Archive of SID

شناسائی فاکتور ضد رشد سلول سرطانی پروستات (LNCaP)

نویسنده: دکتر محسن ابوالحسنی[1]

خلاصه

فاکتور ضد رشد سلولی جدیدی از سوپرناتانت محیط کشت دو لاین سلولی کارسینومای پروستات PC_2 و DU-۱۴۵ که وابسته به آندروژن نیستند جدا گردید. این فاکتور ضد رشد بطور اختصاصی از رشد لاین سلولی کارسینومای پروستات LNCaP که وابسته به آندروژن می باشد جلوگیری بعمل آورد. ولی، در توقف رشد سایر لاین های سلولی از جمله سلول لوکمی انسان، سلول لنفومای T ، سلولهای ادنوکارسینومای انسان (سلولهای دهانه رحم، تخمدان و سینه) و همچنین لنفوسیت های نرمال خون محیطی انسان اثری ندارد. این فاکتور جدید مرگ سلولی یا اپوپتوسیس ایجاد نمی نماید ولی مانع ورود سلولهای LNCaP به فاز S سیکل رشد سلولی میشود. عمل ضد رشد این فاکتور قابل برگشت بوده و نسبت به هضم آنزیمی پروتیناز حساس می باشد. وزن ملکولی این فاکتور بین ۵۰ تا ۱۰۰ کیلو دالتون می باشد. آنتی بادی های خنثی کننده ضد سایتوکاین های شناخته شده از جمله، $IL-_6$ $IL-_1$, $IL-_2$, $IL-_3$, $IL-_4$, EGF, PDGF, TNF- α, TGF- $\beta_{1,2,3}$ اثری در فعالیت ضد رشد این فاکتور ندارد.

کلید واژه: سرطان پروستات، فاکتور ضد رشد، سلولهای سرطانی DU-۱۴۵, PC۳, LNCaP

سال ۱۳ / شماره ۵۱

مقدمه:

کارسینومای پروستات، از معمولترین سرطان مردان بالاتر از چهل سال می باشد و هر سال باعث مرگ بیش از سی هزار نفرمرد در ایالات متحده می شود. بیش از پنجاه سال است که درمان هورمونی از اساسی ترین روشهای درمانی برای سرطان متاستاتیک پروستات می باشد(۱). بیماران پس از واکنشهای اولیه بالاخره تومورهایی ایجاد می نمایند که به درمان هورمونی پاسخ نمی دهند و مقاوم می شوند. سایر معالجات از جمله اشعه درمانی ، جراحی و شیمی درمانی طول عمر بیماران مبتلا به کارسینومای متاستاز شده را افزایش نمی دهند. به همین دلیل، محققین به دنبال راه های درمانی متفاوتی هستند تا بتوانند از آنها در جلوگیری و درمان سرطان پروستات استفاده کنند.

مطالعات جدید نشان می دهد که مواد مختلفی می توانند رشد سلول های سرطان پروستات را کنترل نمایند. ویتامین D رشد سلول های سرطانی LNCaP را که در اثر اتصال پروتئین-۳ به

(۱) F.R.C.P دانشیار ایمونولوژی و عضو هیئت علمی انستیتو پاستور ایران

www.SID.ir

فاکتور رشد مشابه انسولین متوقف می کند (۲). چای سبز روی سلول های DU-۱۴۵ و Lncap علاوه بر اثر ضد رشد اپوپتوسیس نیز ایجاد می کند (۳). گیاه داروئی چینی (ZYD۸۸) باعث توقف رشد سلول های سرطانی پروستات می شود و با افزایش کاپیاز-۳ و قطعه قطعه شدن DNA سلول های Lncap، مرگ سلولی ایجاد می نماید (۴). ترومبین نیز با غلظت یک واحد در میلی لیتر پس از اتصال به رسپتور PAR-۱ که در سطح سلول های DU-۱۴۵ و Lncap وجود دارد قادر است پس از ۷۲ ساعت رشد سلول ها را متوقف کند (۵). همچنین، پروتئین p۲۰۲ نیز که باعث تولید IFN می شود رشد سلول های پروستات را در فاز G۱ سیکل سلولی متوقف می کند (۶).

در معالجه سرطان، نتایج مطلوبی با ایمنو تراپی در مدلهای حیوانی بدست آمده است. گزارشات نشان می دهند که سایتوکاین های مانند TNF-α,β، (۷، ۸)، اینترفرونها (۹، ۱۰)، IL-۱ (۱۱) و TGF-β (۱۲) فعالیت ضد رشد دارند. TNF علیه چندین لاین سلولی سرطان پروستات in vito و in vivo اثر ضد رشد دارد (۱۳) و تزریق وریدی آن به موش NUDE که دارای تومورهای PC۳ زیر پوستی می باشد رشد اولیه این تومورها را متوقف می کند (۱۳). این فاکتور ضد رشد همراه با سورامین عمل سینرژیک قوی علیه لاین های سلولی پروستات انسان از جمله LNCaP و PC۳ دارد (۱۴). همچنین، تزریق توام IFN-γ و IFN-α با TNF اثرات ضد توموری آنرا in vivo و in vitro تقویت می نماید (۱۷-۱۵).

