Original Article

Metformin reduces cisplatin-mediated apoptosis in gastric adenocarcinoma cells

Salaramoli J[1], Ghaffari H[2], Heidari M[3], 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.

تاثیر متفورمین بر کاهش اثر آپوپتوتیک سیس‌پلاتین در سلول‌های آدنوکارسینومای معده

جمیله سالار آملی [۱]، حمیدالله غفاری [۲]، منصور حیدری [۳]، وحید لسان [۴*]

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 آدنوکارسینومای معده MKN45 پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: جهت بررسی حیات سلولی و آپوپتوز به‌ترتیب 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 سیس‌پلاتین به‌تنهایی 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 سوروایوین 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 سوروایوین باشد. از سوی دیگر نتایج نشان داده است که فعالیت ضد آپوپتوزی متفورمین در تیمار هم‌زمان با سیس پلاتین، ناشی از افزایش بیان AKT است.

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

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

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

مقدمه

متفورمین یک داروی خوراکی ضد دیابت نوع ۲ و از دسته بی‌گوانایدِ (biguanide) است [۱]. این دارو در درمان سندروم تخمدان پلی‌کیستیک کاربرد دارد [۲]. متفورمین 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 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 گلوکونئوژنز در کبد و افزایش جذب گلوکز توسط بافت‌های محیطی می‌گردد [۶-۴]. هم‌چنین، تنها داروی ضد دیابت است که از مشکلات قلبی‌عروقی دیابت پیشگیری می‌کند [۱].

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 [۱۰-۷]. در بررسی‌های متعدد، اثرات متفورمین بر القاء آپوپتوز و کاهش پرولیفراسیون انواع سلول‌های سرطانی مانند پستان و تخمدان در محیط کشت مشاهده شده است [۱۲،۱۱]. هم‌چنین، اثر مهاری 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 به‌نظر می‌رسد که اثرات آپوپتوتیک متفورمین مربوط به اثر آن بر فعال‌سازی AMPK از مسیر LKB1 می‌باشد [۱۸-۱۶]. 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. سیس‌پلاتین یک داروی شیمی‌درمانی رایج در درمان انواع مختلف سرطان از جمله سارکوما، بعضی از انواع کارسینوما (مانند سرطان تخمدان)، لیمفوم‌ها، تومور سلول‌های جنسی و هم‌چنین سرطان معده است. سیس‌پلاتین از طریق تحریک استرس اکسیداتیو و ایجاد اتصالات متقاطع مابین رشته‌های DNA در سلول‌های سرطانی

[۱] دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

[۲] دانشیار، مرکز تحقیقات هماتولوژی انکولوژی 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

* **نشانی نویسنده مسئول:**
دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه

تلفن: ۰۲۱۶۱۱۱۷۰۴۶ **دورنویس:** ۰۲۱۸۸۰۰۴۱۴۰

پست الکترونیک: vlesan@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۷ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۲/۱/۲۸

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 پروتئین و DNA با DNA و در نتیجه سبب توقف تکثیر سلول‌های توموری و ایجاد آپوپتوز می‌گردد [۲۱]. توانایی متفورمین در بالا بردن کارایی سیس‌پلاتین در سرطان تخمدان مشاهده شده است [۲۲]. علاوه بر آن گزارش شده است که متفورمین سبب تقویت اثر سیس‌پلاتین در کاهش اندازه تومور و مهار رگ‌زایی در موش گردیده است [۱۰]. این یافته‌ها متفورمین را کاندیدای درمان هم‌زمان با سیس‌پلاتین می‌کند. از سوی دیگر Jaevotic و همکاران نشان داده‌اند که متفورمین 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 متفورمین نیز استفاده می‌کنند، به چه نحو خواهد بود. از این‌رو، در این مطالعه به بررسی اثر تجویز متفورمین به تنهایی و یا هم‌زمان با سیس‌پلاتین پرداخته شده است.

مواد و روش ها

کشت سلولی و تجویز

رده سلولی MKN45 سرطان معده از انیستیو 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 ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار از متفورمین و غلظت-های ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرومولار از سیس‌پلاتین (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، مورد تیمار قرار گرفتند.

