DOI: 10.22122/jims.v38i567.12384 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و هشتم/شماره‌ی ۵۶۷/هفته‌ی سوم اردیبهشت ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱/۱۸ تاریخ چاپ: ۱۳۹۹/۲/۲۱

بررسی سمیت سلولی ترکیب متفورمین با دوسه‌تاکسل و ۵–فلورواوراسیل بر روی سلول‌های سرطان معده

مریم فاتحی اقدم[۱]، نوروز نجف‌زاده[۲]، محمد قاسم گل‌محمدی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در مطالعه‌ی حاضر، اثر ضد سرطانی ترکیب متفورمین با دوسه‌تاکسل و با ۵–فلورواوراسیل را بر روی سلول‌های سرطانی معده رده‌ی AGS مورد ارزیابی گرفت.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، سلول‌ها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف متفورمین (۸۰–۱ میلی‌مولار)، دوسه‌تاکسل (۲۲/۵–۰/۶ نانومول) و ۵–فلورواوراسیل (۱۲–۰/۰۴۵ میکروگرم/میلی‌لیتر) و ترکیب آن‌ها با هم قرار گرفتند. میزان تکثیر سلولی با روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان آپوپتوز با روش آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: متفورمین، دوسه‌تاکسل و ۵–فلورواوراسیل به صورت وابسته به غلظت و زمان، باعث مهار بقای سلول‌های سرطان معده AGS شدند. بعد از تیمار سلول‌ها با ترکیب متفورمین/دوسه‌تاکسل و متفورمین/۵–فلورواوراسیل میزان The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) کاهش یافت. همچنین، بعد از تیمار با ترکیب داروها، میزان آپوپتوز سلولی نیز به صورت معنی‌داری افزایش یافت ($P < ۰/۰۵۰$).

نتیجه‌گیری: استفاده از ترکیب متفورمین با دوسه‌تاکسل و ۵–فلورواوراسیل می‌تواند در درمان بیماران مبتلا به سرطان معده مؤثر واقع بشود.

واژگان کلیدی: متفورمین؛ دوسه‌تاکسل؛ ۵–فلورواوراسیل؛ سرطان معده؛ آپوپتوز

ارجاع: فاتحی اقدم مریم، نجف‌زاده نوروز، گل‌محمدی محمد قاسم. **بررسی سمیت سلولی ترکیب متفورمین با دوسه‌تاکسل و ۵–فلورواوراسیل بر روی سلول‌های سرطان معده.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۹؛ ۳۸ (۵۶۷): ۱۴۶–۱۳۹

مقدمه

سرطان بعد از بیماری‌های قلبی– عروقی، مهم‌ترین عامل مرگ و میر در جهان محسوب می شود. سرطان معده، پنجمین سرطان شایع و دومین علت شایع مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان است (۱). در ایران، بیشترین میزان شیوع در استان اردبیل و در استان های گلستان و مازندران است (۲). عمده ی داروهای شیمی درمانی در درمان سرطان معده عبارت از ۵–فلورواوراسیل، میتومایسین، دوکسوروبیسین، سیس پلاتین و دوسه تاکسل بودند که اثربخشی ۳۰–۱۵ درصد دارند (۳).

۵–فلوروراسیل، از جمله داروهای شیمی درمانی رایج در درمان سرطان معده است که این دارو، با مهار غیر قابل برگشت آنزیم تیمیدیلات سنتتاز، باعث مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود (۴). دوسه‌تاکسل نیز یک داروی شیمی‌درمانی دیگر ضد سرطان است که تجمع میکروتوبول‌ها از دایمرهای توبولین را کنترل می‌کند و این دارو، با جلوگیری از دپلیمریزاسیون، میکروتوبول‌ها را تثبیت می‌کند (۵).

متفورمین، یک داروی خوراکی ضد دیابت نوع ۲ با فرمول C4H11N5 و از دسته ی بیگوانیدها است. متفورمین، با فعال کردن 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) باعث مهار مسیر سیگنال‌دهی mammalian target of rapamycin (mTOR) و باعث افزایش بیان ژن P53 در سلول های سرطانی می شود (۶). مطالعات ضد و نقیضی از اثرات متفورمین در مطالعات بالینی مشاهده شده است. مطالعه‌ی Zheng و همکاران، نشان داد که مصرف

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریح و پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۲- دانشیار، آزمایشگاه جنین‌شناسی و سلول‌های بنیادی و گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: نوروز نجف‌زاده؛ دانشیار، آزمایشگاه جنین‌شناسی و سلول‌های بنیادی و گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