مطالعات نشان می دهند که لاین های سرطانی چندین فاکتور کنترل کننده رشد تولید و در محیط کشت سلول آزاد می نمایند و تا کنون بعضی از این فاکتورها خالص شده اند و بقیه هنوز در حال مطالعه می باشند (۱۲، ۲۳-۱۸). در این مقاله، سوپرناتانت محیط کشت چندین لاین سلولی مورد مطالعه قرار گرفت تا یک فاکتور ضد رشد شناسائی شد که قادر است بطور اختصاصی رشد سلولهای سرطانی را متوقف نماید بدون اینکه اثر نامطلوبی در سیستم ایمنی داشته باشد.

روش کار:

لاین های سلولی و جمع آوری سوپرناتانت کشت سلول:

لاین های کارسینومای پروستات انسان (DU-۱۴۵, PC۳ و LNCap)، همچنین سلولهای سرطانی خون انسان (HL-۶۰)، سلولهای T لیمفوما (Hut-۷۸) و لاین های ادنوکارسینومای انسانی از جمله سلولهای سرطانی دهانه رحم (C-۳۳A)، تخمدان (NIH:OVCAR-۳)، پستان (MDA-MB-۲۳۱) و سلولهای فیبروبلاست موش (۳T۳) از کمپانی (Type Culture Collection American) خریداری گردید. سلول سرطانی پروستات انسان (JCA-۱) از دکتر موراکی (۲۴) گرفته شد. این سلولها در محیط RPMI-۱۶۴۰ حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FCS) همراه با آنتی بیوتیک پنیسیلین (۱۰۰ واحد در میلی لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) کشت داده شدند. سلولها با کیت کمپانی Gen-Probe (ساندیه گو، آمریکا) تست شدند و همه فاقد مایکوپلاسم بودند. برای جمع آوری سوپرناتانت کشت سلولی، سلولها را ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگرد کشت داده و سوپرناتانت را بکمک سانتریفیوژ (۱۵ دقیقه در ۴۰۰xg) جدا کرده و سپس با فیلتر ۰/۲۵ میکرومتر صاف و برای تست توقف رشد سلولی بکار برده شدند.

تست رشد سلولی (cell proliferation assay):

$۴/۵ \times ۱۰^{۴}$ سلول در میلی لیتر را در خانه های دیش ۹۶ خانه ای کشت داده و سوپرناتانت را تا حجم نهائی ۲۰۰ میکرولیتر به آنها اضافه شدند. سلولها را ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده و در ۴ ساعت آخر کشت مقدار ۲ میکروکوری در میلی لیتر تایمیدین مارکه [۳H] به آنها اضافه شد. سلولها را به کمک تریپسین- EDTA از دیش جدا نموده و تایمیدین مارکه وارد شده در DNA سلول با scintilation counter اندازه گرفته شد.

آنتی بادیهای خنثی کننده سایتوکاین ها:

EGF, TGF-$\beta_{۲,۳}$ و آنتی بادیهای اختصاصی علیه TGF-$\beta_{۱,۲,۳}$, IL-۱, IL-۲, IL-۳, IL-۴, IL-۶ از کمپانی Genzyme آمریکا خریداری شدند. TNF-α و آنتی بادی علیه آن از کمپانی Endogen (آمریکا) و آنتی بادی ضد PDGF از (Collaborative Research) تهیه گردیدند. منوکلنال علیه TGF-$\beta_{۱,۲,۳}$ انسان (۳۰ میکروگرم در میلی لیتر) حدود ۰/۵ نانوگرم در میلی لیتر TGF-β را خنثی،

Archive of SID
www.SID.ir

آنتی بادی علیه IL-۱ انسان (۱:۲۰) یک واحد IL-۱ را خنثی، آنتی بادی علیه IL-۲ انسان ۲۰۰۰۰ واحد IL-۲ را خنثی، یک میلی لیتر منوکلنال ضد IL-۳ انسان ۵۰۰۰ واحد rIL-۳ را خنثی، یک میلی لیتر آنتی بادی ضد IL-۴ انسان، ۱۰۰۰ پیکوگرم در میلی لیتر IL-۴ را خنثی، یک میلی لیتر آنتی بادی ضد IL-۶ انسان، ۱۰۰۰۰ واحد IL-۶ را خنثی و یک میلی لیتر آنتی بادی ضد PDGF، ۵ نانوگرم در میلی لیتر PDGF را خنثی می کند. این آنتی بادیهای خنثی کننده با سوپرناتات کشت سلول با غلظتهای مختلف مخلوط شدند وپس از یک ساعت کشت در ۳۷ درجه، سلول LNCaP به آنها اضافه گردید.

