

نقش گیرنده آدنوزین A_3 در سیتوتوکسیسیتی رده های سلولی سرطان پستان

مجتبی پنجه پور^۱، فاطمه کریمی تهرانی^۱، محسن کریمی^۲

۱- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی، آزمایشگاه بیوشیمی سرطان

۲- انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی

چکیده

نوکلئوزید آدنوزین در تمامی سلول ها و مایعات فیزیولوژیک وجود داشته و تولید آن از مسیرهای متابولیک داخل و خارج سلول پدیده ای وابسته به انرژی بوده که در نهایت منجر به افزایش غلظت خارج سلولی آدنوزین می شود. اثرات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و فارماکولوژیک آدنوزین خارج سلولی توسط گیرنده های آدنوزین (P1-purinergic receptors) اعمال می شود. اگر چه این گیرنده ها در سلول های نرمال و سرطانی گزارش شده اند، ولی تاکنون حضور و نقش آنها در سلول های سرطان پستان مورد مطالعه قرار نگرفته است که تحقیق حاضر به این مهم پرداخته است.

رده های سلولی MCF-7 و MDA-MB468 در محیط کشت RPMI-1640 در حضور غلظت های مختلف آگونیست اختصاصی IB-MECA و آنتاگونیست اختصاصی MRS-1220 گیرنده آدنوزین A_3 در زمان های مختلف کشت داده و با استفاده از تست MTT پاسخ سلول بررسی می گردد. بیان گیرنده های آدنوزین در سطح mRNA توسط تکنیک RT-PCR نشان داده می شود.

نتایج نشان می دهد که IB-MECA در غلظت های بالاتر از ده میکرومولار باعث افزایش مرگ سلولی می شود ($P < 0.05$). استفاده از آنتاگونیست MRS-1220 باعث تعدیل اثر سیتوتوکسیسیتی آگونیست IB-MECA می گردد. نتایج تکنیک RT-PCR که وجود mRNA را نشان می دهد تایید دیگری بر وجود گیرنده های A_3 است. یافته های این تحقیق اهمیت نقش آدنوزین در افزایش مرگ سلولی در سرطان پستان که به ویژه از طریق گیرنده A_3 اعمال می شود را برای اولین بار مورد توجه قرار می دهد.

واژه های کلیدی: گیرنده آدنوزین، A_3 ، سرطان پستان، MCF-7، MDA-MB-468، RT-PCR.

مقدمه

[۱ و ۲]. افزایش غلظت آدنوزین خارج سلولی دارای اثرات بیوشیمیایی، فارماکولوژیک و فیزیولوژیک ویژه ای می باشد و از طریق گیرنده های آدنوزین که در سطح سلول هستند اعمال می شود. این گیرنده ها از دسته گیرنده های متصل

آدنوزین، نوکلئوزید آدنین، در اثر هیدرولیز نوکلئوتید های آدنین (ATP) و (ADP) توسط نوکلئوتیداز ها حاصل می شود. همچنین آدنوزین از طریق واکنش های آنزیمی داخل سلولی از S-آدنوزیل هوموسیستئین بدست می آید

اختصاصی MRS-1220 ($K_i=0.65\text{nM}$) [۱۲] در تکثیر و رشد این سلول ها در کنار استفاده از تکنیک مولکولی (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain RT-PCR Reaction) برای تعیین بیان گیرنده A₃ در داخل سلول ارایه می گردد.

مواد و روش ها

رده های سلولی و شرایط کشت: رده های سلولی سرطان پستان (MCF-7 و MDA-MB-468) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید و در محیط کشت RPMI-1640 (Gibco) محتوی ده درصد سرم جنین گاوی، پنی سیلین ۱۰۰ U/ml و استرپتومایسین ۱۰۰ g/ml کشت داده شد. سلول ها در انکوباتور حاوی ۵٪ CO₂، ۹۵٪ هوا، ۹۵٪ رطوبت و دمای ۳۷ درجه قرار داده شدند. محیط کشت سلول ها بر حسب نیاز و به طور میانگین هر سه روز یک بار تعویض و زمانی که به ۸۵٪ confluency می رسید پاساژ داده شدند.

