

# RON/PI3K 信号通路在子宫内膜癌中的表达及临床意义

庄晓革 邵玲燕 林琼琼

**【摘要】** 目的 探讨酪氨酸激酶受体(RON)/磷酸酰肌醇 3-激酶(PI3K)信号通路在子宫内膜癌中的表达及临床意义。方法 收集子宫内膜癌组织 80 例(子宫内膜癌组),不典型增生子宫内膜组织 80 例(不典型增生组);收集同期 20 例因子宫肌瘤行全子宫切除术的正常子宫内膜组织(正常组)。采用 Western blot 法检测子宫内膜组织 RON、PI3K 和磷酸化 PI3K(pPI3K)蛋白表达水平,采用 RT-PCR 法检测子宫内膜组织 RON 和 PI3K mRNA 表达水平。结果 与正常组比较,子宫内膜癌组和不典型增生组 RON 和 pPI3K 蛋白表达水平均上升,PI3K 蛋白表达水平均下降,RON 和 PI3K mRNA 表达水平均下降,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。与不典型增生组比较,子宫内膜癌组 RON 和 pPI3K 蛋白表达水平均上升,PI3K 蛋白表达水平下降,RON 和 PI3K mRNA 表达水平均下降,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。子宫内膜癌患者术后随访时间为 1~60 个月,中位生存期为 44 个月,死亡 15 例。结论 RON/PI3K 信号通路与子宫内膜癌的发生、发展密切相关。

**【关键词】** 子宫内膜癌 酪氨酸激酶受体 磷酸酰肌醇 3-激酶

Expression and clinical significance of RON/PI3K signaling pathway in endometrioid adenocarcinoma ZHUANG Xiaoping, SHAO Lingyan, LIN Qiongqiong. Department of Pathology, Wenzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Wenzhou 325000, China

**【Abstract】** Objective To investigate the expression and clinical significance of RON/PI3K signaling pathway proteins in endometrioid adenocarcinoma. Methods The expression of RON, PI3K and pPI3K protein were detected by Western blot and the expression of RON and PI3K mRNA were detected by RT-PCR in 80 tissue samples of endometrioid adenocarcinoma, 80 samples of atypical hyperplasia endometriim and 20 sampels of normal endometrium. Results Compared with the normal endometrium, the expression levels of RON and pPI3K proteins in the endometrioid adenocarcinoma and the atypical hyperplasia were increased. However, the expression levels of PI3K proteins and RON and PI3K mRNA of the two groups were decreased(all  $P < 0.05$ ). Compared with the atypical hyperplasiap, the expression levels of RON and pPI3K proteins in the endometrioid adenocarcinoma were increased; however, the expression levels of PI3K proteins and RON and PI3K mRNA were decreased (all  $P < 0.05$ ). Conclusion Expressions of RON/PI3K signaling pathway may be associated with the development of endometrioid adenocarcinoma.

**【Key words】** Endometrioid adenocarcinoma RON PI3K

子宫内膜癌是女性生殖道最常见的恶性肿瘤之一。随着社会经济的发展,人们生活方式、饮食结构的改变以及雌激素等药物的广泛使用,子宫内膜癌发病率呈逐年上升趋势<sup>[1]</sup>。研究表明,酪氨酸激酶受体(RON)异常表达导致自身磷酸化,激活下游通路,而下游通路 RON/磷

酯酰肌醇 3-激酶(PI3K)是蛋白质合成的主要信号调节通路,该通路激活后可以产生一系列级联反应,从而促进细胞的增殖、侵袭、转移<sup>[2]</sup>。目前国内尚无 RON/PI3K 信号通路在子宫内膜癌中表达的相关报道。本研究通过检测 RON/PI3K 信号通路在子宫内膜癌中的表达,为设计新型靶向药物对该病患者进行精准治疗提供参考。

## 1 对象和方法

1.1 对象 收集 2010 年 1 月至 2013 年 1 月在温州市中西医结合医院妇产科住院的 160 例患者的子宫内膜组织,其中子宫内膜癌 80 例(子宫内膜癌组),不典型增生 80 例(不典型增生组);并收集同期 20 例因子宫肌瘤

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.14.2019-118

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2017KY630)

作者单位:325000 温州市中西医结合医院病理科(庄晓革);三门县人民医院病理科(邵玲燕);温州医科大学附属第二医院病理科(林琼琼)

