网络出版时间:2019 - 6 - 10 17:48 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190606.1643.004.html

NLRC5 抑制自噬促进子宫内膜癌细胞增殖的研究

姚 顺,詹 磊,孙士莹,王文艳,卫 兵

摘要 **目的** 初步探究 NLRC5 对子宫内膜癌细胞 AN3CA 增殖的作用及其机制。**方法** 选取 20 例子宫内膜癌患者手术切除的子宫内膜腺癌标本及门诊病理显示正常的子宫内膜标本 20 例,免疫组化实验检测子宫内膜癌组织和正常子宫内膜组织标本中 NLRC5 及自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 的表达。Western blot 及 qRT-PCR 法检测子宫内膜癌组织和正常子宫内膜组织标本及子宫内膜癌 AN3CA 细胞中 NLRC5 及自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 的表达。CCK-8 法检测 AN3CA 细胞增殖。**结果** 子宫内膜癌组与正常子宫内膜组相比,NLRC5 蛋白表达下调,自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 表达上调($P<0.05$);转染 NLRC5 质粒后,转染组与未转染组相比,自噬蛋白 Beclin1、LC3 的蛋白表达水平显著下调($P<0.05$);转染 NLRC5 质粒后,转染组与未转染组相比,细胞增殖明显增加($P<0.05$);转染 NLRC5 质粒后并加自噬激动剂雷帕霉素,结果显示,转染 NLRC5 质粒组与未转染 NLRC5 质粒组相比,细胞增殖明显增加($P<0.05$);转染 NLRC5 质粒后同时加雷帕霉素组与只转染 NLRC5 质粒组相比,细胞自噬水平升高,但细胞增殖明显下降($P<0.05$)。**结论** NLRC5 可能通过抑制自噬进而促进子宫内膜癌细胞增殖。

关键词 NLRC5;自噬;子宫内膜癌;细胞增殖
中图分类号 R 711.74
文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2019)07 - 1022 - 06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2019.07.004

2019 - 03 - 26 接收
基金项目:国家自然科学基金(编号:81802586);安徽省公益性研究联动计划项目(编号:5101ID04041)
作者单位:安徽医科大学第二附属医院妇产科,合肥 230601
作者简介:姚 顺,男,硕士研究生;
卫 兵,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:weibing1965@163.com

子宫内膜癌(endometrial cancer,EC)作为最常见的女性生殖系统癌症之一,是第六大肿瘤死亡原因,而且 EC 在年轻女性中的发病率正在上升,流行病学调查显示每年全世界有超过280 000个女性被诊断为 EC 患者[1]。目前临床上 EC 的治疗主要包

Preparation and *in vitro*/*in vivo* effect of antitumor evaluation of biomimetic nanoerythrocyte targeting drug delivery system

Wei Kaiyan, Fu Xudong, Wang Xinjun, et al
(*Dept of Neurosurgery, The Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou* 450052)

Abstract ***Objective*** To construct arginine-glycine-aspartate (RGD)-modified doxorubicin (DOX)-based biomimetic nano-erythrocyte (NE) targeted drug delivery system RGD-NE-DOX, and to evaluate its anti-tumor effect *in vitro* and *in vivo*. ***Methods*** NE-DOX was prepared by physical extrusion method, and modified by RGD to construct RGD-NE-DOX. The particle size, zeta potential and appearance were detected. The loading content (LC), encapsulation efficiency (EE) and the release profiles *in vitro* was determined. Cell uptake and targeting ability were observed by laser scanning confocal microscopy. Then the distribution of tissue *in vivo* and the pharmacodynamics were studied. ***Results*** The prepared RGD-NE-DOX was spherical. The mean particle size was (197.41 ± 2.27) nm, PDI was (0.21 ± 0.02), zeta potential was (-16.87 ± 1.51) mV, LC was (14.8 ± 1.2)% and EE was (58.69 ± 3.7)%. Compared with free DOX, burst release of RGD-NE-DOX was effectively reduced and sustained release was obvious. The uptake of RGD-NE-DOX was much more than NE-DOX and DOX by MCF-7 cell but rarely by Hs578Bst cell. The image of distribution *in vivo* demonstrated the good targeting capacity and long circulation. The study of pharmacodynamics showed better anti-tumor efficacy ($P<0.05$) and biocompatibility. ***Conclusion*** Thebiomimetic nanoerythrocyte targeting drug delivery system RGD-NE-DOX has a long circulation, excellent biocompatibility, targeting property and anti-tumor efficacy, and has a broad application prospect.

