Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Decreased activity of matrix metalloproteinases in gastric cancer stem cells by treatment with ibuprofen

Fatemeh Mahmoodi, Hassan Akrami*

Department of Biology, School of Science, Razi University, Kermanshah, Iran
*Corresponding author; E-mail: h.akrami@razi.ac.ir

Received: 3 April 2014 Accepted: 8 October 2014 First Published online: 10 April 2017
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2017 June;39(2):64-69

Abstract

Background: Metastasis is the main cause of cancer-related death. Matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role in tumor migration and are known as the main factors in metastasis. Cancer stem cells are a rare population of tumor cells responsible for initiation, spreading and growth of cancer. Ibuprofen, a member of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) family is used for the prevention and treatment of certain cancers. In the present study, we investigate the effect of ibuprofen on metalloproteinase activity in gastric cancer cells.

Methods: Gastric cancer stem cell of MKN45 cell lines was isolated by the spheroid colony formation technique. Gastric cancer stem cells were treated with various concentrations of ibuprofen to achieve the IC50 values. MMP activity in Gastric cancer stem cells treated with ibuprofen compared to control cells was investigated by zymography technique.

Results: Metalloproteinase activity was reduced in the cancer stem cells treated with ibuprofen in comparison with the control cancer stem cells.

Conclusions: Ibuprofen inhibits metastatic ability of gastric cancer cells by reducing metalloproteinase activity in gastric cancer stem cells.

Keywords: Ibuprofen, Zymography, Cancer Stem Cells, Metalloproteinase, Metastasis

How to cite this article: Mahmoodi F, Akrami H. [Decreased activity of matrix metalloproteinases in gastric cancer stem cells by treatment with ibuprofen]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2017 June;39(2):64-69. Persian.

© 2017 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

کاهش فعالیت متالوپروتئینازهای سلول های بنیادی سرطان معده در اثر تیمار با ایبوپروفن

فاطمه محمودی، حسن اکرمی*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
* نویسنده رابط؛ ایمیل: h.akrami@razi.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۳/۴/۱۲ **پذیرش:** ۱۳۹۳/۷/۱۶ انتشار برخط: ۱۳۹۶/۱/۲۱
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. خرداد و تیر ۱۳۹۶ ؛ ۳۹(۲): ۶۴-۶۹

چکیده

زمینه: متاستاز به گسترش سلول‌های سرطانی به محل‌های ثانویه گفته می‌شود که عامل اصلی مرگ‌های وابسته به سرطان می‌باشد. ماتریکس متالوپروتئینازها نقش مهمی در مهاجرت سلول های سرطانی دارند و از فاکتورهای اصلی در متاستاز هستند. سلول های بنیادی سرطانی جمعیتی کمیاب و متفاوت از سلول ها در بین سایر سلول های توموری هستند و مسئول شروع و گسترش سرطان شناخته شده اند. بیان متالوپروتئینازها در سلول های بنیادی سرطانی بیشتر از سایر سلول های توموری است. ایبوپروفن عضوی از خانواده داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی است که برای پیشگیری و درمان سرطان های خاصی استفاده می شود. در مطالعه حاضر اثر داروی ایبوپروفن بر روی میزان فعالیت متالوپروتئینازها در سلول های بنیادی سرطان معده بررسی شد.

روش کار: سلول های بنیادی سرطانی از رده سلولی سرطان معده MKN45 با استفاده از تکنیک تشکیل اجسام کروی spheroid colony (formation) جداسازی شد و پس از تیمار با غلظت های مختلف ایبوپروفن مقدار IC50 به دست آمد. سپس با کمک تکنیک زایموگرافی میزان فعالیت متالوپروتئینازها در سلول های بنیادی سرطان معده تیمار شده با ایبوپروفن نسبت به سلول های کنترل بررسی گردید.

یافته ها: میزان فعالیت متالوپروتئینازها در سلول های بنیادی سرطانی تیمار شده با ایبوپروفن نسبت به سلول های بنیادی سرطانی کنترل کاهش پیدا کرد.

نتیجه گیری: ایبوپروفن از طریق کاهش فعالیت متالوپروتئینازها در سلول های بنیادی سرطانی متاستاز را در سلول های سرطان معده کاهش می دهد.

