

بررسی تأثیر متفورمین بر افزایش حساسیت سلول‌های سرطان تخمدان مقاوم به سیس پلاتین (A2780 / CP)

وحید شفیعی ایران‌نژاد^{۱*}، نصرت‌اله ضرغامی^۲، ناصر صمدی^۳، ابوالفضل اکبرزاده^۴

تاریخ دریافت ۱۴۰۲/۱۲/۰۹ تاریخ پذیرش ۱۴۰۳/۰۱/۰۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سرطان یکی از عوامل اصلی مرگ‌ومیر و چالش اساسی سلامت در جهان محسوب می‌شود. مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی یکی از اساسی‌ترین چالش‌ها در این زمینه است. برخی یافته‌ها اخیراً نشان داده‌اند که داروهای ضد دیابت، به‌ویژه متفورمین، در صورت ترکیب با داروهای ضد سرطان، اثرات مثبتی در درمان سرطان ایجاد می‌کنند. در مطالعه حاضر، فعالیت و مکانیسم احتمالی اثر متفورمین در افزایش حساسیت رده سلولی کارسینوم تخمدان A2780/CP به سیسپلاتین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار: در این مطالعه کارآزمایی بالینی، سلول‌های سرطان تخمدان مقاوم به سیس پلاتین (A2780/CP) انتخاب شدند. اثر متفورمین بر سمیت سلولی سیس پلاتین با استفاده از روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. سطوح بیان mRNA ژن مربوط به پروتئین مقاومت چند دارویی (MRP-2) پس از درمان با متفورمین با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز رونویسی معکوس (RT-PCR) تعیین شد. اثر متفورمین بر آپوپتوز ناشی از سیس پلاتین با استفاده از روش Annexin V/FITC مورد بررسی قرار گرفت. نتایج با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism 6.01 آنالیز شدند و مقادیر P کمتر از ۰.۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: متفورمین باعث افزایش اثرات سمیت سلولی سیس پلاتین در سلول‌های سرطان تخمدان مقاوم به سیس پلاتین A2780/CP شد، ولی تأثیری بر مقاومت سلول‌های سرطان پستان حساس A2780 نداشت. متفورمین تأثیری بر بیان ژن MRP-2 نداشت. همچنین متفورمین سبب افزایش اثرات آپوپتوزی سیس پلاتین در سلول‌های A2780/CP شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که متفورمین حساسیت سلول‌های A2780/CP را به اثرات سمی سیس پلاتین افزایش می‌دهد. بنابراین، متفورمین ممکن است یک ترکیب مؤثر و قوی برای درمان ترکیبی در سلول‌های سرطان تخمدان و غلبه بر مقاومت چند دارویی در برابر عوامل شیمی‌درمانی باشد.

کلیدواژه‌ها: رده سلولی A2780/CP، سیس پلاتین، متفورمین، مقاومت چند دارویی، سرطان تخمدان

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و پنجم، شماره اول، ص ۹-۱، فروردین ۱۴۰۳

آدرس مکاتبه: ارومیه، بلوار رسالت، جنب اورژانس، ستاد دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ساختمان معاونت تحقیقات و فناوری، تلفن: ۰۹۱۹۴۷۰۹۳۵۷

Email: vahid.shafiei@hotmail.com

مقدمه

به‌صورت ترکیبی مورد استفاده قرار گیرد شامل جراحی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی است (۱). سرطان تخمدان یک بدخیمی زنانه است و بیشترین میزان مرگ‌ومیر را در بین بدخیمی‌های زنان دارد. سالانه بیش از ۵۰ درصد بیماران مبتلا به سرطان تخمدان به دلیل این بیماری جان خود را از دست می‌دهند (۲). سرطان تخمدان به سه

سرطان عامل اصلی مرگ‌ومیر و مشکل عمده سلامت در سراسر جهان است و سالانه هزینه‌های زیادی را برای درمان بیماران و بررسی روش‌های جدید تشخیصی و درمانی ایجاد می‌کند. روش‌های معمول برای درمان و مدیریت سرطان که می‌تواند به‌تنهایی یا

^۱ استادیار بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

^۲ استاد بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۳ دانشیار بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی و آزمایشگاه‌های بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۴ دانشیار شیمی دارویی، گروه نانو تکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

فسفات (AMPK) را تحریک کند که منجر به کاهش گلوکونوزنز توسط سلول‌های کبدی و افزایش حساسیت به انسولین می‌شود (۱۵، ۱۶). AMPK آنزیم تنظیم‌کننده کلیدی برای اثرات متابولیک متفورمین است. علاوه بر اثرات متابولیک، AMPK با سیگنال‌هایی که در رشد سلولی و آپوپتوز نقش دارند تداخل می‌کند (۱۷). چندین مطالعه پایه و بالینی اثرات مفید متفورمین در درمان سرطان را نشان داده‌اند، با این حال، مکانیسم دقیق مشخص نیست. بنابراین در مطالعه حاضر، هدف ما بررسی اثرات احتمالی متفورمین بر سمیت سلولی سیس پلاتین و بیان ژن MRP-2 و همچنین فعالیت آن‌ها بر روی سلول‌های سرطانی تخمدان مقاوم به سیس پلاتین است.

