DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.3.7

بررسی اثرات سایتوتوکسیک تستوسترون بر رده سلولی سرطان کولون (HCT) و ارزیابی فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹

ندا امانی[۱]، دکتر مهرداد شریعتی[۱]، دکتر رحیم احمدی[۲]*، دکتر سعید خاتم ساز [۱] و دکتر مختار مختاری[۱]

[۱] ایران، کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازورن، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

[۲] ایران، همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، دانشکده علوم پایه، گروه فیزیولوژی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۴

چکیده

مطالعات نشان داده اند که استروییدهای جنسی بر تکثیر سلولهای سرطانی در سطح سلولی و مولکولی تأثیرگذارند. این مطالعه به بررسی اثرات ضد تکثیری تستوسترون بر رده سلولی سرطان کلون (HCT) و ارزیابی فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ می پردازد. در این مطالعه آزمایشگاهی سلولهای HCT به گروه شاهد (عدم مواجهه با هورمون) و گروههای تیمار شده با غلظتهای ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی گرم/ میلی‌لیتر تستوسترون تقسیم بندی شدند. اثر سیتوتوکسیک هورمون با استفاده از سنجش MTT اندازه گیری شد. همچنین میزان فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ توسط کیت الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه (آزمون تعقیبی Tukey) و تی- تست بین گروهها مقایسه شدند. غلظتهای ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی گرم برمیلی لیتر تستوسترون سبب کاهش معنادار زنده مانی سلولهای HCT در مقایسه با گروه شاهد شد (P<۰/۰۰۱). مواجهه سلولهای سرطان کلون با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر هورمون تستوسترون باعث افزایش معنی دار در میزان فعالیت کاسپاز ۳ (P<۰/۰۰۱) و ۹ (P<۰/۰۵) در این سلولها نسبت به گروه کنترل شد، اما تغییر معنی داری بر میزان فعالیت کاسپاز ۸ ایجاد نکرد. یافته های این تحقیق نشان دادند که هورمون تستوسترون می تواند اثر سیتوتوکسیک بر سلولهای سرطانی کلون اعمال نماید و بخشی از این اثر حداقل از طریق افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ میانجی گری می شود.

واژه‌های کلیدی: تستوسترون، HCT، MTT ، کاسپاز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۶۱۲۰۳۵۳، پست الکترونیکی: drrahahmadi@yahoo.com

مقدمه

سرطان کولورکتال سومین سرطان شایع در دنیا بوده که سالانه ۱۲۰۰۰۰۰ نفر مبتلا به آن می شوند. این بیماری چهارمین عامل مرگ از سرطانها، بعد از سرطان پروستات، ریه و پستان در جهان محسوب می شود (۲۷). در سراسر دنیا این سرطان ۱۰ درصد از کل سرطانها در مردان و ۹/۴ درصد را در زنان تشکیل می دهد. خصوصیات اپیدمیولوژیک سرطان کولورکتال در نقاط مختلف دنیا متفاوت است (۳). در حالی که میزان بروز سالیانه این سرطان در شمال آمریکا و اروپا در حدود ۳۰-۵۰ مورد در صد هزار نفر گزارش می شود، این میزان در کشورهای خاورمیانه بین ۳ تا ۷ مورد در صد هزار برآورد می گردد. این بیماری با دارا بودن میزان بروز اختصاصی سنی معادل ۸/۱ در صد هزار مرد و ۷/۵ در صد هزار زن، به ترتیب مقام پنجم و سوم را در بین کل سرطانها داراست، ولی بروز آن در کشور و متعاقب آن اهمیت سرطان کولورکتال به عنوان یک مشکل سلامت عمومی به طور فزاینده ای در حال افزایش است (۹).

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.3.7

کاسپازها نوعی فعالیت سیستئین پروتئازی ویژه دارند، بدین نحو که یک سیستئین در جایگاه فعالشان به صورت نوکلئوفیل به پروتئین هدف حمله‌ور شده و آن را در محل باقیمانده اسیدآسپارتیک می شکند. این کاسپازها که آپوپتوز سلولی را القاء می کنند به طور کلی به دو دسته تقسیم می‌شوند کاسپازهای آغازگر شامل کاسپازهای ۲، ۸، ۹ و ۱۰ که جزء کاسپازهای بالادست بوده و کاسپازهای اجرایی شامل کاسپازهای ۳، ۶ و ۷ که جزء کاسپازهای پایین دست قرار می گیرند (۳۰). در روند آپوپتوز، کاسپازها فعال شده و روی سوبستراهای خود عمل کرده و سبب تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیک در سلول آپوپتوتیک می شوند. کاسپازها به صورت پروکاسپازهای غیر فعال سنتز می‌شوند. فعال سازی کاسپازها شامل دایمریزه شدن و اغلب اولیگومریزاسیون پروکاسپازها می باشد که به دنبال آن شکاف در یک زیر واحد کوچک و زیر واحد بزرگ اتفاق می افتد. زیر واحدهای بزرگ و کوچک برای ایجاد یک کاسپاز فعال هتروودایمر به یکدیگر می پیوندند (۲۹)، که در واقع کاسپازها به صورت فرم غیرفعال (پروآنزیم) ساخته شده و بعد از دریافت پیام مرگ سلولی به فرم فعال آنزیمی تبدیل می شوند. عمل اصلی کاسپازهای بالا دست (آغازگر) فعال کردن کاسپازهای پایین دست است و کاسپازهای پایین دست (اجرایی) مسئول تخریب پروتئینهای سلولی هستند (۲۸).

