

# اثر مهارکنندگی DNA آزاد شده از سلول سرطانی میلوئید انسان (HL-60) بر روی تکثیر لنفوسيت‌های خون محیطی

حسن ابوالحسنی\*(Ph.D.) جن وی چیائو\*\*

## چکیده

سابقه و هدف: تا کنون چندین عامل پروتئینی مهارکننده سیستم ایمنی توسط سلول‌های سرطانی مختلف در محیط کشت، آزاد و خصوصیات آن‌ها مطالعه شده است. در این مقاله، DNA آزاد شده از سلول میلوئید انسان (HL-60) مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد دارای فعالیت مهارکننده سیستم ایمنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: سوپرناکت کشت سلولی HL-60 پس از تعليظ به ستون تعويض یونی DEAE-سفاروز CL-6B اضافه گردید و به کمک گرادیانت کلوروسدیم، فراکشن‌های مختلفی به دست آمد. فراکشن‌های مهارکننده سیستم ایمنی به کمک HPLC خالص گردید.

یافته‌ها: آزمایش‌ها نشان می‌دهند که تریپسین و RNase اثری روی فعالیت ضد تکثیر ندارد ولی DNase فعالیت ضد تکثیر را کاملاً از بین می‌برد. DNA با فعالیت مهارکنندگی غیرقابل برگشت تکثیر لنفوسيت‌ها، دو رشته بوده و وزن ملکولی آن بین  $1/6$  تا  $1/10$  کیلو باز می‌باشد. DNA ضد تکثیر، تغییری در تعداد سلول و زنده بودن آن‌ها نمی‌دهد و در نتیجه مسمومیت سلولی ایجاد نمی‌کند. آنالیز سیکل سلولی نشان می‌دهد که DNA، لنفوسيت‌های تحریک شده توسط میتوژن را در فاز G1 سیکل سلولی متوقف می‌نماید و مانع ورود آن‌ها به فاز S می‌شود.

استنتاج: علاوه بر فاكتورهای پروتئینی، DNA نیز می‌تواند سیستم ایمنی را مهار کند. همچنین، DNA تکثیر بعضی از سلول‌های سرطانی را نیز متوقف می‌نماید. این DNA ممکن است در آینده به عنوان شاخصی در تشخیص سرطان به کار رود.

واژه‌های کلیدی: دی.ان.ای، سلول اچ ال لنفوسيت‌ها-ناهنجاری‌ها، لوسمی میلوئید حاد، ایمونوسپریو

## مقدمه

تکثیر لنفوسيت‌های فعال شده را مهار کنند، اغلب پلی‌پپتید بوده و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مختلفی دارند. مطالعات مختلفی نشان داده است که پروکاریوت‌ها و همچنین سلول‌های جانوران عالی تر قادر هستند خود به خود DNA را در محیط کشت آزاد مطالعات متعددی در مورد شناسایی و تعیین خصوصیات عوامل مهارکننده سیستم ایمنی حاصل از سلول‌های سرطانی انجام گرفته است (۱). بیشتر این عوامل، خود به خود یا پس از تحریک با مولکول‌های مختلف تولید می‌شوند (۲-۷). این عوامل که قادر هستند

\* دپارتمان ایمونولوژی انتیتو پاستور ایران تهران: خیابان پاستور-شماره ۶۹-کد پستی ۱۳۱۶۴

\*\* دپارتمان پزشکی کالج پزشکی نیویورک، والهلا، نیویورک

۱۳۸۲/۰۳/۸۲ تاریخ دریافت: ۱۳۸۲/۰۳/۸۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات:

تهيه شدند. سلول سرطاني پروستات (JCA-1) و سلول کارسينوماи penile (KU-8) در محیط RPMI ۱۹۰۲ در درصد FCS ۱۵٪ داده شدند.

