

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

رباب شیخ پور^{۱*}، جواد محیطی اردکانی^۲

تاریخ دریافت ۱۳۹۳/۰۶/۲۰ تاریخ پذیرش ۱۳۹۳/۰۸/۳۰

چکیده

پیش زمینه و هدف: سرطان پستان شایع ترین بیماری بدخیم در زنان است. حدود ۵۰ درصد از سرطان های پستان وابسته به هورمون های جنسی هستند و اثرات این هورمون ها به واسطه اتصال به گیرنده اختصاصی شان می باشد. همچنین پروتئین p53 در نیمی از سرطان ها از جمله سرطان پستان دچار جهش می شود و افزایش سطح آن ویژگی مشترک بسیاری از سرطان های بدخیم است، با توجه به این که رده سلولی T47D دارای رسپتور استروژن، پروژسترون است و پروتئین p53 به عنوان محصول مهم ترین ژن مهارکننده تومور است، این مقاله به تأثیر هورمون پروژسترون بر میزان پروتئین p53 در رده سلولی T47D می پردازد.

مواد و روش کار: رده سلولی T47D سرطان پستان در یک فلاسک 25cm² در محیط DMEM و FBS کشت داده شد. سپس سلول ها تحت تیمار با غلظت های مختلف هورمون پروژسترون (۱، ۱۰ و ۲۰ نانو مول) قرار گرفتند. میزان پروتئین p53 با روش وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار Gene tool انجام گرفت.

نتایج: سلول هایی که تحت تیمار با غلظت ۱ نانومول از هورمون پروژسترون قرار داشتند تغییری در میزان پروتئین p53 نسبت به گروه کنترل نشان ندادند ($P > 0.05$) ولی سلول هایی که تحت تیمار با غلظت ۱۰ و ۲۰ نانومول بودند میزان پروتئین کمتری نسبت به گروه کنترل نشان دادند ($P < 0.01$).

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش غلظت هورمون پروژسترون سبب کاهش میزان پروتئین p53 در رده سلولی T47D می شود. بنابراین به نظر می رسد هورمون پروژسترون با کاهش میزان پروتئین p53، سبب کاهش تجمع پروتئین p53 در رده سلولی T47D شود.

کلمات کلیدی: هورمون پروژسترون، رده سلولی T47D، سرطان پستان، پروتئین p53

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره دهم، ص ۹۶۰-۹۵۴، دی ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: یزد، خیابان دکتر چمران، خیابان رهبر - کوچه ۱۷ رهبر - پلاک ۹۱، تلفن: ۰۹۱۳۱۵۲۲۴۶۲

Email: R.Sheikhpour@yahoo.com

مقدمه

سرطان پستان شایع ترین سرطان در میان زنان است (۱-۳). سالانه حدود یک میلیون مورد جدید از این بیماری تشخیص داده می شود. علی رغم پیشرفت های چشمگیر در درمان، حدود ۲۵ درصد بیماران مبتلا به سرطان پستان سالانه جان خود را به علت این بیماری از دست می دهند (۴)، درحالی که به نظر نمی رسد سرطان های غیرحساس به هورمون رسپتورهای عملکردی در پاسخ به هورمون ها داشته باشند، ولی سرطان های وابسته به هورمون مانند سرطان پستان دارای گیرنده های استروژن و پروژسترون هستند (۵) و اثرات این هورمون ها به واسطه اتصال به گیرنده های اختصاصی شان می باشد. تیمار

سلول های سرطانی با هورمون استروژن و پروژسترون و یا داروهای ضد هورمونی ممکن است سبب یک تأخیر یا پیشرفت در رشد سلول های سرطانی می شود (۶، ۷). همچنین از پروژسترون در پیش گیری از بارداری و هورمون تراپی در زنان یائسه نیز استفاده می شود. از طرف دیگر ژن p53 یکی از مهم ترین ژن های مهارکننده تومور است که در نیمی از سرطان ها دچار جهش می شود (۸، ۹). ژن p53 یک فسفو پروتئین هسته ای ۵۳ کیلو دالتونی ۳۹۳ آمینواسیدی را کد می کند که عملکرد طبیعی آن محافظت از ژنوم در مقابل صدمات وارده است. این فرایند منجر به ترمیم ژنوم می گردد و در صورت عدم ترمیم، آنکو پروتئین p53 با القا مرگ سلولی منجر به آپوپتوز سلول می شود و از این طریق سلول های کارسینوماتیک را حذف می نماید (۱۰-۱۲).