通信作者:庄晓革,E-mail:lerang56@126.com

行全子宫切除术患者的正常子宫内膜组织(正常组)。本研究经温州市中西医结合医院医学伦理委员会批准通过,患者均签署知情同意书。

## 1.2 方法

1.2.1 试剂 兔抗人 RON(ab85063)、PI3K(ab32089)、磷酸化 PI3K(pPI3K)(ab182651)抗体均购自美国 Abcam 公司,RT-PCR 引物由大连 TAKARA 公司合成,E-CL 化学发光底物购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2.2 子宫内膜组织 RON、PI3K 和 pPI3K 蛋白表达水平检测 采用 Western blot 法。提取总蛋白,用 BCA 法测定总蛋白浓度。蛋白上样量 50 $\mu$ g,12%SDS-PAGE 凝胶电泳,湿转法转膜,5%脱脂奶粉室温封闭 2h,TBST 冲洗 15min $\times$ 3 次。加入兔抗人 RON(1:2 500 稀释)、PI3K(1:5 000 稀释)、pPI3K(1:5 000 稀释)抗体,室温孵育 1.5h,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。TBST 冲洗 15min $\times$ 3 次,加入二抗(1:5 000),室温孵育 1.5h,TBST 冲洗 10min $\times$ 3 次。加入 ECL 化学液,成像仪上进行曝光获得凝胶图像。应用 Image J 软件对目的蛋白和内参蛋白的灰度值进行分析,计算出目的蛋白的相对表达水平(目的蛋白与内参蛋白灰度值的比)。

1.2.3 子宫内膜组织 RON 和 PI3K mRNA 表达水平检测 采用 RT-PCR 法。严格按照 Trizol RNA 试剂盒说明提取总 RNA,并将 RNA 反转录为 cDNA。以同一 cDNA 为模板,PCR 反应体系为 20 $\mu$ l,反应条件如下:95 $^{\circ}$ C 预变性 30s;95 $^{\circ}$ C 5min,60 $^{\circ}$ C 30min,72 $^{\circ}$ C 1min,40 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min,至反应结束。引物序列:RON 上游引物:5'-AAGGATGTGCTGATTCCTCCCA-3',下游引物:5'-TACCAATGAGAGCCAGCACA-3';PI3K 上游引物:5'-CCTATTGTCGTGCATGTGGG-3',下游引物:5'-AATCTGGTGCCTCATTTGC-3';GAPDH 上游引物:5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3',下游引物:5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'。以 GAPDH 作为内参,RT-PCR 反应结束后得出目的基因及内参基因的 Ct 值,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行相对定量,每样本重复 3 次,最后取平均值。

1.3 子宫内膜癌患者术后随访 采用电话及定期复查的方式随访,随访截止时间为 2018 年 12 月 30 日,以死亡或复发、转移为随访终点。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3 组子宫内膜组织 RON、PI3K 和 pPI3K 蛋白表达

水平比较 与正常组比较,子宫内膜癌组和不典型增生组 RON 和 pPI3K 蛋白表达水平平均上升,PI3K 蛋白表达水平平均下降,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。与不典型增生组比较,子宫内膜癌组 RON 和 pPI3K 蛋白表达水平平均上升,PI3K 蛋白表达水平下降,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ ),见表 1 和图 1。

表 1 3 组子宫内膜组织 RON、pPI3K 和 PI3K 蛋白表达水平比较

组别	<i>n</i>	RON 蛋白	PI3K 蛋白	pPI3K 蛋白
子宫内膜癌组	80	0.635 $\pm$ 0.118 <sup>*<math>\Delta</math></sup>	0.131 $\pm$ 0.046 <sup><math>\Delta</math></sup>	0.508 $\pm$ 0.106 <sup>*<math>\Delta</math></sup>
不典型增生组	80	0.329 $\pm$ 0.041 <sup>*</sup>	0.223 $\pm$ 0.051 <sup>*</sup>	0.322 $\pm$ 0.051 <sup>*</sup>
正常组	20	0.251 $\pm$ 0.065	0.415 $\pm$ 0.050	0.107 $\pm$ 0.013
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05

注:与正常组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与不典型增生组比较, <sup>$\Delta$</sup>  $P<0.05$