مواد و روش کار

شرایط کشت سلول:

این مطالعه یک مطالعه مداخله‌ای در سطح *in vitro* هست. سلول‌های حساس سرطان تخمدان A2780 و مقاوم به سیس پلاتین سرطان تخمدان A2780/CP در محیط کشت RPMI-1640 همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی^۳ (FBS)، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک، ۲ میلی مولار گلوتامین و ۱ درصد پیروات سدیم در محیطی با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۹۵ درصد رطوبت اتمسفری و حاوی ۵ درصد دی‌اکسید کربن نگهداری شدند. سلول‌های A2780/CP در حضور ۲ میکرومولار سیس پلاتین کشت داده شدند و قبل از استفاده در آزمایش‌ها به مدت ۱ هفته در محیط کشت عاری از دارو رشد داده شدند.

تست MTT:

برای تجزیه و تحلیل زنده‌مانی سلول، سنجش MTT انجام شد. به‌طور خلاصه، سلول‌های A2780/CP و A2780 در سه تکرار در پلیت‌های ۹۶ چاهک در محیط کشت RPMI-1640 با ۱۰ درصد FBS با تراکم ۱۰^۴ سلول در هر چاهک کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، غلظت‌های مختلف سیس پلاتین با و بدون متفورمین در RPMI-1640 حل شد و به هر چاهک اضافه شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، محیط کشت با ۲۰۰ میکرولیتر محیط تازه حاوی ۱۰ درصد پودر MTT (5mg/ml) جایگزین شد و به مدت ۴ ساعت دیگر انکوبه شد. سپس محیط خارج شد و فورمازان تشکیل شده در ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شد. جذب در ۵۷۰ نانومتر با دستگاه خوانش الیزا (State Fax, 2100, Awareness Technology Inc, Palm City, FL, USA) اندازه‌گیری شد. زنده‌مانی سلول‌ها در هر گروه تیمار شده و غلظت

زیرگروه تقسیم می‌شود: تومورهای سلول زایا، استرومایی و اپیتلیال که شایع‌ترین نوع آن، اپیتلیال است (۳). درمان استاندارد سرطان تخمدان شامل جراحی و به دنبال آن شیمی‌درمانی است. اگرچه اکثر بیماران در مرحله اولیه شیمی‌درمانی پاسخ به درمان خوبی دارند، عود تقریباً در ۷۰ درصد بیماران رخ می‌دهد. بنابراین، ترکیبات جدیدی برای کاهش خطر عود مورد نیاز است.

شیمی‌درمانی ابزار مهمی برای درمان بسیاری از سرطان‌ها است، با این حال، موانعی برای شیمی‌درمانی موفق وجود دارد (۴، ۵). علیرغم پیشرفت‌هایی که در زمینه توسعه داروهای شیمی‌درمانی با اثربخشی بالاتر و سمیت کمتر انجام شده است با این حال، مقاومت در برابر شیمی‌درمانی هنوز یک مانع بزرگ در درمان موفقیت‌آمیز سرطان است. مقاومت در برابر شیمی‌درمانی که به‌عنوان مقاومت چند دارویی (MDR)^۱ شناخته می‌شود، با مکانیسم‌های مختلفی از جمله افزایش خروج دارو از سلول‌ها از طریق ناقلین متصل‌شونده به آدنوزین تری‌فسفات (ABC)^۲، کاهش ورود دارو به سلول، فعال شدن مسیرهای ترمیم DNA، تعدیل مسیرهای آپوپتوز و تغییر در مولکول‌های هدف صورت می‌گیرد (۶، ۷). در این میان، افزایش جریان دارو توسط ناقلین ABC شایع‌ترین روش برای مقاومت دارویی است. انتقال‌دهنده‌های ABC پروتئین‌هایی هستند که از ATP برای انتقال انواع مختلف ترکیبات در غشاهای بیولوژیکی استفاده می‌کنند. تا به امروز، ۴۸ نوع از انتقال‌دهنده‌های ABC در هفت زیر خانواده مختلف طبقه‌بندی شده‌اند. گلیکو پروتئین-P (gp) و پروتئین مقاومت چند دارویی ۲ (MRP-2) از رایج‌ترین انتقال‌دهنده‌های ABC هستند که در بسیاری از سرطان‌های انسانی از جمله سرطان‌های روده بزرگ، پستان و سرطان خون بیان می‌شوند و طیف گسترده‌ای از عوامل سیتوتوکسیک مانند آلکالوئیدهای وینکا، تاکسان‌ها و آنتراسایکلین‌ها را انتقال می‌دهند (۸-۱۰). یکی از راهبردهای جلوگیری کننده از این اتفاق استفاده از مهارکننده‌ها مانند وراپامیل و سیکلوسپورین A در ترکیب با داروهای شیمی‌درمانی است (۱۱، ۱۲).