^۱ گروه پرستاری، دانشکده پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران (نویسنده مسئول)

^۲ دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران

مدت زمان ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام می‌گیرد و سلول‌ها بین فلاسک‌های جدید توزیع می‌شوند.

تیمار رده سلولی با لیگاند:

در این مرحله، تعداد سلول‌ها با لام نئوبار شمارش شد و ۵ پلیت که هرکدام دارای ۶ well بود انتخاب شد و تعداد ۳۰۰ هزار سلول به هرکدام از well ها انتقال داده شد. بعد از ۴۸ ساعت، سلول‌ها تحت تیمار با غلظت‌های مختلف پروژسترون (P1: ۱ نانومول، P2: ۱۰ نانومول، P3: ۲۰ نانومول) برای مدت زمان ۷۲ ساعت قرار گرفتند. لیگاندها در محلول ۰/۱ درصد اتانول تهیه شدند. همچنین پلیت‌های حاوی رده سلولی بدون هورمون به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شدند و فقط محلول اتانولی دریافت نمودند. حذف هورمون‌های استروئیدی از سرم با سوسپانسیون چارکول (۵ درصد چارکول، ۰/۵ درصد دکستران T70) انجام شد. بعد از اضافه کردن سرم به این سوسپانسیون، آن برای مدت زمان چند ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود و بعد ۲۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰ g سانتریفیوژ می‌شود. سپس سرم با فیلتر ۰/۲ میکرون فیلتر و در دمای ۲۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود (۴).

لیز کردن سلول:

سلول‌ها بعد از کنده شدن از کف پلیت برای لیز شدن تحت تأثیر بافر لیزکننده (شرکت سیگما) با مهارکننده پروتاز و فسفاتاز NaF, Cocktail inhibitor برای مدت زمان ۴۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفتند. همچنین برای وارد شدن شوک به سلول‌ها و لیز شدن کامل، سلول‌ها سه دفعه و هر بار ۲۰ ثانیه در ظرف نیتروژن مایع قرار داده شدند و بعد ۲۰ ثانیه بر روی ظرف یخ قرار داده شدند. سپس سلول‌های لیز شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰ g سانتریفیوژ می‌شوند و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شوند. سنجش کمی محتوای پروتئینی لیزات سلولی با روش برادفورد انجام شد (۲۲).

الکتروفورز و وسترن بلات:

لیزات سلولی در حضور Sample بافر و محلول ۷۰ میلی مولار مرکاپتواتانول در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان ۵ دقیقه جوشانده شدند. سپس ۶۰ میکروگرم پروتئین به داخل چاهک‌های ژل ۱۰ درصد پلی اکریل آمید بارگذاری شدند سپس پروتئین‌های جداسازی شده از ژل بر روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شدند. برای این عمل از شدت جریان ۱۲۰ میلی‌آمپر به مدت زمان ۱۷ ساعت انجام شد. پس از انجام فرایند انتقال، کاغذ نیتروسلولز، به مدت یک ساعت در محلول بلوکی‌نگ بافر (TBS-Tween) حاوی ۵ درصد پودر (Skim milk) قرار گرفت. در مرحله بعد عمل شستشو انجام می‌شود و سپس با آنتی‌بادی (Santa Cruz, C.A) P53-