Email: nowruz30@gmail.com

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

متفورمین باعث کاهش معنی‌داری در ابتلا به سرطان معده‌ی آدنوکارسینوما نمی‌شود (۷). همچنین، مطالعه‌ی دیگری نشان داد که مصرف متفورمین، باعث کاهش مرگ و میر کلی بیماران می‌شود، اما روی مرگ و میر ناشی از ابتلا به سرطان تأثیری ندارد (۸). با این حال، در بررسی‌های متعدد، اثرات متفورمین بر القای آپوپتوز و کاهش تکثیر انواع سلول‌های سرطانی در محیط کشت به اثبات رسیده است. استفاده به تنهایی از متفورمین، باعث مهار سلول‌های سرطانی در مدل‌های حیوانی می‌گردد و ترکیب متفورمین با داروهای شیمی‌درمانی رایج، باعث افزایش کارایی داروهای شیمی‌درمانی در سرطان معده می‌شود و از محدودیت‌های داروهای ضد سرطان، استفاده‌ی به تنهایی از دزهای بالای آن‌ها و مقاومت دارویی هستند (۹). از این رو، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثرات هم‌افزایی ترکیب متفورمین با ۵-فلوروراواوراسیل و متفورمین با دوسه تاکسل بر روی سلول‌های سرطان معده انجام شد.

روش‌ها

داروها: متفورمین (BP227)، دوسه‌تاکسل (01885) و ۵-فلورواوراسیل (F6627) از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شدند.

کشت سلولی: سلول‌های سرطان معده‌ی رده‌ی AGS از مؤسسه‌ی پاستور خریداری شدند و سلول‌ها در محیط Roswell Park memorial institute-1640 (RPMI1640) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد پنی سیلین/استرپتومایسین کشت داده شدند.

روش 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2.5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT): طبق مطالعات قبلی، تأثیر غلظت‌های مختلف داروهای متفورمین (۱۰)، دوسه‌تاکسل (۱۱) و ۵-فلورواوراسیل (۱۲) به تنهایی بر روی سلول‌های سرطانی در چند گروه شامل شاهد (بدون دریافت دارو)، متفورمین (۱، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌مول)، دوسه‌تاکسل (۰/۶، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵/۰، ۷/۵، ۱۰/۰، ۱۵/۰ و ۲۲/۵ نانومول) و ۵-فلورواوراسیل (۰/۰۴۵، ۰/۰۹، ۰/۱۸، ۰/۳۷، ۰/۷۵، ۱/۵۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰، ۸/۰۰ و ۱۲/۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) بررسی شد.

به منظور بررسی تأثیر تیمار ترکیبی داروها، ابتدا سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌مول متفورمین تیمار شدند و بعد از برداشتن محیط حاوی متفورمین، سلول‌ها بار دیگر تحت تیمار با غلظت‌های مختلف دوسه‌تاکسل و ۵-فلورواوراسیل به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار گرفتند. دلیل انتخاب دزهای ۲۰ و ۴۰ میلی‌مول داروی متفورمین با استناد به The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) به دست آمده بود. در این مطالعه، ابتدا از سه غلظت بالا (۴۰ میلی‌مولار)، متوسط (۲۰ میلی‌مولار) و پایین (۱۰ میلی‌مولار) متفورمین استفاده گردید؛ به لحاظ این که غلظت پایین متفورمین در ترکیب با داروهای ۵-فلورواوراسیل و دوسه‌تاکسل تأثیری نداشت، از بخش نتایج و گروه‌بندی خارج شد.

در مرحله‌ی بعد، با اضافه کردن محیط بدون Fetal bovine serum (FBS) و رنگ MTT (۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر)، پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت داخل انکوباتور نگهداری شدند. بعد از آن، ۱۵۰ میکرولیتر از محلول دی‌متیل سولفوکسید به هر خانه اضافه گردید و جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) اندازه‌گیری شد. در نهایت، میزان بقای سلولی در پلیت ۹۶ خانه با استفاده از فرمول زیر محاسبه و میزان IC_{50} با برنامه‌ی Sigma Plot نسخه‌ی ۱۲ محاسبه شد.

$$\text{درصد سلول‌های زنده} = \frac{\text{میانگین جذب نمونه}}{\text{میانگین جذب کنترل}} \times ۱۰$$

و برای تعیین اثرات سینرژیسم ترکیب دارویی متفورمین با دوسه‌تاکسل و ۵-فلورواوراسیل از فرمول زیر استفاده شد:

$$CI = \frac{d1}{IC50_1} + \frac{d2}{IC50_2} = \left\{ \frac{P}{(q+p)IC50_1} + \frac{q}{(p+q)IC50_2} \right\} IC50_c$$

CI = شاخص ترکیبی (Combination Index)، d1 = داروی شماره‌ی ۱، d2 = داروی شماره‌ی ۲، $IC50_1$ = غلظتی که در آن داروی شماره‌ی ۱ رشد ۵۰ درصد سلول‌ها را مهار می‌کند (The half maximal inhibitory concentration of drug1)، $IC50_2$ = غلظتی که در آن داروی شماره‌ی ۲ رشد ۵۰ درصد سلول‌ها را مهار می‌کند (The half maximal inhibitory concentration of drug2)، p = غلظتی از داروی شماره‌ی ۱ (Unit of drug1)، q = غلظتی از داروی شماره‌ی ۲ (Unit of drug2)، $IC50_c$ = غلظتی که در آن دو داروی شماره‌ی ۱ و ۲ رشد ۵۰ درصد سلول‌ها را مهار می‌کنند (The half maximal inhibitory concentration of combination of drug1 and drug2).