Key words biomimetic; cell-derived nanomedicine delivery system; erythrocyte; targeting

括外科手术、放化疗以及药物治疗，但这些治疗方式疗效均不是很好[2]。NLR 家族含 CARD 结构域 5［NOD like receptor (NLR) family，caspase recruitment(CARD) domaincontaining 5，NLRC5］，又称 MHC I 反式激活因子，是 2010 年新发现的 NLRs 样受体家族中的受体之一[3]。最新研究[4]发现，NLRC5 在肿瘤的发生发展过程中发挥着重要的作用，且 NLRC5 的水平与肿瘤患者发病率与存活率相关。但 NLRC5 对 EC 的作用及其机制尚不清楚。近年来，国内外学者发现，自噬可以参与 NLRs 的调节过程[5-6]。自噬是近年来新发现的一种程序性细胞死亡形式，是溶酶体介导的细胞内大分子物质及细胞器降解的过程[7]。其过程需要依赖自噬相关蛋白 LC3、Beclin1 等的参与[8]。大量研究[9]证实自噬与肿瘤之间存在密切的联系而且自噬在肿瘤的治疗中具有潜在作用。但自噬是否参与 NLRC5 的调节过程目前尚无文献报道。该研究探讨 NLRC5 是否通过调控自噬在 EC 细胞中发挥作用，以期为该病的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人子宫内膜腺癌 AN3CA 细胞株(上海 Sigma 公司)由安徽医科大学第二附属医院实验室保存，将细胞培养于含 10% 胎牛血清、含 1% 青霉素及链霉素的 DMEM 培养基中(美国 Gibico 公司)，在 37 ℃、5% CO_2 及饱和湿度的恒温培养箱内培养，每 2～3 d 换液 1 次。

1.1.2 标本收集 收集 EC 患者手术切除的 EC 组织标本及门诊病理显示正常的子宫内膜标本各 20 例，术前均未接受性激素的治疗或辅助放化疗。EC 标本 20 例为实验组，选取病例年龄为 45～65(52±5.42)岁，平均年龄 52 岁。病理类型均为腺癌，手术病理分期为Ⅰ期。正常子宫内膜标本 20 例作为对照组，且与研究组年龄差异无统计学意义，术前均未接受性激素的治疗。标本在获取知情同意后取自安徽医科大学第二附属医院妇产科临床诊断明确的患者。符合伦理学要求(伦理编号：LLSC20180085)。

1.1.3 主要试剂 NLRC5 (ab105411)兔多克隆抗体、Beclin1 兔单克隆抗体、LC3B［EPR18709］兔单克隆抗体(美国 Abcam 公司)；ECL 发光试剂盒、山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗(美国 affinity 公司)；PVDF 膜(上海 Biosharp 公司)；绿色荧光蛋白(green fluorescent protein，GFP)抗体(南京金斯瑞生物科技)；CCK-8 试剂盒(日本 Dojindo 公司)；GADPH、NLRC5、Beclin1、LC3 引物序列(南京金斯瑞生物科技有限公司合成)；NLRC5 质粒(武汉赛维尔生物科技有限公司构建)；免疫组化试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司)；高糖 DMEM 液体培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司)；PBS(美国 Hyclone 公司)；jetPRIME®试剂(法国 Polyplus-transfection 公司)；胰蛋白酶、50×TAE 缓冲液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液、Tris-HCl pH 8.8、Tris-HCl pH 6.8、青霉素、链霉素(上海碧云天公司)。

