

Ингибирование пролиферации раковых клеток

Исследования *in vitro* на культивированных линиях раковых клеток.

[Исследование *in vitro*].

Были проверены ингибирующие рост раковых клеток свойства, проявленные PS - B1.

Метод испытания.

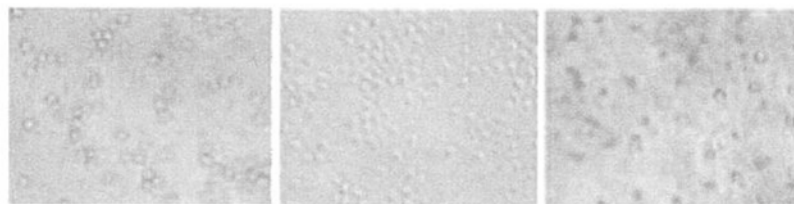
PS-B1 действовал на культивированные линии клеток промиелоцитарной лейкемии человека (HL60), клетки Т-лимфоцитарной лейкемии (Jurkat), клетки Т-лимфоцитарной лейкемии (MOLT-4), гистологическую лимфому (U937), рак легких (A549) и рак желудка (KatoHI).

[Результаты испытаний *in vitro*].

I Открытие ингибирования пролиферации раковых клеток.

① Было исследовано влияние PS-B1 на рост клеточной линии промиелоцитарного лейкоза человека (HL60).

PS - B1 добавляли в культуральную среду клеток HL60 после предварительной культуры, и внешний вид клеток через 24 часа наблюдали под оптическим микроскопом, как показано на рисунке 1.



Контроль
(0 часв)

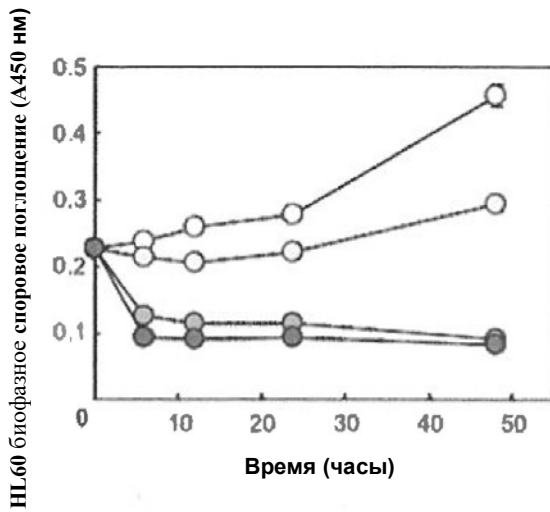
Контроль
(24 часа)

+ 4,5% дозировка
BS-B1 (24 часа)

[Рис. 1] Ингибирующий эффект PS-B1 на рост раковых клеток против клеточной линии промиелоцитарного лейкоза человека (HL60).

В клетках HL60, обработанных PS - B1 в дозе 4,5% от объема среды, клетки, соответствующие 49,8% в начале эксперимента (через 24 ч), достигли гибели. Результаты свидетельствуют о том, что PS-B1 обладает мощной ингибирующей рост раковых клеток активностью.

② Для дальнейшего выяснения природы ингибирующей рост клеток активности PSB1, было исследовано влияние изменения количества PS - B1, добавленного в среду (1,8%, 4,5% и 9,0%), на количество жизнеспособных клеток HL60, результаты показаны на рисунке 2.



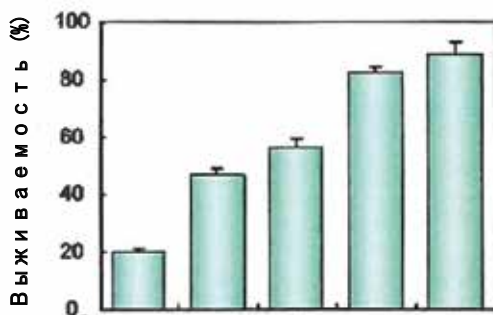
[Рис. 2] Ингибирующий эффект PS-B [на рост клеточной линии промиелоцитарного лейкоза человека (HL60) (изменение со временем).

