

## مکانیسم آپوپتوز ناشی از تاموکسیفن در رده سلولی MDA-MB468 با منشاء ادنوکارسینوم ارتشاحی سینه: نقش پروتئین های کاسپاز-۳، Bcl-2 و Bax

\*دکتر فاطمه کرمی تهرانی، سیامک سلامی، \*\*دکتر فرزانه اوسطی آشتیانی

\* گروه بیوشیمی بالینی، آزمایشگاه بیوشیمی سرطان، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

\*\* گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ایران

### خلاصه

در سالهای اخیر گزارش شده است که داروی تاموکسیفن اثرات درمانی در سرطان های فاقد گیرنده استروژن نشان می دهد. از این رو مطالعه حاضر جهت بررسی مکانیسم آپوپتوز ناشی از تاموکسیفن در سلولهای سرطان سینه فاقد گیرنده استروژن، MDA-MB468، طراحی و اجرا شده است. در این مطالعه تکثیر سلولی و سیتوتوکسیسیته با روش شمارش سلولی با لام هماسیتومتر و رنگ آمیزی اکریدین اورنج ارزیابی شده است. آپوپتوز با روش فلوسایتومتری و با استفاده از ترکیب دو رنگ AnnexinV-PI بررسی شده است. از میکروسکوپ فلورسنت نیز برای اثبات نتایج فلوسایتومتری و تمایز مورفولوژی سلولهای آپوپتوزی دیررس از سلولهای نکروزه استفاده شده است. سنجش افزایش میزان کاسپاز ۳ فعال شده به روش رنگ سنجی و مقدار پروتئین Bcl-2 و Bax سلولها نیز با روش وسترن ایمنوبلاتینگ انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که تاموکسیفن در دوز ۲۰ میکرو مولار سبب القای وابسته به دوز و زمان آپوپتوز می شود (تست  $X^2$ ،  $P < 0/05$ ). میزان آنزیم کاسپاز ۳ فعال در سلولهای تیمار شده نیز به صورت وابسته به دوز - زمان افزایش می یابد (تست  $X^2$ ،  $P < 0/05$ ). پیش تیمار سلولها با مهارکننده اختصاصی کاسپاز-۳ سبب مهار آپوپتوز ناشی از تاموکسیفن در این سلولها شده و نشانگر وابستگی این فرآیند به فعال شدن آنزیم کاسپاز-۳ دارد. مقدار پروتئین های آپوپتوزی Bcl-2 و Bax در سلولهای تیمار شده تغییر معنی داری نسبت به سلولهای شاهد نشان ندادند. با توجه به نتایج حاصله، تاموکسیفن به دلیل امکان القای آپوپتوز وابسته به کاسپاز-۳ می تواند به عنوان ترکیب موثری علیه سلولهای سرطانی فاقد گیرنده نیز به کار گرفته شود.

کلمات کلیدی: آپوپتوز، پروتئین های Bcl-2 و Bax، تاموکسیفن، رده سلولی MDA-MB468، کاسپاز-۳.

### مقدمه

استروژنی تاموکسیفن در سلولهای سرطانی سینه که به واسطه گیرنده استروژن (ER) انجام می شود، سبب هر دو نوع آثار سیتواستاتیک (توقف رشد سلولها) و سیتوتوکسیک (مرگ سلولی و کوچک شدن حجم تومور) می گردد (۲۷). از سوی دیگر نیز در سالهای اخیر آثار درمانی مفیدی از کاربرد تاموکسیفن در درمان سرطان های غیر بافت سینه مانند سرطان سلولهای کبدی، تخمدان و پانکراس که فاقد گیرنده استروژن می باشند، گزارش شده است (۲۴،۸،۳). یکی از راههایی که داروهای ضد سرطان سبب بروز آثار درمانی و مرگ این سلولها می شوند، عبارت از القای آپوپتوز

در سالهای اخیر علی رغم افزایش شیوع سرطان سینه، مرگ و میر ناشی از این سرطان کاهش ۲۵ درصدی نشان می دهد که بی شک شیمی درمانی و همچنین کاربرد تاموکسیفن در درمان کمکی (adjuvant) نقش به سزایی در این پدیده داشته است (۲۱). تاموکسیفن که از سال ۱۹۷۱ میلادی در عرصه درمان سرطان سینه وارد شده است، اکنون به عنوان انتخاب اول در درمان موارد سرطان سینه دارای گیرنده استروژن به شمار رفته و حتی به عنوان دارویی جهت پیشگیری شیمیایی (chemoprevention) نیز پذیرفته شده است (۲۸). همان گونه که ما در مطالعات قبلی نیز نشان داده ایم، اثرات آنتی

## مواد و روش کار

### کشت سلولهای MDA-MB 468

این سلولها از بانک سلولی جمهوری اسلامی ایران خریداری شده و منشاء آنها آدنوکارسینوم ارتشاحی بافت پستان است. این سلولها فاقد گیرنده استروژن بوده و به رشد در محیط کشت RPMI 1640 سازش یافته اند. سلولها در محیط کشت مذکور که حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله، ۱۰۰ u/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین می باشد، کشت داده شده و در آنکوباتور (Memert, Germany) با رطوبت ۹۰٪، CO<sub>2</sub> ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری می شدند. کشتها به صورت روزانه به وسیله میکروسکوپ معکوس (Micros, Austria) از نظر مورفولوژی سلولها، آلودگی و تراکم رشد بررسی و در صورت نیاز کشت مجدد می شدند.