آزمونMTT

آزمون MTT (Microculture tetrazolium) جهت ارزیابی اثر مهاری متفورمین و سیس‌پلاتین 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 و یا غلظت‌های مختلف متفورمین، سیس‌پلاتین و متفورمین/ سیس‌پلاتین به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. سپس، 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 الایزا ریدر خوانده شد و درصد سلول‌های زنده با فرمول (%)=(ODexp/ODcon)×100 محاسبه گردید. ODexp و ODcon به‌ترتیب 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، به‌وسیله 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 مرحله۱۰ میکرولیتر از سایبرگرین مستر میکس، ۲ ماکرولیتر از نمونه cDNA، ۰/۵ میکرولیتر از هرکدام 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 به‌مدت ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه که دنبال می‌شود با ۴۰ سیکل، یک مرحله واسرشت به‌مدت ۵ ثانیه در ۹۵ درجه و مرحله اتصال پرایمر و رونویسی به‌مدت 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 فسفوریبوزیل‌ترانسفراز ۱ (HPRT1) جهت کنترل داخلی تقویت شد و تغییر فولد در بیان نسبی هر mRNA هدف، به‌وسیله روش comparative Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) محاسبه گردید.

ارزیابی آپوپتوز با فلوسایتومتری

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

دوگانه شامل Hoechst 33342 و propidium iodide (PI) استفاده شد (Invitrogen). بعد از تجویز غلظت‌های مختلف سیس‌پلاتین و متفورمین و تجویز هم‌زمان دو دارو برای ٤٨ ساعت، سلول‌ها برداشت شده و در PBS سرد شسته شدند. سپس، تراکم سلولی به میزان ^{6}۱۰×۰/۵ 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 (۱میلی گرم 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 ۳۵۰/٤٦۱ و برای Propidium معادل ۵۳۵/٦۱۷ بود. در پایان یافته‌ها با نرم‌افزار Flow Max مورد ارزیابی قرار گرفتند.

آنالیزآماری

داده‌ها به‌صورت $\overline{X} \pm SD$ 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<$۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج

متفورمین سبب کاهش اثر ضد سرطانی سیس‌پلاتین گردید.

جهت بررسی تجویز هم‌زمان سیس‌پلاتین و متفورمین، از سلول‌های سرطانی آدنوکارسینومای معده MKN45، استفاده شد. سلول‌ها با دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌مولار از متفورمین و دوزهای ۰/۱، ۱، ۲/۵ ، ۵ و ۱۰ از سیس‌پلاتین، به‌صورت تکی و یا توام با هم، به‌مدت ٤٨ 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 سیس‌پلاتین به‌صورت تکی، سبب کاهش در احیای MTT و در نتیجه حیات سلولی شدند، اما هنگامی‌که 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.

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 سیس‌پلاتین به‌صورت مجزا و تجویز هم‌زمان دو دارو به‌مدت ٤٨ ساعت انجام گرفت. همان‌گونه که در شکل‌های ۲ و ۳ دیده می‌شود، در تجویز هم‌زمان دوز ۵ از سیس پلاتین به‌همراه دوز ۱۰ از متفورمین، تعداد سلول‌های آپوپتوتیک ۱۲ درصد کمتر از تجویز به تنهایی دوز ۵ از سیس‌پلاتین است و این خود نشانه اثر آنتاگونیسم دو دارو با یکدیگر است.

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

جهت بررسی مکانیسم ملکولی اثر حفاظتی سلولی متفورمین بر اثرات سمی سیس پلاتین، به بررسی بیان پروتیین سوروایوین پرداخته شد. در نتایج مشاهده شد که سوروایوین 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 ٤٨ ساعت، بیان سوروایوین هنگامی که دو دارو به تنهایی تجویز می‌شود کاهش می‌یابد ولی موقعی که دو دارو به‌صورت هم زمان تجویز می‌گردد، بیان سوروایوین افزایش می‌یابد (شکل شماره ٤).

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 شیمی‌درمانی با داروی سیس‌پلاتین است، پرداخته شد. در بررسی با روش Real-time PCR، دیده شد که بعد از ٤٨ ساعت تجویز، بیان ژن AKT در موقعی که دو دارو به‌صورت مخلوط تجویز می‌گردند، بالاتر از هنگامی است که دو دارو به‌صورت تکی تجویز می‌شوند (شکل شماره ۵)؛ بنابراین، به‌نظر 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 ٤٨ ساعته و تکی متفورمین کاهش یافت، ولی هنگامی که دو دارو به‌طور هم‌زمان تجویز گردیدند، افزایش بیان mTOR مشاهده شد که خود می‌تواند دلیل دیگری بر اثر آنتاگونیسم دو دارو باشد. (شکل شماره ٦).

جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده در مطالعه حاضر

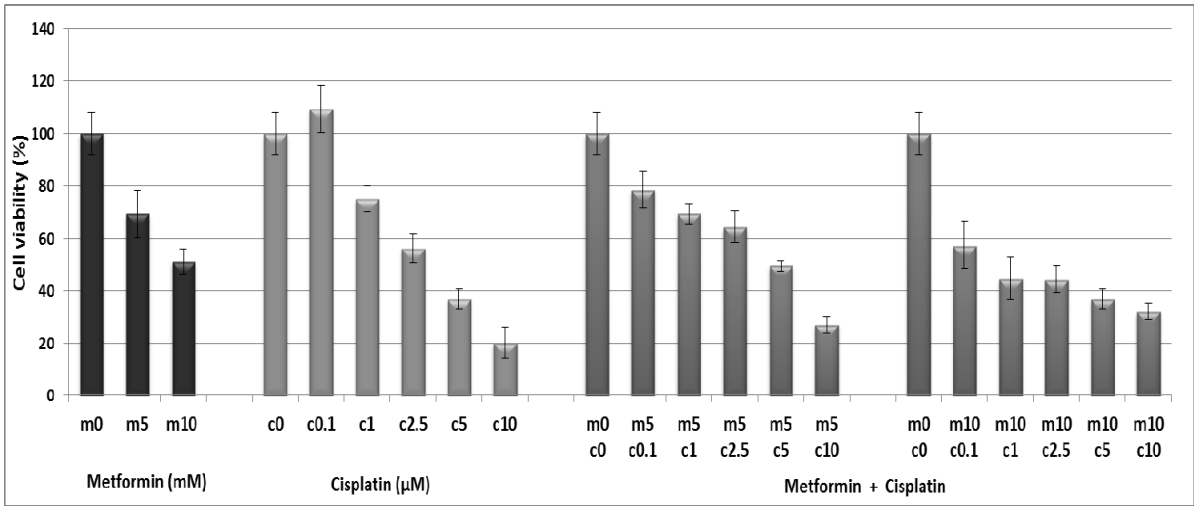
Gene	Accession number	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')	Size
HPRT	NM_000194	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	111
Akt	NM_005163	AGCGACGTGGCTATTGTGAAG	GTACTCCCCTCGTTTGTGCAG	51
Survivin	NM_001168	CCAGATGACGACCCCATAGAG	TTGTTGGTTTCCTTTGCAATTTT	152
mTOR	NM_004958	AACTCCGAGAGATGAGTCAAGA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

جدول شماره ۲- شاخص ترکیبی (CI) برای سیس‌پلاتین و متفورمین در رده سلولی MKN45 به‌مدت ٤٨ ساعت

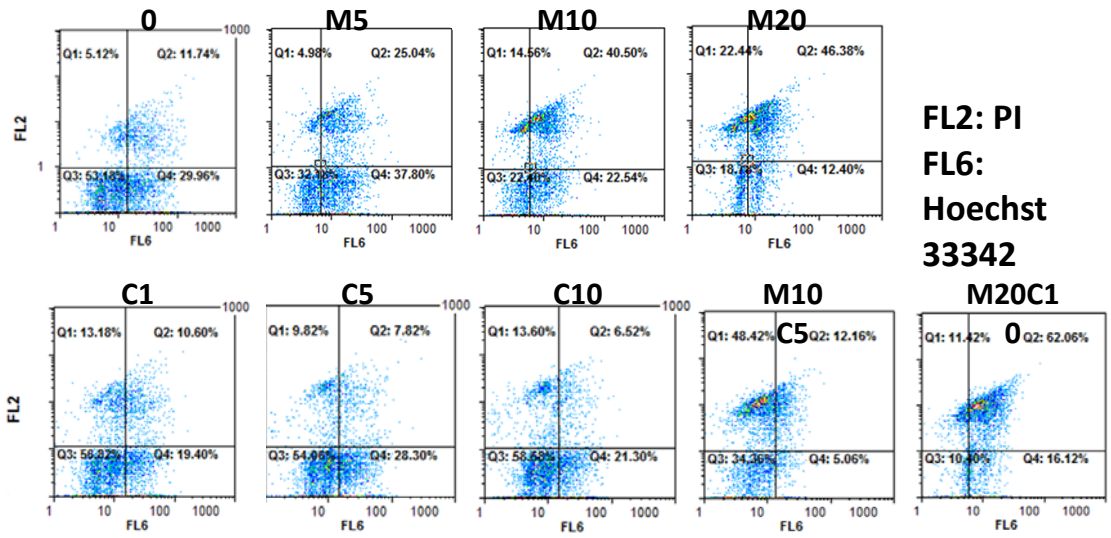
سیس پلاتین Mμ	CI (metformin=5mM)	CI (metformin=10mM)
۰/۱	۱/۳۰٤	۱/٤۱٦
۱	۱/۲۰۵	۱/۱۳۳
۲/۵	۱/۰۹۹	۱/٤۰۳
۵	۱/۳۰۹	۱/۰۹۱
۱۰	۱/۱٤۳	۱/۱۸۳

