



## Evaluation of Cox-2 expression in human gastrocarcinoma cells

Zolfaghari Sharifi S1, Eidi M \*,2, Zare Karizi S 3

1. M.Sc Graduated, Department of Genetics, Biological Sciences College, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, Iran
2. Full Professor, Department of Biology, Biological Sciences College, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, Iran
3. Associate Professor, Department of Genetics, Biological Sciences College, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, Iran

Department of Genetics, Biological Sciences College, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin- Pishva

### Article Info

#### Article History:

Received 8.27.2022  
Revised 9.7.2022  
Accepted 9.18.2022  
Online 9.20.2022

#### KeyWords:

Cancer  
Gastrocarcinoma  
Cyclooxygenase-2

#### \*Corresponding author:

E-mail address  
zolfagharinor@gmail.com  
maryameidi@gmail.com  
& eidi@iauvaramin.ac.ir  
shohrehzare@yahoo.com

### Abstract

**Introduction:** Gastrointestinal cancers are among the most common causes of death worldwide. Studies have shown that the cyclooxygenase enzyme plays an important role in the development of gastrointestinal cancers and increases the level of this enzyme in gastrointestinal cancers.

**Aim:** The aim of this study was to investigate the expression of Cox-2 in human gastrocarcinoma cells.

**Materials and Method:** In this case-control study, 30 samples of gastro-carcinoma tissues and 30 healthy surrounding tissues as control were obtained by the surgeon from the Imam Khomeini Hospital's surgery department. Characteristics of cancerous tissues including lymph node invasion, tumor size, stage of disease, vascular invasion and grade of disease were recorded. Real Time PCR reaction was performed using primer design and cDNA synthesis, and Bio-RAD was used to determine the Cox-2 gene expression. The results were analyzed by linReg PCR software and ultimately gene expression was analyzed by Rest 2009 software.

**Results:** The Cox-2 expression was increased in tumor samples in compared to normal samples, significantly ( $p < 0.05$ ). There were significant and positive correlations between Cox-2 expression and tumor size ( $p < 0.01$ ), lymphatic invasion ( $p < 0.01$ ) and tumor stage ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Considering the increased expression of cyclooxygenase 2 in human gastro-carcinoma cells, insignificantly, and the relationship between expression of Cox-2 and various parameters of cancer, it seems that Cox-2 expression levels should be further investigated in future research by selecting tumor samples at the same stages.

Cite this article: Zolfaghari Sharifi S, Eidi M\*, Zare Karizi S. Evaluation of Cox-2 expression in human gastrocarcinoma cells. Iranian Journal of Biological Sciences. 2022; 17(1): 59-70

doi 10.30495/zisti.2022.1967638.1137

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

DOR 20.1001.1.17354226.1401.17.1.6.6

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



## بررسی بیان Cox-۲ در سلول‌های گاستروکارسینومای انسان

سمیه ذوالفقاری شریفی ۱، مریم عیدی\* ۲، شهره زارع کاریزی ۳

۱. فارغ التحصیل ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

۲. استاد تمام، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

۳. دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

محل انجام تحقیق: گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخچه مقاله

دریافت ۵/۶/۱۴۰۱

بازنگری ۱۶/۶/۱۴۰۱

پذیرش ۲۷/۶/۱۴۰۱

انتشار ۲۹/۶/۱۴۰۱

کلمات کلیدی

سرطان

گاستروکارسینوما

سیکلوآکسیژناز ۲

\* نویسنده مسؤل

zolfagharinor@gmail.com

maryameidi@gmail.com

و eidi@iavaramin.ac.ir

shohrehzare@yahoo.com

**مقدمه:** سرطان‌های دستگاه گوارش جزء شایع‌ترین علل مرگ و میر در سراسر جهان می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند آنزیم سیکلوآکسیژناز در ایجاد سرطان‌های معده - روده‌ای نقش مهمی داشته و سطح این آنزیم در سرطان‌های دستگاه گوارش افزایش می‌یابد.

**هدف:** با توجه به اهمیت آنزیم سیکلوآکسیژناز ۲ (Cox-۲) در سرطان‌های لوله گوارش، هدف از مطالعه حاضر بررسی بیان Cox-۲ در سلول‌های گاستروکارسینومای انسان می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مورد-شاهدی ۳۰ نمونه بافت گاستروکارسینوما و ۳۰ نمونه از بافت سالم اطراف آن به عنوان کنترل توسط جراح از مراجعه به بخش جراحی بیمارستان امام خمینی (ع) جمع آوری شد. خصوصیات بافت‌های سرطانی از جمله درگیری غدد لنفاوی، سائیز تومور، مرحله بیماری، وضعیت تهاجم به عروق و مرحله بیماری مشخص شد. جهت انجام واکنش Real Time PCR طراحی پرایمر و سنتز cDNA صورت گرفته و واکنش آن در دستگاه Bio-RAD برای تعیین بیان ژن Cox-۲ انجام شد.

**نتایج:** بیان Cox-۲ در نمونه تومور در مقایسه نمونه‌های سالم افزایش غیرمعنی داری نشان داد. همچنین، بین بیان Cox-۲ و اندازه تومور (سانتی‌متر) ( $p > 0.01$ )، غدد لنفاوی درگیر ( $p < 0.01$ ) و مرحله تومور (Stage) ( $p < 0.05$ ) ارتباط مثبت و معنی داری وجود دارد. بعبارتی با افزایش اندازه تومور، پیشرفت مرحله تومور و افزایش تعداد گره‌های لنفاوی در تومور بیان Cox-۲ افزایش یافته است.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به افزایش غیرمعنی دار بیان آنزیم سیکلوآکسیژناز ۲ در سلول‌های گاستروکارسینومای انسان، و ارتباط بین بیان ژن این آنزیم و پارامترهای مختلف نمونه‌های تومور، بنظر می‌رسد باید در تحقیقات بیشتر با انتخاب نمونه‌های تومور در مراحل یکسان میزان بیان Cox-۲ مورد بررسی بیشتری قرار گیرد.