نیمه‌عمر پروتئین p53 کوتاه است، در هسته سلول، پروتئین MDM2 به پروتئین p53 متصل می‌شود و کمپلکس MDM2-p53 پس از صدور به سیتوپلاسم توسط پروتئوزوم تجزیه می‌گردد (۱۳، ۱۴) ولی پروتئین MDM2 قادر نیست به پروتئین موتانت یافته متصل شود، در نتیجه نیمه‌عمر آن در سلول بالا می‌رود. همچنین در پاسخ به استرس‌های آنکوژن، ARF با اتصال به ناحیه Ring Finger پروتئین MDM2، مانع اتصال آن به پروتئین P53 می‌گردد، در نتیجه این فرایند، غلظت پروتئین P53 در هسته سلول زیاد می‌شود و درون سلول تجمع پیدا می‌کند (۱۵-۱۷). نتایج محققان در مورد تأثیر پروژسترون بر میزان پروتئین p53 متفاوت است. Cliff و همکاران در سال ۲۰۰۵ طی مطالعه‌ای نشان دادند که هورمون پروژسترون سبب کاهش میزان پروتئین p53 می‌شود (۱۸)، درحالی‌که Lu در سال ۲۰۰۸ نشان داد که هورمون پروژسترون سبب افزایش میزان پروتئین p53 می‌شود (۱۸). Alkhalaf و همکاران تأثیر پروژسترون بر بیان ژن p53 را با روش Real-Time-PCR مورد بررسی قرار دادند و در پایان گزارش کردند که پروژسترون سبب افزایش بیان ژن p53 می‌شود (۱۹). Carol طی مطالعه‌ای گزارش کرد رده سلولی T47D به دلیل دارا بودن سطح بالایی از گیرنده‌های پروژسترون می‌تواند به‌عنوان مدل خوبی برای مطالعه عمل پروژسترون باشد (۲۰). بنابراین با توجه به این‌که رده سلولی T47D، دارای رسیپور پروژسترون و پروتئین موتانت یافته p53 است (۲۱) و این پروتئین به‌عنوان محصول مهم‌ترین ژن مهارکننده تومور، میانجی مهم برای اثرات ضد تکثیری و آپوپتوزیزی بسیاری از داروها و درمان‌ها است (۱) و مطالعات کمی در مورد تأثیر پروژسترون بر میزان پروتئین p53 وجود دارد، هدف از انجام این مطالعه، بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون پروژسترون بر میزان پروتئین p53 در رده سلولی T47D می‌باشد.

مواد و روش کار

کشت سلول:

رده سلولی T47D از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری شد و در یک فلاسک 25cm² در محیط 15 درصد DMEM و FBS، جنتامایسین، انکوباتور مرطوب حاوی ۵ درصد دی‌اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد و محیط حاوی سلول یک روز در میان تعویض گردید. وقتی سلول‌ها ۸۰ درصد از کف فلاسک را پر کردند، پاساژ صورت می‌گیرد و سلول‌ها با Phosphate Buffer Saline (PBS) شسته می‌شوند و از کف فلاسک در حضور ۱/۵ میلی‌لیتر Trypsin-EDTA (1x, PAA) کنده می‌شوند. بعد عمل سانتریفیوژ در دور ۱۵۰۰ برای

نتایج

در این مطالعه بعد از این که سلول‌ها تحت تیمار با غلظت‌های مختلف هورمون پروژسترون قرار گرفتند، برای تعیین میزان پروتئین از روش وسترن بلات استفاده شد و در نهایت با کیت ECL تشخیص پروتئین p53 مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۱ باندهای نمونه کنترل و تحت تیمار بر روی کاغذ نیتروسلولز را نشان می‌دهد.



شکل (۱): باندهای نمونه کنترل و تحت تیمار بر روی کاغذ

نیتروسلولز

از سمت راست: C: کنترل، P1: غلظت ۱ نانومول، P2: ۱۰ نانومول، P3: ۲۰ نانومول

سپس با استفاده از نرم‌افزار Gel tool برای هر کدام از باندها یک منحنی رسم شد و سطح زیر منحنی به عنوان معیاری از میزان پروتئین در نظر گرفته شد. جدول ۱ مقادیر مربوط به سطح و ارتفاع منحنی باندهای کنترل و تحت تیمار با هورمون پروژسترون را نشان می‌دهد.

جدول (۱): مقادیر مربوط از سطح و ارتفاع منحنی مربوط به باندهای کنترل و تحت تیمار با هورمون پروژسترون

