

## شناسایی مکانیزم آزادسازی کارسینوآمبریونیک آنتی ژن Carcinoembryonic Antigen (CEA) از سطح سلولهای سرطانی کولورکتال

پدیده عبادی<sup>۱</sup>، فخرالدین نقیب الحسینی<sup>۲</sup>

۱- مربی عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، بورسیه، بخش زیست شناسی (مؤلف مسئول) Padideh\_ebadi@yahoo.com

۲- استادیار گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

### چکیده

**زمینه و هدف:** کارسینوآمبریونیک آنتی ژن (CEA) Carcinoembryonic Antigen یکی از مارکرهای توموری است که بیان آن در بسیاری از سرطانهای کولورکتال، معده، پانکراس، ریه و سینه زیاد می شود. مکانیزم دقیق آزاد شدن این آنتی ژن از سطح سلول به درون سرم بیماران سرطانی هنوز ناشناخته است. پروتئین کارسینوآمبریونیک آنتی ژن از طریق یک اتصال گلیکوزیل فسفا تبدیل اینوزیتول (GPI-anchor) به غشاء سلولی متصل می شود. شواهدی مبنی بر دخالت آنزیمهای فسفولیپاز اختصاصی در شکستن GPI اتصال و جداسازی CEA از سطح سلولها وجود دارد. با توجه به این شواهد و داده ها، ما نقش احتمالی گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول فسفولیپاز D (GPI-PLD) را در هیدرولیز و آزادسازی کارسینوآمبریونیک آنتی ژن بررسی کردیم.

**روش بررسی:** در این تحقیق، ما با به کار بردن RT-PCR بیان GPI-PLD در برخی از رده های سلولی آدنوکارسینومای کولورکتوم را نشان دادیم. میزان کارسینوآمبریونیک آنتی ژن آزاد شده توسط یکی از رده های سلولی سرطانی (LS-180) که مقادیر زیادی کارسینوآمبریونیک آنتی ژن را به طور خودبخود در محیط کشت رها می سازند را در حضور و عدم حضور مهارکننده ها و فعال کننده های اختصاصی این آنزیم، اندازه گیری کردیم.

**یافته ها:** بررسی بیان ژن به کمک RT-PCR نشان داد که GPI-PLD در این سلولها بیان می شود. همچنین مقدار پروتئین CEA نیز در محیط کشت در حضور و عدم حضور مهارکننده ها و فعال کننده های اختصاصی این آنزیم، افزایش یا کاهش می یابد.

**نتیجه گیری:** با توجه به نتایج به دست آمده، شواهدی مبنی بر نقش آنزیم GPI-PLD موجود در این سلولها به عنوان آنزیم مؤثر در آزادسازی کارسینوآمبریونیک آنتی ژن بدست آوردیم.

**کلید واژه ها:** کارسینوآمبریونیک آنتی ژن (CEA)، GPI-PLD، اتصال گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول

وصول مقاله: ۸۵/۳/۱۸ اصلاح نهایی: ۸۶/۲/۲۳ پذیرش مقاله: ۸۶/۲/۲۸

### مقدمه

مختلف بسیار متغیر است. در بعضی از بیماران سرطانی،

علیرغم بیان کارسینوآمبریونیک آنتی ژن در بافت

توموری، مقادیر سرمی آن نرمال است (۳-۱).

ساختمان پروتئین کارسینوآمبریونیک آنتی ژن

شامل یک دنباله V-like Ig domain در انتهای آمینی

است که در کنار آن ۶ ناحیه I-like Ig domain قرار

داشته و در انتها به یک دنباله هیدروفوب در انتهای

کارسینوآمبریونیک آنتی ژن (CEA)

Carcinoembryonic Antigen یکی از رایجترین

مارکرهای توموری است. میزان این آنتی ژن در بسیاری

از بیماریهای سرطانی همچون سرطان کولون، سینه، ریه،

پروستات و معده و نیز بدخیمی های Gynecological

افزایش می یابد. سطح این آنتی ژن سرمی در بیماران

مطالعات نشان دادند که، در سلولهای اپی تلیال کولون طبیعی و نیز در سلولهای سرطانی کولون، CEA به وسیله یک برش غیر پروتئولیتیکی، و احتمالاً به کمک یک فسفولیپاز اندوژن، آزاد می شود (۱۳).

GPI-PLD اندوژن که مسؤول برش و آزادسازی پروتئینهای GPI از لنگرگاهشان در سطح سلول بوده، شناسایی شده است (۱۶-۱۴). cDNA یک فسفولیپاز D مختص GPI (GPI-PLD) کلون شده است (۱۷) و بیان آن در تعدادی از بافتهای انسانی از جمله سلولهای بتای پانکراس، ماکروفاژها، کراتینوسیتها، و سلولهای کبدی نشان داده شده است (۱۸). مطالعات جدید گویای این است که، GPI-PLD سلولی مسؤول برش و آزادسازی تعدادی از پروتئینهای GPI از انواعی از سلولهای مثل سلولهای توموری است (۱۸-۱۶) و بنابراین ما را به سمت بررسی نقش این آنزیم در آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن از سطح سلولهای کولورکتال کارسینوما هدایت کرد.

## روش بررسی

### مواد

گوآنیدینوم تیوسیانات، سیترات سدیم، فنل، و ۱۰-۱۰-فنانترولین (PNT) از Fluka chemical (Switzerland) company، L-گلوتامین، BSA، سورامین و DMEM از شرکت Sigma (USA) خریداری شد. Random Primer، آگارز MP و dNTPs از شرکت Roche (Germany)، تهیه پنی سیلین، استرپتومایسین، مهارکننده ریونوکلئاز، Taq DNA polymerase، V reverse transcriptase و مارکرهای DNA و بیوستز پرایمرهای الیگونوکلئوتید به وسیله شرکت Fermentas (Lithuania) فراهم شد.

کربوکسیل ختم می شود. این ناحیه که شامل ۲۶ آمینو اسید است، پردازش شده و به وسیله یک بخش گلیکو فسفاتیدیل (GPI anchor)، به غشاء سلول وصل می شود (۴).

عملکرد طبیعی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن و ارتباط آن با پیدایش سرطان، نامشخص است. دیده شده که ترشح این آنتی ژن از بسیاری از تومورهای کولون، با پیشرفت سرطان و بروز بدخیمی مرتبط است (۵). بعضی از نقشهای CEA شامل شرکت در چسبندگیهای homophilic و heterophilic بین سلولی است (۶) و احتمالاً از این طریق در بروز سرطان نقش دارد (۷). کارسینو آمبریونیک آنتی ژن، همچنین در متاستاز کبدی ناشی از سرطان کولون، نیز نقش دارد (۸ و ۹)، که مورد اخیر به احتمال زیاد از طریق تحریک سلولهای Kupffer به وسیله آنتی ژن محلول و تولید سیتوکاین است (۸، ۱۰).