کلید واژه ها: ایبوپروفن، ایموگرافی، سلول های بنیادی سرطانی، متالوپروتئیناز، متاستاز

نحوه استناد به این مقاله: محمودی ف، اکرمی ح. کاهش فعالیت متالوپروتئینازهای سلول های بنیادی سرطان معده در اثر تیمار با ایبوپروفن. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۶؛ ۳۹(۲): ۶۴-۶۹

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد

مقدمه

سرطان معده یکی از کشنده ترین و رایج ترین سرطان ها در تمام دنیا است (۱). سرطان معده معمولاً در مراحل پیشرفته تشخیص داده می شود و علی رغم مداخلات درمانی انجام شده افراد مبتلا جان خود را در اثر این بیماری از دست می دهند. به گونه ای که از هر ۹۸۸۰۰۰ مورد جدید مبتلا به بیماری در سال ۲۰۰۸، ۷۳۶۰۰۰ نفر تا سال ۲۰۱۲ مرده اند (۲, ۳). از مشکلات بیشتر سرطان ها از جمله سرطان معده تکثیر سلولی غیر قابل کنترل و متاستاز می باشد (۴). در حال حاضر، به خوبی می دانیم که جمعیتی متمایز و نادر از سلول ها به نام سلول های بنیادی سرطانی یا سلول های شروع کننده تومور در بین سایر سلول های توموری وجود دارند (۵) که در هر تومور بدخیم باعث رشد تومور (۶)، تهاجم موضعی ومتاستاز به بافت های دور دست می‌شوند (۷, ۸) همچنین این سلول ها مسئول مقاومت دارویی وبازگشت بیماری نیز شناخته شده اند (۹, ۱۰). سلول های بنیادی سرطانی دارای توانایی و ویژگی هایی مشابه سلول های بنیادی از جمله خود تجدیدی و تمایز به انواع سلول های مختلف هستند (۶). طی مطالعات انجام شده گذشته حضور این سلول ها در سرطان های مختلف از جمله سرطان معده گزارش شده است (۱۱–۱۴). برای مطالعه هر چه بهتر مسیر های ژنی و ویژگی های رفتاری سلول های بنیادی سرطانی ابتدا بایدآن ها را از سایر سلول های توموری جداسازی کرد. در حال حاضر چندین روش متفاوت برای شناسایی و جداسازی سلو ل های بنیادی سرطانی بر اساس ویژگی ها و بیومارکرهایشان وجود دارد (۱۵) و از جمله این روش ها، تشکیل اجسام کروی است که به شکل کار آمدی، دربافت توموری ورده های سلولی سرطان های مختلف موفق به جداسازی سلول های بنیادی سرطانی شده است (۱۶). ماتریکس متالوپروتئینازها (Matrix Metaloproteinase) خانواده‌ای از اندوپپتیدازهای حاوی عنصر روی (Zn) هستند که با شکستن باند های پپتیدی، پروتئین ها را تجزیه می کنند و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک که نیازمند تخریب ماتریکس خارج سلولی (ECM) هستند از جمله اندام زایی، ترمیم زخم، متاستاز تومور و رگ زایی نقش دارند(۱۷). بیان ماتریکس متالوپروتئینازها در سلول های بنیادی سرطانی نسبت به سایر سلول های توموری بالاتر است (۱۸). داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی Non-Steroidal Anti-Inflamatory Drugs(NSAIDs) اساسا" به عنوان کاهش دهنده‌ی درد جهت تسکین درد و کنترل التهاب استفاده می‌شوند. داروهای NSAID از قبیل ایبوپروفن با مکانیسم‌های مختلفی از قبیل مهار تکثیر سلولی و مهار رگ‌زایی و مهار متاستاز و القای آپوپتوز با پیشرفت و گسترش سرطان مقابله می‌کنند (۱۹, ۲۰). در مطالعه حاضر ما با استفاده از تکنیک تشکیل اجسام کروی در شرایط کشت سه بعدی و در حضور فاکتورهای رشد موفق به جداسازی سلول های بنیادی سرطانی از رده سلولی سرطان معده MKN45 شدیم. در مرحله بعد تاثیر داروی ایبوپروفن بر میزان فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها در سلول های بنیادی سرطانی توسط تکنیک زایموگرافی بررسی کردیم.

