

## بررسی شیوع پلیمورفیسم rs 1049174 ژن NKG2D در بیماران مبتلا به سرطان پستان و مقایسه آن با افراد سالم

سمیرا قبادزاده<sup>۱</sup>، علی شمس<sup>۲\*</sup>، گیلدا اسلامی<sup>۳</sup>، سید علی میرغنی زاده<sup>۴</sup>

- کارشناسی ارشد اینمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
- استادیار اینمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
- استادیار گروه انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
- مری اینمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۸/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۲۶

### چکیده

**مقدمه:** گیرنده NKG2D یکی از گیرندهای فعال کننده سلول‌های سیستم ایمنی می‌باشد. دو نوع پلیمورفیسم تک نوکلئوتیدی (rs1049174G>C) در هاپلوتاپ‌های ژن NKG2D مشخص شده است. پلیمورفیسم GG سبب افزایش میل ترکیبی گیرنده NKG2D برای لیگاندهای آن روی سلول‌های مختلف می‌شود. در حالی که پلیمورفیسم CC یا CG سبب کاهش میل ترکیبی سلول‌های سیستم ایمنی و تحلیل قدرت کشندگی این سلول‌ها می‌گردد. در این مطالعه نوع آلل‌ها در ژن NKG2D در بیماران مبتلا به سرطان پستان مورد بررسی قرار می‌گیرد.

**روش بررسی:** در این مطالعه مورد-شاهدی تعداد ۱۰۸ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۱۰۸ فرد سالم از مراکز درمانی شهر یزد انتخاب شدند. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن NKG2D تکتیر گردید و ژنوتیپ rs1049174G>C این ژن با روش-PCR تعیین شد.

**نتایج:** فراوانی ژنوتیپ‌های هموزیگوت GG و CC در بیماران مبتلا به سرطان پستان به ترتیب ۴۴٪ و ۱۳٪ به دست آمد. در حالی که فراوانی این ژنوتیپ‌ها در گروه زنان سالم مورد مطالعه به ترتیب برابر با ۷۱٪ و ۶۵٪ بود. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که در فراوانی این ژنوتیپ‌ها بین افراد سالم و بیماران تفاوت معنی‌داری وجود دارد. از طرفی ژنوتیپ هتروزیگوت GC با فراوانی ۴۲٪ در زنان مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با فراوانی ۲۲٪ در زنان سالم نیز تفاوت معنی‌داری نشان داد ( $p < 0.0001$ ). با محاسبه خطر نسبی مشخص گردید که وجود آلل C نسبت به عدم وجود آلل C شans ابتلا به سرطان پستان را ۱/۷ برابر افزایش می‌دهد ( $CI = 0.95\% - 2.41\%$ ).

**نتیجه‌گیری:** پژوهش حاضر نشان می‌دهد که زنان دارای ژنوتیپ هموزیگوت CC شans بیشتری برای ابتلا به سرطان پستان در جامعه یزد دارند.

**واژه‌های کلیدی:** سرطان پستان، پلیمورفیسم، ژن NKG2D، سلول‌های سیستم ایمنی

\* (نویسنده مسئول)؛ تلفن ۰۳۵۱-۸۲۰۳۴۱۷، پست الکترونیکی: Alishams@ssu.ac.ir

## مقدمه

جمله کولون، پروستات، هپاتوسلولار کارسینوما، مغز و پستان بیان می‌شوند. اتصال NKG2D و MICA نقش مهمی در شناسایی و تخریب سلول‌های سرطانی توسط سیستم ایمنی میزبان دارد. در اثر اتصال NKG2D با یکی از لیگاندهایش DAP-10 مسیر سیگنالینگ آن از طریق پروتئین آداپتور 10 موجب شروع پاسخ‌های سیتوولیتیک وابسته به پرفورین در سلول‌های NK، CTL، T<sub>γδ</sub> می‌گردد(۱۴-۹).

