مقاله اصیل پژوهشی

بررسی پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی 16C/A در ژن کموکاین CCL22 در بیماران مبتلا به بیماری تروفوبلاستیک حاملگی

سیروس نعیمی[1]، نصراله عرفانی[2]

چکیده

زمینه و هدف: بیماری تروفوبلاستیک حاملگی یکی از عوارض دوران بارداری است که دارای زیرگروه‌های مختلف شامل مول کامل، مول ناقص و کوریوکارسینوما می‌باشد. عامل مشتق‌شده از ماکروفاژها یا CCL22، جزء خانواده کموکاین‌ها می‌باشد که توسط ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیکی و سلول‌های توموری تولید شده و نقش مهمّی در فراخوانی لنفوسیت‌های T تنظیمی و لنفوسیت‌های $T\ helper_2$ به محل تومور دارد. ژن این کموکاین دارای چندین پلی‌مورفیسم است که مهمترین آن در موقعیت 16C/A می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی پلی‌مورفیسم ژن مذکور و ارتباط آن با بیماری تروفوبلاستیک حاملگی انجام شد.

روش تحقیق: در این مطالعه مورد–شاهدی، خون محیطی ۱۱۰ بیمار مبتلا به تروفوبلاستیک حاملگی و ۱۲۰ خانم باردار سالم به منظور استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. تغییرات ژنتیکی مولکول CCL22 با روش Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism بررسی و با استفاده از نرم‌افزار Epi Info 2000 و SPSS ویرایش ۱۱/۵، در سطح معنی‌داری $P<0/05$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: تفاوت معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم ژن CCL22 (شامل ژنوتیپ‌های CC، CA و AA) و میزان فراوانی آلل‌های این ژن بین گروه مورد و شاهد مشاهده نشد. همچنین ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم ژن CCL22 و زیرگروه‌های بیماری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تغییرات ژنتیکی مولکول CCL22 در ارتباط با بیماری ترفوبلاستیک حاملگی نبوده؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده نقش سایر کموکاین‌های درگیر در این بیماری بررسی شود.

واژه‌های کلیدی: پلی‌مورفیسم. بیماری تروفوبلاستیک حاملگی، کموکاین، CCL22

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۰؛ ۱۸(۲): ۸۶-۹۳

دریافت: ۱۳۸۹/۰۸/۲۹ اصلاح نهایی: ۱۳۹۰/۰۴/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۵/۱۸

[1] نویسنده مسؤول، دانشجوی دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی و مربی ایمونولوژی بخش زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، ایران
آدرس: کازرون– دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون– بخش زیست‌شناسی
تلفن: ۲۲۳۰۵۰۵ و ۰۷۲۱۲۲۳۰۵۰۶ نمابر: ۰۷۲۱۲۲۴۳۹۳۷ پست الکترونیکی: naeimis@kau.ac.ir
[2] استادیار ایمونولوژی، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران

مقدمه

بیماری تروفوبلاستیک حاملگی یکی از پیچیدگی‌های دوران بارداری است و شامل طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله مول هیداتید فرم کامل، مول هیداتید فرم ناقص، کوریوکارسینوما و تومور تروفوبلاستیک جای جفت می‌باشد که همه این موارد توانایی متاستاز در موضع یا متاستاز به بافت‌های دورتر را دارند (۱). بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت، شیوع جهانی این بیماری بین ۰/۵ تا ۸/۳ مورد در هر هزار زایمان موفق است و این مورد در آسیایی‌های مقیم انگلستان ۱/۵ مورد در هر هزار زایمان می‌باشد (۲).

عوامل زیادی از جمله ژنتیک، نژاد، سن مادر، عفونت‌های ویروسی، رژیم غذایی، عوامل ایمونولوژی و وضعیت اجتماعی- اقتصادی در ایجاد این بیماری مورد توجه قرار گرفته‌اند ولی علت‌شناسی این بیماری و نقش هر کدام از این عوامل بخوبی شناخته نشده است (۳).

