

ORIGINAL ARTICLE

Association between polymorphism of interleukin 17 (IL-17F) and increased susceptibility to gastric cancer

Aboozar Ghorbani¹,
Vahid Hosseini²,
Abulghasem Ajami¹,
Alireza Rafiei¹,
Zahra Hosseini-khah³,
Ghasem Janbabai⁴

¹ Department of Immunology, Molecular Cell-Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Molecular Cell-Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Department of Internal Medicine, Molecular Cell-Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received Sat 18, 2012 ; Accepted July 2 , 2012)

Abstract

Background and purpose: Gastric cancer is one of the most common gastrointestinal cancers in the world. Gastric cancer is the most common cancer in north of Iran. Interleukin-17F (IL-17F) is a pro-inflammatory cytokine expressed by a novel subset of CD4+ Th cells (Th-17), and it causes the occurrence and strengthening the inflammatory response. This study aimed to assess the association between IL-17F- A7488G polymorphism and potential susceptibility to gastric cancer.

Materials and methods: A case-control study consisting of 161 gastric cancer patients with mean age 62.14 ± 12.6 and 171 healthy controls with mean age 58.93 ± 14.2 was conducted. Genomic DNA was extracted and genotypes of - A7488G polymorphism were assessed through polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).

Results: The frequency of G allele was higher in gastric cancer patients (12.1%) compared with the control group (9.15%), but these differences were not significant ($P=0.22$). In addition, the distribution of GG genotype was not significantly differed between the patients and the controls (4.3% vs. 1.8%, $P=0.182$). Furthermore, logistic regression analysis revealed no significant association between the presence of 7488G allele and clinical stages ($P=0.28$), tumor grade ($P=0.36$) and H. pylori infection ($P=0.89$).

Conclusion: These results suggest that IL-17F A7488G polymorphism in the promoter of IL-17F gene is not directly assumed as a genetic risk factor in the predisposition to gastric cancer.

Keywords: Gastric cancer, gene polymorphism, IL-17F, Th-17

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(91): 11-20 (Persian).

بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن اینترلوکین-۱۷ (IL-17F) با افزایش استعداد ابتلاء به سرطان معده

ابوذر قربانی^۱
وحید حسینی^۲
ابوالقاسم عجمی^۱
علیرضا رفیعی^۱
زهرا حسینی خواه^۳
قاسم جان بابایی^۴

چکیده

سابقه و هدف: سرطان معده یکی از شایع ترین سرطان‌های دستگاه گوارشی در دنیا می‌باشد که در ایران نیز از شیوع بسیار بالایی برخوردار است. اینترلوکین-۱۷ (IL-17) یک سایتوکاین پیش التهابی می‌باشد است که توسط سلول‌های Th-17 ترشح می‌شود و از طریق القای فاکتورهای مختلف باعث ایجاد و تقویت التهاب می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم IL-17 در بیماران مبتلا به سرطان معده و مقایسه آن با گروه شاهد می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مورد-شاهدی بر روی ۳۳۲ نفر انجام گردید که شامل ۱۶۱ بیمار مبتلا به سرطان معده با میانگین سنی $۴۲/۱۴ \pm ۱۲/۶$ سال (۸۹ مرد و ۷۷ زن) و ۱۷۱ فرد سالم با میانگین سنی $۵۸/۹۳ \pm ۱۴/۲$ سال (۷۴ مرد و ۸۷ زن) بودند. DNA ژنومی با استفاده از روش تغییر یافته رسبو پروتئین با کمک غلظت بالای نمک استخراج شد و ژنوتیپ‌های حاصل از پلی مرفیسم (rs 7488T/C) در ژن IL-17F در ژن IL-17F با روش RFLP-PCR مورد بررسی گرفت و نتایج بین گروه بیمار و شاهد مقایسه گردید.

یافته‌ها: فراوانی آلل G در بیماران مبتلا به سرطان معده بیشتر (۱۲/۱ درصد) از فراوانی آن در گروه سالم (۹/۱۵ درصد) بود ولی این تفاوت از نظر آماری معنی دار نشد ($p=0.22$). همچنین فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت موتان GG در بیماران مبتلا به سرطان معده به مرتب از افراد سالم بیشتر بود ($۴/۳$ درصد در مقابل ۱/۸ درصد) با این وجود این تفاوت هم از نظر آماری قابل توجه نبود ($p=0.182$). ارتباط معنی داری بین حضور آلل 7488G با مراحل بالینی تومور (۰/۲۸)، درجه بد خیمی تومور ($p=0.36$) و عفونت هلیکوباتر پیلوری ($p=0.89$) دیده نشد.

استنتاج: عدم وجود ارتباط معنی داری بین پلی مرفیسم A7488G در پرومотор ژن IL-17F و سرطان معده بیان می‌نماید که آلل G نمی‌تواند به تنهایی به عنوان یک فاکتور خطر ژنتیکی در تعیین استعداد ابتلاء به سرطان معده نقش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان معده، پلی مورفیسم ژن، اینترلوکین-۱۷-F، IL-17

مقدمه

سرطان‌های دستگاه گوارش، بیش از یک سوم سرطان‌های شایع و تقریباً نیمی از سرطان‌هایی که منجر به مرگ می‌شوند را تشکیل می‌دهند. از میان سرطان‌های لوله گوارش می‌توان به سرطان کولورکتال و سرطان

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۵۱۲-۸۹ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تأمین شده است.

