

تأثیر توأم سیتوتوکسیک وروتوکسین تیپ ۱ و منوفسفوریل لیپید A بر روی رده سلولی MCF-7 در شرایط آزمایشگاهی

دکتر حسن حسین زادگان^۱، مرتضی سالاری^۲، عبدالامیر علامه^۳، زهیر محمد حسن^۴، سیمین اصغری^۵

یافته / سال پنجم / شماره ۱۹

چکیده

مقدمه: وروتوکسین ها سمومی با ساختمان دو بخشی هستند که در پاتوژن سویه های اشرشیا کولی انتروهموراژیک دخالت دارند. مطالعات اولیه درمان برخی تومورهای سرطانی و نیز بررسی اثر سیتوتوکسیسیته این سموم روی رده های توموری در شرایط محیط کشت (In Vitro) و حیوانات آزمایشگاهی نشان دهنده اثر بخشی آنهاست. این سموم به دلیل دارا بودن گیرنده های اختصاصی بر روی رده های توموری مطالعه شده به صورت انتخابی عمل می نمایند. هدف از این تحقیق بررسی سیتوتوکسیسیته وروتوکسین ۱ تخلیص شده از سویه مولد وروتوکسین اشرشیا کولی توأم با منوفسفوریل لیپید A (MPL) بر روی رده سلولی تومور پستانی انسان به نام MCF-7 بود.

مواد و روشها: در این تحقیق ابتدا وروتوکسین ۱ تولید شده از ۵ سویه مولد وروتوکسین به دست آمده از انستیتو پاستور ایران و آزمایشگاه مرجع بو علی با استفاده از کیت آگلوتیناسیون معکوس (VTEC-RPLA) ۱ تأیید و با استفاده از کروماتوگرافی جذبی تخلیص شد. در مرحله بعد رقت های مختلف وروتوکسین ۱ و MPL به صورت توأم و یا جداگانه بر روی رده سلولی MCF-7 اضافه شد و قابلیت زنده ماندن سلول ها (Viability) با استفاده از تریپان بلو و شکستگی ژنوم آنها با الکتروفورز آگارز بررسی گردید.

یافته ها: مطالعات ما نشان داد که سلول های MCF-7 مطابق با تحقیقات قبلی حساسیت فوق العاده ای به وروتوکسین ۱ دارند و مقدار ۳۳ نانوگرم در هر میلی لیتر اثری معادل دوز سیتوتوکسیک ۵۰ درصد CD50% ایجاد می کند. بررسی های شکستگی ژنوم سلولی الگوی مشخصی از بروز پدیده آپوپتوزیز را نشان می دهد. در حالی که MPL به تنهایی ماده ای غیر سمی است؛ ولی استفاده توأم آن با وروتوکسین ۱ اثرات سمی آن را تشدید می کند.

نتیجه گیری: اگرچه اثرات ضد توموری وروتوکسین ۱ از سال ها قبل روشن شده است؛ ولی کشف و شناسایی عوامل مختلف تشدید کننده اثر سیتوتوکسیک مواد ضد تومورها نیز مورد توجه محافل علمی است. MPL یکی از متابولیت های میکروبی است که اثر سینرژیستی آن با وروتوکسین ۱ در مرگ سلول های توموری پستان برای اولین بار در این تحقیق مورد بررسی شده است.

واژه های کلیدی: وروتوکسین ۱، MPL، MCF-7، سرطان پستان، اثر سیتوتوکسیک

- ۱- عضو هیئت علمی - گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی لرستان
- ۲- استادیار - گروه میکروب شناسی دانشگاه تربیت مدرس
- ۳- استاد - گروه بیوشیمی دانشکده تربیت مدرس (دانشکده پزشکی)
- ۴- استادیار - گروه انکال شناسی دانشگاه تربیت مدرس (دانشکده پزشکی)
- ۵- لیسانس زیست شناسی

مقدمه

وروتوکسین ها یا سموم شبه شیگا، سمومی با ساختمان زیر واحدی هستند که از برخی سویه های اشرشیا کولی و شیگلا دیسانتریه تیپ ۱ تولید می شوند. این سموم به دلیل ساختمان زیر واحدی پروتئینی جزء قوی ترین سموم شناخته شده هستند. باکتری های مولد وروتوکسین علاوه بر اسهال آبکی یا خونی در بروز سندرم اورمی همولیتیک (HUS)^۱ و کولیت هموراژیک (HC)^۲ نیز نقش دارند (۱).

