

ARTIKEL PENELITIAN

Peningkatan Ekspresi Gen *NKG2D* Sel-sel NK oleh Brokoli untuk Mencegah Kanker

Diana Krisanti Jasaputra,¹ Khie Khiong,² Ervi Afifah,³ Hanna Sari W. Kusuma³

¹Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha, Bandung,

²Pascasarjana STIAB Smaratungga, Boyolali; White Rose Clinic, Surakarta,

³Aretha Medika Utama, Biomolecular and Biomedical Research Centre, Bandung

Abstrak

Kanker termasuk kelompok penyakit tidak menular (*non-communicable diseases* atau NCD) dan penyebab kematian terbesar di dunia. Salah satu faktor yang memengaruhi perkembangan kanker adalah reseptor *NKG2D* (*natural-killer group 2, member D*) merupakan kompleks reseptor yang mengaktivasi sel NK dan penting dalam *immunosurveillance* kanker. Brokoli, sayuran golongan *Cruciferae*, mengandung glukosinolat dan isotiosianat. Glukosinolat akan dihidrolisis oleh mirosinase (*thioglucodase β*) dan membentuk senyawa isotiosianat. Senyawa isotiosianat penting untuk mencegah kanker adalah senyawa sulforafan. Tujuan penelitian adalah menilai efek brokoli dalam meningkatkan ekspresi reseptor *NKG2D* dalam rangka memperbaiki aktivitas sel NK untuk mencegah kanker. Penelitian ini bersifat prospektif eksperimental laboratorium bersifat komparatif yang dilakukan di Laboratorium Aretha Medika Utama pada Februari–Juli 2016. Brokoli di-*freeze dryer* dan dibuat tepung dua konsentrasi, yaitu 50 µg/mL dan 25 µg/mL. Penelitian diawali dengan perbanyakan sel NK (*cell line*), kemudian dilanjutkan dengan perlakuan selama 24 jam dan penilaian ekspresi gen *NKG2D* menggunakan qPCR. Data penelitian ekspresi gen *NKG2D* dihitung dengan rumus Livak dan dianalisis menggunakan uji ANOVA satu arah dan uji lanjutan Tukey (SPSS 16). Pemberian brokoli konsentrasi 50 µg/mL dan 25 µg/mL meningkatkan level ekspresi gen *NKG2D* yang mengindikasikan peningkatan aktivitas sel-sel NK. Simpulan penelitian ini adalah pemberian brokoli meningkatkan aktivitas sel-sel NK dalam mencegah dan melawan sel-sel kanker.

Kata kunci: Brokoli, ekspresi *NKG2D*, sel kanker

Increased *NKG2D* Gene Expression of *NKG* Cells by Broccoli to Prevent Cancer

Abstract

Cancer is the non-communicable diseases (NCD) and the biggest cause of death in the world. One of the factors that affect cancer development is *NKG2D* receptors (*natural-killer group 2, member D*) is a receptor complex that activates NK cells and is important in cancer *immunosurveillance*. Broccoli, *Cruciferae* vegetable, contains glucosinolate and isothiocyanate. Glucosinolate will be hydrolysed by the mirosinase (*thioglucodase β*) and form the isothiocyanate compound. Isothiocyanate compounds essential to prevent cancer are sulforafan compounds. The objective of the study was to assess the effect of broccoli in enhancing *NKG2D* receptor expression in order to improve NK cell activity to prevent cancer. This experimental study is a comparative true experimental laboratory, conducted in the Aretha Medika Utama in February to July 2016. Broccoli was freeze dryer and made two concentrations of flour, 50 µg/mL and 25 µg/mL. The study begins with multiplication of NK cells (*cell line*), then continued with treatment for 24 hours and assessment of *NKG2D* gene expression using qPCR. *NKG2D* gene expression research data was calculated by Livak formula and analyzed using one-way ANOVA test and Tukey's advanced test (SPSS 16). The administration of broccoli concentrations of 50 µg/mL and 25 µg/mL increased the level of *NKG2D* gene expression, indicating an increase in NK cell activity. The conclusion of this study is the provision of broccoli increases the activity of NK cells in preventing and fighting cancer cells.