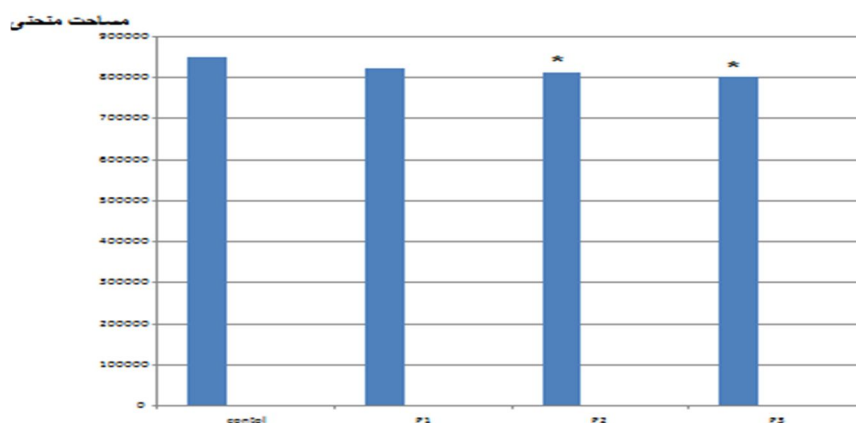
	Control	P1	P2	P3
Raw	18747 ± 110	18746.5 ± 106	18640 ± 109	18638 ± 99.5
vol.				
Heigh	45.02 ± 7.5	44.95 ± 8.2	44.51 ± 8.5	44.21 ± 6.8

ولی غلظت ۱ نانومول از پروژسترون تفاوتی در میزان پروتئین p53 نسبت به گروه کنترل نشان نداد ($P > 0.05$). نمودار ستونی ذیل میزان پروتئین p53 را در گروه کنترل و تحت تیمار مقایسه می‌کند.

mouse monoclonal antibody رقیق شده با همان محلول قبلی با رقت ۱:۵۰۰ به مدت زمان یک شبانه‌روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس آنتی‌بادی ثانویه کنژوگه 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 لومینسانس وبا ECL-kit Advance Western blotting detection kit, Amersham, Sweden تشخیص پروتئین p53 انجام گرفت. و پس از قرار دادن کاغذ در محفظه تاریک دستگاه Gel documentation و پس از گذشت ۵ دقیقه و تولید فوتون، تصویربرداری از باندهای پروتئین به فواصل زمانی ۲۰ ثانیه انجام گرفت. آزمایش‌ها به‌طور کامل چهار بار تکرار شد.

داده‌های به‌دست آمده توسط دستگاه ژل داک با استفاده از نرم‌افزار مخصوص خود دستگاه Gene tool مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه میزان پروتئین بین گروه‌های تیمار با گروه کنترل با استفاده از تست آماری Student t test انجام گرفت. $P < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

سپس با استفاده از نرم‌افزار Gene tool مساحت منحنی برای تک‌تک باندها محاسبه شد. مساحت منحنی متناسب با میزان پروتئین p53 می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌هایی که تحت تیمار با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ نانومول از پروژسترون بودند میزان پروتئین کمتری نسبت به گروه کنترل داشتند ($P < 0.01$)