1.1.4 主要仪器 Heraeus CO_2 恒温培养箱(德国 Heraeus 公司)；FlexCycler 多功能 PCR 仪(德国 Jena 公司)；生物安全柜、电泳仪(上海天能科技有限公司)；TS100 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司)；酶标仪(上海科华实验系统有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 收集正常子宫内膜组织及 EC 组织，组织石蜡切片脱蜡后，经微波炉修复表面抗原、3% H_2O_2 封闭内源性过氧化酶、山羊血清封闭，加一抗：NLRC5 抗体、Beclin1 抗体、LC3 抗体，4 ℃过夜，复温后滴加与一抗相应种属的二抗(HRP 标记)，室温孵育 50 min，滴加链亲和素—过氧化物酶溶液，室温孵育 10 min，滴加新鲜配制的 DAB 混合染液，室温避光染色 10 min，显微镜下观察颜色。每组标本随机选取若干个目的区域，通过 Image-Pro-Plus 6.0 分析系统分别计算各组样本中 NLRC5、Beclin1、LC3 着色阳性面积百分比(%)，取均值进行比较。

1.2.2 Western blot 法检测蛋白表达 RIPA 裂解液提取组织及细胞总蛋白，BCA 法定量后，按 10 μl/孔的量加样、电泳、转膜。转膜结束后，5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min。孵一抗：各蛋白抗体分别参考抗体说明书进行操作，4 ℃孵育过夜，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min。孵二抗：相应二抗室温孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min。ECL 发光、显影，以 β-actin 为内参，分析各指标的相对表达量。

1.2.3 qRT-PCR 法检测 mRNA 水平 收集转染后的细胞，按 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA，测 RNA 的 $OD_{260\ nm}/OD_{280\ nm}$ 比值及浓度，再以 RNA 为模板逆转录成 cDNA。采用 SYBR Green 试剂盒进行 qRT-PCR，每组样本应重复检测 3 次。GADPH 引物序列上游引物：5′-GGTTGAGCAGGTACTTT-3′；下游引物：5′-AGCAAGAGCACAAGAGGAAG-3′。NLRC5

引物序列上游引物：5′-CTATCAACTGCCCTTCCACAAT-3′；下游引物：5′-TCTCTATCTGCCCACAGCCTAC-3′。Beclin1 引物序列上游引物：5′-AGCACCATGCAGGTGAGCTT-3′；下游引物：5′-TGACACGGTCCAGGATCTTG-3′。LC3 引物序列上游引物：5′-AGCAGCATCCAACCAAAATC-3′；下游引物：5′-CTGTGTCCGTTCACCAACAG-3′。以上引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.2.4 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖情况 将转染 24、48、72 h 后的细胞接种在 96 孔板中（100 μl/孔），每孔 2×10^3 个细胞，每组 3 个复孔，待细胞贴壁后每孔中加 10 μl 的 CCK-8 溶液，置于培养箱内继续孵育 4 h，用酶标仪测定 450 mm 处吸光度值测定各组细胞的增殖情况，实验重复 3 次，以实验测得的均值为实验结果。

1.2.5 质粒构建 NLRC5 质粒（其序列如下：上游引物：5′-CCGGAATTCCGGATGGCCAGGAAGCTGGA-3′，下游引物：5′-GGGATCCCGTCACCTGAGTGTCTTCCCA-3′）由武汉赛维尔生物科技有限公司构建，经鉴定证实构建成功。

1.2.6 细胞转染 当细胞长满时接种于 6 孔板中，继续培养细胞至汇合度为 70% 时，使用 jetPRIME® 转染试剂并参考其说明书进行细胞转染。将 2 μg NLRC5 质粒稀释至 200 μl 缓冲液中，通过上下吸管混合。加入 4 μl jetPRIME® 转染试剂，涡旋 10 s，低速离心数秒，在室温孵育 10～15 min。取出 6 孔板，每孔中加入 2 ml 含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素及链霉素的 DMEM 培养基，将转染混合物添加至含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素及链霉素的 DMEM 培养基的细胞中。转染后 24 h 用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素及链霉素的 DMEM 培养基替换转染培养基，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中继续培养至 48 h，用于后续检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析，计量资料结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用独立样本 t 检验或单因素方差分析，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 子宫内膜组织与 EC 组织中 NLRC5 及自噬因子表达 收集 EC 组织标本和正常子宫内膜标本各 20 例，免疫组化结果显示，与正常子宫内膜组织相比，NLRC5 蛋白在 EC 组织中表达相对较低，而自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 在 EC 组织中表达相对较高，见图 1。同时 Western blot 结果分析显示 EC 组织与正常子宫内膜相比，NLRC5 蛋白表达相对较低，而自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 相对较高，见图 2，各指标组间差异有统计学意义，见表 1。