آنالیز سیکل سلولی:

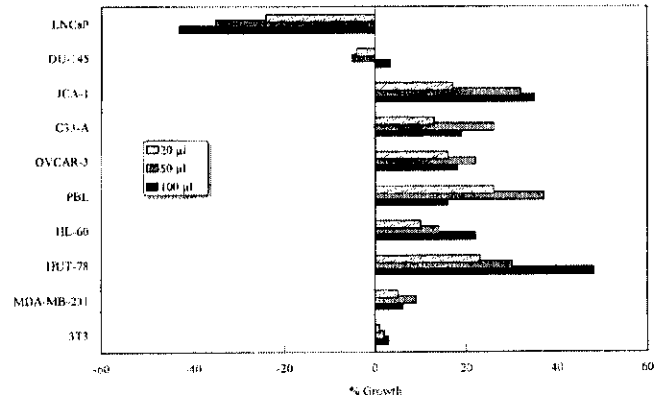
10×5^{5} سلول LNCaP در میلی لیتر در حضور یک میلی لیتر سوپرناتانت کشت PC۳ یا DU-۱۴۵ به مدت ۲ روز کشت داده شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر فسفات بافر، ۲۵۰ میکرولیتر RNase (از ۵۰۰ واحد در میلی لیتر) به سلولها اضافه گردید و پس از ۱۵ دقیقه، یک میلی لیتر پروپیدیوم آیوداید (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) به آنها افزوده شد. سلولها را پس از ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار دادن با فلوسایتومتر کمپانی Coulter مورد مطالعه قرار گرفت و سیکل سلولی مشخص گردید.

نتایج:

شناسائی فاکتور ضد رشد از سوپرناتانت کشت سلولی PC۳ و DU-۱۴۵ :

شکل ۱ اثر غلظتهای مختلف سوپرناتانت کشت سلولی PC۳ را در تکثیر سلولهای مختلف نشان میدهد. سوپرناتانت کشت سلولی PC۳ سنتز DNA سلول کارسینومای پروستات LNCaP را که وابسته به آندروژن می باشد بطور اختصاصی متوقف می نماید، ولی باعث تحریک رشد سایر سلولها می شود. مشابه این جواب با سوپرناتانت کشت سلول DU-۱۴۵ نیز به دست آمد. در تمام آزمایشات از محیط کشت (FCS ٪۱۰ + ۱۶۴۰-RPMI) بعنوان کنترل استفاده شد. با مصرف سوپرناتانت PC۳ و DU-۱۴۵ غلیظ شده (تا ۶۰۰ میکروگرم در هر آزمایش) حداکثر ۹۲٪ توقف رشد سلول LNCaP با سوپرناتانت PC۳ و ۷۶٪ توقف رشد با سوپرناتانت DU-۱۴۵ بدست آمد. ولی، سوپرناتانت های کشت سلولهای JCA-۱, C۳۳-A, OVCAR-۳ یا ۳T۳ روی سلولهای LNCaP اثر ضد رشد نداشتند. در این آزمایشات، سلولهای کنترل و سلولهای که به آن سوپرناتانت اضافه شده بودند بیشتر از ۹۷٪ زنده بودند

Archive of SID



شکل ۱- اثر سوپرناتانت PC۳ در کنترل رشد سلولهای مختلف. سلول در خانه های دیش ۹۶ خانه ای در حضور غلظت های مختلف سوپرناتانت PC۳ به مدت ۲ روز کشت داده شدند و سپس ماده رادیواکتیو وارد شده به سلول اندازه گیری شد. لنفوسیتهای خون محیطی (PBL) α در حضور مایتوژن PHA و سوپرناتانت PC۳ به مدت ۳ روز کشت داده شدند.