$P < 0.01^*$

شکل (۳): مقایسه میزان پروتئین p53 در گروه کنترل و تحت تیمار با هورمون پروژسترون

بحث

حدود نیمی از سرطان‌های پستان دارای گیرنده‌های استروژن و پروژسترون هستند و تیمار آن‌ها با هورمون استروژن و یا پروژسترون و یا داروهای ضد هورمونی ممکن است سبب یک تأخیر یا پیشرفت در رشد سلول‌های سرطانی شود. همچنین بسیاری از اعمال پروژسترون به اثرات ضد استروژنی آن‌ها نسبت داده می‌شود. پروژسترون بیان گیرنده استروژن را کاهش داده و تجزیه آن را افزایش می‌دهد. بسیاری از مطالعات نشان دادند که پروژسترون رشد سلول‌های سرطانی را در حضور استروژن مهار می‌کند و این فرضیه که پروژسترون اثر حفاظتی دارد را تأیید می‌نماید (۷). Alkhalaf گزارش کرد که مهار رشد سلول‌های سرطان پستان به وسیله پروژسترون با تغییر بیان ژن‌هایی همراه است که در توقف رشد و تمایز نقش دارند (۶). همچنین مطالعات نشان دادند که از دست دادن فعالیت p53 سبب افزایش مقاومت سلول‌ها به انواع داروهای شیمی‌درمانی می‌شود. از دست دادن عملکرد این پروتئین همراه با پیش‌آگهی ضعیف بیماران سرطانی می‌باشد و تومورهای دارای p53 فعال قادر به القا آپوپتوزیز هستند (۱). پروتئین p53 از طریق بیان پروتئین p21 و bax می‌تواند در فرایند توقف سلولی و آپوپتوزیز نقش داشته باشد و به عنوان یک مهارکننده تومور، میانجی مهم برای اثرات ضد تکثیر و آپوپتوزیزی بسیاری از داروها و درمان‌ها باشد (۲۳). در مورد تأثیر هورمون پروژسترون بر میزان پروتئین P53 گزارش‌های ضدونقیضی وجود دارد. در مطالعه حاضر، هورمون پروژسترون سبب کاهش میزان پروتئین P53 در رده سلولی T47D شد. Guilemoro و همکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که هورمون‌های استروئیدی بعد از اتصال به گیرنده‌های خود می‌تواند مستقیماً بر روی بیان ژن تأثیر بگذارد (۲۴). Alkhalaf در سال ۲۰۰۵ به همین نتیجه دست یافت (۱۹). Cliff در سال ۱۹۹۵ مطالعه‌ای بر روی رده سلولی T47D در محیط DMEM و FBS در حضور چارکول انجام داد و تأثیر دزهای مختلف پروژسترون را بر روی رده سلولی T47D مورد بررسی قرار داد و مشاهده کرد که پروژسترون سبب کاهش میزان پروتئین P53 در رده سلولی T47D می‌شود. Cliff گزارش کرد که هورمون پروژسترون سبب کاهش بیان ژن p53 می‌شود (۱۸). Wang در مطالعه‌ای نشان داد که در رده سلولی MCF-7 تیمار شده با پروژسترون، کاهش میزان پروتئین p53 با کاهش آپوپتوزیز همراه هست. بنابراین به نظر می‌رسد که پروژسترون با تحریک بیان پروتئین‌های آنتی آپوپتوتیک و یا با کاهش بیان پروتئین‌های آپوپتوتیک، سلول‌ها را برای زنده ماندن یا برای فرار از مرگ با آپوپتوزیز قادر می‌سازد (۲). Lee و همکاران در سال ۲۰۱۲، اثر پروژسترون و تاموکسیفن را بر

رده سلولی سرطان تخمدان مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که پروژسترون سبب آپوپتوزیز و تاموکسیفن سبب بازداري سیکل سلولی (G1) می‌شود. اثر ترکیبی تاموکسیفن و پروژسترون سبب القا آپوپتوزیز شد (مشابه اثر پروژسترون به تنهایی) (۲۵). Laura و همکاران در سال ۲۰۱۳ تأثیر پروژسترون را بر روی یک رده سلولی سرطان مورد بررسی قرار دادند و در پایان گزارش کردند پروژسترون سبب افزایش بیان ژن پروتئین Bax می‌شود که این افزایش همراه با مهار رشد سلول‌های سرطان و آپوپتوزیز می‌باشد (۲۶). Lu و همکاران طی مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۸ انجام دادند، این نتیجه را گزارش کردند که رشد و تمایز پستان تحت تأثیر هورمون استروژن و پروژسترون است و هر دو باعث افزایش میزان پروتئین p53 می‌شوند، ولی مسیری که این هورمون‌ها باعث تنظیم فعالیت پروتئین p53 می‌شوند مشخص نیست (۲۷). Gao در مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۲ نشان داد که تیمار سلول‌ها با پروژسترون تأثیری بر میزان پروتئین p53 ندارد و اعلام کرد که نمی‌توان هیچ مکانیسم خاصی را برای آن در نظر گرفت (۲۸). Kester و همکاران طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۳، رده سلولی T47D را به مدت ۳ روز تحت تیمار با پروژسترون قرار دادند و در پایان مطالعه مشاهده کردند که پروژسترون سبب فعال شدن پروتئین P53 و آن‌هم بالطبع سبب فعال شدن پروتئین p21 (پروتئینی که در فعال شدن فرایند آپوپتوزیز نقش دارد) شد. بدین ترتیب با انجام فرایند آپوپتوزیز در حضور پروژسترون تکثیر سلول‌ها مهار شد (۲۹). همچنین مطالعه دیگری توسط Formby و همکاران در سال ۱۹۹۸ انجام شد و این محققان نشان دادند که هورمون پروژسترون سبب افزایش پروتئین p53 می‌شود. این محققان گزارش کردند که هورمون پروژسترون سبب افزایش بیان ژن p53 می‌گردد و افزایش بیان ژن p53 با افزایش آپوپتوزیز همراه است (۳۰). Alkhalaf و همکاران تأثیر پروژسترون بر بیان ژن p53 را مورد بررسی قرار دادند و در پایان گزارش کردند که پروژسترون سبب افزایش بیان ژن p53 می‌شود. بیان بیش از حد پروتئین p53 در تومورهای پستان با افزایش تکثیر سلولی و ریسک سرطان پستان همراه است. (۶). مطالعه دیگری نشان داد که پروژسترون سبب کاهش بیان ژن MDM2 می‌گردد. آن‌ها گزارش کردند که کاهش بیان پروتئین MDM2 با افزایش پروتئین p53 همراه است (۱۶).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که هورمون پروژسترون سبب کاهش میزان پروتئین p53 در رده سلولی T47D می‌شود. به نظر می‌رسد هورمون پروژسترون با کاهش میزان پروتئین p53، سبب

