Journal of Gorgan University of Medical Sciences

e-ISSN: 2008-4080 p-ISSN: 1562-4765

2025 / Vol 27 / No 3

Simultaneous Evaluation of Regulatory Molecules CXC Chemokine Receptor 3 (CXCR3), Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1), Natural Killer Group 2 Member D (NKG2D), and Transforming Growth Factor Beta Receptor II (TGF-βRII) on T Lymphocytes of Newly Diagnosed Breast Cancer Patients

Elaheh Arianfar (M.Sc)[1], **Ghazaleh Alizad (M.Sc)**[1], **Ali Memarian (Ph.D)***[2,3]

1 M.Sc in Immunology, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. 2 Golestan Research Center of Gastroenterology and Hepatology (GRCGH), Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. 3 Associate Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

Research Article

Abstract

Background and Objective: Breast cancer is one of the most common diseases worldwide and the second leading cause of death among women. Immune responses play a critical role in inhibiting the onset and progression of this disease. Given the important role of T lymphocytes in identifying and preventing the spread of breast cancer tumor cells, this study was conducted to simultaneously evaluate the regulatory molecules CXC chemokine receptor 3 (CXCR3), programmed cell death protein 1 (PD-1), natural killer group 2 member D (NKG2D), and transforming growth factor beta 1 receptor II (TGF-βRII) on T lymphocytes of newly diagnosed breast cancer patients.

Methods: This case-control study was performed on 26 newly diagnosed breast cancer patients (mean age = 46.2±9.5 years) admitted to the Fifth Azar Educational-Therapeutic Center in Gorgan, Iran, and 12 non-breast cancer individuals (mean age = 42.9±9.9 years) selected from the staff and students of Golestan University of Medical Sciences during 2018-2019. First, blood sampling was performed and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated. Then, using flow cytometry, different cell populations were evaluated for the expression of CXCR3, PD-1, NKG2D, and TGF-βRII. Plasma levels of interferon gamma (IFN-γ) and major histocompatibility complex class I chain related gene-A (MIC-A) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: The mean percentage of T lymphocyte population in newly diagnosed breast cancer patients was significantly lower compared to healthy individuals ($P<0.05$). Also, the mean percentage of T lymphocytes expressing PD-1 and TGF-βRII was higher in the case group compared to the control group, while the expression of NKG2D and CXCR3 showed lower levels ($P<0.05$). The results of comparing plasma concentrations of IFN-γ and MIC-A indicated that the case group had higher levels of MIC-A than the control group ($P<0.05$); however, no statistically significant difference was found regarding IFN-γ.

Conclusion: It seems that the increased expression of TGF-βRII and PD-1 along with the decreased expression of NKG2D and CXCR3 and the reduced level of MIC-A in newly diagnosed breast cancer patients may be related to upregulation and potent suppression of T lymphocyte immunity and their dysfunction in breast cancer disease.

Keywords: Breast Neoplasms; T-Lymphocytes; Receptors, CXCR3; Programmed Cell Death 1 Receptor; NK Cell Lectin-Like Receptor Subfamily K; Receptors, Transforming Growth Factor beta; Interferon-gamma; MHC class I-related chain A

***Corresponding Author:** Ali Memarian (Ph.D), **E-mail:** alimemarian@goums.ac.ir

Received 11 Nov 2024 **Received in revised form** 5 Feb 2025 **Accepted** 23 Apr 2025 **Available Online** 4 Oct 2025

Cite this article as: Arianfar E, Alizad Gh, Memarian A. [Simultaneous Evaluation of Regulatory Molecules CXC Chemokine Receptor 3 (CXCR3), Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1), Natural Killer Group 2 Member D (NKG2D), and Transforming Growth Factor Beta Receptor II (TGF-βRII) on T Lymphocytes of Newly Diagnosed Breast Cancer Patients]. J Gorgan Univ Med Sci. 2025; 27(3): 21-31. http://dx.doi.org/10.21859/JGorganUnivMedSci.27.3.21. [Article in Persian]

© The author(s)

Owned: Golestan University of Medical Sciences **Publisher:** Deputy of Research and Technology

Journal of Gorgan University of Medical Sciences

Extended Abstract

2025 / Vol 27 / No 3

Introduction

Breast cancer is considered one of the most prevalent diseases globally. Female gender, mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes, family history, alcohol consumption, obesity, age of first pregnancy older than 35 years, early menarche, late menopause, and nulliparity or late-age pregnancy are among the risk factors identified for this disease.

Since immune responses can play a key role in inhibiting the onset and progression of this disease, a precise understanding of the regulatory features of the immune system is of paramount importance. Cancer immunotherapy enhances the power of immune system responses against the tumor, either actively or passively. The goal of passive immunotherapy is to strengthen the body's existing anti-tumor responses, and it involves the use of monoclonal antibodies, lymphocytes, and cytokines. Active immunotherapy redirects the immune system to attack cancer cells by targeting antigens expressed on their surface. The types of cells used in this approach include natural killer (NK) cells, cytotoxic T lymphocytes (CTLs), and dendritic cells. Activating and recruiting immune system cells, particularly lymphocytes and NK cells, to the tumor microenvironment is one of the main therapeutic mechanisms for breast cancer.

T lymphocytes play a vital role in both the cell-mediated and humoral components of immunity. Studies have indicated that the suppression and dysfunction of these cells are associated with a high risk of developing cancer.

NK group 2 member D (NKG2D) is a type 2 transmembrane protein expressed on NK cells, CD8+ T cells, CD4+ T cells, and Tαβ cells. NKG2D recognizes a large family of stress ligands, including major histocompatibility complex class I chain related gene-A (MICA), MICB, and the UL16-binding protein (ULBP) family (ULBP1-6), which are expressed on human tumor cells. Through interaction with these ligands, NKG2D regulates tumor cell death. Studies have demonstrated that tumor formation can be inhibited through NKG2D signaling. Furthermore, the expression of an NKG2D ligand is sufficient to induce cytolysis by an NKG2D-expressing effector cell. NKG2D-mediated killing in CD8+ T cells requires the simultaneous activation of the T-cell receptor (TCR). Additionally, the co-activation of NKG2D with the TCR in CD4+T cells leads to proliferation and the production of the cytokines interferon gamma (IFN-γ) and tumor necrosis factor alpha (TNF-α).

Transforming growth factor beta (TGF-β) is recognized as a critical immunosuppressive factor within the tumor microenvironment. It facilitates angiogenesis, suppresses IFN-γ secretion by T cells, impairs the maturation of helper T cells, reduces NKG2D expression, and consequently diminishes T cell cytotoxic activity, thereby promoting tumor progression.

Among the three isoforms of the large mammalian TGF-β family, TGF-β1 exhibits the greatest increase in tumor cells. Following the binding of TGF-β to TGF-β receptor II (TGF-βRII), two TGF-βRII molecules and two TGF-β receptor I (TGF-βRI) molecules form a heterotetramer. The TGF-βRII then leads to the phosphorylation of TGF-βRI, which ultimately results in the regulation of the corresponding transcription factors. Therefore, TGF-βRII is examined as the key molecule in assessing the presence of this receptor.

Increased presence and performance of T lymphocytes are necessary characteristics for assessing cancer prognosis. In tumor environments, high titers of both type I and type II IFNs (IFN-I and IFN-II) induce the secretion of the chemokines CXC motif chemokine ligand 9 (CXCL9), CXCL10, and CXCL11. These ligands are potent chemokines for recruiting CXC chemokine receptor 3 (CXCR3) + NK or CXCR3+ T cells toward solid tumors, enabling them to migrate to inflammatory sites, proliferate, and participate in cancer immunosurveillance. Several studies suggest a relationship between CXCR3 expression and breast, colon, renal, and prostate cancers in humans. Conversely, CXCR3 is also expressed on various types of regulatory T (Treg) cells (CD4+ Treg and CD8+ Treg). The expression of CXCR3 on these Treg subsets plays a critical role in their recirculation and recruitment to different inflammatory sites.

Programmed cell death protein 1 PD-1 (CD279) is an immune checkpoint receptor variably expressed on various cell types in the body, including T cells, Tregs, exhausted T cells, NK cells, and NK T (NKT) cells. PD-1 is expressed at low levels on the surface of resting T cells, whereas its expression is increased on the surface of activated T cells.