شیوه آدرس‌دهی این مقاله: ذوالفقاری شریفی س، عیدی\* م، زارع کاریزی ش. بررسی بیان Cox-۲ در سلول‌های گاستروکارسینومای انسان. مجله

دانش زیستی ایران. ۱۴۰۱؛ ۱۷(۱): ۵۹-۷۰

doi 10.30495/zisti.2022.1967638.1137

DOR 20.1001.1.17354226.1401.17.1.6.6

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا | شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶ | شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-۴۵۹X | نویسنده‌گان: © حق مؤلف

**مقدمه:**

تحقیقات جدید نشان داده که اتصال سوبسترا یا مهار کننده در جایگاه فعال يك زیرواحد مانع از اتصال مولکول‌ها به زیرواحد دیگر می‌شود. هر دو ایزوزیم Cox-1 و Cox-2 در سطوح لومنی شبکه اندوپلاسمی و غشاء داخلی و خارجی پوشش هسته وجود دارند. آنزیم سیکلواکسیژناز آنزیم اصلی ساخت پروستاگلاندین‌ها است که بصورت 2 ایزوفرم Cox-1 و Cox-2 وجود دارد. بروز ژن Cox-2 توسط محرک‌های التهابی القاء می‌گردد (۳). آنزیم سیکلواکسیژناز از مهمترین آنزیم‌های ساختاری در تولید میانجی‌های التهابی بدن یا پروستاگلوئیدها شامل پروستاگلاندین، پروستاگلین و ترومبوکسان است. مهار فارماکولوژیکی این آنزیم‌ها می‌تواند سمپتوم و نشانه‌های آرتریک (التهابی) و درد را از بین ببرد. عملکرد داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی مهار این آنزیم است. آنزیم فسفولیپاز فسفولیپیدهای غشای سلول (استریفیه) را به اسید آراشیدونیک (غیراستریفیه) تبدیل می‌کند. سپس آنزیم سیکلواکسیژناز باعث تبدیل اسید آراشیدونیک به پروستاگلاندین H<sub>2</sub> می‌شود که پیش‌ساز سایر پروستاگلاندین‌ها است. آنزیم لیبواکسیژناز موجب تبدیل اسید آراشیدونیک به لوکوترین‌ها می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند آنزیم سیکلواکسیژناز در ایجاد سرطان‌های معدی - روده‌ای نقش مهمی داشته و سطح این آنزیم در سرطان‌های دستگاه گوارش افزایش می‌یابد. همچنین، آنزیم Cox-2 بعنوان یکی از مهم‌ترین مدیاتورهای القاءکننده سرطان به‌ویژه سرطان دستگاه گوارش مطرح است (۴). لذا با توجه به اهمیت آنزیم Cox-2 در سرطان‌های لوله گوارش، هدف از مطالعه حاضر بررسی بیان Cox-2 در سلول‌های گاستروکارسینوما انسان می‌باشد.

سرطان بعد از بیماری قلبی-عروقی دومین عامل شایع مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و سومین عامل مرگ در کشورهای کمتر توسعه یافته است. سرطان عامل حدود ۶۰ درصد مرگ و میر در کشورهای کمتر توسعه یافته جهان است. بالاترین میزان شیوع سرطان مربوط به کشور امریکا با میزان ۵/۱ درصد در طول ۵ سال می‌باشد. ۱ درصد ژاپنی‌ها و ۷ درصد ساکنین اروپای شرقی در طول ۵ سال گذشته به سرطان مبتلا شده‌اند. این رقم برای ایران ۲ درصد جمعیت است (۱).

سرطان دستگاه گوارش به طور عمده شامل قسمت‌های مری و معده و سرطان روده بزرگ است. سرطان معده یکی از شایعترین سرطان‌های دستگاه گوارش است. سرطان معده براساس سه فاکتور تومور اولیه، گره لنفاوی موضعی و متاستاز دوردست طبقه‌بندی می‌شود. در حقیقت سرطان معده به هرگونه نئوپلاسم بدخیم منشاء گرفته از ناحیه توسعه یافته بین محل اتصال مری و معده تا پیلور اشاره دارد. حدود ۹۵٪ از تومورهای معده در اصل اپیتلیالی هستند. سرطان معده بیشتر در سنین ۶۰ تا ۸۰ آغاز شده و در بیماران جوان تر از ۳۰ سال به ندرت دیده می‌شود. سرطان معده بیشترین میزان بروز را در ایران داشته و سهم آن ۱۶/۵٪ از کل میزان بروز سرطان‌ها در این سال در ایران می‌باشد (۲). سیکلواکسیژنازها پروتئین‌های داخل غشایی گلیکوزیله و هومودیمر، متشکل از زیرواحدهای ۷۰ کیلودالتون می‌باشند که هر کدام از زیرواحدها دارای يك مولکول هم و يك جایگاه کاتالیتیکی بوده و از طریق سطوح هیدروفوبیک هلیکس‌های آمفی پاتیک در يك لایه از غشاء فسفولیپیدی قرار می‌گیرند. اگرچه فرض شده که هر دو زیرواحد هم زمان فعال هستند،

**مواد و روش‌ها:**

تمام بیماران تکمیل و از آنان دریافت گردید. نمونه‌ها توسط جراح از بافت سرطانی و حاشیه سالم بیماران اخذ شد و بررسی پاتولوژیکی نیز انجام شد. نمونه‌های مذکور بلافاصله پس از جدا شدن در شرایط عاری از RNAase و DNAase در کرایوتوب قرار گرفتند.

تحقیق حاضر یک مطالعه مورد - شاهدهی است که در بخش مولکولی انستیتو کسر بیمارستان امام خمینی روی ۳۰ نمونه بافت تومور و ۳۰ نمونه بافت مجاور تومور (از حاشیه تومور با فاصله < ۵ سانتی‌متر از محل تومور) به عنوان کنترل انجام شد. فرم رضایت‌نامه آگاهانه توسط

### معیارهای خروج از مطالعه:

مواردی که همراهی با هر گونه سرطان دیگر نشان می‌داد، از مطالعه کنار گذاشته شدند که شامل موارد زیر بودند: بیماری التهابی نداشته باشند، سرطان‌های دیگری همزمان با سرطان معده نداشته باشند، قبلاً شیمی درمانی داشته باشند، قبلاً رادیوتراپی داشته باشند.

### اطلاعات دموگرافیک بیماران:

میانگین سنی بیماران  $51/3 \pm 16/4$ ، ۱۶ مرد و ۱۴ زن، ۶/۶۷ درصد سیگاری، ۳/۳۳ درصد مصرف الکل داشتند، ۲۶/۶۷ درصد علائم استفراغ و ۲۰ درصد حالت تهوع داشتند (جدول ۱).

جدول ۱ - اطلاعات دموگرافیک افراد شرکت کننده در مطالعه بر حسب میانگین  $\pm$  انحراف معیار

اطلاعات دموگرافیک	تعداد (%)
سن (سال)	$51/3 \pm 16/4$
جنس (مرد- زن)	۱۶ - ۱۴
سیگار	۲ (% ۶/۶۷)
الکل	۱ (% ۳/۳۳)
استفراغ	۸ (% ۲۶/۶۷)
حالت تهوع	۶ (% ۲۰)

### مطالعات بافت‌شناسی:

وجود گره‌های لنفاوی در نمونه‌های تومور نیز بررسی انجام شد. نمونه‌ها از نظر تمایز یافتگی نیز مورد بررسی قرار گرفتند و به گروه‌های II یا بطور متوسط تمایز یافته (Moderately differentiated)، III یا به مقدار بسیار کم تمایز یافته (Poorly differentiated)، IV یا تمایز نیافته (Undifferentiated) و X یا مجهول (Unknown) تقسیم شدند.

