

## اثرات استروژن، پروژسترون و تستوسترون بر پرولیفراسیون رده های سلولی سرطان پستان

دکتر محمد هاشمی\*، دکتر سعید قوامی\*

تاریخ دریافت مقاله: ۸۳/۱۲/۱۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۴/۲/۲۴

\* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی

### چکیده

**زمینه و هدف:** هورمون های استروئیدی پرولیفراسیون سرطان پستان را تحت تاثیر قرار می دهند. هدف از این پژوهش بررسی اثرات  $\beta$ -۱۷ استرادیول، پروژسترون و تستوسترون بر رده های سلولی سرطان پستان MCF-7 و MDA-MB468 می باشد.

**مواد و روش کار:** سلول ها در محیط کشت با سرم استریپ شده توسط چارکول محتوی غلظت های مختلف هورمون های استروژن، پروژسترون و تستوسترون و در محیط کشت با سرم استریپ شده محتوی استرادیول (۱۰ nM) و غلظت های مختلف پروژسترون و تستوسترون به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند. پرولیفراسیون سلولی با روش MTT ارزیابی شد.

**یافته ها:** نتایج نشان می دهد که استرادیول به طور معنی داری سبب پرولیفراسیون رده سلولی MCF-7 می شود ( $P < 0.05$ )، اما بر رده سلولی MDA-MB468 اثری ندارد. در حالی که پروژسترون به تنهایی اثر معنی داری بر رده های سلولی مورد مطالعه ندارد، ولی در حضور استرادیول از پرولیفراسیون رده سلولی MCF-7 جلوگیری می کند. تستوسترون به طور معنی داری از پرولیفراسیون رده سلولی MCF-7 در حضور و در غیاب استرادیول جلوگیری می کند ولی بر روی رده سلولی MDA-MB-468 اثری ندارد.

**نتیجه گیری:** پرولیفراسیون سلول های سرطان پستان وابسته یا غیر وابسته به هورمون هستند. (مجله طبیب شوق، سال هفتم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۴، ص ۲۱ تا ۲۹)

**کلواژه ها:** رده های سلولی سرطان پستان، پرولیفراسیون، هورمون های استروئیدی

### مقدمه

رده های سلولی حذف استروژن و یا آنتی استروژن منجر به مرگ سلولی می شود.<sup>(۵)</sup> غدد پستانی بافت هدف برای هورمون های استروژن و پروژسترون هستند. اثرات این هورمون ها به واسطه اتصال به گیرنده اختصاصی شان می باشد. اثر آنتی آپوپتوتیک استروژن همراه با اثر میتوزنیک آن در سلول های پستان در ایجاد سرطان پستان نقش دارد. آنتی استروژن ها به عنوان یک شیوه درمانی در پیشگیری از سرطان پستان کاربرد دارد. پروژستین ها در پیشگیری از بارداری و هورمون درمانی جایگزینی<sup>۱</sup> به کار می رود. علی رغم اهمیت

هوموستاز بافتی در نتیجه تعادل بین تریازید سلولی و آپوپتوز می باشد. آپوپتوز نقش کلیدی در تنظیم رشد و تکامل بافت های سالم و سرطانی به عهده داشته و به هم خوردن روند آپوپتوز منجر به بیماری های مختلف از جمله سرطان می شود.<sup>(۱-۳)</sup> آپوپتوز را در بافت ها و رده های سلولی با حذف هورمون و فاکتورهای رشد می توان القاء کرد. همانند پرولیفراسیون به نظر می رسد که آپوپتوز هم در بافت طبیعی پستان دارای تغییرات دوره ای است و حداکثر آن در پایان فاز لوتئال است.<sup>(۴)</sup> این روند افزایش آپوپتوز در اثر کاهش استروژن یا پروژسترون است که در پایان سیکل ماهانه اتفاق می افتد. اثر استرادیول در رده های سلولی دارای گیرنده بررسی و نشان داده شده که در این

<sup>۱</sup> Hormone replacement therapy (HRT)

