

تأثیر هورمون استروژن بر میزان پروتئین p53 در رده سلولی T47D سرطان پستان

* ریباب شیخ پور: دانشکده پزشکی واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران (نویسنده مسول).
حسین حکمت مقدم: گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوqi یزد، یزد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۴
تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌های پستان وابسته به هورمون‌های جنسی هستند و این هورمون‌ها از جمله استروژن می‌توانند پیشرفت سرطان پستان را تحت تأثیر قرار دهند. پروتئین p53 در اکثر سرطان‌ها از جمله سرطان پستان دچار جهش می‌شود و افزایش سطح آن ویژگی مشترک بسیاری از سرطان‌های بدخیم است. با توجه به این‌که رده سلولی T47D دارای رسپتور استروژن و پروژسترون است و پروتئین P53 به عنوان مهم‌ترین ژن مهارکننده تومور است، این مقاله به تأثیر هورمون استروژن بر پروتئین p53 در رده سلولی T47D می‌پردازد.

روش کار: رده سلولی T47D در یک فلاسک 25-cm² در محیط DMEM کشت داده شد سپس سلول‌ها تحت تیمار با غلظت‌های مختلف هورمون استروژن (۳، ۶ و ۹ نانومول) قرار گرفتند. میزان پروتئین p53 با روش وسترن بلات مورد شناسایی قرار گرفت. نتایج حاصل از آنالیز با نرم‌افزار Gene tool و آنالیز واریانس یکراهه (ANOVA) انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج مطالعه نشان داد که سلول‌هایی که در مععرض غلظت ۳، ۶ و ۹ نانومول هورمون استروژن قرار گرفتند میزان پروتئین P53 بیشتری نسبت به گروه کنترل داشتند ($p < 0.001$).

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که هورمون استروژن سبب افزایش سطح پروتئین P53 در رده سلولی T47D می‌شود، بنابراین به نظر می‌رسد هورمون استروژن بر افزایش پروتئین p53 و تجمع آن در سلول تأثیر می‌گذارد.

کلیدواژه‌ها: استروژن، پروتئین p53، رده سلولی T47D

مهم‌ترین ژن‌های مهارکننده تومور است (۷، ۸) که در نیمی از سرطان‌ها دچار جهش می‌شود. این ژن یک فسفو پروتئین هسته‌ای ۵۳ کیلودالتونی را کد می‌کند که عملکرد طبیعی آن محافظت از ژنوم در مقابل صدمات وارده است. این فرایند منجر به ترمیم ژنوم می‌گردد و در صورت عدم ترمیم، p53 با القا مرگ سلولی منجر به آپوپتوز یز سلول می‌شود و از این طریق سلول‌های کارسینوژنیک را حذف می‌نماید (۹-۱۲). پروتئین p53 دارای نیمه عمر کوتاهی است، در هسته سلول، پروتئین MDM2 به پروتئین p53 متصل می‌شود و کمپلکس MDM2-p53 پس از صدور به سیتوپلاسم توسط پروتئوزوم تجزیه می‌گردد. عوامل مختلفی از جمله آسیب وارد بر DNA سبب فعال شدن پروتئین p53 کیناز و بالاتبع فسفریلاسیون پروتئین p53 می‌شوند. در نتیجه این فسفریلاسیون، پروتئین

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین بیماری بدخیم در میان زنان است (۱، ۲)، به طوری که سالیانه حدود یک میلیون مورد جدید از این بیماری در دنیا تشخیص داده می‌شود. در ایران سرطان پستان ۴/۲۴٪ بیماری‌های بدخیم شناسایی شده در زنان را تشکیل می‌دهد (۳)، در حالی که به نظر نمی‌رسد ناهنجاری‌های (سرطان‌های) غیر حساس به هورمون رسپتورهای عملکردی در پاسخ به هورمون‌ها داشته باشند، ولی سرطان‌هایی وابسته به هورمون مانند سرطان پستان دارای گیرنده‌های استروژن و پروژسترون هستند (۴، ۵). تیمار سلول‌های سرطانی با هورمون استروژن و یا پروژسترون و یا داروهای ضد هورمونی ممکن است سبب یک تأخیر یا پیشرفت در رشد سلول‌های سرطانی شود (۶، ۴). از طرف دیگر ژن p53 یکی از

جنتامایسین، انکوباتور مرطوب حاوی ۵ درصد دی اکسید کربن، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد و یک روز در میان محیط کشت سلول‌ها تعویض گردید. وقتی سلول‌ها ۸۰ درصد از کف فلاسک را پر کردند، سلول‌ها با Phosphate Saline Buffer (PBS) شسته شدند و از کف Trypsin فلاسک در حضور ۱/۵ میلی لیتر – EDTA (1x, PAA) کنده شدند. بعد عمل سانتریفیوژ در دور ۱۵۰۰ برای مدت زمان ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد.

