

ภาคผนวก

1. คณะผู้ดำเนินการวิจัย

- 1.1) หัวหน้าโครงการ รศ. ดร. ชาญวิทย์ ลีลาญวัฒน์ (Chanvit Leelayuwat)
 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
 โทรศัพท์/โทรสาร 043-202089
 E-mail address chanvit@kku.ac.th
- 1.2) ผู้ร่วมโครงการ รศ. ดร. สหพัฒน์ บรรีศรีวัรกิจ (Sahapat Barusruj)
 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
 โทรศัพท์/โทรสาร 043-202089
 E-mail address sahapat@kku.ac.th
- 1.3) ผู้ร่วมโครงการ อ. วัชนันท์ วงศ์เสนา (Watchanan Wongsena)
 คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
 โทรศัพท์ 055-261000 9 ต่อ 6233, 6235
 โทรสาร 055-261935
 E-mail address watchananw@yahoo.com
- 1.4) ผู้ร่วมโครงการ ผศ. นพ. อนุชา พัวไพโรจน์ (Anucha Paupairoj)
 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
 โทรศัพท์ 043-348388
 โทรสาร 043-202024
- 1.5) ผู้ร่วมโครงการ รศ. ดร. พัชรี เจียรนัยกูร (Patcharee Jearanaikoon)
 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
 โทรศัพท์/โทรสาร 043-202088
 E-mail address patjea@kku.ac.th

- 1.6) ผู้ร่วมโครงการ ผศ. พญ. พิศมัย ยืนยาว (Pissamai Yuenyao)
ภาควิชาสูติรีเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
โทรศัพท์/โทรสาร 043-348395
E-mail address pissamai@kku.ac.th
- 1.7) ผู้ร่วมโครงการ รศ. อรุณรัฐ ร่มพฤกษ์ (Arunrat Romphruk)
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
โทรศัพท์/โทรสาร 043-202089
E-mail address arunrant@kku.ac.th
- 1.8) ผู้ร่วมโครงการ นายไชยเชษฐ นานอก
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
โทรศัพท์/โทรสาร
E-mail address

2. ขั้นตอนวิธีการย้อม MICA โดยวิธี Immunohistochemistry (IHC)

Tissue section was performed using the EnVision+ system (DAKO, Carpinteria, CA)

2.1 Tissue sections (4 μ m-thick) were deparaffinized in xylene 3 chamber, 5 min each (30 min in first chamber) and rehydrated by passage through decreasing concentrations of ethanol (2 chambers with xylene for 30 min, 2 chambers with absolute ethanol, 2 chambers with 95% ethanol, respectively, 2 min for each chamber). Then place slides in water for 2 min.

2.2 Antigens were retrieved by steaming in citrate buffer (pH 6.0) 20 min and cooled down at room temperature 20 min. Then place slides in wash buffer for 2 min.

2.3 Endogenous peroxidase activity was blocked by a 30 minute incubation at room temperature with 3% H₂O₂. Slides were washed 2 times with wash buffer in 2 chamber, 5 min each.

2.4 Tissue sections were then sequent incubated for 30 minutes with protein block serum free buffer (DAKO).

2.5 After remove blocking buffer by flip off, primary antibody was added and incubated overnight at room temperature.

2.6 After twice washing in PBST 2 chamber, 5 min each, tissue sections were incubated for 30 minutes at room temperature with the mouse EnVision+ reagent.

2.7 After twice washing in PBST 2 chamber, 5 min each, peroxidase activity was detected by incubating tissue sections with liquid 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate-chromogen system (DAKO) for 5 minutes at room temperature.

2.8 After washing under running water for 5 min, tissue sections were counterstained with Hematoxylin (ACTA) for 10 dips (10 sec).

2.9 After excess wash with tap water for 5 min, slide were dehydrated in 2 chambers of 95% ethanol for 2 min each, 2 chambers of absolute ethanol for 2 min each and 2 chambers of xylene for 2 min each. Then slides were mounted with permount.

ต้นฉบับ

ที่ได้รับการยอมรับจากวารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์

การย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสำหรับตรวจการแสดงออกของมิกเอในเซลล์มะเร็งปากมดลูก
สหพัฒน์ บัรศวีร์รักษ์^{1,2*}, วัชพันธ์ วงศ์เสนา³, ชาญวิทย์ ลีลาวัฒน์^{1,2}, อนุชา พัวไพโรจน์⁴,
พัชรี เจียรนัยกุล^{1,2}, พิศมัย ยืนยาว⁵, อรุณรัฐ ร่มพฤกษ์^{1,2}, ไชยเชษฐ นานอก⁶
¹คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ
ทางการแพทย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ³คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, ⁴ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะ
แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ⁵ภาควิชาสูติศาสตร์และสูติเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ⁶
นักศึกษาหลักสูตรปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

มิกเอหรือเพอร์บี11.1 (MICA/PERB11.1) เป็นโมเลกุลเอ็นเคจีทูติไลแกนบนผิวเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกับ MHC Class I ทำหน้าที่ในการกระตุ้น NK cells, $\gamma\delta$ T cells, activated $\alpha\beta$ T cells และ macrophages ผ่านตัวรับ NKG2D MICA มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์มะเร็งที่มีต้นกำเนิดมาจาก epithelium วัตถุประสงค์การศึกษานี้ เพื่อพัฒนาการตรวจหาการแสดงออกของมิกเอ บนเนื้อเยื่อปากมดลูกที่แช่ในฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินโดยวิธีย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วย mouse monoclonal anti-MICA 3 ชนิด ได้แก่ WW6B7, WW9B8 และ WJ1 โดยทดลองใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูกจากกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก 10 ราย และกลุ่มที่ไม่เป็นมะเร็งปากมดลูก 5 ราย ผลการศึกษาพบว่า anti-MICA ทั้ง 3 ชนิด (WW6B7, WW9B8, WJ1) ความเข้มข้น 6, 25, 9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สามารถย้อมติดมิกเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูก บนเนื้อเยื่อที่แช่ในฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินได้ชัดเจน การศึกษาครั้งนี้สามารถพัฒนาการตรวจหาการแสดงออกของมิกเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยวิธีย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วย anti-MICA ทั้ง 3 ชนิดเพื่อเพิ่มความไวการตรวจให้ครอบคลุมมิกเออัลลีลมากขึ้น สามารถนำไปใช้ศึกษาความสัมพันธ์ต่อการแสดงออกของมิกเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูก เพื่อการพยากรณ์ความรุนแรง หรือการตอบสนองการรักษา หรือการกลับเป็นซ้ำต่อไป

