مقاله پژوهشی

بررسی اثر سیتوتوکسیک هورمون پروژسترون بر بقای سلولی و بیان ژن نیتریک اکسید سنتتاز در سلول‌های فیبروبلاستوما (L929)

مینا مفتون[1] و رحیم احمدی[*1و2]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

۲- گروه بیولوژی، کالج بین المللی اویسینا، بوداپست، مجارستان

*نویسنده مسئول: رحیم احمدی، دکتری تخصصی فیزیولوژی جانوری، rahahmadi2000@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱/۱۸ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۳/۲۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۶/۲۴

چکیده

پیشینه مطالعه و هدف: سرطان فیبروبلاستوما یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های پوستی است. مطالعات نشان می‌دهند که هورمون‌های جنسی از جمله پروژسترون، می‌تواند اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی داشته باشند. بر این اساس، مطالعه حاضر به بررسی اثرات غلظت سمی هورمون پروژسترون بر بیان ژن نیتریک اکسید سنتتاز در سلول‌های فیبروبلاستوما (L929) می‌پردازد.

روش مطالعه: زنده مانی سلول‌های L929 در مواجهه با غلظت‌های ۱۰، ۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروژسترون با استفاده از تست MTT مورد سنجش قرار گرفت. اثر غلظت‌های مختلف پروژسترون بر میزان نیتریک اکساید به روش گریس اندازه‌گیری شد و میزان بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز القایی (iNOS) با استفاده از تکنیک Real time PCR انجام شد. در نهایت، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSSو آزمون آماری ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج: زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاستوما در مواجهه با غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هورمون پروژسترون نسبت به گروه کنترل دچار کاهش معناداری گردید ($P<0.001$). سطح بیان نسبی ژن iNOS در سلول‌های تیمار شده با دوز IC50 هورمون پروژسترون نسبت به گروه کنترل دچار افزایش معناداری شد ($P<0.001$). میزان غلظت نسبی نیتریک اکساید در سلول‌های فیبروبلاستوما مواجهه شده با غلظت‌های ۰.۰۱ و ۰.۱ و ۱ نسبت به کنترل دچار افزایش معنادار گردید (به ترتیب $P<0.001$، $P<0.001$ و $P<0.05$).

نتیجه‌گیری: هورمون پروژسترون دارای اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌های L929 است و بخشی از این اثر به دلیل تاثیر این هورمون بر بیان ژن iNOS و افزایش آن می‌باشد که احتمالا سبب القای آپوپتوز در سلول‌های L929 شده است.

واژه‌های کلیدی: پروژسترون، رده سلولی L929، زنده مانی، iNOs ، نیتریک اکساید

مقدمه

سرطان عبارت است از رشد و تکثیر و گاهی انتشار غیر طبیعی سلول‌های بدن که به علت ناهماهنگی میان رشد و مرگ سلول‌ها به وجود می‌آید. این فرآیند در نهایت منجر به تولید تومور می‌شود که در پزشکی آن را بیشتر با نام نئوپلاسم می‌شناسند که ممکن است از نوع خوش خیم و یا بدخیم باشد. احتمال بروز سرطان در سنین مختلف وجود دارد ولی با افزایش سن احتمال ابتلا به سرطان بیشتر می‌شود. سرطان از عوامل مرگ و میر در انسان‌ها می‌باشد. بر طبق گزارش انجمن بهداشت آمریکا۷/۶ میلیون نفر بر اثر سرطان در سال ۲۰۰۷ مرده‌اند. سرطان تنها ویژه انسان‌ها نمی‌باشد و همه جانداران و گیاهان پرسلول نیز ممکن است دچار این بیماری شوند (Sudhakar, 2009).

سرطان پوست شایع‌ترین نوع سرطان است و به مجموعه سرطان‌هایی گفته می‌شود که که منشا آن پوست بوده و به علت توسعه سلول‌های غیر طبیعی که توانایی حمله به سایر قسمت‌های بدن را دارند به وجود می آیند. سه نوع اصلی از سرطان‌های پوست وجود دارد: سرطان پوست سلول‌های پایه‌ای (BCC)، سرطان پوست سلول‌های سنگفرشی (SCC) و ملانوم (Cakir *et al.*, 2012). دو مورد اول، همراه با تعدادی از سرطان‌های پوستی کمتر رایج، به عنوان سرطان پوست غیر ملانوم شناخته می‌شوند. (سرطان سلول پایه ای رشد می کند و می‌تواند به بافت اطراف آن صدمه بزند اما بعید است که به مناطق دورافتاده یا به مرگ منتهی شود. اغلب به عنوان یک ناحیه ناشی از درد پوست به نظر می‌رسد، که ممکن است به همراه رگ‌های خونی کوچک در حال حرکت بر روی آن باشد یا ممکن است به عنوان یک ناحیه بالایی با زخم وجود داشته باشد.