جدا کردن DNA آزاد شده از سوپرناتانت کشت سلول: سوپرناتانت کشت سلولی HL-60 پس از تغليظ، در بافر ۰/۰۱ مolar تريپ pH ۸ دialiز شد و به ستون تعويض یونی DEAE-CL-6B شرکت فارماسيا (۱۶ × ۶/۵ سانتيمتر) اضافه گردید. ستون را با همان بافر شسته و سپس با گراديان مرحله به مرحله ۰/۰۱ تا يك مolar نمک طعام فراکشن‌های ۵ ميلی ليتری جمع آوری شد که پس از تغليظ و استريل شدن با فيلتر ۰/۲۵ ميكرون مورد آزمایش ضد تکثیر قرار گرفتند. فراکشن‌هایي که فعالیت ضد تکثیر داشتند و در يك ناحیه بودند مخلوط و به کمک HPLC و ستون HPLC Gen-Pak خالص گردید. بافرهای بکار رفته در شامل (A) ۲۵ ميلی مolar تريپ، يك ميلی مolar EDTA، (B) یك مolar NaCl می باشد. غلظت DNA با pH ۸ از HPLC در آگارز ۱ درصد الكتروفورز و به وسیله اتیدیوم بروماید شناسایی شدند. DNA فائز لمبدا هضم شده توسط آنزیم BstEII به عنوان شاخص استاندارد استفاده شد.

آزمایش ضد تکثیر لنفوسيت: لنفوسيت‌های خون محیطی فرد نرمال به وسیله سانتريفیوز فایکول-هایپک جدا شد(۲) و به مقدار  $10^0 \times 3/3$  سلول در میلی لیتر RPMI ۱۵ درصد FCS به ديش ۹۶ خانه‌اي اضافه گردید. لنفوسيت‌ها با PHAM  $70 \mu\text{g}/\text{ml}$  ConA  $6 \mu\text{g}/\text{ml}$  تحريک شدند(۲) و غلظت‌های مختلف سوپرناتانت (بسته به نوع آزمایش) به آن‌ها اضافه گردید. پس از سه روز کشت در ۳۷ درجه، سلول‌ها با  $2/3 \mu\text{g}/\text{ml}$  سوپرناتانت تايميدين  $[^3\text{H}]$  علامت‌دار شدند و پس از ۴ ساعت راديواكتيو وارد شده در DNA اندازه گيری شد.

کنند. اين DNA ممکن است متعاقباً به غشاء سلول متصل شود (۱۲۵۸). DNA در سطح بيشتر سلول‌های سرطانی، سلول‌های T بعضی از گونه‌ها و سلول‌های DNA ترانسفرم شده، شناسایی شده است (۱۴، ۱۳). عمل آزاد شده و اثرات آن بر روی سیستم ایمنی به خوبی شناخته نشده است، ولی ممکن است نقشی در ارتباط سلول به سلول داشته باشد (۱۱).

سلول‌های طحال موش لوکمیک AKR قادر است پاسخ‌های آنتی‌بادی موش AKR نرمال را علیه گلبول قرمز گوسفند مهار کند و این فعالیت به هضم آنزیمی DNase حساس می‌باشد (۱۶، ۱۵).

گرچه سلول سرطانی پرمیلوسیتیک انسان HL-60 یک پروتئین ۶۶ کیلو دالتونی با فعالیت مهارکننده سیستم ایمنی در محیط کشت تولید می‌کند (۱۷) در مورد آزاد شدن DNA توسط HL-60 و اثرات آن بر روی سیستم ایمنی گزارشی وجود ندارد. در این مقاله، برای مطالعه اثر DNA آزاد شده از سلول HL-60 و نقش آن بر روی سیستم ایمنی از سوپرناتانت کشت سلولی استفاده شده و خصوصیات آن مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

لاین‌های سلولی: رده سرطانی مایلوبلاست انسان-HL-60 در محیط کشت RPMI-1640 بدون سرم، حاوی انسولین، ترانسفرین و سلینیوم کشت داده شد (۱۸). محیط کشت سلول‌ها که فاقد مایکوپلاسمای بود هر سه روز عوض و سوپرناتانت آن‌ها پس از سانتريفیوز در  $\times 500$ -۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. همچنین، سلول‌های استئوسارکوما (TE81)، کارسينومای پستان (MCF-7) و لاین سلولی فيربلاست موش (3T3) که به همین نحو کشت داده شدند. کلیه سلول‌ها از ATCC به American Culture Collection، Rockville، MD

