

بررسی اثرات آپوپتوزی تولمتین بر سلولهای سرطانی معده

ساناز نوروزی^۱، رحیم احمدی^۲، مینو ایرانشاهی^۳

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات نشان داده‌اند که داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی بر تکثیر سلولهای سرطانی سیستم گوارشی تاثیرگذارند؛ گرچه مکانیسم سلولی و مولکولی اثرات داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی بر تکثیر سلولهای سرطانی سیستم گوارشی در موارد زیادی واضح و آشکار نیست. هدف از این مطالعه، بررسی اثر غلظت سیتوتوکسیک تولمتین بر بیان ژنهای BAX و BCL2 در سلولهای سرطانی معده (AGS) می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه‌ی تجربی-آزمایشگاهی سلولهای AGS از بانک انستیتوپاستور تهیه گردید و به گروه‌های شاهد و در مواجهه با غلظتهای مختلف تولمتین تقسیم‌بندی شدند. اثرات سیتوتوکسیک تولمتین از طریق سنجش MTT اندازه‌گیری گردید. با استفاده از واکنش چند زنجیره ای در زمان واقعی (Real-time PCR: Poly Chain Reaction) بیان نسبی ژنهای BAX و BCL2 نیز ارزیابی گردید. داده‌ها با استفاده از روش آماری آزمون واریانس یک‌طرفه بین گروه‌ها مقایسه شدند.

یافته‌ها: سطح بیان نسبی ژن ضد آپوپتوزی BCL2 در مقایسه با ژن آپوپتوزی BAX در سلولهای AGS دریافت‌کننده غلظت IC50 تولمتین دچار کاهش بیشتری شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که تولمتین می‌تواند با کاهش بیان ژن ضد آپوپتوزی BCL2 سبب القای مرگ سلولی در سلولهای AGS گردد. بر این اساس در نظر گرفتن تولمتین در درمان سرطان معده ممکن است حایز اهمیت باشد.

واژه‌های کلیدی: تولمتین، سلول سرطانی معده، آپوپتوز

دریافت مقاله: بهمن ۱۳۹۸
پذیرش مقاله: اردیبهشت ۱۳۹۹

* نویسنده مسئول:

رحیم احمدی؛
دانشگاه آزاد اسلامی همدان

Email :
drrahmadi@yahoo.com

- ۱ کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- ۲ استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران
- ۳ پزشک داروساز، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مقدمه

سرطان‌های گوارشی دومین سرطان‌های رایج در سراسر جهان بوده و سالانه ۹۰۰ هزار نفر بر آمار مبتلایان به این بیماری افزوده می‌شود (۱). طبق نتایج گزارش‌یافته از سوی سازمان بهداشت جهانی، سرطان معده در ایران شایع‌ترین نوع بدخیمی در آقایان و سومین نوع نئوپلاسم تشخیص داده شده در بانوان است (۲). از جمله عواملی که با افزایش ریسک ابتلا به سرطان گوارشی مرتبط است می‌توان به عفونت هلیکوباکتر، مصرف دخانیات، الکل، چاقی و هم‌چنین سابقه‌ی خانوادگی در بروز این نوع سرطان اشاره نمود (۱). تحریک‌کننده‌های بیولوژیکی و شیمیایی در ارتباط با بروز آسیب‌های مختلفی در بافت‌های بدن بوده و بررسی‌ها نشان داده که تحریک مزمن بافتی با خطر ابتلا به سرطان، در ارتباط است.

