

تغییرات بیان برخی ژن‌های دخیل در فرایند EMT به وسیله متفورمین و پی-کوماریک اسید در دودمان سلولی سرطان معده AGS

یوسف سفیدی هریس¹، ایرج سعادت^{2*}

1- دکترای سلولی و مولکولی، بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

2- دانشیار بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

* نویسنده مسئول

isaadat@shirazu.ac.ir

صندوق پستی: 71467-13565

دریافت: 1402/8/18 پذیرش: 1402/9/13

چکیده

سرطان معده یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در جهان است. درمان‌های رایج این بیماری، گران قیمت بوده و آثار جانبی شدیدی ایجاد می‌کند. بنابراین درمان با ترکیب‌های طبیعی و عوامل درمانی شناخته‌شده یا ترکیبی از هر دو گروه از این عوامل می‌تواند به‌عنوان درمان جایگزین مؤثری مطرح شود. پی-کوماریک اسید و متفورمین در گروه چنین درمان‌های جایگزین ضدسرطانی به شمار می‌آیند. گذار اپیتلیالی- مزانشیمی (EMT) یک فرایند چندمنظوره است که نقش مهمی را در سرطان معده ایفا می‌کند. این فرایند شامل شبکه‌ای پیچیده از نشانگرهای زیستی است که در آغاز سرطان معده و در متاستاز آن ایفای نقش می‌کند. در نتیجه عواملی که بیان نشانگرهای EMT را کاهش دهند، می‌توانند به‌صورت بالقوه به‌عنوان عوامل ضدسرطان معده مطرح شوند. از آنجا که تأثیر پی-کوماریک اسید، متفورمین و ترکیب آنها روی بیان نشانگرهای گذار اپیتلیالی- مزانشیمی *ZEB1*، *Snail2* و *Vimentin* بررسی نشده است، هدف مطالعه پیش روی، ارزیابی این تأثیرات بود. آزمون MTT اثر کشندگی یاخته‌ای 48 ساعته پی-کوماریک اسید و متفورمین را در دودمان سلولی AGS نشان داد. Real-time PCR برای ارزیابی تغییرات در سطوح بیان ژن‌های مؤثر در فرایند گذار اپیتلیالی- مزانشیمی بعد از تیمارهای 48 ساعته استفاده شد. ترکیب پی-کوماریک اسید و متفورمین بیان ژن‌های *ZEB1* و *Vimentin* را در غلظت‌های غیرکشنده به‌طور معناداری کاهش داد. بنابراین این دو ترکیب را می‌توان به‌عنوان نامزدهای بالقوه‌ای برای مطالعه‌های بیشتر در زمینه مبارزه با سرطان معده در نظر گرفت.

واژه‌های کلیدی: متفورمین، پی-کوماریک اسید، سرطان معده، نشانگرهای EMT، Real-time PCR.

1- مقدمه

EMT از راه آسان‌سازی تهاجم سلول‌های توموری و انتشار آنها به اندام‌های دوردست، نقش چشمگیری در متاستاز ایفا می‌کند [23]. بنابراین EMT یکی از حوزه‌های فعال پژوهشی در مطالعه بسیاری از سرطان‌ها مانند سرطان معده است. فعال‌شدن این فرایند باعث القای رخ-نمود مزانشیمی شده و خصوصیات اپیتلیالی را در سلول‌های سرطان معده کاهش می‌دهد. این تغییرات، مهم هستند، چون سلول‌هایی که رخ‌نمود مزانشیمی کسب می‌کنند، خواص تومورزایی از جمله مهاجرت، تهاجم، متاستاز، مقاومت به آپوپتوز و مقاومت دارویی را از خود نشان می‌دهند [22-24].

EMT که در آغاز و پیشرفت سرطان نقش دارد، شامل شبکه وسیعی از نشانگرهای زیستی است که از بین آنها می‌توان به عامل رونویسی انگشت روی هموباکس متصل به جعبه E (ZEB)، Snail، Vimentin و عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGFA) اشاره کرد. تغییر بیان این نشانگرهای زیستی زمینه را برای ظهور رخ‌نمود متاستاتیک در سلول‌های سرطان معده فراهم می‌کند [24].

