

Metformin reduces cisplatin-mediated apoptosis in gastric adenocarcinoma cells

Salaramoli J¹, Ghaffari H², Heidari M³, Lesan V^{1*}

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.

تأثیر متغورمین بر کاهش اثر آپوپتوزیک سیس‌پلاتین در سلول‌های آدنوکارسینومای معده

جمیله سالار آملی^۱، حمید‌الله غفاری^۲، منصور حیدری^۳ و حید لسان^{۴*}

خلاصه:

سابقه و هدف: متغورمین یک داروی ضد دیابت نوع ۲ است که دارای خصوصیات ضد سرطانی می‌باشد. در این مطالعه به بررسی اثر داروی متغورمین بر سمیت سلولی داروی سیس‌پلاتین روی سلول‌های آدنوکارسینومای معده MKN45 پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: جهت بررسی حیات سلولی و آپوپتوز بدتریب از روش‌های MTT و فلواسایتمتری و جهت تعیین میزان بیان ژن‌های AKT و mTOR از روش Real-time PCR استفاده شد. کلیه آزمایشات سه بار تکرار شدند.

نتایج: یافته‌های مطالعه حاضر نشان دادند که متغورمین و سیس‌پلاتین به‌نهایی سبب کاهش حیات سلولی در سلول‌های سرطانی می‌شوند ولی در تجویز همزمان دو دارو، متغورمین سبب کاهش سمیت سلولی داروی سیس‌پلاتین می‌شود. در تجویز همزمان افزایش بیان سوروایوین و به طبع آن کاهش اثر ضد سرطانی سیس‌پلاتین مشاهده گردید. بنابراین، می‌توان تیجه‌گیری نمود که اثرات آنتاگونیستی این دو دارو می‌تواند وابسته به بیان سوروایوین باشد. از سوی دیگر نتایج نشان داده است که فعالیت ضد آپوپتوزی متغورمین در تیمار همزمان با سیس‌پلاتین، ناشی از افزایش بیان AKT است.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد متغورمین گزینه مناسبی برای حساس کردن سلول‌ها به سیس‌پلاتین نمی‌باشد و در تجویز این دو دارو به صورت همزمان اثرات آنتاگونیستی آن‌ها باید مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: متغورمین، سیس‌پلاتین، رده سلولی MKN45، سوروایوین، AKT

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

مقدمه

اخیراً در مطالعات اپیدمیولوژیک دیده شده است که خطر بروز سرطان کولورکتال، کبد و پانکراس در بیمارانی که از داروی متغورمین استفاده کرده‌اند، کاهش می‌یابد [۷-۱۰]. در بررسی‌های متعدد، اثرات متغورمین بر القاء آپوپتوز و کاهش پرولیفراسیون انواع سلول‌های سرطانی مانند پستان و تخمدان در محیط کشت مشاهده شده است [۱۱-۱۲]. هم‌چنان، اثر مهاری آن بر ایجاد و گسترش تومور و رگزایی در مدل‌های حیوانی مشاهده شده است [۱۳-۱۴]. بیان گردیده است که متغورمین سبب بهبود پاسخ به شیمی درمانی در بیماران دیابتی مبتلا به سرطان سینه می‌شود [۱۵]. این که چگونه متغورمین باعث القای اثرات فوق می‌شود هنوز مشخص نشده، اما با توجه به مطالعات موجود به نظر می‌رسد که اثرات آپوپتوزیک متغورمین 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، متغورمین می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی در درمان سرطان معده دارای اهمیت باشد. سیس‌پلاتین یک داروی شیمی درمانی رایج در درمان انواع مختلف سرطان از جمله سارکوما، بعضی از انواع کارسینوما (مانند سرطان تخمدان)، لیمفومن، تومور سلول‌های جنسی و هم‌چنان سرطان معده است. سیس‌پلاتین از طریق تحریک استرس اکسیداتیو و ایجاد اتصالات متقاطع مابین رشته‌های DNA در سلول‌های سرطانی