هورمون‌های استروئیدی یک استروئید است که به عنوان یک هورمون عمل می‌کند. هورمون‌های استروئیدی را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد: کورتیکواستروئیدها معمولا در قشر آدرنال و استروئیدهای جنسی که معمولا در گناد یا جفت ساخته می‌شوند. در میان این دو کلاس پنج نوع با توجه به گیرنده‌هایی که به آنها متصل می‌شوند عبارتند از: گلکوکورتیکوئیدها، کورتیکوئیدهای معدنی (کورتیکواستروئیدها)، آندروژن‌ها، استروژن‌ها و پروژسترون‌ها استروئیدهای جنسی و نیز مشتقات ویتامین D (Boulanger, 2018). هورمون‌های استروئیدی به کنترل متابولیسم، التهاب، عملکرد سیستم ایمنی، تعادل نمک و آب، توسعه ویژگی‌های جنسی و توانایی مقاومت در برابر بیماری و آسیب کمک می‌کنند. اصطلاح استروئید هر دو هورمون تولید شده توسط بدن و داروهای تولید شده مصنوعی را توصیف می‌کند که عمل را برای استروئید های طبیعی تکرار می‌کنند (Funder *et al.*, 1997).

هورمون پروژسترون یکی از هورمون‌های جنسی زنانه است. پروژسترون هورمونی است که وظیفه تنظیم و تحریک اندام‌های مختلف بدن را بر عهده دارد (Chill *et al.*, 2017). طی چرخه تخمک‌گذاری این هورمون از جسم زرد ترشح می‌شود و قطع آن موجب شروع قائدگی می‌شود. این هورمون بدن را برای بارداری و سیکل قائدگی آماده کرده و تاثیر زیادی بر میل جنسی می‌گذارد و میزان این هورمون در سیکل قائدگی متغیر است. همچنین در زمان بارداری نیز این هورمون ترشح میشود که مقدار اندکی هم از غدهی فوق کلیه ترشح می‌شود (Richards *et al.*, 2018).

نیتریک اکسید (NOSs) یک خانواده از آنزیم‌های کاتالیزوری سنتز و تولید نیتریک اکسید از ال-آرژینین است. نیتریک اکسید، یک مولکول سیگنالینگ مهم سلولی است که به تجمع عروق، ترشح انسولین، تنفس هوا و درگیر شدن در آنژیوژنز (رگ‌زایی) و توسعه عصبی کمک می‌کند و ممکن است به عنوان یک انتقال دهنده عمل نماید. نیتریک اکسید در پستانداران توسط ایزوآنزیم‌های کنترل شده کلسیم و کالمدولین eNOS اندوتلیال و nNOS عصبی تأمین می‌شود .ایزوفرم القایی، iNOS، در پاسخ ایمنی دخیل است و کالمودولین را در غلظت‌های مرتبط با شرایط فیزیولوژیک مرتبط می‌کند و NO را به عنوان مکانیسم دفاع ایمنی تولید می‌کند، زیرا NO یک رادیکال آزاد با الکترون ناهمگن است .این علت نزدیکی به شوک سپتیک است و ممکن است در بیماری‌های خودایمنی اثر بگذارد (Delker *et al.*, 2010). پوست حاوی ذخایر عظیمی از اکسید نیتروژن (NO) است که پس از برخورد اشعه ماوراء بنفش با کاهش فتوشیمیایی آزاد می‌شود و منجر به افزایش میزان نیتریت در خون می‌شود (Liu and Feng, 2012). همچنین پس از برخورد اشعه ماوراء بنفش به پوست NO synthase موجب آزاد شدن NO از آرژینین می‌شود. مطالعه اکسید نیتریک به عنوان مولکول سیگنالینگ در سلول‌های طبیعی و سرطانی به دلیل ارتباط بین بیماری‌های التهابی مزمن مانند دیابت و اکسیژن واکنش‌پذیر و گونه‌های واکنش پذیر (ROS/RNS) و سرطان بسیار انجام شده است. نیتریک اکسید می‌تواند بسته به غلظت و سطوح ROS فعالیت‌های پروتومورژنیک و ضد توموریتی داشته باشد. برای مثال، مهار NO سنتتاز اندروژن سبب بلوک کردن برخی سلول‌های توموری می‌شود که یا با تأثیر مستقیم سیتوتوکسیک بر سلول‌های تومور یا مهار سلول‌های اندوتلیال تومور انجام می‌شود. در مقابل، افزایش فعالیت NOS القا شده (iNOS) در سلول‌های سرطانی سینه و کولورکتال باعث افزایش رشد تومور می‌شود و موجب انتقال سیگنال Wnt/β-catenin می‌شود (Armitage *et al.*, 2021).

در مطالعاتی که توسط PflugerArch در سال ۲۰۱۰ انجام شد، نشان داد که پروژسترون عملکرد ژنومیکeNOs را تحت تاثیر قرار می‌دهد و همچنین پروژسترون غیرژنومیک به فعال شدن یک غشاء محدود می‌شود و باعث فعالسازی P13K/AKT منجر به فعالسازی eNOs می‌شود. همینطور پروژسترون ژنومیک eNOs را تحت تاثیر قرار می‌دهد و از طریق فعالسازی تیروزین کیناز مسیر MAPK و P13Kinas مقدار eNOs افزایش می‌دهد (Schini-Kerth *et al.*, 2010; Taguchi *et al.*, 2012

با توجه به اینکه شیوع سرطان در پی صنعتی شدن جوامع افزایش یافته و کشور ما ایران نیز از این قاعده مستثنی نیست. لذا این مطالعه به بررسی تعیین زنده‌مانی رده‌ی سلولی فیبروبلاستوما متعاقب تیمار شده با دوز بالای پروژسترون تعیین تغییر سطح بیان ژن NO سنتتاز پرداخته است.

