

# HLA-KIR-MICA 基因及其 NK 受体免疫应答与三阴性乳腺癌的相关性

金 强<sup>1</sup>, 冯振中<sup>2</sup>

(1. 蚌埠市第三人民医院, 安徽 蚌埠 233000;

2. 蚌埠医学院第一附属医院, 安徽 蚌埠 233030)

**摘要:** [目的] 探讨 HLA-KIR-MICA 基因及其自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)受体免疫应答与三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)的相关性。[方法] 选取 2018 年 2 月至 2019 年 2 月我院治疗的 TNBC 女性患者 400 例, 同时选取 100 例健康成年女性作为对照组。采用 HLA 分型法检测 HLA 等位基因、MICA 基因和 KIR 基因; 采用 Real-time PCR 法检测 HLA 等位基因、MICA 基因和 KIR 基因转录水平; 检测 NK 细胞免疫球蛋白经 MICA 检测后的表达量差异及与预后的关系。[结果] TNBC 患者的等位基因中, HLA-KIR\*17(48.5% vs. 28.0%,  $P<0.001$ ), HLA-KIR\*1003 (45.3% vs. 34.0%,  $P=0.042$ ), HLA-KIR\*14 (32.5% vs. 19.0%,  $P=0.008$ ), MICA\*13(40.8% vs. 20.0%,  $P<0.001$ ), MICA\*20(33.3% vs. 15.0%,  $P<0.001$ ) 基因占比均高于对照组; HLA-KIR\*02 (16.5% vs. 49.0%,  $P<0.001$ ), HLA-KIR\*12 (48.3% vs. 77.0%,  $P<0.05$ ), MICA\*04(10.8% vs. 44.0%,  $\chi^2=61.538$ ,  $P<0.001$ ), MICA\*17(34.8% vs. 69.0%,  $P<0.001$ ) 和 MICA\*15 (33.8% vs. 66.0%,  $P<0.001$ ) 基因占比均低于对照组; 两组 HLA-KIR\*0801 和 MICA\*0601 基因占比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与完全缓解(CR)+部分缓解(PR)比, 稳定(SD)+疾病进展(PD)的 HLA-KIR\*17、HLA-KIR\*1003、MICA\*13、MICA\*20 基因占比降低 (均  $P<0.05$ ), HLA-KIR\*14、HLA-KIR\*02、HLA-KIR\*12、MICA\*04、MICA\*17 和 MICA\*15 基因占比增高 (均  $P<0.05$ )。[结论] HLA-KIR\*17、HLA-KIR\*1003、MICA\*13、MICA\*20 及 HLA-KIR\*14、HLA-KIR\*02、HLA-KIR\*12、MICA\*04、MICA\*17、MICA\*15 等位基因可能与 TNBC 发生相关, 可能起到抑制或延缓 TNBC 发生的作用。