شد، سپس به آن ۳ میلی لیتر محلول تریپسین استریل (برای تهیه این محلول، ۰/۰۵ گرم تریپسین و ۰/۰۲ گرم EDTA را در ۱۰۰ میلی لیتر فسفات بافر سالین (PBS) حل و با فیلتر ۰/۲ میکرون استریل شد) اضافه گردید. پس از ۱ تا ۲ دقیقه محلول تخلیه و به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور CO<sub>2</sub> قرار داده می شد. به محض مشاهده کنده شدن سلول ها از کف فلاسک به وسیله میکروسکوپ معکوس، آن ها را به هود لامینار منتقل کرده و به آن محیط کشت اضافه و بین فلاسک های جدید تقسیم می شدند. فلاسک ها با درج مشخصات و تاریخ، مجدداً در انکوباتور CO<sub>2</sub> کشت داده می شد.

**استریپ کردن سرم جنین گاوی (FCS):** برای بررسی وابستگی رده سلولی به هورمون، نیاز به سرم استریپ (عاری از هورمون) است که تهیه آن به این صورت است که: سوسپانسیون ۵ درصد چارکول، ۰/۵ درصد دکستران تی-۷۰ تهیه شد. معادل حجمی از FCS مورد نظر، سوسپانسیون دکستران، چارکول اضافه و در ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس به رسوب حاصل، سرم اضافه و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه و سپس به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. آنگاه سرم با فیلتر ۰/۲ میکرون فیلتر و در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. با این روش، بیش از ۹۹ درصد هورمون های استروئیدی حذف می شوند.<sup>(۱۰)</sup>

**تیمار سلول ها:** سلول ها در فلاسک ۲۵ cm<sup>2</sup> کشت داده شد زمانی که تراکم سلولی به حدود ۸۵ درصد رسید، تریپسین نموده و پس از شمارش سلولی توسط لام نئوبار، سلول با دانسیته یکسان (۳×۱۰<sup>۴</sup> سلول در میلی لیتر) به هر یک از چاهک های پلیت ۹۶ چاهکی اضافه می شد. حال پلیت ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> قرار می گرفت تا سلول ها به کف چسبیده و رشد نمایند. پلیت هایی که مطابق با دستورالعمل بالا جهت تیمار آماده شدند، به زیر هود منتقل گردید و محیط کشت چاهک ها توسط سمپلر با دقت خالی شد. سپس محیط

درمانی آن ها، یافته ها مبنی بر اثر پروژستین ها در رده های سلولی سرطان پستان اندک است. اطلاعاتی در رابطه با تنظیم هورمونی آپوپتوز در بافت طبیعی پستان در دست نیست. اغلب مطالعات *in vitro* در رابطه با اثر پروژسترون در روی سلول های طبیعی پستان<sup>(۷)</sup> و رده های سلولی پستان که دارای گیرنده پروژسترون (از قبیل T47-D هستند)<sup>(۸)</sup> حاکی از آن است که پروژسترون اثر آنتی پرولیفراسیون دارد. شواهد بالینی نشان دهنده این است که آندروژن ها در درمان سرطان پستان مؤثر هستند و در غلظت فیزیولوژیک، رشد رده سلولی سرطان پستان ZR-75-1 را مهار می کند.<sup>(۹)</sup>

## روش کار

**رده های سلولی مورد بررسی:** رده های سلولی سرطان پستان MDA-MB-468 و MCF-7 از بانک سلولی ایران (NCBI) مستقر در انستیتو پاستور خریداری شد. رده MCF-7، یک مدل استاندارد برای تحقیقات سرطان پستان در *in vitro* است که به صورت چسبیده به کف فلاسک رشد می نماید. منشاء این رده آدنوکارسینوما پستان است و دارای مورفولوژی سلول های اپی تلیال بوده و گیرنده استروژن را بیان می نماید. منشاء رده MDA-MB-468 نیز آدنوکارسینوما پستان و دارای مورفولوژی سلول های اپی تلیال بوده و تفاوت اصلی آن با رده قبلی این است که گیرنده استروژن را بیان نمی کند.<sup>(۱۰)</sup>

