فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۷، شماره ۲، پائیز و زمستان ۸۲

نقش گیرنده آدنوزین A_3 در سیتوتوکسیسیتی رده های سلولی سرطان پستان

مجتبی پنجه پور[۱]، فاطمه کرمی 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 درتمامی 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.

واژه‌های کلیدی : گیرنده آدنوزین، A_3، سرطان پستان،MCF-7، MDA-MB-468 وRT-PCR .

مقدمه

آدنوزین، نوکلئوزید آدنین،در اثر هیدرولیز نوکلئوتید های آدنین(ATP و(ADP توسط نوکلئوتیداز ها حاصل می‌شود. همچنین آدنوزین از طریق واکنش های آنزیمی داخل سلولی از S-آدنوزیل هوموسیستئین بدست می آید [۱و۲]. افزایش غلظت آدنوزین خارج سلولی دارای اثرات بیوشیمیایی، فارماکولوژیک و فیزیولوژیک ویژه ای می‌باشد و از طریق گیرنده های آدنوزین که در سطح سلول هستند اعمال می شود. این گیرنده ها از دسته گیرنده های متصل

به G-پروتئین ها هستند و در چهار زیر گروه قرار دارند: گیرنده های A1 به Gi و A_3 به Gq کوپل می شوند که مستقل از تغییرات درون سلولی غلظت آدنوزین وفعال شدن آن ها منجر به کاهش cAMP داخل سلولی می شود، در صورتی که گیرنده های A2B و A2A به Gs کوپل هستند و با فعال کردن آدنیلات سیکلاز مقدار cAMP را افزایش می دهند [۱-٤]. وجود گیرنده های آدنوزین , A2A A2B و A1 قبل از کلون شدن آن ها به اثبات رسیده بود،در صورتی که وجود A_3 همزمان با کلونینگ آن ابتدا از رت و سپس از انسان مشخص گردید [٥].

اثرات cardioprotective در قلب در حالات هیپوکسی [۱]، neuroprotective در سیستم اعصاب مرکزی از طریق سرکوب آزادسازی نوروترانسمیترها [۱و۲]، اثر ضد التهاب از طریق مهار آزادسازی سیتوکین ها [٦]، تجمع پلاکت ها [۷] و تنظیم فعالیت لنفوسیت ها در سیستم ایمنی [۸] از جمله تاثیرات وسیع آدنوزین از طریق گیرنده A_3 می‌باشد.

یکی از مهمترین اثرات آدنوزین تحریک رشد و تکثیر سلولی [۱و۹] (proliferation) و همچنین تحریک سیتوتوکسیسیتی و مرگ سلولی از نوع apoptosis در سلول‌های طبیعی و سرطانی است [٤]. نوع پاسخ سلولی به تکثیر یا آپوپتوز وابسته به نوع سلول، تنوع و میزان گیرنده آدنوزین در سطح سلول است [۱و۱۰]. یافته‌های محققین در مورد افزایش غلظت آدنوزین خارج سلولی در بافت های سرطانی solid [۹ و ۱۱] ما را بر آن داشت تا به بررسی گیرنده‌های آدنوزین در رده های سلولی سرطان پستان (MCF-7 و MDA-MB-468) بپردازیم. استفاده از لیگاندهای اختصاصی A_3 اطلاعات مهمی را در مورد نقش پاتوفیزیولوژی این دسته از گیرنده ها نشان می دهد [۱۰]. در تحقیق حاضر نقش ویژه گیرنده A_3 با استفاده از آگونیست اختصاصی IB-MECA (K_I=1.1nM) و آنتاگونیست اختصاصی MRS-1220 (K_I=0.65nM) [۱۲] در تکثیر و رشد این سلول ها در کنار استفاده از تکنیک مولکولی (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) RT-PCR برای تعیین بیان گیرنده A_3 در داخل سلول ارایه می گردد.

مواد و روش‌ها

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 ٥٪ CO2، ۹٥٪ هوا ، ۹٥٪ 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 confluency ۸٥٪ می‌رسید پاساژ داده شدند.