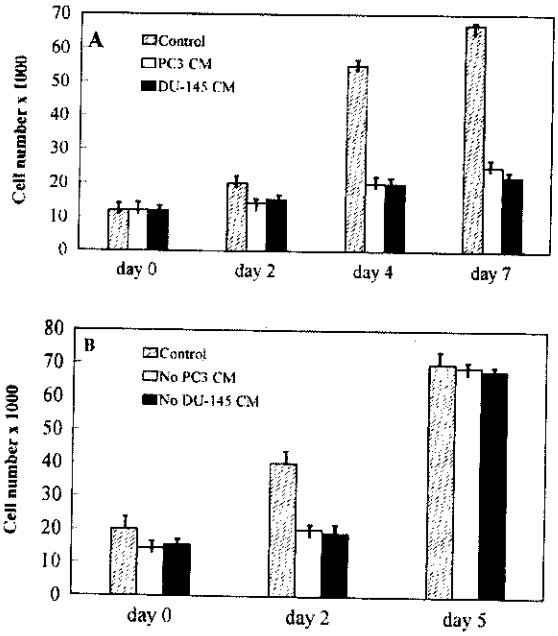
مطالعه سیکل سلولی:

جدول ۱ مطالعه سیکل سلولهای LNCaP را پس از اینکه دو روز در حضور سوپرناتانت PC۳ یا DU-۱۴۵ کشت داده شده بودند نشان می دهد. نتایج نشان می دهد که سوپرناتانت هر دو سلول توانستند رشد سلولهای LNCaP را در فاز G۰-G۱ سیکل سلولی متوقف نمایند و مانع ورود بعضی از این سلولها به فاز S

جدول ۱: فعالیت ضد رشد سوپرنانت PC ۳ و DU-۱۴۵ بر روی آنالیز سیکل سلولهای LNCaP

شرایط	فازهای سیکل سلولی (٪) G0 + G1	S	G2 + M
LNCaP	۷۲/۲	۱۴/۳۰	۱۳/۴۰
LNCaP + DU-145	۸۶/۰	۷/۶۷	۶/۲۴
LNCaP + PC3	۸۴/۷	۸/۲۹	۶/۹۷

www.SID.ir



شکل ۲- قسمت A، سلولهای LNCaP در حضور ۱۰۰ میکرولیتر سوپرناتانت PC۳ و ۵۰ میکرولیتر سوپرناتانت DU-۱۴۵ به مدت ۷ روز کشت داده شد. در روزهای دوم و چهارم محیط کشت تعویض گردید. قسمت B، رشد دوباره سلولهای LNCaP را ۲۱ و ۵ روز پس از برداشتن سوپرناتانت نشان می دهد (LNCaP دو روز در حضور سوپرناتانت کشت داده شده بود).

شوند. سلولهای اپوپتوتیک (apoptotic) در ناحیه سلولهای اپوپتوتیک در فازهای سیکل سلولی دیده نشد. برای تعیین اینکه فعالیت ضد رشد قابل برگشت است یا نه، سلولهای LNCaP را به مدت ۲ روز در حضور سوپرناتانت PC۳ یا DU-۱۴۵ کشت داده شدند. پس از شستن سلولها، آنها را به مدت ۵-۲ روز دیگر فقط در محیط کشت بدون سوپرناتانت کشت داده شدند. شکل ۲ نشان می دهد که تعداد سلولهای LNCaP ۵ روز پس از برداشتن سوپرناتانت به اندازه تعداد سلولهای کنترل میرسد. این نتایج نشان می دهند که فعالیت ضد رشد سوپرناتانت سلولهای PC۳ و DU-۱۴۵ سایتواستاتیک (cytostatic) بوده و بعلت اثر سایتوتوکسیک نمی باشد.

اثر آنتی بادیهای خنثی کننده علیه فعالیت فاکتور ضد رشد:

برای تعیین اینکه آیا فعالیت ضد رشد سوپرناتانت سلولهای PC۳ و DU-۱۴۵ بعلت وجود سایتوکاین های شناخته شده می باشد یا نه، اثرات آنتی بادیهای خنثی کننده علیه سایتوکاین های IL-۴, IL-۳, IL-۲, IL-۱, EGF, PDGF, TNF-α, TGF-β ۱،۲،۳ و IL-۶ روی سوپرناتانت PC۳ و DU-۱۴۵ مورد مطالعه قرار گرفتند. جدول ۲ نشان می دهد که آنتی بادیهای خنثی کننده در غلظت نهائی خود قادر نیستند اثر متوقف کنندگی سوپرناتانت PC۳ و DU-۱۴۵ را بر روی سلولهای LNCaP خنثی نمایند. کم شدن فعالیت ضد رشد بوسیله آنتی بادی ضد IL-۴ بعلت فعالیت ضد رشد IL-۴ در سوپرناتانت نمی باشد زیرا افزودن IL-۴ تا ۱۰۰۰ واحد در میلی لیتر به محیط کشت سلول LNCaP باعث فعالیت ضد رشد نگردید.