برای حذف هورمون‌های استروئیدی از سرم نیاز به سوسپانسیون چارکول (۵ درصد چارکول، ۰/۵ درصد دکستران) T70 است، بعد از اضافه کردن این سوسپانسیون به سرم، برای چندین ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری می‌شود و بعد ۲۰ دقیقه در دور ۸ ۱۵۰۰ سانتریفیوژ می‌شود. سپس سرم با فیلتر ۰/۲ میکرون فیلتر و در دمای ۲۰ – درجه سانتی گراد نگهداری می‌شود (۲۱).

سلول‌ها بعد از سانتریفیوژ در پلیت‌های ۶ تایی به تعداد یکسان در یک محیط مناسب برای مدت زمان ۴۸ ساعت کشت داده شدند. بعد از ۴۸ ساعت سلول‌ها تحت تأثیر تیمار با غلظت‌های مختلف استروژن قرار گرفتند. لیگاندها در محلول ۱/۰ درصد اتانول تهیه شدند و سپس رده سلولی تحت تیمار با چندین غلظت از هورمون استرادیول والرات (۳ نانومول E1، ۶ نانومول E2، ۹ نانومول E3) برای مدت زمان ۷۲ ساعت قرار گرفتند. بعد از ۷۲ ساعت، سلول‌ها با محلول فسفات بافر شسته می‌شوند و از کف فلاسک طبق روشی که قبلً توضیح داده شد کنده می‌شوند همچنین پلیت‌های حاوی رده سلولی بدون هورمون به عنوان کنترل (شاهد) در نظر گرفته شدند و فقط محلول اتانولی دریافت نمودند.

سلول‌ها بعد از کنده شدن از کف فلاسک برای لیز شدن تحت بافر لیزکننده [15mM NaCl, 1% SDS, 5% 15mM Tris, 20mM EDTA Mercaptoethanol, 20% Glycerol, 5mM NaF, 2mM Na3VO4, and 1x inhibitor Cocktail] برای مدت زمان یک ساعت بر روی

MDM2 نمی‌تواند به پروتئین p53 متصل گردد و باعث افزایش میزان پروتئین و تجمع آن می‌گردد (۱۳، ۱۴). اکسلرد و هم کاران در سال ۲۰۱۲ طی مطالعه‌ای گزارش کردند که در پاسخ به استرس‌های آنکوژن، پروتئین‌های ARF با اتصال به ناحیه Ring finger پروتئین MDM2 باعث غیرفعال شدن پروتئین MDM2 و مانع اتصال آن به پروتئین p53 می‌شوند؛ بنابراین برهمنش بین پروتئین ARF و MDM2 سبب تجمع پروتئین p53 در هسته سلول می‌شود (۱۵). بسیاری از مطالعات نشان دادند که افزایش سطح پروتئین p53 ویژگی مشترک بسیاری از سرطان‌های بدخیم است و با پیش‌آگهی ضعیف در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان پستان همراه است (۱۶، ۱۷)، همچنین نتایج ضدونقیضی در مورد تأثیر هورمون استروژن بر میزان پروتئین وجود دارد. اکومرا و همکاران در سال ۲۰۰۲ تأثیر استروژن را بر میزان پروتئین p53 در رده سلولی MCF-7 بررسی کردند و در پایان مطالعه مشاهده کردند که استروژن سبب افزایش میزان پروتئین P53 می‌شود (۱۸). در مطالعه دیگری برگمن و هم کاران در سال ۲۰۱۱، با تأثیر هورمون استروژن بر رده سلولی MCF-7 سرطان پستان تغییری در میزان پروتئین p53 مشاهده نکردند (۱۹). کریستال و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند که هورمون استروژن سبب کاهش بیان ژن p53 می‌گردد (۲۰)؛ بنابراین با توجه به دارا بودن رسپتور استروژن در رده سلولی T47D و نتایج ضدونقیض تأثیر هورمون استروژن بر میزان پروتئین p53 نقش این پروتئین به عنوان یک مهارکننده تumor و میانجی مهم برای اثرات ضد تکثیری و آپوپتوزیزی بسیاری از درمان‌ها در سرطان پستان (۱۲-۹)، هدف از انجام این مطالعه، بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف استروژن بر میزان پروتئین P53 در رده سلولی T47D است.