روش رنگ آمیزی آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید: در این روش، ابتدا سلول‌های سرطانی در ظرف‌های کشت ۱۲ خانه‌ای کشت داده شدند. این سلول‌ها، با توجه به گروه‌بندی، در معرض داروهایی شامل متفورمین (غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌مول)، دوسه‌تاکسل (غلظت‌های ۱ و ۰/۵ نانومول)، ۵-فلورواوراسیل (غلظت‌های ۱ و ۰/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر)، گروه‌های ترکیبی با غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌مول متفورمین همراه با غلظت‌های مطرح شده برای ۵-فلورواوراسیل و دوسه‌تاکسل قرار گرفتند:

بعد از گذشت ۲۴ ساعت، به هر خانه از پلیت مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول اکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید اضافه گردید. سپس، توسط میکروسکوپ فاز کنتراست تصویربرداری انجام گرفت و از نرم‌افزار Image J برای شمارش سلولی استفاده شد.

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها، از آزمون One-way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید. در تمام آزمون‌ها، $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها و تعیین IC_{50}، از نرم‌افزارهای Excel و Sigma Plot نسخه‌ی ۱۲ استفاده گردید.

یافته‌ها

در تیمار ترکیبی متفورمین با ۵-فلوروواوراسیل و دوسه‌تاکسل، با گذشت زمان میزان IC_{50} به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت (جدول ۱ و شکل ۱). تیمار ترکیبی سلول‌های سرطان معده در مقایسه با استفاده از ۵-فلوروواسیل و دوسه‌تاکسل به تنهایی، اثر سمیت بیشتری داشت و میزان IC_{50} به دست آمده در مقایسه با تیمار ۵-فلوروواسیل و دوسه‌تاکسل به تنهایی، به طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۱).

جدول ۱. مقادیر The half maximal inhibitory concentration (IC50) پس از تیمار سلول‌های سرطان معده با غلظت‌های مختلف داروها و ترکیب آن‌ها

فواصل زمانی / گروه‌ها	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
متفورمین	۵۲/۷۹ ± ۴/۰۰	۳۵/۵۹ ± ۵/۰۱	۲۰/۷۰ ± ۲/۶۰
دوسه‌تاکسل	۹/۵۵ ± ۰/۳۳	۱۰/۳۴ ± ۱/۹۷	۵/۲۰ ± ۰/۸۰
۵-فلوروواوراسیل	۱/۸۲ ± ۰/۳۲	۰/۴۲ ± ۰/۲۷	۰/۳۲ ± ۰/۰۲
متفورمین ۲۰ و دوسه‌تاکسل	[a]۴/۱۰ ± ۰/۱۱	[a]۴/۱۰ ± ۰/۲۰	۰/۸۲ ± ۰/۲۹
متفورمین ۴۰ و دوسه‌تاکسل	[a]۴/۵۶ ± ۰/۲۴	[a]۳/۰۷ ± ۰/۱۳	[a]۰/۹۲ ± ۰/۰۱
متفورمین ۲۰ و ۵-فلوروواوراسیل	[b]۱/۱۲ ± ۰/۱۶	[b]۰/۱۴ ± ۰/۰۰	[b]۰/۰۷ ± ۰/۰۰
متفورمین ۴۰ و ۵-فلوروواوراسیل	[b]۱/۰۶ ± ۰/۱۲	[b]۰/۱۴ ± ۰/۰۱	[b]۰/۱۱ ± ۰/۰۴

واحد متفورمین میلی‌مول، واحد دوسه‌تاکسل نانومول و واحد ۵-فلوروواوراسیل میکروگرم/میلی‌لیتر می‌باشد.

[a] $P < ۰/۰۵۰$ در مقایسه با گروه دوسه‌تاکسل به تنهایی

[b] $P < ۰/۰۵۰$ در مقایسه با گروه ۵-فلوروواوراسیل به تنهایی

در گروه های ترکیبی نیز اثرات سینرژیسم ترکیب دارویی مشاهده شد و مقدار شاخص CI در ترکیب‌های دارویی در زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کمتر از ۱ بود (جدول‌های ۲ و ۳).