تیمار سلول ها با داروها : سلول ها در پلیت های ۹٦ خانه ای با دانسیته سلولی ۳۰۰۰۰ سلول بر میلی لیتر کشت داده شد، پس از ۲٤ ساعت محیط کشت با محیط جدید محتوی غلظت های مختلف آگونیست اختصاصی IB-MECA و یا آنتاگونیست اختصاصی MRS-1220 (هر دو از شرکت Sigma) تعویض و انکوباسیون در زمان های ۲٤و٤۸و۷۲ ساعت انجام گردید (زمان ٤۸ 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

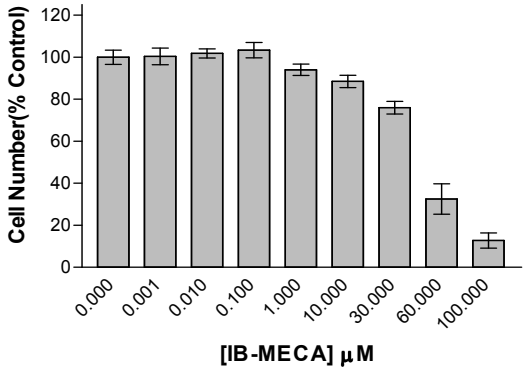
استفاده شد [۱۰]. میزان سلول های زنده بر اساس توانایی میتوکندری در تبدیل ترکیب محلول MTT 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) به محصول نامحلول فورمازان و بررسی تغییرات رنگ سنجی مشخص گردید. میزان تاثیر مواد استفاده شده درالقاء سیتوتوکسیسیته یا تکثیر سلولی در پایان زمان انکوباسیون بررسی گردید. محلول MTT (غلظت نهایی ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) به محیط کشت اضافه و ٤ 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 وتکنیک RT-PCR : RNA سلولی با استفاده از متد acid guanidinium thiocyanate phenol استخراج گردید [۱۳]. واکنش نسخه برداری معکوس (Reverse Transcriptase) وPCR طبق گزارش Gessi و همکاران انجام گردید [۱٤و۱۵]. بطور کلی RNA استخراج شده با استفاده از آنزیم نسخه برداری معکوس M-Mulv (Roche) و با استفاده از پرایمر های شش تایی تصادفی (Random Hexamer) تبدیل به cDNA گردید. سپس یک توالی ۱۵٦ نوکلئوتیدی از ژن گیرنده آدنوزین A_3 با استفاده از پرایمر های تایید شده توسط Gessi و همکاران [۱٤و۱۵]: 5′-ACGGTGAGGTACCACAGCTTGTG-3′، (قطعه forward) و 5′-ATACCGCGGGATGGCAGACC-3′، (قطعه reverse) از cDNA بدست آمده و با استفاده از آنزیم Taq Polymerase تحت شرایط استاندارد تکثیر گردید. برنامه استفاده شده به صورت (۹٤ °C، ۳۰ ثانیه) Denaturation، (۵۹/۵ °C، ۳۰ ثانیه) Annealing و ٦۸ °C، ۲ دقیقه) Polymerization، به تعداد ٤۰ چرخه بود [۱٤و۱۵]. محصولات PCR به دست آمده بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز گردید و با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید (۰/٤ µg/ml) مورد بررسی قرار گرفت [۱٦].

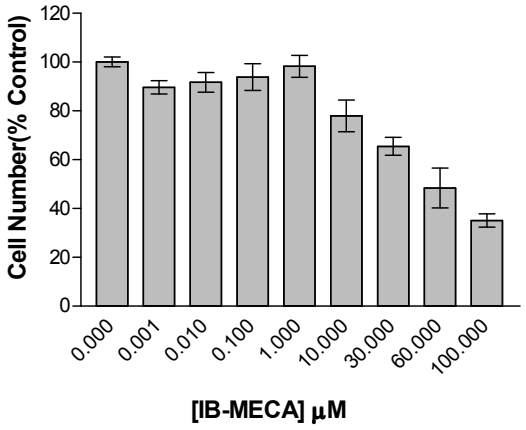
محاسبات آماری و تحلیل داده ها : محاسبات آماری با استفاده ازآنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) که با تست Dunnett تایید می شود و توسط نرم افزار Graphpad Prism 3.02 انجام گردید. آزمایشات به صورت تکرارهای سه تایی است که سه تا چهار بار جداگانه انجام شد. $P<0.05$ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شده است.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

نتایج

تیمار سلول های MCF-7 و MDA-MB-468 با آگونیست A_3، (IB-MECA) به مدت ٤۸ 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 بین۰/۰۰۱ تا ۱۰۰ µM می‌باشد. 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 ($P<0.05$).



شکل ۱ – تاثیر IB-MECA در کاهش تعداد سلول های MCF-7 پس از ٤٨ ساعت انکوباسیون سلول ها در حضور غلظت های افزاینده IB-MECA درصد سلول های زنده با روش MTT تعیین می گردد. نتایج بر اساس MEAN± SD در مقایسه با کنترل به صورت در صد ارایه شده است (n=١٢).آنالیز داده ها به طریق ANOVA یک طرفه انجام و $P<0.05$ معنی دار است.غلظت ها بر حسب میکرو مولار می‌باشد.