**کشت رده های سلولی:** رده های سلولی در محیط کشت RPMI-1640 محتوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله، ۲ میلی مولار گلوتامین، ۲ گرم در لیتر بی کربنات، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر استرپتومایسین در انکوباتور CO<sub>2</sub> با شرایط ۵ درصد دی اکسید کربن، ۹۵ درصد هوای مرطوب و دمای ۳۷ °C کشت داده شد.<sup>(۱۱،۱۲)</sup>

**پاساژ سلول ها:** در صورتی که تراکم سلولی در فلاسک ها به بیش از ۸۵ درصد برسد، سلول ها پاساژ داده می شد. به این صورت که ابتدا در زیر هود لامینار، محیط کشت سلول ها خالی

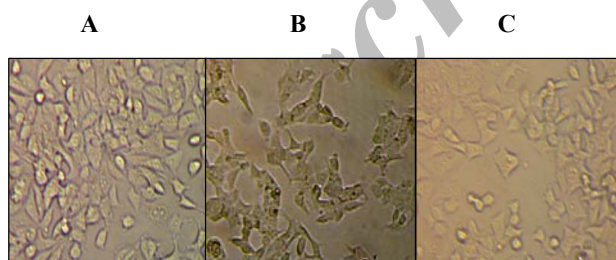
کنترل محاسبه گردید.

**روش های آماری:** جهت ارزیابی آماری نتایج بدست آمده از تست ANOVA با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-10 استفاده شد.

### یافته ها

در تصویر ۱ مورفولوژی سلول های MCF-7 در محیط کشت کامل حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی استریپ نشده و استریپ شده و محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی استریپ شده محتوی استرادیول (۱۰ nM) نشان داده شده است. مورفولوژی سلول های MCF-7 در محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی استریپ شده تغییر کرده و در این شرایط به خوبی رشد نمی کند که دال بر وابستگی این رده سلولی به هورمون برای رشد است. افزودن استرادیول به سرم استریپ شده سبب می شود که مورفولوژی آن شبیه به شاهد شود و به خوبی رشد نماید.

**تصویر ۱. مورفولوژی سلول های MCF-7 در محیط کشت ممتوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (A)، محیط کشت حاوی سرم استریپ شده (B) و محیط کشت حاوی سرم استریپ شده ممتوی ۱۰ nM استرادیول (C).**



تصویر ۲ مورفولوژی سلول های MDA-MB468 در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی استریپ نشده و استریپ شده را نشان می دهد. همان طوری که مشاهده می شود مورفولوژی این رده سلولی در دو محیط با هم تفاوت ندارد و به خوبی در محیط کشت عاری از هورمون رشد می کند.

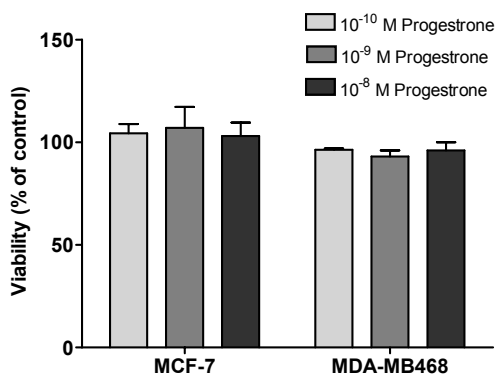
کشت جدید با سرم استریپ شده حاوی غلظت های مختلف ، به هر یک اضافه گردید. برای بررسی اثر هورمون ها بر روند پرولیفراسیون/سیتوتوکسیسیته، سلول ها در پلیت ۹۶ چاهکی رشد داده و سپس محیط کشت سلول ها با محیط کشت جدید با سرم استریپ شده محتوی غلظت های مختلف هورمون های استروژن، پروژسترون و تستوسترون تعویض گردید. همچنین سلول ها را با سرم استریپ شده محتوی استرادیول (۱۰ nM) و غلظت های مختلف پروژسترون و تستوسترون تیمار شدند. برای هر غلظت سه چاهک در نظر گرفته شد. چاهک های شاهد محتوی محیط کشت با سرم استریپ شده بوده و هیچ تیماری دریافت نکردند.