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که داروهای ضد دیابت از جمله متفورمین، تیازولیدین دیون‌ها و سولفونیل اوره‌ها در صورت ترکیب با عوامل ضد سرطان اثرات مفیدی در درمان سرطان دارند (۱۳، ۱۴). اثرات ضد دیابتی متفورمین با مسدود کردن کمپلکس I زنجیره انتقال الکترون و فسفوریلاسیون اکسیداتیو رخ می‌دهد که منجر به افزایش نسبت آدنوزین مونوفسفات به آدنوزین تری فسفات می‌شود. افزایش آدنوزین مونوفسفات می‌تواند آنزیم‌هایی مانند آدنیلات سیکلاز، فروکتوز ۱،۶-بی فسفات و پروتئین کیناز فعال آدنوزین مونو

³ Fetal bovine serum

¹ Multi Drug Resistance

² ATP-binding cassette family

سلول‌ها مجدداً در ۵۰۰ میکرولیتر از بافر اتصال مخلوط شدند، ۵ میکرولیتر Annexin V-FITC و سپس ۵ میکرولیتر پروپیدیوم دیدید اضافه شد. سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (BD FACSCalibur, BD) و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (Biosciences, San Jose, CA, USA) آنالیز شدند.

آنالیز آماری:

تمامی داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شد و تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) برای توضیح تفاوت بین گروه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر P کمتر از ۰.۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. تمامی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 6.01 تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

تأیید فنوتیپ مقاوم در سلول‌های سرطان تخمدان:

سلول‌های A2780/CP به سیس پلاتین مقاوم بودند، همان‌طور که سمیت بالاتر در سلول‌های A2780/S تأیید شد. تفاوت قابل‌توجهی در بیان ژن MRP-2 در سلول‌های A2780 و A2780/CP مشاهده نشد، که نشان می‌دهد مقاومت در A2780/CP به سیس پلاتین به دلیل بیان بالاتر MRP-2 نیست و مکانیسم‌های دیگری ممکن است در سرطان تخمدان نسبت به مقاومت به سیس پلاتین دخیل باشند.

متفورمین سمیت سلولی را در سلول‌های مقاوم به سیس

پلاتین افزایش داد:

همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، متفورمین سمیت سلولی تقریباً برابری را علیه تمام سلول‌های سرطان پستان حساس و مقاوم تیمار شده اعمال کرد. در غلظت‌های ۵-۱۵ میلی‌مولار متفورمین اثر بازدارندگی پایینی داشت، در حالی که اثرات سمی در دوزهای بالاتر از ۲۰ میلی‌مولار مشاهده شد. انحراف به چپ در پروفایل سمیت سیس پلاتین پس از افزودن متفورمین نشان می‌دهد که متفورمین سمیت سلولی سیس پلاتین را در سلول‌های A2780/CP افزایش می‌دهد، در حالی که هیچ تأثیری بر سمیت سلولی سیس پلاتین در سلول‌های حساس نداشت. درمان با متفورمین در سلول‌های مقاوم به‌طور قابل‌توجهی مقادیر IC50 سیس پلاتین و RF را کاهش داد، که نشان می‌دهد متفورمین می‌تواند MDR را در سلول‌های A2780/CP معکوس کند.

