y, YANG T, LI J, et al. Identification of a marine-derived sesquiterpenoid, compound-8, that inhibits tumour necrosis factor-induced cell death by blocking complex II assembly [J]. Br J Pharmacol, 2024, 181(15): 2443-58.
- [6] DE AMORIM Í S S, PINHEIRO D, DA SILVA OLIVEIRA M, et al. APX2009 sensitizes hypoxic breast cancer cells to doxorubicin by increasing its accumulation and caspase-3/7-mediated apoptosis [J]. Breast Cancer Res Treat, 2025, 209(3): 533-40.
- [7] DADSENA S, CUEVAS ARENAS R, VIEIRA G, et al. Lipid unsaturation promotes BAX and BAK pore activity during apoptosis [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 4700.
- [8] ZHOU Z, ARROUM T, LUO X, et al. Diverse functions of cytochrome c in cell death and disease [J]. Cell Death Differ, 2024, 31(4): 387-404.
- [9] WANG Q, QIN B, YU H, et al. Dingxian pill alleviates hippocampal neuronal apoptosis in epileptic mice through TNF- α /TNFR1 signaling pathway inhibition [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 334: 118579.

- [10] BO L, YING L, RONG W, et al. MiR-29c Inhibits TNF- α -induced ROS production and apoptosis in mouse hippocampal HT22 cell line [J]. *Neurochem Res*, 2022, 48(2): 519-36.
- [11] VANAMEE ÉS, FAUSTMAN DL. TNFR2: a novel target for cancer immunotherapy [J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23(11): 1037-46.
- [12] QINMEI M, JIALIN Y, XU Z, et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway-a versatile player in apoptosis and autophagy [J]. *Biochimie*, 2023, 211: 57-67.
- [13] ZHANG Y, WANG X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 165.
- [14] BARROW J R. Wnt/PCP signaling: a veritable polar star in establishing patterns of polarity in embryonic tissues [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2006, 17(2): 185-93.
- [15] DE A. Wnt/ Ca^{2+} signaling pathway: a brief overview [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2011, 43(10): 745-56.
- [16] ZHAO X, MA L, DAI L, et al. TNF α promotes the malignant transformation of intestinal stem cells through the NF κ B and Wnt/ β catenin signaling pathways [J]. *Oncol Rep*, 2020, 44(2): 577-88.
- [17] ZHAO X, MA B, ZHU H, et al. PI3K/Akt and Wnt/ β -catenin signaling cross-regulate NF- κ B signaling in TNF- α -induced human Lgr5 $^{+}$ intestinal stem cells [J]. *Anticancer Res*, 2022, 42(7): 3325-40.
- [18] XIAO SQ, CHENG M, WANG L, et al. The role of apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. *Int Orthop*, 2023, 47(8): 1895-919.
- [19] YAN R, ZHU H, HUANG P, et al. Liquidambaric acid inhibits Wnt/ β -catenin signaling and colon cancer via targeting TNF receptor-associated factor 2 [J]. *Cell Rep*, 2022, 38(5): 110319.
- [20] WANG Z, LIU X, CHEN W, et al. Scutellarin suppressed proliferation and induced apoptosis in gastric cancer via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Curr Pharm Des*, 2023, 29(5): 368-78.
- [21] MENON NA, KUMAR CD, RAMACHANDRAN P, et al. Small-molecule inhibitors of Wnt signalling in cancer therapy and their links to autophagy and apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2025, 986: 177137.
- [22] SCHULTZ DC, VANDERVEER L, BERMAN DB, et al. Identification of two candidate tumor suppressor genes on chromosome 17p13.3 [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(9): 1997-2002.
- [23] GOWSALYA R, RAVI C, NACHIAPPAN V. Human OVCA2 and its homolog FSH3-induced apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Curr Genet*, 2021, 67(4): 631-40.
- [24] MORGENSTERN M, PEIKERT C D, LÜBBERT P, et al. Quantitative high-confidence human mitochondrial proteome and its dynamics in cellular context [J]. *Cell Metab*, 2021, 33(12): 2464-83.
- [25] ZHUANG K R, CHEN C F, CHAN H Y, et al. Andrographolide suppresses the malignancy of pancreatic cancer via alleviating DNMT3B-dependent repression of tumor suppressor gene ZNF382 [J]. *Phytomedicine*, 2024, 132: 155860.
- [26] BONNAY F, VELOSO A, STEINMANN V, et al. Oxidative metabolism drives immortalization of neural stem cells during tumorigenesis [J]. *Cell*, 2020, 182(6): 1490-507.
- [27] HE D, FENG H, SUNDBERG B, et al. Methionine oxidation activates pyruvate kinase M2 to promote pancreatic cancer metastasis [J]. *Mol Cell*, 2022, 82(16): 3045-60.
- [28] GLORIEUX C, LIU S, TRACHOOTHAM D, et al. Targeting ROS in cancer: rationale and strategies [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2024, 23(8): 583-606.
- [29] ARFIN S, JHA N K, JHA S K, et al. Oxidative stress in cancer cell metabolism [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(5): 642.
- [30] DING Y, YU J, CHEN X, et al. Dose-dependent carbon-dot-induced ROS promote uveal melanoma cell tumorigenicity via activation of mTOR signaling and glutamine metabolism [J]. *Adv Sci*, 2021, 8(8): 2002404.
- [31] HEINKE L. Mitochondrial ROS drive cell cycle progression [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(9): 581.
- [32] SEONG J B, KIM B, KIM S, et al. Macrophage peroxiredoxin 5 deficiency promotes lung cancer progression via ROS-dependent M2-like polarization [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 176: 322-34.
- [33] GLORIEUX C, LIU S, TRACHOOTHAM D, HUANG P. Targeting ROS in cancer: rationale and strategies [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2024, 23(8): 583-606.
- [34] SUNDARAM B, PANDIAN N, KIM H J, et al. NLRC5 senses NAD^{+} depletion, forming a PANoptosome and driving PANoptosis and inflammation [J]. *Cell*, 2024, 187(15): 4061-77.
- [35] PAN Y, LIU S, SHU G, et al. STX17-DT facilitates axitinib resistance in renal cell carcinoma by inhibiting mitochondrial ROS accumulation and ferroptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16(1): 125.
- [36] STEFANOUDAKIS D, FROUNTZAS M, SCHIZAS D, et al. Significance of TP53, CDKN2A, SMAD4 and KRAS in pancreatic cancer [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2024, 46(4): 2827-44.
- [37] VOUTSADAKIS I A. Mutations of p53 associated with pancreatic cancer and therapeutic implications [J]. *Ann Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2021, 25(3): 315-27.
- [38] XIAO M, WANG F, CHEN N, et al. Smad4 sequestered in SFPQ condensates prevents TGF- β tumor-suppressive signaling [J]. *Dev Cell*, 2024, 59(1): 48-63.