Cytotoxic effects of Clusterin antisense oligonucleotides and Docetaxel on two prostate cancer cell lines

N. Bakhtiari* SM. Safavi* K. Hoseinipajouh**

*Assistant Professor of Biochemistry, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran
**Assistant Professor of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

✵Abstract

Background: Clusterin is a glycoprotein that is overexpressed under stress conditions and causes cell survival by inhibiting apoptosis. Clusterin is overexpressed in prostate cancer. Antisense RNA drugs bind to mRNA of target gene and lead to inhibition of protein translation.

Objective: The aim of this study was to determine the synergistic effects of the Clusterin antisense oligonucleotides and Docetaxel on two prostate cancer cell lines.

Methods: This study was conducted in the Research Institute for Biotechnology affiliated to the Iranian Research Organization for science and technology, 2013. Antisense oligonucleotides in phosphorothioate form targeting Clusterin were delivered into androgen-independent PC3 and androgen-dependent LNCaP cell lines with 25, 50, 100, 200 and 500 nanomolar concentrations. Then cell lines were treated with 100 nanomolar Docetaxel. The effect of antisense oligonucleotides with and without Docetaxel was evaluated using the MTT assay.

Findings: Antisense oligonucleotides induced cell death in both PC3 and LNCaP cell lines. There was a synergistic effect between antisense oligonucleotides and Docetaxel.

Conclusion: Despite the difference in cytotoxicity, there was a synergistic effect between Clusterin antisense oligonucleotides and Docetaxel in both PC3 and LNCaP cell lines.

Keywords: Clusterin, Antisense RNA, Prostatic Neoplasms, Cell Line

Citation: Bkhtiari N, Safavi SM, Hoseinipajouh K. Cytotoxic effects of Clusterin antisense oligonucleotides and Docetaxel on two prostate cancer cell lines. J Qazvin Univ Med Sci. 2015; 19 (2): 4-10.

Corresponding Address: Nahid Bakhtiari, Research Institute for Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Sh. Ehsani Rad St., Enqelab St., Parsa Sq., Ahmadabad Mostoufi, Azadegan Highway, Tehran, Iran
Email: nbakhtiari@irost.org
Tel: +98-912-2812960
Received: 27 Aug 2014
Accepted: 18 Nov 2014

اثر سمیت سلولی اولیگوی آنتی‌سنس RNAی ژن کلاسترین با داروی دُسِتاکسل در دو دودمان سلولی سرطان پروستات

دکتر ناهید بختیاری* دکتر سیده ملیحه صفوی* دکتر خسرو حسینی پژوه**

* استادیار بیوشیمی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
** استادیار بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسؤول: تهران، بزرگراه آزادگان، مسیر شمال به جنوب، احمدآباد مستوفی، بعد از میدان پارسا، انتهای خیابان انقلاب، خیابان شهید احسانی‌راد، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری، تلفن ۰۹۱۲۲۸۱۲۹۶۰
Email: nbakhtiari@irost.org

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۲۷

✵چکیده

زمینه: کلاسترین گلیکوپروتئینی است که در شرایط نامساعد زیستی در سلول بیان شده و با جلوگیری از مرگ سلولی سبب بقای آن می‌شود. مطالعه‌ها افزایش بیان این پروتئین در سرطان پروستات را اثبات کرده‌اند. داروهای آنتی‌سنس RNA به بخش ویژه‌ای از mRNAی ژن مورد نظر متصل می‌شوند و از ترجمه آن به پروتئین هدف جلوگیری می‌کنند.

هدف: مطالعه به منظور تعیین هم‌افزایی اثر اولیگوی آنتی‌سنس RNAی ژن کلاسترین با داروی دُسِتاکسل در دو دودمان سلولی سرطان پروستات انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۲ در پژوهشکده زیست فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران انجام شد. اولیگوی آنتی‌سنس RNAی ژن کلاسترین به صورت فسفروتیوایت با مقادیر ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ نانومولار به دو دودمان سلولی غیر وابسته به آندروژن PC3 و وابسته به آندروژن LNCaP منتقل شد. سپس سلول‌ها با غلظت ۱۰۰ نانومولار از داروی دُسِتاکسل تیمار شدند و اثر اولیگوی منتقل شده با، یا بدون داروی مذکور با انجام آزمون MTT اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: اولیگوی آنتی‌سنس سبب القای مرگ سلولی در هر دو رده سلولی PC3 و LNCaP شد. بین این اولیگو و داروی شیمیایی دُسِتاکسل اثر هم‌افزایی در القای مرگ سلول‌های سرطان پروستات دیده شد.

