

米非司酮通过抑制 Rab27a 和 Rab27b 的表达对子宫内膜癌细胞增殖的抑制作用

李森森, 宋渊博

河南大学附属南石医院 妇产科, 河南 南阳 473000

摘要: **目的** 研究米非司酮在子宫内膜癌中的功能和潜在分子机制。**方法** 通过细胞增殖实验研究不同质量浓度(10、50、100 $\mu\text{g/mL}$)米非司酮以及随着时间变化米非司酮对子宫内膜癌细胞的影响;蛋白免疫印记实验及免疫荧光实验研究米非司酮(50 $\mu\text{g/mL}$)对子宫内膜癌细胞内外泌体分泌、外泌体调控关键蛋白的表达、外泌体关键调控蛋白对外泌体分泌的影响。**结果** 随着加入子宫内膜癌细胞内的米非司酮质量浓度升高和时间推移,子宫内膜癌细胞增殖速率显著减慢,同时细胞状态变差,数目显著减少;米非司酮显著降低外泌体蛋白胞外分泌,包括外泌体总蛋白以及标志蛋白 CD63 和 Gp96 等,使其滞留在胞内;米非司酮显著降低外泌体分泌调控蛋白 Rab27a 和 Rab27b 的表达;敲低外泌体分泌调控蛋白 Rab27a 和 Rab27b 的表达显著降低外泌体总蛋白以及标志蛋白 CD63 的胞外分泌。**结论** 米非司酮通过抑制外泌体分泌调控蛋白 Rab27a 和 Rab27b 的表达,从而抑制外泌体分泌,最终导致子宫内膜癌细胞增殖显著减慢。

关键词: 米非司酮;子宫内膜癌;外泌体;增殖

中图分类号: R984

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2020)11-2131-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.11.004

Inhibition of mifepristone on proliferation of endometrial cancer cells by inhibiting Rab27a and Rab27b expression

LI Sen-sen, SONG Yuan-bo

Department of Obstetrics and Gynecology, Nanshi Hospital Affiliated to Henan University, Nanyang 473000, China

Abstract: Objective To study the function and potential molecular mechanism of mifepristone on endometrial cancer. **Methods** Cell proliferation experiments was used to study the effects of different concentrations of mifepristone on endometrial cancer cells, and the effects of mifepristone on endometrial cancer cells over time. Western blotting and immunofluorescence experiments were used to study the effects of mifepristone on exocrine secretion, expression of key exosome regulatory proteins, and key exosome regulatory proteins on exosome secretion of endometrial cancer cells. **Results** With the increase of mifepristone concentration in the endometrial cancer cells and the passage of time, the proliferation rate of the endometrial cancer cells significantly slowed down, and at the same time, the state of the cells deteriorated, and the number decreased significantly. Mifepristone could significantly reduce the extracellular secretion of exosomal proteins, including total exosome proteins and marker proteins CD63 and Gp96, so that it remained in the cell. Mifepristone could significantly reduce the exosome secretion regulatory proteins Rab27a and Rab27b expression. The extracellular secretion of total exosomal protein and marker protein CD63 reduced significantly by knocking down the expression of exosome secretion regulatory proteins Rab27a and Rab27b. **Conclusion** Mifepristone can inhibit the expression of exosome secretory regulatory proteins Rab27a and Rab27b, thereby inhibiting exosome secretion, which ultimately leads to a significant slowdown of endometrial cancer cell proliferation.