مطالعات بافت‌شناسی و پاتولوژیکی روی نمونه‌ها انجام شد و به دسته‌های T1 (تومور رشد خود را به دیواره‌های معده آغاز کرده است)، T2 (تومور به درون لایه عضلانی معده نفوذ کرده است)، T3 (تومور به لایه خارجی معده گسترش یافته است) و T4 (تومور در پوشش بیرونی معده رشد کرده است) تقسیم شدند. همچنین، از نظر

### بررسی بیان ژن به روش real-time PCR

و با اتانول ۷۰٪ مخلوط و مجدداً سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل زیر هود و دمای اتاق قرار گرفت تا اتانول خشک شود و سپس در ۳۰ میکرولیتر DEPC water حل گردید. جهت بررسی کمی RNA استخراج شده، میزان جذب نور در ۲۶۰nm و نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ از دستگاه نانودراپ استفاده شد. همچنین، برای مشخص نمودن احتمال آلودگی با مواد آلی و آروماتیک مانند تیوسیانات ناشی از

در حدود ۵۰ میلی گرم بافت مورد نظر را در یک لوله عاری از RNAase قرار داده و تراپزول (invitrogen) و کلروفورم به آن اضافه شد. پس از سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰g در دمای ۴ درجه، فاز بالایی به دقت جدا گردید و ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و مخلوط حاصل جهت افزایش مقدار RNA در  $24^{\circ}\text{C}$  - به صورت یک شبانه روز نگهداری شد. پس از سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰g، رسوب حاصله جدا شده

و بانک اطلاعاتی NCBI و شماره‌های مربوط به mRNA هر ژن دریافت شد و با وارد کردن در نرم افزار و تطبیق دادن وارته‌های گوناگون مربوط به هر ژن نقاط مشترک مشخص شد و در نهایت با توجه به پارامترهای مختلف فیزیکی- شیمیایی مانند طول پرایمر، طول محصول واکنش، دمای ذوب، طراحی پرایمر صورت گرفت (جدول ۲).

محلول‌های لیز کننده از نسبت جذب طول موج ۲۶۰/۲۳۰ استفاده شد. به منظور بررسی کیفی RNA از دستگاه ترانس لومیناتور استفاده شد که RNA سالم و با کیفیت استاندارد روی ژل باندی واضح با حداقل اسمیر نشان داد. به منظور انجام واکنش Real Time PCR پرایمرهای اختصاصی مورد نیاز با استفاده از نرم افزار AlleleIDV,6

جدول ۲ - توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Real-time-PCR.

Primer types	Primer sequences	Product Size
Cox-2	forward: TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT Reverse: AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT	۲۶۱ bp
$\beta$ -actin	Forward: GCACCACACCTTCTACAATG Reverse: TGCTTGCTGATCCACATCTG	۱۵۱ bp

### آنالیز آماری:

برای نمونه‌های گروه کنترل همیشه ۱ در نظر گرفته می‌شود. لازم به ذکر است واکنش‌های Real Time PCR برای هر ژن دو بار صورت گرفت و از میانگین نتایج استفاده شد. بررسی بیان این ژن‌ها توسط نرم افزار Rest و SPSS (Version ۲۲) انجام گرفت. از نرم افزار SPSS (Version ۲۲) و تست T-Test برای مقایسه بیان ژن استفاده شد. از نرم افزار SPSS و تست Correlation برای تعیین ارتباط بین پارامترها استفاده شد.

$$\Delta CT (\text{test or control}) = CT (\text{target}) - CT (\text{reference})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{test}) - \Delta CT (\text{control})$$

$$\text{Fold change} = (1 + \text{efficiency})^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

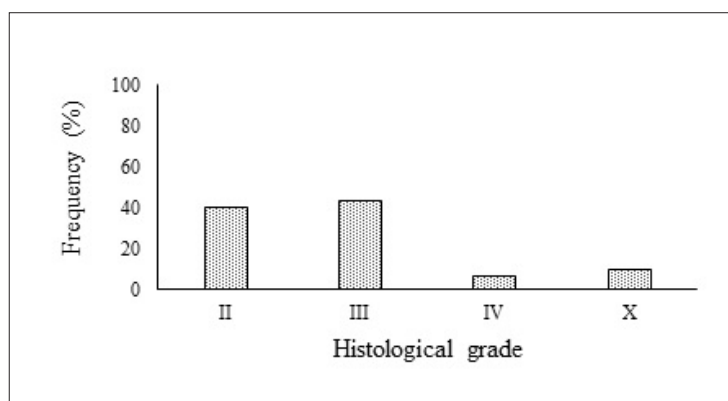
پس از انجام واکنش، CT value مربوط به ژن‌های  $\beta$ -actin و Cox-2 ثبت شد تا مورد آنالیز قرار گیرد و با استفاده از روش  $\Delta\Delta CT$  به بررسی تفاوت میزان بیان نسبی ژن در دو گروه توموری و حاشیه سالم پرداخته شد.

برای بررسی میزان تاثیرگذاری ژن مورد نظر در تشدید رشد سلول‌های توموری، میزان Fold Change ژن Cox-2 بین گروه سالم و گروه توموری با استفاده از نرم افزار Rest مقایسه شد. برای محاسبه Fold Change: CT ژن مورد نظر در نمونه سرطانی را از CT همان ژن در نمونه‌های سالم تفریق کرده و عدد حاصل  $\Delta\Delta CT$  نامیده می‌شود.

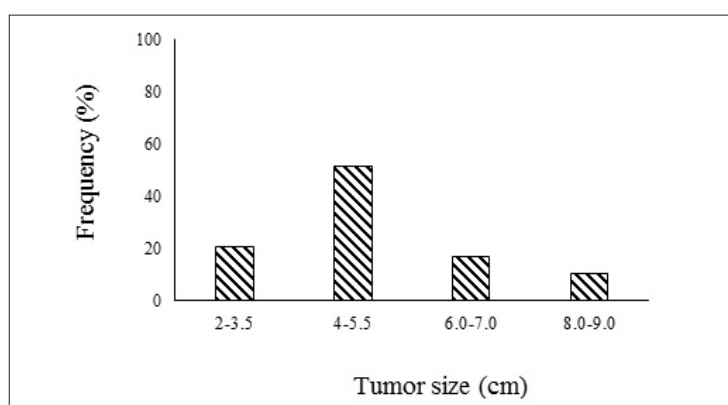
$\Delta\Delta CT$  در فرمول  $\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta CT}$  قرار شد.

