



· 论 著 ·

EIF4A3/USP5 通过去泛素化稳定 PTK2 促进子宫内膜癌细胞增殖和迁移的机制及临床病理学相关性研究

崔天霞¹, 刘佳鑫¹, 李丁香¹, 洪星河¹, 吴佳玥², 曹颖², 秦怡², 王晓燕², 赵虹¹

1. 山西医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 山西太原 030001;

2. 山西医科大学附属肿瘤医院 山西省肿瘤医院 中国医学科学院肿瘤医院山西医院妇瘤科, 山西太原 030013

[摘要] 背景与目的: 子宫内膜癌严重威胁女性健康, 发病率和死亡率逐年升高且呈年轻化趋势。蛋白酪氨酸激酶 2 (protein tyrosine kinase 2, PTK2) 作为肿瘤驱动因子, 其异常激活与肿瘤恶性程度相关, 然而 PTK2 在子宫内膜癌中的作用机制尚不清楚。本研究旨在探讨 PTK2 在子宫内膜癌中的表达、临床意义及上游调控机制。方法: 筛选山西医科大学附属肿瘤医院生物样本库保存的 2021 年 1 月—2021 年 12 月于该院经手术切除的子宫内膜癌患者的肿瘤组织和癌旁组织样本。采用实时荧光定量聚合酶链反应法 (real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测 PTK2 的 mRNA 水平并分析其与患者临床病理学特征的相关性。本研究获山西医科大学附属肿瘤医院伦理委员会批准 (JC2024036)。采用 RT-qPCR 和蛋白质印迹法 (Western blot) 检测子宫内膜癌细胞中 PTK2 的表达。基于肿瘤免疫评估资源 (Tumor Immune Estimation Resource, TIMER) 和人类蛋白图谱 (The Human Protein Atlas, HPA) 数据库分析 PTK2 表达及其与患者预后的相关性。构建 PTK2 敲低模型, 通过细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 和 transwell 实验评估其对细胞增殖迁移的影响。去泛素化酶-底物相互作用数据库 Ubibrowser 预测 PTK2 潜在去泛素化酶, 结合 TIMER 数据库和基因表达谱交互分析 (The Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA) 数据库筛选出泛素特异性肽酶 5 (ubiquitin-specific peptidase 5, USP5) 并分析其与 PTK2 表达的相关性。构建 USP5 敲低细胞模型, 用泛素蛋白酶体抑制剂 MG132 处理, 检测 PTK2 表达变化, 结合免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 验证其对 PTK2 的调控作用, 功能回复实验验证 USP5 是否通过 PTK2 影响子宫内膜癌细胞的增殖与迁移。进一步通过 RNA 相互作用百科全书 (The Encyclopedia of RNA Interactomes, ENCORI) 数据库筛选出真核翻译起始因子 4A3 (eukaryotic translation initiation factor 4A3, EIF4A3) 并分析其与 USP5 表达的相关性。构建 EIF4A3 敲低/过表达细胞模型并用放线菌素 D 处理, 评估其对 USP5 的调控作用。结果: 共纳入 29 例患者, PTK2 在肿瘤组织及细胞中均呈高表达 ($P<0.05$), 且与患者总生存期缩短相关 (log-rank $P<0.05$)。敲低 PTK2 抑制子宫内膜癌细胞的增殖和迁移 ($P<0.05$)。USP5 与 PTK2 表达呈正相关 ($P<0.05$), 敲低 USP5 不影响其 mRNA 表达, 但可降低蛋白水平 ($P<0.05$), 该效应可被 MG132 逆转; Co-IP 实验证实敲低 USP5 增强 PTK2 泛素化水平。功能回复实验显示, 过表达 USP5 上调 PTK2 并促进细胞增殖和迁移, 敲低 PTK2 可逆转此效应 ($P<0.05$); 反之, 敲低 USP5 下调 PTK2 并抑制增殖和迁移, 过表达 PTK2 可逆转此效应 ($P<0.05$)。RNA 结合

基金项目: 山西省基础 Research 计划项目 (202403021221309); 国家肿瘤区域医疗中心科教培育基金——博士研究生导师硕士研究生导师伴飞基金 (SD2023015)。

利益冲突: 所有作者均声明无利益冲突。

伦理批件: JC2024036。

知情同意: 已获取。

引用本文: 崔天霞, 刘佳鑫, 李丁香, 等. EIF4A3/USP5 通过去泛素化稳定 PTK2 促进子宫内膜癌细胞增殖和迁移的机制及临床病理学相关性研究 [J]. 中国癌症杂志, 2026, 36(6): 545-557.

CC 协议: CC BY-NC-ND 4.0。

Funding: Fundamental Research Program of Shanxi Province (202403021221309), National Tumor Regional Medical Center Science and Education Cultivation Fund-Supervisor Accompaniment Flight Fund (SD2023015).

Conflicts of interest: All authors declare no conflicts of interest.

Ethical approval: JC2024036.

Informed consent: Acquired.

Cite this article: CUI T X, LIU J X, LI D X, et al. Mechanism and clinicopathological relevance of EIF4A3/USP5 promoting the proliferation and migration of endometrial cancer cells by stabilizing PTK2 via deubiquitination [J]. Chin Oncol, 2026, 36(6): 545-557.

CC license: CC BY-NC-ND 4.0.

蛋白 EIF4A3 与 USP5 相互作用且表达呈正相关。放线菌素 D 实验显示 EIF4A3 可延长 USP5 mRNA 半衰期 ($P<0.05$), Western blot 证实其正向调控 USP5 蛋白水平 ($P<0.05$)。结论: *PTK2* 在子宫内膜癌中呈高表达且与患者不良预后相关, 是 USP5 发挥促癌作用的关键下游分子。此外, EIF4A3 通过增强 *USP5* mRNA 稳定性正向调控其表达。本研究揭示了 EIF4A3/*USP5*/*PTK2* 信号轴在子宫内膜癌中的作用, 为子宫内膜癌的分子靶向治疗提供了新靶点。

[关键词] 子宫内膜癌; *PTK2*; *USP5*; EIF4A3; 细胞增殖; 细胞迁移

中图分类号: R737.33 文献标志码: A

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2026.06.002

Mechanism and clinicopathological relevance of EIF4A3/USP5 promoting the proliferation and migration of endometrial cancer cells by stabilizing *PTK2* via deubiquitination CUI Tianxia¹, LIU Jiaxin¹, LI Dingxiang¹, HONG Xinghe¹, WU Jiayue², CAO Ying², QIN Yi², WANG Xiaoyan², ZHAO Hong¹ (1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China; 2. Department of Gynecology, Cancer Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Shanxi Province Cancer Hospital, Shanxi Hospital Affiliated to Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Taiyuan 030013, Shanxi Province, China)

Correspondence to: ZHAO Hong E-mail: shanxizhaohong@163.com; WANG Xiaoyan E-mail: wangxiaoyan369@sina.com