مهارى (IC50) محاسبه شد. علاوه بر این، میزان کاهش مقاومت سلولی (RF) با تقسیم IC50 سلول‌های مقاوم در هر گروه تیمار شده به IC50 سلول‌های نوع حساس محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل سطوح mRNA توسط RT-PCR:

RNA کل 1×10^6 سلول با استفاده از معرف RNX-PLUS طبق دستورالعمل سازنده (سیناژن، تهران، ایران) استخراج شد. سپس ۱ میکروگرم از RNA کل برای سنتز cDNA با استفاده از AccuPower PCR PreMix (Daedeok-Bioneer, Korea)، Daejeon، gu استفاده شد. بلافاصله پس از رونویسی معکوس، RT-PCR توسط SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio، Otsu, Shiga, Japan) توسط micPCR (Bio Molecular Systems, Australia) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در RT-PCR به شرح زیر بود:

ABCC2 forward 5'-

AGGTTTGCCAGTTATCCGTG-3', reverse 5'-

AACAAAGCCAACAGTGTCCC-3',

GAPDH forward 5'-

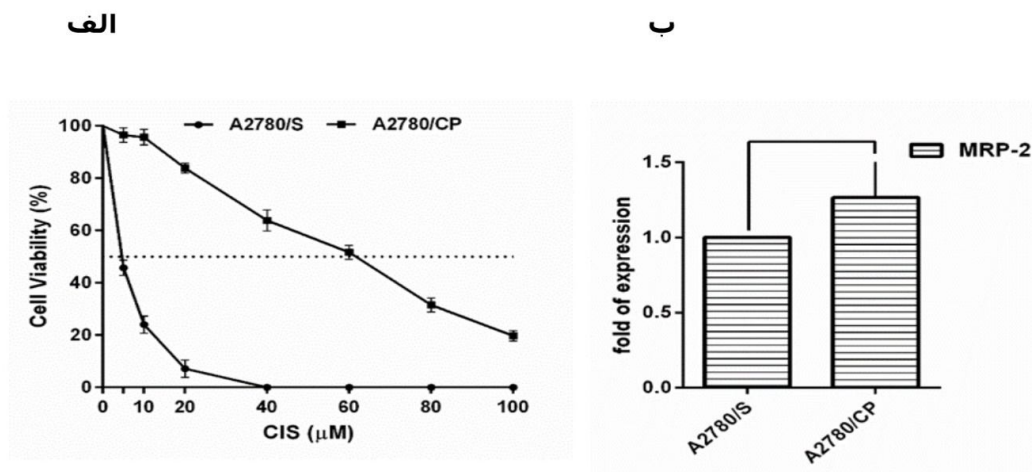
TGCACCACCAACTGCTTAGC-3', reverse 5'-

GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

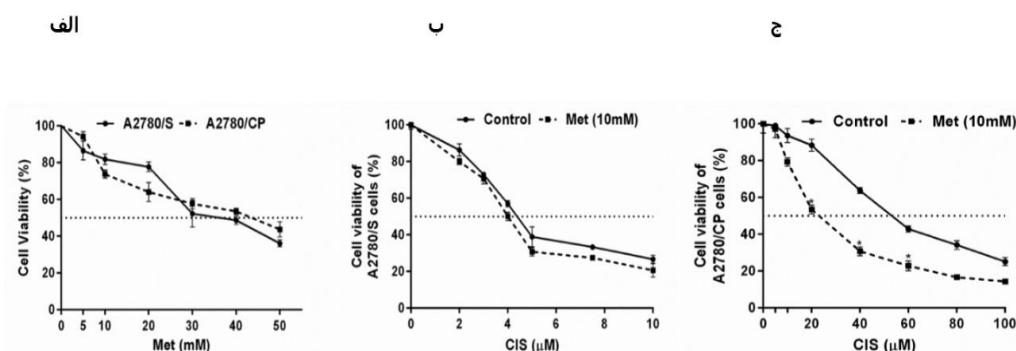
شرایط PCR شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و سپس ۴۰ چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گرادی به مدت ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه بود. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و برای هر نمونه مقدار آستانه سیکل (Ct) برای ژن هدف و GAPDH به‌عنوان ژن مرجع داخلی تعیین شد. سطح بیان mRNA نسبی ژن هدف به سطح بیان GAPDH نرمال شد، که امکان محاسبه cDNA هدف را فراهم کرد.