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

^۱ دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

^۲ دانشیار، مرکز تحقیقات هماتولوژی انکلوژی و پیوند سلول‌های بنیادی، دانشگاه

علوم پزشکی تهران

^۳ دانشیار، واحد فراهم آوری سلول‌های بنیادی، بیمارستان فارابی، دانشگاه علوم

پزشکی تهران

^۴ دانشجوی دکترای سم‌شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

*^۵ لشانی نویسنده مسئول؛

دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه

تلفن: ۰۲۱۶۱۱۱۷۰۴۶؛ دورنوبیل: ۰۲۱۸۸۰۰۴۱۴۰

پست الکترونیک: vlesan@ut.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۲/۱/۲۸

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۷

و یا غلظت‌های مختلف متغورمین، سیس‌پلاتین و متغورمین/ سیس‌پلاتین به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. سیس، مدیوم‌ها با محلول MTT با غلظت (0.5 mg/kg) جایگزین MTT با 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 الایزا ریدر خوانده شد و درصد سلول‌های زنده (%)=(ODexp/ODcon)¹⁰⁰ محاسبه گردید. با فرمول ODcon و ODexp 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 RNA (Takara) از سلول‌های کشت شده استخراج گردید ND-1000 Pure RNA Bio Inc., Otsu, Japan) و کمیت آن با نانودراب 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 معمکوس گردید. مرحله با دستگاه لایت سایکلر (Roche Diagnostics, Germany) و 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 ۴ سیکل، یک مرحله وارش 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. هیوگزاتین فسفوربیوزیل ترانسفراز ۱ (HPRT1) جهت کنترل داخلی تقویت شد و تغییر فولد در بیان نسی هر mRNA هدف، به وسیله روش $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ comparative Ct محاسبه گردید.

ارزیابی آپوپتوز با فلوسایتمتری

برای ارزیابی آپوپتوز در سلول‌های MKN45 که تحت تجویز متغورمین و سیس‌پلاتین قرار گرفته بودند، کیت رنگ‌آمیزی

سبب مهار میتوز و القاء آپوپتوز می‌گردد [۲۰]. مکانیسم اصلی فعالیت ضد سرطانی سیس‌پلاتین از طریق تداخل با عملکرد باز پورین DNA می‌باشد که منجر به ایجاد اتصالات متقاطع DNA با DNA و سیس‌پلاتین در نتیجه سبب توقف تکثیر سلول‌های توموری و ایجاد آپوپتوز می‌گردد [۲۱]. توانایی متغورمین در بالا بردن کارایی سیس‌پلاتین در سرطان تخمدان مشاهده شده است [۲۲]. علاوه بر آن گزارش شده است که متغورمین سبب تقویت اثر سیس‌پلاتین در کاهش اندازه تومور و مهار رگزایی در موش گردیده است [۱۰]. این یافته‌ها متغورمین را کاندیدای درمان هم‌زمان با سیس‌پلاتین می‌کند. از سوی دیگر Jaevotic و همکاران نشان داده‌اند که متغورمین از طریق مهار استرس اکسیداتیو و مهار فعال‌سازی کاسپازها سبب کاهش اثر آپوپتوزی سیس‌پلاتین 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 سیس‌پلاتین 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 متغورمین نیز استفاده می‌کنند، به چه نحو خواهد بود. از این‌رو، در این مطالعه به بررسی اثر تجویز متغورمین به تنهایی و یا هم‌زمان با سیس‌پلاتین پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی و تجویز

رده سلولی MKN45 سرطان معده از اینسیتو 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 CO₂ کشت داده شد. سپس کشت‌های سلولی با غلظت‌های ۱۰، ۵ و ۲۰ میلی‌مولار از متغورمین و غلظت‌های ۰/۵، ۰، ۱، ۰/۵ و ۱۰ میکرومولار از سیس‌پلاتین (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، مورد تیمار قرار گرفتند.

آزمون MTT

آزمون MTT (Microculture tetrazolium) ارزیابی اثر مهاری متغورمین و سیس‌پلاتین روی حیات سلول‌های MKN45 Viability (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

متغورمین سبب کاهش آپوپتوز ناشی از سیس پلاتین گردید. آنالیز فلوسایوتومتری روی دوزهای ۱۰، ۵ و ۲۰ از متغورمین و دوزهای ۱/۵ و ۱۰ از سیس پلاتین به صورت مجزا و تجویز هم زمان دو دارو به مدت ۴۸ ساعت انجام گرفت. همان‌گونه که در شکل‌های ۲ و ۳ دیده می‌شود، در تجویز هم زمان دوز ۵ از سیس پلاتین به همراه دوز ۱۰ از متغورمین، تعداد سلول‌های آپوپتویک ۱۲ درصد کمتر از تجویز به تنها بی 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 سوروایوبین بود.