[25]. بنابراین، عوامل مداخله‌گری را که قابلیت کاهش بیان این نشانگرها را داشته باشند، می‌توان به‌عنوان عوامل ضدسرطان بالقوه در نظر گرفت.

از آنجایی که اثر پی-کوماریک اسید، متفورمین و ترکیب آنها بر بیان نشانگرهای گذار اپیتلیالی - مزانشیمی *ZEB1*، *Snail*، *Vimentin* و *VEGFA* (به‌عنوان شاخص‌های شروع و پیشرفت سرطان معده) مطالعه و بررسی نشده است، مطالعه پیش روی به‌منظور ارزیابی این آثار انجام شده است.

2- مواد و روش‌ها

2-1 کشت سلول و مواد استفاده‌شده

دودمان سلولی سرطان معده انسانی AGS (نستیتو پاستور، ایران) در محیط کشت RPMI-1640 (Bio-Idea، ایران)

سرطان معده جزء شایع‌ترین سرطان‌ها با تعداد بالای موارد مرگ‌ومیر در سرتاسر جهان است. درمان سرطان معده گران‌قیمت است و آثار جانبی بسیاری ایجاد می‌کند [1]. در نتیجه، راهبردهای درمانی جایگزین برای مبارزه با سرطان معده، ضروری به نظر می‌رسد. در این زمینه، درمان با برخی ترکیب‌های طبیعی و عوامل درمانی شناخته‌شده، یا ترکیبی از هر دو گروه از این عوامل می‌تواند گزینه‌های نویدبخشی باشد. این تیمارها آثار جانبی شایع درمان‌های معمول برای سرطان معده را ایجاد نکرده و حتی فعالیت ضدسرطانی بیشتری را نشان می‌دهند [2؛ 3].

پی-کوماریک اسید (pCA) و متفورمین (Met) دو ترکیب با اثر ضدسرطانی شناخته‌شده هستند. پی-کوماریک اسید یک ترکیب فنولی موجود در میوه‌جات، سبزیجات، غلات، قارچ و قهوه است [4-6]. علاوه بر برخی آثار فیزیولوژیک، مطالعه‌های بسیاری نشان داده است که پی-کوماریک اسید فعالیت ضدسرطانی بر لوکمی حاد انسانی [6]، سرطان کولون [5-9]، سرطان پستان [10]، ملانوما [11]، نوروبلاستوما [4] و سرطان معده [12؛ 13] را دارد. متفورمین شایع‌ترین داروی استفاده‌شده برای درمان دیابت نوع 2 است [14]. این دارو فعالیت ضدپیری [15] و ضد نشانگان تخمدان پلی‌کیستیک [16] نیز دارد. این عامل ضددیابت شناخته شده است. همچنین فعالیت ضدسرطانی بر سرطان‌های پستان [17-19]، ریه [20] و معده [21] نیز دارد.

تغییرات سرطانی در سلول‌های مخاطی معده باعث تغییرات ریخت‌شناختی، افزایش قدرت مهاجرت، تهاجم و متاستاز می‌شود. یکی از وقایع آسیب‌شناختی مهم در مسیر ایجاد و پیشرفت سرطان، فرایند گذار اپیتلیالی - مزانشیمی (EMT) است. اما همین فرایند گذار اپیتلیالی - مزانشیمی برخی نقش‌های فیزیولوژیک مهم را در فرایندهایی طبیعی بدن مانند رشد جنینی و ترمیم زخم ایفا می‌کند [22].

بعد از 48 ساعت، زنده‌مانی سلولی به‌وسیله احیای رنگ MTT بررسی شد. چاهک‌ها نیز به‌وسیله یک دستگاه خوانش پلیت الیزا در طول موج 595 nm بررسی شد.

