

## مهار سیستم ایمنی توسط فاکتور ضد رشد سلول کارسینومای پروستات انسان (JCA-1)

دکتر محسن ابوالحسنی<sup>۱</sup> و دکتر جن وی چیانو<sup>۲</sup>

### خلاصه

کارسینومای پروستات، از معمول‌ترین سرطان‌ها در مردان بالاتر از چهل سال می‌باشد و هر سال باعث مرگ بیش از سی هزار مرد در آمریکا می‌شود. رده‌های سرطانی قادرند چندین فاکتور کنترل‌کننده رشد تولید و در محیط کشت سلول آزاد نمایند و تاکنون فاکتورهای مهارکننده ایمنی بسیاری که از تومورهای انسان منشاء می‌شوند و روی سیستم ایمنی اثر می‌گذارند گزارش شده‌اند. در این پژوهش، یک فاکتور مهارکننده ایمنی در محیط کشت رده سلولی کارسینومای پروستات انسان (JCA-1) که وابسته به آندروژن می‌باشد شناسایی شد. این فاکتور ضد رشد خود به خود توسط سلول JCA-1 تولید می‌شود و قادر است تکثیر لنفوسیت‌های خون محیطی طبیعی انسان را به طور غیر قابل برگشت و وابسته به دوز مهار نماید. فاکتور مهارکننده ایمنی توسط کروماتوگرافی تعویض یونی (DEAE-سفاروز) و ژل فیلتراسیون (سفاکریل S-200) خالص شد و وزن ملکولی آن حدود ۴۰-۵۵ کیلو دالتون تخمین زده شد. این فاکتور برای لنفوسیت‌ها کشنده نبوده و به حرارت ۵۶ درجه سانتیگراد، حضور مواد احیاءکننده و هضم آنزیمی حساس می‌باشد. آنالیز سیکل سلولی لنفوسیت‌ها نشان داد که این فاکتور مرگ سلولی ایجاد نکرده ولی قادر است از ورود لنفوسیت‌های فاز G1 به فاز S سیکل سلولی جلوگیری نماید. جهت تعیین اهمیت این فاکتور ضد رشد لنفوسیت و شناسایی رابطه آن با سیستم ایمنی به مطالعات بیوشیمیایی و ایمونولوژیکی بیشتری نیاز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: رده سلولی پروستات (JCA-1)، فاکتور مهارکننده ایمنی، فاکتور ضد رشد لنفوسیت‌ها

۱- دانشیار ایمونولوژی، عضو هیأت علمی انستیتو پاستور ایران، بخش ایمونولوژی، ۲- استاد ایمونولوژی، کالج پزشکی نیویورک، بخش پزشکی، والهالا، نیویورک، آمریکا

دریافت مقاله: ۱۳۸۲/۶/۱۸ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۳/۵/۲۰ پذیرش مقاله: ۱۳۸۳/۶/۱۱

## مقدمه

کارسینومای پروستات از معمول‌ترین تومورهای شناسایی شده در بین مردان بالای ۴۰ سال است که سالیانه باعث مرگ بیش از ۳۰,۰۰۰ نفر در ایالت متحده می‌شود. بیش از ۵۰ سال است که هورمون درمانی از روش‌های معمول سرطان پروستات متاستاز شده است (۹). پس از پاسخ اولیه، متعاقباً در بیماران تومور ایجاد می‌گردد که به هورمون پاسخ نداده و به روش‌های درمانی موجود نیز مقاوم می‌شود. سایر درمان‌ها مانند اشعه درمانی، جراحی و شیمی درمانی نیز نمی‌توانند طول عمر بیماران مبتلا به کارسینومای متاستاز شده پروستات را افزایش دهند.