### بررسی سیتوتوکسیسیته با استفاده از روش $MTT^2$ :

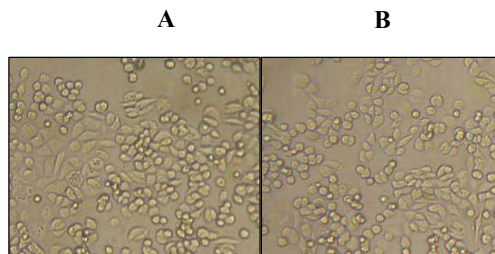
MTT نمک زرد رنگ تترازولیم محلول در آب است که توسط سوکسینات دهیدروناز میتوکندری های سلول های زنده و فعال، احیاء و به ترکیب رنگی فورمازان نامحلول تبدیل می شود که این رنگ با حلال آلی حل گشته و شدت رنگ در طول موج ۵۷۰ نانومتر متناسب با میزان سلول های زنده است.<sup>(۱۱-۱۳)</sup> برای ارزیابی سیتوتوکسیسیته، سلول ها با دانسیته  $3 \times 10^4$  cell/ml، در پلیت های ۹۶ چاهکی کشت داده و پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت که سلول ها به سطح پلیت چسبید و وارد فاز رشد شدند، تیمار می گردند. پس از مدت زمان مورد نظر (۷۲ ساعت) به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول MTT (محلول MTT ۵ mg/ml در PBS) اضافه و به مدت ۵ ساعت در انکوباتور انکوبه می شد. سپس محیط کشت سلول با سرنگ و سوزن به دقت خارج و به هر چاهک، ۱ میلی لیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO) اضافه و جذب هر چاهک در مقابل شاهد، در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت می شد.

نتایج بر حسب درصد سلول های زنده تیمار شده نسبت به

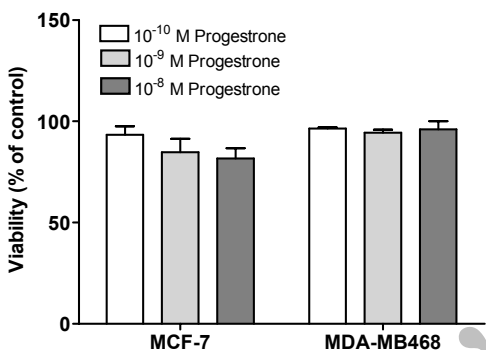
<sup>2</sup> [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide]



تصویر ۲. مورفولوژی سلول های MDA-MB468 در ممیبا کشت ممتوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (A)، ممیبا کشت ماوی سرم استریپ شده (B).

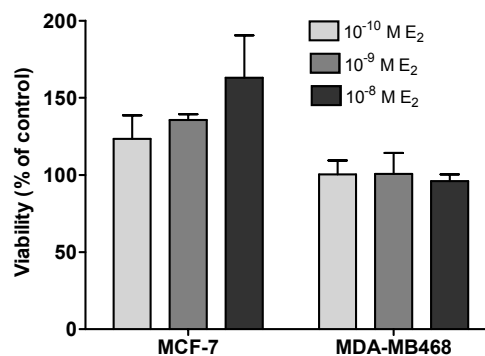
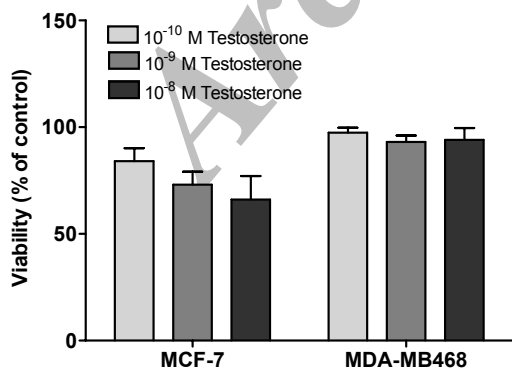


نمودار ۲. اثر غلظت های مختلف پروژسترون بر پرولیفراسیون رده های سلولی سرطان پستان MCF-7 و MDA-MB468. نمودار بیانگر میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD) داده می باشد.