คำรหัส: มิกเอ, เอ็นเคจีทูติ, มะเร็งปากมดลูก, อิมมูโนฮิสโตเคมี

* ติดต่อได้ที่ สหพัฒน์ บัรศวีร์รักษ์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002
โทร/ โทรสาร 043 202089 e-mail : sahapat@kku.ac.th, dr_sahapat@yahoo.com

Immunohistochemical staining for MICA expression in cervical cancer cells

Sahapat Barusrux^{1,2†}, Wachanan Wongsena³, Chanvit Leelayuwat^{1,2}, Anucha Paupairoj⁴,
Patcharee Jearanaikoon^{1,2}, Pissamai Yuenyao⁵, Arunrat Romphruk^{1,2}, Chaiyachet Nanok⁶

¹Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, ²The Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Khon Kaen University, ³Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, ⁴Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, ⁵Department of Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

Abstract

MICA/PERB11.1 is a NKG2D ligand, a member of a highly divergent MHC class I-related gene family, which is expressed as a transmembrane protein. It is recognized by NKG2D, an activating receptor on NK cells, $\gamma\delta$ T cells, activated $\alpha\beta$ T cells and macrophages. Expression of MICA is up-regulated in many tumor cell lines and primary tumors of epithelial origin. We aimed to set up the method for detection of MICA expression on cervical cancer cells in formalin fixed paraffin embedded tissues by immunohistochemistry (IHC) technique. Cervical tissue sections from 10 cases of cervical cancer and 5 cases of non cervical cancer(myoma) were stained by three of mouse monoclonal anti- MICA antibodies (WW6B7, WW9B8 and WJ1). The results showed that MICA in all 10 cases of cervical cancer tissue sections were clearly demonstrated by all three anti-MICA antibodies. The optimal concentrations of antibodies were 6 $\mu\text{g/ml}$ (WW6B7), 25 $\mu\text{g/ml}$ (WW9B8) and 9 $\mu\text{g/ml}$ (WJ1). In conclusion, we have successfully set up a MICA expression assay in cervical cancer by immunohistochemistry (IHC) technique with 3 anti-MICA to cover diverse MICA alleles. The method is useful for the study of correlation of MICA expression in cervical cancer, and also possible to use as the prognostic marker for disease severity, therapeutic response or relapsing cases.

Key words: MICA, NKG2D, Cervical cancer, immunohistochemistry

[†] To whom correspondence should be addresses. Sahapat Barusrux, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. Tel/ Fax 0 4320 2089 e-mail : sahapat@kku.ac.th, dr_sahapat@yahoo.com

บทนำ

มะเร็งปากมดลูกพบได้บ่อยในหญิงทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย¹ แม้ว่าการติดเชื้อ human papillomas virus (HPV) ทั่วยุ 16 และ 18 เป็นสาเหตุหลักของการเกิดภาวะ cervical neoplasia และมีการพบจีโนมของ HPV รวมทั้ง viral protein (HPV 16, E6 และ E7) ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกส่วนใหญ่² แต่ผู้ติดเชื้อเพียงบางส่วนที่มีการดำเนินของโรคนกลายเป็นมะเร็งปากมดลูก ดังนั้นการติดเชื้อ HPV จึงไม่น่าเป็นปัจจัยหลักเพียงอย่างเดียวที่ก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูก ประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อน่าจะสำคัญในการกำจัดเซลล์มะเร็ง จากการร่วมกันของเซลล์ 2 ชนิด คือ CD8+ T cell (Cytotoxic T cell; CTL) และ natural killer cell (NK cell) กลไกรับรู้และทำลายเซลล์มะเร็ง (immune surveillance) เกิดได้ 2 แบบคือ 1) แบบอาศัย T-cell receptor (TCR) ซึ่งจำเพาะต่อ peptide แอนติเจนที่แปลกลปอม หรือ ที่จำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง จับกับโมเลกุลของ MHC class I ดังนั้นเมื่อ T cells พบว่าเซลล์ดังกล่าวมีความผิดปกติก็จะทำลาย ทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถเจริญเติบโตแพร่กระจายต่อไป บทบาทการทำลายของเซลล์มะเร็งดังกล่าวยังขึ้นกับ การทำงานของ NK cells³ เซลล์มะเร็งหลายชนิดจะหลีกเลี่ยงการทำลายของ T cells โดยการลดการแสดงออกของ HLA Class I⁴⁻⁵ ทำให้ T cells ไม่สามารถทำลายได้ และ 2) แบบอาศัย NKG2D receptor จับกับ NKG2D ligands ที่แสดงบนผิวเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้ NKG2D receptor มีความหลากหลาย (polymorphic)³ เชื่อว่าความหลากหลายของ receptors และ ligands น่าจะมีผลในการทำงานของ NK cells และชักนำให้เกิด NKG2D signal ซึ่งเป็น direct immune activation นอกจากนี้ NKG2D ligand ยังมีส่วนเกี่ยวข้องในการกระตุ้นแบบ adaptive ซึ่งกลไกในการกระตุ้นยังไม่ทราบแน่ชัด⁶⁻⁸ NKG2D receptor พบได้บนผิว NK cell⁹ CD8+ T cell และ $\gamma\delta$ T cell¹⁰ โดยมีโปรตีนเชื่อม (adaptor protein) DAP10 ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณกระตุ้นเป็น co-stimulatory signal ใน CTL¹¹⁻¹⁴ ส่วน DAP12 พบเฉพาะใน NK cell จึงเป็นการกระตุ้น NK cell อย่างอิสระ (direct activation)^{6,13,15} และสามารถกระตุ้นเมื่อมีสัญญาณมากพอชนะ (override) กลไกยับยั้งผ่านทาง MHC class I^{8,10,16-18} NK receptors แบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ 1) inhibitory receptors จับกับ HLA Class I ทำหน้าที่ในการตรวจสอบหาสิ่งแปลกปลอม และทำลายเซลล์ที่ขาด แอนติเจนพวกเดียวกัน (self antigens)¹⁹ และ 2) activating receptors ได้แก่ NKG2D ถูกกระตุ้นด้วยการจับกับ NKG2D ligands ใน CTL และ NK cell อาศัย DAP10 เพื่อส่งสัญญาณในลักษณะ co-stimulation ผ่านทาง Src-PTK แต่ใน NK cell ซึ่งมี DAP12 จะสามารถเกิด NKG2D signal อิสระโดยตรงผ่านทาง Syk-PTK¹³ มีผลให้เกิด activated effector cell^{7,20,21} ชักนำ effector cell ให้ทำลายเซลล์เป้าหมาย^{13,14,18,22-24} NKG2D ligands ของคนเป็น MHC Class I – like