### نتایج:

آنالیز توصیفی در مورد بافت‌شناسی درجه تمایز نمونه‌های تومور نشان داد بیشترین فراوانی نمونه‌ها در مرحله III (تمایز کم) و سپس II (تمایز متوسط) و کمترین فراوانی در مرحله IV (بدون تمایز) وجود داشتند (ممودار ۱). همچنین، تومورهای ۴-۵/۵ سانتی‌متری بیشترین فراوانی و تومورهای ۸-۹ سانتی‌متری کمترین فراوانی را در بین نمونه‌ها داشتند (ممودار ۲).

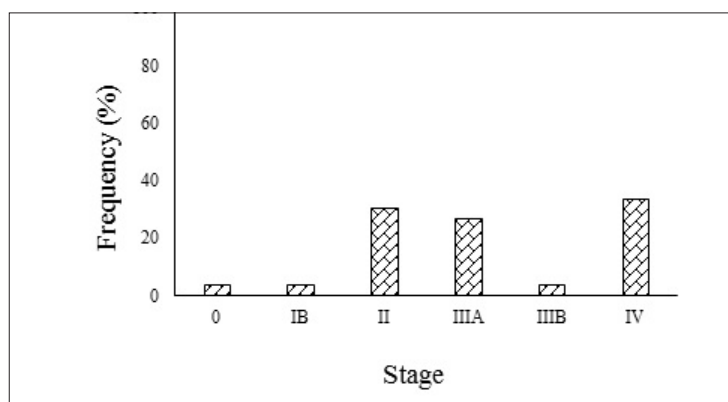


نمودار ۱ - فراوانی درجات مختلف تمایز در نمونه‌های سرطانی گاستروکارسینوما بیماران مورد مطالعه.



نمودار ۲ - مقایسه فراوانی اندازه تومورها در بیماران مورد مطالعه بر حسب سانتی‌متر.

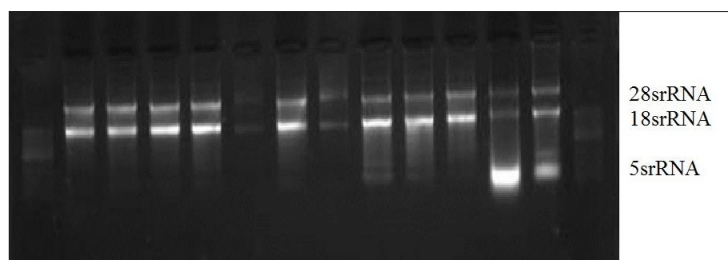
آنالیز توصیفی نشان داد ۳۳/۳ درصد نمونه‌ها در مرحله IV (تومور به قسمت‌های دور بدن گسترش یافته)، ۳۰ درصد نمونه‌ها در مرحله‌های II (سرطان هنوز به مناطق دور انتشار پیدا نکرده است)، و ۲۶/۷ درصد نمونه‌ها در مرحله IIIA (سرطان به سایر قسمت‌های بدن متاستاز داده است) بودند، و کمترین فراوانی نمونه‌های تومور مربوط به مراحل IB، IIB و ۰ بود (نمودار ۳).



نمودار ۳ - فراوانی مراحل مختلف سرطان در بیماران مورد مطالعه.

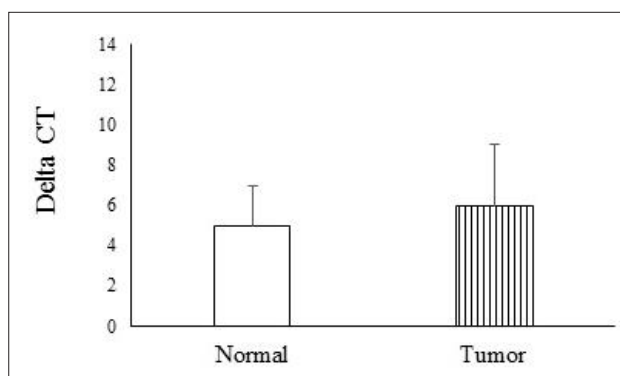
عدم آلودگی به پروتئین است. مشاهده باندهای ۲۸s و ۱۸s و ۵s مربوط به RNA ریپوزومی در ژل آگاروز نشان دهنده عدم تجزیه و خرد شدن RNA است. اسمیر بین این دو باند نشان دهنده mRNA موجود در نمونه است (تصویر ۱).

کیفیت RNA استخراج شده از سلول‌ها با روش الکتروفورز در ژل آگاروز یک درصد انجام شد و کمیت آن توسط محاسبه نسبت جذب نوری در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر (دستگاه اسپکتروفوتومتر) بین ۱/۸ و ۲ به دست آمد که نشان دهنده خلوص RNA و



تصویر ۱- تصویر حاصل از الکتروفورز RNA در ژل آگارز.

یافته‌های حاصل از RT-PCR نشان داد میزان Fold change بیان ژن Cox-2 در نمونه‌های تومور در حدود یک و دارای افزایش غیرمعنی‌دار می‌باشد.



نمودار ۴ - مقایسه بیان ژن Cox-2 در نمونه‌های توموری و نمونه‌های سالم.

و stage نمونه‌های تومور وجود ندارد. همچنین، ارتباط مثبت و معنی داری بین هجوم غدد لنفاوی با اندازه تومور ( $p=0.01$ )، مرحله تومور ( $p<0.01$ ) و هجوم عروق خونی ( $p<0.01$ ) وجود دارد. همچنین، بین هجوم سرطان به منطقه اطراف عصب (perineural invasion) و هجوم عروق خونی و هجوم عروق لنفاوی ارتباط مثبت و معنی داری وجود دارد ( $p<0.05$ ).