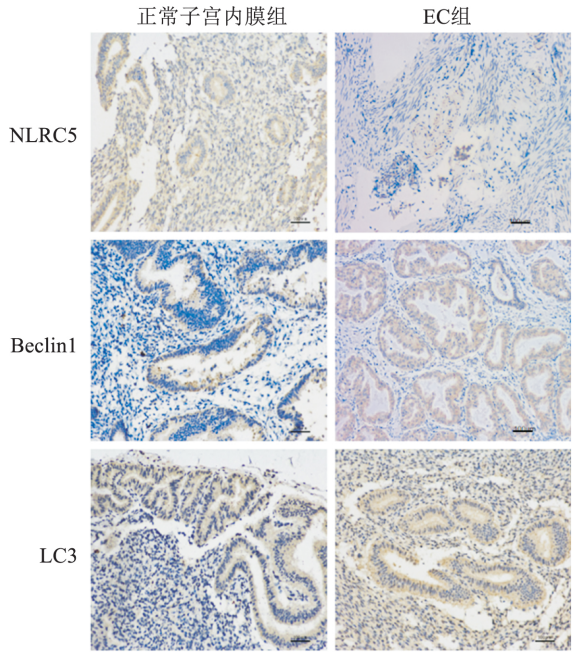

图 1 正常子宫内膜组与 EC 组 NLRC5、Beclin1、LC3 免疫组化 ×200

表 1 正常子宫内膜组与 EC 组 NLRC5、Beclin1、LC3 蛋白表达水平（$\bar{x}\pm s$）

项目	正常子宫内膜组	EC 组	*F* 值	*P* 值
NLRC5	1.00±0.15	0.66±0.09	28.48	<0.05
Beclin1	1.00±0.09	1.64±0.09	49.46	<0.05
LC3	1.00±0.13	1.53±0.08	25.76	<0.05

2.2 NLRC5 对 AN3CA 细胞自噬的作用 转染 NLRC5 质粒后通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测，转染组与未转染组相比，自噬蛋白 Beclin1、LC3 的蛋白表达水平降低（图 3、4）；各指标组间差异有统计学意义（表 2、3）。

表 2 未转染组与转染组 NLRC5、Beclin1、LC3 蛋白表达水平（$\bar{x}\pm s$）

项目	未转染组	转染组	*F* 值	*P* 值
NLRC5	1.00±0.10	1.35±0.13	14.42	<0.05
Beclin1	1.00±0.08	0.59±0.05	35.32	<0.05
LC3	1.00±0.04	0.61±0.08	42.55	<0.05