روش مطالعه

مواد: سلولی توموری فیبروبلاستوما (L929)، از انستیتوپاستور ایران خریداری شد و این سلول‌ها در تانک نیتروژن در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. هورمون پروژسترون از شرکت معتبر دارویی امین سام تهیه گردید. محیط کشت DMEM و سرم جنین گاوی (FCS: Fetal calf Serum) از شرکت Gibco-Invitrogen (آمریکا) خریداری شدند. کیت سنجش LDH از شرکت پارس آزمون خریداری شد. تریپسین (Trypsin-EDTA)، 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium و Neutral Red از شرکت سیگما آلدریچ (آمریکا) خریداری شدند. پنی سیلین (Penicilin) و استرپتومایسین (Streptormycine) از شرکت Invitrogen (آمریکا) خریداری شدند. کیت استخراج RNA و کیت استخراج c DNA از شرکت Easy Pure RNA kit (چین) خریداری شد.

تیمار سلول‌های L929 با هورمون پروژسترون: جهت تیمار سلول‌ها با هورمون و تشخیص این که سلول‌ها به چه غلظتی از این هورمون پاسخ می‌دهد نیاز به غلظت‌های مختلف هورمون وجود داشت. غلظت‌هایی که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت غلظت توکسیک یا سمی و یا غلظت غیر توکسیک یاغیرسمی است. برای این منظور غلظت‌های ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیترتا ۰۰۱ / ۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را تهیه میکندتهیه شد. همه رقت‌ها در میکروتیوب‌های استریل و در زیر هود لامینار تهیه شد. سلول‌ها در محیط DMEM و در شرایط استاندارد بمدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. پس از اینکه تراکم سلول‌های سرطانی به بیش از ۸۰ %رسید، غلظت‌های مختلف پروژسترون (۱۰، ۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ ۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به سلول‌ها اضافه گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت، مرگ سلولی به روش MTT بررسی گردید (Mohsenpour *et al.*, 2021) تا غلظت مناسب از لحاظ تاثیرگذاری جهت مطالعه بعدی بر روی بیان ژن‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

بررسی بقای سلولی با استفاده از روش MTT : تخمین درصد حیات سلولی با استفاده از پروتکل استاندارد روش MTT [3- (4 ,5- dimethylthiazol-2-yl) -2, 5- diphynyltetrazolium bromide] مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت پلیت‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکترومتر خوانده شد. میانگین درصد زنده‌مانی سلول‌ها به منظور بررسی اثر هورمون پروژسترون بر روی سلول‌ها مقایسه شد و درصد مرگ سلول‌ها در برابر غلظت هورمون رسم شد. درصد مرگ سلولی به شرح زیر محاسبه شد:

% Cytotoxicity=1-[(OD extract treated-OD blank)/(OD control-OD blank)]´100

بررسی بیان ژن: میزان RNA کل از سلول‌ها با استفاده از محلول RNX-plus استخراج شد. سپس مقدار ۱µg از RNA با استفاده از پروتکل استاندارد (شرکت فرمنتاز) به cDNA تبدیل شد. در نهایت با استفاده از کیت و توسط دستگاه Real Time PCR، Applied Biosystems Step One Plus به تعداد ۴۰ سیکل و با استفاده از پرایمرهای جدول شماره ۱ بیان کمی‌ژن‌ها بررسی گردید. میزان سطح mRNAs هر یک از ژن‌ها به طور نسبی در مقایسه با میزان سطح mRNAs ژن GAPDH محاسبه گردید. به این صورت که میزان (Delta Ct =ΔCT) با استفاده از فرمول [ΔCT = CT (target) – CT(control)] محاسبه شد و بیان ژن با فرمول $2^{-\Delta Ct}$ مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی بیان ژن iNOs: آزمایش گریس یک تست رنگ سنجی است و نشان دهنده میزان نیتریت در بافت‌های کشت داده شده است. در ابتدا ۱ میلی‌لیتر از نیتریت استاندارد درون پلیت ۲۴ خانه ریخته شد به طوری که۱۰۰ میکرولیتر درون جایگاه A هر ۳ ردیف ریخته و در جایگاه‌های B تا H ۵۰ میکرولیتر نیتریت استاندارد اضافه شد. سپس از جایگاه A ۵۰ میکرولیتر برداشته و به جایگاه B و از جایگاه B ۵۰ میکرولیتر برداشته و به جایگاه C و تا جایگاه H این کار ادامه یافت و رقت‌های ۰، ۱/۵۶، ۳/۱۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار بدست آمد. سپس در دمای اتاق سلول‌ها انکوبه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از سولفانامید در همه چاهک‌ها ریخته شد. سلول‌ها ۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند و سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول NED در هر کدام از چاهک‌هاریخته شد. میطان OD در کمتر از ۳۰ دقیقه در طول موج ۵۲۰-۵۵۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. بر اساس Curve استاندارد نیتریت نمودار تغییرات غبظت نیتریت رسم شد.

