

## Metformin reduces cisplatin-mediated apoptosis in gastric adenocarcinoma cells

Salaramoli J<sup>1</sup>, Ghaffari H<sup>2</sup>, Heidari M<sup>3</sup>, Lesan V<sup>1\*</sup>

1- Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, I. R. Iran.

2- Hematology, Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

3- Stem Cell Preparation Unit, Eye Research Center, Farabi Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

Received October 8, 2012; Accepted April 17, 2013

### Abstract:

**Background:** Metformin, a drug widely used for type 2 diabetes, may also have anti-cancer properties. The purpose of this study was to examine the effect of metformin on cisplatin cytotoxicity in the gastric adenocarcinoma cells line (MKN45).

**Materials and Methods:** In this study, cells viability and apoptosis were measured using the (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay and flow cytometry, respectively. Moreover, the expressions of mammalian target of rapamycin, survivin and AKT genes were evaluated by RT-PCR. All experiments were performed in triplicate.

**Results:** The results showed that each of metformin and cisplatin separately reduced the viability of cancer cell, but in co-administration, metformin reduced the cytotoxicity of cisplatin. In co-administration, the survivin expression was increased followed by a reduction in cisplatin anti-cancer effect. Therefore, the antagonistic effect of drugs can be associated with survivin expression. The results also revealed that the anti-apoptotic effects of metformin co-administrated with cisplatin are associated with increased AKT expression.

**Conclusion:** It seems that in gastric cancers, metformin is not an appropriate choice to make cells sensitive to cisplatin and the antagonistic effects of the two drugs should be considered when they prescribed in combination.

**Keywords:** Metformin, Cisplatin, MKN45 cell line, Survivin, AKT

\* Corresponding Author.

**Email:** vlesan@ut.ac.ir

**Tel:** 0098 216 111 7046

**Fax:** 0098 218 800 4140

Conflict of Interests: *No*

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences May, 2013; Vol. 17, No 2, Pages 139-148*

Please cite this article as: Salaramoli J, Ghaffari H, Heidari M, Lesan V. Metformin reduces cisplatin-mediated apoptosis in gastric adenocarcinoma cells. *Feyz* 2013; 17(2): 139-48.

# تاثیر متفورمین بر کاهش اثر آپوتوتیک سیسپلاتین در سلول‌های آدنوکارسینوماى معده

جمیله سالار آملی<sup>۱</sup>، حمیدالله غفاری<sup>۲</sup>، منصور حیدری<sup>۳</sup>، وحید لسان<sup>۴\*</sup>

## خلاصه:

سابقه و هدف: متفورمین یک داروی ضد دیابت نوع ۲ است که دارای خصوصیات ضد سرطانی می‌باشد. در این مطالعه به بررسی اثر داروی متفورمین بر سمیت سلولی داروی سیس پلاتین روی سلول‌های آدنوکارسینوماى معده MKN45 پرداخته شده است. مواد و روش‌ها: جهت بررسی حیات سلولی و آپپتوز به ترتیب از روش‌های MTT و فلوسایتومتری و جهت تعیین میزان بیان ژن‌های Survivin، mTOR و AKT از روش Real-time PCR استفاده شد. کلیه آزمایشات سه بار تکرار شدند. نتایج: یافته‌های مطالعه حاضر نشان دادند که متفورمین و سیس پلاتین به تنهایی سبب کاهش حیات سلولی در سلول‌های سرطانی می‌شوند ولی در تجویز هم‌زمان دو دارو، متفورمین سبب کاهش سمیت سلولی داروی سیس پلاتین می‌شود. در تجویز هم‌زمان افزایش بیان سورویوین و به طبع آن کاهش اثر ضد سرطانی سیس پلاتین مشاهده گردید. بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که اثرات آنتاگونیستی این دو دارو می‌تواند وابسته به بیان سورویوین باشد. از سوی دیگر نتایج نشان داده است که فعالیت ضد آپپتوزی متفورمین در تیمار هم‌زمان با سیس پلاتین، ناشی از افزایش بیان AKT است. نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد متفورمین گزینه مناسبی برای حساس کردن سلول‌ها به سیس پلاتین نمی‌باشد و در تجویز این دو دارو به صورت هم‌زمان اثرات آنتاگونیستی آن‌ها باید مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: متفورمین، سیس پلاتین، رده سلولی MKN45، سورویوین، AKT

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره هفدهم، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۲، صفحات ۱۴۸-۱۳۹

## مقدمه

اخیرا در مطالعات اپیدمیولوژیک دیده شده است که خطر بروز سرطان کولورکتال، کبد و پانکراس در بیمارانی که از داروی متفورمین استفاده کرده‌اند، کاهش می‌یابد [۷-۱۰]. در بررسی‌های متعدد، اثرات متفورمین بر القاء آپپتوز و کاهش پرولیفراسیون انواع سلول‌های سرطانی مانند پستان و تخمدان در محیط کشت مشاهده شده است [۱۲، ۱۱]. هم‌چنین، اثر مهارى آن بر ایجاد و گسترش تومور و رگ‌زایی در مدل‌های حیوانی مشاهده شده است [۱۴، ۱۳]. بیان گردیده است که متفورمین سبب بهبود پاسخ به شیمی درمانی در بیماران دیابتی مبتلا به سرطان سینه می‌شود [۱۵]. این‌که چگونه متفورمین باعث القای اثرات فوق می‌شود هنوز مشخص نشده، اما با توجه به مطالعات موجود به نظر می‌رسد که اثرات آپپتوتیک متفورمین مربوط به اثر آن بر فعال‌سازی AMPK از مسیر LKB1 می‌باشد [۱۶-۱۸]. سرطان معده چهارمین سرطان شایع در جهان و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان می‌باشد و همه ساله عامل بیش از ۸۰۰ هزار مرگ در دنیا را موجب می‌شود [۱۹]. با توجه به مطالعات انجام شده، متفورمین می‌تواند به‌عنوان یک هدف درمانی در درمان سرطان معده دارای اهمیت باشد. سیس پلاتین یک داروی شیمی‌درمانی رایج در درمان انواع مختلف سرطان از جمله سارکوما، بعضی از انواع کارسینوما (مانند سرطان تخمدان)، لیمفوما، تومور سلول‌های جنسی و هم‌چنین سرطان معده است. سیس پلاتین از طریق تحریک استرس اکسیداتیو و ایجاد اتصالات متقاطع مابین رشته‌های DNA در سلول‌های سرطانی

