

تأثیر تاموکسیفن بر سلول های سرطانی پروستات در محیط آزمایشگاه

ایرج خدادادی (PhD)^۱، رقیه عباسعلی پورکبیره (PhD)^۲، غلامرضا شفیعی (PhD)^{۳*}

۱- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

دریافت: ۹۶/۱۲/۲۵، اصلاح: ۹۷/۶/۱۴، پذیرش: ۹۷/۷/۷

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به شیوع بالای سرطان پروستات و تأثیر آندروژن ها در پیشرفت آن، این مطالعه به منظور بررسی اثرات مهارى تاموکسیفن بعنوان یک آنتی آندروژن، بر سرطان پروستات انجام شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی رده سلولی (PC3) انسانی از انستیتو پاستور خریداری شد. غلظت های ۰، ۳/۲۵، ۷/۵، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ میکرومولار تاموکسیفن بر روی سلولها اثر داده شد و تستهای زنده مانی، مهاجرت، کولونی زایی و تغییرات مورفولوژیک سلولی به ترتیب با روش های MTT، wound healing، کولونی زایی و رنگ آمیزی گیمسا بررسی شدند.

یافته ها: مقدار IC50 تاموکسیفن با غلظت ۱۵ میکرومولار و در زمان ۲۴ ساعت با ضریب رگرسیون ۰/۹۰ بدست آمد. نتایج نشان داد که تاموکسیفن بطور معنی داری باعث مهار تکثیر با ۷/۳±۰/۶ کولونی نسبت به ۱۰۰ کولونی کنترل ($p < ۰/۰۳$) و مهاجرت با قطر شیار $۲۷۸/۴ \pm ۱/۵$ میکرومتر نسبت به $۸۹/۶ \pm ۰/۹$ میکرومتر کنترل ($p < ۰/۰۱$) در دوز ۱۵ میکرومولار می شود. درمان سلول ها با دوز ۱۵ میکرومولار نیز در مقایسه با گروه کنترل باعث ایجاد تغییرات در هسته و سیتوپلاسم و ایجاد آپوپتوز می گردد. **نتیجه گیری:** نتایج مطالعه نشان داد که تاموکسیفن دارای اثرات مهارى معنی داری بر روی سلول PC3 پروستات می باشد و می تواند بعنوان یک راه مناسب در جهت درمان سرطان پروستات مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: سرطان پروستات، تاموکسیفن، مهاجرت سلولی، تکثیر سلولی.

مقدمه

تاموکسیفن متابولیزه می شود (۶). با توجه به شیوع بالای سرطان پروستات در چند سال اخیر و اثرات ضد سرطانی تاموکسیفن، این مطالعه به منظور بررسی اثرات سیتوتوکسیک، تکثیر و تغییرات مورفولوژیک تاموکسیفن بر رده سلولی سرطان پروستات (PC3) انجام شد.

مواد و روش ها

مواد: رده سلولی PC3 از انستیتو پاستور، تاموکسیفن و DMSO از شرکت سیگما (Sigma, Steinheim-Germany) و محیط ۱۶۴۰ (FBS, RPMI, Gibco) پنی سیلین-استرپتومایسین و تریپسین-EDTA از شرکت Gibco (Gibco, Life Technologies-USA) خریداری گردید.

روش ها: ابتدا جهت تعیین IC50 با روش MTT ۱۰۴ سلول در پلیت های ۹۶ خانه در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت داده شد. سلول ها با ۵۰ میکرولیتر با دوزهای مختلف (۰، ۳/۲۵، ۷/۵، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ میکرومولار) تاموکسیفن تیمار داده شد و پس از ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت، ۱۵ میکرولیتر محلول MTT اضافه، مدت ۴ ساعت انکوبه،