در نمودار ۱ اثر غلظت های مختلف استرادیول بر رده های سلولی MCF-7 و MDA-MB468 پس از ۷۲ ساعت نشان داده شده است. استرادیول به طور معنی داری سبب پرولیفراسیون رده سلولی MCF-7 می شود ( $P < 0.05$ )، در حالی که بر رده سلولی MDA-MB468 اثری ندارد. همان طوری که در نمودار ۲ نشان داده شده پروژسترون به تنهایی اثر معنی داری بر رده های سلولی مورد مطالعه ندارد ولی در حضور استرادیول از پرولیفراسیون رده سلولی MCF-7 جلوگیری می کند (نمودار ۳). تستوسترون به طور معنی داری از پرولیفراسیون رده سلولی MCF-7 در حضور و در غیاب استرادیول جلوگیری می کند در صورتی که بر روی رده سلولی MDA-MB-468 اثری ندارد (نمودار ۴ و ۵).

نمودار ۳. اثر غلظت های مختلف پروژسترون بر پرولیفراسیون رده های سلولی سرطان پستان MCF-7 و MDA-MB468 در حضور استرادیول (۱ nM). نمودار بیانگر میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD) داده می باشد.

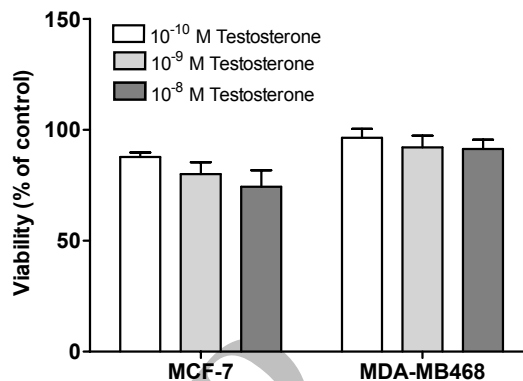


نمودار ۴. اثر غلظت های مختلف تستوسترون بر پرولیفراسیون رده های سلولی سرطان پستان MCF-7 و MDA-MB468. نمودار بیانگر میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD) داده می باشد.

نمودار ۱. اثر غلظت های مختلف استرادیول بر پرولیفراسیون رده های سلولی سرطان پستان MCF-7 و MDA-MB468. نمودار بیانگر میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD) داده می باشد.

رده های سلولی MCF-7 جلوگیری می کند و این عمل را به واسطه فسفوریلاسیون و غیر فعال کردن پروتئین BAD که یک پروآپوپتوتیک پروتئین است انجام می دهد.<sup>(۱۷)</sup> استرس های مختلف نظیر هیپوکسی و آسیب به DNA سبب توقف رشد یا آپوپتوز وابسته به p53 می شود.<sup>(۱۸)</sup> در رده سلولی MCF-7 که آلل وحشی p53 در آن بیان می شود،<sup>(۱۹)</sup> استرادیول سبب غیر فعال شدن عملکرد این پروتئین می گردد. از طرفی غیر فعال شدن p53 وابسته به استرادیول سبب تومورزایی سلول های بدخیم وابسته به گیرنده استروژن می شود. همچنین در رده سلولی MCF-7 نشان داده شده که استروژن از طریق گیرنده سطح سلولی و با افزایش cAMP سبب پرولیفراسیون سلولی می شود.<sup>(۲۰)</sup>

از طرفی استرادیول سبب افزایش بیان پروتئین Bcl 2 می شود که این پروتئین اثر آنتی آپوپتوزی دارد.<sup>(۲۱ و ۲۲)</sup> استرادیول در غلظت های فیزیولوژیک سبب پرولیفراسیون سلول های رده MCF-7 می شود.<sup>(۲۳)</sup> در این پژوهش مشاهده شد که سلول های MCF-7 که در محیط کشت با سرم استریپ شده کشت داده شده، افزودن استرادیول سبب پرولیفراسیون وابسته به میزان، در این رده سلولی می شود. بسیاری از اعمال پروژسترون به اثرات ضد استروژنی آن نسبت داده می شود. پروژسترون بیان گیرنده استروژن (ER) را کاهش داده و تجزیه آن را افزایش می دهد.<sup>(۲۴)</sup> پروژسترون به تنهایی اثری ندارد ولی در حضور استرادیول باعث مهار رشد سلول های سرطانی می شود. یکی از دلایلی که پروژسترون به تنهایی اثر ندارد ولی در حضور استروژن از پرولیفراسیون رده سلولی MCF-7 جلوگیری می کند این است که گیرنده پروژسترون از محصولات عمل استروژن است و در غیاب استرادیول گیرنده پروژسترون بیان نمی شود.<sup>(۲۵)</sup> همان طوری که بیان شد پروژسترون رشد سلول های سرطانی را در حضور استروژن مهار می کند و این فرضیه که پروژسترون اثر محافظتی