یک نقش اساسی در تطبیق سیستم ایمنی مادر در دوران بارداری با جنین (که به عنوان یک بافت نیمه خودی شناخته می‌شود)، توسط سایتوکاین‌ها ایفا می‌گردد. افزایش کورتیزول، پروژسترون و استرادیول در خلال دوران بارداری باعث افزایش تولید سایتوکاین‌های Th_2 و کاهش تولید سایتوکاین‌های Th_1 و در نتیجه سوق یافتن سیستم ایمنی به سمت Th_2 می‌گردد. به نظر می‌رسد سایتوکاین‌های Th_2 برای تهاجم و لنگر انداختن بافت‌های جنینی و برقراری حاملگی مهم باشند (۴).

کموکاین‌ها خانواده‌ای از سایتوکاین‌های پیش‌التهابی هستند و گیرنده‌های آنها تنظیم‌کننده پاسخ‌های ایمنی متنوع در برابر عفونت، التهاب و ترمیم بافتی می‌باشند. علاوه بر این در امبریوژنز و تشکیل و تکامل سلول‌های خونی نقش دارند (۵).

عامل مشتق‌شده از ماکروفاژها (MDC/CCL22) جزء خانواده CC کموکاین‌ها بوده و توسط ماکروفاژهای بالغ و سلول‌های دندریتیک ساخته می‌شود (۶). این مولکول همچنین توسط سلول‌های توموری نیز تولید می‌گردد. مولکول CCL22 را با عنوان عامل القای جذب لنفوسیت‌های T نیز شناسایی می‌نمایند (۷). سایتوکاین‌های تولیدشده توسط لنفوسیت‌های Th_2 از قبیل اینترلوکین ۴ (IL-4) و اینترلوکین ۱۳ (IL-13) باعث القای تولید این کموکاین می‌گردد؛ در صورتی که اینترفرون گاما (IFNγ) باعث کاهش تولید آن می‌شود. این کموکاین به گیرنده خود، یعنی مولکول CCR4 که بر روی سطح لنفوسیت‌های Th_2 و لنفوسیت‌های T تنظیمی بیان می‌شود، متصل شده و باعث جذب این سلول‌ها به مناطق تولید این کموکاین می‌گردد (۸). امروزه بخوبی مشخص شده است که مولکول CCL22[۱] دارای یک نقش مهم در سرکوب سیستم ایمنی در مقابل عفونت‌های میکروبی و سلول‌های توموری می‌باشد که این کار را از طریق فراخواندن لنفوسیت‌های Th_2 و T تنظیمی به محل ضایعه انجام می‌دهد (۹).

ژن مولکول CCL22 بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۶ (16q.3) قرار دارد و دارای سه اگزون و دو اینترون می‌باشد (۱۰). ژن این مولکول دارای چهار پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی است که شامل 16C/A در اگزون شماره یک، 1639T/C و 1676C/T در اگزون شماره دو و 4732 T/C در اگزون شماره سه است (۱۱). گزارشات زیادی درباره نقش این مولکول در سرطان‌های مختلف و بیماری‌های خودایمنی وجود دارد (۱۲-۱۵). در مطالعه‌ای ارتباط پلی‌مورفیسم ژن مولکول CCL22 و احتمال ابتلا به سرطان دستگاه گوارش گزارش شده است (۱۱)؛ بنابراین به نظر می‌رسد پلی‌مورفیسم ژن مذکور با بیماری تروفوبلاستیک حاملگی در ارتباط باشد.

تحقیق حاضر با هدف ارزیابی چند شکلی تک‌نوکلئوتیدی ژن CCL22 در موقعیت 16C/A و همراهی یا عدم همراهی این چند شکلی با بیماری تروفوبلاستیک حاملگی انجام شد؛ همچنین مقایسه فراوانی ژنوتیپی و اشکال مختلف بیماری بررسی گردید.

