



بررسی اثرات آسپیرین بر سطح بیان ژن‌های BAX، Bcl-2 و iNOS در رده سلولی سرطانی Hela

ساره بیاتانی: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران

رحیم احمدی: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران و کالج بین المللی اویسینا، بوداپست، مجارستان (* نویسنده مسئول)

drrahmadi@yahoo.com

نیکا غلامرضایی: گروه بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

آسپیرین،

ژن Bax،

ژن Bcl-2،

ژن iNOS،

رده سلولی Hela

زمینه و هدف: مطالعات نشان داده اند که آسپیرین دارای اثرات ضد سرطانی بر سلول‌های سرطانی می‌باشد. گرچه یافته‌های پژوهشی بیانگر اثرات ضد سرطانی آسپیرین می‌باشند، اما اثر مهار آسپیرین بر سلول‌های سرطانی هنوز نیز چالش برانگیز است. مطالعه حاضر به بررسی اثرات سیتوتوکسیک آسپیرین بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم و بیان ژن‌های BAX، Bcl-2 و iNOS پرداخته است.

روش کار: طی این تحقیق تجربی- آزمایشگاهی، رده سلولی سرطانی دهانه رحم از انستیتو پاستور خریداری شد و سلول‌ها به گروه‌های تیمار شده با آسپیرین در غلظت‌های ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نیز گروه کنترل (عدم تیمار) تقسیم‌بندی شدند. زنده ماندن سلول‌ها به کمک روش سنجش MTT اندازه‌گیری شد و سطح بیان ژن‌های BAX، Bcl-2، iNOS با کمک تکنیک RT-qPCR ارزیابی گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری واریانس یک طرفه آنالیز شدند.

یافته‌ها: غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر آسپیرین سبب کاهش معنادار زنده‌مانی سلول‌ها گردید (به ترتیب $p < 0/05$ و $p < 0/001$). دوز ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر آسپیرین سبب افزایش نسبت BAX/Bcl-2 (۳/۱۸) و سطح بیان ژن iNOS (۰/۰۵) ($p < 0/001$) در سلول‌های Hela شد.

نتیجه‌گیری: غلظت‌های پایین آسپیرین دارای اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم نبوده، اما غلظت‌های بالاتر اثرات سیتوتوکسیک داشته و می‌توانند احتمالاً سبب آپوپتوز وابسته به BAX و نیتریک اکساید در سلول‌های سرطانی دهانه رحم شوند. در مجموع به نظر می‌آید آسپیرین با دوز مصرفی فارماکولوژیک اثرات ضد سرطانی بر سرطان دهانه رحم نخواهد داشت.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Bayatani S, Ahmadi R, Gholamrezaei N. The Effects of Aspirin on Bax, Bcl-2 and iNOS Expression Level in Hela Cancer Cell Line. Razi J Med Sci. 2023;29(11):24-33.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

The Effects of Aspirin on Bax, Bcl-2 and iNOS Expression Level in Hela Cancer Cell Line

Sareh Bayatani: Department of Physiology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran

Rahim Ahmadi: Department of Physiology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran and Avicenna International College, Budapest, Hungary (* Corresponding author) drrahmadi@yahoo.com

Nika Gholamrezaei: Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Abstract

Background & Aims: Cervical cancer develops in female cervix. 99% of cervical cancer cases are linked to infection with high-risk human papillomaviruses (HPV). Cervical cancer is the fourth most common cancer in women. Effective primary (HPV vaccination) and secondary prevention approaches can prevent most cervical cancer cases. The treatment of cervical cancer varies worldwide. Radiation may be used in all stages where surgical options do not exist. In addition, chemotherapy can be used to treat cervical cancer, and has been found to be more effective than radiation alone. However, prevention methods are very important to be considered to overcome the soaring incidence of cervical cancers (1,2). Nonsteroidal anti-inflammatory agents (NSAIDs) are a group of medicines that relieve pain and fever and reduce inflammation. They work by blocking a specific group of enzymes called cyclo-oxygenase enzymes (COX enzymes) leading to reducing of prostaglandins production. Aspirin, also known as acetylsalicylic acid (ASA), is an NSAID used to reduce pain, fever, or inflammation. Aspirin is also used long-term to help prevent further heart attacks, ischaemic strokes, and blood clots in people at high risk. Aspirin decomposes rapidly in some chemical solutions including ammonium acetate or the acetates. Aspirin's ability to suppress the production of prostaglandins and thromboxanes is due to its irreversible inactivation of the cyclooxygenase enzyme required for prostaglandin synthesis. Aspirin also uncouples oxidative phosphorylation in certain tissues mitochondria, by diffusing from the inner membrane space as a proton carrier back into the mitochondrial matrix, where it ionizes once again to release protons. There is evidence that has shown that aspirin as a chemoprotective agent may reduce overall cancer incidence and mortality in colorectal, esophageal and gastric cancers with smaller effects on prostate, breast and lung cancer. Research has shown that NSAIDs such as aspirin play a role in preventing cancer development in a variety of organs including colon, pancreas, stomach, uterus and esophagus (3,4). *In vitro* and *in vivo* studies have revealed that NSAIDs have significant inhibitory effects on a variety of tumors, including gastrointestinal tumors and tumors of the reproductive system. Recent research suggest that NSAIDs have inhibitory effects on ovarian, breast, and cervical cancer cells *in vivo* and *in vitro* (5-10). Aspirin has been reported to have antitumor effects on reproductive cancer cells (11). However, contrary to research findings that confirm the anti-tumor effects of aspirin on cancer cells of the reproductive system, some research has shown that aspirin has no significant effects on cancer development. Some research results have not shown a significant association between aspirin and reduced endometrial and ovarian cancers (12, 13). Although many studies demonstrate the anti-cancer effects of aspirin, the inhibitory effect of aspirin on cancer cells are still challenging. The present study investigated the cytotoxic effects of aspirin on cervical cancer (Hela) cells *in vitro* and the effects of cytotoxic concentration