تستوسترون، از لحاظ فیزیولوژیکی یک اندروژن مهم در مردان و زنان است و نقش مهمی در توسعه اندامهای تولید مثلی در مردان دارد. تستوسترون از طریق گیرنده اندروژن NR3C4 (گیرنده هسته ای زیر گروه ۳، گروه C، عضو ۴) عمل می کند. این گیرنده یک فاکتور رونویسی متصل به DNA است که بیان ژن و سنتز پروتئین را تنظیم می کند و نقش مهمی در افزایش میزان پروتئین درون سلولی دارد. در پاسخ به سیگنالهای اندروژن، بافت گسترش می یابد و هر دو نیاز متابولیک پایه و مصرف انرژی افزایش می یابد. تستوسترون همچنین نقش مهمی در حفظ اسپرماتوژنز و باروری مردان دارد. در غیاب آن، فرآیند اسپرماتوژنز انجام نمی شود. علاوه بر این، سلولهای اسپرم بالغ به تستوسترون نیاز دارند تا از سلولهای سرتولی آزاد شوند. به طور گسترده در تحقیقات نشان داده شده است که تستوسترون از طریق انتقال دهنده گیرنده های اندروژن و اتصال به عنصر تنظیم کننده DNA خاص، رونویسی ژن را فعال می کند (۲۷). تاکنون تحقیقات بسیاری نقش هورمونهای جنسی مردانه، به خصوص تستوسترون را در سرطان مورد مطالعه و بررسی قرار داده اند. با این حال رابطه بین تستوسترون و سرطان نسبتاً ناشناخته است و نتایج تحقیقات در این زمینه بسیار ضد و نقیض می‌باشد. به طوری که برخی از مطالعات عنوان کرده اند که سطوح بالای تستوسترون خطر ابتلا به سرطان را افزایش می دهد (۱۰ و ۲۱). همچنین گروهی از محققین نشان دادند که هورمونهای جنسی زنانه می تواند اثرات محافظتی در برابر سرطان کلون داشته باشد در حالی که هورمونهای جنسی مردانه ممکن است به طور فعال سرطان کولون را توسعه دهد (۱). از طرف دیگر در مطالعه ای مشخص شده است که تستوسترون–آلبومین کونژوگه به گیرنده های اندروژن غشایی متصل شده و از طریق فعال سازی کاسپاز ۳ منجر به آپوپتوز می شوند. AKT کینازها زمانی که فسفریله می شوند تهاجم سلولهای سرطان روده بزرگ را افزایش می دهند. این کینازها بر اثر فعال سازی گیرنده های اندروژن غشایی دفسفریله می شوند در نتیجه تحرک و تهاجم سلولهای سرطان روده بزرگ را کاهش می دهند (۱۶ و ۲۷). همچنین در مطالعه بر روی سرطان پستان مشخص شده است تستوسترون بر رشد و نمو این سلولها اثر مهاری دارد (۱۵). نقش دقیق تستوسترون در سرطان کولون به خوبی شناخته نشده است و تعدادی از مطالعات متضاد روی رابطه بین تستوسترون و سرطان کولون منتشر شده است. بنابراین، تحقیقات بالینی طولانی مدت، مطالعات مولکولی و ژنتیکی برای تعیین نقش دقیق تستوسترون در این زمینه

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.3.7

ضروری است. بنابراین، با توجه به اهمیت نقش هورمون تستوسترون در سرطان کولون و عدم شناخت کافی از چگونگی عملکرد و مکانیسم اثر این هورمون در سطح سلولی و مولکولی به ویژه در خصوص اثرات آن بر فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در سلولهای سرطان کولون، این تحقیق در پی بررسی اثرات تستوسترون بر تکثیر رده سلولهای سرطان کولون (HCT) و ارزیابی فعالیت کاسپاز ۳، ۸ و ۹ در محیط کشت سلولی است.