3-2 استخراج RNA تام، سنتز cDNA و Real-time PCR

بعد از تیمار سلول‌های AGS با پی-کوماریک‌اسید، متفورمین و ترکیب آنها به مدت 48 ساعت، RNA تام با استفاده از Trizol (Invitrogen، آمریکا) و براساس دستورعمل شرکت سازنده، استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA تام استخراج‌شده با اندازه‌گیری OD_{260/280} و ژل الکتروفورز ارزیابی شد. کیت سنتز cDNA (پارس توس، ایران) برای سنتز DNA مکمل استفاده شد. cDNA سنتز شده (5 ng/μl) برای تکثیر در واکنش real-time PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (تکاپوزیست، ایران) در دستگاه Rotor Gene™ 6000 (Corbett Research، استرالیا) استفاده شد. توالی آغازگرها برای ژن‌های *ZEB1*، *Vimentin*، *Snail2* و *GAPDH* در جدول 1 قابل مشاهده است. *GAPDH* به‌عنوان ژن خانه‌دار در نظر گرفته شد و تغییرات در سطوح نسبی بیان ژن‌های هدف با استفاده از معادله $2^{-\Delta\Delta Ct}$ تعیین شد.

کشت داده شد. محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی غیرفعال شده با حرارت (Gibco، FBS، آمریکا، 10 v/v درصد)، پنی‌سیلین و 100 units/mL پنی‌سیلین و 100 units/mL استرپتومایسین (Bio-Idea، ایران) بود. پی-کوماریک‌اسید، محصول شرکت سیگما (آمریکا) در دی‌متیل سولفوکساید (DMSO؛ Shellmax، چین) حل و با محیط کشت رقیق شد. متفورمین از شرکت Santa Cruz Biotechnology (آمریکا) خریداری و در محیط کشت حل و رقیق‌سازی شد. 3- (0.4- دی‌متیل‌تيازول-2-یل)-0.2-دی‌فنیل - ترازولیوم بروماید (MTT؛ Roche، سوئیس) برای تعیین زنده‌مانی سلولی استفاده شد.

2-2 آزمون MTT

آزمون MTT برای تعیین کشندگی یاخته‌ای پی-کوماریک‌اسید، متفورمین و ترکیب آنها در دودمان سلولی AGS انجام شد. 5×10^3 سلول در میکروپلیت‌های 96 چاهکی کشت و به مدت 24 ساعت در دمای 37 °C در یک انکوباتور مرطوب با 5 درصد CO₂ انکوبه شد. سپس تیمارهای 48 ساعته با پی-کوماریک‌اسید (0- 0/25 mM) به‌صورت افزایشی دوبرابری، متفورمین (2/5 mM – 80 به‌صورت افزایشی دو برابری) و ترکیب آنها انجام شد.

جدول 1 توالی پرایمرهای اختصاصی برای بررسی سطح بیان ژن‌های *ZEB1*، *Vimentin*، *Snail2* و *VEGFA* و

GAPDH

ژن	توالی آغازگرها	طول محصول (bp)
<i>ZEB1</i> (NM_001323638; MIM: 189909)	F: TGGGAGGATGACACAGGAAAGG R: GCATCTGACTCGCATTCATCATC	104
<i>Snail2</i> (NM_003068; MIM: 602150)	F: CATATTCGGACCCACACATTACCT R: AAAAGGCTTCTCCCCCGTG	111
<i>Vimentin</i> (MIM: 193060; NM_003380)	F: GACATTGAGATTGCCACCTACAG R: CCAGATTAGTTCCCTCAGGTTTCAG	106
<i>VEGFA</i> (MIM: 192240; NM_001025366.3)	F: TACATCTTCAAGCCATCC R: TTCTTGTCTTGCTCTATCT	210
<i>GAPDH</i> (MIM: 138400; NM_002046.6)	F: ACATCGCTCAGACACCAT R: GGCAACAATATCCACTTTACCA	112

2-4 تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد (SE) برای سه تکرار مستقل ارائه شده است. تحلیل یک‌طرفه واریانس (ANOVA) با آزمون تعقیبی دانکن در نرم‌افزار 16.0 SPSS (شرکت SPSS، آمریکا) با سه سطح معناداری زیر 0/05، 0/01 و 0/001 (به ترتیب، $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$) استفاده شد.

3- نتایج و بحث

3-1 کشندگی یاخته‌ای پی-کوماریک‌اسید و متفورمین

در تیمارهای مجزا و ترکیبی

آزمون MTT کشندگی یاخته‌ای وابسته به غلظت پی-کوماریک‌اسید و متفورمین را در دودمان سلولی AGS نشان داد. مقادیر غلظت مهارکننده 50 درصدی (IC_{50}) برای پی-کوماریک‌اسید و متفورمین به ترتیب، 3/36 mM و 70/40 mM بود. پی-کوماریک‌اسید (به‌عنوان یک ماده موجود در غذاها) و متفورمین (به‌عنوان یک دارو)، هیچ اثر کشنده‌ای را به ترتیب در غلظت‌های نهایی 0/2 mM و 0/4 mM نشان ندادند. بنابراین تیمارهای بعدی برای استخراج RNA تام با استفاده از این غلظت‌ها انجام شد.