مؤلف مسئول: علیرضا رفیعی- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پامبر اعظم، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی E-mail: rafiei1710@gmail.com

۱. گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲. گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۳. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۴. گروه داخلی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۵. تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۰/۱/۲۱ تاریخ تصویب: ۹۱/۴/۱۲

ایمنی ضد تومور می‌شوند (Benchetrit F 2002) در حالی که سایر گزارشات بیانگر ارتباط Th-17 و بهویژه IL-17 با فرایند رگزایی در تومورها و تعداد عروق خونی در بافت‌های سرطانی می‌باشند (Kato T 2001). مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که التهاب مزمن می‌تواند سنگ بنای پیدایش سرطان باشد. سلول‌های Th17 به‌واسطه نقشی که در پیدایش التهاب بهویژه التهاب مزمن دارند، می‌توانند با پیدایش و پیشرفت سرطان ارتباط داشته باشند (Horlock C 2009). ارتباط IL-17 با پیشرفت سرطان پروسسات (Steiner GE 2003)، کارسینوم پوست (Wang L 2010) و سرطان معده کارسینوم (Zhang B 2008) مشخص شده است. IL-17F موجب تولید بسیاری از سیتوکاین‌های التهابی نظیر IL-6 و GM-CSF و کموکاین‌های CxCL1 و CxCL2 و CxCL5 شده و تشکیل گرانولوم را تشید نموده و در فراخوان نوتوفیل‌ها نقش به‌سازی دارد (Weaver CT 2007).

مطالعات متعددی ارتباط بین پلی مرفیسم در ژن سیتوکاین‌ها و سرطان معده را بررسی کرده‌اند ولی اندک مطالعاتی در جهان به بررسی نقش پلی مرفیسم در ژن IL-17F در ارتباط با سرطان معده پرداخته‌اند. ژن IL-17F بر روی کروموزوم ۶ قرار گرفته و دارای ۳ اگزون می‌باشد. بروز پلی مرفیسم در ژن کد کننده IL-17F با بروز و شدت بیماری‌های خود ایمنی نظیر آرتیت روماتوئید (Nordang GB 2009)، بیماری التهابی روده (Chen B 2009)، سرطان معده ارتباط دارد (Tahara T 2009; Tahara T 2010). جایگزینی گوانین به آدنین در موقعیت A7488G A7488G پرموتور ژن IL-17F rs 763780 که باعث ایجاد پلی مرفیسم عملکردی rs می‌شود قابلیت تغییر فعالیت ژن را دارد به‌طوری که در افراد دارای آلل 197A میزان تولید IL-17F بسیار بیشتر از ناقلين 197G است (Espinoza JL 2011). هدف از این مطالعه، ارزیابی نقش اشکال پلی مرفیک ژن IL-17F در استعداد ابتلا به سرطان معده می‌باشد. به همین منظور وضعیت پلی مرفیسم A7488G در ژن

معده اشاره کرد که شایع‌ترین آن‌ها هستند و به ترتیب سومین و چهارمین بدخیمی‌های رایج در دنیا با شیوع سالیانه تقریباً یک میلیون و نهصد و سی و چهار هزار نفر مورد جدید را شامل می‌شوند (Jemal A 2005). سرطان معده به جهت شیوع بالا و مرگ و میر زیاد از اهمیت به‌سازی در استان مازندران برخوردار است. هر چند تلاش‌های زیادی در جهت تشخیص و درمان مؤثر سرطان صورت گرفته است ولی از آن‌جا که سرطان معده معمولاً در مراحل تقریباً پیشرفته تشخیص داده می‌شود که عملاً به جهت عدم پاسخ مناسب به درمان‌های موجود از پیش‌آگاهی خوبی برخوردار نیست لذا تلاش‌های وافری می‌باشد در پیشگیری از این سرطان‌ها و بهویژه سرطان معده انجام شود (Lichtenstein P 2000).

از آن‌جا که ابتلاء به عفونت‌ها از جمله عفونت با هلیکوباتر پیلوئی نقش مهمی در بروز التهاب مزمن در مخاط معده دارد (Suerbaum S 2002) و التهاب مزمن شرایط را برای بروز زخم پیتیک و ادنوکارسینوم معده فراهم می‌نماید. با این حال، وجود تفاوت قابل ملاحظه در میزان التهاب در معده افراد مختلف آلدوده به Prinz C 2001 H. pylori (H. pylori) نشان می‌دهد که غیر از عوامل مربوط به پاتوژن، فاکتورهای دیگری از جمله فاکتورهای ژنتیکی و ایمونولوژیکی مربوط به میزان نیز در این راستا نقش دارند. بنابراین سازوکارهایی که در ایجاد التهاب در مخاط معده نقش دارند، می‌توانند به عنوان محور اصلی مطالعاتی پاتوژن سرطان معده قرار گیرند. در این میان Th-17 که دودمان جدیدی از لنفوسيت‌های CD4+ می‌باشد که مرز بین پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی محسوب می‌شود با تولید سیتوکاین‌های پیش التهابی از قبیل IL-22، IL-17A، IL-17F و IL-26 نقش کلیدی در ایجاد التهاب داشته و در پاتوژن بسیاری از بیماری‌های خود ایمن (Chabaud M 1998) و بیماری‌های التهابی روده‌ای و بدخیمی‌ها (Ye ZJ 2010) بیماری‌های التهابی روده‌ای و بدخیمی‌ها (Chen D 2012) مؤثرند. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های Th-17 باعث تقویت پاسخ‌های

