

PROSTAT KANSERİNDE SELENYUMUN PROTEOMİK TEMELLİ BİR YAKLAŞIMLA FARKLI ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Nur Özten Kandaş¹

¹ Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye

ÖZET

Serum prostat spesifik antijeni (PSA) prostat kanserli hastaların tanımlanmasında kliniğe çok önemli katkı sağlamıştır. Bununla birlikte PSA'nın bazı limitasyonları bulunmaktadır. Bu durum erken tanı ve tedavide yeni biomarkerların tanımlanması ihtiyacını doğurmuştur. Klinik çalışmalara göre, selenyumun ileri ve agresif prostat kanserinde potansiyel önleyici etkisinin olduğu gösterilmiştir. Ancak bu etki mekanizmasının daha çok düşük selenyuma sahip erkeklerde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, yeni tümör markerlarının araştırılması ve selenyumla indüklenen değişikliklerin proteomiks teknolojisiyle saptanmasıdır. Selenyumla muamale edilmiş BPH-1 ve LNCaP hücrelerinin bulunduğu besiyerindeki proteinler iki boyutlu elektroforez yapılmış ve MALDI-TOF-MS ile tanımlanmıştır. MALDI-TOF-MS kullanılarak ve veri tabanı araştırılması yapılarak besiyerinde eksprese olan 9 farklı protein tanımlanmıştır. Proteomikse dayalı bir yöntemle yeni tümör markerlarının araştırılması için uygun ve etkin bir yol olarak prostat kanseri ve benign prostatik hipertrofi hücrelerinin ayırımında 9 aday protein bir kemopreventif ajan olan selenyum kullanımına yanıt vermesine bağlı olarak tanımlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Prostat kanseri, proteomik, selenyum.*

ABSTRACT

*Although the induction of serum prostate specific antigen (PSA) measurements in clinical practice has been considered revolutionary in the treatment of prostate cancer in patients, accepted constraints still remain in the usage of PSA. Hence, it is crucial to identify other prostate cancer biomarkers that could contribute to early detection and prognosis. According to the clinical trials, selenium shows its potential inhibitory effects in advanced-stage or aggressive prostate cancer. But this chemopreventive effect shows inhibitory action only in men with low selenium levels. The aim of this study was to search new tumor markers and selenium induced changes utilizing proteomics technology. After profiling of the proteins found in conditioned medium (CM) of selenium treated BPH-1 and LNCaP cells via two-dimensional electrophoresis, identification was performed by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Nine differentially expressed proteins were identified in the CM of BPH-1 and LNCaP cells using MALDI-TOF-MS and database search. **Conclusion:** We procured possible and efficient way to search new tumor marker candidates by a proteomics-based analysis and identified 9 potential candidate proteins in CM of selenium treated BPH-1 and LNCaP cells to differentiate prostate cancer response from benign prostatic hypertrophy response.*

Keywords: *Prostate cancer, proteomics, selenium.*

1. GİRİŞ

Prostat spesifik antijen (PSA), prostat kanseri (PCa) için iyi bilinen bir serum biyolojik belirteçidir. Bununla birlikte, PSA testinin iyi bilinen kısıtlamaları vardır ve bu serum belirteci asla semptomlara neden olmayacak agresif kanserlerden latent kanserleri ayırt etmemektedir [1].

PSA'nın yanı sıra, kanser hücrelerinden karsinoembriyjenik antijenler (CEA), osteopontin, matris metalloproteinaz 2 (MMP-2) gibi belirteçleri içeren serum, idrar gibi vücut sıvılarına salınan proteinler potansiyel olarak yararlı biyolojik belirteç olabilir [2,3]. Bunlar, kantitatif proteomik ve genomik temelli yaklaşımların güçlü tarama araçlarıyla tanımlanmıştır [2].

Selenyum (Se), tüm memeli türleri için gerekli olan önemli bir iz elementtir. Klinik araştırmalara göre, selenyum ileri veya agresif prostat kanserinde potansiyel inhibitör etkilerini göstermektedir [1]. Bunun mekanizması açık değildir; [4] selenyumun bu selenoproteinlerin seviyelerini modüle ederek kanseri önleme olasılığı söz konusudur [5].