روش کار

رده سلولی سرطان معده MKN45 از موسسه انستیتو پاستور ایران خریداری شد. برای کشت این رده سلولی از محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 (DMEM/F1;Sigma) حاوی ۱۰ درصد سرم (Fetal Bovine Serum ;FBS; Gibco)، صد میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین و صد میکرویونیت در میلی لیتر پنی سیلین (Sigma) استفاده شد. پس از کشت، سلول ها در انکوباتور حاوی ۵ درصد دی اکسید کربن (CO2) با رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

۵۰۰۰۰ سلول از رده سلولی MKN45 که در فاز لگاریتمی رشد قرار داشتند به کمک تکنیک تریپان بلو شمارش شده و به فلاسک‌های سلولی ۲۵سانتی متری با چسبندگی کم (Low Attachment) که از قبل ۵ میلی لیتر محیط کشت DMEM/F12 بدون سرم حاوی فاکتور های رشد EGF ۵ng/ml ، bFGF ۱۰ ng/ml و ۲ درصد B27 به آن اضافه شده بود، افزوده شد و به مدت ۲۱ روز در انکوباتور ۳۷°C با ۵ درصد دی اکسید کربن (CO_2) و ۹۵ درصد رطوبت قرار گرفت. مراحل تشکیل کلونی‌ها توسط میکروسکوپ (Olympus) بررسی و ثبت شد.

مقاومت دارویی سلول های والدی MKN45 و سلول های بنیادی سرطانی جداسازی شده از آن نسبت به داروی ایبوپروفن در زمان ۲۴ ساعت اندازه گیری شد. ابتدا تعداد ۴۰۰۰۰ سلول از رده سلولی سرطان معده و سلول های بنیادی سرطانی در هر خانه از ظرف ۲۴ خانه‌ای کشت داده شد، سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف ایبوپروفن به مدت ۲۴ ساعت تیمار داده شدند. نهایتا" میزان زنده ماندن سلول‌ها با استفاده از روش نوترال رد بررسی شد.

بررسی اثر ایبوپروفن بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها در سلول های بنیادی سرطان معده اثر ایبوپروفن بر روی فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها توسط تکنیک زایموگرافی بررسی شد. ابتدا تعداد ۴۰۰۰۰ سلول از سلول های بنیادی جداسازی شده از رده سلولی MKN45 در هر خانه از ظرف ۹۶ خانه ای کشت داده شد و به آن ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM/F12 به علاوه ۱۰ درصد سرم وغلظت ۴۰۰ میکرومولار ایبوپروفن به سلول های بنیادی سرطان معده MKN45 اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت اولیه سلول ها محیط کشت رویی سلول ها جمع آوری شد. ژلاتین زایموگرافی مطابق پروتکل Millipore Technical Publications (Catalogue Number: MCPROTO009) انجام شد.

یافته ها

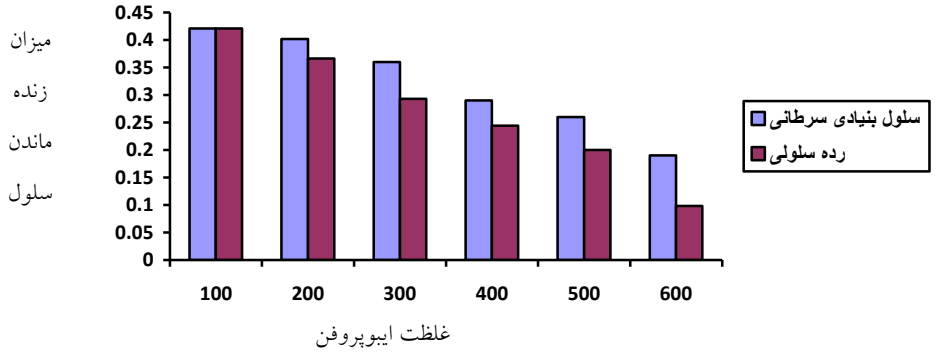
مراحل تشکیل اجسام کروی از سوسپانسیون تک سلولی شده رده سلولی MKN45 در فلاسک سلولی ۲۵ سانتی متری با چسبندگی کم و در شرایط کشت سه بعدی در شکل ۱ مشاهده می شود. بیشترین میزان آپوپتوز طی سه روز اول کشت در رده

