

# Meme Kanserinde Tamoksifen Direncinde IL-6/STAT3 Yolağı Temelli EMT Mekanizmasının Rolünün Araştırılması

Investigating the Role of IL-6/STAT3 Pathway Mediated EMT Mechanism in Tamoxifen Resistance of Breast Cancer

Ahmet Yasir Men<sup>1</sup>, Erhan Bezdegumeli<sup>1</sup>, Gamze Guney Eskiler<sup>2\*</sup>, Merve Nur Ince<sup>1</sup>, Asuman Devci Ozkan<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Sakarya, Türkiye

<sup>2</sup> Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Sakarya, Türkiye

Yazışma Adresi / Correspondence:

**Gamze Güney Eskiler**

Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Korucuk, Adapazarı, Sakarya, Türkiye

T: +90 264 295 43 08

E-mail: [gamzeguney@sakarya.edu.tr](mailto:gamzeguney@sakarya.edu.tr)

Geliş Tarihi / Received: 09.04.2021 Kabul Tarihi / Accepted: 31.01.2022

Orcid :

Ahmet Yasir Men <https://orcid.org/0000-0002-1981-4587>

Erhan Bezdegumeli <https://orcid.org/0000-0002-5798-2186>

Gamze Guney Eskiler <https://orcid.org/0000-0002-2088-9914>

Merve Nur Ince <https://orcid.org/0000-0003-2884-5542>

Asuman Devci Ozkan <https://orcid.org/0000-0002-3248-4279>

(Sakarya Tıp Dergisi / Sakarya Med J 2022, 12(1):52-57) DOI: 10.31832/smj.912495

## Öz

Amaç	Tamoksifen östrojen reseptörlerine seçici bir şekilde bağlanarak anti-östrojenik etki gösteren ve östrojen reseptörü pozitif (ER+) meme kanseri hastalarının endokrin tedavisinde kullanılan bir ajandır. Epitelyal mezenkimal transizyon (EMT) mekanizmasının ER+ meme kanserinde ilaç direnci gelişiminde kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu kapsamda mevcut çalışmada ilk kez iki farklı şekilde geliştirilen tamoksifen dirençli meme kanseri hücre gruplarında (R1 ve R2) parental MCF-7 hücreleri ile karşılaştırılarak IL-6/STAT3 temelli EMT aktivitesinin gen ekspresyon düzeyinde araştırılması amaçlanmıştır.
Yöntem ve Gereçler	Mevcut çalışmada MCF7 ve dirençli R1 ve R2 hücrelerinde tamoksifenin sitotoksik etkisi WST-1 analizi ile belirlendikten sonra, her bir hücre grubunda IL-6, STAT3 ve E-Kaderin genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişimler RT-PCR ile analiz edilmiştir.
Bulgular	WST-1 analizi sonucuna göre 48 saat boyunca 1 µM tamoksifen uygulanan MCF-7, R1 ve R2 hücrelerinde canlılık oranlarının sırasıyla %32.0, %119.7 ve %91.9 olarak belirlenmiştir ve R1 ve R2 hücrelerinin sırasıyla 1 µM tamoksifene karşı 3.7 ve 2.9-kat dirençli olduğu tespit edilmiştir. Gelişen tamoksifen direncine bağlı olarak MCF-7 hücrelerine kıyasla E-Kaderin ekspresyon düzeylerinin R1 ve R2 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir (p<0.01). Ayrıca, artan tamoksifen konsantrasyonuna bağlı olarak R1 hücrelerinde IL-6 ekspresyon düzeyi daha yüksek iken, R2 hücrelerinde STAT3 mRNA düzeyinin daha yüksek olduğu analiz edilmiştir (p<0.01).
Sonuç	R1 hücrelerinde R2 hücrelerine göre E-kaderin ekspresyonunun daha az olduğu ve dolayısıyla EMT aktivitesinin daha yüksek olabileceği belirlenmiştir. Ancak, EMT mekanizmasını düzenleyen ve direnç gelişiminde potansiyel role sahip olabilecek TGFβ/SMAD2 veya WNT/GSK3β/β-Catenin gibi diğer sinyal yollarının araştırılması ve EMT aktivitesinde değişimlerin aydınlatılmasına yönelik detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.
Anahtar Kelimeler	Meme Kanseri; Tamoksifen; IL-6; STAT3; Epidermal Mezenkimal Transizyon