در سال‌های گذشته مطالعات بسیاری در خصوص نقش سیکلواکسیژنازها در بروز سرطان معده صورت گرفته است (۳). آنزیم سیکلواکسیژناز با دو ایزوفرم COX1 و COX2 به‌عنوان کاتالیزور اصلی در مسیر ساخت پروستاگلاندین‌ها و ترومبوکسان‌ها از آراشیدونیک اسید، شناسایی شده و مطالعات نشان داد که به دنبال پاسخ به یک محرک التهابی بیان سیکلواکسیژنازها افزایش می‌یابد. مهارکننده‌های آنزیم سیکلواکسیژناز شناخته شده تا به امروز، بر خلاف ساختارهای متفاوت، اثرات درمانی یکسانی دارند و بنابراین همگی در دسته داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی قرار گرفته‌اند (۴). دیکلوفناک، اتودولاک، ایندومتاسین، کتورولاک، نابومتون، سولینداک و تولمتین از جمله «داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی» (NSAID: Non-Steroid Ant-inflammatory Drugs) بوده (۵) که در درمان بیماری‌های التهابی به‌کار می‌روند (۶). مهارکننده‌های آنزیم سیکلواکسیژناز، بر مرگ سلولی (آپوپتوز) با ایجاد تعادل بین فاکتورهای تحریک‌کننده و مهارکننده تاثیر می‌نهند. پروتئین‌های بسیاری نیز در مسیر تنظیم آپوپتوز نقش داشته و از جمله مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به BCL2 و BAX اشاره نمود که پس از تشکیل آپوپتوزوم نقش کلیدی در فعال‌سازی آنزیم‌های کاسپاز و القای آپوپتوز ایفا می‌کنند (۷).

بررسی‌ها نشان داده که NSAID ها بر سرطان‌های مختلف از

جمله کولون (۷)، سلول‌های سنگفرشی سر و گردن، پستان (۸) و نیز معده (۳) موثر واقع شده‌اند. هم‌چنین عفونت هلیکوباکتری به‌عنوان اصلی‌ترین عامل بروز سرطان معده با افزایش بیان ژن آنزیم سازنده‌ی سیکلواکسیژناز ۲ منجر به متاپلازی و کارسینومای معده می‌شود (۹). سیکلواکسیژنازها در بافت‌های طبیعی موکوس کولون در سطح بسیار کمی بیان می‌شوند؛ اما در پنجاه درصد آدنوماها و هشتاد درصد کارسینوماهای کولون، بیان بالای سیکلواکسیژناز در سطح mRNA و پروتئین مشاهده شده است. در واقع استفاده‌ی منظم از NSAID ها، باعث کاهش پنجاه درصدی خطر ابتلا به سرطان کولون، کاهش تعداد و اندازه پولیپ‌های کولونی در بیماران مبتلا به پولیپوز فامیلی (FAP: Familial Adenomatous Polyposis) و نیز کاهش درد در بیماران می‌شود (۱۰). به‌علاوه، بیان بالای COX2 باعث افزایش سطح پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک BCL2 و نیز مقاومت سلول‌های پوششی روده به آپوپتوز شده (۱۱) و عدم افزایش بیان BAX را سبب می‌شود (۱۲). هم‌چنین مهارکننده‌های اختصاصی آنزیم COX2 می‌توانند سیکل سلولی را در مرحله «توقف دوم میتوز» (G2/M) متوقف ساخته و به القای آپوپتوز کمک نمایند (۱۳). از سویی دیگر، مطالعات نشان داده‌اند که غلظت موثر NSAID ها به‌منظور مهار رشد سلولی، در حدود ۱۰۰ برابر غلظتی است که برای مهار COX2 نیاز است (۱۴) و مهار غیراختصاصی آنزیم سیکلواکسیژناز در طولانی‌مدت و دوزهای بالا، منجر به بروز اختلالات گوارشی و آسیب‌های کلیوی خواهد شد. به‌علاوه تجویز مهارکننده‌های اختصاصی سیکلواکسیژناز ۲، بروز بیشتر عوارض ترومبوتیک قلبی و عروقی را در پی دارد (۵).