3-2 تغییرات در بیان ژن‌های دخیل در فرایند EMT

فرایند EMT نقشی اساسی در ابتلا به سرطان معده و پیشرفت آن دارد [23]. به همین دلیل، عوامل مهارکننده بیان نشانگرهای EMT می‌توانند به‌عنوان عوامل ضدسرطان بالقوه مطرح شوند. براین اساس، پس از تعیین غلظت‌های مناسب از راه آزمون MTT، تأثیر تیمار با پی-کوماریک‌اسید و متفورمین بر بیان چهار نشانگر EMT بررسی شد. سطوح mRNA ژن‌های *ZEB1*، *Snail2*، *Vimentin* و *VEGFA* به‌صورت میانگین \pm خطای استاندارد (SE) ارائه شده است.

سطوح نسبی mRNA ژن *ZEB1* در گروه‌های تیمار با پی-کوماریک‌اسید، متفورمین و ترکیب به‌ترتیب، $0/67 \pm 0/003$ ، $0/77 \pm 0/08$ و $0/43 \pm 0/03$ بود (شکل 1 الف). *ZEB1* یک نشانگر EMT با افزایش بیان در سرطان معده است که پیشرفت تومورهای معده را آسان می‌کند. در نتیجه، کاهش بیان آن می‌تواند یک راهبرد ضدسرطان معده جالب باشد [26]. در همین راستا، نتایج ما نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل، تیمار با پی-کوماریک‌اسید به‌طور معناداری ($p < 0.01$) بیان *ZEB1* را کاهش داده است. اختلاف بین گروه‌های کنترل و متفورمین ($p < 0.05$) و تیمار ترکیبی و کنترل ($p < 0.001$) نیز معنادار بود. علاوه‌بر این، تیمار ترکیبی نسبت به تیمارهای مجزا، به‌طور معناداری ($p < 0.05$) اثر مهارتی بیشتری را بر بیان *ZEB1* اعمال کرد. جالب این که این آثار مهارتی در غلظت‌هایی بسیار پایین‌تر از مقادیر IC_{50} برای هر دو، یعنی پی-کوماریک‌اسید و متفورمین قابل مشاهده بود.

بیان *Snail2* بعد از تیمار با پی-کوماریک‌اسید و متفورمین کاهش پیدا کرد. سطوح نسبی mRNA ژن *Snail2* بعد از تیمار با پی-کوماریک‌اسید، متفورمین و ترکیب، به ترتیب، $0/22 \pm 0/07$ ، $0/11 \pm 0/01$ و $0/02 \pm 0/05$ بود (شکل 1 ب). با وجود این که تیمارهای مجزا و ترکیبی با پی-کوماریک‌اسید و متفورمین در مقایسه با نمونه‌های تیمار نشده، به‌طور معناداری ($p < 0.001$) بیان *Snail2* را کاهش داد، اثر تیمار ترکیبی فقط نسبت به تیمار مجزا با پی-کوماریک‌اسید (و نه متفورمین) به‌طور معناداری ($p < 0.05$) شدیدتر بود. اختلاف غیرمعنادار بین تیمار متفورمین و تیمار ترکیبی ممکن است ناشی از مسائلی مثل SE بالای داده‌ها باشد. با این وجود، از آنجا که افزایش بیان *Snail2* فنوتیپ‌های متاستاتیک سلول‌های سرطانی را تشدید می‌کند [27]، این تیمارهای کاهنده بیان