جدول ۱. مشخصات توالی پرایمرهای مربوط به هر یک از ژن‌ها

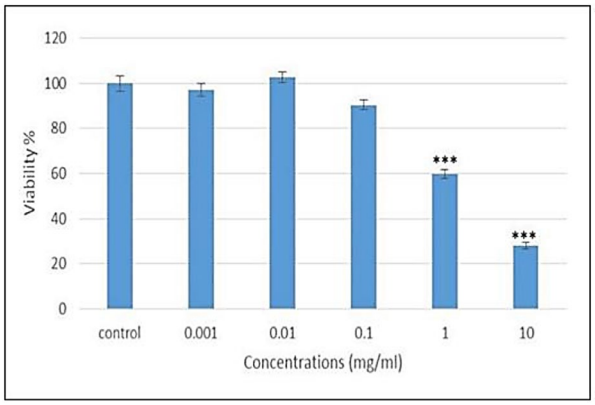
Gene	
iNOS	5’ TGACGCCAAACATGACTTCAG 3’ 3’ GCCATCGGGCATCTGGTA 5’
GAPDH	5’GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3’ 3’GAAGATGGTGATGGGATTTC 5’

آنالیزهای آماری: داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار تحلیل آماری Excel و SPSS آنالیز شدند و برای بررسی توضیع نرمال داده‌ها از تست کولموگورف – اسمیرنوف استفاده شد و بدین وسیله توزیع داده‌ها مشخص گردید. با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها و با توجه به اینکه گروه‌های مورد آزمایش، مستقل هستند از روش One- Way ANOVA داده‌ها مورد آنالیز قرار گرفت و برای مقایسه بین گروهی داده‌ها از تست Tukey استفاده شد و $P<0.05$ اختلاف معنادار در نظر گرفته شده است.

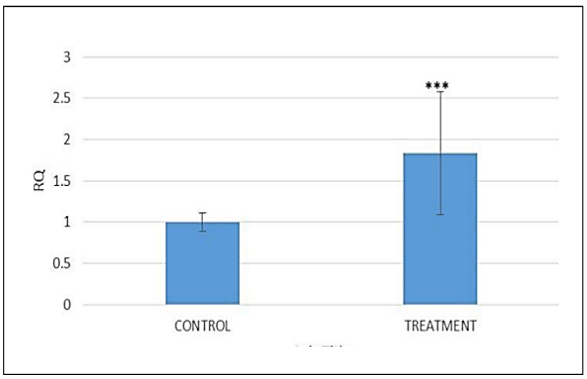
نتایج

مقایسه اثرات غلظت‌های مختلف هورمون پروژسترون با گروه کنترل بر رده سلولی فیبروبلاستوما L929: مطابق نمودار ۱ زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاستوما در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر کاهش معنادار نسبت به گروه شاهد داشت ($P<0.001$). اما در گروه‌های دیگر نسبت به گروه کنترل تغییر معناداری مشاهده نگردید. میزان IC50 نیز ۰/۹۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد.

تاثیر هورمون پروژسترون بر بیان ژن نیتریک اکسید: نمودار ۲ نشان دهنده اثر دوز IC50 هورمون پروژسترون بر بیان ژن نیتریک اکسید در مقایسه گروه کنترل ژن GAPDH با استفاده از تکنیک Real Time PCR بر رده سلولی فیبروبلاستوما L929 است. همانگونه که مشاهده می‌شود سطح نسبی بیان ژنی (RQ) گروه دریافت کننده دوز IC50 در مقایسه گروه کنترل افزایش معنادار نشان داد ($P<0.001$).

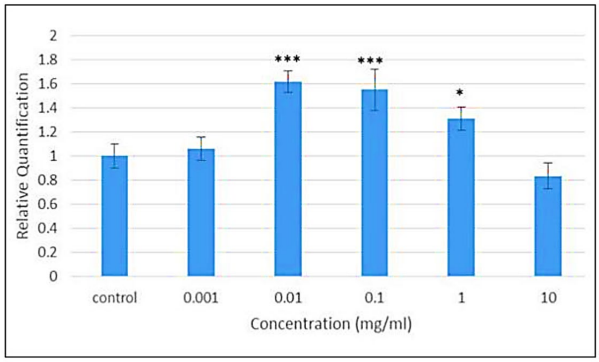


نمودار ۱- مقایسه اثرات غلظت‌های مختلف هورمون پروژسترون با گروه کنترل بر رده سلولی فیبروبلاستوما (*$P<0.001$).



نمودار ۲- اثر دوز IC50 هورمون پروژسترون بر سطح بیان نسبی (RQ) ژن نیتریک اکسید سنتاز القایی در مقایسه با گروه کنترل (*$P<0.001$).

اندازه‌گیری غلظت نیتریک اکسید در رده سلولی فیبروبلاستوما: با توجه به نمودار ۳ غلظت نسبی نیتریک اکسید در سلول‌های فیبروبلاستوما تیمار شده با غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نسبت به کنترل دچار افزایش معنادار گردید (به ترتیب $P<0.001$، $P<0.001$ و $P<0.05$). در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر میزان نیتریک اکسید برابر با ۰ / ۸ بوده و در مقایسه با کنترل دچار کاهش غیر معنادار شد. در غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر میزان نیتریک اکسید برابر با ۱/۱ بوده و در مقایسه با کنترل دچار افزایش غیرمعنادار گردیده بود.