## Abstract

Introduction	Tamoxifen is a selective estrogen receptor modulator used as an antiestrogen endocrine therapy agent in the treatment of estrogen-receptor-positive (ER+) breast cancer patients. Epithelial mesenchymal transition (EMT) mechanism plays a crucial role in the development of drug resistance in ER+ breast cancer. In this context, the aim of the current study was to identify IL-6/STAT3-mediated EMT activity in two different groups of tamoxifen-resistant breast cancer cells (R1 and R2) and parental MCF-7 cells.
Materials and Methods	The cytotoxic effect of tamoxifen on MCF-7 and R1 and R2 resistant cells was analyzed by WST-1 analysis. Changes in the expression levels of IL-6, STAT3, and E-cadherin genes were determined by RT-PCR.
Results	WST-1 analysis results showed that the viability rates of MCF-7, R1, and R2 cells treated with 1 µM tamoxifen for 48 h were 32.0%, 119.7%, and 91.9%, respectively and 3.7- and 2.9-fold resistant to 1 µM tamoxifen was detected in R1 and R2 cells, respectively. E-cadherin expression levels in R1 and R2 cells significantly decreased (p<0.01). Moreover, IL-6 expression level was higher in R1 cells, whereas STAT3 mRNA level was higher in R2 cells (p<0.01).
Conclusion	It was determined that the expression of E-cadherin was lower in R1 cells compared to R2 cells and therefore EMT activity may be higher in R1 cells. However, further studies are required to investigate signaling pathways such as TGF-β/SMAD2 or WNT/GSK3-β/β-catenin that regulate the EMT mechanism and play a role in resistance development.
Keywords	Breast Cancer; Tamoxifen; IL-6; Epidermal Mesenchymal Transition

## GİRİŞ

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen farklı patolojik ve moleküler karakteristik özelliklere sahip heterojen bir kanser tipidir.<sup>1</sup> İmmünohistokimyasal belirteçlere dayanarak meme kanseri östrojen reseptörü [ER], progesteron reseptörü [PR] ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 [HER2] varlığına göre 4 temel alt tipe ayrılmaktadır. Meme kanseri tedavi seçenekleri arasında mastektomi, meme koruyucu cerrahi, radyoterapi ve adjuvan sistemik tedaviler (kemoterapi, hormon tedavi vs.) yer almaktadır. Erken evre meme kanseri tanısı alan ER+, PR+/- ve HER2- hastalarda adjuvan sistemik tedavi stratejileri içerisinde selektif östrojen reseptör modülatörleri (SERM)'ler, aromataz inhibitörleri gibi endokrin tedavi östrojeni bloke ederek proliferasyonun baskılanmasını sağlamaktadır.<sup>2,3</sup>

Tamoksifen östrojen reseptörlerine seçici bir şekilde bağlanarak anti-östrojenik etki gösteren ve meme kanseri endokrin tedavisinde kullanılan bir ajandır.<sup>4</sup> Bir selektif östrojen reseptör modülatörü (SERM) olarak tamoksifen, meme dokusunda östrojenin reseptörlerine bağlanmasını engelleyerek anti-östrojenik etki göstermesine rağmen, kemik doku ve kardiyovasküler sistemde parsiyel agonistik etki sergilemektedir.<sup>5,6</sup> Ayrıca, tamoksifen başlangıçta ER+ hastalarının çoğunda etkili olmasına rağmen, hastalarda tamoksifene karşı gelişen direnç metastaz ve nüks oranlarında artışa neden olmasından dolayı tedavinin başarısını kısıtlamaktadır. Bu nedenle tamoksifen direnci gelişmesine neden olan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasını hedefleyen çalışmalar önem kazanmaktadır.<sup>7-10</sup>

Epitelyal Mezenkimal Transizyon (EMT) tümör mikro-çevresinde bulunan otokrin/endokrin büyüme faktörleri (FGF, TGF-B, EGF) ve sitokinler (TNF-a, IFN-y, IL-10, IL-6) aracılığı ile indüklenen ve kanser hücrelerinin metastatik özellik kazanmasında temel rol alan bir mekanizmadır.<sup>11</sup> Bu süreçte epitelyal kanser hücreleri hücre adherens bağlantılarını sağlayan Notch, NF-kB, Wnt/ $\beta$ -katenin ve PI3K/Akt gibi hücre içi sinyal yollarının aktivitesindeki değişimlere bağlı E-kaderinin transkripsiyonunun baskı-

lanması sonucunda N-kadherin, vimentin ve fibronektin eksprese eden mezenkimal türevlerine dönüşmektedir.<sup>12-15</sup>