روش کار

رده سلولی T47D از بانک سلولی انسنتیتو پاستور تهران خریداری شد و در یک فلاسک FBS و DMEM ۱۵ درصد ۲۵cm² در محیط ۱۵

همان محلول قبلی با رقت ۱:۵۰۰ به مدت زمان یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس آنتی بادی ثانویه کثروگه شده HRP(Goat anti-mouse IgG Santa cruz) با رقت ۱:۱۰۰۰ برای مدت زمان ۳ ساعت در دمای محیط قرار گرفت و در نهایت با روش کمی ECL-kit Advance Luminol و با کیت Western blotting detection kit, Amersham, Sweden) مراحل تشخیص پروتئین p53 انجام گرفت. برای این کار ابتدا مخلوط مساوی از محلول لومیژن و محلول پراکسید هیدروژن موجود در کیت به صورت یکنواخت روی کاغذ نیتروسلولز ریخته شد و پس از قرار دادن در محفظه تاریک ۵ دقیقه و تولید فوتون، تصویر برداری از باندهای پروتئین به فواصل زمانی ۲۰ ثانیه انجام گرفت. همچنین از نمونه Negitive Control (NC) یا کنترل منفی نیز استفاده شد، بدین ترتیب که به جای در معرض قرار دادن کاغذ نیتروسلولز با آنتی بادی اولیه از FBS استفاده شد و بقیه مراحل مانند بالا انجام گرفت.

آزمایشات به طور کامل ۳ بار تکرار شد، داده‌های Gel documentation and analysis system به دست آمده توسط دستگاه Gel documentation and analysis system استفاده از نرمافزار مخصوص خود دستگاه Gene tool مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه میزان p53 میان باندهای پروتئین بین گروه های تیمار با گروه کنترل با استفاده از آنالیز واریانس یک راهه (ANOVA) انجام گرفت. $p < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

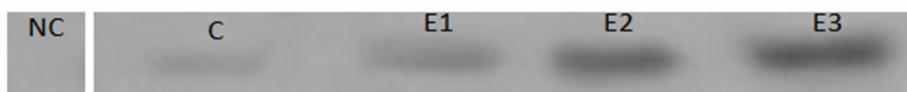
یافته‌ها

شکل ۱ باندهای نمونه کنترل و تحت تیمار بر روی کاغذ نیتروسلولز را نشان می دهد. باند های پروتئینی به دست آمده با نرمافزار Gene-tool مورد بررسی قرار گرفت و برای هر باند یک منحنی رسم گردید. شکل ۲ منحنی مربوط به نمونه کنترل را نشان می دهد. سطح وارتفاع منحنی مربوط به باندهای کنترل و تحت تیمار با هورمون استروژن محاسبه شد.

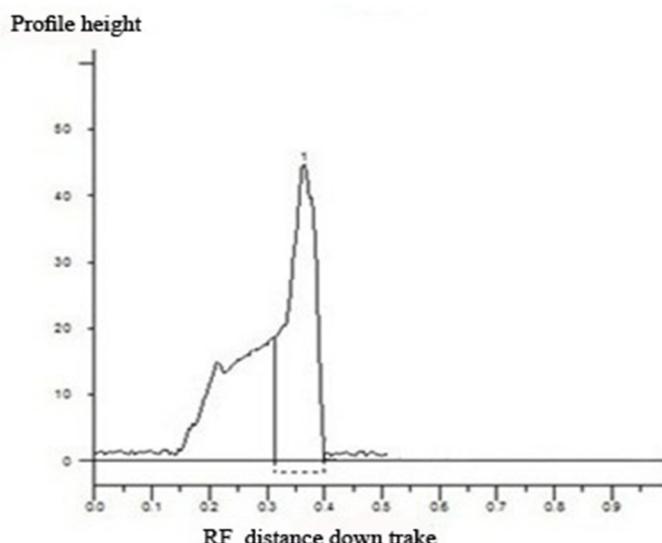
یخ قرار می گیرند. همچنین برای لیز شدن کامل، می توان سلول ها را سه دفعه و هر بار ۲۰ ثانیه در نیتروژن مایع قرارداد و بعد ۲۰ ثانیه بر روی ظرف یخ قرار داده شوند، سپس سلول های لیز شده در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۵۰.۰ g سانتریفیوژ می شوند. سپس سلول ها در فریزر -۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری می شوند تا بعداً مورد استفاده قرار گیرند.