Key words: Broccoli, cancer cells, *NKG2D* expression

Korespondensi: Dr. Diana Krisanti Jasaputra, dr., M.Kes. Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha. Jln. Prof. drg. Suria Sumantri MPH No. 65, Bandung, 40164, Jawa Barat, Indonesia. Telepon: +62 22-201 2186. Faksimile: +6222 2015154. HP: +6287822417890. *E-mail:* dianakjasaputra@yahoo.com

Pendahuluan

Kanker merupakan salah satu penyakit yang termasuk ke dalam kelompok penyakit tidak menular (*non-communicable diseases* atau NCD) dan merupakan penyebab kematian terbesar di dunia. Pada tahun 2008 terdapat 63% (36 juta) kematian disebabkan oleh NCD, terutama penyakit pada kardiovaskular (17 juta kematian), kanker (7,6 juta kematian), penyakit paru kronik (4,2 juta kematian), dan diabetes melitus (1,3 juta kematian). Angka kematian akibat NCD lebih tinggi dibanding dengan jumlah seluruh kematian karena penyebab lainnya. Berbeda dengan pendapat secara umum, 80% kematian akibat NCD justru terdapat di negara-negara dengan berpendapatan rendah dan menengah. NCD merupakan penyebab kematian tertinggi di sebagian besar negara di Amerika, Mediterania Timur, Eropa, Asia Tenggara, dan Pasifik Barat.¹

Data Riskesdas 2007–2008² menunjukkan bahwa prevalensi kanker berdasar atas provinsi terdapat 5 provinsi yang prevalensi kankernya melebihi prevalensi kanker nasional (>5,03%), yaitu Provinsi DIY sebesar 9,66%; Provinsi Jawa Tengah sebesar 8,06%; Provinsi DKI Jakarta sebesar 7,44%; Provinsi Banten sebesar 6,35%; dan Provinsi Sulawesi Utara sebesar 5,76%. Berdasar atas *odds ratio* dari 12 jenis tumor yang diteliti menunjukkan bahwa tumor ovarium dan serviks uteri mempunyai OR sebesar 19,3 dengan 95% IK 17,8–20,9, sedangkan *odds ratio* yang terendah adalah tumor saluran pernapasan yang mempunyai OR 0,6 dengan 95% CI 0,4–0,9.

Sel kanker/tumor memiliki enam perbedaan utama dengan sel normal, yaitu³ (1) mampu menyediakan sendiri faktor-faktor pertumbuhan yang dibutuhkan; (2) tidak sensitif terhadap penghambat faktor pertumbuhan; (3) mampu menghindari dari proses apoptosis; (4) memiliki potensi untuk replikasi yang tidak terbatas; (5) dapat membentuk pembuluh darah yang baru (angiogenesis); serta (6) memiliki kemampuan menginvasi jaringan dan metastasis.

Salah satu faktor yang mampu memengaruhi perkembangan sel-sel kanker adalah *receptor natural-killer group 2, member D* (*NKG2D*) yang merupakan kompleks reseptor yang dapat mengaktifasi sel NK yang sangat penting dalam *immunosurveillance* terhadap kanker. Bila sel NK teraktivasi maka reseptor *NKG2D* berinteraksi dengan ligannya dan berperan sebagai reseptor aktivasi primer yang dapat memicu sitotoksitas sel NK.⁴ Reseptor *NKG2D* manusia secara normal

diekspresikan pada sel NK, sel CD8 T, sel $\gamma\delta$ T, dan beberapa sel CD4 T yang berperan dalam proses autoimun dan immunosupresi.^{5,6}