نمودار ٤- غلظت نسبی نیتریک اکسید در محیط کشت سلولی در مواجهه با غلظتهای مختلف هورمون پروژسترون (***$P<0.001$ و *$P<0.05$).

بحث

در این مطالعه به بررسی اثرات پروژسترون بر بیان ژن نیتریک اکسید سنتتاز با استفاده از تکنیک Real Time PCR در سلول فیبروبلاستوما L929 در محیط کشت پرداخته شد. در همین راستا غلظت‌های مختلفی از هورمون پروژسترون تهیه شد و سلول‌های فیبروبلاستوما با این غلظت‌ها تیمار شدند و توسط تست MTT درصد زنده مانی سلول‌های تیمار شده بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که پروژسترون با غلظت‌های۱۰ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ، قادر به کشتن ۲۲ ٪ و ۶۰ ٪ سلول‌ها است و این اختلاف از لحاظ آماری معنادار می‌باشد. در حالی که در غلظت‌های پایین‌تر (۰/۱ و ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر) اثرات توکسیک مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهند که هورمون پروژسترون در غلظت‌های ۱۰ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای اثرات توکسیک بر سلول فیبروبلاستومای L929 می‌باشد. همچنین پس از بررسی دقیق نتایج حاصل از تست MTT و محاسبه دوز IC50 ملاحظه شد بیان ژن نیتریک اکسید سنتتاز در مقایسه با گروه کنترل دچار افزایش معنادار شد. این نتایج گویای آن است که هورمون پروژسترون می‌تواند بر روی ژن نیتریک اکسید سنتتاز در سلول‌های فیبروبلاستوما تاثیرگذار باشد.

هورمون‌های استروییدی جنسی، به ویژه استرادیول، پروژسترون و تستوسترون از مشهورترین هورمون‌های سیستم تولید مثلی می‌باشند که بررسی نقش آنها در تکوین، تکثیر و یا مهار رشد و نمو سلول‌های سرطانی از جایگاه تحقیقاتی برجسته و ممتازی برخوردار است. مطالعات نشان می‌دهند که هورمون‌های استروییدی علاوه بر تاثیر در پیدایش و یا مهار ایجاد سرطان، دارای نقش‌های عمده‌ای بر سلول‌های سرطانی پدید آمده نیز می‌باشند. در این راستا، هورمون‌های استروییدی می‌توانند سبب تحریک تکثیر سلول‌های سرطانی شده و یا موجب مهار رشد و تکثیر آنها شوند. همچنین، این هورمون‌ها می‌توانند در پیشگیری از متاستاز و یا تحریک متاستاز در سلول‌های سرطانی ایفای نقش نمایند. مطالعات نشانگر آن است که هورمون‌های استروییدی می‌توانند در تکوین تومورهای مغزی و نیز تکثیر سلول‌های توموری، نقش‌های مهاری و یا تحریکی داشته باشند؛ هرچند، هنوز مکانیسم این نقش‌ها از نظر سلولی ومولکولی بسیار واضح و آشکار نیست (Meier *et al.*, 2000). از سویی، پژوهش‌ها نشان می‌دهند که هورمون‌های استروییدی می‌توانند در تکوین تومورهای دستگاه گوارشی، تکثیر سلول‌های توموری، نقش‌های مهاری و یا تحریکی داشته باشند؛ هرچند، در این خصوص نیز مکانیسم این نقش‌ها از نظر سلولی و مولکولی بسیار واضح و آشکار نیست. در رابطه با تاثیر هورمون‌های استرویید جنسی بر پیدایش سرطان‌های مختلف، مطالعات بسیاری صورت گرفته است. همچنین، در خصوص بررسی اثرات هورمون‌های استرویید جنسی بر سلول‌های سرطانی تحقیقات زیادی در حال اجرا می‌باشد. در واقع مطالعات نشان می‌دهند که هورمون‌های استرویید جنسی نقش به سزایی در تکوین بسیاری از سرطان‌ها دارند. مسئله مهم در این مطالعات، نتایج بسیار ضد و نقیض در این حیطه می‌باشد. به عنوان مثال، نتایج برخی تحقیقات بیانگر آن است که هورمون‌های استروییدی مردانه سبب بروز سرطان‌های آدنوما و تحریک تکثیر سلول‌های سرطانی آدنومایی می‌شوند (Shutze and Patman, 1995). در حالی که در مقابل، نتایج تحقیقات اخیر، بیانگر اثر مهاری هورمون‌های استروئیدی جنسی بر رشد و نمو سلول‌های سرطانی غده پستان است (Dimitrakakis *et al.*, 2010). همچنین، تحقیق دیگری نشان می‌دهد که گرچه دهیدرواپی آندروسترون دارای اثر ضد آپوپتوزی بر سلول‌های سرطانی است، اما هورمون‌های استروئیدی موجب مقابله با این اثر در این سلول‌ها می‌گردد (Kolovou *et al.*, 2014). از سویی، نتایج یک تحقیق نشانگر آن است که آندروژن‌ها به ویژه در غلظت‌های پایین تاثیری بر رشد و نمو سلول‌های سرطانی ندارند.