نظیر ارتقیت روماتوئید؛ لوپوس اریتماتوس سیستمیک، دیابت ملیتوس و بیماری التهابی روده و یا بیماری‌های عفونی مزمن بودند. همچنین چنانچه در بستگان درجه یک این افراد سابقه سرطان معده وجود داشت نیز از ورود به مطالعه حذف می‌شدند. ویژگی‌های دموگرافیک و خصوصیات بالینی و پاتولوژی بیماران در چک لیست ثبت گردید. پروتکل انجام این مطالعه به تصویب کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی مازندران رسید. از افراد تحت مطالعه بعد از اخذ رضایت آگاهانه حدود ۱۰-۵ میلی‌لیتر خون وریدی توسط سرنگ خلا دار استریل اخذ گردید و با لوله‌های حاوی ۵۰ میلی‌مolar EDTA جهت استخراج DNA ژنومی و لوله‌های حاوی خون لخته جهت جداسازی سرم منتقل شد و تازمان آزمایش در فریزر ۲۰-سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA به روش تغییر یافته Salting out بدین منظور حدود ۴ میلی‌لیتر خون حاوی EDTA را به لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل گردید و با بافر لیزکننده I به حجم ۱۵ میلی‌لیتر رسید. سپس به منظور مخلوط کردن، محتويات لوله را چند بار سر و ته کرده و ۵ دقیقه در دمای اتاق گذاشتند. و بهمدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و مجدداً لوله را تا ۱۵ میلی‌لیتر با بافر I پر شد و مراحل فوق الذکر سه بار تکرار گردید در مرحله بعد بر روی رسوب حاصله ۲ میلی‌لیتر بافر II ریخته و بهمدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۴۵ درجه سانتی‌گراد گذاشتند و در طی این مدت چند بار لوله‌ها شیک شده تا رسوب کاملاً حل شود. نیم میلی‌لیتر محلول سدیم پر کلرات ۵ مولار به لوله‌ها افزوده و دو تا سه دقیقه مخلوط گردید، به هر لوله دو میلی‌لیتر کلرو فرم سرد، در زیر هود افزوده شد. لوله‌ها بهمدت ۵ تا ۷ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ شد و محلول رویی که حاوی DNA می‌باشد به لوله‌های حاوی ۳ میلی‌لیتر اتانول سرد

IL-17F در بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد سالم بررسی شد. شناسایی فنوتیپ و ژنتیک بیماران مبتلا به سرطان علاوه بر کمک شایان در مشخص شدن فیزیوپاتولوژی بیماری، می‌تواند در شناسایی و غربالگری افراد دارای استعداد ابتلا ژنتیکی و احیاناً استفاده از راه کارهای پیش‌گیرانه و درمانی مناسب کمک نماید.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه

جمعیت مورد بررسی در این مطالعه مورد-شاهدی با توجه به سطح اطمینان ۹۵ درصد ($\alpha=0.05$) و توان آزمون ۹۰ درصد ($\beta=0.10$) و با توجه به ۷۲/۹ درصد = P و ۲۵/۱ درصد = P، ۱۶۱ نفر در هر گروه برآورد گردید. به طوری که از مجموع ۳۳۲ نفر مورد مطالعه، ۱۶۱ بیمار مبتلا به سرطان معده بودند که از تیر ماه ۱۳۸۸ لغایت بهمن ماه ۱۳۹۰ به پلی کلینیک طبی و بخش‌ها گوارش و انکولوژی بیمارستان امام خمینی ساری جهت آندوسکوپی و شیمی درمانی مراجعه کرده بودند. تشخیص سرطان معده بر اساس یافته‌های بالینی، آندوسکوپی و تأیید پاتولوژی بر طبق پروتکل بین‌المللی International Classification of Diseases for Oncology IX، code 151 (Lauren P 1965) انجام گردید. بیماران مورد بررسی بر اساس شواهد بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی فاقد بیماری‌های التهابی بهویژه کولیت اولسرو و بیماری التهابی روده بودند. ۱۷۱ نفر داوطلب سالم غیر خویشاوند با افراد مبتلا به سرطان معده که از نظر مشخصات سنی، جنس و منطقه جغرافیایی و نژاد با گروه بیمار مورد تحقیق مطابقت داشتند نیز به عنوان شاهد انتخاب شدند. این افراد از میان از اهداء کنندگان خون و یا از افرادی انتخاب شدند که جهت پایش سلامت خود مورد آندوسکوپی قرار می‌گرفند و نتیجه آندوسکوپی آن‌ها نرمال بود. افراد شاهد بر اساس شواهد بالینی فاقد سابقه بیماری‌های خود اینمن یا التهابی

کولموگراف- اسمیرنوف، داده‌های کمی با استفاده از آزمون Student t Test مستقل و داده‌های کیفی با استفاده از تست‌های آماری مربع Chi و با Fisher Exact test ارزیابی شدند. ارتباط بین ژنتوتیپ‌ها و یا آلل‌ها پلی‌مرفیسم ژن‌ها با بیماری و مراحل مختلف آن با استفاده از آزمون رگرسیون لوژستیک بررسی شد و میزان نسبت شانس Odd ratio با سطح اطمینان کمتر از ۰/۰۵ به دست آمد.

یافته‌ها

الف- ارزیابی یافته‌های دموگرافی و بالینی و پاتولوژیک بیماران مبتلا به کانسر معده در این مطالعه ۱۶۱ بیمار مبتلا به آدنوکارسینوم معده شرکت داشتند که از این تعداد ۸۹ (۵۵/۲۴ درصد) مرد و ۷۲ (۴۴/۷۳ درصد) زن با میانگین سنی ۶۲/۱۴±۱۲/۶ سال بودند به طوری حداقل ۲۸ و حداً کثر ۴۹/۱۲ (۸۴ سال داشتند. از ۱۷۱ نفر شاهد سالم درصد) مرد و ۵۰/۹ (۸۷ درصد) زن با میانگین سنی ۵۸/۹۳±۱۴/۲ سال وارد مطالعه شدند. همان‌طور که جدول شماره ۱ نشان می‌دهد اختلاف معنی‌داری بین میانگین سن بیماران و افراد شاهد مشاهده نشد (p=۰/۹۹). همچنین اختلاف قابل توجهی بین گروه بیماران و گروه شاهد از نظر جنسی مشاهده نشد (p=۰/۱۶). وضعیت تأهل و شغل در بین دو گروه تفاوت معنی‌داری وجود داشت به طوری که گرچه بیشترین جمعیت در هر گروه را افراد متاهل تشکیل می‌دادند با این حال فراوانی مجردین و افراد مطلقه در مبتلایان به سرطان معده بیشتر از افراد شاهد بود. همچنین اختلاف معنی‌داری بین دو گروه تحت مطالعه از لحاظ ویژگی‌های اجتماعی- اقتصادی وجود داشت به طوری که اشتغال در بیماران با سرطان معده کمتر از افراد شاهد بود (p=۰/۰۰۱) و میزان تحصیلات افراد بیمار کمتر از افراد شاهد بود (p=۰/۰۰۳).