در سال ۱۹۷۷ کونووالکوک^۳ و همکاران وی اولین بار گزارش کردند که برخی سویه های اشرشیا کولی اثرات سیتوتوکسیک بر سلول های ورو^۴ دارند. بدین سبب آن را وروتوکسین^۵ نام گذاری کردند. وروتوکسین ها به دو نوع اصلی ۱ و ۲ شناخته شده اند، نوع ۱ از نظر ساختمانی و ایمنی شناسی مشابه سم شیگا^۶ است که از شیگلا دیسانتریه نوع ۱ تولید می شود. این سموم متشکل از دو زیر واحد A و B هستند و به ترتیب حدود ۳۲ و ۷/۵ کیلو دالتون وزن دارند. زیر واحد A بخش سمی است که دارای فعالیت N-گلیکوزیدازی است و با حذف باز آدنین از موقعیت ۴۳۲۴ در 28srRNA مانع سنتز پروتئین و مرگ سلول های حساس می شود. بخش ملکولی گیرنده اصلی این سم بر روی سلول های حساس Gb3 یا گلوبوتریا اوسیل سرامید است که به نامهای CD-77 در سطح سلول های لنفوسیت B مراکز زاینده ویا آنتی ژن pK در سطح سلول های خونی P نامیده می شود (۲). این گیرنده علاوه بر بخش کورتیکال کلیه ها و سلول های اندوتلیال عروق در سطح بسیاری از سلول های توموری نیز شناسایی شده است. بنابر این وروتوکسین ها به عنوان یکی از مواد سیتوتوکسیک انتخابی برای درمان انواع تومورها کانون توجه قرار گرفته اند (۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹). در سال های اخیر دو مورد از درمان تومورهای بدخیم مننژیوما و آستروسیتوما ی مقاوم به درمان در کانادا گزارش شده است (۴،۵).

سرطان پستان با وجود پیشرفت های مهم در تشخیص و درمان هنوز از معضلات شایع زنان است. اگرچه وجود داروهای مؤثری مانند تاموکسیفن و رالوکسیفن (مدولاتورهای گیرنده استروژنی یا آنتی استروژن ها) و یا داروهای داخل توموری آناسترازول (Armidex) و لتروزول (ممانعت کننده های آروماتازی) که به همراه اشعه درمانی و یا ادجوانت درمانی در طی سی سال گذشته جان بسیاری از زنان مبتلا را نجات داده است (۱۰)؛ ولی معایب مختلفی از جمله عود موارد بیماری ناشی از متاستاز در چند ماه پس از درمان، اثرات ناشی از مصرف داروها بر روی متابولیسم گلوکوکورتیکوئید ها و خطرات سرطان بعد از شیمی درمانی سرطان سینه (۱۱،۱۲) سبب محدودیت استفاده از این شیوه های درمانی شده است. لذا هدف اصلی این تحقیق با توجه به سابقه مطالعات انجام شده، ابتدا بررسی اثرات سیتوتوکسیک وروتوکسین ۱ بر روی رده توموری MCF-7 و بعد اثر توأم آن با MPL است، که یکی از متابولیت های میکروبی مشتق شده از لیپوبلی ساکارید باکتری هاست.

با توجه به سابقه مطالعات سیتوتوکسیسیته وروتوکسین ۱ بر روی سلول های توموری مختلف و اثبات وجود گیرنده مربوط روی آنها، رده توموری MCF-7 به عنوان مدل و نمونه شاخصی از رده های توموری کارسینومای پستانی در این تحقیق استفاده شده است.