---

[۱] *Chemokine cc motif ligand 22*

روش تحقیق

در این مطالعه مورد- شاهدی، تعداد ۱۱۰ بیمار مبتلا به بیماری تروفوبلاستیک حاملگی مراجعه‌کننده به مراکز درمانی شیراز در طیّ سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۸که بیماری آنها به تایید جراح و متخصص زنان و زایمان رسیده بود، انتخاب و در قالب گروه مورد قرار گرفتند. پس از تکمیل پرسشنامه مخصوص و بررسی وضعیت بالینی و تاریخچه خانوادگی، نمونه‌گیری از آنان انجام شد؛ همچنین ۱۲۰ خانم باردار سالم مراجعه‌کننده به پزشک متخصص زنان و زایمان که فاقد هر گونه سابقه تروفوبلاستیک حاملگی بودند و از نظر سن با بیماران مطابقت داشتند، به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند.

از افراد دو گروه ۷ mL خون سیاهرگی گرفته شد و به لوله‌های آزمایش حاوی EDTA منتقل گردید. DNA ژنومی از لکوسیت‌های خون محیطی با روش Proteinase K استخراج شد (۱۶).

به منظور تعیین ژنوتیپ در موقعیت 16C/A از روش PCR-RFLP استفاده گردید؛ بدین صورت که ابتدا قطعه مورد نظر DNA توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمر از (PCR) تکثیر شد؛ سپس محصول PCR تحت تأثیر آنزیم محدودکننده (Restricition Endonuclease) مربوطه قرار گرفت و به قطعاتی تبدیل شد که بر اساس تعداد و اندازه قطعات به دست آمده به ژنوتیپ DNA مورد آزمایش پی برده شد. آزمایشات PCR، پس از جمع‌آوری نمونه‌ها به صورت گروهی بر روی ۲۵ نمونه در هر سری انجام گردید و برای انجام PCR در موقعیت 16C/A به منظور تکثیر DNA مورد نظر از زوج پرایمرهای زیر استفاده شد:

Primer forward:

5`-TGGGAGGTAGTTCTTCTTTTGA-3`

Primer reverse:

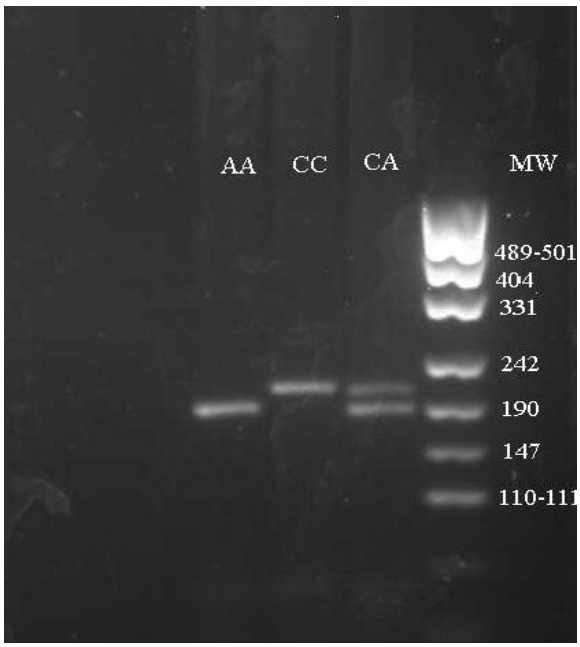
5`-CCACAGCAAGGAGGACGA-3`

واکنش PCR در یک تیوب اپندروف با حجم ۰/۲ mL برای هر نمونه DNA انجام پذیرفت که در هر تیوب اپندورف مقدار ۱۸ µL از مخلوط تکثیری PCR قرار گرفت و مواد زیر به ترتیب زیر اضافه شدند:

مقدار ۰/۷ µL از DNA ژنومی (با غلظت ۰/۳ µg/µL)، ۲ µL آنزیم Taq پلی‌مراز (با غلظت ۱u/µL)، ۶/ µL از هر نوکلئوتید (dNTP) (با غلظت ۱۰ Mm)، ۱/۷ µL از بافر PCR (با غلظت ۱۰×)، ۰/۴ µL از $MgCl_2$ (با غلظت ۵۰mM)، ۰/۷ µM از هر پرایمر (با غلظت ۲۰ pm) و ۱۱/۲ µL آب دیونیزه‌شده.