برای تفکیک فعالیت ضد رشد PC۳ و DU-۱۴۵ از فعالیت ضد رشد TNF آزمایش زیر انجام شد. جدول ۳ نشان می دهد که TNF ۳۷٪ رشد سلولهای LNCaP را متوقف می نماید. این فعالیت ضد رشد کاملاً بوسیله آنتی بادی ضد TNF-α خنثی میگردد. برعکس، این آنتی بادی نتوانست فعالیت ضد رشد سوپرناتانت PC۳ و DU-۱۴۵ را خنثی نماید.

جدول ۴ نشان می دهد که اگر سوپرناتانت PC۳ یا DU-۱۴۵ همراه با TNF بکاربرده شود فعالیت ضد رشد افزایش پیدا می نماید. سوپرناتانت PC۳ (۱۰۰ میکروگرم) به تنهائی ۴۹٪ رشد

جدول ۲: اثر آنتی بادیهای خنثی کننده بر روی فعالیت ضد رشد سوپرناتانت PC۳ و DU-۱۴۵

آنتی بادی	محیط کشت	سوپرناتانت PC3	سوپرناتانت DU-145
None	٤٠١٦٠	١٧٣٢٦ (٥٦/٨)	٢٣١٠٠ (٤٢/٥)
Anti-IL-1 (5μ)	٤٦٠٠٩	٢٠٨٩٢ (٥٦/٦)	٢١٢٠٠ (٥٤)
Anti-IL-2 (5μl)	٤٣٣٥٧	١٧٢٥٣ (٦٠/٢)	٢٣٨٠٠ (٤٥/١)
Anti-IL-3 (2μl)	٣٩٠٢٤	١٨١٥١ (٥٣/٥)	٢٤٧٠٠ (٣٦/٥)
Anti-IL-4 (1μl)	٤٠٠٢٢	٢٥٥٩٥ (٣٦)	٢٦٨٠٠ (٣٣)
Anti-IL-6 (2μl)	٥٥٣٣٢	٢٠٤٣٣ (٦٣)	٣٢٢٠٠ (٤١/٨)
Anti-PDGF (2μl)	٤٢٠٩٢	١٧٠٥٢ (٥٩/٥)	٢٥١٠٥ (٤٠/٣)
Anti-TGF-β (4μl)	٤١٥٦٣	٢٠٠٠٢ (٥١/٨)	١٩٨٦٥ (٥٢/٢)
Anti-TNF-α (5μl)	٤٣٧٨٩	١٧٠٣٢ (٦١/١)	٢٣٤١٢ (٤٦/٥)

۵۰ میکرولیتر سوپرناتانت PC3 و ۱۰ میکرولیتر سوپرناتانت DU-145 با آنتی بادیهای خنثی کننده مختلف به مدت یکساعت مجاور گردید و سپس به سلولهای LNCaP اضافه شد و ٤٨ ساعت کشت داده شدند. اعداد داخل پرانتز نمایانگر درصد توقف رشد سلول می باشد و میانگین ۳ آزمایش مستقل است.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۳: اثر آنتی بادی ضد TNF-α بر روی فعالیت ضد رشد سوپرنانت PC۳ و DU-۱۴۵

شرایط	cpm	در صد توقف رشد
Control medium	٤٣٧٠٧	-
TNF-α (250 U)	٢٧٤٥٨	٣٧/١٠
Anti-TNF-α (5 µl)	٤٣٠٢٠	١/٦٠
TNF-α (250 U) + anti-TNF-α (5 µl)	٤٤٨٠٣	-٢/٥٠
PC3 Supernatant (50 µl)	٢٢٠٥٠	٤٢/٨٠
PC3 supernatant (50 µl) + anti-TNF-α (5 µl)	٢٣٠١٥	٤٧/٤٠
Du-145 supernatant (20 µl)	١٩٠٤٦	٥٦/٥٠
Du-145 supernatant (20 µl) + anti-TNF-α (5 µl)	١٧٠٠٧	٦١/١٠

جدول ۴: اثر مضاعف فعالیت ضد رشد TNF-α به فعالیت ضد رشد سوپرنانت PC۳ و DU-۱۴۵

شرایط	cpm	در صد توقف رشد
Control medium	٧٣٨٠٣	-
PC3 supernatant (50 µl)	٣٧٥٤٠	٤٩/١
DU-145 supernatant (50 µl)	٢٨٥٠٤	٦١/٤
TNF-α (250 U)	٤٤٨١١	٣٩/٣
PC3 supernatant (50 µl) + TNF-α (250 µl)	٨٥٩٥	٨٨/٣
Du-145 supernatant (59 Ul) + TNF-α (250 U)	٣٩٨٧	٩٥/٦
PC3 supernatant (50 µl) + DU-145 supernatant (50 µl)	٢٦٧٦٢	٦٣/٧