İnterlökin 6 (IL-6) tümör mikroçevresinde ve kanser hastalarında sistemik olarak yüksek seviyede bulunan bir sitokindir. IL-6 çeşitli kanser türlerinde (akciğer, meme, gastrik) tümör stroması ile etkileşime girerek, metastaz gelişmesinde rol alan metalloproteinaz aktivitesinin yanı sıra kanser kök hücrelerinin proliferasyonunu arttırarak ilaç direnci gelişmesine ve kötü prognoza neden olmaktadır.<sup>16-19</sup> Ayrıca, meme kanserinde IL-6 ve IL-6R (İnterlökin 6 reseptörü) temelli JAK2/STAT3 sinyal yolağının aktivitesinde değişimlerin EMT aktivitesine neden olduğu belirlenmiştir.<sup>20,21</sup> Diğer yandan, sinyal transdüktör ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3) ekspresyon düzeyinde artışın tamoksifen direncinin gelişmesinde önemli bir rol aldığı ve dirençli hücrelerde fosfo-STAT3 ekspresyon düzeyinin tamoksifen duyarlı MCF7 hücrelerine göre anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir.<sup>22,23</sup> Literatürde, meme kanserinde EMT mekanizması ile ilişkili olarak IL-6 ve STAT3 ekspresyon seviyesinde değişimlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar olmasına rağmen, tamoksifen dirençli hücrelerde IL-6/STAT3 temelli EMT mekanizmasının aktivitesinde değişimlerin belirlenmesine yönelik bir çalışma henüz bulunmamaktadır.

Bu kapsamda, mevcut çalışmada iki farklı şekilde tamoksifen direnci geliştirilen hücrelerde MCF7 meme kanseri parental hücreleri ile karşılaştırmalı olarak tamoksifen direncinde IL-6/STAT3 temelli EMT mekanizmasının rolünün aydınlatılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEMLER

### Hücre Kültürü

MCF-7 parental hücreleri ve önceki çalışmamız kapsamında geliştirilen R1 (3 ay boyunca sabit 1  $\mu$ M tamoksifen uygulanan hücreler) ve R2 (3 ay boyunca 0.1  $\mu$ M'dan başlayarak maksimum 10  $\mu$ M'a kadar artan bir şekilde tamoksifen uygulanan hücreler) %5 FBS içeren DMEM medyumda kültüre edilerek %5 CO2 içeren inkübatörde 37°C 'de in-

kübe edilmiştir.<sup>24</sup>

### Tamoksifen Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Tamoksifenin sitotoksik etkisinin belirlenmesi için; WST-1 kit protokolüne göre MCF7, R1 ve R2 hücreleri 96 kuyulu hücre kültürü plakalarına her bir kuyucuğa  $2 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde ekildikten sonra 0.1, 1 ve 10  $\mu\text{M}$  tamoksifen uygulanarak 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, her bir kuyuya WST-1 boyası eklenerek 450 nm dalga boyunda Elisa Reader ile ölçüm yapılmıştır.

### RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve RT-PCR Analizi

MCF7, R1 ve R2 hücrelerinde *IL-6*, *STAT3* ve *E-kaderin* genlerinin ekspresyon seviyesindeki değişimlerin belirlenmesi için; hücreler 6 kuyulu hücre plakasına  $1 \times 10^6$  hücre/kuyu olacak şekilde ekildikten sonra, 48 saat boyunca 0.1, 1 ve 10  $\mu\text{M}$  tamoksifen ile inkübe edilmiştir. Sonrasında her bir hücre grubundan total RNA izolasyonu "Omega RNA izolasyon kiti" ile uygun kit protokolüne göre yapılmıştır. İzole edilen RNA'ların miktar ve saflık tayini Qubit (İnvitrogen) cihazı ile yapılmıştır. İzole total RNA'dan High Capacity cDNA kit (Thermo) kullanılarak uygun kit protokolüne göre cDNA elde edilmiş ve ilgili genlerin ekspresyon düzeylerinde değişimler RT-PCR cihazı (Applied Biosystems) ile belirlenmiştir.