[Abstract] **Background and purpose:** Endometrial carcinoma is a serious threat to women's health with rising incidence, mortality and a trend toward younger onset. As a tumor driver, abnormal activation of protein tyrosine kinase 2 (*PTK2*) is associated with the degree of malignancy. However, its mechanism in endometrial carcinoma remains unclear. This study aims to elucidate the expression, clinical significance and upstream regulatory mechanism of *PTK2* in endometrial carcinoma. **Methods:** Patients with endometrial cancer who underwent initial surgical treatment at Cancer Hospital Affiliated to Shanxi Medical University from January 2021 to December 2021 were enrolled. Cancer and adjacent normal tissues were obtained from the biobank. The mRNA level of *PTK2* was detected by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) and its correlation with clinicopathological characteristics was analyzed. This study was approved by the Ethics Committee of Cancer Hospital Affiliated to Shanxi Medical University (No. JC2024036). The expression of *PTK2* in endometrial carcinoma cell lines was detected by RT-qPCR and Western blot. The expression and prognostic relevance of *PTK2* were analyzed based on The Tumor Immune Estimation Resource (TIMER) and The Human Protein Atlas (HPA) databases. *PTK2* knockdown models were established and their effects on cell proliferation and migration were evaluated by cell counting kit-8 (CCK-8) and transwell assays. The deubiquitinase-substrate interaction database Ubibrowser was used to predict potential deubiquitinases of *PTK2* and the TIMER database together with The Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) database were used to identify ubiquitin-specific peptidase 5 (*USP5*) and analyze its expression correlation with *PTK2*. *USP5* knockdown models were established and cells were treated with the ubiquitin-proteasome inhibitor MG132 to detect changes in *PTK2* expression. The regulatory role of *USP5* on *PTK2* was verified by co-immunoprecipitation (Co-IP). Functional rescue experiments were performed to determine whether *USP5* regulates endometrial carcinoma cell proliferation and migration through *PTK2*. Furthermore, The Encyclopedia of RNA Interactomes (ENCORI) database was used to screen for eukaryotic translation initiation factor 4A3 (EIF4A3) interacting with *USP5* and analyze the expression correlation between EIF4A3 and *USP5* in endometrial cancer. *EIF4A3* knockdown/overexpression cell models were established and treated with actinomycin D to evaluate the regulatory role of EIF4A3 on *USP5*. **Results:** A total of 29 patients were enrolled. *PTK2* was highly expressed in both cancer tissues and cell lines ($P<0.05$) and its high expression was associated with shortened overall survival (log-rank $P<0.05$). Knockdown of *PTK2* inhibited the proliferation and migration of endometrial carcinoma cells ($P<0.05$). *USP5* expression was positively correlated with *PTK2* expression ($P<0.05$). Knockdown of *USP5* did not affect *PTK2* mRNA levels but reduced its protein level ($P<0.05$) and this effect was reversed by MG132. Co-IP assays confirmed that *USP5* knockdown enhanced *PTK2* ubiquitination. Functional rescue experiments showed that overexpression of *USP5* upregulated *PTK2* and promoted cell proliferation and migration, whereas knockdown of *PTK2* reversed these effects ($P<0.05$). Conversely, knockdown of *USP5* downregulated *PTK2* and inhibited proliferation and migration, whereas overexpression of *PTK2* reversed these inhibitory effects ($P<0.05$). The RNA-binding protein EIF4A3 interacted with *USP5* and their expression levels were positively correlated. Actinomycin D assays showed that *EIF4A3* prolonged the half-life of *USP5* mRNA ($P<0.05$) and Western blot confirmed that EIF4A3 positively regulated *USP5* protein levels ($P<0.05$). **Conclusion:** *PTK2* is highly expressed in endometrial carcinoma and is associated with poor patient prognosis, serving as a key downstream molecule through which *USP5* exerts its oncogenic function. Furthermore, *EIF4A3* positively regulates *USP5* expression by enhancing the stability of *USP5* mRNA. This study reveals the role of the EIF4A3/*USP5*/*PTK2* signaling axis in endometrial carcinoma, providing a novel target for molecular targeted therapy.

[Key words] Endometrial carcinoma; *PTK2*; *USP5*; EIF4A3; Cell proliferation; Cell migration

子宫内膜癌是常见的妇科恶性肿瘤^[1], 2022年全球新发病例约42.0万, 死亡病例约9.8万^[2], 严重威胁女性健康。尽管手术联合放化疗及靶向治疗等综合手段改善了部分患者的预后, 但晚期及高危组织学类型患者的生存率仍不理想^[3], 急需深入探索其发病机制并寻找新的治疗靶点。

蛋白酪氨酸激酶2 (protein tyrosine kinase 2, PTK2) 又称黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK), 参与调控细胞黏附、迁移、增殖等过程^[4]。生理状态下表达水平较低^[5], 在乳腺癌^[6]、肝癌^[7]等多种恶性肿瘤中异常激活。PTK2在子宫内膜癌中同样高表达且与肿瘤恶性程度相关^[8], 但其作用机制尚不明确。去泛素化是一种重要的蛋白质翻译后修饰方式, 参与调控蛋白质稳定性^[9]。生物信息学分析发现泛素特异性肽酶5 (ubiquitin-specific peptidase 5, USP5) 可能与PTK2相互作用, 二者在子宫内膜癌中的表达呈正相关。USP5可特异性去除底物的泛素化修饰防止其降解^[10], 但其是否通过介导PTK2去泛素化促进子宫内膜癌进展尚待阐明。此外, RNA相互作用百科全书 (The Encyclopedia of RNA Interactomes, ENCORI) 数据库预测发现真核翻译起始因子4A3 (eukaryotic translation initiation factor 4A3, EIF4A3) 与USP5之间存在相互作用, 且二者在子宫内膜癌中的表达也呈正相关。EIF4A3是真核生物翻译起始复合体的核心组分, 可通过稳定癌基因mRNA来驱动肿瘤进展^[11]。但其在子宫内膜癌中是否通过稳定USP5 mRNA进而介导PTK2去泛素化尚不清楚。

基于此, 本研究旨在探究EIF4A3对USP5的调控作用及USP5是否通过调控PTK2去泛素化影响子宫内膜癌进展, 以期为子宫内膜癌的靶向治疗提供新的理论依据和潜在靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系

人子宫内膜基质细胞系hESC购自厦门逸漠生物科技有限公司, 人子宫内膜癌细胞系HEC-1-B、RL95-2、Ishikawa购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 临床资料

筛选山西医科大学附属肿瘤医院生物样本库保存的2021年1月—2021年12月于该院经手术切除的子宫内膜癌患者的肿瘤组织和癌旁组织。本研究从样本库调取库存冷冻标本, 通过实时荧

光定量聚合酶链反应法 (real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测PTK2的mRNA水平, 并收集患者的临床资料用于基线特征分析。患者纳入标准: ①接受初次根治性子宫切除术, 且未接受任何术前新辅助化疗或放疗; ②术后病理学检查明确诊断为原发性子宫内膜癌; ③临床资料完整。排除标准: ①术前接受过任何形式的抗肿瘤治疗; ②合并有其他器官恶性肿瘤病史; ③非肿瘤相关因素所致的死亡。本研究获山西医科大学附属肿瘤医院伦理委员会批准 (JC2024036), 所有患者均签署书面知情同意书。

1.1.3 试剂

胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS; F802-050)、DMEM基础培养基 (L1007-500)、细胞冻存液 (A400-100) 购自浙江百迪生物科技有限公司, 青链霉素混合液 (P1400) 购自北京索莱宝科技有限公司, 0.25%胰酶溶液 (CN0004-100ML) 购自山东思科捷生物技术有限公司, si-NC、si-PTK2、si-USP5、si-EIF4A3购自上海生工生物有限公司, pcDNA、EIF4A3、PTK2过表达质粒购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司, TRIzol® Reagent (9108)、RNA反转录试剂盒 (RR820A)、RT-qPCR试剂盒 (RR036A) 购自日本Takara公司, 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8; K1018) 购自美国APEX BIO公司, siRNA转染试剂 (C0533)、Protein A/G磁珠 (P2179S) 购自上海碧云天生物技术有限公司, 0.1%结晶紫染色液 (G1063) 购自北京索莱宝科技有限公司, 放线菌素D (HY-17559)、MG-132 (HY-13259) 购自上海MCE公司, PAGE凝胶快速制备试剂盒 (PG212) 购自上海雅酶生物医药科技有限公司, 电化学发光 (electrochemical luminescence, ECL; BMU102-CN) 试剂盒购自亚科因生物技术有限公司。兔抗PTK2 (1: 10 000, 12636-1-AP)、兔抗USP5 (1: 5 000, 10473-1-AP)、兔抗EIF4A3 (1: 2 000, 17504-1-AP) 以及兔抗泛素抗体 (1: 1 000, 10201-2-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司。兔抗GAPDH抗体 (1: 10 000, bs-10900R)、兔抗 β -Actin抗体 (1: 10 000, bs-0061R)、HRP标记的山羊抗兔IgG二抗 (1: 5 000, bs-0295G-HRP) 购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.1.4 仪器与设备

ViiA™ 7实时荧光定量PCR仪购自美国

Thermo Fisher Scientific公司, 蛋白电泳套装购自美国Bio-Rad公司, GelView 6000M凝胶成像系统购自中国博鹭腾生物科技有限公司, iMark™酶标仪购自美国Bio-Rad公司, CKX 53荧光倒置显微镜购自日本Olympus公司, 5417R小型台式冷冻型高速离心机购自德国Eppendorf公司, Sorvall ST 40通用台式离心机购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.2 方法