تیمار سلول ها با داروها: سلول ها در پلیت های ۹۶ خانه ای با دانسیته سلولی ۳۰۰۰۰ سلول بر میلی لیتر کشت داده شد، پس از ۲۴ ساعت محیط کشت با محیط جدید محتوی غلظت های مختلف آگونیست اختصاصی MRS-1220 (هر دو از شرکت Sigma) تعویض و انکوباسیون در زمان های ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام گردید (زمان ۴۸ ساعت به عنوان بهترین زمان برای آزمایشات بعدی انتخاب گردید). در بررسی توام آگونیست و آنتاگونیست، آنتاگونیست ۳۰ دقیقه قبل از آگونیست به محیط کشت سلول ها اضافه گردید و سپس آگونیست اضافه شد.

سنجش تکثیر سلولی: به منظور ارزیابی تاثیر آگونیست و آنتاگونیست مورد مطالعه بر رشد سلولی از تست MTT

به G-پروتئین ها هستند و در چهار زیر گروه قرار دارند: گیرنده های A1 به Gi و A₃ به Gq کوپل می شوند که مستقل از تغییرات درون سلولی غلظت آدنوزین و فعال شدن آن ها منجر به کاهش cAMP داخل سلولی می شود، در صورتی که گیرنده های A2A و A2B به Gs کوپل هستند و با فعال کردن آدنیلات سیکلاز مقدار cAMP را افزایش می دهند [۴-۱]. وجود گیرنده های آدنوزین A2A، A2B و A1 قبل از کلون شدن آن ها به اثبات رسیده بود، در صورتی که وجود A₃ همزمان با کلونینگ آن ابتدا از رت و سپس از انسان مشخص گردید [۵].

اثرات cardioprotective در قلب در حالات هیپوکسی [۱]، neuroprotective در سیستم اعصاب مرکزی از طریق سرکوب آزادسازی نوروترانسمیترها [۲ و ۱]، اثر ضد التهاب از طریق مهار آزادسازی سیتوکین ها [۶]، تجمع پلاکت ها [۷] و تنظیم فعالیت لئوسیت ها در سیستم ایمنی [۸] از جمله تاثیرات وسیع آدنوزین از طریق گیرنده A₃ می باشد.

یکی از مهمترین اثرات آدنوزین تحریک رشد و تکثیر سلولی [۹ و ۱] (proliferation) و همچنین تحریک سیتوتوکسیسیته و مرگ سلولی از نوع apoptosis در سلول های طبیعی و سرطانی است [۴]. نوع پاسخ سلولی به تکثیر یا آپوپتوز وابسته به نوع سلول، تنوع و میزان گیرنده آدنوزین در سطح سلول است [۱۰ و ۱]. یافته های محققین در مورد افزایش غلظت آدنوزین خارج سلولی در بافت های سرطانی solid [۹ و ۱۱] ما را بر آن داشت تا به بررسی گیرنده های آدنوزین در رده های سلولی سرطان پستان (MCF-7 و MDA-MB-468) بپردازیم. استفاده از لیگاند های اختصاصی A₃ اطلاعات مهمی را در مورد نقش پاتوفیزیولوژی این دسته از گیرنده ها نشان می دهد [۱۰]. در تحقیق حاضر نقش ویژه گیرنده A₃ با استفاده از آگونیست اختصاصی IB-MECA ($K_i=1.1\text{nM}$) و آنتاگونیست

برنامه استفاده شده به صورت (°C ۹۴، ۳۰ ثانیه) Denaturation، (°C ۵۹/۵، ۳۰ ثانیه) Annealing و Polymerization، به تعداد ۴۰ چرخه بود (°C ۶۸، ۲ دقیقه) PCR به دست آمده بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز گردید و با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید (۰/۴ μg/ml) مورد بررسی قرار گرفت [۱۶].

محاسبات آماری و تحلیل داده ها: محاسبات آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) که با تست Dunnett تایید می شود و توسط نرم افزار Graphpad Prism 3.02 انجام گردید. آزمایشات به صورت تکرارهای سه تایی است که سه تا چهار بار جداگانه انجام شد. P<0.05 به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شده است. همه داده ها به صورت میانگین ± SD گزارش شده است.