اگرچه مدتهاست که ترشح خودبخودی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن از سطح سلولها معلوم شده است، ولی مکانیزم دقیق آزادسازی آن از سطح سلول به درون سرم همچنان ناشناخته است. آزمایشهایی که به کمک تریتون X-114 انجام شد، نشان دادند که، فرم ترشحاتی آن، هیدروفیل تر بوده و در فاز آبی قرار می گیرد در حالی که فرم متصل به غشاء خاصیت هیدروفوبیستی بیشتری را نشان می دهد، لذا نشان داده می شود که CEA ترشحاتی، فاقد بخش هیدروفوب GPI می باشد (۱۱). Khan و Hammarstrom نشان دادند که کارسینو آمبریونیک آنتی ژنی که در غشاهای ایزوله شده و قطعات غشائی و نه در سلولهای سالم موجود است، می تواند به وسیله سرم تازه انسانی و یا GPI-PLD تخلیص شده، برش خورده و آزاد شود (۱۲). همچنین

هرگونه سلول معلقی خارج شود، سپس محیط روئی به لوله جدیدی منتقل و برای مدت ۲۰ دقیقه دیگر در دور  $10000 \times g$  و دمای  $4^{\circ}C$  سانتریفیوژ شدند تا وزیکولهای سلولی و خرده های سلولی خارج شود. محیط کشت حاصل در دمای  $4^{\circ}C$  نگهداری شد تا میزان آزادسازی CEA به وسیله کیت ELISA و طبق دستورالعمل اندازه گیری شود. در زمان پر شدن فلاسک، کل پروتئین سلولی خارج شد. این عمل با اضافه کردن همزمان  $600 \mu L$  Lysis buffer (10 mM Tris pH 7.0, 1% SDS) در دمای جوش، به سلولهای کشت داده شده در پلیتها و سپس کندن آنها از کف پلیت صورت می گیرد. مقدار کارسینو آمبریونیک آنتی ژن آزاد شده از هر لاین سلول، بر حسب نانوگرم آنتی ژن در هر میلی گرم پروتئین سرم، نرمال شده و غلظت آن به وسیله روش Bradford (۲۰) و Crystallin BSA به عنوان استاندارد، اندازه گیری شد.

#### تأثیر سورامین، ۱۰-۱۰۰-فنانترولین و EDTA بر آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن

سورامین به صورت یک استوک استریل با غلظت  $100 \text{ mg/ml}$  در آب مقطر تهیه و در  $4^{\circ}C$  نگهداری شد و PNT در محیط بدون سرم با غلظت  $250 \mu\text{g/ml}$  تهیه و در  $4^{\circ}C$  تا زمان استفاده نگهداری شد. برای بررسی تأثیر سورامین و فنانترولین بر آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن، همزمان دو سری سلول LS-180 در پلیتهای چهار خانه ای، کشت داده شدند ( $200000 \text{ cells/well}$  در  $250 \mu\text{L}$  محیط کشت) و به این سلولها اجازه داده شد تا مرحله Sub-confluency رشد کنند. در این مرحله، سلولها دو بار با PBS شسته شده و سپس در محیط DMEM تازه، که در دو سری شامل و فاقد FBS، همراه با سورامین یا فنانترولین بودند، انکوبه

از FBS (Germany) Biochrom و کیت CEA ELISA از CanAg CEA EIA Kit (Sweden) خریداری شد. لاینهای سلولی کولون کارسینوما انسانی که شامل لاینهای HT-29، HT-29، LS-180، HT-29/219 و SW749 بودند، از بانک بین المللی سلول ایران، انستیتو پاستور، تهران (NCBI, Pasteur Institute, Tehran) تهیه شد. خریداری پلیتهای کشت سلول و فلاسکها از شرکت NUNC (Denmark) و کلیه مواد شیمیایی از شرکت Merck (Germany) انجام شد.

#### کشت سلول

لاینهای سلولی LS-180، HT-29، HT-29/219 و SW749 در فلاسکهای کشت سلول T25 و T75 کشت داده شدند. شرایط کشت، شامل محیط DMEM که حاوی ۱۰٪ FBS بوده که  $100 \text{ U/ml}$  پنی سیلین،  $100 \mu\text{g/ml}$  استرپتومایسین و  $2 \text{ mM}$  ال-گلوتامین به آن اضافه شده است. سلولها در دمای  $37^{\circ}C$  و اتمسفر مرطوب با ۵٪  $\text{CO}_2$  نگهداری شدند.

#### اندازه گیری کارسینو آمبریونیک آنتی ژن آزاد شده از چندین لاین سلولی کولون کارسینوما

$40000$  سلول از لاینهای سلولی کولون کارسینوما در پلیتهای ۴ خانه با قطر  $2 \text{ cm}$  در هر خانه، کشت داده شدند. سلولها به صورت تک لایه در  $250 \mu\text{L}$  محیط حاوی سرم، رشد داده شدند، تا زمانی که تمام کف پلیت را پوشانند. در این شرایط، محیط کشت برای مطالعه میزان آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن در فاز ساکن، خارج شده و به وسیله محیط فاقد سرم جایگزین شد و انکوباسیون برای ۹۶ ساعت دیگر، ادامه یافت. محیط کشت هر ۴۸ ساعت یکبار خارج و برای مدت ۵ دقیقه در دور  $3000 \times g$  سانتریفیوژ می شد، تا

محلول واکنش و طبق دستور، تهیه شد. PCR در  $50 \mu\text{L}$  از مخلوط واکنش که دارای  $10 \mu\text{L}$  از محصول واکنش RT،  $1/5$  واحد آنزیم DNA Polymerase،  $0.2 \text{ mM}$  dNTPs و به میزان  $0.5 \mu\text{M}$  از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse در  $1 \times \text{PCR}$  از بافر واکنش، که توسط شرکت تولید کننده آنزیم Taq فراهم شده بود. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای GPI-PLD، کارسینو آمبریونیک آنتی ژن و  $\beta$ -actin (کنترل داخلی) در جدول ۱ نشان داده شده است. مخلوط واکنش برای مدت ۵ دقیقه در دمای  $94^\circ\text{C}$  دناتوره شده و در طی ۳۵ سیکل تکثیر شد، به طوری که هر سیکل شامل ۱ دقیقه denaturation در  $94^\circ\text{C}$ ، ۴۵ ثانیه annealing در  $62^\circ\text{C}$  و ۴۵ ثانیه polymerization در دمای  $72^\circ\text{C}$  بود.

#### روشهای آماری

داده‌های آماری به وسیله نرم افزار SPSS بررسی شده و تفاوت‌های آماری بین گروهها به وسیله تست tukey HSD multiple comparison test مطالعه شد.

#### یافته‌ها

زمان بندی آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن از سلولهای کارسینومای کولون

ما ابتدا، میزان آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن از لاین‌های مختلف کارسینومای کولون به محیط کشت را به صورت تابعی از زمان، مقایسه کردیم. میزان آزادسازی CEA در چهار لاین سلولی مختلف Ls-180، HT-29، HT-29/219 و SW742 در فاز exponential و stationary (که سلولها در محیط بدون سرم و در شرایط confluency هستند) بررسی شد.