1.2.1 在线预测网站

基于肿瘤免疫评估资源(The Tumor Immune Estimation Resource, TIMER)和人类蛋白图谱(The Human Protein Atlas, HPA)数据库分析PTK2在子宫内膜癌中的表达及其与患者预后的相关性。为探索其上游调控机制, 通过去泛素化酶-底物相互作用数据库Ubibrowser预测并筛选出可能与PTK2相互作用的去泛素化酶USP5。进而, 借助ENCORI数据库筛选出可能与USP5相互作用的RNA结合蛋白EIF4A3。最后, 结合基因表达谱交互分析(The Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA)数据库验证USP5与PTK2、EIF4A3与USP5在子宫内膜癌中的表达相关性。

1.2.2 细胞培养与转染

所有细胞均在含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM完全培养基, 37℃、CO₂体积分数为5%饱和湿度的恒温培养箱中培养。使用0.25%胰酶消化细胞, 取对数生长期的细胞, 消化后接种于6孔板过夜, 使第2天细胞密度能达到约70%, 更换新鲜培养基。配制DMEM基础培养基Lipofectamine™ 8000转染试剂-si-RNA/过表达质粒混合物, 室温温育20 min, 每孔分别加入125 μL混合物。培养4~6 h后, 更换新鲜培养基, 继续培养。

1.2.3 RT-qPCR检测

TRIzol试剂提取总RNA, 使用NanoDrop微量分光光度计检测RNA浓度与纯度。按照PrimeScript™ RT Master Mix说明书, 以500 ng总RNA为模板进行反转录, 合成cDNA。反应条件为37℃ 15 min, 85℃ 5 s。使用TB Green® Premix Ex Taq™ II在PCR仪上进行扩增反应。反应体系为20 μL, 包含: TB Green Premix Ex Taq II、上游及下游特异性引物、ROX Reference Dye、cDNA模板和RNase-free水。按照如下程序进行反应: 预变性: 95℃ 30 s (1个循环); PCR扩增: 95℃ 5 s, 60℃ 30 s (40个循环)。以

GAPDH为内参, 采用2^{-ΔΔCt}法分析PTK2、USP5和EIF4A3 mRNA的相对表达量。本实验所用引物由上海生工生物技术有限公司设计并合成, 所有引物(5'-3')序列如下:

GAPDH基因的引物正义链为GAAGGTGAAGGTCGGAGT, 反义链为GAAGATGGTGTATGGGATTTC; EIF4A3引物的正义链为ATGACGACATCCGCATCCTC, 反义链为GATCAGCAACGTTTCATCGGC; PTK2引物的正义链为CCATCCCTAACCATTCGCGG, 反义链为GCCCGTTTACCTTCTTTCTG; USP5引物的正义链为TGTGTGGTCACTACGTCTGC, 反义链为TCTCGGAGGCACACACTTTC。

1.2.4 蛋白质印迹法(Western blot)

使用放射免疫沉淀法(radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液提取总蛋白质, 二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid assay, BCA)测定蛋白浓度。取等量蛋白样品(20~30 μg)上样, 经10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 湿转法转移至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)上。随后, 用含5%脱脂牛奶的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水-吐温20(Tris-buffered saline with Tween 20, TBST)溶液室温封闭1.5 h。封闭完成后, 将膜与相应的一抗于4℃温育过夜。次日, 用TBST缓冲液洗涤3次, 每次10 min, 再与辣根过氧化物酶标记的相应二抗室温温育1 h。经TBST充分洗涤后, 使用ECL试剂在成像系统下进行曝光, 曝光时间设置为自动。用Image J软件分析目标蛋白与内参灰度比值进行半定量分析。

1.2.5 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)

将对数生长期的细胞按照每孔5 000个细胞接种于96孔板, 每孔100 μL, 每组5个复孔, 铺好后置于37℃、CO₂体积分数为5%的培养箱中培养。分别于培养的24、48和72 h, 向每孔中加入10 μL CCK-8试剂。随后将培养板放回培养箱中继续避光温育2 h。温育结束后, 立即使用酶标仪在450 nm波长下测定各孔的吸光度(D)值。

1.2.6 Transwell实验

取对数生长期细胞消化制备成单细胞悬液, 1 200 r/min离心5 min (r=8.6 cm), 弃上清液, 用无血清培养基重悬细胞, 调整细胞密度至2×10⁵个/mL, 在下室加入600 μL含20% FBS的完全培养基, 上室加入200 μL细胞悬液, 于培养

箱中培养 24 h。将小室移至预先加入 600 μ L 4% 多聚甲醛的孔中，室温固定 30 min。PBS 漂洗后，再用 0.1% 结晶紫染色液染色 15 min。再次用 PBS 漂洗，用棉签轻轻擦去上室内侧未迁移的细胞。在倒置光学显微镜下随机选取 4 个视野进行拍照，并计数穿过膜到达下表面的细胞数，取平均值进行统计分析。

1.2.7 放线菌素 D 实验

RL95-2 和 Ishikawa 细胞分别转染 si-NC、si-*EIF4A3* 以及 pcDNA 空载体、*EIF4A3* 过表达质粒。转染 48 h 后，更换为含有放线菌素 D 的新鲜培养基，使其工作浓度为 5 μ g/mL，分别处理 0、3、6 和 9 h 后收集细胞。提取 RNA，RT-qPCR 检测 *USP5* mRNA 表达。以 GAPDH 为内参，设定 0 h 时 *USP5* mRNA 表达量为 100%，计算各时间点的相对残留率。通过拟合 mRNA 降解曲线，分析 *EIF4A3* 敲低和过表达对 *USP5* mRNA 半衰期的影响。

1.2.8 免疫共沉淀实验 (co-immunoprecipitation, Co-IP)

将 RL95-2 和 Ishikawa 细胞接种于 6 孔板，培养至 70% 融合度。分别转染 si-NC 和 si-*USP5*，24 h 后，使用 10 μ mol/L 蛋白酶体抑制剂 MG132 处理 6 h 以阻断泛素化蛋白降解。弃去培养基，预冷 PBS 洗涤细胞 2 次，加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min，用细胞刮刮下细胞，4 $^{\circ}$ C、12 000 *r/min* 离心 10 min ($r=9.8$ cm)，取部分上清液与 PTK2 抗体于 4 $^{\circ}$ C 温育过夜，剩余上清液作为 Input 对照。在含有抗体的上清液中加入磁珠继续温育 4 h。磁珠经裂解缓冲液洗涤后，加入 2 $\times$ 上样缓冲液煮沸 10 min 使结合蛋白从磁珠上洗脱下来。12 000 *r/min* 离心 1 min ($r=9.8$ cm)，取上清液，即为 IP 产物。分别取 Input

样品和 IP 样品进行 Western blot，检测 PTK2 的泛素化水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析。计量资料采用 Shapiro-Wilk 检验进行正态性检验，Levene 检验进行方差齐性检验。符合正态分布且方差齐的数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组间比较采用独立样本 Student's *t* 检验，多组间比较采用 One-way ANOVA 单因素方差分析，涉及多个时间点的多组数据，采用 Two-way ANOVA 两因素方差分析，事后两两比较采用 Tukey's 检验；符合正态分布但方差不齐的数据采用 Welch's *t* 检验；不符合正态分布的数据以中位数（四分位数间距）[M (Q1, Q3)] 表示，采用非参数 Mann-Whitney *U* 检验。计数资料组间比较采用 Fisher 精确检验 (Fisher's exact test)。生存分析数据来源于 TIMER 公共数据库，基于 TCGA-UCEC 队列 ($n=545$) 完成分析，采用单因素 COX 比例风险回归模型计算风险比 (hazard ratio, HR)、95% CI 及 COX 模型对应的 *P* 值，组间比较采用 log-rank 检验，基因表达相关性分析采用 Pearson 相关系数检验。采用双侧显著性检验， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 研究人群的筛选流程与基线特征

本研究按照纳排标准共纳入 29 例子宫内膜癌患者 (图 1)。根据 PTK2 表达中位数分为低表达组 ($n=16$) 和高表达组 ($n=13$)，Fisher 检验结果显示两组在年龄、FIGO 分期、组织学分级、肌层浸润深度、淋巴结转移、LVSI 及 *TP53* 突变状态方面的差异均无统计学意义 (表 1)。

