بررسی اثر آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد hCG، بر روی رده سلول‌های سرطانی انسان

مجتبی فتحی[۱]
منوچهر میرشاهی[۲*]
محمدرضا قرائتی[۲]

۱- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲- گروه بیوشیمی پایه، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، ،بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی تلفن: ۸۲۸۸۴۴۰۸-۰۲۱
E-mail: mirshahi@modares.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۵/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۷/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های سرطانی، صرف‌نظر از نوع و منشأ آن‌ها هورمون گنادوتروپین جفتی انسان (hCG)، زیرواحدها و مشتقات آن را بیان می‌کنند، ظاهراً hCG، فنوتیپ مشترک رده سلول‌های سرطانی انسان است. در این تحقیق اثر آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد hCG (7D9، T18H7 و T8B12) روی سلول‌های سرطانی انسان بررسی شد. ***روش بررسی:*** هیبریدوماهای ترشح‌کننده آنتی‌بادی‌های منوکلونال 7D9، T18H7 و T8B12 تکثیر و به موش‌های Balb/C به‌صورت داخل صفاقی تزریق شدند. تخلیص آنتی‌بادی‌ها از مایع آسیت، با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی پروتیین G- سفارز و سپس تعویض یونی انجام گرفت. SDS-PAGE و الایزا به‌ترتیب ساختار و عملکرد آنتی‌بادی‌ها را تأیید کرد. دو رده سلول سرطانی انسان "Hela و MDA"، توسط آنتی‌بادی‌های تخلیص شده، تیمار شدند. سه روز بعد، از چاهک‌ها، میکروگراف تهیه گردید و سپس شمارش سلولی انجام شد. ***یافته‌ها:*** ژل غیراحیایی SDS-PAGE نشان داد که الگوی مهاجرت باندها با آنتی‌بادی کنترل، مطابقت دارد. تست الایزا با آنتی‌ژن مربوطه (hCG) نشان داد که آنتی‌بادی‌های تولیدشده قادر به تشخیص آنتی‌ژن hCG هستند. شمارش سلولی و تصاویر میکروسکوپی از چاهک‌های مختلف تیمارشده، ثابت کرد که از بین آنتی‌بادی‌های مورد مطالعه، آنتی‌بادی 7D9 اثرات سیتوتوکسیک روی سلول‌های مورد مطالعه دارد. ***نتیجه‌گیری:*** آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد hCG می‌توانند در تیمار هدفمند سرطان استفاده شوند؛ چون سلول‌های سرطانی، ژن hCG را بیان می‌کنند. آنتی‌بادی 7D9 که فعالیت پروتئازی دارد، کاندیدای مناسبی برای این هدف است؛ چون هم خاصیت خنثی کردن عملکرد hCG و هم خاصیت آنزیمی دارد.

کلمات کلیدی: سرطان، گنادوتروپین جفتی انسان، اثر سیتوتوکسیک، آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد hCG.

مقدمه

هورمون گنادوتروپین جفتی انسان human Chorionic Gonadotropin (hCG)، سیالو گلیکو پروتیینی متعلق به خانواده هورمون‌های TSH، FSH و LH است که از دو زیر واحد آلفا و بتا تشکیل شده است. زیرواحد آلفای آن ۹۲ اسید آمینه و زیرواحد بتای آن ۱۴۶ اسید آمینه دارد. زیرواحد آلفای تمام هورمون‌های گلیکو پروتیینی این خانواده (TSH، FSH و LH) مشابه است و تفاوت زیرواحد بتای این هورمون‌ها مربوط به‌دنباله ۲۴ اسید آمینه‌ای است که در قسمت C- ترمینال hCG واقع شده و C- ترمینال پپتید (CTP) نام دارد.[۱] تولید هورمون hCG در طول دوران بارداری توسط جفت و در سرطان‌ها توسط تومورها صورت می‌گیرد. به‌ویژه، حضور hCG و زیرواحدهای آن مخصوصاً βhCG در انواع مختلف سلول‌های سرطانی، با روش فلوسیتومتری (Flow cytometry) نشان داده شده است.[۲-۴] در ارتباط با نقش hCG در سرطان، یافته‌ها نشان می‌دهد که زیرواحد بتای hCG عامل متاستاز و hCG holo عامل رشد موضعی در تومورها محسوب می‌شود. از این رو نقش βhCG به‌عنوان بیومارکر پیش‌آگهی در سرطان‌های مختلف مثل تخمدان، پروستات، پانکراس و غیره ارزیابی شده است.[۵-۷] با کریستالوگرافی hCG موتیف ساختاری Cystein knot در آن مشخص شده که وجه مشخصه فاکتورهای رشد