از طرف دیگر، آنالیز آماری نتایج نشان داد بین بیان Cox-2 و اندازه تومور (سانتی‌متر) ( $p<0.01$ )، غدد لنفاوی درگیر ( $p<0.01$ ) و مرحله تومور (Stage) ( $p<0.05$ ) ارتباط مثبت و معنی داری وجود دارد. عبارتی با افزایش اندازه تومور، پیشرفت مرحله تومور و افزایش تعداد گره‌های لنفاوی در تومور بیان Cox-2 افزایش یافته است، ولی ارتباط معنی داری بین بیان ژن Cox-2 و grade، درجه تمایز

## بحث:

نیمی از سرطان‌هایی که منجر به مرگ می‌شوند، را تشکیل می‌دهند (۶). در میان سرطان‌های لوله گوارش، سرطان معده به عنوان چهارمین بیماری بدخیم انسانی و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در انسان شناخته شده است

سرطان یکی از معضلات جدی در جوامع امروزی می‌باشد، به طوری که بعد از بیماری‌های قلبی-عروقی دومین جایگاه مرگ و میر در دنیا را به خود اختصاص داده است (۵). سرطان‌های دستگاه گوارش، بیش از یک سوم سرطان‌های شایع و تقریباً



بنظر می‌رشد نیاز به انتخاب نمونه‌های بیشتر دارد. همچنین، آنالیز آماری نتایج نشان داد بین بیان Cox-2 و اندازه تومور (سانتی‌متر) ( $p < 0.01$ )، غدد لنفاوی درگیر ( $p < 0.01$ ) و مرحله تومور (Stage) ( $p < 0.05$ ) ارتباط مثبت و معنی داری وجود دارد. به عبارتی با افزایش اندازه تومور، پیشرفت مرحله تومور و افزایش تعداد گره‌های لنفاوی در تومور بیان Cox-2 افزایش یافته است.

در راستای مطالعه ما مطالعات زیادی صورت گرفته است که به مواردی از آن‌ها اشاره می‌شود. Huang و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که افزایش بیان آنزیم سیکلواکسیژناز ۲، موجب افزایش تولید پروستاگلندین PGE<sub>2</sub> می‌شود که PGE<sub>2</sub> به عنوان تنظیم کننده مسیر MAP کیناز مطرح بوده و این مسیر به تولید پروتئین آنتی آپوپتوزی Bcl-2 می‌انجامد. پروتئین Bcl-2، از طریق اتصال مستقیم با غشای خارجی میتوکندری و مهار پروتئین‌های پروآپوپتوتیک موجب حفظ تمامیت غشای خارجی میتوکندری و مهار آپوپتوز می‌شود (۱۷).

مطالعه Pang و همکارانش (۲۰۰۷) نشان داد که سیکلواکسیژناز-۲ با افزایش تولید PGE<sub>2</sub> موجب فسفریله کردن و فعالسازی پروتئین AKT\_Kinase می‌گردد که این پروتئین به عنوان مسیر بقا و زنده ماندن سلول مطرح می‌باشد و موجب فعال شدن مولکول IKK $\alpha$  شده و از این طریق پروتئین پروآپوپتوزی Bax را که پروتئین پیش برنده مسیر آپوپتوزی است مهار کرده و مانع آپوپتوز می‌شود (۱۸).

در مطالعه Liu و همکاران (۲۰۰۸) نشان داده شد که میزان سیکلواکسیژناز-۲ در کارسینوما سلول‌های کولورکتال افزایش می‌یابد و افزایش سیکلواکسیژناز-۲ با موتاسیون در ژن P53 همراه است. پروتئین P53، نقش مهمی در تنظیم چرخه سلولی نرمال، آپوپتوز و پاسخ به DNA ایفاء می‌کند. P53 مانع ورود چرخه سلولی به فاز S می‌شود و سلول را در مقابل سرطان زایی محافظت می‌کند. در این مدت سلول، فرصت ترمیم DNA را به دست می‌آورد و در صورت عدم ترمیم، P53 با القای مرگ سلولی منجر به آپوپتوز سلول می‌شود. اختلال در پروتئین P53، منجر به عدم تنظیم چرخه سلولی و رشد انتخابی و تشکیل تومور می‌گردد (۱۹).

Nzaeko و همکاران (۲۰۰۶) در طی یک پژوهش نشان دادند که آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ در سلول‌های توموری کولون،

(۷). کارسینوژنز معده، فرایندی چند مرحله‌ای است. هر چند تغییرات ژنتیکی درگیر در شروع و پیشرفت این سرطان، هنوز به خوبی مشخص نیست، اما عوامل ژنتیکی و اپی ژنتیکی مختلفی برای آن در نظر گرفته‌اند. (۸).

در دو دهه گذشته، آزمایشات کلینیکی و مطالعات اپیدمیولوژیک بسیاری در ارتباط با سرطان و حضور سیکلواکسیژناز صورت گرفته است. آنزیم اصلی ساخت پروستاگلاندین‌ها، آنزیم سیکلواکسیژناز است که به صورت دو ایزوفرم Cox-1 و Cox-2 موجود می‌باشد (۹،۱۰).

آنزیم سیکلواکسیژناز-۲، آنزیم سیتوپلاسمی و کلیدی برای ساخت پروستاگلاندین‌ها در پاسخ به سایتوکین‌ها است که سبب واکنش‌های التهابی می‌گردد. این آنزیم در بافت‌های طبیعی وجود نداشته و در حقیقت، یک نوع آنزیم القایی است که طی پدیده‌های پاتولوژیک چون التهاب و بدخیمی‌ها به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد (۱۱).

آنزیم سیکلواکسیژناز-۲، به عنوان یکی از مهم‌ترین مدیاتورهای القاء کننده سرطان به ویژه سرطان دستگاه گوارش مطرح می‌باشد. از سوی دیگر، تاکنون بیشتر تحقیقات بر روی تغییرات هیستوپاتولوژی سرطان معده در درازمدت صورت گرفته است و بر روی وقایع مولکولی سرطان در کوتاه مدت، مطالعات بسیار اندکی وجود دارد. مطالعات نشان داده است که آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ در ایجاد سرطان‌های معده- روده‌ای نقش مهمی دارد و سطح این آنزیم در سرطان‌های دستگاه گوارش افزایش می‌یابد (۱۲-۱۴).

افزایش بیان سیکلواکسیژناز-۲، در کارسینوم‌های کولورکتال، معده، پستان، پانکراس و ریه نشان داده شده است و به نظر می‌رسد که این آنزیم در مراحل مختلفی از پیشرفت سرطان از طریق افزایش تکثیر سلول‌های جهش یافته نقش دارد (۱۵).

یکی از مکانیسم‌های عملکردی آنزیم Cox-2، مهار آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌باشد. احتمالاً افزایش میزان سیکلواکسیژناز-۲ میزان اسید آراشیدونیک آزاد داخل سلولی را پایین آورده و از آپوپتوز جلوگیری می‌کند. به عبارتی سیکلواکسیژناز-۲ موجب حذف سیگنال‌های آپوپتوزی می‌شود (۱۶).

یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد بیان Cox-2 در نمونه‌های تومور بطور غیرمعنی داری بیشتر از نمونه‌های سالم است و



شدن انتخابی Cox-2، اثرات ضدتوموری را بوسیله بازگرداندن تعادل بین IL-10 و IL-12 بدن ایفاء می‌کند (۲۴).