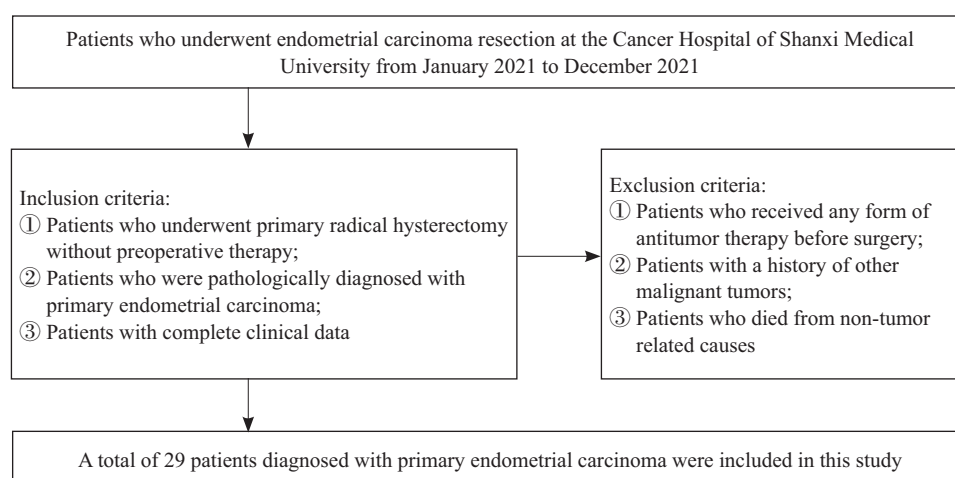


图 1 患者纳入和排除标准流程图

Fig. 1 Flowchart of patients' inclusion and exclusion criteria

表1 患者的临床病理学特征

Tab. 1 Clinicopathological characteristics of patients

Characteristics	Case (n=29)	PTK2 expression		P value
		Low (n=16)	High (n=13)	
Age/year				0.666 5
≤50	7 (24.13)	3	4	
>50	22 (75.87)	13	9	
FIGO stage				0.573 1
I - II	26 (89.66)	15	11	
III - IV	3 (10.34)	1	2	
Histological grade				0.092 3
G1-G2	21 (72.41)	14	7	
G3	8 (27.59)	2	6	
Myometrial invasion				0.274 2
<1/2	17 (58.62)	11	6	
≥1/2	12 (41.38)	5	7	
Lymph node metastasis				0.299 4
Negative	25 (86.21)	15	10	
Positive	4 (13.79)	1	3	
Lymphovascular space invasion				1
Negative	27 (93.10)	15	12	
Positive	2 (6.90)	1	1	
TP53 mutation status				0.063 8
Mutant	6 (20.69)	1	5	
Wild	23 (79.31)	15	8	

2.2 PTK2在子宫内膜癌中呈高表达且与患者不良预后相关

为了探究PTK2在子宫内膜癌中的表达及临床意义,首先通过TIMER数据库进行泛癌分析,结果显示PTK2在包括子宫内膜癌在内的多种肿瘤组织中mRNA水平显著升高(图2A, $P<0.05$)。进一步利用HPA数据库中子宫内膜癌患者的组织样本进行免疫组织化学分析,显示PTK2在肿瘤组织中蛋白水平升高(图2B, $P<0.001$)。为验证上述发现,采用RT-qPCR检测29例子宫内膜癌患者的配对肿瘤组织与癌旁组织中PTK2的mRNA水平,结果显示PTK2在肿瘤组织中表达显著上调(图2C, $P<0.05$),与生物信息学分析结果一致。基于TCGA-UCEC队列($n=545$)的生存分析显示,PTK2高表达组患者的总生存期显著短于低表达组(图2D, log-rank $P<0.05$)。单因素COX回归分析证明,PTK2高表达是子宫内膜癌的不良预后因素(HR=1.542, 95% CI: 1.074~2.214, $P<0.05$)。此外,在细胞水平上,通过RT-qPCR与Western blot检测发现,与人子宫内膜基质细胞hESC相比,3种子宫内膜癌细胞系HEC-1-B、RL95-2和Ishikawa中PTK2的mRNA表达(图2E, $P<0.01$)及蛋白水平(图

2F, $P<0.01$)均显著升高。上述结果表明,PTK2在子宫内膜癌组织及细胞系中均呈现高表达,且其高表达与患者不良预后相关。

2.3 敲低PTK2可抑制子宫内膜癌细胞的增殖与迁移能力

本研究采用特异性siRNA在PTK2表达较高的RL95-2和Ishikawa细胞系中对其进行敲低。Western blot结果显示,si-PTK2组PTK2蛋白水平显著下调(图3A, $P<0.05$),表明敲低模型构建成功。通过CCK-8实验评估PTK2敲低对细胞增殖的影响,结果显示,敲低PTK2能显著抑制RL95-2和Ishikawa细胞的增殖能力(图3B, $P<0.01$)。为进一步评估PTK2敲低对细胞迁移的影响,transwell实验表明,敲低PTK2后两种细胞的穿膜细胞数均显著减少(图3C, $P<0.01$),提示子宫内膜癌细胞的迁移能力受到明显抑制。

2.4 USP5通过去泛素化稳定PTK2蛋白

本研究进一步探讨了PTK2在子宫内膜癌中的上游调控机制。首先通过UbiBrowser数据库预测得到包括USP5在内的多个靶向PTK2的去泛素化酶(图4A)。通过TIMER数据库对TCGA泛癌队列进行表达水平分析发现,USP5在子宫内膜癌组织中显著高表达(图4B, $P<0.001$),进一步