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

است و پیشنهاد شده که hCG ترشحی، مثل یک فاکتور رشد عمل کرده، باعث افزایش VEGF که عامل مهمی در آنژیوژنز محسوب می‌شود می‌گردد.[۸-۱۰] همان‌طور که پیش‌تر گفته شد hCG فنوتیپ مشترک سلول‌های سرطانی است و نقش‌های مهمی در رشد، آنژیوژنز و متاستاز سلول‌های سرطانی دارد، پس می‌توان از آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد آن، در ایمنی درمانی سرطان‌ها و به‌عنوان بیومارکر در تشخیص و پیش‌آگهی استفاده کرد. در مرکز تحقیقات آنتی‌بادی‌های منوکلونال دکتر میرشاهی، برای بعضی نقاط آنتی‌ژنیک hCG، هیبریدوماهای ترشح‌کننده آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولید شده است. در پژوهش حاضر از این هیبریدوماها برای تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد hCG استفاده شد و پس از تخلیص، اثر آن‌ها روی دو رده سلول سرطانی انسان "Hela" و "MDA" بررسی گردید.

روش بررسی

مواد مورد استفاده در این مطالعه تجربی شامل هیبریدوماهای T18H7، 7D9 و T8B12 تولیدکننده آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد hCG و Man-1 تولیدکننده آنتی‌بادی ضد Fc (IgG انسانی) است که از مرکز تحقیقات آنتی‌بادی‌های منوکلونال دکتر میرشاهی تهیه شدند. رده سلول سرطانی Hela (Carcinoma cell line of the cervix) از انستیتو پاستور ایران و رده سلولی سرطان پستان MDA، (Carcinoma cell line of the breast) از بانک سلولی دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس خریداری شدند. آنتی‌بادی ثانویه Goat Anti-Mouse IgG, Horseradish Peroxides Conjugated از شرکت Sigma و محیط کشت سلولی RPMI 1640 و سرم جنین گاوی (FBS) از شرکت Gibco و پروتیین G- سفارز از اینویتروژن خریداری شدند. بقیه مواد مصرفی از شرکت Sigma تهیه شدند و کشت هیبریدوماها و رده سلول‌های سرطانی در انکوباتور کشت سلولی (۳۷ °C و ۵٪ CO2) انجام و برای اطمینان از حیات سلول‌ها شمارش سلولی با تریپان بلو و لام نئوبار انجام شد. پاساژ سلول‌ها با تریپسین ۰/۲۵٪ PBS و ۰/۱٪ EDTA صورت گرفت. بخشی از آزمایش‌ها در دانشگاه تربیت مدرس در سال ۱۳۸۵ و آزمایش‌های تکمیلی آن در مرکز تحقیقات آنتی‌بادی‌های منوکلونال دکتر میرشاهی در سال ۱۳۸۸ انجام شد.