متفورمین یک داروی خوراکی ضد دیابت نوع ۲ و از دسته بی‌گواناید (biguanide) است [۱]. این دارو در درمان سندروم تخمدان پلی‌کیستیک کاربرد دارد [۲]. متفورمین پرستفاده‌ترین داروی ضد دیابت در جهان محسوب می‌گردد و تنها در آمریکا در سال ۲۰۱۰، ۴۸ میلیون نسخه از آن تجویز شده است [۳]. عملکرد متفورمین بر ضد دیابت از طریق کاهش تولید کبدی گلوکز است. از نظر مکانیسم عمل گفته شده است که متفورمین از طریق فعال‌سازی Adenosine Mono Phosphate activated protein kinase (AMPK) سبب مهار گلوکوئوتوزنر در کبد و افزایش جذب گلوکز توسط بافت‌های محیطی می‌گردد [۴-۶]. هم‌چنین، تنها داروی ضد دیابت است که از مشکلات قلبی-عروقی دیابت پیشگیری می‌کند [۱].

<sup>۱</sup> دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

<sup>۲</sup> دانشیار، مرکز تحقیقات هماتولوژی انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۳</sup> دانشیار، واحد فراهم آوری سلول‌های بنیادی، بیمارستان فارابی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۴</sup> دانشجوی دکتری سم‌شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

## \* نشانی نویسنده مسئول:

دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه

دوره‌نویس: ۰۲۱۸۸۰۰۴۱۴۰

تلفن: ۰۲۱۶۱۱۱۷۰۴۶

پست الکترونیک: vlesan@ut.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۲/۱/۲۸

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۷

متفورمین سبب کاهش اثر آپوتوزی، ...

و یا غلظت‌های مختلف متفورمین، سیس پلاتین و متفورمین/سیس پلاتین به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. سیس، مدیوم‌ها با محلول MTT با غلظت (0.5 mg/kg) جایگزین گردید. بعد از ۳ ساعت انکوباسیون، در تاریکی محلول MTT با DMSO جایگزین گردید و سپس جذب نوری در طول موج ۵۷۸ نانومتر در دستگاه الیزا ریدر خوانده شد و درصد سلول‌های زنده با فرمول  $100 \times (\text{ODexp}/\text{ODcon}) = (\%)$  محاسبه گردید. ODexp و ODcon به ترتیب مربوط به جذب نوری گروه مواجهه یافته و گروه کنترل است.

ارزیابی بیان ژن با روش Real-time PCR

برای Real-time PCR ابتدا RNA با استفاده از کیت Fast Pure RNA از سلول‌های کشت شده استخراج گردید (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) و کمیت آن با نانودراپ ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA) اندازه‌گیری شد. سپس، به وسیله Prime Script RT reagent kit (Takara Bio) میزان یک میکروگرم از هر نمونه RNA، ترجمه معکوس گردید. مرحله Real-time PCR با دستگاه لایت سایکلر (Roche Diagnostics, Germany) و با استفاده از SYBR Premix Ex Taq technology (Takara Bio Inc.) انجام گرفت. در این مرحله ۱۰ میکرولیتر از سایبرگرین مستر میکس، ۲ میکرولیتر از نمونه cDNA، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (10 pmol) در آب و ۷ میکرولیتر از آب عاری از نوکلئاز (Qiagen, Hilden, Germany) برای انجام PCR در ۲۰ میکرولیتر نمونه مورد آزمایش، مخلوط گردید. شرایط سیکل‌های دمایی شامل یک مرحله فعال‌سازی اولیه به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه که دنبال می‌شود با ۴۰ سیکل، یک مرحله واسرشت به مدت ۵ ثانیه در ۹۵ درجه و مرحله اتصال پرایمر و رونویسی به مدت ۲۰ ثانیه در ۶۰ درجه بوده است. توالی پرایمرها در جدول شماره ۱ آمده است. منحنی‌های ذوب جهت اعتبار بخشی محصول منفرد هر پرایمر، آنالیز شد. هیپوگزانتین فسفوریبوزیل ترانسفراز ۱ (HPRT1) جهت کنترل داخلی تقویت شد و تغییر فولد در بیان نسبی هر mRNA هدف، به وسیله روش comparative Ct ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) محاسبه گردید.

ارزیابی آپوتوز با فلوسایتومتری

برای ارزیابی آپوتوز در سلول‌های MKN45 که تحت تجویز متفورمین و سیس پلاتین قرار گرفته بودند، کیت رنگ آمیزی

سبب مهار میتوز و القاء آپوتوز می‌گردد [۲۰]. مکانیسم اصلی فعالیت ضد سرطانی سیس پلاتین از طریق تداخل با عملکرد باز پورین DNA می‌باشد که منجر به ایجاد اتصالات متقاطع DNA با پروتئین و DNA با DNA و در نتیجه سبب توقف تکثیر سلول‌های توموری و ایجاد آپوتوز می‌گردد [۲۱]. توانایی متفورمین در بالا بردن کارایی سیس پلاتین در سرطان تخمدان مشاهده شده است [۲۲]. علاوه بر آن گزارش شده است که متفورمین سبب تقویت اثر سیس پلاتین در کاهش اندازه تومور و مهار رگ‌زایی در موش گردیده است [۱۰]. این یافته‌ها متفورمین را کاندیدای درمان هم‌زمان با سیس پلاتین می‌کند. از سوی دیگر Jaevotic و همکاران نشان داده‌اند که متفورمین از طریق مهار استرس اکسیداتیو و مهار فعال‌سازی کاسپازها سبب کاهش اثر آپوتوزی سیس پلاتین در بعضی از رده‌های سلولی سرطانی می‌گردد که این در تضاد با مطالعات قبلی است [۲۳]. با توجه به نتایج فوق و با نظر به اینکه سیس پلاتین در درمان سرطان معده کاربرد دارد و با توجه به اینکه اثر تجویز هم‌زمان این دو دارو در سرطان معده تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است، این سوال مطرح می‌شود که این تداخل دارویی در مورد افراد مبتلا به سرطان معده که از داروی متفورمین نیز استفاده می‌کنند، به چه نحو خواهد بود. از این رو، در این مطالعه به بررسی اثر تجویز متفورمین به تنهایی و یا هم‌زمان با سیس پلاتین پرداخته شده است.