Keywords

Aspirin,
BAX gene,
Bcl-2 gene,
iNOS gene,
Hela cell line

Received: 17/12/2022

Published: 07/02/2023

of aspirin on expression level of apoptotic BAX, anti-apoptotic Bcl-2 and iNOS in cervical cancer cells.

Methods: In this experimental-laboratory study, cervical cancer cell line was purchased from Pasteur Institute and divided into aspirin-treated groups with 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 mg /ml, and control (untreated) group. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide) assay was used to determine cell viability through determination of mitochondrial function of cells by measuring activity of mitochondrial succinate dehydrogenase, during which, MTT is reduced to a purple formazan by NADH. The product was quantified by light absorbance at 570 nm. The expression levels of BAX, Bcl-2, iNOS genes were evaluated by Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) technique. Total RNAs were extracted with the high purity RNA extraction kit according to the manufacturer's instructions and reverse-transcribed into cDNAs. Then, real-time quantitative PCR was conducted to analyze Bax , Bcl-2, iNOS and GAPDH expression levels. The expression of genes was calculated based on $2^{-\Delta\Delta CT}$ method and was normalized to the loading control, GAPDH. Data were analyzed using one-way ANOVA.

Results: The results of the present study showed that cervical cancer (Hela) cell viability did not change significantly when exposed to 0.0001, 0.001, 0.01 and 0.1 of aspirin compared to control group. However, exposure of cervical cancer cells to 1 and 10 mg / ml of aspirin significantly reduced cell viability ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively). BAX, Bcl-2 and iNOS expression levels significantly increased in cervical cancer cells exposed to 1 mg/ml of aspirin. The BAX / Bcl-2 ratio was 3.18 showing the higher level of apoptotic BAX than anti-apoptotic Bcl-2 expression level.

Conclusion: The results of this study showed that lower concentrations of aspirin did not have cytotoxic effects on cervical cancer cells, but higher concentrations could induce BAX-dependent apoptosis by increasing the ratio of BAX to Bcl-2 expression level, and increasing the relative expression of Nitric oxide synthase gene. After binding to its receptor and triggering a chain of reactions, aspirin is thought to trigger the expression of apoptotic genes by acting on DNA and transcription. In this way, BAX in the mitochondrial membrane, after homodimerization and oligomerization, causes the opening of anion channels, and consequently the potential difference of the mitochondrial membrane changes. These channels release proteins and apoptotic factors such as cytochrome C into the cellular cytosol, and following this release, apoptosis occurs with the activation of caspase cascade. In this study, the cytotoxic concentration of aspirin, in addition to significantly increasing the expression of BAX apoptotic gene, unexpectedly increased Bcl-2 anti-apoptotic gene, but due to the very high ratio of BAX to Bcl-2, increased gene expression of anti-apoptotic Bcl-2 was not able to counteract the high level of BAX expression and thus the process of induction of apoptosis has occurred in cervical cancer cells. The results of this study showed that aspirin increases the expression level of iNOS gene, which in turn plays a role in apoptosis induction in cervical cancer cells. Conclusively, lower concentrations of aspirin (and physio-pharmacological doses) do not have significant anticancer effects on cervical cancer cells. However, further experimental, clinical and epidemiological studies are required to determine the exact anticancer effects of aspirin on the cervical cancer cells.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Bayatani S, Ahmadi R, Gholamrezaei N. The Effects of Aspirin on Bax, Bcl-2 and iNOS Expression Level in Hela Cancer Cell Line. *Razi J Med Sci.* 2023;29(11):24-33.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

مقدمه

سرطان دهانه رحم، چهارمین سرطان شایع در میان زنان است و ناشی از رشد غیر طبیعی و خارج از کنترل سلولهای می باشد که توانایی حمله یا گسترش به سایر قسمت‌های بدن را دارند. آلودگی به ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) از مهم ترین عواملی است که زمینه را برای ابتلا به سرطان دهانه رحم فراهم می کند. ضعف سیستم ایمنی، مصرف قرص های ضد بارداری، بارداری های متعدد و کشیدن سیگار نیز از دیگر عواملی هستند که فرد را مستعد ابتلا به این بیماری می کنند. در مراحل پیشرفته تر سرطان دهانه رحم، بیمار با نشانه هایی چون خونریزی غیرطبیعی واژن و درد لگن، مواجه می شود. تشخیص این بیماری به کمک بیوپسی از دهانه رحم صورت می پذیرد (۱،۲). نتایج تحقیقات نشان داده اند که داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی همچون آسپرین می توانند در پیشگیری یا درمان سرطان دهانه رحم مؤثر واقع شوند. آسپرین، ترکیبی از دسته ی داروهای غیر استرادیولی ضدالتهابی معروف به NSAIDs است که با نام علمی استیل سالیسیلیک اسید نیز شناخته می شود. این ترکیب از واکنش استریفیکاسیون سالیسیلیک اسید و استیک انیدرید حاصل می شود و با مهار فعالیت سیکلوژناز، مانع از سنتز پروستاگلندین ها می شود. تصور می شود این دارو علاوه بر کاهش درد، تب و التهاب، می تواند با القای آپوپتوز و بیان برخی ژن ها، اثرات ضد سرطانی قابل توجهی نیز داشته باشد (۳،۴).