اندازه‌گیری: برای سنجش کمی محتوای پروتئینی لیزات سلولی از روش برادفورد استفاده شد (۲۲). ابتدا برای رسم نمودار استاندارد برادفورد، محلول های پروتئینی با غلظت ۵۰-۵۰۰ میکروگرم در میلی لیترهایه، که از سرم آلبومین گاوی استفاده شد و برای انجام آزمایش از معرف برادفورد (آماده از شرکت سیگما) استفاده شد و جذب لوله ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد، سپس با استفاده از جذب های به دست آمده در غلظت های ۵۰-۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از سرم آلبومین گاوی منحنی استاندارد رسم شد. با توجه به جذب محلول به دست آمده در ۵۹۵ نانومتر و رسم منحنی استاندارد، غلظت پروتئین در عصاره ها محاسبه گردید.

در مرحله بعد، لیزات سلولی تحت تاثیر Sample buffer و محلول ۷۰ میلی مولار مرکاپتوتانول در در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد برای مدت زمان ۵ دقیقه جوشانده شدند. سپس ۶۰ میکروگرم پروتئین به داخل چاهک های ژل ۱۰ درصد پلی اکریل آمید بارگذاری شدند و برای مدت زمان ۱/۵ ساعت و با شدت جریان ۳۵ میلی آمپر عمل جداسازی پروتئین ها انجام شد. سپس پروتئین های جدا شده از ژل بر روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شدند. برای این عمل از شدت جریان ۱۲۰ میلی آمپر به مدت زمان ۱۷ ساعت انجام شد. پس از انتقال پروتئینها، ابتدا کاغذ نیتروسلولز ۰.۴۵ mm، در محلول بلوکینگ (-TBS) Tween ۵ حاوی ۵ درصد پودر Skim milk به مدت یک ساعت برای مسدود کردن جایگاه های غیراختصاصی قرار گرفت و بعد از شستشو با آنتی بادی (Santa Cruz, C.A. P53-S) میانه monoclonal antibody



شکل ۱- باندهای نمونه کنترل و تحت تیمار بر روی کاغذ نیتروسلولز



شکل ۲- نمودار بدست آمده از میزان نسبی p53 از باند مربوط به کنترل

($p < 0.001$). همچنین میزان پروتئین p53 در گروهی که تحت تیمار با E1، E2، E3 بودند میزان پروتئین بیشتری نسبت به گروه کنترل داشتند ($p < 0.001$).

بحث و نتیجه‌گیری
توسعه، رشد و تکامل پستان تحت تأثیر بسیاری از هورمون‌ها از جمله هورمون‌های جنسی مانند استروژن و پروژسترون است (۲۳). در حالی که به نظر نمی‌رسد ناهنجاری‌های (سرطان‌های) غیر حساس به هورمون رسپتورهای عملکردی در پاسخ به هورمون‌ها داشته باشند ولی بسیاری از سرطان‌های وابسته به هورمون مانند سرطان پستان دارای گیرنده‌های استروژن و پروژسترون می‌باشند (۲۴، ۲۳) و تیمار آنها با هورمون استروژن و یا پروژسترون و یا داروهای ضد هورمونی ممکن است

جدول ۱ مقادیر مربوط به سطح و ارتفاع منحنی مربوط به باندهای کنترل و تحت تیمار با هورمون استروژن را نشان می‌دهد.