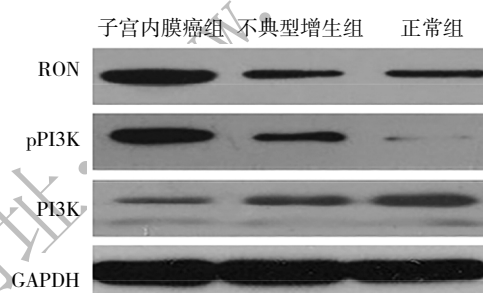


图 1 3 组子宫内膜组织 RON、PI3K 和 pPI3K 蛋白表达的电泳图

2.2 3 组子宫内膜组织 RON 和 PI3K mRNA 表达水平比较 与正常组比较,子宫内膜癌组和不典型增生组 RON 和 PI3K mRNA 表达水平平均下降,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。与不典型增生组比较,子宫内膜癌组 RON 和 PI3K mRNA 表达水平平均下降,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ ),见表 2。

表 2 3 组子宫内膜组织 RON 和 PI3K mRNA 表达水平比较

组别	<i>n</i>	RON mRNA	PI3K mRNA
子宫内膜癌组	80	6.852 $\pm$ 1.402 <sup>*<math>\Delta</math></sup>	7.516 $\pm$ 1.569 <sup>*<math>\Delta</math></sup>
不典型增生组	80	8.229 $\pm$ 1.723 <sup>*</sup>	8.374 $\pm$ 1.641 <sup>*</sup>
正常组	20	9.626 $\pm$ 2.248	9.675 $\pm$ 1.811
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05

注:与正常组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与不典型增生组比较, <sup>$\Delta$</sup>  $P<0.05$

2.3 子宫内膜癌患者术后随访情况 子宫内膜癌患者术后随访时间为 1~60 个月,中位生存期为 44 个月。死亡 15 例,复发/转移 3 例,无瘤生存 62 例。

## 3 讨论

肿瘤的侵袭和转移是一个动态生物学过程,涉及多种分子的异常表达和相关信号传导通路的调控。RON

属于人类受体酪氨酸激酶家族(RTK)中的 Met 原癌基因亚家族,其生物学效应主要是通过与巨噬细胞刺激蛋白(MSP)结合而活化,介导多种细胞内信号级联反应,在调节细胞生长、增殖、表型转化、侵袭迁移等多个方面起到重要作用<sup>[3]</sup>。本课题组前期研究发现 RON 蛋白在正常子宫内膜组织、不典型增生子宫内膜组织和子宫内膜癌组织中表达水平呈递增趋势;Cox 单因素回归分析显示,子宫内膜癌患者的预后与肿瘤组织学分级、c-Met/RON 异常表达、c-Met/RON 共同高表达有关;Cox 多因素回归分析显示,肿瘤组织学分级高(低分化)、c-Met/RON 共同高表达是子宫内膜癌预后不良的独立危险因素<sup>[4]</sup>。此外,本课题组在实验中还发现,RON 及其下游 PI3K 信号通路的异常激活<sup>[4]</sup>。这个结果与 Bieniasz 等<sup>[5]</sup>提出在缺氧状态下 RON 可通过激活 PI3K 介导细胞增殖、存活、迁移参与肿瘤的发生的研究结论一致。

PI3K 存在于细胞质中,是磷脂激酶家族中的一个重要成员<sup>[6]</sup>,具有脂类激酶活性与蛋白激酶活性。PI3K 主要从酪氨酸激酶连接受体传递信号,当 RON 与特异性配体 MSP 结合后,通过 RON 受体分子二聚化而产生自身激酶域的磷酸化,与 p85 $\alpha$  上的 SH2 区结合,引起 PI3K I A 二聚体构象改变而激活 PI3K<sup>[7]</sup>。PI3K 激活后在质膜上产生第二信使三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3),PIP3 通过与 Akt 的 N 端 PH 结构域结合,将蛋白激酶 B(Akt)转位于细胞膜上。同时,在 3-磷酸肌醇依赖性激酶 1(PDK1)协助下,催化 Akt 蛋白的苏氨酸磷酸化位点(Thr308)磷酸化,并通过 3-磷酸肌醇依赖性激酶 2(PDK2)催化丝氨酸磷酸化位点(Ser473)磷酸化,从而最大限度激活 Akt<sup>[8]</sup>。过度活化的 Akt 激活其下游哺乳动物雷帕霉素靶蛋白,可以引起肿瘤细胞的快速增殖、蛋白分泌增加、细胞周期加快、G1 期时程缩短,从而促进肿瘤的迅速发生、发展<sup>[9-11]</sup>。因此,RON/PI3K 信号通路是蛋白质合成的主要信号调节通路,参与细胞增殖、分化、迁移等的调节。目前已有研究发现 RON 及其下游信号通路的异常激活(如 PLC $\gamma$ /DAG/PKC 通路、PI3K/Akt 通路、Ras/Raf/MAPK 通路等)与膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、胆管癌、前列腺癌等<sup>[12-16]</sup>多种恶性肿瘤的发生、发展密切相关,有可能成为肿瘤治疗的一个潜在的重要靶点,因而备受关注。RT-PCR 法证实,与不典型增生组和正常组比较,子宫内膜癌组 RON 和 PI3K mRNA 表达水平均下降,表明 RON/PI3K 与子宫内膜癌发生、发展有密切关系。