یافته های متعددی بیانگر آنند که مصرف داروهای ضدالتهابی غیر استروئیدی، دارای اثرات مهاری قابل توجهی بر انواع مختلفی از سرطان ها از جمله سرطان های دستگاه گوارشی (چون سرطان کولون و پانکراس) و نیز سرطان های دستگاه تولید مثلی می باشند و مصرف آنها با کاهش قابل توجهی در میزان مرگ و میر ناشی از سرطان همراه است (۵-۷). پژوهش های اخیر نیز حاکی از آن است که مصرف داروهای ضدالتهابی غیر استروئیدی دارای اثرات مهاری بر سرطان های دستگاه تولید مثلی مانند سرطان تخمدان، سینه و همچنین سرطان دهانه رحم می باشند (۸-۱۰). در این بین، گفته می شود آسپرین که از یکی از داروهای خانواده NSAID ها است، می تواند دارای اثرات

ضد توموری قابل توجهی بر سلول های سرطانی دستگاه تولید مثل و به ویژه سلول های سرطانی دهانه رحم باشد (۱۱).

با این وجود، برخلاف یافته های تحقیقاتی که موید اثرات ضد توموری آسپرین بر سلول های سرطانی دستگاه تولید مثلی می باشند، برخی نتایج پژوهشی نشان داده اند که آسپرین اثرات قابل توجهی بر پیشگیری و درمان سرطان ندارد و در این راستا تحقیقات انجام یافته در خصوص سرطان های دستگاه تولید مثلی نشان داده است که یک رابطه قطعی میان مصرف آسپرین و کاهش سرطان آندومتر یا و تخمدان یافت نشده است. (۱۲ و ۱۳) از سوی دیگر بررسی های انجام یافته در مورد مضرات آسپرین، یافته ها بیانگر آن بودند که آسپرین، ریسک خونریزی های مغزی و نیز دستگاه گوارش را افزایش می دهد و مصرف آن می تواند عوارض جانبی قابل توجهی را برای مصرف کننده به همراه داشته باشد (۱۴ و ۱۵).

با توجه به شیوع گسترده سرطان رحم در جهان و عوارض گسترده بالینی، اجتماعی و تحمیل هزینه های درمانی ناشی از آن (۱۶) و همچنین با توجه به تحقیقات محدود در خصوص موضوع این پژوهش و نیز نتایج ضد و نقیض (۱۱-۱۳، ۱۷، ۱۸) در حوزه ی این تحقیق، پژوهش حاضر به بررسی اثرات دوزهای مختلف آسپرین بر زنده ماندن سلولی و سطح نسبی بیان ژن های BAX، Bcl-2 و iNOS در رده سلولی سرطانی Hela می پردازد. نتایج حاصل از این تحقیق دارای اهمیت ویژه ای در حوزه سرطان شناسی بوده و می تواند در ارتقاء روش های درمانی و پیشگیری از سرطان، به ویژه سرطان دهانه رحم، کاربرد داشته باشد.

روش کار

در طی این تحقیق تجربی-آزمایشگاهی، داروی مورد استفاده در این پژوهش (آسپرین) به صورت پودر خالص از شرکت معتبر دارویی امین سام تهیه شد و غلظت های ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۱ و ۱۰ میلی گرم/ میلی لیتر آماده گردید. به منظور تهیه این غلظت ها، به ۰/۱ گرم دارو، حلال PBS [شکر کت Sigma] افزوده گردید. سپس جهت استریل کردن دارو، محلول به دست آمده توسط فیلتر سرسرنگی، فیلتر شد و در

درصد زنده مانده سلول‌ها به دست آمد. $100 \times$ (میانگین جذب گروه کنترل / میانگین جذب گروه تست) = درصد زنده مانده سلول‌ها

بیان ژن‌ها با استفاده از تکنیک Real time qPCR انجام گرفت. بدین منظور 5×10^5 سلول در هر چاهک کشت داده شد. پس از کشت، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس محلول‌ها از چاهک خارج شده، به خانه گروه‌های کنترل و تیمار، محیط DMEM (شرکت Gibco, Invitrogen) و بافر FBS اضافه شد. همچنین گروه تیمار در معرض غلظت سیتوتوکسیک آسپیرین (۱ میلی گرم / میلی لیتر)، قرار گرفت. پلیت مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. در ادامه پس از انجام مراحل مختلف سانتریفیوژ و استخراج RNA، cDNA طبق کیت استاندارد تاکارا سنتز شد. تکنیک Real time qPCR به منظور تکثیر قطعه مد نظر 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 (جدول ۱) و cDNA افزوده گردید. در این سیستم، مولکول سایبرگرین برای مشاهده پیشرفت فرآیند 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 ژنها با استفاده از فرمول $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید.

داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار تحلیل آماری SPSS18 آنالیز شدند. نخست جهت اطمینان از

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 سانتی گراد نگهداری گردید. در این برنامه مطالعاتی، رده سلولی HeLa، به طور تصادفی به هفت گروه تقسیم بندی شد. از این هفت گروه، شش گروه تحت تاثیر داروی آسپیرین با دوزهای ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۱ و ۱۰ میلی گرم / میلی لیتر قرار گرفتند و یک گروه هم به عنوان شاهد (عدم مواجهه با دارو) در نظر گرفته شد.

در ادامه جهت بررسی اثرات سیتوتوکسیک آسپیرین، از روش سنجش MTT استفاده گردید. در این راستا، پس از کشت سلول به تعداد 1×10^4 و در نظر گرفتن محیط کشت کافی برای آن‌ها و همچنین در نظر گرفتن حداقل ۶ بار تکرار، غلظت‌های مختلف دارو به چاهک‌های حاوی سلول‌ها اضافه شده و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفتند. پس از سپری شدن یک روز، محیط و دارو خارج شده و رنگ MTT در تاریکی به پلیت‌ها اضافه شد و برای ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. در طی زمان انکوبا سیون MTT توسط سیستم سوکسینات دهیدروژناز احیا شد. سپس محیط رویی چاهک‌ها خارج گشت و DMSO [شرکت Sigma] جهت حل شدن کریستال‌های فورمازان به چاهک‌ها افزوده گردید. سپس به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه صورت گرفت و در نهایت میزان شدت رنگ حاصل در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر [شرکت BIOTEK] خوانده شد و بر اساس جذب نوری نمونه‌ها و با کمک از فرمول زیر،

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای هر ژن در واکنش‌های Real time qPCR

نام ژن	توالی پرایمر
Bax	Forward: TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC Reverse: CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAG
Bcl-2	Forward: TTGCTTCAGGGTTTCATCCAG Reverse: AGCTTCTGGTGGACGCATC
iNOS	Forward: CGCTACAACATCCTGGAG Reverse: ACATTCTGCTTCTGGAACTA
GAPDH	Forward: CGTCTGCCCTATCAACTTTCG Reverse: CGTTTCTCAGGCTCCCTCT

iNOS نشان داد که میانگین سطح نسبی بیان ژنی (RQ) هر سه ژن نام در مقایسه با گروه کنترل دچار افزایش معناداری شدند (نمودارهای ۲، ۳ و ۴). محاسبه نسبت بیان ژن BAX به Bcl-2 نشان داد این نسبت برابر ۳/۱۸ می باشد و بر این اساس سطح بیان ژن آپوپتوزی BAX نسبت به سطح بیان ژن ضد آپوپتوزی Bcl-2 بیش از سه برابر بود.

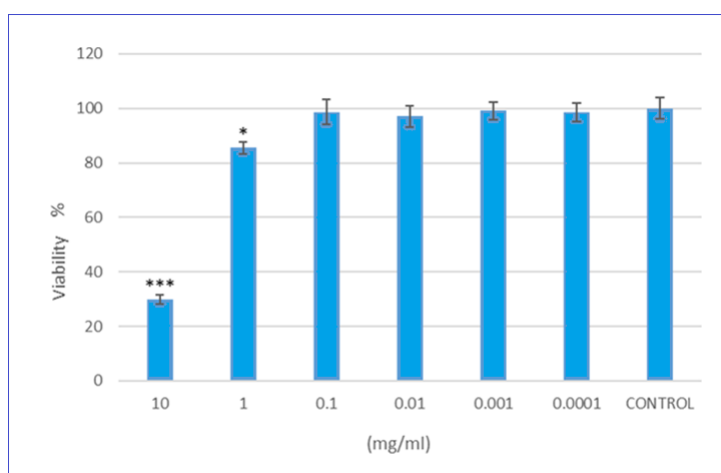
بحث

پژوهش‌های بسیاری حاکی از آنند که داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی به ویژه آسپرین، دارای اهمیت قابل توجهی در حوزه سرطان‌ها بخصوص سرطان دهانه رحم می باشند. نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که غلظتهای پایین آسپرین دارای اثرات سیتوتوکسیک بر

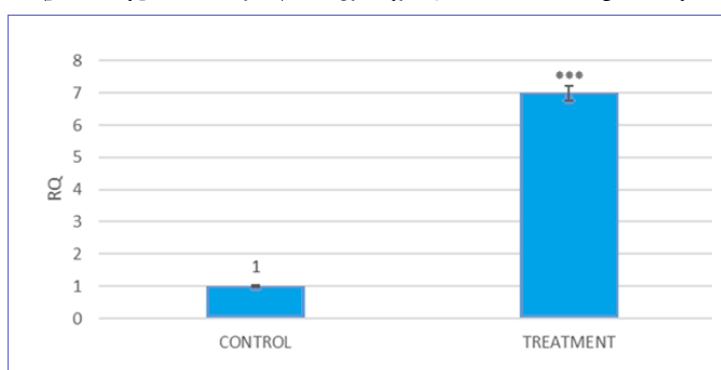
توزیع طبیعی داده‌ها از تست کولموگورف-اسمیرنوف استفاده شد. متعاقباً جهت مقایسه بین گروه‌ها، از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی (Tukey) استفاده گردید. سطح معنی داری در سطح $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