نتیجه‌گیری: با وجود تفاوت عملکرد، بین اثر سمیت سلولی اولیگوی آنتی‌سنس RNAی ژن کلاسترین و داروی دُسِتاکسل در سلول های PC3 و LNCaP اثر هم‌افزایی وجود دارد.

کلیدواژه‌ها: کلاسترین، آنتی سنس RNA، نئوپلاسم‌های پروستات، دودمان سلولی

✵مقدمه:

سرطان پروستات بیماری است که طی آن سلول‌های بافت‌های مختلف غده پروستات سرطانی می‌شوند و به طور عمده، در مردان مسن دیده می‌شود.[۱] سرطان پروستات دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در مردان است؛ به طوری که ۲۵ درصد مردان جهان از این سرطان می‌میرند. به علاوه، بیماران مبتلا به سرطان پروستات برای بهبود علایمی مانند درد، خون‌ریزی و انسداد مجاری ادراری به مصرف دارو نیاز دارند. بنابراین، سرطان پروستات از علل عمده درد و رنج و ایجاد هزینه مراقبت‌های بهداشتی نیز هست.[۲]

میزان بالای مرگ و میر ناشی از سرطان پروستات از تشخیص دیرهنگام آن ناشی می‌شود. در سال‌های اخیر، غربال‌گری سرطان پروستات با اندازه‌گیری آنتی‌ژن اختصاصی پروستات در سرم (PSA) که دقیق‌ترین آزمون تک مرحله‌ای برای تشخیص سرطان پروستات است، با روش سنتی آزمایش دیجیتال مقعد ترکیب شده است. در

مقایسه با سایر روش‌های تشخیصی، این دو روش به همراه نمونه‌برداری فراصوت از پروستات، میزان کلی تشخیص را ۷۰ درصد افزایش داده‌اند.[۳]

انجمن سرطان و انجمن اورولوژی آمریکا توصیه می‌کنند که مردان ۵۰ ساله یا مسن‌تر برای تشخیص زود هنگام سرطان پروستات تحت اندازه‌گیری سالانه PSA سرم و معاینه مقعد قرار گیرند و مردانی که در معرض خطر بالای سرطان پروستات هستند (سیاه پوستان و افراد با سابقه خانوادگی قوی)، با شروع سن ۴۰ سال تحت غربال‌گری سالانه قرار گیرند؛ زیرا هزینه این کار بسیار کم‌تر از درمان بیماری پس از ابتلای افراد به آن است.[۴]

در مردانی که در مرحله پیشرفته بیماری هستند، تنها راه مؤثر حذف آندروژن است که در بیش از ۸۰ درصد موارد نتیجه مناسبی می‌دهد.[۵] اما، در اغلب این موارد پس از گذشت چند سال، سرطان به مرحله غیر وابسته به آندروژن می‌رسد و سبب کاهش کیفیت زندگی و حتی مرگ می‌شود.[۶] وجود این مشکلات سبب شده است محققان به ایجاد و توسعه روش‌های درمانی جدید در مورد این بیماری بپردازند.

با توجه به مطالعه‌های انجام شده در سطح مولکولی و آشکار شدن بیان یا افزایش بیان برخی ژن‌ها در اثر روش‌های مختلف درمانی از جمله اخته‌سازی، شیمی درمانی یا پرتو درمانی، مشخص شده است که به کار بردن روش‌های مذکور همراه با عواملی که از این افزایش بیان جلوگیری می‌کنند، نتیجه بهتری در درمان خواهد داشت.[۶] از جمله عوامل مهارکننده بیان ژن که امروزه مورد توجه محققان و داروسازان قرار گرفته، اولیگوهای RNA آنتی سنس است. این دسته از داروها، اولیگوهای کوتاه تک رشته‌ای هستند که روی توالی خاصی از mRNAی ژن مورد نظر می‌نشینند و از بیان آن به پروتئین جلوگیری می‌کنند.[۷]

یکی از ژن‌هایی که در سلول‌های سرطانی پروستات شروع به افزایش بیان می‌کند، ژن clu است که پروتئین کلاسترین را کد می‌کند.[۸] کلاسترین گلیکوپروتئینی چند ایزوفرمی است که از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول جلوگیری می‌کند و باعث بقای آن می‌شود. از آنجا که مهار بیان ژن کلاسترین سبب راه‌اندازی روند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در سلول‌های تحت شیمی درمانی می‌شود؛ این ژن هدف مناسبی جهت مطالعه‌های بالینی درمان سرطان پروستات با RNAی آنتی‌سنس است.[۸] از سوی دیگر، در حال حاضر دُسِتاکسل پُر مصرف‌ترین داروی شیمیایی برای مهار سرطان پیشرفته پروستات است. بنابراین مطالعه حاضر به منظور تعیین هم‌افزایی اثر اولیگوی آنتی‌سنس RNAی ژن کلاسترین با داروی دُسِتاکسل در دو دودمان سلولی سرطان پروستات انجام شد.