2.3 NLRC5 对 EC 细胞（AN3CA）细胞增殖的影响 转染 NLRC5 质粒后，转染 24、48、72 h 后分别用 CCK-8 法检测两组细胞的增殖情况，结果显示转

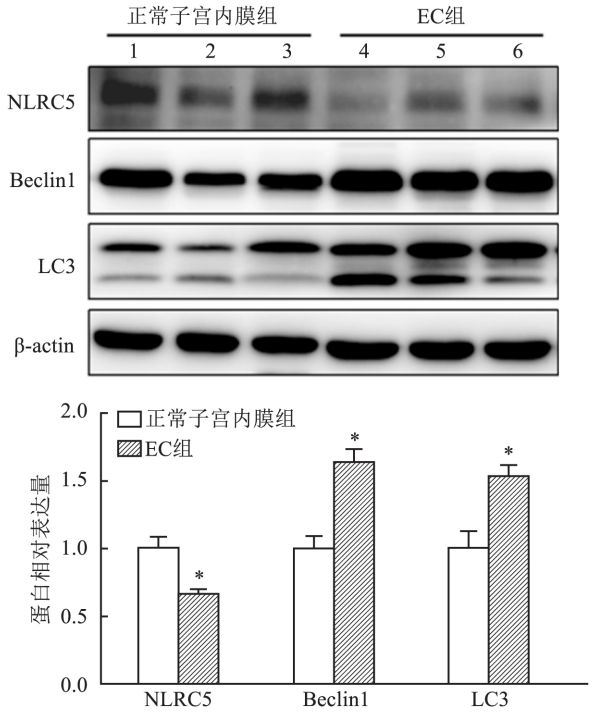

图2 Western blot 法检测组织蛋白表达情况

1、2、3: 正常子宫内膜标本; 4、5、6: EC 标本; 与正常子宫内膜组比较: * $P<0.05$

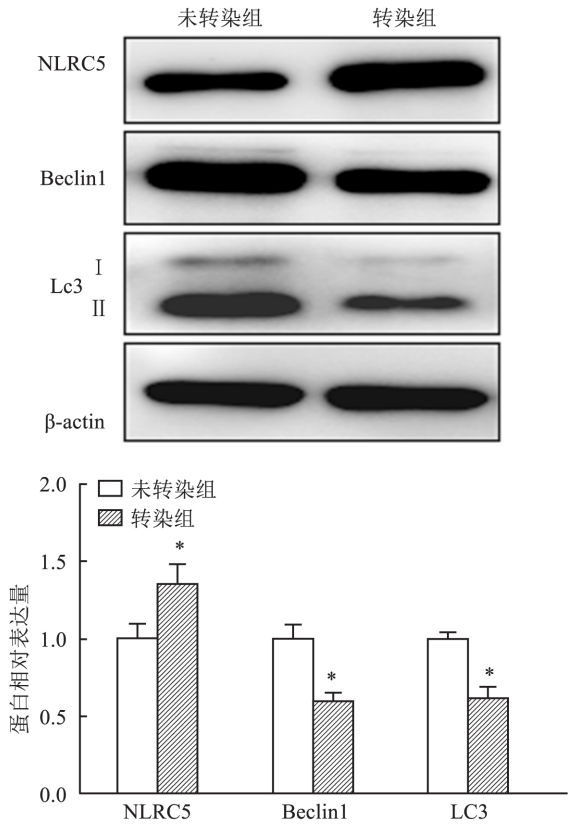

图3 Western blot 法检测过表达 NLRC5 细胞蛋白表达情况

与未转染组比较: * $P<0.05$

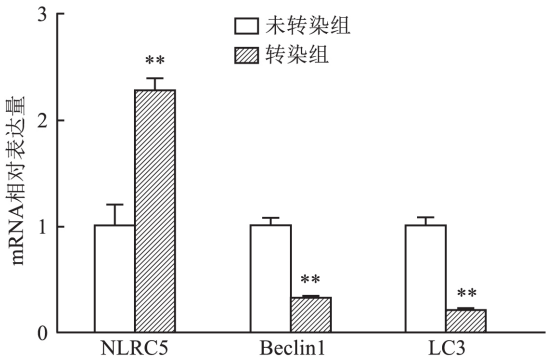

图4 实时定量 PCR 检测过表达 NLRC5 细胞中 NLRC5、Beclin 1、LC3 mRNA 水平

与未转染组比较: ** $P<0.01$

表3 未转染组与转染组 NLRC5、Beclin1、LC3 mRNA 表达水平($\bar{x}\pm s$)

项目	未转染组	转染组	*F* 值	*P* 值
NLRC5	1.00±0.20	2.27±0.11	61.25	<0.01
Beclin1	1.00±0.07	0.32±0.03	147.10	<0.01
LC3	1.00±0.08	0.20±0.03	181.60	<0.01