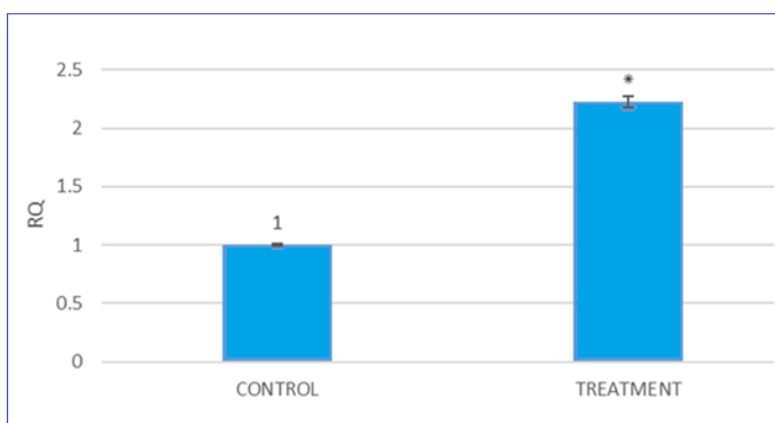
نتایج حاصل از بررسی اثرات آسپرین بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم نشان دادند که درصد زنده ماندن این سلول‌ها در مواجهه با غلظت‌های ۱۰ و ۱ میلی‌گرم / میلی لیتر، نسبت به گروه کنترل دچار کاهش معناداری شد (به ترتیب با $p < 0/001$ و $p < 0/05$) (نمودار ۱). نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت ۱ میلی‌گرم / میلی‌لیتر آسپرین بر بیان ژن‌های BAX، Bcl-2 و



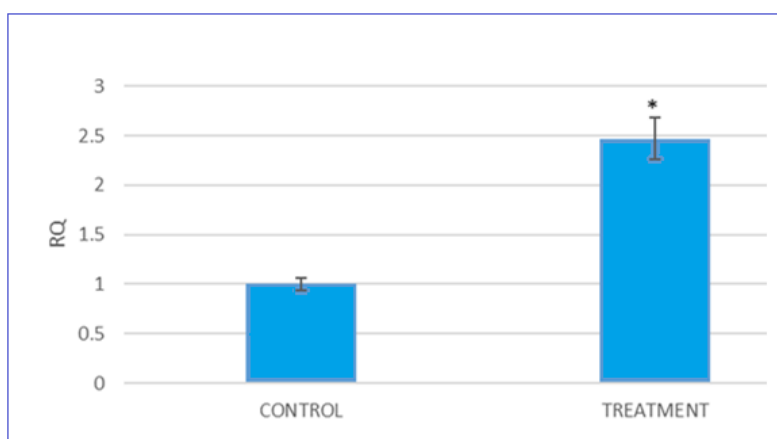
نمودار ۱- اثر غلظت‌های مختلف آسپرین بر حسب میلی‌گرم / میلی لیتر بر زنده ماندن سلول‌های HeLa در مقایسه با گروه کنترل. * و *** نشان دهنده‌ی اختلاف معنادار با گروه کنترل هستند (به ترتیب $p < 0/05$ و $p < 0/001$).



نمودار ۲- اثر دوز ۱ میلی‌گرم / میلی لیتر آسپرین بر بیان ژن BAX در مقایسه با گروه کنترل. RQ بیانگر میانگین سطح نسبی بیان ژنی است. علامت *** نشان دهنده اختلاف معنادار در مقایسه با گروه کنترل است ($p < 0/001$).



نمودار ۳- اثر دوز ۱ میلی گرم/ میلی لیتر آسپیرین بر بیان ژن Bcl-2 در مقایسه با گروه کنترل. RQ بیانگر میانگین سطح نسبی بیان ژنی است. علامت * نشان دهنده اختلاف معنادار در مقایسه با گروه کنترل است ($p < 0.05$).



نمودار ۴- اثر دوز ۱ میلی گرم/ میلی لیتر آسپیرین بر بیان ژن iNOS در مقایسه با گروه کنترل. RQ بیانگر میانگین سطح نسبی بیان ژنی است. علامت * نشان دهنده اختلاف معنادار در مقایسه با گروه کنترل است ($p < 0.05$).

۱/۲ به ۱۸/۹٪ تغییر کرده است (۱۹) که نشانگر اثر مهارى آسپیرین بر قدرت تکثیرى سلول‌هاى هدف بوده است. همچنین مطالعه‌اى انجام یافته در خصوص اثرات ضد سرطانى آسپیرین بر سلول‌هاى سرطانى دهانه رحم، حاکی از آن است که تقسیمات سلولى رده سلولى Hela پس از تیمار شدن با دوزهاى مختلف آسپیرین، به صورت وابسته به دوز متوقف گشته و درصد سلول‌هاى آپوپتوزى القا شده توسط آسپیرین، افزایش داشته است (۲۰). تحقیقات آزمایشگاهی دیگری نیز نشان می‌دهند که مصرف آسپیرین متاستاز سرطان سینه را کاهش می‌دهد و مرگ و میر ناشی از این سرطان را کم می‌کند (۲۲-۲۴). علاوه بر این یافته‌هاى پژوهشى نشان داده