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

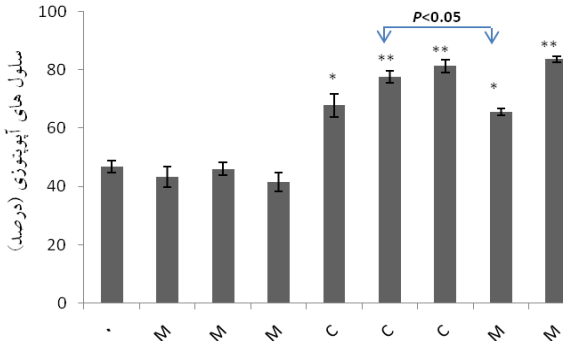
سیس پلاتین Mμ	CI (metformin=5mM)	CI (metformin=10mM)
۰/۱	۱/۵۹۱	۱/۲۹۱
۱	۱/٤۷۰	۱/۰۵٦
۲/۵	۱/۸۵۲	۱/۵۳۷
۵	۱/۹٤۵	۱/٦۹٤
۱۰	۱/۹۱٤	۲/٤٤۷



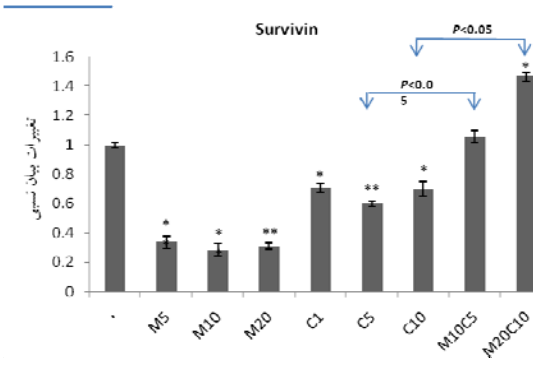
شکل شماره ۱- ارزیابی اثر متفورمین، سیس‌پلاتین و متفورمین/ سیس‌پلاتین بر زیست‌پذیری رده سلولی آدنوکارسینومای معده MKN-45. رده سلولی با غلظت‌های مختلف از متفورمین و/یا سیس‌پلاتین به‌مدت ٤٨ و ۷۲ ساعت تیمار شده و زیست‌پذیری آنها با روش MTT ارزیابی شد. نتایج به‌صورت درصد زیست‌پذیری در مقایسه با گروه کنترل محاسبه شد و به‌صورت میانگینی از ۳ آز مایش مستقل 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 0.1 ماکرو 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



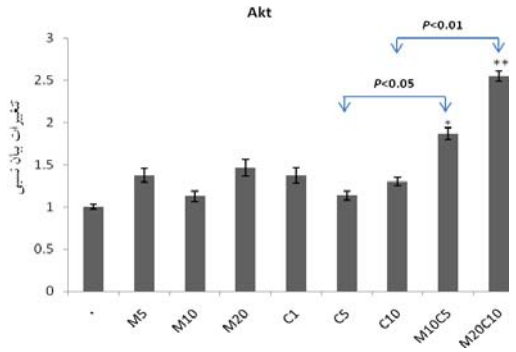
شکل شماره ۲- اثر متفورمین، سیس‌پلاتین و متفورمین/ سیس‌پلاتین بر آپوپتوز در رده سلولی MKN-45. رنگ Hoechst 33342، کروماتین فشرده در سلول های آپوپتوتیک را روشن‌تر از کروماتین در سلول‌های نرمال رنگ‌آمیزی می‌نماید و رنگ Propidium Iodide (PI) فقط به سلول‌های مرده نفوذ می‌نماید (FL2: PI, FL6: Hoechst 33342). تیمار با متفورمین، سیس پلاتین و متفورمین/ سیس‌پلاتین در مقایسه با گروه کنترل سبب تغییر معنی‌دار در میزان آپوپتوز در سلول‌های MKN45 می‌گردد.