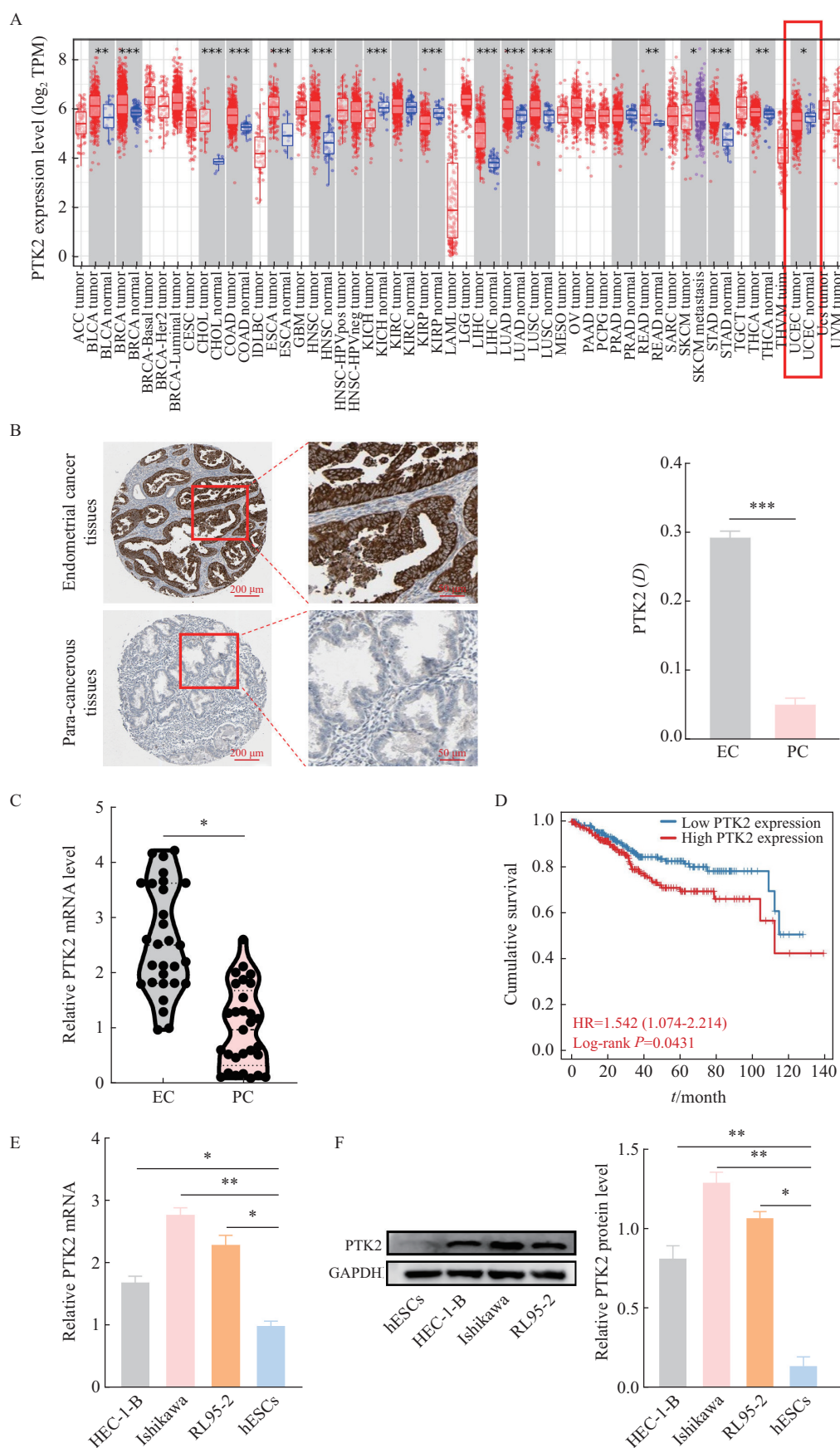


图2 PTK2在子宫内膜癌中的表达及临床意义

Fig. 2 Expression and clinical significance of PTK2 in endometrial carcinoma

A-B: The expression of PTK2 in endometrial carcinoma was analyzed via TIMER (A) and HPA (B) databases; C: The mRNA levels of PTK2 in adjacent tissues and endometrial carcinoma tissues were tested by RT-qPCR assay ($n=29$); D: The correlation between PTK2 expression and overall survival rate of patients was analyzed with TIMER; E-F: The mRNA and protein levels of PTK2 in normal human endometrial stromal cells (hESCs) and three endometrial cancer cell lines (HEC-1-B, RL95-2, Ishikawa) were detected by RT-qPCR (E) and Western blot (F) respectively, data were expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$); *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$. EC: Endometrial cancer tissues; PC: Para-cancerous tissues.

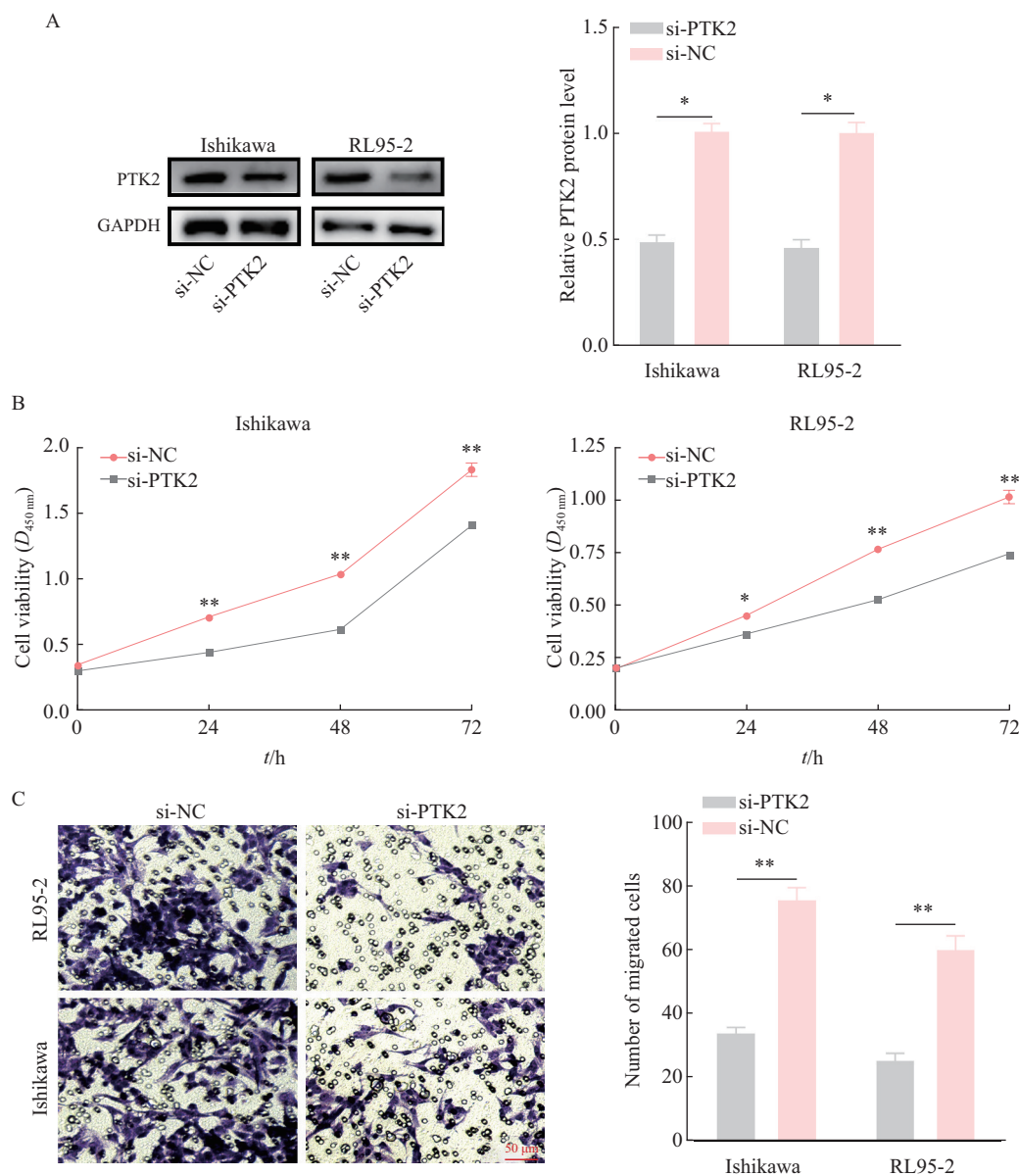


图3 敲低 *PTK2* 对子宫内膜癌细胞增殖和迁移能力的影响

Fig. 3 Effects of *PTK2* knockdown on proliferation and migration of endometrial cancer cells

A: The efficiency of *PTK2* knockdown was assessed by Western blot; B: Cell viability of Ishikawa and RL95-2; C: Effects of *PTK2* knockdown on cell proliferation and migration were assessed by transwell assays. Data were expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$); *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

通过GEPIA数据库对TCGA-UCEC子宫内膜癌队列进行表达相关性分析证实, *USP5*与*PTK2*的表达水平呈正相关(图4C, $R=0.24$, $P<0.01$), 初步提示*USP5*可能是*PTK2*在子宫内膜癌中的一个关键调控因子。此外, 本研究在RL95-2和Ishikawa两种细胞系中构建了*USP5*敲低模型(图4D, $P<0.01$)。随后通过RT-qPCR和Western blot检测*USP5*敲低对*PTK2*表达的影响。结果显示, 敲低*USP5*并不影响*PTK2*的mRNA表达(图4E), 但会显著降低其蛋白水平(图4F, $P<0.01$)。用泛素蛋白酶体抑制剂MG132处理后, 结果显示MG132能够显著逆转由*USP5*敲低引起的*PTK2*蛋白下调(图4F, $P<0.01$)。泛素化实验进一步证实, 敲低*USP5*可显著上调细胞中*PTK2*

的泛素化水平(图4G)。以上结果表明, *USP5*通过其去泛素化酶活性抑制*PTK2*蛋白降解, 从而在蛋白水平上维持*PTK2*的稳定性。

2.5 *PTK2*是*USP5*促进子宫内膜癌细胞增殖和迁移的关键下游分子

为了明确*USP5*是否通过调控*PTK2*介导子宫内膜癌细胞的增殖和迁移, 我们进行了功能回复实验。结果显示, 在RL95-2与Ishikawa细胞中, 过表达*USP5*可显著上调*PTK2*蛋白水平, 促进细胞的增殖与迁移能力; 而在过表达*USP5*的同时敲低*PTK2*, 可显著逆转*USP5*介导的*PTK2*上调以及对细胞增殖、迁移的促进效应(图5A~C)。反之, 敲低*USP5*可显著下调*PTK2*蛋白表达, 抑制子宫内膜癌细胞的增殖与迁移; 而在敲低*USP5*的同时回补过表达*PTK2*, 可显著逆转