گرچه بر خلاف بسیاری از مطالعات، برخی پژوهش‌ها نشانگر آنند که NSAID ها اثرات ضدآپوپتوزی دارند (۱۶ و ۱۵). نتایج حاصل از بررسی‌های انجام شده در بیماران مبتلا به سرطان معده نیز حاکی از این است که تجویز دوزهای کم NSAID ها اثری بر کاهش مرگ و میر و یا افزایش بهبودی سرطان معده ندارد (۱۷ و ۱۸).

با توجه به شیوع گسترده‌ی سرطان معده در جهان (۱۹) و ایران (۲) و پیامدهای قابل توجه بالینی، اجتماعی و تحمیل هزینه‌های درمانی و نیز ضرورت بررسی اثرات داروهای مختلف به‌ویژه داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی بر تکوین یا مهار سلول‌های

بافری (PBS: Phosphate-Buffered Saline) و محیط کشت کامل (RPMI1641) حجم به ۱۰ میلی‌لیتر رسیده و حل شد. در ادامه به منظور بررسی اثرات سایتوتوکسیک تولمتین و نیز با توجه به تجربیات آزمایشگاهی قبلی محققان در بررسی اثرات داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی بر سلول‌های سرطانی، رقت‌های ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از محلول استوک تهیه شدند. سلول‌های تهیه شده در محیط کشت رشد کامل (RPMI1641) دارای سرم گاوی جنینی (FBS) ۱۰٪، آنتی‌بیوتیک‌های (پنی‌سیلین/استرپتومایسین) ۱٪، تحت اتمسفر ۹۵٪ هوا و دی‌اکسیدکربن ۵٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد یافتند. جهت بررسی سایتوتوکسیسیته‌ی تولمتین در سلول‌های سرطان معده، از ارزیابی MTT به‌منظور تعیین IC50 استفاده شد. در این راستا سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ چاهک حاوی محیط کشت مناسب با تراکم cells/cm2 ۱۰۰۰۰ کاشته شده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از ۲۴ ساعت محیط خارج شده و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۰/۵ mg/well در تاریکی به پلیت‌ها اضافه شده و به مدت ۴ ساعت داخل انکوباتور قرار داده شد. سپس محیط رویی چاهک‌ها با سمپلر برداشته شده و ۱۰۰ میکرولیتر ماده ایزوپروپانول به چاهک‌ها اضافه شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شده و در نهایت میزان شدت رنگ حاصل توسط دستگاه ELISA READER (DNM9602G) در طول موج ۵۷۱ نانومتر قرائت گردید. RNA توتال با استفاده از کیت Transgen Biotech ER101-01 استخراج شده و متعاقباً توسط کیت Transgen Biotech AE301-02، رونویسی معکوس شد.

سرطانی در محیط کشت سلولی و با توجه به نتایج ضد و نقیض مطالعات قبلی در خصوص اثر سایتوتوکسیک داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی و مهارکننده‌های سیکلو‌اکسیژناز بر سلول‌های سرطانی (۱۸ و ۱۶ و ۱۵ و ۱۲ و ۱۰ و ۸ و ۷ و ۳) و از سویی با توجه به امکان کاربرد داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی در بهبود برخی بیماریهای سرطانی و نیز نامکشوف بودن بخشی از اثرات سلولی و مولکولی این دسته دارویی بر سلول‌های سرطانی و همچنین از آنجاکه مطالعات در خصوص اثرات تولمتین (به‌عنوان یک مهارکننده سیکلو‌اکسیژناز) بر سلول‌های سرطانی به ویژه سلول‌های سرطانی معده بسیار محدود است؛ بر این اساس، تحقیق حاضر به‌منظور دست‌یابی به مکانیسم سلولی اثرات تولمتین بر سلول‌های سرطانی معده به بررسی اثرات تولمتین بر آپوپتوز و بیان ژنهای آپوپتوزی و ضدآپوپتوزی در این سلول‌ها در محیط کشت سلولی پرداخته است.