## مواد و روش‌ها

### کشت سلولی و تجویز

رده سلولی MKN45 سرطان معده از انیستیتو پاستور تهیه شد. سلول‌ها در محیط RPMI 1640 (Invitrogen) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنینی گوساله (Invitrogen)، در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO<sub>2</sub> کشت داده شد. سپس کشت‌های سلولی با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار از متفورمین و غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرومولار از سیس پلاتین (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، مورد تیمار قرار گرفتند.

### آزمون MTT

آزمون MTT (Microculture tetrazolium) جهت ارزیابی اثر مهارتی متفورمین و سیس پلاتین روی حیات (Viability) سلول‌های MKN45 انجام پذیرفت؛ به این صورت که سلول‌های کشت شده در پلیت ۹۶ خانه با تراکم ۵۰۰۰ سلول در ۱۰۰ میکرولیتر RPMI در هر خانه پلیت با محیط کشت کنترل

متفورمین سبب کاهش آپوپتوز ناشی از سیس پلاتین گردید. آنالیز فلوسایتومتری روی دوزهای ۵، ۱۰ و ۲۰ از متفورمین و دوزهای ۱/۵ و ۱۰ از سیس پلاتین به صورت مجزا و تجویز هم‌زمان دو دارو به مدت ۴۸ ساعت انجام گرفت. همان‌گونه که در شکل‌های ۲ و ۳ دیده می‌شود، در تجویز هم‌زمان دوز ۵ از سیس پلاتین به همراه دوز ۱۰ از متفورمین، تعداد سلول‌های آپوپتوتیک ۱۲ درصد کمتر از تجویز به تنهایی دوز ۵ از سیس پلاتین است و این خود نشانه اثر آنتاگونیسم دو دارو با یکدیگر است.

اثرات آنتاگونیستی دو دارو وابسته به بالا رفتن بیان سورویوین بود.

جهت بررسی مکانیسم ملکولی اثر حفاظتی سلولی متفورمین بر اثرات سمی سیس پلاتین، به بررسی بیان پروتیین سورویوین پرداخته شد. در نتایج مشاهده شد که سورویوین نقش مهمی در مقاومت به شیمی درمانی سلول‌های mkn45 با داروی سیس پلاتین بازی ایفا می‌نماید. نتایج Real-time PCR نشان داد که بعد از ۴۸ ساعت، بیان سورویوین هنگامی که دو دارو به تنهایی تجویز می‌شود کاهش می‌یابد ولی موقعی که دو دارو به صورت هم‌زمان تجویز می‌گردد، بیان سورویوین افزایش می‌یابد (شکل شماره ۴).

اثرات آنتاگونیسمی دو دارو وابسته به بیان AKT بود. جهت بررسی مکانیسم ملکولی تداخل اثر دو دارو به بررسی بیان AKT که یکی از پروتیین‌های مهم در مقاومت به شیمی‌درمانی با داروی سیس پلاتین است، پرداخته شد. در بررسی با روش Real-time PCR، دیده شد که بعد از ۴۸ ساعت تجویز، بیان ژن AKT در موقعی که دو دارو به صورت مخلوط تجویز می‌گردند، بالاتر از هنگامی است که دو دارو به صورت تکی تجویز می‌شوند (شکل شماره ۵)؛ بنابراین، به نظر می‌آید که اثرات آنتاگونیسم این دو دارو به بیان AKT نیز وابسته است.

نقش mTOR در تداخل اثر دو دارو در این تحقیق دیده شد که بیان ژن mTOR تحت تاثیر تجویز ۴۸ ساعته و تکی متفورمین کاهش یافت، ولی هنگامی که دو دارو به طور هم‌زمان تجویز گردیدند، افزایش بیان mTOR مشاهده شد که خود می‌تواند دلیل دیگری بر اثر آنتاگونیسم دو دارو باشد. (شکل شماره ۶).

دوگانه شامل Hoechst 33342 و propidium iodide (PI) استفاده شد (Invitrogen). بعد از تجویز غلظت‌های مختلف سیس پلاتین و متفورمین و تجویز هم‌زمان دو دارو برای ۴۸ ساعت، سلول‌ها برداشت شده و در PBS سرد شسته شدند. سپس، تراکم سلولی به میزان  $10^6 \times 0.5$  سلول در هر میلی‌لیتر بافر فسفات تنظیم شد. از هر نمونه ۱ میلی‌لیتر برداشته شد و ۱ میکرولیتر از محلول استوک Hoechst 33342 (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب) و ۱ میکرولیتر از محلول استوک propidium iodide (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در آب) به هریک از سوسپانسیون‌های ۱ میلی‌لیتری سلول‌ها اضافه گردید. بعد از ۱۵ دقیقه سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با دستگاه فلوسایتومتری (PartecPasIII, Germany) ارزیابی شدند. نسبت excitation/emission برای Hoechst معادل ۳۵۰/۴۶۱ و برای Propidium معادل ۵۳۵/۶۱۷ بود. در پایان یافته‌ها با نرم‌افزار Flow Max مورد ارزیابی قرار گرفتند.

#### آنالیز آماری

داده‌ها به صورت  $\bar{X} \pm SD$  بیان شدند. کلیه آزمایشات سه بار تکرار شدند و داده‌ها با استفاده از آزمون‌های Student's t-test و آنالیز واریانس یک‌طرفه بررسی شدند.  $P < 0.05$  معنی‌دار تلقی گردید.