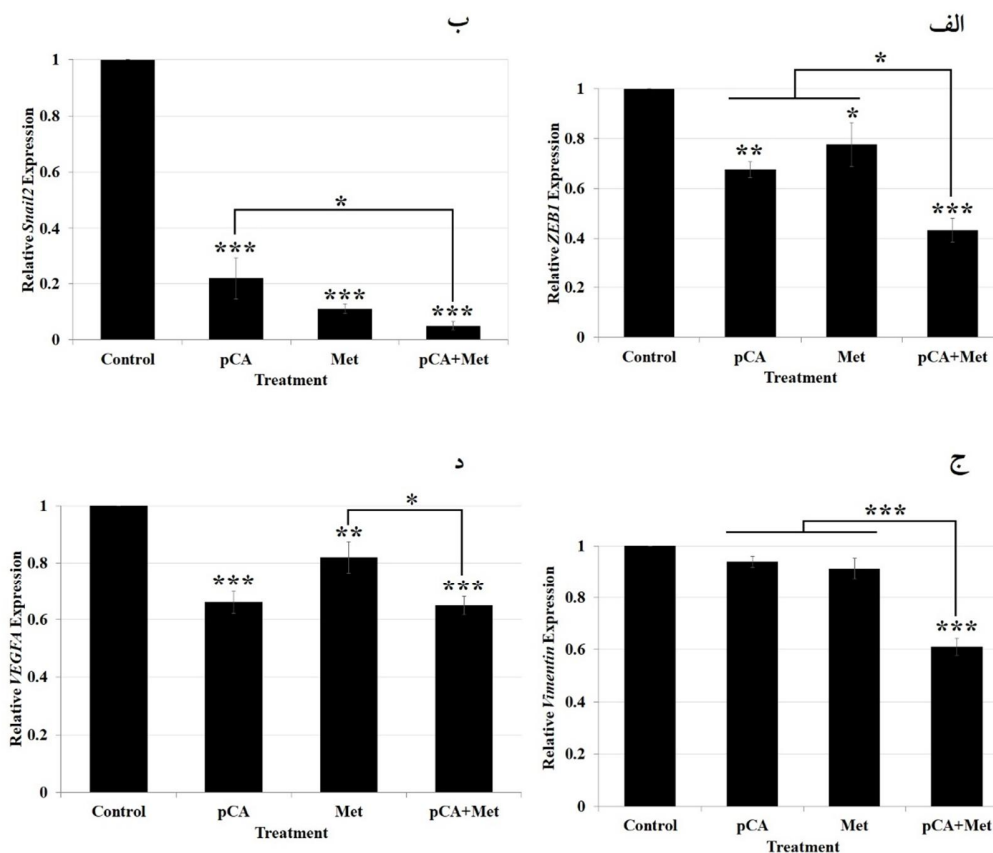
ترکیب، به ترتیب، $0/04 \pm 0/66$ ، $0/05 \pm 0/82$ و $0/03 \pm 0/65$ بود (شکل 1 د). هردو تیمارهای مجزا با پی-کوماریکاسید ($p < 0.001$) و متفورمین ($p < 0.01$) و تیمار ترکیبی ($p < 0.001$) بیان *VEGFA* را در مقایسه با گروه کنترل به طور معناداری کاهش دادند ولی تیمار ترکیبی فقط در مقایسه با تیمار مجزا با متفورمین ($p < 0.05$) (و نه پی-کوماریکاسید) به طور معناداری اثر مهارتی بر بیان *VEGFA* اعمال کرد. بیان *VEGFA* با متاستاز و آنژیوژنز سرطان معده همبستگی دارد [29]. بنابراین این تیمارهای سرکوبگر بیان *VEGFA* می توانند به عنوان تیمارهای بالقوه ضدسرطان معده مطرح شوند.

Snail2 می توانند به عنوان تیمارهای ضدسرطان معده مطرح شوند.

سطوح نسبی mRNA *Vimentin* بعد از تیمار با پی-کوماریکاسید، متفورمین و ترکیب، به ترتیب، $0/02 \pm 0/94$