غیاب آن به مدت سه روز کشت داده و سپس پس از شستن با الکل ۷۰ درصد به مدت یک ساعت در حرارت ۴ درجه تثیت شدند. سپس، سه میلی لیتر (mg/ml) RNase (۱۰) اضافه و پس از یک ساعت در حرارت ۳۷ درجه، سلولها شسته شدند. به سلولها ۱ ml از ۵۰ µg/ml پروپیدیوم آیو داید اضافه و سیکل سلولی با فلوسایتو متری (Coulter, Epics-Profile II) مطالعه شد.

آزمایش ضد تکثیر روی سلولهای سرطانی نیز به همین صورت انجام گرفت ولی از ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر DNA استفاده شد و مقدار سلولهای به کار رفته در جدول شماره ۱ ذکر شده است. درصد توقف تکثیر از فومول زیر به دست آمد:

$$\% \text{ Suppression} = (1 - \frac{\text{Sample CPM}}{\text{Control CPM}}) \times 100$$

جدول شماره ۱: اثر DNA در رشد لاین‌های سلولی مختلف

درصد توقف رشد	CPM		سلول در لاین سلولی میلی لیتر × ۱۰۰۰	
	+DNA	-DNA		
۹۳	۵۵۰۰	۷۶۷۰۰	۱۰۰	KU8
۸۸	۱۱۲۷	۱۱۰۴۸	۱۵	TE81
۷۵	۸۶۰۰	۳۰۰۰	۱۰۰	MCF-7
۱۴	۵۴۵۰	۶۳۰۰	۵۰	3T3
۰	۱۲۲۰	۱۲۲۰	۵۰	JcA-1
۰	۲۵۲۰	۲۵۵۰	۱۵	HL-60

سلولها در حضور DNA (۲۵ µg/ml) یا عدم حضور آن به مدت ۳ روز کشت داده شد. نتایج، میانگین سه بار تکرار است.

الکتروفورز: در ژل ۱۰ درصد انجام و سپس با رنگ کماسی بلو ونقره رنگ آمیزی شد. ژل رنگ نشده به قطعات کوچکی تقسیم و DNA هر قطعه جدا و علیه RPMI دیالیز و به کمک فیلتر ۰/۲۵ میکرون استریل شد و برای آزمایش ضد تکثیر به کار رفت. DNA در آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و با آئیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد.

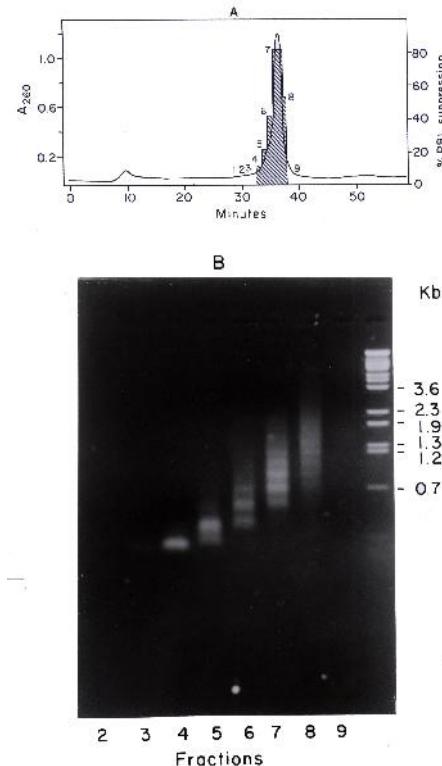
هضم آنزیمی: فراکشن‌ها تحت اثر ۰/۵ mg/ml تریپسین، ۰/۴ mg/ml آلفا کیموتریسین، ۶۲ µg/ml یا RNase به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه هضم و سپس در آزمایش ضد تکثیر به کار رفتد.