### İstatistiksel Analizler

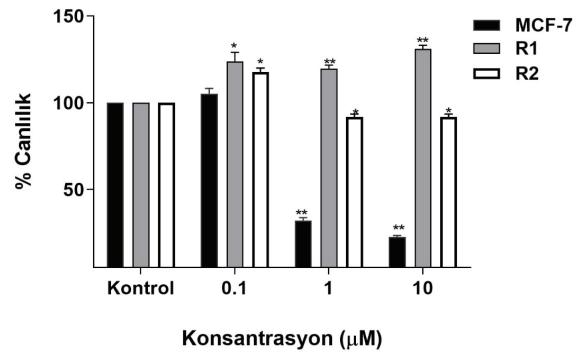
Veriler "SPSS 22.0" istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir.  $P < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Hücrelerin canlılık yüzdeleri arasındaki farklılıklar tek-yönlü varyans analizi (Post-Hoc Tukey) ile değerlendirilmiştir. Doza ve zamana bağlı olarak değişen, mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar "REST (2009 V2.0.13)" istatistik programı ile karşılaştırılmıştır.

### BULGULAR

#### Tamoksifen Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Mevcut çalışmamızda, 48 saat boyunca 0.1, 1 ve 10  $\mu\text{M}$  tamoksifen uygulanan MCF-7 hücrelerinde canlılık oranı doza bağlı bir şekilde azalmasına rağmen, R1 ve R2 hücre-

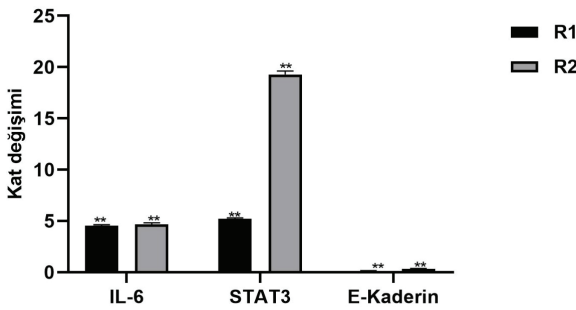
lerinde gelişen ilaç direncinden dolayı hücre canlılığının önemli derecede azalma olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 1). 48 saat boyunca 0.1, 1 ve 10  $\mu\text{M}$  tamoksifen uygulanan MCF-7 hücrelerinde canlılık oranlarının sırasıyla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde %105.2, %32.0 ve %22,6'ya azaldığı belirlenmesine rağmen ( $p < 0.05$ ), R1 hücrelerinde canlılık oranı sırasıyla %123.9, %119.7 ve %131.1 ve R2 hücrelerinde sırasıyla %117.8, %91.9 ve %91.8 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 1. 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda tamoksifen uygulanan hücrelerde sitotoksik etkinin değerlendirilmesi (a) MCF-7, (b) R1 ve (c) R2 hücreleri ( $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ )

## IL-6/STAT3 ve E-Kadherin Gen Ekspresyon Düzeyinde Değişimlerin Belirlenmesi

Çalışma kapsamında *IL-6*, *STAT3* ve *E-Kadherin* genlerinin ekspresyon seviyelerinde olan değişimler RT-PCR analizi ile belirlenmiş ve elde edilen bulgular Şekil 2 ve 3'te özetlenmiştir. R1 hücrelerinde MCF7 parental hücrelerine göre *IL-6*, *STAT3* ve *E-kadherin* mRNA seviyelerinin sırasıyla 4.5-, 5.2- ve 0.1-kat iken, R2 hücrelerinde sırasıyla 4.7-, 19.3- ve 0.3-kat olarak belirlenmiştir (Şekil 2).