دمای مورد استفاده جهت انجام واکنش PCR بدین صورت بود که ابتدا مخلوط حاصل در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدّت ۵ دقیقه حرارت داده شد و سپس برای ۳۵ دور، تحت فرایند PCR قرار گرفت؛ این فرایند شامل ۳۰ ثانیه Denaturation در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۴۰ ثانیه Annealing در دمای ۵۵ درجه و ۴۰ ثانیه Extention در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بود. محصول نهایی که یک قطعه ۲۱۵ جفت بازی می‌باشد، توسط آنزیم محدودکننده MboI هضم شده که برای انجام این عمل، در یک تیوپ اپندورف با حجم ۰/۲ mL، مقدار ۱۰ µL از محصول PCR ریخته و به آن مقدار ۳/۲ µL آب مقطر دیونیزه، ۱/۵ µL بافر مخصوص آنزیم با غلظت ۱۰× و ۰/۳ µL آنزیم محدودکننده فوق‌الذکر با غلظت ۵۰۰۰ واحد اضافه گردید و بعد از ورتکس، نمونه‌ها در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدّت یک شبانه روز قرار داده شدند که در صورت وجود آلل A به دو قطعه ۱۸۷ و ۱۹ جفت بازی تقسیم می‌شد؛ سپس بر روی ژل آگاروز ۲/۵٪ و با رنگ‌آمیزی ژل قرمز (Gel Red) الکتروفورز و مشاهده گردید؛ بر این اساس سه ژنوتیپ برای این پلی‌مورفیسم قابل مشاهده می‌باشد که نمونه‌ای از این مجموعه آزمایشات در شکل ۱ ارائه شده است.

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای SPSS (ویرایش ۱۱/۵) و Epi Info 2000 و آزمون‌های کای‌دو، من‌ویتنی، فیشر و Hardy-weinberg equilibrium استفاده شد. P<۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار تلقی گردید.



شکل ۱- نتیجه الکتروفورز محصول PCR در موقعیت 16 C/A بعد از اثرگذاری آنزیم محدودکننده

فرد هوموزیگوت دارای ژنوتیپ AA، فرد هوموزیگوت دارای ژنوتیپCC، فرد هتروزیگوت دارای ژنوتیپ CA در موقعیت 16C/A ژن CCL22

یافته‌ها

میانگین سنّی بیماران گروه مورد ۱۱/۷±۳۰ و گروه شاهد ۱۳±۳۵ سال بود (P=۰/۹۷).

نتایج حاصل از آزمایش PCR-RFLP بر روی هر دو گروه با شرایط ذکر شده در آزمایش، منجر به تولید محصولی به طول ۲۱۵ جفت باز به عنوان قطعه مورد آزمایش گردید؛ قطعه حاصل در معرض آنزیم قرار گرفت و به قطعات متفاوت تبدیل گردید.

جدول ۱ فراوانی ژنوتیپ‌های 16C/A ممکن را در جمعیت هر دو گروه نشان می‌دهد.