### تیمار سلولها با تاموکسیفن

ماده تاموکسیفن سیترات از سوی کارخانه داروسازی ایران هورمون هدیه شده بود. غلظت ۱ میلی مولار از این دارو به عنوان ذخیره در اتانول مطلق تهیه و در ۲۰-درجه سانتیگراد نگهداری می شد. جهت تیمار سلولها با تاموکسیفن، ابتدا آنها را در پلیت های کشت ۲۴ چاهکی با غلظت ۱۰<sup>۵</sup> سلول در هر چاهک کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت آنکوبه شد تا سلولها به پلیت متصل شده و از فاز تاخیری خارج شوند. غلظتهای مختلف تاموکسیفن بین ۰/۵ تا ۲۰ میکرومولار برای زمانهای ۶ تا ۴۸ ساعت در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است. در هر تیمار، چاهک شاهد دارویی دریافت نکرده است و برای هر غلظت از دارو چاهک کنترل اثر حلال (اتانول) نیز در نظر گرفته شده است. با این حال غلظت اتانول از ۰/۲٪ فراتر نرفته است.

بررسی رشد سلولی و سیتوتوکسیسیته تاموکسیفن منحنی رشد سلولی با استفاده از شمارش تام سلولی در زمانهای مورد بررسی به دست آمده است. مرگ سلولی ناشی از تاموکسیفن در دوز - زمان های مختلف نیز به روش رنگ آمیزی با آکریدین اورنج و بررسی با میکروسکوپ

است (۲۳). محققین متعددی گزارش نموده اند که تاموکسیفن چنین اثرات درمانی خود را حداقل در بخشی به واسطه القای آپوپتوز ایجاد می نماید (۷،۲). اگرچه سی سال از معرفی آپوپتوز می گذرد (۱۶) اما تنها در سالهای اخیر امکان درک مکانیسم های بنیادی این فرآیند پیچیده مقدور شده است. به رغم کثرت عوامل دخیل در فرآیند آپوپتوز، می توان مهمترین عناصر کلیدی آن را به دو گروه محدود نمود که شامل کاسپازها و خانواده پروتئین های Bcl-2 می شود (۲۵). کاسپازها آنزیم های پروتولیتیکی حاوی رزیدیوی سیستمی بوده در سوپسترای خود رزیدیوی آسپاراتات را در توالی خاص شناسایی می نمایند. تاکنون دست کم ۱۵ نوع از آنها شناسایی شده است (۱). این کاسپازها به صورت آبشاری عمل کرده و مهمترین عضو این گروه از آنزیم ها که در بخش فرودست سبب اجرای آپوپتوز می گردد، آنزیم کاسپاز-۳ است (۲۶). وابستگی آپوپتوز به فعال شدن کاسپاز-۳ از مهمترین زمینه های تحقیقات محسوب می شود (۱۵). دسته دوم از مهمترین عوامل فرآیند آپوپتوز پروتئین های خانواده Bcl-2 می باشند که به دو گروه عمده پروتئین های آنتی آپوپتوزی (به سرگروهی Bcl-2) و پروتئین های پروآپوپتوزی (به سرگروهی Bax) تقسیم می شوند (۱۸). این پروتئین ها به صورت رئوستایی عمل نموده و با تشکیل همو یا هترودیر با یکدیگر سبب پیشرفت یا مهار آپوپتوز می شوند و مسیر میتوکندریایی آپوپتوز عمدتاً به طریق این پروتئین ها فعال می شود (۶). این پروتئین ها در فرآدمت سیستم کاسپازی قرار می گیرند (۴). بر مبنای چنین وضعیتی، برای درک بهتر مکانیسم اثر تاموکسیفن در سلولهای فاقد گیرنده استروژن و از این رو توسعه امکان کاربرد درمانی این دارو، مطالعه حاضر به بررسی توانایی تاموکسیفن در القای آپوپتوز در نزدیکترین مدل سلولهای سرطان سینه فاقد گیرنده استروژن نسبت به شایعترین فرم سرطان سینه، یعنی رده سلولی MDA-MB468، و نقش فعال شدن کاسپاز ۳ و تغییر مقدار پروتئین های Bcl-2 و Bax در مکانیسم این فرآیند پرداخته است.

فلورسین AnnexinV و قرمز PI را به خود می گیرند. تمایز این دو نوع سلول با توجه به مورفولوژی سلولی به راحتی امکان پذیر است. از رنگ آمیزی با رنگ هوست ۳۳۲۵۸ نیز برای اثبات مورفولوژی هسته ای ویژه آپوپتوز که عبارت از مورفولوژی دانه تسیبی (bead like) ناشی از فراگماتاسیون DNA می باشد، استفاده شده است.

### سنجش کاسپاز-۳ فعال

جهت سنجش افزایش میزان کاسپاز ۳ فعال شده، ابتدا سلولها را با دانسیته  $10^6$  را در هر چاهک کشت داده و با تاموکسیفن تیمار شد. سلولهای تیمار شده با دوزهای مختلف تاموکسیفن در زمانهای مورد نظر با بافر لیز مخصوص لیز شده و ۵۰ میکرولیتر (معادل ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکروگرم پروتئین) از مایع رویی حاصل از ترسیب لیزات با سانتریفوژ (با شتاب ۱۰۰۰۰g، در مدت ۱ دقیقه) را در پلیت ۹۶ خانه ریخته و واکنش آنزیمی مطابق دستورالعمل کیت (R&D Systems, USA) انجام گردید. روش عمل دارای دو چاهک کنترل است که در یکی لیزات سلولی و در دیگری سوبسترا اضافه نمی شود. نتایج بر اساس ضریب (fold) افزایش فعالیت کاسپاز ۳ نسبت به میزان فعالیت در سلولهای شاهد تیمار نشده بیان شده است.