RON/PI3K 牵涉各种肿瘤的进展和转移,包括黏附、侵袭、迁移、增殖、抑制凋亡。Ling 等<sup>[2]</sup>研究 RON $\Delta$ 165E2

变异体通过张力蛋白同源蛋白(PTEN)磷酸化激活 PI3K/AKT 通路,促使肿瘤的发生,在 67 例人类结肠直肠癌样本中,约 58% 的样本存在该变异体高表达,并且与肿瘤浸润深度也呈正相关。Liu 等<sup>[7]</sup>发现短小 RON 能通过 PI3K 信号通路来自发主动地引起乳腺癌细胞的转移。PI3K 通常以无活性的方式存在细胞质中,受到一些基因刺激后 pPI3K 磷酸化激活,进一步激活其下游因子如 B 细胞淋巴瘤因子 2(Bcl-2)家族、p53、叉头转录因子等,从而促进肿瘤细胞的凋亡、增殖、分化及迁移。本研究 Western blot 法检测结果显示 RON 和 pPI3K 蛋白在子宫内膜癌组表达最高,而在不典型增生组表达量较少,正常组最弱,提示 RON 和 pPI3K 表达量随着子宫内膜癌的进展是逐渐增加的,其肿瘤恶性程度越高,pPI3K 磷酸化越明显,进一步证实 RON 通过刺激 pPI3K 磷酸化,激活 PI3K 信号通路途径促进子宫内膜癌的浸润、转移。

综合文献证据和本课题研究结果,可以认为 RON/PI3K 与子宫内膜癌的发生、发展相关,两者有可能作为肿瘤标志物用于子宫内膜癌的诊断和治疗,这为笔者了解 RON 调控子宫内膜癌转移的机制拓展了思路,同时也为子宫内膜癌转移机制的研究和相关靶向新药物的研发提供新的启示。

#### 4 参考文献

- [1] Raglan O, Kalliala I, Markozannes G, et al. Risk Factor for Endometrial Cancer: An umbrella review of the literature[J]. Int J Cancer, 2018. DOI:10.1002/ijc.31961.[Epub ahead of print]
- [2] Ling Y, Kuang Y, Chen LL, et al. A novel RON splice variant lacking exon 2 activates the PI3K/AKT pathway via PTEN phosphorylation in colorectal carcinoma cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(24): 39101-39116. DOI:10.18632/oncotarget.16603.
- [3] Han Z, Harris PK, Karmakar P, et al.  $\alpha$ -Ketobenzothiazole Serine Protease Inhibitors of Aberrant HGF/c-MET and MSP/RON Kinase Pathway Signaling in Cancer[J]. Chem Med Chem, 2016, 11(6):585-599. DOI:10.1002/cmdc.201500600.
- [4] Zhuang XP, Jin WW, Teng XD, et al. c-Met and RON expression levels in endometrial adenocarcinoma tissue and their relationship with prognosis[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2015, 36(3):255-259.
- [5] Bieniasz M, Radhakrishnan P, Faham N, et al. Preclinical Efficacy of Ron Kinase Inhibitors Alone and in Combination with PI3K Inhibitors for Treatment of sfRon-Expressing Breast Cancer Patient-Derived Xenografts[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(24):5588-5600. DOI:10.1158/1078-0432.
- [6] Li H, Zeng J, Shen K. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway as a therapeutic target for ovarian cancer[J]. Arch Gynecol Obstet, 2014, 290(6): 1067-1078. DOI:10.1007/s00404-014-3377-3.
- [7] Hervieu A, Kermorgant S. The Role of PI3K in Met Driven Cancer: A Recap[J]. Front Mol Biosci, 2018, 5:86. DOI:10.3389/fmolb.2018.