مواد و روشها

این مطالعه، تحقیقی بنیادی و کاربردی است که به روش زیر انجام گردید. سویه های مولد وروتوکسین از انستیتو پاستور ایران و آزمایشگاه مرجع بوعلی تهیه گردید. از محیط کشت TSB با ۲٪ آگار و سولفات پلی میکسین ب (سیگما) سلیت ۵۴۵ خشک و Gb3 (سیگما) برای تولید، تخلیص و استخراج سم استفاده شد. کیت سرولوژیک آگلو تیناسیون معکوس VTEC-RPLA (اکسوئید) برای بررسی وجود و تعیین نوع و

1. Hemolytic Uremic Syndrome
2. Hemorrhagic Colitis
3. Konovalkok
4. Vero
5. Verotoxin
6. Shign

گرفت. تعداد سلول های زنده و مرده با استفاده از جذب رنگ تریپان بلو در روزهای ۱، ۲ و ۳ بعد از تیمار در مقایسه با گروه شاهد (بدون تیمار) و مقدار سیتوتوکسیک ۵۰ درصد سم برای هر رده سلولی با استفاده از رابطه Reed & Munch محاسبه گردید (۳).

بررسی قطعه قطعه شدن ژنوم سلول ها:

میزان قطعه قطعه شدن DNA سلولی پس از مجاورت با سم بر اساس روش زیر انجام شد: تعدادیک میلیون سلول در هر چاهک از پلیت ۶ خانه ای به مدت ۱ روز با وروتوکسین ۱ (۲۰ نانوگرم) تیمار شد. سلول ها با بافر فسفات شستشو در بافر لیز سرد (10mM تریس-HCL با pH برابر ۷/۴ و 1mM EDTA و ۰/۲ درصد از تریتون X-100) به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه لیز شدند. سپس با سانتریفوژ در 14000g به مدت ۱۵ دقیقه لیزات سلول ها حذف و به سوپرناتانت حاوی ملکول های با وزن ملکولی پایین مقدار ۲ میلی گرم در میلی لیتر از پروتئیناز K در ۳۷ درجه به مدت ۴ ساعت افزوده شد؛ سپس DNA سلولی دو بار با فنل /کلروفرم استخراج و با اتانول سرد ۲۰°- به مدت یک شب رسوب داده و با سانتریفوژ در 14000g به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه جمع آوری و پلت DNA در ۱۵ میکرولیتر از بافر TE حل شد. بعد از یک ساعت تیمار با RNase در ۳۷ درجه با استفاده از بافر loading در ژل اگرز ۱ درصد دارای اتیدیوم بروماید وجود شکستگی بین نوکلئوزوم ها زیر نور ماورای بنفش بررسی شد (۱۴).

یافته ها

در شکل ۱ نمونه ای از سلول MCF-7 تیمار شده با وروتوکسین ۱ نشان داده شده است. مشاهدات میکروسکوپی نشان داد، تیمار هم زمان وروتوکسین ۱ با سلول ها مانع اتصال آنها در سطح فلاسک های کشت و یا چاهک های میکروپلیت می شود و حد اکثر سیتوتوکسیسیته را بر روی آنها ایجاد می کند. لذا تمامی آزمایشات بر روی کشتهایی انجام گرفت، که یک روز پس از پاساژ به صورت تک لایه در آمده بودند.

تیر سموم وروتوکسین ۱ و ۲ استفاده شد. رده سلولی MCF-7 نیز از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. تولید و تخلیص وروتوکسین ۱:

هر یک از پنج سویه در محیط TSB و دمای ۳۷ درجه با ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس در سوسپانسیون باکتری ها با فیلتر ۰/۴۵ میکرون استریل و با استفاده از کیت VTEC-RPLA طبق دستور العمل کارخانه سازنده، تولید و یا عدم تولید دو سم وروتوکسین ۱ و ۲ بررسی شد. یکی از سویه ها که تنها تولید کننده وروتوکسین ۱ بود، در محیط TSB کشت و در شرایط ۲۰- درجه و ۱۰ درصد گلیسرول به عنوان استوک نگهداری و به نام PA101 نام گذاری شد.