Key words: mifepristone; endometrial cancer; exosomes; proliferation

随着现代生活水平的提高及生活节奏的加快, 肿瘤发病率呈增加趋势, 女性患子宫内膜癌的风险

也在加大。子宫内膜癌的大部分患者为年龄 50 岁以上的女性。雌激素紊乱是一个重要的致癌因素, 雌

收稿日期: 2020-06-10

基金项目: 河南省重点科技计划项目(2019BJ0366)

作者简介: 李森森(1984—), 女, 本科, 主治医师, 研究方向为妇科肿瘤诊治。E-mail: 54691526@qq.com

激素的长期紊乱则会导致子宫内膜癌^[1]。而影响雌激素紊乱的因素主要有肥胖、多囊卵巢综合征(PCOS)、无排卵、无怀孕和2型糖尿病^[2],这些因素也被认为是增加子宫内膜癌的致癌因素。子宫内膜增生,即子宫内膜腺的不规则增生,在某些情况下被认为是子宫内膜癌的前兆。与子宫内膜癌一样,“非典型”增生的风险最高,目前,治疗子宫内膜癌的手段主要是子宫切除术。

外泌体是由细胞分泌的细胞外囊泡,外泌体可以携带多种蛋白质、mRNA和miRNA^[3]。外泌体参与许多细胞生物学过程,包括细胞传导、细胞迁移、血管生成和肿瘤细胞生长过程。肿瘤来源的外泌体通常携带独特的基因或蛋白质。通过外分泌,肿瘤细胞可以促进癌基因、功能蛋白分子、肿瘤相关microRNA的移位,从而引起肿瘤微环境的改变和重编程,并影响肿瘤的发生、发展和转移。

米非司酮是一种常见的孕激素受体拮抗剂,被广泛用作抗妊娠药,也可用于妇科手术中^[4-5]。在最近的研究中发现米非司酮对多种肿瘤细胞也具有抑制作用,如乳腺癌和前列腺癌,尤其是抑制妇科相关肿瘤细胞^[6-8]。它可以有效抑制子宫肌瘤中所含的孕激素受体,并缩小子宫肌瘤的大小^[9]。研究也发现患者每天服用米非司酮5、10 mg的剂量可以有效维持子宫肌瘤治疗3~12个月^[10-11]。一种解释是米非司酮可以降低肿瘤周围的孕酮水平,因此,它最终可以达到抑制子宫肌瘤生长的作用^[12]。其他解释是米非司酮可以阻断神经酰胺糖基化并促进细胞凋亡,减少MDR相关蛋白和P-糖蛋白的胞吐作用,增强DNA修复能力并调节抑癌基因的表达^[13]。也有报道研究米非司酮对子宫内膜癌的影响^[14],但尚无确切机制。故本研究进一步探讨米非司酮对子宫内膜癌细胞增殖的影响及外泌体相关的机制,为其临床应用及新用途拓展提供参考。

1 材料

1.1 细胞

人子宫内膜癌细胞HEC1A购于美国ATCC细胞库。

1.2 试剂

胎牛血清(FBS)、McCoy's 5a改良培养基、胰蛋白酶、PVDF膜、ECL发光显色液购自美国Thermo Fisher公司;Trizol试剂、脂质体2000购自美国Invitrogen公司;米非司酮(M8046-1G)购自Sigma公司;Rab27a和Rab27b siRNA购自广州市锐博生

物科技有限公司;逆转录试剂及荧光定量PCR试剂购自宝生物工程(大连)有限公司;BCA蛋白浓度检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;鼠抗人HLA-DR多克隆抗体、抗CD63抗体、抗Rab27a抗体购自Zymed公司;大鼠抗人Gp96抗体购自Stressgen公司;兔抗人Rab27b抗体、抗 β -Actin抗体及HRP偶联二抗购自英国Abcam公司。

1.3 仪器

ABI 7500型实时定量PCR仪购自美国应用生物系统有限公司;BIO-RAD Powerpac Universal通用型电泳仪购自美国伯乐公司;Multiskan Sky IVD型全波长酶标仪购自美国伯乐公司。

2 方法

2.1 细胞培养

人子宫内膜癌细胞HEC1A培养在含10%胎牛血清的McCoy's 5a改良培养基中,并加入100 μ g/mL链霉素和100 U/mL青霉素,细胞培养瓶置于含5% CO₂和95%湿度的37℃培养箱中。