۹۹ درجه اضافه شد اکلاف DNA مشخص و رسوب کند. در پایان DNA را با پت پاستور خارج کرده تا در هوای آزاد اتانول آن تبخیر شود و سپس DNA در ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرو لیتر آب مقطر استریل حل شد.

تکثیر تاچیه ژنی IL-17F

تکثیر بخشی از ژن IL-17F که حاوی پلی‌مرفیسم A7488G می‌باشد با استفاده از جفت پرایمرهای (PCR) تکثیر یافت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از مخلوطی از ۱۰۰ ng DNA زنومی، ۱ میکرومول از هر یک از بازهای آلی (dNTP)، ۱ میکرومول از هر یک از پرایمرها، ۲ mM از محلول Taq DNA polymerase، MgCl₂، یک واحد آنزیم PCR انجام گردید. پروفایل دمایی PCR شامل، دناتوراسیون اولیه به مدت ۴ دقیقه در ۹۵ °C، و سپس در ۳۵ سیکل با شرایط دمایی زیر ادامه می‌یابد: دمای دناتوراسیون ۹۵ °C به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمر در ۶۰ °C به مدت ۳۵ ثانیه، مرحله تکثیر در دمای ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت تکثیر نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۴ دقیقه.

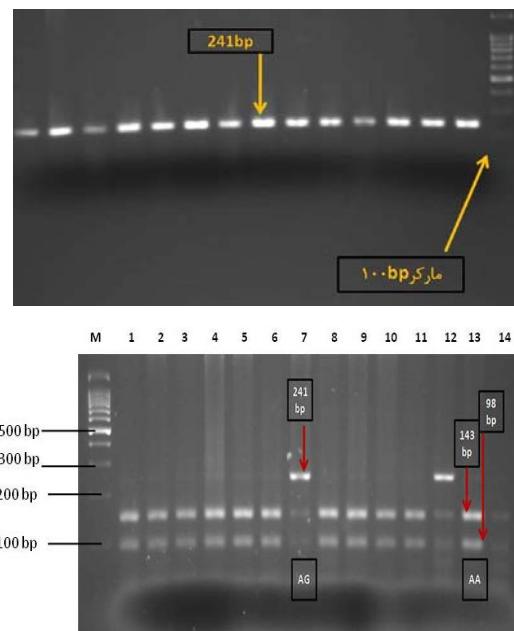
تعیین ژنوتیپ IL-17F

برای تعیین ژنوتیپ‌های حاصل از پلی‌مرفیسم در ژن IL-17F از روش RFLP استفاده شد. برای این منظور بخش تکثیر یافته ژن IL-17F تحت تأثیر روش هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدود الاثر (NlaIII فرماتاز، آلمان) به مدت 12 ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید. سپس محصول هضم شده بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز برد و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ترانس ایلومیناتور آشکارسازی باند‌ها صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

برای ارزیابی داده‌های کمی پس از اطمینان از طبیعی بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون

کارایی نداشت و بنابراین تنها همان قطعه ۲۶۲ جفت بازی آشکار خواهد شد.



تصویر شماره ۱: الگوی الکتروفوروتیک محصول PCR بخش تکثیر یافته‌ای از ژن IL-17F بطول 241 جفت باز (شکل بالا) که حاوی ناحیه پلی مرفیک A7488G و قطعات حاصل از هضم آنزیمی در روش RFLP-PCR (شکل پایین) را نشان می‌دهد. همان طور که دیده می‌شود ژنوتیپ AA باعث ایجاد دو باند ۱۴۳ و ۹۸ جفت بازی و ژنوتیپ AG بعث ایجاد سه قطعه ۲۴۱، ۱۴۳ و ۹۸ جفت بازی و ژنوتیپ GG تنها بواسطه حضور قطعه ۲۴۱ جفت بازی مشخص می‌شود.

توزیع فراوانی آلل و ژنوتیپی پلی مرفیسم A7488G در ژن IL-17F در بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد سالم در جدول شماره ۲ آمده است. به علت این که امکان بررسی نتیجه این پلی مرفیسم در ۷ فرد سالم فراهم نشد عملاً آنالیز آماری تعیین فراوانی ژنوتیپی در مورد ۱۶۴ نفر انجام گردید. توزیع ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی مرفیسم در افراد شاهد از قانون هارדי وینبرگ تبعیت می‌کرد ($p=0.126$). همان‌طوری که در جدول شماره ۲ دیده می‌شود فراوانی آلل G که با افزایش تولید IL-17F همراه است، در بیماران مبتلا به سرطان معده بیشتر (۱۲/۱ درصد) از فراوانی آن در گروه سالم (۹/۱۵ درصد) بود در حالی که فراوانی آلل طبیعی A در

سرطان معده در بیماران مورد بررسی از نوع روده‌ای بود و ۷۱/۷ درصد بیماران در مرحله سوم و چهارم بیماری خود قرار داشتند. همچنین بررسی‌های پاتولوژی نشان داد اکثر بیماران مورد مطالعه در مراحل پیشرفته بیماری قرار داشتند و تنها در کمتر از ۱۰ درصد بیماران، تشخیص در مراحل اولیه بیماری انجام شده است. از طرف دیگر طبقه‌بندی بیماران بر اساس درجه بدخیمی نشان داد که درجه تمایز سلول‌ها در بیشتر از دو سوم بیماران نسبتاً تا کاملاً تمایز نیافنگ بود.

