

# 胃癌组织中 NLRC5 表达的意义 及其影响胃癌侵袭转移的可能机制

徐 徽<sup>1</sup> 吴文涌<sup>2</sup> 张 震<sup>2</sup> 孟 刚<sup>1</sup>

**摘要** 目的 观察核苷酸结合结构域受体家族含 CARD 结构域-5 (NLRC5)、 $\beta$ -catenin 在胃癌组织中的表达情况。分析 NLRC5 与胃癌临床病理特征及预后的关系。并初步探讨 NLRC5 与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路间的关系。方法 收集根治性胃癌切除术患者石蜡标本 93 例,免疫组化检测胃癌组织中 NLRC5 和  $\beta$ -catenin 的表达情况;分析 NLRC5 的表达与胃癌临床病理特征的关系。采用胃癌细胞株 MKN-45 和 MGC-803 分别转染 pEGFP-C2-NLRC5 重组质粒,qRT-PCR 法和 Western blot 法验证 NLRC5 转染效率。采用 MTT 细胞增殖和细胞划痕实验对 NLRC5 进行功能分析,观察体外实验中 NLRC5 表达变化对胃癌细胞的生物学行为的影响,采用 Western blot 法检测 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白的变化。结果 NLRC5 在 93 例胃癌标本中阳性表达 67 例 (72.04%) 阴性表达 26 例 (27.96%)。NLRC5 的表达情况与胃癌的 TNM 分期、淋巴结转移和复发情况密切相关。Kaplan-meier 生存分析结果显示 NLRC5 阴性表达的患者预后好于阳性表达患者 ( $P < 0.05$ )。93 例胃癌标本中  $\beta$ -catenin 阳性表达 63 例 (67.74%) 阴性表达 30 例 (32.26%)。Cox 多因素回归分析显示,NLRC5 和  $\beta$ -catenin 的阳性表达、低 TNM 分期、淋巴结转移是影响胃癌患者预后的独立危险因素。胃癌细胞在过表达 NLRC5 后,MTT 细胞增殖和划痕实验结果显示,细胞的增殖和迁移能力显著增强 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),Western blot 实验结果显示,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路中关键蛋白  $\beta$ -catenin 和下游关键靶蛋白 C-myc、金属基质蛋白酶-7 的表达水平明显提高。结论 NLRC5 广泛表达于胃癌组织中,其表达与胃癌的 TNM 分期和淋巴结转移密切相关。Kaplan-meier 生存分析显示:NLRC5 高表达是影响胃癌预后的危险因素。Cox 多因素回归分析显示:NLRC5 高表达是影响胃癌预后的独立危险因素。NLRC5 与  $\beta$ -catenin 的表达呈正相关性,NLRC5 的表达变化影响胃癌细胞的生物学行为和 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的关键蛋白的表达。提示 NLRC5 可能通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路影响胃癌的浸

润和转移。

**关键词** 胃癌; NLRC5; 临床病理特征; 侵袭转移  
中图分类号 R 365

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1445-08  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.009

核苷酸结合结构域受体家族含 CARD 结构域-5 (NLR family, CARD domain containing 5, NLRC5) 是最新发现的核苷酸结合寡聚域 (nucleotide-binding oligomerization domain, NOD) 样受体 (NOD like receptors, NLRs) 家族成员之一。与大多数 NLR 相似,NLRC5 普遍被报道在先天和适应性免疫反应中发挥关键作用<sup>[1]</sup>。NLRC5 的生物学功能已经被广泛研究。其参与 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路的激活、控制 I 型 IFN 信号传导和炎症小体激活<sup>[1-3]</sup>。

由于 NLRC5 与机体的炎症反应存在密切关系,因此,NLRC5 是否参与恶性肿瘤的发生发展以及具体的作用机制受到国内外很多研究者的关注。Carretero et al<sup>[4]</sup> 研究发现与前列腺良性肿瘤组相比,人类白细胞抗原-I 阴性组的前列腺癌患者 NLRC5 的 mRNA 表达显著降低。Yao et al<sup>[5]</sup> 使用免疫组化法检测了 NLRC5 在肺癌中的表达,结果发现 NLRC5 在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) III 期患者中的阳性表达为 67.7%,进一步的生存分析显示细胞核 NLRC5 阳性组 NSCLC 患者的总生存率更短。Yao et al<sup>[5]</sup> 进一步检测了多种实体肿瘤中 NLRC5 在细胞质和细胞核的表达情况,结果显示恶性黑色素瘤、肾癌、肝癌、宫颈鳞状细胞癌、直肠癌、前列腺癌等多种肿瘤中广泛表达 NLRC5。但 NLRC5 在胃癌中的表达情况及其与胃癌患者的临床病理特征及其影响胃癌侵袭转移的可能机制尚不明确,有待于进一步的深入研究。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集 2011 年 1 月~2012 年 10 月安徽医科大学第一附属医院的胃癌患者 93 例,其中男 70 例,女 23 例;年龄 37~83 岁,中位年龄 63 岁。患者术前未行放化疗,其手术切除标本经常规固定、

2017-07-21 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81572305);安徽省自然科学基金(编号:KJ2017A204)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学基础医学院病理学教研室,合肥 230032

<sup>2</sup>安徽医科大学第一附属医院普外科,合肥 230022

作者简介:徐 徽,女,硕士研究生;

孟 刚,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: 836151694@qq.com

石蜡包埋、切片染色后,由两位病理科医师读片确认其病例类型。临床治疗方案中根治性远端胃癌切除术 25 例,根治性近端胃癌切除术 2 例,根治性全胃癌切除术 66 例。随访截止日期为 2016 年 6 月 30 日,计算手术日期至死亡或最后随访日期,时间单位为月。