از میان ۱۱۰ نفر گروه مورد در تروفوبلاستیک حاملگی، ۸۸ نفر (۸۰٪) ژنوتیپ CC، ۱۹ نفر (۱۷/۳٪) ژنوتیپ CA و ۳ نفر (۲/۷٪) ژنوتیپ AA را نشان دادند؛ این میزان در گروه شاهد به ترتیب ۹۷ نفر (۸۰/۸٪)، ۲۰ نفر (۱۶/۷٪) و ۳ نفر (۲/۵٪) بود. آزمون کای‌دو نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار بین پلی‌مورفیسم ژن CCL22 در دو گروه بود (جدول ۱). جدول ۲ فراوانی آلل‌های ممکن را در جمعیت بیماران هر دو گروه نشان می‌دهد. در گروه مورد، ۸۸/۶٪ آلل C و ۱۱/۴٪ آلل A را نشان دادند؛ این میزان در گروه شاهد به ترتیب ۸۹/۲٪ و ۱۰/۸٪ بود. آزمون کای‌دو تفاوت معنی‌داری را بین آلل‌های ژن CCL22 بین افراد دو گروه نشان نداد. بر اساس جدول ۳، ارتباطی بین پلی‌مورفیسم ژن مورد نظر و زیرگروه‌های بیماری (شامل مول کامل، مول ناقص و کوریوکارسینوما) مشاهده نشد.

جدول ۱- مقایسه پلی‌مورفیسم‌های ژن CCL22 در بیماران مبتلا به تروفوبلاستیک حاملگی (گروه مورد) و گروه شاهد

لوکوس	شاهد	مورد	ژنوتیپ	سطح معنی‌داری
16C/A	۹۷ (٪۸۰/۸)	۸۸ (٪۸۰)	CC	P=۰/۹۸
	۲۰ (٪۱۶/۷)	۱۹ (٪۱۷/۳)	CA	
	۳ (٪۲/۵)	۳ (٪۲/۷)	AA	

جدول ۲- مقایسه فراوانی آلل‌های CCL22 در بیماران مبتلا به تروفوبلاستیک حاملگی (گروه مورد) و گروه شاهد

لوکوس	گروه شاهد	گروه مورد	آلل	سطح معنی‌داری
16C/A	٪۸۹/۲	٪۸۸/۶	C	P=۰/۸۱
	٪۱۰/۸	٪۱۱/۴	A	

جدول ۳- مقایسه ژنوتیپ ژن CCL22 و فرم‌های بیماری در بیماران مبتلا به تروفوبلاستیک حاملگی (گروه مورد)

لوکوس	زیرگروه‌های بیماری			ژنوتیپ	سطح معنی‌داری
	کوریوکارسینوما	مول کامل	مول جزئی		
16C/A	۱۴ (٪۱۲/۷)	۴۸ (٪۴۳/۷)	۲۴ (٪۲۱/۸)	CC	P=۰/۹
	۴ (۳/۶)	۱۱ (٪۱۰)	۶ (٪۵/۵)	CA	
	۰ (٪۰)	۲(٪۱/۸)	۱ (٪۰/۹)	AA	

بحث

بیماری تروفوبلاستیک حاملگی شامل گروه‌های متنوعی از بیماری‌های وابسته به هم می‌باشد و در طیف وسیعی از بیماری‌ها شامل تهاجم موضعی تا ایجاد متاستاز قرار می‌گیرد (۱۵)؛ فراوانی این بیماری در آسیا سه برابر بیشتر از فراوانی آن در اروپا و آمریکای شمالی گزارش شده است (۳).

لنفوسیت‌های T تنظیمی (CD4+/CD25+) به عنوان یک زیر گروه منحصر به فرد در جفت وجود دارد و باعث پایداری جنین و تحمل سیستم ایمنی مادر به جنین به عنوان یک پیوند آلوژنیک می‌گردد (۱۶)؛ همچنین این زیرگروه از سلول‌ها باعث جلوگیری از ایجاد بیماری‌های خودایمنی می‌شود (۱۷–۱۹).

لنفوسیت‌های T کمکی، سه فرم از سایتوکاین‌ها را ترشح می‌کنند که شامل Th_1، Th_2 و Th_3 می‌گردد. سایتوکاین‌های Th_2 از قبیل IL-4 و IL-10 باعث پایداری حاملگی می‌شوند؛ در حالی که سایتوکاین‌های Th_1 (IFNγ، IL-2 و TNF-α) ممکن است در کنش- واکنش‌های مادر و جنین، باعث پس‌زدن جنین گردند؛ بنابراین تعادل میان پاسخ‌های Th_1/Th_2 سیستم ایمنی مادر نسبت به جنین در پایداری جنین می‌تواند نقش مهمّی داشته باشد (۲۰).