شدند. سورامین در دوزهای  $50 \mu\text{g/ml}$  و  $100 \mu\text{g/ml}$  و فنانتروپین در دوز  $2 \mu\text{g/ml}$  و در دو حالت همراه با و بدون  $12/5 \mu\text{M}$  از  $\text{ZnCl}_2$  استفاده شد. این سلولها در انکوباتور مرطوب  $37^\circ\text{C}$  برای مدت ۲-۸ ساعت نگهداری شدند. شرایط کنترل، شامل کشت سلولها در محیط کشت فاقد این مواد شیمیائی است. محیط کشت هر دو سری پلیتها، بعد از هر دو ساعت انکوباسیون، یکبار جمع‌آوری گردید. برای خروج هرگونه بقایای سلولی، طبق دستورالعمل گفته شده، محیط کشت سانتریفیوژ می‌شد. در پایان تعداد سلولهای زنده در هر خانه پلیت، با روش تریپان بلو و استفاده از لام نئوبار شمارش شد. مقدار کارسینو آمبریونیک آنتی ژن آزاد شده در محیط کشت به وسیله روش الیزا اندازه‌گیری گردید. بررسی تأثیر EDTA بر آزادسازی این آنتی ژن نیز به همین ترتیب صورت گرفت. به طور خلاصه می‌توان گفت،  $10 \times 10^6$  سلول Ls-180 در پلیتهای  $6 \text{ cm}$  تا مرحله Sub-confluency کشت داده شدند. سپس، سلولها در  $2 \text{ mL}$  محیط کشت تازه و غلظتهای  $10 \mu\text{M}$  و  $25 \mu\text{M}$  EDTA برای ۲-۴ ساعت انکوبه شده و میزان آنتی ژن آزادشده، طبق روش گفته شده اندازه‌گیری گردید. نتایجی که در این مقاله آمده، میانگین مقادیر به دست آمده از هر یک از دو کشت جداگانه است.

#### استخراج RNA و انجام RT-PCR

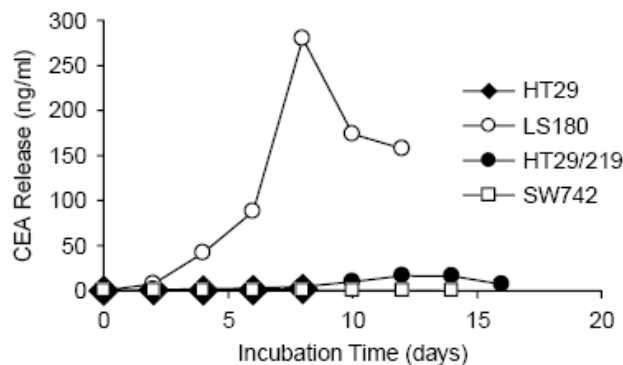
کل RNA سلول، از سلولهای Sub-confluent و با روش تک مرحله‌ای به کمک اسید گوانیدیم تیوسیانات و طبق دستورالعمل Sacchi و Chomczynski استخراج شد (۲۱). cDNA به کمک روش Reverse Transcription (RT) و با استفاده از  $5 \mu\text{g}$  از Total RNA، پرایمرهای Pd(N)6 random hexamer primer و M-MuLV Reverse transcriptase در  $20 \mu\text{L}$

## جدول ۱: نوالی پرایمرهای مورد استفاده برای RT-PCR amplification

Gene	Primer sequence
GPI-PLD	Sense: 5`GGACACAGGGCTCTGGAGTTTCT3` Antisense: 5`AACTGGCTCAACACGTCTCCTCC3`
CEA	Sense: 5`TTCACCTGTGAACCTGAGGC3` Antisense: 5`AGAGACTGTGATGCTCTAGACTATGGA3`
$\beta$ -Actin	Sense: 5`CCACGAAACTACCTTCAACTCC3` Antisense: 5`TCATACTCCTGCTGCTTGCTGATCC3`

مقادیر  $46 \mu\text{g/ml}$  و  $3/9$  کارسینوآمبریونیک آنتی ژن به ازای هر میلی‌گرم پروتئین تام سلول آزاد کردند در حالیکه، سلولهای تولیدکننده ضعیف، یعنی SW742 و HT-29 به ترتیب مقادیر  $0/4 \mu\text{g/ml}$  و  $0/2$  را آزاد کردند.

شکل ۱: زمان آزادسازی کارسینوآمبریونیک آنتی ژن از این لاین‌ها را با هم مقایسه می‌کند. میزان آزادسازی آنتی ژن مذکور از سلولها در فاز confluency به حداکثر مقدار خود می‌رسد و در محیط بدون سرم، کاهش می‌یابد. تفاوت زیادی در میزان CEA از لاین‌های مختلف، مشاهده می‌شود. لاین‌های سلولی تولیدکننده قوی، یعنی Ls-180 و HT-29/219 در شرایط confluency و در مدت ۴۸ ساعت، به ترتیب



شکل ۱: زمان بندی آزادسازی کارسینوآمبریونیک آنتی ژن از لاینهای مختلف سلولی کولورکتال کارسینوما

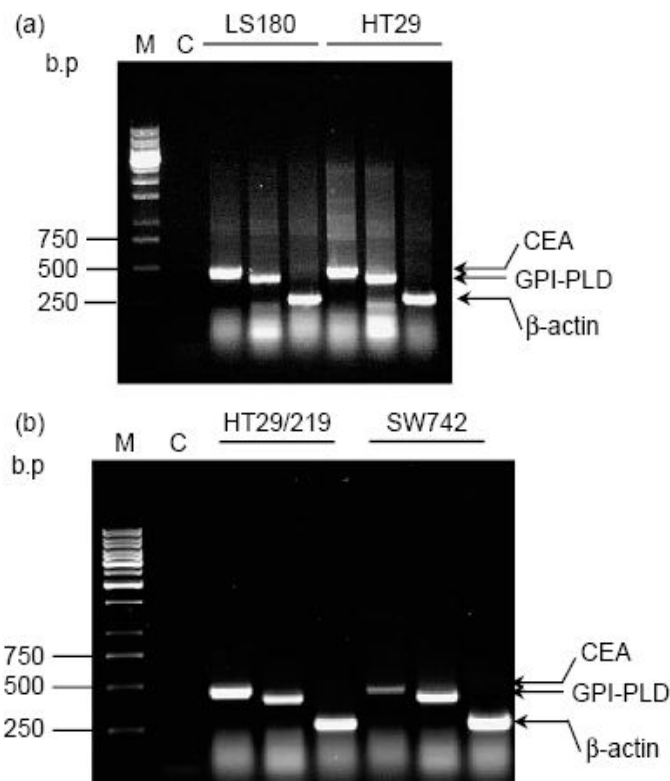
آمده، اندازه‌گیری شد. در هر منحنی، دو نقطه آخر نشان دهنده میزان آنتی ژن آزاد شده در محیط فاقد سرم است.

محیط کشت این سلولها در هر ۴۸ ساعت یکبار جمع‌آوری شده و میزان CEA آن، همان‌طور که در متن

مشاهده می‌شود، در هر چهار لاین سلولی، mRNA مربوط به کارسینو آمبریونیک آنتی ژن و GPI-PLD، محصول DNA با اندازه‌های پیش بینی شده یعنی باندهای ۴۶۵ و ۴۱۶ می‌دهد.