### سنجش آپوپتوز به دنبال پیش تیمار سلولها با مهار کننده کاسپاز-۳

در این روش ابتدا سلولها با غلظت ۱۰۰ میکرومولار مهارکننده اختصاصی کاسپاز-۳، z-DEVD-FMK (R&D Systems, USA)، به مدت یک ساعت پیش تیمار شده و سپس تیمار اصلی با دوز القا کننده آپوپتوز انجام می شد. آنگاه نتایج به طریق فلوسایتومتری آنالیز می گشت. این مهارکننده به دلیل وجود گروه بنزیل اکسی کربونیل (BOC یا Z) در انتهای آمینی و زنجیره های جانبی O-متیل قادر به عبور از غشای سلولی بدون ایجاد آسیب در آن است. پپتیدهای دارای گروه فلورومتیل کتون (FMK) مهارکننده غیر قابل برگشت بسیار قوی بوده ولی سبب اثرات سیتوتوکسیک نمی شود.

فلوروسنت (Micros, Austria) انجام شده است. سلولهای مرده به سلولهای اطلاق می شد که هسته این سلولها به دلیل امکان ورود رنگ به درون سلول رنگ سبز درخشانی را ساطع می ساختند (تصویر ۱). این روش نسبت به رنگ آمیزی رایج تریپان بلو حساسیت بالاتری دارد.

**بررسی فلوسایتومتری آپوپتوز:** جهت تشخیص سلولهای زنده از سلولهای آپوپتوزی (اولیه و دیررس) و سلولهای نکروزی از رنگ آمیزی دوگانه AnnexinV-FLUOS و پروپیدیوم ایداید (PI) استفاده گردید (Roche, Germany). به روش دستورالعمل کیت عمل نموده و سلولهای تیمار شده با دوزهای مختلف تاموکسیفن را در زمانهای مورد نظر ترپسینه کرده و با بافر فسفات - سالین استریل شستشو داده شد. رسوب حاصل از سانتریفوژ (با شتاب ۲۰۰g، در مدت ۵ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتیگراد) را در ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ آمیزی سوسپانسیون نموده و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شد. در نهایت، سوسپانسیون سلولی با استفاده از فلوسایتومتر مدل FACSCalibur (Becton & Dickinson, USA) با استفاده از طول موج تحریک ۴۸۸ نانومتر و فیلتر قرائت ۵۱۵ نانومتر (FL-1) برای تعیین فلوروسین و فیلتر ۶۰۰ نانومتر برای PI (FL-2) آنالیز شد. خروجی دستگاه با استفاده از نرم افزار مربوطه آنالیز گردید.

بررسی به طریق میکروسکوپ فلوروسنت: به جهت تأیید نتایج فلوسایتومتری و همچنین امکان تشخیص و تمایز بین سلولهای آپوپتوزی دیررس و نکروزی از تکنیک رنگ آمیزی فلوروسنت سلولهای کشت شده در لام محافظه دار (Chamber Slide) ۸ چاهکی استفاده شد. سلولها را بعد از تیمار با رنگ های AnnexinV-FLUOS و پروپیدیوم ایداید (PI) رنگ آمیزی کرده و با استفاده از میکروسکوپ اپی فلوروسنت (Micros, Austria) بررسی می شد. سلولهای زنده رنگی به خود نگرفته، سلولهای آپوپتوزی اولیه تنها رنگ سبز مربوط به فلورسین AnnexinV را نشان می دهند و سلولهای آپوپتوزی دیررس و نکروزی هر دورنگ سبز

تنها در غلظت ۲۰ میکرومولار قادر به ایجاد کاهش معنی داری در رشد سلولی گردیده است.

#### ارزیابی سیتوتوکسیسیته تاموکسیفن

همان گونه که در تصویر ۱ - ب نشان داده شده است تاموکسیفن به طریق وابسته به دوز - زمان سبب بروز سیتوتوکسیسیته در سلولهای MDA-MB 468 می گردد. دوزهای پایین تاموکسیفن ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵ میکرومولار قادر به ایجاد سیتوتوکسیسیته قابل توجهی در طی ۴۸ ساعت نمی باشند اما غلظت ۲۰ میکرومولار از تاموکسیفن قادر به ایجاد سیتوتوکسیسیته وابسته به زمان به طور معنی داری در این سلولها است (تست  $X^2$ ،  $P < 0/05$ ). سلولهای مرده که رنگ آکریدین اورنج را به هسته خود گرفته اند در تصویر ۱- ج نشان داده شده است.

#### بررسی به روش فلوسایتومتری و میکروسکوپ فلورسنت

دستگاه فلوسایتومتر با استفاده از سلولهای شاهد رنگ نشده تنظیم شده (تصویر ۲- الف) و میزان سلولهای تیمار شده که در هر یک از مربع های تعریف شده قرار می گرفتند به صورت کمی استخراج و در نمودارهای تصویر ۲ - ب و ج نشان داده شده اند. غلظت های پایین تاموکسیفن (۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵ میکرومولار) سبب القای آپوپتوز یا مهار تکثیر قابل توجهی در طی ۴۸ ساعت نمی شوند اما تاموکسیفن در غلظت ۲۰ میکرومولار قادر به القای آپوپتوز و مهار تکثیر وابسته به زمان به طور معنی داری در این سلولها می شود (تست  $X^2$ ،  $P < 0/05$ ). شدت این آپوپتوز و مهار تکثیر در ۳۶ ساعت به حداکثر می رسد. این نتایج به طریق میکروسکوپ فلورسنت نیز تایید شده است. به نحوی که در تصویر ۳- الف مشاهده می شود یک میدان میکروسکوپی به طریق میکروسکوپ نوری و فلورسنت نشان داده شده است. سلولهای زنده در تصویر فلورسنت دیده نشده و سلولهای آپوپتوزی و نکروزه از هم تمایز می یابند. هسته آپوپتوزی که به روش رنگ آمیزی هوخست ۳۳۲۵۸ رنگ شده اند، در تصویر ۳- ب نشان داده شده است.