مواد و روشها

در این تحقیق تجربی-آزمایشگاهی پودر خالص هورمون تستوسترون از شرکت دارویی ابوریحان تهیه شد. در ادامه ۱ میلی‌گرم پودر خالص هورمون تستوسترون در ۱ میلی‌لیتر حلال دی متیل سولفوکسید، ۱ میلی‌لیتر توین ۸۰ به اضافه ۷ میلی‌لیتر محلول نمکی بافر فسفات (PBS) حل شد. رقتهای مختلف از هورمون تستوسترون (۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱ ، ۱ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) در میکروتیوبهای استریل تهیه و از فیلتر سر سرنگی عبور داده شد و در نهایت از این رقتها برای تیمار رده سلولی سرطان کولون استفاده شد. سلولهای سرطان کلون از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه شدند و سلولها در شرایط استاندارد نگهداری شدند. سپس این سلولها در محیط کشت رشد کامل (RPMI 1640) دارای سرم گاوی جنینی و آنتی‌بیوتیکهای پنی‌سیلین و استرپتومایسین تحت اتمسفر ۹۵ درصد هوا و دی اکسیدکربن ۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد رشد یافتند. سلولهای سرطان کلون به دو گروه کنترل (شاهد) و دریافت کننده غلظت سیتوتوکسیک هورمون تستوسترون تقسیم شدند. گروه شاهد تحت هیچ گونه تیماری قرار نگرفت. جهت بررسی اثر سیتوتوکسیک تستوسترون بر سلولهای سرطانی از روش رنگ سنجی سنجش MTT استفاده شد. در این راستا شمارش سلولی با استفاده از تریپان بلو انجام شده و حدود ۱×۱۰^{۴} سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس، هورمون تستوسترون با رقتهای تهیه شده (۱۰، ۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر) به چاهکها اضافه و برای هر رقت هشت چاهک از هورمون در نظر گرفته شد، بنابراین ۸ بار تکرار تست برای هر رقت انجام گرفت. از طرفی یک ردیف به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد که تستوسترون به آن اضافه نشد این گروه فقط شامل سلولها و محیط و FBS می باشد. سپس سلولها به مدت ۲۴ ساعت دیگر با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس سلولها و محیط کشت از چاهکها خارج گردید. در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت (۰/۰۵ mg/well) در تاریکی به پلیتها اضافه شد. پلیتها در فویل آلومینیوم پیچیده شدند و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. محیط رویی حاوی MTT از چاهکها حذف شد و به کریستال فورمازان باقی مانده از MTT هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر ماده DMSO اضافه و بعد از پوشاندن چاهکها، (جلوگیری از رسیدن نور) به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شدند. در نهایت جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر (DNM-9602G) خوانده شد.

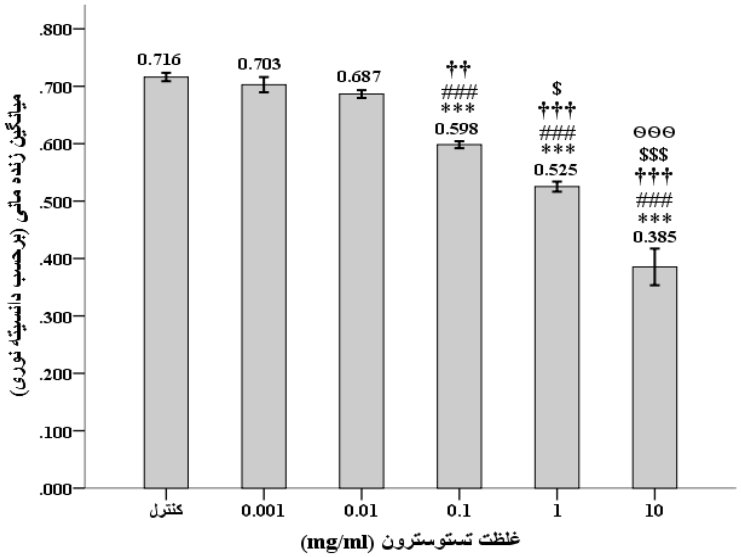
فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ با استفاده از کیت آزمایشگاهی رنگ سنج ApoTarget (Abnova، تایوان) با توجه به دستورالعملهای تولید کننده تعیین شد. به طور خلاصه، سلولها با غلظتهای کشنده تستوسترون تیمار شدند و به طور همزمان گروه کنترل کشت داده شدند. سلولها شمارش شدند و در پلیت با تراکم $۱۰^{۶}\times$ ۵-۳ سلول در هر نمونه قرار گرفتند و متعاقباً در ۵۰ میکرولیتر از بافر لیز سلولی سرد مجدداً ترکیب شده و بر روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند و برای یک دقیقه در یک میکروسانتریفیوژ مورد سانتریفیوژ قرار گرفتند. سوپرناتانت (عصاره سیتوزول) به یک لوله تازه اضافه و روی یخ قرار داده شد. هر عصاره سیتوزولی به غلظت ۵۰-۲۰۰ میکروگرم پروتئین در ۵۰ میکرولیتر بافر لیزسلولی رقیق