**关键词:** 免疫应答; HLA; MICA; KIR; 三阴性乳腺癌; 疗效

**中图分类号:** R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)09-0772-04

**doi:** 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.09.B004

## Correlation Between HLA-KIR-MICA Gene and NK Receptor Immune Response and Triple-Negative Breast Cancer

JIN Qiang<sup>1</sup>, FENG Zhen-zhong<sup>2</sup>

(1. The Third People's Hospital of Bengbu, Bengbu 233000 China; 2. The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College Bengbu 233030, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the relationship between HLA-KIR-MICA gene and natural killer cell (NK) receptor immune response and triple negative breast cancer (TNBC). [Methods] From February 2018 to February 2019, 400 female TNBC patients who received treatment in our hospital were selected, while 100 healthy adult female were selected as the control group. Real-time PCR was used to detect the transcription level of HLA alleles, MICA gene and KIR gene. The expression difference of NK cell immunoglobulin after MICA detection and its relationship with prognosis was detected. [Results] Among the alleles of TNBC patients, HLA-KIR\*17 (48.5% vs 28.0%,  $P<0.001$ ), HLA-KIR\*1003 (45.3% vs 34.0%,  $P=0.0042$ ), HLA-KIR\*14 (32.5% vs 19.0%,  $P=0.0008$ ), MICA\*13 (40.8% vs 20.0%,  $P<0.001$ ), MICA\*20 (33.3% vs 15.0%,  $P<0.001$ ) gene ratios were higher than that in control group. HLA-KIR\*02 (16.5% vs 49.0%,  $P<0.001$ ), HLA-KIR\*12 (48.3% vs 77.0%,  $P<0.001$ ), MICA\*04 (10.8% vs 44.0%,  $P<0.001$ ), MICA\*17 (34.8% vs 69.0%,  $P<0.001$ ) and MICA\*15 (33.8% vs 66.0%,  $P<0.001$ ) ratios were lower than that in control group. HLA-KIR\*0801 and MICA\*0601 showed no significant difference in the proportion of genes ( $P>0.05$ ). Compared with CR+PR group, HLA-KIR\*17, HLA-KIR\*1003, MICA\*13, MICA\*20 gene proportions in SD+PD group were significantly reduced ( $P<0.05$ ), HLA-KIR\*14, KIR\*02, HLA-KIR\*12, MICA\*04, MICA\*17 and MICA\*15 genes were significantly increased ( $P<0.05$ ). [Conclusion] HLA-KIR\*17, HLA-KIR\*1003, MICA\*13, MICA\*20 and HLA-KIR\*14, HLA-KIR\*02, HLA-KIR\*12, MICA\*04, MICA\*17, MICA\*15 allele may be related to the occurrence of TNBC, and may play a role in suppressing or delaying the occurrence of TNBC.

**Subject words:** immune response; HLA allele; MICA gene; KIR gene; triple-negative breast cancer; prognosis

**通信作者:** 冯振中, 教授, 硕士研究生导师, 博士; 蚌埠医学院第一附属医院病理科, 安徽省蚌埠市长淮路 287 号 (233030); E-mail: fzzapple1976@163.com

**收稿日期:** 2019-11-21; **修回日期:** 2020-04-07

三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC)是指孕激素受体(progesterone receptor, PR)、雌激素受体(estrogen receptor, ER)和原癌基因 Her-2 不表达的乳腺癌,不仅预后差,且容易发生脑转移及肺转移。研究表明,TNBC 发病与遗传因素、地区环境、个体差异等相关,存在 TNBC 发生的易感基因<sup>[1]</sup>。诸多研究显示,HLA-KIR-MICA 基因与多种恶性肿瘤的发生具有相关性。本文探讨 HLA-KIR-MICA 基因及其 NK 受体与 TNBC 的相关性,为 TNBC 临床诊疗提供参考依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选取 2018 年 2 月至 2019 年 2 月蚌埠市第三人民医院妇科接受治疗的 TNBC 女性患者 400 例作为观察组,年龄 21~73 岁,平均年龄(41.2±10.3)岁;同时选取 100 例健康成年女性作为对照组,年龄 23~71 岁,平均年龄(40.3±11.5)岁。观察组与对照组在年龄、婚育、区域等方面均无统计学意义差异( $P>0.05$ )。研究对象或其家属均已签署知情同意书,且已获医院伦理委员会批准。

TNBC 患者均接受手术治疗,并根据情况给予放化疗,均未接受内分泌治疗。收集所有研究对象外周血 2ml,置于-20℃环境中冷冻保存,诊疗开始前收集 TNBC 患者的血液样本和乳腺细胞样本。

### 1.2 研究方法

#### 1.2.1 提取基因组 RNA 和 DNA

应用酚氯仿法从两组研究对象的血液样本提取基因组 RNA 和 DNA,提取步骤为<sup>[2-3]</sup>:①将血液样本置于离心机中进行离心 10min;②离心后加入研钵裂解;③研磨好的制品置于离心机中,加入 10ml 蛋白酶 K,再加入等体积 Tris 饱和粉。离心 10min,离心后分为上中下三层,上层为 DNA,中层为蛋白质,下层为有机质;④吸取上层液体置于新的离心管中,加入 Tris 饱和粉、氯仿和异戊醇混合液,离心 10min,重复上述操作 1 遍;⑤吸取上清液加入新的离心管,加入 2.5 倍经过-20℃ 100%酒精,-20℃下静置 8h;⑥再次离心 10min 后,剩下白色沉淀物即为 DNA,使用基因检测仪监测提取的 DNA 浓度。