**1.2 主要试剂和耗材** 逆转录试剂盒购自立陶宛 Fermentas 公司; TRIzol Reagent 试剂、Lipofectamine™ 2000 脂质体购自美国 Invitrogen 公司; 质粒大抽试剂盒购自北京瑞泽康公司; 2 000 bp DNA Marker、β-actin 一抗购自美国 Santa Cruz 公司; NLRC5 一抗购自英国 Abcam 公司; β-catenin、C-myc 癌基因和金属基质蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) -7 一抗购自美国 Cell Signaling 公司; 山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗购自北京中杉金桥公司; 细胞株 MKN-45 和 MGC-803 (胃癌细胞株) 均购自中国上海科学院细胞库; 质粒: pEGFP-C2 Vector 真核表达重组质粒和 pEGFP-C2-NLRC5 由安徽医科大学药理实验室提供。

**1.3 主要设备** 可见紫外分光光度计(上海精密科学仪器公司); 全自动酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司); 凝胶成像系统(南京捷达生物技术公司); 荧光倒置显微镜(日本 OLYPMUS 公司); qRT-PCR 扩增仪(德国 Thermo 公司); 医用型洁净工作台(苏州安泰有限公司)。

**1.4 实验方法**

**1.4.1 免疫组化检测胃癌标本中的蛋白表达(S-P 法染色)**

**1.4.1.1 免疫组化** 胃癌标本石蜡块 4 μm 切片, 阴性对照为以 PBS 代替一抗。具体步骤按照 SP 试剂盒操作规范进行。

**1.4.1.2 免疫组化结果判定** 采用双盲法, NLRC5 蛋白阳性反应颗粒位于胞质和细胞核, 以胞质为主, β-catenin 阳性反应颗粒位于胞质, 显微镜下显示清晰的棕黄色染色的细胞为阳性细胞, 阳性细胞富集区域为阳性区域。在阳性区域随机选取 5 个视野, 高倍(×400)视野下观察, 每个视野至少观察 200 个肿瘤细胞, 如不足 200 个肿瘤细胞, 在该阳性区域重新随机选取一个视野观察, 按阳性细胞所占的百分比及着色强度进行结果判定。着色强度评分: 无着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 普通黄色为 2 分, 棕黄色为 3 分, 棕褐色为 4 分; 阳性细胞占同类细胞数的百分比评分: 阴性为 0 分, 阳性细胞数 ≤ 10% 为 1 分, 阳性细胞数 > 10% ~ 30% 为 2 分, 阳性细胞数

> 30% ~ 50% 为 3 分, 阳性细胞数 > 50% 为 4 分。总积分为两者的乘积, ≤ 2 分为阴性, > 2 分为阳性。

**1.4.2 实验分组** pEGFP-C2-NLRC5 重组质粒转染胃癌细胞株, 分别检测正常组(normal)、质粒空载体转染组和 pEGFP-C2-NLRC5(NLRC5) 重组质粒转染组 MKN-45 和 MGC-80 胃癌细胞中 NLRC5 mRNA 和蛋白水平变化。

**1.4.3 qRT-PCR 法检测 mRNA 的表达**

**1.4.3.1 引物的设计** 根据 Pubmed 数据库中的 NLRC5、β-actin、β-catenin 核苷酸序列设计引物, 由上海生工生物有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
NLRC5	F: CTATCAACTGCCCTTCCACAAT R: TCTCTATCTGCCACAGCCTAC
β-catenin	F: GCGTTCCTCTCAGATGGTGTCTC R: CCAGTAAGCCCTCAGCATGAT
β-actin	F: GCCAACACAGTGTCTGTCTGG R: CTCAGGAGGACCAATGATCTTG

**1.4.3.2 qRT-PCR 检测方法** 用提取液提取培养的细胞的总 RNA, 具体步骤按照试剂盒操作规范进行。

**1.4.4 Western blot 法检测蛋白表达** 提取总蛋白: ① 倒掉培养液, 吸水纸吸干培养液; ② PBS 洗涤细胞; ③ 加裂解液, 使细胞充分裂解; ④ 将细胞碎片和裂解液移至离心管中; ⑤ 离心; ⑥ 将离心后的上清液分装转移至离心管保存。测定蛋白含量(SDS-PAGE 电泳): 清洗玻璃板, 灌胶与上样, 电泳(溴酚兰刚跑出即可终止) 转膜, 抗体封闭, 化学 DAB 试剂盒显影。

**1.4.5 MTT 细胞增殖实验** ① 取转染后 24 h 后细胞, 先后以 PBS 洗涤及胰蛋白酶消化, 再配制单细胞悬液, 计数后加入到 96 孔板中, 并分别设空白孔及阴性对照孔; ② 将 96 孔板置于 CO<sub>2</sub> 温箱中培养, 分别于培养后 0、24、48、72 h 取出, 分别加入 MTT 溶液, 37 °C 避光孵育 4 h; ③ 取出 96 孔板, 去除 MTT 溶液, 再加如 DMSO, 室温避光孵 10 min 后放置在酶标仪上进行检测各孔的光吸收值, 选择 490 nm 波长比色。记录结果并绘制各组细胞处理后的时间变化曲线: 时间为横坐标, 吸光度值为纵坐标。所有实验重复 3 次。

