

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

محسن ابوالحسنی (Ph.D.) * جن وی چیاو (Ph.D.) **

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: سوپرناتانت کشت سلولی HL-60 پس از تغلیظ به ستون تعویض یونی DEAE-سفاروز CL-6B اضافه گردید و به کمک گرادانت کلرور سدیم، 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 لنفوسیت‌ها، دو رشته بوده و وزن ملکولی آن بین ۰/۶ تا ۱/۵ 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، لنفوسیت‌های تحریک شده توسط میتوز را در فاز G1 سیکل سلولی متوقف می‌نماید و مانع ورود آن‌ها به فاز S می‌شود.

استنتاج: علاوه بر فاکتورهای 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 لنفوسیت‌ها- ناهنجاری‌ها، لوسمی میلوئید حاد، ایمونوسپرسیو

مقدمه

تکثیر لنفوسیت‌های 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 عالی‌تر 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 تا ۷). این عوامل که قادر هستند

* دپارتمان ایمونولوژی انستیتو پاستور ایران

** دپارتمان پزشکی کالج پزشکی نیویورک، والهالا، نیویورک

تاریخ دریافت: ۸۲/۷/۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۲/۱۰/۳ تاریخ تصویب: ۸۳/۲/۱۶

تهیه شدند. سلول سرطانی پروستات (JCA-1) و سلول کارسینومای penile (KU-8) (۱۹-۲۰) در محیط RPM1 حاوی ۱۵ درصد FCS کشت داده شدند.

جدا کردن DNA آزاد شده از سوپرناتانت کشت سلول: سوپرناتانت کشت سلولی HL-60 پس از تغلیظ، در بافر ۰/۰۱ مولار تریس ۸ pH دیالیز شد و به ستون تعویض یونی DEAE-سفاروز CL-6B شرکت فارماسیا (۱۶ × ۶/۵ سانتیمتر) اضافه گردید. ستون را با همان بافر شسته و سپس با گرادینت مرحله به مرحله ۰/۰۱ تا یک مولار نمک طعام فراکشن‌های ۵ میلی لیتری جمع آوری شد که پس از تغلیظ و استریل شدن با فیلتر ۰/۲۵ میکرون مورد آزمایش ضد تکثیر قرار گرفتند. فراکشن‌هایی که فعالیت ضد تکثیر داشتند و در یک ناحیه بودند مخلوط و به کمک HPLC و ستون Gen-Pak خالص گردید. بافرهای بکار رفته در HPLC شامل (A) ۲۵ میلی مولار تریس، یک میلی مولار EDTA، ۸ pH و (B) یک مولار NaCl می باشد. غلظت DNA با جذب در ۲۶۰ نانومتر تعیین گردید. فراکشن‌های حاصل از HPLC در آگارز ۱ درصد الکتروفورز و به وسیله اتیدیوم بروماید شناسایی شدند. DNA فاژ لمبدا هضم شده توسط آنزیم BstEII به عنوان شاخص استاندارد استفاده شد.

آزمایش ضد تکثیر لنفوسیت: لنفوسیت‌های خون محیطی فرد نرمال به وسیله سانتریفیوژ فایکول-هایپک جدا شد (۲) و به مقدار $10^6 \times 3/3$ سلول در میلی لیتر RPMI حاوی ۱۵ درصد FCS به دیش ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید. لنفوسیت‌ها با $70 \mu\text{g/ml}$ PHAM یا $6 \mu\text{g/ml}$ ConA تحریک شدند (۲) و غلظت‌های مختلف سوپرناتانت (بسته به نوع آزمایش) به آن‌ها اضافه گردید. پس از سه روز کشت در ۳۷ درجه، سلول‌ها با $2/3 \mu\text{g/ml}$ سوپرناتانت تایمیدین [^3H] علامت‌دار شدند و پس از ۴ ساعت رادیواکتیو وارد شده در DNA اندازه گیری شد.

کنند. این DNA ممکن است متعاقباً به غشاء سلول متصل شود (۱۲تا۸). DNA در سطح بیش تر سلول‌های سرطانی، سلول‌های T بعضی از گونه‌ها و سلول‌های ترانسفرم شده، شناسایی شده است (۱۳، ۱۴). عمل DNA 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 (۱۵، ۱۶).