Aktivasi reseptor *NKG2D* memiliki peranan proteksi terhadap sitolisis dan aktivasi respons sitokin baik melalui mekanisme secara langsung atau melalui kostimulasi sel-sel NK dan sel CD8 T.^{7,8} Aktivasi ini bergantung pada lingkungan sitokin dan induksi ligan normal maka reseptor kelainan *NKG2D* juga mampu berperan dalam eksaserbasi terhadap penyakit autoimun atau kanker.^{8–10} Ekspresinya ligan reseptor *NKG2D* pada tumor antara lain berhubungan dengan mekanisme mutasi genetik yang terkait dengan stres seluler, proliferasi, dan respons protein yang tidak melipat sesuai dengan konformasi 3 dimensi yang normal atau melalui mekanisme intermediat sinyal dan juga *checkpoint* yang berasosiasi dengan status onkogenik.^{11,12}

Brokoli ialah salah satu sayuran yang termasuk golongan *Cruciferae* yang kaya akan kandungan glukosinolat dan isotiosianat. Glukosinolat akan dihidrolisis oleh mirosinase (*thioglucodase β*) dan juga membentuk senyawa isotiosianat. Salah satu isotiosianat yang memiliki peranan penting terhadap kanker adalah senyawa sulforafan.^{13,14} Sulforafan mempunyai berbagai potensi sebagai bakterisida, bakteriostatik, antiviral, antikanker, dan antioksidan.¹⁵ Penelitian yang dilakukan oleh Li dkk.¹⁶ menyatakan brokoli dapat menghambat sel stem kanker payudara. Mekanisme brokoli menghambat kanker adalah dengan beberapa jalur antara lain dengan memodulasi jalur NF- κ B, WNT/ β -katenin atau *epithelial-mesenchymal transition* atau EMT pada sistem imun yang teraktivasi pada kanker. Tujuan penelitian ini adalah menilai efek brokoli dalam meningkatkan ekspresi gen reseptor *NKG2D* dengan memakai qPCR dan dihitung dengan rumus Livak yang berpotensi dalam mencegah dan melawan sel-sel kanker.

Metode

Penelitian ini bersifat prospektif eksperimental laboratorium yang bersifat komparatif. Brokoli diperoleh dari daerah Kopeng, Jawa Tengah. Brokoli di-*freeze dryer* dan dibuat tepung di PT “B” Semarang. Brokoli *powder* selanjutnya dibuat dengan dua konsentrasi, yaitu 50 μ g/mL dan 25 μ g/mL. Konsentrasi tersebut ditentukan berdasar atas uji pendahuluan dosis aktif yang diyakini mampu untuk meningkatkan proliferasi sel NK, yaitu konsentrasi 50 dan 25 μ g/mL.

Penelitian diawali dengan perbanyakan sel NK (*cell line*), kemudian dilanjutkan dengan perlakuan dengan menggunakan dua konsentrasi brokoli. Perlakuan dilakukan selama 24 jam yang kemudian dilanjutkan isolasi RNA, pembuatan cDNA, kemudian penilaian ekspresi gen *NKG2D* menggunakan qPCR, dengan rinciannya sebagai berikut: proliferasi sel-sel NK dilakukan secara aseptis menggunakan laminar dan alat-alat serta medium yang steril. Perbanyakan sel NK dilakukan dengan subkultur sel yang memenuhi substrat polistiren botol kultur sebanyak 80–90%. Medium untuk pertumbuhan pada kultur sel lalu dimasukkan ke dalam tabung Falcon 15 mL. Kemudian, disentrifugasi dengan kecepatan $500 \times g$ (Heraeus) selama 5 menit. Supernatan dibuang dan *pellet* diresuspensi dengan 1 mL medium pertumbuhan. Suspensi sel lalu dibagi ke dalam T-*flask* yang sebelumnya telah diisi dengan medium pertumbuhan dengan kepadatan 8.000 sel/cm². Selama perawatan sel, medium ditambah setiap dua hari. Inkubasi dilakukan pada kondisi suhu 37°C dan 5% CO₂.