#### نتایج

متفورمین سبب کاهش اثر ضد سرطانی سیس پلاتین گردید. جهت بررسی تجویز هم‌زمان سیس پلاتین و متفورمین، از سلول‌های سرطانی آدنوکارسینومای معده MKN45، استفاده شد. سلول‌ها با دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌مولار از متفورمین و دوزهای ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ از سیس پلاتین، به صورت تکی و یا توأم با هم، به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت مواجه شدند. سپس، با استفاده از روش MTT اثر داروها روی حیات سلولی مورد آنالیز قرار گرفت. هر یک از دو داروی متفورمین و سیس پلاتین به صورت تکی، سبب کاهش در احیای MTT و در نتیجه حیات سلولی شدند، اما هنگامی که دو دارو هم‌زمان تجویز شد، متفورمین سبب کاهش اثر سمیت سلولی سیس پلاتین گردید (شکل شماره ۱). در پایان این مرحله، داده‌ها با نرم‌افزار calcusin آنالیز قرار گرفت و Combination Index (CI) مورد محاسبه قرار گرفت (جداول شماره ۲ و ۳). CI بالای ۱ در همه گروه‌ها مشاهده شد که نشانه اثر آنتاگونیسم دو دارو با یکدیگر است.

جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده در مطالعه حاضر

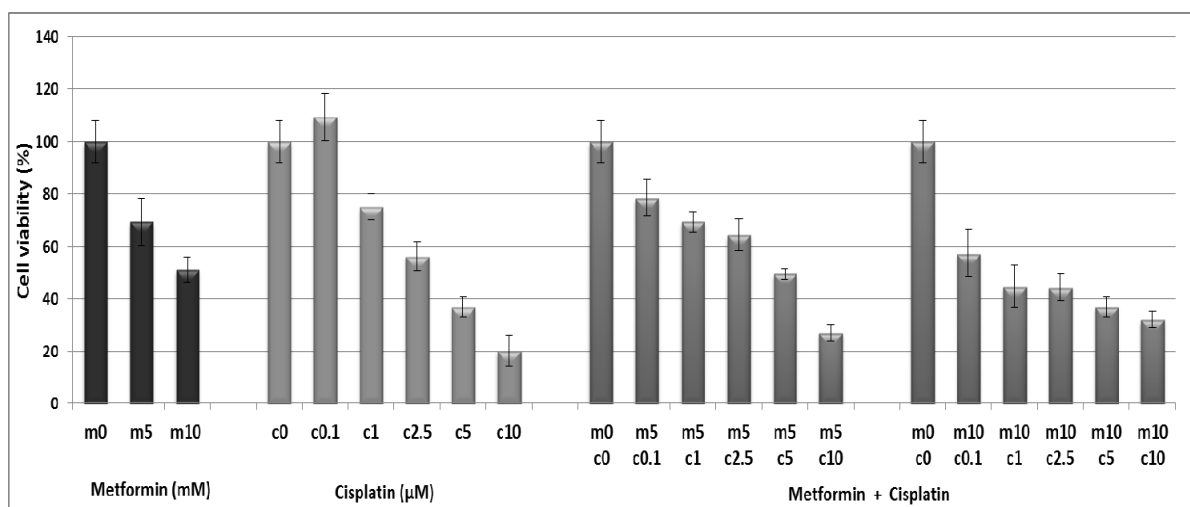
Gene	Accession number	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Size
HPRT	NM_000194	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	111
Akt	NM_005163	AGCGACGTGGCTATTGTGAAG	GTACTCCCCTCGTTTGTGCAG	51
Survivin	NM_001168	CCAGATGACGACCCCATAGAG	TTGTTGGTTTCCTTTGCAATTTT	152
mTOR	NM_004958	AACTCCGAGAGATGAGTCAAGA	AGTTGGTCATAGAAGCGAGTAGA	49
Caspase-3	NM_032991	ATGGAAGCGAATCAATGGACTC	CTGTACCAGACCGAGATGTCA	138

جدول شماره ۳- شاخص ترکیبی (CI) برای سیس پلاتین و متفورمین در رده سلولی MKN45 به مدت ۷۲ ساعت

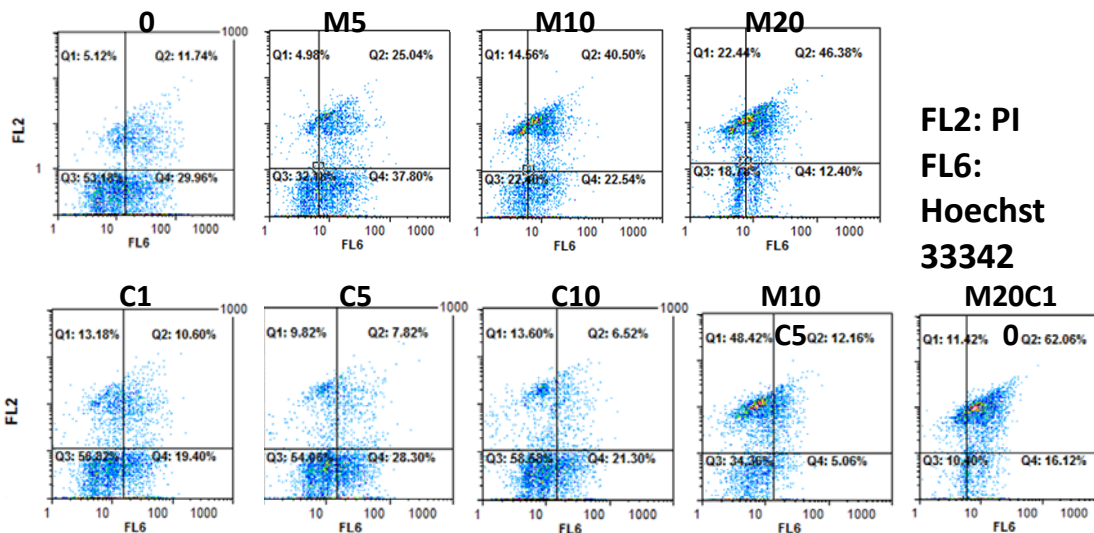
سیس پلاتین M $\mu$	CI (metformin=5mM)	CI (metformin=10mM)
۰/۱	۱/۵۹۱	۱/۲۹۱
۱	۱/۴۷۰	۱/۰۵۶
۲/۵	۱/۸۵۲	۱/۵۳۷
۵	۱/۹۴۵	۱/۶۹۴
۱۰	۱/۹۱۴	۲/۴۴۷