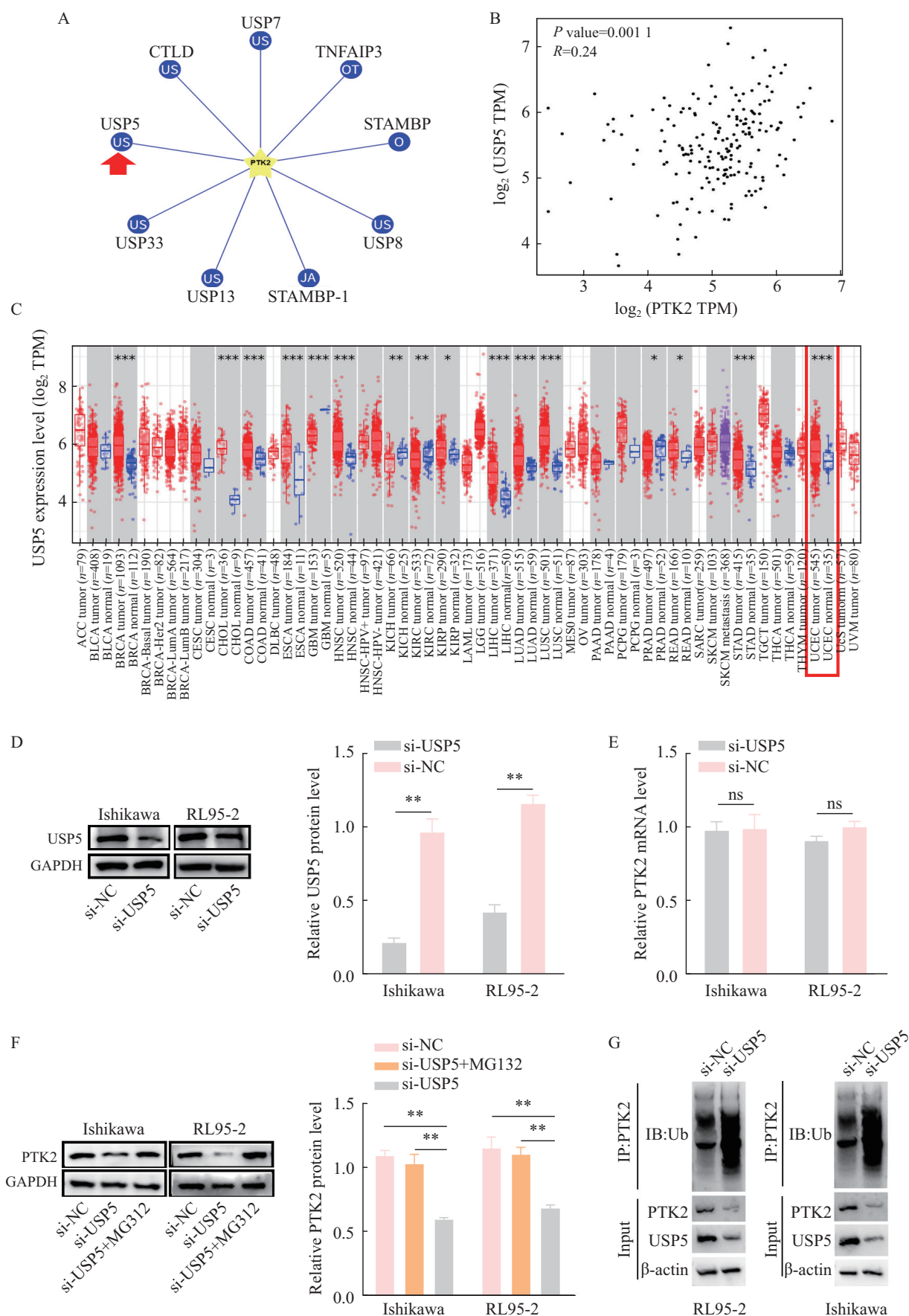


图4 USP5通过去泛素化稳定PTK2蛋白

Fig. 4 USP5 stabilizes PTK2 protein through deubiquitination

A: The deubiquitinating enzymes that may target PTK2 were predicted using Ubibrowser database; B: The correlation between PTK2 and USP5 expression was analyzed with GEPIA database; C: The expression of USP5 in endometrial carcinoma was analyzed via TIMER database; D: The efficiency of USP5 knockdown was confirmed by Western blot; E-F: The mRNA and protein levels of PTK2 were tested by RT-qPCR (E) and Western blot (F) in cells transfected with si-NC, si-USP5 and treated with MG132; G: The effect of USP5 knockdown on PTK2 ubiquitination was examined by co-immunoprecipitation. Data were expressed as $\bar{x} \pm s$ (n=3); ns: No significance; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

USP5敲低介导的PTK2下调以及对细胞增殖、迁移的抑制效应(图5D~F)。上述结果证实,

PTK2是USP5调控子宫内膜癌细胞增殖与迁移的关键下游分子。

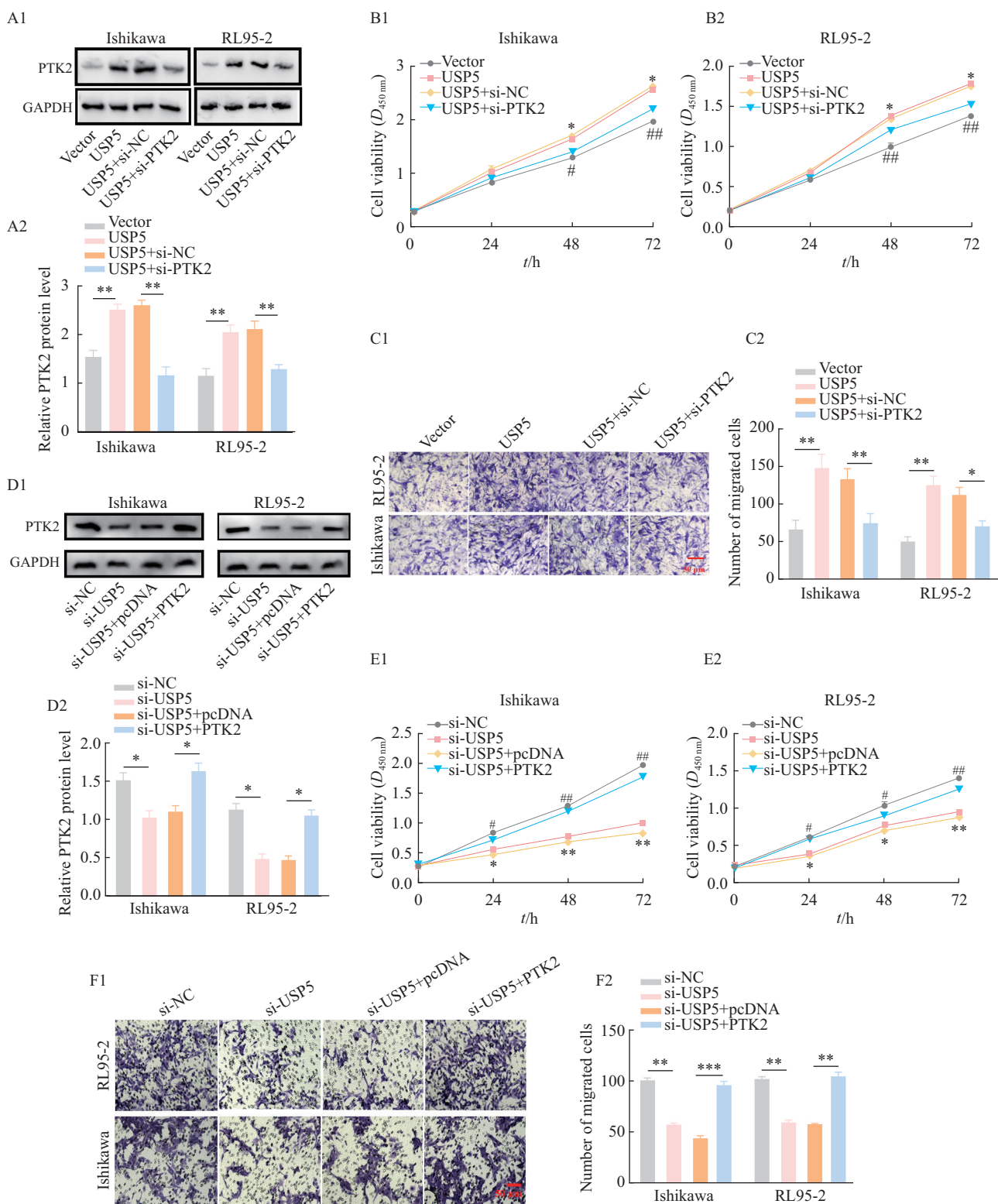


图5 USP5通过调控PTK2介导子宫内膜癌细胞的增殖和迁移

Fig. 5 USP5 mediates proliferation and migration of endometrial cancer cells via regulating PTK2

A1-A2: Western blot was conducted to detect PTK2 protein levels. B1-B2: CCK-8 assay was performed to evaluate cell proliferative activity. C1-C2: Transwell migration assay was used to assess cell migratory ability. D1-D2: Western blot analysis of PTK2 protein expression. E1-E2: CCK-8 assay measured cell proliferation at 0 h, 24 h, 48 h and 72 h in cells with the transfections. F1-F2: Representative transwell staining images and quantitative statistics of migrated cells for the transfection groups shown in D. Data were expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$); *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; #: $P<0.05$; ###: $P<0.01$.