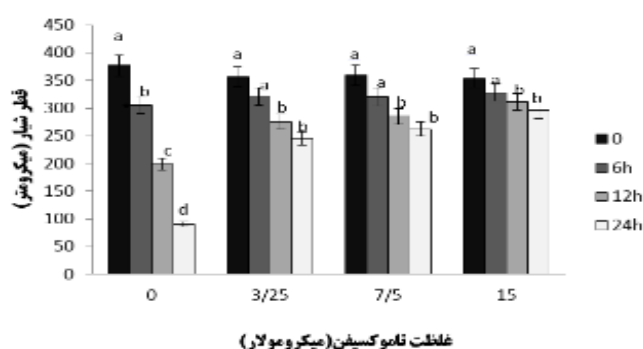
امروزه سرطان دومین عامل مرگ و میر پس از بیماریهای قلب و عروق شناخته شده است (۱). در کشورهای توسعه یافته سرطان پروستات جزو شش سرطان رایج و مرگ آور در دنیا بشمار می رود. گفته می شود از هر شش مرد بالای ۶۵ سال یک نفر به این سرطان مبتلا می شود (۲). عوامل ارثی، رژیم غذایی، الگوهای رفتاری جنسی، مصرف الکل و میزان برخورد با پرتوهای فرابنفش نقش مهمی در میزان بروز سرطان پروستات دارند (۳). یک راه فرار از سرطانی شدن سلول ها، تقویت آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی می باشد تا با از بین بردن سلول سرطانی سبب مهار رشد و توقف مهاجرت و متاستاز آن گردند. بروز سرطان پروستات می تواند با افزایش سن و به علت تغییرات هورمونی نظیر افزایش تستوسترون باشد. مطالعات آندوکرینی نشان داده که کاهش آندروژنها منجر به آتروفی سلولهای سرطانی پروستات می شود (۴). تاموکسیفن با نام علمی تری فنیل اتیلن، یک آنتی استروژن غیر استروئیدی و از گروه داروهای Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) = Receptor Modulator تعدیل کننده های انتخابی گیرنده استروژن می باشد (۵). تاموکسیفن درکبد توسط سیستم سیتوکروم-P450 به متابولیت های فعال خود از جمله به ۴-هیدروکسی تاموکسیفن و N-دمتیل

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۹۳۱۲۱۲۶۶۸۰ دانشگاه علوم پزشکی همدان می باشد

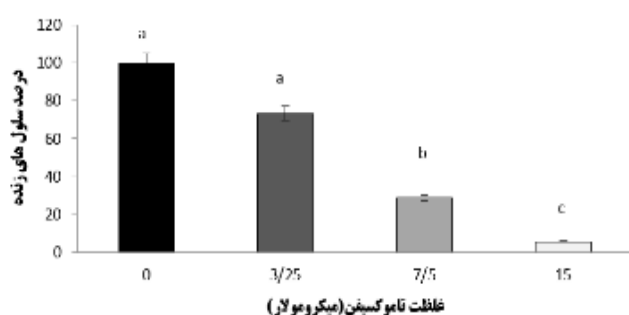
*مسئول مقاله: دکتر غلامرضا شفیعی

آدرس: همدان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی. تلفن: ۰۸۱-۳۸۳۸۰۴۶۲

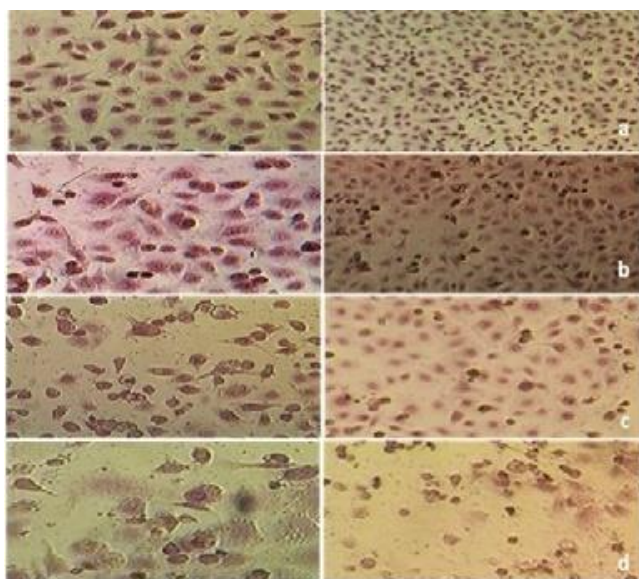
E-mail: g_r-shafiee@yahoo.com



نمودار ۲. اثر تاموکسیفن بر مهاجرت در غلظت های مختلف. قطر شمار در گروه کنترل با افزایش زمان کاهش معنی داری دارد اما این مهاجرت در گروه با دوز ۱۵ در زمان ۲۴ ساعت کاهش معنی داری نشان نمی دهد. حرف a نشانگر عدم معنی داری و حروف b و c و d وجود معنی داری $p < 0.05$ با گروه های ماقبل است.