بررسی آپوپتوز به روش فلوسایتومتری:

اثرات آپوپتوتیک متفورمین بر روی سلول‌های A2780/CP استفاده از کیت ApoFlowEx® FITC (EXBIO Diagnostics) جمهوری چک انجام شد. سلول‌ها در صفحات ۶ چاهکی با تراکم 5×10^5 سلول در هر چاهک کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت سلول‌ها با سیس پلاتین تنها، ترکیب متفورمین و سیس پلاتین و محیط تازه به‌عنوان گروه کنترل تیمار شدند و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌ها جدا شدند، دو بار با PBS شسته شدند،



شکل (۱) - الف - زنده ماندن سلول‌های A2780/CP و A2780 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف سیس پلاتین به مدت ۴۸ ساعت با روش MTT ارزیابی شد. هر نقطه نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار سه آزمایش مستقل است. (ب) سطح بیان mRNA ژن MRP-2 در سلول‌ها با استفاده از RT-PCR تعیین و با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ تعیین شد. برای آنالیز آماری ما بین دو گروه از آزمون t test استفاده شد. (معنی‌داری $p < 0.05$)



شکل (۲) - الف - سمیت سلولی متفورمین در غلظت‌های مختلف در سلول‌های A2780/S و A2780/CP. (ب، ج) سلول‌های A2780/S و A2780/CP با یا بدون ۱۰ میلی‌مولار متفورمین پس از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف سیس پلاتین به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. زنده ماندن سلولی با استفاده از روش MTT تعیین شد. هر نقطه نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار سه آزمایش مستقل است. (معنی‌داری $p < 0.05$)

جدول (۱): تأثیر قرار گرفتن در معرض فرمولاسیون متفورمین به همراه سیس پلاتین بر سمیت سلولی در سلول‌های A2780 و

Cell lines	A2780/CP		A2780/CP	
	CIS		CIS+Met (10mM)	
	IC ₅₀ (μM)	RF	IC ₅₀ (μM)	RF
A2780/S	4.88 ± 0.37	-	4.13 ± 0.33	-
A2780/CP	54.52 ± 3.12	11.17	24.47 ± 1.94	5*

می‌دهند که مقاومت به سیس پلاتین در سلول‌های مقاوم به سیس پلاتین A2780/CP به دلیل بیان بالاتر MRP-2 نیست و احتمالاً مکانیسم‌های دیگری در مقاومت به سیس پلاتین در این سلول‌ها دخالت دارند (شکل ۲).

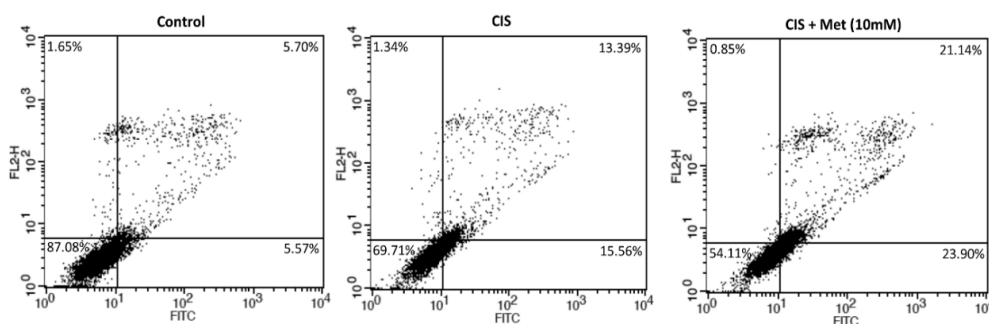
میزان آپوپتوز سلول‌های سرطان تخمدان:

برای تعیین اثرات درمان با متفورمین بر آپوپتوز ناشی از سیس پلاتین، روش رنگ‌آمیزی Annexin V/PI انجام شد. نتایج فلوسایتومتری نشان داد که متفورمین در ترکیب با سیس پلاتین به‌طور قابل‌توجهی میزان آپوپتوز در سلول‌های A2780/CP را در مقایسه با سلول‌هایی که دارو را به‌تنهایی دریافت کرده بودند افزایش می‌دهد (شکل ۳).

پس از تیمار با غلظت‌های مختلف سیس پلاتین در فرمولاسیون‌های مختلف، زنده ماندن سلول‌ها با استفاده از روش MTT همان‌طور که در بخش روش‌ها توضیح داده شد، تعیین شد. هر مقدار نشان‌دهنده میانگین \pm انحراف معیار سه آزمایش مستقل است. RF با تقسیم IC50 سلول‌های مقاوم در هر گروه‌درمانی به IC50 سلول‌های نوع حساس محاسبه شد. برای آنالیز آماری ما بین دو گروه از آزمون t test استفاده شد \times (معنی‌داری $p < 0.05$)

میزان بیان MRP-2:

جهت تعیین فنوتیپ مقاوم ما ابتدا میزان بیان پایه زن MRP-2 را در سلول A2780 و A2780/CP اندازه‌گیری کردیم. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سطح بیان پایه MRP-2 در سلول‌های A2780 و A2780/CP وجود نداشت، این یافته‌ها نشان



شکل (۳): تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری آپوپتوز سلول‌های A2780/CP. سلول‌های A2780/CP با سیس پلاتین (۲۴ میکرومولار) و متفورمین (۱۰ میلی مولار) تیمار شدند. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها با PI و Annexin V رنگ‌آمیزی شدند.