CCL22 جزو خانواده کموکاین‌ها بوده و توسط ماکروفاژهای فعال‌شده و سلول‌های دندریتیکی ساخته می‌شود؛ این کموکاین باعث جذب لنفوسیت‌های Th^2 و T تنظیمی می‌گردد (۸).

نقش مولکول CCL22 در بیماری‌های سرطان و خودایمنی متعددی مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعات نشان می‌دهد که وجود CCL22 و CCL17 در محیط توموری باعث افزایش لنفوسیت‌های T تنظیمی (FOXP3+)[1] در مراحل اولیه سرطان دستگاه گوارش می‌گردد (۲۰)؛ همچنین مطالعه دیگری حاکی از افزایش بیان این سایتوکاین در محیط‌های توموری متعددی می‌باشد (۲۱).

بیان این سایتوکاین در سرطان ریه نیز افزایش نشان داده (۲۲) و در سرطان سر و گردن باعث فراخوانی لنفوسیت‌های T تنظیمی به محل تومور می‌گردند (۲۳)؛ از طرف دیگر نقش این مولکول در ایجاد بیماری خودایمنی مانند روماتیسم مفصلی و التهاب مفاصل مشخص شده (۱۴) و نشان داده شده است که این سایتوکاین در پیشرفت بیماری مولتیپل اسکلروزیس در زنان نقش مهمّی دارد (۲۴).

نقش پلی‌مورفیسم ژن CCL22 در سرطان‌های شایع کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است و عمده مطالعات مربوط به بیماری‌های عفونی و سرطان دستگاه گوارش است (۱۱).

با توجه به تحقیقات انجام‌شده و نقش لنفوسیت‌های T تنظیمی و Th_2، بیان مولکول CCL22 در توسعه و افزایش سلول‌های سرطانی نقش مهمی را ایفا می‌نماید؛ ژن این مولکول دارای چهار پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی و شامل 16C/A در اگزون شماره یک، 1639T/C و 167C/T در اگزون شماره دو و 4732T/C در اگزون شماره سه است؛ به نظر می‌رسد موقعیت 16C/A دارای حداقل ۲٪ تنوع ژنتیکی باشد. نحوه عملکرد پلی‌مورفیسم ژن CCL22 در سرطان‌ها بخوبی مشخص شده است و به نظر می‌رسد به دلیل تفاوت خصوصیات فیزیکی- شیمیایی اسید آمینه آلانین نسبت به اسید آمینه آسپارتیک، جایگزینی اسید آمینه‌های مذکور که در اثر چند شکلی در موقعیت 16C/A اتفاق می‌افتد، در توانایی تولید و یا رها شدن این پروتئین در شبکه اندوپلاسمی تأثیر بسزایی داشته باشد (۱۱)؛ این جابه‌جایی اسید آمینه در دومین اسید آمینه از ناحیه انتهایی آمین سیگنال پپتید مولکول CCL22 اتفاق افتاده، منجر به افزایش شارژ مثبت ناحیه انتهایی آمین، سیگنال پپتید شده، در نتیجه این امر، تأثیر آنزیم سیگنال پپتیداز در جهت جداشدن قطعه سیگنال پپتید، بر روی پروتئین پیش‌ساز CCL22 بهتر صورت می‌گیرد و بنابراین افزایش بیان پروتئین مذکور را هنگامی که اسید آمینه آلانین به جای اسید آمینه آسپارتیک قرار می‌گیرد را شاهد خواهیم بود (۲۵).