molecules แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) MIC /PERB11^{25,26} ได้แก่ MICA (PERB 11.1) และ MICB (PERB 11.2) มีโครงสร้าง 3 โดเมน คล้ายกับ MHC class I จะพบที่ผิวของเซลล์บุ (epithelial) ในบางบริเวณเช่น gastrointestinal epithelium²⁷ เซลล์มะเร็งหลายชนิดที่มีต้นกำเนิดมาจาก epithelial cells จะมีการแสดงออกของ PERB11.1 หรือ MICA เพิ่มขึ้น²⁸ 2) UL16 binding protein (ULBP1,2,3,4) หรือ RAET1(Retinoic acid inducible early transcript 1) พบบนเซลล์ปกติหลายชนิด รวมทั้งเซลล์มะเร็ง^{16,29} การแสดงออกของ NKG2D ligands จะเพิ่มมากขึ้น ในภาวะที่เซลล์เกิดความเครียด (stress-inducible expression)²⁷ เซลล์มะเร็งหลายชนิด²⁸ รวมทั้งในภาวะที่เซลล์มีการติดเชื้อเช่น CMV⁶, *M. tuberculosis*³⁰, *E. coli*³¹ การทำงานของ NK cells ขึ้นกับความสมดุลระหว่างสัญญาณยับยั้ง และสัญญาณกระตุ้นการทำลายที่เกิดจากการจับกันระหว่าง activating receptor เช่น NKG2D receptor และ inhibitory receptors เช่น Killer immunoglobulin like receptor(KIR) กับ MHC Class I หรือ/และ NKG2D ligands ในสภาวะปกติ NK cells จะไม่ทำลายเซลล์ของตัวเอง เนื่องจากจะถูกยับยั้งโดย MHC Class I เมื่อเซลล์ผิดปกติก็จะลดการแสดงออกของ MHC Class I และมีโมเลกุลมิกเอเพิ่มมากขึ้น ทำให้ NK cells รับรู้ว่าคุณเซลล์มีความผิดปกติและเข้าทำลายได้ดียิ่งขึ้น^{6,32} ในทางกลับกันเชื่อว่าเซลล์มะเร็งอาจมีกลไกที่หลบหลีกการทำลายของ NK cells ด้วยการลดการแสดงออกของ MHC class I ทำให้ปริมาณของ tumor rejection antigen ที่แสดงบนผิวเซลล์น้อยลง จนกระทั่ง TCR ของ CTL ตรวจไม่พบ หรือเซลล์มะเร็งลดการแสดงออกของมิกเอน้อยลงจนไม่สามารถส่งสัญญาณกระตุ้นได้เพียงพอให้เกิดการฆ่าเซลล์ ทำให้เสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งได้ง่ายขึ้น หรือมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค ผู้ศึกษาเชื่อว่าการตรวจติดตามการแสดงออกของมิกเอในเซลล์มะเร็ง น่าจะมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเซลล์มะเร็งปากมดลูกต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัย NKG2D receptor น่าจะเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ในการพยากรณ์ความรุนแรง หรือการตอบสนองการรักษา หรือการกลับเป็นซ้ำ แต่ปัจจุบันการตรวจการแสดงผลของมิกเอในเซลล์มะเร็งปากมดลูกยังไม่มีผู้รายงาน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจการแสดงผลของมิกเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกบนเนื้อเยื่อที่แช่ในฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน เพื่อใช้สำหรับศึกษาการแสดงผลของมิกเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่างศึกษาและตัวอย่างตรวจ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งภายใต้ชุดโครงการวิทยามะเร็งและภูมิคุ้มกันระดับโมเลกุลในโรคมะเร็งปากมดลูกผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หมายเลข HE480227 กลุ่มตัวอย่างศึกษาในโครงการได้จาก ผู้เข้ารับการรักษาโดยสูตินรีแพทย์ที่ คลินิกสูตินรีเวช โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เซ็นชื่อให้ความยินยอมเข้าร่วมโครงการ และผ่านการวินิจฉัย ยืนยันจากพยาธิแพทย์ ตามระบบ FIGO staging system³³ จำนวน 15 รายประกอบด้วย กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก 10 ราย และกลุ่มที่ไม่เป็นมะเร็งปากมดลูก (myoma) ที่มีผล ThinPrep[®] ให้ผลลบ 5 ราย โดยสูตินรีแพทย์จะทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูก ตั้งแต่ครั้งแรกที่มาตรวจรักษา

mouse monoclonal Anti-MICA

WW6B7, WW9B8 และ WJ1 เป็น Mouse monoclonal anti-MICA (Wongsena, et al. submitted) ผลิตขึ้นจากความร่วมมือกับ Dr. Soldano Ferrone, สถาบัน Roswell Park Cancer Institute, ประเทศสหรัฐอเมริกา การศึกษาครั้งนี้เริ่มต้นโดยใช้ anti-MICA (WW6B7) เจือจางด้วย PBS ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับปรับขั้นตอนการย้อมตัวอย่างชิ้นเนื้อตับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งใช้เป็นชิ้นเนื้อควบคุม จากนั้นใช้ anti-MICA (WW9B8) เจือจางด้วย PBS ความเข้มข้น 10.0, 20.0, 22.0, 25.0, 30.0 $\mu\text{g/ml}$ และใช้ anti-MICA (WJ1) ด้วยความเข้มข้น 5.0, 7.0, 9.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