### تشخیص بیان GPI-PLD و کارسینو آمبریونیک آنتی ژن به وسیله RT-PCR

در این چهار لاین سلولی کولون کارسینوما، بیان این آنتی ژن، GPI-PLD و  $\beta$ -actin (کنترل داخلی) به وسیله RT-PCR مشخص شد. نتایج این RT-PCR در شکل ۲ نشان داده شده است. همان طور که در شکل

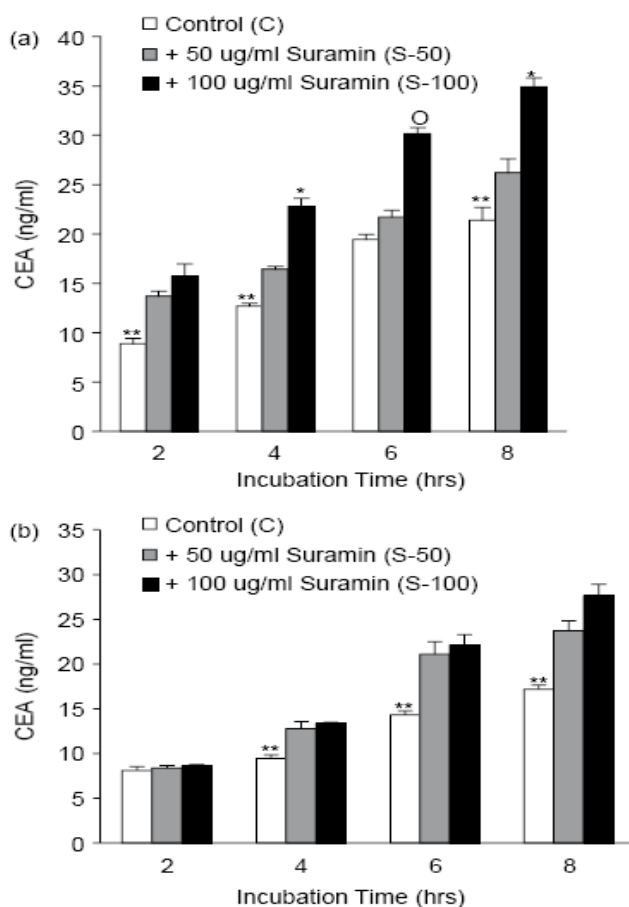


ضروری است که در لاین سلولی SW742 باند کم تراکم تری مشاهده می‌شود.

C: Negative Control و M:Marker

شکل ۲: الکتروفورز با آگارز ژل کارسینو آمبریونیک آنتی ژن، GPI-PLD و  $\beta$ -actin حاصل از RT-PCR در لاینهای کولون کارسینوما ی LS-180 و HT-29 (در شکل a)، و HT-29/219 و SW742 (در شکل b) و رنگ آمیزی آن با اتیدیوم برمید. توجه به این نکته

اثر فعال کننده GPI-PLD بر میزان آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن

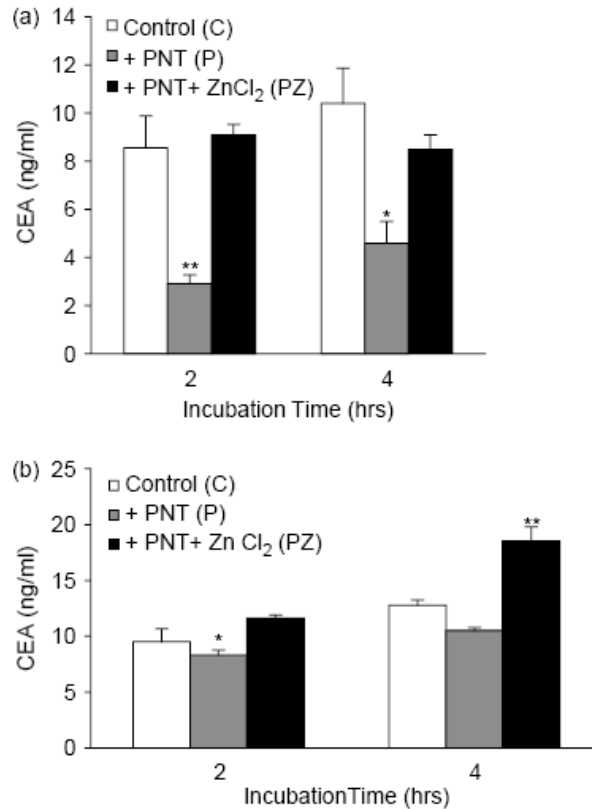


××، Significant P-value vs S-50 × شد.

و S-50 O، S-100 و significant P-value vs S-50 significant P-value vs C

شکل ۳: تأثیر فعال کننده GPI-PLD (سورامین) بر آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن از سلولهای Ls-180. سلولهای Ls-180 در پلیتهای ۴ خانه ای کشت داده شدند و برای مدت ۲-۸ ساعت در غلظتهای ۵۰ (S-50) و ۱۰۰ (S-100)  $\mu\text{g/ml}$  سورامین و محیط دارا (a) و فاقد (b) سرم قرار گرفتند. میزان کارسینو آمبریونیک آنتی ژن رها شده به وسیله کیتهای تجاری الیزا اندازه گیری شد. محیط کشت سلولهای بدون این ماده شیمیائی به عنوان کنترل استفاده شد. نتایج آزمایش، خطای میانگین استاندارد در دو مطالعه مستقل را نشان می دهد. تفاوت های آماری بین گروهها به وسیله تست tukey HSD multiple comparison test آزمایش

تأثیر مهارکننده GPI-PLD بر ترشح کارسینو آمبریونیک آنتی ژن

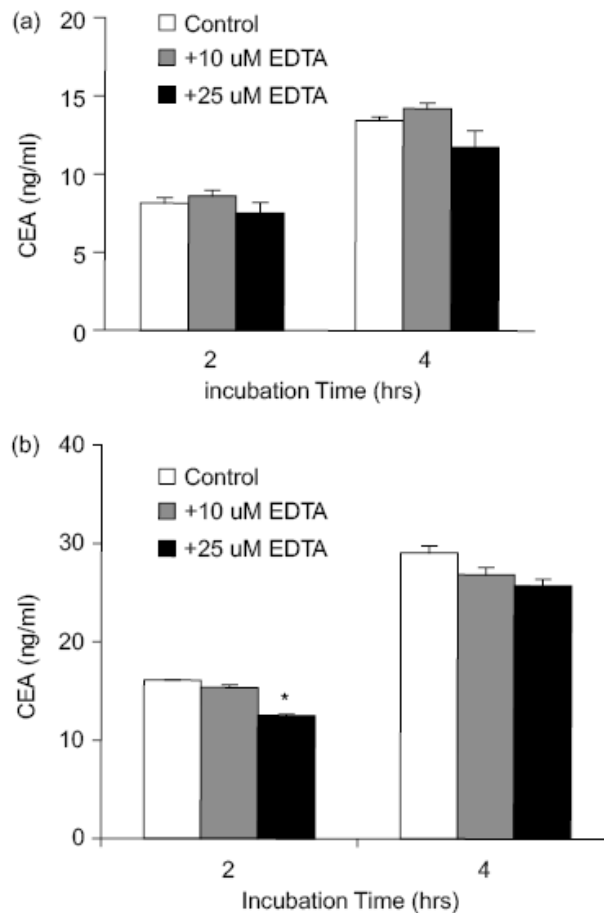


سلول‌هایی که تحت هیچ ماده شیمیایی قرار نگرفته‌اند، به عنوان کنترل استفاده شد. نتایج به صورت خطای میانگین و استاندارد دو آزمایش مستقل، ارائه شده است. تفاوت‌های آماری بین دو گروه با تست Tukey HSD test محاسبه شده است. (a)  $P$ -value vs  $\times$  significant PZ\* (b) ،significant  $P$ -value vs C and PZ\*\*،C significant  $P$ -value vs C \*\* ،significant  $P$ -value vs .and P