جهت بررسی مکانیسم ملکولی اثر حفاظتی سلولی متغورمین بر اثرات سمی سیس پلاتین، به بررسی بیان پروتئین سوروایوبین پرداخته شد. در نتایج مشاهده شد که سوروایوبین نقش مهمی در مقاومت به شیمی درمانی سلول‌های mkn45 با داروی Real-time PCR نشان داد که بعد از ۴۸ ساعت، بیان سوروایوبین هنگامی که دو دارو به تنها بی تجویز می‌شود کاهش می‌یابد ولی موقعی که دو دارو به صورت هم زمان تجویز می‌گردد، بیان سوروایوبین 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 پروتئین‌های مهم در مقاومت به شیمی درمانی 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 می‌گردد، بالاتر از هنگامی است که دو دارو به صورت تنکی 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 تنکی متغورمین کاهش یافت، ولی هنگامی که دو دارو به طور هم زمان تجویز گردیدند، افزایش بیان mTOR مشاهده شد که خود می‌تواند دلیل دیگری بر اثر آنتاگونیسم دو دارو باشد. (شکل شماره ۶).

دوگانه شامل propidium iodide 33342 و Hoechst (PI) استفاده شد (Invitrogen). بعد از تجویز غلظت‌های مختلف سیس پلاتین و متغورمین و تجویز هم زمان دو دارو برای ۴۸ ساعت، سلول‌ها برداشت شده و در PBS سرد شسته شدند. سپس، تراکم سلولی به میزان $1 \times 10^6 / 5 \times 10^6$ سلول در هر میلی‌لیتر بافر فسفات تنظیم شد. از هر نمونه ۱ میلی‌لیتر برداشته شد و ۱ میکرولیتر از محلول استوک 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 فلوسایوتومتری (PartecPasIII, Germany) ارزیابی شدند. نسبت excitation/emission برای Hoechst معادل $535/617$ و برای Propidium معادل $461/535$ 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

متغورمین سبب کاهش اثر ضد سرطانی سیس پلاتین گردید. جهت بررسی تجویز هم زمان سیس پلاتین و متغورمین، از سلول‌های سرطانی آدنوکارسینومای معده MKN45 استفاده شد. سلول‌ها با دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌مولار از متغورمین و دوزهای ۰/۱، ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ از سیس پلاتین، به صورت تنکی و یا توام 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 متغورمین و سیس پلاتین به صورت تنکی، سبب کاهش در احیای MTT و در نتیجه حیات سلولی شدند، اما هنگامی که دو دارو هم زمان تجویز شد، متغورمین 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