การหาสถานะการย้อมมิเคอที่เหมาะสมโดยวิธีภูมิโนฮิสโตเคมี

นำสไลด์ชิ้นเนื้อตับซึ่งใช้เป็นชิ้นเนื้อควบคุมจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีหนา 4 μm ผ่านขั้นตอน deparaffinized โดยอุ่นสไลด์ชิ้นเนื้อที่อุณหภูมิ 60° ซ นาน 15 นาที และนำไปแช่ในอ่าง xylene 3 อ่าง โดยแช่ในอ่างแรกนาน 30 นาที และ อ่างที่เหลืออ่างละ 5 นาที จากนั้นขั้นตอน rehydrated โดย แช่ในอ่าง 100% เอทานอล 2 อ่าง และ 95% เอทานอล 2 อ่าง อ่างละ 2 นาที ตามลำดับ แล้วแช่ในน้ำกลั่น 2 นาที นำสไลด์ไป retrieve antigen โดยต้มใน citrate buffer (pH 6.0) นาน 20 นาที วางสไลด์ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที จากนั้นนำไปจุ่มในบัฟเฟอร์ 2 นาที ทำการยับยั้ง endogenous peroxidase activity ด้วยการแช่ใน 3 % H_2O_2 นาน 30 นาที และแช่ในบัฟเฟอร์ 2 อ่าง อ่างละ 5 นาที และ หยด protein block serum free buffer (DAKO) นาน 30 นาที เททิ้งเมื่อครบเวลา และเติม anti-MICA (WW6B7) ให้ท่วมและวางไว้ที่อุณหภูมิห้องในอ่างความชื้น 1 คืน จากนั้นแช่ในบัฟเฟอร์ 2 อ่าง อ่างละ 5 นาที และ

หยด mouse EnVision+ reagent (DAKO, Carpinteria, CA) ให้ท่วม และวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในอ่างความชื้น 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่ ในบัฟเฟอร์ 2 อ่าง อ่างละ 5 นาที จากนั้นหยด DAB (diaminobenzidine) ให้ท่วม และวางในอ่างความชื้น ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ล้างโดยผ่าน น้ำประปา 5 นาที ย้อมทับด้วย hematoxylin (ACTA) โดยการจุ่ม 10 ครั้ง นาน 10 วินาที ล้างโดย ผ่านน้ำประปา 5 นาที จากนั้น dehydrated โดยแช่ในอ่าง 95% เอทานอล 2 อ่าง, 100% เอทานอล 2 อ่าง xylene 2 อ่าง อ่างละ 2 นาที และปิดทับด้วย permount ตามลำดับ เมื่อทราบความเข้มข้น anti-MICA (WW6B7) สำหรับใช้ย้อมชิ้นเนื้อควบคุมในเบื้องต้นแล้ว แต่ผลการย้อมมิกเอได้ผลยังไม่ ชัดเจน และมี nonspecific background จึงได้ปรับขั้นตอนการย้อม โดยแช่ใน xylene นานขึ้น 30 นาที แทนการการอุ่นสไลด์ชิ้นเนื้อที่ 60° ซ ก่อนการ deparaffin และใช้น้ำยา protein block serum free buffer แทน 3 % fetal bovine serum สำหรับขั้นตอนการ block nonspecific binding เพื่อให้ ได้ผลการย้อมชัดเจน

การย้อมมิกเอโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูก

ทดลองย้อมมิกเอในชิ้นเนื้อปากมดลูกจากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก(cervical cancer) เทียบ กับกลุ่มที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปากมดลูก (myoma) โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วย anti-MICA (WW6B7, WW9B8 , WJ1) ที่ความเข้มข้นเหมาะสม

การอ่านผลและรายงานผลการย้อมมิกเอโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในชิ้นเนื้อ

วิธีรายงานผลคัดแปลงจากที่เคยมีผู้รายงานผลการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี^{34,35} แต่ละสไลด์ จะประเมินในภาพรวมโดยอ่านผลอย่างน้อย 5 บริเวณทั่วทั้งสไลด์ รายงานผลเป็นค่าคะแนน เป็นเชิงปริมาณ (A) และเชิงคุณภาพ (B) รายงานผลโดยคูณค่าคะแนนเป็นค่าคะแนนสุดท้าย (final score; A*B)

A) ผลเชิงปริมาณพิจารณาจากจำนวนเซลล์ที่ย้อมติด (immunoreactive cell number) แบ่งเป็นเป็น 4 ระดับ โดยให้ค่าคะแนนดังนี้ 0 คะแนน (<10% stained cell) แสดงถึง เซลล์ย้อมติดน้อยกว่าร้อยละ 10 %, 1 คะแนน(10-40% stained cell)แสดงถึงเซลล์ย้อมติดร้อยละ 10-40 %, 2 คะแนน(40-60% stained cell)แสดงถึงเซลล์ย้อมติดร้อยละ 40-60 %, 3 คะแนน(>60% stained cell)แสดงถึงเซลล์ย้อมติดมากกว่าร้อยละ 60 %

B) ผลเชิงคุณภาพ: พิจารณาจากความเข้มการย้อมติด (immunoreactive intensity) แบ่งเป็นเป็น 4 ระดับ โดยให้ค่าคะแนนดังนี้ 0 คะแนน(no staining)แสดงถึงเซลล์ย้อมไม่ติด, 1 คะแนน(weak staining)แสดงถึงเซลล์มีความเข้มการย้อมติดน้อย, 2 คะแนน(moderate staining)

แสดงถึงเซลล์มีความเข้มการย้อมติดปานกลาง, 3 คะแนน(intense staining)แสดงถึงเซลล์มีความเข้มการย้อมติดเข้มชัดเจน