**1.4.6 细胞迁移实验(划痕实验)** 细胞长满单层后, 0.25% 的胰酶消化, 调整细胞浓度为 10<sup>5</sup> 个/ml, 将胃癌细胞 2 × 10<sup>4</sup> 个加入 48 孔细胞培养板, 37 °C、

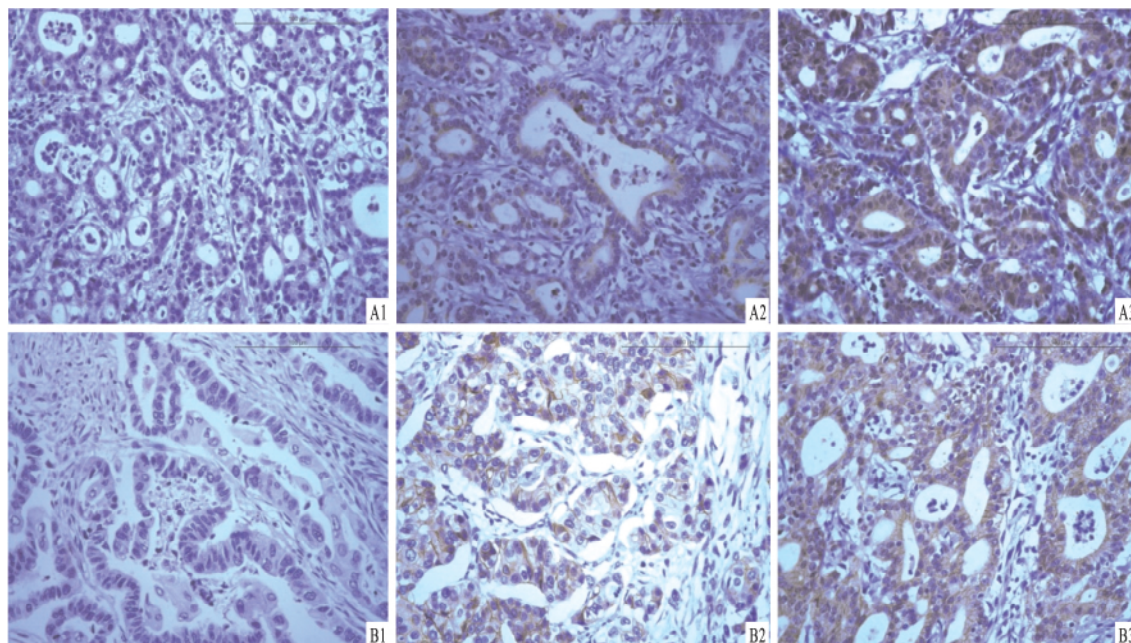


图1 NLRC5 和  $\beta$ -catenin 在胃癌组织中的表达 SP  $\times$  400  
A: NLRC5; B:  $\beta$ -catenin; 1: 阴性; 2: 弱阳性; 3: 强阳性

5%  $\text{CO}_2$  环境中培养,长满单层后,用移液枪枪头刮去一条直线。弃去培养基,PBS洗3次,100  $\mu\text{l}$ /次。继续培养12 h,弃去培养基,PBS洗3次。10倍倒置显微镜下拍照,观察胃癌细胞向刮除区迁移的距离。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。NLRC5 及  $\beta$ -catenin 的表达与临床病理资料的联系采用非参数检验中的  $\chi^2$  检验;Cox 多因素分析检测 NLRC5 表达与临床病理资料的危险因素;采用 Kaplan-merier 生存分析检测 NLRC5 的表达水平与患者预后的关系,并进行 Log-rank 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胃癌组织中 NLRC5 及 $\beta$ -catenin 的表达情况

免疫组化法检测 NLRC5 和  $\beta$ -catenin 在 93 例胃癌中的表达情况(图1)。其中 NLRC5 表达阳性 67 例,表达阴性 26 例,NLRC5 在胃癌组织中的阳性表达率为 72.04%。

**2.2 NLRC5 和  $\beta$ -catenin 的表达与胃癌临床病理特征的关系** 采用  $\chi^2$  检验的方法检测 NLRC5 和  $\beta$ -catenin 与 93 例胃癌患者的临床病理特征间的相关性。结果显示 NLRC5 阳性组和 NLRC5 阴性组以及  $\beta$ -catenin 阳性组和  $\beta$ -catenin 阴性组在年龄、性别方面均差异无统计学意义。NLRC5 和  $\beta$ -catenin 在胃

癌中异常表达与胃癌的淋巴结转移和 TNM 分期有关( $P < 0.05$ )。见表 2。

**2.3 NLRC5 与胃癌患者的生存分析** 对 93 例胃癌患者进行了 5 年的随访,通过 Log-rank 检验分析对 NLRC5 表达程度不同的两组病例行 Kaplan-merier 生存分析,结果显示 NLRC5 低表达组患者的预后好于高表达组(图 2),Log-rank 检验( $\chi^2 = 9.542$ ,  $P = 0.002$ )。