تولید و تخلیص آنتی‌بادی‌ها از آسیت: هیبریدوماها در محیط RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۶۰µg/ml جنتامایسین به‌همراه لایه تغذیه‌دهنده (طحال موش Balb/C) کشت داده شدند. سلول‌ها پس از جمع‌آوری، به موش‌های نژاد Balb/C که با پریستان تیمار شده بودند، به‌صورت داخل صفاقی (۵×۱۰۶ سلول به هر موش) تزریق شدند. دو هفته بعد، مایع آسیت‌ها جمع‌آوری و به‌منظور تخلیص در ۲۰ °C- نگه‌داری شدند. مایع آسیت‌های جمع‌آوری‌شده، به‌روش رسوب با آمونیوم سولفات ۵۰ درصد تغلیظ و به‌مدت یک شبانه روز با کیسه دیالیز ۱۲۰۰۰ Cutoff علیه بافر PBS دیالیز شدند. نمونه‌های تغلیظ‌شده، بر روی ستون تمایلی پروتیین G- سفارز و سپس تعویض یونی سلولز- DEAE انتقال یافتند. جهت به‌تعادل رساندن و شستشوی ستون‌ها، به‌ترتیب از PBS و Tris-HCl (pH=۵) استفاده گردید. میزان جذب نوری نمونه‌های خالص‌شده در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و با استفاده از قانون بیر- لامبرت، غلظت نمونه‌های پروتیینی محاسبه گردید. خلوص آنتی‌بادی‌های تخلیص‌شده با SDS-PAGE، در ژل ۱۰ درصد غیراحیایی (۱۲V/cm) و با رنگ‌آمیزی کوماسی آبی G-۲۵۰ مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی واکنش آنتی‌بادی‌های منوکلونال با hCG، آنتی‌ژن hCG در چاهک‌های الایزا قرار گرفت (۱mg/ml) و پس از انکوباسیون شبانه، آنتی‌بادی‌های منوکلونال تخلیص‌شده با غلظت‌های مختلف به چاهک‌های الایزا اضافه و به‌مدت ۹۰ دقیقه انکوبه گردیدند که به‌دنبال آن آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار با HRP اضافه و به‌مدت ۹۰ دقیقه انکوبه گردید. از سوبسترای TMB و اسید سولفوریک دو نرمال به‌ترتیب برای انجام واکنش و توقف واکنش استفاده گردید. پس از توقف واکنش، جذب در OD ۴۵۰ توسط الایزا ریدر خوانده شد.

تیمار رده سلول‌های سرطانی با آنتی‌بادی‌های منوکلونال خالص: رده سلول‌های سرطانی Hela و MDA در حالت فاز لگاریتمی در پلیت شش خانه (۳۵۰×۱۰۳ سلول در هر چاهک) کشت داده شدند و با غلظت ۱۰nM از آنتی‌بادی‌های منوکلونال تخلیص‌شده، تیمار شدند. پس از سه روز انکوباسیون در دمای ۳۷ °C و ۵٪ CO2، چاهک‌ها با میکروسکوپ اینورت بررسی و میکروگراف تهیه شد و از هر چاهک شمارش سلولی انجام گرفت (تعداد آزمایش‌ها= ۱۰) که از میانگین آن‌ها برای آنالیز داده‌ها استفاده گردید. از نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۶ و روش آنالیز Student's t- test و one way ANOVA برای آنالیز داده‌ها استفاده شد و داده‌ها به‌صورت میانگین با انحراف‌معیار

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

مشخص (Mean±SD) محاسبه گردید (تعداد آزمایش‌ها= ۱۰). مقادیر میانگین در گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری نشان می‌داد وقتی P<۰/۰۱ در نظر گرفته می‌شد.