مهار سیستم ایمنی (immunosuppression) اغلب در بیماران مبتلا به سرطان کلیه دیده می‌شود. سلول کارسینومای کلیه، تکثیر لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران تحریک شده با میتوزن PHA را مهار می‌کند. همچنین سرم این بیماران می‌تواند از تکثیر لنفوسیت‌های خون محیطی افراد نرمال جلوگیری به عمل آورد (۱۱). در بیماران مبتلا به سرطان پروستات، تغییرات مارکرهای سطح لنفوسیت‌ها، کاهش سلول‌های T کمکی و افزایش سلول T سایتوتوکسیک دیده می‌شود (۱۴،۱۶). فاکتورهای مهارکننده سیستم ایمنی بسیاری که از تومورهای انسان منشاء می‌شوند و روی سیستم ایمنی اثر دارند گزارش شده است (۳،۴،۷،۱۵،۱۷). بیشتر این فاکتورها از محیط کشت رده‌های سلولی مختلفی شناسایی شده‌اند و بعضی خود به خود و بعضی دیگر پس از تحریک با آنتی‌ژن تولید می‌شوند. به دلیل مقدار بسیار کم این فاکتورها، جداسازی و تعیین دقیق خصوصیات بیوشیمیایی آنها مشکل می‌شود. در این مقاله یک فاکتور مهارکننده سیستم ایمنی از سوپرناتانت رده سلولی کارسینومای پروستات انسان شناسایی و خصوصیات آن تعیین گردید.

گرچه در بدن واکنش‌های ایمنی بر علیه تومورها ایجاد می‌شود، ولی مؤثر نمی‌باشند زیرا سلول‌های سرطانی با مکانیسم‌های متفاوتی به سیستم ایمنی حمله می‌نمایند. در این مقاله یکی از این مکانیسم‌ها که یک فاکتور مهارکننده سیستم ایمنی می‌باشد و در سوپرناتانت رده سلولی کارسینومای پروستات انسان شناسایی شده گزارش می‌گردد.

## مواد و روش کار

کشت سلولی: سلول‌های رده JCA-1 (۱۲) در محیط کشت بدون سرم ITS+ (Collaborated Research, Inc. USA) و در محیط کشت PRMI -164 حاوی ۱۰٪ FCS

کشت داده شدند. کشت سلولی بدون مایکوپلازما بوده (Gen-prob, Inc., San Diego, CA, USA). هر سه روز محیط کشت عوض شده و سوپرناتانت جمع‌آوری و پس از سانتریفیوژ و فیلتر کردن (با فیلتر ۰/۲ میکرون) در ۲۰- درجه سانتیگراد تا موقع استفاده ذخیره گردید. تعداد سلول‌ها و درصد زنده بودن آنها با روش رنگ تریپان بلو تعیین گردید.

تست تکثیر لنفوسیت‌ها: برای آزمایش فعالیت فاکتور مهارکننده ایمنی از لنفوسیت‌های خون محیطی افراد سالم و میتوزن PHA-M (کمپانی Difco) استفاده شد. لنفوسیت‌ها به کمک سانتریفیوژ فیکول-هایپک جدا و به تعداد  $10^5 \times 3/3$  سلول در هر میلی لیتر در دیش ۹۶ خانه‌ای تقسیم شدند و سپس توسط ۷۰ میکروگرم در میلی لیتر PHA تحریک و سوپرناتانت کشت سلولی با غلظت‌های متفاوت به آنها اضافه گردید. پس از سه روز کشت در ۳۷ درجه سانتیگراد، لنفوسیت‌ها به مدت ۴ ساعت با ۲/۳ میکروکوری در میلی لیتر تایمیدین [ $^3\text{H}$ ] مارک شده شدند. ورود تایمیدین رادیو اکتیو در DNA توسط scintillation اندازه‌گیری شد.