染 NLRC5 质粒组与未转染组相比,转染组细胞增殖明显增加,见图5。各指标组间差异有统计学意义,见表4。

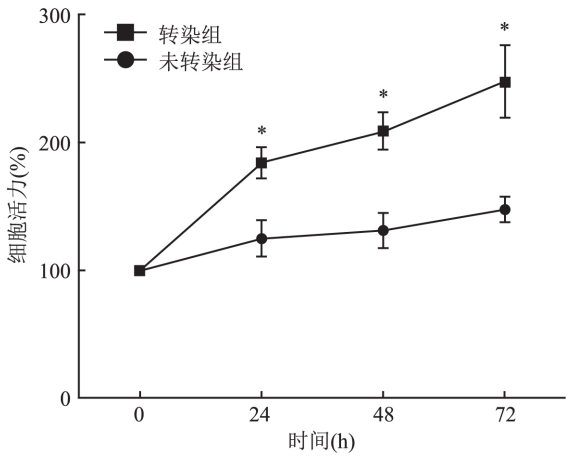

图5 CCK-8 检测细胞增殖情况

与未转染组比较: * $P<0.05$

表4 CCK-8 检测未转染组与转染组 AN3CA 细胞活力($\bar{x}\pm s$)

时间	未转染组	转染组	*F* 值	*P* 值
24 h	124.90±13.30	184.10±11.00	31.37	<0.05
48 h	131.50±12.30	209.10±13.20	49.38	<0.05
72 h	147.50±8.70	247.70±26.90	33.55	<0.05

2.4 NLRC5 促进 AN3CA 细胞增殖的机制 本实验分四组,两组转染组和两组未转染组,其中一组转

染组和未转染组在转染 NLRC5 质粒 24 h 后加自噬激动剂雷帕霉素(50 nmol/L),继续培养 24、48 h 后分别用 CCK-8 法检测 4 组细胞的增殖情况,结果显示,转染 NLRC5 质粒组与未转染 NLRC5 质粒组相比,细胞增殖明显增加($P<0.05$);转染 NLRC5 质粒后同时加雷帕霉素组与只转染 NLRC5 质粒组相比,细胞自噬水平升高,但细胞增殖明显下降($P<0.05$),见图 6。转染组与未转染组比较,0、24、48 h 的 F 值分别为 17.72、80.73、145.8,与转染同时加雷帕霉素组比较,24 h、48 h 的 F 值分别为 13.06、17.62,各指标组间差异有统计学意义,见表 5。

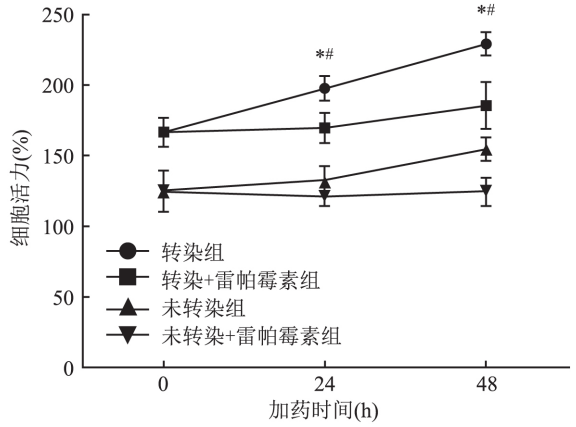

图 6 CCK-8 检测细胞增殖情况

与未转染组比较:$^{*}P<0.05$;与转染同时加雷帕霉素组比较:$^{\#}P<0.05$

表 5 CCK-8 检测各组 AN3CA 细胞活力($\bar{x}\pm s$)

时间	未转染+雷帕霉素组	未转染组	转染+雷帕霉素组	转染组
0 h	124.90±13.30	124.90±13.30	166.60±9.20	166.60±9.20*
24 h	120.90±5.70	133.10±8.70	169.90±9.70	197.60±7.90$^{*\#}$
48 h	124.70±9.10	154.90±7.30	185.50±15.60	229.40±7.00$^{*\#}$

与未转染组比较:$^{*}P<0.05$;与转染+雷帕霉素组比较:$^{\#}P<0.05$

3 讨论

EC 是女性生殖系统中常见的三大恶性肿瘤之一,位居女性常见癌症的第六位。据统计,在全球范围内每年有超过 20 万的 EC 新增病例,其发病率和死亡率逐年增高,并且呈年轻化趋势,严重危害女性的身心健康[10]。但是,其影响机制尚不明确。