نتایج

تیمار سلول های MCF-7 و MDA-MB-468 با آگونیست A₃، (IB-MECA) به مدت ۴۸ ساعت باعث کاهش تعداد سلول ها در مقایسه با کنترل گردید (تست MTT) که این کاهش وابسته به غلظت می باشد (شکل ۱ و ۲). محدوده غلظت های بکار رفته IB-MECA بین ۰/۰۰۱ تا ۱۰۰ μM می باشد. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود غلظتی از IB-MECA که باعث سیتوتوکسیسیتی در رده سلولی MCF-7 می شود از یک میکرومولار شروع و تا ۱۰۰ میکرومولار افزایش می یابد. به عبارت دیگر در محدوده غلظتی نانومولار آگونیست تاثیر معنی داری دیده نمی شود. ولی در رده سلولی MDA-MB-468 در غلظت ۰/۰۰۱ میکرومولار آگونیست (یک نانومولار) کاهش رشد دیده می شود (P<0.05).

استفاده شد [۱۰]. میزان سلول های زنده بر اساس توانایی میتوکندری در تبدیل ترکیب محلول MTT 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide به محصول نامحلول فورمازان و بررسی تغییرات رنگ سنجی مشخص گردید. میزان تاثیر مواد استفاده شده در القاء سیتوتوکسیسیتی یا تکثیر سلولی در پایان زمان انکوباسیون بررسی گردید. محلول MTT (غلظت نهایی ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) به محیط کشت اضافه و ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس محیط خارج و رسوب در ایزوپروپانول حاوی هشت صدم درصد HCL حل و جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. میزان جذب به طور مستقیم با تعداد سلول های زنده متناسب است. نتایج به صورت درصد نسبت به کنترل سنجیده و گزارش گردید.

جداسازی RNA سلولی و تکنیک RT-PCR:

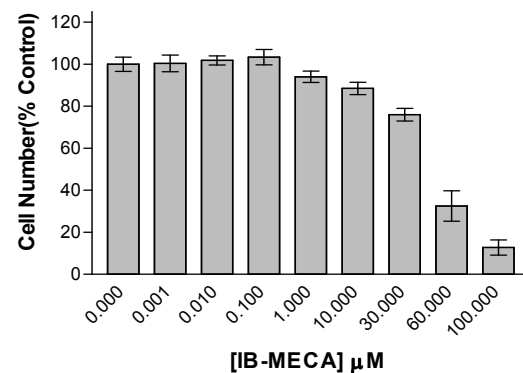
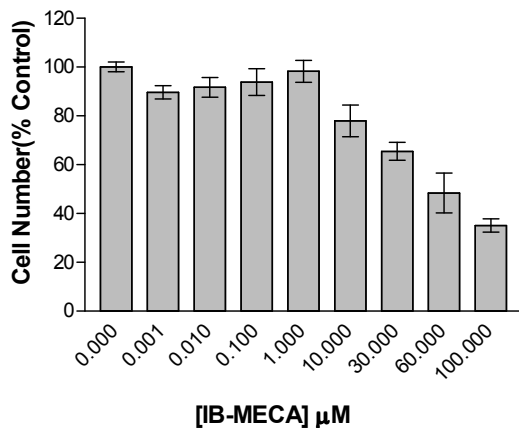
RNA سلولی با استفاده از متد acid guanidinium thiocyanate phenol استخراج گردید [۱۳]. واکنش نسخه برداری معکوس (Reverse Transcriptase) و PCR طبق گزارش Gessi و همکاران انجام گردید [۱۵ و ۱۴]. بطور کلی RNA استخراج شده با استفاده از آنزیم نسخه برداری معکوس (Roche) M-Mulv و با استفاده از پرایمر های شش تایی تصادفی (Random Hexamer) تبدیل به cDNA گردید. سپس یک توالی ۱۵۶ نوکلئوتیدی از ژن گیرنده آدنوزین A₃ با استفاده از پرایمر های تایید شده توسط Gessi و همکاران [۱۵ و ۱۴]:

5'-ACGGTGAGGTACCACAGCTTGTG-3'

(قطع forward) و

5'-ATACCGCGGGATGGCAGACC-3' (قطع reverse)

از cDNA بدست آمده و با استفاده از آنزیم Taq Polymerase تحت شرایط استاندارد تکثیر گردید.