قابل توجهی آپوپتوز سلولی را در مقایسه با هر عامل به‌تنهایی افزایش داد.

در سلول‌های سرطانی تخمدان، تفاوت معنی‌داری در سطح بیان پایه MRP-2 در سلول‌های مقاوم A2780/CP و سلول‌های حساس A2780 مشاهده نشد، که نشان می‌دهد مقاومت به سیس پلاتین در سلول‌های A2780/CP به دلیل بیان بیش‌ازحد MRP-2 نیست و مکانیسم‌های دیگری ممکن است دخیل باشند. علاوه بر بیان بیش‌ازحد پروتئین‌های خارج کننده دارو، مکانیسم‌های متعدد دیگری مانند افزایش ترمیم DNA، تغییرات در مولکول‌های هدف، پاسخ‌های ژنتیکی و آنزیم‌های متابولیسم‌کننده دارو در توسعه MDR دخیل هستند (۱۹-۲۳). به‌عنوان مثال، اشاره شده است که سطح پروتئین‌های ترمیم‌کننده DNA مانند xeroderma pigmentosum group E binding factor (XPE-BF) excision repair cross-complementing protein (ERCC-1) عامل اتصال رنگ‌دانه خشک پوستی گروه E (XPE-BF) و

بحث و نتیجه‌گیری

اگرچه سیس پلاتین جزء ترکیبات ضد سرطانی قوی و پرکاربردی هست، درمان با این دارو با عوارض جانبی شدید به‌ویژه سمیت کلیوی همراه است که بیشتر به غلظت دارو بستگی دارد (۱۸). برای کاهش عوارض جانبی سمی سیس پلاتین یک رویکرد استفاده هم‌زمان آن با ترکیبات بی‌خطر و با عوارض جانبی کم هست. در این مطالعه مشاهده کردیم که ترکیب متفورمین در غلظت‌های غیر سمی با سیس پلاتین، IC50 را در سلول‌های A2780/CP کاهش داد، که نشان می‌دهد متفورمین ممکن است عوارض جانبی سمی سیس پلاتین را بدون تغییر در اثربخشی آن بهبود بخشد. برای بررسی بیشتر اثر متفورمین بر سمیت سلولی سیس پلاتین، ما اثر متفورمین را بر آپوپتوز ناشی از سیس پلاتین در سلول‌های A2780/CP از طریق آنالیز فلوسایتومتری ارزیابی کردیم. نتایج نشان داد که ترکیب متفورمین با سیس پلاتین به‌طور

MDR در برابر عوامل شیمی‌درمانی باشد. مکانیسم پیشنهادی کاهش مقاومت سلول‌های A2780/CP می‌تواند افزایش گلوکوتایون احیاء داخل سلولی باشد که پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده تأثیر متفورمین بر میزان گلوکوتایون احیاء داخل سلولی مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی:

از مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه برای همکاری در این طرح تحقیقاتی تشکر و قدردانی می‌شود.

حمایت مالی تحقیق:

ندارد.

تضاد منافع:

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تضاد منافع مرتبط با نگارش و یا انتشار این مقاله ندارند.

ملاحظات اخلاقی:

این مطالعه با کد اخلاق IR.TBZMED.REC.1394.795 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز به تصویب رسیده است.

پروتئین‌های ترمیم‌کننده DNA ترمیم‌کننده متقاطع (ERCC-1) در سلول‌های مقاوم به سیس پلاتین و کربوپلاتین افزایش می‌یابد. مطالعات بیشتر نشان داد که سطح بیان این دو پروتئین ارتباط مستقیمی با مقاومت تومورها به سیس پلاتین و کربوپلاتین دارد (۲۴). در مطالعه اخیر جمالی و همکارانش دریافتند که مقاومت سیس پلاتین با افزایش سطح گلوکوتایون درون‌سلولی به‌عنوان یک عامل سم‌زدایی در ارتباط است (۲۵). بنابراین، مقاومت سیس پلاتین به نظر می‌رسد چندعاملی باشد و مکانیسم‌های مختلفی ممکن است در مقاومت به سیس پلاتین غیر از MRP-2 دخیل باشد.