سلول‌هاى سرطانى دهانه رحم نمى‌باشند و تنها غلظتهاى بالای آسپیرین می‌توانند سبب کاهش در صد زنده مانى سلول‌هاى سرطانى دهانه رحم شوند. موافق با این یافته تحقیقات دیگری نیز نشان داده‌اند که آسپیرین دارای اثرات سیتوتوکسیک قابل توجهی بر سلول‌هاى سرطانى دهانه رحم می‌باشد. در این راستا، نتایج حاصل از پژوهشى که به بررسی اثرات ضد سرطانى آسپیرین بر سلول‌هاى سرطانى دهانه رحم پرداخته است، بیانگر آن است آسپیرین با اثرات سیتوتوکسیک سبب مهار رشد و تکثیر سلول‌هاى سرطانى دهانه رحم شده است. در این پژوهش، جمعیت سلولى فاز sub-G1، پس از ۴۸ ساعت قرار گرفتن در معرض آسپیرین ۱ میلی مولار از

اند که ریسک ابتلا به سرطان‌های مختلفی مانند سرطان کولون و پانکراس با افزایش فرکانس مصرف هفتگی آسپیرین کاهش می‌یابد (۵ و ۶). گرچه نتایج این مطالعات شاهدهی بر اثرات ضد سرطانی داروی آسپیرین به عنوان یک NSAID می‌باشند، در مقابل، برخی یافته‌های پژوهشی نشان داده‌اند که داروهای ضدالتهابی غیر استروئیدی دارای اثرات مهارتی قابل توجهی بر سلول‌های سرطانی به ویژه سلول‌های سرطانی دستگاه تولید مثل نیستند. در این زمینه مطالعات صورت گرفته بیانگر آنند که ارتباط قابل توجهی میان مصرف NSAIDs و کاهش ریسک ابتلا به سرطان تخمدان وجود ندارد (۱۲). همچنین پژوهشی دیگر حاکی از آن است که ارتباط قابل ملاحظه‌ای بین مصرف NSAIDs و کاهش ریسک ابتلا به سرطان دهانه رحم یافت نشده است (۲۱). نتایج تحقیقی دیگر نیز نشان داده‌اند که میان مصرف آسپیرین و کم شدن ریسک سرطان آندومتر، ارتباط قابل ملاحظه‌ای وجود ندارد (۱۳). از طرفی نتایج تحقیق حاضر نشان دادند که دوزهای بسیار بالای آسپیرین اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم اعمال نموده‌اند که این دوزها احتمالاً می‌توانند اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های طبیعی بدن نیز داشته باشد. در این راستا مطالعات بیشتری مورد نیاز است تا اثرات سیتوتوکسیک آسپیرین بر سلول‌های سرطانی را در مقایسه با سلول‌های طبیعی مورد بررسی قرار دهد.

از سویی، محاسبه نسبت بیان ژن BAX به Bcl-2 در سلول‌های سرطانی دهانه رحم تیمار شده با آسپیرین نشان داد که سطح بیان ژن آپوپتوزی BAX نسبت به سطح بیان ژن ضد آپوپتوزی Bcl-2 بیش از سه برابر بود که می‌تواند نشانه‌ای از بروز آپوپتوز در این سلول‌ها باشد، گرچه اثبات بروز آپوپتوز نیاز به بررسی‌های بیشتری با استفاده از بلاتینگ یا فلوسایتومتری دارد. همسو با نتایج پژوهش حاضر که بیانگر احتمال القای آپوپتوز توسط آسپیرین در سلول‌های سرطانی دهانه رحم می‌باشد، مطالعات دیگری نیز نشان داده‌اند که NSAIDs با تحریر یک آپوپتوز نقش قابل توجهی در فعالیت ضد توموری دارند (۲۵). در این راستا مشاهده

شده است که NSAIDs آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی کولون تحریر می‌کنند (۲۶) و نیز با فعالسازی caspase-8/Bid و مسیره‌های BAX باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی معده می‌شوند (۲۷). در مطالعات دیگری نیز نشان داده شده است که آسپیرین می‌تواند با مهار فعالیت پروتوزوم، سلول را به آپوپتوز وادار نماید (۲۸). همچنین آسپیرین قادر است به کمک آزاد کردن سیتوکروم C منجر به فعالسازی کاسپاز و آپوپتوز گردد (۲۹، ۳۰). درباره مکانیسم احتمالی اثر آسپیرین بر بیان ژن‌های BAX و Bcl-2 با یاد گفت از آنجا که آنزیم COX-2 با کاهش میزان آراشیدونیک اسید آزاد داخل سلولی باعث جلوگیری از آپوپتوز می‌شود و نیز افزایش گیرنده‌های COX-2 در سرطان‌های متعددی چون پوست، شش، مثانه، رحم و سر و گردن دیده شده است، آسپیرین با استیل‌کردن این آنزیم، آن را مهار می‌کند و موجب القای آپوپتوز می‌شود (۳۱). از سویی دیگر آسپیرین با کاهش گیرنده‌های COX-2 نقش آنتی توموری دارد (۳۲). آسپیرین پس از اتصال به گیرنده خود و به راه افتادن زنجیره‌ای از واکنش‌ها، با اثر بر DNA و رونویسی می‌تواند باعث بیان ژن‌های آپوپتوزی می‌شود. در این راستا، پروتیین BAX در غشای میتوکندری پس از هومودایمیریزه و الیگومریزه شدن، موجب باز شدن کانال‌های آنیونی می‌گردد و در پی آن اختلاف پتانسیل غشای میتوکندری از بین می‌رود. این کانال‌ها موجب آزاد شدن پروتئین‌ها و فاکتورهای آپوپتوزی همچون سیتوکروم C به سیتوسل سلولی شده و به دنبال این آزادسازی، آپوپتوز به کمک فعال شدن کاسپازها، اتفاق می‌افتد (۳۰-۳۲). در پژوهش حاضر، غلظت سیتوتوکسیک آسپیرین علاوه بر افزایش معنی‌دار بیان ژن آپوپتوزی BAX، بر خلاف انتظار منجر به افزایش ژن ضد آپوپتوزی Bcl-2 نیز گردید، اما با توجه به بالا بودن بسیار قابل توجه نسبت BAX به Bcl-2، افزایش بیان ژن ضد آپوپتوزی Bcl-2 قادر به مقابله با سطح بالای بیان BAX نبوده و بدین ترتیب اثر سیتوتوکسیک آسپیرین بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم اعمال شده است. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند که آسپیرین سبب