نمودار ۳. اثرات تاموکسیفن بر میزان تشکیل کولونی در سلول های PC3. دارو در دوزهای بالا بویژه در دوز ۱۵ میکرومولار اثر مهاری بسیار معنی داری بر تشکیل کولونی دارد. حرف a نشانگر عدم معنی داری و حروف b و c وجود معنی داری $p < 0.05$ با گروه های ماقبل است.



شکل ۱. تأثیر تاموکسیفن بر مورفولوژی سلولی. گروه های کنترل، دریافت کننده ۳/۲۵، ۷/۵ و ۱۵ میکرومولار به ترتیب با حروف a، b، c و d نشان داده شده اند. با افزایش دوز هسته ها متراکم تر و سیتوپلاسم تغییر شکل داده، دچار آپتوز و متلاشی می شود.

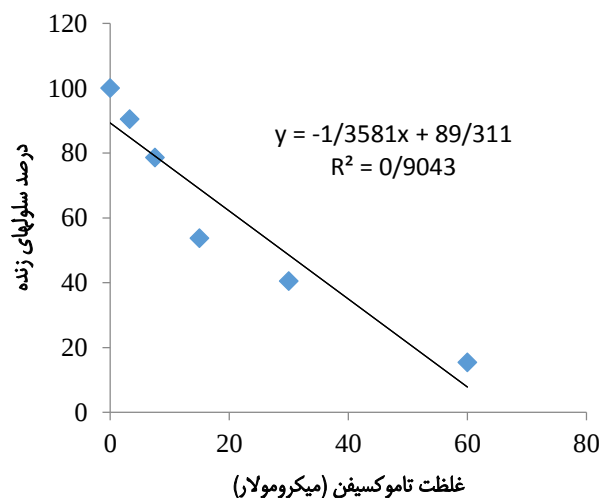
سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO اضافه و با دستگاه الیزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد (۷). برای تست مهاجرت با سر سمپلر کریستالی خراشی ایجاد و سپس دوزهای ۳/۲۵، ۷/۵ و ۱۵ میکرومولار طی ۰، ۶ و ۱۲ ساعت تیمار و با گیمسا رنگ آمیزی گردید (۸). بدلیل کندی شدن سلول ها از دوزهای پایین تر استفاده شد. برای بررسی مورفولوژی به سلول ها، غلظت های ۰، ۳/۲۵، ۷/۵ و ۱۵ میکرومولار بمدت ۲۴ ساعت تیمار و پس از رنگ آمیزی با میکروسکوپ بررسی گردید (۹). در تست کولونی زایی تعداد ۱۰۰ سلول در پلیت های ۶ خانه ای که سبب کولونی های فاصله دار می شدند، کشت یافت و با غلظت های ۰، ۳/۲۵، ۷/۵ و ۱۵ میکرومولار تیمار و با کریستال ویوله ۰/۵ درصد با متانول به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق فیکس و رنگ آمیزی شدند (۱۰).

آزمون های آماری: تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SPSS 16 (Chicago-USA) و مقایسه بین گروه ها با آزمون One Way ANOVA و آزمون Tukey انجام شد و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج نشان داد که در مدت زمان ۲۴ ساعت میزان تکثیر سلولی در تمام گروه های تیماری با ضریب رگرسیون ۰/۹۰ کاهش پیدا کرده است (نمودار ۱). مهاجرت سلولی اختلاف معنی داری را میان گروه های تیمار شده با دوز ۱۵ میکرومولار نشان داد. به گونه ای که در زمان ۲۴ ساعت و دوز ۱۵ میکرومولار مهاجرت با قطر شمار ۱/۵±۲۷۸ میکرومتر نسبت به ۰/۹±۸۹/۶۸ میکرومتر کنترل ($p < 0.01$) کاهش معنی داری پیدا کرد (نمودار ۲).