جدول شماره ۱: خصوصیات دموگرافیک در بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد شاهد سالم

متغیر	شاهد (n=۱۶۱)	سرطان معده (n=۷۱)	سطوح معنی داری
سن (سال)	۵۷/۱۴±۱۲/۶	۵۷/۹۳±۱۴/۲	۰/۹۹
جنس (زن: مرد)	۸۹:۷۲	۸۴:۷۷	۰/۱۶
وضعیت تأهل	۳ (۱/۹)	۷ (۹/۱)	۰/۰۰۲
مجرد	۱۶۶ (۹۷/۶)	۱۴۹ (۹۳/۸)	۰/۰۰۱
متاهل	۱ (۰/۵)	۳ (۲/۱)	۰/۰۰۳
متلقف	۱ (۰/۶)	۴ (۵/۷)	
شغل	۳۵ (۲۰/۴)	۲۴ (۱۵)	
بی کار	۷۶ (۴۳/۱)	۴۶ (۲۹/۲)	
کارمند	۶۰ (۳۶)	۸۵ (۵۳/۱)	
خانه دار	۸۵ (۴۹/۷)	۵۳ (۳۲/۹)	
سایر			
تحصیلات در حد دیپلم و بالاتر			

ب) تعیین ژنوتیپ حاصل از پلی مرفیسم A7488G در بیماران مبتلا به سرطان معده تغییر باز آلی گوانین به جای آدنین در موقعیت A7488G پرومتوئر ژن IL-17F که موجب جایگزینی اسید آمینه آرژینین به جای هیستیدین در موقعیت ۱۶۱ پروتئین (H161R) می‌گردد موجب ایجاد سه ژنوتیپ GG و GA و AA می‌شود. این ژنوتیپ‌ها همان‌طور که در قسمت پایین تصویر شماره ۱ دیده می‌شود براساس تعداد و اندازه قطعه حاصل از برش توسط آنزیم محدودالاثر مشخص می‌شوند به‌طوری که ژنوتیپ هموزیگوت AA دو قطعه ۱۴۳ و ۹۸ جفت بازی، ژنوتیپ هتروزیگوت GA سه قطعه ۲۴۱، ۱۴۳ و ۹۸ در ژنوتیپ هموزیگوت موتان GG آنزیم محدودالاثر

(AG+GG) با اندیس‌های مرتبط با سرطان معده مورد بررسی قرار گرفت. به همین دلیل برای ارزیابی نقش پلی‌مرفیسم A7488G از ژن IL-17F در میزان تمایز تومور، ارتباط حضور یا فقدان این آلل با درجات تمایزی تومور بررسی شد. همان‌طور که جدول شماره ۳ نشان می‌دهد ارتباط معنی‌داری بین حضور آلل G7488G با مراحل بالینی تومور ($p=0.028$ درجه بدخیم ($p=0.036$) و عفونت هلیکوباتریلوری ($p=0.089$) دیده نشد. به طوری که وجود یا عدم حضور آلل موتان G باعث جایگزینی آرژنین در موقعیت ۱۶۱ سیتوکاین IL-17F می‌شود، موجب افزایش یا کاهش معنی‌دار شانس ابتلا به سرطان معده نمی‌شود.

جدول شماره ۲: ارتباط فراوانی آللی و توزیع ژنوتیپی حاصل از پلی‌مرفیسم A7488G (rs763780) از ژن IL-17F با سرطان معده

پلی‌مرفیسم	A7488G	شاهد (n=۱۶)	سرطان معده (n=۱۶)	سطح اطمینان ۹۵ درصد	OR	سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌داری
ژنوتیپ						
AA	۱۲۷ (۸۵/۵)	۱۲۹ (۸۰/۱)	۱ (۱/۱)	۱	۱/۱	۰.۰۷۴
GA	۲۴ (۱۴/۶)	۲۵ (۱۵/۵)	۱/۱	۰.۱/۱	۰.۰۶-۰.۰۳	۰.۰۷۴
GG	۳ (۱/۸)	۷ (۴/۳)	۰.۵/۰.۵	۰.۰۷۳-۰.۰۷۹	۰.۰۷۳-۰.۰۷۹	۰.۰۱۸۲
آلل	۲۹۸ (۹۰/۱۵)	۲۸۳ (۷۷/۹)	۱	۰.۰۷۳-۰.۰۷۹	۰.۰۷۳-۰.۰۷۹	۰.۰۱۸۲
G	۳۰ (۹/۱۵)	۳۹ (۱۲/۱)	۰.۵/۰.۵	۰.۰۸۳-۰.۰۲۶	۰.۰۸۳-۰.۰۲۶	۰.۰۰۲۲
ناقل آلل	۲۷ (۱۶/۴۶)	۳۲ (۱۹/۹)	۰.۵/۰.۵	۰.۰۷۱-۰.۰۲۲	۰.۰۷۱-۰.۰۲۲	۰.۰۰۴۲
(GG+AG vs. AA)						

توزیع ژنوتیپی و فراوانی آللی بصورت فراوانی مطلق و نسبی (اعداد داخل پرانتز) نشان داده شده است. اولین آلل یا ژنوتیپ طبیعی بعنوان رفرانس در نظر گرفته شده است.