هورمون‌های استروئیدی، وابسته به غلظت مورد استفاده، می‌تواند باعث تکثیر و یا مهار سلول‌های غیرسرطانی گردد. بر این مبنا، به نظر می‌آید غلظت‌های پایین‌تر، دارای اثرات محافظتی یا تکثیری بر سلول‌های غیر سرطانی بوده، اما غلظتهای بالاتر احتمالا دارای اثرات سیتوتوکسیک می‌باشند. از نظر مکانیسم احتمالی، با توجه به مطالعات پیشین می‌توان چنین پنداشت که غلظت پایین‌تر هورمون‌های استروئیدی سبب فعال شدن گیرنده‌های غیر کلاسیک (گیرنده های غشایی) آندروژنی شده و این امر سبب فعال شدن مسیر غیر ژنومی گردیده و در نتیجه باعث تکثیر سلول‌ها می‌شود، اما غلظت‌های بالاتر هورمون‌های استروئیدی از طریق گیرنده‌های سیتوزولی موجب تحریک مسیر آپوپتوز شده و بدین ترتیب سبب مهار تکثیر سلولی می‌شوند (Verzola *et al.*, 2004). گیرنده سیتوزولی پروژسترون به نام گیرنده هسته‌ای و یا NR3C3 مشهور است که یک پروتیین سیتوزولی است. این پروتیین توسط هورمون پروژسترون فعال می‌شود. گیرنده پروژسترون عمدتا به دو شکل A و B می‌باشد (Li and O'Malley, 2003). علاوه بر گیرنده‌های سیتوزولی پروژسترون، گیرنده‌های غشایی پروژسترون نیز شناسایی شده‌اند. این گیرنده‌ها، گیرنده‌های ممزوج با G-پروتیین‌ها می‌باشند و در مسیرهای سیگنالینگ درون سلولی مربوط به هورمون پروژسترون به کار گرفته می‌شوند. این گیرنده‌ها دارای بیان بالای در سول های سرطانی می‌باشند. گیرنده‌های غشایی پروژسترون دارای انواع متعددی هستند. گیرنده غشایی پروژسترونی آلفا، در بافت رحم انسان و گیرنده غشایی پروژسترونی بتا در بافت تخمدان خوک و گیرنده غشایی پروژسترونی گاما در بافت شش و کبد موش شناسایی شده‌اند (Li and O'Malley, 2003).

در پژوهش انجام یافته در خصوص بررسی اثرات سیتوتوکسیک مشتقات پروژسترون بر سلول‌های سرطانی در محیط کشت سلولی، نتایج بیانگر آن است که تیمار سلول‌های سرطانی مختلف با مشتقات ویژه ای از پروژسترون منجر به مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌گردد. البته، اثرات سیتوتوکسیک مشتقات پروژسترون بر سلول‌های سرطانی مورد مطالعه، به طور معناداری متفاوت ازهم بوده است. در مطالعه انجام یافته در خصوص بررسی اثرات تومورزایی پروژسترون بر روده، نتایج نشان دادند که گیرنده‌های پروژسترون در سلول‌های طبیعی و سلول‌های سرطانی مختلف بیان نمی‌شوند. از سویی، طی این مطالعه اثرات پروژسترون بر سلول‌های طبیعی و سلول‌های سرطانی مختلف به صورت مستقل از گیرنده مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های این پژوهش نشان دادند که پروژسترون موجب تحریک تکثیر سلول‌های سرطانی نمی‌شود (Heijmans *et al.*, 2011). پژوهش‌های مختلفی بیانگر ارتباط پروژسترون با انواع مختلفی از سرطان‌ها می‌باشند. در مجموع با توجه به نتایج حاصل در خصوص اثرات پروژسترون بر سلول‌های سرطان پوست، می‌توان گفت که پروژسترون، می‌تواند باعث مهار سلول‌های سرطانی گردد. بر این مبنا، به نظر می‌آید غلظت‌های بالاتر پروژسترون احتمالا دارای اثرات سیتوتوکسیک می‌باشد. از نظر مکانیسم احتمالی و با توجه به مطالعات پیشین می‌توان چنین پنداشت که غلظت‌های بالاتر پروژسترون از طریق گیرنده‌های سیتوزولی موجب

تحریک مسیر آپوپتوز شده و بدین ترتیب سبب مهار تکثیر سلولی می‌شوند.

بعضی از سرطان‌ها به خصوص سرطان سینه برای رشد خود به هورمون زنانه استرادیول نیاز دارند در حالیکه برخی از انواع دیگر چنین نیستند .در این نوع بیماری سلول‌های سرطانی منابع تغذیه ایی خود را از هورمون‌های استروژن و پروژسترون تامین می‌کنند. سلول‌های سرطانی دارای گیرنده‌های استروژن و پروژسترون به ترتیب ER^+ , PR^+ خوانده می‌شوند. در بعضی از سرطان‌ها به خصوص سرطان سینه که دارای گیرنده‌های استروژن یا پروژسترونی و یا هر دو هستند. در حال حاضر درمان خاصی که پروژسترون‌ها را مورد هدف قرار دهند وجود ندارد اما زنان مبتلا به سرطان پستان دارای گیرنده های PR^+ می‌تواند از درمان‌هایی که بر کاهش استروژن متمرکز می‌شود بهره گیرند. به این درمان‌ها که از طریق بلوک کردن منابع قابل دسترس استروژن انجام می‌شوند، درمان اندوکرین یا هورمون درمانی گفته می‌شود. مطالعاتی انجام یافته نتایج نشان داده که نیتریک اکسید گازی اصلی و پایدار است که به آسانی به درون سلول‌ها و غشای آنها در واکنش به هدف های مولکولی منتشر میشود. واکنش دقیق نیتریک اکسید بستگی به تراکم نیتریک اکسید رسیده به تفاوت‌های ساختاری محیط داخل یا خارج سلولی دارد. به نظر می‌رسد نیتریک اکسید در ایجاد سرطان از پیدایش تا توسعه آن نقش بسیاری دارد. بیان نیتریک اکسید سنتتاز در سرطان‌های انسانی دیده شده است و همینطور در شروع و گسترش متاستاتیک سرطان پستان، نیتریک اکسید نقش بسزایی داشته است. نیتریک اکسید در سرطان‌های مغزی به عنوان کوفاکتور مولکولی همراه با عفونت HPV نقش دارد (Choudhari *et al.*, 2013).