شکل ۲- تاثیر IB-MECA در کاهش تعداد سلول های MDA-MB-468 پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون سلول ها در حضور غلظت های افزایشنده IB-MECA درصد سلول های زنده با روش MTT تعیین می گردد. نتایج بر اساس $MEAN \pm SD$ در مقایسه با کنترل به صورت در صد ارایه شده است ($n=12$). آنالیز داده ها به طریق ANOVA یک طرفه انجام و $P < 0.05$ معنی دار است. غلظت ها بر حسب میکرو مولار می باشد.

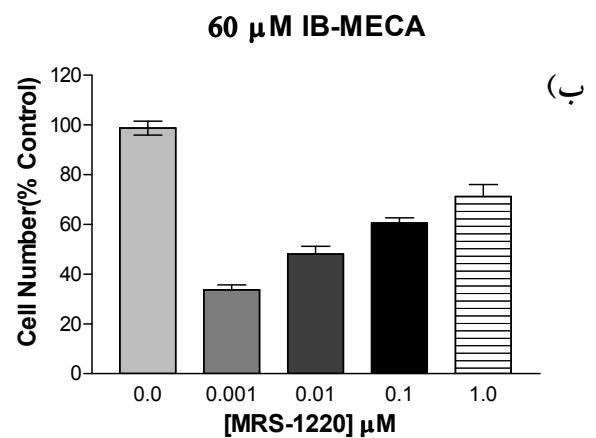
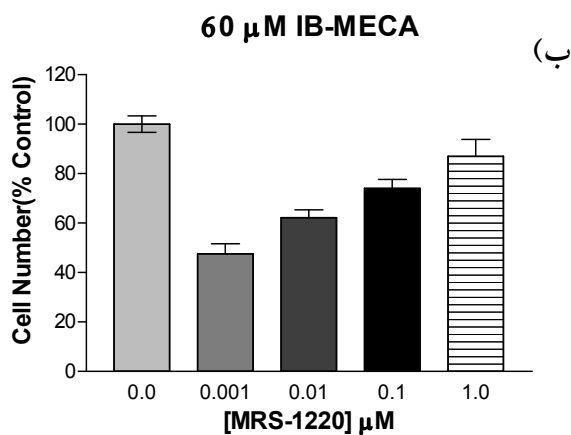
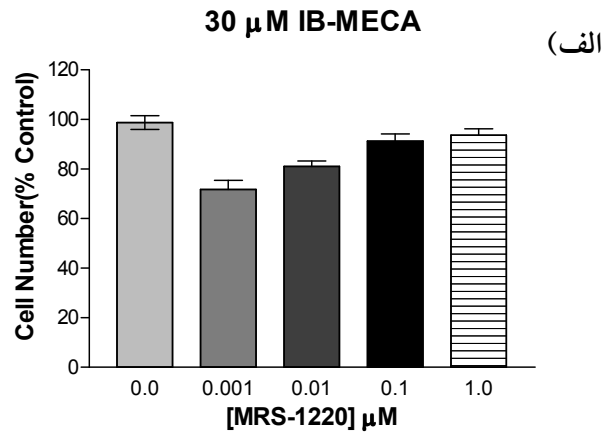
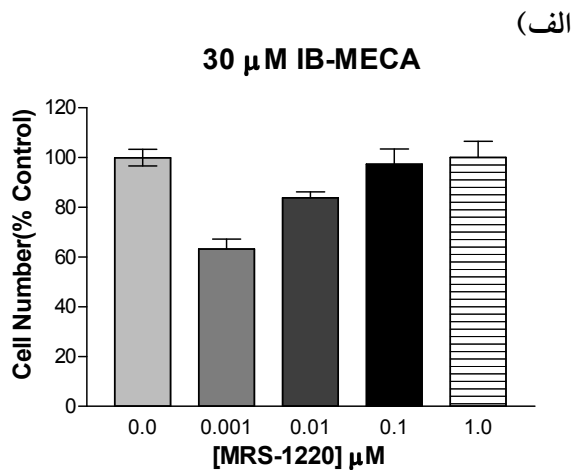
(در حضور غلظت ۶۰ میکرومولار IB-MECA) افزایش می یابد (شکل ۳ الف و ب). در رده سلولی MDA-MB-468 میزان رشد سلول از ۱۰۰ درصد به ۶۵ درصد در غلظت ۳۰ میکرومولار و به ۴۹ درصد در غلظت ۶۰ میکرومولار IB-MECA می رسد و این اثر توسط MRS-1220 ۰/۰۱ میکرومولار به ۶۲ درصد و ۰/۱ میکرومولار به ۷۷ درصد (در حضور غلظت ۶۰ میکرومولار IB-MECA) افزایش می یابد (شکل ۴ الف و ب).