ارزیابی قرار گیرد

سپاسگزاری

در پایان از همکاری کلیه کارکنان و کارکنان بخش بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی و پژوهشکده تولیدمثل یزد کمال تشکر را دارم.

کاهش تجمع پروتئین موتانت یافته p53 در رده سلولی T47D شود. پیشنهاد می‌گردد میزان پروتئین p53 در زمان‌های مختلف سیکل قاعدگی بیماران مبتلا به سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گیرد و ارتباط آن با غلظت هورمون پروژسترون بررسی شود. همچنین میزان بیان ژن p53 با روش Rea Time PCR مورد

References:

1. 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): 472-9.
2. Wang YA, Johnson SK, Brown BL, McCarragher LM, Al-Sakkaf K, Royds JA, et al. Enhanced anti-cancer effect of a phosphatidylinositol-3 kinase inhibitor and doxorubicin on human breast epithelial cell lines with different p53 and oestrogen receptor status. *Int J Cancer* 2008;123(7):1536-44.
3. Richie RC, Swanson JO. Breast cancer: a review of the literature. *J Insur Med* 2003;35(2):85-101.
4. Azizi E, Namazi A, Kaabinejadian S, Fouladdel S, Rezaei P, Ramezani M. Molecular analysis of MEN1 expression in MCF7, T47D and MDA-MB 468 breast cancer cell lines treated with adriamycin using RT-PCR and immunocytochemistry. *Daru* 2010;18(1):17-22.
5. Lumachi F, Brunello A, Maruzzo M, Basso U, Basso SMM. Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Curr Med Chem* 2013;20(5):596-604.
6. Alkhalaf M, El-Mowafy A. 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.
7. Hashemi M, Ghavami S. Effects of estradiol, progesterone and testosterone on proliferation of human breast cancer cell lines. *Tabib Shargh* 2006; 7(1): 22-9.
8. Jean F, Simpson L. The p53 Tumor Suppressor Gene in Ductal Carcinoma in Situ of the Breast. *Am J Pathol* 2000; 156(1): 5-6.
9. Bergh J. Clinical studies of p53 in treatment and benefit of breast cancer patients. *Endocr Relat Canc* 1999. 6: 51-9.
10. Pleşan DM, Georgescu CV, Pătrână N, Pleşan C, Stoica D. Immunohistochemical study of p53 and Ki67 in a group of patients with mammary carcinoma. *Rom J Morphol Embryol* 2010;51(3):459-65.
11. Breen L, Heenan M, Amberger Murphy V, Clynes M. Investigation of the Role of p53 in Chemotherapy Resistance of Lung Cancer Cell Lines. *Anti Canc* 2007; 27: 1361-4.
12. Rahko E. A mutant TP53 gene status is associated with a poor prognosis and anthracycline-resistance in breast cancer patients 2003; *Eur J Canc* 39:447-53.
13. Tsutsui 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 oliveriam 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): 275-80.
15. Mar Axelrod DE. Prognosis for Survival of Young Women with Breast Cancer by Quantitative p53 Immunohistochemistry. *Canc Clin Oncol* 2012; 1(1): 52-65.