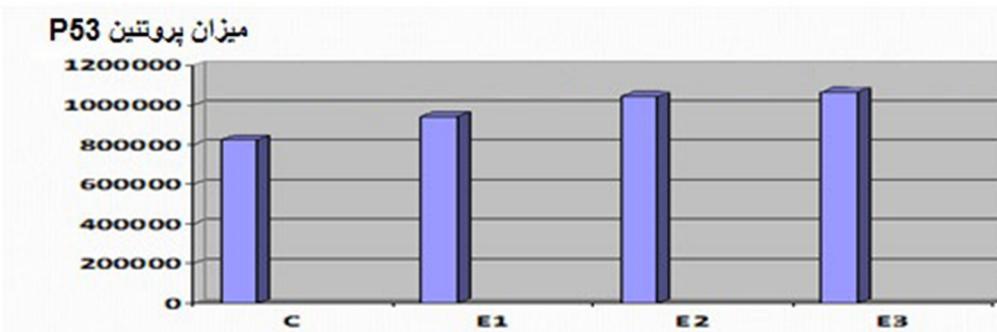
برای محاسبه مساحت منحنی، مقادیر Row را در مقادیر Height ضرب نموده و بدین ترتیب میزان پروتئین p53 به دست می‌آید. میزان پروتئین p53 متناسب با مساحت منحنی (سطح زیر منحنی) می‌باشد.

شکل ۳ مقایسه میزان پروتئین p53 (متناسب با مساحت منحنی) در گروه کنترل و تحت تیمار با غلظت‌های مختلف هورمون استروژن را نشان می‌دهد.

مقایسه میزان پروتئین در گروه کنترل و تیمار با استروژن (شکل ۳) نشان داد که میزان پروتئین p53 در گروهی که تحت تیمار با E1 بودند میزان پروتئین بیشتری نسبت به گروه کنترل نشان داد

جدول ۱- مقادیر مربوط از سطح و ارتفاع منحنی مربوط به باندهای کنترل و تحت تیمار با هورمون استروژن

	Control	E1	E2	E3
Raw vol.	۱۸۷۴۵/۴±۱۱۲/۰۰	۱۹۲۰۴/۹±۱۲۰/۰۰	۱۹۱۲۰/۴±۱۲۳/۰۰	۱۹۱۳۵/۵±۱۲۳/۰۰
Height	۴۴/۲±۷/۳	۴۹/۱±۸/۱	۵۴/۶±۸/۸	۵۵/۷±۹/۰۱



شکل ۳- مقایسه میزان پروتئین در گروه کنترل و نیمار با استروژن

E3: ۶ نانومول، E2: ۲ نانومول، E1: ۰ نانومول هورمون استروژن

(۲۶). اکومورا و همکاران در سال ۲۰۰۲ تأثیر استروژن را بر میزان پروتئین p53 در رده سلولی MCF-7 بررسی کردند و در پایان مطالعه مشاهده کردند که استروژن سبب افزایش پروتئین p53 می‌شود. این محققان در مطالعه خود گزارش کردند که هورمون استروژن سبب کاهش بیان p53 می‌گردد. پروتئین MDM2 به عنوان Ubiquitin-Ligase می‌باشد و به p53 متصل شده و آن را مستعد تخریب توسط پروتئازها می‌کند، بنابراین کاهش بیان p53 سبب افزایش میزان پروتئین MDM2 می‌گردد (۱۸). نوآکی و همکاران طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که هورمون استروژن سبب افزایش میزان پروتئین p53 در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان می‌شود. شرح پیشنهاد مکانیسم عمل هورمون این گونه بود که هورمون استروژن تاثیری بر روی بیان mRNA p53 expression ندارد و سبب افزایش نسبت P60-P90-MDM2 می‌گردد که با تجزیه p53 رابطه عکس دارند و این افزایش ممکن است بر روی تجمع p53 تأثیر بگذارد (۲۷). در مطالعه‌ای برکمن و همکاران در سال ۲۰۱۱ با تأثیر هورمون استروژن بر رده سلولی MCF-7 سرطان پستان شاهد افزایش میزان پروتئین MDM2 بدون هیچ تغییری در میزان پروتئین p53 بودند. این محققان گزارش کردند که ممکن است p53 هدف اصلی پروتئین MDM-2 نباشد و می‌توان از این یافته‌های نوین، target MDM-2 را برای درمان در