همچنین، در مطالعه‌ای که توسط Yuan و همکاران (۲۰۱۰) صورت پذیرفت، مشاهده شد که افزایش بیان آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ در بدخیمی‌ها با تولید پروستاگلندین E2 سبب افزایش تمایز سلول‌های تنظیمی (Treg) می‌گردد. سلول‌های Treg، انواعی از سلول‌های ایمنی بدن هستند که در بلوکه نمودن فعالیت Th1 و Th2 یا هر دو دخالت دارند و می‌توانند هم پاسخ‌های ایمنی همورال و هم سلولی را مهار کنند. این سلول‌ها، تکثیر سلول‌های T اجرایی را مهار کرده، مراقبت ایمنی مؤثر ضد توموری را بر هم می‌زنند و مانع عمده‌ای برای توسعه موفقیت آمیز ایمونوتراپی سرطان‌ها هستند. افزایش سلول‌های T تنظیمی در محل تومور ممکن است رشد موضعی تومور را افزایش دهد (۲۵).

مکانیسم دیگری که نقش سیکلواکسیژنازها را در رشد تومور توجیه می‌کند، مربوط به نقش سیکلواکسیژنازها در ترشح آروماتاز است. سیکلواکسیژنازها از طریق تولید پروستاگلندین E2، منجر به افزایش آنزیمی به نام آروماتاز می‌گردند. این آنزیم که از آنزیم‌های موجود در سیتوکروم P450 است به نام CYP19 نیز معروف است و قادر است آندروژن‌ها را به استروژن تبدیل کند. از آن جایی که استروژن موجب افزایش رشد تومور می‌گردد، احتمالاً با مهار آروماتاز توسط مهارکننده‌های سیکلواکسیژناز میزان استروژن کاهش یافته و رشد تومور کمتر خواهد شد (۲۶).

یکی از عوامل مهمی که بر رشد و نمو تومورها تأثیر می‌گذارد، پشتیبانی عروقی تومور است. مطالعات فراوانی مبنی بر این که تومورها هیچ‌گاه نمی‌توانند بدون پشتیبانی عروقی رشد کنند، وجود دارد. فرایند رگ‌زایی یا آنژیوژنز نقش کلیدی در رشد تومور، گسترش و متاستاز آن دارد و این امر در رشد بسیاری از تومورها نظیر تومورهای سرطان تخمدان، ریه، کولون، پروستات، مغز و برخی تومورهای لنفوئیدی به خوبی اثبات شده است (۲۷). بیشتر تومورهای سفت برای فراهم کردن مواد غذایی ضروری برای رشد و زنده ماندن نیاز به رگ‌های خونی جدید دارند. در طی فرایند رگ‌زایی، سلول‌های توموری قادرند تشکیل رگ‌های جدید را از شبکه مویرگی موجود القاء کنند. مشخص شده است که آنزیم سیکلواکسیژناز-۲، قادر است از طریق فاکتورهای

آپوپتوز را از مسیر وابسته به Fas/FasL مهار می‌کند و به این ترتیب موجب افزایش رشد و تکثیر سلول‌های توموری کولون می‌گردد (۲۰).

همچنین، مطالعه Ernst و همکاران نشان داد که سیکلواکسیژناز-۲، مسیر انتقال پیام JAK/STAT را فعال کرده، پروتئین کینازهای JAK1، JAK2 و TYK2 دنباله‌های تیروزینی (Y759) واقع در دم سیتوپلاسمی gp130 را فسفریله می‌کنند. این فسفریلاسیون به شدت فاکتور نسخه برداری STAT3 را فعال می‌کند. مشخص شده است که فعالیت STAT3، رشد و بقای سلول‌های سرطانی معده را افزایش داده و با افزایش آنژیوژنز معده مرتبط می‌باشد. STAT3، در القای بیان ژن‌های بالابرنده آنژیوژنز، پیش برنده چرخه سلولی مانند سایکلین D1 و بقای سلولی نظیر سوروایوین<sup>۱</sup> دخالت دارد. همچنین، کاهش فعالیت سبب کاهش تعدادی از ژن‌های دخیل در پیشرفت چرخه سلولی، ضد آپوپتوزی، رگ‌زایی، تهاجم سلولی توموری و التهاب، می‌گردد، که نشان می‌دهد بیان نا به جا، برای بسیاری از جنبه‌های تومورزایی ضروری است (۲۱).

مشخص شده است که آنزیم Cox-2، با افزایش تولید آنزیم‌های متالوپروتئیناز ۲ و ۹ توانایی سلول‌های سرطانی را برای حمله به بافت‌های اطراف افزایش می‌دهد (۲۲). مطالعه Kuge و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که افزایش سیکلواکسیژناز-۲، با افزایش بیان ماتریکس متالوپروتئینازهای ۱ و ۲ مرتبط می‌باشد. شواهد نشان می‌دهند که افزایش قدرت تهاجمی سلول‌های توموری از افزایش تولید و فعال شدن آنزیم‌های قادر به تخریب غشاء پایه ناشی می‌شود. افزایش قدرت تهاجمی با فعال شدن متالوپروتئیناز-۲ غشاء و افزایش مقدار mRNA متالوپروتئیناز ۱ غشایی همراه می‌باشد. این آنزیم‌ها کلاژن ماتریکس غشاء پایه را تخریب و قدرت تهاجمی و حرکت سلول‌های توموری را تحریک می‌کنند (۲۳). بیشتر سرطان‌ها با کاهش قدرت سیستم ایمنی مانند تغییر در ترشح سیتوکین‌های فعال ایمنی همراه می‌باشند. در سرطان، میزان اینترلوکین ۱۰ (IL-10) افزایش و میزان اینترلوکین ۱۲ (IL-12) و فاکتور نکروز تومور (TNF $\alpha$ ) و اینترلوکین ۱ (IL-1) کاهش می‌یابد. این تغییرات با افزایش ساخت پروستاگلندین E2 و فعالیت Cox-2 همراه می‌باشد. ترکیب پروستاگلندین E2، تولید فاکتور نکروز تومور (TNF $\alpha$ ) را مهار و تولید اینترلوکین ۱۰ را القاء می‌کند. محققان معتقدند که مهار