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.3.7

شد. تعداد نمونه‌ها برای اندازه گیری تعیین شدند و به اندازه کافی بافر واکنشی اضافه گردید. برای هر نمونه ۵۰ میکرولیتر از بافر واکنشی اضافه شد. سپس ۵ میکرولیتر سوبسترای ۴ میلی‌مولار اضافه شد و به مدت ۱-۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. نمونه ها در حین انکوباسیون در تاریکی نگه داشته شدند. در نهایت نمونه‌ها در یک خواننده میکروپلیت در طول موج ۴۰۰ نانومتر یا ۴۰۵ نانومتر خوانده شدند و میزان فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ با مقایسه مستقیم با میزان کنترل تعیین شد. جهت بررسیهای آماری، ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرونوف توزیع طبیعی داده ها مورد بررسی قرار گرفت و پس از حصول از طبیعی بودن توزیع داده ها، اطلاعات مربوط به اثر سیتوتوکسیک تستوسترون با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) و داده های مربوط به فعالیت کاسپازها با استفاده از آزمون تی-تست (Student's t-test) در نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. اختلاف بین گروهها در سطح $\alpha<0/05$ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

شکل ۱ بیانگر اثرات غلظتهای مختلف تستوسترون بر میانگین زنده مانی رده سلولهای HCT می باشند.



شکل ۱- مقایسه اثرات غلظتهای مختلف تستوسترون بر زنده‌مانی رده سلولهای HCT. داده ها به صورت "میانگین ± انحراف معیار" نشان داده شده‌اند. * بیانگر معناداری نسبت به گروه کنترل، # بیانگر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده ۰/۰۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تستوسترون، † بیانگر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده ۰/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تستوسترون، $ بیانگر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی-لیتر تستوسترون و Θ بیانگر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تستوسترون است. (***:P<0.001) ، (###:P<0.001) ، (†††:P<0.001 ، ††:P<0.01) ، ($$$:P<0.001 ، $:P<0.05) ، (ΘΘΘ:P<0.001)

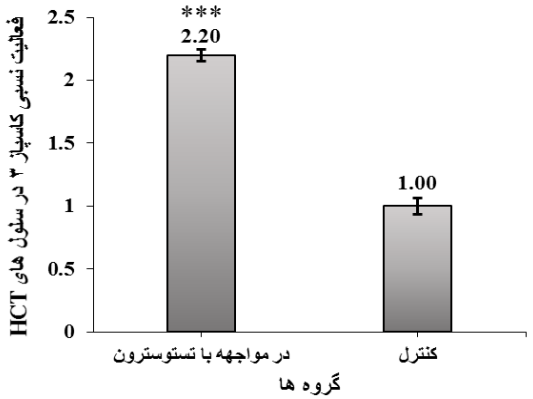
با توجه به نتایج مندرج در شکل ۱، اختلاف معنی داری بین تیمار های ۰/۰۰۱ و ۰/۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر تستوسترون با گروه کنترل مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در مقابل، در بررسی میانگین زنده مانی سلولهای HCT در گروه دریافت کننده ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تستوسترون، کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. همچنین در گروههای دریافت کننده ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تستوسترون، کاهش معناداری در میانگین زنده مانی سلولهای HCT نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.

شکلهای ۲، ۳ و ۴ به ترتیب نشان دهنده نمودارهای مربوط به درصد فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در سلولهای سرطان

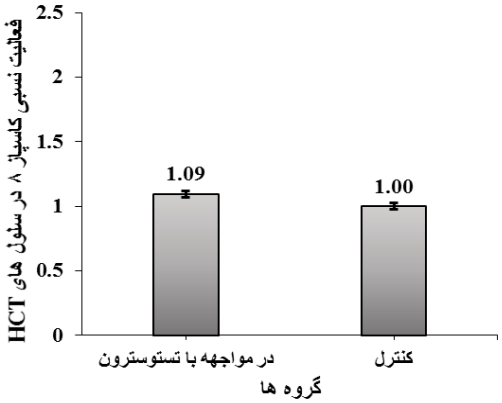
DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.3.7

کولون تحت تأثیر ۱ میلی گرم بر میلی لیتر هورمون تستوسترون می باشند.

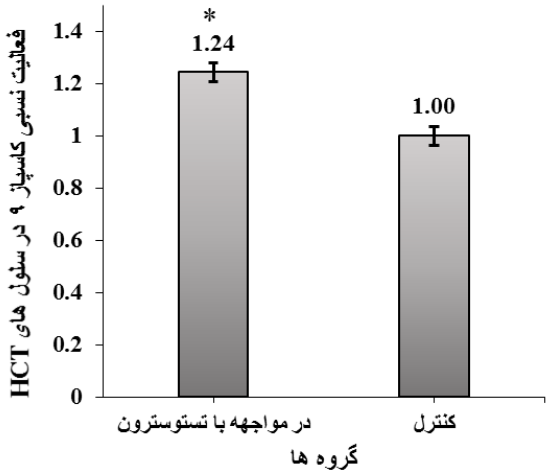
مطابق شکلهای ۲ و ۴، مواجهه سلولهای سرطان کولون با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر هورمون تستوسترون باعث افزایش معنی دار در میزان فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ در این سلولها نسبت به گروه کنترل شد (به ترتیب در P <۰/۰۰۱ و P < ۰/۰۵). مطابق شکل ۳، مواجهه سلولهای سرطان کولون با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر (دز IC50) هورمون تستوسترون باعث افزایش معنی داری در میزان فعالیت کاسپاز ۸ در این سلولها نسبت به گروه کنترل نشد.