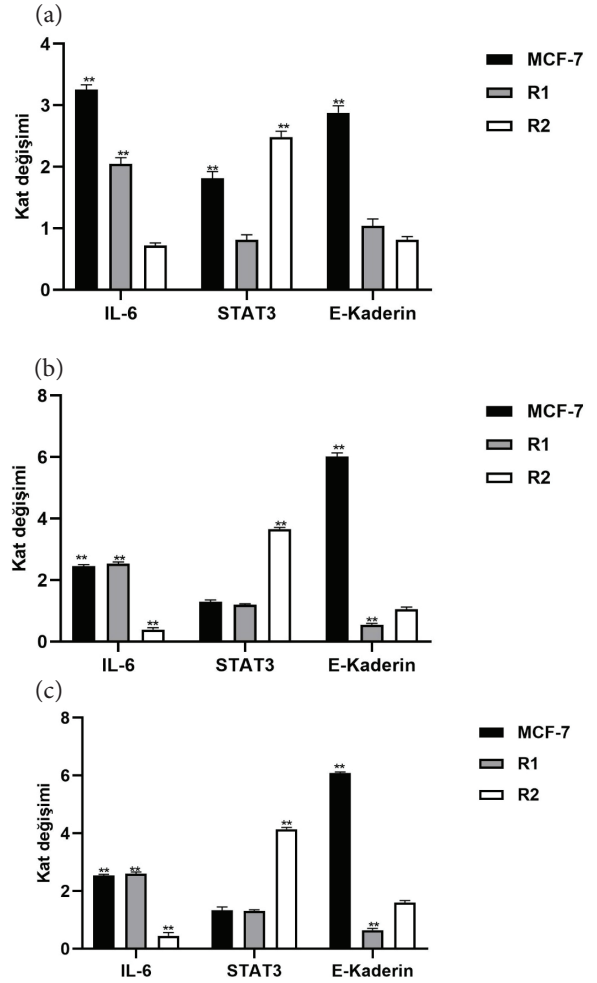


Şekil 2. MCF-7 parental hücrelerine göre R1 ve R2 hücrelerinde *IL-6*, *STAT3* ve *E-Kadherin* mRNA düzeyinde değişimlerin belirlenmesi ( $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ ).

MCF-7 hücrelerinde 48 saat boyunca 1  $\mu$ M tamoksifen uygulandığında kontrol grubuna göre *IL-6* mRNA seviyesi 2.5-kat, *STAT3* mRNA seviyesi 1.3-kat ve *E-kadherin* mRNA seviyesi sırasıyla 6.0-kat olarak analiz edilmiştir (Şekil 3). 1  $\mu$ M tamoksifen uygulanan R1 hücrelerinde *IL-6*, *STAT3* ve *E-kadherin* mRNA düzeyleri sırasıyla 2.5-, 1.2- ve 0.5- kat iken, R2 hücrelerinde sırasıyla 0.4-, 3.7- ve 1.1- kat olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 10  $\mu$ M tamoksifen uygulandığında ise R1 ve R2 hücrelerinde benzer kat değişimleri elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, MCF-7 hücrelerinde tamoksifenin artan konsantrasyonuna bağlı olarak *E-kadherin* ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmesine rağmen, R1 ve R2 hücrelerinde *E-kadherin* mRNA düzeyinin gelişen dirençten dolayı anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir ( $p < 0.01$ ). Ayrıca, R2 hücrelerinde azalan *IL-6* ekspresyonuna ile birlikte *STAT3* ekspres-

yon seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmesine rağmen, R1 hücrelerinde *E-kadherin* ekspresyon düzeyinin daha düşük olduğu analiz edilmiştir.



Şekil 3. 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda [(a) 0.1, (b) 1 ve (c) 10  $\mu$ M] tamoksifen uygulanan hücrelerde *IL-6/STAT3* temelli EMT aktivitesinin değerlendirilmesi (a) MCF-7, (b) R1 ve (c) R2 hücreleri ( $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ )

## TARTIŞMA

Mevcut çalışmada, tamoksifen direncinde *IL-6/STAT3* temelli EMT mekanizmasının rolünün belirlenmesi amacıyla *IL-6*, *STAT3* ve *E-kadherin* ekspresyon seviyelerinde değişimleri RT-PCR analizi ile aydınlatılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, 3 ay boyunca sabit tamoksifen uygulanan R1 hücrelerinin artan dozda tamoksifen uygulanan R2

hücrelerine daha fazla tamoksifene karşı direnç geliştirdiği belirlenmiştir. Ayrıca, parental MCF-7 hücreleri ile karşılaştırıldığında R1 hücrelerinde *E-kaderin* mRNA seviyesinin R2 hücrelerine daha az oranda eksprese olduğu belirlenmesine rağmen, R2 hücrelerinde özellikle *STAT3* ekspresyon seviyelerinin R1 hücresine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. 1 µM tamoksifen uygulandığında ise gelişen dirençten dolayı R1 ve R2 hücrelerinde *E-kaderin* ekspresyon seviyesinin azalmasıyla birlikte, *IL-6* ve *STAT3* ekspresyon seviyelerinin hücrelerde direnç gelişme protokolüne göre farklı olduğu analiz edilmiştir.