مطالعات دیگری همچنین نشان داده‌اند که مقاومت به سیس پلاتین با افزایش فعالیت پمپ glutathione-S-conjugate export pump (GS-X pump) و کاهش تجمع سیس پلاتین در داخل سلول‌های سرطانی در ارتباط است (۲۶، ۲۷). بنابراین، کاهش محتوای درون‌سلولی سیس پلاتین در سلول‌های A2780/CP پس از تیمار با متفورمین ممکن است منجر به کاهش فعالیت پمپ GS-X و کاهش جریان کوئزوگه گلوکوتایون از سلول‌ها و کاهش مقاومت به سیس پلاتین شود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار با متفورمین حساسیت سلول‌های A2780/CP را به اثرات سیتوتوکسیک سیس پلاتین افزایش می‌دهد. بنابراین، متفورمین ممکن است یک ترکیب مؤثر و قوی برای درمان ترکیبی در سلول‌های سرطان تخمدان و غلبه بر

References:

1. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C, Leach C, Cannady RS, Cho H, Scoppa S, Hachey M, Kirsh R, Jemal A, Ward E. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *Cancer J Clin* 2012;62(4):220-41. <https://doi.org/10.3322/caac.21149>
2. Morrison J, Haldar K, Kehoe S, Lawrie TA. Chemotherapy versus surgery for initial treatment in advanced ovarian epithelial cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;2012(8):Cd005343. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005343.pub3>
3. Ozols RF. Treatment goals in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15 Suppl 1:3-11. <https://doi.org/10.1136/ijgc-00009577-200505001-00002>
4. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:361-98. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.361>
5. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000;11(4):265-83. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00114-7](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00114-7)
6. Gottesman MM, Ambudkar SV. Overview: ABC transporters and human disease. *J Bioenerg Biomembr* 2001;33(6):453-8. <https://doi.org/10.1023/A:1012866803188>
7. Yousefi B, Samadi N, Baradaran B, Shafiei-Irannejad V, Zarghami N. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Ligands and Their Role in Chronic

- Myeloid Leukemia: Therapeutic Strategies. *Chem Biol Drug Des* 2016;88(1):17-25.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.12737>
- 8 .Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976;455(1):152-62.
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90160-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90160-7)
 - 9 .Kartner N, Riordan JR, Ling V. Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* 1983;221(4617):1285-8. <https://doi.org/10.1126/science.6137059>
 - 10 .Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, Pirker R, Green A, Crist W, Brodeur GM, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst* 1989;81(2):116-24. <https://doi.org/10.1093/jnci/81.2.116>
 - 11 .Gottesman MM, Ling V. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research. *FEBS Lett* 2006;580(4):998-1009. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.060>
 - 12 .Zhang Z, Tan S, Feng SS. Vitamin E TPGS as a molecular biomaterial for drug delivery. *Biomaterials* 2012;33(19):4889-906.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.046>
 - 13 .Edgerton DS, Johnson KM, Cherrington AD. Current strategies for the inhibition of hepatic glucose production in type 2 diabetes. *Front Biosci* 2009;14(3):1169-81. <https://doi.org/10.2741/3301>
 - 14 .Bikman BT, Zheng D, Kane DA, Anderson EJ, Woodlief TL, Price JW, Dohm GL, Neuffer PD, Cortright RN. Metformin Improves Insulin Signaling in Obese Rats via Reduced IKKbeta Action in a Fiber-Type Specific Manner. *J Obes* 2010;2010. <https://doi.org/10.1155/2010/970865>
 - 15 .Zheng J, Woo SL, Hu X, Botchlett R, Chen L, Huo Y, Wu C. Metformin and metabolic diseases: a focus on hepatic aspects. *Front Med* 2015;9(2):173-86.
<https://doi.org/10.1007/s11684-015-0384-0>
 - 16 .Lee JM, Seo WY, Song KH, Chanda D, Kim YD, Kim DK, Lee MW, Ryu D, Kim YH, Noh JR, Lee CH, Chiang JY, Koo SH, Choi HS. AMPK-dependent repression of hepatic gluconeogenesis via disruption of CREB.CRRC2 complex by orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *J Biol Chem* 2010;285(42):32182-91.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.134890>
 - 17 .Pierotti MA, Berrino F, Gariboldi M, Melani C, Mogavero A, Negri T, Pasanisi P, Pilotti S. Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: metformin, an old drug with multifaceted effects. *Oncogene*. 2013;32(12):1475-87.
<https://doi.org/10.1038/onc.2012.181>
 - 18 .McGowan JV, Chung R, Maulik A, Piotrowska I, Walker JM, Yellon DM. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther* 2017;31(1):63-75. PMC5346598.
<https://doi.org/10.1007/s10557-016-6711-0>
 - 19 .Hartwell LH, Szankasi P, Roberts CJ, Murray AW, Friend SH. Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science* 1997;278(5340):1064-8.
<https://doi.org/10.1126/science.278.5340.1064>
 - 20 .Burger H, Foekens JA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Wiemer EA, Stoter G, Nooter K. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res* 2003;9(2):827-36.
 - 21 .Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P. Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer* 2004;11(3):537-51.
<https://doi.org/10.1677/erc.1.00800>
 - 22 .Welsh PL, King MC. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10(7):705-13.
<https://doi.org/10.1093/hmg/10.7.705>