انتخابی، در سلول‌های اندوتلیال بیان شده و موجب افزایش میتوز در سلول‌های اندوتلیال هستند، می‌شوند (۳۲). اتصال سلول به سلول باعث مشخص شدن شارژ الکتریکی و شرکت سلول در تمایز و پایداری هوموستاز بافت می‌گردد. در طی فرآیند سرطان‌زایی، این اتصال ارگانیزه شده، دچار تخریب می‌گردد که این تخریب در اثر تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی رخ می‌دهد. کاده‌رین-E، پروتئین اصلی چسبندگی سلولی در سلول‌های پوششی است و در تمایز و ساختمان بافتی نقش دارد. در بافت‌های پوششی، نقش میانجی‌گری کاده‌رین-E باعث چسبندگی بین سلولی وابسته به کلسیم، هموفیلیک و در نهایت نگهداری ساختار سالم بافت می‌شود. کاده‌رین-E، به طور مشخص توانایی سرکوب تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطانی را دارند. کاهش میزان بیان کاده‌رین-E در مراحل بالاتر و پیشرفته‌تر بیشتر کارسینوما مشاهده شده است. تصور می‌شود غیر فعال سازی یا کاهش عملکرد کاده‌رین-E، یک مرحله مهم در گسترش تومور و متاستاز است (۳۳). Chen و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که آنزیم سیکلوآکسیژناز-۲، با افزایش تولید پروستاگلندین E<sub>2</sub>، موجب کاهش کاده‌رین E در سطح سلول‌های پوششی می‌گردد و به این ترتیب می‌تواند موجب متاستاز و تهاجم کارسینوم‌ها گردد (۳۴).

آنژیوژنیک از قبیل فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) و نیز اینترلوکین-۸ (IL-۸) و همچنین ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ (MMP-۲) فرایند رگ‌زایی در سلول‌های توموری را القاء کند (۲۸، ۲۹). تولید VEGF و رسپتورش (Flk-۱) به‌طور مستقیم میزان رگ‌زایی در تومور را کنترل می‌کنند، به علاوه افزایش میزان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، سبب افزایش میکرووسل‌های بین توموری در سرطان سینه می‌شود، سلول‌های توموری تولید VEGF را در فیبروبلاست احاطه‌کننده تومورها القاء می‌کنند. علاوه بر این، فاکتور VEGF مسیرهای سیگنال‌دهی مختلفی را از قبیل، MAPK, PI3K, PKC فعال می‌کند. فعال‌سازی مسیر ERK1,2/MEK1 برای تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال ضروری می‌باشد (۳۰). ماتریکس متالوپروتئیناز-۲، غشای پایه را هضم می‌کند و منجر به ایجاد تغییراتی در ماتریکس خارج سلولی می‌گردد و آن را برای مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی مناسب می‌کند (۳۱). مطالعه Sun و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد که پروستاگلندین E<sub>2</sub> که توسط آنزیم سیکلوآکسیژناز-۲ تولید می‌شود، کلید اصلی در رگ‌زایی تومور است و موجب القای ماتریکس متالوپروتئینازهای ۲- و ۹- و اینترگرین  $\alpha_2\beta_1$  که به صورت

### نتیجه‌گیری:

می‌رسد تعیین بروز این مارکر می‌تواند نقش به‌سزایی را در پیش‌آگهی سرطان گاستروکارسینوما ایفاء کند، اگرچه این مسئله برای تأیید نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

با توجه به افزایش غیرمعنی‌دار بیان آنزیم سیکلوآکسیژناز ۲ در سلول‌های گاستروکارسینوما انسان، و ارتباط بین بیان ژن این آنزیم و پارامترهای مختلف نمونه‌های تومور، بنظر

### تقدیر و تشکر:

از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا تشکر و قدردانی می‌گردد.

### تعارض منافع:

تعارض منافی از نویسندگان گزارش نشده است.

## References

1. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *International Journal of Cancer* 45-1133 ;(5)132 ;2013. **DOI:** 10.1002/ijc.27711.
2. Maddams J, Utley M, Møller H. Projections of cancer prevalence in the United Kingdom, 2040–2010. *British Journal of Cancer* 1195 ;(7)107 ;2012. **DOI:** 10.1038/bjc.2012.366.
3. Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *British Journal of Pharmacology* 912-894 ;(3)164 ;2011. **DOI:** 10.1111/j.-1476 5381.2011.01276.x.
4. Ghosh N, Chaki R, Mandal V, Mandal SC. Cox2- as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacological Reports* 44-233 ;(2)62 ;2010. **DOI:** 10.1016/s-1734 0-70262(10)1140.
5. du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials. *Cancer* 44-1234 ;(6)115 ;2009. **DOI:** 10.1002/cncr.24149.
6. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 96-71 ;(2)58 ;2008. **DOI:** 10.3322/CA.2007.0010.
7. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* ;(1)64 ;2014 29-9. **DOI:** 10.3322/caac.21208
8. Hirasawa T, Gotoda T, Miyata S, Kato Y, Shimoda T, Taniguchi H, Fujisaki J, Sano T, Yamaguchi T. Incidence of lymph node metastasis and the feasibility of endoscopic resection for undifferentiated-type early gastric cancer. *Gastric Cancer* 148 ;(3)12 ;2009. **DOI:** 10.1007/s-0515-009-10120x.
9. Koeberle A, Zettl H, Greiner C, Wurglics M, Schubert-Zsilavecz M, Werz O. Pirinixic acid derivatives as novel dual inhibitors of microsomal prostaglandin E2 synthase1- and -5lipoxygenase. *Journal of Medicinal Chemistry* 76-8068 ;(24)51 ;2008. **DOI:** 10.1021/jm801085s.
10. Zidar N, Odar K, Glavac D, Jerse M, Zupanc T, Stajer D. Cyclooxygenase in normal human tissues—is COX-1 really a constitutive isoform, and Cox-2 an inducible isoform? *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9)13 ;2009b); 63-3753. **DOI:** 10.1111/j.4934.2008.00430-1582.x.
11. Harris R. Cyclooxygenase2- (cox2-) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacology* ;2009 67-55 ;(2)17. **DOI:** 10.1007/s8-8049-009-10787.
12. Tseng YC, Tsai YH, Tseng MJ, Hsu KW, Yang MC, Huang KH, Li AFY, Chi CW, Hsieh RH, Ku HH, Yeh TS. Notch2-induced COX-2 expression enhancing gastric cancer progression. *Molecular Carcinogenesis* ;2012 51-939 ;(12)51. **DOI:** 10.1002/mc.20865.
13. Moore RA, Derry S, McQuay HJ, Paling J. What do we know about communicating risk? A brief review and suggestion for contextualising serious, but rare, risk, and the example of cox2- selective and non-selective NSAIDs. *Arthritis Research & Therapy* ;2008 1)10): R20. **DOI:** 10.1186/ar2373.
14. Stasinopoulos I, Shah T, Penet M-F, Krishnamachary B, Bhujwalla ZM. COX2- in cancer: Gordian knot or Achilles heel? *Frontiers in Pharmacology* 10.3389 ;2013/fphar.2013.00034. **DOI:** 103389/fphar.2013.00034.
15. Yan M, Rerko RM, Platzer P, Dawson D, Willis J, Tong M, et al. -15Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a COX2- oncogene antagonist, is a TGF- $\beta$ -induced suppressor of human gastrointestinal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. -17468 ;(50)101 ;2004 73. **DOI:** 10.1073/pnas.0406142101.
16. Sharma S, Yang SC, Zhu L, Reckamp K, Gardner B, Baratelli F, Huang M, Batra RK, Dubinett SM. Tumor cyclooxygenase2-/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD+4 CD+25 T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Research* 20-5211 ;(12)65 ;2005. **DOI:** -0008/10.1158 5472.CAN0141-05-.
17. Huang D-S, Shen K-Z, Wei J-F, Liang T-B, Zheng S-S, Xie H-Y. Specific Cox2- inhibitor NS398 induces apoptosis in human liver cancer cell line HepG2 through BCL2-. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 204 ;(2)11 ;2005. **DOI:** 10.3748/wjg.v11.i2.204.
18. Pang RP, Zhou JG, Zeng ZR, Li XY, Chen W, Chen MH, Hu PJ. Celecoxib induces apoptosis in COX2-deficient human gastric cancer cells through Akt/GSK3 $\beta$ /NAG1- pathway. *Cancer Letters* ;(2)251 ;2007 77-268. **DOI:** 10.1016/j.canlet.2006.11.032.
19. Liu Y, Borchert G, Surazynski A, Phang J. Proline oxidase, a p-53induced gene, targets COX2-/PGE2 signaling to induce apoptosis and inhibit tumor