2.2 转染

以6孔板转染siRNA为例:将1 μ L siRNA与250 μ L无血清Opti-MEM培养基混匀,1 μ L脂质体2000与250 μ L无血清Opti-MEM混匀,室温放置5 min,然后将2部分合并,混匀,静置15 min,逐滴、均匀加入6孔板中。

2.3 细胞增殖实验

消化长满的10 cm培养皿的细胞,重悬于1 mL新鲜培养基中,调整细胞数目为 1×10^5 个/mL,用20 μ L可铺1个96孔板的密度铺细胞,每个实验组需3个生物重复,铺好所需的实验孔数。在5% CO₂、37℃条件下孵育。细胞贴壁后实验组即可换含有不同质量浓度(10、50、100 μ g/mL)米非司酮的培养基培养,用新鲜培养基做对照。在细胞培养12、24、36、48 h时,每孔加入100 μ L MTS反应溶液(按照MTS与培养液1:20的比例配制反应液),37℃继续培养,孵育4 h后检测吸光度(A)值。将培养皿置摇床上低速振荡10 s以充分溶解结晶物,在490 nm处测量各孔的A值,并绘制细胞增殖曲线。

2.4 免疫荧光实验

细胞分组及处理同“2.3”项,将细胞以 1×10^5 /mL接种在玻璃盖玻片上18 h,固定在4%多聚甲醛中,用0.1 mol/L甘氨酸淬灭,在0.2% PBS-0.05% BSA中透化,并与一级(1:100)和二级(1:200)荧光抗体孵育。在荧光倒置显微镜下

进行图像采集。

2.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验

细胞分组及处理同“2.3”项, 使用 primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) 设计特异性 qRT-PCR 引物; cDNA 用灭菌纯水稀释适当的浓度, 一般稀释 20 倍, 按照 qRT-PCR mix 5 μL , primer 1 μL , cDNA 4 μL 的配方加入到 96 孔 PCR 板中; 贴膜, 以 2 500 r/min 离心 1 min, 将样品放入 qRT-PCR 仪器中进行实验, 反应完成后, 拷贝数据, 进行分析。

2.6 蛋白质免疫印迹实验

细胞分组及处理同“2.3”项, 收集细胞进行蛋白定量并制样, 准备电泳、电转装置, 电泳液以及电转液, 装样品加入在凝胶中, 100 V 进行电泳, 待蓝色条带跑出即进行电转, 100 V 电转 2 h, 将蛋白膜放在牛奶中封闭 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗 (1:1 000) 过夜, 洗膜 4 次, 每次 5 min, 室温孵育二抗 (1:5 000) 1 h, 洗膜 4 次, 每次 5 min, 暗房显影。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 2.0 统计学软件对实验结果进行分析, 每个实验均设计 3 次重复, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 米非司酮抑制子宫内膜癌细胞增殖

细胞增殖实验显示, 在子宫内膜癌细胞培养时分别加入 0、10、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 米非司酮, 细胞增殖率随着质量浓度的升高显著降低, 见图 1。显微镜观察也发现随着米非司酮质量浓度的增加, 细胞形态改变, 且数目逐渐减少, 见图 2。结果表明米非司酮可以抑制子宫内膜癌细胞增殖。

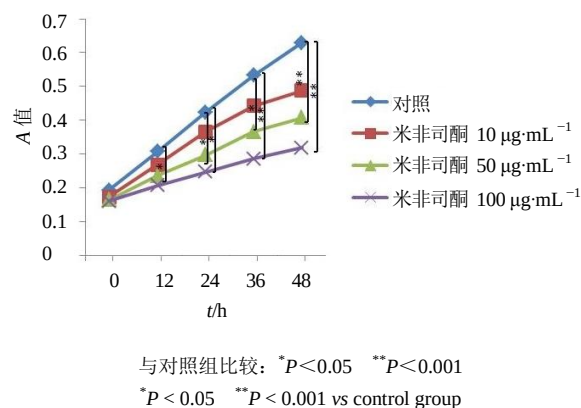


图 1 米非司酮对 HEC1A 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Fig. 1 Effect of mifepristone on proliferation of HEC1A cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