روش بررسی

طی این تحقیق تجربی آزمایشگاهی، سلول‌های سرطانی معده (AGS) از بانک سلولی مولکولی انیستیتوی پاستور تهیه و در شرایط استاندارد و استریل نگهداری شدند. سلول‌های سرطان معده به دو گروه شاهد و دریافت‌کننده تولمتین تقسیم شدند که گروه شاهد تحت هیچ‌گونه تیماری قرار نگرفت و سلول‌های گروه تجربی تولمتین با دوزهای متفاوتی را دریافت نمودند. دارو به‌صورت پودر خالص یک گرمی از شرکت دارویی سیگما تهیه شده و با استفاده از ۱ میلی‌لیتر محلول نمک فسفات با خاصیت

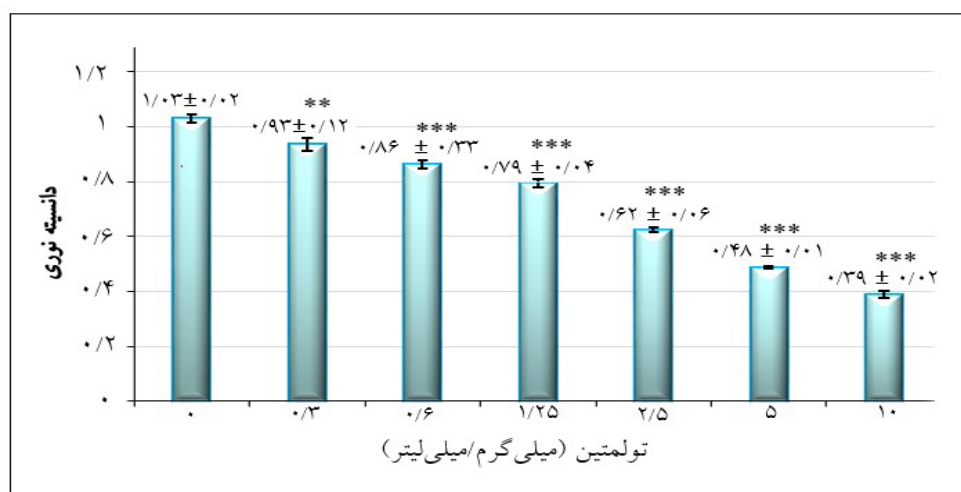
جدول ۱: پرایمر ژنهای Bax، Bcl-2 و GAPDH

Gene	Primer	
Bcl-2	F	5'-TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC-3'
	R	5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAG-3'
Bax	F	5'-TTGCTTCAGGGTTTCATCCAG-3'
	R	5'-AGCTTCTTGGTGACGCATC-3'
GAPDH	F	5'- CCCACTCCTCCACCTTTGAC -3'
	R	5'- CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA -3'

یافته‌ها

در ادامه، جهت ارزیابی بیان ژنی از طریق Real Time PCR پرایمرهای مخصوص ژن‌های BAX و BCL2 استفاده گردید (جدول ۱). در نهایت جهت بررسی‌های آماری ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف توزیع طبیعی داده‌ها بررسی شد و پس از حصول اطمینان از طبیعی بودن توزیع داده‌ها، آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی با استفاده از نرم افزار SPSS استفاده گردید. اختلاف بین گروه‌ها در سطح $\alpha < 0/05$ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج این تحقیق نشان داد که زنده‌مانی سلولی AGS، در گروه دریافت‌کننده‌ی ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تولمتین نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. ازسویی، اثر سیتوتوکسیک تولمتین بر سلول‌های سرطانی معده وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت تولمتین زنده‌مانی سلول‌ها به‌طور معناداری دچار کاهش گردید (نمودار ۱). همچنین دوز IC50 تولمتین با استفاده از روش رگرسیون غیرخطی اندازه‌گیری شد و غلظت IC50 تولمتین برابر ۳/۳۶ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تعیین گردید.