خالص کردن فاکتور مهارکننده ایمنی: سوپرناتانت کشت سلول JCA-1 با فیلتر میلی پور (۱۰۰۰۰ کیلودالتون) تغلیظ شد و پس از دیالیز شدن علیه ۰/۱ مولار بافر تریس pH=۸ به ستون تعویض یونی DEAE-سفاروز CL-6B (۱×۹ سانتی متر) اضافه گردید. ستون توسط بافر تریس ۰/۱ مولار شسته شد و پروتئین‌ها با گرادیانست ۰/۱ تا ۰/۵ مولار نمک طعام در بافر تریس ۰/۱ مولار با pH=۸ مرحله به مرحله از ستون جدا گردید. محلول پروتئین‌ها به مقدار ۵ میلی لیتر در هر لوله جمع‌آوری شد و آزمایش ضد رشد انجام شد. بخش‌های حاوی فاکتور ضد رشد با هم مخلوط شدند و برای خلوص بیشتر پس از دیالیز علیه بافر فسفات pH=۷ به ستون سفاکریل S-200 (۲×۱۰۰ سانتی متر) اضافه شد. پروتئین‌های خارج شده بکمک فیلتر آمیکون تغلیظ شدند و برای فعالیت ضد رشد بکار رفتند. مقدار پروتئین توسط کیت اندازه‌گیری پروتئین شرکت Bio-Rad آمریکا اندازه‌گیری شد (پروتئین آلبومین گاوی بعنوان استاندارد به کار برده شد).

## نتایج و بحث

اثر سوپرناتانت کشت سلول JCA-1 روی تکثیر لنفوسیت‌های خون محیطی: شکل ۱A نشان می‌دهد که وقتی سلول JCA-1 در محیط کشت بدون سرم یا حاوی ۱۰٪ FCS کشت داده شود قادر است رشد لنفوسیت‌های تحریک شده با PHA را مهار نماید. در محیط

توقف سیکل سلولی درصدی از نفوسیت‌ها در فاز G0-G1 می‌شود و از ورود آنها به فاز S جلوگیری می‌کند. در فلوسیتومتری، در ناحیه اپوپتوتیک سیکل سلولی سلول‌های اپوپتوتیک دیده نشد.

**جدول ۱:** اثر حرارت، ماده احیاکننده و هضم آنزیمی بر فاکتور ضد

رشد (۶ میکروگرم)

عامل	تأثیر	درصد توقف رشد لنفوسیت خون محیطی
شاهد		۵۷/۵
حرارت ۵۶ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ دقیقه		۶
حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه		۰
DTT دو میلی مولار به مدت ۲ ساعت		۰
تریپسین ۱٪		۳
پروناز ۱٪		۱

**جدول ۲:** اثر فاکتور ضد رشد (۲۰ میکروگرم در میلی لیتر) بر سیکل

سلولی لنفوسیت‌های خون محیطی

نمونه	دوره سلولی	G0/G1	S	G2/M
لنفوسیت خون محیطی + PHA		۵۹/۵	۲۲/۲	۱۸/۳
لنفوسیت خون محیطی + PHA + فاکتور ضد رشد		۶۷/۸	۱۷/۹	۱۴/۳

براساس وزن ملکولی تقریبی فاکتور ضد رشد و خصوصیات بیوشیمیایی آن به نظر می‌رسد این فاکتور ضد رشد با سایر فاکتورهایی که توسط سلول‌های سرطانی مختلف تولید می‌شود تفاوت داشته باشد. (۱۵،۱۹،۲۰). قبلاً نشان داده شده است که بعضی از سلول‌های سرطانی قطعات DNA در محیط کشت ترشح می‌کنند که خاصیت ضد رشد دارند (۵،۶)، ولی فعالیت فاکتور ضد رشد سلول JCA-1 به علت حضور نوکلئیک اسید نبوده زیرا نوکلئازها فعالیت آن را از بین نمی‌برند. شاید این فاکتور برای سلول کارسینومای پروستات JCA-1 که وابسته به آندروژن است اختصاصی باشد، زیرا سوپرناتانت دو رده سلولی دیگر پروستات PC3 و DU-145 که وابسته به آندروژن نمی‌باشند فعالیت ضد رشد لنفوسیت نداشتند (۱۰،۱۸). همین‌طور، در سوپرناتانت رده سلولی پروستات وابسته به آندروژن (LNCap) فاکتور ضد رشد لنفوسیت