PD-1 expression is upregulated on T lymphocytes due to persistent activation of these cells, and its resultant interactions lead to the inhibition of T cell activation, proliferation, and cytokine production, ultimately resulting in T lymphocyte exhaustion. Furthermore, PD-1 blockade has been associated with the control of certain cytokine production, including a reduction in vascular endothelial growth factor (VEGF), thereby correlating with anti-tumor immunity and reduced angiogenesis. Given the critical role of T lymphocytes in identifying and preventing the spread of breast cancer tumor cells, this study was conducted to simultaneously evaluate the regulatory molecules CXCR3, PD-1, NKG2D, and TGF-βRII on T lymphocytes of newly diagnosed breast cancer patients.

Methods

This case-control study was conducted on 26 newly diagnosed breast cancer patients admitted to the Fifth Azar Educational-Therapeutic Center in Gorgan, Iran, and 12 non-breast cancer individuals.

First, 10 mL of peripheral blood was collected from all participants into a heparinized tube. The plasma from all samples was separated and stored at −70℃ for subsequent enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) testing. After isolation using a Ficoll solution and density gradient, the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were prepared for flow cytometry analysis. The populations of T lymphocytes (FITC anti-human CD56 antibody) and NK cells were determined in samples from all patients and control subjects using monoclonal antibodies conjugated with fluorescent materials from Biolegend (APC anti-human CD3 antibody). Subsequently, the expression frequency percentages of the markers NKG2D, PD-1, CXCR3, and TGF-βRII within the aforementioned cell populations were investigated using the following antibodies: PerCP/Cyanine5.5 anti-human CXCR3 antibody; PE anti-human PD-1 antibody; PerCP/Cyanine5.5, anti-human NKG2D antibody; and TGF-βRII phycoerythrin (PE)-conjugated antibody.

The samples were read and analyzed using a flow cytometer (BD Accuri C6). To perform the ELISA test, following the protocol suggested by the kit manufacturers, Biolegend (for IFN-γ) and R&D (for MIC-A), stored plasma samples at -70℃ were utilized to measure the concentration levels of IFN-γ and MIC-A.

Results

In the flow cytometric four-color analysis of the CD3+CD56- population (T cells), the percentage frequency of these cells in the peripheral blood of patients was significantly lower than in the control group ($P<0.001$). Furthermore, the percentage of TGF-βRII and PD-1 expression in the peripheral blood of patients ($P<0.019$) showed a statistically significant increase compared to the control group ($P<0.011$). Conversely, the

Journal of Gorgan University of Medical Sciences

Extended Abstract

2025 / Vol 27 / No 3

percentage of NKG2D and CXCR3 expression in patients was significantly lower than in the control group (P<0.001).

The results of IFN-γ and MIC-A concentrations in the peripheral blood of newly diagnosed breast cancer patients demonstrated a statistically significant increase in MIC-A compared to the control group (P<0.001). In contrast, no statistically significant difference was found in IFN-γ concentrations between the case and control groups.

No statistically significant difference was found between all the variables examined, including CXCR3, PD-1, NKG2D, and TGF-βRII, and the pathological and laboratory features of the case and control groups.

A significant positive correlation was found between the percentage of TGF-βRII expression (in the CD3+CD56+ cell population) and the plasma concentration of MIC-A in patients (r=0.612, P=0.034). Furthermore, a significant inverse correlation was observed between the percentage of PD-1 expression on these cells and the plasma concentration of IFN-γ in the control group (r=−0.787, P=0.012).

Conclusion

Based on the results of the present study, T cells in newly diagnosed breast cancer patients exhibited a suppressed phenotype, accompanied by increased expression of inhibitory markers and decreased expression of activating markers.

In the current study, this reduction in the frequency of T lymphocytes in the case group compared to the control group may indicate the negative effect of the tumor microenvironment on the number and differentiation of T lymphocytes in breast cancer patients and on disease progression.

Differences in the expression of target molecules were observed in T-cell populations in the results of this study, which could provide a justification for the reduced cytotoxic activity of these cells and the progression and evolution of tumors in breast cancer patients.

Tumor formation can be inhibited through NKG2D signaling (ITAM and DAP10-dependent) and by the release of cytotoxicity-associated molecules, namely IFN-γ and TNF-α. Experimental and clinical evidence has demonstrated that reduced expression of the NKG2D receptor is associated with decreased T lymphocyte cytotoxicity and increased formation of aggressive tumors.

Our findings reveal a reduction in the expression of the NKG2D receptor on T lymphocytes in the peripheral blood of patients, as well as an increase in the serum level of MIC-A in breast cancer patients compared to the control group, which may be associated with a decrease in the cytotoxic activity of NK cells.

Proteolytic shedding of NKG2D ligands not only reduces their expression on the surface of tumor cells but also results in secreted MIC-A binding to NKG2D, leading to its internalization and lysosomal degradation on the surface of NK and CD8+ T cells. Furthermore, it is also plausible that factors present in the tumor microenvironment, such as TGF-β, which are secreted by tumor cells and CD4+ CD25+ Treg cells, can culminate in a decrease in NKG2D expression on the surface of T cells and a reduction of its ligands on the surface of tumor cells.

In the present study, an increase in the expression of TGF-βRII on the surface of peripheral blood T lymphocytes was observed in breast cancer patients compared to normal individuals. Considering that reduced expression of TGF-βRII on the surface of cancer cells leads to increased cellular resistance to the growth-inhibitory effects of TGF-β, tumor progression, and angiogenesis, it is thus expected that on the surface of immune cells, such as T cells, an increase in TGF-βRII expression would be observed, consequently leading to decreased resistance to TGF-β growth inhibition and subsequent suppression of the immune system in the context of tumor progression. Since MIC-A levels are elevated as a marker of disease progression in cancer patients, the existence of a direct correlation between the inhibitory marker TGF-βRII and the concentration of MIC-A secreted in the patients' serum in our study may indicate that patients with immunosuppression exhibit greater and more robust progression. These patients express higher levels of the inhibitory TGF-βRII receptors on the surface of their T cells, which could be associated with the negative effect of TGF-β signaling via TGF-βRII and the resulting T lymphocyte immunosuppression in the peripheral blood of breast cancer patients.

Ethical Statement

This article was approved by the Research Ethics Committee of Golestan University of Medical Sciences (IR.GOUMS.REC.1398.020).

Funding

This article has been extracted from the master's thesis of Ms. Elaheh Arianfar in Medical Immunology at the School of Medicine, Golestan University of Medical Sciences. It is also part of a research project (No. 110632) approved by the Gastroenterology and Hepatology Research Center, Golestan University of Medical Sciences. The study was funded by the Vice-Chancellor of Research and Technology, Golestan University of Medical Sciences.

Conflicts of Interest

No conflict of interest.

Acknowledgments

We would like to thank the Gastroenterology and Hepatology Research Center, Golestan University of Medical Sciences, for their financial support. We also sincerely thank Dr. Seyed Reza Khandoozi, a Radiation Oncologist, for his cooperation in executing the project and collecting the samples.

Authors' Contributions

Elaheh Arianfar (M.Sc): Project execution, Data collection, Data analysis, Interpretation of the results, Drafting of the initial manuscript, Approval of the final manuscript.

Ghazaleh Alizad (M.Sc): Project execution, Data analysis, Drafting of the initial manuscript, Approval of the final manuscript.

Ali Memarian (Ph.D): Project administration and design, Data analysis, Interpretation of the results, Approval of the final manuscript.

Increased expression of TGF-βRII and PD-1 alongside decreased expression of NKG2D and CXCR3, as well as reduced MIC-A levels in newly diagnosed breast cancer patients, may be associated with the upregulation and potent suppression of T lymphocyte immunity and their dysfunction in breast cancer disease.