2.6 EIF4A3可稳定 *USP5* mRNA并调节其蛋白水平

本研究通过 ENCORI 数据库预测其可能与 RNA 结合蛋白 EIF4A3 存在相互作用 (图 6A)。结果显示, 在子宫内膜癌组织中, *EIF4A3* 与 *USP5* 的表达呈显著正相关 (图 6B, $P<0.0001$)。为验证此调控关系, 本研究构建了 *EIF4A3* 敲低

与过表达的细胞模型 (图 6C, $P<0.01$)。放线菌素 D 实验表明, 敲低 *EIF4A3* 显著缩短了 *USP5* mRNA 的半衰期, 而过表达 *EIF4A3* 则明显延长其半衰期 (图 6D, $P<0.05$)。Western blot 实验显示, *EIF4A3* 敲低或过表达可相应地降低或升高 *USP5* 的蛋白水平 (图 6E, $P<0.05$)。上述结果表明, *EIF4A3* 通过增强 *USP5* mRNA 的稳定性, 正向调控其蛋白表达。

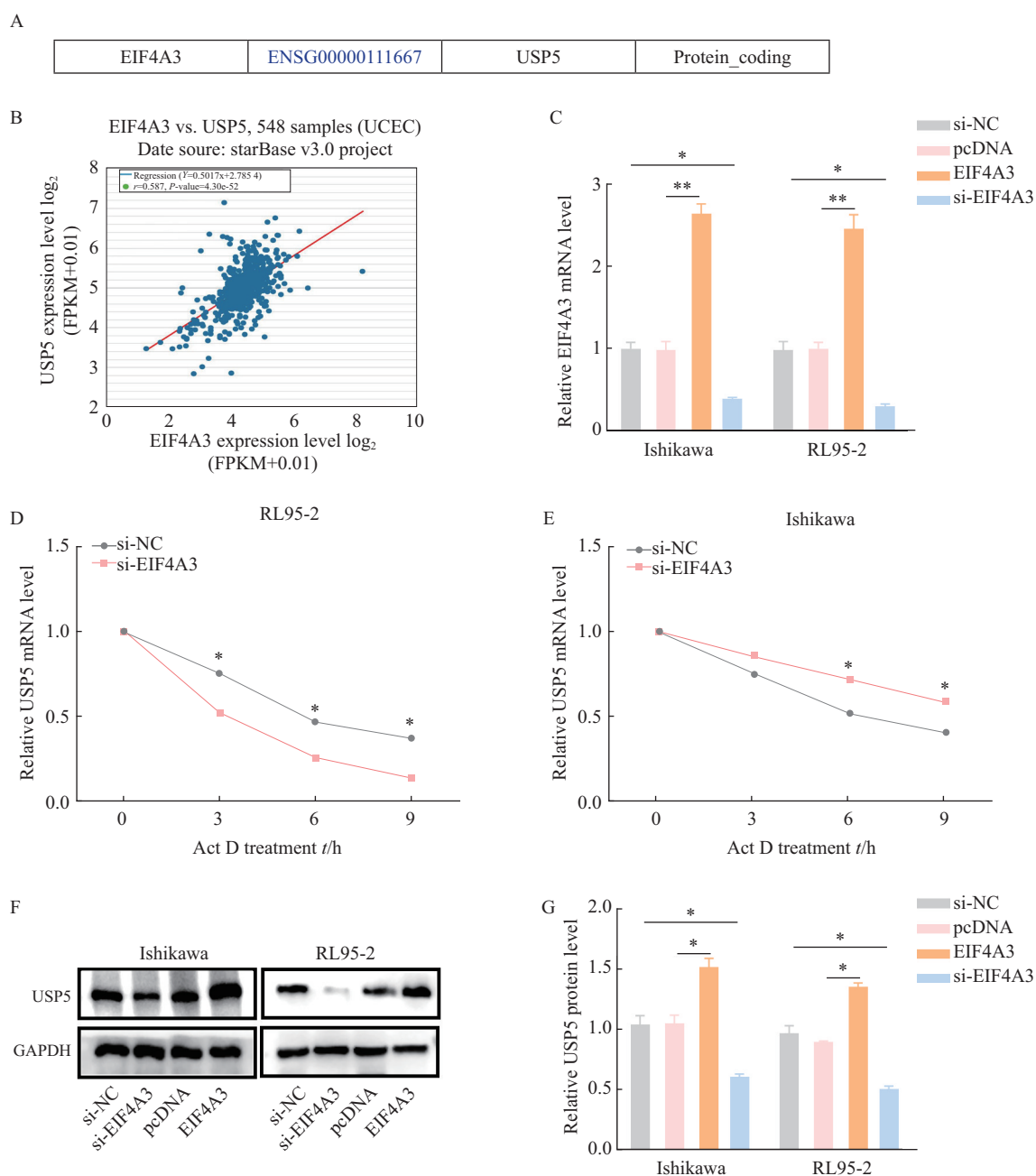


图6 EIF4A3可稳定 *USP5* mRNA并调节其蛋白水平

Fig. 6 EIF4A3 can stabilize *USP5* mRNA and regulate its protein level

A: The RNA-binding protein EIF4A3 was predicted to interact with *USP5* using ENCORI database; B: The correlation between *USP5* and EIF4A3 expression was analyzed with ENCORI database; C: The transfection efficiencies of si-EIF4A3 and EIF4A3 overexpression vector were confirmed by RT-qPCR; D-E: The half-life of *USP5* mRNA was measured by RT-qPCR following actinomycin D treatment in RL95-2 or Ishikawa cells transfected with si-EIF4A3 and in Ishikawa cells transfected with EIF4A3 overexpression vector; F-G: The effects of EIF4A3 on *USP5* protein level were detected by Western blot. Data were expressed as $\bar{x}\pm s$ ($n=3$); *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

3 讨 论

目前,手术联合放化疗仍是子宫内膜癌治疗的重要手段,但晚期及复发患者常因肿瘤转移和化疗耐药导致治疗失败^[12]。尽管靶向治疗为患者的预后带来希望,但其广泛应用仍受限于生物标志物的筛选不足^[13]。因此,探索新的治疗靶点尤为重要。

PTK2 作为细胞信号转导分子,在乳腺癌^[14]、卵巢癌^[15]等多种实体瘤中异常高表达并促进肿瘤进展。在卵巢癌中,PTK2通过激活蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 介导的 Y 框结合蛋白 1 (Y-box binding protein 1, YB-1) 磷酸化和分化簇 44 (cluster of differentiation 44, CD44) 表达导致化疗耐药^[15]。本研究发现,PTK2在子宫内膜癌组织和细胞中均显著高表达,且与患者总生存期缩短相关。功能实验证实,敲低 PTK2 可抑制细胞增殖与迁移。这些结果与 PTK2 在其他实体瘤中的促癌作用一致,提示其可能是驱动子宫内膜癌恶性进展的关键因子之一。去泛素化酶 (deubiquitinating enzyme, DUB) 通过移除泛素链阻止底物降解,是调控肿瘤蛋白稳定性的重要机制^[16]。USP5 可通过稳定人锌指转录因子 Snail 家族转录抑制因子 2 (snail family transcriptional repressor 2, SNAI2) 促进肝癌上皮-间质转化^[17],也可稳定信号转导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 促进食管鳞状细胞癌血管生成^[18]。本研究发现敲低 USP5 不影响 PTK2 的 mRNA 表达但显著降低其蛋白水平,该效应可被蛋白酶体抑制剂 MG132 逆转,表明 USP5 是 PTK2 的一个上游去泛素化酶。功能回复实验结果显示,过表达 USP5 促进子宫内膜癌细胞增殖迁移,而敲低 PTK2 可逆转此效应;反之,敲低 USP5 抑制细胞增殖迁移功能,过表达 PTK2 可挽救该表型。这些结果证实,USP5 通过去泛素化稳定 PTK2 蛋白,进而促进子宫内膜癌恶性进展。RNA 结合蛋白 (RNA binding protein, RBP) 通过调控 mRNA 稳定性影响基因表达,参与肿瘤进展^[19]。本研究发现 EIF4A3 可作为 USP5 的上游调控因子,二者在子宫内膜癌中的表达呈正相关。实验证实 EIF4A3 可延长 USP5 mRNA 半衰期,正向调控 USP5 蛋白水平,表明 EIF4A3 通过增强 USP5 mRNA 稳定性上调其表达。有研究^[20]表明,EIF4A3 可通过调控环状 RNA (circular