نیتریک اکسید می‌تواند شروع کننده ی تبدیل سلول‌های معده‌ای به سلول‌های سرطانی هم باشد. اما نیتریک اکسید می‌تواند اثرات ضد سرطانی داشته باشد. احتمالا اثرات سیتواستاستیمک و سیتوتکسیک روی سلول‌های سرطانی دارد که این اثرات برای درمان سرطان به کار برده می‌شود. همچنین نیتریک اکسید می‌تواند نقش میانجیگر درمانی بالقوه جدیدی در سرطان‌های راجعه با افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی به شیمی درمانی و پرتو درمانی یا ایمونوتراپی داشته باشد.

در مطالعاتی دیگر نشان داد که پروژسترون در رت‌ها اثر منفی به روی میزان نیتریک اکسید و cGMP دارد در حالی که در مطالعاتی دیگر نشان داده شد که هر دو تاثیر تحریکی پروژسترون روی NOs رحمی را گزارش کردند. به همین گونه پروژسترون اثرات مهاری یا تحریکی روی بیان NOs در سلول‌های اندوتلیال دارد. نتیجه ی این مطالعه نشان دهنده ی عمل غیر ژنومی پروژسترون جهت افزایش فسفریلاسیون eNOs در سلول‌های HES است. بطور خلاصه نشان داده شد که پروژسترون بصورت مستقیم روی سلول‌های اپیتلیال اندومتر جهت تحریک بیان eNOs/iNOs در مکانیسم وابسته به رسپتور پروژسترون هسته‌ای عمل می‌کند و تاثیر سریع غیر ژنومی روی سلول‌های اپیتلیال اندومتری جهت تحریک فسفریلاسیون eNOs در مسیر های PI3/AKT و MAPK دارد (Khorram and Han, 2009). در مطالعات انجام یافته نتایج نشان داد که پروژسترون عملکرد ژنومیک eNOs را تحت تاثیر قرار می‌دهد و همچنین پروژسترون غیرژنومیک به فعال شدن یک غشاء محدود می‌شود و باعث فعالسازی P13K/AKT منجر به فعالسازی eNOs می‌شود (Blaise *et al.*, 2005). در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که هورمون پروژسترون دارای اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی فیبروبلاستوما است و بخشی از این اثر به دلیل تاثیر این هورمون بر بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز القایی و افزایش نیتریک اکساید می‌باشد که احتمالا سبب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی فیبروبلاستوما شده است.

نتیجه‌گیری

هورمون پروژسترون دارای اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی فیبروبلاستوما است و بخشی از این اثر به دلیل تاثیر این هورمون بر بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز القایی و افزایش نیتریک اکساید می‌باشد که احتمالا سبب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی فیبروبلاستوما شده است.

تقدیر و تشکر

از حمایت مالی پژوهشگاه هوا فضا کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

مراجع

Armitage, J.D., Newnes, H.V., McDonnell, A., Bosco, A. and Waithman, J. 2021. Fine-tuning the tumour microenvironment: Current perspectives on the mechanisms of tumour immunosuppression. Cells, 10(1): 56.

Blaise, G.A., Gauvin, D., Gangal, M. and Authier , S. 2005. Nitric oxide, cell signaling and cell death. Toxicology, 208(2): 177-192.

Boulanger, N. 2018. Skin and arthropod vectors. Academic Press.

Cakir, B.Ö., Adamson, P. and Cingi, C. 2012. Epidemiology and economic burden of

nonmelanoma skin cancer. Facial plastic surgery clinics of North America, 20(4): 419-422.

Chill, H., Safrai, M., Reuveni Salzman, A. and Shushan, A. 2017. The rising phoenix-progesterone as the main target of the medical therapy for leiomyoma. BioMed research international, 2017.

Choudhari, S.K., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadbail, A.R. and Joshi, V. 2013. Nitric oxide and cancer: A review. World journal of surgical oncology, 11(1): 1-11.

Delker, S.L., Xue, F., Li, H., Jamal, J., Silverman, R.B. and Poulos, T.L. 2010. Role of zinc in isoform-selective inhibitor binding to neuronal nitric oxide synthase. Biochemistry, 49(51): 10803-10810.