سبب یک تأخیر یا پیشرفت در رشد سلول‌های سرطانی شود. همچنین مشخص شده است که p53 از طریق بیان p21 و Bax می‌تواند در فرایند توقف سلولی و آپوپتوزیز نقش داشته باشد (۱)، این پروتئین به عنوان یک مهارکننده تومور، میانجی مهم برای اثرات ضد تکثیری و آپوپتوزیزی بسیاری از داروها و درمانها می‌باشد و در مورد تأثیر هورمون استروژن بر میزان پروتئین p53 گزارش‌های ضد و نقیضی وجود دارد. مطالعه‌ای نشان داد، استروژن سبب غیرفعال شدن عملکرد پروتئین p53 در رده سلولی MCF-7 می‌گردد (۳)، از طرفی غیرفعال شدن پروتئین p53 وابسته به استروژن سبب توموزایی سلول‌های بدخیم وابسته به گیرنده استروژن می‌گردد (۳). کلیف در سال ۱۹۹۵ مطالعه‌ای بر روی رده سلولی T47D در محیط DMEM انجام داد و تأثیر دزهای مختلف استروژن را بر روی رده سلولی T47D بررسی کرد و مشاهده کرد که استروژن سبب افزایش میزان پروتئین p53 می‌گردد (۵). نتایج مطالعه این محقق با مطالعه ما همخوانی دارد. کلیف مکانیسم عمل هورمون استروژن را این گونه گزارش کرد که استروژن سبب افزایش بیان ژن p53 می‌گردد (۲۵). لیندسترم در سال ۲۰۰۳ اعلام کرد که استروژن باعث شدن ژن c-Myc می‌شود و بالتیع پروتئین c-Myc باعث شدن p53 می‌گردد (۲۶). پروتئین ARF می‌گردد. پروتئین ARF به p53 متصل شده و مانع تجزیه آن توسط پروتئازها می‌گردد. بدین ترتیب غلظت پروتئین p53 در سلول زیاد می‌شود

p53 در زمان های مختلف سیکل قاعدگی بیماران مبتلا به سرطان پستان مورد بررسی قرار گیرد، همچنین میزان بیان ژن P53 با روش Real time PCR انجام گیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله مستخرج از پایان نامه دکترای بیوشیمی نویسنده مسئول می باشد. همکاری استادی و کاکنان دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی و پژوهشکده علوم تولید مثل یزد کمال تشکر را دارم.

منابع

- Sheikhpour R, Ghassemi N, Yaghmaei P. Immunohistochemical assessment of p53 protein and its correlation with clinicopathological parameters in breast cancer patients. Indian J sci technol; 2014. 7(4): 472-479.
- Richie RC, Swanson JO. Breast Cancer: A Review of the Literature. J Insur Med; 2003.35:85-101.
- Azizi E, Namazi A, Kaabinejadian S, Fouladdel Sh, Rezaei P, Ramezani M. Molecular analysis of MEN1 expression in MCF 7, T47D and MDA-MB 468 breast cancer cell lines treated with adriamycin using RT-PCR and immunocytochemistry. Daru; 2010.18(1): 17-23.
- Hashemi M, Ghavami S. [Effects of estradiol, progesterone and testosterone on proliferation of human breast cancer cell lines]. TabibShargh 2006;7(1): 22-29(Persian)
- Lu S, Becker KA, Hagen MJ, Yan H, Roberts AL, Mathews LA, et al. Transcriptional response to estrogen and progesterone in mammary gland identify network regulating p53 activity. J Endocrinol; 2008.149(10): 4809-4820.
- Alkhalf M, El-Mowafy AM. Overexpression of wild-type p53 gene renders MCF-7 breast cancer cells more sensitive to the antiproliferative effect of progesterone. J Endocrinol; 2003. 179: 55-62.
- Bergh J. Clinical studies of p53 in treatment and benefit of breast cancer patients. Endocr Relat Canc; 1999. 6:51-9.
- Jean F, Simpson L, David L. The p53 Tumor Suppressor Gene in Ductal Carcinoma in Situ of the Breast. Am J Pathol; 2000. 156(1): 5-6.
- Plesan D, Valentina G, Patrana N, Plesan C, Stoica D. Immunohistochemical study of p53 and Ki67 in a group of patients with mammary carcinoma. Rom J Morpho Embryol; 2010. 51(3):459-465.