❋مواد و روش‌ها:

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۲ در پژوهشکده زیست فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران انجام شد. رده‌های سلولی سرطان پروستات انسان با نام رده‌های سلولی PC3 و LNCaP از مؤسسه پاستور ایران تهیه شدند. سلول‌ها در محیط RPMI1640 (Gibco) حاوی FBS (Gibco) ۱۰ درصد و آنتی بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسین کشت داده شدند.

اولیگونوکلئوتید آنتی کلاسترین با توالی 5'-CAGCAGCAGAGTCTTCATCAT-3' به صورت فسفروتیوایت و توسط شرکت Bioneer و با سفارش شرکت تکاپوزیست ساخته شد.

تیمار سلول‌ها با اولیگوی آنتی‌سنس و داروی شیمیایی دُسِتاکسل به شرح زیر انجام شد: برای افزایش جذب اولیگونوکلئوتیدها توسط سلول‌های مورد نظر، از لیپوفکتامین (شرکت invitrogen) استفاده شد. برای این منظور، پس از تیمار لایه‌های سلولی PC3 و LNCaP کشت داده شده در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربع با تریپسین، تعداد ۵۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بود. جهت اتصال سلول‌ها به بستر، پلیت به مدت یک

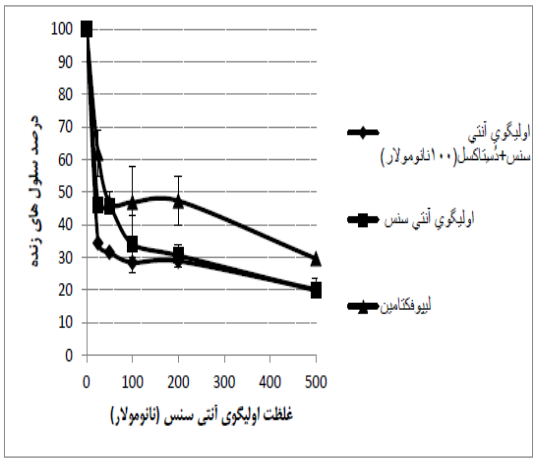
شب در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن پنج درصد و حاوی رطوبت مناسب قرار داده شد. محلول حاوی لیپوفکتامین و اولیگوی آنتی‌سنس در محیط کشت بدون سرم و آنتی بیوتیک جهت هر بار استفاده به صورت تازه تهیه شد. لیپوفکتامین و اولیگوی آنتی‌سنس در محیط کشت بدون سرم و آنتی بیوتیک به مدت ۲۰ دقیقه در گرم‌خانه گذاشته شدند. غلظت اولیگوی آنتی‌سنس و لیپوفکتامین به ترتیب ۵ پیکومول و ۰/۲۵ میکرولیتر در ۱۰ میکرولیتر محیط کشت بود (طبق دستور شرکت سازنده لیپوفکتامین). محیط کهنه از چاهک‌ها خارج و محیط جدید حاوی غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ نانومولار از اولیگوی آنتی‌سنس به چاهک‌های دارای سلول اضافه شد. برای هر غلظت ۳ تکرار منظور شد. سپس گرم‌خانه‌گذاری به مدت ۴ ساعت انجام و محیط جدید حاوی آنتی بیوتیک و سرم، جای‌گزین محیط دارای اولیگو شد. پس از ۲۰ ساعت، مجدداً عمل لیپوفکشن مشابه قبل انجام شد؛ به طوری که محیط حاوی آنتی بیوتیک و سرم توسط سمپلر خارج شد و محیط بدون آنتی بیوتیک و سرم حاوی حاوی غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ نانومولار از اولیگوی آنتی‌سنس در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به چاهک‌های دارای سلول اضافه شد. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون و تعویض محیط کشت حاوی اولیگوی آنتی‌سنس، محیط کشت حاوی سرم و آنتی بیوتیک و دُسِتاکسل اضافه گردید و پس از ۴۸ ساعت خوانش انجام شد.