کشت حاوی سرم، سلول JCA-1 بهتر رشد می‌کند و فاکتور ضد رشد بیشتری نسبت به محیط کشت بدون سرم تولید می‌کند. شکل ۱ همچنین نشان می‌دهد که وقتی سلول JCA-1 به مدت ۴ ساعت در معرض  $0.1 \mu\text{g/ml}$  مایتومایسین C قرار می‌گیرد فاکتور ضد رشدی ترشح نمی‌شود، حتی اگر سلول JCA-1 تا ۶ روز کشت داده شود. این نتایج نشان می‌دهند که فاکتور ضد رشد از مواد محیط کشت منشأ نشده و به‌طور فعال از سلول ترشح می‌شود و به سنتز DNA نیاز دارد. پس از کشت  $2/5 \times 10^5$  سلول، فاکتور ضد رشد در روز دوم کشت قابل تشخیص بود و در غلظت  $1/5 \times 10^6$  سلول در میلی لیتر به حداکثر رسید.

در حضور فاکتور ضد رشد، تعداد لنفوسیت‌ها و زنده بودن آنها در طول سه روز کشت تغییر نکرد که نشان می‌دهد مهار رشد لنفوسیت‌ها در اثر لیز سلولی نمی‌باشد. همچنین، اثر مهارکنندگی رشد لنفوسیت‌ها غیر قابل برگشت است، زیرا اگر پس از سه روز کشت در حضور سوپرناتانت JCA-1 لنفوسیت‌ها شسته شوند و فقط در حضور میتوزن برای سه روز دیگر کشت داده شوند لنفوسیت‌ها مهار شده باقی می‌مانند.

تعیین خصوصیات بیوشیمی فاکتور ضد رشد: سوپرناتانت کشت سلولی JCA-1 توسط ستون تعویض یونی خالص و فاکتور ضد رشد بدون اتصال از ستون خارج گردید. این بخش سپس به ستون سفاکریل S-200 اضافه شد و فاکتور ضد رشد در بخشی که معادل ۴۰-۵۵ کیلو دالتون بود (براساس وزن ملکولی استاندارد) از ستون خارج گردید. شکل ۲ نشان می‌دهد که فاکتور ضد رشد خالص شده (۶۰ میکروگرم در میلی لیتر) قادر است بیش از ۷۰ درصد رشد لنفوسیت را مهار نماید.

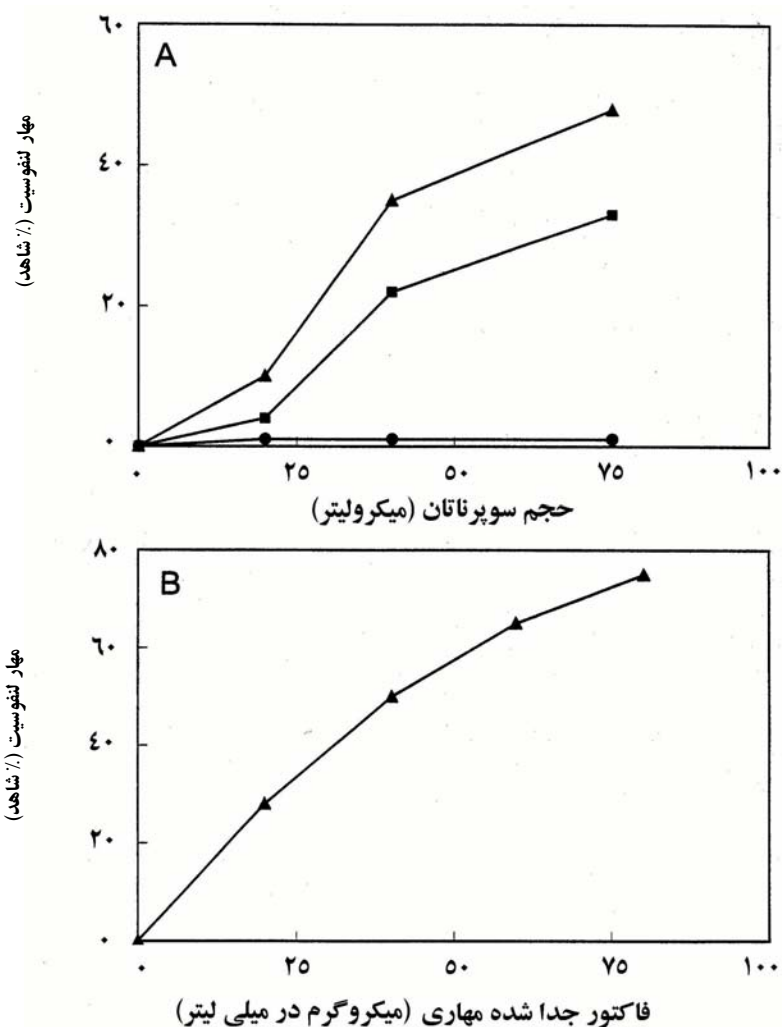
جدول ۱ نشان می‌دهد که فاکتور ضد رشد جدا شده از ستون، به حرارت، ماده احیاءکننده و هضم آنزیمی حساس می‌باشد. شکل ۳ نشان می‌دهد که حداکثر مهار رشد لنفوسیت هنگامی صورت می‌گیرد که میتوزن و فاکتور ضد رشد هم‌زمان به لنفوسیت‌ها اضافه شود. افزودن فاکتور ضد رشد یک یا دو روز پس از افزودن میتوزن به ترتیب باعث کاهش مهار رشد ۶۲٪ و ۳۷٪ لنفوسیت‌ها می‌شود. اگر فاکتور ضد رشد در ۴ ساعت آخر کشت سلول اضافه گردد، مهار رشد قابل توجهی دیده نمی‌شود.