ผลการศึกษา

ผลการหาภาวะการย้อมมิคเอที่เหมาะสมโดยวิธีภูมิโนฮิสโตเคมี

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย้อมมิคเอในชิ้นเนื้อตับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งใช้เป็นชิ้นเนื้อควบคุม ด้วย mouse monoclonal Anti-MICA (WW6B7, WW9B8, WJ1) พบว่า WW6B7 ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{g/ml}$ ได้ผลย้อมติดจางๆ(w+) (ตาราง 1-I) เมื่อเพิ่มความเข้มข้น Anti-MICA (WW6B7) เป็น 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g/ml}$, anti-MICA (WW9B8) 10.0, 20.0, 30.0 $\mu\text{g/ml}$ และ anti-MICA (WJ1) 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ พบว่าความเข้มข้น Anti-MICA (WW6B7) 2.0, 3.0 $\mu\text{g/ml}$, anti-MICA (WW9B8) 10.0, 20.0 $\mu\text{g/ml}$ และ anti-MICA (WJ1) 5.0 $\mu\text{g/ml}$ ได้ผลย้อมติดจางๆไม่ชัดเจน(w+) (ตาราง 1-II) แต่ความเข้มข้น Anti-MICA (WW6B7) 4.0, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g/ml}$, anti-MICA (WW9B8) 30.0 $\mu\text{g/ml}$ และ anti-MICA (WJ1) 10.0, 20.0 $\mu\text{g/ml}$ ได้ผลย้อมติดไม่ชัด โดยมีลักษณะการติดแบบไม่จำเพาะร่วม(?/bg) (ตาราง 1-II) แสดงว่าความเข้มข้น Anti-MICA (WW6B7, WW9B8, WJ1) ที่เหมาะสมน่าจะอยู่ในช่วงมากกว่า 4.0, 20.0, 5.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ แต่ขั้นตอนการย้อมยังไม่เหมาะสม เมื่อปรับขั้นตอนการย้อมโดยแช่ใน xylene นานขึ้น 30 นาที แทนการอุ่นสไลด์ชิ้นเนื้อที่ 60° ซ ก่อนการ deparaffin และใช้น้ำยา protein block serum free buffer (DAKO) แทน 3 % fetal bovine serum ในขั้นตอนการ block nonspecific binding เมื่อทำการย้อมใหม่โดยใช้ Anti-MICA (WW6B7) ความเข้มข้น 4.0, 6.0, 8.0 $\mu\text{g/ml}$, anti-MICA (WW9B8) 22.0, 25.0 $\mu\text{g/ml}$ และ anti-MICA (WJ1) 7.0, 9.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ(ตาราง 1-III) พบว่า Anti-MICA (WW6B7, WW9B8, WJ1) ความเข้มข้น 6.0, 25.0, 9.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับได้ผลย้อมติดชัดเจน(3+)โดยไม่มี nonspecific background แต่ Anti-MICA (WW6B7, WW9B8, WJ1) ความเข้มข้น 4.0, 22.0, 7.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับได้ผลย้อมติดจางๆ(w+) เมื่อย้อมซ้ำโดยใช้ Anti-MICA (WW6B7, WW9B8, WJ1) ความเข้มข้น 6.0, 25.0, 9.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ พบว่าได้ผลย้อมติดชัดเจน(3+)โดยไม่มี nonspecific background (ตาราง 1-IV) ผลย้อมมิคเอในชิ้นเนื้อตับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งใช้เป็นชิ้นเนื้อควบคุม ด้วย anti-MICA(WW6B7) ความเข้มข้น 6.0 $\mu\text{g/ml}$ จะมีรูปแบบการติดสีกระจายตัวสม่ำเสมอทั่วทั้งไซโตพลาสซึม (cytoplasmic staining pattern) ดังแสดงในรูป 1

ผลย้อมมิกเอโดยวิธีimmunohistochemistryในชิ้นเนื้อปากมดลูก

ผลย้อมมิกเอในชิ้นเนื้อปากมดลูกจากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก(cervical cancer) 10 รายและกลุ่มที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปากมดลูก (myoma) 5 ราย โดยวิธีimmunohistochemistryด้วย WW6B7 ความเข้มข้น 6.0 $\mu\text{g/ml}$, WW9B8 ความเข้มข้น 25.00 $\mu\text{g/ml}$ และ WJ1 ความเข้มข้น 9.0 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าแอนติบอดี ทั้ง 3 ชนิดสามารถย้อมติดได้ผลสอดคล้องกันทั้ง 9 ราย แตกต่างเพียง 1 ราย (CACX8270) ที่ WW9B8 สามารถย้อมติดชัดเจน (final score=9) และ WJ1 ย้อมติดได้อ่อนๆ (final score = 2) แต่ย้อมไม่ติดด้วย WW6B7 (final score=0) ดังแสดงในตาราง 2 โดยลักษณะการย้อมติคมิกเอของเซลล์มะเร็งจะมีรูปแบบการติดสีกระจายตัวสม่ำเสมอทั่วทั้งไซโตพลาสซึม (cytoplasmic staining pattern) ดังแสดงในรูป 1 ผลย้อมมิกเอในชิ้นเนื้อปากมดลูกจากชิ้นเนื้อปากมดลูกของกลุ่มที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปากมดลูก (myoma) พบว่าตัวอย่างทั้ง 5 ราย ย้อมไม่ติด(final score = 0) ด้วยแอนติบอดีทั้ง 3 ตัว ดังแสดงในตาราง 2

Table 1 Optimization of MICA staining by immunohistochemistry technique with mouse monoclonal anti- MICA (WW6B7, WW9B8 and WJ1)

Mouse monoclonal anti-MICA ($\mu\text{g/ml}$)	Staining result			
	1-I	1-II	1-III	1-IV
WW6B7				
0.5	w+	/	/	/
1.0	w+	/	/	/
2.0	w+	w+	/	/
3.0	/	w+	/	/
4.0	/	?/bg	w+	/
5.0	/	?/bg	/	/
6.0	/	/	3+	3+
8.0	/	/	3+	/
10.0	/	?/bg	/	/
20.0	/	?/bg	/	/
WW9B8				
10.0	/	w+	/	/
20.0	/	w+	/	/
22.0	/	/	w+	/
25.0	/	/	3+	3+
30.0	/	?/bg	/	/
WJ1				
5.0	/	w+	/	/
7.0	/	/	W+	/
9.0	/	/	3+	3+
10.0	/	?/bg	/	/
20.0	/	?/bg	/	/

w+ = weak, ? = not clear, bg = high background, 3+ = well and clear, / = not done