آنالیز سیکل سلولی: لنفوسیت‌های تحریک شده با میتوژن در حضور ۲۵ µg/ml فراکشن ضد تکثیر یا در

تشخیص فاکتور ضد رشد: شکل ۱A پروفایل پروتئینی حاصل از ستون تعویض یونی را که با گرادیانت مرحله به مرحله و فراکشن‌های حاوی فاکتور ضد تکثیر را نشان می‌دهد. فاکتور ضد تکثیر در غلظت ۰/۶ مولار نمک طعام از ستون خارج می‌شود. ناحیه I شامل چندین فراکشن است که همگی فعالیت ضد تکثیر داشته و با هم مخلوط شدند. شکل ۱B درصد مهار تکثیر لنفوسیت‌ها را با غلظت‌های مختلف نشان می‌دهد. فاکتور ضد تکثیر با غلظت نهایی ۵۰ µg/ml می‌تواند تکثیر لنفوسیت‌های تحریک شده با PHA یا Con A را تا درصد مهار نماید. این شکل همچنین نشان می‌دهد سوپرناکت غلیظ شده کشت سلولی، دارای حداقل قدرت مهاری است. محیط کشت غلیظ شده، هیچ گونه فعالیت مهار کننده‌گی ندارد که نشان می‌دهد فعالیت ضد تکثیر از اجزاء محیط کشت حاصل نمی‌شود و صرفاً سلول آن را تولید می‌کند.

پس از الکتروفورز، با رنگ کماسی بلو هیچ گونه باندی مشاهده نشد ولی با رنگ نقره چندین باند با وزن مولکولی زیاد مشاهده گردید. مولکولهای این ناحیه از ژل رنگ نشده، جدا گردید و در آزمایش ضد تکثیر مشاهده گردید که فعالیت ضد رشد دارند. جذب نوری این فراکشن با اسپکتروفوتومتر در ۳۲۰-۲۲۰ نانومتر اندازه گرفته شد که حداقل جذب در ۲۶۰ نانومتر بود.

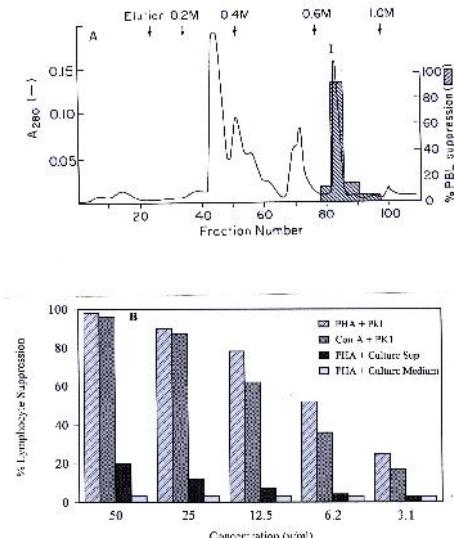
اندازه‌های متفاوتی بوده ولی DNA با وزن مولکولی بین ۱/۵ کیلو باز دارای حداکثر فعالیت ضد رشد است.



شکل شماره ۲: خالص کردن فراکشن (I) حاصل از ستون تعویض یونی به کمک HPLC با ستون Gen-pak. شستشوی ستون با گرادیانت خطی ۰-۱۰۰% NaCl یک مolar در تریس ۲۵ میلی مolar با pH، ۸ صورت گرفت. از هر فراکشن ۲۰ میکرولیتر برای آزمایش فعالیت ضد رشد به کار برده شد. (B) الکتروفوروز فراکشن‌های حاصل از HPLC در ژل آگاراز ۱٪ DNA لمبدا که توسط BstEII خالص شده بود به عنوان شاخص استاندارد به کار رفت.