سلولیMKN45 مشاهده شد. سلول هایی که دچار آپوپتوز نشدند به هم پیوسته و تشکیل کلونی های چند سلولی دادند. با گذشت زمان کلونی ها بزرگتر شده و مرکز کلونی ها نسبت به لبه ها تیره تر مشاهده شد. بعد از گذشت ۲۱ روز سلول های بنیادی سرطانی از سایر سلول ها به صورت کامل جداسازی شدند.

پس از جداسازی سلول های بنیادی سرطانی برای بررسی میزان مقاومت دارویی این سلول ها نسبت به رده های سلولی والدی، سلول های رده سلولی MKN45 و سلول های بنیادی سرطانی جداسازی شده از آن ها با غلظت های مختلفی از ایبوپروفن تیمار شد و پس از ۲۴ ساعت میزان زنده ماندن سلول‌ها بررسی شد که در نتیجه این بررسی مشخص شد که میزان زنده بودن سلول های بنیادی سرطانی نسبت به رده های سلولی بیشتر بود. میزان IC50 برای سلول های بنیادی سرطانی جداسازی شده از رده سلولی MKN45 ۴۰۰ میکرومولار به دست آمد (شکل ۲).

پس از بدست آوردن مقدار IC50 داروی ایبوپروفن برای سلول های بنیادی سرطان معده MKN45 تاثیر این دارو بر میزان فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها در سلول های بنیادی سرطانی با استفاده از تکنیک زایموگرافی بررسی شد. نتایج حاصل از زایموگرافی بیانگر کاهش فعالیت این آنزیم در سلول های بنیادی سرطانی تیمار شده با ایبوپروفن نسبت به فعالیت این آنزیم در نمونه کنترل بود (شکل ۳).

شکل۱: مراحل جداسازی سلول های بنیادی سرطانی از رده سلولی سرطان معدهMKN45 . الف– رده سلولیMKN45 که به صورت دانه دانه از هم جدا شده اند و شکل های ب،ج،د،ه به ترتیب تشکیل کلونی در روزهای ۳،۱۰،۱۴ و ۲۱ بعد از کشت را نشان می دهند. تصاویر توسط میکروسکوپ با بزرگنمایی ۲۰۰x ثبت شد.



شکل۲: مقاومت سلول های بنیادی سرطانی جداسازی شده از رده سلولی MKN45 تیمار شده با ایبوپروفن نسبت به رده سلول والدی.

شکل۳: بررسی اثر ایبوپروفن بر فعالیت متالوپروتئینازهای سلول های بنیادی سرطان معده MKN45 به ترتیب از سمت راست به چپ باندهای روشن ۱ فعالیت متالوپروتئینازها در سلول های بنیادی سرطان معده MKN45 کنترل و قسمت ۲ عدم فعالیت متالوپروتئینازها در سلول های تیمار شده با غلظت های ۴۰۰ میکرومولار از ایبوپروفن را نشان می دهد.