NLRC5 是 2010 年新发现的 NLRs 样受体家族中的受体之一[3]。NLRC5 在多种肿瘤中表达相对偏低,而 NLRC5 在肝细胞癌、结直肠癌以及脑部肿瘤中相对偏高[11]。Peng et al[12] 发现 NLRC5 可以促进肝癌细胞增殖、迁移和侵袭能力。但是 NLRC5 是否可能参与 EC 的发生发展,目前尚不清楚。因此,本实验主要研究 NLRC5 的表达变化,观察其是否可能参与 EC 发生发展,并初步探讨其可能的作用机制。为观察 NLRC5 在 EC 中的表达,本实验通过收集 EC 组织和正常子宫内膜组织,免疫组化及 Western blot 结果显示,与正常子宫内膜组织相比,在 EC 中,NLRC5 蛋白表达是下调的。为了证实 NLRC5 与 EC 间的关系,本研究 CCK-8 结果显示转染 NLRC5 质粒组与未转染组相比,转染组细胞增殖明显增加。综上所述,NLRC5 可能促进 EC 细胞的增殖,但其如何影响 EC 细胞增殖,机制尚不明确。

近年来,国内外学者发现,自噬参与 NLRs 的调节过程[5-6]。自噬是一种保守的溶酶体降解途径,在此过程中细胞内物质被降解和再循环[13]。自噬已被证实对肿瘤的发生发展发挥着重要的作用,但结论仍存在争议,最初认为自噬是肿瘤抑制机制,在乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌细胞中自噬抑制肿瘤发生[14]。但是,在肝癌早期阶段,自噬可破坏肿瘤组织以达到抑制肿瘤增殖的作用,当癌细胞剧增达到肿瘤晚期阶段时,自噬降解的受损细胞器又为肿瘤提供营养支持,使癌细胞不断繁殖[15]。因此自噬在癌症中的作用是复杂的,并且受背景条件的影响[13]。本实验免疫组化及 Western blot 结果显示 EC 组织与正常子宫内膜组织比较,在 EC 组织中自噬蛋白 Beclin1、LC3 的蛋白表达水平上调。那么自噬是否参与 NLRC5 的调节,目前尚不清楚。为探究 NLRC5 是否可能通过调控自噬在 EC 中发挥作用,选择 AN3CAEC 细胞株作为体外实验的研究对象。通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测结果显示转染 NLRC5 质粒组与未转染组相比,自噬蛋白 Beclin1、LC3 的蛋白表达水平下调。进一步研究该途径如何影响 EC 的作用,本研究 CCK-8 检测结果表明转染 NLRC5 质粒组与未转染 NLRC5 质粒组相比,细胞增殖明显增加;转染 NLRC5 质粒后同时加雷帕霉素组与只转染 NLRC5 质粒组相比,细胞自噬水平升高,但细胞增殖明显下降。以上研究结果表明 NLRC5 可能通过抑制自噬进而促进 EC 细胞的增殖。

综上所述,本研究结果表明在 EC 组织标本中 NLRC5 的蛋白表达水平下调,而自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 的蛋白表达水平上调;过表达 NLRC5 后,EC 细胞自噬水平下降,但 EC 细胞增殖升高;相反,过表达 NLRC5 后,提高自噬水平,细胞增殖反而下降。因此,NLRC5 可能通过抑制自噬促进 EC 细胞增殖,NLRC5 可能成为 EC 治疗的新靶点。

参考文献

[1] Ferlay J, Shin H R, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008 [J]. Int J Cancer, 2010,127(12):2893 - 917.

[2] Takiuchi T, Blake E A, Matsuo K, et al. Aspirin use and endometrial cancer risk and survival [J]. Gynecol Oncol, 2018,148(1):222 - 32.

[3] Kobayashi K S, Elsen P J. NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses [J]. Nat Rev Immunol,2012,12(12):813 - 20.