سلول LNCaP را متوقف می نماید و یک میکرولیتر TNF (۲۵۰واحد) به تنهائی قادر است ۳۹٪ رشد سلولهای LNCaP را متوقف کند. با افزودن هم زمان سوپرناتانت PC۳ و TNF (با همان غلظت قبلی)باعث افزایش توقف رشد سلولهای LNCaP تا۸۵٪ می شود. این افزایش فعالیت ضد رشد باسوپرناتانت DU-۱۴۵ نیز دیده شد. بر خلاف عمل TNF ، افزودن توام سوپرناتانت PC۳ و DU-۱۴۵ به سلولهای LNCaP باعث افزایش توقف رشد نمیشود (جدول ۴). این نتایج نشان می دهند که فاکتور ضد رشد PC۳ و DU-۱۴۵ ممکنست مشابه باشند، ولی مکانیسم عمل آنها با مکانیسم ضد رشد TNF ممکنست متفاوت باشد.

ماده فعال ضد رشد پروتئین است زیرا فعالیت ضد رشد آن بوسیله آنزیم پروتئیناز در مدت ۵ساعت در ۳۷ درجه کاملا" از بین میرود. برای تعیین وزن ملکولی تقریبی این فاکتور از فیلترهای آمیکون با وزن ملکولی متفاوت استفاده شد. فاکتور ضد رشد از فیلتر ۱۰۰ کیلو دالتونی عبور نمود ولی روی فیلتر ۵۰ کیلو دالتونی باقی ماند که نشان می دهد وزن ملکولی فاکتور ضد رشد بین ۵۰ تا ۱۰۰ کیلو دالتون می باشد.

Archive of SID

بحث:

در این مقاله، یک فاکتور جدید ضد رشد در سوپرناتانت دو لاین سرطانی پروستات غیر وابسته به آندروژن (PC۳ و DU-۱۴۵) شناسائی شد که بطور اختصاصی رشد سلولی لاین سرطان پروستات وابسته به آندروژن (LNCaP) را متوقف میکند. فعالیت ضد رشد قابل برگشت بوده زیرا ۵ روز پس از برداشت ماده متوقف کننده رشد، تعداد سلولها به حد معمول سلولهای کنترل می رسد. بنظر میرسد که فاکتور ضد رشد روی سنتز DNA سلول اثر میگذارد زیرا هر دو فاکتور قادرند رشد سلولهای LNCaP را در فاز G۰-G۱ سیکل سلولی متوقف نمایند. نتایج بدست آمده نشان میدهد که این فاکتور با عمل سایتواستاتیک خود رشد سلولی را متوقف می نماید ولی باعث مرگ سلول نمیشود.

مطالعات قبلی نشان داده اند که سلولهای کارسینومای پروستات قادرند چندین سایتوکاین را که روی رشد سلول اثر می گذارند تولید و به محیط کشت خود ترشح نمایند (۱۱، ۱۲، ۲۲، ۲۵، ۲۶). یکی از این سایتوکاینها که سلولهای PC۳ و DU-۱۴۵ تولید و ترشح می نمایند TGF-β می باشد (۱۲). این سایتوکاین در تنظیم مراحل مختلف رشد سلول، تمایز و اعمال آن نقشی ایفا می نماید. TGF- β برای بعضی سلولها محرک رشد و برای برخی دیگر متوقف کننده رشد می باشد. برخلاف رل متوقف کنندگی TGF-β ، سایتوکاین TGF-α رشد تومورهای پروستات را که این ماده را ترشح می نمایند افزایش می دهد (۲۳، ۲۶). نتایج بدست آمده در این مقاله نشان می دهد ک ماده متوقف کننده رشد، TGF- نمی باشد زیرا وزن ملکولی TGF ۵۲ کیلو دالتون است و وزن ملکولی فاکتور ضد رشد بیش از ۵۰ کیلو دالتون می باشد. همچنین، آنتی بادی ضد TGF-β قادر به خنثی نمودن فعالیت ضد رشد نمیشود. فاکتور ضد رشد IFN-β نیست زیرا سلولهای LNCaP نسبت به آن مقاوم هستند (۲۷). بعلاوه، وزن ملکولی هر دو IFN-α , IFNβ کمتر از ۲۵ کیلو دالتون است.