Количество **клеток в начале** эксперимента в клетках HL60 без PS - B1 рассчитывалось как 100%.

Содержание PS-B1 в среде: ○ контроль, ○ 1,8% ● 4,5% ● и 9,0%.

Количество клеток HL60 в среде без PS- B1 значительно увеличивалось со временем, но было обнаружено, что добавление небольшого количества PS B1 (1,8%) подавляло рост клеток HL60. Кроме того, было обнаружено, что увеличение доли PS-B1 в среде сильно подавляло пролиферацию клеток HL60, и количество клеток начинало уменьшаться. В связи с вышеизложенным, было сочтено необходимым исследовать возможность того, что PS -B1 индуцирует программируемую гибель клеток или арест (нарушение) клеточного цикла в клетках HL60.

II Спектр ингибирования роста раковых клеток PS-B1 против многовидовых раковых клеток и влияние на нормальные клетки. Активность ингибирования роста раковых клеток PS - B1 была исследована на пяти других линиях раковых клеток человека (Jurkat, MOLT-4, U937, A549 и KatoHI), отличных от клеток HL60. [Рисунок 3.]



[Рис. 3] Ростоподавляющая активность PS-B1 против клеточных линий рака человека.

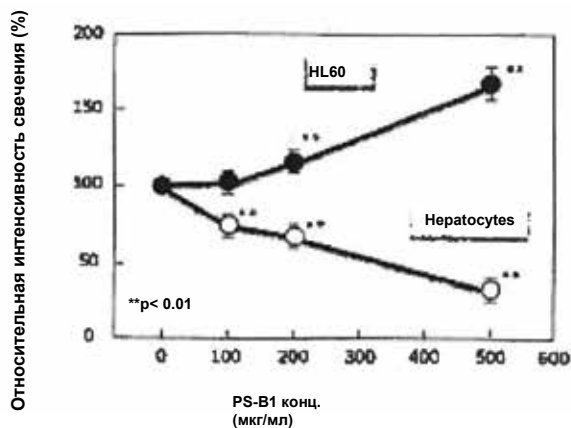
Количество жизнеспособных клеток в каждой группе клеток без PS - B1 рассчитывалось как 100% от количества жизнеспособных клеток через 24 ч после начала эксперимента.

Рак человека/штамм

Значительное снижение жизнеспособности клеток после 24 часов действия PS - B1 (доза 4,5%) было обнаружено во всех пяти линиях клеток рака человека. Результаты показывают, что PS-B1 обладает чрезвычайно широким спектром ингибирования роста раковых клеток. В частности, было установлено, что они также проявляют сильную активность против гематологических раковых клеточных линий (H60, Jurkat, MOLT-4 и U937).

III Повышение уровня реактивных форм кислорода в раковых клетках

Некоторые противораковые препараты оказывают свое противораковое действие путем специфического увеличения количества внутриклеточных реактивных форм кислорода в раковых клетках. Поскольку PS - B1 проявляет ингибирующий рост раковых клеток эффект только на раковые клетки, в качестве одного из возможных механизмов действия этой физиологической активности рассматривалось влияние на реактивные формы кислорода в раковых клетках. Поэтому PS-B1 наносили на клетки HL60 и гепатоциты (нормальные клетки) и определяли изменения в количестве внутриклеточных реактивных форм кислорода [рис. 4].

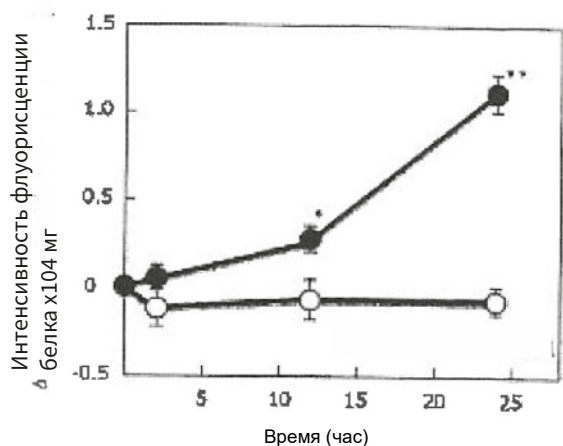


[Рис. 4] Влияние PS-B1 на количество внутриклеточных реактивных форм кислорода в клетках HL60 и нормальных клетках (гепатоцитах).