$0/04 \pm 0/91$ و $0/03 \pm 0/61$ بود (شکل 1 ج). بیان ژن *Vimentin* تنها زمانی به طور معنادار ($p < 0.001$) کاهش پیدا کرد که دودمان سلولی AGS با ترکیب پی-کوماریکاسید و متفورمین تیمار شده باشد. به عبارت دیگر، تیمارهای مجزا اثر مهارتی معناداری را بر بیان ژن *Vimentin* اعمال نکرد. علاوه بر این، تیمار ترکیبی در مقایسه با تیمارهای مجزا هم به طور معناداری ($p < 0.001$) اثر مهارتی بر بیان *Vimentin* اعمال کرده بود. عدم کاهش بیان ژن *Vimentin* در اثر تیمارهای مجزا با پی-کوماریکاسید و متفورمین که براساس نتایج مطالعه‌های قبلی مورد انتظار بود، می تواند ناشی از عواملی مانند ماهیت متفاوت دودمان سلولی استفاده شده در مطالعه حاضر یا غلظت‌های متفاوت مواد استفاده شده باشد. افزایش بیان *Vimentin* پدیده‌ای قابل مشاهده در سرطان معده است. این افزایش بیان با القای فرایند EMT، خصوصیات تهاجمی و متاستاتیک سلول‌های سرطان معده را تشدید می کند [28]. بنابراین، کاهش بیان *Vimentin* می تواند مانع پیشرفت فرایند EMT شده و یک گزینه جالب در مبارزه با سرطان معده باشد. نتایج ما نشان داد که پی-کوماریکاسید و متفورمین بیان ژن *Vimentin* را فقط در تیمارهای ترکیبی به طور معناداری ($p < 0.001$) کاهش دادند. در نتیجه، تیمارهای ترکیبی (و نه مجزا) ممکن است متاستاز توموری ناشی از EMT را که از راه مسیر *Vimentin* روی می دهد، مهار کنند.

تیمار با پی-کوماریکاسید و متفورمین بیان ژن *VEGFA* را کاهش داد. سطوح نسبی mRNA *VEGFA* بعد از تیمار با پی-کوماریکاسید، متفورمین و



شکل 1 تغییرات در بیان ژن‌های دخیل در فرایند EMT بعد از تیمار با pCA (0/2 mM)، Met (0/4 mM) و ترکیب آنها

الف - تغییرات در بیان ZEB1 در طول 48 ساعت؛ ب - تغییرات در بیان Snail2 در طول 48 ساعت؛ ج - تغییرات در بیان Vimentin در طول 48 ساعت؛ د - تغییرات در بیان VEGFA در طول 48 ساعت. pCA = پی-کوماریک‌اسید؛ Met = متفورمین. نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد (SE) برای سه تکرار مستقل ارائه شده است. *، **، *** به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنادار در سه سطح $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$ است.

4- نتیجه‌گیری

سرطان معده) در دودمان سلولی سرطان معده AGS کاهش می‌دهد. علاوه بر این، تیمار با پی-کوماریک‌اسید و متفورمین بیان Snail2 و VEGFA را نیز به‌طور معناداری کاهش می‌دهد. نکته جالب توجه این است که این فعالیت مهارکننده در غلظت‌هایی قابل مشاهده است که بسیار پایین‌تر از IC_{50} بوده و هیچ‌گونه اثر کشنده‌ای هم نشان نمی‌دهند. به دلیل کاهش بیان برخی نشانگرهای مهم EMT در غلظت‌های

تا جایی که بررسی‌ها نشان داد، مطالعه حاضر اولین مطالعه متمرکز بر اثر مهارتی تیمار همزمان با پی-کوماریک‌اسید و متفورمین بر بیان نشانگرهای EMT است. به‌طور خلاصه، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که ترکیب همزمان پی-کوماریک‌اسید و متفورمین بیان ژن‌های ZEB1 و Vimentin را (به‌عنوان دو نشانگر مهم متاستاز ناشی از EMT در

[7] Sharma SH, Chellappan DR, Chinnaswamy P, Nagarajan S. (2017) Protective effect of *p*-coumaric acid against 1,2 dimethylhydrazine induced colonic preneoplastic lesions in experimental rats. *Biomed Pharmacother* 94, 577–588.

[8] Sharma SH, Rajamanickam V, Nagarajan S. (2018) Antiproliferative effect of *p*-coumaric acid targets UPR activation by downregulating Grp78 in colon cancer. *Chem Biol Interact* 291, 16–28.

[9] Janicke B, Hegardt C, Krogh M, Onning G, Akesson B, Cirenajwis HM, Oredsson SM. (2011) The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and *p*-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. *Nutr Cancer* 63(4), 611–622.