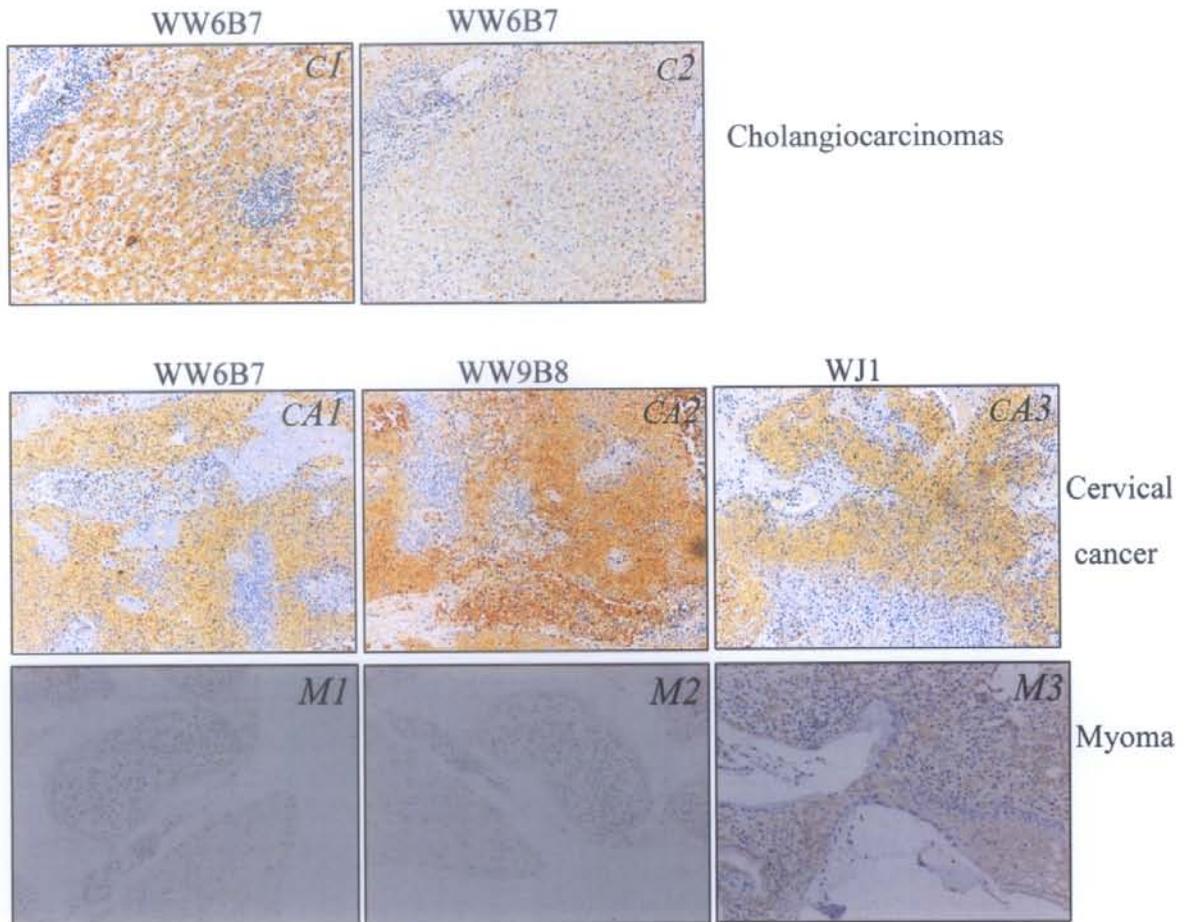


Figure 1 Immunohistochemical staining for MICA with 6.0 $\mu\text{g/ml}$ of mouse monoclonal anti-MICA(WW6B7) in cholangiocarcinomas(CCA) liver tissue sections (C1, C2). Positive MICA staining was a cytoplasmic staining pattern. The results of staining score (immunoreactive cell number/ intensity) were; 3/3 for C1 and 3/1 for C2 tissue sections. The final scores of C1 and C2 were 9 and 3 respectively. Three mouse monoclonal anti-MICA(WW6B7, WW9B8 and WJ1) were used to stained cervical tissue sections from 3 cervical cancer cases (CA1,CA2,CA3) and 3 myoma cases (M1,M2,M3) The staining scores (immunoreactive cell number/ intensity) with 6.0 $\mu\text{g/ml}$ of WW6B7 were 3/2 for CA1, 0/0 for M1 and with 25.0 $\mu\text{g/ml}$ of WW9B8 were 3/3 for CA2, 0/0 for M2 and with 9.0 $\mu\text{g/ml}$ of WJ1 were 3/2 for CA3, 0/0 for M3 respectively. The final scores of CA1, CA2, CA3 were 6,9,6 respectively and 0 in all sections from the myoma cases (M1,M2,M3) (immunoreactive cell number score; 0 <10%, 1=10-40%, 2=40-60%, 3>60%, immunoreactive intensity score; 0=no staining, 1=weak staining, 2=moderate staining, 3=intense staining)

Table 2 The PERB11.1/ MICA immunohistochemistry results of cervical tissue sections using mouse monoclonal anti- PERB11.1/ MICA (WW6B7, WW9B8 and WJ1) in 10 cases of cervical cancer and 5 cases of non cervical cancer.

Cervical tissue sections code	WW6B7			WW9B8			WJ1		
	staining score		Final Score	staining score		Final Score	staining score		Final Score
	A	B	(A*B)	A	B	(A*B)	A	B	(A*B)
CACX 8653	3	2	6	3	2	6	3	1	3
CACX 9484	3	2	6	3	2	6	3	3	9
CACX 9713	3	1	3	3	2	6	3	1	3
CACX 916	3	3	9	3	2	6	3	1	3
CACX 2410	3	3	9	3	3	9	3	3	9
CACX 8894	3	2	6	3	1	3	3	2	6
CACX 1261	3	1	3	3	1	3	3	2	6
CACX 261	3	1	3	3	1	3	3	2	6
CACX 228	2	2	4	3	1	3	3	1	3
CACX 8270	0	0	0	3	3	9	2	1	2
My 1616	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My 1410	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My 1244	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My 1245	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My 278	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CACX= cervical cancer, My= myoma, A= immunoreactive cell number score; 0 <10%, 1=10-40%, 2=40-60%, 3>60%, B= immunoreactive intensity score; 0=no staining, 1=weak staining, 2=moderate staining, 3=intense staining