جدول شماره ۳: ارتباط پیشرفت و درجه بدخیمی تومور معده با ژنوتیپ حاصل از پلی‌مرفیسم A7488G از ژن IL-17F

معنی‌داری	95% CI	OR	ژنوتیپ		مرحله تومور
			AA (n=۳۲)	AG+GG (n=۱۲۹)	
۰/۰۲۸	۰/۱۹-۱/۰۵۵	۰/۰۴	۱۹ (۳۲/۸)	۹ (۴۷/۴)	I+II
			۳۹ (۵۷/۲)	۱۰ (۵۲/۶)	III+IV
					تمایز تومور**
			۲۰ (۳۳/۵)	۲ (۱۱/۸)	پیویزی تمایز یافته
۰/۰۳۶	۰/۰۴۲-۱۰/۰۳۷	۰/۰۸	۴۸ (۵۶/۵)	۱۰ (۵۸/۸)	تمایز متوسط
۰/۰۲۲	۰/۰۵۰-۱۷/۱۴	۰/۰۹۴	۱۷ (۲۰)	۵ (۲۹/۴)	تمایز نامناسب
					عفونت هلیکوباتریلوری
					دارد
۰/۰۸۹	۰/۰۴۱-۲/۰۰۴	۰/۰۹۲	۷۸ (۶۰/۵)	۲۰ (۴۲/۵)	نداور
			۵۱ (۳۹/۵)	۱۲ (۳۷/۵)	

طبقه‌بندی تومور براساس مبنای TNM انجام گردید.

*داده حاصل ۷۷ بیمار مبتلا به سرطان معده می‌باشد

**داده‌ها حاصل ۱۰۷ بیمار مبتلا به سرطان معده می‌باشد

افراد شاهد بیشتر از بیماران مبتلا به سرطان معده بود (۹۰/۸۵ درصد در مقابل ۸۷/۹ درصد) ولی این اختلافات از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p=0.22$). بررسی چگونگی توزیع ژنوتیپ‌های حاصل از این آلل پلی‌مرفیسم در ژن IL-17F نشان داد ژنوتیپ هموزیگوت موتان GG در بیماران مبتلا به سرطان معده به مرتب از افراد سالم بیشتر می‌باشد (۴/۳ درصد در مقابل ۱/۸ درصد) با این وجود این تفاوت از نظر آماری قابل توجه نیود (۰/۱۸۲). همان‌طور که جدول شماره ۲ نشان می‌دهد گرچه فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت طبیعی AA در افراد سالم بیشتر از بیماران مبتلا به سرطان معده می‌باشد (۸۵/۵ درصد در مقابل ۱/۱ درصد) ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p=0.04$).

با توجه به این که فراوانی ژنوتیپ موتان GG در جمعیت مورد مطالعه کم می‌باشد برای آن که بتوان تأثیر حضور آن را ارزیابی نمود کل جمعیت حامل یک نسخه و یا دونسخه از آلل موتان G با هم ترکیب گردید و به صورت مدل غالب آلل موتان G (شامل ژنوتیپ‌های GG+AG) ارائه شد. سپس جمعیت مورد مطالعه براساس حضور (ژنوتیپ‌های GG+AG) یا عدم حضور (ژنوتیپ GG) آلل G مورد مقایسه قرار گرفتند. همان‌طور که در جدول شماره ۲ دیده می‌شود گرچه حضور آلل G در بیماران بیشتر از افراد شاهد دیده شد (۰/۲۰ درصد در برابر ۱۶/۵ درصد) ولی این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p=0.42$).

ارزیابی ارتباط پلی‌مرفیسم IL-17F با پیشرفت سرطان معده

به منظور ارزیابی تأثیر آلل G7488G در پیشرفت سرطان معده و درجه بدخیمی آن، ارتباط مراحل تومور با حضور آلل G7488G (ژنوتیپ GG) یا فقدان این آلل (ژنوتیپ AA) بررسی شد. از آنجا که فراوانی آلل موتان G کم می‌باشد به جای بررسی تأثیر آلل G، مدل غالب این آلل یعنی ژنوتیپ‌های حاوی این آلل

بحث

اخیراً اثبات شده است که کاهش بیان IL-17 در تومور می‌تواند نشان دهنده پیش‌آگهی نامناسب سرطان معده باشد (Chen JG 2011). گرچه در مطالعات متعدد عملکرد IL-17A در بروز و پیشرفت تومورهای مختلف گزارش شده است و بر نقش پاتوژنیک آن در سرطان‌های دستگاه گوارش از جمله سرطان کولون تأکید گردیده ولی نقش IL-17F در تومورزایی به خوبی مشخص نشده است. به طوری که حتی برخی از مطالعات نقش حفاظتی برای IL-17F در سرطان کولون گزارش نموده‌اند که بر خلاف نقش IL-17A می‌باشد (Tong Z 2012). به همین خاطر این مطالعه انجام گردید تا مشخص شود آیا بروز تغییرات ژنی در IL-17F می‌تواند با استعداد ابتلا به سرطان معده در ارتباط باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ هموزیگوت GG در موقعیت ژن IL-17F به میزان ۳ درصد در افراد شاهد و ۴/۳ درصد بیماران مبتلا به سرطان معده شیوع داشته که عملاً اختلاف معنی‌داری را از نظر آماری به وجود نیاورد. این فراوانی با فراوانی گزارش شده در سفید پوستان اروپایی (۴/۵ درصد) بسیار نزدیک می‌باشد حال آن که فراوانی ژنوتیپ موتان G/G 7488 در جمعیت ژاپن بیشتر می‌باشد (Shibata T 2009). همچنین فراوانی آلل موتان G در افراد شاهد ۹/۱۵ درصد و در مبتلایان به سرطان معده ۱۲/۱ درصد به دست آمد که این اختلاف باز هم از نظر آماری معنی‌دار نبود. به عبارت دیگر ارتباط بین ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی‌مرفیسم و سرطان معده به دست نیامد. این یافته‌ها با نتایج مطالعه Shibata و همکاران در ژاپن همسو می‌باشند که نشان دادند فراوانی ژنوتیپ موتان GG در جمعیت موتان ۹/۱۵ درصد فراوانی ژنوتیپ موتان G در جمعیت موتان ۱۲/۱ درصد به دست آمد که این اختلاف باز هم از نظر آماری معنی‌دار نبود. به عبارت دیگر ارتباط بین ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی‌مرفیسم و سرطان معده و افراد غیر مبتلا ۴ درصد می‌باشد (Shibata T 2009). درحالی که ارتباط پلی‌مرفیسم 7488G از ژن IL-17F با بیماری کولیت اولسرو در جمعیت ژاپن (Arisawa T 2008) و با آرتربیت