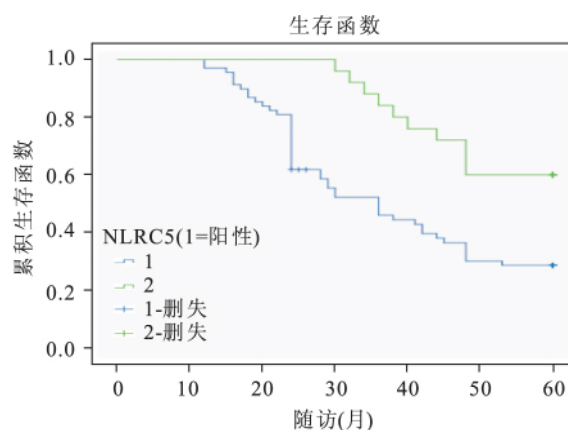


图2 NLRC5 表达与胃癌患者预后的关系

**2.4 影响胃癌患者预后的 Cox 多因素分析** 对 NLRC5 和  $\beta$ -catenin 在胃癌组织中的表达以及胃癌患者的临床病理特征对胃癌患者预后的影响进行了 Cox 多因素分析。结果显示,NLRC5 的阳性表达、低 TNM 分期、淋巴结转移和  $\beta$ -catenin 是影响胃癌患者

表2 NLRC5 和  $\beta$ -catenin 表达与胃癌患者临床病理特征的关系 [n( % )]

项目	NLRC5				$\beta$ -catenin			
	( + )	( - )	$\chi^2$ 值	P 值	( + )	( - )	$\chi^2$ 值	P 值
年龄(岁)								
<60	26(38.2)	7(28.0)	0.837	0.360	23(36.5)	10(33.3)	0.089	0.765
60	42(61.8)	18(72.0)			40(63.5)	20(66.7)		
性别								
男	48(70.6)	22(88.0)	2.977	0.084	45(71.4)	25(83.3)	1.547	0.214
女	20(29.4)	3(12.0)			18(28.6)	5(16.7)		
肿瘤部位								
贲门胃底部	40(58.8)	7(28.0)	8.597	0.014	29(46.0)	18(60.0)	1.595	0.450
胃体部	19(27.9)	15(60.0)			25(39.7)	9(30.0)		
胃窦部	9(13.2)	3(12.0)			9(14.3)	3(10.0)		
肿瘤直径(cm)								
<4	19(27.9)	10(40.0)	1.239	0.266	16(25.4)	13(43.3)	3.047	0.081
$\geq 4$	49(72.1)	15(60.0)			47(74.6)	17(56.7)		
分化程度								
低、未分化	29(42.6)	6(24.0)	2.942	0.230	28(44.4)	7(23.3)	3.884	0.143
中-低分化	25(36.8)	11(44.0)			22(34.9)	14(46.7)		
中分化	14(20.6)	8(32.0)			13(20.6)	9(30.0)		
淋巴结转移数(个)								
0	25(36.8)	17(68.0)	7.237	0.027	22(34.9)	20(66.7)	9.931	0.007
1~7	25(36.8)	5(20.0)			22(34.9)	8(26.7)		
$\geq 7$	18(26.5)	3(12.0)			19(30.2)	2(6.7)		
TNM 分期								
I	10(14.7)	8(32.0)	10.813	0.004	9(14.3)	9(30.0)	9.182	0.010
II	13(19.1)	10(40.0)			12(19.0)	11(36.7)		
III	45(66.2)	7(28.0)			42(66.7)	10(33.3)		

表3 胃癌患者临床病理学因素与预后的 Cox 多因素分析

指标	$\beta$ 值	SE 值	Wald 值	P 值	RR 值	95% CI
NLRC5	-0.888	0.381	5.435	0.020	0.412	0.195 ~ 0.868
$\beta$ -catenin	-0.856	0.381	5.038	0.025	0.425	0.201 ~ 0.897
肿瘤部位	0.101	0.222	0.210	0.647	1.107	0.717 ~ 1.708
肿瘤直径	-0.071	0.379	0.035	0.852	0.932	0.443 ~ 1.960
分化程度	-0.198	0.196	1.020	0.313	0.820	0.558 ~ 1.205
TNM 分期	0.953	0.363	6.898	0.009	2.594	1.274 ~ 5.282
淋巴结转移数	0.707	0.247	8.210	0.004	2.028	1.250 ~ 3.288

预后的独立危险因素,相对危险度分别 0.412、0.425、2.594 和 2.028,见表 3。

**2.5 胃癌细胞株转染 pEGFP-C2-NLRC5 重组质粒后 NLRC5 mRNA 和蛋白表达的变化** 采用 pEGFP-C2-NLRC5 重组质粒转染胃癌细胞株。MKN-45 和 MGC-80 胃癌细胞株转染后 qRT-PCR 实验结果显示 NLRC5 mRNA 表达水平明显提高,且差异有统计学意义 ( $F = 28.065, 19.287, P < 0.05$ ), Western blot 实验结果显示 NLRC5 蛋白表达水平明显提高 ( $F = 19.402, 21.385, P < 0.05$ )。见图 3、4。

**2.6 过表达 NLRC5 对胃癌细胞增殖和迁移能力的影响** 本研究采用 MTT 实验检测胃癌细胞转染株过表达 NLRC5 后增殖能力的变化。结果

显示 培养 24、48、72 h 后胃癌细胞的增殖能力在过表达 NLRC5 后显著增强,与质粒空载体组相比差异有统计学意义 ( $57.442 vs 43.816, 69.334 vs 19.546, 31.024 vs 57.159, P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 5。

采用细胞划痕实验检测胃癌细胞转染株过表达 NLRC5 后迁移能力的影响,结果显示胃癌细胞的迁移能力在过表达 NLRC5 后显著增强,见图 6、7。

**2.7 过表达 NLRC5 对  $\beta$ -catenin、C-myc 和 MMP-7 的表达水平影响** 本研究采用 Western blot 实验检测胃癌细胞转染株过表达 NLRC5 后 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路中关键蛋白  $\beta$ -catenin 和下游关键靶蛋白 C-myc、MMP-7 表达水平的变化。结果显示,过表达 NLRC5 能明显提高  $\beta$ -catenin 和 C-myc、MMP-7