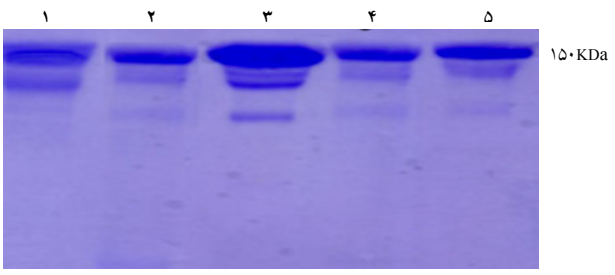
یافته‌ها

تولید و تخلیص آنتی‌بادی‌ها: جهت حصول اطمینان از تخلیص آنتی‌بادی‌ها به‌وسیله کروماتوگرافی تمایلی پروتیین G- سفارز و تعویض یونی، SDS-PAGE انجام شد. همان‌طوری که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد از آنتی‌بادی شماره پنج به‌عنوان شاخص وزن مولکولی استفاده شده است و علت وجود باندهای اضافی، هیبریدوماهای مورد استفاده است که بعضی از زنجیره‌های کوچک و بزرگ آنتی‌بادی‌ها را تولید و ترشح می‌کنند و همراه آنتی‌بادی‌ها تخلیص می‌گردند. الگوی باند آنتی‌بادی‌های تخلیص‌شده با الگوی آنتی‌بادی کنترل مشابه بوده و بیانگر تخلیص خوب آن‌ها می‌باشد. برای اطمینان از فعال بودن آنتی‌بادی‌ها، الایزا انجام شد (نمودار ۱). پس از قرار دادن آنتی‌ژن hCG در چاهک‌های الایزا، غلظت‌های متفاوتی از آنتی‌بادی‌های تخلیص‌شده، به آن‌ها اضافه شده است. همان‌طوری که نمودار ۱ نشان می‌دهد هر سه آنتی‌بادی 7D9، T8B12 و T18H7 که ضد hCG هستند آنتی‌ژن hCG را می‌شناسند؛ ولی آنتی‌بادی منوکلونال Man-1 که ضد Fc ایمونوگلوبولین انسانی است، آنتی‌ژن hCG را نمی‌شناسد.

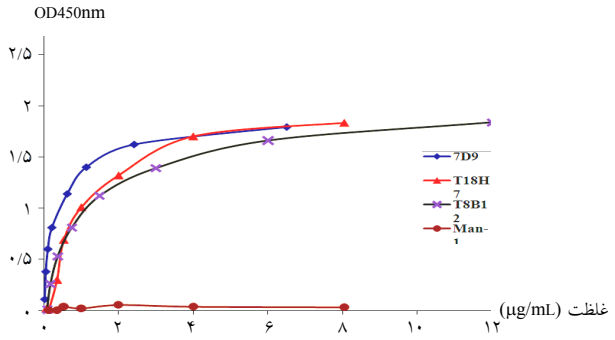
تیمار رده سلول‌های سرطانی با آنتی‌بادی‌های منوکلونال خالص و تصاویر میکروسکوپی: رده سلول‌های سرطانی "Hela" و "MDA" سه روز پس از تیمار با آنتی‌بادی‌های خالص‌شده (7D9، T8B12 و T18H7)، توسط میکروسکوپ اینورت مورد مشاهده و بررسی قرار گرفتند، سپس تریپسینه و شمارش شدند. همان‌گونه که در شکل ۲ مشخص است آنتی‌بادی 7D9 اثر سیتوتوکسیک روی رده سلولی Hela و MDA دارد و از تکثیر آن‌ها ممانعت می‌کند، در صورتی‌که تکثیر سلول‌ها در چاهک‌های تیمارشده با T8B12 و T18H7 مثل کنترل صورت می‌گیرد. این مشاهدات با شمارش سلولی از چاهک‌های مرتبط با تصاویر و آنالیز داده‌ها (P<۰/۰۱) تأیید شدند. از طرفی هم اثرات آنتی‌بادی‌های 7D9، T8B12 و T18H7 روی رده سلولی MDA، مشابه اثرات آن‌ها بر روی Hela (شکل ۲-A) بود. ضمن این‌که اثر مهاری 7D9 بر رشد MDA شدیدتر می‌باشد (شکل ۲-B).

رده سلول سرطانی Hela: تعداد سلول‌ها در چاهک‌های تیمارشده با آنتی‌بادی‌های منوکلونال T18H7، 7D9، Man-1 و T8B12، پس از گرفتن تصویر شمارش (۱۰ آزمایش) و با نرم‌افزار SPSS آنالیز شد. نمودار ۲، نمایانگر متوسط سلول‌های شمارش‌شده در این چاهک‌ها در رده سلولی Hela است. T18H7، Man-1، T8B12 و کنترل اختلاف معنی‌دار نداشته و 7D9 اختلاف آشکاری با آن‌ها دارد (P<۰/۰۱).