مجله دانشگاه علوم پزشکی گرگان

پاییز ۱۴۰۴ / دوره ۲۷ / شماره ۳ (پی در پی ۹۵)

دارای رتبه علمی -پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

e-ISSN: ۲۰۰۸-۴۰۸۰ p-ISSN: ۱۵۶۲-۴۷۶۵

با دسترسی آزاد

تحقیقی

ارزیابی همزمان مولکول‌های تنظیمی CXCR3، PD-1، NKG2D و TGFβR II بر لنفوسیت‌های T بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص

الهه آریان فر [۱]، غزاله علیزاد [۱]، دکتر علی معماریان *[۲و۳]

۱ کارشناس ارشد ایمنولوژی، گروه ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان ، ایران. ۲ مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان ، ایران. ۳ دانشیار، گروه ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان ، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: *سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در سراسر جهان محسوب شده و دومین علت مرگ و میر در زنان است. پاسخ‌های ایمنی می‌توانند نقش کلیدی در مهار شروع و پیشرفت این بیماری داشته باشند. با توجه به اهمیت نقش لنفوسیت T در شناسایی و جلوگیری ازگسترش سلول‌های توموری سرطان پستان، این مطالعه به منظور ارزیابی همزمان مولکول‌های تنظیمی CXCR3، PD-1، NKG2D و TGFβR II بر لنفوسیت‌های T بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص انجام شد.*

روش بررسی: *این مطالعه مورد - شاهدی روی ۲۶ بیمار (میانگین سنی ۹/۵±۴۶/۲ سال) مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص داده شده در مراجعین به مرکز آموزشی درمانی ۵ آذر گرگان و ۱۲ فرد (میانگین سنی ۹/۹±۴۲/۹ سال) غیرمبتلا به سرطان پستان از بین کارمندان و دانشجویان دانشگاه علوم پزشکی گلستان طی سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ انجام شد. ابتدا خونگیری و جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی انجام شد. سپس با استفاده از تکنیک فلوسیتومتری جمعیت‌های مختلف سلولی از نظر بیان CXCR3، PD-1، NKG2D و TGFβR II ارزیابی شدند. سطح پلاسمایی IFNγ و MIC-A به روش الایزا مورد سنجش قرار گرفت.*

یافته‌ها: *میانگین درصد جمعیت لنفوسیت‌های T در بیماران تازه تشخیص مبتلا به سرطان پستان نسبت به افراد سالم پایین‌تر بود (P<۰/۰۵). همچنین میانگین درصد فراوانی لنفوسیت‌های T بیان کننده PD-1 و TGFβRII در گروه مورد نسبت به گروه شاهد بالاتر و بیان NKG2D و CXCR3 سطوح پایین‌تری را نشان دادند (P<۰/۰۵). نتایج مقایسه غلظت پلاسمایی IFNγ و MIC-A حاکی از آن بود که گروه مورد نسبت به گروه شاهد سطح MIC-A بالاتری داشتند (P<۰/۰۵)؛ در حالی که از نظر IFNγ تفاوت آماری معنی‌داری یافت نشد.*

نتیجه‌گیری: *به‌نظر می‌رسد افزایش بیان TGFβRII و PD-1 در کنار کاهش بیان NKG2D و CXCR3 و کاهش سطح MIC-A در بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص داده شده با تنظیم و سرکوب زیاد ایمنی لنفوسیت‌های T و اختلال عملکردی آنها در بیماری سرطان پستان مرتبط باشد.*

واژه‌های کلیدی: *سرطان پستان ، لنفوسیت T ، گیرنده CXCR3 ، پروتئین PD-1 ، گیرنده NKG2D ، گیرنده TGF-beta ، اینترفرون گاما ، زنجیره A مرتبط با MHC کلاس I*

* نویسنده مسؤول: دکتر علی معماریان ، پست الکترونیکی: alimemarian@goums.ac.ir

نشانی: گرگان، ابتدای جاده قدیم گرگان به کردکوی، مجموعه آموزش عالی (شادروان فلسفی) دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی پزشکی، تلفن ۳۲۴۵۱۶۵۳-۰۱۷

وصول ۱۴۰۳/۸/۲۱ اصلاح نهایی ۱۴۰۳/۱۱/۱۷ پذیرش ۱۴۰۴/۲/۳ انتشار ۱۴۰۴/۷/۱۲

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در سراسر جهان محسوب شده و علی‌رغم روش‌های غربالگری پیشرفته و گزینه‌های درمانی جدید همچنان این بیماری دومین علت مرگ و میر در زنان با وقوع ۲/۳ میلیون مورد جدید در جهان است.[۱] سرطان پستان در مردان به ندرت اتفاق می‌افتد. براساس آمار انجمن سرطان آمریکا، در ایالات متحده از ۲۶۲۰ مرد مبتلا به سرطان پستان تشخیص داده شده؛ در مجموع ۵۲۶ مورد مرگ و میر در سال ۲۰۲۰ گزارش شد.[۲]

طبق مطالعه سال ۲۰۱۵ در ایران، میزان شیوع سرطان پستان ۲۳/۱ مورد در هر ۱۰۰ هزار نفر گزارش شد.[۳] در جهان بالاترین میزان شیوع این بیماری در سنین بالای ۷۰ سال رخ می‌دهد؛ اما در ایران میانگین سنی سرطان پستان در زنان ۴۵ سال است.[۴] جنسیت زن، جهش در ژن‌های BRCA1 و BRCA2، پیشینه خانوادگی، مصرف الکل، چاقی، سن اولین زایمان بیشتر از ۳۵ سال، بلوغ زودرس، یائسگی دیررس، هرگز حامله نشدن یا حاملگی دیرهنگام از جمله عوامل مستعد کننده این بیماری شناسایی شده‌اند.[۵]

از آنجایی که پاسخ‌های ایمنی می‌توانند نقشی کلیدی در مهار شروع و پیشرفت این بیماری داشته باشند؛ شناخت دقیق ویژگی‌های تنظیمی سیستم ایمنی بسیار حائز اهمیت است. ایمونوتراپی سرطان قدرت پاسخ‌های سیستم ایمنی را به شکل فعال یا غیرفعال علیه تومور افزایش می‌دهد. هدف ایمونوتراپی غیرفعال تقویت پاسخ‌های ضدتوموری موجود در بدن است و شامل استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، لنفوسیت‌ها و سایتوکاین‌ها است. ایمونوتراپی فعال هدایت مجدد سیستم ایمنی برای حمله به سلول‌های سرطانی به‌وسیله هدف‌گیری آنتی‌ژن‌های بیان شده در سطح این سلول‌هاست. انواع سلول‌هایی که در این روش مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ سلول‌های کشنده طبیعی (Natural Killer: NK)، سلول‌های T کشنده و سلول‌های دندرتیک هستند. فعالسازی و فراخوانی سلول‌های سیستم ایمنی به خصوص لنفوسیت‌ها و سلول‌های کشنده طبیعی به محیط تومور یکی از مکانیسم‌های درمانی اصلی سرطان پستان است.[۶]

لنفوسیت‌های T در هر دو جزء ایمنی با واسطه سلولی و هومورال نقش حیاتی دارند. مطالعات نشان داده‌اند که سرکوب و اختلال عملکردی این سلول‌ها با خطر بالای ابتلا به سرطان ارتباط دارد.[۷] با وجود مطالعات انجام شده در زمینه تعامل لنفوسیت‌های T با ریز محیط تومور، برخی از جنبه‌های مهم چگونگی این تعامل کمتر شناخته شده است. لذا بررسی دقیق‌تر به منظور آگاهی بیشتر از این جنبه‌ها و بهبود روش‌های درمانی سرطان امری ضروری است.

NKG2D یک پروتئین درون غشایی نوع ۲ بوده که بر روی سلول‌های NK، +T CD8، +T CD4 و Tαβ بیان می‌شود.[۸] NKG2D خانواده بزرگی از لیگاندهای استرسی شامل MICB ،MICA و خانواده پروتئین‌های متصل شونده به UL16 (ULBP1-6) را که بر روی سلول‌های توموری انسان بیان می‌شوند را شناسایی نموده و از طریق تعامل با آنها موجب تنظیم مرگ سلول توموری می‌شود.[۹] مطالعات نشان داده تشکیل تومورها می‌تواند به‌واسطه انتقال سیگنال NKG2D ممانعت شود.[۱۰] همچنین بیان یک لیگاند NKG2D برای به راه اندازی سایتولیز به وسیله یک سلول افکتور بیان کننده NKG2D کافی است.[۱۱] کشندگی به‌واسطه NKG2D در سلول‌های +TCD8 نیاز به فعال‌سازی همزمان گیرنده TCR دارد.[۸] همچنین فعال‌سازی همزمان NKG2D با TCR در سلول‌های+TCD4 باعث تکثیر و تولید سیتوکین‌های IFN-γ و TNF-α می‌شود.[۱۲]