جدول ۲. شاخص ترکیبی برای متفورمین و ۵-فلوروواوراسیل در رده‌ی سلولی AGS سرطان معده

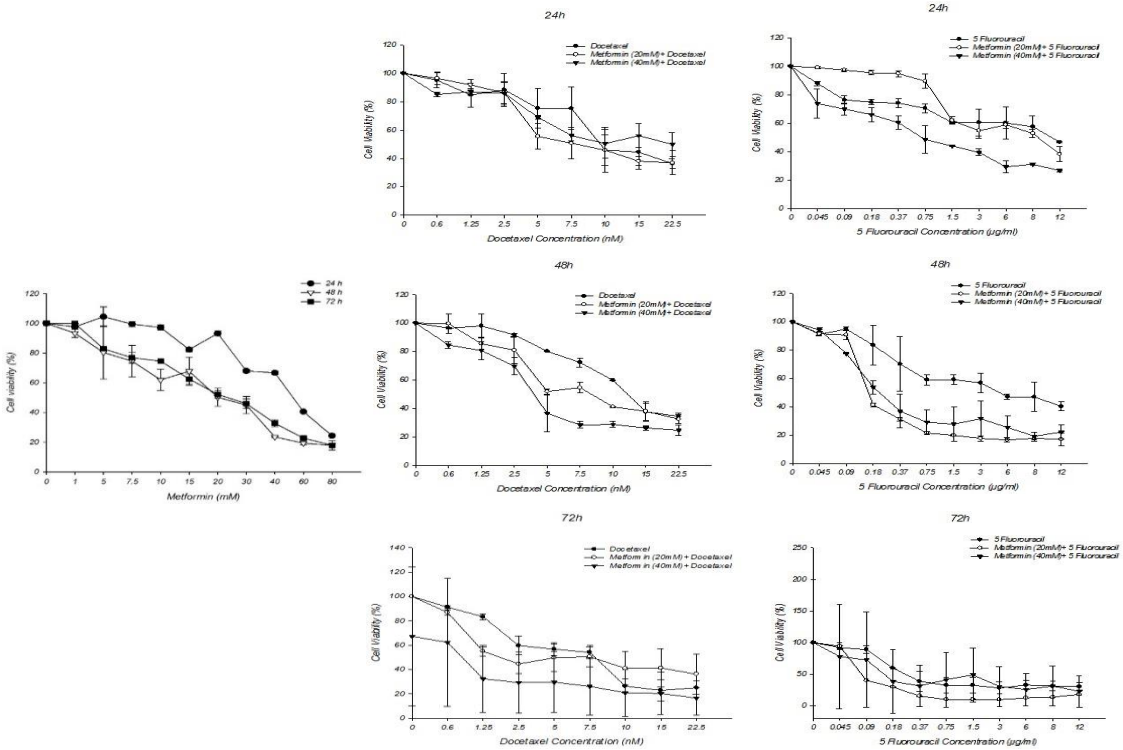
شاخص ترکیبی متفورمین ۲۰			
۵-فلوروواوراسیل	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۰/۰۴	۰/۵۵	۰/۲۲	۰/۱۴
۰/۰۹	۰/۵۲	۰/۲۳	۰/۱۴
۰/۱۸	۰/۵۲	۰/۲۲	۰/۱۲
۰/۳۷	۰/۵۱	۰/۲۰	۰/۱۰
۰/۷۵	۰/۵۰	۰/۱۹	۰/۰۹
۱/۵۰	۰/۴۷	۰/۱۹	۰/۰۹
۳/۰۰	۰/۴۷	۰/۱۸	۰/۰۸
۶/۰۰	۰/۴۷	۰/۱۷	۰/۰۹
۸/۰۰	۰/۴۶	۰/۱۷	۰/۰۸
شاخص ترکیبی متفورمین ۴۰			
۵-فلوروواوراسیل	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۰/۰۴	۰/۳۵	۰/۲۷	۰/۲۶
۰/۰۹	۰/۳۳	۰/۲۷	۰/۲۶
۰/۱۸	۰/۳۳	۰/۲۶	۰/۲۳
۰/۳۷	۰/۳۳	۰/۲۵	۰/۲۰
۰/۷۵	۰/۳۲	۰/۲۴	۰/۱۸
۱/۵۰	۰/۳۰	۰/۲۴	۰/۱۸
۳/۰۰	۰/۳۰	۰/۲۴	۰/۱۸
۶/۰۰	۰/۳۰	۰/۲۲	۰/۱۸
۸/۰۰	۰/۳۰	۰/۲۲	۰/۱۷

واحد متفورمین میلی‌مول و واحد ۵-فلوروواوراسیل میکروگرم/میلی‌لیتر می‌باشد.

تأثیر غلظت های مختلف داروها بر روی میزان آپوپتوز: نتایج مطالعه ی حاضر نشان داد که تیمار ترکیبی داروهای متفورمین/دوسه تاکسل و متفورمین/۵-فلوروواوراسیل، منجر به افزایش درصد سلول‌های آپوپتوتیک نسبت به استفاده‌ی تنها از این داروها شد. تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه تیمار ترکیبی، در مقایسه با گروه هایی که به تنهایی با دوسه‌تاکسل و ۵-فلوروواوراسیل تیمار شده بودند، به طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۴ و شکل ۲).

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، متفورمین اثرات سمیت وابسته به دز از خود نشان داد و باعث افزایش آپوپتوز سلول‌های سرطانی شد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که این دارو، موجب کاهش رشد و تکثیر سلول‌های تومور می‌شود. مهار mTOR در سلول‌های توموری، یکی از مکانیسم‌های کلیدی بالقوه است که فعالیت ضد سرطانی متفورمین را باعث می‌شود (۱۳).