Dimitrakakis, C., Zava, D., Marinopoulos, S., Tsigginou, A., Antsaklis, A. and Glaser, R. 2010. Low salivary testosterone levels in patients with breast cancer. BMC cancer, 10(1): 1-8.

Funder, J.W., Krozowski, Z., Myles, K., Sato, A., Sheppard, K.E. and Young, M. 1997. Mineralocorticoid receptors, salt, and hypertension. Recent progress in hormone research, 52: 247-260; discussion 261.

Heijmans, J ,.Muncan, V., Jacobs, R.J., de Jonge-Muller, E.S., Graven, L., Biemond, I., Ederveen, A.G., Groothuis, P.G., Mosselman, S. and Hardwick, J.C. 2011. Intestinal tumorigenesis is not affected by progesterone signaling in rodent models. PLoS One, 6(7): e22620.

Khorram, O. and Han, G. 2009. Influence of progesterone on endometrial nitric oxide synthase expression. Fertility and sterility, 91(5): 2157-2162.

Kolovou, G., Ragia, G., Kolovou, V., Mihas, C., Katsiki, N., Vasiliadis, I., Mavrogeni, S., Vartela, V., Tavridou, A. and Manolopoulos, V.G. 2014. Impact of cyp3a5 gene polymorphism on efficacy of simvastatin. The open cardiovascular medicine journal, 8: 12.

Li, X. and O'Malley, B.W. 2003. Unfolding the action of progesterone receptors. Journal of biological chemistry, 278(41): 39261-39264.

Liu, Y. and Feng, Q. 2012. Noing the heart: Role of nitric oxide synthase-3 in heart development. Differentiation, 84(1): 54-61.

Meier, P., Finch, A. and Evan, G. 2000. Apoptosis in development. Nature, 407(6805): 796-801.

Mohsenpour, K., Hekmat, A., Atyabi, S.M. and Bakhshandeh, H. 2021. Nanoscale, 8(1): 132-148.

Richards, G., Klimek, M., Jasienska, G. and Marcinkowska, U.M. 2018 .Digit ratio (2d: 4d) and circulating testosterone, oestradiol, and progesterone levels across the menstrual cycle. Early human development, 117: 68-73.

Schini-Kerth, V.B., Auger, C., Kim, J.-H., Étienne-Selloum, N. and Chataigneau, T. 2010. Nutritional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: Role of no and edhf. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 459(6): 853-862.

Shutze, W.P. and Patman, R.D. 1995. Nonatherosclerotic vascular diseases and vasospastic conditions :Inflammatory conditions (part 1 of a 3-part series). In: Baylor University Medical Center Proceedings. Taylor & Francis: pp: 21-28.

Sudhakar, A. 2009. History of cancer, ancient and modern treatment methods. Journal of cancer science & therapy, 1(2): 1.

Taguchi, K., Morishige, A., Matsumoto, T., Kamata, K. and Kobayashi, T. 2012. Enhanced estradiol-induced vasorelaxation in aortas from type 2 diabetic mice may reflect a compensatory role of p38 mapk-mediated enos activation. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 464(2): 205-215.

Verzola, D., Gandolfo, M.T., Salvatore, F., Villaggio, B., Gianiorio, F., Traverso, P., Deferrari, G. and Garibotto, G. 2004. Testosterone promotes apoptotic damage in human renal tubular cells. Kidney international, 65: 252–1261.

Research in Karyotic Cell &Tissue, Volume 2, Issue 2, 2021 Pages 28-34

Research Article

The cytotoxic effect of progesterone on viability and Nitric oxide gene expression in fibroblastoma cells (L929)

Mina Maftoon[1] and Rahim Ahmadi[1,2*]

[1] Department of Biology, School of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran
[2] Department of Biology, Avicenna International College, Budapest, Hungary

*Correspondence to Rahim Ahmadi, Ph.D., rahahmadi2000@yahoo.com

Received 7th April 2021 Revised 15th June 2021 Accepted 15th September 2021

Abstract

Introduction and Aim: Fibroblastoma is a common skin malignancy and a common cause of morbidity worldwide. Studies have shown that sex steroid hormones including progesterone have cytotoxic effects on cancer cells. According to this, the present study aims to determine the effects of progesterone cytotoxic concentration on iNOs expression in fibroblastoma (L929) cells.
Methods: Cell viability was measured using MTT assay in cells exposed to 0.001, 0.01, 0.1, 1, and 10 mg/ml of progesterone, and IC50 dose was determined. NO concentration levels were also measured using the Griess test. The expression level of iNOS was measured by real-time RT-PCR. Data were analyzed using SPSS by one-way ANOVA.
Results: Viability significantly decreased in fibroblastoma cells exposed to 1 and 10 mg/ml of progesterone ($P<0.001$). The relative expression level of iNOS significantly increased in cells exposed to IC50 dose of progesterone ($P<0.001$). The relative concentration of NO significantly increased in fibroblastoma cells exposed to 0.01, 0.1, and 1 mg/ml of progesterone ($P<0.001$, $P<0.001$, and $P<0.05$, respectively).
Conclusion: Progesterone has cytotoxic effects on fibroblastoma cancer cells due partly to the effects of the hormone on iNOS expression level and increased NO that probably induces apoptosis in fibroblastoma cancer cells.

***Keywords*:** Progesterone, L929 cell line, Viability, iNOS, Nitric oxide