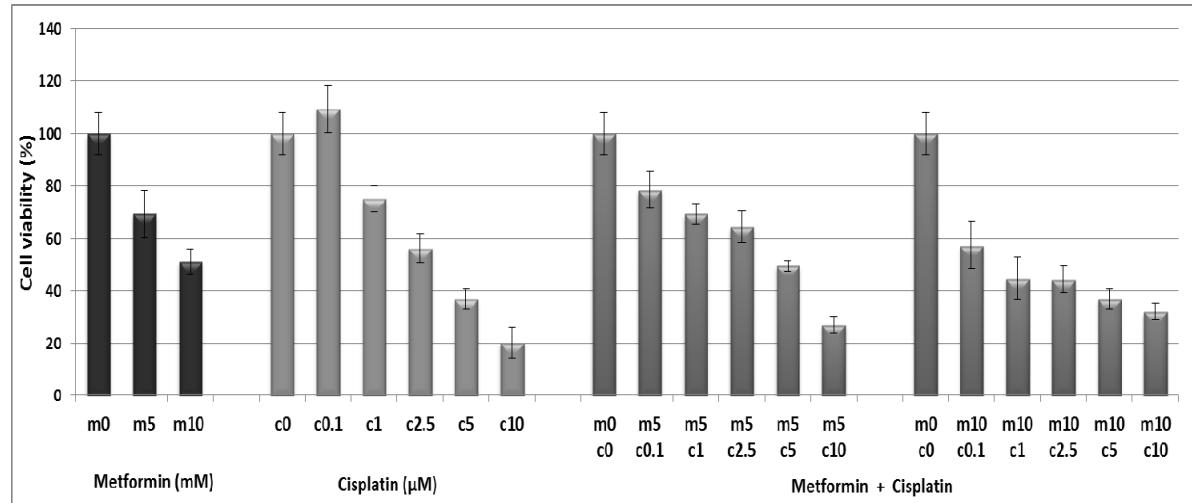
Gene	Accession number	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Size
HPRT	NM_000194	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	CCAGCAGGTCAAGAAATTAA	111
Akt	NM_005163	AGCGACGTGGCTATTGTGAAG	GTACTCCCCTCGTTGTGCAG	51
Survivin	NM_001168	CCAGATGACGCCCATAGAG	TTGTTGGTTCTTGCATTT	152
mTOR	NM_004958	AACTCCGAGAGATGAGTCAGA	AGTTGGTCATAGAACGAGTAGA	49
Caspase-3	NM_032991	ATGGAAGCGAATCAATGGACTC	CTGTACCAGACCGAGATGTCA	138

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

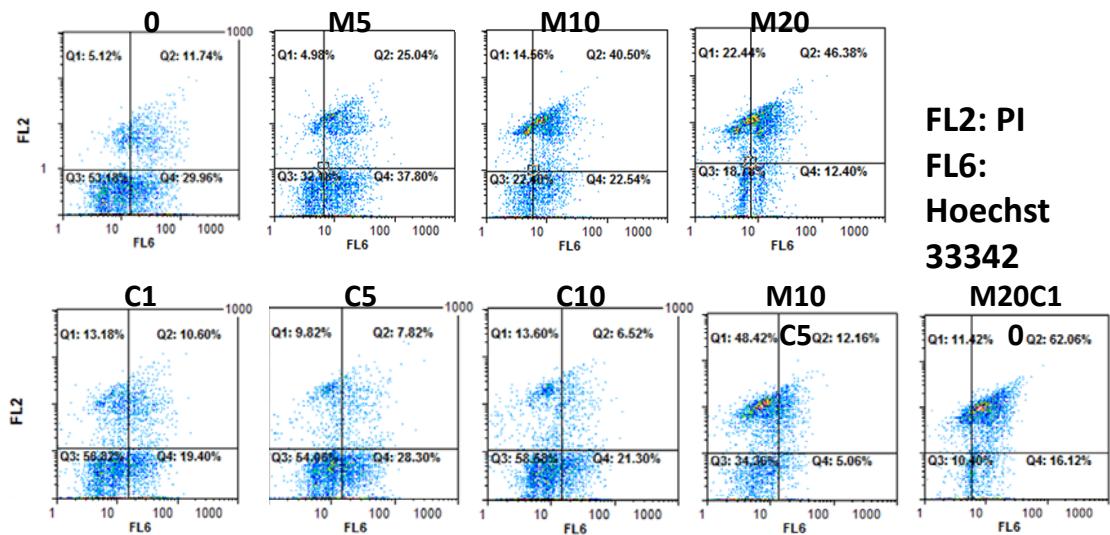
سیسپلاتین μ M	CI (metformin=5mM)	CI (metformin=10mM)
۰/۱	۱/۵۹۱	۱/۲۹۱
۱	۱/۴۷۰	۱/۰۵۶
۲/۵	۱/۸۰۲	۱/۰۳۷
۵	۱/۹۴۰	۱/۶۹۴
۱۰	۱/۹۱۴	۲/۴۴۷

