مجله دانشکده پزشکی اصفهان **مقاله پژوهشی**
سال سی‌ام/شماره ۲۱۴/هفته چهارم دی ماه ۱۳۹۱
تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۵ **تاریخ پذیرش:** ۹۱/۹/۷

بیان مولکول NKG2D در سطح لنفوسیت‌های T خون محیطی افراد مبتلا به مراحل متاستازی و غیر متاستازی سرطان کولورکتال

هادی غضنفری[۱]، دکتر مرجان قراگوزلو[۲]، دکتر عباس رضایی[۳]، دکتر حمید کلانتری[۴]، دکتر محمدرضا مرآثی[۵]، دکتر محمدحسین صانعی[۶]، وجیهه استادی[۷]، نیلوفر حسن‌نژاد[۸]

چکیده

مقدمه: لنفوسیت‌های T، مهم‌ترین سلول‌های ایمنی دخیل در مبارزه علیه سرطان‌های مختلف به حساب می‌آیند. این سلول‌ها از طریق گیرنده‌های مختلف فعال می‌شوند. یکی از این گیرنده‌های کمک محرک، مولکول‌های NKG2D (Natural killer group 2D) می‌باشند. لنفوسیت‌های T، ضمن تحریک توسط گیرنده‌ی آنتی‌ژنی (T-cell receptor یا TCR) به وسیله‌ی مولکول‌های NKG2D بیشتر فعال می‌گردند. هدف این مطالعه، بررسی بیان مولکول NKG2D در لنفوسیت‌های T در مراحل مختلف ابتلا به سرطان کولورکتال بود.

روش‌ها: در مطالعه‌ی حاضر، نمونه‌های خون محیطی ۱۸، ۱۵، ۱۱ و ۱۰ نفر از افراد به ترتیب در گروه‌های شاهد، غیر متاستازی با مرحله‌ی پایین، غیر متاستازی با مرحله‌ی بالا و متاستازی جهت تحقیقات آزمایشگاهی موجود در این مطالعه تهیه گردید. درصد سلول‌های T بیان‌کننده‌ی NKG2D و میانگین شدت بیان (Median fluorescence intensity یا MFI) مولکول مزبور بر روی این سلول‌ها در افراد مبتلا به مراحل مختلف سرطان کولورکتال توسط تکنیک فلوسایتومتری ارزیابی شد.

یافته‌ها: میان گروه‌های بیمار (غیر متاستازی با مرحله‌ی پایین، غیر متاستازی با مرحله‌ی بالا و متاستازی) در مقایسه با افراد شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به نقش مولکول‌های NKG2D در فعال‌سازی لنفوسیت‌های T، مطالعات بیشتری مورد نیاز است تا مکانیسم این عدم تغییر معنی‌دار در مراحل مختلف سرطان کولون نسبت به افراد سالم مشخص گردد.

واژگان کلیدی: نئوپلاسم کولورکتال، لنفوسیت‌های T، NKG2D

مقدمه

سرطان یا نئوپلاسم کولورکتال (Colorectal cancer)، که به آن سرطان کولون (Colon cancer) هم می‌گویند، شایع‌ترین سرطان دستگاه گوارش می‌باشد که عامل اصلی بروز آن هنوز به طور دقیق شناخته نشده است (۲-۱). این سرطان بر اساس سیستم TNM (Tumor/node/metastasis) به چهار مرحله (I، II، III و VI) به صورت انواع غیر متاستازی

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۱۸۹۰۲۲ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

[۱] دانشجوی کارشناس ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۳] استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۴] دانشیار، گروه داخلی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۵] دانشیار، گروه اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۶] دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۷] دانشجوی دکتری، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۸] دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مرجان قراگوزلو
Email: marjangh@gmail.com

(I، II و III) و متاستازی (IV) قابل تقسیم می‌باشد (طبقه‌بندی مرحله‌ای) (۳). همچنین می‌توان این سرطان را از منظری دیگر (طبقه‌بندی درجه‌ای یا Grading) در انواع درجه‌ی پایین (Low grade) و درجه‌ی بالا (High grade) طبقه‌بندی نمود (۴).