شکل ۲- نمودار مربوط به بررسی اثر تستوسترون بر میزان فعالیت کاسپاز ۳ در سلولهای HCT. داده ها به صورت "میانگین ± انحراف معیار" نشان داده شده‌اند. *** بیانگر معناداری نسبت به گروه کنترل با P<۰/۰۰۱ است.



شکل ۳- نمودار مربوط به بررسی اثر تستوسترون بر میزان فعالیت کاسپاز ۸ در سلولهای HCT. داده ها به صورت "میانگین ± انحراف معیار" نشان داده شده‌اند.



شکل ۴- نمودار مربوط به بررسی اثر تستوسترون بر میزان فعالیت کاسپاز ۹ در سلولهای HCT. داده ها به صورت "میانگین ± انحراف معیار" نشان داده شده‌اند. * بیانگر معناداری نسبت به گروه کنترل با P<۰/۰۵ است.

بحث

مطابق نتایج حاصل از این پژوهش، غلظتهای ۰/۰۰۱ و ۰/۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر هورمون تستوسترون اثر معناداری بر کاهش زنده مانی سلولهای سرطانی HCT نداشته اند، اما مواجهه با غلظتهای ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر هورمون تستوسترون به طور معنی داری اثر ضدتکثیری بر سلولهای سرطانی HCT دارند. بر این اساس غلظت بالای تستوسترون اثر مهاری بر تکثیر سلولهای سرطانی HCT داشته اند.

همسو با یافته‌های تحقیق حاضر، دیگر مطالعات نیز نشان می‌دهند که تستوسترون دارای اثرات مهاری بر روی تکثیر و رشد سلولهای مختلف سرطانی از جمله سرطان مغز، کولون و کلیه می باشد. محققین توسط تست MTT نشان دادند که مواجهه رده سلولی سرطان مغز (A172)، کلون (HT29) و کلیه (HEK293) با دزهای توکسیک تستوسترون در محیط کشت، به طور معنی داری باعث کاهش زنده مانی سلولهای سرطانی می شود (۸). در یک آزمایش in vitro، اثر تستوسترون بر روی رده سلولهای لیدیک (TM3) بررسی شده و نتایج نشان داده که

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.3.7

تستوسترون در دز ۱۰۰ نانومول اثرات محافظتی بر روی سلولهای لیدیک داشته و باعث کاهش گونه های فعال اکسیژن (ROS) و پراکسیداسیون لیپید می شود، اما اثرات سمی تستوسترون بر روی این رده سلولی در دزهای بالای ۵۰۰ نانومول مشاهده شد (۱۸). برخی تحقیقات بیانگر این موضوع بوده که هورمونهای استرویید مردانه سبب تحریک تکثیر سلولهای سرطانی آدنومایی می شوند (۱۳). در مقابل، نتایج تحقیقات اخیر، بیانگر اثر مهاری تستوسترون بر رشد و نمو سلولهای سرطانی غده پستان است (۱۵). بررسیها نشان می دهد در سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) غیر طبیعی بودن سنتز و ترشح اندروژنهای تستوسترون و آندرستون دیون (androstenedione) احتمالاً علت این سندرم باشد. شواهد روشنی از ترشح زیاد آندروژن توسط سلول تکای تخمدان و اختلال در تولید اندروژن غده آدرنال وجود دارد (۲۵). مطالعه دیگری نشان می دهد که سطوح افزایش یافته تستوسترون احتمالاً با خطر افزایش یافته سرطان ریه و خطر سرطان پروستات مرتبط است اما برای سرطان کولون این چنین نیست و مطالعه بر روی مردان نشان می دهد که ارتباطی بین سطوح تستوسترون و خطر سرطان کولورکتال وجود ندارد (۱۹). در کل با توجه به نتایج این پژوهش، تستوسترون در دزهای کمتر، دارای اثرات محافظتی یا تکثیری بر سلولهاست، اما در دزهای بالاتر دارای اثرات سیتوتوکسیک می باشد.

در این مطالعه اثرات غلظت سیتوتوکسیک تستوسترون بر میزان فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در رده سرطانی کولون بررسی گردید. یافته ها نشان داد مواجهه سلولهای HCT با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر تستوسترون باعث افزایش معنی دار در میزان فعالیت کاسپاز ۳ ($P < ۰/۰۰۱$) و کاسپاز ۹ ($P < ۰/۰۵$) در این سلولها نسبت به گروه کنترل گردید ولی تغییر معنی داری را در میزان فعالیت کاسپاز ۸ ایجاد نکرد.