**خصوصیات فاکتور ضد رشد: آزمایش‌های انجام شده نشان می‌دهد که کشت لنفوسيت‌ها در حضور فاکتور ضد رشد، تغییری در تعداد سلول و میزان زنده بودن آن‌ها ایجاد نمی‌کند و نشان‌دهنده این است که مهار رشد سلول به علت مسمومیت سلولی DNA نمی‌باشد. فاکتور ضد رشد در حرارت ۱۰۰ درجه به مدت ۵ دقیقه**

به علاوه، میزان جذب در ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر برابر ۱/۸ بود که نشان دهنده وجود نوکلئیک اسید است نه پروتئین. فراکشن حاصل از ژل، با هضم شد که حاصل این هضم آنزیمی از بین رفتن باندها بود و نشان دهنده حضور DNA در فراکشن است. ولی RNase اثربخش روی باندها نداشت.



شکل شماره ۱: کروماتوگرافی تعویض یونی سوپرنا坦ت تغليط شده کشت سلول HL-60 در ستون DEAE-CL-6B شستشوی ستون با گرادیانت NaCl صورت گرفت. فراکشن‌ها با با غلظت نهایی ۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر همراه با لنفوسيت‌های خون محیطی که با PHA تحریک شده بودند به مدت سه روز کشت داده شد. فعالیت ضد رشد لنفوسيت‌ها در ناحیه (I) مشخص گردید. (B) فعالیت ضد رشد ماده حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی (فراکشن I) لنفوسيت‌های تحریک شده با PHA یا ConA را نشان می‌دهد که وابسته به دوز می‌باشد.

شکل ۲A جداسازی DNA را به کمک HPLC نشان می‌دهد. آزمایش ضد رشد نشان می‌دهد که حداکثر فعالیت ضد رشد در فراکشن‌های ۷ و ۸ می‌باشد که از ستون HPLC جدا شده. الکتروفوروز این فراکشن‌ها در شکل ۲B نشان می‌دهد که فراکشن‌های DNA دارای

لنسوسیت‌های تحریک شده با میتوژن را که وابسته به دوز است، متوقف نماید. نسبت جذب نوری عامل ضد تکثیر در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز در آگارز ادرصد در حضور پروتئار، RNase و DNase نشان داد که فعالیت ضد رشد به آنزیم پروتولیتیک و RNase حساس نمی‌باشد ولی DNase فعالیت زیستی آن را کاملاً از بین می‌برد. جدا سازی فراکشن‌های مختلف DNA با HPLC نشان داد که مولکول DNA که اندازه آن بین ۰/۶ تا ۱/۵ کیلو باز باشد، فعالیت ضد رشد قوی دارد، ولی مولکول خارج از این محدوده، فعالیت ضد رشد قابل توجهی ندارد. نتایج فلوسیتمتری نشان می‌دهد که رشد لنسوسیت‌ها را در فاز G1 سیکل سلولی متوقف می‌کند و مانع ورود سلول‌ها به فاز S می‌شود. اثر ضد رشد DNA غیرقابل برگشت می‌باشد؛ زیرا اگر پس از سه روز کشت، سلول‌ها شسته شوند و بدون عامل ضد رشد و فقط در حضور میتوژن دوباره فعال شوند، لنسوسیت‌ها به صورت سرکوب شده باقی می‌مانند که نشان می‌دهد فعالیت ضد رشد، غیر قابل برگشت است (نتایج ارائه نشده). همچنین، سلول‌های مختلف سرطانی نسبت به ماده ضد رشد حساسیت متفاوتی دارند که نشان می‌دهد فعالیت ضد رشد DNA یک سم عمومی برای سلول‌ها نمی‌باشد.

مطالعات محدودی که توسط سایر محققین صورت گرفته نشان می‌دهد که DNA ضد رشد ممکن است تکثیر لنسوسیت‌ها را از طریق اتصال به گیرنده اختصاصی DNA متوقف نماید. یک گیرنده اختصاصی DNA در سطح بیشتر لنسوسیت‌ها و منوسيت‌ها شناسایی شده که یک زنجیر پروتئینی با وزن مولکولی ۳۰/۰۰۰ دالتون است (۲۱، ۲۲) و واکنش DNA با لنسوسیت‌های انسان با واکنش لیگاند-رسپتور هماهنگی دارد (۲۱).