رده سلول سرطانی MDA: همان‌گونه که در بالا ذکر شد، در این آزمایش نیز سلول‌های سرطانی MDA که توسط آنتی‌بادی‌ها تیمار شده بودند، شمارش و سپس تحلیل آماری انجام شد (نمودار ۳). تفاوت معنی‌داری بین چاهک‌های آنتی‌بادی‌های T18H7، Man-1 و

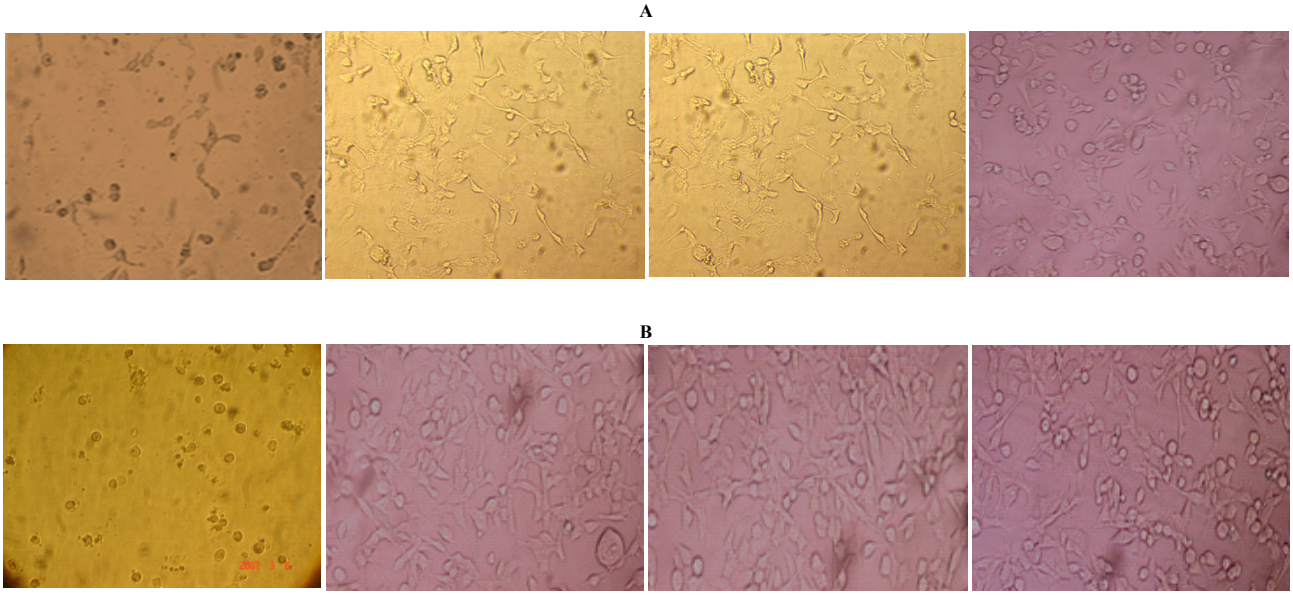


شکل-۱: ژل SDS-PAGE غیراحیایی آنتی‌بادی‌های منوکلونال تخلیص شده. شماره ۱، Man-1 آنتی‌بادی منوکلونال ضد قطعه Fc آنتی‌بادی IgG انسانی، شماره‌های ۲ و ۳ و ۴، T18H7 و T8B12 و 7D9 هر سه آنتی‌بادی ضد hCG هستند. آنتی‌بادی شماره ۵ به‌عنوان کنترل وزن مولکولی و الگوی تخلیص می‌باشد که وزن مولکولی آن ۱۵۰ کیلودالتون است



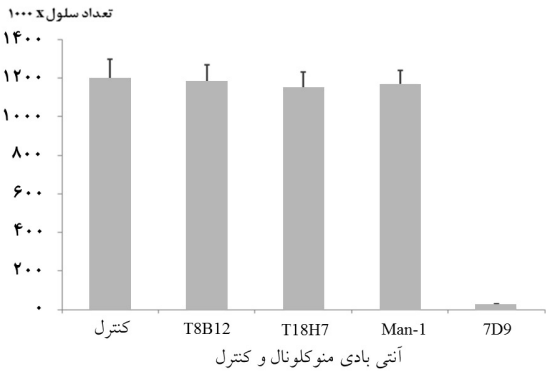
نمودار-۱: واکنش آنتی‌بادی‌های 7D9، T18H7، T8B12، Man1 با آنتی‌ژن hCG (الایزا). hCG در پلیت الایزا coat و ۲۴ ساعت در دمای اتاق انکوبه و غلظت‌های مختلف آنتی‌بادی‌های اولیه اضافه شد. آنتی‌بادی ثانویه، آنتی mouse نشان‌دار با HRP بود و جذب نوری در ۴۵۰nm پس از اضافه کردن TMB و توقف با اسید سولفوریک ۲ نرمال با الایزا ریدر خوانده شد