آپوپتوز یک نوع از مرگ سلولی کنترل شده است که با انقباض سلولی، قطعه قطعه شدن DNA و تراکم کروماتین مشخص می شود. آپوپتوز با فعال سازی سلولی کاسپازهای خانواده سیستئین پروتئاز همراه است. کاسپاز ۳ فاز اجرای چرخه آپوپتوز را میانجی گری می کند. پس از فعال شدن کاسپاز ۳، پروتئین کیناز C δ-(PKC) به وسیله پروتئولیتیک تجزیه می شود و در نتیجه فعال شدن آن در داخل سیتوزول مرگ سلولی اتفاق می افتد (۲۰). در پژوهشی نشان دادند که تیمار سلولهای دوپامینرژیک (N27) با تستوسترون و دی هیدروتستوسترون باعث فعال سازی کاسپاز ۳ و در نتیجه تجزیه PKCδ شده و آپوپتوز را در این رده سلولی القاء می کنند (۵).

در مطالعه ای نشان داده شده است که برداشتن بافت سرطانی در سرطان کولورکتال (DCC) به طور مستقل از مسیر وابسته به میتوکندری و مسیر مرگ گیرنده/ کاسپاز ۸ منجر به مرگ سلول می شود. علاوه بر این، این مطالعه نشان داده است که DCC هم با کاسپاز ۹ و هم با کاسپاز ۳ همکاری می کند و فعال سازی کاسپاز ۳ از طریق کاسپاز ۹ بدون نیاز به سیتوکروم C یا Apaf-1 صورت می گیرد. بنابراین، DCC به عنوان مسیر اضافی برای فعال سازی کاسپاز مستقل از آپوپتوزوم تعریف می شود (۱۱). مطالعه دیگری بر روی سلولهای سرطانی کولون در انسان نشان داد که سلولهای بیان کننده COX-2 به میزان زیاد نسبت به سلولهای والد، فعال سازی کاسپاز و سیتوکروم C کاهشی را نشان می دهند. NSAIDs (Non-steroidal anti-inflammatory drugs) و FU-5 (5-fluorouracil) رهاسازی میتوکندریایی سیتوکروم C همچنین فعال سازی کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ و به میزان کمتر کاسپاز ۸ را القاء می کنند (۳۱).

در مقابل با یافته های این تحقیق، در آزمایشی نشان داده شد که میزان بیان و فعال سازی کاسپازهای ۳ و ۶ در رتهای عقیم شده افزایش یافته و تجویز تستوسترون به این

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.3.7

رتها باعث کاهش بیان و فعال سازی این کاسپازها شده است. اما در موافقت با یافته های تحقیق حاضر، آنها نیز مشاهده کردن که بیان و فعال سازی کاسپاز ۸ در مواجهه با تستوسترون تغییری نمی کند (۲۳). بر اساس تحقیق دیگری گرچه دهیدرواپی اندروسترون دارای اثر ضد آپوپتوزی بر سلولهای سرطانی کولون است، اما تستوسترون موجب مقابله با این اثر در این سلولها می گردد (۲).

اندروژنها بر اساس سیستم و غلظت اندروژنهای مورد مطالعه دارای اثرات محافظتی (۲۲) و یا اثرات سمی (۱۴) هستند. علاوه بر این، اندروژنها می توانند مسیرهای مختلف سلولی مانند مسیر ERK / MAPK را که در محافظت از عصب (۲۶) دخیل هستند فعال کنند. از طرف دیگر، نشان داده شده است که سطح فیزیولوژیکی اندروژنها باعث افزایش آپوپتوز در سلولهای پروستات (۱۴) و سلولهای مخلوط کورتیکال در حضور مهار کننده آروماتاز می شوند (۲۴). متابولیتهای مختلف اندروژن یا فعال کردن گیرنده های آندروژن غشایی یا درون سلولی ممکن است این اثرات متفاوت را توضیح دهند. تستوسترون می تواند به وسیله آروماتاز به استرادیول یا از طریق آنزیم، آلفا۵–ردوکتاز (۶) به دی هیدروتستوسترون تبدیل شود. به طور مداوم نشان داده شده است که استروژن از عصب حفاظت کرده (۴) و گزارش شده است آپوپتوز دوپامینرژیک را در موشهای فاقد آروماتاز افزایش می دهد (۱۷). این مطالعات نشان می دهد که مکانیسمهای آندروژنی به فرآیند آپوپتوز کمک می کنند.

از نظر مکانیسم احتمالی اثر تستوسترون بر تکثیر سلولهای سرطانی کولون، با توجه به مطالعات پیشین، می توان چنین پنداشت که غلظت پایین تر تستوسترون سبب فعال شدن گیرنده های غیرکلاسیک (گیرنده های غشایی) آندروژنی شده (۱۲) و این امر سبب فعال شدن مسیر غیرژنومی در تکثیر سلولی شده و در نتیجه باعث تکثیر سلولهای سرطانی می شود، اما غلظتهای بالاتر تستوسترون از طریق گیرنده های سیتوزولی موجب تحریک مسیر آپوپتوز شده (۳۲) و بدین ترتیب سبب مهار تکثیر سلولهای سرطانی می شوند. در مجموع و با توجه به نتایج بررسیهای پیشین، دز سیتوتوکسیک تستوسترون فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ را متأثر می سازد اگرچه که در این مطالعه تنها کاسپازهای ۳ و ۹ سطح معنی داری داشتند. با توجه به مکانیسمهای داخلی و خارجی مسیر آپوپتوزی (۷) احتمالاً تستوسترون از طریق فعال سازی مسیر داخلی آپوپتوز فعالیت کاسپاز ۹ را متأثر ساخته است و اثری بر روی مسیر خارجی و فعال سازی کاسپاز ۸ نداشته است.