به منظور تعیین بیان گیرنده A₃ آدنوزین در رده های سلولی سرطان پستان (MCF-7 و MDA-MB-468) توسط تکنیک RT-PCR از پرایمر های طراحی شده توسط Gessi و همکاران [۱۵ و ۱۴] استفاده شد. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز نشان می دهد که طول قطعه مورد نظر با طول پیش بینی شده از توالی مربوط به ژن A₃ و گزارش Gessi و همکاران مطابقت دارد و مؤید بیان این دسته از گیرنده های آدنوزین در هر دو رده سلولی سرطان پستان می باشد (شکل ۵).

شکل ۱ - تاثیر IB-MECA در کاهش تعداد سلول های MCF-7 پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون سلول ها در حضور غلظت های افزایشنده IB-MECA درصد سلول های زنده با روش MTT تعیین می گردد. نتایج بر اساس $MEAN \pm SD$ در مقایسه با کنترل به صورت در صد ارایه شده است ($n=12$). آنالیز داده ها به طریق ANOVA یک طرفه انجام و $P < 0.05$ معنی دار است. غلظت ها بر حسب میکرو مولار می باشد.

افزایش غلظت تا یک میکرومولار بدون اثر بوده و در غلظت های میکرومولار مجدداً کاهش تعداد سلول ها مشاهده می گردد (شکل ۲).

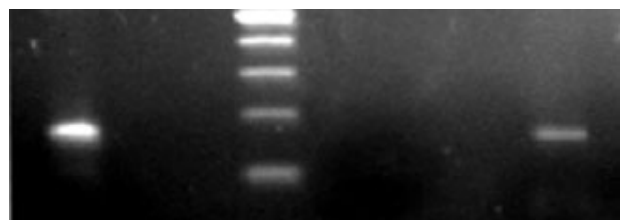
به منظور بررسی اثر آنتاگونیست در تعدیل اثر آگونیست، استفاده توام این لیگاندها و تاثیر آن ها بر روی رشد سلول ها مورد مطالعه قرار گرفت. ابتدا تاثیر مستقیم آنتاگونیست بر روی رده های سلولی مورد نظر نشان داد که آنتاگونیست (در محدوده غلظتی ۱ - ۰/۰۰۱ میکرومولار) به تنهایی اثری بر روی رشد سلول ها در مقایسه با کنترل ندارد (نتایج نشان داده نشده است)، سپس تاثیر آنتاگونیست در غلظت های ۳۰ و ۶۰ میکرومولار آگونیست مطالعه گردید (شکل ۳ و ۴). به عنوان مثال IB-MECA در غلظت ۳۰ میکرومولار میزان رشد سلول را از ۱۰۰ درصد به ۷۵ درصد و در غلظت ۶۰ میکرومولار به ۳۲ درصد در رده سلولی MCF-7 می رساند و این اثر توسط MRS-1220 ۰/۰۱ میکرومولار به ۵۰ درصد و ۰/۱ میکرومولار به ۶۰ درصد



شکل ۴- (الف و ب) تاثیر آنتاگونیست MRS-1220 در تعدیل پاسخ رده سلولی MDA-MB-468 به آگونیست IB-MECA سلول‌ها در غلظت ۳۰ میکرومولار آگونیست (الف) و ۶۰ میکرومولار آگونیست (ب) به همراه غلظت‌های مختلف آنتاگونیست کشت داده و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون درصد سلول‌های زنده تعیین می‌گردد. نتایج بر اساس $MEAN \pm SD$ ارائه شده است (n=۹). آنتاگونیست MRS-1220 به تنهایی تاثیر معنی‌داری بر روی سلول‌های مورد مطالعه ندارد.

شکل ۳- (الف و ب) تاثیر آنتاگونیست MRS-1220 در تعدیل پاسخ رده سلولی MCF-7 به آگونیست IB-MECA سلول‌ها در غلظت ۳۰ میکرومولار آگونیست (الف) و ۶۰ میکرومولار آگونیست (ب) به همراه غلظت‌های مختلف آنتاگونیست کشت داده و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون درصد سلول‌های زنده تعیین می‌گردد. نتایج بر اساس $MEAN \pm SD$ ارائه شده است (n=۹). آنتاگونیست MRS-1220 به تنهایی تاثیر معنی‌داری بر روی سلول‌های مورد مطالعه ندارد.