شکل ۱. منحنی‌های دز-پاسخ سلولی بعد از تیمار با غلظت‌های مختلف متفورمین، دوسه‌تاکسل و ۵-فلوروواوراسیل به تنهایی و تیمار ترکیبی متفورمین ۲۰ و ۴۰ میلی‌مول و داروهای شیمی‌درمانی بر روی رده‌ی سلولی AGS

نتایج بقای سلولی به صورت میانگین ± انحراف معیار از سه آزمایش مستقل گزارش شده است. در این مطالعه، از غلظت‌های ۸۰-۱ میلی‌مولار متفورمین، ۲۲/۵-۰/۶ نانومول دوسه‌تاکسل و ۱۲-۰/۰۴۵ میکروگرم/میلی‌لیتر ۵-فلوروواوراسیل استفاده شده است.

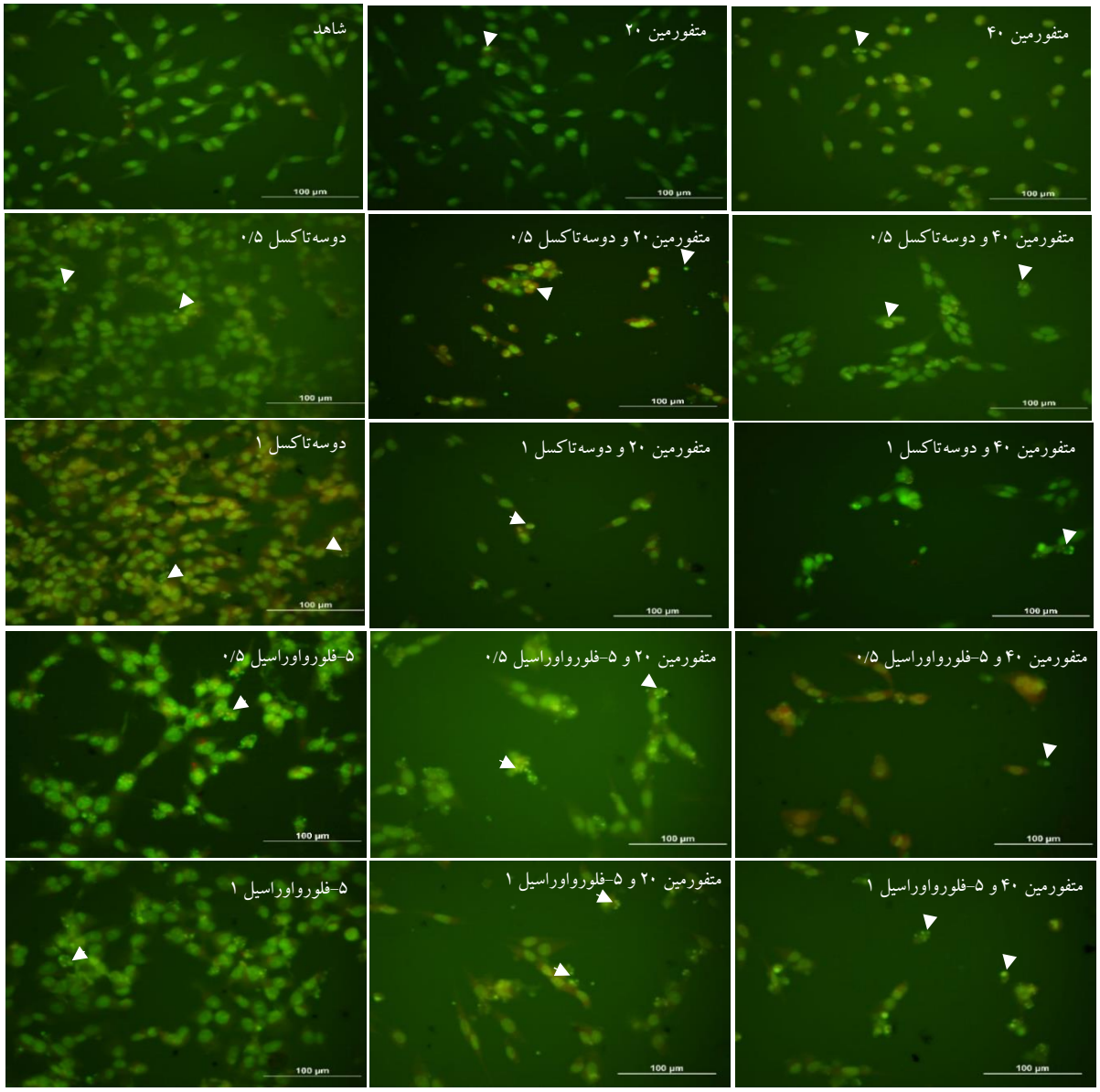
در مطالعه‌ی مشابهی، Kim و همکاران با بررسی تأثیر متفورمین بر روی سرطان کلورکتال نشان دادند که متفورمین، باعث مهار تکثیر سلولی، توانایی مهاجرت سلولی و توانایی کلونی زایی می شود. همچنین، باعث سرکوب چرخه‌ی سلولی در رده‌ی سلولی سرطان کلورکتال مقاوم به ۵-فلوروواوراسیل می‌گردد (۱۴).