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]



شکل-۲: اثر آنتی‌بادی‌های منوکلونال 7D9، T8B12 و T18H7 روی رده سلول‌های سرطانی "Hela" و "MDA". (A) از چپ به راست به‌ترتیب تصویر چاهک تیمارشده با ۱۰nM از 7D9، T_8B_{12} و $T_{18}H_7$ بر روی Hela است و شکل چهار از چپ به راست، مربوط به چاهک کنترل است که با هیچ ماده‌ای تیمار نشده است. 7D9 اثر سیتوتوکسیک بر روی Hela دارد و چاهک‌های مربوط به T_8B_{12} و $T_{18}H_7$ از نظر رشد مثل چاهک کنترل می‌باشد که با شمارش سلولی چاهک‌ها پس از تریپسینه کردن، در آزمایش‌های متعدد (n=۱۰ و P<۰/۰۱) تأیید شد. اختلاف معنی‌داری بین اثر مهار رشد بین چاهک مربوط به 7D9 و بقیه چاهک‌ها وجود دارد این اختلاف‌ها بین T_8B_{12} و $T_{18}H_7$ و همین‌طور بین آن‌ها و چاهک کنترل معنی‌دار نیست (P<۰/۰۱). (B) تصاویر مربوط به آنتی‌بادی‌های مذکور روی رده سلولی MDA است که از چپ به راست به‌ترتیب چاهک تیمارشده با 7D9، T_8B_{12}، $T_{18}H_7$ و چاهک کنترل است. اثر سیتوتوکسیک 7D9 روی رده سلولی MDA بیش‌تر است. این اختلاف اثر به‌لحاظ آماری (P<۰/۰۱) معنی‌دار بوده که پس از شمارش سلولی از چاهک‌های مرتبط آنالیز شد و اختلاف معنی‌داری بین T_8B_{12} و $T_{18}H_7$ و بین آن‌ها و چاهک کنترل مشاهده نشد (P<۰/۰۱).

نمودار-۲: شمارش سلولی از چاهک‌های تیمارشده با آنتی‌بادی‌های T8B12، T18H7، Man-1 و 7D9 و چاهک کنترل در رده سلولی Hela: چاهک‌های تیمار شده، تریپسینه، با رنگ‌آمیزی تریپان بلو شمارش شد (۱۰ آزمایش). متوسط این سلول‌ها بر اساس مواد استفاده در تیمارها، در شکل دیده می‌شود. تعداد سلول‌های چاهک‌های مربوط به T18H7، Man-1 و T8B12 اختلاف معنی‌دار نداشته و بین آن‌ها و 7D9 اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۱).



نمودار-۳: شمارش سلولی از چاهک‌های تیمارشده با آنتی‌بادی‌های منوکلونال T8B12، T18H7، Man-1، 7D9 و چاهک کنترل رده سلولی MDA: متوسط سلول‌های شمارش‌شده (۱۰ آزمایش) بر اساس مواد استفاده در تیمارها، در شکل دیده می‌شود. همانند رده سلولی Hela، تعداد سلول‌های موجود در چاهک‌های مربوط به T18H7، Man-1 و T8B12 اختلاف معنی‌دار نداشته؛ ولی تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها و 7D9 وجود دارد (P<۰/۰۱).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

T8B12 و نیز بین آن‌ها و کنترل مشاهده نشد؛ ولی 7D9 دارای اختلاف آشکاری با سایر مواد است (P<۰/۰۱). در مقایسه اثر 7D9 بر روی MDA و Hela، اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۱) و تاثیر آن بر رده سلولی MDA بیش‌تر بود.