شکل ۵- محصول حاصل از PCR که بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز و با اتیدیوم برمایند رنگ آمیزی شده است. RNA سلولی تخلیص و برای RT-PCR استفاده گردید. ستون ۱ MDA-MB-468، ستون‌های ۲ و ۴ و ۵ کنترل‌های منفی، ستون ۳ (Fermantas) Marker (M.W. 100 bp, 200bp, 300bp, 400bp, 500bp) و ستون ۶ MCF-7.



بحث

(میکرومولار) باعث مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در این رده‌ها [۲۴] و همچنین سلول‌های ملانوما [۱] یا نکروز در نوروں‌ها [۲۳] می‌گردد.

نتایج ما نشان می‌دهد که اثرات سیتوتوکسیسته آگونیست در دو رده سلولی مورد مطالعه در دوزهای مختلف متفاوت است. علت این تفاوت را میتوان به نوع سلول MCF-7(ER⁺) و MDA-MB-468(ER⁻)، توزیع متفاوت گیرنده‌های آدنوزین که می‌تواند پاسخ سلول به گیرنده A₃ را تغییر دهد و همچنین تفاوت در میزان بیان گیرنده A₃ نسبت داد. در مواردی مانند استرس‌های هیپوکسی که در قسمت‌های مرکزی توده سرطانی بوقوع می‌پیوندد غلظت آدنوزین بشدت افزایش یافته [۹ و ۱۱] و باعث تاثیر بر روی رشد سلول‌های مجاور از طریق گیرنده‌های مربوطه می‌شود. اگرچه نقش گیرنده‌های آدنوزین در فرآیندهای رگ‌زایی و متاستاز مورد بحث است [۲] ولی نقش ویژه گیرنده A₃ بر روی مرگ و یا رشد سلول توجه زیادی را به عنوان یک هدف درمانی جلب کرده است [۹ و ۱۰]. مطالعه بر روی سلول‌های CHO و HEK293 که هر دو فاقد این گیرنده هستند نشان می‌دهد که اگر آن‌ها را با گیرنده A₃ ترانسفکت کنند، اثرات سیتوتوکسیک IB-MECA اختصاصاً فقط در سلول‌های ترانسفکت شده دیده می‌شود و در سلول‌های فاقد گیرنده (wild type) اثری ندارد [۱۰]. این یافته نشان می‌دهد که تاثیر IB-MECA فقط از طریق گیرنده A₃ صورت می‌گیرد و بر گرداندن اثر آگونیست توسط آنتاگونیست نیز تایید کننده دیگری بر این موضوع می‌باشد [۱۰].

مسیر انتقال پیام داخل سلولی که از طریق فعال شدن گیرنده A₃ باعث مرگ سلولی می‌شود می‌تواند از طریق افزایش Ca²⁺ بدنال فعال شدن فسفولیپاز C [۲۶]، فعال شدن بیان Fas و کاسپاز ۳ [۲۷]، کاهش فعالیت پروتئین کیناز A [۲۸] و عوامل دیگر باشد. لازم به ذکر است که این مسیرها و

تاثیر مستقیم آگونیست و آنتاگونیست نشان می‌دهد که اثرات سیتوتوکسیسته آدنوزین بر روی رده‌های سلولی مورد نظر از طریق گیرنده‌های سطح سلول اعمال می‌شود. در طی دهه‌های اخیر استفاده گسترده از نوشیدنی‌های کافئین‌دار و ارتباط آن با ایجاد و گسترش سرطان‌ها بویژه سرطان پستان مورد توجه بوده است [۱۷]. نتایج حاصل از این مطالعات که عمدتاً اپیدمیولوژیک بوده است متناقض می‌باشد و در سطح مولکولی و بیوشیمیایی کار قابل توجهی انجام نشده است. اگرچه گزارشات معدودی با استفاده از آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های گیرنده‌های آدنوزین بر روی بافت پستان پستانداران، آن‌هم به طور غیر مستقیم صورت گرفته ولی در هیچ موردی از گیرنده‌های A₃ صحبتی نشده است [۲۰-۱۸]. علیرغم اینکه تغییرات غلظت آدنوزین داخل سلولی در مرگ سلول دخالت دارد [۲۱].