Literatürde tamoksifen direnci gelişiminde ER ekspresyon değişimleri veya mutasyonlar, *EMT*, *JAK2/STAT3* ve *MAPK/PI3K/Akt* gibi hücre içi sinyal yollarının aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin yanısıra hücre döngüsü kontrolünün bozulması, apoptoz ve immün kaçış mekanizmaları gibi mekanizmaların rol oynadığı belirlenmiştir.<sup>20-23</sup> Gao ve ark. yaptığı çalışmada *IL-17*, *IL-35*, *IL-8* ve *EGF* gibi sitokinlerin *STAT3*'ün ekspresyon seviyesinde artışa neden olarak, meme kanserinde progresyon, proliferasyon, metastaz ve ilaç direncine ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.<sup>25</sup> Diğer bir çalışma, tamoksifen tedavisi almış ER+ meme kanseri hastalarında TMEM16A kalsiyum ile aktive olan klorür kanalının aşırı eksprese olduğu ve ekspresyonunda değişimlerin EGFR/STAT3 sinyal yoluyla aracılı EGF uyarımı ilişkili olarak tamoksifen tedavisi alan hastalarda düşük sağ kalıma neden olduğu bildirilmiştir.<sup>26</sup> Sansone ve ark. tarafından *IL-6/Notch3* yolunun, metastatik meme kanserinde hormon tedavisinin CD133(-hi)/ER(lo)/*IL-6*(hi) kanser kök hücrelerinin proliferasyonunda ve hormon tedavisine direnç göstermesinde rol aldığı gösterilmiştir.<sup>27</sup> Ayrıca Xing ve ark. çalışmalarında SIRT4'ün MCF-7 ER+ meme kanseri hücrelerinde MYC, CCND1 ve MCL1 gibi protoonkogenlerin gen ekspresyonunu azaltarak *IL-6/STAT3* sinyal yolunun inhibisyonunu ve tamoksifene karşı duyarlılığı arttırdığı belirlenmiştir.<sup>28</sup> Mevcut çalışmada, tamoksifen direnci gelişmiş hücrelerde parental hücrelerine göre EMT biyobelirteci olarak *E-kaderin* ekspresyon seviyesinin anlamlı derecede azaldığı be-

lirlenmesine rağmen, *EMT* mekanizmasının aktivitesinde rol alan *IL-6/STAT3* sinyal yolunun aktivitesinin direnç uygulama protokolüne göre farklı olduğu tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz verilere göre R2 hücrelerinde R1 hücrelerine göre *STAT3*'ün ekspresyon seviyesinin daha yüksek olduğu, ancak R1 hücrelerinde R2 hücrelerine göre *IL-6*'nın ekspresyon seviyesinin daha yüksek olduğu ve E-Kaderin ekspresyon seviyesinin daha az olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, tamoksifen dirençli hücrelerde *IL-6* ve *STAT3* ekspresyon seviyelerindeki bu farklılığın tamoksifen direnci gelişiminde *IL-6*'nın *STAT3*'e alternatif olarak *PI3K-Akt*, *MAPK* ve *Notch3* gibi diğer hücre içi sinyal yolları aracılığı ile *EMT* mekanizması aktivitesinde değişimlere neden olabileceği öngörülmektedir. Ayrıca, R2 hücrelerinde *STAT3* mRNA seviyesinin yüksek belirlenmesinde *IL-6* dışında *EGF* gibi *EGFR/STAT3* yolunu aktive eden diğer faktörlerin etkili olabileceği de düşünülmektedir.

Sonuç olarak, tamoksifen dirençli hücrelerde yüksek dozda tamoksifen uygulandığında bile *EMT* mekanizmasının daha aktif olduğu ve buna bağlı olarak gelişen tamoksifen direncinin aşılamadığı belirlenmiştir. Ancak, *IL-6* ve *STAT3* aktivitesinde değişimler temel alındığında *TGFβ/SMAD2* veya *WNT/GSK3β/β-Catenin* gibi *EMT* mekanizmasının aktivitesinde rol alan diğer sinyal yollarının araştırılmasına yönelik daha ileri çalışmaların gerçekleştirilmesi gereklidir.