ژن NKG2D بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۲ انسانی واقع شده است. این لوکوس ژنی شامل نواحی کدکننده رسپتورهای NKG2F و NKG2D CD94 و NKG2E و NKG2A می‌باشد. در این میان بین هاپلوتاپی از NKG2D با فعالیت سیتوولیتیک NK ارتباطی یافت شده است(۱۵،۱۶). دو نوع پلیمورفیسم تکنوکلوتیدی (rs1049174G>C) در هاپلوتاپهای ژن NKG2D مشخص شده است. پلیمورفیسم GG سبب افزایش میل ترکیبی گیرنده NKG2D برای لیگاندهای آن روی سلول‌های سرطانی می‌شود. در حالی که پلیمورفیسم CC یا CG کاهش میل ترکیبی سلول‌های سیستم ایمنی و تحلیل قدرت کشندگی این سلول‌ها را سبب می‌گردد. نوع پلیمورفیسم در ژن NKG2D ممکن است در استعداد ابتلای افراد به سرطان پستان و پیش‌آگهی بیماری مؤثر باشد(۱۶،۱۷). از آنجایی که مطالعه مشابهی در ایران در خصوص گیرنده‌های فعال‌کننده سلول‌های سیستم ایمنی از جمله NKG2D انجام نگرفته و اطلاعات بسیار محدودی از فراوانی ژنتیک‌های این ژن در جمعیت ایران وجود دارد و بنا به اهمیت این گیرنده در فعالیت و توانایی سیستم ایمنی در مبارزه با سرطان‌ها در این مطالعه فراوانی این ژن در بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد سالم شهر پرداخته شد.

## روش بررسی

پس از تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوqi یزد و کسب رضایت آگاهانه از بیماران و افراد سالم، ۱۰۸ زن بیمار مبتلا به سرطان پستان مراجعه کننده به مراکز درمانی شهر یزد به عنوان گروه مورد و ۱۰۸ زن سالم بدون

سرطان پستان یکی از سرطان‌های شایع است به طوری که پس از سرطان پوست دومین سرطان شایع در زنان سراسر دنیا می‌باشد(۱،۲). سالانه بیش از ۱۰۰۰۰۰ مورد جدید ابتلا به این بیماری در جهان شناخته می‌شود. سرطان پستان ۲۲/۹٪ از کل سرطان‌ها در زنان را شامل می‌شود. این سرطان در زنان نسبت به مردان ۱۰۰ برابر متداول‌تر است. سن ابتلا به این بیماری در زنان سفید پوست نسبت به زنان سیاه پوست بالاتر می‌باشد و میزان مرگ و میر در زنان سیاه پوست بیشتر است(۳). به طور کلی عوامل بروز سرطان پستان ناشناخته هستند، اما می‌توان به عواملی همچون سابقه خانوادگی و زمینه ژنتیکی، سن شروع قاعدگی و یائسگی، سن اولین زایمان، مصرف هورمون‌ها، مصرف مشروبات الکلی و سابقه قبلی سرطان در فرد اشاره کرد(۴). مجموعه عوامل ژنتیکی، ایمونولوژیک و عوامل محیطی در بروز این سرطان مؤثرند(۵،۶).

سیستم ایمنی و عوامل ژنتیکی در ابتلای افراد به سرطان و پیشرفت این بیماری دخیل می‌باشند(۷). ایمونولوژی سرطان، علمی است که ارتباط بین سیستم ایمنی و سرطان را بررسی می‌کند. این زمینه تحقیقاتی با هدف کشف روش‌های نوین ایمنی درمانی بنا گردیده است. شواهدی دال بر عملکرد هر دو سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی در جلوگیری از ابتلا و عود سرطان پستان وجود دارد(۸). یکی از اجزای ایمنی ذاتی که در نظارت ایمنی علیه سرطان نقش دارد کمپلکس-NKG2D-MICA/B می‌باشد. NKG2D یکی از انواع رسپتورهای فعال‌کننده سلول‌های سیستم ایمنی است که متعلق به خانواده لکتین نوع C می‌باشد. این گیرنده به صورت هومودیمر بر روی سلول‌های CTL، T<sub>γδ</sub>، NK، NKT و ماکروفاز بیان می‌شود. HLA-I لیگاند این رسپتور مولکول‌های گلیکوپروتئینی شبیه UL16 bp MICB، MICA و MICB است که به طور طبیعی روی سلول‌های بدن بیان نمی‌گردد و یا بیان آن بسیار کم است. از طرفی بیان این مولکول‌ها تحت تأثیر استرس‌هایی مانند عفونت و شوک حرارتی در سطح سلول‌ها افزایش می‌یابد. این دسته از مولکول‌ها به فراوانی در سطح سلول‌های توموری از

b: Annealing با دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه؛

c: Extension با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه؛

مرحله Extension نهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه صورت پذیرفت. بعد از انجام PCR محصولات جهت انجام الکتروفورز و RFLP در فریزر نگهداری شدند. حدود ۵ میکرولیتر از محصول واکنش PCR همراه ۱ میکرولیتر بافر بارگذاری در ژل آگاروز ۱٪ در بافر ۰.۵X TBE ۰.۵X الکتروفورز شد و کارایی واکنش تکثیر با استفاده از دستگاه شناساگر نور ماوراء بنفس مشاهده گردید.