شکل ۴: اثر PNT، مهارکننده GPI-PLD، بر روی آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن در محیط کشت سلول‌های Ls-180. سلولها تا مرحله sub-confluency در پلیتهای ۴ خانه‌ای کشت داده شدند و سپس ۲  $\mu\text{g/ml}$  PNT (p) ویا ۲  $\mu\text{g/ml}$  PNT به اضافه ۱۲/۵  $\mu\text{M}$  ZnCl<sub>2</sub> (p+z) به محیط فاقد (a) و دارای (b) سرم اضافه شد. همان طوری که در بخش ۲ آمده است، مقدار CEA آزاد شده در محیط اندازه گیری شد. محیط



## تأثیر EDTA بر میزان آزادسازی کارسینوما آمبریونیک آنتی ژن



Significant *P*-value vs control and 10  $\mu$  M  $\times$  EDTA

## بحث

زمان بندی آزادسازی کارسینوما آمبریونیک آنتی ژن از سلولهای کارسینوما کولون

GPI-PLD فعال در سرم بسیاری از گونه‌های پستانداران، شناسایی شده است (۲۲، ۲۳). از آنجایی که، GPI-PLD پلاسما و GPI-PLD تخلیص شده، در شرایط فیزیولوژیک فاقد توانایی برش پروتئینهای GPI-anchored از سطح سلولهای سالم هستند (۲۴، ۲۵)، برای حذف تأثیر GPI-PLD موجود در FBS محیط کشت و

شکل ۵: اثر EDTA، بر روی آزادسازی کارسینوما آمبریونیک آنتی ژن در محیط کشت سلولهای Ls-180. سلولها تا مرحله sub-confluency در پلیتهای ۶ cm کشت داده شدند و سپس ۱۰ و ۲۵  $\mu$  M EDTA در ۲ ml محیط فاقد (a) و دارای سرم (b) به آنها اضافه شد. میزان CEA آزاد شده همین طور که در متن آمده، اندازه گیری شد. محیط سلولهایی که تحت هیچ ماده شیمیایی قرار نگرفته‌اند، به عنوان کنترل استفاده شد. نتایج به صورت خطای میانگین و استاندارد دو آزمایش مستقل، ارائه شده است. تفاوت‌های آماری بین دو گروه با تست Tukey HSD test محاسبه شده است.

بیان فسفولیپاز ویژه GPI (GPI-PLD) و لزوم آن برای برش پروتئینهای GPI-anchored خاص، در بسیاری از سلولهای نرمال و سرطانی انسان، نشان داده شده است (۲۷). همانطور که آزمایشات بالا به وضوح نشان می‌دهند، این چهار لاین سلولی سرطانی، در میزان آزادسازی CEA با هم تفاوت دارند. بنابراین، ما تصمیم گرفتیم که همزمان بیان ژن کارسینوآمبریونیک آنتی ژن و GPI-PLD را در سلولهای مذکور، بررسی کنیم. در این چهار لاین سلولی کولون کارسینوما، بیان این آنتی ژن، GPI-PLD و  $\beta$ -actin (کنترل داخلی) به وسیله RT-PCR مشخص شد. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، در هر چهار لاین سلولی، mRNA مربوط به کارسینوآمبریونیک آنتی ژن و GPI-PLD، محصول DNA با اندازه‌های پیش بینی شده یعنی باندهای ۴۶۵ و ۴۱۶ bp می‌دهد. این محصول به خاطر آلودگی با genomic DNA نمی‌باشد، چرا که هر دو پرایمر در آگزونها‌های مختلف طراحی شده‌اند، همچنین، در لوله کنترل با حذف مرحله RT، DNA amplification کاهش یافت (کنترل منفی در شکل ۲).

RT-PCR یک quantitative assay نیست ولی مقایسه intensity چهار باند مربوط به همه سلولها نشان داد که باند CEA در لاین SW742 به طور مشخصی نسبت به سایر باندها کم تراکم تر است. این کاهش بیان، به طور واضحی در مقایسه با بیان  $\beta$ -actin مشخص می‌شود (باند ۷۵۰ bp در شکل ۲). با توجه به این که ما مقدار مساوی از RNA تام و شرایط یکسان واکنش را برای هر چهار لاین به کار بردیم، لذا به نظر می‌رسد که حداقل SW742 به نسبت، مقدار کمتری از کارسینو آمبریونیک آنتی ژن را در مقایسه با لاینهای سلولی دیگر بیان می‌کند. اینکه با استفاده از RNA تام به جای

تائید وابستگی آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن به رشد سلول، ما سلولها را در محیط فاقد سرم کشت دادیم و آزادی خودبخودی این آنتی ژن در محیط کشت را آنالیز کردیم. همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، محیط فاقد سرم در مقایسه با محیط دارای سرم، مقدار کمتری CEA آزاد می‌کند. هر چند که، آزادسازی خودبخودی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن در محیط بدون سرم، بعد از ۴ روز کم نشد (دو نقطه آخر در شکل ۱) که این مطلب نشان دهنده آن است که یک آنزیم اندوژن و نه آنزیم سرمی، مسؤول کاتالیز آزادسازی آن از سلولها است. سلولها برای رشد فعال نیازمند فاکتورهای رشدی هستند که به وسیله FBS موجود در محیط تامین می‌شود. کاهش آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن به وسیله سلولهای Ls-180 در شرایط بدون سرم، ممکن است به خاطر همین کاهش متابولیسم سلولی و بیوسنتز کمتر پروتئینها باشد.

مطالعات پیشین نشان دادند که CEA محلول در محیط کشت، فاقد بخش اینوزیتول گلیکان است (۱۲). آنالیز SDS-PAGE محیط کشت این لاینهای سلولی و همچنین تحقیقات گذشته، نشان داده‌اند که پروتئین کارسینوآمبریونیک آنتی ژن آزاد شده، دارای همان وزن مولکولی فرم سالم متصل به غشاء (KD ۱۸۰ ~) است. Sack و همکاران، نیز نشان دادند که، این آنتی ژن سطح سلول نسبت به برش به وسیله انواع پروتئازها، مقاوم است (۲۶). این مشاهدات، فرضیه آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن از سطح سلول به کمک پروتئازها را رد می‌کند.

**تشخیص بیان GPI-PLD و کارسینو آمبریونیک آنتی ژن به وسیله RT-PCR**

میزان این آنتی ژن در زمانهای مختلف در شرایط پایه‌ای و تحریک فعالیت GPI-PLD با سورامین، با هم مقایسه شدند. به طور مشخصی آزادسازی CEA در سلولهای تحت تأثیر سورامین نسبت به سلولهای کنترل زیاد شد، چرا که غلظت بیشتری از آن که به خاطر تأثیر روی GPI-PLD است، مشاهده می‌شود (شکل ۳ a و ۳ b). تفاوت سلولهای کنترل و سلولهای تحت تأثیر سورامین، بعد از ۲ ساعت انکوباسیون سلولها در محیط دارای سرم مشخص می‌شود (شکل ۳ a). در شرایطی که سلولها ۴ ساعت تحت تأثیر ۱۰۰ µg/ml سورامین قرار گیرند، میزان آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن آنها در مقایسه با سلولهای کنترل، به میزان ۷۹٪ افزایش می‌یابد. هر چند که، پس از آن کاهش می‌یابد، که احتمالاً به خاطر کاهش محتوای کلی CEA درون سلول است. این افزایش آزادسازی آنتی ژن، به خاطر کاهش cell integrity نیست، چرا که رنگ آمیزی سلولها با تریپان بلو نشان داد که تعداد سلولهای زنده در هر دو نمونه تفاوتی نمی‌کند. تأثیر سورامین در آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن به محیط بدون سرم در مقایسه با محیط دارای سرم، کاهش یافت (شکل ۳ b)، که ممکن است به خاطر بیوستتز کمتر آن در شرایط بدون سرم است. به طور کلی، همه داده‌ها نشان می‌دهند که سورامین می‌تواند به طور مشخصی آزادسازی CEA از سلولهای هر دو نوع محیط را افزایش دهد. چون سورامین باعث رهایی مقادیر قابل اندازه‌گیری کارسینو آمبریونیک آنتی ژن از سلولهای HT-29 که تولیدکننده ضعیف آن هستند، نمی‌شود، لذا می‌توان این طور نتیجه‌گیری کرد که سورامین تنها آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن و نه بیوستتز آن را تحریک می‌کند.