جدول شماره ۲- شاخص ترکیبی (CI) برای سیس پلاتین و متفورمین در رده سلولی MKN45 به مدت ۴۸ ساعت

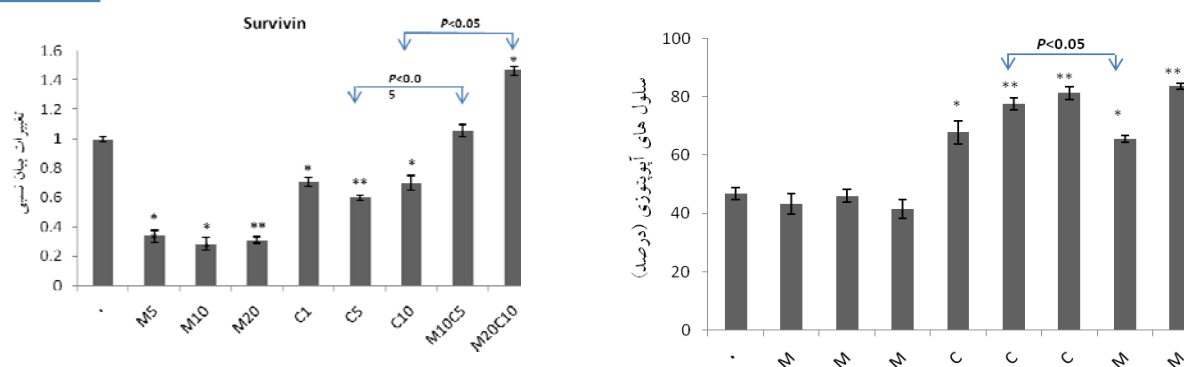
سیس پلاتین M $\mu$	CI (metformin=5mM)	CI (metformin=10mM)
۰/۱	۱/۳۰۴	۱/۴۱۶
۱	۱/۲۰۵	۱/۱۳۳
۲/۵	۱/۰۹۹	۱/۴۰۳
۵	۱/۳۰۹	۱/۰۹۱
۱۰	۱/۱۴۳	۱/۱۸۳



شکل شماره ۱- ارزیابی اثر متفورمین، سیس پلاتین و متفورمین / سیس پلاتین بر زیست پذیری رده سلولی آدنوکارسینوما مای معده MKN-45. رده سلولی با غلظت‌های مختلف از متفورمین و/یا سیس پلاتین به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شده و زیست پذیری آنها با روش MTT ارزیابی شد. نتایج به صورت درصد زیست پذیری در مقایسه با گروه کنترل محاسبه شد و به صورت میانگینی از ۳ آزمایش مستقل  $\pm$  SD نشان داده شده است. M5: دوز ۵ میلی مولار متفورمین، M10: دوز ۱۰ میلی مولار متفورمین، M20: دوز ۲۰ میلی مولار متفورمین، C0.1: دوز ۰.۱ میکرو مولار سیس پلاتین، C1: دوز ۱ میکرو مولار سیس پلاتین، C2.5: دوز ۲/۵ میکرو مولار سیس پلاتین، C5: دوز ۵ میکرو مولار سیس پلاتین، C10: دوز ۱۰ میکرو مولار سیس پلاتین



شکل شماره ۲- اثر متفورمین، سیس پلاتین و متفورمین / سیس پلاتین بر آپوپتوز در رده سلولی MKN-45. رنگ Hoechst 33342، کروماتین فشرده در سلول های آپوپتوتیک را روشن تر از کروماتین در سلول های نرمال رنگ آمیزی می نماید و رنگ Propidium Iodide (PI) فقط به سلول های مرده نفوذ می نماید (FL2: PI, FL6: Hoechst 33342). تیمار با متفورمین، سیس پلاتین و متفورمین / سیس پلاتین در مقایسه با گروه کنترل سبب تغییر معنی دار در میزان آپوپتوز در سلول های MKN45 می گردد.

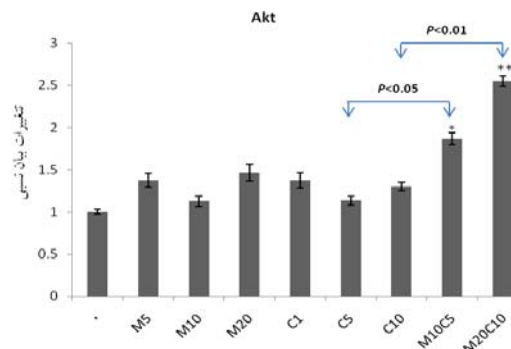


شکل شماره ۴- اثر متفورمین، سیس پلاتین و متفورمین / سیس پلاتین بر سطح بیان ژن سورویوین با روش Real-time PCR. داده ها بر اساس تغییرات فولد در بیان نسبی در مقایسه با HPRT1 نشان داده شده و بر پایه روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Ct نسبی محاسبه گردیده است. تیمار با متفورمین یا سیس پلاتین در ۴۸ ساعت سبب کاهش بیان سورویوین گردیده است، اما هنگامی که دو دارو هم زمان داده شده است، افزایش بیان سورویوین در مقایسه با گروه سیس پلاتین مشاهده می شود. داده ها به صورت  $\bar{X} \pm SD$  نشان داده شده است. از لحاظ آماری داده ها با  $P < 0.01$  و  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل نشان داده شدند. M5: دوز ۵ میلی مولار متفورمین، M10: دوز ۱۰ میلی مولار متفورمین، M20: دوز ۲۰ میلی مولار متفورمین، C1: دوز ۱ میکرو مولار سیس پلاتین، C5: دوز ۵ میکرو مولار سیس پلاتین، C10: دوز ۱۰ میکرو مولار سیس پلاتین، M10C5: دوز ۱۰ میکرو مولار متفورمین به همراه ۵ میکرو مولار سیس پلاتین، M20C10: دوز ۲۰ میلی مولار متفورمین به همراه ۱۰ میکرو مولار سیس پلاتین.