سویه PA101 در ۳۷ درجه و محیط کشت TSB با ۲ درصد آگار کشت شد. کلنی باکتری ها بعد از ۲۴ ساعت جمع آوری و با بافر فسفات استریل شستشو داده شد؛ سپس با ۳ میلی گرم در هر میلی لیتر از پلی میکسین ب سولفات به مدت نیم ساعت در ۳۷ درجه مجاورت داده شدند تا وروتوکسین ۱ استخراج شود. محلول حاوی سم با استفاده از آنتی پروتئاز فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) با غلظت ۳۰ میلی مولار در هر میلی لیتر استریل، دیالیز و پس از لیوفیلیزه کردن با استفاده از کروماتوگرافی جذبی تخلیص و مجددا لیوفیلیزه شد و به عنوان سم خالص برای بررسی های سیتوتوکسیسیته استفاده گردید (۱۳).

تعیین قابلیت زنده بودن سلول های MCF-7:

از هر یک از رده های سلولی، ۲۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای در محیط کشت RPMI-1640 ۱۰ درصد سرم جنین گاوی در شرایط ۵ درصد Co2 و ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس با تعویض محیط کشت با غلظت های مختلف وروتوکسین ۱ (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانوگرم در هر میلی لیتر وروتوکسین ۱) و MPL (۰، ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم) و غلظت های متقاطع آنها تیمار شدند. هر غلظت به صورت سه تایی شکل

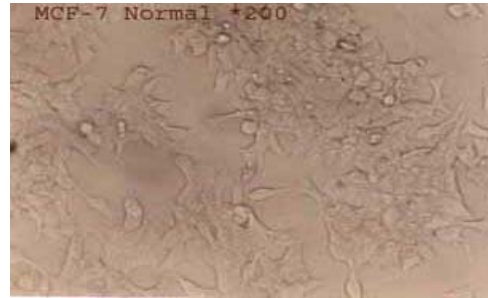
در شکل ۳ نمونه ای از الکتروفورز DNA استخراج شده از سلول های تیمار شده در کنار سلول های تیمار نشده با وروتوکسین ۱ نشان داده شده است، وجود باندهای مختلف که نشان دهنده شکستگی ژنوم از نواحی بین نوکلئو زو مها است. از معیار های آپپتوزیز تحریک شده در سلول هاست که در بررسی های مربوط به سیتوتوکسیسیته از آن استفاده می شود. در سلول های تیمار شده با وروتوکسین ۱ (ستون ۱) در مقایسه با سلول های کنترل (ستون ۲) وجود شکستگی در ژنوم استخراج شده از سلول ها مشخص است.



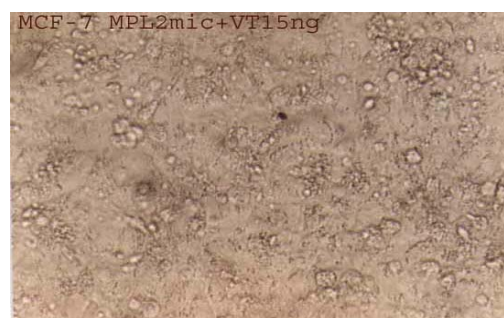
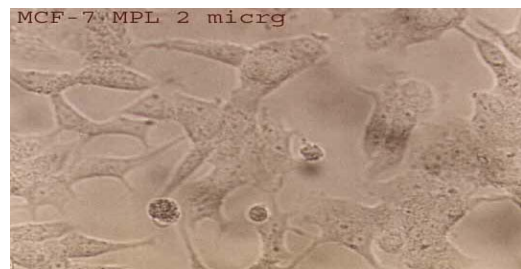
شکل ۳- نمونه ای از الکتروفورز DNA استخراج شده از سلولهای تیمار شده در کنار سلولهای تیمار نشده با وروتوکسین ۱