مصرفی فارماکولوژیک اثرات قابل توجه سیتوتوکسیک بر سرطان دهانه رحم ندارد. گرچه جهت تعیین دقیق اثرات ضدسرطانی آسپیرین بر دهانه رحم نیاز به مطالعات بیشتر تجربی و اپیدمیولوژیک وجود دارد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با حمایت‌های معنوی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان انجام گرفته است. همچنین از زحمات همکاران در مرکز بیوتکنولوژی جاوید به ویژه آقای وحید عسگری تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

1. Buskwofie A, David-West G, Clare CA. A review of cervical cancer: incidence and disparities. *J Natl Med Assoc.* 2020;112(2):229-32.
2. Harris RE, Beebe-Donk J, Doss H, Doss DB. Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective COX-2 blockade. *Oncol Rep.* 2005;13(4):559-83.
3. Song Y, Zhong X, Gao P, Zhou C, Shi J, Wu Z, et al. Aspirin and its potential preventive role in cancer: an umbrella review. *Front Endocrinol.* 2020;11:3.
4. Veronese N, Demurtas J, Thompson T, Solmi M, Pesolillo G, Celotto S, et al. Effect of low-dose aspirin on health outcomes: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Br J Clin Pharmacol.* 2020;86(8):1465-75.
5. Zaman FY, Orchard SG, Haydon A, Zalberg JR. Non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer: a review of clinical studies. *Br J Cancer.* 2022;1-9.
6. Khoudari G, Alkhayat M, Abou Saleh M, Mansoor E, Sarmini MT, Baidoun F, Vega KJ, Sanaka MR. The epidemiology of pancreatic cancer and the association with acetylsalicylic acid in the United States: a population-based study. *Pancreas.* 2020;49(9):1207-12.
7. Zappavigna S, Cossu AM, Grimaldi A, Bocchetti M, Ferraro GA, Nicoletti GF, Filosa R, Caraglia M. Anti-inflammatory drugs as anticancer agents. *Int J Mol Sci.* 2020;21(7):2605.
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

افزایش بیان ژن iNOS نیز می‌گردد. به نظر می‌رسد که فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی NF-kappaB و STAT-1alpha در پی آن فعال شدن پروموتور iNOS مرحله‌ای اساسی در القای iNOS باشد. به دنبال بیان iNOS نوعی آنزیم غیر وابسته به کلسیم/کالمودولین بیان می‌شود که سنتز نیتریک اکساید از ال-آرژنین را تسریع می‌بخشد. نیتریک اکساید حاصله که یک رادیکال قوی است، با اتصال به SCG موجب فعال شدن بخش کاتالیزوری داخل سلولی آن شده و GTP به cGMP کاتالیز می‌شود. سپس پروتئین کیناز G و کیناز تنظیم شده با سیگنال خارجی فعال می‌شوند. فعال شدن این مسیر سیگنالینگ می‌تواند گامی مهم در مهار تکثیر سلولی و آپوپتوز ایفا نماید (۳۲).

این تحقیق در محدوده بررسی اثرات غلظت سیتوتوکسیک آسپیرین بر بیان ژن‌های BAX، Bcl-2 و iNOS در سلول‌های سرطانی دهانه رحم در محیط کشت سلولی اجرا گردیده و از نظر بررسی‌های فرآیندهای مولکولی از قبیل آبشار کاسپازی و پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز، دارای محدودیت‌هایی می‌باشد. محققان این پژوهش امیدوارند که در آینده امکان بررسی اثرات غلظت‌های مختلف آسپیرین 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 فراهم گردد.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این پژوهش نشان دادند که غلظت‌های پایین آسپیرین دارای اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم نبوده، اما غلظت‌های بالاتر دارای اثرات سیتوتوکسیک بوده و سبب افزایش معنادار سطح بیان ژن آپوپتوزی BAX نسبت به سطح بیان ژن ضد آپوپتوزی Bcl-2 نیز افزایش بیان نسبی ژن نیتریک اکساید سنتتاز القایی می‌گردد که این امر احتمالاً نقش اساسی در کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطانی دهانه رحم تیمار شده با آسپیرین داشته است. بر این اساس، احتمالاً آسپیرین با دوزهای مرسوم