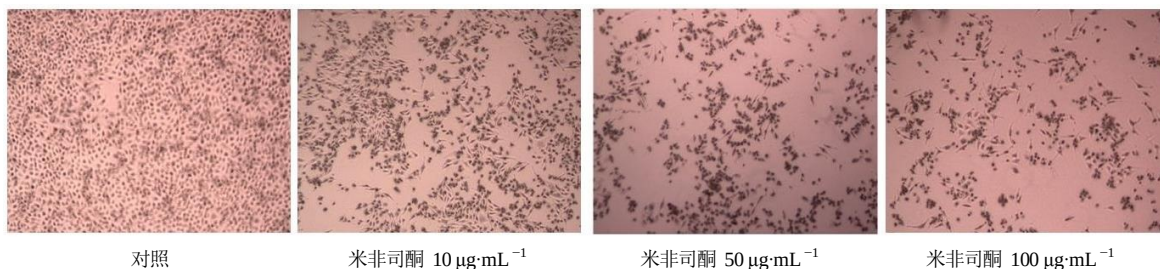


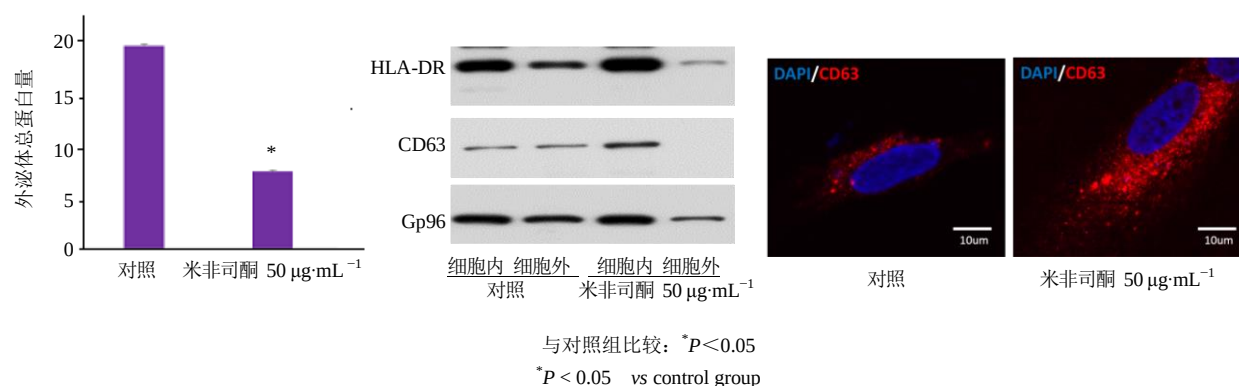
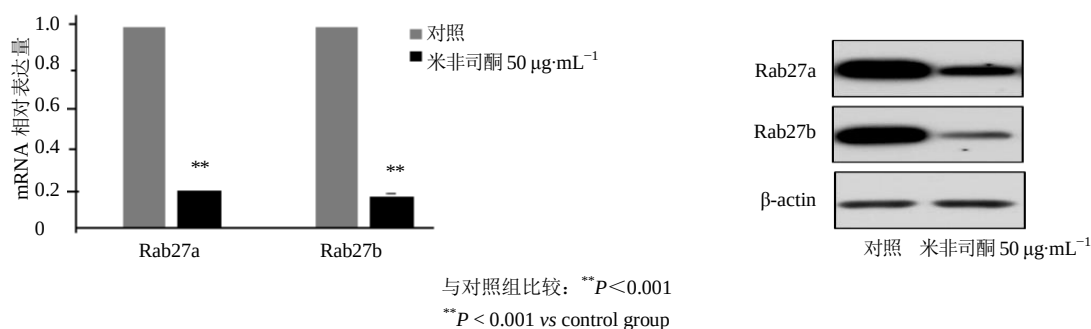
图 2 米非司酮对 HEC1A 细胞形态的影响
Fig. 2 Effect of mifepristone on morphology of HEC1A cells