(۹۴ درصد توقف رشد) و در حضور آنزیم‌های تریپسین، کیموتریپسین و RNaseA مقاوم بوده (به ترتیب ۷۷ درصد، ۷۱ درصد و ۷۷ درصد) (با مقایسه با شاهد DNase ۷۴ درصد) فعالیت خود را حفظ می‌کند ولی DNase فعالیت ضد رشد آن را از بین می‌برد (۲۷ درصد). این آزمایش‌ها نشان می‌دهند که فعالیت مهارکننده‌گی رشد در اثر RNA است نه DNA و پروتئین.

جدول شماره ۲ آنالیز سیکل سلولی لنسوسیت‌های تحریک شده با PHA را به مدت ۳ روز در حضور فاکتور ضد رشد نشان می‌دهد. DNA رشد لنسوسیت‌ها را در فاز G0-G1 متوقف می‌کند و مانع ورود آن‌ها به فاز S سیکل سلولی می‌شود.

جدول شماره ۲: آنالیز اثر DNA ضد رشد (مقدار ۲۵µg/ml) روی سیکل سلولی با فلوسایتومتری (نتایج، میانگین سه بار تکرار است).

	فازهای سیکل سلولی		شرایط
	G2+M	S	
لنسوسیت	%۰/۰	%۱/۵	%۹۸
لنسوسیت PHA +	%۴/۹	%۱۷/۴	%۷۷/۷
لنسوسیت DNA + PHA +	%۳/۴	%۹/۸	%۸۷/۸

جدول شماره ۱ نشان می‌دهد که لاین‌های سلولی مختلف نسبت به فعالیت ضد رشد DNA حساسیت متفاوتی دارند. رشد سلول HL-60، که DNA از آن‌ها مشتق شده، سلول سرطانی پروستات (JCA-1) و سلول فیبربلاست موش (3T3) تحت تاثیر فعالیت ضد رشد DNA نبوده ولی رشد سایر سلول‌ها متوقف می‌شود.

## بحث

در این مطالعه یک عامل ضد تکثیر که توسط سلول سرطانی HL-60 در محیط کشت آزاد شده شناسایی و خصوصیات آن بررسی شد. این فراکشن قادر است رشد

مرده (۲۵). اگر تعداد مشخصی سلول HL-60 را به مدت ۱، ۲ یا ۳ روز کشت دهیم، مقدار تقریباً مساوی DNA (حدود ۵۱ میکروگرم) از سوپرناتانت کشت سلولی در روزهای مختلف حاصل می‌شود (۲۵). اگر بفرض، DNA از سلول‌های مرده حاصل می‌شد، انتظار می‌رفت که غلظت DNA خارج سلولی در عرض ۲ یا ۳ روز افزایش یابد.

به علاوه، همه سلول‌ها نمی‌توانند DNA آزاد نمایند. در محیط کشت سلول JCA-1، در شرایط یکسان با سلول HL-60، فراکشن DNA با اثر ضد رشد مشاهده نشد. همچنین، در سوپرناتانت کشت سلول T انسان اثرباری از DNA متوقف کننده رشد مشاهده نگردید (۲). در نتیجه، بعيد به نظرمی‌رسد که اکثر DNA در سوپرناتانت کشت سلولی مربوط به سلول‌های مرده یا در حال مرگ باشد. ممکن است برای آزادشدن DNA، کنترل فعل در بعضی از سلول‌ها وجود داشته باشد که هنوز مکانیسم آن مشخص نشده است. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که DNA آزاد شده سلول‌های سرطانی در مدفوع، ادرار و سرم، شاخص خوبی برای تشخیص سرطان کولون می‌باشند (۲۶-۲۸). تومورها، DNA طویل آزاد می‌کنند ولی DNA سلول‌های غیرسرطانی کولون، هنگام مرگ سلولی، قطعه قطعه شده و به صورت قطعات کوچک وارد مدفوع می‌شود (۲۶-۲۸). همچنین، آزاد شده توسط تومورها در سرم، شاخص مناسبی برای تشخیص و پیشگیری سرطان ریه می‌باشد (۲۹). در مورد DNA آزاد شده توسط سلول سرطانی HL-60 به مطالعات بیشتری نیاز است تا مکانیسم عمل و خصوصیات آن به خوبی مشخص شود.