دفاع در برابر سرطان‌ها، به طور عمده توسط لنفوسیت‌های T شکل می‌گیرد. در این میان نقش سلول‌های CD8+T (با کشتن سلول‌های توموری) و سلول‌های CD4+T (با فراهم کردن سایتوکاین‌های مؤثر جهت فعال کردن سلول‌های CD8+T) حایز اهمیت می‌باشد (۵). در این میان، تعدادی از زیرگروه‌های سلول‌های T، برخی از گیرنده‌های مهاری و فعال‌کننده‌ی سلول‌های کشنده‌ی طبیعی (Natural killer یا NK) که دسته‌ی دیگری از سلول‌های ایمنی مهم در دفاع ضد توموری هستند، بیان می‌کنند. یکی از این گیرنده‌های با اهمیت، مولکول NKG2D (Natural killer group 2 D; CD314) می‌باشد که به آن گیرنده‌ی NKG2D (NKG2D receptor) نیز اطلاق می‌گردد. این مولکول، هومودایمری با باند دی‌سولفیدی است که به زیرخانواده‌ی گیرنده‌های شبه لکتین تیپ C تعلق دارد و یک گلیکوپروتئین تراغشایی تیپ II به حساب می‌آید (۷-۶). مولکول مزبور از لحاظ تکاملی حفاظت‌شده است و ژن کدکننده‌ی آن در انسان بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۲ واقع است. مولکول مزبور در سطح سلول‌های NK، CD8+T، γδT و تعدادی از سلول‌های CD4+T بارز می‌گردد و به عنوان یک مولکول کمک تحریکی در فرایند فعال شدن این سلول‌ها وارد عمل می‌شود (۹-۸). تفاوت عمده‌ای که میان NKG2D در سلول‌های NK و لنفوسیت‌های T وجود دارد این است که این گیرنده در سطح سلول‌های NK قادر است به تنهایی باعث تحریک فعالیت کشندگی شود؛ اما در سلول‌های T برای فعال شدن سلول، علاوه بر پیام‌رسانی از طریق NKG2D نیاز به تحریک گیرنده‌ی سلول T (TCR یا T-cell receptor) می‌باشد (۱۰).

لیگاندهای NKG2D نیز، شامل گروهی از مولکول‌ها هستند که از لحاظ ساختاری مشابه مولکول‌های MHC I (Major histocompatibility complex) می‌باشند. این لیگاندها در انسان شامل دو نوع مولکول از خانواده‌ی پروتئین مرتبط با زنجیره‌ی MHC I یا MIC A & B (MHC class I-chain related protein A and B) و شش نوع مولکول از خانواده‌ی پروتئین‌های متصل‌شونده به UL16 یا ULBPs (UL16 binding proteins) هستند (۱۰). به طور کلی، بیان لیگاندهای NKG2D، در انسان و موش می‌تواند به دنبال عفونت‌های مختلف ویروسی نظیر سایتومگالوویروس، ویروس آنفلوانزا، هپاتیت B، ویروس اپشتین‌بار (EBV) و آدنوویروس اتفاق بیافتد. همچنین لیگاندهای NKG2D، به طور وسیعی بر روی تومورهای توده‌ای (Solid) از جمله سرطان کولون و تعدادی از لوسمی‌ها بیان می‌گردند (۱۴-۱۱، ۶). بدین ترتیب، عدم بیان لیگاندهای NKG2D در حالت طبیعی و بیان آن در عفونت‌های ویروسی و شرایط بدخیمی و به طور کلی استرس سلولی (Cellular stress)، این مولکول را به عنوان یکی از مولکول‌های دخیل در فرایند نظارت ایمنی مطرح می‌نماید (۱۷-۱۵).

در این مطالعه، برای اولین بار، میزان حضور مولکول NKG2D بر روی سلول‌های T خون محیطی افراد مبتلا به مراحل مختلف سرطان کولون توسط

تکنیک فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

تعداد ۴۸ نفر، به صورت متوالی از افراد مراجعه‌کننده به درمانگاه گوارش بیمارستان الزهرای (س) اصفهان که نتیجه‌ی کولونوسکوپی آن‌ها مثبت بود و برای جراحی در این بیمارستان بستری شده بودند و نیز بیماران مبتلا به مرحله‌ی متاستازی سرطان کولون که به بیمارستان سیدالشهدای (ع) اصفهان جهت شیمی‌درمانی ارجاع داده شده بودند، انتخاب گردیدند. همچنین برای نمونه‌گیری از افراد سالم، تعداد ۲۴ نفر، به صورت متوالی از میان افراد مراجعه‌کننده به درمانگاه گوارش بیمارستان الزهرای (س) اصفهان که نتیجه‌ی کولونوسکوپی آن‌ها نیز منفی شده بود، انتخاب شدند. از بین این افراد، نمونه‌های خون محیطی در ۱۸، ۱۵، ۱۱ و ۱۰ نفر به ترتیب از افراد گروه‌های شاهد، غیر متاستازی با درجه‌ی پایین، غیر متاستازی با درجه‌ی بالا و متاستازی برای تحقیقات آزمایشگاهی موجود در این مطالعه قابل استفاده بود.

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی: بررسی شاخص‌ها بر روی لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها به طور معمول به روش فلوسایتومتری بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC یا Peripheral blood mononuclear cell) انجام می‌گیرد. در این مطالعه، ابتدا PBMC از خون تام جداسازی شد. بدین ترتیب که خون محیطی که در لوله‌ی حاوی ضد انعقاد هپارین تهیه شده بود، با محلول بافر فسفات و سرم جنین گاوی ۲ درصد به نسبت یک به یک رقیق گردید و در ادامه و به آرامی به روی محلول فایکول در یک لوله‌ی سانتریفوژ با نسبت یک به یک اضافه شد. سپس سانتریفوژ به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۲۸۰۰ دور در دقیقه انجام گردید. ناحیه‌ی PBMC پس از جداسازی به کمک پیپت پاستور در داخل یک لوله جمع‌آوری و با PBS به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. همچنین تعداد سلول‌ها نیز در ۱ میلی‌لیتر به کمک لام نئوبار تعیین شدند.

بررسی فلوسایتومتری: یکی از روش‌های رایج در بررسی میزان بروز گیرنده‌ها و سایر مولکول‌ها در سلول‌های T و همچنین تعیین درصد سلول‌های واجد آن‌ها، استفاده از دو مارکر سطحی CD3 و CD56 به صورت $CD3^{+}$ $CD56^{-}$، به عنوان تابلوی پایه‌ی مشخص‌کننده‌ی سلول‌های T در میان دیگر سلول‌های موجود در PBMC می‌باشد. در این حالت، مولکول یا مولکول‌های مورد بررسی، در کنار این پانل توسط تکنیک فلوسایتومتری مورد سنجش قرار می‌گیرند. در این تحقیق، بررسی مولکول مورد نظر در قالب پانل‌های سه رنگی (CD3+CD56-NKG2D) صورت پذیرفت. CD3، CD56 و NKG2D از مارکرهای سطحی هستند و در دستگاه فلوسایتومتری (FACS caliber; BD) توسط آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی که به ترتیب با رنگ‌های فلورسنت Percp، FITC و PE کونژوگه شده بودند، قرائت گردیدند. کلیه‌ی آنتی‌بادی‌ها به جز Phycoerythrin (PE) anti-human NKG2D / CD314 (activating) (eBioscience)، از BD bioscience خریداری شدند.

تمامی اطلاعات از طریق نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹ (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) و با استفاده از آزمون‌های ANOVA و Kruskal–Wallis مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

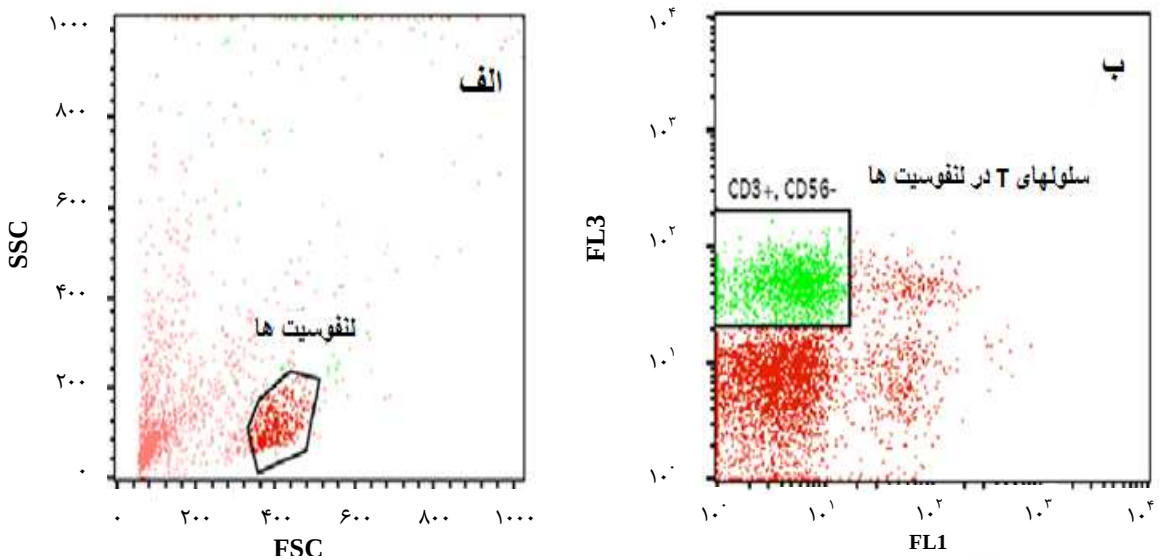
مشخصات دموگرافیک افراد مورد مطالعه در هر گروه در جدول ۱ نشان داده شده است.

رسم محدوده (Gate) برای سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های T بر اساس پانل CD3+CD56-. برای gate لنفوسیت‌ها در نمودار FSc-SSc (Fluorescence-activated cell sorting- side scatter channel)، با توجه به خصوصیات این سلول‌ها که دارای اندازه و گرانولیتی کمتری نسبت به دیگر گروه سلولی عمده در PBMC یعنی سلول‌های مونوسیت می‌باشند، محدوده یا دروازه‌ای (Gate) برای این سلول‌ها در نمودار FSc-SSc تعریف می‌شود که باعث می‌شود در نمودارهای بعدی مربوط به آن نمونه تنها سلول‌های لنفوسیتی مورد ارزیابی قرار گیرند (شکل ۱-الف).

با توجه به این که برای شاخص CD3 از آنتی‌بادی مونوکلونال نشان‌دارشده با PerCp و برای CD56 از آنتی‌بادی نشان‌دارشده با FITC (Fluorescein isothiocyanate) استفاده شده بود، در دستگاه فلوسایتومتری CD3 در کانال ۳ (FL3) و CD56 در کانال ۱ (FL1) قرائت گردید و سلول‌های CD3+CD56- به عنوان جمعیت سلولی T تعیین محدوده (Gate) شد (شکل ۱-ب).

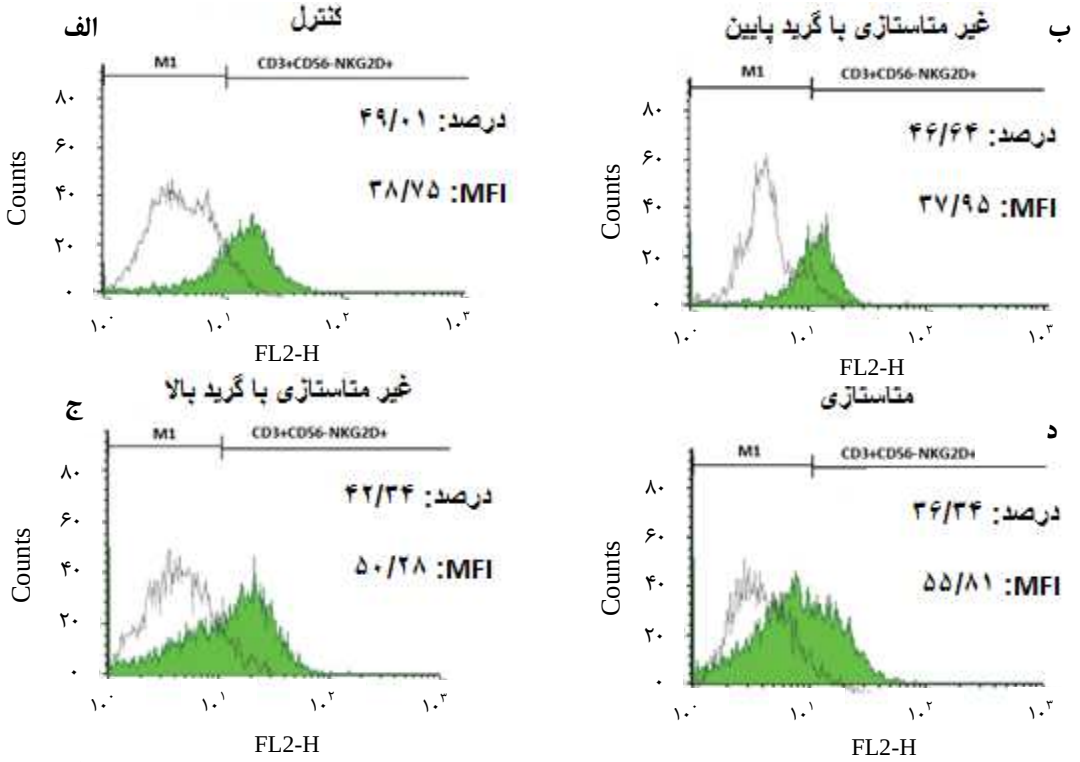
جدول ۱. خصوصیات کلی جمعیت مورد مطالعه از لحاظ مرحله‌ی بیماری، سن و جنس افراد

ویژگی		شاهد	متاستازی	غیر متاستازی با درجه‌ی بالا	غیر متاستازی با درجه‌ی پایین
تعداد		۱۸	۱۰	۱۱	۱۵
جنس	زن	۸	۳	۴	۷
	مرد	۱۰	۷	۷	۸
سن (سال)	حداقل	۲۹	۴۴	۴۳	۴۰
	حداکثر	۶۵	۷۲	۷۱	۷۱



شکل ۱. الف. **Gate** کردن (تعیین محدوده) لنفوسیت‌ها در **PBMC** (**Peripheral blood mononuclear cell**)، ب. **Gate** کردن سلول‌های **T** بر اساس پانل **CD3+CD56-**

بررسی شاخص NKG2D به عنوان رنگ سوم در سلول‌های T بر اساس نمودارهای هیستوگرام و Box and whisker plot. در این نمودارها می‌توان گستره‌ی نمودار را به کمک ایزوتایپ کنترل به دو بخش M1 و M2 تقسیم‌بندی نمود که در چنین حالتی ناحیه‌ی M1 فلورسانس پایه را به ما نشان می‌دهد و ناحیه‌ی M2 فلورسانس شاخص مورد نظر را در Gating اعمال شده برای آن نمونه ترسیم می‌کند.



شکل ۲. نمودارهای هیستوگرام شاخص NKG2D (Natural killer group 2D) در سلول‌های T نمونه‌های خون محیطی گروه‌های مورد مطالعه: الف) شاهد، ب) غیر متاستازی، ج) غیر متاستازی و د) متاستازی سرطان کولورکتال. درصد سلول‌های T بیان‌کننده‌ی NKG2D و میانگین شدت فلورسانس برای این مولکول در سطح سلول‌های T در ارتباط با گروه‌های چهارگانه نیز مشخص شده است.

جدول ۲. نتایج فلوسایتومتریک سلول‌های T در گروهای مورد مطالعه براساس شاخص سطحی NKG2D (کلیه نتایج بر اساس میانگین ± انحراف معیار در گروه‌های مربوط تهیه شده است)

	متاستازی انحراف معیار ± میانگین	غیر متاستازی با درجه‌ی بالا انحراف معیار ± میانگین	غیر متاستازی با درجه‌ی پایین انحراف معیار ± میانگین	شاهد انحراف معیار ± میانگین	مقدار P
درصد سلول‌های T در لنفوسیت‌ها	۱۷/۶۴ ± ۳/۶۰	۱۶/۷۵ ± ۳/۱۰	۱۹/۲۶ ± ۵/۳۵	۱۹/۳۸ ± ۶/۲۰	۰/۶۰
درصد سلول‌های NKG2D+ در لنفوسیت‌های T	۳۶/۳۴ ± ۱۷/۴۶	۴۲/۳۴ ± ۱۷/۹۷	۴۶/۶۴ ± ۱۵/۳۳	۴۹/۰۱ ± ۱۷/۹۱	۰/۲۱
MFI سلول‌های NKG2D+	۵۵/۸۱ ± ۲۵/۹۵	۵۰/۲۸ ± ۲۱/۴۲	۳۷/۹۵ ± ۱۶/۰۸	۳۸/۷۵ ± ۱۵/۰۶	۰/۰۷

NKG2D: Natural killer group 2D MFI: Median fluorescence intensity

میانگین و انحراف معیار درصد سلول‌های NKG2D+T به همراه میانگین و انحراف معیار مربوط به میانگین شدت بیان (MFI یا Median fluorescence intensity) این سلول‌ها برای شاخص NKG2D در گروه‌های مورد مطالعه در شکل ۲ و جدول ۲ نشان داده شده است. MFI، میانگین شدت فلورسانس یک شاخص است و بیانگر میانگین بیان آن شاخص در سطح سلول‌های T می‌باشد.

همان طور که مشاهده می‌شود درصد سلول‌های NKG2D+T و میانگین بیان شاخص NKG2D در سطح این سلول‌ها در گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارد. این نتایج به صورت جمع‌بندی شده در جدول ۲ نیز نشان داده شده است.

بحث

بررسی‌های مختلف، تغییرات متفاوتی از درصد سلول‌های T خون محیطی را در سرطان‌های مختلف نشان می‌دهد. Groh و همکاران اعلام کردند که تماس مولکول‌های NKG2D با مولکول‌های MIC محلول، باعث ارتقای گسترش سلول‌های NKG2D+CD4+T در بیماران مبتلا به سرطان با تومورهای MIC+ می‌شود (۱۵).

همچنین در تحقیقات انجام‌شده‌ی دیگر نشان داده شد که سلول‌های TCD4+ واجد NKG2D قدرت تکثیر محدودی هستند و دچار خستگی تکثیری (Replicative exhausion) می‌شوند (۱۸). در نتیجه افزایش بیان NKG2D در سطح سلول‌های CD4+T می‌تواند به عنوان مارکر پیری در سیستم ایمنی (Marker of immunosenescence) مطرح باشد (۱۹). مطالعه‌ی Osaki و همکاران نیز نشان‌دهنده‌ی کاهش بیان NKG2D در سطح سلول‌های CD8+T بیماران مبتلا به سرطان معده نسبت به افراد سالم بود (۲۰). Arreygue-Garcia و همکاران مشخص نمودند که بیان NKG2D در سلول‌های NK و T افراد دچار سرطان گردن رحم در مقایسه با افراد سالم با کاهش مواجه بود (۲۱). اما در مطالعه‌ی دیگری، هیچ تفاوتی در سلول‌های T بیان‌کننده‌ی NKG2D میان بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد سالم مشاهده نشد (۲۲). در مطالعه‌ی ما نیز درصد سلول‌های NKG2D+T و میانگین بیان شاخص NKG2D در سطح این سلول‌ها در افراد مبتلا به مراحل مختلف سرطان کولون و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشت.

هر چند که تحقیقات ذکر شده و از جمله مطالعه‌ی ما در سرطان‌ها ی مختلفی انجام شده است، ولی در نوع خود منحصر به فرد می‌باشند. با این وجود، شاید توجه به این نکته ضروری باشد که تحقیق حاضر بر روی سلول‌های CD3+CD56- به عنوان لنفوسیت‌های T خون محیطی و در ارتباط با سرطان‌های دستگاه گوارش (معده و کولون) بررسی گردید، در حالی که مطالعه‌ی Osaki و همکاران (با وجود انجام بررسی بر روی سرطان معده)، تنها سلول‌های CD8+T را مد نظر قرار داده‌اند.

از سوی دیگر، مطالعه‌ی Guerra و همکاران بر روی موش‌های دچار نقص در NKG2D نشان داد که عملکردهای نظارتی این مولکول بیشتر مربوط به مراحل سرطان‌زایی در بدخیمی‌های اپیتلیال و لنفوئیدی می‌باشد، اما در مراحل متاستاتیک، تأثیر چندانی مشاهده نمی‌شود. همچنین این محققین نشان دادند که موش‌های مبتلا به تومورهای تهاجمی سرطان پروستات، بیان لیگاندهای NKG2D را در اثر انتخاب

یا ویرایش ایمنی وابسته به NKG2D خاموش می‌کنند (۱۷). به طور کلی، گسترش تومور را می‌توان به عنوان یک فرایند تکاملی در نظر گرفت که شامل انتخاب جهش‌ها و تنظیم مولکول‌های اختصاصی مفید برای سرطان می‌باشد. در واقع، اگر سیستم ایمنی قادر به حذف تومور نباشد، فنوتیپ آن را تغییر می‌دهد و با وجود فعالیت خود، شرایطی را برای رشد بهتر برخی از سلول‌های توموری فراهم می‌کند که ناشی از انتخاب طبیعی می‌باشد؛ چرا که فعالیت سیستم ایمنی باعث از بین رفتن سلول‌های توموری حساس (ایمونوژن) و باقی ماندن سلول‌های مقاوم (غیر ایمونوژن) می‌گردد. چنین روندی شرایط را برای فرار سلول‌های توموری از دست سیستم ایمنی (Immuno evasion) فراهم می‌کند (۲۴-۲۳).

تومورهای بیان‌کننده‌ی لیگاند NKG2D به خصوص MICA (MICA expressing tumors) نظیر سرطان پستان، کولون، پروستات، ریه، تخمدان و لوسمی‌ها در ارتباط با این نوع مکانیسم فرار از دست سیستم ایمنی می‌باشند. در واقع MICAها، لیگاندهای محلول تله (Soluble decoy receptors) هستند که به احتمال زیاد در مراحل اولیه‌ی سرطان تولید نمی‌شوند و از این رو سرطان‌های ابتدایی با تعداد جهش کم، هدف خوبی برای سلول‌های NK و سلول‌های +TCD8 هستند، در حالی که در مراحل بعدی سرطان که جهش‌های ثانویه (Secondary mutation) اتفاق می‌افتد، توانمندی تولید MICA و یا خاموش کردن بیان لیگاند به وجود آمده و سلول‌های سرطانی امکان فرار سیستم ایمنی را از این طریق پیدا می‌کنند. بدین ترتیب می‌توان برای سیستم MICA-NKG2D، یک نقش شمشیر دو لبه را در مراحل مختلف سرطان در نظر گرفت (۲۷-۲۵). ضمن این که، این نحوه‌ی بیان مولکول‌های NKG2D در سطح سلول‌های توموری می‌تواند در وجود تفاوت در میزان بیان این مولکول بر روی سلول‌های T در تحقیقات مختلف حایز اهمیت باشد.

نتیجه‌گیری

در این بررسی مشخص گردید که درصد سلول‌های NKG2D+T و میانگین بیان شاخص NKG2D در سطح این سلول‌ها در گروه‌های مورد مطالعه (گروه‌های سرطانی و سالم) تفاوت معنی‌داری نداشت. این بررسی تاکنون در ارتباط با سرطان کولورکتال انجام نشده بود. مطالعات بیشتری نیاز است تا مکانیسم این عدم تغییر معنی‌دار در مراحل مختلف سرطان کولون نسبت به افراد سالم مشخص گردد.

به نظر می‌رسد، انجام بررسی بیان مولکول NKG2D و لیگاندهای آن به صورت In vitro و In vivo در ارتباط با زیرگروهای مختلف سلول‌های T به ویژه لنفوسیت‌های CD4+T و CD8+T در این زمینه راهگشا باشد.

تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر نتیجه‌ی اجرای بخشی از طرح پژوهشی به شماره‌ی ۱۸۹۰۲۲ می‌باشد که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تصویب و هزینه‌ی آن به وسیله‌ی این معاونت تأمین گردید. نویسندگان این مقاله از همکاری صمیمانه کلیه‌ی پرسنل بیمارستان‌های الزهرا (س)، سیدالشهدا (ع) و خانواده و همچنین نمونه‌دهندگان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Becker N. Epidemiology of colorectal cancer. Der Radiologe 2003; 43(2): 98-104.
2. Levin KE, Dozois RR. Epidemiology of large bowel cancer. World J Surg 1991; 15(5): 562-7.
3. Thorsteinsson M, Jess P. The clinical significance of circulating tumor cells in non-metastatic colorectal cancer--a review. Eur J Surg Oncol 2011; 37(6): 459-65.
4. Med India Network for Health. Colorectal cancer/Colon and rectal cancer. [Online]. 2012. Available from: URL: http://wwwmedindianet/patients/patientinfo/ColorectalCancer-Staginghtm.
5. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai Sh. Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2011.
6. Coudert JD, Held W. The role of the NKG2D receptor for tumor immunity. Semin Cancer Biol 2006; 16(5): 333-43.
7. Eagle RA, Jafferji I, Barrow AD. Beyond Stressed Self: Evidence for NKG2D Ligand Expression on Healthy Cells. Curr Immunol Rev 2009; 5(1): 22-34.
8. Furue H, Matsuo K, Kumimoto H, Hiraki A, Suzuki T, Yatabe Y, et al. Decreased risk of colorectal cancer with the high natural killer cell activity NKG2D genotype in Japanese. Carcinogenesis 2008; 29(2): 316-20.
9. Kloess S, Huenecke S, Piechulek D, Esser R, Koch J, Brehm C, et al. IL-2-activated haploidentical NK cells restore NKG2D-mediated NK-cell cytotoxicity in neuroblastoma patients by scavenging of plasma MICA. Eur J Immunol 2010; 40(11): 3255-67.
10. Gonzalez S, Groh V, Spies T. Immunobiology of human NKG2D and its ligands. Curr Top Microbiol Immunol 2006; 298: 121-38.
11. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. Nat Immunol 2001; 2(3): 255-60.
12. Vilarinho S, Ogasawara K, Nishimura S, Lanier LL, Baron JL. Blockade of NKG2D on NKT cells prevents hepatitis and the acute immune response to hepatitis B virus. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104(46): 18187-92.
13. Pappworth IY, Wang EC, Rowe M. The switch from latent to productive infection in epstein-barr virus-infected B cells is associated with sensitization to NK cell killing. J Virol 2007; 81(2): 474-82.
14. McSharry BP, Burgert HG, Owen DP, Stanton RJ, Prod'homme V, Sester M, et al. Adenovirus E3/19K promotes evasion of NK cell recognition by intracellular sequestration of the NKG2D ligands major histocompatibility complex class I chain-related proteins A and B. J Virol 2008; 82(9): 4585-94.
15. Groh V, Smythe K, Dai Z, Spies T. Fas-ligand-mediated paracrine T cell regulation by the receptor NKG2D in tumor immunity. Nat Immunol 2006; 7(7): 755-62.
16. Coudert JD, Zimmer J, Tomasello E, Cebecauer M, Colonna M, Vivier E, et al. Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells. Blood 2005; 106(5): 1711-7.
17. Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, et al. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. Immunity 2008; 28(4): 571-80.
18. Saez-Borderias A, Guma M, Angulo A, Bellosillo B, Pende D, Lopez-Botet M. Expression and function of NKG2D in CD4+ T cells specific for human cytomegalovirus. Eur J Immunol 2006; 36(12): 3198-206.
19. Alonso-Arias R, Moro-Garcia MA, Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Baltar J, Garcia FM, et al. NKG2D expression in CD4+ T lymphocytes as a marker of senescence in the aged immune system. Age (Dordr) 2011; 33(4): 591-605.
20. Osaki T, Saito H, Yoshikawa T, Matsumoto S, Tatebe S, Tsujitani S, et al. Decreased NKG2D expression on CD8+ T cell is involved in immune evasion in patients with gastric cancer. Clin Cancer Res 2007; 13(2 Pt 1): 382-7.
21. Arreygue-Garcia NA, Daneri-Navarro A, del Toro-Arreola A, Cid-Arregui A, Gonzalez-Ramella O, Jave-Suarez LF, et al. Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. BMC Cancer 2008; 8: 16.
22. Sayan O, Bilgi O, Kandemir EG, Erikci AA, Ozgun A, Yilmaz B, et al. Decreased NKG2D expression on natural killer cells in gastric cancer patients. Int J Hematol Oncol 2009; 19(1): 42-7.
23. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. Immunity 2004; 21(2): 137-48.
24. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. Nat Rev Immunol 2006; 6(11): 836-48.
25. Doubrovina ES, Doubrovin MM, Vider E, Sisson RB, O'Reilly RJ, Dupont B, et al. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon

molecule A and NKG2D receptor on NK cells in pancreatic cancer. Med Oncol 2011; 28(2): 466-74.
27. Ljunggren HG. Cancer immunosurveillance: NKG2D breaks cover. Immunity 2008; 28(4): 492-4.

adenocarcinoma. J Immunol 2003; 171(12): 6891-9.
26. Duan X, Deng L, Chen X, Lu Y, Zhang Q, Zhang K, et al. Clinical significance of the immunostimulatory MHC class I chain-related

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 214, 4th week, January 2013 Received: 26.9.2012 Accepted: 27.11.2012

The Expression of Natural Killer Group 2D Molecule on Peripheral Blood T-lymphocytes in Metastatic and Non-metastatic Colorectal Cancer Patients in Comparison to Healthy Controls

Hadi Ghazanfari[1], Marjan Gharagozloo PhD[2], Abbas Rezaei PhD[3], Hamid Kalantari MD[4], Mohammad Reza Maracy PhD[5], Mohammad Hossein Sanei MD[6], Vajiheh Ostadi MSc[7], Niloofar Hassannejad MSc[8]

Abstract

Background: T-lymphocytes are considered as the most important immune cells fighting against various cancers. These cells are activated by different co-stimulatory receptors such as natural killer group 2D (NKG2D) molecules. Besides being stimulated via antigen-specific T-cell receptors, T-lymphocytes are further activated by NKG2D molecules. Up to now, the expression of NKG2D molecules has not been studied in various stages of colorectal cancer.

Methods: In this study, peripheral blood samples of 18, 15, 11, and 10 individuals were obtained in control, low-grade non-metastatic, high-grade non-metastatic, and metastatic groups, respectively. The ratio of NKG2D expressing T-cells and the mean florescent intensity of NKG2D on these cells were evaluated in study groups by flow cytometry.

Findings: There was no significant difference among the patients of low-grade non-metastatic, high-grade non-metastatic, and metastatic groups in comparison with the control subjects.

Conclusion: Regarding the role of NKG2D molecules in T-cell activation, further studies are needed to explain our findings of not significant difference between various stages of colorectal cancer and healthy controls.

Keywords: Colorectal neoplasm, T-lymphocytes, Natural killer cell receptors

* This paper is derived from a MSc thesis No. 189022 in Isfahan University of Medical Sciences.

[1] MSc Student, Department of Immunology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[3] Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[4] Associate Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[5] Associate Professor, Department of Biostatistics and Epidemiology, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[6] Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[7] PhD Student, Department of Immunology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[8] PhD Student, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
Corresponding Author: Marjan Gharagozloo PhD, Email: marjangh@gmail.com