#### روش ایمونوبلاتینگ (Western Immunoblotting)

#### برای سنجش مقدار پروتئین های Bcl-2 و Bax

سلولهای تیمار شده با تاموکسیفن به طریق خراشیدن (Scraping) جمع آوری شده و لیزات سلولی در بافر لیز حاوی ۱۰ میلی مولار Tris-HCl (pH = ۷/۴)، ۱۵۰ میلی مولار سدیم کلراید، ۵ میلی مولار EDTA (pH = ۸)، یک درصد تریتون X-100، ۰/۰۱ mg/ml آپروتینین و ۰/۰۴ mg/ml فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) تهیه می شد. حجم یکسانی از لیزات سلولی به روش SDS-PAGE الکتروفورز شده و باندهای پروتئینی به روش بلاتینگ با استفاده از دستگاه Semi dry blotter (پایپزوهش طوس) به روی ورقه نیتروسلولوز (Macherey-Nagel, Germany) منتقل می شد. محل باندهای پروتئینی و راندمان انتقال به طریق رنگ آمیزی Ponceau S بررسی می شد. محل باند مورد نظر و کنترل راندمان انتقال همچنین با استفاده از مارکر وزن ملکولی از پیش رنگ شده (Prestained MW marker) (SantaCruz, USA) نیز کنترل می شد. برای شناسایی باندهای مربوط به پروتئین های Bcl-2 و Bax از مونوکلونال آنتی بادی اولیه مونوکلونال بر علیه این پروتئین ها استفاده شد (Bax (B-9):sc-7480; Bcl-2: sc-509 Santa Cruz Co. (USA)). این آنتی بادی توسط آنتی بادی ثانویه متصل به پراکسیداز (HRP) (secondary antibody: sc-2031) شناسایی و به طریق کروموزن ۳،۳ دی آمینوبنزیدین (DAB) (DAKO, Denmark) ظاهر گردید. ورقه های ظاهر شده اسکن گردیده و به صورت نسبت Bcl2/Bax بیان شده اند.

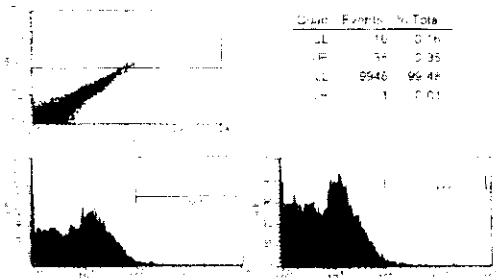
#### نتایج

#### ارزیابی رشد سلولی

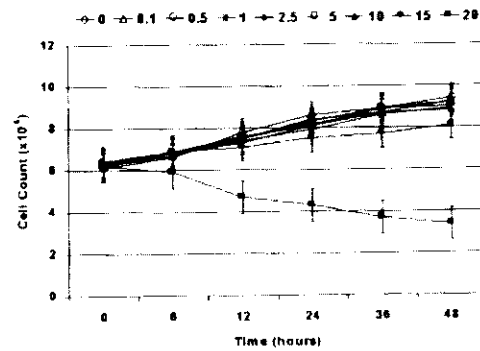
همان طور که در تصویر ۱ - الف نشان داده شده است، سلولها در چاهک کنترل در طی زمان بررسی در فاز رشد لگاریتمی قرار دارند. پاسخ رشد سلولی به دوز های مختلف تاموکسیفن نیز در این شکل مشاهده می گردد. تاموکسیفن

آپوتوز ناشی از تاموکسیفن

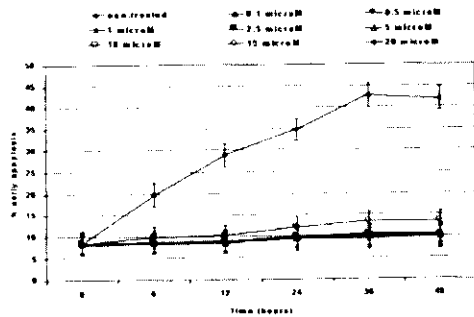
(الف)



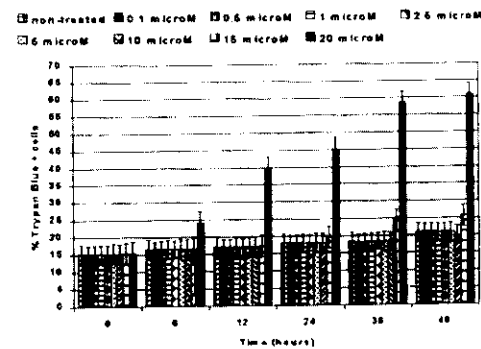
(الف)



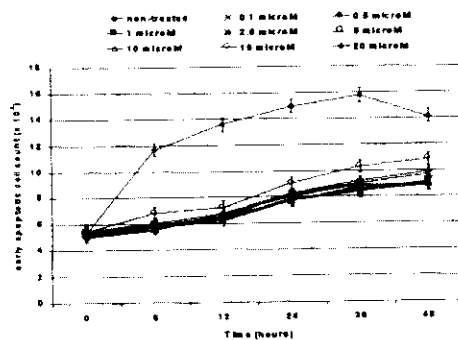
(ب)



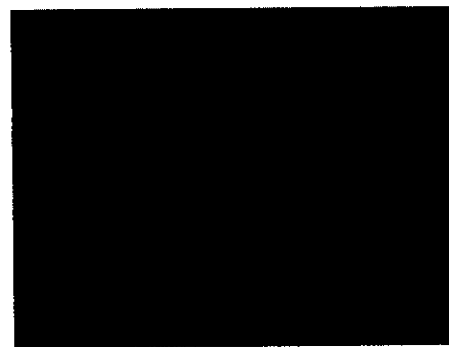
(ب)



(ج)



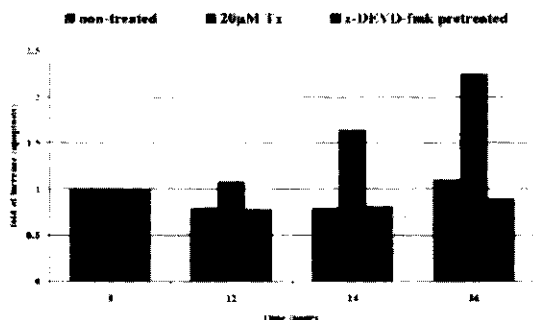
(ج)



