مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل

دوره بیستم، شمارهٔ ۱۱، آبان ۱۳۹۷، صفحه ۱۸-۱۳

تأثیر تاموکسیفن بر سلول های سرطانی پروستات در محیط آزمایشگاه

ایرج خدادادی (PhD)[۱]، رقیه عباسعلی پورکبیره (PhD)[۱]، غلامرضا شفیعی (PhD)[۱*]

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 تاثیر آندروژن ها در پیشرفت آن، این مطالعه به منظور بررسی اثرات مهاری تاموکسیفن بعنوان یک آنتی آندروژن، بر سرطان پروستات انجام شده است.

مواد و روش‌ها: 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.

یافته‌ها: 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 با۷/۳±۰/۶ کلونی نسبت به ۱۰۰ کلونی کنترل (p<۰/۰۳) و مهاجرت با قطر شیار۲۷۸/۴±۱/۵میکرومتر نسبت به ۸۹/۶۸±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.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که تاموکسیفن دارای اثرات مهاری 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.

واژه‌های کلیدی: سرطان پروستات، تاموکسیفن، مهاجرت سلولی، تکثیر سلولی.

مقدمه

امروزه سرطان دومین عامل مرگ و میر پس از بیماریهای قلب و عروق شناخته شده است(۱). درکشوهای 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 سلول‌ها، تقویت آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌باشد 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 تستوسترسترون باشد. مطالعات آندوکرینی نشان داده که کاهش آندروژنها منجر به آتروفی سلولهای سرطانی پروستات می‌شود(۴). تاموکسیفن با نام علمی تری فنیل اتیلن، یک آنتی استروژن غیر استروئیدی و از گروه داروهای Selective Estrogen) Receptor Modulator =SERM) 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-دزمتیل 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 وDMSO از شرکت سیگما (Sigma, Steinheim-Germany) و محیط RPMI۱۶۴۰، FBS، پنی سیلین-استرپتومایسین و تریپسین-EDTA از شرکت Gibco (Gibco, Life Technologies-USA) خریداری گردید.

روش ها: ابتدا جهت تعیین IC50 با روش MTT ۱۰۴سلول در پلیت‌های ۹۶ خانه در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت داده شد. سلول‌ها با ۵۰ میکرولیتر با دوزهای مختلف (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،

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

*مسئول مقاله: دکتر غلامرضا شفیعی

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

E-mail: g.r_shafiee@yahoo.com

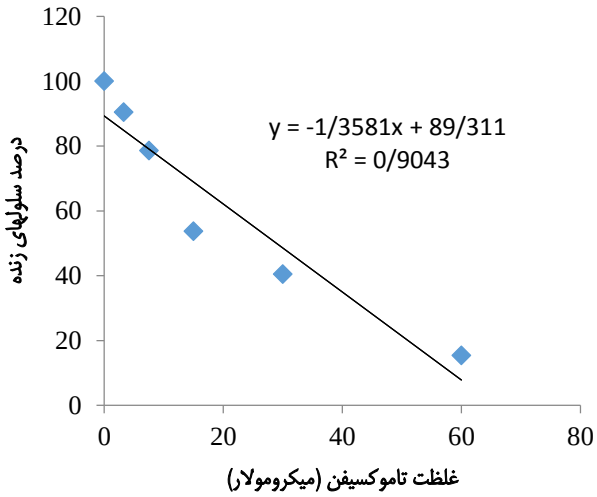
سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO اضافه و با دستگاه الایزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد(۷). برای تست مهاجرت با سر سمپلر کریستالی خراشی ایجاد و سپس دوزهای ۳/۲۵ ، ۷/۵ و ۱۵ میکرومولار طی ۰ و ۶ و ۱۲ ساعت تیمار و با گیمسا رنگ آمیزی گردید(۸). بدلیل کنده شدن سلول ها از دوزهای پایین‌تر استفاده شد. برای بررسی 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 پلیت‌های ۶ خانه‌ای 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).

آزمون‌های آماری: تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SPSS 16 (Chicago-USA) و مقایسه بین گروهها با آزمون One Way ANOVA و آزمون Tukey انجام شد و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

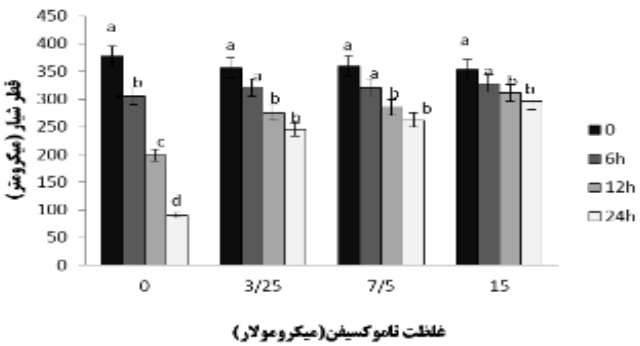
یافته ها

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(نمودار۱). مهاجرت سلولی اختلاف معنی داری را میان گروههای تیمار شده با دوز ۱۵ میکرومولار نشان داد. به گونه ای که در زمان ۲۴ ساعت و دوز ۱۵ میکرومولار مهاجرت با قطر شیار۱/۵±۲۷۸/۴میکرومتر نسبت به ۰/۹±۸۹/۶۸ میکرومتر کنترل($p<0/01$) کاهش معنی داری پیدا کرد(نمودار ۲).