روماتوئید در سفید پوستان اروپایی (Nordang GB 2009) گزارش شده است. از آن‌جا که نقش IL-17 و سلول‌های Th17 در بروز پاسخ‌های التهابی معده مرتبط با عفونت (Luzza F and 2000. H. pylori شده است (H. pylori به‌طوری که مقدار پروتئین IL-17 در مخاط معده بیماران مبتلا به H. pylori از افراد فاقد این باکتری بیشتر بوده و در نواحی زخم معده نیز غلظت IL-17 از نواحی سالم بیشتر می‌باشد (Mizuno T and 2005; Mizuno T and 2005)، بنابراین نقش به سزاگی در التهابات معده ناشی از وجود هلیکوباتر پیلوری و به دنبال آن بیماری‌های معده از جمله کارسینوم معده خواهد داشت. به همین دلیل تصور می‌شود که پلی‌مرفیسم عملکردی در ژن IL-17 استعداد ابتلا به سرطان معده را افزایش دهد. با توجه به یافته‌های این مطالعه که بیانگر عدم وجود ارتباط معنی‌دار بین بروز واریانت‌های ژنتیکی IL-17F در موقعیت A7488G و سرطان معده می‌باشد می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است سایر همولوگ‌ها سیتوکاینی IL-17A از جمله IL-17A در این میان نقش داشته باشند.

در خانواده IL-17 پنج سیتوکاین وجود دارد که بیشترین تشابه ساختاری بین IL-17A و IL-17F وجود دارد. این دو سیتوکاین عملکرد مشترکی در القای تولید کموکاین‌هایی دارند که نقش به سزاگی در فراخوان و فعال کردن نوتروفیل‌ها ایفا می‌کنند. مطالعاتی بسیار کمی وجود داند که به بررسی تأثیر پلی‌مرفیسم IL-17F در بروز اختلالاتی انسانی پرداخته‌اند. کاواگوچی نشان داد که بیان و یا عملکرد IL-17F در افراد حامل آلل موتان G 7488G ساپرس می‌شود (Kawaguchi M 2004). این محققین همچنین نشان داند که حضور واریانت موتان G A7488G که باعث جایگزینی آرزنین در موقعیت ۱۶۱ به جای هیستیدین می‌شود موجب جلوگیری از تأثیر IL-17F طبیعی در تحریک بیان سیتوکاین‌های التهابی نظیر IL-8 و IL-6 در مطالعات تجربی می‌گردد (Kawaguchi M 2006).

در مجموع عدم وجود ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مرفیسم IL-17F و سرطان معده بیان می‌نماید که آلل G نمی‌تواند به تنهایی به عنوان یک فاکتور خطر ژنتیکی در پیش‌گویی استعداد ابتلا به سرطان معده نقش داشته باشد. بنابراین با توجه به نقش ثابت شده IL-17 در روند کارسینوژن سرطان معده، بررسی ارتباط سایر مولکول‌های خانواده IL-17 می‌تواند در تعیین ژنوتیپ و هاپلوتیپ مستعد کننده مفید باشد تا بتواند در تشخیص سریع و غربالگری افراد مستعد به سرطان معده کمک کند.

سپاسگزاری

محققین لازم می‌دانند از زحمات و همکاری‌های پرسنل محترم بخش آندوسکوبی بیمارستان امام خمینی ساری و همین‌طور بخش انکولوژی بیمارستان امیرکلای بابل و پلی کلینیک طبی و همچنین کارشناسان مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران که امکان انجام این مطالعه را فراهم آورده‌اند تشکر نمایند.

براساس طبقه‌بندی Lauren سرطان معده به دو دسته تقسیم می‌گردد: نوع روده‌ای که ساختارهای غده‌ای شبیه غدد روده در معده ایجاد می‌شود و ارتباط تنگاتنگی با التهاب مزمن و به‌ویژه با گاستریت آتروفیک و به دنبال آن متاپلازی روده‌ای دارد و نوع منتشر که فاقد ساختار غده‌ای بوده و در مجاورت لبه‌های مخاط ملتهب معده پدید می‌آید. بنابراین التهاب شدید مخاط معده به همراه سایر ویژگی‌های میزبان می‌تواند مستقیماً باعث به راه انداختن و قایع موتابن گردد و شرایط را برای رخداد نوع منتشر نیز فراهم سازد. در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین حضور آلل موتان G از ژن IL-17F با ویژگی‌های بالینی سرطان معده از جمله اندازه تومور و متاستاز به مخاط معده و همچنین درجه تمایز تومور مشاهده نشد. این امر شاید به‌واسطه تأثیر ضد التهابی واریانت ژنی IL-17F-7488G باشد که باعث می‌شود پروتئین حاصل فاقد خواص پیش‌التهابی نظیر پروتئین طبیعی IL-17F باشد به‌طوری که گزارش شده است که این واریانت ژنی دارای اثرات مهار متاستاز و همچنین کاهش تحریک تولید متالوپروتئینازها می‌باشد (Kolls JK 2004).

References

1. Arisawa T, T. T., Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, (2008). "The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis." *J Clin Immunol* 28: 44-49.
2. Benchetrit F, C. A., Vives V, Warnier G, Gey A, Sautès-Fridman C, Fossiez F, Haicheur N, Fridman WH, Tartour E. (2002). "Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism.." *Blood* 99(6): 2114-2121.
3. Chabaud M, F. F., Taupin JL, Miossec, (1998). "Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines." *J Immunol* 161: 409-414.
4. Chen B, Z. Z., Hou J, Chen M, Gao X, Hu P, (2009). "Association of interleukin-17F 7488 single nucleotide polymorphism and inflammatory bowel disease in the Chinese population." *Scand J Gastroenterol* 44: 720-726.
5. Chen D, H. Q., Mao C, Jiao Z, Wang S, Yu L, Xu Y, Dai D, Yin L, Xu H, (2012). "Increased IL-17-producing CD4(+) T cells in patients with esophageal cancer." *Cell Immunol* 272(2): 166-174.