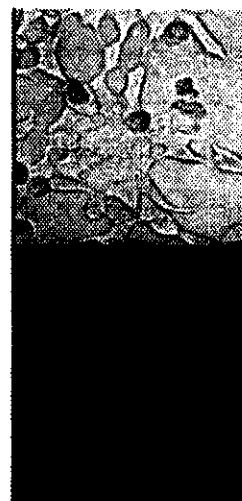
تصویر ۲: بررسی آپوتوز در سلولهای تیمار شده با غلظت های مختلف تاموکسیفن به روش فلوسایتومتری و میکروسکوپ فلورسنت. (الف) تنظیم فلوسایتومتر جهت آنالیز جمعیت های مختلف سلولی بر اساس دو کانال (AnnexinV-FLUOS) FL1-H و (PI) FL2-H (ب) درصد وقوع آپوتوز در غلظت های مختلف تاموکسیفن. تاموکسیفن تنها در غلظت ۲۰ میکرومولار قادر به القای معنی دار آپوتوز در سلولهاست و غلظت های کمتر قادر به ایجاد چنین اثری نیستند. نتایج به صورت  $\pm$  میانگین (n=3) می باشند. (ج) تعداد سلولهای آپوتوزی در غلظت های مختلف تاموکسیفن. تاموکسیفن تنها در غلظت ۲۰ میکرومولار قادر به القای معنی دار آپوتوز در سلولهاست و غلظت های کمتر قادر به ایجاد چنین اثری نیستند. نتایج به صورت  $\pm$  میانگین (n=3) می باشند.

تصویر ۱: رشد سلولهای MDA-MB468 و بروز سیتوکسیسته ناشی از تاموکسیفن. (الف) بررسی منحنی رشد سلولی ( $\pm$  میانگین ، n=3). (ب) بررسی سیتوتوکسیسته غلظت های مختلف تاموکسیفن در زمان های مختلف به روش آکریدین اورنج ( $\pm$  میانگین ، n=3). (ج) سلول مرده آکریدین اورنج مثبت

(الف)



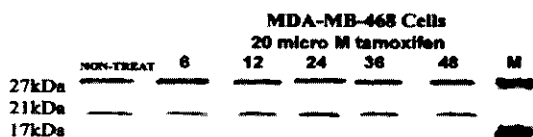
تصویر ۵: نتایج بررسی آپوپتوز ناشی از غلظت ۲۰ میکرومولار آپوپتوز در سلولهای پیش تیمار شده با مهار کننده اختصاصی کاسپاز-۳، سلولهای MDA-MB 468 به دنبال پیش تیمار با مهار کننده با مهار کننده کاسپاز-۳ قادر به اجرای آپوپتوز ناشی از غلظت ۲۰ میکرومولار تاموکسیفن نیستند. نتایج حاصل چهار بار تکرار آزمایشات است.



(ب)



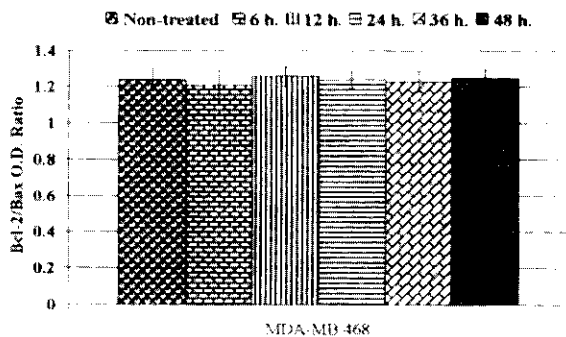
(الف)



(ب)

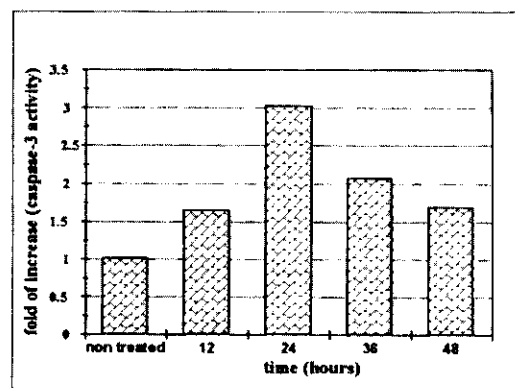
تصویر ۳: تغییرات مورفولوژی سلول و هسته در جریان آپوپتوز (الف) مقایسه یک میدان میکروسکوپی لام رنگ شده با رنگهای PI و Amexin V که با میکروسکوپ معمولی و فلورسنت نشان داده شده است.

(ب) رنگ آمیزی هسته آپوپتوزی با رنگ هوخست ۳۳۲۵۸.



تصویر ۶: نتایج بررسی تغییرات مقدار پروتئین های Bcl-2 و Bax در سلول های تیمار شده با غلظت ۲۰ میکرو مولار تاموکسیفن (الف) باند پروتئین های Bcl-2 و Bax سلول های تیمار شده با غلظت ۲۰ میکرومولار تاموکسیفن.

(ب) نمودار نسبت Bcl-2/Bax در سلول های تیمار شده با غلظت ۲۰ میکرومولار تاموکسیفن. تغییر معنی داری در غلظت باندها یا نسبت Bcl-2/Bax دیده نمی شود. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SD (n=5) می باشند.



تصویر ۸: نتایج بررسی افزایش میزان کاسپاز-۳ فعال در سلولهای تیمار شده با غلظت ۲۰ میکرومولار تاموکسیفن. میزان آنزیم کاسپاز-۳ فعال در فرآیند آپوپتوز ناشی از تاموکسیفن افزایش یافته و این افزایش در فاصله زمانی ۲۴ ساعت از زمان تیمار به حداکثر می رسد. نتایج حاصل چهار بار تکرار آزمایشات است.