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้สามารถพัฒนาวิธีตรวจหาการแสดงออกมิกเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกบนเนื้อเยื่อที่คงเก็บในฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน ได้โดยวิธีย้อมอิมโมโนฮิสโตเคมี โดยใช้ mouse monoclonal anti-MICA 3 ชนิด ได้แก่ WW6B7, WW9B8 และ WJ1 โดย WW6B7 ความเข้มข้น 6.0 $\mu\text{g/ml}$, WW9B8 ความเข้มข้น 25.00 $\mu\text{g/ml}$ และ WJ1 ความเข้มข้น 9.0 $\mu\text{g/ml}$ ได้ผลการย้อมมิกเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชัดเจน โดยพบว่ามิกเอมีการกระจายทั่วไซโตพลาสซึม (cytoplasmic staining pattern) นับเป็นแอนติบอดีตัวแรกในโลกที่สามารถย้อมบนเนื้อเยื่อที่คงเก็บในฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน การใช้แอนติบอดีมากกว่าหนึ่งชนิดแม้ว่าทำให้เสียเวลาและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากขึ้น แต่จะช่วยสนับสนุนกันในรายที่ผลสอดคล้องกัน และได้ทำให้ย้อมได้ครอบคลุมอัลลีลที่แตกต่างกันของมิกเอซึ่งแอนติบอดีบางตัวอาจย้อมไม่ติด³⁶ จึงเป็นการเพิ่มความไวการตรวจให้สูงขึ้นกว่าการใช้แอนติบอดีเพียงชนิดเดียว ดังที่พบในตัวอย่าง 1 ราย (CACX8270) ที่ ย้อมไม่ติด โดย WW6B7 แต่สามารถติดได้ชัดเจนด้วย WW9B8 (final score=9) และย้อมติดได้จางๆ (final score=2) ด้วย WJ1 ดังผลในตารางที่ 2 เหตุผลประการแรกคือ แอนติบอดีแต่ละตัวอาจมีคุณสมบัติเกิดปฏิกิริยาต่อส่วนของแอนติเจนที่ต่างกัน ทำให้มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาได้แตกต่างกัน แต่นั่นไม่ได้หมายความว่า WW9B8 มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่า WJ1 และ WW6B7 ตามลำดับเสมอไป เพราะมีตัวอย่างบางรายที่ผลการย้อมด้วย WW6B7 สามารถย้อมติดได้ดีกว่า (CACX 2410) และบางรายที่ผลการย้อมด้วย WJ1 สามารถย้อมติดได้ดีกว่า (CACX 9484) เหตุผลประการที่สองคือปัจจุบันมีรายงานมิกเอมากกว่า 59 อัลลีล³⁷⁻⁴¹ ดังนั้นการตรวจโดยใช้แอนติบอดีเพียง 1 ชนิดเป็นไปได้ยากที่จะสามารถให้ผลได้ครอบคลุมต่อการเกิดปฏิกิริยากับมิกเอได้ทุกอัลลีล ดังนั้นการศึกษานี้จึงใช้ผลการย้อมอิมโมโนฮิสโตเคมีจากแอนติบอดี 3 ชนิด เพื่อให้ได้ผลที่ครอบคลุมต่อมิกเออัลลีลต่างๆ ได้มากขึ้น และผลการศึกษาสนับสนุนว่าควรใช้แอนติบอดีทั้ง 3 ชนิด วิธีตรวจการแสดงออกมิกเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยการย้อมอิมโมโนฮิสโตเคมีจากการศึกษานี้ มีประโยชน์สามารถนำไปใช้ศึกษาการตอบสนองของเซลล์มะเร็งปากมดลูกต่อการทำงานของภูมิคุ้มกันแบบอาศัย NKG2D receptor โดยดูความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกมิกเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ต่อไป อันจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในระดับเซลล์และระดับโมเลกุล ของเซลล์มะเร็งที่จะสามารถใช้ตรวจกรองหรือพยากรณ์ ความรุนแรงของโรค และใช้ ติดตามผลการรักษาได้ มิกเอเป็น ligands ต่อตัวรับ NKG2D ทำหน้าที่ในการกระตุ้น NK cells และ co-stimulate T cells^{6,10} มีบทบาทอย่างมากในการกำจัดเซลล์มะเร็งและสร้างเสริมภูมิคุ้มกันในการต่อสู้กับโรคมะเร็ง^{7,22,42,43} โดยมีงานวิจัยหลาย

ฉบับที่แสดงว่ามีอัลลีลมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลายชนิดเช่น PERB11.1*TM06 ซึ่งประกอบด้วย 9 GCT monomers และมีความสัมพันธ์กับ HLA-Cw*06 นั้นสัมพันธ์กับการเกิดโรค Psoriasis⁴⁴ และ MICA-ABCD ซึ่งสัมพันธ์กับ HLA-B*5101 มีความสัมพันธ์กับโรค Bechet disorder⁴⁵ การที่มิกเอมีความหลากหลายมากทั้งในระดับดีเอ็นเอ และโปรตีน บางอัลลีลเช่น MICA*010 จะมีการแทนที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 6 โดยเปลี่ยนจากอาร์จินีนเป็นโพรลีน ทำให้โครงสร้างเกิดความผิดปกติไม่เสถียร และทำให้ไม่สามารถแสดงออกบนผิวเซลล์⁴⁶ หรืออาจเกิดจากแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษาไม่สามารถตรวจพบได้ เป็นที่น่าสังเกตว่าอัลลีลดังกล่าวมักจะพบร่วมกับ HLA-B*46³⁷ ซึ่งเป็นอัลลีลที่พบได้บ่อยที่สุดในชาวไทยอีสาน⁴⁶ และมีความสัมพันธ์กับโรคมะเร็งหลังโพรงจมูก (nasopharyngeal carcinoma) ที่พบได้บ่อยในคนจีนตอนใต้⁴⁷ รวมทั้งคนไทยอีสาน จึงน่าจะมีผลต่อการกระตุ้น NK cells ดังนั้นมิกเอจึงมีความสำคัญต่อการเกิดโรค ที่ควรได้รับการศึกษาโดยเฉพาะในโรคมะเร็งต่างๆ การศึกษาครั้งนี้เน้นว่ามีประโยชน์สามารถพัฒนาวิธีตรวจหาการแสดงออกมิกเอจากเนื้อเยื่อเยื่อปากมดลูกที่ดองเก็บในฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินได้ด้วยวิธีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีโดยควรใช้แอนติบอดีทั้ง 3 ชนิดเพื่อเพิ่มความไวของวิธีตรวจให้สามารถครอบคลุมอัลลีลที่แตกต่างกันของมิกเอ