- cancer Minireview. *Neoplasma*. 2004;51(4):239-47.
9. Cairat M, Al Rahmoun M, Gunter MJ, Severi G, Dossus L, Fournier A. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer risk in a prospective cohort of postmenopausal women. *Breast Cancer Res*. 2020;22(1):1-4.
 10. Sørensen HT, Friis S, Nørgård B, Møller L, Blot WJ, McLaughlin JK, et al. Risk of cancer in a large cohort of nonaspirin NSAID users: a population-based study. *Br J Cancer*. 2003;88(11):1687-92.
 11. Lee SK, Park MS, Nam MJ. Aspirin Has Antitumor Effects via Expression of Calpain Gene in Cervical Cancer Cells. *J Oncol*. 2008;2008:285374.
 12. Brasky TM, Bonner MR, Moysich KB, Ambrosone CB, Nie J, Tao MH, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and breast cancer risk: differences by molecular subtype. *Cancer Causes Control*. 2011;22(7):965-75.
 13. Bosetti C, Bravi F, Talamini R, Montella M, Negri E, La Vecchia C. Aspirin and risk of endometrial cancer: a case-control study from Italy. *Eur J Cancer Prev*. 2010;19(5):401-3.
 14. Garcia Rodriguez LA, Martín-Pérez M, Hennekens CH, Rothwell PM, Lanan A. Bleeding risk with long-term low-dose aspirin: a systematic review of observational studies. *PloS One*. 2016;11(8):e0160046.
 15. Thun MJ, Jacobs EJ, Patrono C. The role of aspirin in cancer prevention. *Nature Rev Clin Oncol*. 2012;9(5):259.
 16. Thorat MA, Cuzick J. Role of aspirin in cancer prevention. *Curr Oncol Rep*. 2013 ;15(6):533-40.
 17. 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.
 18. Chen RH, Tian YJ. Enhanced anti-tumor efficacy of aspirin combined with triptolide in cervical cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(5):3041-4.
 19. Xiang S, Sun Z, He Q, Yan F, Wang Y, Zhang J. Aspirin inhibits ErbB2 to induce apoptosis in cervical cancer cells. *Med Oncol*. 2010;27(2):379-87.
 20. Chen RH, Tian YJ. Enhanced anti-tumor efficacy of aspirin combined with triptolide in cervical cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(5):3041-4.
 21. Wilson JC, O'rorke MA, Cooper JA, Murray LJ, Hughes CM, Gormley GJ, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and cervical cancer risk: a case-control study using the Clinical Practice Research Datalink. *Cancer Epidemiol*. 2013;37(6):897-904.
 22. Holmes MD, Chen WY, Li L, Hertzmark E, Spiegelman D, Hankinson SE. Aspirin intake and survival after breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(9):1467.
 23. Bosco JL, Palmer JR, Boggs DA, Hatch EE, Rosenberg L. Regular aspirin use and breast cancer risk in US Black women. *Cancer Causes Control*. 2011;22(11):1553-61.
 24. Brasky TM, Bonner MR, Moysich KB, Ambrosone CB, Nie J, Tao MH, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and breast cancer risk: differences by molecular subtype. *Cancer Causes Control*. 2011;22(7):965-75.
 25. Tsutsumi S, Gotoh T, Tomisato W, Mima S, Hoshino T, Hwang HJ, et al. Endoplasmic reticulum stress response is involved in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis. *Cell Death Diff*. 2004;11(9):1009-16.
 26. Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Staiano-Coico L, et al. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol*. 1996;52(2):237-45.
 27. Gu Q, Wang JD, Xia HH, Lin MC, He H, Zou B, et al. Activation of the caspase-8/Bid and Bax pathways in aspirin-induced apoptosis in gastric cancer. *Carcinogenesis*. 2005;26(3):541-6.
 28. Dikshit P, Chatterjee M, Goswami A, Mishra A, Jana NR. Aspirin induces apoptosis through the inhibition of proteasome function. *J Biol Chem*. 2006;281(39):29228-35.
 29. Piqué M, Barragán M, Dalmau M, Bellosillo B, Pons G, Gil J. Aspirin induces apoptosis through mitochondrial cytochrome c release. *FEBS Lett*. 2000;480(2-3):193-6.
 30. Zimmermann KC, Waterhouse NJ, Goldstein JC, Schuler M, Green DR. Aspirin induces apoptosis through release of cytochrome c from mitochondria. *Neoplasia*. 2000;2(6):505-13.
 31. Mirabito Colafella KM, Neuman RI, Visser W, Danser AJ, Versmissen J. Aspirin for the prevention and treatment of pre-eclampsia: A matter of COX-1 and/or COX-2 inhibition? *Bas Clin Pharmacol Toxicol*. 2020;127(2):132-41.
 31. Jiang W, Yan Y, Chen M, Luo G, Hao J, Pan J, et al. Aspirin enhances the sensitivity of colon cancer cells to cisplatin by abrogating the binding of NF- κ B to the COX-2 promoter. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(1):611.
 32. Wu KK. Control of COX-2 and iNOS gene expressions by aspirin and salicylate. *Thrombosis Res*. 2003;110(5):273-6.