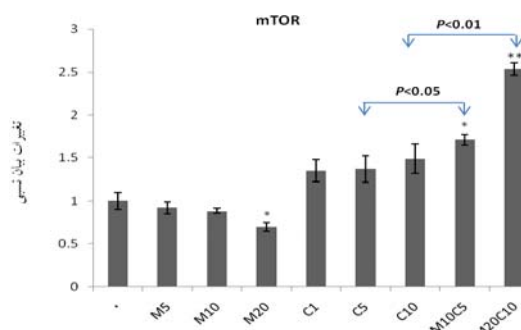
شکل شماره ۳- داده های کمی آپوپتوز در سلول های MKN45 تیمار شده با متفورمین، سیس پلاتین و متفورمین / سیس پلاتین. آپوپتوز ناشی از غلظت ۵ میکرومولار سیس پلاتین به طور معنی داری بیشتر از آپوپتوز در تجویز هم زمان ۵ میکرومولار سیس پلاتین و ۱۰ میلی مولار متفورمین است. از لحاظ آماری داده ها با  $P < 0.01$  و  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل نشان داده شدند. M5: دوز ۵ میلی مولار متفورمین، M10: دوز ۱۰ میلی مولار متفورمین، M20: دوز ۲۰ میلی مولار متفورمین، C1: دوز ۱ میکرو مولار سیس پلاتین، C5: دوز ۵ میکرو مولار سیس پلاتین، C10: دوز ۱۰ میکرو مولار سیس پلاتین، M10C5: دوز ۱۰ میلی مولار متفورمین به همراه ۵ میکرومولار سیس پلاتین، M20C10: دوز ۲۰ میلی مولار متفورمین به همراه ۱۰ میکرو مولار سیس پلاتین.

### بحث

اخیرا در مطالعات اپیدمیولوژیک دیده شده است که خطر بروز سرطان کولورکتال، کبد و پانکراس در بیمارانی که از داروی متفورمین استفاده کرده‌اند، کاهش می‌یابد [۷-۱۰]. از طرف دیگر در مطالعات متعدد، اثرات متفورمین بر القاء آپوتوز و کاهش پرولیفراسیون انواع سلول‌های سرطانی مانند پستان و تخمدان در محیط کشت مشاهده شده است [۱۲،۱۱]. هم‌چنین، اثر مهارى این دارو بر ایجاد و گسترش تومور و رگ‌زایی در محیط درون‌تنی مشاهده شده است [۱۴،۱۳]. در مطالعات مختلف دیده شده است که متفورمین می‌تواند سبب تقویت اثر ضد سرطانی سیس‌پلاتین در سرطان پستان و تخمدان گردد [۲۲،۱۵،۱۰]. Jaevotic و همکاران نشان داده‌اند که متفورمین از طریق مهار استرس اکسیداتیو و مهار فعال‌سازی کاسپازها سبب کاهش اثر آپوتوزی سیس‌پلاتین در رده‌های سلولی سرطانی U251, C6, SHYS5Y، L929 و HL-60 می‌گردد که این در تضاد با مطالعات قبلی است [۲۳]. می‌توان نتیجه گرفت که تداخل اثر این دو دارو وابسته به نوع تومور است. در این مطالعه این تداخل دارویی در سلول‌های سرطانی معده MKN45 مورد بررسی قرار گرفت. همان‌گونه که در نتایج MTT و فلوسایتومتری دیده شد این دو دارو در رده سلولی MKN45 آنتاگونیسم دارند. مطالعه ما پیشنهاد می‌نماید که اثر مداخله‌گر متفورمین روی سمیت سلولی سیس‌پلاتین وابسته به افزایش بیان ژن سوروایوین است. بیان سوروایوین در طی میتوز تشخیص داده شده است. سوروایوین به‌طور اختصاصی به terminal effector cell death proteases، کاسپاز ۳ و کاسپاز ۷ باند می‌شود و سبب مهار آپوتوز می‌گردد [۲۴]. در یک مطالعه گزارش شده است که در مواجهه کردن سلول‌ها با سوروایوین سبب مهار آپوتوز ناشی از اتوپوزاید می‌شود [۲۵]. هم‌چنین، نشان داده شده است در بیماران مبتلا به سرطان پیشرفته مری که تحت شیمی‌درمانی بودند، بیان mrMA مربوط به سوروایوین در گروهی که به درمان تاحدی جواب داده بودند به‌طور معنی‌داری کمتر از گروهی بود که به درمان مقاومت نشان داده بودند [۲۶]. گزارش‌های اخیر نشان می‌دهد که بیان mRNA یا پروتئین سوروایوین با پیش‌آگهی نامطلوب در سرطان‌های بدخیم مختلف در ارتباط است [۲۷-۲۹]. این یافته پیشنهاد می‌نماید که سوروایوین نقش مهمی در مقاومت به شیمی‌درمانی در سلول‌های بدخیم ایفا می‌نماید. در مورد مکانیسم اثر متفورمین بر بیان سوروایوین گفته شده است که متفورمین سبب فعال‌سازی AMPK می‌گردد [۳۰]. AMPK فسفوریله با واسطه TSC1 و TSC2 سبب مهار mTOR می‌گردد [۳۰]. مهار



شکل شماره ۵- اثر متفورمین، سیس‌پلاتین و متفورمین / سیس‌پلاتین بر سطح بیان ژن AKT محاسبه شده با روش Real-time PCR. هنگامی که سلول‌ها با سیس‌پلاتین و متفورمین به‌صورت هم‌زمان تیمار می‌شوند، بیان AKT بالاتر از زمانی است که دو دارو به تنهایی تجویز می‌شوند. داده‌ها به‌صورت  $\bar{X} \pm SD$  نشان داده شده است. از لحاظ آماری داده‌ها با  $P < 0.01$  و  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل نشان داده شدند. M5: دوز ۵ میلی‌مولار متفورمین، M10: دوز ۱۰ میلی‌مولار متفورمین، M20: دوز ۲۰ میلی‌مولار متفورمین، C1: دوز ۱ میکرومولار سیس‌پلاتین، C5: دوز ۵ میکرومولار سیس‌پلاتین، C10: دوز ۱۰ میکرومولار سیس‌پلاتین، M10C5: دوز ۱۰ میلی‌مولار متفورمین به‌همراه ۵ میکرومولار سیس‌پلاتین، M20C10: دوز ۲۰ میلی‌مولار متفورمین به‌همراه ۱۰ میکرومولار سیس‌پلاتین.