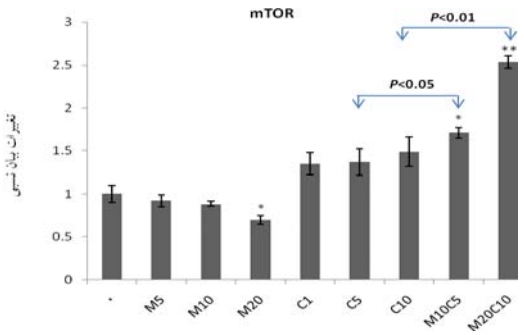
شکل شماره ۳- داده‌های کمی آپوپتوز در سلول‌های MKN45 تیمار شده با متفورمین، سیس‌پلاتین و متفورمین/ سیس‌پلاتین. آپوپتوز ناشی از غلظت ۵ میکرومولار سیس‌پلاتین به‌طور معنی‌داری بیشتر از آپوپتوز در تجویز هم‌زمان ۵ میکرومولار سیس‌پلاتین و ۱۰ میلی‌مولار متفورمین است. از لحاظ آماری داده‌ها با $P<۰/۰۱$** و $P<۰/۰۵$* در مقایسه با گروه کنترل نشان داده شدند. M5: دوز ۵ میلی‌مولار متفورمین، M10: دوز ۱۰ میلی‌مولار متفورمین، M20: دوز ۲۰ میلی-مولار متفورمین، C1: دوز ۱ میکرو مولار سیس پلاتین، C5: دوز ۵ میکرو مولار سیس پلاتین، C10: دوز ۱۰ ماکرو مولار سیس پلاتین، M10C5: دوز ۱۰ میلی‌مولار متفورمین به همراه ۵ میکرومولار سیس پلاتین، M20C10: دوز ۲۰ میلی‌مولار متفورمین به‌همراه ۱۰ میکرو مولار سیس پلاتین.



شکل شماره ٤- اثر متفورمین، سیس‌پلاتین و متفورمین/ سیس‌پلاتین بر سطح بیان ژن سوروایوین با روش Real-time PCR. داده‌ها بر اساس تغییرات فولد در بیان نسبی در مقایسه با HPRT1 نشان داده شده و بر پایه روش Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) نسبی محاسبه گردیده است. تیمار با متفورمین یا سیس‌پلاتین در ٤٨ ساعت سبب کاهش بیان سوروایوین گردیده است، اما هنگامی که دو دارو هم‌زمان داده شده است، افزایش بیان سوروایوین در مقایسه با گروه سیس‌پلاتین مشاهده می‌شود. داده‌ها به‌صورت $\overline{X} \pm SD$ نشان داده شده است. از لحاظ آماری داده‌ها با $P<۰/۰۱$** و $P<۰/۰۵$* 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 میکرو مولار سیس پلاتین، C5: دوز ۵ میکرومولار سیس پلاتین، C10: دوز ۱۰ میکرو مولار سیس پلاتین، M10C5: دوز ۱۰ میلی-مولار متفورمین به‌همراه ۵ میکرومولار سیس پلاتین، M20C10: دوز ۲۰ میلی‌مولار متفورمین به‌همراه ۱۰ میکرومولار سیس پلاتین.



شکل شماره ۵- اثر متفورمین، سیس‌پلاتین و متفورمین/ سیس پلاتین بر سطح بیان ژن AKT محاسبه شده با روش Real-time PCR. هنگامی‌که سلول‌ها با سیس‌پلاتین و متفورمین به‌صورت هم‌زمان تیمار می‌شوند، بیان AKT بالاتر از زمانی است که دو دارو به تنهایی تجویز می‌شوند. داده‌ها به‌صورت $\overline{X} \pm SD$ نشان داده شده است. از لحاظ آماری داده‌ها با $P<$۰/۰۱** و $P<$۰/۰۵* 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 ماکرو مولار سیس پلاتین، C5: دوز ۵ میکرو مولار سیس پلاتین، C10: دوز ۱۰ میکرو مولار سیس پلاتین، M10C5: دوز ۱۰ میلی‌مولار متفورمین به‌همراه ۵ میکرومولار سیس پلاتین، M20C10: دوز ۲۰ میلی‌مولار متفورمین به‌همراه ۱۰ میکرومولار سیس پلاتین.