بحث

تلاش محققین در تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد hCG از طریق هیبریدومای پریماتی بی‌ثمر بوده؛ زیرا در تولید هیبریدومای پریماتی از سلول‌های سرطانی میلومای انسانی دارای hCG استفاده می‌شود. اثر خودکشی آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد hCG منجر به از بین رفتن هیبریدومای تولیدکننده آنتی‌بادی می‌گردد که اهمیت hCG را در سرطان دوچندان می‌نماید.[۱۹] مطالعات نشان می‌دهد که آنتی‌بادی‌های هدف‌دهنده hCG، خاصیت سیتوتوکسیک بر روی سلول‌های سرطانی دارند.[۲۳-۱۹] در پژوهش ما، از بین آنتی‌بادی‌های منوکلونال هدف‌دهنده hCG، 7D9 خاصیت سیتوتوکسیک بر روی رده سلول‌های سرطانی، "MDA" و "Hela" دارد. همه این آنتی‌بادی‌های منوکلونال که IgG هستند، خاصیت سیتوتوکسیک از خود نشان نمی‌دهند. این آنتی‌بادی-های بر ضد اپیتوپ‌های مختلف hCG بوده و همگی در آزمون الایزا، hCG را شناسایی می‌نمایند. شکل فضایی hCG در غشای سلول‌های سرطانی، ممکن است طوری باشد که اپیتوپ‌های مربوطه در دسترس نمی‌باشند. احتمالاً، عدم تأثیر آنتی‌بادی‌های منوکلونال T8B12 و T18H7، به علت در دسترس نبودن اپیتوپ مربوطه در hCG می‌باشد. خاصیت پروتئازی آنتی‌بادی 7D9، به اثبات رسیده است.[۲۴]

مشاهدات ما برای اولین‌بار نشان می‌دهد که خاصیت پروتئازی آنتی‌بادی 7D9 در مهار عملکرد hCG باید نقش مهمی داشته باشد. از طرفی، در غلظت‌های خیلی کم این اثرات ظاهر می‌گردد که ممکن است توجیه‌کننده اثرات آنزیمی آن باشد؛ چون آنزیم در غلظت‌های کم، واکنش کاتالیتیک را به انجام می‌رساند. خاصیت سیتوتوکسیک 7D9 بر روی رده سلولی MDA بیش‌تر است؛ شاید به‌این دلیل باشد که مقدار بیان hCG در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی متفاوت است.[۷-۵]