### Teşekkür

Bu çalışma "1919B011900868" numaralı proje olarak "2209-A-Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı" tarafından maddi olarak desteklediği için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2019; 69(1): 7-34.
2. Erođlu A, Çiçek E. Surgical treatment approaches according to molecular subtypes in breast cancer. *New Med J* 2014; 31(2): 83-87.
3. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician* 2010; 81(11): 1339-46.
4. Buckley M, Goa K. Tamoxifen. *Drugs* 1989; 37(4): 451-490.
5. Binkhorst L, van Gelder T, Mathijssen RH. Individualization of tamoxifen treatment for breast carcinoma. *Clin Pharmacol Ther* 2012; 92(4): 431-3.
6. Cengiz B, Demirel C, Kurtay G. Selektif Östrojen Reseptör Modülatörlerinin Klinik Kullanımı. *J Clin Obstet Gynecol* 2002; 12(1): 1-7.
7. Ali S, Rasool M, Chaoudhry H. Molecular mechanisms and mode of tamoxifen resistance in breast cancer. *Bioinformation* 2016; 12(3): 135-139.
8. Chang M. Tamoxifen resistance in breast cancer. *Biomol Ther (Seoul)* 2012; 20(3): 256-267.
9. Ramaswamy B, Lu Y, Teng K. Hedgehog Signaling Is a Novel Therapeutic Target in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer Aberrantly Activated by PI3K/AKT Pathway. *Cancer Res* 2012; 72(19): 5048-5059
10. Lehnert M. Chemotherapy resistance in breast cancer. *Anticancer Res* 1998; 18(3C): 2225-2226.
11. Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; 14(10): 611-629.
12. Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 9: 631-643.
13. Gee JM, Robertson JF, Ellis IO. Phosphorylation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase is associated with poor response to anti-hormonal therapy and decreased patient survival in clinical breast cancer. *Int J Cancer* 2001; 95(4): 247-54.
14. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 178-196.
15. Huang J, Li H, Ren G. Epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in breast cancer (Review). *Int J Oncol* 2015; 47: 840-848.
16. Ham IH, Oh HJ, Jin H. Targeting interleukin-6 as a strategy to overcome stroma-induced resistance to chemotherapy in gastric cancer. *Mol Cancer* 2019; 18(1): 68.
17. Cathcart JM, Banach A, Liu A, Chen J, et.al. Interleukin-6 increases matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) levels via down-regulation of p53 to drive cancer progression. *Oncotarget* 2016; 7(38): 61107-61120.
18. Zhang F, Duan S, Tsai Y, Keng PC, et.al. Cisplatin treatment increases stemness through upregulation of hypoxia-inducible factors by interleukin-6 in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2016; 107(6): 746-54.
19. Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15(4): 234-248.
20. Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, Vesuna F, et.al. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* 2009; 28(33): 2940-7.
21. Yang L, Han S, Sun Y. An IL6-STAT3 loop mediates resistance to PI3K inhibitors by inducing epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell expansion in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 453(3): 582-7.
22. Wang X. STAT3 mediates resistance of CD44 CD24-/low breast cancer stem cells to tamoxifen in vitro. *J Biomed Res* 2012; 26(5): 325-335.
23. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, et.al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100(9): 672-9.
24. Guney Eskiler G, Cecener G, Tunca B, Egeli U. An in vitro model for the development of acquired tamoxifen resistance. *Cell Biol Toxicol* 2016; 32(6): 563-581.
25. Gao Y, Li X, Zeng C, Liu C, et.al. CD63+ Cancer-Associated Fibroblast Confer Tamoxifen Resistance to Breast Cancer Cells through Exosomal miR-22. *Adv Sci* 2020; 7: 2002518.
26. Hui W, Fan Y, Shuya L, Ke M, et.al. A mutual activation loop between the Ca2+-activated chloride channel TMEM16A and EGFR/STAT3 signaling promotes breast cancer tumorigenesis. *Cancer Lett* 2019; 455: 48-59.
27. Sansone P, Ceccarelli C, Berishaj M, Chang Q, et.al. Self-renewal of CD133(hi) cells by IL6/Notch3 signalling regulates endocrine resistance in metastatic breast cancer. *Nat Commun* 2016; 7: 10442.
28. Xing J, Li J, Fu L, Gai J, et.al. SIRT4 enhances the sensitivity of ER-positive breast cancer to tamoxifen by inhibiting the IL-6/STAT3 signal pathway. *Cancer Med* 2019; 8(16): 7086-7097.