نتیجه گیری

یافته های این تحقیق نشان دادند که غلظتهای بالای هورمون تستوسترون می تواند اثر سیتوتوکسیک بر سلولهای سرطانی کلون اعمال نماید و سبب القای آپوپتوز در سلولهای سرطانی کلون گردد که بخشی از این اثر حداقل از طریق افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ میانجی گری می‌شود و احتمالاً سبب فعال سازی کاسپاز آغازگر مسیر داخلی آپوپتوز شده، اما اثری بر کاسپاز آغازگر مسیر خارجی ندارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه دکترا مصوب دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون می باشد. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون جهت پشتیبانی این پژوهش تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1- Amos-Landgraf JM, Heijmans J, Wielenga MC, Dunkin E, Krentz KJ, Clipson L, et al. 2014. Sex disparity in colonic adenomagenesis involves promotion by male hormones, not

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.3.7

protection by female hormones. Proceedings of the National Academy of Sciences. 111(46):16514-16519.

2- Anagnostopoulou V PI, Alkahtani S, Alarifi SA, Schmidt EM, Lang F, et al. 2013. Differential effects of dehydroepiandrosterone and testosterone in prostate and colon cancer cell apoptosis: the role of nerve growth factor (NGF) receptors. Endocrinology. 154(7):2446-56.

3- Ansari R, Mahdavinia M, Sadjadi A, Nouraie M, Kamangar F, Bishehsari F, et al. 2006. Incidence and age distribution of colorectal cancer in Iran: results of a population-based cancer registry. Cancer Lett. 240(1):143-7.

4- Bains M, Cousins JC, and Roberts JL. 2007. Neuroprotection by estrogen against MPP+-induced dopamine neuron death is mediated by ERα in primary cultures of mouse mesencephalon. Experimental neurology. 204(2):767-776 .

5- Cunningham RL, Giuffrida A, and Roberts JL. 2009. Androgens induce dopaminergic neurotoxicity via caspase-3-dependent activation of protein kinase Cδ. Endocrinology. 150(12):5539-5548 .

6- Edinger KL and Frye CA. 2005. Testosterone's anti-anxiety and analgesic effects may be due in part to actions of its 5α-reduced metabolites in the hippocampus. Psychoneuroendocrinology. 30(5):418-430 .

7- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic pathology. 35(4):495-516.

8- Farahmandlou N, Oryan S, Ahmadi R, and Eidi A. 2017. Association of testosterone with colorectal cancer (ht29), human glioblastoma (a172) and human embryonic kidney (hek293) cells proliferation. Acta Endocrinologica (1841-0987). 13(2): 144–149.

9- Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, and Wang HL. 2012. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. Journal of gastrointestinal oncology. 3(3):153-173.

10- Fogh J FJ, Orfeo T. 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. J Natl Cancer Inst. 59(1):221-6 .

11- Forcet C, Ye X, Granger L, Corset V, Shin H, Bredesen DE, et al. 2001. The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 98(6):3416-3421 .

12- Fu R, Liu J, Fan J, Li R, Li D, Yin J, et al. 2012. Novel evidence that testosterone promotes cell proliferation and differentiation via G protein-coupled receptors in the rat L6 skeletal muscle myoblast cell line. Journal of cellular physiology. 227(1):98-107.

13- G. P. 2015. Colorectal cancer: male hormones increase the incidence of colonic adenomas. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 12(1):4 .

14- Gavrielides MV, Gonzalez-Guerrico AM, Riobo NA, and Kazanietz MG. 2006. Androgens regulate protein kinase Cδ transcription and modulate its apoptotic function in prostate cancer cells. Cancer research. 66(24):11792-11801 .

15- Glaser R DC. 2015. Testosterone and breast cancer prevention. Maturitas. 15(00701-X):0378-5122 .

16- Gu S, Papadopoulou N, Gehring E-M, Nasir O, Dimas K, Bhavsar SK, et al. 2009. Functional membrane androgen receptors in colon tumors trigger pro-apoptotic responses in vitro and reduce drastically tumor incidence in vivo. Molecular cancer. 8(1):114 .

17- Hill RA, Pompolo S, Jones ME, Simpson ER, and Boon WC. 2004. Estrogen deficiency leads to apoptosis in dopaminergic neurons in the medial preoptic area and arcuate nucleus of male mice. Molecular and Cellular Neuroscience. 27(4):466-476 .