برای ارزیابی اثر دارو بر روی سلول‌ها از کیت سنجش MTT (دی‌متیل تیازولیل دی‌فنیل تترازولیوم بروماید) شرکت ایده زیست استفاده شد. محیط کشت چاهک‌ها با محیط کشت تازه بدون فنل رِد جای‌گزین شد. سپس به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر محلول ۱۲ میلی‌مولار MTT اضافه و به مدت ۴ ساعت در گرم‌خانه گذاشته شد. سپس از محلول رویی به آرامی برداشته شد؛ به طوری که در هر چاهک ۲۵ میکرولیتر باقی ماند.۵۰ میکرولیتر محلول دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) به هر چاهک اضافه و پس از ۱۰ دقیقه، خوانش با دستگاه الایزا (TECAN) در طول موج ۵۶۰ نانومتر انجام شد.

❋یافته‌ها:

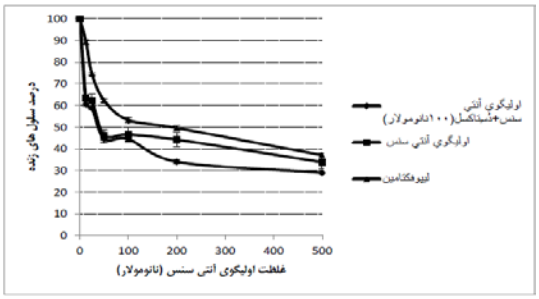
کاهش مشخص سلول‌های زنده مانده تیمار شده با اولیگوی آنتی‌سنس نسبت به سلول‌های تیمار شده با لیپوفکتامین بدون اولیگو در دودمان سلولی PC3 از غلظت ۲۰۰ نانومولار به بالای اولیگوی آنتی‌سنس شاهد وجود داشت. اما دُسِتاکسل سبب شد تا این اثر در غلظت‌های پایین‌تر از ۲۰۰ نانومولار اولیگوی آنتی‌سنس هم مشاهده شود. در غلظت ۲۰۰ نانومولار و بالاتر تفاوت مشخصی در میزان سلول‌های زنده دیده نشد (نمودار شماره ۱).

نمودار ۱- مقایسه اثر اولیگوی آنتی‌سنس با و بدون دُسِتاکسل بر دودمان سلولی PC3



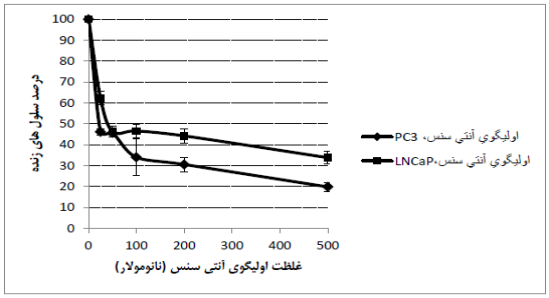
در مورد دودمان سلولی LNCap نیز سمیت سلولی از همان غلظت‌های اولیه مشاهده شد. اثر سمیت اولیگوی آنتی‌سنس بر این دودمان سلولی، خفیف‌تر از دودمان سلولی PC3، ولی اثر داروی دُسِتاکسل نسبت به اولیگوی آنتی‌سنس بیش‌تر بود (نمودار شماره ۲).

نمودار ۲- مقایسه اثر اولیگوی آنتی‌سنس با و بدون دُسِتاکسل بر دودمان سلولی LNCaP



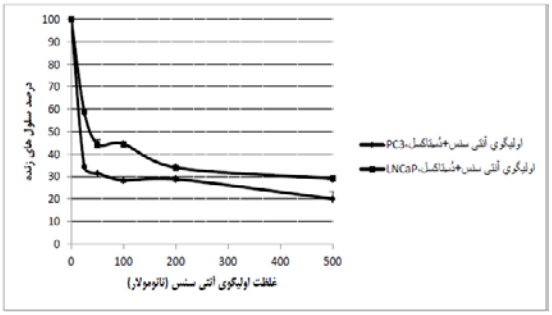
دودمان سلولی PC3 نسبت به دودمان سلولی LNCap، به اولیگوی آنتی‌سنس حساسیت بیش‌تری نشان داد (نمودار شماره ۳).