В гепатоцитах, обработанных PS - B1, количество внутриклеточных ROS уменьшалось дозозависимым образом при добавлении PS - B1. Напротив, количество ROS в клетках HL60 увеличилось. Результаты этого исследования, которые показали противоположные результаты между нормальными клетками (гепатоцитами) и раковыми клетками (клетками HL60), позволяют предположить, что полученные результаты могут стать ключом к ответу на вопрос "почему PS-B1 действует только на раковые клетки?".

IV Индуцирование апоптоза

① В эксперименте III было обнаружено, что PS - B1 увеличивает количество ROS в клетках HL60. Поскольку повышение активности каспазы-3 является мощным фактором для индуцирования апоптоза, было исследовано влияние на активность каспазы-3 в клетках HL60, обработанных PS - B1, и результаты показаны на рис. 5.



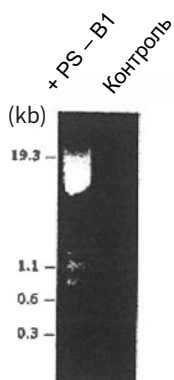
[Рис. 5] Влияние PS-B1 на активность каспазы-3 в клетках HL60.

(○) PS - B1 дополнение, (●) PS - добавление B1

В клетках HL60, обработанных PS -B1, было обнаружено, что активность каспазы 3 в клетках HL60 специфически повышалась пропорционально длительности воздействия.

② Поскольку фрагментация генома в клетках HL60 ожидалась под действием каспазы 3, ДНК была выделена из обработанных PS -B1 клеток HL60 и подвергнута гель-электрофорезу на агарозе. Полученная фореитическая картина показана на рисунке 6.

[Рисунок 6.]

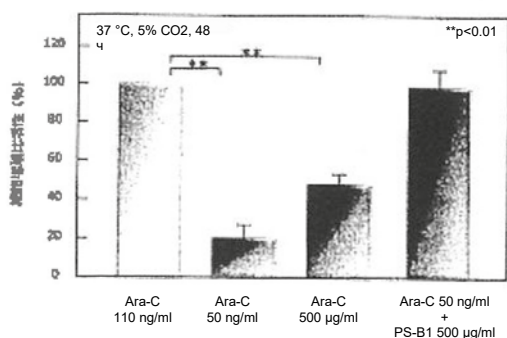


[Рис. 6] Фрагментация ДНКВ клеток HL60 под действием PS-B1.

Фрагментация ДНК была обнаружена в клетках HL60 с PS - B1.

Результаты (1) и (2) выше свидетельствуют о том, что PS - B1 увеличивал количество реактивных видов кислорода в клетках HL60 специфическим для раковых клеток образом, что в свою очередь вызывало увеличение активности каспазы-3 и последующую фрагментацию ДНК, в конечном итоге вызывая апоптоз.

V Возможность комбинированной терапии с противораковыми препаратами. Ara-C (цитарабин), одно из ведущих противораковых средств против лейкемии, показал концентрационно-зависимую противораковую активность против клеток HL60. Хотя предпочтительнее использовать противораковые препараты в минимально возможной концентрации, важно, чтобы интенсивность противоракового действия сохранялась. Поэтому была исследована возможность усиления PS - B1 противоракового эффекта Ara-C при использовании PS - B1 в комбинации с Ara-C, результаты показаны на рисунке 7.



[Рис. 7] Влияние PS-B1 на противораковое действие Ara-C.

Если противораковая активность при добавлении 110 нг/мл Ara-C составляла 100%, то противораковая активность при добавлении 50 нг/мл Ara-C составляла приблизительно 20%. Однако при сочетании с 500 μ г/мл PS - B1 противораковая активность 50 нг/мл Ara-C возросла почти до 100% от эквивалента Ara-C 110 нг/мл. PS - B1 был признан важным и был сделан вывод для поддержки новых видов использования B1 в будущем.