بحث

جمعیتی متمایز و نادر از سلول های شروع کننده سرطان در سرطان های سیستم خونساز، مغز و سینه شناسایی شده است. این سلول ها توانایی خود تجدیدی و توانایی بالقوه برای تولید انواع رده های سلولی مختلف در یک بافت توموری و همچنین تکثیر گسترده و تولید جمعیتی از سلول های بدخیم را دارا می باشند. سلول های بدخیم با این ویژگی های عملکردی، «سلول های بنیادی سرطانی» نامیده می شوند. سلول های بنیادی سرطانی منشاء همه سلول های بدخیم در یک تومور اولیه هستند و همچنین می-توانند جمعیت کوچکی از سلول های مقاوم به دارودرمانی را تشکیل دهند که باعث عود و برگشت تومور بعد از شیمی درمانی ویا متاستاز به بافت های دورتر شوند (۲۱, ۲۲). در حال حاضر چندین روش متفاوت برای شناسایی و جداسازی سلول های بنیادی سرطانی بر اساس ویژگی هایشان وجود دارد (۲۳). از جمله این روش ها، تشکیل اجسام کروی است که به شکل کار آمدی،در بافت توموری ورده های سلولی سرطان های مختلف موفق به جداسازی سلول های بنیادی سرطانی شده است (۲۴). در مطالعه حاضر نیز با استفاده از تکنیک تشکیل اجسام کروی در طی ۲۱ روز وبا استفاده از شرایط کشت غیر چسبنده و در حضور فاکتورهای رشد موفق به جداسازی سلول های بنیادی سرطانی از سایر سلول های توموری در رده سلولی MKN45 شدیم.همانگونه که عنوان شد سلول های بنیادی سرطانی مسئول مقاومت دارویی و بازگشت بیماری شناخته شده اند. از این ویژگی سلول های بنیادی سرطانی برای تایید بنیادی بودن این سلول ها استفاده می‌شود (۲۴). در این مطالعه نیز مقاومت سلول های بنیادی سرطانی جداسازی شده از رده سلولی MKN45 نسبت به غلظت های متفاوت داروی ایبوپروفن در برابر رده سلول والدی بررسی شد و مقدار IC50 برای سلول های بنیادی سرطانی رده سلولی MKN45 به دست آمد. همانگونه که انتظار می‌رفت مقاومت سلول های بنیادی سرطانی نسبت به سلول های والدی تیمار شده با غلظت های مختلف ایبوپروفن بیشتر بود. در شرایط کمبود اکسیژن، سلول‌های سرطانی فرایند متاستازی را انجام می‌دهند. از جمله موانعی که سلول سرطانی برخلاف سلول طبیعی قادر است از آن عبور کند، نفوذ در غشاهای پایه است تا توسط آن بتواند وارد جریان خون شود. سلول‌های سرطانی تجزیه ماتریکس برون سلولی را توسط آنزیم‌هایی به نام ماتریکس متالوپروتئینازها (MMP) انجام می‌دهند. MMP در فرآیندهای متاستاز و رگ‌زایی نقش دارند. داروهای NSAID با مهار مسیر سیگنالی ERK بیان MMP را مهار می‌کنند. این داروها بیان مهار کننده‌های MMP از قبیل TIMP، PCPE، TFPI-2 و RECK را بالا برده و MMP را مهار می‌کنند. پروتئین‌های SPARC، Cyr ۶۱ و CTGF در رگ‌زایی، آپوپتوز، تکثیر سلولی و متاستاز نقش دارند. داروهای NSAID با فعال نمودن این پروتئین‌ها در مهار متاستاز نقش دارند (۲۵). طی مطالعات انجام شده گذشته ثابت شده است که سلول های بنیادی سرطانی نسبت به سایر سلول های توموری قدرت تهاجم و متاستازی بیشتری دارند. از طرفی بیان متالوپروتئینازها نیز در این سلول ها بیشتر از سایر سلول های توموری است (۲۶). در این تحقیق ما میزان فعالیت متالوپروتئینازها در سلول های بنیادی سرطانی جداسازی شده از رده سلولی MKN45تیمار شده با غلظت های ۴۰۰ میکرومولار بررسی کردیم که نتایج بیانگر کاهش فعالیت متالوپروتئینازهای تیمار شده با ایبوپروفن نسبت به سلول های بنیادی سرطانی کنترل بود.

نتیجه گیری

متاستاز یکی از دلایل اصلی مرگ وابسته به سرطان است و یکی از فاکتور های مهم در متاستاز ماتریکس متالو پروتئیناز ها هستند. مطالعات انجام شده در سال های اخیر سلول های بنیادی سرطانی را که به تعداد بسیار اندک در بین سایر سلول های توموری حضور دارند را مسئول شروع وگسترش سرطان می دانند. مطالعات گسترده ای برای پی بردن به مکانیسم، عوامل وداروهای موثر بر این سلول ها در سرتاسر جهان در حال انجام است. در تحقیق حاضر نیز میزان فعالیت متالوپروتئینازها در سلول های بنیادی سرطان معده تیمار شده با ایبوپروفن بررسی شد و بنابر نتایج حاصل می توان عنوان کرد که ایبوپروفن متاستاز را در سلول های سرطان معده از طریق کاهش فعالیت متالوپروتئینازها در سلول های بنیادی سرطانی کاهش می دهد.