#### 1.2.2 检测 HLA、KIR 和 MICA 基因

采用 HLA 分型法检测研究对象的 HLA、KIR 和

MICA 基因,进行基因分型时采用基因型分析软件测定基因差异性。HLA 分型法操作原理是:ABO 基因片段从内含子 5 到 UTR3 内生成目的片段,基因长度扩加到 1962 个单位,同时对外显子 6 和 7 直接测序。在热循环仪中进行 PCR 核酸测序:初始时,在引物的作用下检测核酸序列,ABO 等位基因中的两个同时进行选择性复制;然后,PCR 对目的基因进行核酸序列测定过程来确定等位基因的多态位点。在巢式引物牵引突变点的作用下,凭借引物的特异性定位多态位点的 cis/trans 的结合点。使用 Exosap IT 对获得的 PCR 产物进行提纯。采用排序标准试剂盒测定目标基因的核酸序列,在基因分析仪上从内含子 5 到 UTR3 进行测序反应,该反应在巢式引物的作用下进行<sup>[4]</sup>。

#### 1.2.3 检测 HLA-KIR-MICA 转录水平及 NK 细胞免疫球蛋白<sup>[5]</sup>

采用 Real-time PCR 法检测等位基因 HLA-KIR-MICA 转录水平,检测 NK 细胞免疫球蛋白经 MICA 检测后的表达量差异。

#### 1.2.4 预后

随访至少 10 个月,根据世界卫生组织(world health organization,WHO)标准评价疗效,即完全缓解(complete response,CR)、部分缓解(partial response,PR)、稳定(stable disease,SD)和疾病进展(progressive disease,PD)。CR+PR 为总有效率。

### 1.3 统计学处理

采用 Excel 2016 对临床资料 and 各项数据进行录入和管理,建立数据库。资料分析采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,采用卡方检验分析和比较 TNBC 患者的 HLA-KIR\*12、HLA-KIR\*1003、HLA-KIR\*17、HLA-KIR\*02、HLA-KIR\*14 等位基因的分布频率差异。统计检验均为双侧概率检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PCR 产物及 DNA 提取物鉴定结果

TNBC 癌组织均有不同程度的 HLA-KIR 和 MICA 基因表达,正常组织无 HLA-KIR 和 MICA 基因(Figure 1)。

### 2.2 HLA-KIR 等位基因分布频率比较

TNBC 患者的等位基因中,HLA-KIR\*17(48.5% vs.

28.0%,  $\chi^2=13.619$ ,  $P<0.001$ ), HLA-KIR\*1003 (45.3% vs. 34.0%,  $\chi^2=4.131$ ,  $P=0.042$ ), HLA-KIR\*14 (32.5% vs. 19.0%,  $\chi^2=6.970$ ,  $P=0.008$ ) 基因占比均高于对照组; HLA-KIR\*02 (16.5% vs. 49.0%,  $\chi^2=47.713$ ,  $P<0.001$ ), HLA-KIR\*12 (48.3% vs. 77.0%,  $\chi^2=26.620$ ,  $P<0.001$ ) 基因占比均低于对照组; 两组 HLA-KIR\*0801 基因占比差异无统计学意义 (41.0% vs. 51.0%,  $\chi^2=3.264$ ,  $P=0.071$ ) (Table 1)。