[10] Saremi S, Kolahi M, Tabandeh MR, Hashemitabar M. (2022) Induction of apoptosis and suppression of Ras gene expression in MCF human breast cancer cells. *J Can Res Ther* 18(4), 1052-1060.

[11] Hu X, Yang Z, Liu W, Pan Z, Zhang X, Li M, Liu X, Zheng Q, Li D. (2020) The anti-tumor effects of *p*-coumaric acid on melanoma A375 and B16 cells. *Front Oncol* 10, 558414.

[12] Jang MG, KO HC, Kim SJ. (2020) Effects of *p*-coumaric acid on microRNA expression profiles in SNU-16 human gastric cancer cells. *Genes Genomics* 42, 817–825.

[13] Sefidi-Heris Y, Zarei E, Saadat I. (2023) Metformin and *p*-coumaric acid downregulate the expression of *hTERT* in gastric cancer cell line AGS. *Gene Rep* 32, 101795.

[14] Flory J, Lipska K. (2019) Metformin in 2019. *Jama* 321(19), 1926–1927.

[15] Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, Gomes AP, Ward TM, Minor RK, Blouin MJ. (2013) Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun* 4(1), 1–9.

[16] Johnson NP. (2014) Metformin use in women with polycystic ovary syndrome. *Ann Transl Med* 2(6), 56.

[17] Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, Meric-Bernstam F, Liedtke C, Barnett CM, Hsu L, Hung MC, Hortobagyi GN, Gonzalez-Angulo AM. (2009) Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 27(20), 3297–3302.

[18] Vázquez-Martín A, Oliveras-Ferreros C, del Barco S, Martín-Castillo B, Menéndez JA. (2009) mTOR inhibitors and the anti-diabetic biguanide

غیرکشنده، پی-کوماریکاسید و متفورمین می‌توانند نامزدهای بالقوه‌ای برای مطالعات آتی در حوزه مبارزه با سرطان معده باشند. ولی مطالعه‌های تکمیلی از جمله مطالعه‌ها در سایر دودمان‌های سلولی، آزمایش‌های درون‌تن و بررسی‌های سازوکار اثر اینها می‌تواند ابعاد بیشتری از این اثر ضد EMT را روشن کند.

قدردانی و تشکر

مطالعه حاضر با حمایت دانشگاه شیراز (97GCU3M1740) انجام شد.

منابع

[1] O'Reilly M, Mellotte G, Ryan B, O'Connor A. (2020) Gastrointestinal side effects of cancer treatments. *Ther Adv Chronic Dis* 11, 2040622320970354.

[2] Roy N, Narayanankutty A, Nazeem PA, Nazeem R, Babu TD, Mathew D. (2016) Plant Phenolics ferulic acid and *p*-coumaric acid inhibit colorectal cancer cell proliferation through EGFR down-regulation. *Asian Pac J Cancer Prev* 17(8), 4019–4023.

[3] Falah, R.R., Talib, W.H., Shbailat, S.J. (2017) Combination of metformin and curcumin targets breast cancer in mice by angiogenesis inhibition, immune system modulation and induction of p53 independent apoptosis. *Ther Adv Med Oncol* 9(4), 235–352.

[4] Shailasree, S, Venkataramana M, Niranjana SR, Prakash HS. (2015) Cytotoxic effect of *p*-coumaric acid on neuroblastoma, N2a cell via generation of reactive oxygen species leading to dysfunction of mitochondria inducing apoptosis and autophagy. *Mol Neurobiol* 51, 119–130.

[5] Pei H, Ou J, Huang J, Ou S. (2016) *p*-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *J Sci Food Agric* 96, 2952–2962.

[6] Lee JW, Kim YH. (2011) Activation of pro-apoptotic multidomain Bcl-2 family member Bak and mitochondria-dependent caspase cascade are involved in *p*-coumaric acid-induced apoptosis in human Jurkat T cells. *J Life Sci* 21(12), 1678-1688.