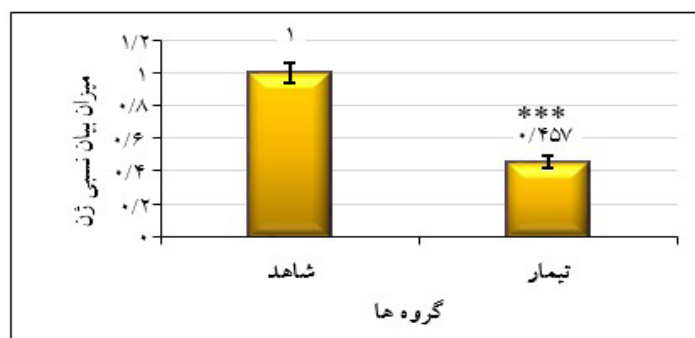


*** و ** به ترتیب با $P < 0/05$ و $P < 0/001$ نشانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه شاهد (غلظت صفر) است.

نمودار ۱: مقایسه‌ی اثرات غلظت‌های مختلف داروی تولمتین بر زنده‌مانی سلول‌های سرطانی معده

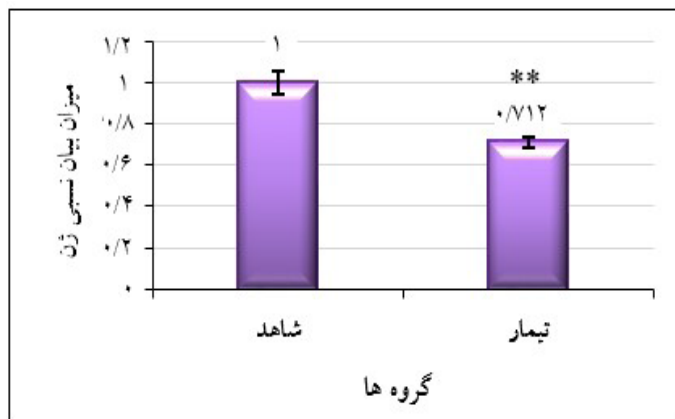
BAX در سلول‌های سرطانی معده تیمار شده با دوز IC50 تولمتین دچار کاهش معناداری نسبت به گروه شاهد شد (نمودار ۳ و ۲).

در نمودار ۱ میزان دانسیته نوری به‌صورت مستقیم متناسب با میزان زنده‌مانی سلول‌ها می‌باشد. از طرفی نتایج نشان داد که میزان بیان نسبی ژن BCL2 و



*** بیانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه شاهد است ($P < 0/001$).

نمودار ۲: مقایسه‌ی اثرات داروی تولمتین بر سطح بیان نسبی ژن BCL2 در رده‌ی سلولی AGS



** بیانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه شاهد است ($P < 0.05$).

نمودار ۳: مقایسه‌ی اثرات داروی تولمتین بر سطح بیان نسبی ژن BAX در رده‌ی سلولی AGS

NSAID ها می‌توانند از طریق کاهش بیان ژن BCL2 منجر به القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شوند (۲۳). مطالعات متعدد اپیدمیولوژی، کلینیکی و آزمایشگاهی بر این موضوع اشاره دارند که داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی از پیشرفت و گسترش تعدادی از تومورها جلوگیری کرده و استفاده‌ی طولانی‌مدت آن‌ها با کاهش خطر سرطانه‌ی پروستات، کولون، پستان و ریه همراه است (۲۴ و ۲۵). اثر حفاظتی داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی در سرطان‌های گوارشی از جمله سرطان کولون در مطالعات حیوانی نیز بررسی شده و مشاهده شده است که استفاده از NSAID ها خطر ابتلا به سرطان کولون و مری را کاهش داده (۲۶) و رگ‌زایی تومور، رشد تومور و متاستاز را کاهش می‌دهد (۲۷). مطالعات انجام یافته در مورد اثرات ضدسرطانی تولمتین بسیار محدود است. تجارب آزمایشی محدودی نشان می‌دهند که این دارو در فرم سنتزی خود می‌تواند سبب القای آپوپتوز در برخی سلول‌های سرطانی گوارشی گردد. در این راستا، تولمتین می‌تواند بر پروتئین‌های بسیاری که در مسیر تنظیم آپوپتوز نقش دارند و نیز در فعال‌سازی آنزیم‌های کاسپاز و القای آپوپتوز موثر باشد (۷).

گرچه برخی تحقیقات نشانگر آنند که داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی ممکن است تاثیر ضدسرطانی نداشته یا در مواردی خود سبب القای سرطان گردند. نتایج بررسی انجام شده بر روی بیماران مبتلا به سرطان تخمدان، مری و معده حاکی از این است که تجویز دوزهای کم NSAID ها اثری مبنی بر کاهش مرگ‌ومیر و یا افزایش بهبودی بیماران را در پی نداشته است (۱۷ و ۱۸). هم‌چنین برخی NSAID ها ممکن است

در مقایسه‌ی میزان کاهش بیان نسبی ژن BCL2 نسبت به ژن BAX، نتایج نشانگر آن بود که ژن ضد آپوپتوزی BCL2 نسبت به ژن آپوپتوزی BAX دچار کاهش بیشتری (با نسبت ۶۳ درصد) گردید ($P < 0.01$). از این نظر می‌توان گفت که اثرات سیتوتوکسیک تولمتین بر سلول‌های سرطانی معده از طریق کاهش بیان ژن ضد آپوپتوزی BCL2 اعمال گردیده است.

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که تولمتین می‌تواند با اثرگذاری بر ژن‌های مرتبط با آپوپتوز از جمله کاهش قابل توجه بیان ژن ضد آپوپتوزی BCL2 سبب القای مرگ سلولی در سلول‌های AGS گردد. از طرفی، برخلاف انتظار بیان نسبی ژن BAX نیز دچار کاهش معناداری گردید. این امر نشانگر آن بود که تولمتین اثرات آپوپتوزی خود بر سلول‌های سرطانی معده را از طریق کاهش سطح بیان ژن BCL2 و نه افزایش سطح بیان ژن BAX اعمال می‌نماید. موافق با این یافته، مطالعات دیگر نیز نشان می‌دهند که برخی داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی ضمن توقف سیکل سلولی در مرحله‌ی ورود G2/M، موجب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شده و با مهار بروز پاسخ التهابی به‌صورت هم‌زمان، نقش بسزایی در درمان سرطان دارند (۲۰ و ۱۳). هم‌چنین، نتایج تحقیقات در خصوص اثرات ضدسرطانی داروهای NSAID بیانگر آن است که به دنبال تجویز طولانی‌مدت برخی داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی، بروز سرطان‌های گوارشی در افراد به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد (۲۲-۲۰). به‌علاوه، یک مطالعه‌ی کاملا موافق با نتایج تحقیق حاضر نشان داد که



اثرات حفاظتی در مقابل مرگ سلولی القا نمایند (۱۶ و ۱۵).

این مطالعه در حیطه‌ی بررسی اثرات غلظت سیتوتوکسیک تولمتین بر بیان ژن‌های BAX و BCL2 در سلول‌های سرطانی معده AGS در محیط کشت سلولی انجام گرفته است و تفسیر نتایج تنها در حیطه‌ی موضوع فوق امکان‌پذیر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که داروی تولمتین دارای اثرات سایتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی معده بوده و بخشی از این اثر از طریق کاهش سطح بیان نسبی ژن ضد آپوپتوزی BCL2 اعمال می‌گردد. پژوهش بیشتر در خصوص اثرات تولمتین بر بیان ژنها، آنزیم‌ها و

منابع

پروتئین‌های درگیر در مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز می‌تواند در شناسایی مکانیسم سلولی و مولکولی اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی معده مکمل تحقیق حاضر باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد با کد شناسایی ۲۸۳۳۰۵۰۳۹۶۲۰۰۲ مصوب ۱۳۹۶/۱۱/۲۸ دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق می‌باشد. بدین وسیله از همکاران آزمایشگاه بیوتکنولوژی جاوید که در اجرای این تحقیق یاریگر محققان این پژوهش بوده‌اند، تقدیر و تشکر می‌نماییم.

1. Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND & Kamangar F. Gastric cancer: Descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2014; 23(5): 700-13.
2. Beard JR, Officer A, De Carvalho IA, Sadana R, Pot AM, Michel JP, et al. The world report on ageing and health: A policy framework for healthy ageing. *The Lancet* 2016; 387(10033): 2145-54
3. Wessler S, Krisch LM, Elmer DP & Aberger F. From inflammation to gastric cancer—the importance of Hedgehog/GLI signaling in *Helicobacter pylori*-induced chronic inflammatory and neoplastic diseases. *Cell Communication and Signaling* 2017; 15(1): 1-3.
4. Consalvi S, Biava M & Poce G. Cox inhibitors: A patent review(2011–2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2015; 25(12): 1357-71.
5. Mason L, Moore RA, Edwards JE, Derry S & McQuay HJ. Topical NSAIDs for chronic musculoskeletal pain: Systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2004; 5(1): 1-8.
6. Ramadan AA, Elbakry AM, Esmaeil AH & Khaleel SA. Pharmaceutical and pharmacokinetic evaluation of novel rectal mucoadhesive hydrogels containing tolmetin sodium. *Journal of Pharmaceutical Investigation* 2018; 48(6): 673-83.
7. Kucukguzel SG, Koç D, Cıkla Suzgun P, Ozsavcı D, Bingol Ozakpınar O, Mega Tiber P, et al. Synthesis of tolmetin hydrazide–hydrazones and discovery of a potent apoptosis inducer in colon cancer cells. *Archiv Der Pharmazie (Weinheim)* 2015; 348(10): 730-42.
8. Cai Y, Yousef A, Grandis JR & Johnson DE. NSAID therapy for PIK3CA-Altered Colorectal, Breast, and head and neck cancer. *Advances in Biological Regulation* 2019; 75(1): 100653.
9. Walduck AK, Weber M, Wunder C, Juettner S, Stolte M, Vieth M, et al. Identification of novel cyclooxygenase-2-dependent genes in *Helicobacter pylori* infection in vivo. *Molecular Cancer* 2009; 8(1): 22.
10. Roelofs HM, Te Morsche RH, van Heumen BW, Nagengast FM & Peters WH. Over-expression of Cox-2 mRNA in colorectal cancer. *BMC Gastroenterology* 2014; 14(1): 9005.
11. Peek RM. Prevention of colorectal cancer through the use of Cox-2 selective inhibitors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2004; 54(1): 50-6.

12. Dihlmann S, Siermann A & Von Knebel Doeberitz M. The nonsteroidal anti-inflammatory drugs aspirin and indomethacin attenuate β -catenin/TCF-4 signaling. *Oncogene* 2001; 20(5): 645-53.
13. Setiawati A. Celecoxib, a Cox-2 selective inhibitor, induces cell cycle arrest at the G2/M phase in HeLa cervical cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2016; 17(4): 1655-60.
14. Dihlmann S, Klein S & Von Knebel Doeberitz M. Reduction of β -catenin/T-cell transcription factor signaling by aspirin and indomethacin is caused by an increased stabilization of phosphorylated β -catenin. *Molecular cancer therapeutics* 2003; 2(6): 509-16.
15. Świątkiewicz M, Zaremba M, Joniec I, Członkowski A & Kurkowska Jastrzębska I. Potential neuroprotective effect of ibuprofen, insights from the mice model of Parkinson's disease. *Pharmacological reports: PR* 2013; 65(5): 1227-36.
16. Moore AH, Bigbee MJ, Boynton GE, Wakeham CM, Rosenheim HM, Staral CJ, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: Reconsidering the role of neuroinflammation. *Pharmaceuticals* 2010; 3(6): 1812-41.
17. Spence AD, Busby J, Johnston BT, Baron JA, Hughes CM, Coleman HG, et al. Low-dose aspirin use does not increase survival in 2 independent population-based cohorts of patients with esophageal or gastric cancer. *Gastroenterology* 2018; 154(4): 849-60.
18. Verdoodt F, Dehlendorff C, Friis S & Kjaer SK. Non-aspirin NSAID use and ovarian cancer mortality. *Gynecologic Oncology* 2018; 150(2): 331-7.
19. Hongo M, Nagasaki Y & Shoji T. Epidemiology of esophageal cancer: Orient to Occident. Effects of chronology, geography and ethnicity. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2009; 24(5): 729-35.
20. Gao X, Grignon DJ, Chbihi T, Zacharek A, Chen YQ, Sakr W, et al. Elevated 12-lipoxygenase mRNA expression correlates with advanced stage and poor differentiation of human prostate cancer. *Urology* 1995; 46(2): 227-37.
21. Gupta RA & DuBois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nature Reviews Cancer* 2001; 1(1): 11-21.
22. Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B & Kinzler KW. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; 95(2): 681-6.
23. Bank A, Yu J & Zhang L. NSAIDs downregulate Bcl-XL and dissociate BAX and Bcl-XL to induce apoptosis in colon cancer cells. *Nutrition and Cancer* 2008; 60(1): 98-103.
24. Pountos I, Georgouli T, Bird H & Giannoudis PV. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Prostaglandins, indications, and side effects. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research* 2011; 3(1): 19-27.
25. Hung WC. Anti-metastatic action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 2008; 24(8): 392-7.
26. Ratnasinghe D, Tangrea J, Roth MJ, Dawsey S, Hu N, Anver M, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human squamous cell carcinoma of the esophagus; An immunohistochemical survey. *Anticancer Research* 1999; 19(1): 171-4.
27. Yao M, Zhou W, Sangha S, Albert A, Chang AJ, Liu TC, et al. Effects of nonselective cyclooxygenase inhibition with low-dose ibuprofen on tumor growth, angiogenesis, metastasis, and survival in a mouse model of colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 2005; 11(4): 1618-28.

The Apoptotic Effects of Tolmetin on Human Gastric Cancer Cells

Sanaz Noroozi¹ (M.S.) - Rahim Ahmadi² (Ph.D.) - Minoo Iranshahi³ (Pharm.D.)

1 Master of Science in Genetics, Faculty of Basic Sciences, Eastern Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2 Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran

3 Pharmacist, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Received: Jan 2019

Accepted: Apr 2020

Background and Aim: Studies have shown that non-steroid anti-inflammatory drugs have an effect on cancer cells of digestive system, however, the cellular and molecular mechanism of the non-steroidal anti-inflammatory drugs and their effects on the proliferation of gastrointestinal cancer cells is unclear in many cases. The aim of this study was to investigate the effects of cytotoxic dose of tolmetin on BAX and BCL2 genes expression level in gastric cancer cells (AGS).

Materials and Methods: In this laboratory-experimental study, AGS cells were purchased from Pasture institute and divided into control group and groups exposed to different concentrations of tolmetin. MTT assay was used to measure cytotoxic effects of tolmetin. Real-time PCR was used to evaluate BAX and BCL2 genes expression levels. The data were statistically analyzed between groups using ANOVA.

Results: Higher decrease in relative expression level of anti-apoptotic BCL2 was observed than expression level of apoptotic BAX gene in AGS cells exposed to IC50 concentration of tolmetin.

Conclusion: The results of this study indicated that tolmetin can induce apoptosis in gastric cancer cells by decreasing of anti-apoptotic BCL2 gene expression level. Therefore, consideration might be given to tolmetin in treatment of gastric cancer.

Keywords: Tolmetin, Gastric Cancer Cell, Apoptosis

* Corresponding Author:
Ahmadi R
Email :
drrahmadi@yahoo.com