18- Hwang TIS, Liao T-L, Lin J-F, Lin Y-C, Lee S-Y, Lai Y-C, et al. 2011. Low-dose testosterone treatment decreases oxidative damage in TM3 Leydig cells. Asian journal of andrology. 13(3):432-437.

19- Hyde Z, Flicker L, McCaul KA, Almeida OP, Hankey GJ, Chubb SP, et al. 2012. Associations between testosterone levels and incident prostate, lung, and colorectal cancer. A population-based study. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers. 21(8):1319-29.

20- Kanthasamy AG, Kitazawa M, Kanthasamy A, and Anantharam V. 2003. Role of proteolytic activation of protein kinase Cδ in oxidative stress-induced apoptosis. Antioxidants and Redox Signaling. 5(5):609-620 .

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.3.7

21- Kita Y MS, Baba K, Uchikado Y, Arigami T, Idesako T, et al. 2015. Mucinous adenocarcinoma emerging in sigmoid colon neovagina 40 years after its creation: a case report. World J Surg Oncol. 13:213.

22- Nguyen TVV, Yao M, and Pike CJ. 2005. Androgens activate mitogen-activated protein kinase signaling: Role in neuroprotection. Journal of neurochemistry. 94(6):1639-1651 .

23- Omezzine A, Mauduit C, Tabone E, Nabli N, Bouslama A, and Benahmed M. 2003. Caspase–3 and -6 Expression and Activation Are Targeted by Hormone Action in the Rat Ventral Prostate During the Apoptotic Cell Death Process. Biology of Reproduction. 69(3):752-760.

24- Orlando R, Caruso A, Molinaro G, Motolese M, Matrisciano F, Togna G, et al. 2007. Nanomolar concentrations of anabolic–androgenic steroids amplify excitotoxic neuronal death in mixed mouse cortical cultures. Brain research. 1165:21-29 .

25- Pasquali R S-VE, Ylidiz B, Duleba A, et al. 2011. PCOS Forum: research in polycystic Ovary syndrome today and tomorrow. Clinical Endocrinology. 74(4):424-433 .

26- Ramsden M, Shin T, and Pike C. 2003. Androgens modulate neuronal vulnerability to kainate lesion. Neuroscience. 122(3):573-8.

27- Roshan MHK, Tambo A, and Pace NP. 2016. The role of testosterone in colorectal carcinoma: pathomechanisms and open questions. The EPMA journal. 7(1):22-22.

28- Sharifi AM, Eslami H, Larijani B. 2010. Evaluation of the role of the intrinsic pathway of apoptosis in cell death induced by high concentrations of glucose in PC12 cells. Iranian Journal of Diabetes and Metabolism. 9(4):326-334. [Persian article]

29- Shi Y. 2004. Caspase Activation. Cell. 117(7):855-858.

30- Shi Y. 2002. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. Molecular Cell. 9(3):459-470.

31- Sun Y, Tang XM, Half E, Kuo MT, and Sinicrope FA. 2002. Cyclooxygenase-2 overexpression reduces apoptotic susceptibility by inhibiting the cytochrome c-dependent apoptotic pathway in human colon cancer cells. Cancer research. 62(21):6323-6328 .

32- Verzola D, Gandolfo MT, Salvatore F, Villaggio B, Gianiorio F, Traverso P, et al. 2004. Testosterone promotes apoptotic damage in human renal tubular cells. Kidney international. 65(4):1252-1261 .

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.3.7

The Cytotoxic Effects of Testosterone on Colorectal Cancer (HCT) cells and evaluation of the caspase-3, -8 and -9 activity

Amani N.[1], Shariati M.[1], Ahmadi R.[2*], Khatamsaz S.[1] and Mokhtari M.[1]

[1] Dept. of Biology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Physiology, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, I.R. of Iran; Avicenna International College, Budapest, Hungary.

Abstract

The studies have shown that sex steroids affected cancer cells at the cellular and molecular level. The aim of this study was to investigate the anti-proliferation effects of testosterone on colorectal cancer (HCT) cell lines and caspase-3, -8 and -9 activity level. In this laboratory-experimental study, cells were divided into control group (no exposure to hormone) and groups exposed to 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 mg/ml of testosterone. The cytotoxic effect of the extract was measured using MTT assay method. Caspase-3, -8 and -9 activity level was evaluated by ELISA method. The data were statistically analyzed between groups using student's t-test and ANOVA (Tukey). 0.1, 1 and 10 mg/ml of testosterone significantly reduced the viability of HCT cells compared to the control group ($P<0.001$). Exposure of colorectal cancer cells to 1 mg/ml of testosterone significantly increased the activity level of caspase-3 ($P<0.001$) and -9 ($P<0.05$) compared to control group, but no significant change was observed in the activity level of caspase -8. The findings of this study showed that testosterone can exert cytotoxic effects on colorectal cancer (HCT) and this effect is at least partly mediated by caspase-3 and -9.

Key words: Testosterone, HCT, MTT, Caspase