- [29] Wang X, Chen X, Fang J, Yang C. (2013) Overexpression of both VEGF-A and VEGF-C in gastric cancer correlates with prognosis, and silencing of both is effective to inhibit cancer growth. *Int J Clin Exp Pathol* 6(4), 586-597.
- metformin: new insights into the molecular management of breast cancer resistance to the HER2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib. *Clin Transl Oncol* 11(7), 455–459.
- [19] Zhuang Y, Miskimins, WK. (2011) Metformin induces both caspase-dependent and poly(ADP-ribose) polymerase-dependent cell death in breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 9(5), 603–615.
- [20] Morgillo F, Sasso FC, Della Corte CM, Festino L, Manzo A, Martinelli E, Troiani T, Capuano A, Ciardiello F. (2013) Metformin in lung cancer: rationale for a combination therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 22(11), 1401–9.
- [21] Valaee S, Yaghoobi MM, Shamsara M. (2017) Metformin inhibits gastric cancer cells metastatic traits through suppression of epithelial-mesenchymal transition in a glucose-independent manner. *PLoS One* 12(3).
- [22] Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, Wu CC, LeBleu VS, Kalluri R. (2015) Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* 527(7579), 525.
- [23] Choi YJ, Jang H., (2016) Gastric cancer: epithelial mesenchymal transition, in: *Helicobacter pylori*. Springer, pp. 275–291.
- [24] Peng Z, Wang CX, Fang EH, Wang GB, Tong Q. (2014) Role of epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer initiation and progression. *World J Gastroenterol* 20(18), 5403.
- [25] Lamouille S, Xu J, Derynck R. (2014) Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(3), 178–196.
- [26] Shen H, Zhu H, Chen Y, Shen Z, Qiu, W, Qian C, Zhang J. (2021) ZEB1-induced LINC01559 expedites cell proliferation, migration, and EMT process in gastric cancer through recruiting IGF2BP2 to stabilize ZEB1 expression. *Cell Death Dis* 12, 349.
- [27] Masuo K, Chen R, Yogo A, Sugiyama A, Fukuda A, Masui T, Uemoto S, Seno H, Takaishi S. (2021) SNAIL2 contributes to tumorigenicity and chemotherapy resistance in pancreatic cancer by regulating IGF2BP2. *Cancer Sci* 112(12), 4987-4999.
- [28] Zhang H, Wu X, Xiao Y, Wu L, Peng Y, Tang W, Liu G, Sun Y, Wang J, Zhu H, Liu M, Zhang W, Dai W, Jiang P, Li A, Li G, Xiang L, Liu S, Wang J. (2019) Coexpression of FOXK1 and vimentin promotes EMT, migration, and invasion in gastric cancer cells. *J Mol Med* 97, 163-176.

Metformin and *p*-coumaric acid alter the expression of some EMT genes in gastric cancer cell line AGS

Youssof Sefidi-Heris¹ and Iraj Saadat^{2*}

1. PhD in Cell and Molecular Biology, Department of Biology, School of Science, Shiraz University, Shiraz, Iran

2. Associate Professor, Department of Biology, School of Science, Shiraz University, Shiraz, Iran

*Corresponding author: Iraj Saadat, Department of Biology, School of Science, Shiraz University, Shiraz, 71467-13565, Iran

Received:2023/11/9

Accepted: 2023/12/4

*Corresponding author :

isaadat@shirazu.ac.ir

Abstract

Gastric cancer is one of the most common cancers in the world. Its treatments are costly and can cause severe side effects. As a result, treatments with natural compounds, well-established therapeutics, or combinations of both groups may be effective alternatives. *p*-Coumaric acid (pCA) and metformin (Met) are among such anticancer treatments. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a multi-purpose process that plays a critical role in gastric cancer. This process involves a complex network of biological markers participating in gastric cancer initiation and metastasis. Subsequently, the agents downregulating the expression of EMT markers may be potential anti-gastric cancer therapeutics. Because the effects of pCA, Met, and their combination on the expression of EMT markers *ZEB1*, *Snail2*, *Vimentin*, and *VEGFA* have not been inspected, the present study aimed at assessing these effects. MTT assay determined the cytotoxicity of pCA and Met on the AGS cells for 48 hours. Real-time PCR was used to evaluate the changes in the expression levels of these EMT genes after 48 hours. A combination of pCA and Met downregulated the expression of *ZEB1* and *Vimentin* genes at low, non-cytotoxic concentrations. Therefore, they may be potential candidates for further investigations in fighting against gastric cancer.

Key Words: Metformin, *p*-Comaric Acid, Gastric Cancer, EMT Markers, Real-time PCR