توانایی کولونی زایی سلول های سرطانی اختلاف معنی داری را میان تمام گروه های تیمار شده نشان داد به گونه ای که در دوز ۱۵ میکرومولار، باعث مهار تکثیر با $7/3 \pm 0/6$ کلونی نسبت به ۱۰۰ کلونی کنترل شد ($p \leq 0.05$) (نمودار ۳). هسته ها در گروه کنترل طبیعی بوده ولی در گروه های دریافت کننده تاموکسیفن با افزایش دوز هسته ها متورم و نیز سیتوپلاسم متراکم و سلول چروکیده گردید (شکل ۱).



نمودار ۱. اثر تاموکسیفن بر بقای سلولی طی ۲۴ ساعت. نمودار نقطه ای با معادله خط و رگرسیون آورده شده است.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه نشان داده شد که تاموکسیفن دارای اثرات وابسته به دوز سمی و ضد تکثیری معنی داری بر روی سلول های سرطانی پروستات است. به گونه ای که مشابه نتایج ما، Norris و همکاران دریافتند تاموکسیفن قادر است اثر توکسیک از طریق فرآیندهای مهار فاکتور رشد $TGF\beta$ انجام دهد (۱۱). تاموکسیفن مشابه $TGF\beta$ با مهار فعالیت پروتئین کیناز c (PKC) و افزایش P21 سبب مهار رشد و پرولیفراسیون سرطان پروستات می شود (۱۲).

همچنین مطالعه Kalachaveedu و همکاران نشان داد که رالوکسیفن مشابه تاموکسیفن با افزایش کاسپاز-۹ سبب القای آپوپتوز در سلولهای سرطان پستان می شود (۱۳). نتایج ما نشان داد که در گروه های تیمار شده هسته ها بصورت بیضوی شده و سیتوپلاسم متراکم و سلول چروکیده می شود که نشان از بروز آپوپتوز داشت و هم راستا با یافته های دیگران می باشد. تاموکسیفن می تواند از طریق مهار PKC، افزایش P21 و توقف چرخه سلولی در فاز G1/S سبب مهار رشد سلولهای سرطان پستان گردد (۱۴). با توجه به نقش مهاجرت سلولی و متاستاز در سرطانها، مهار این مسیرها بسیار حائز اهمیت است که نتایج مربوط به مهاجرت نشان داد مشابه مطالعات دیگر تاموکسیفن قادر است میزان و قدرت مهاجرت سلول های سرطانی را در گروه های تیمار شده بطور معنی داری کاهش دهد (۱۵). مطالعه Koka و همکاران نشان داد که مسیرهای MAPK و AKT نقش مهمی در تنظیم مهاجرت سلولی دارند (۱۶). اثرات مهاری تاموکسیفن بر روی سرطانهای دیگر نظیر کولون و ریه نیز اثرات بالقوه مهاری آنها با سرکوب مسیرهای سیگنالینگ AKT/ERK1/2 تایید می کند (۱۷). مشخص شده است که آنتاگونیست های

گیرنده آندروژنی باعث کاهش اثرات آندروژن ها و مهار پیشرفت پروستات می گردند (۱۸) و یا داروهای آنالوگ هورمون آزاد کننده هورمون لوتئینه کننده (LHRH) مقدار تستوسترون را کاهش می دهند (۱۹). بنابراین بنظر میرسد تاموکسیفن همچنانکه با مهار گیرنده های استروژنی $ER\alpha$ سبب مهار پیشرفت سرطان پستان می گردد (۲۰)، با اتصال آنتاگونیستی به گیرنده های آندروژنی سبب مهار این گیرنده ها و کاهش مسیرهای سیگنالینگ رشد سرطان پروستات ناشی از تستوسترون میگردد. دیده شده است که تاموکسیفن علاوه بر اثرات ضدسرطانی می تواند با کاهش میزان کلسترول، لیوپروتئین LDL سبب کاهش استعداد ابتلا به بیماریهای قلبی-عروقی شود (۲۱). اثرات مفید تاموکسیفن بر بافت استخوان و درمان بیماریهای مرتبط با این بافت نیز ثابت شده است (۲۲). همچنین مشاهده شده است که ترکیبات گیاهی با اثری مشابه تاموکسیفن، نظیر جنیستین مشتق از سویا نیز اثرات ضد سرطانی بر سرطان های کولون و معده دارند (۲۳).