Ekspresi reseptor *NKG2D* pada sel NK dievaluasi mempergunakan metode RT-PCR (kit qPCR, Bio-rad, 1708890) dengan menggunakan alat qPCR (Thermopico 96). Sel-sel NK dikultur dan diperbanyak untuk selanjutnya mendapat perlakuan. Sel-sel NK itu diperbanyak sampai 1.000 sel untuk setiap *well plate* dan diinkubasi selama 30 menit. Kemudian, perlakuan yang diberikan dengan brokoli dua konsentrasi 50 µg/mL dan 25 µg/mL serta diinkubasi selama 24 jam. Setelah inkubasi, setiap *well plate* ditambahkan 20 µg MTS masing-masing. Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C dan 5% CO₂. Setelah isolasi RNA, dinilai ekspresinya dengan teknik PCR.

Primary NKG2D yang dipergunakan adalah sebagai berikut:

R 5'-GAC TTC ACC AGT TTA AGT AAA TC -3'
F 5'-CTG GGA GAT GAG TGA ATT TCA TA-3'.

Primary β-actin yang digunakan adalah sebagai berikut:

R 5'-AGC ACA GCC TGG ATA GCA ACG-3'
F 5'-TCT GGC ACC ACA CCT TCT ACA ATG-3'

Analisis statistik mempergunakan *software* statistik SPSS 16.0. Analisis data menggunakan uji ANOVA satu arah lalu dilanjutkan dengan uji Tukey *honestly significant difference* atau HSD *post-hoc* dan jika $p < 0,05$ menunjukkan perbedaan signifikansi data.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Aretha Medika Utama, Bandung pada Februari sampai Juli 2016, dan mendapat persetujuan dari

Komisi Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha-Rumah Sakit Immanuel, Bandung dengan Nomor 010/KEP/III/2016.

Hasil

Hasil penelitian ekspresi gen *NKG2D* perlakuan brokoli dengan memakai perhitungan ekspresi gen dilakukan dengan rumus Livak, yaitu sebagai berikut:

$\Delta CT_1 \rightarrow$ ekspresi gen target
= CT gen target – CT gen *house keeping*

$\Delta CT_2 \rightarrow$ ΔCT kontrol
= CT kontrol – CT *house keeping*

$\Delta\Delta CT \rightarrow \Delta CT_1 - \Delta CT_2$
 $2 - \Delta\Delta CT \rightarrow$ perbandingan level ekspresi

Threshold cycle (CT) mengindikasikan jumlah siklus fraksional yang diamplifikasi itu dengan jumlah tertentu sampai mencapai ambang batas tetap. Tabel 1 memperlihatkan CT gen target, yaitu CT gen *NKG2D* dengan perlakuan brokoli dengan dua konsentrasi 50 µg/mL dan 25 µg/mL dengan kontrolnya. Sementara itu, Tabel 2 memperlihatkan CT gen *house keeping*, yaitu CT gen *β-actin* dengan perlakuan brokoli dengan dua konsentrasi 50 µg/mL dan 25 µg/mL dengan kontrolnya. Tabel 3 menunjukkan CT gen target – CT gen *house keeping* menghasilkan ΔCT_1 dan CT kontrol – CT *house keeping* yang menghasilkan ΔCT_2 .

Tabel 4 menunjukkan selisih dari $\Delta CT_1 - \Delta CT_2$. Tabel 5 memperlihatkan hasil perbandingan level ekspresi gen *NKG2D*, yaitu antara perlakuan brokoli dibanding dengan kontrolnya dengan penghitungan $2 - \Delta\Delta CT$ (2 pangkat $\Delta\Delta CT$). Berdasar atas Tabel 5, brokoli pada konsentrasi 25 µg/mL menunjukkan perbedaan signifikan dibanding dengan konsentrasi 50 µg/mL dan kontrol. Hal ini mengindikasikan pada konsentrasi 25 µg/mL