می‌گردد. تاموکسیفن با بیش از ۳۰ سال قدمت کاربرد در درمان کمکی سرطان سینه حاوی گیرنده استروژن (ER)، علاوه بر مکانیسم ژنومی وابسته به مسیر ER آثار غیر ژنومی غیر وابسته به ER متعددی نیز نشان می‌دهد (۱۱). یکی از این آثار نیز القای آپوپتوز است که اخیراً بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۲۰). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تاموکسیفن در غلظت ۲۰ میکرومولار سبب القای ارزشمند مرگ سلولی از نوع آپوپتوز و همچنین مهار تکثیر در زمان ۳۶ ساعت در رده سلولی MDA-MB 468 می‌گردد. غلظت‌های پائین‌تر این دارو قادر به ایجاد هیچ یک از آثار فوق نیستند. این نتایج مشابه نتایج حاصل از سلول‌های غیر پستان فاقد گیرنده استروژن نظیر T-leukaemic Jurkat cells، Ovarian A2780 cancer cells و GT1-7 cells (۸، ۱۰، ۱۴) می‌باشد. ولی نتایج حاصل از تحقیق بر روی رده‌های دیگر سلولی سرطان سینه فاقد گیرنده استروژن چون MDA-MB23 و BT-20 (۲۲) نشان داده است که این سلول‌ها حساسیت بیشتری نسبت به تاموکسیفن داشته و در دوز ۵ میکرومولار دچار آپوپتوز می‌شوند. از این رو تفاوت بین حساسیت رده‌های سلولی سرطان از یک بافت مشترک و تشابه با بعضی از رده‌های سلولی با منشاء بافتی متفاوت حکایت از این دارد که رده‌های سلولی تفاوت رفتاری قابل توجهی با یکدیگر داشته و تحقیق بر روی رده‌های سلولی مختلف می‌تواند نتایج مفیدی در کشف مکانیسم‌های عملکرد متفاوت یک داروی خاص ارائه نماید. در این تحقیق مهمترین نکته ای که در مورد انتخاب رده سلولی MDA-MB468 مورد توجه قرار گرفته است نوع هیستولوژیک منشاء این رده سلولی است چرا که این رده سلولی بر خلاف رده‌های سلولی فاقد گیرنده استروژن سرطان سینه نظیر MDA-MB23 و BT-20 که منشاء آدنوکارسینومی غیر ارتشاحی دارند، منشاء ارتشاحی (infiltrating adenocarcinoma) داشته (۲۹) و به همین دلیل نزدیکترین مدل سلولی به شایعترین فرم سرطان سینه در بین خانم‌ها محسوب می‌گردد. بر این مبنا، نتایج

### نتایج سنجش کاسپاز ۳ فعال :

نتایج این سنجش نشان داد که تیمار سلول‌های MDA-MB 468 با تاموکسیفن تنها در غلظت ۲۰ میکرومولار سبب افزایش معنی‌داری در مقدار کاسپاز ۳-فعال نسبت به سلول‌های شاهد می‌گردد (تست  $X^2$ ،  $P < 0.05$ ) که این افزایش در مدت ۲۴ ساعت به حداکثر خود می‌رسد (تصویر ۴). غلظت‌های پائین‌تر این دارو قادر به ایجاد چنین افزایشی نیستند. از نظر کینتیک سلولی حداکثر فعال شدن کاسپاز ۳- (در ۲۴ ساعت) نسبت به بروز حداکثر آپوپتوز و مهار تکثیر (۳۶ ساعت) تقدم زمانی دارد.

### نتایج سنجش اثر مهار کاسپاز ۳- در وقوع آپوپتوز

به صورتی که در تصویر ۵ نشان داده شده است وقوع آپوپتوز ناشی از تاموکسیفن با غلظت ۲۰ میکرومولار منحصراً به طریق وابسته به آنزیم کاسپاز ۳-انجام می‌شود و پیش تیمار سلول‌ها با مهارکننده کاسپاز ۳- سبب مهار کامل آپوپتوز می‌شود. از این رو می‌توان نتیجه گرفت که تاموکسیفن در غلظت ۲۰ میکرومولار سبب القای آپوپتوز وابسته به کاسپاز ۳- در سلول‌های MDA-MB 468 می‌گردد.

### نتایج بررسی تاثیر تاموکسیفن بر بیان پروتئین‌های Bax و Bcl-2

جهت ارزیابی اثر تاموکسیفن بر بیان این پروتئین‌ها، از غلظت ۲۰ میکرومولار تاموکسیفن برای فواصل زمانی ۶ الی ۴۸ ساعت استفاده شده است نتایج وسترن ایمنوبلاستینگ (تصویر ۶-الف) نشان می‌دهد که تاموکسیفن در این غلظت سبب تغییری در میزان پروتئین‌های مذکور نمی‌شود.

تصویر ۶-ب نیز نشان می‌دهد که تاموکسیفن در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده، تاثیر بر نسبت پروتئین Bcl-2/Bax نیز نمی‌گذارد. از این رو آپوپتوز ناشی از تاموکسیفن در این رده سلولی مستقل از تغییرات پروتئین‌های Bax و Bcl-2 است.

### بحث و نتیجه گیری

درک مکانیسم ملکولی اثر یک داروی ضد تومور سبب امکان بهینه‌سازی کاربرد آن و همچنین توسعه مصارف درمانی

میکرومولار تاموکسیفن در مقایسه با سلولهای تیمار نشده به روش ایمونوبلاتینگ سنجیده شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آپوتوز ناشی از تاموکسیفن در این رده سلولی بدون ایجاد تغییر در مقدار این دو پروتئین اتفاق می افتد، در حالی که نتایج حاصل از رده سلولی MDA-MB231 افزایش سطح پروتئین Bax به دنبال تیمار با تاموکسیفن را نشان داده است (۹).