mRNA ، نیز نتیجه RT-PCR موفقیت‌آمیز بود نشان می‌دهد که به نسبت بیان GPI-PLD در این لاین‌های سلولی توموری زیاد است.

### اثر فعال‌کننده GPI-PLD بر میزان آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن

برای بررسی نقش احتمالی GPI-PLD سلولی در آزادسازی خودبخودی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن از این سلولها، تصمیم گرفتیم که تأثیر سورامین و ۱۰،۱- فنانترویلین که به ترتیب فعال‌کننده و مهارکننده‌های GPI-PLD هستند را مطالعه کنیم.

اغلب برای بررسی میزان فعالیت آنزیم GPI-PLD از سیستم‌های cell free استفاده می‌شود. برای این کار از cell lysate به عنوان منبعی برای آنزیم GPI-PLD و پروتئین radio labeled GPI-anchored برای مثال VSG (variant surface glycoprotein) به عنوان سوبسترا، استفاده می‌شود (۲۸). این روش، دشوار و وقت‌گیر است. بنابراین به عنوان راه حل دیگر، ما اثر فعال‌کننده و مهارکننده GPI-PLD در میزان آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن از سلولهای سالم را بررسی کردیم. این مطالعه، بر روی سلولهای Ls-180 انجام گرفت، چرا که میزان آزادسازی CEA از این لاین زیاد است و لذا مطالعه محصول واکنش GPI-PLD با روش غیر رادیواکتیو برای تشخیص این آنتی ژن، آسانتر خواهد بود. سورامین یک پلی سولفونات نفتیل اوره است، که در مطالعات in vitro فعالیت GPI-PLD را زیاد می‌کند (۲۹، ۳۰). کشت‌های Ls-180 در وضعیت sub-confluency، دائماً در معرض سورامین با غلظتهای ۵۰ µg/ml و ۱۰۰ در محیط با و بدون سرم و برای ۸ ساعت قرار گرفتند. محیط کشت هر ۲ ساعت، یکبار جمع‌آوری شده و مقدار CEA آن اندازه‌گیری شد.

سلولهای Ls-180 در حضور و عدم حضور  $\mu\text{g/ml}$  ۲ PNT در محیط با و بدون سرم، برای ۴-۲ ساعت، قرار داده شدند. اثر این مهار کننده اختصاصی GPI-PLD در ترشح کارسینو آمبریونیک آنتی ژن از سلولهای Ls-180، به روش گفته شده و اندازه گیری مقادیر CEA در محیط، اندازه گیری شد. در این سلولهای سالم، اضافه کردن chelator کاتیونهای دو ظرفیتی (PNT) قویا، آزادسازی این آنتی ژن را مهار می کند. این اثر در محیط بدون سرم، مشخص تر است که احتمالاً به خاطر بر هم کنش PNT با کاتیونهای سرم است. غلظت کارسینو آمبریونیک آنتی ژن محیط فاقد سرم، در مقایسه با گروه کنترل، دو بار کمتر است. یک کاهش ۱۸٪ و ۱۲/۵٪ در آزادسازی آنتی ژن به ترتیب، پس از ۴ و ۲ ساعت انکوباسیون در محیط فاقد سرم به اضافه PNT مشاهده شد. داده ها ۲ بار با دو آزمایش مستقل، به دست آمده و مقادیر میانگین کلیه آزمایشها در شکل ۴ نشان داده شده است. پس از ۴ ساعت و رنگ آمیزی با تریپان بلو، هیچ تفاوتی از نظر زنده ماندن سلولها مشاهده نشد. چون PNT، GPI-PLD و نه GPI-PLC را مهار می کند (۲۲، ۲۳، ۳۳)، اثر مهار PNT در رهائی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن از سلولهای Ls-180 را می توان به عنوان شاهد دیگری بر عدم تأثیر GPI-specific PLC در آزادسازی CEA به کار می آید.

GPI-PLD در اتصال با یک یون  $\text{Zn}^{+2}$  است و این کاتیون برای عملکرد آن ضروری است (۳۳). PNT یک  $\text{Zn}$  chelator است و نشان داده شده است که، تأثیر آن بر روی GPI-PLD پستانداران، در اثر اضافه کردن  $\text{ZnCl}_2$  معکوس می شود (۳۴). برای بررسی این که آیا  $\text{ZnCl}_2$  می تواند اثر مهار PNT بر آزاد سازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن را معکوس کند، ما مقدار

اگرچه که سورامین یک فعال کننده غیر اختصاصی برای GPI-PLD بوده و دارای اثرات پلیوتروپیک بر روی بسیاری از سیستم های آنزیمی و بر هم کنشهای فاکتور رشد-گیرنده است، نتایج هماهنگ فعال کننده و مهار کننده GPI-PLD، با مکانیزم برش GPI مطابقت می کند.

نشان داده شده است که ترشح کارسینو آمبریونیک آنتی ژن با تمایزی که به خاطر سورامین در سلولهای سرطان کولون انسانی رخ می دهد، مرتبط است (۳۱). انکوباسیون سلولهای HT-29 و Moser برای ۴ روز با غلظت IC-50 سورامین، باعث تمایز و ترشح CEA از این سلولها می شود. همچنین اثر مشابه سورامین بر روی لاین سلولی سرطان معده انسانی SNU-16 نشان داده شده است (۳۲). Ls-180 یک لاین سلولی تمایز کننده نیست. نتایج ما نشان دادند که حتی اگر سلولها برای مدت کوتاهی (۲ ساعت)، تحت تأثیر سورامین قرار گیرند، ترشح کارسینو آمبریونیک آنتی ژن زیاد می شود. بنابراین، به نظر می رسد که تأثیر سورامین بر روی این آنتی ژن یک فرایند مستقل از تحریک تمایز سلولی است.

#### تأثیر مهار کننده GPI-PLD بر ترشح کارسینو آمبریونیک آنتی ژن

آنزیم GPI-PLD، به وسیله ۱۰، ۱-فنانترولین (PNT) مهار می شود. این ترکیب، یک chelator برای کاتیونهای دو ظرفیتی است که آنزیم های فسفولیپاز نوع GPI-PLD و نه نوع C را مهار می کند (۲۲ و ۲۱). سلولهای Ls-180 با مقادیر  $\mu\text{g/ml}$  ۱۰-۲ از PNT انکوبه شدند. غلظتهای بالاتر از  $\mu\text{g/ml}$  ۴ PNT باعث cell toxicity شد، به همین دلیل غلظت  $\mu\text{g/ml}$  ۲ ( $\mu\text{M}$ ) از PNT در آزمایشات بعدی استفاده شد.