Selenyum eksikliği ve toksisitesi arasında, sağlıkta faydalı etkilerine ilişkin çok dar bir aralık vardır [6]. Kanser araştırmacıları, yıllarca prostat kanserinde selenyumun kemopreventif aktivitesi ile son derece ilgilenmektedirler, birkaç yıl önce yapılan büyük bir araştırmadan elde edilen sonuçlar tek başına veya vitamin E takviyesiyle selenyumun prostat kanserini önlemediğini göstermektedir [7]. Ancak, normal selenyum düzeyleri olan erkekleri analiz eden bu alandaki önemli bir çalışma olan SELECT (Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial) denemesinde, belirli bir prostat kanseri tipine odaklanılmamıştır. Selenyum yetersiz olan erkekler ileri prognozu kötü olan prostat kanseri için daha fazla risk taşır [8].

Kuşkusuz, prostat kanseri tanısında kullanılabilecek yeni biyolojik belirteçlerin tanımlanması önemlidir ve muhtemelen PCa'nın erken teşhisinde önemli bir yere sahiptir.

Bu çalışmanın amacı, potansiyel aday prognostik tümör belirteçlerini aramakla birlikte, proteomik tabanlı bir yaklaşımla selenyum tedavisiyle ilgili temel önemli değişiklikleri izlemektir.

Bu çalışmada, sodyum selenite maruz bırakılmış benign BPH-1 ve (erken evre) LNCaP prostat kanseri hücre hatlarında ortama salınan proteinler, iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2-DE) ile profillenmiş ve daha sonra matris ile desteklenmiş *lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi* (MALDI-TOF MS) ile analiz edilmiştir. Dokuz proteinin farklı şekilde eksprese edildiği ve prostat kanserinin potansiyel olarak yararlı belirteçleri olabileceği ve potansiyel tümör belirteçleri elde etmek için hücre hattı medyumunun proteomunun analiz edilmesinde uygulanabilir ve etkili olabileceği düşünülmektedir.

2. YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürü ve Örnek Hazırlama

İnsan prostat hücre hattı LNCaP ve BPH-1, ATCC'den satın alındı. Hücre hatları, % 5 CO₂ nemlendirilmiş atmosferde 37°C'de % 10 sığır fetüsü serumu (Hyclone, USA9, 10 mmol/L HEPES ve 1.0 mmol/L sodyum bikarbonat) ile takviye edilmiş RPMI 1640 ortamında (Gibco, ABD) yetiştirildi. Her iki hücre, 24 saat boyunca 2,5µM sodyum selenit (Sigma-Aldrich, ABD) ile muamele edildi ve ortam medyumunu (CM) toplandı ve (Acrodisc Şırınga filtresi 0.45 µm süper membran filtresi, Pall, ABD) filtrelendi. Daha sonra bir Amicon Ultra-15 santrifüj filtre cihazı (Millipore, ABD) kullanılarak yaklaşık 200 mL'ye konsantre edildi. Örnek protein konsantrasyonları ölçüldü. Şartlandırılmış ortam medyumunu daha sonra Ready PrePTM 2D Cleanup kiti (Bio-Rad, ABD) kullanılarak çöktürüldü ve proteinler kullanıma kadar -80°C'de saklandı.

2.2. 2-DE ve jelde protein parçalanması

Çöktürülmüş protein numuneleri (1.6 mg) çözelti (8mol/L üre, %4 (3-kolamidopropil) dimetilamoniyum)-1-proansülfonat, 65 mmol / L ditiotreitol (DTT), % 0.2 Bio-Lyte amfolitleri ve 400 µl'lik bir nihai hacme kadar bromfenol mavisi (Bio-Rad, ABD) içeren çözelti içinde çözüldü. İzoelektrik odaklama (IEF) üreticinin talimatlarına (Bio-Rad, ABD) göre gerçekleştirildi. IEF'den sonra her şerit % 1 DTT ve bunu takiben % 2.5 iyodoasetamit ile dengelendi. İkinci boyut için, Protein II XL Muti-Hücre sisteminde dikey döküme SDS-PAGE (% 15), 30 mA/jel ile çalıştırıldı (Bio-Rad, ABD).

Jeller daha sonra CBB G-250 (Amresco, ABD) ile boyandı. Tarama, PDQuest yazılımı (Bio-Rad) ile işlendi. Farklı olarak ifade edilen proteinler, her bir hücre dizisi arasında 2 misli fazla fark olarak tanımlandı. Deneyler bağımsız olarak üç kez tekrarlandı.