شکل شماره ٦- اثر متفورمین، سیس پلاتین و متفورمین/ سیس پلاتین بر سطح بیان ژن mTOR محاسبه شده با روشReal-time PCR. هنگامی که سلول‌ها با سیس‌پلاتین و متفورمین به‌صورت هم زمان تیمار می‌شوند، بیان mTOR بالاتر از زمانی است که سیس‌پلاتین به تنهایی داده می‌شود. داده‌ها به‌صورت $\overline{X} \pm SD$ نشان داده شده است. از لحاظ آماری داده‌ها با $P<$۰/۰۱** و $P<$۰/۰۵* در مقایسه با گروه کنترل نشان داده شدند. M5: دوز ۵ میلی‌مولار متفورمین، M10: دوز ۱۰ میلی‌مولار 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 میلی‌مولار متفورمین به‌همراه ۵ میکرومولار سیس پلاتین، M20C10: دوز ۲۰ میلی‌مولار متفورمین به‌همراه ۱۰ میکرومولار 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 [۱۰-۷]. از طرف دیگر در مطالعات متعدد، اثرات متفورمین بر القاء آپوپتوز و کاهش پرولیفراسیون انواع سلول‌های سرطانی مانند پستان و تخمدان در محیط کشت مشاهده شده است [۱۲،۱۱]. هم‌چنین، اثر مهاری این دارو بر ایجاد و گسترش تومور و رگ‌زایی در محیط درون‌تنی مشاهده شده است [۱٤،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 آپوپتوزی 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 آپوپتوز می‌گردد [۲٤]. در یک مطالعه گزارش شده است که در مواجه کردن سلول‌ها با سوروایوین سبب مهار آپوپتوز ناشی از اتوپوزاید می‌شود [۲۵]. هم‌چنین، نشان داده شده است در بیماران مبتلا به سرطان پیشرفته مری که تحت شیمی درمانی بودند، بیان mRMA مربوط به سوروایوین در گروهی که به درمان تا حدی جواب داده بودند به‌طور معنی‌داری کمتر از گروهی بود که به درمان مقاومت نشان داده بودند [۲٦]. گزارش‌های اخیر نشان می‌دهد که بیان mRNA یا پروتئین سوروایوین با پیش‌آگهی نامطلوب در سرطان‌های بدخیم مختلف در ارتباط است [۲۹-۲۷]. این یافته پیشنهاد می‌نماید که سوروایوین نقش مهمی در مقاومت به شیمی درمانی در سلول‌های بدخیم ایفا می‌نماید. در مورد مکانیسم اثر متفورمین بر بیان سوروایوین گفته شده است که متفورمین سبب فعال سازی AMPK می‌گردد [۳۰]. AMPK فسفوریله با واسطه TSC1 و TSC2 سبب مهار mTOR می‌گردد [۳۰]. مهار

mTOR نیز در نتایج این مطالعه دیده شد. از آنجا که mTOR سبب افزایش سوروایوین می‌گردد، بنابراین مهار mTOR سبب مهار سوروایوین و در نتیجه کاهش زنده ماندن سلول و افزایش آپوپتوز می‌گردد. متفورمین می‌تواند از طریق کاهش بیان سوروایوین، سبب کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطانی و القای آپوپتوز گردد. در مطالعه حاضر، دیده شد که متفورمین به تنهائی سبب کاهش بیان سوروایوین و mTOR می‌گردد، ولی هنگامی که دو دارو همزمان تجویز می‌شوند، افزایش بیان سوروواوین و mTOR مشاهده می‌شود. بنابراین، اثرات آنتاگونیسم این دو دارو می‌تواند وابسته به بیان سوروایوین باشد. در مورد دلیل بالا رفتن بیان سوروواوین 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 سوروایوین در درده سلولی MKN45 می‌گردد. این افزایش بیان ژن و پروتئین سوروایوین 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 سرین‌ترئونین‌کیناز AKT است. ژن AKT یک تحت واحد PI3K است که نقش مهمی در کنترل زنده ماندن سلول و آپوپتوز ایفا می‌نماید. AKT مستقیما و از طریق فسفوریلاسیون و غیرفعال‌سازی اهداف پیش‌آپوپتوزی شامل BAD، forkhead transcription factors، c-Raf و کاسپاز ۹ سبب مهار آپوپتوز می‌گردد [۳۴-۳۱]. هم‌چنین، این پروتئین از طریق فعال سازی NF-κB و ژن‌های پروسوروایوال 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 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 سیس‌پلاتین، ناشی از مهار بر کاهش بیان AKT ناشی از سیس‌پلاتین 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 سیس‌پلاتین در تومور معده نمی‌باشد و هنگامی که این دو دارو به‌صورت هم زمان 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 هماتولوژی‌انکولوژی 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.

[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

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-Ferraros 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.