- 00086.
- [8] Ersahin T, Tuncbag N, Cetin-Atalay R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway[J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11(7):1946–1954. DOI: 10.1039/c5mb00101c.
- [9] Mabuchi S, Kuroda H, Takahashi R, et al. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 137(1):173–179. DOI: 10.1016/j.ygyno.2015.02.003.
- [10] Mayer IA, Arteaga CL. The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment[J]. *Annu Rev Med*, 2016, 67:11–28. DOI: 10.1146/annurev-med-062913-051343.
- [11] Chen H, Zhou L, Wu X, et al. The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2016, 1(21):1084–1091.
- [12] Chen JF, Yu BX, Ma L, et al. RON is overexpressed in bladder cancer and contributes to tumorigenic phenotypes in 5637 cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5):6547–6554. DOI: 10.3892/ol.2018.8135.
- [13] Sehrawat A, Singh SV. Short-form RON overexpression augments benzyl isothiocyanate-induced apoptosis in human breast cancer cells[J]. *Mol Carcinog*, 2016, 55(5):473–485. DOI: 10.1002/mc.22295.
- [14] Mayer S, Hirschfeld M, Jaeger M, et al. RON alternative splicing Regulation in primary ovarian cancer[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(1): 423–430. DOI: 10.3892/or.2015.395.
- [15] Hayashi Y, Yamaguchi J, Kokuryo T, et al. The Complete Loss of Throsine Kinase Receptors MET and RON Is a Poor Prognostic Factor in Patients with Extrahepatic Cholangiocarcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(12):6585–6592.
- [16] Yin B, Liu Z, Wang Y, et al. RON and c-Met facilitate metastasis through the ERK signaling pathway in prostate cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(6): 3209–3218. DOI: 10.3892/or.2017.5585.
- [17] Liu X, Zhao L, Derose YS, et al. Short-Form Ron Promotes Spontaneous Breast Cancer Metastasis through Interaction with Phosphoinositide 3-Kinase[J]. *Genes Cancer*, 2011, 2(7):753–762. DOI: 10.1177/1947601911421924.
- (收稿日期: 2019-01-09)  
(本文编辑: 陈丽)

(上接第 1463 页)

- [6] 《乳腺癌 HER2 检测指南(2014 版)》编写组. 乳腺癌 HER2 检测指南(2014 版)[J]. *中华病理学杂志*, 2014, 43(4): 262–267. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2014.04.012.
- [7] 《乳腺癌 HER2 检测指南(2019 版)》编写组. 乳腺癌 HER2 检测指南(2019 版)[J]. *中华病理学杂志*, 2019, 48(3): 169–175. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2019.03.001.
- [8] 刘月平, 步宏, 杨文涛. 2019 版中国乳腺癌 HER2 检测指南更新解读[J]. *中华病理学杂志*, 2019, 48(3): 182–185. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2019.03.003.
- [9] Vance GH, Barry TS, Bloom KJ, et al. Genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer: panel summary and guidelines[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2009, 133(4): 611–612. DOI: 10.1043/1543-2165-133.4.611.
- (本文由浙江省医学会推荐)  
(收稿日期: 2019-04-18)  
(本文编辑: 陈丽)

(上接第 1467 页)

- via increasing the Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 expression in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer in vitro and in vivo [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(6): 2265–2272. DOI: 10.3892/mmr.2014.2108.
- [15] Shi J, Zhang M, Zhang L, et al. Epigallocatechin-3-gallate attenuates microcystin-LR-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells through activation of the NRF2/HO-1 pathway[J]. *Environ Pollut*, 2018, 239: 466–472. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.04.038.
- [16] Yan X, Li Y, Yu H, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in Mouse Vascular Smooth Muscle Cells via 67kD Laminin Receptor[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7774. DOI: 10.1038/s41598-017-08301-6.
- [17] Du K, Liu M, Zhong X, et al. Epigallocatechin Gallate Reduces Amyloid beta-Induced Neurotoxicity via Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62(8): e1700890. DOI: 10.1002/mnfr.201700890.
- (收稿日期: 2019-04-23)  
(本文编辑: 陈丽)