نمودار ۵. اثر غلظت های مختلف تستوسترون بر پرولیفراسیون رده های سلولی سرطان پستان MCF-7 و MDA-MB468 در حضور استرادیول (۱ nM). نمودار بیانگر میانگین  $\pm$  انحراف معیار (Mean  $\pm$  SD) داده می باشد.

## بحث

هورمون درمانی به عنوان یک شیوه درمانی مؤثر در سرطان پستان است. اولین بار بیتسون در سال ۱۸۹۶ بیان کرد که برداشتن دو طرفه تخمدان در خانم مبتلا به سرطان پیشرفته پستان باعث بهبود بیماری می شود. پس از آن روش های اندوکراین درمانی متعددی مطرح شد که از جمله آن ها می توان به آدرنالکتومی، هیپوفیزکتومی و تجویز دوز فارماکولوژیک استروژن ها، اندروژن ها، پروژستین ها و گلوکوکورتیکوئیدها اشاره کرد. هیچکدام از این روش ها آن چنان در درمان موفق نبود. در اوایل دهه ۱۹۷۰ تاموکسیفن که یک آنتی استروژن است، در درمان سرطان پستان مطرح شد. اندازه گیری گیرنده استروژن این امکان را فراهم آورد تا تومورهایی که به هورمون درمانی پاسخ می دهند انتخاب گردند.<sup>(۱۴)</sup> هورمون های استروئیدی عمل خود را به واسطه گیرنده های سیتوپلاسمی خود انجام می دهند و بر بیان ژن اثر می گذارند.

استروژن اثرات متعددی در بیان ژن های مختلف از جمله فاکتور رشد، بیان گیرنده فاکتور رشد و گیرنده پروژسترون دارد.<sup>(۱۵ و ۱۶)</sup> بررسی ها نشان داده که استرادیول از آپوپتوز در

مهار می نماید<sup>(۳۱،۳۲)</sup>، گرچه همه مطالعات این ارتباط را نشان نمی دهد.<sup>(۳۳)</sup> آندروژن ها اثر استروژن را در رده سلولی MCF-7 مهار می نماید.<sup>(۳۳)</sup> در این پژوهش ما نیز نشان دادیم که تستوسترون در حضور و در غیاب استرادیول پرولیفراسیون رده سلولی MCF-7 را مهار می کند.

در رده سلولی MDA-MB435 که گیرنده آندروژن را در غیاب گیرنده های استروژن و پروژسترون بیان می کند آندروژن سبب پرولیفراسیون این رده سلولی می شود.<sup>(۳۴)</sup> در رده سلولی MDA-MB468 مشخص شد که تستوسترون اثری بر پرولیفراسیون در این رده سلولی ندارد و تاکنون گزارشی از اثر آندروژن ها در این رده سلولی منتشر نشده است. نقش و اهمیت بالینی آندروژن ها و گیرنده های آن ها در سرطان پستان به درستی شناخته نشده است.

#### سپاسگزاری

این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقات سرطان گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. از سرکار خانم دکتر کریمی تهرانی کمال تشکر و قدردانی می شود.