TGFβ به عنوان یکی از عوامل مهم سرکوب سیستم ایمنی در ریزمحیط تومور شناخته شده[۱۳] که می‌تواند موجب تسهیل رگ‌زایی، کاهش ترشح IFN-γ از سلول‌های T، کاهش بلوغ سلول‌های T کمکی، کاهش بیان NKG2D و در نتیجه کاهش فعالیت کشندگی سلول‌های T و پیشرفت تومور در مقابل سلول‌های هدف شود.[۱۴]

در میان سه ایزوفرم خانواده بزرگ TGFβ پستانداران، TGFβ1 بیشترین افزایش را در سلول‌های توموری دارد. پس از اتصال TGFβ به TGFβRII، دو مولکول TGFβRII و دو مولکول TGFβRI یک هتروترامر تشکیل می‌دهند که TGFβRII منجر به فسفویلاسیون TGFβRI شده و نهایتاً منجر به تنظیم فاکتورهای رونویسی مربوطه می‌شوند. از این رو TGFβRII به عنوان مولکول اصلی در ارزیابی وجود این گیرنده بررسی می‌شود.[۱۵]

افزایش حضور و عملکرد لنفوسیت‌های T یک ویژگی و مشخصه لازم برای سنجش پیش‌آگهی سرطان است. در محیط‌های توموری، تیترهای بالا هر دو نوع IFN نوع یک و دو باعث ترشح کموکاین‌های CXCL9 ، CXCL10 و CXCL11 می‌شوند.[۱۶] این لیگاندها کموکین‌های قدرتمندی در فراخوانی سلول‌های NK CXCR3+ یا T CXCR3+ به سمت تومورهای جامد هستند و می‌توانند به جایگاه‌های التهابی مهاجرت کرده؛ تکثیر شوند و در نظارت ایمنی سرطان نقش داشته باشند.[۱۷] چندین مطالعه از وجود رابطه بین بیان CXCR3 و سرطان پستان، کولون، کلیه و پروستات در انسان دلالت دارند.[۱۸-۲۱] از طرف دیگر CXCR3 در انواع سلول‌های Treg (CD4+Treg و +Treg CD8) نیز بیان می‌شود. بیان این مولکول بر سطح این دسته از سلول‌های T در بازگردش و فراخوانی این سلول‌ها در نواحی مختلف التهابی نقش مهمی را ایفا می‌کند.[۲۲]

PD-1 (CD279) یک گیرنده کنترلی سیستم ایمنی بوده[۲۳] که بر روی برخی از سلول‌های بدن از جمله سلول‌های T، Tregs exhausted T cells ، Natural killer (NK) cells و Natural killer T (NKT) cells به‌طور متغیر بیان می‌شود. PD-1 بر سطح سلول‌هایT در حال استراحت بیان کمی دارد. درحالی که بر سطح سلول‌هایT فعال به میزان بیشتری بیان می‌شود.[۲۴]

بیان PD-1 با استمرار در فعال‌سازی لنفوسیت‌های T روی این دسته از سلول‌ها تنظیم می‌شود و نتیجه تعاملات آن موجب مهار فعال‌شدن سلول‌های T ، تکثیر و تولید سیتوکین و در نهایت فرسودگی لنفوسیت‌های T است.[۲۵] از طرفی مهار مارکر PD-1 باعث کنترل تولید برخی سایتوکاین‌ها از جمله کاهش فاکتور رشد اندوتلیال عروقی شده و در نتیجه با ایمنی ضدتوموری و کاهش رگ‌زایی مرتبط است.[۲۶] با توجه به اهمیت نقش لنفوسیت T در شناسایی و جلوگیری از گسترش سلول‌های توموری سرطان پستان، این مطالعه به منظور ارزیابی همزمان مولکول‌های تنظیمی CXCR3، PD-1، NKG2Dو TGFβR II بر لنفوسیت‌های T بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه مورد – شاهدی روی ۲۶ بیمار (میانگین سنی ۹/۵±۴۶/۲ سال) مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص داده شده در مراجعین به مرکز آموزشی درمانی ۵ آذر گرگان و ۱۲ فرد (میانگین

سنی ۹/۹±۴۲/۹ سال) غیرمبتلا به سرطان پستان از بین کارمندان و دانشجویان دانشگاه علوم پزشکی گلستان طی سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ انجام شد.

معیارهای ورود به مطالعه شامل تایید بیماری توسط انکولوژیست و رضایت بیمار برای شرکت در مطالعه بودند. معیارهای عدم ورود به مطالعه شامل دریافت داروهای سرکوبگر ایمنی برای بیماران و وجود بیماری زمینه‌ای یا التهابی در افراد سالم بود.[۱۰]

ابتدا از همه شرکت‌کنندگان ۱۰ میلی‌لیتر نمونه خون محیطی در لوله هپارینه جمع‌آوری شد. پلاسما همه نمونه‌ها جداسازی و در فریزر با دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای انجام تست الایزا نگهداری شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بعد از جداسازی با استفاده از گرادیان غلظت و محلول فایکول برای انجام تست فلوسایتومتری آماده شدند. با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کنژوگه با مواد فلورسنتی شرکت Biolegend (APC Anti human CD3 Antibody) جمعیت لنفوسیت‌های T (FITCAnti human CD56 Antibody) و جمعیت سلول‌های NK نمونه همه بیماران و افراد تعیین گردید. در ادامه درصد فراوانی بیان مارکرهای NKG2D، PD-1، CXCR3 و TGFβRII در جمعیت سلول‌های مذکور با استفاده از آنتی‌بادی‌های زیر مورد بررسی قرار گرفتند.

PerCP/Cyanine5.5 Antihuman CXCR3 Antibody
PE Anti human PD-1 Antibody
PerCP/Cyanine5.5
Anti human NKG2D Antibody
TGF-beta RII PE-conjugated Antibody

نمونه‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری (BD accuri c6) خوانش و آنالیز شدند. به منظور انجام تست الایزا طبق پروتکل پیشنهادی کیت شرکت Biolegend (IFNγ) و R&D (MIC-A) برای سنجش میزان غلظت IFNγ و MIC-A از نمونه‌های پلاسما نگهداری شده در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد، استفاده شد.

داده‌ها با استفاده از آزمون آماری SPSS-16 تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه متغیرهای کمی در دو گروه مجزا برای متغیرهای با توزیع نرمال (پارامتریک) از آزمون t مستقل(Independent sample t test) و برای متغیرهای با توزیع غیر نرمال (غیر پارامتریک) از آزمون من‌ویتنی (Mann Whitney test) استفاده شد. برای مقایسه متغیرهای کمی در بیش از دو گروه مجزا از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One- way ANOVA) و آزمون‌های تعقیبی استفاده شد. در بررسی همبستگی بین متغیرهای کمی با توزیع نرمال (پارامتریک) با استفاده از محاسبه ضریب همبستگی توسط آزمون Pearson و برای همبستگی بین متغیرهای کمی با توزیع غیر نرمال (غیرپارامتریک) توسط آزمون Spearman انجام شد. سطح معنی‌داری تمام آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

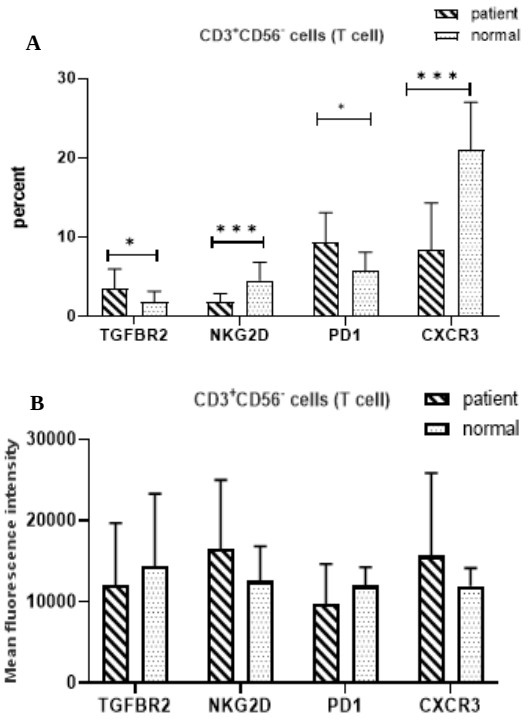
یافته‌ها

بین متغیرهای سن و جنس دو گروه مورد مطالعه تفاوت آماری معنی‌داری وجود نداشت (جدول یک).