آزادسازی کارسینوآمبریونیک آنتی ژن دارد. بنابراین، اثر مهارى PNT، بر روی آزادى CEA حتى در مقایسه با غلظتهای بالاتر EDTA هم اختصاصی است. اگرچه که در آزمایش ما آنزیم GPI-PLD خالص سازی نشده بود، ولی با این حال، این الگوی فعال و غیر فعال شدن با مکانیزم برش به وسیله GPI-PLD، هماهنگی دارد (۲۲،۲۳،۳۶).

### نتیجه گیری

CEA با سرطان بدخیم کولورکتال مرتبط است، و برای شناسائی بدخیمی‌های مکرر مفید است. تفاوت بین سطح کارسینو آمبریونیک آنتی ژن و تومورهای بیان کننده آن در بعضی از بیماران سرطانی، می‌تواند به خاطر فعال شدن انتخابی آنزیم مسئول آزادى آنتی ژن باشد. پروتئینهای GPI-anchored مثل کارسینوآمبریونیک آنتی ژن، به راحتی به وسیله اضافه کردن آگزوزن آنزیم PI-PLC باکتریائی، برش می‌خورند اگرچه که این آنزیم برای GPI اختصاصی نیست. این پژوهش، اولین تحقیقی است که ادعا می‌کند که GPI-PLD اندوژن، در آزاد سازی این آنتی‌ژن از سلولهای کارسینومای کولورکتال نقش دارد.

مکان سلولی دقیق GPI-PLD و محل برش GPI-anchor که در سطح سلول باشد یا درون سلول، هنوز مشخص نیست (۲۹،۳۷،۳۸). بنابراین، اینکه CEA از سطح سلول آزاد می‌شود یا از درون سلول، نامشخص است.

ارتباط بین افزایش کارسینوآمبریونیک آنتی ژن و پیشرفت بدخیمی سرطان، به طور کامل معلوم نیست. عمل عمل GPI-anchored CEA و / یا CEACAM6 (که عضو دیگری از خانواده کارسینوآمبریونیک آنتی ژن

۲ µg/ml PNT را به اضافه ۱۲/۵ µM ZnCl<sub>2</sub> را به کار بردیم. همانطور که انتظار می‌رفت، ZnCl<sub>2</sub> آزادسازی ضعیف CEA در طی انکوباسیون با PNT، را معکوس کرد همان طور که مشاهده می‌شود، مقدار آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن به مقادیری بالاتر از کنترل باز می‌گردد که نشان می‌دهد که Zn<sup>+2</sup> همچنین می‌تواند، آزادسازی این آنتی ژن را تحریک کند (شکل ۴). ۲ ساعت انکوباسیون با Zn<sup>+2</sup>، آزادسازی CEA را در مقایسه با PNT، در محیط فاقد و دارای سرم، به ترتیب ۳ و ۱/۴ برابر می‌کند. اضافه کردن ZnCl<sub>2</sub> به تنهایی و نه MgCl<sub>2</sub>، به محیط کشت باعث افزایش مشخص آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن از این سلولها می‌شود. در نتیجه، ما نشان دادیم که PNT با آزادسازی خودبخود کارسینو آمبریونیک آنتی ژن از سلولهای سالم Ls-180 مداخله می‌کند ولی این کاهش آزادسازی، با ZnCl<sub>2</sub> جبران می‌شود. این که در محیط دارا و فاقد سرم و در حضور سورامین و PNT، آزادسازی کارسینوآمبریونیک آنتی ژن افزایش و کاهش می‌یابد، پیشنهاد می‌کند که آزادسازی آنتی ژن مذکور به وسیله GPI-PLD اندوژن کاتالیز می‌شود.

مطالعات متعدد نشان می‌دهد که PNT که chelator یونهای فلزی است، که توانائی اتصال به یون Ca<sup>+2</sup>، یک مهار کننده مؤثرتری برای GPI-PLD است، تا EDTA یا EGTA (۲۲،۳۴،۳۵). برای تأیید اثر اختصاصی PNT بر روی آزادسازی CEA، ما اثر EDTA (که یک chelator غیر اختصاصی برای Ca<sup>+2</sup> و سایر یونها است) را بر روی آزادسازی آن بررسی کردیم. همانطور که در شکل ۵ دیده می‌شود، وقتی که EDTA را در غلظتهای ۱۰ و ۲۵ µM به محیط کشت سلولهای Ls-180 اضافه می‌کنیم، اثر کمی بر روی

بین وضعیت تمایز و فعالیت آنزیم GPI-PLD در این سلولها معلوم شود.

در این پژوهش، ما مکانیزم آزادسازی خودبخود CEA در سلولهای سرطان کولون انسانی را بررسی کردیم. ما در تعدادی از این سلولها، بیان آنزیم GPI-PLD را تغییر دادیم. با استفاده از فعال کننده و مهارکننده این آنزیم، نشان دادیم که در سلولهای سرطانی کولون لاین LS-180، رهاسازی این آنتی ژن به ترتیب افزایش و کاهش می‌یابد. درک مکانیزم آزادسازی کارسینو آمبریونیک آنتی ژن می‌تواند در تشخیص و کنترل بیماران سرطانی کمک کننده باشد (۱۹).

است) از اساس با اعضای خانواده TM-linked CEA، تفاوت می‌کند و این تفاوت به این خاطر است که افزایش بیان کنترل نشده گروه نخست، باعث توقف تمایز بسیاری از سلولها از جمله کولونوسیتها می‌شود (۱۹). مطالعات نخستین نشان داده‌اند که GPI-PLD در signal transduction نقش دارد. برش و آزادسازی پروتئینهای GPI به وسیله GPI-PLD باعث آزادی واسطه‌های آبشار signaling به وسیله phosphatidic acid و diacylglycerol می‌شود (۳۹). حضور کارسینوآمبریونیک آنتی ژن و GPI-PLD در سطح سلولهای کارسینوما، جالب است، چرا که پتانسیل تولید پیامبرهای ثانویه که دارای نقش داخل سلولی هستند، را پیشنهاد می‌کند. بنابراین، جالب خواهد بود که، ارتباط