6. Chen JG, X. J., Liang XT, Pan K, et al. (2011). "Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients." *Int J Biol Sci* 7: 53- 60.
7. Espinoza JL, T. A., Nakata K, Onizuka M, Kawase T, Akiyama H, Miyamura K, Morishima Y, Fukuda T, Kodera Y, Nakao S; Japan Marrow Donor Program. (2011). "A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation." *PLoS One*. 6(10): e26229.
8. Horlock C, S. B., Dyson PJ, Morishita M, Coombes RC, Savage P, Stebbing J. (2009). "The effects of trastuzumab on the CD4+CD25+FoxP3+ and CD4+IL17A+ T-cell axis in patients with breast cancer." *Br J Cancer* 100(7): 1061-1067.
9. Jemal A, M. T., Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. (2005). "Cancer statistics, 2005." *CA Cancer J Clin* 55 (1): 10-30.
10. Kato T, F. H., Ogura T, Onishi Y, Irahara M, Yamano S, Kamada M, Aono T. (2001). "Expression of IL-17 mRNA in ovarian cancer." *Biochem Biophys Res Commun*. 282(3): 735-738.
11. Kawaguchi M, A. M., Oda N, Kokubu F, Huang SK, (2004). "IL-17 cytokine family." *J Allergy Clin Immunol* 114: 1265-1274.
12. Kawaguchi M, T. D., Hizawa N, (2006). "IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity." *J Allergy Clin Immunol* 117: 795-801.
13. Kolls JK, L. A. (2004). "Interleukin-17 family members and inflammation." *Immunity* 21: 467-476.
14. Lauren P (1965). "The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification." *Acta Pathol Microbiol Scand*. 64: 31-49.
15. Lichtenstein P, H. N., Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytte A, Hemminki K. (2000). "Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland." *N Engl J Med* 343(2): 78-85, PMID: 10891514.
16. Lanza F, P. T., Monteleone G, et al, and 2000. (2000). "Up-regulation of IL-17 is associated with bioactive IL-8 expression in Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa." *J Immunol* 165: 5332-5337.
17. Mizuno T, A. T., Nobata K, et al, and 2005;11: (2005). "Interleukin-17 levels in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa and pathologic sequelae of colonization." *World J Gastroenterol* 11: 6305-6311
18. Nordang GB, V. M., Hollis-Moffatt JE, Merriman TR, Forre OT, Helgetveit K, et al (2009). "Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand." *Rheumatol Oxf* 48: 397-370.
19. Nordang GB, V. M., Hollis-Moffatt JE, Merriman TR, Førre ØT, Helgetveit K, Kvien TK, Lie BA. (2009). "Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand." *Rheumatology (Oxford)* 48(4): 367-370.
20. Prinz C, S. M., Rad R, Becker I, Keiditsch E, Wagenpfeil S, Classen M, Rösch T, Schepp W, Gerhard M. (2001). "Key importance of

- the Helicobacter pylori adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation." *Cancer Res* 61(5): 1903-1909, PMID: 11280745.
21. Shibata T, T. T., Hirata I, Arisawa T. (2009). "Genetic polymorphism of interleukin-17A and -17F genes in gastric carcinogenesis." *Hum Immunol.* 70 (7): 547-551.
22. Steiner GE, N. M., Paikl D, Stix U, et al. (2003). "Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate" *Prostate* 56: 171-182.
23. Suerbaum S, M. P. (2002). "Helicobacter pylori infection." *N Engl J Med* 347: 1175-1186.
24. Tahara T, S. T., Nakamura M, Yamashita H, Yoshioka D, Okubo M, Yonemura J, Maeda Y, Maruyama N, Kamano T, Kamiya Y, Fujita H, Nakagawa Y, Nagasaka M, Iwata M, Hirata I, Arisawa T. (2009). "Effect of polymorphisms of IL-17A, -17F and MIF genes on CpG island hyper-methylation (CIHM) in the human gastric mucosa." *Int J Mol Med.* 24(4): 563-569.
25. Tahara T, S. T., Nakamura M, Yamashita H, Yoshioka D, Okubo M, Yonemura J, Maeda Y, Maruyama N, Kamano T, Kamiya Y,
- Fujita H, Nakagawa Y, Nagasaka M, Iwata M, Hirata I, Arisawa T. (2010). "Association between IL-17A, -17F and MIF polymorphisms predispose to CpG island hyper-methylation in gastric cancer." *Int J Mol Med.* 25(3): 471-477.
26. Tong Z, Y. X., Yan H, Liu W, Niu X, Shi Y, Fang W, Xiong B, Wan Y, Dong C. (2012). "A protective role by interleukin-17F in colon tumorigenesis." *PLoS One.* 7(4): e34959.
27. Wang L, Y. T., Zhang W, Pardoll DM, Yu H, (2010). "IL-17 enhances tumor development in carcinogen-induced skin cancer." *Cancer Res* 70: 10112-10120.
28. Weaver CT, H. R., Mangan PR, Harrington LE, (2007). "IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages." *Annu Rev Immunol* 25: 821-852.
29. Ye ZJ, Z. Q., Gu YY, Qin SM, Ma WL, Xin JB, Tao XN, Shi HZ, (2010). "Generation and differentiation of IL-17-producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion." *J Immunol* 185(10): 6348-6354.
30. Zhang B, R. G., Wei H, Zhang M, Bi J, et al, (2008). "The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer." *Biochem Biophys Res Commun.* 374: 533-537.