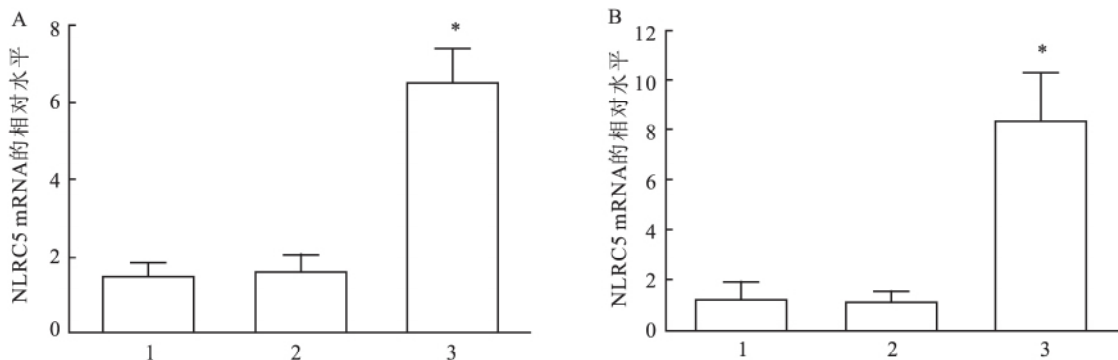


图3 pEGFP-C2-NLRC5 重组质粒转染对 NLRC5 mRNA 表达影响

A: MKN-45; B: MGC-803; 1: 空白组; 2: 质粒空载组; 3: NLRC5 质粒转染组; 与质粒空载组比较: \*  $P < 0.05$

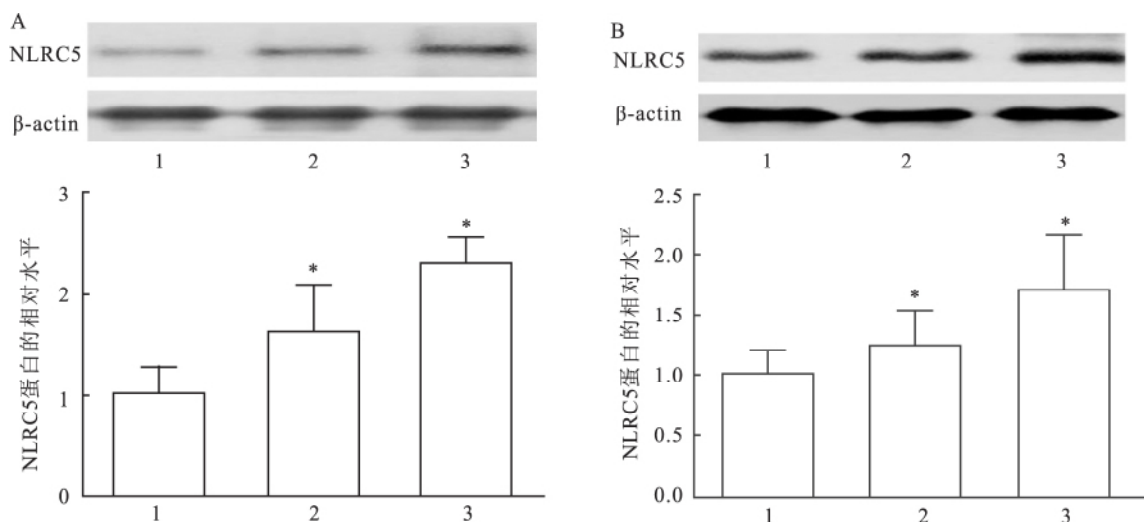


图4 pEGFP-C2-NLRC5 重组质粒转染对 NLRC5 蛋白表达影响

A: MKN-45; B: MGC-803; 1: 空白组; 2: 质粒空载组; 3: NLRC5 质粒转染组; 与质粒空载组比较: \*  $P < 0.05$

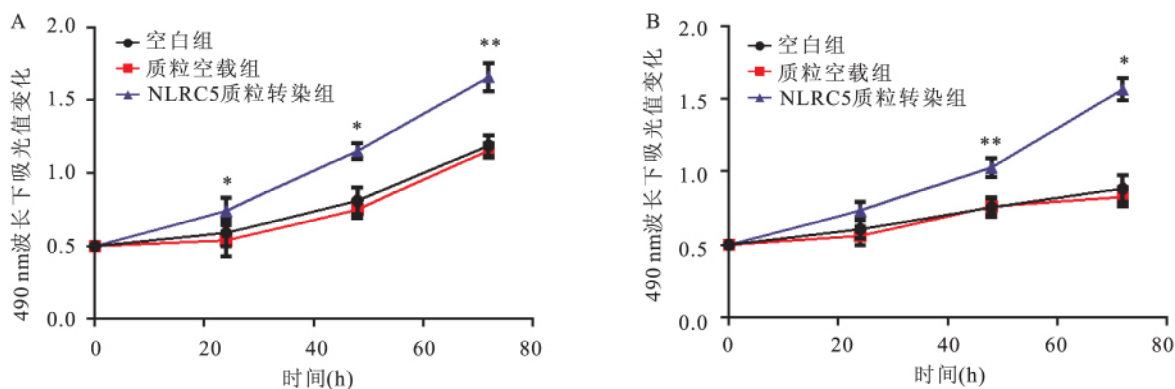


图5 MTT 法测定过表达 NLRC5 对细胞增殖能力影响

A: MKN-45; B: MGC-803; 与质粒空载组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