3.2 米非司酮抑制子宫内膜癌细胞外泌体分泌

为探究米非司酮抑制子宫内膜癌细胞增殖的机制, 以加入米非司酮 50 $\mu\text{g/mL}$ 为研究对象, 发现经米非司酮处理后, 细胞外总外泌体蛋白量显著减少, 同时相比于对照细胞, 米非司酮处理后, 细胞外泌体标志蛋白 HLA-DR、CD63 和 Gp96 被分泌到细胞外的量显著减少, 相反滞留在细胞内的量增加。说明米非司酮可能是通过抑制外泌体分泌从而抑制子宫内膜癌细胞增殖。结果见图 3。

3.3 米非司酮通过调控 Rab27a 和 Rab27b 的表达从而调控外泌体分泌

有文献报道, Rab27a 和 Rab27b 显著调控外泌体分泌^[15], 因此观察米非司酮对 Rab27a 和 Rab27b 的调控影响, 发现相比于对照组, 加入米非司酮可显著降低 Rab27a 和 Rab27b 的转录和表达, 说明米非司酮可能是通过抑制 Rab27a 和 Rab27b 的表达进而抑制了外泌体分泌, 最终导致细胞增殖减慢。结果见图 4。

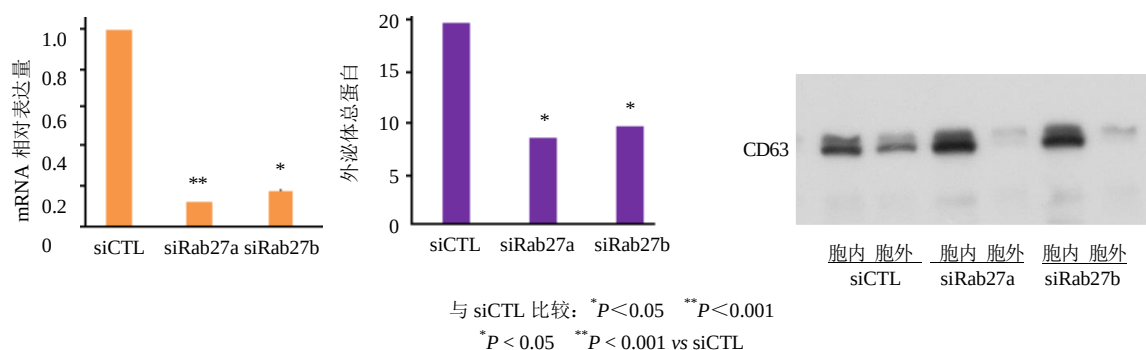
图 3 米非司酮抑制子宫内膜癌细胞外泌体分泌 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 3 Effect of mifepristone on exocrine secretion of endometrial cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 4 米非司酮对 Rab27a 和 Rab27b 的 mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effect of mifepristone on mRNA and protein expression of Rab27a and Rab27b ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 敲低 Rab27a 和 Rab27b 的表达可显著抑制外泌体分泌

为了进一步验证上述结论, 敲低 Rab27a 和 Rab27b 在 HEC1A 细胞中的表达, 发现相比于对照组, 敲低 Rab27a 和 Rab27b 表达后, 分泌到细胞外的外泌体总蛋白量显著减少, 同时外泌体标志蛋白 CD63 被分泌到细胞外的量也显著减少, 结果见图 5。说明米非司酮通过抑制 Rab27a 和 Rab27b 的表达, 进而抑制外泌体分泌, 最终导致细胞增殖减慢。