جدول ۱ : فراوانی و درصد متغیرهای سن و جنس در بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص و افراد سالم

متغیرها		گروه مورد تعداد (درصد)	گروه شاهد تعداد (درصد)	P-value
سن (سال)	کمتر از ۵۰	۱۸ (۶۹/۲)	۹ (۰/۸۱)	۰/۴۸
	بیشتر مساوی ۵۰	۸ (۳۰/۸)	۲ (۰/۱۸)	
جنسیت	زن	۲۵ (۰/۹۶)	۱۰ (۰/۹۰)	۰/۵۲
	مرد	۱ (۰/۰۴)	۱ (۰/۰۹)	

در بررسی جمعیت (T cell) CD3+CD56- با استفاده از فلوسیتومتری چهار رنگ، درصد فراوانی این سلول‌ها در خون محیطی بیماران به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۰۱) (نمودار یک). همچنین درصد بیان TGFβRII و PD-1 در خون محیطی بیماران (P<۰/۰۱۹) نسبت به گروه شاهد (P<۰/۰۱۱) افزایش آماری معنی‌داری داشت. در حالی که درصد بیان NKG2D و CXCR3 در بیماران به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۰۱) (نمودار یک).



نمودار ۱ : بیان TGFβRII، NKG2D، PD-1، CXCR3 در بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص در مقایسه با گروه شاهد
A) درصد بیان بر CD3+CD56- T cells ؛ B) شدت بیان بر CD3+CD56- T cells
* P<۰/۰۵ ، ** P<۰/۰۱ ، *** P<۰/۰۰۱ ، **** P<۰/۰۰۰۱

نتایج حاصل از غلظت IFNγ و MIC-A در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص افزایش آماری معنی‌دار MIC-A را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد (P<۰/۰۰۱). در حالی که میان غلظت IFNγ در خون محیطی گروه مورد با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌داری یافت نشد (نمودار ۲).

جدول ۲ : برخی از داده‌های دموگرافیک و ویژگی‌های کلینیکی و پاتولوژیک بیماران مبتلا به سرطان پستان

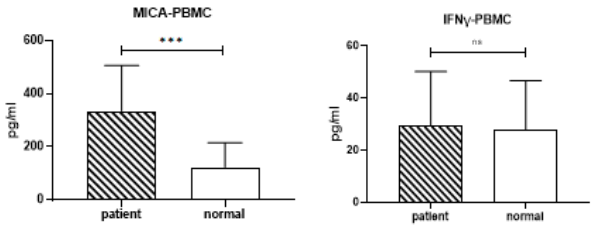
متغیرها		تعداد (درصد)
سن (سال)	کمتر از ۵۰	۱۸ (۶۹/۲)
	بیشتر مساوی ۵۰	۸ (۳۰/۸)
اندازه تومور	pT1	۶ (۲۳/۱)
	pT2	۱۴ (۵۳/۸)
	pT3	۰ (۰)
	pT4	۳ (۱۱/۵)
درگیری گره لنفی	pN0	۱۱ (۴۲/۳)
	pN1	۷ (۲۶/۹)
	pN2	۴ (۱۵/۴)
	pN3	۳ (۱۱/۵)
استیج TNM	I	۳ (۱۱/۵)
	IIA	۹ (۳۴/۶)
	IIB	۳ (۱۱/۵)
	IIIA	۳ (۱۱/۵)
	IIIB	۲ (۴۲/۳)
	IIIC	۳ (۱۱/۵)
گرید	I	۳ (۱۱/۵)
	II	۱۱ (۴۲/۳)
	III	۴ (۱۵/۴)
زیر گروه	Luminal A	۳ (۱۱/۵)
	Luminal B (HER2-)	۵ (۱۹/۲)
	Luminal B (HER2+)	۸ (۳۰/۸)
	HER2 positive	۴ (۱۵/۴)
	Triple negative (TNBC)	۳ (۱۱/۵)
گیرنده استروژن (ER)	مثبت	۱۵ (۵۷/۷)
	منفی	۸ (۳۰/۸)
گیرنده پروژسترون (PR)	مثبت	۱۳ (۵۰)
	منفی	۱۰ (۳۸/۵)
وضعیت HER2	مثبت	۱۲ (۴۶/۲)
	منفی	۹ (۳۴/۶)
وضعیت P53	مثبت	۶ (۲۳/۱)
	منفی	۱۲ (۴۶/۲)

جدول ۳ : میانگین و انحراف معیار داده‌های آزمایشگاهی بیماران مبتلا به سرطان پستان

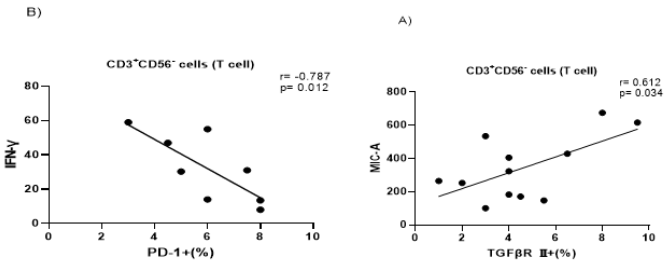
متغیرها	میانگین و انحراف استاندارد
WBC ($\times 10^3/\mu L$)	۷/۰۵±۱/۴۳
RBC ($\times 10^6/\mu L$)	۴/۳۲±۰/۳۱
HBG (g/dl)	۱۱/۷۴±۱/۵۴
LYMPH (%)	۴۳/۷۱±۷/۴۴
CEA (ng/ml)	۲/۱۳±۱/۶۱
CA15-3 (u/ml)	۲۰/۶۱±۱۱/۱۹

در جدول ۲ داده‌های پاتولوژیک بیماران شامل دسته‌بندی سایز تومور و همچنین درگیری پوست، نیپل و عضلات زیر پستان (T1 تا T4) براساس طبقه‌بندی TNM، بر پایه سایز تومور(T)، تعداد غدد لنفاوی درگیر (N) و وضعیت متاستاز (M)، به هفت Stage مختلف آمده است. علاوه بر این، بیماران به پنج subtype نیز گروه‌بندی شدند و اطلاعات بیان مولکول‌های ER, PR, HER2, Ki67 ارائه شده است. در مقایسه به‌عمل آمده میان تمامی متغیرهای بررسی شده شامل CXCR3، PD-1، NKG2D و TGFβRII با ویژگی‌های پاتولوژیک و آزمایشگاهی گروه‌های مورد و شاهد اختلاف آماری معنی‌داری یافت نشد (جدول‌های ۲ و ۳).

داده‌ها نشان دادند که میان درصد بیان TGFβRII (در جمعیت سلول‌های CD3+CD56) و غلظت پلاسمایی MIC-A بیماران رابطه مثبت معنی‌داری وجود دارد (P=۰/۰۳۴ ، r=۰/۶۱۲). همچنین میان درصد بیان PD-1 در این سلول‌ها با غلظت پلاسمایی IFN-γ در گروه شاهد رابطه معکوس معنی‌داری یافت شد (P=۰/۰۱۲ ، r=-۰/۷۸۷) (نمودار ۳).



نمودار ۲ : میانگین غلظت IFNγ و MIC-A در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص در مقایسه با گروه شاهد
*** P<۰/۰۵ ، ** P<۰/۰۱ ، *** P<۰/۰۰۱ ، **** P<۰/۰۰۰۱ ، NS: غیرمعنی‌دار**



نمودار ۳: A) آنالیزهمبستگی بین بیان متغیرهای TGFβRII و MIC-A روی جمعیت CD3+CD56_ T cell در خون محیطی بیماران؛ B) آنالیزهمبستگی بین بیان متغیرهای PD-1 و IFN-γ روی جمعیت CD3+CD56_ T cell در خون محیطی گروه شاهد.

بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، سلول‌های T در بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص داده شده همراه با فنوتیپ مهارشده با افزایش بیان مارکرهای مهاری و کاهش بیان مارکرهای فعال کننده بودند که این یافته همراستا با مطالعات گذشته منجر به نقص

عملکردی آنها در این بیماری خواهد شد که به طور عمده با تغییر فنوتیپی آنها مرتبط است.[۲۷و۲۸] یکی از دلایل مهم پیشرفت، مقاومت به درمان و عود بیماری سرطان‌ها تنظیم کنترل نشده و سرکوب سیستم ایمنی و اجزای آن است.[۲۹] سرکوب ایمنی در سطوح مختلفی برای انواع سلول‌های ایمنی در سرطان پستان مشاهده شده که از مهم‌ترین آنها سرکوب کنندگی ایمنی سلول‌های T است.[۳۰] سیگنالینگ ناشی از گیرنده‌ها و مولکول‌های مهم، سرنوشت لنفوسیت‌های T در برابر سلول‌های سرطانی را تعیین می‌کند. همچنین حضور عوامل سرکوب کننده ریز محیط توموری می‌تواند با اثر بر تعامل گیرنده‌ها و لیگاندهای سطحی، پاسخ ایمنی لنفوسیت‌های T را مختل کند.