روش RLFP بر روی محصولات PCR بدین روش انجام شد: ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۲/۵ میکرولیتر از بافر آنزیم و ۱ میکرولیتر آنزیم DdeI ساخت شرکت Fermentas و ۷/۵ میکرولیتر آب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱-۱۶ ساعت انجام گرفت. برای مشاهده قطعات حاصل از برش محصول از ژل آگاروز ۰.۲٪ با ولتاژ ۹۵ ولت و شدت جریان ۵۰ میلی آمپر استفاده شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. برای مقایسه توزیع فراوانی سه ژنتوتیپ مختلف در جایگاه rs1049174 NKG2D در نمونه‌های سلطانی با توزیع فراوانی این سه ژنتوتیپ در نمونه‌های شاهد از آزمون مجدول کای استفاده شد.

### نتایج

درجه‌بندی تومور و مرحله بیماری بر اساس اطلاعات موجود در پرونده پاتولوژی بیماران انجام گرفت. نتایج نشان داد که ۱۸/۵٪ بیماران در زمان جراحی مرحله ۱، ۰.۴۳/۵٪ در مرحله ۲، ۰.۲۷٪ در مرحله ۳ و ۰.۱۱٪ در مرحله ۴ قرار داشتند (جدول ۱). تمامی DNA های استخراجی دارای کیفیت مناسب برای PCR بودند. شکل ۱ نتیجه یک نمونه PCR را نشان می‌دهد. محصولات PCR برای انجام روش RFLP و بارگذاری در ژل آگار در یخچال نگهداری شدند. شکل ۲ نتیجه یک نمونه از روش PCR-RFLP را نشان می‌دهد. توزیع ژنتوتیپ‌ها و آل‌های

سابقه ابتلا به هر سلطان بر اساس معیارهای مندرج در پرسشنامه به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. با توجه به ضریب آزمون ۰.۹۵٪ و توان آزمون ۰.۸۰٪ و با توجه به شیوع پلی‌مورفیسم‌های مذکور در جمعیت، تعداد ۱۰۸ نمونه در هر گروه محاسبه شد. متوسط سنی بیماران مورد بررسی در این مطالعه ۴۵±۴ سال بود. ۳۰ نفر از بیماران پایین‌تر از ۴۰ سال و ۷۸ نفر بالاتر از ۴۰ سال داشتند. بیماران مورد مطالعه از نظر مرحله، طبقه‌بندی شده بودند، به طوری که ۲۵ نفر در مرحله ۱، ۲۹ نفر در مرحله ۲، ۳ نفر در مرحله ۳ و ۶ نفر در مرحله ۴ قرار داشتند. محدوده سنی گروه کنترل ۰.۴۳±۱۰ سال بود. آن دسته از افرادی که سابقه توده یا کیست پستان داشتند از مطالعه حذف گردیدند. از هر بیمار و فرد سالم در محدوده سنی ۰.۴۳±۱۰ سال، ۲ میلی‌لیتر خون وریدی به منظور استخراج DNA گرفته شد. استخراج DNA با استفاده از کیت accuprep genomic DNA extraction kit, Bioneer) گرفت و در میکروتیوب در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. بررسی کیفی DNA استخراجی با استفاده از ژن NKG2D با آگار ۰.۸٪ انجام شد. در مرحله بعدی تکثیر ژن NKG2D با روش PCR انجام گرفت. واکنش PCR با استفاده از ۲ میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰۰ نانوگرم، ۰.۲۵ میکرولیتر Taq polymerase با غلظت ۱ واحد بین‌المللی، ۰.۵ میکرولیتر بافر ۰/۵ میکرولیتر dNTP با غلظت ۰/۲ میلی مولار، ۰/۷۵ PCR میکرولیتر MgCl با غلظت ۱/۵ میلی مولار و ۰/۵ میکرولیتر پرایمر با غلظت ۱ پیکومولار انجام گرفت.