4 讨论

米非司酮可以发挥抗肿瘤作用, 可以选择性抑制多种肿瘤的形成和发展^[16-18], Liu 等^[19]证明米非司酮可以作为治疗三阴性乳腺癌的潜在药物, 并通过体内和体外实验, 发现米非司酮可以显著抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖并促进其凋亡, 其机制与下调 KLF5 的表达有关。KLF5 是细胞核内关键转录因子, 能够维持三阴性乳腺癌细胞干性^[20-21], Jurado 等^[22]发现米非司酮可以大大提高顺铂对宫颈癌的

图 5 敲低 Rab27a 和 Rab27b 的表达对外泌体分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 5 Effect of knocking down the expression of exosome secretion regulatory proteins Rab27a and Rab27b on exosome secretion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

治疗作用。建议将抗激素药与抗癌药联合用于宫颈癌和其他癌症的治疗可大大提高治疗效果。但是,尚未对相关机制进行深入研究。Lu等^[14]使用不同浓度的米非司酮来研究其对人子宫内膜癌细胞迁移的影响,发现米非司酮可以通过促进H19启动子的甲基化来抑制H19转录水平,最终导致E-钙黏着蛋白表达的上调,并产生对人子宫内膜癌细胞迁移的抑制作用。

在本研究中,首先通过细胞增殖实验,在给予子宫内膜癌细胞培养时分别加入0、10、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 米非司酮,结果发现细胞增殖速率、细胞形态及数目均随着质量浓度的升高显著降低。说明米非司酮可以抑制子宫内膜癌细胞增殖,且随着米非司酮质量浓度的升高,抑制效果显著增加。为了探究米非司酮抑制子宫内膜癌细胞增殖的机制,本研究发现米非司酮可显著抑制外泌体总蛋白的分泌,显著减少标志性地分泌蛋白CD63和Gp96的分泌,使其被滞留在细胞内,而Rab27a和Rab27b作为调控外泌体分泌的重要蛋白,推测米非司酮可能是通过调控Rab27a和Rab27b的表达进而调控外泌体分泌。对加入米非司酮的子宫内膜癌细胞检测了Rab27a和Rab27b的表达,发现相比于对照组,不论是mRNA水平还是蛋白水平,米非司酮都显著降低了其表达;同时也验证了敲低Rab27a和Rab27b的表达,显著降低外泌体总蛋白的胞外分泌,CD63这个标志性地分泌蛋白的胞外分泌也随之减少。由此,说明米非司酮是通过抑制Rab27a和Rab27b的表达,从而抑制外泌体分泌,最终导致子宫内膜癌细胞增殖减慢。