جدول ۲ نشان می‌دهد که حضور فاکتور ضد رشد به مدت سه روز در محیط کشت لنفوسیت تحریک شده با میتوزن باعث

مشاهده نگردید (۸). از طرف دیگر، اخیراً در سوپرناتانت سلول‌های PC3 و DU-145 فاکتور ضد رشدی مشاهده گردیده است که می‌تواند رشد سلول پروستات LNCap را که وابسته به آندروژن است متوقف کند (۲۰).

به مطالعات بیوشیمیایی و ایمونولوژیکی بیشتری نیاز است تا اهمیت این فاکتور ضد رشد لنفوسیت را شناسایی و رابطه آن را

با سیستم ایمنی مشخص نمود. امید است با تولید منوکلنال آنتی‌بادی بتوان اثر این فاکتور ضد رشد را از بین برد و به کمک مواد مؤثر دیگر (۱۳، ۱۴) از رشد سلول‌های سرطانی پروستات جلوگیری نمود.



شکل ۱: (A) اثر غلظت‌های مختلف سوپرناتانت JCA-1 روی تکثیر لنفوسیت‌های خون محیطی تحریک شده با میتوژن PHA سوپرناتانت هم‌زمان به میتوژن اضافه و سلول‌ها به مدت سه روز کشت داده شدند. (▲) سوپرناتانت حاوی سرم، (■) سوپرناتانت فاقد سرم و (●) سوپرناتانت از سلولی که به آن مایتومایسین افزوده شده. (B) اثر غلظت‌های مختلف فاکتور ضد رشد جدا شده روی لنفوسیت‌های تحریک شده با PHA.

---

## **Summary**

### **Inhibition of Immune System by an Immunosuppressive Factor from a Human Prostatic Carcinoma Cell Line (JCA-1)**

Abolhassani M, PhD<sup>1</sup>. and Chiao J.W, PhD<sup>2</sup>.

1. Associate Professor of Immunology, Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran, 2. Professor of Immunology, Department of Medicine, New York Medical College, Valhalla, New York, USA

*Prostatic carcinoma is the most commonly diagnosed tumor among men over 40 which results in over 30,000 deaths each year in the United States. Previous studies indicated that tumor cell lines produce and release several growth regulatory factors into their condition media and so far a number of human tumor cell-derived suppressor factors have been isolated that affect normal immune functions. In this report, an immunosuppressive factor is identified from the supernatant of an androgen-dependent human prostatic carcinoma cell line (JCA-1). This factor is constitutively produced by JCA-1 cells and is able to suppress normal human peripheral blood lymphocyte proliferation irreversibly and in a dose-dependent manner. The immunosuppressive factor was semi-purified by a combination of ion-exchange chromatography on DEAE-Sephacryl and gel filtration (Sephacryl S-200) with an apparent molecular weight of 40-55 kDa. The immunosuppressive factor was not cytolytic to lymphocytes and was sensitive to 56°C, reducing agent as well as to proteinase digestion. Cell cycle analysis revealed that the immunosuppressive factor does not induce apoptosis, but is able to prevent G1 lymphocytes from entering into the S phase of the cell cycle. Further biochemical purification and immunological studies are needed to determine the importance of this factor and its relationship to the immune system.*