آینده شناسایی کرد (۱۹) ولی گائو در سال ۲۰۰۲ نشان داد که تیماراستروژن باعث کاهش میزان پروتئین P53 در تووده سلولی رحم می شود. بنابراین گزارش کرد که استروژن می تواند سبب کاهش بیان ژن p53 گردد (۲۸). کریستال وهم کاران در سال ۲۰۱۲ به همین نتیجه دست یافتند و گزارش کردند که ژن p53 هدف کمپلکس استروژن-رسپتور است و اتصال این کمپلکس سبب کاهش بیان ژن p53 می گردد (۲۰). هاشمی در مطالعه دیگری گزارش کرد در رده سلولی MCF-7، استروژن از طریق گیرنده سطح سلولی و با افزایش سطح cAMP سبب پرولیفراسیون سلولی می شود (۳). کروا وهم کاران در سال ۲۰۰۲ مطالعه دیگری انجام دادند و تأثیر هورمون استروژن را بر روی چند رده سلولی مورد بررسی قرار دادند و در پایان مشاهده کردند که تغییری در میزان پروتئین p53 مشاهده نشد (۲۹). لیو در سال ۲۰۰۸ طی مطالعه ای نشان داد که هورمون های استروئیدی مانند استروژن و پروژسترون می توانند سبب تغییر سطح پروتئین p53 شوند ولی اعلام کرد که نمی توان هیچ مکانیسم خاصی را برای آن در نظر گرفت (۵). در مطالعه ای، کبینزادیان و همکاران در سال ۲۰۰۸ طی مطالعه ای گزارش کردند هنگامی که رده سلولی T47D و MCF-7 (هر دو از رده های سلولی سرطان پستان) تحت تأثیر دز واحدی از یک دارو قرار گرفته اند، میزان متفاوتی از پروتئین p53 در این رده های سلولی مشاهده شد (۲۴). کنی و همکاران در سال ۲۰۰۷ تفاوت تأثیر هورمون استروژن بر میزان پروتئین p53 در رده سلولی MCF-7 و T47D را این گونه گزارش کردند که رده سلولی T47D دارای پروتئین p53 موتانت یافته است ولی رده سلولی MCF-7 دارای پروتئین p53 طبیعی (وحشی) است (۳۰). نتایج این مطالعه نشان داد که استروژن سبب افزایش میزان پروتئین p53 در رده سلولی T47D می شود. بنابراین به نظر می رسد هورمون استروژن می تواند بر افزایش میزان پروتئین p53 و تجمع آن در سلول تأثیر بگذارد. در ادامه پیشنهاد می گردد به منظور تحقیق بیشتر، میزان پروتئین