Tabel 1 Hasil Uji Tukey Post-Hoc CT Gen *NKG2D* dengan Perlakuan Brokoli

Perlakuan	CT Gen <i>NKG2D</i>			Rata-rata*
	1	2	3	
Kontrol	37,97	37,76	37,72	37,82 ^b
50 µg/mL	36,77	36,82	36,85	36,81 ^b
25 µg/mL	35,69	32,82	33,41	33,97 ^a

Keterangan: *rata-rata hasil dianalisis menggunakan uji Tukey *post-hoc*, $p < 0,05$. Perbedaan huruf kecil menunjukkan perbedaan signifikan antarperlakuan; CT = *threshold cycle*

Tabel 2 Hasil Uji Tukey Post-Hoc CT Gen *House Keeping* dengan Perlakuan Brokoli

Perlakuan	CT Gen β -actin			Rata-rata*
	1	2	3	
Kontrol	26,05	26,17	27,00	26,41 ^a
50 μ g/mL	26,00	26,08	26,26	26,04 ^a
25 μ g/mL	26,93	25,78	26,45	26,39 ^a

Keterangan: *rata-rata hasil dianalisis menggunakan uji Tukey *post-hoc*, $p < 0,05$. Perbedaan huruf kecil menunjukkan perbedaan signifikan antarperlakuan; CT=threshold cycle

merupakan konsentrasi yang paling efektif dalam mengekspresikan gen *NKG2D*. Akan tetapi, pada kedua konsentrasi tersebut mempunyai aktivitas dalam mengekspresikan gen *NKG2D*.

Pembahasan

NKG2D merupakan salah satu reseptor aktivasi yang diekspresikan oleh sel NK yang akan dikenali pada sel tumor atau kanker.^{17,18} Selain *NKG2D* terdapat jenis ligan lain seperti NKp46, NKp44, NKp30, DNAM1, dan SLAM yang juga memiliki peran penting sebagai reseptor aktivasi.¹⁹ Sel NK dapat melawan sel tumor serta sel yang terinfeksi oleh virus dan bakteri.²⁰ *NKG2D* merupakan ligan yang tidak diekspresikan pada sel normal, tetapi diekspresikan pada sejumlah sel tumor/kanker.²⁰ Oleh karena itu, *NKG2D* perlu ditingkatkan untuk meningkatkan aktivitas sitotoksik sel sehingga dapat membunuh sel kanker. Tanaman brokoli mempunyai senyawa sulforafan yang diketahui memiliki potensi untuk meningkatkan reseptor aktivator sehingga dapat meningkatkan aktivitas

Tabel 3 Hasil Uji Tukey Post-Hoc Gen Target-CT Gen *House Keeping* dengan Perlakuan Brokoli

Perlakuan	Δ CT			Rata-rata*
	1	2	3	
Kontrol	11,92	11,59	10,72	11,41 ^b
50 μ g/mL	10,77	10,74	10,59	10,70 ^b
25 μ g/mL	8,76	7,04	6,96	7,59 ^a

Keterangan: *rata-rata hasil dianalisis menggunakan uji Tukey *post-hoc*, $p < 0,05$. Perbedaan huruf kecil menunjukkan perbedaan signifikan antarperlakuan; Δ CT=CT gen target-CT gen *house keeping*

Tabel 4 Hasil Uji Tukey Post Hoc Δ CT (Selisih Δ CT₁- Δ CT₂) pada Perlakuan Brokoli

Perlakuan	Δ CT			Rata-rata*
	1	2	3	
Kontrol	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b
50 μ g/mL	-0,64	-0,67	-0,82	-0,71 ^b
25 μ g/mL	-2,65	-4,37	-4,45	-3,82 ^a

Keterangan: *rata-rata hasil dianalisis menggunakan uji Tukey *post-hoc*, $p < 0,05$. Perbedaan huruf kecil menunjukkan perbedaan signifikan antarperlakuan; Δ CT= Δ CT₁- Δ CT₂

sitotoksik. Sulforafan itu juga dapat menghambat progresi siklus sel, merangsang apoptosis, serta menghambat angiogenesis pada beberapa jenis sel kanker.²¹

Pemberian brokoli dengan konsentrasi 50 μ g/mL dan 25 μ g/mL ternyata meningkatkan ekspresi gen *NKG2D* sel-sel NK jika dibanding dengan kontrol. Hal ini menunjukkan pemberian brokoli meningkatkan aktivitas sel-sel NK dalam mencegah dan melawan sel-sel kanker. Ekspresi ligan *NKG2D* oleh sel target mampu memicu sekresi sitotoksitas sel NK dan ion interferon oleh sel NK serta pelepasan nitrogen oksida dan transkripsi faktor nekrosis tumor α (TNF- α) oleh makrofag.²⁰

Kandungan sulforafan yang terdapat dalam tanaman brokoli diketahui dapat meningkatkan aktivitas sel NK dan juga aktivitas sitotoksik sel yang bergantung pada antibodi.²² Penelitian lain memperlihatkan sulforafan menambah aktivitas sitotoksik sel-sel NK/sel-sel dendritik *co-cultures* melawan sel TRAMP pada mencit yang diinduksi sel-sel kanker. Hasil penelitian ini menunjukkan

Tabel 5 Hasil Uji Tukey Post-Hoc Perbandingan Level Ekspresi Gen *NKG2D* dengan Perlakuan Brokoli

Perlakuan	Ekspresi Gen <i>NKG2D</i>			Rata-rata*
	1	2	3	
Kontrol	0,00	0,00	0,00	0,00 ^b
50 μ g/mL	-0,64	-0,67	-0,82	-0,71 ^b
25 μ g/mL	-2,65	-4,37	-4,45	-3,82 ^a

Keterangan: *rata-rata hasil dianalisis menggunakan uji Tukey *post-hoc*, $p < 0,05$. Perbedaan huruf kecil menunjukkan perbedaan signifikan antarperlakuan; Δ CT= Δ CT₁- Δ CT₂

bahwa sel-sel NK diisolasi dari limpa mencit yang mendapat perlakuan sulforafan memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih baik dibanding dengan sel NK yang diisolasi dari kontrol dengan perbedaan yang signifikan. Efek ini berkorelasi terhadap peningkatan yang signifikan dalam hal produksi IL-12 oleh sel-sel dendrit yang diisolasi dari sumsum tulang yang diinduksi sulforafan dibanding dengan kontrol.²³

Penelitian lain memperlihatkan sulforafan menginduksi *reactive oxygen species* atau ROS yang memperantarai induksi *NKG2D* ligan pada *cell line* kanker manusia dan juga meningkatkan kerentanan sel kanker terhadap lisis sel yang dimediasi oleh sel NK. Ekspresi *NKG2D* ligan *MHC class I polypeptide-related sequence A* atau MICA dan *MHC class I polypeptide-related sequence B* (MICB) ditemukan bervariasi dalam 4 macam *cell line* tumor yang diuji (MCF7 <A549 <MDA-MB-231 <U937). Paparan dari sulforafan pada *cell line* mengakibatkan induksi diferensial ligan tersebut dan mengakibatkan meningkatnya kerentanan sel-sel kanker yang memiliki antibodi MICA/MICB oleh sel-sel NK. Hasil penelitian yang memperlihatkan sulforafan menginduksi ROS yang memperantarai induksi *NKG2D* ligan pada *cell line* kanker manusia dan meningkatkan kerentanan sel kanker terhadap lisis sel yang dimediasi oleh sel NK menunjukkan bahwa sulforafan memiliki potensi imunoterapi untuk digunakan dalam terapi kanker.²⁴ Pemicu ekspresi *NKG2D* ini merupakan suatu metode baru untuk meningkatkan respons imun secara *in vivo*.²⁵

Simpulan

Brokoli meningkatkan aktivitas sel NK dengan ekspresi gen reseptor *NKG2D*. Dengan demikian, brokoli akan bermanfaat dalam mencegah dan melawan sel-sel kanker.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kepada Direktur Riset dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi yang telah mendanai penelitian ini melalui skema Hibah Bersaing tahun 2016.