نمودار ۳- مقایسه اثر اولیگوی آنتی‌سنس بر دو دودمان سلولی PC3 و LNCaP



داروی دُسِتاکسل بر روی سلول‌های LNCap نسبت به سلول‌های PC3 اثر کشندگی بیش‌تری داشت (نمودار شماره ۴).

نمودار ٤- مقایسه اثر اولیگوی آنتی‌سنس به همراه دُسِتاکسل بر دو دودمان سلولی PC3 و LNCaP



❋بحث و نتیجه‌گیری:

این مطالعه نشان داد تیمار سلول‌های سرطان پروستات با اولیگوی آنتی سنسی (که برای mRNAی پروتئین کلاسترین ویژگی دارد) سبب تمایل سلول‌های نامیرای سرطانی به مرگ شده است. نقش کلاسترین در جلوگیری از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول در سلول‌های سرطانی متوقف یا کُند می‌شود و تنظیم منفی بیان ژن clu که پروتئین کلاسترین را کُد می‌کند، به انجام این پدیده و مرگ آن منجر می‌شود.[۸] به علاوه این اثر با افزودن دُسِتاکسل افزایش پیدا کرد که نشان‌دهنده هم‌افزایی اثر سمیت سلولی اولیگوی آنتی سنس و این دارو در سلول‌های سرطانی پروستات است.

در مطالعه حاضر، سلول‌های PC3 (مربوط به بافتی از سرطان پروستات پیشرفته و متاستاتیک) نسبت به سلول‌های LNCaP (جدا شده از مراحل اولیه سرطان پروستات)، حساسیت بیش‌تری به اولیگوی آنتی کلاسترین نشان دادند. این امر ممکن است مربوط به بیان پایین‌تر پروتئین کلاسترین در این سلول‌ها نسبت به سلول‌های PC3 باشد. واکنش بهتر سلول‌های LNCaP به حذف آندروژن نیز می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد. به ویژه تمایل به نامیرایی مجدد سلول‌های سرطانی اولیه پس از یک دوره بهبود در اثر حذف آندروژن و شروع پیشرفت بیماری نیز می‌تواند گواه این موضوع باشد.[۶]

تاکنون اولیگوهای آنتی‌سنس RNAی ویژه کلاسترین برای مهار سرطان‌های مختلفی به کار گرفته شده‌اند. از جمله این موارد سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 و MDA-MB-231 است که در آن استفاده از این اولیگو توانسته است هم به تنهایی و هم همراه با داروهای پاکلیتاکسل و تاموکسیفن سبب القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول شود.[۹،۱۰] دسته دیگر سلول‌های A549 (مربوط به سرطان ریه) هستند که تحت تأثیر اولیگوی آنتی سنس ویژه کلاسترین دچار مرگ می‌شوند. در این سلول‌ها نیز بین اثر اولیگوی آنتی‌سنس و داروهای

پاکلیتاکسل و جمسیتیبین هم‌افزایی دیده شده است.[۱۱و۱۲] در تحقیقی که بر روی سلول‌های سرطانی جدا شده از کلیه بیماران مبتلا انجام شد، اولیگوی آنتی‌سنس RNAی ویژه کلاسترین توانست حساسیت سلول‌های سرطانی کلیه را به داروی پاکلیتاکسل بالا ببرد.[۱۳] در سرطان پیشرفته مثانه نیز سطح بیان کلاسترین در سلول‌ها ۴ تا ۵ برابر نسبت به بافت طبیعی بالاتر گزارش شده است.[۱۴] در سلول‌های سرطانی پروستات PC3 و تومورهای شیانوگی بین اثر اولیگوی آنتی‌سنس RNAی ویژه کلاسترین و پاکلیتاکسل هم‌افزایی مشاهده شده است.[۱۵-۱۷] در تحقیق حاضر، اثر سمیت سلولی اولیگوی آنتی‌سنس ویژه کلاسترین با افزودن داروی دُسِتاکسل در سلول‌های PC3، تنها با کاهش غلظت مورد نیاز از اولیگوی آنتی‌سنس همراه بود. اما در مورد سلول‌های LNCaP، افزودن داروی دُسِتاکسل از غلظت بالای ۲۰۰ نانومولار اولیگوی آنتی‌سنس، تفاوت معنی‌داری در سمیت سلولی ایجاد کرد.