بنظر می رسد تاموکسیفن نیز بعنوان یک آنالوگ آندروژن می تواند در مسیرهای مختلف نقش مهاری را ایفا کند. با توجه به نتایج حاصل، تاموکسیفن دارای اثرات مهاری معنی داری بر روی سلول PC3 پروستات می باشد و می تواند گزینه مناسبی برای بهبود سرطان باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان جهت حمایت از این تحقیق، تقدیر و تشکر می گردد.

In Vitro Evaluation of the Effects of Tamoxifen on Prostate Cancer Cells

I. Khodadadi (PhD)¹, R. Abadalipourkabir (PhD)¹, Gh. Shafiee (PhD)^{*1}

1.Department of Clinical Biochemistry, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 20(11); Nov 2018; PP: 13-18

Received: Mar 16th 2018, Revised: Sep 5th 2018, Accepted: Sep 29th 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Considering the high prevalence of prostate cancer and the effect of androgens on its progression, this study was conducted to investigate the inhibitory effects of tamoxifen as an anti-androgen on prostate cancer.

METHODS: In this experimental study, the human cell line (PC3) was purchased from the Pasteur Institute. The effect of tamoxifen at concentrations of 0, 3.25, 7.5, 15, 30 and 60 μ M on cells was evaluated, and the tests of viability, migration, colonization and cell morphological changes were respectively performed using MTT, wound healing, colonization, and giemsa staining methods.

FINDINGS: IC50 dosage of tamoxifen of 15 μ M with a regression coefficient of 0.90 was obtained within 24 hours. The results showed that tamoxifen significantly inhibited proliferation with 7.3 ± 0.6 colonies compared with 100 colonies of control ($p < 0.03$) and migration with 278.4 ± 1.5 μ m groove diameter compared with 89.68 ± 0.9 μ m of control ($p < 0.01$) at the dose of 15 μ M. Treatment of cells with a dose of 15 μ M also causes changes in the nucleus and cytoplasm and causes apoptosis in comparison with the control group.

CONCLUSION: The results of this study showed that tamoxifen has significant inhibitory effects on PC3 prostate cell and can be considered as an appropriate way for the treatment of prostate cancer.

KEY WORDS: Prostate Cancer, Tamoxifen, Cell Migration, Cell Proliferation.

Please cite this article as follows:

Khodadadi I, Abadalipourkabir R, Shafiee Gh. In Vitro Evaluation of the Effects of Tamoxifen on Prostate Cancer Cells. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(11):13-18.

*Corresponding Author: Gh. Shafiee (PhD)

Address: Department of Clinical Biochemistry, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, I.R.Iran