参考文献

- [1] Sweet M G, Schmidt-Dalton T A, Weiss P M, et al. Evaluation and management of abnormal uterine bleeding in premenopausal women [J]. *Am Fam Physician*, 2012, 85(1): 35-43.
- [2] Colombo N, Preti E, Landoni F, et al. Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(Suppl 6): vi33-vi38.
- [3] Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor micro-environment influence cancer progression and metastasis [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(4): 431-437.
- [4] Check J H, DiAntonio G, DiAntonio A, et al. The progesterone receptor antagonist mifepristone does not lower serum progesterone induced blocking factor (PIBF) in the presence of progesterone [J]. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2016, 43(2): 189-191.
- [5] Heikinheimo O, Leminen A, Cacciatore B, et al. Advanced cervical pregnancy: Uterus-sparing therapy initiated with a combination of methotrexate and mifepristone followed by evacuation and local hemostatic measures [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2004, 83(2): 211-213.
- [6] Liguori M, Lanari C, Gass H, et al. Abstract OT1-04-02: Mifepristone treatment for breast cancer patients expressing levels of progesterone receptor isoform A (PRA) higher than those of isoform B (PRB) [C] // Ongoing Clinical Trials. American Association for Cancer Research, 2018: 51-57.
- [7] Zhou H, Jachan N, Singh M, et al. Abstract 4172: Activation of AR signaling by mifepristone enhances prostate cancer growth and impairs enzalutamide response [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(13 Suppl): 4172.
- [8] Chen H, Duan J, Zuo F. Mechanism of the reversal effect of mifepristone on drug resistance of the human cervical cancer cell line HeLa/MMC [J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(1): 1288-1295.
- [9] Liu C, Lu Q, Qu H, et al. Different dosages of mifepristone versus enantone to treat uterine fibroids: a multicenter randomized controlled trial [J]. *Medicine*, 2017, 96(7): e6124.
- [10] Carbonell Esteve J L, Riverón A M, Cano M, et al. Mifepristone 2.5 mg versus 5 mg daily in the treatment of leiomyoma before surgery [J]. *Int J Womens Health*, 2012, 4: 75-84.
- [11] Esteve J L C, Acosta R, Pérez Y, et al. Treatment of uterine myoma with 5 or 10 Mg mifepristone daily during 6 months, post-treatment evolution over 12 months: Double-blind randomised clinical trial [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reproductive Biol*, 2012, 161(2): 202-208.
- [12] Check J H, Check D, Cohen R, et al. Mifepristone causing complete remission of rapidly advancing leukemia with measurement of progesterone-induced blocking factor [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(5): 2413-2416.
- [13] Rekawiecki R, Kowalik M K, Kotwica J. Onapristone (ZK299) and mifepristone (RU486) regulate the messenger RNA and protein expression levels of the progesterone receptor isoforms A and B in the bovine endometrium [J]. *Theriogenology*, 2015, 84(3): 348-357.
- [14] Lu Z Z, Yan L, Zhang H, et al. Mifepristone inhibits the migration of endometrial cancer cells through regulating H19 methylation [J]. *Chin J Oncol*, 2016, 38(6): 411-416.

- [15] Ostrowski M, Carmo N B, Krumeich S, *et al.* Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(1): 19-30.
- [16] de Bruin C, Hofland L J, Nieman L K, *et al.* Mifepristone effects on tumor somatostatin receptor expression in two patients with Cushing's syndrome due to ectopic adrenocorticotropin secretion [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(2): 455-462.
- [17] Wang Y, Yang D, Song L, *et al.* Mifepristone-inducible caspase-1 expression in mouse embryonic stem cells eliminates tumor formation but spares differentiated cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Stem Cells*, 2012; 30(2): 169-179.
- [18] Cerliani J P, Giulianelli S, Sahores A, *et al.* Mifepristone inhibits MPA-and FGF2-induced mammary tumor growth but not FGF2-induced mammary hyperplasia [J]. *Medicine (Baires)*, 2010, 70(6): 529-532.
- [19] Liu R, Shi P G, Nie Z, *et al.* Mifepristone suppresses basal triple-negative breast cancer stem cells by down-regulating KLF5 expression [J]. *Theranostics*, 2016, 6(4): 533-544.
- [20] Shi P G, Liu W J, Tala, *et al.* Metformin suppresses triple-negative breast cancer stem cells by targeting KLF5 for degradation [J]. *Cell Discov*, 2017, 3: 17010.
- [21] Chen C S, Qin J Y, Zhou Z M. Abstract 4967: The BAP1 deubiquitinase promotes triple-negative breast cancer partially by stabilizing the KLF5 transcription factor [C] // Molecular and Cellular Biology. American Association for Cancer Research, 2015: 36-42.
- [22] Jurado R, López-Flores A, Álvarez-Figueroa A, *et al.* Synergistic effects of mifepristone on the cytotoxicity of cisplatin in cervical carcinoma cell lines and tumors grown in athymic mice [J]. *BMC Cancer*, 2007, 7(1): 1.