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که توقف رشد لنفوسيت‌ها ممکن است یک پدیده اختصاصی باشد که نیاز به واکنش DNA به گیرنده‌اش دارد. بر عکس، DNA حاصل از سلول سرطانی ممکن است عمل ضد رشد غیراختصاصی برای لنفوسيت‌ها داشته باشد، زیرا وقتی DNA اسپرم ماهی آزاد را به کار می‌بریم، رشد لنفوسيت‌های خون محیطی را به طور غیر اختصاصی متوقف می‌کند (نتایج ارائه نشده).

مطالعات متعددی در مورد آزاد شدن DNA از سلول‌های زنده صورت گرفته است (۹-۱۰). باکتری‌ها، سلول قلب قورباغه (۸) و سلول‌های طحال خرگوش، خود به خود DNA را در محیط کشت آزاد می‌کنند. لنفوسيت‌های انسان بدون تحریک (۱۲) یا پس از تحریک با آنتی‌ژن یا میتوژن (۱۱-۹) مقدار زیادی DNA سنتز شده جدید در محیط کشت آزاد می‌کنند. بیشتر آزاد شده دو رشته‌ای بوده و وزن مولکولی آن‌ها بین  $10^6 \times 10^6$ -۳-۳ دالتون می‌باشد که حدود ۶۰ درصد آن‌ها به غشاء سلول متصل می‌شود (۹، ۱۰). همچنین، معلوم شده است که تزریق لیبو پلی ساکاریدها به موش باعث آزاد شدن DNA در خون محیطی می‌شود که بعداً باعث تولید آنتی‌بادی علیه یک یا دو زنجیره DNA می‌شود (۲۳). آزاد شده با DNA هسته یا میتوکندری فرق دارد و در فاز G1 ساخته می‌شود و نه فاز S در هسته (۲۴).

Mمکن است غیراختصاصی باشد و توسط سلول‌های آسیب دیده یا مرده آزاد شود. ولی به نظر می‌رسد که DNA خارج سلولی در سوپرناتانت کشت توسط سلول زنده آزاد می‌شود نه از سلول HL-60