گرچه سلول سرطانی پرومیلوسیتیک 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 مایلوئید انسان HL-60 در محیط کشت RPMI-1640 بدون سرم، حاوی انسولین، ترانسفرین و سلنیوم کشت داده شد (۱۸). محیط کشت سلول‌ها که فاقد مایکوپلازما بود هر سه روز عوض و سوپرناتانت آن‌ها پس از سانتریفیوژ در $500 \times g$ در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. همچنین، سلول‌های استئوسارکوما (TE81)، کارسینومای پستان (MCF-7) و لاین سلولی فیروبلاست موش (3T3) که به همین نحو کشت داده شدند. کلیه سلول‌ها از ATCC (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 تثبیت شدند. سپس، سه میلی لیتر (۱mg/ml) RNase اضافه و پس از یک ساعت در حرارت ۳۷ درجه، سلول‌ها شسته شدند. به سلول‌ها ۱ ml از ۵۰ µg/ml پروپیدیم آیداید اضافه و سیکل سلولی با فلوسایتمتری (Coulter, Epics-Profile II) مطالعه شد.

یافته‌ها

تشخیص فاکتور ضد رشد: شکل ۱A پروفایل پروتئینی حاصل از ستون تعویض یونی را که با گرادینت 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 لئوسیت‌ها را با غلظت‌های مختلف نشان می‌دهد. فاکتور ضد تکثیر با غلظت نهایی ۵۰ µg/ml می‌تواند تکثیر لئوسیت‌های تحریک شده با PHA یا Con A را تا ۹۰ درصد مهار نماید. این شکل همچنین نشان می‌دهد سوپرناتانت غلیظ شده کشت سلولی، دارای حداقل قدرت مهار است. محیط کشت غلیظ شده، هیچ‌گونه فعالیت مهارکنندگی 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 هیچ‌گونه باندهی 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 ۲۲۰-۳۲۰ نانومتر اندازه گرفته شد که حداکثر جذب در ۲۶۰ نانومتر بود.

آزمایش ضد تکثیر روی سلول‌های سرطانی نیز به همین صورت انجام گرفت ولی از ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر 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:

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

جدول شماره ۱: اثر DNA در رشد لاین‌های سلولی مختلف

درصد	CPM		سلول در میلی لیتر (× ۱۰۰۰)	لاین سلولی
	+DNA	-DNA		
توقف رشد				
۹۳	۵۵۰۰	۷۶۷۰۰	۱۰۰	KU8
۸۸	۱۱۲۷	۱۱۰۴۸	۱۵	TE81
۷۵	۸۶۰۰	۳۵۰۰۰	۱۰۰	MCF-7
۱۴	۵۴۵۰۰	۶۳۰۰۰	۵۰	3T3
۰	۱۲۲۲۰	۱۲۲۰۰	۵۰	JcA-1
۰	۲۵۲۰۰	۲۵۵۰۰	۱۵	HL-60

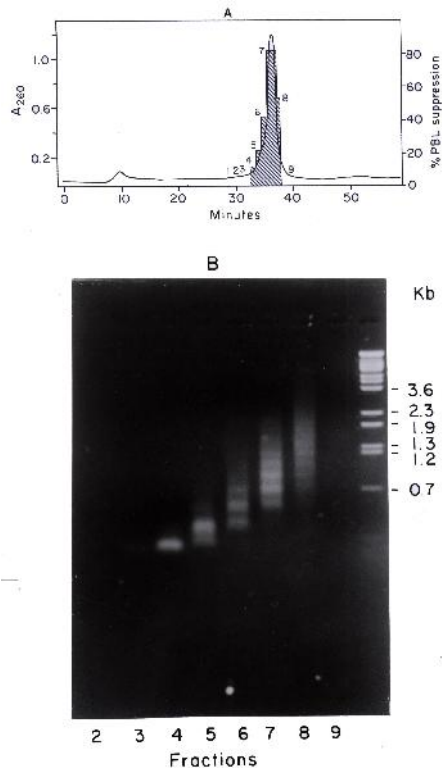
سلول‌ها در حضور DNA (۲۵ µg/ml) یا عدم حضور آن به مدت ۳ روز کشت داده شد. نتایج، میانگین سه بار تکرار است.