شکل ۲– تاثیر IB-MECA در کاهش تعداد سلول های MDA-MB-468 پس از ٤٨ ساعت انکوباسیون سلول ها در حضور غلظت های افزاینده IB-MECA درصد سلول های زنده با روش MTT تعیین می گردد. نتایج بر اساس MEAN ± SD در مقایسه با کنترل به صورت در صد ارایه شده است (n=١٢).آنالیز داده ها به طریق ANOVA یک طرفه انجام و $P<0.05$ معنی دار است. غلظت‌ها بر حسب میکرو مولار می باشد.

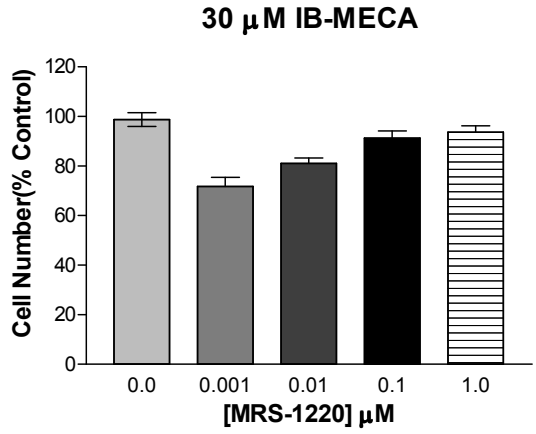
افزایش غلظت تا یک میکرومولار بدون اثر بوده و در غلظت های میکرومولار مجدداً کاهش تعداد سلول ها مشاهده می گردد (شکل۲).

به منظور بررسی اثر آنتاگونیست در تعدیل اثر آگونیست، استفاده توام این لیگاندها وتاثیر 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 غلظتی۱ – 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 ٦٠ میکرو مولارآگونیست مطالعه گردید (شکل۳و٤). به عنوان مثال IB-MECA در غلظت ۳۰ میکرومولار میزان رشد سلول را از ۱۰۰ درصد به ۷۵ درصد ودر غلظت ٦٠ 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 ٦٠ درصد (در حضور غلظت ٦٠ میکرومولار IB-MECA) افزایش می یابد (شکل ٤ الف و ب).

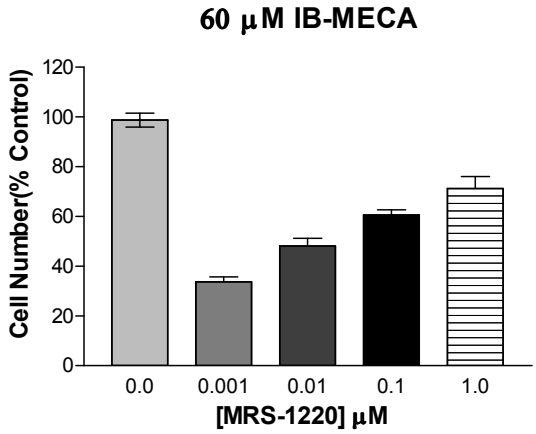
به منظور تعیین بیان گیرندهٔ A_3 آدنوزین در رده های سلولی سرطان پستان (MCF-7 و MDA-MB-468) توسط تکنیک RT-PCR از پرایمر های طراحی شده توسط Gessi و همکاران [١٤و١٥] استفاده شد. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز نشان می دهد که طول قطعه مورد نظر با طول پیش بینی شده از توالی مربوط به ژن A_3 و گزارش Gessi و همکاران مطابقت دارد و مؤید بیان این دسته از گیرنده های آدنوزین در هر دو ردهٔ سلولی سرطان پستان می باشد (شکل ۵).

(در حضور غلظت ٦٠ میکرومولار IB-MECA) افزایش می یابد (شکل ۳ الف و ب). در رده سلولی MDA-MB-468 میزان رشد سلول از ۱۰۰ درصد به ٦٥ درصد در غلظت ۳۰ میکرومولار و به ٤٩ درصد در غلظت ٦٠ میکرومولار IB-MECA می‌رسد و این اثر توسط MRS-1220 ۰/۰۱ میکرومولار به ٦٢ درصد و۰/۱ میکرومولار به ۷۷ درصد (درحضور غلظت ٦٠ میکرومولار IB-MECA) افزایش می یابد (شکل ٤ الف و ب).

الف)

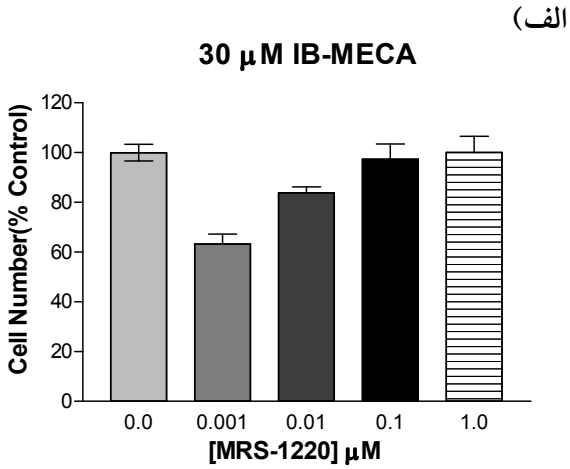


ب)

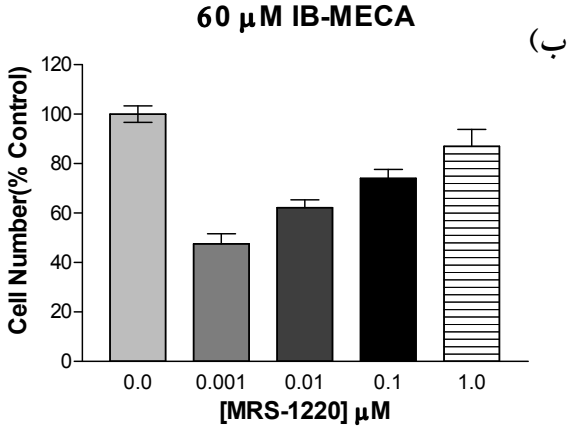


شکل ۳- (الف و ب) تاثیر آنتاگونیست MRS-1220 در تعدیل پاسخ رده سلولی MCF-7 به آگونیست IB-MECA. سلول ها در غلظت ۳۰ میکرومولار آگونیست (الف) و ۶۰ میکرومولار آگونیست (ب) به همراه غلظت های مختلف آنتاگونیست کشت داده و پس از ٤٨ ساعت انکوباسیون درصد سلول های زنده تعیین می گردد. نتایج بر اساس MEAN ± SD ارایه شده است (n=۹). آنتاگونیست MRS-1220 به تنهایی تاثیر معنی داری بر روی سلول های مورد مطالعه ندارد.

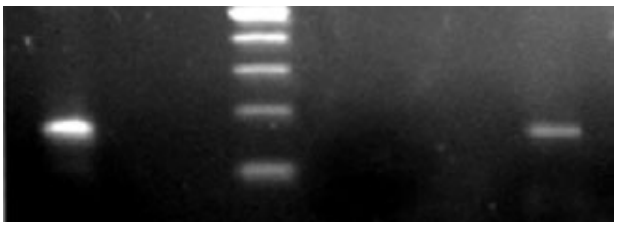
الف)



ب)



شکل ٤- (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 غلظت های مختلف آنتاگونیست کشت داده و پس از ٤٨ ساعت انکوباسیون درصد سلول های زنده تعیین می گردد. نتایج بر اساس MEAN ± SD ارایه شده است(n=۹). آنتاگونیست MRS-1220 به تنهایی تاثیر معنی داری بر روی سلول های مورد مطالعه ندارد.



شکل ۵- محصول حاصل از PCR که بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز و با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شده است .RNA سلولی تخلیص و برای RT-PCR استفاده گردید. ستون ۱ MDA-MB-468، ستون های ۲ و ٤ و ۵ کنترل های منفی، ستون ۳ (DNA M.W. Marker (Fermantas) 100 bp(500bp,400bp,300bp,200bp,100bp و ستون ٦ MCF-7.