در مطالعه حاضر ، در بررسی جمعیت (T cell) CD3+CD56- مشخص شد که درصد فراوانی این سلول‌ها در خون محیطی بیماران به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه شاهد است. چندین مطالعه نیز کاهش در تعداد و فراوانی لنفوسیت‌های T در خون محیطی و بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان نسبت به گروه کنترل را نشان داده‌اند که با کاهش ظرفیت کشندگی این سلول‌ها همراه بوده است.[۳۰] در مطالعه حاضر این کاهش فراوانی لنفوسیت‌های T می‌تواند بیانگر اثر منفی ریز محیط توموری بر تعداد و تمایز لنفوسیت‌های T در بیماران مبتلا به سرطان پستان و پیشرفت بیماری باشد.

در نتایج این مطالعه اختلاف‌هایی در بیان مولکول‌های موردنظر در جمعیت‌های سلولی T یافت شد که می‌توانند توجیهی بر کاهش فعالیت سایتوتوکسیتی این سلول‌ها و پیشرفت و تکامل تومور در بیماران مبتلا به سرطان پستان باشند که در ذیل به بحث آن ها پرداخته شده است.

تشکیل تومورها می‌تواند از طریق سیگنالینگ NKG2D (وابسته به ITAM و DAP10) و با آزادسازی مولکول‌های مرتبط با سایتوتوکسیتی، IFNγ و TNFα ممانعت شود.[۱۱] شواهد تجربی و بالینی نشان داده‌اند که کاهش بیان رسپتور NKG2D با کاهش سایتوتوکسیتی لنفوسیت‌های T و با افزایش تشکیل تومورهای تهاجمی ارتباط دارد.[۳۱و۳۲] در همین راستا افزایش بیان لیگاندهای NKG2D درانواع مختلفی از تومورها، ازجمله سرطان تخمدان، سرطان روده بزرگ و سرطان پستان گزارش شده‌اند.[۳۳و۳۴] به‌نظر می‌رسد افزایش بیان این لیگاندها نتیجه فعال شدن عناصر رونویسی شوک حرارتی در پروموترهای ژن‌های مربوط به این لیگاندها، تخریب DNA و تغییر سطوح هورمونی در بسیاری از تومورها از جمله سرطان تخمدان و پستان باشد.[۹] بیان سطح سلولی لیگاندهای NKG2D به وسیله ریزش پروتئولیتیک به‌واسطه ترشح متالوپروتئازها توسط سلول‌های توموری، کاهش می‌یابد. در نتیجه آن، افزایش فرم‌های محلول دمین‌های خارجی این لیگاندها در سرم بیماران مبتلا به سرطان مشاهده می‌شود.[۱۱] طبق مطالعه مروری انجام شده سطح بالایی از MICA ترشحی در سرم افراد با بدخیمی‌ها و سرطان‌های مختلف و نه در افراد سالم شناسایی شده که با کاهش ایمونوژنسیتی سلول‌های سرطانی و پیشرفت تومور مرتبط است.[۳۵] همچنین براساس مطالعه Jia و همکاران روی سرطان کلیه، سرم افراد مبتلا به این سرطان به‌طور قابل توجهی افزایش میزان سرمی MICA را نشان داد.[۳۶] نتایج حاصل از مطالعه Groh و همکاران نشان داد که یک ارتباط قوی بین سطوح سرمی sMICA و کاهش بیان NKG2D در سلول‌های CD8+ T و پیشرفت بیماری در بیماران مبتلا به سرطان پروستات و سرطان معده وجود دارد.[۳۷] همراستا با این مطالعات یافته‌های ما نیز حاکی از کاهش بیان گیرنده NKG2D در لنفوسیت‌های T در خون محیطی بیماران، همچنین افزایش سطح سرمی MIC-A در سرم بیماران مبتلا به سرطان پستان نسبت به گروه شاهد بود که می‌تواند با کاهش فعالیت سایتوتوکسیتی سلول‌های NK مرتبط باشد. چندین مطالعه نیز کاهش بیان NKG2D بر سطح لنفوسیت‌های T در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان را گزارش کرده‌اند.[۳۱و۳۸] این‌طور به‌نظر می‌رسد که ریزش پروتئولیتیک لیگاندهای NKG2D نه تنها سبب کاهش بیان این لیگاندها بر سطح سلول‌های توموری می‌شود؛ بلکه MIC-A ترشحی با اتصال به NKG2D سبب درونی‌سازی و تجزیه لیزوزومی آن بر سطح NK و TCD8+ می‌گردد.[۱۱] از طرفی این موضوع نیز محتمل است که عوامل موجود در ریزمحیط تومور مثل فاکتور رشد TGF-β که به‌وسیله سلول‌های توموری و سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ ترشح می‌شوند؛ می‌توانند موجب کاهش بیان NKG2D بر سطح سلول‌های T وکاهش لیگاندهای آن بر سطح سلول‌های توموری شوند.[۱۱]

در چندین مطالعه افزایش بیان PD-1 بر سطح لنفوسیت‌های T گزارش شده است که با پیش‌آگهی ضعیف بیماری در سرطان‌های مختلف مرتبط بوده است.[۳۹-۴۱] نتایج حاصل از تحقیقات قبلی در سرطان پستان و ریه نیز نشان دادند که اگرچه لنفوسیت‌های T در محیط توموری سطوح بیشتری از CD25 را نشان داده؛ اما بیان بیشتری از مارکر کنترل سیستم ایمنی PD1 را داشتند که نشان می‌دهد اگرچه فعال شده‌اند؛ اما خسته شده و قادر به ایجاد هرگونه پاسخ ایمنی خاص ضدتومور نیستند.[۴۰و۴۱] حضور فاکتورهای محلول در ریزمحیط توموری می‌تواند در القای بیان PD-1 در سلول‌های TCD8+ نقش داشته باشد.[۴۲] در مطالعه حاضر بیش از نیمی از بیماران مورد مطالعه در مراحل پیشرفته بیماری و در گریدهای بالا بودند که در کنار افزایش بیان این مولکول بر روی سطح لنفوسیت‌های T بیماران نسبت به گروه شاهد؛ می‌تواند با سرکوب این سلول‌ها و پیشرفت بیماری مرتبط باشد. علاوه بر این وجود یک همبستگی

معکوس بین IFN-γ در سرم بیماران و درصد PD-1 بر روی لنفوسیت‌های T می‌تواند تاییدی بر نظریه فرسودگی این سلول‌ها در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان باشد.

در مطالعه Viel و همکاران حذف زیر واحد TGFβRII با افزایش فعالیت کشندگی سلول‌های NK، افزایش تولید IFNγ و سرکوب بهتر متاستاز ارتباط داشت.[۴۳] در مطالعه Chang و همکاران که روی بیماران مبتلا به سرطان رحم انجام شد؛ بیان TGFβRII در NK و Treg به‌طور قابل توجهی در محیط توموری نسبت به خون محیطی این افراد بیشتر بود که با کاهش توان کشندگی این سلول‌ها و تکامل تومور مرتبط بود.[۴۴] در مطالعه حاضر افزایش بیان TGFβRII در سطح لنفوسیت‌های T در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان نسبت به افراد نرمال مشاهده شد. با توجه به این که کاهش بیان TGFβRII در سطح سلول سرطانی منجر به افزایش مقاومت سلول به اثر مهاری رشد TGFβ و پیشرفت تومور و آنژیوژنز می‌شود؛ این موضوع قابل انتظار است که در سطح سلول‌های ایمنی مثل T افزایش بیان TGFβRII و در نتیجه کاهش مقاومت به مهار رشد TGFβ و سرکوب سیستم ایمنی در پیشرفت تومور مشاهده شود.[۴۵و۴۶] از آنجایی که MIC-A به عنوان یک مارکر پیشرفت بیماری (Progression) در بیماران مبتلا به سرطان افزایش دارد؛ وجود ارتباط و همبستگی مستقیم بین مارکر مهاری TGFβRII با غلظت MIC-A ترشحی در سرم بیماران در مطالعه ما می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد که بیماران دارای ایمونوساپرشن، Progression در آنها بیشتر و قوی‌تر است و بیان بالاتری از گیرنده‌های مهاری TGFβRII را در سطح سلول‌های T خود بیان می‌کنند که می‌تواند با با اثر منفی سیگنالینگ TGFβ از طریق TGFβRII و ایمونوساپرشن لنفوسیت‌های Tدر خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان مرتبط باشد.