### 2.3 MICA 等位基因分布频率比较

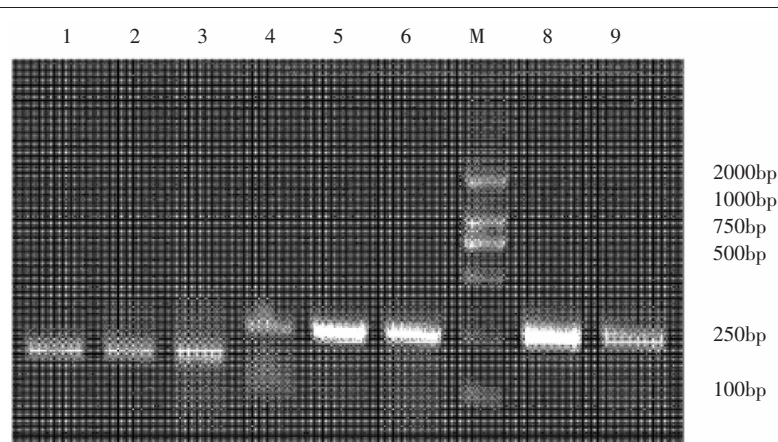
TNBC 患者的等位基因中, MICA\*13 (40.8% vs. 20.0%,  $\chi^2=14.844$ ,  $P<0.001$ ), MICA\*20 (33.3% vs. 15.0%,  $\chi^2=12.787$ ,  $P<0.001$ ) 基因占比均高于对照组; MICA\*04 (10.8% vs. 44.0%,  $\chi^2=61.538$ ,  $P<0.001$ ), MICA\*17 (34.8% vs. 69.0%,  $\chi^2=38.628$ ,  $P<0.001$ ) 和 MICA\*15 (33.8% vs. 66.0%,  $\chi^2=34.612$ ,  $P<0.001$ ) 基因占比均低于对照组; 两组 MICA\*0601 基因占比差异无统计学意义 (33.3% vs. 43.0%,  $\chi^2=3.334$ ,  $P=0.068$ ) (Table 2)。

### 2.4 TNBC 患者中 HLA-KIR-MICA 等位基因分布频率与预后的关系

400 例患者均接受随访, 随访时间 10~22 个月, 随访中位数 15 个月, 无一例死亡, CR、PR、SD 和 PD 分别为 29 例 (7.25%)、130 例 (32.50%)、146 例 (36.50%) 和 95 例 (23.75%), CR+PR 为 159 例 (39.75%)。与 CR+PR 组比, SD+PD 组的 HLA-KIR\*17、HLA-KIR\*1003、MICA\*13、MICA\*20 基因占比显著性降低 ( $P<0.05$ ), HLA-KIR\*14、HLA-KIR\*02、HLA-KIR\*12、MICA\*04、MICA\*17 和 MICA\*15 基因占比显著性增高 ( $P<0.05$ ) (Table 3)。

## 3 讨论

TNBC 作为乳腺癌的一种特殊亚型, 不仅预后差, 且容易发生脑转移及肺转移, 部分 TNBC 患者会出现淋巴结转移, 对内分泌治疗和抗 Her-2 治疗无效<sup>[6-7]</sup>。其发病是由多种外部诱因导致, 临床上对乳腺癌进行诊疗的多用手段是化疗和放疗。相关研究显示, 乳腺癌的发生与 HLA 基因的多态性具有一定



Note: 1~6: the HLA-KIR and MICA gene were expressed in triple negative breast cancer tissue, 8~9: the HLA-KIR and MICA gene did not show in the normal tissue, M is the DNA standard.

Figure 1 Electrophoresis of the production from conventional PCR

Table 1 Distribution frequency of HLA-KIR alleles in gene expression in two groups

| HLA-KIR alleles | TNBC group (n=400) | Control group (n=100) | $\chi^2$ | P      |
|-----------------|--------------------|-----------------------|----------|--------|
| HLA-KIR*17      | 194(48.5)          | 28(28.0)              | 13.619   | <0.001 |
| HLA-KIR*1003    | 181(45.3)          | 34(34.0)              | 4.131    | 0.042  |
| HLA-KIR*14      | 130(32.5)          | 19(19.0)              | 6.970    | 0.008  |
| HLA-KIR*0801    | 164(41.0)          | 51(51.0)              | 3.264    | 0.071  |
| HLA-KIR*02      | 66(16.5)           | 49(49.0)              | 47.713   | <0.001 |
| HLA-KIR*12      | 193(48.3)          | 77(77.0)              | 26.620   | <0.001 |