گزارشات نشان میدهند که TNF مستقیماً برای اکثر سلولهای سرطانی سایتوتوکسیک بوده، ولی سلولهای غیرسرطانی نسبت

www.SID.ir

به لیز وابسته به TNF مقاوم می باشند (۲۹،۲۸) TNF- α . برای هر سه لاین سلولی پروستات (PC$_3$, DU-145, LNCaP) سایتوتوکسیک است، ولی نه برای سلولهای اپیتلیال یا استرومال (۱۳، ۱۵). نتایج بدست آمده در این مقاله فعالیت ضد رشد TNF-α را روی سلولهای LNCaP تائید می نماید، ولی اطلاعات بدست آمده از آنتی بادی ضد TNF و افزایش فعالیت ضد رشد هنگامی که TNF-α همراه با سوپرناتانت ها نشان می دهد که فعالیت ضد رشد PC3 و DU-145 بعلت وجود TNF- α نمی باشد. این فاکتور ضد رشد از سایتوکاین های IL-$_1$, IL-$_2$, IL-$_3$, IL-$_4$, EGF, IL-$_1$ و IL-$_6$ نیز متمایز می باشد. این سایتوکاین ها همگی دارای وزن ملکولی کمتر از ۲۶ کیلو دالتون هستند و آنتی بادی خنثی کننده آنها نیز فعالیت ضد رشد را از بین نمی برد. این نتایج نشان می دهد که فاکتور ضد رشد شناسائی شده جدید می باشد و ممکنست همراه با TNF یا سایر مواد متوقف کننده رشد (۶-۲) برای از بین بردن سلول های سرطانی مفید باشد. تعیین مکانیسم عمل این فاکتور ضد رشد به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

Archive of SID

References:

1- Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer.I. The effect of castration of estrogen snf og snftohrn injrvyion on serum phosphatases in metasatic crcinoma of the prostate. *Cancer Res. 1941; 1: 293-297.*

2- Peehl DM, Krishnan AV, Feldman D. Pathways medicating the growth-inhibitory actions of vitamin D in prostate cancer. *J Nutr. 2003, 133 (7 Suppl): 2461S-2469S.*

3- Adhami VM, Ahmad N, Mukhrar H. Molecular targets for green tea in prostate cancer prevention. *J Nutr. 2003, 133(7 Suppl): 2417S-2424S.*

4- Zhu YS, Huang Y, Car LQ, et al. The Chinese medicinal herbal formula ZYD88 inhibits cell growth and promotes cell apoptosis in prostatic tumor cells. *Oncol Rep. 2003 10(5): 1633-1639.*

5- Liu J, Bastian M, Kohlschein P, et al. Expression of functional protease-activated receptor 1 in human prosate cancer cell lines. *Urol Res. 2003 31(3): 163-168.*

6- Wen Y, Giri D, Yan DH, et al. Prostate-specific antitumor activity by probasin promoter directed p202 expression. Mol Carcinog. 2003 37(3): 130-137.

7- Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, et al. Recombinant human tumor necrosis factor: Efects on proliferation of normal and trasformed cells in vitro. *Science 1985; 230: 943-945.*

8- Schmid DS, Tite JP, Ruddle NH, DNA fragmentation: Manifestation of target cell destruction mediated by cytotoxic T-cell lines lymphotoxin -secretubg gekoer T-cell clones, and cell-free lymphotoxin-containing supernatant. *Proc. Natl. Acad, Sci. U.S.A. 1986;83:1881-1885.*

9- De Maeyer E, De Maeyer-Guignad J, In Interferons and other requlatory cytokines. De Maeyer E, and De maeyer-Gignard J, eds. John Wiley, New York, 1988, pp. 134-153.

10- Sica G, Fabbroni L, Castagnetta L, et al. Antiproliferative effects of interferons on human prostate carcinoma cell lines. *Urol. Res. 1989; 17-111-115.*

11- Onozaki K, Urawa H, Tamatami T, et al. Synergistic interactions of interleukin 1, Inerferon-β, and tumor necrosis factor in terminally differentiating a mouse myeloid leukemic cell line (MI). *J. Immunol. 1988; 140:112-119.*

12- Wilding G, Zugmeier G, Knabbe C, et al. Differential effects of transforming growth factor βon human prostatic cancer cells in vitro. Molecul. Cellul. *Endocrinol. 1989; 62: 79-87.*

13- Sherwood ER, Le C, et al. Therapeutic efficacy of recombinant tumor necrosis factor in an experimental model of human prostatc carcinoma. *J. Biol. Response Mod. 1990; 9:44-52.*

14- Fruehauf JP, Myers CE, Sinha BK, Synergistic activity of suramin with tumor necrosis factor and doxorubicin on human prostate caner cell liner. *J. National Cancer Inst. 1990; 82:1206-1202.*

15- Van Moorselaar RJA, van Stratum P, Borm G, et al. Differential antiproliferative activities of alpha - and gamma-interferon and tumor necrosis factor alone or in combinations against two prostate cancer xenografts trasplanted in nude mice. *The prostate 1991: 18;331-334.*