نتایج ما تایید کننده نقش مستقیم گیرنده در کاهش رشد سلول است. مطالعات وسیعی که در مورد توزیع گیرنده‌های آدنوزین در بافت‌های انسانی صورت گرفته است [۲۲ و ۲۱] از وجود گیرنده‌های A₃ آدنوزین در بافت پستان گزارشی داده نشده و این نتایج برای اولین بار در سطح این رده‌های سلولی گزارش می‌شود. از شواهد متعددی که برای تعیین گیرنده‌های آدنوزین در یک سلول وجود دارد در رده‌های سلولی مورد مطالعه دو پارامتر انتخاب گردیده است. استفاده از تکنیک RT-PCR [۱۵ و ۱۴] تایید کننده حضور و بیان گیرنده A₃ است و استفاده از آگونیست اختصاصی گیرنده A₃ اطلاعات زیادی در مورد نقش این نوع گیرنده در رشد و یا مرگ سلولی می‌دهد که بر اساس نوع سلول و غلظت لیگاند متفاوت است [۱۰]. در غلظت‌های پایین (نانومولار) آگونیست A₃ در سلول‌های HL-60 و U-937 اثر آنتی آپوپتوزی [۲۳ و ۲۴] دارد. در حالیکه در غلظت‌های بالا

تشکر و قدردانی

مؤلفین از سرکار خانم دکتر فرزانه صباحی از همکاران گروه ویروس شناسی دانشگاه تربیت مدرس و خانم لیلا شاهین ساز به خاطر مساعدت های مبذول شده در جهت انجام بخش مربوط به RT-PCR این تحقیق نهایت سپاس و تشکر را دارند.

عوامل دخیل در آن بسته به نوع سلول و توزیع گیرنده های دیگر آدنوزین متفاوت است [۱ و ۲۶ و ۲۷ و ۲۸]. اهمیت گیرنده های آدنوزین در رده های سلولی سرطان پستان می تواند به عنوان اولین قدم در مشخص نمودن نقش این گیرنده ها در ایجاد و پیشرفت این سرطان تلقی گردد.

منابع

- [1] Fredholm, BB. Ijzerman, AP. Jacobson, KA. Klotz, KN. and Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors, *Pharmacol Rev.*, 53 (2001) 527-552.
- [2] Olah, ME. and Stiles, GL. The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity, *Pharmacol Ther.*, 85 (2000) 55-75.
- [3] Fredholm, BB. Arslan, G. Halldner, L. Kull, B. Schulte, G. and Wasserman, W. Structure and function of adenosine receptors and their genes, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 362 (2000) 364-374.
- [4] Ohana, G. Bar-Yehuda, S. Barer, F. and Fishman, P., Differential effect of adenosine on tumor and normal cell growth: focus on the A₃ adenosine receptor, *J Cell Physiol.*, 186 (2001) 19-23.
- [5] Salvatore, CA. Jacobson, MA. Taylor, HE. Linden, J. and Johnson, RG. Molecular cloning and characterization of the human A₃ adenosine- receptor, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 90 (1993) 10365-9.
- [6] MacKenzie, WM. Hoskin, DW. and Blay, J. Adenosine inhibits the adhesion of anti-CD3-activated killer lymphocytes to adenocarcinoma cells through an A₃ receptor, *Cancer Res.*, 54 (1994) 3521-6.
- [7] Priebe, T. Platsoucas, CD. and Nelson JA. Adenosine receptors and modulation of natural killer cell activity by purine nucleosides, *Cancer Res.*, 50 (1990) 4328-31.
- [8] Sajjadi, FG. Takabayashi, K. Foster, AC. Domingo, RC. and Firestein, GS. Inhibition of TNF- alpha expression by adenosine: role of A₃ adenosine receptors, *J Immunol.*, 156 (1996) 3435-3442.
- [9] Spychala, J. Tumor-promoting functions of adenosine, *Pharmacol Ther.*, 87 (2000) 161-173.
- [10] Brambilla, R. Cattabeni, F. Ceruti, S. Barbieri, D. Franceschi, C. Kim, YC. Jacobson, KA. Klotz, KN. Lohse, MJ. and Abbraccio, MP. Activation of the A₃ adenosine receptor affects cell cycle progression and cell growth, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 361 (2000) 225-234.
- [11] Blay, J. White, TD. and Hoskin, DW. The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine, *Cancer Res.*, 57 (1997) 2602-2605.
- [12] Jacobson, KA. Moro, S. Kim, YC. and Li, AH. A₃ adenosine receptors: Protective vs. damaging effects identified using novel agonists and antagonists, *Drug Dev Res.*, 45 (1998) 113-124.
- [13] Chomczynski, P. and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction,