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

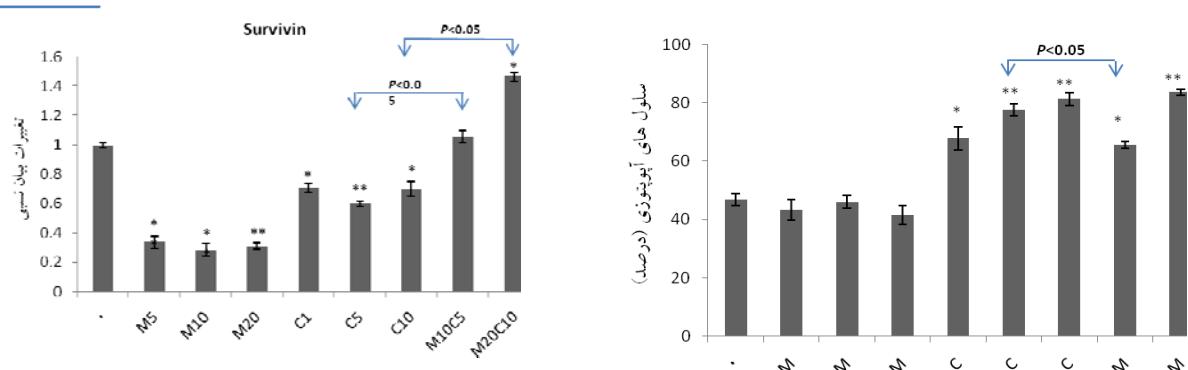
سیسپلاتین μ M	CI (metformin=5mM)	CI (metformin=10mM)
۰/۱	۱/۳۰۴	۱/۴۱۶
۱	۱/۲۰۵	۱/۱۳۳
۲/۵	۱/۰۹۹	۱/۴۰۳
۵	۱/۳۰۹	۱/۰۹۱
۱۰	۱/۱۴۳	۱/۱۸۳



شکل شماره ۱- ارزیابی اثر متفورمین، سیسپلاتین و متفورمین/ سیسپلاتین بر زیست‌پذیری رده سلولی آدنوکارسینومای معده MKN-45. رده سلولی با غلظت‌های مختلف از متفورمین و/یا سیسپلاتین به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شده و زیست‌پذیری آنها با روش MTT ارزیابی شد. نتایج به صورت درصد زیست‌پذیری در مقایسه با گروه کنترل محاسبه شد و به صورت میانگینی از ۳ آزمایش مستقل SD \pm 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 ماکرو مولار سیسپلاتین، C1: دوز ۱ میکرو مولار سیسپلاتین، C2.5: دوز ۲/۵ میکرو مولار سیسپلاتین C5: دوز ۵ میکرو مولار سیسپلاتین، C10: دوز ۱۰ میکرو مولار سیسپلاتین



شکل شماره ۲- اثر متغورمین، سیسپلاتین و متغورمین / سیسپلاتین بر آپوپتوز در رده سلولی MKN-45. رنگ ۳۳۳۴۲ کروماتین فشرده در سلول های آپوپتیک 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 متغورمین، سیسپلاتین و متغورمین / سیسپلاتین در مقایسه با گروه کنترل سبب تغییر معنی دار در میزان آپوپتوز در سلول های MKN45 می گردد.

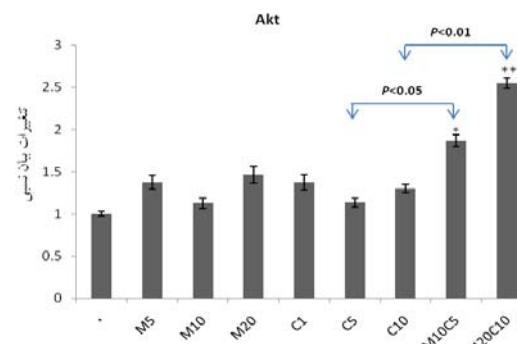


شکل شماره ۴- اثر متغورمین، سیسپلاتین و متغورمین / سیسپلاتین بر سطح بیان ژن سوروایوین با روش Real-time PCR. داده ها بر اساس تغییرات فولد در بیان نسبی در مقایسه با HPRT1 نشان داده شده و بر پایه روش $\Delta\Delta Ct$ نسبی محاسبه گردیده است. تیمار با متغورمین یا سیسپلاتین در ۴۸ ساعت سبب کاهش بیان سوروایوین گردیده است، اما هنگامی که دو دارو هم زمان داده شده است، افزایش بیان سوروایوین در مقایسه با گروه سیسپلاتین 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 میکرومولار متغورمین، M10: دوز ۱۰ میکرومولار متغورمین، M20: دوز ۲۰ میکرومولار متغورمین، C1: دوز ۱ میکرومولار سیسپلاتین، C5: دوز ۵ میکرومولار سیسپلاتین، C10: دوز ۱۰ میکرومولار سیسپلاتین، M10C5: دوز ۱۰ میکرومولار متغورمین به همراه ۵ میکرومولار سیسپلاتین، M20C10: دوز ۲۰ میکرومولار متغورمین به همراه ۱۰ میکرومولار سیسپلاتین.