یکی دیگر از نتایج مطالعه‌ی حاضر این بود که ترکیب متفورمین/۵-فلوروواوراسیل و متفورمین/دوسه‌تاکسل، اثرات سمیت وابسته به دز از خود نشان دادند؛ به طوری که در تیمار ترکیبی با گذشت بیشتر زمان تیمار، میزان IC_{50} به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت و ترکیب آن‌ها در القای آپوپتوز سلول‌های سرطان معده AGS، مؤثرتر از استفاده از این داروهای شیمی درمانی به تنهایی بوده است. مطالعات مشابه دیگری نیز این نتایج را تأیید می‌کنند. یافته‌های مطالعه‌ی Yu و همکاران، نشان داد که متفورمین از طریق القای آپوپتوز، حساسیت به داروهای شیمی‌درمانی را در سلول‌های بنیادی سرطان پستان افزایش می‌دهد (۱۵)..

جدول ۳. شاخص ترکیبی متفورمین/دوسه‌تاکسل در سلول‌های سرطان معده رده‌ی سلولی AGS

شاخص ترکیبی متفورمین ۲۰				شاخص ترکیبی متفورمین ۴۰			
دوسه‌تاکسل	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	دوسه‌تاکسل	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۰/۶۰	۰/۲۹	۰/۳۱	۰/۱۱	۰/۶۰	۰/۳۳	۰/۲۶	۰/۱۴
۱/۲۵	۰/۲۷	۰/۳۱	۰/۱۱	۱/۲۵	۰/۳۱	۰/۲۶	۰/۱۴
۲/۵۰	۰/۲۷	۰/۳۰	۰/۱۰	۲/۵۰	۰/۳۱	۰/۲۶	۰/۱۳
۵/۰۰	۰/۲۶	۰/۳۰	۰/۱۰	۵/۰۰	۰/۳۰	۰/۲۵	۰/۱۳
۷/۵۰	۰/۲۴	۰/۲۹	۰/۰۹	۷/۵۰	۰/۲۸	۰/۲۵	۰/۱۲
۱۰/۰۰	۰/۲۲	۰/۲۸	۰/۰۸	۱۰/۰۰	۰/۲۶	۰/۲۴	۰/۱۱
۱۵/۰۰	۰/۲۱	۰/۲۷	۰/۰۸	۱۵/۰۰	۰/۲۵	۰/۲۳	۰/۱۱

واحد متفورمین میلی‌مول و واحد دوسه‌تاکسل نانومول می‌باشد.



شکل ۲. بررسی آپوپتوز در تصاویر رنگ آمیزی آکریدین اورنج/اتدیوم بروماید بعد از تیمار با داروها و ترکیب آنها با هم

نوک فلش‌ها سلول‌های آپوپتوتیک را نشان می‌دهند. واحد متفورمین برحسب میلی‌مول، واحد دوسه‌تاکسل بر حسب نانومول و واحد ۵- فلورواوراسیل بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

همچنین، در مطالعه‌ی دیگری Harada و همکاران، نشان دادند که درمان ترکیبی متفورمین و ۵-فلورواوراسیل به طور مؤثری رشد سلول‌های سرطان سلول سنگفرشی دهان را مهار می‌کند (۱۶)

یکی دیگر از نتایج این مطالعه، اثر سینرژیسم متفورمین و دوسه‌تاکسل و ۵-فلورواوراسیل بر روی سلول‌های سرطان معده بود. در مطالعه‌ی مشابهی، Lu و همکاران، اثر سینرژیسم ترکیب متفورمین و لیراگلوتید را بر روی مرگ سلول‌های سرطان پانکراس نشان دادند. همچنین، ترکیب متفورمین با لیراگلوتید، باعث افزایش فسفریله شدن AMPK و افزایش بیان X Associated BCL2 (Bax) و Caspase3 در سلول‌های سرطان پانکراس شد (۱۷).

از طرف دیگر، مطالعه‌ی Janjetovic و همکاران، نشان داد که متفورمین با مهار استرس اکسیداتیو و مهار فعال کردن کاسپازها، می تواند اثر ضد سرطانی سیس‌پلاتین را بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی کاهش دهد (۱۸). از این رو، ممکن است که اثر ترکیب دارویی متفورمین و سیس‌پلاتین، متفاوت از تأثیر ترکیب دارویی متفورمین/دوسه‌تاکسل و متفورمین/۵-فلورواوراسیل باشد.

در مطالعه‌ی لسان و همکاران که تأثیر ترکیب متفورمین و سیس‌پلاتین را بر روی رده‌ی سلولی MKN-45 معده‌ی انسان بررسی کرده‌اند، نشان دادند که ترکیب متفورمین و سیس‌پلاتین، اثرات ضد تکثیری سیس‌پلاتین را کاهش می‌دهد (۱۰).