افزایش نفوذ لنفوسیت‌های Tدر محیط‌های توموری، با پیش‌آگهی خوب بیماری در چندین سرطان همراه بوده است.[۴۷] در چندین مطالعه بالینی و آزمایشگاهی افزایش بیان لیگاندها و کموکاین رسپتور CXCR3 توسط سلول‌های توموری پستان گزارش شده است که با پیشرفت تومور و کاهش بقای مرتبط با بیماری همراه بوده است.[۴۸و۴۹] افزایش IFNγ موجود در محیط توموری می‌تواند در القای بیان این کموکاین‌ها موثر باشد. این کموکاین‌ها می‌توانند از طریق فراخوانی سلول‌های توموری بیان کننده CXCR3، در تکامل و آنژیوژنز تومور نیز نقش داشته باشند.[۴۹] در این مطالعه همزمان با تغییرات سایر مارکرها کاهش بیان رسپتور CXCR3 در سطح لنفوسیت‌های T و زیرمجموعه‌های آن در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد که می‌تواند نشانگر کاهش تجمع لنفوسیت‌های T در محیط توموری افراد مبتلا به سرطان پستان باشد. Wendel و همکاران[۵۰] نشان دادند که لیگاندهای کموکاین رسپتور CXCR3 یعنی CXCL9 و CXCL10 موجب تخریب رشد تومور و متاستاز تومور از طریق فراخوانی لنفوسیت‌های T سرکوب کننده تومور می‌شوند. همچنین بیان بیش از حد mRNA CXCL9 با تعداد لنفوسیت‌های تجمع یافته در محیط تومور مرتبط است و این افزایش غلظت لیگاندهای CXCR3 راهی برای افزایش مقابله با سرطان پستان است.[۵۱] در همین راستا نشان داده شده که استفاده از IFNγ در محیط تومور می‌تواند موجب القای بیان کموکاین‌های رسپتور CXCR3 از سلول‌های توموری پستان، افزایش تجمع سلول‌های NK CXCR3+ و بقای طولانی مدت شود.[۵۰و۵۲] از آنجایی که افزایش بیان CXCR3 در سطح سلول‌های توموری با پیشرفت و آنژیوژنز تومور مرتبط است؛ کاهش بیان CXCR3 در سطح سلول‌های ایمنی مثل T وNK در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان در این مطالعه قابل انتظار است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش بیان TGFβRII و PD-1 در کنار کاهش بیان NKG2D و CXCR3 و کاهش سطح MIC-A در بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص داده شده با تنظیم و سرکوب زیاد ایمنی لنفوسیت‌های T و اختلال عملکردی آنها در بیماری سرطان پستان می‌تواند مرتبط باشد.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی گلستان (IR.GOUMS.REC.1398.020) قرار گرفت.

حمایت مالی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۱۱۰۶۳۲) مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی گلستان بود.

مشارکت نویسندگان

الهه آریان فر: انجام پروژه، جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز داده‌ها، تفسیر نتایج، نوشتن نسخه اولیه مقاله و تایید نسخه نهایی مقاله.

غزاله علیزاد: انجام پروژه، آنالیز داده‌ها، نوشتن نسخه اولیه مقاله و تایید نسخه نهایی مقاله.

دکتر علی معماریان: مدیریت و طراحی پروژه، آنالیز داده‌ها، تفسیر نتایج و تایید نسخه نهایی مقاله.

تعارض منافع

بین نویسندگان تضاد منافع وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه خانم الهه آریان فر برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته ایمنی شناسی پزشکی از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان بود. بدینوسیله از مرکز تحقیقات

گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی گلستان به خاطر حمایت مالی تشکر می‌نماییم. همچنین از جناب آقای دکتر سیدرضا خاندوزی متخصص رادیوتراپی که در انجام پروژه و جمع‌آوری نمونه‌ها همکاری داشتند؛ صمیمانه تشکر می‌گردد.

References

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2024 May-Jun;74(3):229-63. https://doi.org/10.3322/caac.21834.
2. Khan NAJ, Tirona M. An updated review of epidemiology, risk factors, and management of male breast cancer. Med Oncol. 2021 Mar;38(4):39. https://doi.org/10.1007/s12032-021-01486-x.
3. Farhood B, Geraily G, Alizadeh A. Incidence and Mortality of Various Cancers in Iran and Compare to Other Countries: A Review Article. Iran J Public Health. 2018 Mar;47(3):309-16.
4. Meshkani Z, Moradi N, Aboutorabi A, Farabi H, Moini N. A cost-benefit analysis of genetic screening test for breast cancer in Iran. BMC Cancer. 2024 Mar;24(1):279. https://doi.org/10.1186/s12885-024-12003-4.
5. Ostroumova E, Preston DL, Ron E, Krestinina L, Davis FG, Kossenko M, et al. Breast cancer incidence following low-dose rate environmental exposure: Techa River Cohort, 1956-2004. Br J Cancer. 2008 Dec 2;99(11):1940-45. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604775.
6. Chamorro DF, Somes LK, Hoyos V. Engineered Adoptive T-Cell Therapies for Breast Cancer: Current Progress, Challenges, and Potential. Cancers (Basel). 2023 Dec 26;16(1):124. https://doi.org/10.3390/cancers16010124.
7. Philip M, Schietinger A. CD8+ T cell differentiation and dysfunction in cancer. Nat Rev Immunol. 2022 Apr;22(4):209-23. https://doi.org/10.1038/s41577-021-00574-3.
8. Prajapati K, Perez C, Rojas LBP, Burke B, Guevara-Patino JA. Functions of NKG2D in CD8+ T cells: an opportunity for immunotherapy. Cell Mol Immunol. 2018 May;15(5):470-79. https://doi.org/10.1038/cmi.2017.161.
9. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. Nat Rev Immunol. 2003 Oct;3(10):781-90. https://doi.org/10.1038/nri1199.
10. Arianfar E, Khandoozi SR, Mohammadi S, Memarian A. Suppression of CD56bright NK cells in breast cancer patients is associated with the PD-1 and TGF-βRII expression. Clin Transl Oncol. 2023 Mar;25(3):841-51. https://doi.org/10.1007/s12094-022-02997-3.
11. Mistry AR, O'Callaghan CA. Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. Immunology. 2007 Aug;121(4):439-47. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02652.x.
12. Sáez-Borderías A, Gumá M, Angulo A, Bellosillo B, Pende D, López-Botet M. Expression and function of NKG2D in CD4+ T cells specific for human cytomegalovirus. Eur J Immunol. 2006 Dec;36(12):3198-206. https://doi.org/10.1002/eji.200636682.
13. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. Annu Rev Immunol. 2006;24:99-146. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737.
14. Papageorgis P, Stylianopoulos T. Role of TGFβ in regulation of the tumor microenvironment and drug delivery (review). Int J Oncol. 2015 Mar;46(3):933-43. https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2816.
15. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. Nature. 2003 Oct;425(6958):577-84. https://doi.org/10.1038/nature02006.
16. Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. Immunol Cell Biol. 2011 Feb;89(2):207-15. https://doi.org/10.1038/icb.2010.158.
17. Martín-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. Nat Immunol. 2004 Dec;5(12):1260-65. https://doi.org/10.1038/ni1138.
18. Engl T, Relja B, Blumenberg C, Müller I, Ringel EM, Beecken WD, et al. Prostate tumor CXC-chemokine profile correlates with cell adhesion to endothelium and extracellular matrix. Life Sci. 2006 Mar;78(16):1784-93. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.08.019.
19. Rubie C, Kollmar O, Frick VO, Wagner M, Brittner B, Gräber S, et al. Differential CXC receptor expression in colorectal carcinomas. Scand J Immunol. 2008 Dec;68(6):635-44. https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2008.02163.x.
20. Goldberg-Bittman L, Neumark E, Sagi-Assif O, Azenshtein E, Meshel T, Witz IP, et al. The expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand, CXCL10, in human breast adenocarcinoma cell lines. Immunol Lett. 2004 Mar;92(1-2):171-78. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2003.10.020.
21. Gacci M, Serni S, Lapini A, Vittori G, Alessandrini M, Nesi G, et al. CXCR3-B expression correlates with tumor necrosis extension in renal cell carcinoma. J Urol. 2009 Feb;181(2):843-48. https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.10.063.
22. Hoerning A, Koss K, Datta D, Boneschansker L, Jones CN, Wong IY, et al. Subsets of human CD4(+) regulatory T cells express the peripheral homing receptor CXCR3. Eur J Immunol. 2011 Aug;41(8):2291-302. https://doi.org/10.1002/eji.201041095.
23. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. EMBO J. 1992 Nov;11(11):3887-95. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x.
24. Grabie N, Gotsman I, DaCosta R, Pang H, Stavrakis G, Butte MJ, et al. Endothelial programmed death-1 ligand 1 (PD-L1) regulates CD8+ T-cell mediated injury in the heart. Circulation. 2007 Oct;116(18):2062-71. https://doi.org/10.1161/circulationaha.107.709360.
25. Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. J Exp Med. 2012 Jun; 209(6):1201-17. https://doi.org/10.1084/jem.20112741.
26. John LB, Devaud C, Duong CP, Yong CS, Beavis PA, Haynes NM, et al. Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells. Clin Cancer Res. 2013 Oct;19(20):5636-46. https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-13-0458.
27. Zhang Z, Liu S, Zhang B, Qiao L, Zhang Y, Zhang Y. T Cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. Front Cell Dev Biol. 2020 Feb;8:17. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00017.
28. Formenti SC, Hawtin RE, Dixit N, Evensen E, Lee P, Goldberg JD, et al. Baseline T cell dysfunction by single cell network profiling in metastatic breast cancer patients. J Immunother Cancer. 2019 Jul;7(1):177. https://doi.org/10.1186/s40425-019-0633-x.