Tel: +98 81 38380462

E-mail: g_r_shafiee@yahoo.com

References

1. Umar A, Dunn BK, Greenwald P. Future directions in cancer prevention. *Nature Rev Cancer*. 2012; 12:835-48.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013;63(1):11-30.
3. Mahmoud AM, Yang W, Bosland MC. Soy isoflavones and prostate cancer: a review of molecular mechanisms. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014; 140:116-32.
4. Dobbs RW, Malhotra NR, Greenwald DT, Wang AY, Prins GS, Abern MR. Estrogens and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2018; doi: 10.1038/s41391-018-0081-6.
5. Skaar TC, Desta Z. CYP2D6 and Endoxifen in Tamoxifen Therapy: A Tribute to David A. Flockhart. *Clin Pharmacol Ther*. 2018; 103(5):755-7.
6. Park J, Thomas S, Zhong AY, Wolfe AR, Krings G, Terranova-Barberio M, et al. Local delivery of hormonal therapy with silastic tubing for prevention and treatment of breast cancer. *Sci Rep*. 2018;92(8).
7. Zhang Z, Jin F, Lian X, Li M, Wang G, Lan B, et al. Genistein promotes ionizing radiation-induced cell death by reducing cytoplasmic Bcl-xL levels in non-small cell lung cancer. *Sci Rep*. 2018;328(8).
8. Menéndez-Menéndez Y, Otero-Hernández J, Vega JA, Pérez-Basterrechea M, Pérez-López S, Álvarez-Viejo M, et al. The role of bone marrow mononuclear cell-conditioned medium in the proliferation and migration of human dermal fibroblasts. *Cell Mol Biol Lett*. 2017; 22: 29.
9. Al-Sheddi ES, Farshori NN, Al-Oqail MM, Musarrat J, Al-Khedhairi AA, Siddiqui MA. Cytotoxicity of *Nigella sativa* seed oil and extract against human lung cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(2):983-7.
10. Yadollahpour A, Rezaee Z, Bayati V, Tahmasebi Birgani MJ, Negad Dehbashi F. Radiotherapy Enhancement with Electroporation in Human Intestinal Colon Cancer HT-29 Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018; 19(5): 1259-62.
11. Norris JD, Ellison SJ, Baker JG, Stagg DB, Wardell SE, Park S, et al. Androgen receptor antagonism drives cytochrome P450 17A1 inhibitor efficacy in prostate cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(6):2326-38.
12. Bekele RT, Venkatraman G, Liu RZ, Tang X, Mi S, Benesch MG, et al. Oxidative stress contributes to the tamoxifen-induced killing of breast cancer cells: implications for tamoxifen therapy and resistance. *Sci Rep*. 2016;6:21164.
13. Kalachaveedu M, Raghavan D, Telapolu S, Kuruvilla S, Kedike B. Phytoestrogenic effect of *Inula racemosa* Hook f–A cardioprotective root drug in traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology*. 2018;210:408-16.
14. Shafiee G, Saidijam M, Tavailani H, Ghasemkhani N, Khodadadi I. Genistein induces apoptosis and inhibits proliferation of HT29 colon cancer cells. *International journal of molecular and cellular medicine*. 2016;5(3):178.
15. Khodadadi I, Ghasemkhani N, Shafiee G. Inhibition of gastric cancer cell growth and proliferation by genistein. *J Zanzan Univ Med Sci Health Serv*. 2018;26 (116):88-99.
16. Koka PS, Mondal D, Schultz M, Abdel-Mageed AB, Agrawal KC. Studies on molecular mechanisms of growth inhibitory effects of thymoquinone against prostate cancer cells: role of reactive oxygen species. *Exp Biol Med*. 2010; 235(6):751-60.
17. Meng X, Vander Ark A, Daft P, Woodford E, Wang J, Madaj Z, et al. Loss of TGF- β signaling in osteoblasts increases basic-FGF and promotes prostate cancer bone metastasis. *Cancer Lett*. 2018;418:109-18.
18. Soares DF, Rhoden EL, Morgentaler A. Testosterone Therapy and Prostate Cancer. Springer, Cham; 2017. p.285-97.
19. Sundararajan V, Chen S, Rosengren R. Raloxifene: Promises and challenges as a drug treatment for castrate resistant prostate cancer. *Environ Toxicol Allied Clin Pharmacol*. 2017;4(1):001.
20. Bostner J, Alayev A, Berman AY, Fornander T, Nordenskjöld B, Holz MK, et al. Raptor localization predicts prognosis and tamoxifen response in estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;168(1):17-27.

21. Schwartz AL, Dickerson E, Dagia N, Malgor R, McCall KD. TLR signaling inhibitor, phenylmethimazole, in combination with tamoxifen inhibits human breast cancer cell viability and migration. *Oncotarget*. 2017; 8(69):113295-302.
22. Zhou Q, Chen J, Feng J, Xu Y, Zheng W, Wang J. SOSTDC1 inhibits follicular thyroid cancer cell proliferation, migration, and EMT via suppressing PI3K/Akt and MAPK/Erk signaling pathways. *Mol Cell Biochem*. 2017;435(1-2):87-95.
23. Stramucci L, Pranteda A, Bossi G. Insights of Crosstalk between p53 Protein and the MKK3/MKK6/p38 MAPK Signaling Pathway in Cancer. *Cancers (Basei)*. 2018;10(5):131.