بحث

وروتوکسین ۱ یا شبه سم شیگا (SLT1) از پروتئین های غیر فعال کننده ریبوزوم های یوکاریوتی است و عمدتاً توسط سویه های پاتوژنیک اشیریشیا کولی سروتیب O157:H7 و سویه های انتروهموراژیک اشیریشیا کولی (EHEC) تولید و سبب مرگ سلول هایی می شود که در سطح خود دارای ملکول های Gb3 و یا CD77 هستند. در این تحقیق نشان داده شد که وروتوکسین ۱ مانع رشد رده تومور پستانی انسان بنام MCF-7 می شود. حساسیت این سلول ها به اندازه رده های سلولی ورو که به طور استاندارد برای شناسایی وروتوکسین ها استفاده می شود، نیست؛ ولی مقادیر بسیار کمی از این سم اثرات



شکل ۱- سلول های MCF-7 کنترل (بالا) و سلول های تیمار شده با ۲۰ نانوگرم از وروتوکسین ۱ (پایین) نشان داده شده اند. گرد شدن سلول ها و اثر سیتوپاتیک ناشی از وروتوکسین ۱ به وضوح مشاهده می شود.



شکل ۲- در این شکل سلول های تیمار شده با MPL (بالا) و سلول های تیمار شده توأم با MPL و وروتوکسین ۱ (پایین) نشان داده شده اند. در سلول های تیمار شده MPL در مقایسه با سلول های کنترل تغییرات ظاهری و سیتوپاتیک مشاهده نمی شود. در حالی که در سلول های تیمار شده با وروتوکسین ۱ و یا توأم آنها اثرات شدید آسیب های سلولی مشاهده می شود.

در تمایز و حفظ هموستاز موجودات پر سلولی مورد استفاده می شود (۴) و اساس طراحی داروهای ضد نئوپلاستی است.

همان طور که می دانیم در سالهای اخیر به دلیل محدودیت درمان های رایج سرطان از جمله شیمی درمانی و پرتودرمانی به استفاده از متابولیت های میکروبی توجه خاصی صورت گرفته است (۱۸). MPL یکی از متابولیت های مهم باکتریایی است که علاوه بر استفاده از آن به عنوان ادجوانت در واکسیناسیون اثرات کاهش حجم تومور آن به دلیل تحریک تولید واسطه های ایمنی از جمله فاکتور نکروز تومور آلفا ثابت شده است (۲۱، ۲۰، ۱۹). لذا بررسی اثرات متقابل آن با سایر متابولیت های میکروبی مانند وروتوکسین ها از زمینه های مهم تحقیقی در این زمینه است.

در این تحقیق ابتدا اثرات سیتوتوکسیک ناشی از وروتوکسین ۱ بر سلول های MCF-7 بررسی و پس از آن کنش های متقابل آن با MPL مطالعه گردید. در سلول های MCF-7 بررسی شده، ۳ ساعت پس از شروع تیمار با وروتوکسین ۱ شکستگی ژنوم با الکتروفورز مشاهده شده و در صورتی که هم زمان با پاساژ، سلول ها در معرض سم قرار می گرفتند. به طور کلی در مقایسه با سلول های شاهد مانع اتصال سلول ها به ته فلاسک های کشت می شود. با وجود گزارشات مختلف در مورد فقدان شکستگی در ژنوم سلول های MCF-7، بررسی های الکتروفورز آگارز ما نشان داد که وروتوکسین ۱ در سلول های MCF-7 تیمار شده اثرات شدید شکستگی ژنوم را ایجاد می کند که یکی از معیارهای آپوپتوزیز محسوب می شود (۲۲).