توالی پرایمرهای رفت و برگشت عبارتند از:

F:5-TCAGTGAAGGAAGAGAAGG-3

R:5-TTAAGGCTGGAGAATAATGC-3

طول قطعه حاصل از این واکنش ۲۳۰ جفت باز بود. شرایط

بهینه برای این تکثیر به ترتیب زیر انجام گرفت:

۱- مرحله Denaturation ابتدایی در دمای ۹۴ درجه

سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه؛

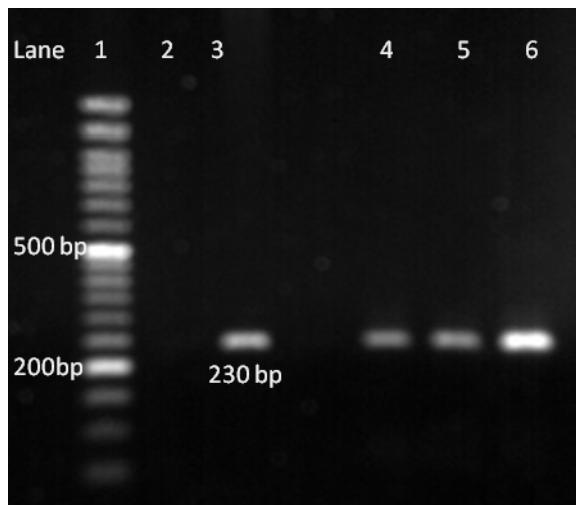
۲- ۳۰ سیکل از مراحل a, b, c که به شرح ذیل بودند:

a: Denaturation با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه؛

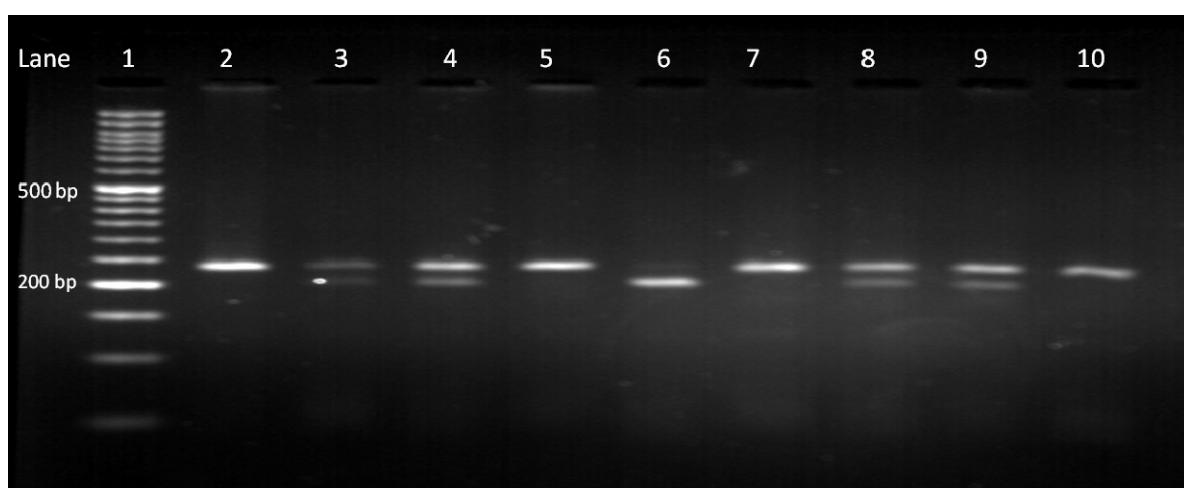
با فراوانی ۶۵٪ در گروه زنان بیمار و فراوانی ۳۵٪ آلل C در زنان مبتلا و فراوانی ۱۸٪ در زنان سالم نشان دهنده اختلاف معنی داری بین گروه های مورد مطالعه در فراوانی آللی است. وجود آلل C نسبت به عدم وجود آلل C شانس ابتلا به سرطان پستان را ۷/۱ برابر افزایش می دهد (جداول ۲ و ۳).

از طرفی ۶۰٪ از بیماران در مرحله ۱ بیماری دارای پلیمورفیسم GG بودند، در حالی که حدود ۸۳٪ از بیماران در مرحله ۴ دارای پلیمورفیسم CC بودند (جدول ۱).