Table 2 Distribution frequency of MICA alleles in gene expression in two groups

| MICA alleles | TNBC group (n=400) | Control group (n=100) | $\chi^2$ | P      |
|--------------|--------------------|-----------------------|----------|--------|
| MICA*13      | 163(40.8)          | 20(20.0)              | 14.844   | <0.001 |
| MICA*04      | 43(10.8)           | 44(44.0)              | 61.538   | <0.001 |
| MICA*20      | 133(33.3)          | 15(15.0)              | 12.787   | <0.001 |
| MICA*17      | 139(34.8)          | 69(69.0)              | 38.628   | <0.001 |
| MICA*15      | 135(33.8)          | 66(66.0)              | 34.612   | <0.001 |
| MICA*0601    | 133(33.3)          | 43(43.0)              | 3.334    | 0.068  |

的相关性<sup>[8]</sup>, 并且人群中 NK 表面 HLA 和 KIR 具有高度多态性的特点可能与乳腺癌发生有关<sup>[9]</sup>, 研究表明, HLA-KIR 活化性不同, 对乳腺癌发生的影响不同。

基因频率是指在一个种群基因库中, 某个基因占所有等位基因数的比例。在自然状态下, 同一物种的基因频率在种族繁衍中保持稳定的趋势, 研究物种的基因频率, 不仅可以了解该物种进化情况, 还能了解某基因的相关疾病的发生与该基因的遗传因素

**Table 3 Relationship between HLA-KIR-MICA alleles distribution and prognosis in TNBC**

| HLA-KIR-MICA alleles | CR+PR (n=159) | SD+PD (n=241) | $\chi^2$ | P      |
|----------------------|---------------|---------------|----------|--------|
| HLA-KIR*17           | 52(32.70)     | 142(58.92)    | 26.361   | <0.001 |
| HLA-KIR*1003         | 55(34.59)     | 126(52.28)    | 12.102   | 0.001  |
| HLA-KIR*14           | 71(44.65)     | 59(24.48)     | 17.770   | <0.001 |
| HLA-KIR*0801         | 61(38.36)     | 103(42.74)    | 0.758    | 0.384  |
| HLA-KIR*02           | 14(8.81)      | 52(21.58)     | 11.342   | 0.001  |
| HLA-KIR*12           | 101(63.52)    | 92(38.17)     | 24.651   | <0.001 |
| MICA*13              | 34(21.38)     | 129(53.53)    | 40.994   | <0.001 |
| MICA*04              | 30(18.87)     | 13(5.39)      | 18.127   | <0.001 |
| MICA*20              | 31(19.50)     | 102(42.32)    | 22.491   | <0.001 |
| MICA*17              | 77(48.43)     | 62(25.73)     | 21.774   | <0.001 |
| MICA*15              | 72(45.28)     | 63(26.14)     | 15.699   | <0.001 |
| MICA*0601            | 47(29.56)     | 86(35.68)     | 1.619    | 0.203  |

之间的关系<sup>[10]</sup>。本文主要研究女性人群中 TNBC 与 MICA 基因、HLA 等位基因和 KIR 基因的基因频率的相关性,以期为临床提供参考依据。

本文采用 HLA 分型法检测 MICA 基因、HLA 等位基因和 KIR 基因在正常女性与 TNBC 患者中的分布占比,结果显示,观察组患者的等位基因中,HLA-KIR\*17、HLA-KIR\*1003、HLA-KIR\*14、MICA\*13、MICA\*20 基因占比均高于对照组;HLA-KIR\*02、HLA-KIR\*12、MICA\*04、MICA\*17 和 MICA\*15 基因占比均低于对照组。进一步分析,与 CR+PR 组比较,SD+PD 组 HLA-KIR\*17、HLA-KIR\*1003、MICA\*13、MICA\*20 基因占比降低,HLA-KIR\*14、HLA-KIR\*02、HLA-KIR\*12、MICA\*04、MICA\*17 和 MICA\*15 基因占比增高,因此推测,HLA-KIR\*17、HLA-KIR\*1003、MICA\*13、MICA\*20 基因可能起到延缓 TNBC 发生的作用,HLA-KIR\*14、HLA-KIR\*02、HLA-KIR\*12、MICA\*04、MICA\*17 和 MICA\*15 可能起到抑制 TNBC 发生的作用。相关的报道也有类似结果,如 Morales-Estevez C 等<sup>[11]</sup>认为 KIR-HLA 可用于预测实体肿瘤患者对抗 EGFR 治疗的反应;Alomar SY 等<sup>[9]</sup>评估 KIR 基因表达可能影响沙特阿拉伯妇女发生乳腺癌的风险;Onyeaghala G 等<sup>[12]</sup>认为 MICA 因参与胰腺癌的发生发展,可用于筛查和诊断腺癌。但上述等位基因如何参与 TNBC 的发生发展尚未见相关报道,还需要进一步研究。

综上所述,HLA-KIR\*17、HLA-KIR\*1003、MICA\*13、MICA\*20 及 HLA-KIR\*14、HLA-KIR\*02、HLA-KIR\*12、MICA\*04、MICA\*17、MICA\*15 等位基因可

能与 TNBC 发生相关,可能起到抑制或延缓 TNBC 的作用。

## 参考文献:

- [1] Shan J, Chouchane A, Mokrab Y, et al. Genetic variation in CCL5 signaling genes and triple negative breast cancer: susceptibility and prognosis implications[J]. Front Oncol, 2019, 9(12):1328.
- [2] Thorn CE, Bergesch C, Joyce A, et al. A robust, cost-effective method for DNA, RNA and protein co-extraction from soil, other complex microbiomes and pure cultures[J]. Mol Ecol Resour, 2019, 19(2):439-455.
- [3] Rana MM, Aycan M, Takamatsu T, et al. Optimized nuclear pellet method for extracting next-generation sequencing quality genomic dna from fresh leaf tissue[J]. Methods Protoc, 2019, 2(2):piiE54.
- [4] Korbie D, Lin E, Wall D, et al. Multiplex bisulfite PCR resequencing of clinical FFPE DNA[J]. Clin Epigenetics, 2015, 7:28.
- [5] Amorim LM, Santos THS, Hollenbach JA. Cost-effective and fast KIR gene-content genotyping by multiplex melting curve analysis[J]. HLA, 2018, 92(6):384-391.
- [6] Al-Mahmood S, Sapiezynski J, Garbuzenko OB, et al. Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options[J]. Drug Deliv Transl Res, 2018, 8(5):1483-1507.
- [7] Lebert JM, Lester R, Powell E, et al. Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer[J]. Curr Oncol, 2018, 25(Suppl 1):S142-S150.
- [8] Zidi I, Dziri O, Zidi N, et al. Association of HLA-G +3142 C>G polymorphism and breast cancer in Tunisian population[J]. Immunol Res, 2016, 64(4):961-968.
- [9] Alomar SY, Alkhuriji A, Trayhym P, et al. Association of the genetic diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor genes and HLA-C ligand in Saudi women with breast cancer[J]. Immunogenetics, 2017, 69(2):69-76.
- [10] Wang X, Liu H, Maimaitiaili A, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in Chinese patients with high-risk breast cancer[J]. Mol Genet Genomic Med, 2019, 7(6):e677.
- [11] Morales-Estevez C, De la Haba-Rodriguez J, Manzanares-Martin B, et al. KIR genes and their ligands predict the response to anti-egfr monoclonal antibodies in solid tumors[J]. Front Immunol, 2016, 7(11):561.
- [12] Onyeaghala G, Lane J, Pankratz N, et al. Association between MICA polymorphisms, s-MICA levels, and pancreatic cancer risk in a population-based case-control study[J]. PLoS One, 2019, 14(6):e0217868.