References

1. Charrel-Dennis M, Terrazzini N, McBride JD, Kaye P, Martensen PM, Justesen J, et al. The human chorionic gonadotropin-beta arginine68 to glutamic acid substitution fixes the conformation of the C-terminal peptide. *Mol Endocrinol* 2005;19(7):1803-11.
2. Acevedo HF, Tong JY, Hartsock RJ. Human chorionic gonadotropin-beta subunit gene expression in cultured human fetal and cancer cells of different types and origins. *Cancer* 1995;76(8):1467-75.
3. Iles RK. Ectopic hCGbeta expression by epithelial cancer: malignant behaviour, metastasis and inhibition of tumor cell apoptosis. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 260-262:264-70.
4. Ind T, Iles R, Shepherd J, Chard T. Serum concentrations of cancer antigen125, placental alkaline phosphatase, cancer-associated serum antigen and free beta human chorionic gonadotropin as prognostic markers for epithelial ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol* 1997;104(9):1024-9.
5. Wu W, Walker AM. Human chorionic gonadotropin beta (HCGbeta) down-regulates E-cadherin and promotes human prostate carcinoma cell migration and invasion. *Cancer* 2006;106(1):68-78.
6. Acevedo HF, Hartsock RJ. Metastasis phenotype correlates with high expression of membrane associated complete β hCG gene in vivo. *Cancer* 1996;78(11):2388-99.
7. Sheaff MT, Martin JE, Badenoch DF, Baithun SI. Beta hCG as a prognostic marker in adenocarcinoma of the prostate. *J Clin Pathol* 1996;49(4):329-32.
8. Ziecik AJ, Kaczmarek MM, Blitek A, Kowalczyk AE, Li X, Rahman NA. Novel biological and possible applicable roles of LH/hCG receptor. Mol Cell Endocrinol 2007;269(1-2):51-60.
9. Zygmunt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, Kunzi-Rapp K, Münstedt K, Rao CV, et al. Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(11):5290-6.
10. Cole LA. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;24(8):102.
11. Kalantarov G, Acevedo HF. Demonstration of dose dependent cytotoxic activity in cancer cells by specific human chorionic gonadotropin monoclonal antibodies. *Cancer* 1998;83(4):783-7.
12. Yu N, Xu W, Jiang Z, Cao Q, Chu Y, Xiong S. Inhibition of tumor growth in vitro and in vivo by a monoclonal antibody against human chorionic gonadotropin beta. *Immunol Lett* 2007;114(2):94-102.
13. Gebauer G, Fehm T, Beck EP, Berkholz A, Licht P, Jäger W. Cytotoxic effect of conjugates of doxorubicin and human chorionic gonadotropin (hCG) in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2003;77(2):125-31.
14. Talwar GP, Gupta JC, Shankar NV. Immunological approaches against human chorionic gonadotropin for control of fertility and therapy of advanced-stage cancers expressing hCG/subunits. *Am J Reprod Immunol* 2011;66(1):26-39.
15. Vyas HK, Pal R, Vishwakarma R, Lohiya NK, Talwar GP. Selective killing of leukemia and lymphoma cells ectopically expressing hCGbeta by a conjugate of curcumin with an antibody against hCGbeta subunit. *Oncology* 2009;76(2):101-11.
16. Mirshahi M, Shamsipour F, Mirshahi T, Khajeh K, Naderi-Manesh H. A novel monoclonal antibody with catalytic activity against beta human chorionic gonadotropin. *Immunol Lett* 2006;106(1):57-62.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 9, December 2011: 523-528

The effects of anti-hCG monoclonal antibodies on human cancer cell lines

Mojtaba Fathi Ph.D.[1]
Manoochehr Mirshahi Ph.D.[2*]
Mohammadreza Garaati Ph.D.[2]

1- Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2- Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Received: August 15, 2011 Accepted: October 08, 2011

Abstract

Background: Human cancer cell lines express human choriogonadotropin (hCG), its subunits and derivatives, regardless of their origin and type. It appears that hCG is a common phenotype in human cancer cell lines. In this research, the effects of hCG targeting monoclonal antibodies (7D9, T18H7 and T8B12) on human cancer cell lines were evaluated.

Methods: Monoclonal antibody secreting hybridomas were proliferated and injected intraperitoneally to Balb/C mice after treatment with pristine. Two weeks later, ascites fluid was collected. Purification of aforementioned antibodies from ascites fluid was performed using G-protein affinity followed by ion exchange chromatography. SDS-PAGE and ELISA confirmed the structure and functional integrity of the purified antibodies, respectively. Two human cancer cell lines "Hela" and "MDA" were treated by the purified antibodies. Three days later, different wells were imaged and the cells counted.

Results: SDS-PAGE gel (None-reducing) indicated consistency of band migration patterns with control antibodies. ELISA test using hCG antigens indicated that the produced antibodies could detect hCG antigens. Cell lines were cultured and treated with different concentrations of each antibody. Counting and imaging different wells of treated plates, indicated that 7D9 antibody had a more significant ($P<0.01$) cytotoxic effect on cancer cell lines than the control cells.

Conclusion: HCG targeting monoclonal antibodies can be used for targeted cancer therapy, as human cancer cells express hCG gene. 7D9 antibody that exhibits protease activity is a proper candidate for this purpose, as it possesses both antagonistic and enzymatic properties.

Keywords: Cancer, cytotoxic, human choriogonadotropin, monoclonal antibodies, targeting.

* Corresponding author: Tarbiat Modares University, Jalal Al Ahmad Highway, P.O.Box: 14115-111, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-82884408
E-mail: mirshahi@modares.ac.ir

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]