نتایج این تحقیق با بررسی های قبلی در مورد سیتوتوکسیسیته وروتوکسین ۱ برای بسیاری از سلول های سرطانی انسانی از جمله رده های توموری پستان همخوانی دارد (۸، ۶، ۵، ۴، ۳).

استفاده هم زمان از MPL نیز سبب تشدید اثرات سیتوتوکسیک وروتوکسین ۱ می شود. با توجه به نتایج حاصل

سیتوتوکسیک شدیدی بر آنها ایجاد می کند که نشانه حساسیت زیاد آنها به وروتوکسین ۱ است.

اخیرا وجود گیرنده گلیکو لیپیدی این سم در سطح سلول های سرطانی پستان به همراه لنفوما و میلوما بررسی شده است؛ ولی علیرغم وجود گیرنده زیاد در سطح برخی از رده ها حساسیت متفاوتی در برابر وروتوکسین ۱ گزارش شده است که نشان دهنده دخالت سایر عوامل در سیتوتوکسیسیته ناشی از وروتوکسین ۱ بر روی این سلول ها است (۸).

وروتوکسین ۱ عامل فعال آنتی نئوپلاستیک موجود در باکتریوسین نیمه خالص است که چندین سال قبل اثر ضد توموری آن بر فیبروسارکومای موشی نشان داده شده است (۵، ۱). درمان موش های تومور دار دارای Gb3 در سطح سلول های توموری مانع متاستاز تومورها شده است (۱۶) و برای رده های توموری مختلف از جمله آستروسیتوما (۴، ۳)، مننژیوما (۵)، لنفوم بورکیت (۱۶)، بیماری لنفو پرولیفراتیو بعد از پیوند ناشی از ویروس ایشیتین بار (۶)، میلوم مولتیپل و رده های سرطانی پستان (۸) اثرات ضد توموری و سیتوتوکسیسیته وروتوکسین ۱ نتایج بسیار درخشان و امیدوار کننده ای داشته است. به طوریکه رده های مقاوم چند دارویی در برابر این سم حساسیت بیشتری نسبت به سلول های نرمال دارند.

در بسیاری از سرطان ها سطح Gb3 در سلول های توموری نسبت به سلول های طبیعی افزایش می یابد و حتی در سرطان های رده سلولی زاینده از جمله کوریو کارسینوما و بیضه ها نیز Gb3 از مارکرهای سرطانی شدن آنها است (۹). زیر واحد B سم بدون فعالیت زیر واحد A قادر به تحریک آپوپتوزیز است. بنابر این وروتوکسین ۱ علاوه بر توقف ساخت پروتئین، با استفاده از تحریک کاسپازهای غشای میتوکندری های سلول های حساس و مستقل از زیر واحد A می تواند سبب تحریک آپوپتوزیز در سلول های حساس دارای Gb3 شود (۱۷). این پدیده از مهم ترین فرایندهای سلولی است که