RNA, circRNA) 发挥作用,如 EIF4A3 可与 circZFAND6 前体 mRNA 结合促进其表达,进而促进乳腺癌细胞增殖转移,还可通过结合 circARHGAP29 诱导其环化和细胞质输出,从而增强前列腺癌糖酵解代谢^[21]。本研究结果显示,EIF4A3 除参与 circRNA 的生物发生外,还可能直接调控去泛素化酶 mRNA 的稳定性,将 RNA 结合蛋白、去泛素化酶和癌蛋白串联为调控轴,具有重要的生物学意义。靶向 PTK2 的小分子抑制剂已在多种肿瘤中表现出抗肿瘤活性,如 PTK2 抑制剂 defactinib 联合快速加速纤维肉瘤 (rapidly accelerating fibrosarcoma, RAF) / 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MEK) 抑制剂 avutemetinib 已于 2025 年获美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准用于 Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, KRAS) 突变的复发性低级别浆液性卵巢癌^[22];在乳腺癌中,PTK2 抑制剂 Y15 可显著抑制肿瘤生长,使原位移植瘤体积缩小 67%^[23]。基于本研究,开发 PTK2 抑制剂或联合现有化疗方案,有望改善晚期及复发患者的预后,特别是上游调控因子 EIF4A3 和 USP5 可能提供更好的治疗窗口,未来可探索其抑制剂单用或与 PTK2 抑制剂、PARP 抑制剂的联合策略。

本研究尚有一定的局限性。首先,纳入分析的子宫内膜癌患者病例数较少,且主要来自单一医疗中心。未来研究将扩大样本量至多中心队列,以更全面地评估 PTK2 在子宫内膜癌中的表达特征及其临床意义。其次,本研究尚缺乏体内实验的验证,体内实验能够更好地模拟肿瘤微环境。后续研究将利用条件性敲除或过表达基因小鼠模型,在体内水平进一步验证 PTK2 在子宫内膜癌中的作用。

综上所述,本研究证实了 PTK2 是子宫内膜癌中一个关键的功能驱动蛋白,并发现其上游的 EIF4A3-USP5-PTK2 调控轴。这一发现为深入理解子宫内膜癌的分子机制提供了新视角。

第一作者:

崔天霞 (ORCID: 0009-0002-9522-0091), 硕士研究生在读。

通信作者:

赵虹 (ORCID: 0000-0002-6975-093X), 硕士,副教授,硕士研究生导师, E-mail: shanxizhaohong@163.com; 王晓燕 (ORCID: 0000-0002-4960-2913), 博士,主任医师,

博士研究生导师, E-mail: wangxiaoyan369@sina.com.

作者贡献声明:

崔天霞: 研究实施、论文撰写与修改; 刘佳鑫: 实验操作与数据分析; 李丁香: 实验操作与数据分析; 洪星河: 数据收集与分析; 吴佳玥: 数据收集与分析; 曹颖: 数据收集与分析; 秦怡: 数据收集与分析; 王晓燕: 研究指导、论文修改、经费支持; 赵虹: 研究指导、论文修改、经费支持。

[参 考 文 献]

- [1] YAO L, LI YB, HUANG H, et al. Immunotherapy response and resistance in endometrial cancer: Integrating molecular subtype, spatial immune states, and pharmacodynamic biomarkers [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2026, 224:105388.
- [2] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA A Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229–263.
- [3] LIN PH, CHENG SH, RAJ EN, et al. Frontline immunotherapy and immune cold reprogramming across molecular subtypes of advanced endometrial cancer [J]. Cancer Lett, 2026, 655: 218652.
- [4] GUNN S A, KREPS L M, ZHAO H J, et al. Focal adhesion kinase inhibitors prevent osteoblast mineralization in part due to suppression of AKT-mediated stabilization of osterix [J]. J Bone Oncol, 2022, 34: 100432.
- [5] CHEN Y R, WANG W, FANG L Y, et al. Identification of PTK2 as an adverse prognostic biomarker in breast cancer by integrated bioinformatics and experimental analyses [J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 984564.
- [6] LUO J, YAO J F, DENG X F, et al. 14, 15-EET induces breast cancer cell EMT and cisplatin resistance by up-regulating integrin α v β 3 and activating FAK/PI3K/AKT signaling [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 23.
- [7] QIN C T, LIU S Y, CHEN W B, et al. HuR-induced circ_0082319 contributes to hepatocellular carcinoma by elevating PTK2 through miR-505-3p [J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2024, 397(5): 3111–3126.
- [8] 秦 怡. EIF4A3通过稳定USP5调控PTK2去泛素化促进子宫内膜癌恶性进展的机制研究 [D]. 山西医科大学, 2025.
- [9] QIN Y. Mechanistic study on how EIF4A3 promotes the malignant progression of endometrial cancer by stabilizing USP5 to regulate PTK2 deubiquitination [D]. Shanxi Medical University, 2025.
- [9] MURALI P, KAVITHA B, NARASIMHAN M. Deubiquitinases and cancer [J]. J Pharm Bioallied Sci, 2024, 16(Suppl 5): S4210–

S4220.

- [10] KITAMURA H. Ubiquitin-specific proteases (USPs) and metabolic disorders [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 3219.
- [11] ZHENG B, ZHOU B, YE D, et al. LINC01572 promotes triple-negative breast cancer progression through EIF4A3-mediated β -catenin mRNA nuclear exportation [J]. Environ Toxicol, 2024, 39(5): 3026–3039.
- [12] CORR B R, ERICKSON B K, BARBER E L, et al. Advances in the management of endometrial cancer [J]. BMJ, 2025: e080978.
- [13] LEBEAU A, KAKKOS A, LEROI N, et al. Targeting synthetic lethality: An effective therapeutic approach in ovarian and endometrial cancers [J]. Ther Adv Med Oncol, 2025, 17: 17588359251392106.
- [14] LI H, SUN L, LING H, et al. Identification of a pyrazolo[3,4-b]pyridine chemotype for dual focal adhesion kinase 1/2 (FAK1/2) targeting in triple-negative breast cancer [J]. Bioorg Chem, 2026;179:110005.
- [15] KANG Y, HU W, IVAN C, et al. Role of focal adhesion kinase in regulating YB-1-mediated paclitaxel resistance in ovarian cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 2013, 105(19): 1485–1495.
- [16] CHEN L, DONG R, HUAN X. Deubiquitinating enzyme OTUDs: Focus on cancers and antiviral response [J]. Oncol Res, 2025, 33 (10): 2833–2856.
- [17] MENG J, AI X Y, LEI Y Y, et al. USP5 promotes epithelial-mesenchymal transition by stabilizing SLUG in hepatocellular carcinoma [J]. Theranostics, 2019, 9(2): 573–587.
- [18] LI C N, WU P J, XIE X T, et al. Aberrant Notch-signaling promotes tumor angiogenesis in esophageal squamous-cell carcinoma [J]. Signal Transduct Target Ther, 2025, 10: 233.
- [19] HARRIS SNELL P, NAELI P, GARZIA A, et al. Coordinated regulation of mRNA translation and stability by ZC3H7A and ZC3H7B RNA-binding proteins [J]. Cell Rep, 2026, 45(6): 117511.
- [20] HUANG X J, TAN W G, LIU Z T, et al. EIF4A3-induced circZFAND6 promotes breast cancer proliferation and metastasis through the miR-647/FASN axis [J]. Life Sci, 2023, 324: 121745.
- [21] JIANG X K, GUO S Q, WANG S, et al. EIF4A3-induced circARHGAP29 promotes aerobic glycolysis in docetaxel-resistant prostate cancer through IGF2BP2/c-Myc/LDHA signaling [J]. Cancer Res, 2022, 82(5): 831–845.
- [22] BLAIR H A. Avutometinib and defactinib: First approval [J]. Drugs, 2025, 85(10): 1319–1327.
- [23] DING L L, LI Y F, LIU H L, et al. Effects of pleiotrophin (PTN) on the FAK inhibitor Y15 in breast cancer cells [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 280: 135962.

(收稿日期: 2026-01-08 修回日期: 2026-05-29)

(责任编辑: 王琳辉)