در مقابل استروژن در بافت پستان دارد را تایید می نماید. از میزان بالای پروژستین ها در درمان سرطان پستان استفاده می شود.<sup>(۲۶)</sup>

بیان شده است که پروژسترون سبب پرولیفراسیون رده سلولی T47D می شود.<sup>(۲۷)</sup> این رده دارای گیرنده استروژن و پروژسترون می باشد. نتایج حاضر نشان داد در رده MCF-7 که دارای این گیرنده ها است پروژسترون در حضور استرادیول سبب مهار پرولیفراسیون سلولی می شود ولی به تنهایی اثری ندارد.

شواهد بالینی نشان دهنده این است که آندروژن ها در درمان سرطان پستان مؤثر هستند و در غلظت فیزیولوژیک رشد رده سلولی سرطان پستان را مهار می کند.<sup>(۹)</sup> در این پژوهش نشان دادیم که تستوسترون رشد رده سلولی MCF-7 را در حضور و در غیاب استروژن مهار می کند ولی بر رده سلولی MDA-MB468 بی اثر است.

پژوهش های انجام شده حاکی از آن است که در میزان فیزیولوژیک، تستوسترون و دی هیدروتستوسترون پرولیفراسیون سلول های رده MCF-7 را در حضور<sup>(۲۸-۳۰)</sup> و در غیاب استروژن

#### References

1. Hashemi M, Krocak TJ. Apoptosis and autoimmune disease. *Curr Med Chem AIAA* 2005; 4: 429-37.
2. Wyllie AH. Apoptosis and regulation of cell numbers in normal & neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metast Rev* 1992; 11:95-103.
3. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue-kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239 -57.
4. Ferguson D, Anderson T. Morphologic evaluation of cell turn over in relation to the menstrual cycle in "resting" human breast. *Br J Cancer* 1981; 44:177- 81.
5. Kyprianou M, English HF, Davidson NE, Isaacs JT. Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation. *Cancer Res* 1991; 51:162-6.
6. Perry PR, Kang Y, Greaves B. Effects of tamoxifen on growth and apoptosis of estrogen-dependent and independent human breast cells. *Ann Surg Oncol* 1995; 2: 238-45.

7. Gompel A, Malet C, Spritzer P, et al. Progestin effect on proliferation and 17 $\beta$ -hydroxy steroid dehydrogenase activity in normal breast cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63:1174-80.
8. Vignon F, Bardon S, Chalbos D. Antiestrogenic effect of R5020, a synthetic progestin in human breast cancer cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 56:1124-30.
9. Poulin R, Simard J, Labrie C, et al. Down-regulation of estrogen receptors by androgens in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Endocrinology* 1989; 125:392-9.
10. Hashemi M, Karami Tehrani F, Ghavami S, Sirati sabet M. Adenosine deaminase activities in the estrogen receptor positive and negative human breast cancer cell lines. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran* 2005; 19: 53-6.
11. Hashemi M, Karami Tehrani F, Farzami B. Caspase dependent apoptosis induced by Cladribine in estrogen receptor negative breast cancer cell line, MDA-MB468. *Journal of Sciences Islamic Republic of Iran* 2003; 14:303-10.
12. Hashemi M, Karami Tehrani F, Ghavami S. Cytotoxicity effect of Cladribine on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Iranian Biomedical journal* 2004; 8:7-12.
13. Ghavami S, Kerkhoff C, Los M, et al. Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions. *J Leukoc Biol* 2004; 86:169-75.
14. Wyld DK, Chester JD, Perren TJ. Endocrine aspects of the clinical management of breast cancer - current issues. *Endocrine Related Cancer* 1998; 5: 97-110.
15. Klijn JGM, Berns EMJJ. Prognostic factors and response to therapy in breast cancer. *Cancer Survey* 1993; 18:165-97.
16. Horwitz KB, McGuire WL. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. *J Biol Chem* 1978; 253:2223-8.
17. Fernando RI, Wimalasena J. Estradiol Abrogates Apoptosis in Breast Cancer Cells through Inactivation of BAD: Ras-dependent Nongenomic Pathways Requiring Signaling through ERK and Akt. *Molec Biol Cell* 2004; 15:3266-84.
18. Maltzman W, Czyzyk L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol* 1984; 4:1689-94.
19. Runnebaum IB, Nagarajan M, Bowman M, et al. Mutations in p53 as potential molecular markers for human breast cancer. *Pro Natl Acad Sci* 1991; 88:10657-61.
20. Zivadinovic D, Gametchu B, Watson CS. Membrane estrogen receptor-alpha levels in MCF-7 breast cancer cells predicts cAMP and proliferation responses. *Breast Cancer Res* 2005; 7: 101-12.
21. Huang Y. Estrogen increases intracellular p26 Bcl-2 to p21 Bax ratios and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 42:73-81.
22. Dong L, Wang W, Wang F, et al. Mechanisms of transcriptional activation of Bcl-2 gene expression by 17 $\beta$ -estradiol in breast cancer cells. *J Biol Chem* 1999; 274:32099-107.