جدول ۴. درصد سلول‌های آپوپتوز شده در گروه‌های تیمار شده با داروها و ترکیب آن‌ها بر روی رده‌ی سلول‌های سرطان معده

گروه‌ها	آپوپتوز (درصد)	گروه‌ها	آپوپتوز (درصد)
متفورمین ۲۰	۶/۴۳ ± ۲/۶۷	---	
متفورمین ۴۰	۲۸/۶۴ ± ۲/۲۸	---	
دوسه‌تاکسل ۰/۵	۱۲/۶۲ ± ۱/۹۱	۵-فلوروواوراسیل ۰/۵	۲۵/۰۴ ± ۶/۴۴
متفورمین ۲۰ + دوسه‌تاکسل ۰/۵	۳۵/۸۴ ± ۵/۵۲ ($^{b}P = ۰/۰۴۰$)	متفورمین ۲۰ + ۵-فلوروواوراسیل ۰/۵	۳۷/۴۸ ± ۷/۹۹ ($P = ۰/۲۸۸$)
متفورمین ۴۰ + دوسه‌تاکسل ۰/۵	۳۷/۰۶ ± ۷/۵۲ ($^{b}P = ۰/۰۰۲$)	متفورمین ۴۰ + ۵-فلوروواوراسیل ۰/۵	۴۹/۱۴ ± ۷/۸۷ ($^{a}P = ۰/۰۰۱$)
دوسه‌تاکسل ۱	۱۶/۳۳ ± ۳/۲۸	۵-فلوروواوراسیل ۱	۲۶/۶۳ ± ۲/۰۵
متفورمین ۲۰ + دوسه‌تاکسل ۱	۳۷/۳۱ ± ۵/۴۰ ($^{b}P < ۰۰۱$)	متفورمین ۲۰ + ۵-فلوروواوراسیل ۱	۳۹/۴۴ ± ۶/۲۴ ($P = ۰/۷۳۶$)
متفورمین ۴۰ + دوسه‌تاکسل ۱	۴۱/۶۰ ± ۷/۰۷ ($^{b}P < ۰۰۱$)	متفورمین ۴۰ + ۵-فلوروواوراسیل ۱	۴۸/۲۹ ± ۳/۴۲ ($^{a}P = ۰/۰۰۱$)

واحد متفورمین میلی‌مول، واحد دوسه‌تاکسل نانومول و واحد ۵-فلوروواوراسیل میکروگرم/میلی‌لیتر می‌باشد.

[a] $P < ۰/۰۵۰$ در مقایسه با گروه دوسه‌تاکسل به تنهایی

[b] $P < ۰/۰۵۰$ در مقایسه با گروه ۵-فلوروواوراسیل به تنهایی

نتیجه‌گیری

نتیجه‌گیری نهایی این که متفورمین در ترکیب با داروهای ۵-فلوروواوراسیل و دوسه‌تاکسل، بر روی ریخت‌شناسی سلول‌های سرطانی و القای آپوپتوز تأثیر زیادی دارد و باعث افزایش کارایی وکاهش دز مصرفی داروهای شیمی‌درمانی می‌شود.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر برگرفته از پایان‌نامه‌ی ثبت شده در شورای پژوهشی دانشکده‌ی پزشکی اردبیل به شماره‌ی ۰۵۱ می‌باشد.نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از تمامی کارشناسان آزمایشگاه مرکزی دانشکده‌ی پزشکی اردبیل به خاطر مساعدت و همکاری در این مطالعه قدردانی نمایند.