2.3. MALDI-MS and Protein Tanımı

Ölçümler, Bruker Reflex III (Bruker daltonik GmbH, Almanya) MALDI-MS üzerinde gerçekleştirildi. Matris için % 50 ACN ve % 0.1 TFA içinde doymuş bir CHCA çözeltisi kullanıldı; 1µl matris çözeltisi ve 1µl örnek çözeltisi karıştırıldı ve 384 hedefi kuyusuna uygulandı. 20kV hızlandırıcı gerilim, 23kV yansıtma gerilimi, MALDI-MS analizinin parametreleri olarak belirlendi. ProteinProspektör ve MS-Fitlink yazılımlarını (<http://prospector.ucsf.edu>) kullanarak, proteinler peptid kütle sonuçlarında tanımlandı. Sadece istatistiksel olarak anlamlı bir puan veren proteinlerin ($P<0.05$) tanımlandığı düşünülmektedir.

3. BULGULAR

LNCaP ve BPH-1 hücreleri, 24 saat içinde hücre canlılığı ve ölüm oranı (önceki deney verileri eklenmemiştir) ile ilgili ilk etkileri gözlemladığımız doz olan 0 ve 2,5 µM selenit ile muamele edilmiştir. 2D elektroforez proteomik analizi ardından kütle spektrometresi analizi yapıldı. Hem LNCaP hem de BPH-1 hücrelerinin 2D jellerde yoğunluklarda azalma gösteren yaklaşık 9 protein lekesi tespit edildi. Bu lekeler jelden çıkarıldı ve MALDI-TOF analizine tabi tutuldu (Şekil 1. ve 2) (Tablo 1 ve 2).

4. TARTIŞMA

Teşhis ve tarama aracı olan PSA, hastaların prostat biyopsisi sürecinde önemli katkılar sağlar. Bununla birlikte, PSA testinin özgüllüğü biyopside düşüktür, PSA aralığı 4-10 ng/ml olan hastaların çoğu prostat kanseri için pozitif olarak değerlendirilmez [9]. Bu gerçek, agresif PCa'yı benign prostatik hiperplaziden ayırmak için araştırmacıları daha etkili biyolojik belirteçler bulmaya yönlendirmiştir.

Bu çalışmada, selenyum ile muamele edilen iki hücre hattının ortam medyumunda (CM) toplam 9 protein belirlendi. Bu proteinler arasında, iki-

si salgılanan proteinler (siklofilin A ve enolaz 1) olarak doğrulandı. Peptidil prolil cis-trans izomeraz (PPIaz) aktivitesine sahip Siklofilin A (Cyp A)'nın taşıma, protein katlanması ve T-hücresi aktivasyonu gibi birçok önemli fonksiyona sahip olduğuna inanılmaktadır [10]. Malign transformasyon ve metastaz için önemli bir belirteç olan CypA'nın kanserde upregüle olduğu bilinmektedir [11]. Çalışmamızda, CypA proteininin, selenyuma maruz kalmış LNCaP hücrelerinde aşırı derecede eksprese olduğu saptanmıştır. Bu durum, 2,5µM selenyumun metastazda koruyucu bir etkiye sahip olamayacağını düşündürmektedir.

Tümör hücrelerinde Warburg etkisine katkıda bulunan birçok glikoz taşıyıcısı ve glikolitik enzim, enolaz 1 (ENO1) upregülasyonuna ve aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir [12]. Bu çalışmada, ENO1 ve ısı şoku proteini 60 (Hsp60), LNCaP hücrelerinin ortam medyumunda aşırı derecede eksprese edildiği saptanmıştır. Hsp60 proteinlerinin rahim, serviks ve kolon kanseri oluşumuyla ilişkili olduğu daha önceden gösterilmiştir [13]. Bu protein ifadeleri, selenyum verildiğinde değişmeyen CypA ifade modelini desteklemektedir. Aşırı ifade edilen HSP60'ın, kalın bağırsak ve prostat karsinogenezinde tümör progresyonu ve kötü prognoz ile pozitif korelasyona sahip olduğu gösterilmiştir [13]. Günümüzde çeşitli ısı şoku proteinleri, karsinogenezin biyolojik belirteçleri olarak düşünülmeyle birlikte bazı tümörlerin farklılaşma ve saldırganlık dereceleri bu proteinlerin ekspresyon seviyelerine bağlanmaktadır [14].

Bu çalışmada, LNCaP prostat kanseri hücrelerinde kalretikulin, keratin 17, keratin 19, tioredoksin peroksidaz ve triosefosfat izomeraz eksikliği tespit edilmiş olup, BPH-1 hücrelerinde bahsedilen proteinlerin ortam medyumunda bulunabileceği gösterilmiştir. Selenyuma maruziyetin spesifik olarak herhangi bir değiştirici etkisinin olmadığı saptanmıştır. Kalretikulin normal prostat dokusunda prostatik epitel hücrelerinde bol miktarda eksprese edilir, ancak prostat androjen tarafından upregüle edilen tüm genleri eksprese etmektedir [15]. Önceki çalışmalar, normal prostat dokusunda keratin 19 dağılımını tanımlamıştır [16,17]. Bu çalışmanın sonucu bahsedilen diğer bulgularla uyumludur.

Tiyoredoksin reduktaz 1 (TrxR1), oldukça yüksek seviyede selenyuma karşı hassas bir proteindir. Bu nedenle prostat kanserinde selenyum maruziyetine karşı güçlü bir biyolojik belirteç olabileceği ileri sürülmektedir [18]. NADPH ve Trx ile tiyoredoksin (Trx) sisteminin bir parçası olan selenoprotein TrxR1 sıkı bir şekilde düzenlenir ve transkrite hücrelerde Trx aşırı ekspresyonunda yanıt toksik olabilir [19]. Yüksek selenit konsantrasyonlarında selenitin TrxR1 ve oksijen ile redoks reaksiyonu oksidatif stres oluşturabilir ve kanser hücrelerinin nekroz ve/veya apoptoz ile öldürülmesine yol açabilir [20]. Dolayısıyla, selenyumun TrxR1 aktivitesini arttırmasının, prostat kanserinde selenyumun apoptotik hücre ölümünün uyarılması yoluyla olabileceği düşünülmektedir. TrxR1'in prostat kanseri hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesine neden olabileceği açıklanmıştır [21]. Lindner ve ark. östrojene duyarlı hücrelerde TrxR1'de artışın kaspaz-3 aktivasyonuna neden olması gerektiğini göstermiştir [22]. Lindner ve ark.'nın yaptığı çalışma, tümörojen olmayan BPH-1 hücrelerinde kaspaz-3 üzerinde yapılan bu çalışmanın sonuçları ile tutarlı iken LNCaP kanser hücrelerinde değildir. Bununla birlikte, TrxR1 aktivitesinin uyarımı, çeşitli hücre hatları arasında çeşitli selenyum dozları ile büyük ölçüde değişebilmektedir [18, 23]. TP1 (triosefosfat izomeraz 1) tümör belirteci olarak mesane, kolon, akciğer karsinoması ile ilişkilendirilmiştir [24, 25]. LNCaP hücrelerinin ortam medyumundaki bazı proteinlerinin downregülasyonu veya kaybedilmesi gösterilmiştir ve bu proteinler prostat

karsinogenezi sırasında işlev gösterebilirler [25, 26]. Bu çalışmada temelde CypA, ENO1, Hsp60 proteinleri LNCaP hücrelerinin ortam medyumunda upregüle olduğu ve selenyum maruziyetinin bu upregülasyonu engellemediği gösterilmiştir. LNCaP hücrelerinin ortam medyumunda kalretikulin, keratin 17, keratin 19, tiyoredoksin peroksidaz ve triosefosfat izomerazın bulunmadığı, selenyuma maruz kalmış BPH-1 hücrelerinin ortam medyumunda bulunduğu gösterilmiştir.

Bu çalışma olası biyolojik belirteçlerin saptanmasında ve *in vitro* prostat kanseri modelinde selenyumun etkileri açısından önemlidir. Yukarıda sözü edilen olası biyolojik belirteçlerin, ek selenyum kullanan prostat kanseri hastalarının birincil teşhisi ve/veya tedavi durumu üzerinde de etkisi olabilir. Hatta potansiyel olarak yararlı tümör belirteçlerinin, prostat kanseri hastalarının kan, idrar ve semen gibi vücut sıvılarında kolaylıkla tespit edilebileceğini ve PSA'ya ek olarak yardımcı biyolojik belirteç olarak kullanılabilirliğini bilmek açısından önemlidir.

5. SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışmada, proteomik temelli bir strateji ile yeni tümör belirteçlerini belirlemenin olası ve etkili bir yolu önerilmektedir. BPH-1 ve LNCaP ortamı hücrelerinden tamamen farklı 9 protein gösterilmiş ve bu proteinlerin potansiyel olarak yararlı biyolojik belirteç olabilecekleri ve takviye selenyum kullanan hastalarda prostat kanseri progresyonunda ilişkili kurulabileceği ileri sürülebilir.

Tablo 1: LNCaP hücrelerinde protein tanımlaması

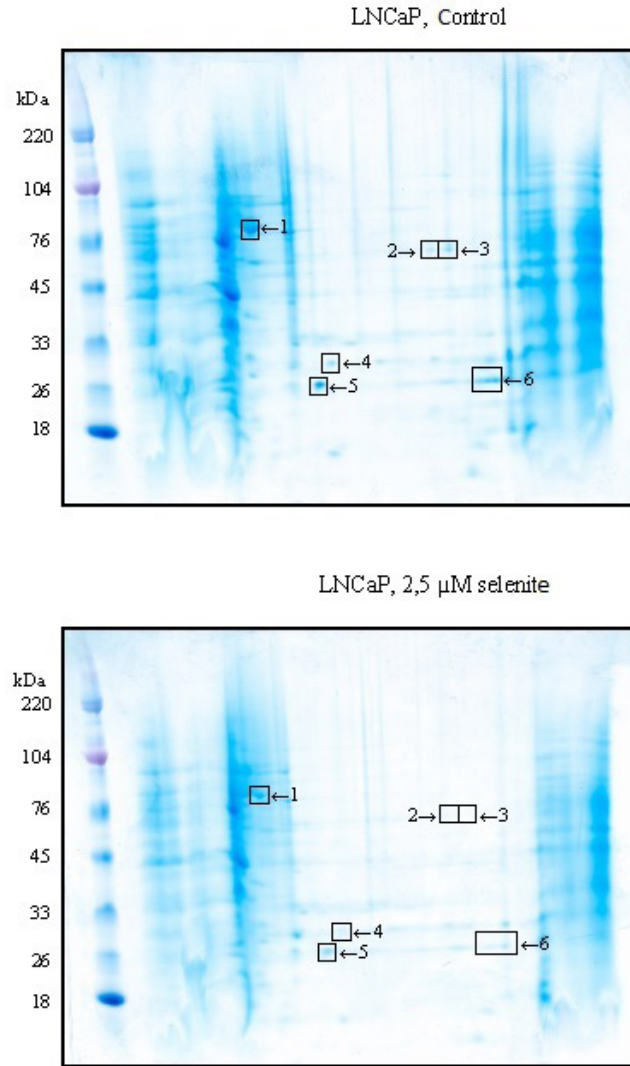
| Jel Elektrofrezisi | | | Kütle Spektrometresi ile Protein Belirlenmesi |
|--------------------|----|-----|--|
| kDa | | pH | MALDI-TOF |
| Spot 1 | 80 | 4.5 | Heat shock protein 60 (isoform CRA_c) (chaperonin) GI:119590557 @ GI:77702086 @ GI: 31542947 |
| Spot 2 | 60 | 7.3 | Enolase 1 (or enolase 1 variant) GI: 4503571 (enolase 1) |
| Spot 3 | 60 | 8.0 | Enolase 1 (or enolase 1 variant) GI: 62896593 @ 62897945 (variant) |
| Spot 4 | 30 | 6.0 | Belirgin tanımlama bulgusu yok |
| Spot 5 | 26 | 5.8 | Belirgin tanımlama bulgusu yok |
| Spot 6 | 25 | 8.5 | Cyclophilin A (= peptidilprolilisomerase) GI:10863927 @ GI: 13937981 |