Daftar Pustaka

1. World Health Organization (WHO). Cancer. 2010 [diunduh 11 November 2016]. Tersedia dari: <http://www.who.int/cancer/en/>.

2. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Depkes RI). Riset kesehatan dasar (Riskesdas) 2007. Jakarta: Depkes RI; 2008.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.
4. Raffaghello L, Prigione I, Sheen TS, Tsai CW, Golub TR, Thorley-Lawson DA. Epstein-barr virus encoded LPM2A induces primary epithelial cell migration and invasion possible role in nasopharyngeal metastasis. *J Virol*. 2005;79(24):1540–4.
5. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, dkk. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*. 2005; 434(7035):864–70.
6. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, dkk. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*. 2005;434(7035):907–13.
7. Shikawa T, Zhang SS, Qin X, Takahashi Y, Oda H, Nakatsuru Y, dkk. DNA repair and cancer: lesson from mutant mouse models. *Cancer Sci*. 2004;95(2):112–7.
8. Attardi LD. The role of p53-mediated apoptosis as a crucial anti-tumor response to genomic instability; lesson from mutant mouse models. *Mutat Res*. 2005;569(1–2):145–7.
9. Raulet DH. Roles of the *NKG2D* immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(10):781–90.
10. El-Gazzar A, Groh V, Spies T. Immunobiology and conflicting roles of the human *NKG2D* lymphocyte receptor and its ligands in cancer. *J Immunol*. 2013;191(4):1509–15.
11. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:39–85.
12. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the *NKG2D* receptor. *Nature*. 2005;436(7054):1186–90.
13. Gasper AV, Al-Janobi A, Smith JA, Bacon JR, Fortun P, Atherton C, dkk. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and metabolism of sulforaphane from standard and high-glucosinolate broccoli. *Am J Clin*

- Nutr. 2005;82(6):1283–91.
14. Khiong K, Darsono L, Yolanda R. Sulforaphane prevents colitis-associated cancer by inducing phase II enzymes activity of liver detoxification. *JKM*. 2011;11(1):64–9.
 15. Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P. Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10(5):501–8.
 16. Li Y, Zhang T, Korkaya H, Liu S, Lee HF, Newman B, dkk. Sulforaphane, a dietary component of broccoli/broccoli sprouts, inhibits breast cancer stem cells. *Clin Cancer Res*. 2010;16(9):2580–90.
 17. Raulet DH, Guerra N. Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(8):568–80.
 18. He S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, dkk. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*. 2004;21(3): 367–77.
 19. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, dkk. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011;331(6013):44–9.
 20. 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(2):119–26.
 21. Clarke JD, Dashwood RH, Ho E. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Lett*. 2008;269(2):291–304.
 22. Thejass P, Kuttan G. Augmentation of natural killer cell and antibody-dependent cellular cytotoxicity in BALB/c mice by sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate from broccoli through enhanced production of cytokines IL-2 and IFN-gamma. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2006; 28(3):443–57.
 23. Singh SV, Warin R, Xiao D, Powolny AA, Stan SD, Arlotti JA, dkk. Sulforaphane inhibits prostate carcinogenesis and pulmonary metastasis in TRAMP mice in association with increased cytotoxicity of natural killer cells. *Cancer Res*. 2009;69(5):2117–25.
 24. Amin PJ, Shankar BS. Sulforaphane induces ROS mediated induction of NKG2D ligands in human cancer cell lines and enhances susceptibility to NK cell mediated lysis. *Life Sci*. 2015;126:19–27.
 25. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:413–41.