- 23 .Urquhart BL, Tirona RG, Kim RB. Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs. *J Clin Pharmacol* 2007;47(5):566-78.
<https://doi.org/10.1177/0091270007299930>
- 24 .Stewart DJ. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;63(1):12-31. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.02.001>
- 25 .Jamali B, Nakhjavani M, Hosseinzadeh L, Amidi S, Nikounezhad N, F HS. Intracellular GSH Alterations and Its Relationship to Level of Resistance following Exposure to Cisplatin in Cancer Cells. *Iran J Pharm Res* 2015;14(2):513-9.
- 26 .Kurokawa H, Nishio K, Ishida T, Arioka H, Fukuoka K, Nomoto T, Fukumoto H, Yokote H, Saijo N. Effect of glutathione depletion on cisplatin resistance in cancer cells transfected with the gamma-glutamylcysteine synthetase gene. *Jpn J Cancer Res* 1997;88(2):108-10. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1997.tb00354.x>
- 27 .Oguri T, Isobe T, Suzuki T, Nishio K, Fujiwara Y, Katoh O, Yamakido M. Increased expression of the MRP5 gene is associated with exposure to platinum drugs in lung cancer. *Int J Cancer* 2000;86(1):95-100. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(20000401\)86:1<95::AID-IJC15>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(20000401)86:1<95::AID-IJC15>3.0.CO;2-G)

EXAMINING THE EFFECT OF METFORMIN ON ENHANCING THE SENSITIVITY OF CISPLATIN-RESISTANT OVARIAN CANCER CELLS (A2780/CP)

Vahid Shafiei-Irannejad^{*1}, Nosratollah Zarghami², Nasser Samadi³, Abolfazl Akbarzadeh⁴

Received: 28 February, 2024; Accepted: 24 March, 2024

Abstract

Background & Aims: Cancer is considered as one of the main causes of death and a major health challenge in the world. Resistance to chemotherapy is one of the challenges in this field. Some recent findings have shown that anti-diabetic drugs, especially metformin, when combined with anticancer drugs, produce positive effects in cancer treatment. In the present study, the activity and possible mechanism of the effect of metformin in increasing the sensitivity of ovarian carcinoma cell line A2780/CP to cisplatin were investigated.

Materials & Methods: In this experimental study, ovarian cancer cells resistant to cisplatin (A2780/CP) were selected. The effect of metformin on cisplatin cytotoxicity was evaluated using MTT method. The mRNA expression levels of multidrug resistant-associated protein 2 (MRP-2) after metformin treatment were determined using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The effect of metformin on cisplatin-induced apoptosis was investigated using the Annexin V/FITC method. All data were analysed using GraphPad Prism 6.01, and p value < 0.05 were considered as significant.

Results: Metformin increased the cytotoxic effects of cisplatin in cisplatin-resistant A2780/CP ovarian cancer cells, but had no effect on the cytotoxicity of sensitive A2780 ovarian cancer cells. Metformin had no effect on MRP-2 gene expression. In addition, metformin increased the apoptotic effects of cisplatin in A2780/CP cells.

Conclusion: The results of the present study showed that metformin increases the sensitivity of A2780/CP cells to the cytotoxic effects of cisplatin. Therefore, metformin may be an effective and potent compound for combination therapy in ovarian cancer cells to overcome multidrug resistance to chemotherapy agents.

Keywords: A2780/CP Cell Line, Cisplatin, Metformin, Multidrug Resistance, Ovarian Cancer

Address: Resalat Ave, P.O.Box 1138 Urmia, Iran

Tel: +989194709357

Email: vahid.shafiei@hotmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2024; 35(1): 09 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹ Assistant Professor of Clinical Biochemistry, Cellular and Molecular Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author)

² Professor of Clinical Biochemistry, Stem Cell Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³ Associate Professor of Clinical Biochemistry, Department of Biochemistry and Clinical Laboratories, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴ Associate Professor of Medicinal Chemistry, Department of Medical Nanotechnology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran