

## ارزیابی اثرات دوز سیتوتوکسیک ایبوپروفن بر سطح بیان ژن تجزیه‌کننده ماتریکسی MMP 9 و ژن ضد متاستازی NM23 در سلول‌های سرطانی دهانه رحم

الناز قدیری<sup>۱</sup>، رحیم احمدی<sup>۲\*</sup>، مزده لشنی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت ۱۴۰۰/۰۵/۰۵ تاریخ پذیرش ۱۴۰۰/۱۲/۲۲

### چکیده

پیش‌زمینه و هدف: گرچه مطالعات نشان داده‌اند که ایبوپروفن دارای اثرات ضد سرطانی در بسیاری از سلول‌های سرطانی است، اما مکانیسم اثر ضد سرطانی ایبوپروفن در سلول‌های سرطانی هنوز به خوبی شناخته نشده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت سیتوتوکسیک ایبوپروفن بر سطح بیان ژنهای MMP-9 و NM23 در سلول‌های سرطانی دهانه رحم بوده است.

مواد و روش کار: طی این تحقیق تجربی- آزمایشگاهی، رده سلولی سرطانی دهانه رحم از انستیتو پاستور خریداری شد و سلول‌ها به گروه‌های تیمار شده با ایبوپروفن در غلظت‌های ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و نیز گروه کنترل (عدم تیمار) تقسیم‌بندی شدند. زنده‌مانی سلول‌ها به کمک روش سنجش MTT اندازه‌گیری شد و سطح بیان ژنهای MMP-9 و NM23 با کمک فن RT-PCR ارزیابی گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری واریانس یک‌طرفه آنالیز شدند.

یافته‌ها: غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر ایبوپروفن سبب کاهش معنادار زنده‌مانی در سلول‌های سرطانی هلا شد (به ترتیب  $P < 0.05$  و  $P < 0.001$ ). دوز ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر ایبوپروفن اثر معناداری بر سطح بیان ژن MMP-9 نداشته، اما باعث کاهش معنادار سطح بیان ژن NM23 گردید ( $P < 0.001$ ).

نتیجه‌گیری: گرچه غلظت‌های پایین ایبوپروفن دارای اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم نبوده، اما غلظت‌های بالاتر می‌توانند سبب کاهش زنده‌مانی در سلول‌های سرطانی دهانه رحم شوند. همچنین غلظت بالای ایبوپروفن بر سطح بیان ژن تجزیه‌کننده ماتریکس خارج سلولی (MMP-9) اثر نداشته، اما با کاهش سطح بیان ژن ضد متاستازی NM23 ممکن است در افزایش پتانسیل متاستازی سلول‌های سرطانی دهانه رحم نقش داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: ایبوپروفن، زنده‌مانی، MMP-9، NM23، سرطان دهانه رحم

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و دوم، شماره دهم، ص ۷۷۲-۷۶۵، دی ۱۴۰۰

آدرس مکاتبه: دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران، تلفن تماس: ۰۹۱۲۶۱۲۰۳۵۳

Email: drrahmadi@yahoo.com

### مقدمه

نشانه‌ای دیده نمی‌شود، اما علائم تأخیری ممکن است شامل خونریزی غیرطبیعی واژن، درد لگن یا درد در طی رابطه جنسی باشد (۲). سرطان دهانه رحم یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در زنان است (۳). یکی از مهم‌ترین اجزای مؤثر در تقسیم و متاستاز سلول‌های سرطانی دهانه رحم، پروتئین ماتریکس متالوپپتیداز ۹ (MMP-9) است. این پروتئین متعلق به خانواده اندوپروتئینازها

سرطان دهانه رحم گونه‌ای از سرطان است که از گردن رحم یعنی قسمت پایینی رحم در محل اتصال رحم به واژن بروز می‌کند. این سرطان به دلیل رشد غیرطبیعی سلول‌ها ایجاد می‌شود و در پی تغییر DNA طبیعی سلول‌های نرمال، توانایی متاستاز به بافت‌های دیگر را پیدا می‌کند (۱). در اوایل بیماری، به‌طور معمول هیچ

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران

<sup>۲</sup> کالج بین‌المللی اوبسینا، بوداپست، مجارستان

<sup>۳</sup> دکترای فیزیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

<sup>۴</sup> کارشناس ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علم و هنر، یزد، ایران

می‌دهند. برخی مطالعات نشانگر افزایش خطر ابتلا به انواع خاصی از سرطان و برخی دیگر بیانگر کاهش خطر سرطان متعاقب استفاده از داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی می‌باشند (۱۲-۱۰) و از این نظر مطالعه در این حوزه به‌ویژه از دیدگاه سلولی و مولکولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

در مجموع با توجه به شیوع قابل توجه سرطان دهانه رحم در جهان و ایران و نیز با توجه به عوارض جسمی، روانی، اجتماعی و اقتصادی حاصل از ابتلا به سرطان دهانه رحم و همچنین با توجه به نتایج ضدونقیض در حوزه پژوهش (۲۱، ۱۲، ۱۱، ۱۰) و همچنین با توجه به اینکه مطالعات قبلی در رابطه با اثر ایبوپروفن بر عملکرد بیان ژن MMP9 و NM23 در سلول‌های سرطانی دهانه رحم بسیار محدود هست؛ بنابراین، تحقیق حاضر به بررسی ارزیابی اثرات دوز سیتوتوکسیک ایبوپروفن بر بیان ژن تجزیه‌کننده ماتریکسی MMP-9 و ژن ضد متاستازی NM23 در سلول‌های سرطانی دهانه رحم می‌پردازد.

### مواد و روش‌ها

در طی این تحقیق تجربی- آزمایشگاهی، ایبوپروفن به صورت پودر خالص از شرکت معتبر دارویی فارماشیمی تهیه شد و غلظت‌های ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آماده گردید. به منظور تهیه این غلظت‌ها، به ۰/۱ گرم دارو، حلال PBS افزوده گردید. سپس جهت استریل کردن دارو، محلول به دست آمده توسط فیلتر سرسرنگی، فیلتر شد و در نهایت غلظت‌های مورد نظر به روش سریالی تهیه شدند.

رده سلولی سرطانی دهانه رحم (Hela) از انستیتو پاستور خریداری و در تانک نیتروژن با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در این برنامه مطالعاتی، رده سلولی Hela، به طور تصادفی به هفت گروه شامل گروه‌های تحت تأثیر ایبوپروفن با دوزهای ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و گروه شاهد (عدم مواجهه با دارو) تقسیم‌بندی شدند.

در ادامه جهت بررسی اثرات سیتوتوکسیک ایبوپروفن بر سلول‌های مورد آزمایش، از روش سنجش MTT استفاده گردید. برای این منظور ایبوپروفن در محلول دیمتیل سولفوکساید 100% (DMSO) با غلظت‌های مختلف به‌طور کامل حل شده و بعد از عبور از فیلتر سرسرنگی در ویال تیره و دمای منفی ۲۰ درجه ذخیره شد. سلول‌ها در محیط کشت کراتینوسایت فاقد سرم و حاوی پنی سلین (۵۰ واحد/ میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۵۰ گرم / میلی‌لیتر) نگهداری شدند. سلول‌ها در محیط کشت کامل تحت اتمسفر ۹۵ درصد هوا و دی‌اکسید کربن ۵ درصد در دمای ۳۷ درجه رشد یافتند. سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ چاهک حاوی محیط کشت

است و فعالیتش وابسته به حضور یون‌های آهن روی و کلسیم است. متالوپروتئینازها با از بین بردن مانع بین سلول‌های توموری و محیط بافت نرمال باعث تجزیه اجزای ماتریکس خارج سلولی می‌شوند و باعث شروع متاستاز می‌شوند. مطالعات در محیط کشت نشان داده‌اند که MMP9 موجب بزرگ‌تر شدن تومور می‌گردد (۴). از طرفی، ژن NM23 که به‌طور مرسوم به نام ژن NME1 نیز شناخته می‌شود، نقش مهم ضد متاستازی ایفا می‌نماید. در واقع کاهش میزان RNA مربوط به این ژن سبب افزایش قابل توجه قدرت متاستازی در سلول می‌گردد (۵). کاهش بیان این ژن در سلول‌های سرطانی مختلف به‌ویژه سلول‌های سرطانی دهانه رحم ارتباط مستقیمی با قدرت تهاجمی و متاستازی این سلول‌ها دارد (۶). گزارش‌ها حاکی از آنند که ایبوپروفن که دارویی از گروه داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی (NSAIDs) است و اساساً برای درمان درد، تب و التهاب استفاده می‌شود دارای اثرات ضدسرطانی نیز هست. مکانیسم اثر ایبوپروفن با واسطه مهار آنزیم سیکلواکسیژناز و متعاقباً مهار تولید پروستاگلاندین‌ها میانجی‌گری می‌شود. ایبوپروفن با مهار تولید پروستاگلاندین‌ها موجب کاهش درد، تورم و تب می‌شود. ایبوپروفن می‌تواند به‌عنوان یک عامل پیشگیرانه در سرطان پانکراس و یا یک عامل کاهش‌دهنده ریسک سرطان کلورکتال نیز ایفای نقش کند (۷). همچنین این دارو می‌تواند رشد آدنوکارسینومای تخمدان را در ۳۳ درصد افراد مهار کند (۸) و بر سلول‌های سرطان دهانه رحم نیز اثرگذار باشد (۹). مهار سیکلواکسیژناز 1-COX) به‌تنهایی یا در ترکیب با ایبوپروفن در مهار رشد برخی سرطان‌ها نقش دارد. در واقع سیکلواکسیژناز آنزیمی کلیدی در تبدیل اسید آراشیدونیک به پروستاگلاندین‌ها است و دارای دو ایزوزیم Cox-1 و Cox-2 است. هر دو ایزوزیم به‌وسیله ایبوپروفن مهار می‌شوند (۱۰). در واقع داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی می‌توانند نقش مهمی در کاهش سرطان داشته باشند. گرچه بخشی از یافته‌های پژوهشی بیانگر اثرات ضد سرطانی برخی از داروهای NSAID هستند اما بخشی از نتایج تحقیقات نشانگر اثرات سرطانی این داروها می‌باشند (۱۴-۱۱) و در این راستا سیکلواکسیژنازها نقش مهمی دارند (۱۵).

گزارش‌ها حاکی از آن است که داروهای ضدالتهاب غیر استروئیدی می‌توانند پتانسیل متاستازی سلول‌های سرطانی دهانه رحم را افزایش دهند (۱۶) و ممکن است این عمل را به‌واسطه تأثیر بر ژنهای MMP9 و NM23 انجام دهند (۷، ۱۷، ۱۸). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که برخی داروهای ضدالتهاب غیر استروئیدی از جمله ایبوپروفن می‌توانند بر بیان ژن MMP9 تأثیرگذار باشند (۱۹، ۲۰). گرچه نقش ضدسرطانی داروهای ضدالتهابی به‌عنوان یک نقش برجسته مدنظر بسیاری از محققین است، درعین حال مطالعات پیشین یافته‌های متناقضی را از نظر نقش این داروها در سرطان نشان

همچنین گروه تیمار در معرض غلظت سیتوتوکسیک اسپرین (۱ میلی گرم بر میلی لیتر)، قرار گرفت. پلیت مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. در ادامه پس از انجام مراحل مختلف سانتریفیوژ استخراج RNA مطابق دستورالعمل کیت استاندارد تاکارا (Takar-Bio) انجام گرفت. خلوص و غلظت RNA توسط دستگاه نانودراپ (Bio-Tek, USA) اندازه گیری شد. سنتز cDNA از mRNA با استفاده از کیت مذکور و بر اساس پروتکل شرکت سازنده کیت در دماهای ۲۵، ۴۲ و ۷۰ درجه سانتی گراد به ترتیب ۵، ۶۰ و ۵ دقیقه انجام شد و خلوص آن توسط دستگاه نانودراپ تعیین گردید. تکنیک Real time PCR به منظور تکثیر قطعه مدنظر و ارزیابی کمی بیان mRNA با استفاده از cDNA ساخته شد و GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. مستر میکس درون کپ استریپ ریخته شد و سپس پرایمرهای فوروارد و ریورس (جدول ۱) و cDNA افزوده شدند. در این سیستم، مولکول سایبرگرین برای مشاهده پیشرفت PCR استفاده شد. آزمایش برای هر ژن، ۴ بار تکرار گردید و برای انجام این تکنیک از دستگاه Applied Biosystems StepOne Plus استفاده شد. در نهایت بیان نسبی ژن ها با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  = RQ محاسبه گردید.

داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار تحلیل آماری SPSS آنالیز شدند. نخست جهت اطمینان از توزیع طبیعی داده ها از آزمون کولموگورف- اسمیرنوف استفاده شد. متعاقباً جهت مقایسه بین گروه ها، از روش آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی (Tukey) استفاده گردید. سطح معنی داری در سطح  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

مناسب با تراکم  $10^6 \times 3-5$  سلول/سانتی متر مکعب کاشته شدند و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از ۲۴ ساعت به محیط کشت حاوی سلول، ایبوپروفن با غلظت های مختلف اضافه شد و سلول ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. در هر چاهک غلظت های مختلف دارو با سه بار تکرار به کار برده شد. در پایان زمان مواجهه با دارو، محیط کشت از چاهک های حاوی سلول حذف و ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت تازه به هر چاهک اضافه شد و سپس اجازه داده شد سلول ها برای ۲۴ ساعت دیگر رشد کنند. در پایان زمان رشد در هر چاهک، ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت تازه و ۵۰ میکرولیتر MTT اضافه شد. پلیت ها سپس در فویل آلومینیوم پیچیده شدند و در محیط مرطوب و دمای ۳۷ درجه برای ۴ الی ۸ ساعت انکوبه شدند. محیط حاوی MTT از چاهک ها حذف شد و کریستال فورمازان باقی مانده از MTT با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر DMSO و ۲۵ میکرولیتر بافر گالیسیگین به هر چاهک حل شده و بلافاصله جذب در طول موج ۵۷۰ خوانده شد. چاهک های حاوی محیط و MTT فاقد سلول به عنوان بلانک در نظر گرفته شدند. همه آزمایش ها به صورت سه بار تکرار انجام شد. در نهایت درصد زندهمانی سلول ها با فرمول زیر محاسبه شد:

$$= \text{درصد زندهمانی سلول ها} \times 100 \text{ (میانگین جذب گروه کنترل / میانگین جذب گروه تست)}$$

بیان ژن ها با استفاده از تکنیک Real time PCR انجام گرفت. بدین منظور  $5 \times 10^5$  سلول در هر چاهک کشت داده شد. پس از کشت، سلول ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس محلول ها از چاهک خارج شده، به خانه گروه های کنترل و تیمار، محیط DMEM (شرکت Gibco, Invitrogen) و بافر FBS اضافه شد.

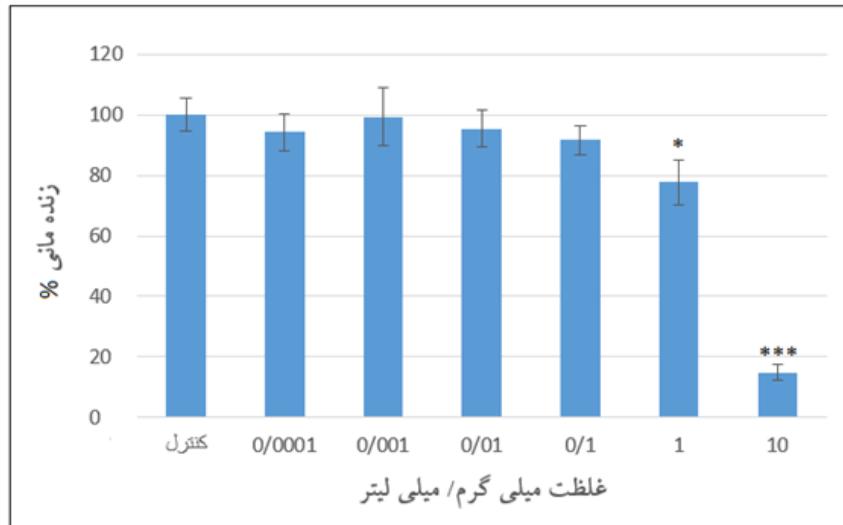
جدول (۱): توالی پرایمرهای مورد استفاده برای هر ژن در واکنش های Real time PCR

ژن	توالی پرایمر
MMP9	F 5'GGCGTCGTGGTTCCAAC-3'
	R 5'CGGTCTCGGTGTCGTAGT-3'
NM23	F 5'GTTGACCTGAAGACCGTCC-3'
	R 5'GATGGTCCCAGGCTTGGAGT-3'
Gapdh	F 5'CCCACTCCTCCACCTTTGAC-3'
	R 5'CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA-3'

با غلظت های ۱۰ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر، نسبت به گروه کنترل دچار کاهش معناداری شد. (به ترتیب با  $P < 0.001$  و  $P < 0.05$ ) (نمودار شماره ۱).

## یافته ها

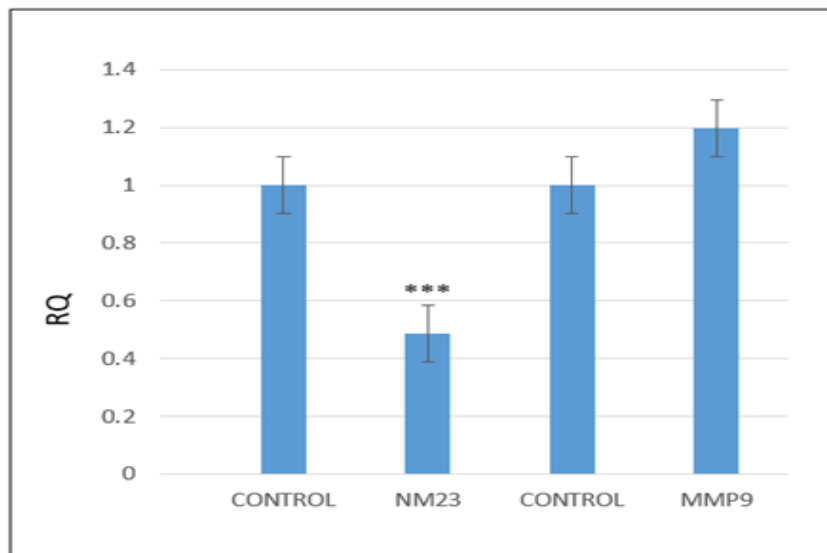
نتایج حاصل از بررسی اثرات ایبوپروفن بر سلول های سرطانی دهانه رحم نشان دادند که درصد زندهمانی این سلول ها در مواجهه



**نمودار (۱):** اثر غلظت‌های مختلف ایبوپروفن برحسب mg/ml بر رده سلولی هیلا در مقایسه با گروه کنترل. \* و \*\*\* نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل هستند (به ترتیب  $P < 0.05$  و  $P < 0.001$ ).

سطح نسبی بیان (RQ) ژن NM23 دچار کاهش معنادار شد اما سطح نسبی بیان ژن MMP-9 دچار تغییر معناداری در مقایسه با گروه کنترل نشد (نمودار ۲).

نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت ۱ میلی‌گرم / میلی‌لیتر ایبوپروفن بر بیان ژن‌های MMP-9 و NM23 نشان داد که میانگین



**نمودار (۲):** اثر دوز ۱ میلی‌گرم / میلی‌لیتر ایبوپروفن بر بیان ژن بر بیان ژن‌های NM23 و MMP-9 در مقایسه با گروه کنترل. علامت \*\*\* نشان‌دهنده اختلاف معنادار در مقایسه با گروه کنترل است ( $P < 0.001$ ).

ایبوپروفن می‌تواند سبب کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی دهانه رحم شوند. از سویی غلظت سیتوتوکسیک ایبوپروفن بر بیان ژن MMP-9 اثر معناداری نداشت اما سبب کاهش معنادار بیان ژن ضد متاستازی NM23 گردید.

## بحث

نتایج این مطالعه نشان دادند که غلظت‌های پایین ایبوپروفن که یکی از مهم‌ترین داروهای NSAID است دارای اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم نمی‌باشند و تنها غلظت‌های بالای

از نظر نقش این داروها در سرطان نشان می‌دهند. در واقع بخشی از یافته‌های پژوهشی بیانگر اثرات ضد سرطانی برخی از داروهای NSAID هستند و بخشی نشانگر اثرات سرطان‌زایی این داروها می‌باشند (۱۴-۱۲).

از نظر مکانیسم احتمالی اثرات ضدسرطانی ایبوپروفن برعلیه سلول‌های سرطانی دهانه رحم به نظر می‌آید مسیر اثر ایبوپروفن بر آنزیم سیکلو اکسیژناز از مهم‌ترین مسیرهای اثر ایبوپروفن بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم می‌باشد. آنزیم سیکلو اکسیژناز-۲ از مهم‌ترین آنزیم‌هایی که علاوه بر نقش کلیدی در تبدیل اسید آراشیدونیک به پروستاگلاندین‌ها با تکوین سرطان در سلول‌های مختلف نیز در ارتباط می‌باشد. از سویی ایبوپروفن می‌تواند سبب مهار این آنزیم گردد (۱۰) و بدین واسطه بخش از اثرات ضدسرطانی خود را اعمال نماید. گرچه ایبوپروفن می‌تواند سبب کاهش بیان ژن NM23 شده و از این طریق متاستاز سلول‌های سرطانی را افزایش دهد که این امر نیاز به مطالعات بیشتر دارد تا مورد اثبات قرار گیرد. این تحقیق از نظر بررسی‌های فرآیندهای مولکولی از قبیل ژنهای آپوپتوزی و آبشار کاسپازی و پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز، دارای محدودیت‌هایی می‌باشد. محققان این پژوهش امیدوارند و پیشنهاد مینمایند که در آینده بررسی اثرات غلظت‌های مختلف ایبوپروفن بر رده‌های سلولی مختلف و بیان ژن‌های مختلف، بررسی آبشار کاسپازی و فعال‌سازی یا مهار آنزیم‌های کیناز در فرایندهای داخل سلولی و نیز مهار سلول‌های سرطانی در مطالعات حیوانی و کلینیکی اجرا گردد.

### نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این پژوهش نشان دادند نتایج این مطالعه نشان دادند که غلظت‌های پایین ایبوپروفن دارای اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم نمی‌باشند و تنها غلظت‌های بالای ایبوپروفن می‌توانند سبب کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی دهانه رحم شوند. از سویی غلظت سیتوتوکسیک ایبوپروفن بر بیان ژن MMP-9 اثر معناداری نداشت اما سبب کاهش معنادار بیان ژن ضد متاستازی NM23 گردید. بر این مبنا، به نظر می‌آید غلظت‌های فیزیوفارماکولوژیک ایبوپروفن دارای اثرات ضد سرطانی برعلیه سلول‌های سرطانی دهانه رحم نباشند اما غلظت بالای ایبوپروفن گرچه اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم دارد اما هم‌زمان احتمالاً پتانسیل متاستازی این سلول‌ها را افزایش می‌دهد. گرچه جهت تعیین دقیق اثرات ضدسرطانی ایبوپروفن بر سلول‌های دهانه رحم نیاز به مطالعات بیشتر تجربی و اپیدمیولوژیک وجود دارد.

در راستای این پژوهش، یافته‌های علمی بیانگر اثرات ضدسرطانی داروهای NSAID به‌ویژه علیه سلول‌های سرطانی دهانه رحم می‌باشند. در مطالعه‌ای مدل‌های مختلف سرطان دهانه رحم در شرایط *in vivo* و *in vitro* مورد بررسی قرار گرفتند و تعدادی دارو از دسته داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی بر رده‌های سلولی SiHa و HeLa, VIPA, INBL اثر داده شدند. نتایج نشان دادند که داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی سمیت سلولی قابل توجهی بر تمامی رده‌های سلولی مورد مطالعه از خود نشان دادند (۱۷). از سویی، موافق یافته‌های پژوهش حاضر، تحقیقات دیگری نیز نشان داده‌اند که ایبوپروفن دارای اثرات ضد سرطانی قابل توجهی بر علیه سرطان دهانه رحم می‌باشد. در این راستا، یافته‌های پژوهشی نشان داده‌اند که ایبوپروفن می‌تواند به‌عنوان یک عامل پیشگیرانه در سرطان پانکراس و یا یک عامل کاهش‌دهنده ریسک سرطان کلورکتال ایفای نقش کند (۷). همچنین پژوهش‌های انجام گرفته نشانگر نقش پیشگیرانه ایبوپروفن در بروز سرطان‌های سیستم تولیدمثلی است. مطالعه انجام‌یافته در خصوص اثرات ایبوپروفن بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی تخمدان نشان داد که این دارو می‌تواند تکوین سرطان آدنوکارسینومای تخمدان را در ۳۳ درصد افراد مهار کند (۸). همچنین تحقیقات انجام‌یافته در خصوص اثرات ایبوپروفن بر متاستاز سلول‌های سرطانی دهانه رحم نشان داده است که ایبوپروفن می‌تواند سبب افزایش پتانسیل متاستازی رده سلولی هلا از طریق کاهش بیان ژن CD82 گردد (۱۶). گرچه در خصوص اثرات ایبوپروفن بر بیان ژن MMP-9 و NM23 که هر دو دارای نقش اساسی در متاستاز سلول‌های دهانه رحم هستند تا حد اطلاع نگارندگان گزارش قبلی وجود ندارد. از سویی، اینوتیلون (Inotilone) که یک داروی ضدالتهابی مهارکننده سیکلو اکسیژنازی است باعث مهار قابل توجه بیان MMP-9 در ماکروفاژهای RAW264.7 می‌شود (۱۸). همچنین گزارش‌ها حاکی از آن است که داروی بتا-د-مانوریک اسید ( $\beta$ -D-Mannuronic acid) که به‌عنوان یک داروی ضدالتهاب غیراستروئیدی جدید شناخته می‌شود باعث کاهش ژن MMP9 در سلول‌های سرطانی سینه می‌گردد (۱۹). همچنین داده‌های پژوهشی نشان داده‌اند که ایبوپروفن می‌تواند فعالیت آنزیمی MMP-9 را تنظیم نماید. در واقع، ایبوپروفن بیان کلاژنازها از جمله MMP-9 را بدون تأثیر بر بیان انواع کلاژن I و III تنظیم مجدد می‌کند (۲۰). علیرغم مطالعات محدود در مورد اثرات ایبوپروفن بر بیان ژن MMP-9 در خصوص اثرات ایبوپروفن بر NM23 در سلول‌های سرطانی به‌ویژه سلول‌های سرطانی دهانه رحم تا حد اطلاع نگارندگان گزارش قبلی وجود ندارد. همچنین گرچه بسیاری محققین نقش ضدسرطانی داروهای ضدالتهابی را مورد تأکید قرار می‌دهند، اما برخی مطالعات یافته‌های متناقضی را

## تشکر و قدردانی

همکاران در مرکز بیوتکنولوژی جاوید به‌ویژه آقای وحید عسگری تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

این تحقیق با حمایت‌های معنوی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار انجام گرفته است. همچنین از زحمات

## References

1. Buskwofie A, David-West G, Clare CA. A review of cervical cancer: incidence and disparities. *J Natl Med Assoc* 2020 Apr 1;112(2):229-32.
2. Fontham ET, Wolf AM, Church TR, Etzioni R, Flowers CR, Herzig A, Guerra CE, Oeffinger KC, Shih YC, Walter LC, Kim JJ. Cervical cancer screening for individuals at average risk: 2020 guideline update from the American Cancer Society. *CA: Cancer J Clin* 2020;70(5):321-46.
3. Naz MS, Kariman N, Ebadi A, Ozgoli G, Ghasemi V, Fakari FR. Educational interventions for cervical cancer screening behavior of women: a systematic review. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018;19(4):875.
4. Vafadari B, Salamian A, Kaczmarek L. MMP-9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy. *J Neurochem* 2016;139:91-114.
5. Tee YT, Chen GD, Lin LY, Ko JL, Wang PH. Nm23-H1: a metastasis-associated gene. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2006;45(2):107-13.
6. Marone M, Scambia G, Ferrandina G, Giannitelli C, Benedetti-Panici P, et al. Nm23 expression in endometrial and cervical cancer: inverse correlation with lymph node involvement and myometrial invasion. *Br J Cancer* 1996;74(7):1063-8.
7. Ait Ouakrim D, Dashti SG, Chau R, Buchanan DD, Clendenning M, Rosty C, Winship IM, Young JP, Giles GG, Leggett B, Macrae FA. Aspirin, ibuprofen, and the risk for colorectal cancer in Lynch Syndrome. *J Natl Cancer Inst* 2015;107(9):d1v170.
8. Altinoz MA, Korkmaz R. NF-kB, macrophage migration inhibitory factor and cyclooxygenase-inhibitions as likely mechanisms behind the acetaminophen-and NSAID-prevention of the ovarian cancer. *Neoplasma* 2004;51(4):239-47.
9. Lagunas L, Bradbury CM, Laszlo A, Hunt CR, Gius D. Indomethacin and ibuprofen induce Hsc70 nuclear localization and activation of the heat shock response in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313(4):863-70.
10. Roya Sharifi, Mehdi Hedayati, Yousef Mozami, Mohammad Rahmati Yamchi, Faezeh Fatemi, Abolfazl Dadkhah, Abdolmir Allameh, Cyclooxygenases, *Cancer Prevention and Treatment. J Med Res* 2007; 31 (3): 289.
11. Ahmadi R, Karimi Ghezeli Z, Gravand F, Naghshineh M. The Effect of Aspirin and Ibuprofen on the Proliferation of Cervical Cancer Cells (HeLa) Compared to Non-Cancerous Cells (HEK 293) in Cell Culture Medium. *Qom Univ Med Sci J* 2018; 12 (5):16-24.
12. Wong RS. Role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in cancer prevention and cancer promotion. *Adv Pharmacol Sci* 2019; 2019:3418975.
13. Fairfield KM, Hunter DJ, Fuchs CS, Colditz GA, Hankinson SE. Aspirin, other NSAIDs, and ovarian cancer risk (United States). *Cancer Causes Control* 2002;13(6):535-42.
14. Friel G, Liu CS, Kolomeyevskaya NV, Hampras SS, Kruszka B, Schmitt K, et al. Aspirin and acetaminophen use and the risk of cervical cancer. *J Low Genit Tract Dis* 2015;19(3):189.
15. Li W, Xu RJ, Lin ZY, Zhuo GC, Zhang HH. Effects of a cyclooxygenase-1-selective inhibitor in a mouse model of ovarian cancer, administered alone or in combination with ibuprofen, a nonselective cyclooxygenase inhibitor. *Med Oncol* 2009;26(2):170-7.
16. Shen W, Zhang X, Du R, Gao W, Wang J, Bao Y, et al. Ibuprofen mediates histone modification to diminish

- cancer cell stemness properties via a COX2-dependent manner. *Br J Cancer* 2020;123(5):730-41.
17. Soriano-Hernandez AD, Madrigal-Pérez D, Galvan-Salazar HR, Martinez-Fierro ML, Valdez-Velazquez LL, Espinoza-Gómez F, et al. Anti-inflammatory drugs and uterine cervical cancer cells: Antineoplastic effect of meclufenamic acid. *Oncol Lett* 2015;10(4):2574-8.
  18. Wang J, Wu Y, Guo J, Fei X, Yu L, Ma S. Adipocyte-derived exosomes promote lung cancer metastasis by increasing MMP9 activity via transferring MMP3 to lung cancer cells. *Oncotarget* 2017;8(47):81880.
  19. Kashefi S, Ahmadi H, Omranipour R, Mahmoodzadeh H, Jafarnejhad-Ansariha F, Zavareh FT, et al. The anti-tumoral effect of  $\beta$ -D-mannuronic acid (M2000) as a novel NSAID on Treg cells frequency and MMP-2, MMP-9, CCL22 and TGF $\beta$ 1 gene expression in pre-surgical breast cancer patients. *Iran J Allergy Asthma* 2019; 18(1): 80 – 90.
  20. Tsai WC, Hsu CC, Chang HN, Lin YC, Lin MS, Pang JH. Ibuprofen upregulates expressions of matrix metalloproteinase-1,-8,-9, and-13 without affecting expressions of types I and III collagen in tendon cells. *J Orthop Res* 2010;28(4):487-91.
  21. Sakonlaya D, Tapanadechopone P, Poomkokruk A, Charoenvilaisiri S. Do NSAID's Inhibit growth of precancerous cervical cells in vitro. *J Med Assoc Thai* 2012;95(Suppl 1):S65-73.

# EVALUATION OF THE EFFECTS OF IBUPROFEN CYTOTOXIC DOSE ON EXPRESSION LEVEL OF EXTRACELLULAR MATRIX DEGRADING MMP-9 AND ANTI-METASTASIS NM23 GENES IN CERVICAL CANCER CELLS

Elnaz Ghadiri<sup>1</sup>, Rahim Ahmadi<sup>2,3\*</sup>, Mozhdeh Lashani<sup>4</sup>

Received: 27 July, 2021; Accepted: 13 March, 2022

## Abstract

**Background & Aim:** Although studies have shown that ibuprofen has anticancer effects on many cancer cells, the mechanism of the ibuprofen anticancer effect in cancer cells is not still well understood. The aim of this study was to investigate the effect of cytotoxic concentration of ibuprofen on the expression level of MMP-9 and NM23 genes in cervical cancer cells.

**Materials & Methods:** During this experimental-laboratory study, cervical cancer (Hela) cell line was purchased from Pasteur Institute. The cells were divided into groups treated with 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 mg/ml of ibuprofen and control (untreated) group. Cell viability was measured by MTT assay and the expression level of MMP-9 and NM23 genes was evaluated using RT-PCR technique. Data were analyzed using one-way ANOVA.

**Results:** 1 and 10 mg / ml of ibuprofen significantly reduced cell viability in Hela cancer cells (P <0.05 and P <0.001, respectively). 1 mg / ml of ibuprofen had no significant effect on MMP-9 gene expression level, however, significantly decreased NM23 gene expression level (P <0.001).

**Conclusion:** Although lower concentrations of ibuprofen have no cytotoxic effects on cervical cancer cells, higher concentrations can reduce viability in cervical cancer cells. High concentration of ibuprofen did not affect the expression level of extracellular matrix degrading (MMP-9) gene, however, it may increase the metastatic potential of cervical cancer cells by reducing the expression level of NM23 anti-metastatic gene.

**Keywords:** Ibuprofen, Survival, MMP-9, NM23, Cervical Cancer

**Address:** Department of Biology, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran. AIC, Budapest, Hungary

**Tel:** +989126120353

**E-mail:** drrahmadi@yahoo.com

SOURCE: STUD MED SCI 2022; 32(10): 772 ISSN: 2717-008X

Copyright © 2022 Studies in Medical Sciences

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

<sup>1</sup>MSc in Genetics, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran

<sup>2</sup>PhD in Physiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran (Corresponding Author)

<sup>3</sup>Avicenna International College, Budapest, Hungary

<sup>4</sup>MSc in Genetics, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Science and Art University, Yazd, Iran