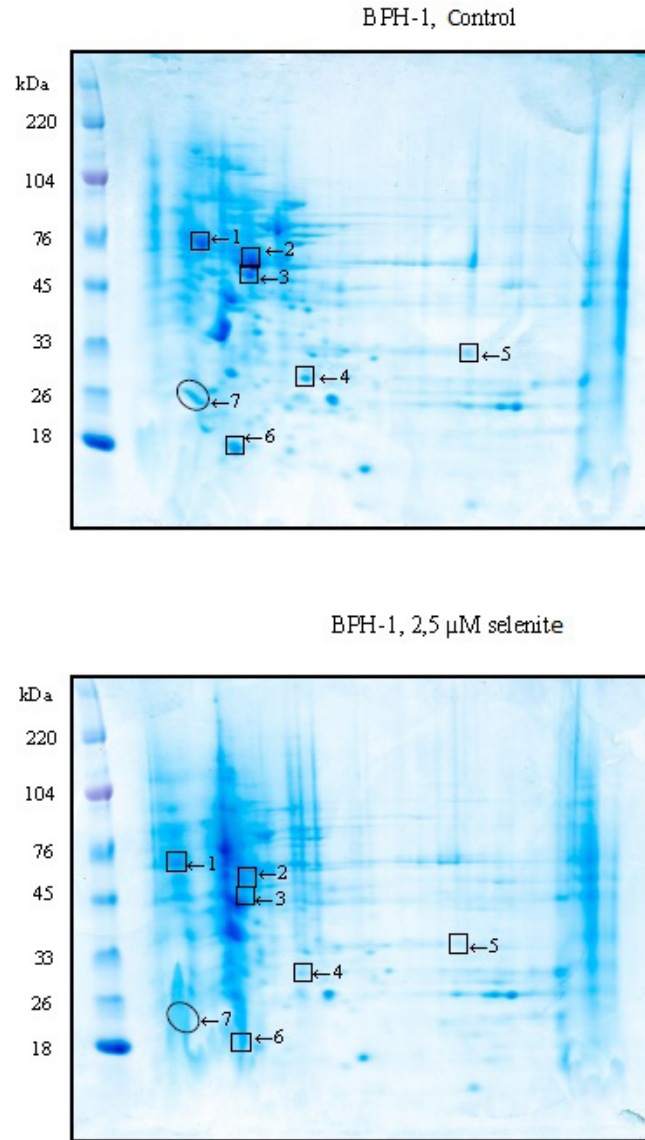
p < 0.05, 3 proteomik çalışmasının ortalaması

Tablo 2: BPH-1 hücrelerinde protein tanımlaması

| Gel Electrophoresis | | | Protein Identification by Mass Spectrometry |
|---------------------|----|-----|--|
| kDa | | pH | MALDI-TOF |
| Spot 1 | 76 | 3.8 | Calreticulin pre-cursors GI: 4757900 |
| Spot 2 | 60 | 4.7 | Keratin 17 (+ probably Keratin 14) GI:24234699 @ GI: 4557701 |
| Spot 3 | 50 | 4.7 | Keratin 19 GI: 34783124 |
| Spot 4 | 28 | 5.5 | Chain A Thioredoxin peroksidase GI:32189392 |
| Spot 5 | 30 | 8.0 | Triosephosphate isomerase (isoform CRA_b)GI: 119609129 @ GI: 4507645 |
| Spot 6 | 18 | 4.2 | Not significant identification |
| Spot 7 | 26 | 3.8 | Not significant identification |