16- Van Moorselaar RJA, Beniers AJMC, Hendriks

www.SID.ir

BTH, et al. In vivo antiproliferative effects of gamma-interferon and tumor necrosis factor alpha in a rat renal cell carcinoma model system. *J. Urol. 1990; 143: 1247-1251.*

17- Baisch H, Otto U, Klppel G, Antiproliferative and cytotoxic effects of single and combined treatment with tumor necrosis factor alpha and/or alpha interferon on a human renal cell carcinoma transplanted into nu/nu mice: cell kinetic studies. *Cancer Res. 1990; 50:6389-6395.*

18- Abolhassani M, muraki J, Chiao JW, Purification of a suppressor lymphokine (SL) from a human T cell line. Immunol. *Invest. 1989; 18:741-751.*

19- Abolhassani M, Chiao JW, Purification and characterization of a human leukemia cell derived immunowsuppressive factor. Prep. *Biochem. 1991; 21:25-33.*

20- Abolhassani M, Chiao JW, Identification of a co-stimulator factor for human T cell proliferation. *Cancer Let. 1991; 56:71-76.*

21-Perker VS, Mohan S, Baylink DJ, et al. An inhibitory insulin-like growth factor binding protein (In-IGFBP) from human prostatic cell conditioned medium reveals N-terminal sequence identity with bone-derived In-IGFBP. *J. Clin. Endovrional. Metab. 1990;71:533-535.*

22- Perkel VS, Mohan S, Herring SJ< et al. Human prostatic cancer cells, PC3, elaborate mitogenic activity which selectively stimulated human bone cells. *Cancer Research, 1990; 580:6902-6907.*

23- Hofer DR, Sherwood EF, Bromberg WD, et al. Autonomous growth of anreogen indpendent human prostatic carcinoma cells: role of transforming growth factor *Cancer res. 1991; 51:2780-2785.*

24- Muraki J, Addonizio JC, Choudhury MS, et al. Establishment of new human prostatic cancer cell line (JCA-1). *Urology 1990;36:79-84.*

25- Nakamoto T, Chang, CS, Li AK, et al. Basic fibroblast gowth factor in human prostate cancer cells. *Cancer res. 1992;52:571-577.*

26- Kim JH, Sherwood ER, Sutkowski DM, et al. Inhibition of prostatic tumor cell proliferation by suramin: alterations in TGF alpha-medicated autocrine growth regulation and cell cycle distribution. *J. Uol. 1991; 146:171-176.*

27- Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res. 1983;43:1809-1818.*

28- Creasey A, Doyle LV, Reynolds MT, et al. Biological effects of recombinant human tumor necrosis factor and its novel muteins on tumor and normal cell lines. *Cancer res. 1987;47:145-149.*

29- Haranaka K, Satomi N, Cytotoxic activity of tumor necrosis factro on human cancer in vitro. Jpn. *J.Exp. Med. 1981; 51:191-194.*

30- Abolhassani M, Tillotson JK, Chang J, t al. Regulation of human lymphocyte proliferation by a tumour cel-derived DNA fraction. *Immunol and Cell Biol. 1991; 69:377-385.*

31- Abolhassani M, Tillotson JK, Chiao JW, Characterization of the release of DNA by a human leukemia cell line HL-60. *Int.J.Oncology 19944:417-421.*

Archive of SID
www.SID.ir

Abstract

Identificaion of a factor inhibiting prostate cancer cell line (LNCaP)

Archive of SID

Authors: Dr. Mohsen Abolhasani (Ph.D.)[1]

A new antiproliferative activity from the conditional medium of two androgen-independent prostatic cancer cell lines, PC3 and DU-145, was identified. This antiproliferative activity selectively inhibited cell proliferation of an androgen-dependent prostate cancer cell line LNCaP in a dose dependent manner. No antiproliferative activity was observed against mouse fibroblast 3T3, normal human lymphocytes, human leukemic cells including promyelocytes HL-60 and T-cells HUT-78, or human adenocarcinoma cell lines, including prostatic cells JCA-1, ovary NIH: OVCAR-3, cervix C-33A and breast MDA-MB-231. Cell cycle analysis revealed that the antiproliferative activity did not induce apoptosis in LNCaP cells, but it prevented some of G1 LNCaP cells from entering into the S-Phase of the cell cycle. The antiproliferative activity was sensitive to protease digestion and its approximate molecular weight was between 50-100 kDa by Amicon filters. The antiproliferative activity was not affected by neutralizing antibodies against TGF- $b_{1,2,3}$ TNF-a, PDGF, EGF, IL-$_1$, IL-$_2$. IL-$_3$, IL-$_4$, or IL-$_6$.

Key words:Prostate cancer, Anti Growth factor, Cancer cells Du-145, Pc3, LNCaP

1- Associate Professor in Pasteur Institute of Iran

www.SID.ir