29. Bates JP, Derakhshandeh R, Jones L, Webb TJ. Mechanisms of immune evasion in breast cancer. BMC Cancer. 2018 May;18(1):556. https://doi.org/10.1186/s12885-018-4441-3.

30. Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. Cancer Cell. 2018 Apr;33(4):547-62. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.012.

31. Gharagozloo M, Kalantari H, Rezaei A, Maracy MR, Salehi M, Bahador A, et al. The decrease in NKG2D+ Natural Killer cells in peripheral blood of patients with metastatic colorectal cancer. Bratisl Lek Listy. 2015;116(5):296-301. https://doi.org/10.4149/bll_2015_056.

32. Zhang Y, Li X, Zhang J, Mao L. Novel cellular immunotherapy using NKG2D CAR-T for the treatment of cervical cancer. Biomed Pharmacother. 2020 Nov;131:110562. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110562.

33. McGilvray RW, Eagle RA, Rolland P, Jafferji I, Trowsdale J, Durrant LG. ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients. Int J Cancer. 2010 Sep;127(6):1412-20. https://doi.org/10.1002/ijc.25156.

34. de Kruijf EM, Sajet A, van Nes JG, Putter H, Smit VT, Eagle RA, et al. NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. BMC Cancer. 2012 Jan 18;12:24. https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-24.

35. Chen D, Gyllensten U. MICA polymorphism: biology and importance in cancer. Carcinogenesis. 2014 Dec;35(12):2633-42. https://doi.org/10.1093/carcin/bgu215.

36. Jia HY, Liu JL, Yuan MZ, Zhou CJ, Sun WD, Zhao JJ, et al. Regulation Roles of MICA and NKG2D in Human Renal Cancer Cells. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(9):3901-905. https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.9.3901.

37. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. Nature. 2002 Oct;419(6908):734-38. https://doi.org/10.1038/nature01112.

38. Nieto-Velázquez NG, Torres-Ramos YD, Muñoz-Sánchez JL, Espinosa-Godoy L, Gómez-Cortés S, Moreno J, et al. Altered Expression of Natural Cytotoxicity Receptors and NKG2D on Peripheral Blood NK Cell Subsets in Breast Cancer Patients. Transl Oncol. 2016 Oct;9(5):384-91. https://doi.org/10.1016/j.tranon.2016.07.003.

39. Zahran AM, Rayan A, Zahran ZAM, Mohamed WMY, Mohamed DO, Abdel-Rahim MH, et al. Overexpression of PD-1 and CD39 in tumor-infiltrating lymphocytes compared with peripheral blood lymphocytes in triple-negative breast cancer. PLoS One. 2022 Jan;17(1):e0262650. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262650.

40. Syed Khaja AS, Toor SM, El Salhat H, Faour I, Ul Haq N, Ali BR, et al. Preferential accumulation of regulatory T cells with highly immunosuppressive characteristics in breast tumor microenvironment. Oncotarget. 2017 May;8(20):33159-71. https://doi.org/10.18632/oncotarget.16565.

41. Tøndell A, Wahl SGF, Sponaas AM, Sørhaug S, Børset M, Haug M. Ectonucleotidase CD39 and Checkpoint Signalling Receptor Programmed Death 1 are Highly Elevated in Intratumoral Immune Cells in Non-small-cell Lung Cancer. Transl Oncol. 2020 Jan;13(1):17-24. https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.09.003.

42. Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Pernot S, Nizard M, Pointet AL, et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. J Exp Med. 2015 Feb;212(2):139-48. https://doi.org/10.1084/jem.20140559.

43. Viel S, Marçais A, Guimaraes FS, Loftus R, Rabilloud J, Grau M, et al. TGF-β inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. Sci Signal. 2016 Feb 16;9(415):ra19. https://doi.org/10.1126/scisignal.aad1884.

44. Chang WC, Li CH, Chu LH, Huang PS, Sheu BC, Huang SC. Regulatory T Cells Suppress Natural Killer Cell Immunity in Patients With Human Cervical Carcinoma. Int J Gynecol Cancer. 2016 Jan;26(1):156-62. https://doi.org/10.1097/igc.0000000000000578.

45. Ko Y, Banerji SS, Liu Y, Li W, Liang J, Soule HD, et al. Expression of transforming growth factor-beta receptor type II and tumorigenicity in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. J Cell Physiol. 1998 Aug;176(2):424-34. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4652(199808)176:2%3C424::aid-jcp21%3E3.0.co;2-1.

46. Soufla G, Porichis F, Sourvinos G, Vassilaros S, Spandidos DA. Transcriptional deregulation of VEGF, FGF2, TGF-beta1, 2, 3 and cognate receptors in breast tumorigenesis. Cancer Lett. 2006 Apr;235(1):100-13. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.04.022.

47. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. Exp Cell Res. 2011 Mar;317(5):620-31. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.12.017.

48. Mulligan AM, Raitman I, Feeley L, Pinnaduwage D, Nguyen LT, O'Malley FP, et al. Tumoral lymphocytic infiltration and expression of the chemokine CXCL10 in breast cancers from the Ontario Familial Breast Cancer Registry. Clin Cancer Res. 2013 Jan;19(2):336-46. https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-11-3314.

49. Jafarzadeh A, Fooladseresht H, Nemati M, Assadollahi Z, Sheikhi A, Ghaderi A. Higher circulating levels of chemokine CXCL10 in patients with breast cancer: Evaluation of the influences of tumor stage and chemokine gene polymorphism. Cancer Biomark. 2016 Mar;16(4):545-54. https://doi.org/10.3233/cbm-160596.

50. Wendel M, Galani IE, Suri-Payer E, Cerwenka A. Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands. Cancer Res. 2008 Oct;68(20):8437-45. https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-1440.

51. Bronger H, Kraeft S, Schwarz-Boeger U, Cerny C, Stöckel A, Avril S, et al. Modulation of CXCR3 ligand secretion by prostaglandin E2 and cyclooxygenase inhibitors in human breast cancer. Breast Cancer Res. 2012 Feb;14(1):R30. https://doi.org/10.1186/bcr3115.

52. Kajitani K, Tanaka Y, Arihiro K, Kataoka T, Ohdan H. Mechanistic analysis of the antitumor efficacy of human natural killer cells against breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 2012 Jul;134(1):139-55. https://doi.org/10.1007/s10549-011-1944-x.