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของชุดโครงการ วิจัยมะเร็งและภูมิคุ้มกันระดับโมเลกุลในโรคมะเร็งปากมดลูก โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2548 และ 2550 และภายใต้การสนับสนุนบางส่วนจากทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ร่วมกับทบวงมหาวิทยาลัย สัญญาเลขที่ MRG4680180

เอกสารอ้างอิง

1. Vatanasapt V, Sriamporn S, Vatanasapt P. Cancer control in Thailand. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32(Suppl):S82-91.
2. Wanrum S, Limpaiboom T, Leelayuwat C, Yaenyao P, Laranratanakarn S, Jearanaikoon P. Development of method for integrated HPV16 bdetction in cervical carcinomas using multiplex PCR. *J Med Tech Phy Ther* 2007; 19: 6-15.
3. Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunology Today* 2000;21:228-34.
4. Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, et al. Natural history of HLA expression during tumour development. *Imunology Today* 1993;14:491-9.
5. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunology Today* 1997;18:89-95.
6. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8 $\alpha\beta$ T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2001;2:255-60.
7. Diefenbach A, Raulet DH, Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol Rev* 2001;181:170-84.
8. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Rault DH. Rae-1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 2001;413:165-71.
9. Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Bach FH. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 1991;173:1017-20.
10. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activating of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999;285:727-8.
11. Wu J, Song Y, Bakker ABH, Bauer S, Spies T, Lanier LL, et al. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999; 285:730-2.

12. Wu J, Cherwinski H, Spies T, Phillips JH, Lanier LL. DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *J Exp Med* 2000;192:1059-68.
13. Trinchieri G. The choices of a natural killer. *Nature Immunology* 2003;4:509-10.
14. Billadeau DD, Upshaw JL, Schoon RA, Dick CJ, Leibson PJ. NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat Immunol* 2003;4:557-64.
15. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 2001;1:220-8.
16. Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, et al. ULBPs, Novel MHC Class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001;14:123-33.
17. Cerwenka A, Baron JL, Lanier LL. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11521-6.
18. Watzl C. The NKG2D receptor and its ligands-recognition beyond the “missing self”? *Microbes and Infection* 2003;5:31-37.
19. Ravetch JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. *Science* 2000; 290:84-9.
20. Sutherland CL, Chalupny NJ, Schooley K, VandenBos T, Kubin M, Cosman D. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* 2002;168: 671-9.
21. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002;296:301-5.
22. Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, Raulet DH. The Role of the NKG2D Immunoreceptor in Immune Cell Activation and Natural Killing. *Immunity* 2002;17:19–29.
23. Jiang K, Zhong B, Gilvary DL, Corliss BC, Hong-Geller E, Wei S, et al. Pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells. *Nat Immunol* 2000;1:419-25.

24. Hayakawa Y, Kelly JM, Westwood JA, Darcy PK, Diefenbach A, Raulet D, et al. Cutting edge: tumor rejection mediated by NKG2D receptor-ligand interaction is dependent upon perforin. *J Immunol* 2002;169:5377-81.
25. Baharm S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91:6259-63.
26. Leelayuwat C, Townend DC, Degli-Esposti MA, Abraham LJ, Dawkins RL. A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I. *Immunogenetics* 1994;40:339-51.
27. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12445-50.
28. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6879-84.
29. Chalupny NJ, Sutherland CL, Lawrence WA, Rein-Weston A, Cosman D. ULBP4 is a novel ligands for human NKG2D. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:129-135.
30. Das H, Groh V, Kuijl C, Sugita M, Morita CT, Spies T, et al. MICA engagement by human V gamma2 V delta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* 2001;15:83-93.
31. Tieng V, Le Bouguence C, du Merle L, Bertheau P, Desreumaux P, Janin A, et al. Binding of Escherichia coli adhesin AfaE10 to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2977-82.
32. Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH. Ligands for the murine NKG2D receptor : expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 2000;1:119-26.
33. Kurman RJ, Solomon D. The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: definitions, criteria, and explanatory notes for terminology and specimen adequacy. New York: Springer-Verlag; 1994.

34. Lu Z, Friess H, Graber HU, Guo X, Schilling M, Zimmermann A, et al. Presence of Two Signaling TGF- β receptors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Dig Dis Sci* 1997;42:2054-63.

35. Liu SS, Tsang BK, Cheung ANY, Xue WC, Cheng DKL, Ng TY, et al. Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 2001;37:1104-10.

36. Li Z, Groh V, Strong RK, Spies T. A single amino acid substitution causes loss of expression of a MICA allele. *Immunogenetics* 2000;51:246-48.

37. Gaudieri S, Leelayuwat C, Townsend D, Mullberg J, Cosman D, Dawkins RL. Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC. *Immunogenetics* 1997;45:209-16.

38. Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, et al. Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 1996;44:351-7.

39. Yao Z, Volgger A, Helmberg W, Keller E, Fan LA, Chandanayingyong D, et al. Definition of new alleles of MIC-A using sequence-based typing. *Eur J Immunogenetics* 1999;26:225-32.

40. Visser CJT, Tilanus MGJ, Tatari Z, van der Zwan A, Bakker R, Rozemuller EH, et al. Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes. *Immunogenetics* 1999; 49 :561-566.

41. Dunn DS, Williamson JF, Cattley SK, Tay GK, Guadieri S, Leelayuwat C, et al. Co-evolution of HLA-B and PERB11.1 (MICA): Significance of independent triplet expansion within the transmembrane region of PERB11.1 (MICA). *J Mol Evol* 2000;50:359-65.

42. Groh V, Li YQ, Cioca D, Hunder NN, Wang W, Riddell SR, et al. Efficient cross-priming of tumor antigen-specific T cells by dendritic cells sensitized with diverse anti-MICA opsonized tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:6461-6.

43. Carbone E, Neri P, Mesuraca M, Fulciniti MT, Otsuki T, Pende D, et al. HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. *Blood* 2005;105:251-8.