References

1. Rahman R, Asombang AW, Ibdah JA. Characteristics of gastric cancer in Asia. World J Gastroenterol 2014; 20(16): 4483-90.
2. Taghavi N, Nasrollahzadeh D, Merat S, Yazdanbod A, Hormazdi M, Sotoudeh M, et al. Epidemiology of upper gastrointestinal cancers in Iran: A sub site analysis of 761 cases. World J Gastroenterol 2007; 13(40): 5367-70.
3. Wagner AD, Grothe W, Haerting J, Kleber G, Grothey A, Fleig WE. Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. J Clin Oncol 2006; 24(18): 2903-9.
4. Yu B, Gu D, Zhang X, Liu B, Xie J. The role of GLI2-ABCG2 signaling axis for 5Fu resistance in gastric cancer. J Genet Genomics 2017; 44(8): 375-83.
5. Tamegai H, Kaiga T, Kochi M, Fujii M, Kanamori N, Mihara Y, et al. Pharmacokinetics of docetaxel in gastric cancer patients with malignant ascites. Cancer Chemother Pharmacol 2013; 71(3): 727-31.
6. Micic D, Cvijovic G, Trajkovic V, Duntas LH, Polovina S. Metformin: Its emerging role in oncology. Hormones (Athens) 2011; 10(1): 5-15.
7. Zheng J, Xie SH, Santoni G, Lagergren J. Metformin use and risk of gastric adenocarcinoma in a Swedish population-based cohort study. Br J Cancer 2019; 121(10): 877-82.
8. Lacroix O, Couttenier A, Vaes E, Cardwell CR, De SH, Robert A. Impact of metformin on gastric adenocarcinoma survival: A Belgian population based study. Cancer Epidemiol 2018; 53: 149-55.
9. Yu G, Fang W, Xia T, Chen Y, Gao Y, Jiao X, et al. Metformin potentiates rapamycin and cisplatin in gastric cancer in mice. Oncotarget 2015; 6(14): 12748-62.
10. Lesan V, Ghaffari SH, Salaramoli J, Heidari M, Rostami M, Alimoghaddam K, et al. Evaluation of antagonistic effects of metformin with Cisplatin in gastric cancer cells. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res 2014; 8(3): 12-9.
11. Xiao P, Ma T, Zhou C, Xu Y, Liu Y, Zhang H. Anticancer effect of docetaxel induces apoptosis of prostate cancer via the cofilin-1 and paxillin signaling pathway. Mol Med Rep 2016; 13(5): 4079-84.
12. Najafzadeh N, Mazani M, Abbasi A, Farassati F, Amani M. Low-dose all-trans retinoic acid enhances cytotoxicity of cisplatin and 5-fluorouracil on CD44(+) cancer stem cells. Biomed Pharmacother 2015; 74: 243-51.
13. Han G, Gong H, Wang Y, Guo S, Liu K. AMPK/mTOR-mediated inhibition of survivin partly contributes to metformin-induced apoptosis in human gastric cancer cell. Cancer Biol Ther 2015; 16(1): 77-87.
14. Kim SH, Kim SC, Ku JL. Metformin increases chemo-sensitivity via gene downregulation encoding DNA replication proteins in 5-Fu resistant colorectal cancer cells. Oncotarget 2017; 8(34): 56546-57.
15. Soo JS, Ng CH, Tan SH, Malik RA, Teh YC, Tan BS, et al. Metformin synergizes 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide (FEC) combination therapy through impairing intracellular

ATP production and DNA repair in breast cancer stem cells. Apoptosis 2015; 20(10): 1373-87.

16. Harada K, Ferdous T, Harada T, Ueyama Y. Metformin in combination with 5-fluorouracil suppresses tumor growth by inhibiting the Warburg effect in human oral squamous cell carcinoma. Int J Oncol 2016; 49(1): 276-84.

17. Lu R, Yang J, Wei R, Ke J, Tian Q, Yu F, et al. Synergistic anti-tumor effects of liraglutide with metformin on pancreatic cancer cells. PLoS One 2018; 13(6): e0198938.

18. 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.

DOI: *10.22122/jims.v38i567.12384* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 38, No. 567, 3rd Week, May 2020**

Received: 16.10.2019 Accepted: 07.04.2020 Published: 19.05.2020

Evaluation of Cytotoxic Effects of the Combination of Metformin with Docetaxel and 5-Fluorouracil on the Gastric Cancer Cells

Maryam Fatehi-Aghdam[1], Nowruz Najafzadeh[2], Mohammad Ghasem Golmohammadi[2]

Original Article

Abstract

Background: In the present study, the cytotoxic effects of the combination of metformin with docetaxel and 5- fluorouracil were studied on AGS gastric cancer cell line.

Methods: In this experimental study, the cells were exposed to different concentrations of metformin (1-80 mM), docetaxel (0.6-22.5 ng/ml), 5-fluorouracil (0.045-12 µg/ml), and combination of them. The cell proliferation was evaluated using MTT assay, and the cell apoptosis was evaluated by acridine orange/ethidium bromide assay.

Findings: Metformin, docetaxel, and 5-fluorouracil inhibited cell viability of AGS gastric cancer cells in a concentration- and time-dependent manner. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values were decreased after treatment with metformin/docetaxel and metformin/5-fluorouracil ($P < 0.050$). Moreover, the combination treatments significantly increased apoptosis of gastric cancer cells ($P < 0.050$).

Conclusion: Our results showed that the combination of metformin with docetaxel and 5-fluorouracil could be effective in the treatment of patients with gastric cancer.

Keywords: Metformin; Docetaxel; 5-fluorouracil; Gastric cancer; Apoptosis

Citation: Fatehi-Aghdam M, Najafzadeh N, Golmohammadi MG. **Evaluation of Cytotoxic Effects of the Combination of Metformin with Docetaxel and 5-Fluorouracil on the Gastric Cancer Cells.** J Isfahan Med Sch 2020; 38(567): 139-46.

1- MSc Student, Department of Anatomical Sciences and Pathology, School of Medicine and Paramedicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
2- Associate Professor, Research Laboratory for Embryology and Stem Cells AND Department of Anatomical Sciences and Pathology, School of Medicine and Paramedicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
Corresponding Author: Nowruz Najafzadeh, Resident, Department of Emergency Medicine, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: nowruz30@gmail.com