مختلف جایگاه rs1049174 در گروه کنترل و بیمار در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصل از این بررسی حاکی از وجود اختلاف معنی داری از فراوانی ژنتیپی و آللی بین دو گروه مورد مطالعه است. ژنتیپ های هموزیگوت GG و CC به ترتیب با فراوانی ۴۴٪ و ۱۳٪ در گروه بیماران در مقایسه با فراوانی ۷۱٪ و ۶٪ در گروه زنان سالم و ژنتیپ هتروزیگوت GC با فراوانی ۴۲٪ در زنان سالم در مقایسه با فراوانی ۲٪ در زنان بیمار با در نظر گرفتن ( $p < 0.05$ ) حاکی از اختلاف معنی دار می باشد. فراوانی آلل G با میزان ۸٪ در گروه افراد سالم در مقایسه



شکل ۱- ژن NKG2D با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر گردید و پس از بارگذاری روی آگار ۱٪ باندهای مربوط به ژن مورد نظر با طول ۲۳۰ جفت باز در این شکل در ردیف های ۴، ۵، ۶ مشخص می باشد. ردیف ۱ مربوط به لدر و ردیف ۲ کنترل منفی می باشد.



شکل ۲: محصول PCR در دمای ۳۷ درجه و به مدت ۱۶-۱۷ ساعت با آنزیم Ddel برش داده شد و پس از بارگذاری روی آگار ۲٪ باندهای مربوط به برش قطعه مورد نظر در این شکل در ردیف های ۲-۱۰ مشخص می باشد. ردیف های ۲ و ۵ و ۷ و ۱۰ فاقد برش و نشان دهنده ژنتیپ GG، ردیف های ۳ و ۸ و ۹ شامل سه باند ۲۳۰ و ۱۹۱ و ۳۹ جفت بازی و نشان دهنده ژنتیپ GC و ردیف ۶ شامل دو قطعه ۱۹۱ و ۳۹ جفت بازی و نشان دهنده ژنتیپ CC می باشد.

جدول ۱: فراوانی ژنوتیپ‌های GG و GC و CC در مرحله‌های مختلف بیماران مبتلا به سرطان پستان

پلی‌مورفیسم	مرحله ۱ (درصد)	مرحله ۲ (درصد)	مرحله ۳ (درصد)	مرحله ۴ (درصد)
GG	۶۰	۵۰	۳۱	.
GC	۴۰	۴۵/۸	۴۴/۸	۱۶/۷
CC	.	۴/۲	۲۴/۱	۸۳/۳

جدول ۲: فراوانی ژنوتیپی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی C&gt;G گروه شاهد و مورد

فرابونی ژنوتیپی	گروه شاهد	گروه مورد	تعداد	(درصد)
GG	۷۷	۴۸	(٪.۴۴/۴)	(٪.۴۴/۴)
GC	۲۴	۴۶	(٪.۲۲/۲)	(٪.۴۲/۶)
CC	۷	۱۴	(٪.۶/۵)	(٪.۱۳)

جدول ۳: فراوانی آللی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی C&gt;G گروه شاهد و مورد

فرابونی آللی	گروه شاهد	گروه مورد	تعداد	(درصد)
G	۱۷۸	(٪.۸۲/۳)	۱۴۲	(٪.۶۵/۵)
C	۳۸	(٪.۱۷/۷)	۷۴	(٪.۳۴/۵)

## بحث

تک‌نوکلئوتیدی (C>G) در هاپلوتایپ‌های ژن NKG2D مشخص شده است. این لوکوس ژنی شامل نواحی کدکننده رسپتورهای سلول‌های کشنده طبیعی مانند CD94 و NKG2A و NKG2E و NKG2F و NKG2D فعالیت سیتولیتیک NK ارتباط یافت شده است (۲۱، ۲۲). پلی‌مورفیسم‌های C>G سبب ایجاد دو نوع عملکرد در فعالیت سلول‌های NK می‌گردد. مطالعات نشان داده‌اند که ژنوتیپ GG سبب HNK1 و CC سبب LNK1 در سلول‌های NK می‌شود. در افراد با هاپلوتایپ HNK1/HNK1 LNK1/LNK کاهش به سرطان در مقایسه با هاپلوتایپ می‌یابد (۲۳). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژنوتیپ

مطالعات انجام گرفته بر روی حالت‌های مختلف یک جایگاه ژنی پیشنهاد می‌کنند که عواملی مانند پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی ممکن است بیان کننده تفاوت‌های فردی در حساسیت افراد به سرطان، بروز زودرس و پیشرفت سرطان و حتی مقاومت‌های دارویی باشند. سرطان پستان عامل اصلی مرگ و میر زنان در کشورهای صنعتی است و در کشورهای در حالت توسعه مانند ایران در حال افزایش است (۱۸-۲۰).

این مطالعه با هدف بررسی و ارزیابی پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی C>G ژن NKG2D در افراد مبتلا به سرطان پستان و مقایسه آن با افراد سالم طراحی و اجرا گردید. گیرنده NKG2D یکی از گیرنده‌های فعال‌کننده سلول‌های سیستم ایمنی می‌باشد. دو نوع پلی‌مورفیسم

باشد. مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۸ میلادی نشان داد که ژنتیپ NKG2D در پیش‌آگهی سرطان کلورکتال نیز تأثیر دارد که نتایج آن مشابه مطالعه حاضر بود(۲۴). در این مطالعه نیز مشخص شد که ژنتیپ CC موجب تضعیف پاسخ‌های سیتولیتیک در سلول‌های سیستم ایمنی می‌شود. مطالعه دیگری که توسط Hayashi و همکاران انجام گرفت نشان داد که ژنتیپ CC و LNK1/LNK1 سبب بقاء کمتر بیماران مبتلا به سرطان می‌شود. همچنین این مطالعه نشان داد که اشکال الی و ژنتیپ‌های مختلف در زن NKG2D می‌تواند در میزان کشنده‌گی سلول‌های NK و سرنوشت پاسخ ایمنی در بیماران مبتلا به سرطان تأثیر به سزایی داشته باشد(۲۵).

به طور کلی در جمعیت مورد مطالعه حاضر با حضور آل C در ژنتیپ افراد احتمال بروز بدخیمی افزایش می‌یابد. از آنجایی که پلی‌مورفیسم مورد بررسی در ناحیه عملکردی پروتئین می‌باشد و در میل ترکیبی رسپتور به لیگاندش نقش مؤثری ایفا می‌کند به نظر می‌رسد افراد LNK1: CC عملکرد ضعیفتری از سلول‌های NK را دارند و در نتیجه نقص در نظارت ایمنی در افراد، بروز سلول‌های توموری افزایش می‌یابد. همچنین حضور ۸۳٪ از افراد هموزیگوت CC در مرحله ۴ بیماری حاکی از پیش‌رونده‌گی و پیش‌آگهی بد بیماری با داشتن چنین ژنتیبی است. بنابر نتایج بررسی حاضر احتمالاً می‌توان گفت که هاپلوتاپ‌های HNK1/LNK1 و HNK1/HNK1 نگذشتند در پیش‌بینی استعداد ابتلا به سرطان پستان و واریانت جدید در پیش‌بینی استعداد ابتلا به سرطان پستان و همچنین پیش‌رونده‌گی سرطان پستان در زنان مؤثر است.

هموزیگوت GG که موجب تقویت پاسخ‌های ایمنی علیه تومورها می‌شود، تنها در ۴۴٪ از بیماران وجود دارد، در حالی که در افراد سالم حدود ۷۱٪ است. از طرف دیگری فراوانی آل هموزیگوت CC در بیماران با مرحله ۳ و ۴ به طور معنی‌داری بیشتر از بیماران در مراحل اولیه بیماری بود. این یافته نشان می‌دهد که وجود ژنتیپ CC می‌تواند در پیش‌آگهی بد بیماری دخالت داشته باشد. از طرفی وجود آل C نسبت به عدم وجود آل C با (۱/۳۱-۲/۲۴) شانس ابتلا به سرطان پستان را ۱/۷ برابر افزایش می‌دهد. وجود آل G نسبت به عدم وجود آل G با (۰/۷۶-۲/۵۴) (CI=۰/۹۵) شانس سالم ماندن را ۱/۳ برابر افزایش می‌دهد. با توجه به نتایج فوق به نظر می‌رسد زنان دارای ژنتیپ هموزیگوت CC در معرض خطر افزایش یافته‌ای جهت ابتلا به سرطان پستان می‌باشند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ میلادی توسط Imai و همکاران بر روی ۷۳۲ نفر از افرادی که در معرض بمب اتم در ژاپن قرار گرفته بودند، انجام گرفت، فراوانی ژنتیپ HNK1/HNK1٪ ۱۳/۳، LNK1/LNK1٪ ۳۵/۲ و ژنتیپ HNK1/LNK1٪ ۵۱/۵ ژنتیپ ژنتیپ Imai نشان داد که ژنتیپ GC به دست آمد(۱۶). تحقیق Imai نشان داد که ژنتیپ GC ژنتیپ غالب در جمعیت افراد سالم در ژاپن است(۰/۵۱)، در حالی که GC در جمعیت سالم زنان شهر یزد حدود ۰/۲۲ به دست آمد. مطالعه Imai روی افراد ژاپنی با جنسیت مختلف انجام شد، در حالی که مطالعه حاضر روی زنان ایرانی صورت گرفت. شاید تفاوت در نتایج به علت نژاد و جنسیت باشد. از طرفی ژنتیپ CC در افراد سالم ژاپنی به طور معنی‌داری بیشتر از این مطالعه بود که دلیل آن می‌تواند اختلافات نژادی باشد.

## References:

- 1- Vogel VG. *Breast cancer prevention: a review of current evidence*. CA Cancer J Clin 2000; 50(3): 156-70.
- 2- Ghafour A, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, Thun M. *Trends in breast cancer by race and ethnicity*. CA Cancer J Clin 2009; 53(6): 342-55.
- 3- Hulka BS, Moorman PG. *Breast cancer: hormones and other risk factors*. Maturitas 2001; 38(1): 103-13.
- 4- Wolff MS, Weston A. *Breast cancer risk and environmental exposures*. Environ Health Perspect 1997;

- 105(Suppl 4): 891-96.
- 5- Dupont WD, Parl FF, Hartmann WH, Brinton LA, Winfield AC, Worrell JA, et al. *Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia*. Cancer 1993; 71(4): 1258-65.
  - 6- Lind H, Zienolddiny S, Ekstrøm PO, Skaug V ,Haugen A. *Association of a functional polymorphism in the promoter of the MDM2 gene with risk of nonsmall cell lung cancer*. Int J Cancer 2006; 119(3): 718-21.
  - 7- Bond GL, Hu W, Levine A. *A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene: from a molecular and cellular explanation to clinical effect*. Cancer Res 2005; 65(13): 5481-4.
  - 8- Standish LJ, Sweet ES, Novack J, Wenner CA, Bridge C, Nelson A, et al. *Breast cancer and the immune system*. J Soc Integr Oncol 2008; 6(4): 158-68.
  - 9- Chalupny NJ, Sutherland CL, Lawrence WA, Rein-Weston A, Cosman D. *ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D*. Biochem Biophys Res Commun 2003; 305(1): 129-35.
  - 10- Liu X, Li L, Pan F, Tian W. *MICB polymorphism in a southern Chinese Han population: the identification of two new MICB alleles, MICB\*005:06 and MICB\*026*. Human Immunol 2012; 73(8): 818-23.
  - 11- Aguera-Gonzalez S, Gross CC, Fernandez-Messina L, Ashiru O, Esteso G, Hang HC, et al. *Palmitoylation of MICA, a ligand for NKG2D, mediates its recruitment to membrane microdomains and promotes its shedding*. Eur J Immunol 2011; 41(12): 3667-76.
  - 12- Wang W, Gao L, Ma YG. *Effect of NKG2D in eliminating hematological malignant cell lines by natural killer cells*. Zhongguo Shi Yan Xue Za Zhi 2012; 20(2): 296-9.
  - 13- Okita R, Mougiakakos D, Ando T, Mao Y, Sarhan D, Wennerberg E, et al. *HER2/HER3 signaling regulates NK cell-mediated cytotoxicity via MHC class I chain-related molecule A and B expression in human breast cancer cell lines*. J Immunol 2012; 188(5): 2136-45.
  - 14- Cerwenka A, Lanier LL. *Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity*. Immunol Rev 2001; 181: 158-69.
  - 15- Borrego F, Kabat J, Kim DK, Lieto L, Maasho K, Pena J, et al. *Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells*. Mol Immunol 2002;38(9):637-60.
  - 16- Imai K, Hayashi T, Yamaoka M, Kajimura J, Yoshida K, Kusunoki Y, et al. *Effects of NKG2D haplotypes on the cell-surface expression of NKG2D protein on natural killer and CD8 T cells of peripheral blood among atomic-bomb survivors*. Human Immunol 2012; 73(6): 686-91.
  - 17- Kopp R, Glas J, Lau-Werner U, Albert ED, Weiss EH. *Association of MICA-TM and MICB C1\_2\_A microsatellite polymorphisms with tumor progression in patients with colorectal cancer*. J Clin Immunol 2009; 29(4): 545-54..
  - 18- Kalemi TG, Lambopoulos AF, Gueorguiev M, Chrisafi S, Papazisis KT, Kotsis A. *The association of p53*

- mutations and p53 codon 72, Her 2 codon 655 and MTHFR C677T polymorphisms with breast cancer in Northern Greece.* Cancer letters 2005; 222(1): 57-65.
- 19- Justenhoven C, Hamann U, Pierl CB, Rabstein S ,Pesch B, Harth V, et al. *One-carbon metabolism and breast cancer risk: no association of MTHFR, MTR, and TYMS polymorphisms in the GENICA study from Germany.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14(12): 3015-8.
- 20- Damin APS, Frazzon APG, Damin DC, Roehe A, Hermes V, Zettler C, et al. *Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk.* Cancer Detect Prev 2006; 30(6): 523-9.
- 21- Diermayr S, Himmelreich H, Durovic B, Mathys-Schneeberger A, Siegler U ,Langenkamp U, et al. *NKG2D ligand expression in AML increases in response to HDAC inhibitor valproic acid and contributes to allorecognition by NK-cell lines with single KIR-HLA class I specificities.* Blood 2008; 111(3): 1428-36.
- 22- Eagle RA, Traherne JA, Ashiru O, Wills MR, Trowsdale J. *Regulation of NKG2D Ligand Gene Expression.* Human immunol 2006; 67(3): 159-69.
- 23-Duan X, Deng L, Chen X, Lu Y, Zhang Q, Zhang K, et al. *Clinical significance of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule A and NKG2D receptor on NK cells in pancreatic cancer.* Med Oncol 2011; 28(2): 466-74.
- 24- Ebert EC, Groh V. *Dissection of spontaneous cytotoxicity by human intestinal intraepithelial lymphocytes: MIC on colon cancer triggers NKG2D-mediated lysis through Fas ligand.* Immunol 2008; 124(1): 33-41.
- 25- Hayashi T, Imai K, Morishita Y, Hayashi I, Kusunoki Y, Nakachi K. *Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immuno surveillance.* Cancer Res 2006; 66(1): 563-70.

## ***Investigation of NKG2D rs1049174G>C Gene Polymorphism in Women with Breast Cancer***

**Ghobadzadeh S(MSc)<sup>1</sup>, Shams A(PhD)<sup>\*2</sup>, Eslami G(PhD)<sup>3</sup>, Mirghanizadeh SA(MSc)<sup>4</sup>**

<sup>1,2,4</sup>Department of Immunology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

<sup>3</sup>Department of Parasitology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

**Received:** 17 Oct 2012

**Accepted:** 15 Nov 2012

### **Abstract**

**Introduction:** NKG2D receptor is one of the activator receptors of immune cells. In humans, NKG2D gene has two single nucleotide polymorphisms (SNP)(rs1049174G>C). According to other studies, GG SNP makes a high affinity receptor for NKG2D ligands whereas, CC polymorphism reduces NKG2D affinity for their ligands. The present study investigates NKG2D SNPs in patients with breast cancer in Yazd for the first time.

**Methods:** In this Case-Control study, 108 patients with breast cancer and 108 healthy women were selected from health Care centers of Yazd. Using specific NKG2D primers the gene proliferated and rs1049174G>C polymorphisms were determined by RFLP procedure.

**Results:** according to our statistic analysis, frequency of CC and GG genotypes in the patients were 44.4% and 13% respectively whereas, in the healthy donors the frequency was 71.3% and 6.5%. The difference between the frequency in healthy and patient groups was significant. On the other hand, the frequency of GC genotype in patients was considerably higher than the healthy women (PV, 0.0001). When the relative risk in the patients was determined, it was revealed that women with CC genotype have more susceptibility for breast cancer in comparison with healthy women (CI=95%, 1.31-2.24, OD=1.7).

**Conclusion:** The present study results showed that women with homozygote CC genotype have more chance of breast cancer in Yazd population.

**Keywords:** Breast Cancer; Immune Cell System; NKG2D; Polymorphism

**This paper should be cited as:**

Ghobadzadeh S, Shams A, Eslami G, Mirghanizadeh SA. ***Investigation of NKG2D rs1049174G>C gene polymorphism in women with breast cancer.*** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2013; 21(3): 291-99.

**\*Corresponding author:** Tel: +98 351 8203417, Email: Alishams@ssu.ac.ir