بحث

تاثیر مستقیم آگونیست و آنتاگونیست نشان می دهد که اثرات سیتوتوکسیسیته آدنوزین بر روی رده های سلولی مورد نظر از طریق گیرنده های سطح سلول اعمال می شود. در طی دهه های اخیر استفاده گسترده از نوشیدنی‌های کافئین‌دار و ارتباط آن با ایجاد و گسترش سرطان ها بویژه سرطان پستان مورد توجه بوده است [۱۷]. نتایج حاصل از این مطالعات که عمدتاً اپیدمیولوژیک بوده است متناقض می باشد و در سطح مولکولی و بیوشیمیایی کار قابل توجهی انجام نشده است. اگر چه گزارشات معدودی با استفاده از آگونیست ها و آنتاگونیست های گیرنده های آدنوزین بر روی بافت پستان پستانداران، آن هم به طور غیر مستقیم صورت گرفته ولی در هیچ موردی از گیرنده های A_3 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 درکاهش رشد سلول است. مطالعات وسیعی که در مورد توزیع گیرنده های آدنوزین در بافت های انسانی صورت گرفته است [۱و۲۲] از وجود گیرنده های A_3 آدنوزین در بافت پستان گزارشی داده نشده و این نتایج برای اولین بار در سطح این رده های سلولی گزارش می شود. از شواهد متعددی که برای تعیین گیرنده های آدنوزین در یک سلول وجود دارد در رده های سلولی مورد مطالعه دو پارامتر انتخاب گردیده است. استفاده از تکنیک RT-PCR [۱۴و۱۵] تایید کننده حضور و بیان گیرنده A_3 است و استفاده از آگونیست اختصاصی گیرنده A_3 اطلاعات زیادی در مورد نقش این نوع گیرنده در رشد و یا مرگ سلولی می دهد که بر اساس نوع سلول و غلظت لیگاند متفاوت است [۱۰]. در غلظت های پایین(نانومولار) آگونیست A_3 در سلول های HL-60 و U-937 اثر آنتی‌آپوپتوزی [۲۳و۲۴] دارد. در حالیکه در غلظت های بالا (میکرومولار) باعث مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در این رده‌ها [۲۴] و همچنین سلول های ملانوما [۱] یا نکروز در نورون ها [۲۳] می گردد.

نتایج ما نشان می دهد که اثرات سیتوتوکسیسیته آگونیست در دو رده سلولی مورد مطالعه در دوزهای مختلف متفاوت است. علت این تفاوت را میتوان به نوع سلول ($MCF\text{-}7(ER^+)$ و $MDA\text{-}MB\text{-}468(ER^-)$، توزیع متفاوت گیرنده های آدنوزین که می تواند پاسخ سلول به گیرنده A_3 را تغییر دهد وهمچنین تفاوت در میزان بیان گیرنده A_3 نسبت داد. در مواردی مانند استرس‌های هیپوکسی که در قسمت های مرکزی توده سرطانی بوقوع می‌پیوندد غلظت آدنوزین بشدت افزایش یافته [۶و۹و۱۱] و باعث تاثیر بر روی رشد سلول های مجاور از طریق گیرنده‌های مربوطه می شود. اگرچه نقش گیرنده های آدنوزین در فرآیندهای رگ زایی و متاستاز مورد بحث است [۲] ولی نقش ویژه گیرنده A_3 بر روی مرگ و یا رشد سلول توجه زیادی را به عنوان یک هدف درمانی جلب کرده است [۱و۹و۱۰]. مطالعه بر روی سلول‌های CHO و HEK293 که هر دو فاقد این گیرنده هستند نشان می دهد که اگر آن ها را با گیرنده A_3 ترانسفکت کنند، اثرات سیتوتوکسیک IB-MECA اختصاصاً فقط در سلول های ترانسفکت شده دیده می شود ودر سلول های فاقد گیرنده(wild type) اثری ندارد [۱۰]. این یافته نشان می دهد که تاثیر IB-MECA فقط از طریق گیرنده A_3 صورت می‌گیرد و بر گرداندن اثر آگونیست توسط آنتاگونیست نیز تایید کننده دیگری بر این موضوع می باشد [۱۰].

مسیر انتقال پیام داخل سلولی که از طریق فعال شدن گیرنده A_3 باعث مرگ سلولی می شود می تواند از طریق افزایش Ca^{2+} بدنبال 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

عوامل دخیل در آن بسته به نوع سلول و توزیع گیرنده های دیگر آدنوزین متفاوت است [۱و۲۶و۲۷و۲۸]. اهمیت گیرنده های آدنوزین در رده های سلولی سرطان پستان می‌تواند به عنوان اولین قدم در مشخص نمودن نقش این گیرنده ها در ایجاد و پیشرفت این سرطان تلقی گردد.

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.

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 A_3 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 A_3 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 A_3 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 A_3 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 Abbracchio, 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. A_3 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. Gubitz, 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 A_3 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 A_3 receptor agonists protect HL-60 and U-937 cells from apoptosis induced by A_3 antagonists, ***Biochem Biophys Res Commun.,*** 232 (1997) 317-322.

[25] Sei, Y. Von Lubitz, DK. Abbracchio, MP. Ji, XD. and Jacobson, KA. Adenosine A_3 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.