- Annal Biochem.*, 162 (1987) 156-9.
- [14] Gessi, S. Varani, K. Merighi, S. Morelli, A. Ferrari, D. Leung, E. Baraldi, PG. Spalluto, G. and Borea, PA. Pharmacological and biochemical characterization of A₃ adenosine receptors in Jurkat T cells, *Br J Pharmacol.*, 134 (2001) 116-126.
- [15] Gessi, S. Varani, K. Merighi, S. Cattabriga, E. Iannotta, V. Leung, E. Baraldi, PG. and Borea, PA. A₃ adenosine receptors in human neutrophils and promyelocytic HL60 cells: a pharmacological and biochemical study, *Mol Pharmacol.*, 61 (2002) 415-24.
- [16] Sambrook, J. and Russell, D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, c2001.
- [17] Welsch, C.W., Caffeine and the development of the normal and neoplastic mammary gland, *Proc Soc Exp Biol Med.*, 207 (1994) 1-12.
- [18] Colquhoun, A. and Newsholme, EA. Inhibition of human tumor cell proliferation by analogues of adenosine, *Cell Biochem Funct.*, 15 (1997) 135-9.
- [19] Valenzuela, MT. Mateos, S. Almodovar, J.M. and McMillan, T.J. Variation in sensitizing effect of caffeine in human tumor cell lines after γ -irradiation, *Radiotherapy & Oncology.*, 54 (2000) 261-271.
- [20] Yuh, IS. and Sheffield, LG. Adenosine stimulation of DNA synthesis in mammary epithelial cells, *Proc Soc Exp Biol Med.*, 218 (1998) 341-8.
- [21] Barry, CP. and Lind, SE. Adenosine-mediated killing of cultured epithelial cancer cells, *Cancer Res.*, 60 (2000) 1887-1894.
- [22] Dixon, AK. Gubitzi, AK. Sirinathsinghji, DJ. Richardson, PJ. and Freeman, TC., Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat, *Br J Pharmacol.*, 118 (1996) 1461-1468.
- [23] Kohno, Y. Sei, Y. Koshiba, M. Kim, HO. and Jacobson, KA. Induction of apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by adenosine A₃ receptor agonists, *Biochem Biophys Res Commun.*, 219 (1996) 904-10.
- [24] Yao, Y. Sei, Y. Abbracchio, MP. Jiang, JL. Kim, YC. and Jacobson, KA., Adenosine A₃ receptor agonists protect HL-60 and U-937 cells from apoptosis induced by A₃ antagonists, *Biochem Biophys Res Commun.*, 232 (1997) 317-322.
- [25] Sei, Y. Von Lubitz, DK. Abbracchio, MP. Ji, XD. and Jacobson, KA. Adenosine A₃ receptor agonist-induced neurotoxicity in rat cerebellar granule neurons, *Drug Dev Res.*, 40 (1997) 267-273.
- [26] Kohno, Y. Ji, X. Mawhorter, SD. Koshiba, M., and Jacobson, KA. Activation of A₃ adenosine receptors on human eosinophils elevates intracellular calcium, *Drug Dev Res.*, 45 (1998) 113-124.
- [27] Kim, SG. Ravi, G. Hoffmann, C. Jung, YJ. Kim, M., Chen, A. and Jacobson, KA., p53-Independent induction of Fas and apoptosis in leukemic cells by an adenosine derivative, Cl-IB-MECA, *Biochem Pharmacol.*, 63 (2002) 871-80.
- [28] Fishman, P. Madi, L. Bar-Yehuda, S. Barer, F. Del Valle, L. and Khalili, K. Evidence for involvement of Wnt signaling pathway in IB-MECA mediated suppression of melanoma cells, *Oncogene.*, 21 (2002) 4060-40.