16. Wu L, Maki CG. MDM2: RING Finger Protein and Regulator of p53. *Madame Curie Bioscience Database. Landes Bioscience* 2000; 275: 5733-8.
17. Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 Interaction. *Mol Canc Res* 2003; 1: 1001-8.
18. Hurd C, et al. Hormonal Regulation of the p53 Tumor Suppressor Protein in T47D Human Breast Carcinoma Cell Line. *J Biol Chem* 1995; 270(48): 2850-7.
19. Alkhalaf M, El-Mowafy AM, Abou-Zeid LA. Progesterone inhibition of MDM2 p90 protein in MCF-7 human breast cancer cell line is dependent on p53 levels. *J Mol Genet Med* 2005;1(1):33-7.
20. Sartorius CA. New T47D Breast Cancer Cell Lines for the Independent Study Transcriptional Agonists by cAMP of Progesterone B- and A-Receptors: Only Antiprogesterin-occupied B-Receptors Are Switched to Transcriptional Agonists by cAMP. *Cancer Res* 1994; 54: 3868-77.
21. Chen C-C, Hardy DB, Mendelson CR. Progesterone receptor inhibits proliferation of human breast cancer cells via induction of MAPK phosphatase 1 (MKP-1/DUSP1). *J Biol Chem* 2011;286(50):43091-102.
22. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
23. 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;25(5):761-9.
24. Guillermo P. Progesterone Signaling to Chromatin in Breast Cancer Cells. Two Initial Cycles of Remodeling. *Advances in Rapid Sex-Steroid Action Advances in Rapid Sex-Steroid Action* 2012; 19-29.
25. Lee J. Effect of combined treatment with progesterone and tamoxifen on the growth and apoptosis of human ovarian cancer cells. *Oncol Rep* 2012; 27(1): 87-93.
26. Lee LR, Teng P-N, Nguyen H, Hood BL, Kavandi L, Wang G, et al. Progesterone enhances calcitriol antitumor activity by upregulating vitamin D receptor expression and promoting apoptosis in endometrial cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 2013;6(7):731-43.
27. Lu S. Transcriptional response to estrogen and progesterone in mammary gland identify network regulating p53 activity. *Endocrinology* 2008; 149(10): 4809-20.
28. Gao Z, Matsuo H, Nakago S, Kurachi O, Maruo T. p53 Tumor suppressor protein content in human uterine leiomyomas and its down-regulation by 17 beta-estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(8):3915-20.
29. Kester HA, Sonneveld E, van der Saag PT, van der Burg B. Prolonged progestin treatment induces the promoter of CDK inhibitor p21 Cip1,Waf1 through activation of p53 in human breast and endometrial tumor cells. *Exp Cell Res* 2003;284(2):264-73.
30. Formby B, Wiley TS. Progesterone inhibits growth and induces apoptosis in breast cancer cells: inverse effects on Bcl-2 and p53. *Ann Clin Lab Sci* 1998;28(6):360-9..

THE EFFECT OF PROGESTERONE ON P53 PROTEIN IN T47D CELL LINE

Robab Sheikhpour^{1*}, Javad Mohiti Ardekani²

Received: 11 Sep, 2014; Accepted: 21 Nov, 2014

Abstract

Background & Aims: Breast cancer is the most common cancer in women. Nearly 50% of breast cancers are dependent to sex hormones, and the effects of these hormones are mediated by their binding to specific receptors. Also p53 protein is mutated in about half of cancers including breast cancer and high level of p53 protein is a common feature of many human malignant cancers. Given that T47D cell line has estrogen and progesterone receptor and p53 protein is product of tumor suppressor gene. This article was devoted to the effect of progesterone on p53 protein in T47D cell line.

Materials & Methods: The breast cancer T47D cell line were grown in 25cm² flasks in DMEM with fetal bovine serum (FBS). Then cells were treated with different concentrations (1 nmol, 10 nmol and 20 nmol) of progesterone hormone. The level of proteins was measured by western blot method. Gene tool software was used for data analysis.

Results: There was no differences in p53 protein level in cells that were exposed to 1nmol of progesterone compared to the control group ($P>0.05$), but cells that were exposed to 10 and 20 nmol of progesterone treatment had lower level of p53 protein concentration than the control ($P<0.01$).

Conclusion: The result of this study showed that increased progesterone can reduce the level of p53 protein in T47D cell line. It seems progesterone with decreased level of p53 protein reduced accumulation of p53 protein in T47 cell line.

Keyword: T47D cell line Breast cancer, Progesterone, p53 protein

Address: No. 91, 17 Rahbar Allay, Rahbar Street, Chamran Avenue, Yazd, Iran

Tel: +989131522462

Email: R.Sheikhpour@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2014; 25(10): 960 ISSN: 1027-3727

¹ Department of Nursing, Yazd Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran (Corresponding Author)

² Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd Iran