[1] *Forkhead Box P3*

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این تحقیق، فراوانی ژنوتیپ‌های ژن CCL22 در افراد مبتلا به بیماری تروفوبلاستیک حاملگی، تفاوت معنی‌داری با افراد سالم باردار از نظر آماری نشان نمی‌دهد؛ این مطلب در آلل های افراد گروه مورد و شاهد نیز مشاهده می‌شود؛ بنابراین به نظر می‌رسد چند شکلی تک نوکلئوتیدی ژن CCL22 در موقعیت 16C/A، ارتباطی با بیماری تروفوبلاستیک حاملگی ندارد؛ از آنجا که این بیماری، چند عاملی است و عوامل متعددی در بروز آن مؤثر است، پیشنهاد می‌گردد دیگر عوامل ایمونولوژیکی از قبیل دیگر کموکاین‌ها و سایتوکاین‌ها مانند IL-10 و IL-4 نیز در این بیماران مورد بررسی قرار گیرند؛ همچنین با انجام تحقیق بر روی نمونه‌های بیشتر، نتایج نیز از قاطعیت بیشتری برخوردار خواهند بود.

تقدیر و تشکر

این تحقیق حاصل طرح پژوهشی می‌باشد که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون به انجام رسیده است.

منابع:

1- Khan F, Everard J, Ahmed S, Coleman RE, Aitken M, Hancock BW. Low-risk persistent gestational trophoblastic disease treated with low-dose methotrexate: efficacy, acute and long-term effects. Br J Cancer. 2003; 89(12): 2197-201.

2- Tham BW, Everard JE, Tidy JA, Drew D, Hancock BW. Gestational trophoblastic disease in the Asian population of Northern England and North Wales. BJOG. 2003; 110(6): 555-59.

3- Smith HO. Gestational trophoblastic disease epidemiology and trends. Clin Obstet Gynecol. 2003; 46(3): 541-56.

4- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? Immunol Today. 1993; 14(7): 353-56.

5- Lu W, Gersting JA, Maheshwari A, Christensen RD, Calhoun DA. Developmental expression of chemokine receptor genes in the human fetus. Early Hum Dev. 2005; 81(6): 489-96.

6- Chantry D, DeMaggio AJ, Brammer H, Raport CJ, Wood CL, Schweickart VL, et al. Profile of human macrophage transcripts: insights into macrophage biology and identification of novel chemokines. J Leukoc Biol. 1998; 64(1): 49-54.

7- Chang M, McNinch J, Elias C 3rd, Manthey CL, Grosshans D, Meng T, et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel CC chemokine, stimulated T cell chemotactic protein (STCP-1) that specifically acts on activated T lymphocytes. J Biol Chem. 1997; 272(40): 25229-37.

8- Bonecchi R, Sozzani S, Stine JT, Luini W, D'Amico G, Allavena P, et al. Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses. Blood. 1998; 92(8): 2668-71.

9- Mantovani A, Gray PA, Van Damme J, Sozzani S. Macrophage-derived chemokine (MDC). J Leukoc Biol. 2000; 68(3): 400-404.

10- Schaniel C, Pardali E, Sallusto F, Speletas M, Ruedl C, Shimizu T, et al. Activated murine B lymphocytes and dendritic cells produce a novel CC chemokine which acts selectively on activated T cells. J Exp Med. 1998; 188(3): 451-63.

11- Wang G, Yu D, Tan W, Zhao D, Wu C, Lin D. Genetic polymorphism in chemokine CCL22 and susceptibility to Helicobacter pylori infection-related gastric carcinoma. Cancer. 2009; 115(11): 2430-37.

12- Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. Cancer Res. 2009; 69(5): 2000-2009.

13-Yogo Y, Fujishima S, Inoue T, Saito F, Shiomi T, Yamaguchi K, et al. Macrophage derived chemokine (CCL22), thymus and activation-regulated chemokine (CCL17), and CCR4 in idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Res. 2009; 10:80.

14- Flytlie HA, Hvid M, Lindgreen E, Kofod-Olsen E, Petersen EL, Jorgensen A, et al. Expression of MDC/CCL22 and its receptor CCR4 in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis. Cytokine. 2010; 49(1): 24-29.