با این که هم‌افزایی اثر سمیت سلولی اولیگوی آنتی-سنس مذکور و داروی شیمیایی دُسِتاکسل در سلول‌های سرطانی پروستات محرز است، انجام آزمایش در نمونه حیوانی اجتناب ناپذیر بوده و برای این کار اولیگوی مذکور باید تحت تغییرات ساختاری شیمیایی قرار گیرد. انجام تغییرات شیمیایی که منجر به افزایش نیمه عمر اولیگو شود، امکان استفاده از آن را در مدل‌های حیوانی فراهم می‌کند.

❋سپاس‌گزاری:

از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران برای حمایت مالی از این پژوهش قدردانی می‌شود.

❋مراجع:

1. Hall J, Guyton A. Textbook of medical physiology. 11th ed. Philadelphia: Saunders; 2011. 999-1000

2. Catalona WJ, Loeb S. Prostate cancer screening and determining the appropriate prostate-specific antigen cutoff values. J Natl Compr Canc Netw 2010 Feb; 8 (2): 265-70.

3. Ganong W. Review of medical physiology. 22nd ed. United States of America: McGraw-Hill; 2005. 428-30.

4. Hankey BF, Feuer EJ, Clegg LX, Hayes RB, Legler JM, Prorok PC, et al. Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer-part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. J Natl Cancer Inst 1999 Jun 16; 91 (12): 1017-24.

5. Gomella LG, Singh J, Lallas C, Trabulsi EJ. Hormone therapy in the management of prostate cancer: evidence-based approaches. Ther Adv Urol 2010 Aug; 2 (4): 171-81.

6. Calais da Silva FE, Bono AV, Whelan P, Brausi M, Marques Queimadelos A, et al. Intermittent androgen deprivation for locally advanced and metastatic prostate cancer: results from a randomised phase 3 study of the South European Uroncological Group. Eur Urol 2009 Jun; 55 (6): 1269-77.

7. Peer D, Lieberman J. Special delivery: targeted therapy with small RNAs. Gene Ther 2011 Dec; 18 (12): 1127-33.

8. Miyake H, Hara I, Gleave ME. Antisense oligodeoxynucleotide therapy targeting clusterin gene for prostate cancer: Vancouver experience from discovery to clinic. Int J Urol 2005 Sep; 12 (9): 785-94.

9. So A, Sinnemann S, Huntsman D, Fazli L, Gleave M. Knockdown of the cytoprotective chaperone, clusterin, chemosensitizes human breast cancer cells both in vitroand in vivo. Mol Cancer Ther 2005 Dec; 4 (12): 1837-49.

10. Redondo M, Téllez T, Roldan MJ, Serrano A, García-Aranda M, Gleave ME, et al. Anticlusterin treatment of breast cancer

cells increases the sensitivities of chemotherapy and tamoxifen and counteracts the inhibitory action of dexamethasone on chemotherapy-induced cytotoxicity. Breast Cancer Res 2007; 9 (6): R86.

11. July LV, Beraldi E, So A, Fazli L, Evans K, English JC, et al. Nucleotide-based therapies targeting clusterin chemosensitize human lung adenocarcinoma cells both in vitro and in vivo. Mol Cancer Ther 2004 Mar; 3 (3): 223-32.

12. Panico F, Rizzi F, Fabbri LM, Bettuzzi S, Luppi F. Clusterin (CLU) and lung Cancer. Adv Cancer Res 2009; 105: 63-76.

13. Zellweger T, Miyake H, July LV, Akbari M, Kiyama S, Gleave ME. Chemosensitization of human renal cell cancer using antisense oigonucleotides targeting the antiapoptotic gene clusterin. Neoplasia 2001 Jul-Aug; 3 (4): 360-7.

14. Miyake H, Gleave M, Kamidono S, Hara I. Overexpression of clusterin in transitional cell carcinoma of the bladder is related to disease progression and recurrence. Urology 2002 Jan; 59 (1): 150-4.

15. Di Cresce C, Koropatnick J. Antisense treatment in human prostate cancer and melanoma. Curr Cancer Drug Targets 2010 Sep; 10 (6): 555-65.

16. Rizzi F, Bettuzzi S. Targeting clusterin in prostate cancer. J Physiol Pharmacol 2008 Dec; 59 (Suppl 9): 265-74.

17. Gleave ME, Miyake H, Zellweger T, Chi K, July L, Nelson C. Use of antisense oligonucleotides targeting the antiapoptotic gene, clusterin/testosterone-repressed prostate message 2, to enhance androgen sensitivity and chemosensitivity in prostate cancer. Urology 2001 Aug; 58 (2 Suppl 1): 39-49.