- protein utilizing the principle of protein-day binding. *Anal Biochem*; 1976;72:248-54.
23. Dunphy KA, Blackburn AC, Yan H, O'Connell LR. Estrogen and progesterone induce persistent increases in p53-dependent apoptosis and suppress mammary tumors in BALB/c-Trp53^{+/−} mice. *Breast Canc Res*; 2008; 10(3): 1-15.
 24. Kabbinejadian S, Fouladdel Sh, Ramazani M, Azizi E. P53 expression in MCF-7, T47D and MDA-MB468 breast cancer cell lines treated with adriamycin using RT-PCR and immunocytochemistry. *J Biol Sci*; 2008;8(2):380-385.
 25. Hurd C, Khattree N, Alban P, Nag K, Jhanwar SC, Dinda S, Moudgil VK. Hormonal Regulation of the p53 Tumor Suppressor Protein in T47D Human Breast Carcinoma Cell Line. *J biol chem*; 1995; 270(48): 2850-7.
 26. Lindström M, Wiman K. Myc and E2F1 induce p53 through p14ARF-independent mechanisms in human fibroblasts. *Oncogene*; 2003; 22: 4993–5005.
 27. Okumura N, Saji Sh, Eguchi H, Hayashi Sh, Saji Sh. Estradiol Stabilizes p53 Protein in Breast Cancer Cell Line, MCF-7. *J. Canc Res*; 2002; 93, 867–873.
 28. Gao Z, Matsuo H, Nakago S, Kurachi O, Maruo T. P53 tumor suppressor protein content in human uterine leiomyomas and down its regulation by 17-beta estradiol. *J Clin Endocrinol Metab*; 2002; 87(8): 3915-20.
 29. Correa I, Carbon MA, Salazar AM, Solano JD, Garcia A, Quintro A. Differential of p53 protein expression level in human cancer derived cell line after estradiol treatment. *Arch Med Res*; 2002;33(5): 455-9.
 30. Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT, et al. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol*; 2007; 1:84-96.
 10. Breen L, Reen, Heenan M, Amberger-Murphy V, Clynes M. Investigation of the Role of p53 in Chemotherapy Resistance of Lung Cancer Cell Lines. *Anticanc Res*; 2007;27: 1361-1364.
 11. Rahko E, Blanco G, Soini Y, Bloigu R, Jukkola A. A mutant TP53 gene status is associated with a poor prognosis and anthracycline-resistance in breast cancer patients. *Eur J Canc*; 2003; 39: 447–453.
 12. Irene Correa, Marco Antonio Cerbón, Ana Ma Salazar, José Dolores Solano, Alejandro García-Carrancá, Angelina Quintero .Differential p53 Protein Expression Level in Human Cancer-Derived Cell Lines after Estradiol Treatment. *Med Res*; 2002; 33(5): 455–459.
 13. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Hachitanda Y, Oda S. Prognostic value of p53 protein expression in breast cancer; An immunohistochemical analysis of frozen section in 514 Japanese women. *Breast Canc*; 2001; 8(3): 194-202
 14. Gaiger de oliveria M, Lauxen I, Cecilia Moraeschaves A. Immunohistochemical analysis of the pattern of p53 and PCNA expression in odontogenic cystic lesion. *Med Oral patol oral cirbucal*; 2008; 13(5):275-280.
 15. Mar Axelrod DE, Shah K, Yang O, Haffty BG. Prognosis for survival of young women with breast cancer by quantitative p53 immunohistochemistry. *Canc Clin Oncol*; 2012; 1(1): 52–65.
 16. Cerrato JA, Alfred Yung WK, Ta-Jen L. Introduction of mutant p53 into a wild-type p53-expressing glioma cell line confers sensitivity to Ad-p53-induced apoptosis. *Neuro-Oncol*; 2001; 4; 113-122.
 17. Peterson LF, Mitrikeska E, Giannola D, Lui Y, Sun H, Bixby D, et al. p53 stabilization induces apoptosis in chronic myeloid leukemia blast crisis cells. *Leukemia*; 2011;1–9.
 18. Okumura N, Saji S, Eguchi H, Hayashi S, Saji S, Nakashima S. Estradiol stabilizes p53 protein in breast cancer cell line, MCF-7. *Canc Sci*; 2002; 93(8):867-73.
 19. Brekman A, Singh KE, Polotskaia A, Kundu N, Bargonetti J. A p53-independent role of Mdm2 in estrogen-mediated activation of breast cancer cell proliferation. *Breast Canc Res*; 2011;13(1):R3.
 20. Berger CE, Qian Y, Liu G. Suppression in ER-positive Breast Cancer Modulates DNA Damage-induced Growth p53, a Target of Estrogen Receptor (ER) in Cells. *J Biol Chem*; 2012; 287:30117-30127.
 21. Hashemi M, KaramiTehrani F, Ghavami S, Siratisabet 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 (In Persian).
 22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of

The effect of estrogen on p53 protein in T47D breast cancer cell line

***Robab Sheikhpour**, Faculty of Medical Sciences of Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran (*Corresponding author). Robab.Sheikhpour@iauyazd.ac.ir

Hossein Hekmat Moghadam, Shaheed Sadoughi University, Pathology Branch, Yazd, Iran.

Abstract

Background: Breast cancer is one of the most common cancers in women. Nearly 30% of breast cancers are hormone-dependent, and these hormones comprising estrogens influence progression of breast cancers. It is now widely recognized that p53 may be the most frequently mutated protein in breast cancer. High levels of p53 protein are a common feature of many human malignant cancers. Given that, T47D cell line is estrogen and progesterone receptor positive and p53 protein is one of the most important tumor suppressor genes. This article examines the effect of estrogen on p53 protein in T47D.

Methods: The human breast cancer T47D cell line were cultured in 25cm² flasks in DMEM medium supplemented with fetal bovine serum (FBS) and treated with different concentrations (3, 6, and 9 nmol) of estrogen. The levels of proteins were measured by western blot method. Gene tool software and One Way ANOVA were used for statistical analysis.

Results: Comparison of p53 levels in T47D cell line showed that cells that were exposed to 3, 6, and 9 nmol of estrogen treatment had higher concentration of p53 than control ($p<0.001$).

Conclusion: The results showed that estrogen can strongly increase p53 protein concentration in T47D cell line. Therefore, it seems that estrogen can cause protein over expression and accumulation in T47D cell line.

Keywords: p53 protein, T47D, Estrogen treatment