15- Wang X, Fu S, Freedman RS, Liu J, Kavanagh JJ. Immunobiology of gestational trophoblastic diseases. Int J Gynecol Cancer. 2006; 16(4): 1500-15.

16- Heikkinen J, Mottonen M, Alanen A, Lassila O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. Clin Exp Immunol. 2004; 136(2): 373-78.

17- Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. Nat Immunol. 2004; 5(3): 266-71.

18- Saito S, Sasaki Y, Sakai M. CD4(+)CD25 high regulatory T cells in human pregnancy. J Reprod Immunol. 2005; 65(2): 111-20.

19- Zenclussen AC. Regulatory T cells in pregnancy. Springer Semin Immunopathol. 2006; 28(1): 31-39.

20- Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, et al. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. Int J Cancer. 2008; 122(10): 2286-93.

21- Atanackovic D, Cao Y, Kim JW, Brandl S, Thom I, Faltz C, et al. The local cytokine and chemokine milieu within malignant effusions. Tumour Biol. 2008; 29(2): 93-104.

22- Nakanishi T, Imaizumi K, Hasegawa Y, Kawabe T, Hashimoto N, Okamoto M, et al. Expression of macrophage-derived chemokine (MDC)/CCL22 in human lung cancer. Cancer Immunol Immunother. 2006; 55(11): 1320-29.

23- Maruyama T, Kono K, Izawa S, Mizukami Y, Kawaguchi Y, Mimura K, et al. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to infiltration of regulatory T cells in esophageal squamous cell carcinoma. Dis Esophagus. 2010; 23(5): 422-29.

24- Galimberti D, Fenoglio C, Comi C, Scalabrini D, De Riz M, Leone M, et al. MDC/CCL22 intrathecal levels in patients with multiple sclerosis. Mult Scler. 2008; 14(4): 547-49.

25- Goder V, Spiess M. Molecular mechanism of signal sequence orientation in the endoplasmic reticulum. EMBO J. 2003; 22(14): 3645-53.

Abstract *Original Article*

Investigation of single nucleotide polymorphism of the CCL22 gene at position 16C/A in patients with gestational trophoblastic disease

S. Naeimi[1], N. Erfani[2]

Background and Aim: Gestational trophoblastic disease (GTD) is one of complications of pregnancy and has different subtypes (complete mole, partial mole and choriocarcinoma). Macrophage derived factor or CCL22 is a member of chemokines that produced by macrophages, dendritic cells and tumors cells. It has an important role in the recruitment of T regulatory cells and T helper2 lymphocytes to the site of tumor. This chemokine has several polymorphisms which the most important is at position 16C/A. This study was aimed to evaluate the polymorphism of this gene and its relationship with GTD.

Materials and Methods: In this case-control study, the peripheral blood of 110 patients with GTD and 120 healthy pregnant women were used for DNA extraction. The polymorphism of the CCL22 gene was investigated with Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method and analyzed by means of Epi Info 2000 and SPSS (version 11.5) at the significant level of $P<0.05$.

Results: No significant difference was observed in the polymorphism of CCL22 (including genotypes CC, CA and AA) and the frequency of its alleles between the case and control groups. Moreover, there was not a significant association between CCL22 polymorphism and subtypes of GTD.

Conclusion: It seems that genetic alteration of CCL22 is not associated with GTD, therefor, investigation of other chemokines gene polymorphisms is suggested in future studies.

Key Words: Polymorphism, Gestational trophoblastic disease (GTD), Chemokine, CCL22

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2011; 18(2): 86-93

Received: November 20, 2010 Last Revised: July 13, 2011 Accepted: August 9, 2011

[1] *Corresponding Author, Instructor, Department of Biology, Science School, Islamic Azad University, Kazerun Branch, Kazerun, Iran*
naeimis@kau.ac.ir
[2] *Assistant Professor, Department of Immunology, Shiraz Institute for Cancer Research, Medical, Shiraz, Iran*