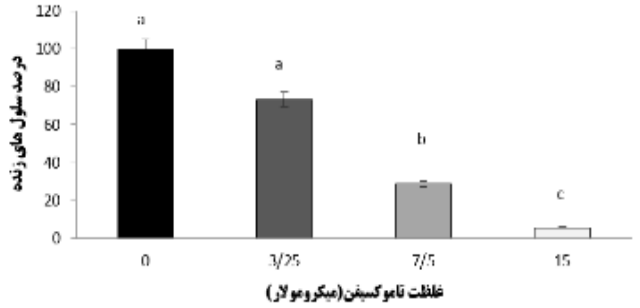
توانایی کولونی زایی سلول های سرطانی اختلاف معنی داری را میان تمام گروههای تیمار شده نشان داد به گونه ای که در دوز ۱۵ میکرومولار، باعث مهار تکثیر با ۰/۶±۷/۳ کلونی نسبت به ۱۰۰ کلونی کنترل شد($p\leq0/05$)(نمودار ۳). هسته ها در گروه کنترل طبیعی بوده ولی در گروه های دریافت کننده تاموکسیفن با افزایش دوز هسته ها متورم و نیز سیتوپلاسم متراکم و سلول چروکیده گردید(شکل ۱).



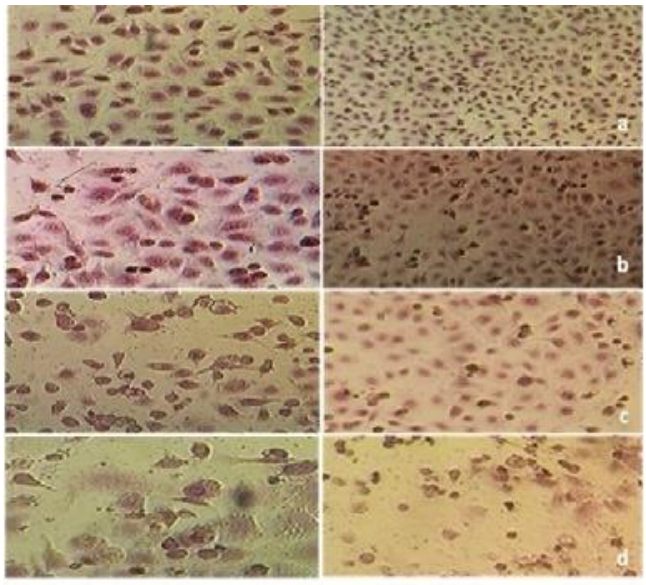
نمودار ۱. اثرتاموکسیفن بر بقای سلولی طی ۲۴ ساعت. نمودار نقطه ای با معادله خط و رگرسیون آورده شده است.



نمودار ۲. اثر تاموکسیفن بر مهاجرت در غلظت های مختلف. قطر شیار 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 نشانگرعدم معنی داری و حروف b و c و d وجود معنی داری $p<0/05$ با گروههای 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 معنی‌داری بر تشکیل کولونی دارد حرف a نشانگرعدم معنی داری و حروف b و c وجود معنی‌داری $p<0/05$ با گروههای ماقبل است.



شکل ۱. تاثیر 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 هسته‌ها متراکم تر و سیتوپلاسم تغییر شکل داده، دچار آپوپتوز و متلاشی می شود.

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 قادراست اثر توکسیک از طریق فرآیندهای مهار فاکتور رشد TGFβ انجام دهد(۱۱). تاموکسیفن مشابه TGFβ 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 آنرا با سرکوب مسیرهای سیگنالینگ AKT/ERK1/2 تایید می کند(۱۷). مشخص شده است که آنتاگونیست های گیرنده آندروژنی باعث کاهش اثرات آندروژن‌ها و مهار پیشرفت پروستات می‌گردند (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 ERα 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، لیپوپروتئین 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 جنیستئین مشتق از سویا نیز اثرات ضد سرطانی بر سرطان های کولون و معده دارند (۲۳).

بنظر می‌رسد 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 می‌گردد.

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 Scinces, 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 µM 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 µM 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 µm groove diameter compared with 89.68 ± 0.9 µm of control ($p<0.01$) at the dose of 15 µM. Treatment of cells with a dose of 15 µM 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.

***Corresonding Author: Gh. Shafiee (PhD)**
Address: Department of Clinical Biochemistry, Hamedan University of Medical Scinces, 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-Khedhairy 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, Tavilani 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 Zanjan 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. Enliven: 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.