23. Lippman M, Bolan G, Huff K. The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res* 1976; 36:4595-601.
24. Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 1997; 18:502-19.
25. Allegra JC, Korat O, Do HM, Lippman M. The regulation of progesterone receptor by 17 beta estradiol and tamoxifen in the Zr-75-1 human breast cancer cell line in defined medium. *J Recept Res* 1981; 2:17-27.
26. Muss HB, Cruz JM. High-dose progestin therapy for metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 1992; 3 3:15-20.
27. Moore MR, Hathaway LD, Bircher JA. Progestin stimulation of thymidine kinase in the human breast cancer cell line T47D. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1096:170-4.
28. Ando S, De Amicis F, Rago V, et al. Breast cancer: from estrogen to androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 193:121-5.
29. Boccuzzi G, Brignardello E, Di Monaco M, et al. 5-En-androstene-3 beta, 17 beta-diol inhibits the growth of MCF-7 breast cancer cells when estrogen receptors are blocked by estradiol. *Br J Cancer* 1994; 70:1035-9.
30. Ortmann J, Prifti S, Bohlmann MK, et al. Testosterone and 5 alpha dihydro testosterone inhibit in vitro growth of human breast cancer cell lines. *Gynecol Endocrinol* 2002; 16:113-20.
31. Mac Indoe JH, Etre LA. An antiestrogenic action of androgens in human breast cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 53:836-42.
32. Birrell SN, Bentel JM, Hickey TE, et al. Androgens induce divergent proliferative responses in human breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 52:459-67.
33. Mac Indoe JH, Etre LA. Androgens inhibit estrogen action in MCF-7 human breast cancer cells. *Life Sci* 1980; 27:1643-8.
34. Hall RE, Birrell SN, Tilley WD, Sutherland RL. MDA-MB-453, an androgen-responsive human breast carcinoma cell line with high level androgen receptor expression. *Eur J Cancer* 1994; 30:484-90.



## ***Effects of estradiol, progesterone and testosterone on proliferation of human breast cancer cell lines***

Hashemi M., PhD\*, Ghavami S., PhD\*

**Background:** Steroid hormones affect the proliferation of breast cancer. The aim of this study was to test the effect of estradiol, progesterone and testosterone on MCF-7 and MDA-MB468 human breast cancer cell line.

**Methods and Materials:** The human breast cancer cell line MCF-7 and MDA-MB468 were grown in charcoal stripped serum in the presence and absence of 10 nM 17- $\beta$ -estradiol with different concentration of progesterone and testosterone for 72 hrs. Growth of cells evaluated by MTT method.

**Results:** The results demonstrated that estradiol produced an increase in the cell proliferation rate of MCF-7 cells grown in the presence of charcoal-stripped serum, but had no effect on MDA-MB468 cells. While progesterone had no effect on cell growth when tested alone on both cell lines, it significantly inhibited the growth of MCF-7 cells in the presence of 10 nM estradiol. Testosterone had no effect on cell growth of MDA-MB468 cells in the presence or absence of estradiol. In MCF-7 cells, testosterone significantly inhibited the growth of these cells in the absence or presence of estradiol.

**Conclusions:** Proliferation of breast cancer cells are hormone dependent or hormone independent.

**KEY WORDS:** Breast cancer cell line, Proliferation, Steroid hormone

\*Clinical Biochemistry Dept, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences and health services, Zahedan, Iran.