الکتروفورز: SDS-PAGE در ژل ۱۰ درصد انجام و سپس با رنگ کماسی بلو و نقره 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 اتیدیم بروماید رنگ آمیزی شد.

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

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

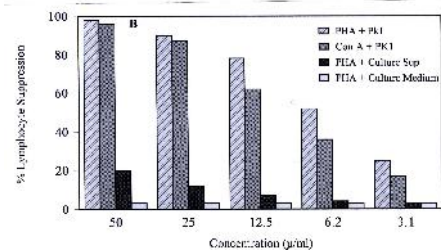
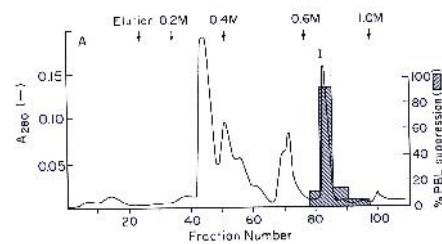
اندازه‌های متفاوتی بوده ولی DNA با وزن مولکولی بین ۰/۶ تا ۱/۵ کیلو باز دارای حداکثر فعالیت ضد رشد است.



شکل شماره ۲: خلاص کردن فراکشن (I) حاصل از ستون تعویض یونی به کمک HPLC با ستون Gen-pak. شستشوی ستون با گرادیانت خطی % 0-100 NaCl یک مولار در تریس ۲۵ میلی مولار با pH ۸، صورت گرفت. از هر فراکشن ۲۰ میکرولیتر برای آزمایش فعالیت ضد رشد به کار برده شد. (B) الکتروفورز فراکشن‌های حاصل از HPLC در ژل آگارز ۱٪ DNA لمبدا که توسط BstEII هضم شده بود به عنوان شاخص استاندارد به کار رفت.

خصوصیات فاکتور ضد رشد: آزمایش‌های انجام شده نشان می‌دهد که کشت لنفوسیت‌ها 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 $^{260}/^{280}$ نانومتر برابر ۱/۸ بود که نشان دهنده وجود نوکلئیک اسید است نه پروتئین. فراکشن حاصل از ژل، با DNase هضم شد که حاصل این هضم آنزیمی از بین رفتن باندها بود و نشان‌دهنده حضور DNA در فراکشن است. ولی RNase اثری روی باندها نداشت.



شکل شماره ۱: کروماتوگرافی تعویض یونی سوپرناتانت تغلیظ شده کشت سلول HL-60 در ستون DEAE سفاروز CL-6B. شستشوی ستون با گرادیانت NaCl صورت گرفت. فراکشن‌ها با غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر همراه با لنفوسیت‌های خون محیطی که با PHA تحریک شده بودند به مدت سه روز کشت داده شد. فعالیت ضد رشد لنفوسیت‌ها در ناحیه (I) مشخص گردید. (B) فعالیت ضد رشد ماده حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی (فراکشن I) لنفوسیت‌های 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. الکتروفورز این فراکشن‌ها در شکل ۲B نشان می‌دهد که فرکشن‌های DNA دارای

لنفوسیت‌های تحریک شده با میتوزن را که وابسته به دوز است، متوقف نماید. نسبت جذب نوری عامل ضد تکثیر در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز در آگارز ۱درصد در حضور پروتئاز، RNase و DNase نشان داد که فعالیت ضد رشد به آنزیم پروتئولیتیک 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 فلوسیتومتری نشان می‌دهد که DNA رشد لنفوسیت‌ها را در فاز G1 سیکل سلولی متوقف می‌کند و مانع ورود سلول‌ها به فاز S می‌شود. اثر ضد رشد DNA غیر قابل برگشت می‌باشد؛ زیرا اگر پس از سه روز کشت، سلول‌ها شسته شوند و بدون عامل ضد رشد و فقط در حضور میتوزن دوباره فعال شوند، لنفوسیت‌ها 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 لنفوسیت‌ها را از طریق اتصال به گیرنده اختصاصی DNA متوقف نماید. یک گیرنده اختصاصی DNA در سطح بیش‌تر لنفوسیت‌ها و منوسیت‌ها شناسایی شده که یک زنجیر پروتئینی با وزن مولکولی ۳۰/۰۰۰ دالتون است (۲۱، ۲۲) و واکنش DNA با لنفوسیت‌های انسان با واکنش لیگاند-رستپور هماهنگی دارد (۲۱).