$p < 0.05$, 3 proteomik çalışmasının ortalaması

**Şekil 1:** Lncap hücre hattında 6 protein spotu



Şekil 2: BPH-1 hücre hattında 7 protein spotu

KAYNAKLAR

- [1] Hartwell L, Mankoff D, Paulovich A, Ramsey S, Swisher E. Cancer biomarkers: a systems approach. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 905-908.
- [2] Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging. *Nat Rev Cancer* 2005; 5 (11): 845-856.
- [3] Chen P, Wang L, Li N, Liu Q, Ni J. Comparative proteomics analysis of sodium selenite-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Metallomics* 2013; 5(5): 541-550.
- [4] Nicastrò HL, Dunn BK. Selenium and prostate cancer prevention: insights from the selenium and vitamin E cancer prevention trial (SELECT). *Nutrients* 2013; 5(4): 1122-1148.
- [5] Shibata MA, Ward JM, Devor DE, Liu ML, Green JE. Progression of prostatic intraepithelial neoplasia to invasive carcinoma in C3 (1)/SV40 large T antigen transgenic mice: histopathological and molecular biological alterations. *Cancer Res* 1996; 56: 4894-4903.
- [6] Hurst R, Hooper L, Norat T, Lau R, Aune D, Greenwood DC, Vieira R, Collings R, Harvey LJ, Sterne JA, Beynon R, Savović J, Fairweather-Tait SJ. Selenium and prostate cancer: systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2012; 96(1):111-22.
- [7] Klein EA, Thompson IM Jr, Tangen CM, Crowley JJ, Lucia MS, Goodman PJ, Minasian LM, Ford LG, Parnes HL, Gaziano JM, Karp DD, Lieber MM, Walther PJ, Klotz L, Parsons JK, Chin JL, Darke AK, Lippman SM, Goodman GE, Meyskens FL Jr, Baker LH. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA* 2011; 306(14): 1549-1556.
- [8] Chan JM, Oh WK, Xie W, Regan MM, Stampfer MJ, King IB, Abe M, Kantoff PW. Plasma Selenium, Manganese Superoxide Dismutase, and Intermediate- or High-Risk Prostate Cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(22): 3577-3583.
- [9] Boccon-Gibod L. Rising PSA with a negative biopsy. *Eur Urol* 2001;40 Suppl 2: 3-8.
- [10] Nigro P, Pompilio G, Capogrossi MC. A key player for human disease. *Cell Death Dis* 2013; 4: 888.
- [11] Yang H, Chen J, Yang J, Qiao S, Zhao S, Yu L. Cyclophilin A is upregulated in small cell lung cancer and activates ERK1/2 signal. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361: 763-767.
- [12] Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(2): 85-95.
- [13] Cappello F, David S, Rappa F, Bucchieri F, Marasà L, Bartolotta TE, Farina F, Zummo G. The expression of HSP60 and HSP10 in large bowel carcinomas with lymph node metastase. *BMC Cancer* 2005; 5:139.
- [14] Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 2005, 10(2): 86-103.
- [15] Zamanian M, Veerakumarasivam A, Abdullah S, Rosli R. Calreticulin and cancer. *Pathol Oncol Res* 2013; 19: 149-154.
- [16] Nagle RB. Intermediate filament expression in prostate cancer. *Cancer Metast Rev* 1996; 15(4): 473-482.
- [17] Peehl DM. Cellular biology of prostatic growth factors. *Prostate Suppl* 1996; 6:74-78).
- [18] Kandaş NO, Randolph C, Bosland MC. Differential Effects of Selenium on Benign and Malignant Prostate Epithelial Cells: Stimulation of LNCaP Cell Growth by Noncytotoxic, Low Selenite Concentrations. *Nutr Cancer* 2009; 61(2):251-264.
- [19] Arner ES & Holmgren A. The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; 16(6): 420-426.
- [20] Gallegos A, Berggren M, Gasdaska JR, Powis G. Mechanisms of the regulation of thioredoxin reductase activity in cancer cells by the chemopreventive agent selenium. *Cancer Res* 1997, 57(21): 4965-4970.

- [21] Zhong W, Oberley TD. Redox-mediated effects of selenium on apoptosis and cell cycle in the LNCaP human prostate cancer cell line. *Cancer Res* 2001; 61(19): 7071-7078.
- [22] Lindner DJ, Hofmann ER, Karra S, Kalvakolanu DV. The interferon-beta and tamoxifen combination induces apoptosis using thioredoxin reductase. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1496(2-3): 196-206.
- [23] Nilsson G, Sun X, Nyström C, Rundlöf AK, Potamitou Fernandes A, Björnstedt M, Dobra K. Selenite induces apoptosis in sarcomatoid malignant mesothelioma cells through oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2006; 41(6): 874-885.
- [24] Montgomerie JZ, Gracy RW, Holshuh HJ, Keyser AJ, Bennett CJ, Schick DG. The 28K protein in urinary bladder, squamous metaplasia and urine is triosephosphate isomerase. *Clin Biochem* 1997; 30(8): 613-618.
- [25] Chen G, Gharib TG, Huang CC, Thomas DG, Shedden KA, Taylor JM, Kardias SL, Misesek DE, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin Cancer Res* 2002; 8(7): 2298-2305.
- [26] Chen WZ, Pang B, Yang B, Zhou JG, Sun YH. Differential proteome analysis of conditioned medium of BPH-1 and LNCaP cells. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124(22): 3806-3809.