的表达水平。见图8。

### 3 讨论

NLRs 是一类位于细胞质中含有 NOD 的蛋白质

家族。目前已知 NLRs 家族包括 5 个亚家族: ① NLRA 亚家族, 含有酸性反式激活结构域; ② NLRB 亚家族, 包含杆状病毒抑制剂重复结构域; ③ NLRC 亚家族, 具有胱天蛋白酶激活和募集结构域; ④ NLRP

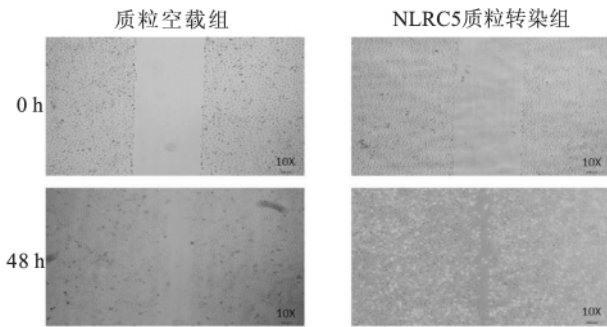


图6 细胞划痕实验测定过表达 NLRC5 对胃癌细胞 MKN-45 迁移能力影响 ×200

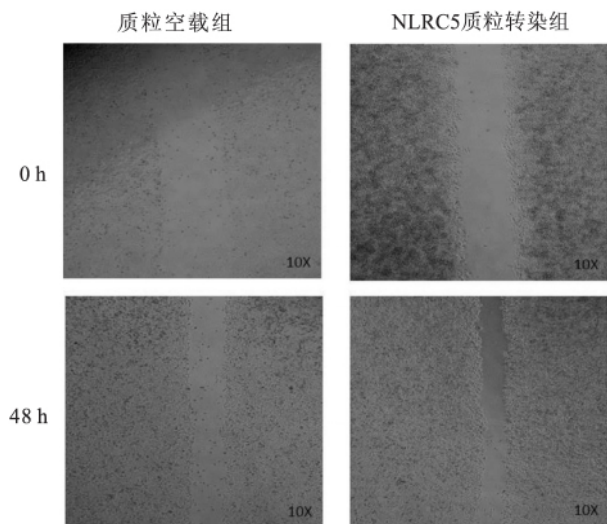


图7 细胞划痕实验测定过表达 NLRC5 对胃癌细胞 MGC-803 迁移能力影响 ×200

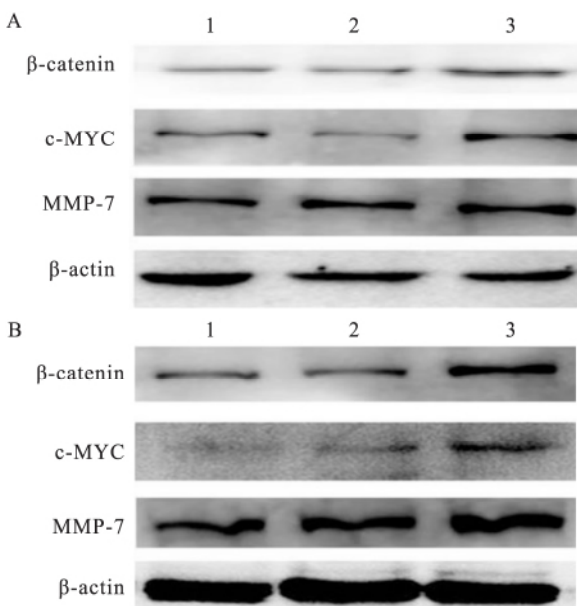


图8 过表达 NLRC5 对 β-catenin、C-myc 和 MMP-7 蛋白表达影响  
A: MKN-45; B: MGC-803; 1: 空白组; 2: 质粒空载组; 3: NLRC5 质粒转染组

亚家族,具有 pyrin 结构域;⑤ NLRX 亚家族,与其他 NLR 没有同源性并定位于线粒体;其中 NLRC 亚家族有 5 个成员,NOD1、NOD2、NLRC3、NLRC4 和 NLRC5。NLRC5 基因位于人类基因组中的 16q13 基因座,其全长 mRNA 为 6 822 bp,由 49 个外显子编码,产生 1 866 个氨基酸的蛋白质<sup>[6-7]</sup>。作为 NLR 家族的成员,NLRC5 是由包括 N-末端的募集结构域,位于中心的核苷酸结合结构域和 C-末端亮氨酸-重复序列。NLRC5 是 NLRs 的最大成员,主要调控机体免疫应答。目前研究<sup>[8]</sup>较一致地表明 NLRC5 参与调控 I 类 MHC 基因表达和 I 类 MHC 抗原呈递过程中相关基因表达。研究<sup>[2-3]</sup>显示 NLRC5 特异性敲除不但能够促进 NF-κB 信号转导,诱导其下游炎症因子肿瘤坏死因子-α 和白细胞介素-6 表达。同时,有研究<sup>[8]</sup>还显示 NLRC5 能促进 I 型 IFN 信号途径和抗病毒免疫反应。虽然近年来很多研究<sup>[5-9]</sup>显示 NLRC5 在多种人体实体恶性肿瘤中存在高表达,参与恶性肿瘤的发生、侵袭和转移,但是关于 NLRC5 在恶性肿瘤中的作用尚存在争议。Yao et al<sup>[5]</sup>通过对 NSCLC III 期患者的回顾性研究认为 NLRC5 在 NSCLC 中高表达,而且 NLRC5 的阳性表达可能是 NSCLC III 期患者预后不良的预测指标之一。Peng et al<sup>[9]</sup>研究发现 NLRC5 高表达于肝癌组织和肝癌细胞株,促进肝癌的增殖、迁移和侵袭能力的可能机制为靶向调控 Wnt/β-catenin 信号传导通路。但是 Rodriguez et al<sup>[10]</sup>研究发现表达 NLRC5 的肿瘤细胞引发抗肿瘤免疫,认为 NLRC5 可以利用恢复肿瘤免疫原性,进而刺激保护性抗肿瘤免疫的激活,从而发挥抑制肿瘤浸润、侵袭和转移的能力。因此 NLRC5 在胃癌中的表达情况及其与胃癌患者的临床病理特征的关系值得进一步的深入研究。