شکل شماره ۶- اثر متفورمین، سیس‌پلاتین و متفورمین / سیس‌پلاتین بر سطح بیان ژن mTOR محاسبه شده با روش Real-time PCR. هنگامی که سلول‌ها با سیس‌پلاتین و متفورمین به‌صورت هم‌زمان تیمار می‌شوند، بیان mTOR بالاتر از زمانی است که سیس‌پلاتین به تنهایی داده می‌شود. داده‌ها به‌صورت  $\bar{X} \pm SD$  نشان داده شده است. از لحاظ آماری داده‌ها با  $P < 0.01$  و  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل نشان داده شدند. M5: دوز ۵ میلی‌مولار متفورمین، M10: دوز ۱۰ میلی‌مولار متفورمین، M20: دوز ۲۰ میلی‌مولار متفورمین، C1: دوز ۱ میکرومولار سیس‌پلاتین، C5: دوز ۵ میکرومولار سیس‌پلاتین، C10: دوز ۱۰ میکرومولار سیس‌پلاتین، M10C5: دوز ۱۰ میلی‌مولار متفورمین به‌همراه ۵ میکرومولار سیس‌پلاتین، M20C10: دوز ۲۰ میلی‌مولار متفورمین به‌همراه ۱۰ میکرومولار سیس‌پلاتین.

درمانی تقویت می‌شوند [۳۶]. هم‌چنین، نشان داده شده است که مهار AKT سبب حساس شدن سلول‌های سرطانی به سیس پلاتین می‌گردد [۳۸،۳۷]. هماهنگ با این یافته‌ها در مطالعه حاضر نیز نشان داده شده است که فعالیت ضد آپوپتوزی متفورمین در تیمار هم‌زمان با سیس پلاتین، ناشی از مهار بر کاهش بیان AKT ناشی از سیس پلاتین است. همان‌گونه که در نتایج دیده می‌شود هنگامی که سلول‌ها به‌صورت هم‌زمان با دو دارو تیمار می‌شوند، افزایش بیشتری نسبت به سایر گروه‌ها در بیان AKT دیده می‌شود. این نظریه که اثر محافظت سلولی ناشی از متفورمین وابسته به مسیر AKT است با اثر مهارکننده‌های AKT بر کاهش اثر ضد آپوپتوزی متفورمین، تقویت می‌شود [۳۰].

#### نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان گفت متفورمین گزینه مناسبی برای حساس کردن سلول‌ها به سیس پلاتین در تومور معده نمی‌باشد و هنگامی که این دو دارو به‌صورت هم‌زمان تجویز می‌شوند، به‌دلیل تداخل دو دارو ضروری است احتیاط‌های لازم صورت پذیرد.

#### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از پایان‌نامه دکترای تخصصی سم‌شناسی بوده و بدین‌وسیله از مدیریت مرکز تحقیقات هماتولوژی انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران و هم‌چنین معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که شرایط انجام این تحقیق را فراهم نمودند، قدردانی می‌گردد.

#### References:

- [1] Basevi V, Di Mario S, Morciano C, Nonino F, Magrini N. Comment on: American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care* 2011; 34(Suppl. 1): S11-S61. *Diabetes Care* 2011; 34(5):e53; author reply e54.
- [2] Moll E, van der Veen F, van Wely M. The role of metformin in polycystic ovary syndrome: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2007; 13(6): 527-37.
- [3] Li D, Yeung SC, Hassan MM, Konopleva M, Abbruzzese JL. Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2009; 137(2): 482-8.
- [4] Correia S, Carvalho C, Santos MS, Proença T, Nunes E, Duarte AI, et al. Metformin protects the brain against the oxidative imbalance promoted by type 2 diabetes. *Med Chem* 2008; 4(4): 358-64.

mTOR نیز در نتایج این مطالعه دیده شد. از آن‌جا که mTOR سبب افزایش سورواویون می‌گردد، بنابراین مهار mTOR سبب مهار سورواویون و در نتیجه کاهش زنده ماندن سلول و افزایش آپوپتوز می‌گردد. متفورمین می‌تواند از طریق کاهش بیان سورواویون، سبب کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطانی و القای آپوپتوز گردد. در مطالعه حاضر، دیده شد که متفورمین به تنهایی سبب کاهش بیان سورواویون و mTOR می‌گردد، ولی هنگامی که دو دارو هم‌زمان تجویز می‌شوند، افزایش بیان سورواویون و mTOR مشاهده می‌شود. بنابراین، اثرات آنتاگونیسم این دو دارو می‌تواند وابسته به بیان سورواویون باشد. در مورد دلیل بالا رفتن بیان سورواویون در تیمار هم‌زمان دو دارو می‌توان به مطالعه Ikeguchi و همکارانش اشاره نمود که در آن دیده شده است که داروی سیس پلاتین سبب بالا رفتن بیان سورواویون در درده سلولی MKN45 می‌گردد. این افزایش بیان ژن و پروتئین سورواویون نقش مهمی در مقاومت به شیمی درمانی بازی می‌نماید [۲۵]. از سوی دیگر مطالعه حاضر نشان داده است که اثر مداخله‌گر متفورمین بر سمیت سلولی سیس پلاتین وابسته به بیان ژن سرین ترئونین کیناز AKT است. ژن AKT یک تحت واحد PI3K است که نقش مهمی در کنترل زنده ماندن سلول و آپوپتوز ایفا می‌نماید. AKT مستقیماً و از طریق فسفوریلاسیون و غیرفعال‌سازی اهداف پیش‌آپوپتوزی شامل BAD، forkhead transcription factors، c-Raf و کاسپاز ۹ سبب مهار آپوپتوز می‌گردد [۳۱-۳۴]. هم‌چنین، این پروتئین از طریق فعال‌سازی NF- $\kappa$ B و ژن‌های پرسورواویوال به‌طور غیرمستقیم سبب مهار آپوپتوز می‌گردد [۳۵]. ذکر این نکته نیز ضروری است که بسیاری از اجزای مسیر PI3K/AKT در تومورهای مقاوم به شیمی