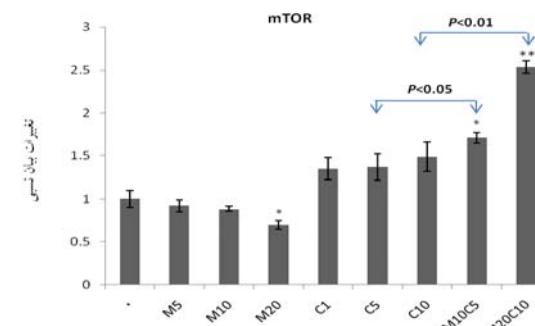
شکل شماره ۳- داده های کمی آپوپتوز در سلول های MKN45 تیمار شده با متغورمین، سیسپلاتین و متغورمین / سیسپلاتین. آپوپتوز ناشی از غلظت ۵ میکرومولار سیسپلاتین به طور معنی داری بیشتر از آپوپتوز در تجویز هم زمان ۵ میکرومولار سیسپلاتین و ۱۰ میکرومولار متغورمین است. از لحاظ آماری داده ها با $P < 0.01$ و $P < 0.05$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

بحث

اخيرا 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 آپوپتوز و کاهش پرولیفراسیون انواع سلول‌های سرطانی مانند پستان و تخدمان در محیط کشت مشاهده شده است [۱۱، ۱۲]. هم‌چنین، اثر مهاری این دارو بر ایجاد و گسترش تومور و رگ‌زایی در محیط درون‌تنی مشاهده شده است [۱۳، ۱۴]. در مطالعات مختلف دیده شده است که متفورمین می‌تواند سبب تقویت اثر ضد سرطانی سیس‌پلاتین در سرطان پستان و تخدمان گردد [۱۰، ۱۵، ۲۲]. هم‌کاران نشان داده‌اند که متفورمین از طریق مهار استرس اکسیداتیو و مهار فعال‌سازی کاسپازها سبب کاهش اثر آپوپتوزی U251، C6، SHYS5Y U251، C6، SHYS5Y 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 فلوزایوتومتری 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 سورواایوبین است. بیان سورواایوبین در طی میتوز تشخیص داده شده است. سورواایوبین به طور اختصاصی به terminal effector cell death proteases کاسپاز ۳ و کاسپاز ۷ باند می‌شود و سبب مهار آپوپتوز می‌گردد [۲۴]. در یک مطالعه گزارش شده است که در مواجه کردن سلول‌ها با سورواایوبین سبب مهار آپوپتوز ناشی از اتوپوزاید می‌شود [۲۵]. هم‌چنین، نشان داده شده است در بیماران مبتلا به سرطان پیشرفتی مری که تحت شیمی درمانی بودند، بیان mRNA مربوط به سورواایوبین در گروهی که به درمان تا حدی جواب داده بودند به طور معنی‌داری کمتر از گروهی بود که به درمان مقاومت نشان داده بودند [۲۶]. گزارش‌های اخیر نشان می‌دهد که بیان mRNA یا پروتئین سورواایوبین با پیش‌آگهی نامطلوب در سرطان‌های بدخیم مختلف در ارتباط است [۲۷-۲۹]. این یافته پیشنهاد می‌نماید که سورواایوبین نقش مهمی در مقاومت به شیمی درمانی در سلول‌های بدخیم ایفا می‌نماید. در مورد مکانیسم اثر متفورمین بر بیان سورواایوبین گفته شده است که متفورمین سبب فعال‌سازی AMPK می‌گردد [۳۰]. AMPK فسفوریله با واسطه TSC2 و mTOR سبب مهار mTOR می‌گردد [۳۰]. مهار