**Key Words:** Prostate cell line, JCA-1, Immunosuppressive factor, Lymphocyte antiproliferative factor

**Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2004; 11(4): 206-211**

## References

- Adhami VM, Ahmad N and Mukhtar H. Molecular targets for green tea in prostate cancer prevention. *J Nutr* 2003; 133(7 Suppl):2417S-2424S.
- Abolhassani M and Chiao JW. Antiproliferative effect of a prostatic cell-derived activity on the human androgen-dependent prostatic carcinoma cell line LNCaP. *J Interferon Cytokine Res* 1995; 15(2): 179-185.
- Abolhassani M and Chiao JW. Purification and characterization of a human leukemia cell-derived immunosuppressive factor. *Prep Biochem* 1991; 21(1): 25-33.
- Abolhassani M, Muraki J and Chiao JW. Purification of a suppressor lymphokine (SL) from a human T-cell line. *Immunol Invest* 1989; 18(6): 741-751.
- Abolhassani M, Tillotson JK, Chang J and Chiao JW. Regulation of human lymphocyte proliferation by a tumour cell-derived DNA fraction. *Immunol Cell Biol* 1991; 69(pt 6): 377-385.
- Abolhassani M, Tillotson JK and Chiao JW. Characterization of the release of DNA by a human leukemia cell line HL-60. *Int J Oncology* 1994; 4: 417-421.
- Ebert EC, Roberts AI, O'Connell SM, Robertson FM and Nagase H. Characterization of an immunosuppressive factor derived from colon cancer cells. *J Immunol* 1987; 138(7): 2161-2168.
- Horszewicz JS, Leong SS, Kawinski E *et al.* LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1983; 43(4): 1809-1818.
- Huggins C and Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res* 1941; 1: 293-297.
- Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF and Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 1979 17(1): 16-23.
- McLaughlin AP 3<sup>rd</sup> and Brooks JD. A plasma factor inhibiting lymphocyte reactivity in urologic cancer patients. *J Urol* 1974; 112(3): 366-372.
- Muraki J, Addonizio JC, Choudhury MS *et al.* Establishment of new human prostatic cancer cell line (JCA-1). *Urology* 1990; 36(1): 79-84.
- Peehl DM, Krishnan AV and Feldman D. Pathways mediating the growth-inhibitory actions of vitamin D in prostate cancer. *J Nutr* 2003; 133(7 Suppl):2461S-2469S.
- Ritchie AW, James K, Micklem HS and Chisholm GD. Lymphocyte subsets in renal carcinoma- a sequential study using monoclonal antibodies. *Br J Urol* 1984; 56(2): 140-148.
- Roth JA, Grimm EA, Osborne BA, Putnam JB, Davidson DD and Ames RS. Suppressive immunoregulatory factors produced by tumors. *Lymphokine Res* 1983; 2(2): 67-73.
- Shaw M, Ray P, Rubenstein M and Guinan P. Lymphocyte subsets in urologic cancer patients. *Urol Res* 1987; 15(3): 181-185.
- Shirakawa F, Tanaka Y, Oda S, *et al.* Immunosuppressive factors from adult T-cell leukemia cells. *Cancer Res* 1986; 46(9): 4458-4462.
- Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH and Paulson DF. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 1978; 21(3): 274-281.
- Werkmeister J, Zaunders J, McCarthy W and Hersey P. Characterization of an inhibitor of cell division released in tumour cell cultures. *Clin Exp Immunol* 1980; 41(3): 487-496.
- Whitehead JS and Kim YS. An inhibitor of lymphocyte proliferation produced by a human colonic adenocarcinoma cell line in culture. *Cancer Res* 1980; 40(1): 29-35.