- [5] Correia S, Carvalho C, Santos MS, Seïça R, Oliveira CR, Moreira PI. Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes and associated complications: an overview. *Mini Rev Med Chem* 2008; 8(13): 1343-54.
- [6] Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001; 108(8): 1167-74.
- [7] Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 2005; 330(7503): 1304-5.
- [8] Chong CR, Chabner BA. Mysterious metformin. *Oncologist* 2009; 14(12): 1178-81.
- [9] Lee MS, Hsu CC, Wahlqvist ML, Tsai HN, Chang YH, Huang YC. Type 2 diabetes increases

and metformin reduces total, colorectal, liver and pancreatic cancer incidences in Taiwanese: a representative population prospective cohort study of 800,000 individuals. *BMC Cancer* 2011; 11: 20.

[10] Rattan R, Graham RP, Maguire JL, Giri S, Shridhar V. Metformin suppresses ovarian cancer growth and metastasis with enhancement of cisplatin cytotoxicity in vivo. *Neoplasia* 2011; 13(5): 483-91.

[11] Wang Y, Zhang MX, Duan XY, Zhou SN, Ermek T, Wang YN, et al. [Effects of antidiabetic drug metformin on human breast carcinoma cells with different estrogen receptor expressing in vitro]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2011; 27(3): 253-6.

[12] Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003; 115(5): 577-90.

[13] Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, Lum JJ, DeBerardinis RJ, Zhao F, et al. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Res* 2007; 67(14): 6745-52.

[14] Huang X, Wullschleger S, Shpiro N, McGuire VA, Sakamoto K, Woods YL, et al. Important role of the LKB1-AMPK pathway in suppressing tumorigenesis in PTEN-deficient mice. *Biochem J* 2008; 412(2): 211-21.

[15] Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, Meric-Bernstam F, Liedtke C, Barnett CM, et al. Metformin and Pathologic Complete Responses to Neoadjuvant Chemotherapy in Diabetic Patients With Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(20): 3297-302.

[16] Zhuang Y, Miskimins WK. Cell cycle arrest in Metformin treated breast cancer cells involves activation of AMPK, downregulation of cyclin D1, and requires p27Kip1 or p21Cip1. *J Mol Signal* 2008; 3: 18.

[17] Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66(21): 10269-73.

[18] Parkin DM. International variation. *Oncogene* 2004; 23(38): 6329-40.

[19] Pruefer FG, Lizarraga F, Maldonado V, Melendez-Zajgla J Participation of Omi Htra2 serine-protease activity in the apoptosis induced by cisplatin on SW480 colon cancer cells. *J Chemother* 2008; 20(3): 348-54.

[20] Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57(8-9): 1229-35.

[21] Diaz R, Jorda MV, Reynes G, Aparicio J, Segura A, Amador R, et al. Neoadjuvant cisplatin and etoposide, with or without tamoxifen, prior to radiotherapy in high-grade gliomas: a single-center experience. *Anticancer Drugs* 2005; 16(3): 323-9.

[22] Gotlieb WH, Saumet J, Beauchamp MC, Gu J, Lau S, Pollak MN, et al. In vitro metformin anti-

neoplastic activity in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 110(2): 246-50.

[23] Janjetovic K, Vucicevic L, Misirkic M, Vilimanovich U, Tovilovic G, Zogovic N, et al. Metformin reduces cisplatin-mediated apoptotic death of cancer cells through AMPK-independent activation of Akt. *Eur J Pharmacol* 2011; 651(1-3): 41-50.

[24] Scartozzi M, Galizia E, Verdecchia L, Berardi R, Antognoli S, Chiorrini S, et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer: across the years for a standard of care. *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8(6): 797-808.

[25] Ikeguchi M, Liu J, Kaibara N. Expression of survivin mRNA and protein in gastric cancer cell line (MKN-45) during cisplatin treatment. *Apoptosis* 2002; 7(1): 23-29.

[26] Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, et al. IAP-Family Protein Survivin Inhibits Caspase Activity and Apoptosis Induced by Fas (CD95), Bax, Caspases, and Anticancer Drugs. *Cancer Res* 1998; 58(23): 5315-20.

[27] Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, Shinoda N, Sato A, Toyama T, et al. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int J Cancer* 2001; 95(2): 92-5.

[28] Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 1998; 351(9106): 882-3.

[29] Monzó M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sánchez JJ, Maestre J, et al. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1999; 17(7): 2100-4.

[30] Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000; 46(5): 645-50.

[31] Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreros C, del Barco S, Martin-Castillo B, Menendez JA. The antidiabetic drug metformin: a pharmaceutical AMPK activator to overcome breast cancer resistance to HER2 inhibitors while decreasing risk of cardiomyopathy. *Annals Oncol* 2009; 20(3): 592-5.

[32] Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91(2): 231-41.

[33] Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96(6): 857-68.

[34] Zimmermann S, Moelling K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* 1999; 286(5445): 1741-4.

- [35] Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al, Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; 282(5392): 1318-21.
- [36] Romashkova JA, Makarov SS. NF-kappa B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 1999; 401(6748): 86-90.
- [37] Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a

- theme. *Oncogene* 2008; 27(41): 5497-10.
- [38] Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Kanda Y, Hisamoto K, Nishio Y, et al. Inhibition of BAD Phosphorylation Either at Serine 112 via Extracellular Signal-regulated Protein Kinase Cascade or at Serine 136 via Akt Cascade Sensitizes Human Ovarian Cancer Cells to Cisplatin. *Cancer Res* 2000; 60(21): 5988-94.