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

جدول شماره ۲ آنالیز سیکل سلولی لنفوسیت‌های تحریک شده با PHA را به مدت ۳ روز در حضور فاکتور ضد رشد نشان می‌دهد. DNA رشد لنفوسیت‌ها 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 فلوسیتومتری (نتایج، میانگین سه بار تکرار است).

شرایط	فازهای سیکل سلولی		
	G2+M	S	G0-G1
لنفوسیت	٪۰/۵	٪۱/۵	٪۹۸
لنفوسیت + PHA	٪۴/۹	٪۱۷/۴	٪۷۷/۷
لنفوسیت + PHA + DNA	٪۳/۴	٪۹/۸	٪۸۶/۸

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 برفرض، 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 اثری از DNA متوقف‌کننده رشد مشاهده نگردید (۲). در نتیجه، بعید به نظر می‌رسد که اکثر DNA در سوپرناتانت کشت سلولی مربوط به سلول‌های مرده یا در حال مرگ باشد. ممکن است برای آزاد شدن DNA، کنترل فعال 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 (۲۸ تا ۲۶). تومورها، DNA طویل آزاد می‌کنند ولی DNA سلول‌های غیر سرطانی کولون، هنگام مرگ سلولی، قطعه قطعه شده و به صورت قطعات کوچک وارد مدفوع می‌شود (۲۸ تا ۲۶). همچنین، DNA 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 لنفوسیت‌ها ممکن است یک پدیده اختصاصی باشد که نیاز به واکنش DNA به گیرنده‌اش دارد. برعکس، DNA حاصل از سلول سرطانی ممکن است عمل ضد رشد غیراختصاصی برای لنفوسیت‌ها داشته باشد، زیرا وقتی DNA اسپرم ماهی آزاد را به کار می‌بریم، رشد لنفوسیت‌های خون محیطی را به‌طور 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. لنفوسیت‌های 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 DNA آزاد شده دو رشته‌ای بوده و وزن مولکولی آن‌ها بین $10^6 \times 12-3$ دالتون می‌باشد که حدود ۶۰ درصد آن‌ها به غشاء سلول متصل می‌شود (۹، ۱۰). همچنین، معلوم شده است که تزریق لیپو 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). DNA آزاد شده با DNA هسته یا میتوکنندری فرق دارد و در فاز G1 ساخته می‌شود و نه فاز S در هسته (۲۴).

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

- فهرست منابع
- Halpern MT. Human nonspecific suppressive lymphokines. *J.Clin. Immunol.* 1991; 11: 1-12.
 - Abolhassani M, Muraki J, Chiao JW. Purification of a suppressor lymphokine(SL) from a human T-cell line. *Immunological Investigations.* 1989; 18: 741-751.
 - Abolhassani M, Chiao JW. Purification and characterization of a human leukemia cell-derived immunosuppressive factor. *Preparative Biochem.* 1991; 21: 25-33.
 - 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 G₁ phase with no influence on interleukin 2 production and interleukin 2 receptor light chain expression. *Eur. J. Immunol.* 1989; 19: 1357-1364.
 - 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.
 - 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.
 - 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.
 - Stroun M, Anker P. *In vitro* synthesis of DNA spontaneously released by bacteria or frog auricles. *Biochimie.* 1972; 54: 1443-1452.
 - Olsen I, Harris G. Uptake and release of DNA by lymphoid tissue and cells. *Immunology.* 1974; 27:973-987.
 - 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.
 - Boldt DH, MacDermott RP, Speckart SF, Nash GS. Excretion of DNA by purified human lymphocyte subpopulations. *J. Immunol.* 1977; 118: 1495-1498.
 - 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.
 - Wickelgren I. DNA's extended domain: Sightings of cell-surface DNA turn *scientific orthodoxy inside out.* *Science News.* 1989; 136: 234-237.
 - 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, Wilmut 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. *Gastroenterology* 2000; 1219-1227.

28. Jen J, et al. An overview on the isolation and analysis of circulating tumor DNA in plasma and serum. *Annal. 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.