شکل شماره ۵- اثر متفورمین، سیس‌پلاتین و متفورمین/ سیس‌پلاتین Real-time PCR محاسبه شده با روش هنگامی که سلول‌ها با سیس‌پلاتین و متفورمین به صورت همزمان تیمار می‌شوند، بیان ژن AKT بالاتر از زمانی است که دو دارو به تهابی تجویز می‌شوند. داده‌ها به صورت $\bar{X} \pm SD$ نشان داده شده است. از لحاظ آماری داده‌ها با $P < 0.05$ * و $P < 0.01$ ** 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 به همراه ۵ میکرو‌مولار سیس‌پلاتین، M20C10: دوز ۲۰ میلی‌مولار متفورمین به همراه ۱۰ میکرو‌مولار سیس‌پلاتین.



شکل شماره ۶- اثر متفورمین، سیس‌پلاتین و متفورمین/ سیس‌پلاتین Real-time PCR بیان ژن mTOR محاسبه شده با روش هنگامی که سلول‌ها با سیس‌پلاتین و متفورمین به صورت همزمان تیمار می‌شوند، بیان mTOR بالاتر از زمانی است که سیس‌پلاتین به تهابی داده می‌شود. داده‌ها به صورت $\bar{X} \pm SD$ نشان داده شده است. از لحاظ آماری داده‌ها با $P < 0.05$ * و $P < 0.01$ ** 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 به همراه ۵ میکرو‌مولار سیس‌پلاتین، M20C10: دوز ۲۰ میلی‌مولار متفورمین به همراه ۱۰ میکرو‌مولار سیس‌پلاتین.

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

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان گفت متforمین گزینه مناسبی برای حساس کردن سلول‌ها به سیس‌پلاتین در تومور معده نمی‌باشد و هنگامی که این دو دارو به صورت هم زمان تجویز می‌شوند، به دلیل تداخل دو دارو ضروری است احتیاط‌های لازم صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از پایان‌نامه دکترای تخصصی سمتناستی 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, Proenca 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.
- [5] Correia S, Carvalho C, Santos MS, Seiça 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

mTOR نیز در نتایج این مطالعه دیده شد. از آنجا که mTOR سبب افزایش سورواوین می‌گردد، بنابراین مهار mTOR سبب افزایش سورواوین و در نتیجه کاهش زنده ماندن سلول و افزایش آپوپتوز می‌گردد. متforمین می‌تواند از طریق کاهش بیان سورواوین، سبب کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطانی و القای آپوپتوز گردد. در مطالعه حاضر، دیده شد که متforمین به تنها می‌سبب کاهش بیان سورواوین و mTOR می‌گردد، ولی هنگامی که دو دارو هم‌زمان تجویز می‌شوند، افزایش بیان سورواوین و mTOR مشاهده می‌شود. بنابراین، اثرات آنتاگونیسم این دو دارو می‌تواند وابسته به بیان سورواوین باشد. در مورد دلیل بالا رفتن بیان سورواوین در تیمار هم‌زمان دو دارو می‌توان به مطالعه Ikeguchi و همکارانش اشاره نمود که در آن دیده شده است که داروی سیس‌پلاتین سبب بالا رفتن بیان سورواوین در درده سلولی MKN45 می‌گردد. این افزایش بیان ژن و پروتئین سورواوین نقش مهمی در مقاومت به شیمی درمانی بازی می‌نماید [۲۵]. از سوی دیگر مطالعه حاضر نشان داده است که اثر مداخله گر متforمین بر سمیت سلولی سیس‌پلاتین وابسته به بیان ژن سرین‌ترئوین کیاز 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 forkhead غیرفعال‌سازی اهداف پیش‌آپوپتوزی شامل BAD, transcription factors c-Raf و کاسپیاز ۹ آپوپتوز می‌گردد [۳۱-۳۴]. هم‌چنین، این پروتئین از طریق فعال سازی NF-κB و ژن‌های پروسورواویوال به طور غیرمستقیم سبب مهار آپوپتوز می‌گردد [۳۵]. ذکر این نکته نیز ضروری است که بسیاری از اجزای مسیر PI3K/AKT در تومورهای مقاوم به شیمی

- 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-Ferraro 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.