## فهرست منابع

1. Halpern MT. Human nonspecific suppressive lymphokines. *J.Clin. Immunol.* 1991; 11: 1-12.
2. Abolhassani M, Muraki J, Chiao JW. Purification of a suppressor lymphokine(SL) from a human T-cell line. *Immunological Investigations.* 1989; 18: 741-751.
3. Abolhassani M, Chiao JW. Purification and characterization of a human leukemia cell-derived immunosuppressive factor. *Preparative Biochem.* 1991; 21: 25-33.
4. Sugimura K, Ueda Y, Takeda K, Fukuda S, Tsukahara K, Habu Y, Fujiwara H, Azuma I. A cytokine, lymphocyte blastogenesis inhibitory factor (LBIF), arrests mitogen-stimulated T lymphocytes at early G<sub>1</sub> phase with no influence on interleukin 2 production and interleukin 2 receptor light chain expression. *Eur. J. Immunol.* 1989; 19: 1357-1364.
5. Ebert EC, Roberts AI, O'Connell SM, Robertson FM, Nagase H. Characterization of an immunosuppressive factor derived from colon cancer cells. *J. Immunol.* 1987; 138: 2161-2168.
6. Roth JA, Grimm EA, Osborne BA, Putnam JB, Darrell JR, Davidson D, Ames, RS. Suppressive immunoregulatory factors produced by tumors. *Lymphokine Res.* 1983; 2: 67-73.
7. Santoli D, Tweardy DJ, Ferrero D, Kreider BL, Rovera G. A suppressor lymphokine produced by human T leukemia cell lines; partial characterization and spectrum of activity against normal and malignant hemopoietic cells. *J. Exp. Med.* 1986; 163: 18-40.
8. Stroun M, Anker P. *In vitro* synthesis of DNA spontaneously released by bacteria or frog auricles. *Biochimie.* 1972; 54: 1443-1452.
9. Olsen I, Harris G. Uptake and release of DNA by lymphoid tissue and cells. *Immunology.* 1974; 27:973-987.
10. Rogers JC, Boldt D, Kornfeld S, Skinner SA, Valeri C R. Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or antigen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1972; 69:1685-1689.
11. Boldt DH, MacDermott RP, Speckart SF, Nash GS. Excretion of DNA by purified human lymphocyte subpopulations. *J. Immunol.* 1977; 118: 1495-1498.
12. Anker P, Stroun M, Maurice MA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an *in vitro* system. *Cancer Res.* 1975; 35: 2375-2382.
13. Wickelgren I. DNA's extended domain: Sightings of cell-surface DNA turn *scientific orthodoxy inside out*. *Science News.* 1989; 136: 234-237.
14. Aggarwal SK, Wagner RW, McAllister PK, Rosenberg B. Cell-surface-associated nucleic acid in

- tumorigenic cells made visible with platinum-pyrimidine complexes by electron microscopy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1975; 72: 928-932.
15. Russell JL, Golub ES. Leukemia in AKR mice: A defined suppressor cell population expressing membrane-associated DNA. *Immunology*. 1978; 75: 6211-6214.
16. Russell JL, Golub ES. Cell surface DNA in immunosuppression in AKR leukemia. *J. Immunol.* 1980; 125: 2328-2333.
17. Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension culture. *Nature*. 1977; 270: 347-349.
18. Breitman TR, Collins SJ, Keene BR. Replacement of serum by insulin and transferrin supports growth and differentiation of the human promyelocytic cell line, HL60. *Exp. Cell. Res.* 1980; 126:494-498.
19. Muraki J, Addonizio JC, Choudhury MS, Fischer J, Eshghi M, Davidian MM, Shapiro LR, Wilmot PL, Nagamatsu GR, Chiao JW. Establishment of new human prostatic cancer cell line (JCA-1). *Urology*. 1990; 36: 79-84.
20. Tsukamoto T. Establishment and characterization of a cell line (KU-8) from squamous cell carcinoma of the penis. *Keio J. Med.* 1989; 38: 277-293.
21. Bennett RM, Gabor GT, Merritt MM. DNA binding to human leukocytes: Evidence for a receptor-mediated association, internalization, and degradation of DNA. *J. Clin. Invest.* 1985; 76: 2182-2190.
22. Bennett RM, Hefeneider SH, Bakke A, Merritt M, Smith CA, Mourich D, Heinrich MC. The production and characterization of murine monoclonal antibodies to a DNA receptor on human leukocytes. *J. Immunol.* 1988; 140: 2937-2942.
23. Fournie GJ, Lambert PH, Miescher PA. Release of DNA in circulating blood and induction of anti-DNA antibodies after injection of bacterial lipopolysaccharides. *J. Exp. Med.* 1974; 140: 1189-1206.
24. Lerner RA, Meinke W, Goldstein DA. Membrane-associated DNA in the cytoplasm of diploid human lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1971; 68: 1212-1216.
25. 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.
26. Steinberg D. Detecting tumors from shed DNA. *The Scientist* 2001; 15 1-5.
27. Ahlquist DA. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastrenterology* 2000; 1219-1227.

28. Jen J, et al. An overview on the isolation and analysis of circulating tumor DNA in plasma and serum. *Ann NY Acad. Sci.* 2000; 906: 8-12.
29. Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? *Cancer Treat. Rev.* 2002; 28: 255-271.