本实验结果显示 NLRC5 在胃癌组织中高表达,阳性表达率为 72.04%,NLRC5 和 β-catenin 在胃癌中异常表达与胃癌的淋巴结转移和 TNM 分期有关。该结果提示 NLRC5 的高表达可能参与胃癌的侵袭和转移,影响胃癌患者的预后。Kaplan-meier 生存分析显示 NLRC5 低表达组患者的预后好于高表达组,Cox 多因素分析显示,NLRC5 的阳性表达是影响胃癌患者预后的独立危险因素,提示 NLRC5 的高表达是胃癌患者预后不良的分子标志之一,NLRC5 可能参与胃癌的侵袭和转移。为了进一步探讨 NLRC5 对胃癌癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。采用人源 pEGFP-C2-NLRC5 重组质粒,并通过基因

转染的方法观察重组质粒转染入胃癌细胞 MKN-45 和 MGC-803 细胞中 NLRC5 的表达变化。转染 pEGFP-C2-NLRC5 重组质粒可显著提高 NLRC5 mRNA 和蛋白表达,提示 pEGFP-C2-NLRC5 重组质粒转染成功。进一步的 MTT 和细胞划痕实验结果显示,胃癌细胞转染 NLRC5 后的增殖、迁移和侵袭能力显著增强。本研究显示 NLRC5 在胃癌组织中高表达,是胃癌患者预后不良的分子标志之一,而且 NLRC5 参与调控胃癌细胞增殖、迁移和侵袭能力。

大量研究<sup>[11]</sup>显示肿瘤的侵袭转移与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路密切相关。Wnt 基因编码 Wnt 配体是一种富含半胱氨酸、糖基化、脂质修饰的分子量约为 40 ku 的蛋白质<sup>[12]</sup>。而  $\beta$ -catenin 是 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的关键调控因子。 $\beta$ -catenin 主要有两类作用:①作为经典的 Wnt 信号通路的关键调控分子调控该通路的开关。促进胃癌发生发展的重要的分子机制之一就是 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号传导通路的异常激活。Segditsas et al<sup>[13]</sup>研究发现结直肠癌发生发展的重要驱动力量之一就是 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号传导通路的异常激活。Suzuki et al<sup>[14]</sup>研究发现胃黏膜细胞感染幽门螺杆菌后,会导致促癌基因 c-MYC 表达增加,进而激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号传导通路,促进胃癌的发生发展。②另外  $\beta$ -catenin 还可以通过介导 E-钙黏蛋白与  $\alpha$ -catenin 的相互作用,参与细胞的黏附、迁徙与转移等过程。Cheng et al<sup>[15]</sup>研究发现在弥漫型胃癌中细胞核内的  $\beta$ -catenin 异常增多,而且发现存在膜结合的 E-钙黏蛋白的丢失。Mei et al<sup>[16]</sup>研究发现  $\beta$ -catenin 的表达程度与肿瘤细胞的侵袭转移能力呈正相关性,总而言之,大量的针对经典的 Wnt 信号通路的研究表明  $\beta$ -catenin 蛋白参与了胃癌的发生发展。

本研究显示  $\beta$ -catenin 在胃癌组织中的阳性表达率为 67.74%,Cox 多因素回归分析显示 NLRC5 的阳性表达、低 TNM 分期、淋巴结转移和  $\beta$ -catenin 阳性表达是影响胃癌患者预后的独立危险因素。进一步采用 Western blot 检测胃癌细胞转染株过表达 NLRC5 后  $\beta$ -catenin 和 C-myc、MMP-7 表达水平的变化。结果显示,过表达 NLRC5 能明显提高  $\beta$ -catenin 和 C-myc、MMP-7 的表达水平;提示 NLRC5 可能通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路影响胃癌的侵袭转移。因此本研究推测 NLRC5 的异常表达可以通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,进而促进下游靶基因的表达,从而调控细胞生长、凋亡以及影响细胞间黏附功能,参与胃癌的发生,并进一步影响胃癌的浸润