مقایسه تفاوت نتایج حاصل از این دو رده سلولی نشان دهنده وجود تفاوت اساسی در مکانیسم پاسخ به تاموکسیفن می باشد. مطالعات متعددی مکانیسم های متفاوتی را برای تاموکسیفن نشان داده اند. برای مثال ممکن است این اثر از طریق مکانیسم پیام یون کلسیمی (۱۷) اتفاق افتد.

در مجموع، نتایج این تحقیق نشان می دهد که تاموکسیفن می تواند در غلظت بالا (۲۰ میکرومولار) سبب القای آپوتوز وابسته به کاسپاز ۳ در رده سلولی فاقد گیرنده استروژن MDA-MB468 گردد. با توجه به این که این رده سلولی نزدیک ترین مدل سلولی فاقد گیرنده استروژن به شایعترین فرم سرطان سینه می باشد می توان به کاربرد این دارو در درمان سرطان های سینه فاقد گیرنده استروژن امیدوار بود. با توجه به مقدار پلاسمایی پایدار تاموکسیفن که حدود ۱ میکرومولار می باشد دست یافتن به مقادیر پلاسمایی بالا مانند ۲۰ میکرومولار نیازمند دوزهای بسیار بالاست.

اگرچه کاربرد دوزهای بالای تاموکسیفن به کارآزمایی های (trial) بالینی راه یافته است (۵) اما جهت ممانعت از بروز اثرات استروژنی دوزهای بالای تاموکسیفن که خود ممکن است خطراتی را به دنبال داشته باشد، تحقیق در خصوص استفاده از وجود سینرژیسیم بین تاموکسیفن و بعضی از ترکیبات دارویی (۱۲) در جهت کاهش دوز مورد نیاز پیشنهاد می گردد.

### تشکر و قدردانی

بخشی از این تحقیق از طریق طرح ملی تحقیقات، شماره ۸۸ و با حمایت شورای پژوهش های علمی کشور انجام یافته است. به این وسیله نویسندگان بر خود لازم می دانند که از ریاست

حاصل از این رده سلولی که مورد بررسی جهت القای آپوتوز ناشی از تاموکسیفن قرار نگرفته بود، حائز اهمیت وافری است و مقاومت بالای آن به غلظت های کم تاموکسیفن ( کمتر از ۲۰ میکرومولار) می تواند نشانگر نیاز به دوزهای بسیار بالایی از تاموکسیفن جهت حصول اثر درمانی آن حتی در درمان سرطان سینه فاقد گیرنده استروژن باشد. جهت بررسی مکانیسم ملکولی اثر تاموکسیفن در این رده سلولی ابتدا تغییر در میزان کاسپاز-۳ فعال مورد بررسی قرار گرفت. روش پذیرفته شده در سنجش میزان کاسپاز-۳ فعال استفاده از سنجش میزان کاتالیز سوپسترای سنتزی (DEVD) نشاندار شده با عامل فلورسنت (AFC) یا کروموزنیک (pNA) است که هر دو کینتیک مشابهی نشان می دهند (۱۳).

از این رو در مطالعه حاضر از سوپسترای نشاندار با پارانیتر آیلین استفاده شده است. نتایج نشان داد که تیمار سلولها با تاموکسیفن تنها در غلظت ۲۰ میکرومولار سبب افزایش معنی داری در میزان کاسپاز-۳ فعال شده، این افزایش در زمان ۲۴ ساعت به حداکثر خود می رسد و نسبت به پیک آپوتوز تقدم زمانی دارد. نتایج مشابهی در مورد رده سلولی MDA-MB231 نیز گزارش شده است (۲۲). برای اثبات وابستگی آپوتوز ناشی از تاموکسیفن به فعالیت کاسپاز-۳ از سنجش آپوتوز به دنبال پیش تیمار سلولها با مهارگر اختصاصی کاسپاز-۳ استفاده شد و نتایج حاصل نشان داد که این مهار سبب توقف کامل القای آپوتوز می شود و لذا می توان نتیجه گرفت که آپوتوز ناشی از تاموکسیفن در رده سلولی MDA-MB468 همانند رده سلولی MDA-MB231 وابسته به کاسپاز-۳ است. این در حالی است که در رده های سلولی دیگری نظیر MCF-7 آپوتوز ناشی از تاموکسیفن مستقل از کاسپاز-۳ است (۲۲، ۱۹). دسته دیگر از مهمترین بازیگران در مکانیسم اجرای آپوتوز که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت دو سرگروه بخش آنتی آپوتوزی (Bcl-2) و پرو آپوتوزی (Bax) پروتئین های خانواده Bcl-2 بود. میزان این دو پروتئین در سلولهای تیمار شده با غلظت ۲۰