## References

1. E Pihl, RC Nairn, ES Hughes, AM Cuthbertson, AJ Rollo. Mucinous colorectal carcinoma: immunopathology and prognosis, Pathology 1980; 12: 439-447.
2. C Wagener, R Muller-Wallraf, S Nisson, J Groner, H Breuer. Localization and concentration of carcinoembryonic antigen (CEA) in gastrointestinal tumors: correlation with CEA levels in plasma. J Natl Cancer Inst 1981; 67: 539-547.
3. R Goslin, MJ O'Brien, G Steele, R Mayer, R. Wilson, JM Corson and et al. Correlation of plasma CEA and CEA tissue staining in poorly differentiated colorectal cancer. Am J Med 1981; 71: 246-253.
4. SA Hefta, LJ Hefta, TD Lee, RJ Paxton, JE Shively. Carcinoembryonic antigen is anchored to membranes by covalent attachment to a glycosylphosphatidylinositol moiety: identification of the ethanolamine linkage site. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 4648-4652.
5. LM Tibbetts, CM Doremus, GN Tzanakakis, MP Vezeridis. Liver metastases with 10 human colon carcinoma cell lines in nude mice and association with carcinoembryonic antigen production. Cancer 1993; 71: 315-321.
6. H Zhou, A Fuks, CP Stanners. Specificity of intercellular adhesion mediated by various members of the immunoglobulin supergene family. Cell Growth Differ 1990; 1: 209-215.
7. RA Screaton, LZ Penn, CP Stanners. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, cooperates with Myc and Bcl-2 in cellular transformation. J Cell Biol 1997; 137: 939-952.
8. KH Edmiston, A Gangopadhyay, Y Shoji, AP Nachman, P Thomas, JM Jessup. In vivo induction of murine cytokine production by carcinoembryonic antigen. Cancer Res 1997; 57: 4432-4436.
9. A Gangopadhyay, DA Lazure, P Thomas. Adhesion of colorectal carcinoma cells to the endothelium is mediated by cytokines from CEA stimulated Kupffer cells. Clin Exp. Metastasis 1998 16: 703-712.
10. S Minami, J Furui, T Kanematsu. Role of carcinoembryonic antigen in the progression of colon cancer cells that express carbohydrate antigen. Cancer Res 2001; 21: 2732-2735.

11. F Jean, P Malapert, G Rougon, J Barbet. Cell membrane but not circulating, carcinoembryonic antigen is linked to a phosphatidylinositol-containing hydrophobic domain. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 155: 794-800.
12. WN Khan, S Hammarstrom. Biosynthesis of carcinoembryonic antigen (CEA) gene family members expressed in human tumor cell lines: evidence for cleavage of the glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) anchor by GPI-PLC and GPI-PLD. *Biochem Int* 1991; 25: 723-731.
13. T Kinugasa, M Kuroki, T Yamanaka, Y Matsuo, S Oikawa, H Nakazato, Y Matsuoka. Non-proteolytic release of carcinoembryonic antigen from normal human colonic epithelial cells cultured in collagen gel *Int J Cancer* 1994; 58: 102-107.
14. CN Metz, G Brunner, NH Choi-Muira, H Nguyen, J Gabilove, IW Caras, et al. Release of GPI-anchored membrane proteins by a cell-associated GPI-specific phospholipase D. *Eur Mol Biol Org J* 1994; 13: 1741-1751.
15. R Lierheimer, B Kunz, L Vogt, R Savoca, U Brodbeck, P Sonderegger. The neuronal cell-adhesion molecule axonin-1 is specifically released by an endogenous glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase. *Eur J Biochem* 1997; 243: 502-510.
16. OG Wilhelm, S Wilhelm, GM Escott, V Lutz, V Magdolen, MDB. Schmitt, et al. Cellular glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D regulates urokinase receptor shedding and cell surface expression. *J Cell Physiol* 1999; 180: 225-235.
17. TC Tsang, WJ Fung, J Levine, CN Metz, MA Davitz, D Burns, et al. Isolation and expression of two human glycosylphosphatidylinositol phospholipase D (GPI-PLD) cDNAs. *Fed Am Soc Exp Biol J* 1992; 6: 1922.
18. MG Low. Structure and function of GPI-specific phospholipases in: NG Young, J Moss (Eds.). *PNH and the GPI-Linked proteins*, Academic Press: San Diego CA, 2000. p. 239-268.
19. C Ilantzis, L DeMarte, RA Screaton, CP Stanners. Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation *Neoplasia* 2002; 4: 151-163.
20. MM Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
21. P Chomczynski, N Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
22. KS Huang, S Li, WJ Fung, JD Hulmes, L Reik, YC Pan, MG Low. Purification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D. *J Biol Chem* 1990; 265: 17738-17745.
23. MG Low, AR Prasad. A phospholipase D specific for the phosphatidylinositol anchor of cell-surface proteins is abundant in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 980-984.
24. MG Low, KS Huang. Factors affecting the ability of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D to degrade the membrane anchors of cell surface proteins. *Biochem J* 1991; 279: 483-493.
25. JT Deng, MF Hoylaerts, ME De Broe, VO Van Hoof. Hydrolysis of membrane-bound liver alkaline phosphatase by GPI-PLD requires bile salts. *Am J Physiol* 1996; 271: G655-G663.
26. TL Sack, JR Gum, MG Low, YS Kim. Release of carcinoembryonic antigen from human colon cancer cells by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Clin Invest* 1988; 82: 586-593.
27. H Xiaotong, MJ Hannocks, I Hampson, G Brunner. GPI-specific phospholipase D mRNA expression in tumor cells of different malignancy. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 291-299.
28. MA Deeg, EL Bierman, MC Cheung. GPI specific phospholipase D associates with an apoA-I- and apoA-IV-containing complex *J Lipid Res* 2001; 42: 442-451.
29. JY Lee, MR Kim, DE. Sok. Enzymatic release of  $Zn^{+2}$  glycerophosphocholine cholinephosphodiesterase from brain membranes by glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipases and its regulation. *Neurochem Res* 1998; 23: 899-905.
30. S Kristiansen, EA Richter. GLUT4-containing vesicles are released from membranes by phospholipase D cleavage of a GPI anchor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E374-E382.

31. S Reynolds, S Rajagopal, S Chakrabarty. Differentiation inducing effect of retinoic acid, difluoromethylornithine, sodium butyrate and sodium suramin in human colon cancer cells. *Cancer Lett* 1998; 134: 53-60.
32. G Choe, WH Kim, JG Park, YI Kim. Effect of suramin on differentiation of human stomach cancer cell lines. *J Korean Med. Sci* 1997; 12: 433-442.
33. SW Park, K Choi, IC Kim, HH Lee, NM Hooper, HS Park. Endogenous glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase C releases renal dipeptidase from kidney proximal tubules in vitro. *Biochem J* 2001; 353: 339-344.
34. JY Li, K Hollfelder, KS Huang, MG Low. Structural features of GPI-specific phospholipase D revealed by proteolytic fragmentation and  $Ca^{+2}$  binding studies. *J Biol Chem* 1994; 269: 28963-28971.
35. JY Li, MG Low. Studies of the role of the integrin EF-hand,  $Ca^{+2}$  -binding sites in glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D: reduced expression following mutagenesis of residues predicted to bind  $Ca^{+2}$  *Arch Biochem Biophys* 1999; 361: 142-148.
36. MA Davitz, J Hom, S Schenkman. Purification of a glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase D from human plasma. *J Biol Chem* 1989; 264: 13760-13764.
37. T Hari, H Kunze, E Bohn, U Brodbeck, P Butikofer. Subcellular distribution of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D in rat liver. *Biochem J* 1996; 320: 315-319.
38. G Brunner, CN Metz, H Nguyen, J Gabrilove, SR Patel, MA Davitz, DB Rifkin, EL Wilson. An endogenous glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D releases basic fibroblast growth factor-heparan sulfate proteoglycan complexes from human bone marrow cultures. *Blood* 1994; 83: 2115-2125.
39. H Tsujioka, N Takami, Y Misumi, Y Ikehara. Intracellular cleavage of glycosylphosphatidylinositol by phospholipase D induces activation of protein kinase C alpha. *Biochem J* 1999; 342: 449-455.