和转移,从而在胃癌的发生发展中起重要的作用。具体的作用机制尚需进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] Staehli F, Ludigs K, Heinz L X, et al. NLRC5 deficiency selectively impairs MHC class I-dependent lymphocyte killing by cytotoxic T cells [J]. *J Immunol*, 2012, 188(8): 3820-8.
- [2] Kersse K, Bertrand M J, Lamkanfi M, et al. NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22(5-6): 257-76.
- [3] Hayden M S, Ghosh S. Signaling to NF- $\kappa$ B [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(18): 2195-224.
- [4] Carretero F J, Del Campo A B, Flores-Martín J F, et al. Frequent HLA class I alterations in human prostate cancer: molecular mechanisms and clinical relevance [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2016, 65(1): 47-59.
- [5] Yao Y, Wang Y, Chen F, et al. NLRC5 regulates MHC class I antigen presentation in host defense against intracellular pathogens [J]. *Cell Res*, 2012, 22(5): 836-47.
- [6] Benko S, Magalhaes J G, Philpott D J, et al. NLRC5 limits the activation of inflammatory pathways [J]. *Immunol*, 2010, 185(3): 1681-91.
- [7] Kuenzel S, Till A, Winkler M, et al. The nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor NLRC5 is involved in IFN-dependent antiviral immune responses [J]. *J Immunol*, 2010, 184(4): 1990-2000.
- [8] Cui J, Zhu L, Xia X, et al. NLRC5 negatively regulates the NF- $\kappa$ B and type I interferon signaling pathways [J]. *Cell*, 2010, 141(3): 483-96.
- [9] Peng Y Y, He Y H, Chen C, et al. NLRC5 regulates cell proliferation, migration and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. [J]. *Cancer Lett*, 2016, 376(1): 10-21.
- [10] Rodriguez G M, Bobbala D, Serrano D, et al. NLRC5 elicits anti-tumor immunity by enhancing processing and presentation of tumor antigens to CD8(+) T lymphocytes [J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(6): e1151593.
- [11] Franco A T, Israel D A, Washington M K, et al. Activation of  $\beta$ -catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori* [J]. *Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(30): 10646-51.
- [12] Port F, Basler K. Wnt trafficking: new insights into Wnt maturation, secretion and spreading [J]. *Traffic*, 2010, 11(10): 1265-71.
- [13] Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway [J]. *Oncogene*, 2006, 25(57): 7531-7.
- [14] Suzuki M, Mimuro H, Kiga K, et al. *Helicobacter pylori* Cag A phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation [J]. *Cell Host Microbe*, 2009, 5(1): 23-34.
- [15] Cheng X X, Wang Z C, Chen X Y, et al. Frequent loss of membranous E-cadherin in gastric cancers: a cross-talk with Wnt in de-

terminating the fate of  $\beta$ -catenin [J]. *Clin Exp Metastasis* 2005, 22(1): 85-93.

[16] Mei J M, Borchert G L, Donald S P, et al. Matrix metalloproteinase (s) mediate(s) NO-induced dissociation of beta-catenin from

membrane bound E-cadherin and formation of nuclear beta-catenin/LEF-1 complex [J]. *Carcinogenesis* 2002, 23(12): 2119-22.

## The significance of NLRC5 expression in gastric carcinoma and its possible mechanism of invasion and metastasis of gastric carcinoma

Xu Hui<sup>1</sup>, Wu Wenyong<sup>2</sup>, Zhang Zhen<sup>2</sup>, et al

(Dept of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032;

Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To observe the expression of nucleotides-binding domain receptor family containing CARD domain-5 (NLRC5) and  $\beta$ -catenin in gastric cancer, analyze the relationship between NLRC5 and clinicopathological features and prognosis of gastric cancer, and preliminarily explore the relationship between NLRC5 and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. **Methods** A total of 93 patients with gastric cancer who underwent radical gastrectomy were enrolled. All patients were diagnosed by immunohistochemical staining to investigate the expression of NLRC5 and  $\beta$ -catenin in gastric carcinoma, and to analyze the relationship between the expression of NLRC5 and the clinicopathological features of gastric cancer. Gastric cancer cell lines MKN-45 and MGC-803 were transfected by pFP-C2-NLRC5 recombinant plasmid. qRT-PCR and Western blot were used to verify the transfection efficiency of NLRC5. The effect of NLRC5 expression on the biological behavior was observed by MTT cell proliferation and cell scratches test ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) and the changes of related protein in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway were detected by Western blot in gastric cancer cells. **Results** The expression of NLRC5 in 93 cases of gastric cancer was positive in 67 cases (72.04%) and negative in 26 cases (27.96%). The expression of NLRC5 was closely related to the TNM staging, lymph node metastasis and recurrence of gastric cancer. Kaplan-meier survival analysis was performed in gastric cancer patients with different expression of NLRC5. The results showed that patients with NLRC5-negative expression were better than those with positive expression ( $P < 0.05$ ). The expression of  $\beta$ -catenin was positive in 63 cases (67.74%) and negative in 30 cases (32.26%). Cox multivariate regression analysis showed that the positive expression of NLRC5 and  $\beta$ -catenin, low TNM staging and lymph node metastasis were independent prognostic factors of gastric cancer. MTT and scratches showed that overexpression of NLRC5 could significantly promote the proliferation and migration of gastric cancer cells. Western blot showed that overexpression of NLRC5 could significantly increase the key protein  $\beta$ -catenin and the key downstream of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway target protein C-myc, matrix metalloproteinase-7 expression levels. **Conclusion** NLRC5 is widely expressed in gastric cancer tissues, and its expression is closely related to TNM staging and lymph node metastasis of gastric cancer. Kaplan-meier survival analysis shows that NLRC5 overexpression is a risk factor for prognosis of gastric cancer. Cox multivariate regression analysis shows that NLRC5 overexpression is an independent risk factor for the prognosis of gastric cancer patients. NLRC5 and  $\beta$ -catenin are positively correlated, and the expression of NLRC5 affects the biological behavior of gastric cancer cells and the expression of key proteins in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, suggesting that NLRC5 may affect the invasion and metastasis of gastric cancer by regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

**Key words** gastric adenocarcinoma; NLRC5; clinicopathological characteristics; invasion and metastasis