[4] Ludigs K, Jandus C, Utzschneider D T, et al. NLRC5 shields T lymphocytes from NK-cell-mediated elimination under inflammatory conditions [J]. Nat Commun, 2016,10547:10554.

[5] Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity [J]. Nat Rev Immunol, 2013,13: 722 - 37.

[6] Carneiro L A, Travassos L H. The interplay between NLRs and autophagy in immunity and inflammation [J]. Front Immunol, 2013,4:361.

[7] Zhan L, Zhang Y, Wang W, et al. Autophagy as an emerging therapy target for ovarian carcinoma [J]. Oncotarget, 2016,7(50):83476 - 87.

[8] Dokladny K, Myers O B, Moseley P L. Heat shock response and autophagy-cooperation and control [J]. Autophagy, 2015,11(2):200 - 13.

[9] Levy J, Cacheux W, Bara M A, et al. Intestinal inhibition of Atg7 prevents tumour initiation through a microbiome-influenced immune response and suppresses tumour growth [J]. Nat Cell Biol, 2015,17(8):1062 - 73.

[10] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69 - 90.

[11] Yoshihama S, Roszik J, Downs I, et al. NLRC5/MHC class I transactivator is a target for immune evasion in cancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016,113(21):5999 - 6004.

[12] Peng Y Y, He Y H, Chen C, et al. NLRC5 regulates cell proliferation, migration and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting the Wnt/β-catenin signaling pathway [J]. Cancer Lett,2016, 376(1):10 - 21.

[13] Feng X P, Zhou J, Li J Y, et al. Tubeimoside I induces accumulation of impaired autophagolysosome against cervical cancer cells by both initiating autophagy and inhibiting lysosomal function [J]. Cell Death Dis,2018,9(11):1117.

[14] White E. The role for autophagy in cancer [J]. J Clin Invest,2015, 125(1):42 - 6.

[15] 朱朋飞，秦建民. 细胞自噬在原发性肝癌发生与防治中的生物学作用 [J]. 中国医药科学,2015,5(4):24 - 8.

NLRC5 promotes proliferation of endometrial cancer cells by inhibiting autophagy

Yao Shun, Zhan Lei, Sun Shiying, et al

(*Dept of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230601)

Abstract ***Objective*** To preliminarily explore the effect and mechanism of NLRC5 on the proliferation of endometrial cancer cells AN3CA. ***Methods*** We selected 20 specimens of endometrial adenocarcinoma surgically removed from patients with endometrial cancer and 20 cases of normal endometrial specimens in outpatient pathology. The protein expression of NLRC5 and autophagy-related proteins Beclin1, LC3 in endometrial cancer tissue and normal endometrial tissue specimens were observed by immunohistochemistry. Expression of NLRC5 and autophagy-related proteins Beclin1, LC3 in endometrial carcinoma and normal endometrial tissue specimens and endometrial carcinoma AN3CA cells were detected by Western blot and qRT-PCR. Proliferation of AN3CA cells was detected by the method of cck-8. ***Results*** The expression of NLRC5 protein was down-regulated and the expression of autophagy-related proteins Beclin1, LC3 were up-regulated in endometrial carcinoma tissues compared with normal endometrial tissues ($P<0.05$). After transfection of NLRC5 plasmid, the expression levels of autophagy-related proteins Beclin1 and LC3 were significantly down-regulated in the transfected group compared with the untransfected group ($P<0.05$). After transfection of NLRC5 plasmid, the cell proliferation of the transfected group was significantly increased compared with the untransfected group ($P<0.05$). After transfecting the NLRC5 plasmid and treating with rapamycin, cell proliferation was significantly increased in the transfected NLRC5 plasmid group compared with the untransfected NLRC5 plasmid group ($P<0.05$). Compared with NLRC5 plasmid group, the autophagy level was increased, but the cell proliferation was significantly decreased ($P<0.05$). ***Conclusion*** NLRC5 may promote the proliferation of human endometrial cancer cells by inhibiting autophagy.

Key words NLRC5; autophagy; endometrial cancer; cell proliferation