- in oestrogen receptor-negative human cancer cell lines, *Br. J. Cancer*, 79: 257-263.
11. Friedman Z. Y., 1998, Recent advances in understanding the molecular mechanisms of tamoxifen action, *Cancer Invest.*, 16:391-6.
  12. Gu W. Z., Chen Z., Tahir S. K., Rosenberg S. H., Ng S. C., 1999, Synergistic effect of paclitaxel and 4-hydroxytamoxifen on estrogen receptor-negative colon cancer and lung cancer cell lines, *Anticancer Drugs*, 10:895-901.
  13. Gurtu V., Kain R. S., Zhang G., 1997, Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis, *Anal. Biochem.*, 251: 98-102.
  14. Hashimoto M., Inoue S., Muramatsu M., Masliah E., 1997, Estrogens stimulate tamoxifen-induced neuronal cell apoptosis in vitro: A possible nongenomic action, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 240: 464-470.
  15. Izban F. K., Worne-Smith T., His D. E., *et al.*, 1999, Characterization of the ICE/Ced-3 - family proteases, caspase-3 / CPP32 in Hodgkin's disease, *Am. J. Pathol.*, 154:1439-1447.
  16. Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R., 1972, Apoptosis: A basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue-kinetics, *Br. J. Cancer*, 26:239-57.
  17. Kim J. A., Kang Y. S., Jung M. W., Lee S. H., Lee Y. S., 1999, Involvement of Ca<sup>2+</sup> influx in the mechanism of tamoxifen-induced apoptosis in HepG2 human hepatoblastoma cells, *Cancer Lett.*, 147:115-123.
  18. Kroemer G., 1997, The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis, *Nat. Med.*, 3:614-620.
  19. Mandlekar S., Hebbar V., Christov K., Kong A. N., 2000, Pharmacodynamics of tamoxifen and its 4-hydroxy and N-desmethyl metabolites: activation of caspases and induction of apoptosis in rat mammary tumours and in human breast cancer cell lines, *Cancer Res.*, 60: 6601-6.
  20. Mandlekar S., Kong A. N. T., 2001, Mechanisms of tamoxifen - induced apoptosis, *Apoptosis*, 6: 469-477.
  21. Mc pherson K., Steel C. M., Dixon J. M., 2000, ABC of the breast diseases, breast cancer epidemiology, risk factors and genetics, *Br. Med. J.*, 321:624-8.
  22. Mandlekar S., Yu R., Tan T. H., Kong A. N., 2000, Activation of caspase-3 and c-Jun NH2-terminal kinase-1 signaling pathways in tamoxifen-induced apoptosis of human breast cancer cells, *Cancer Res.*, 60: 5995-6000.
  23. Pruschy M., Rocha S., Zaugg K., Tenzer A., Hess C., Fisher D. E., Glanzmann C., Bodis S., 2001, Key targets for the execution of radiation-induced tumour cell apoptosis: the role of p53 and caspases, *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 49: 561-567.
  24. Robinson E. K., Grau A. M., Evans D. B., Smid C. M., Chiao P. J., Abbruzzese J. L., Grimm E. A., 1998, Cell cycle regulation of human
- محترم کمیسیون پزشکی جناب آقای دکتر عزیزی و ناظر محترم طرح جناب آقای دکتر تابعی کمال تشکر را داشته باشند و همچنین از ریاست محترم کارخانه داروسازی ایران هورمون به دلیل اهدا تاموکسیفن سیترات، و ریاست محترم مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران نیز به جهت استفاده از امکانات فلوسایتومتری سپاسگزاری می شود.

## References

1. Alnemri E. S., Livingston D. J., Nicholson D. W., *et al.*, 1998, Human ICE/CED-3 protease nomenclature, *Cell*, 87, 171.
2. Cameron D. A., Keen J. C., Dixon J. M., *et al.*, 2000, The relative importance of proliferation and cell death in breast cancer growth and response to tamoxifen, *Eur. J. Cancer*, 36: 845-51.
3. Carthew P., Nolan B. M., Edwards R. E., Smith L. L., 1996, The role of cell death and cell proliferation in the promotion of rat liver tumours by tamoxifen, *Cancer Lett.*, 106: 163-169.
4. Chinnaiyan A. M., Orth K., O'Rourke K., *et al.*, 1996, Molecular ordering of the cell death pathway, Bcl-2 and Bcl-xL function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases, *J. Biol. Chem.*, 271: 573-576.
5. Couldwell W. T., Hinton D. R., Surnock A. A., *et al.*, 1996, Treatment of recurrent malignant gliomas with chronic oral high-dose tamoxifen, *Clin. Cancer Res.*, 2: 619-22.
6. Crompton M., 2000, Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis, *Current Opinion in Cell Biology*, 12L: 414 - 419.
7. Dietze E. C., Caldwell L. E., Grupin S. L., *et al.*, 2001, Tamoxifen but not 4-hydroxytamoxifen initiates apoptosis in p53 (-) normal human mammary epithelial cells by inducing mitochondrial depolarization, *J. Biol. Chem.*, 276: 5384-5394.
8. Ercoli A., Scambia G., Fattorossi A., Raspaglio G., Battaglia A., Cicchillitti L., Malorni W., Rainaldi G., Benedetti Panici P., Mancuso S., 1998, Comparative study on the induction of cytostasis and apoptosis by ICI 182,780 and tamoxifen in an oestrogen receptor-negative ovarian cancer cell line, *Int. J. Cancer*, 76, 47-54.
9. Fattman C. L., An B., Sussman L., Dou Q. P., 1998, P53-independent dephosphorylation and cleavage of retinoblastoma protein during tamoxifen-induced apoptosis in human breast carcinoma cells, *Cancer Lett.*, 130:103-13.
10. Ferlini C., Scambia G., Marone M., Distefano M., Gaggini C., Ferrandina G., Fattorossi A., Isola G., Benedetti Panici P., Mancuso S., 1999, Tamoxifen induces oxidative stress and apoptosis

دکتر فاطمه کرمی تهرانی

- oestrogen and progesterone receptor, Br. J. Surg., 69: 121-125.
28. Wyld D. K., Chester J. D., Perren T. J., 1998, Endocrine aspect of the clinical management of the breast cancer- current issues, Endocr. Relat. Cancer, 58: 97-110.
29. Zapata J. M., Krayewska M., Krayewsk. S., Huang R. P., Takayama S., *et al.*, 1998, Expression of multiple apoptosis – regulatory genes in human breast cancer cell lines and primary tumors, Breast Cancer Res. Treat., 47: 129-140.
- pancreatic cancer by tamoxifen, Ann. Surg. Oncol., 5: 342-349.
25. Saraste A., Pulkki K., 2000, Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, Cardiovascular Research, 45: 528–537.
26. Thornberry N. A., Lazebnik Y., 1998, Caspases: enemies within, Science (Washington DC), 281: 1312–1316.
27. Wilson A. J., Tehrani F., Baum M., 1982, Adjuvant tamoxifen therapy for early breast cancer: an experimental study with reference to