## References

- growth in colorectal cancers. *Oncogene* ;2008 37-6729 :(53)27. **DOI:** 10.1038/onc.2008.322.
20. Nzeako UC, Guicciardi ME, Yoon JH, Bronk SF, Gores GJ. Cox-2 inhibits Fas-mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* :(3)35 ;2002 9-552. **DOI:** 10.1053/jhep.2002.31774.
21. Ernst M, Najdovska M, Grail D, Lundgren-May T, Buchert M, Tye H, Matthews VB, Armes J, Bhathal PS, Hughes NR, Marcusson EG, Karras JG, Na S, Sedgwick JD, Hertzog PJ, Jenkins BJ. STAT3 and STAT1 mediate IL-11-dependent and inflammation-associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice. *The Journal of Clinical Investigation* 1727 :(5)118 ;2008. **DOI:** 10.1172/JCI34944.
22. Greenhough A, Smartt HJM, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A. The COX2-/PGE 2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 86-377 :(3)30 ;2009. **DOI:** 10.1093/carcin/bgp014.
23. Kuge Y, Takai N, Ishino S, Temma T, Shiomi M, Saji H. Distribution profiles of membrane Type-1 matrix metalloproteinase (MT-1MMP), matrix metalloproteinase2- (MMP2-) and cyclooxygenase2- (COX2-) in rabbit atherosclerosis: comparison with plaque instability analysis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 40-1634 :(9)30 ;2007. **DOI:** 10.1248/bpb.30.1634.
24. Obermajer N, Muthuswamy R, Lesnock J, Edwards RP, Kalinski P. Positive feedback between PGE 2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 505-5498 :(20)118 ;2011. **DOI:** 10.1182/blood365825-07-2011-.
25. Yuan X-L, Chen L, Li MX, Dong P, Xue J, Wang J, Zhang TT, Wang X, Zhang FM, Ge HL, Shen LS, Xu D. Elevated expression of Foxp3 in tumor-infiltrating Treg cells suppresses T-cell proliferation and contributes to gastric cancer progression in a COX-2-dependent manner. *Clinical Immunology* 88-277 :(3)134 ;2010. **DOI:** 10.1016/j.clim.2009.10.005.
26. Subbaramaiah K, Morris PG, Zhou XK, Morrow M, Du B, Giri D, Kopelovich L, Hudis CA, Dannenberg AJ. Increased levels of Cox2- and prostaglandin E 2 contribute to elevated aromatase expression in inflamed breast tissue of obese women. *Cancer Discovery* 65-356 :(4)2 ;2012. **DOI:** -2159/10.1158/8290.CD0241-11-.
27. shida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management* 213 :(3)2 ;2006. **DOI:** 10.2147/vhrm.2006.2.3.213.
28. Lavalle G, Bertagnolli A, Tavares W, Cassali G. Cox2- expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary Pathology* 80-1275 :(6)46 ;2009. **DOI:** 10.1354/vp.-08VP-0226-C-FL.
29. oysungnoen P, Wirachwong P, Bhattarakosol P, Niimi H, Patumraj S. Effects of curcumin on tumor angiogenesis and biomarkers, COX2- and VEGF, in hepatocellular carcinoma cell-implanted nude mice. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 15-109 :(2-1)34 ;2006. PMID: 16543625.
30. Timoshenko A, Chakraborty C, Wagner G, Lala P. COX-2-mediated stimulation of the lymphangiogenic factor VEGF-C in human breast cancer. *British Journal of Cancer* 63-1154 :(8)94 ;2006. **DOI:** 10.1038/sj.bjc.6603067.
31. Mrena J, Wiksten J, Nordling S, Kokkola A, Ristimäki A, Haglund C. MMP2- but not MMP9- associated with COX2- and survival in gastric cancer. *Journal of Clinical Pathology* 23-618 :(6)59 ;2006. **DOI:** 10.1136/jcp.2005.033761.
32. Sun WH, Sun YL, Fang RN, Shao Y, Xu HC, Xue QP, Ding GX, Chen YL. Expression of cyclooxygenase2- and matrix metalloproteinase9- in gastric carcinoma and its correlation with angiogenesis. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 13-707 :(12)35 ;2005. **DOI:** 10.1093/jjco/hyi196.
33. Xu K, Shuai Q, Li X, Zhang Y, Gao C, Cao L, Hu F, Akaike T, wang JX, Gu Z, Yang J. Human VE-cadherin fusion protein as an artificial extracellular matrix enhancing the proliferation and differentiation functions of endothelial cell. *Biomacromolecules* 66-756 :(3)17 ;2016. **DOI:** 10.1021/acs.biomac.5b01467.
34. Chen Z, Liu M, Liu X, Huang S, Li L, Song B, Li H, Ren Q, Hu Z, Zhou Y, Qiao L. Cox2- regulates E-cadherin expression through the NF- $\kappa$ B/Snail signaling pathway in gastric cancer. *International Journal of Molecular Medicine* 100-93 :(1)32 ;2013. **DOI:** 10.3892/ijmm.2013.1376.