References

- Chart H. Clinical significance of verotoxin-producing *Echerichia coli* O157:H7. *World J of Microbiol, Biotech*, 2000; 16:719-724
- Ramotar K, Boyds B, Tyrrel G, Garipey J, Lingwood C, and Branton J. Characterization of Shiga-like toxin 1 B subunit purified from overproducing clones of the SLT-1 B cistron. *Biochem J*, 1999; 272: 805-811
- Sara A, Murakami M, Boyd B, Hubbard S, Lingwood C, and Rutka J. Verotoxin inhibits the growth of and induce apoptosis in human astrocytoma cells. *J Neurol Oncol*, 1998; 40: 137-150
- Sara A, James R, and Lingwood C. Verotoxin induces apoptosis and the complete, rapid, elimination of human astrocytoma xenografts in nude mice. *Oncol Res*, 1999; 11: 33-39
- Salhia B, James R, Lingwood C, et al. The treatment of malignant meningioma with verotoxin. *Neoplasia*, 2002; 4: 304-311
- Arbus GS, Grisara S, Segal O, et al. Verotoxin targets lymphoma infiltrates of patients with post-transplant lymphoproliferative disease. *Leuk. Res*, 2000; 24: 857-864
- Wenk J, Peter WA, Jochen C, et al. Glycolipids of germ cell tumors, extended globo-series glycolipids are a hallmark of human embryonal carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 1994; 58: 108-115
- Lacasse EC, Bary MR, Patterson B, et al. SLT-1 receptor on human breast cancer, lymphoma, and myeloma and absence from CD34+ hematopoietic stem cells: Implications for ex vivo tumor purging and autologous stem cell transplantation. *Blood*, 1999; 94: 2901-2910
- Chikara O, Yasuo F, Makoto S, et al. Changes in glycolipid expression in human testicular tumors. *Int. J. Cancer*, 1990; 45:1040-1044
- Baum M. The changing face of breast cancer post-present and future perspectives. *Breast Cancer Res and Treatment*, 2002; 75: S1-S5
- Lowrence W. Tamoxifen- An update on current data and where it can now be used. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2002; 75: S7-S12.
- Carole R, Florent DV, Ibrahima D, et al. Radiation dose, chemotherapy and risk of lung cancer after breast cancer treatment. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2002; 75: 15-24
- Jean B, Sara A, and Clifford A L. Universal method for the facile production glycolipid/lipid matrices for the affinity purification of binding ligands. *Analy. Biochem*, 1994; 217: 1-6

سینرژی بین MPL و روتوکسین ۱ از دو جهت اهمیت دارد: اول این که در عفونت های ناشی از سویه های مولد روتوکسین تولید و وجود هم زمان این دو ماده میکروبی در جایگاه عفونت ها صورت می گیرد و احتمالاً در پاتوژنز آنها نقش مهمی ایفا می کند که می توان از نظر استفاده از آنتی بادی های ضد لیپید A و یا MPL در کاهش شدت آسیب های حاصله مطالعه بیشتری نمود. دوم این که در رابطه با درمان و حذف سریع تر سلول های توموری مختلف به عنوان یک ادجوانت قوی می توان از MPL استفاده نمود که نیازمند مطالعات بیشتری در شرایط آزمایشگاهی و الگوهای In Vivo انجام داد.

14. Beatriz M, Sira N, Maria P, et al. Prodiogin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *British J. Of pharmacology*, 2000; 131: 585-593
15. Hill RP, Frakas H. Further studies of the action of a partially purified bacteriocin against a murine fibrosarcoma. *Cancer Res.* 1991; 51: 1359-1365
16. Frakas H, Hill P, Rosen B, et al. The bacterial colicin active against tumor cells in vitro and in vivo is verotoxin1. *Pro Natl Acad Sci, USA*, 1995; 92: 6996-7000
17. Taga S, Carlier D, Tetaud C, et al. Intracellular signaling events in CD77-mediated apoptosis of Burkits lymphoma cells. *Blood*, 1997; 90: 2757-2767
18. Dang L. et al. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Pro. Natl. Acad. Sci USA*, 2001; 98: 15155-15160
19. Madona GS, Peterson J, Ribic E, and Vogel S.N. Early-phase endotoxin tolerance induction by a detoxified lipidA derivative monophosphoryl lipid A. *Infection and Immunity*, 1986; 52: 6-11
20. Beth EH, William RB, and Vogel N.S. Differential cytokine induction by doses of lipopolysaccharide and monophosphoryl lipidA that result in equivalent early endotoxin tolerance. *Infection and Immunity*, 1990; 58[8]: 2429-2437
21. Michael M, Suzanne MM, and Jannet K. Role of innate factors in the adjuvant activity of monophosphoryl lipidA. *Infection and Immunity*, 2003; 71[5]: 2498-2508
22. Villar E, Redendo M, Rodrigo I, et al. Bcl-2 expression and apoptosis in priming and metastatic breast carcinomas. *Tumor Biology*, 2001; 22: 137-145