قدردانی

این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی و ملکولی دانشگاه رازی کرمانشاه صورت پذیرفت. از کلیه دوستان و همکاران محترمی که در انجام این پروژه ما را یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Yang L, Ping Y-F, Xi Yua FQ, Guo Z-J, Qian C, Cui Y-H, et al. Gastric cancer stem-like cells possess higher capability of invasion and metastasis in association with a mesenchymal transition phenotype. *Cancer Letters* 2011; **310**: 46-52. doi: 10.1016/j.canlet.2011.06.003
2. Rocco A, Compare D, Nardone G. Cancer stem cell hypothesis and gastric carcinogenesis: experimental

evidence and unsolved questions. *World J Gastrointest Oncol* 2012; **4**(3): 54-59. doi: 10.4251/WJGO.v4.i3.54
3. Nagini S. Carcinoma of the stomach: a review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World J Gastrointest Oncol* 2012; **4**(7): 156-169. doi: 10.4251/WJGO.v4.i7.156
4. Gigek C. Epigenetic mechanisms in gastric cancer. *epigenomics* 2012; **4**: 279-294. doi: 10.2217/epi.12.22
5. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004; **23**: 7274-7282. doi: 10.1038/sj.onc.1207947
6. Reya T, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature* 2001; **414**: 105-110. doi:10.1038/35102167
7. Wicha MS. Cancer stem cells and metastasis: lethal seeds. *Clin Cancer Res* 2006; 1**2**(19): 5606.
8. Yang L, Ping Y-F, Xi Yua FQ, Guo Z-J, Qian C, Cui Y-H, et al. Gastric cancer stem-like cells possess higher capability of invasion and metastasis in association with a mesenchymal transition phenotype. *Cancer Letters* 2011; **310:** 46-52.
9. Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**(7): 545-554. doi: 10.1038/nrc2419
10. Dean M, Fojo T, Bates S. tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**(4): 275-284. doi:10.1038/nrc1590
11. Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SSW, Wataru, Shibata, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker cd44. *Stem Cells* 2009; **27**(5): 1006-1020.
12. Saikawa Y, Fukuda K, Tsunehiro Takahashi, Nakamura R, Takeuchi H, Kitagawa Y. Gastric carcinogenesis and the cancer stem cell hypothesis. *Gastric Cancer* 2010; **13**: 11–24. doi:10.1007/s10120-009-0537-4
13. Neethan, Lobo, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2007; **23**: 675-699. doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154
14. Beck B. A vascular niche and a vegf–nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature* 2011; **478**: 399-403. doi:10.1038/nature10525
15. Tirino V, Desiderio V, Paino F, Papaccio G, Rosa MD. Methods for cancer stem cell detection and isolation,methods in molecular biology somatic stem cells book.*espringer*. 2012; **879**: 513-529. doi: 10.1007/978-1-61779-815-3_32
16. Chen S-F, Chang Y-C, Nieh S, Liu C-L, Yang C-Y, Lin Y-S. Nonadhesive culture system as a model of rapid sphere formation with cancer stem cell properties. *Plos ONE* 2012; **7**(2): 1-11.
17. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (mmps): chemical–biological functions and (q)sars. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2007; **15**: 2223-2268.
18. Li F, Tiede B, Massagué J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Research* 2007; **17**: 3-14. doi: 10.1038/sj.cr.7310118
19. Ulrich C. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. *Nature Reviews* 2006; **6**: 130-140. doi:10.1038/nrc1801
20. Harris R. Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective cox-2 blockade (Review). *Oncology Reports* 2005; **13**: 559-583. doi: 10.3892/or.13.4.559
21. Jordan CT, Guzman ML. Mechanisms of disease cancer stem cells. *The New England Journal of Medicine* 2006; **355**: 1253-1261. doi: 10.1056/NEJMra061808
22. Soltysova A, V.A. Ca. Cancer stem cells. *Neoplasma* 2005; **52**: 1-6.
23. Tirino V. Methods for cancer stem cell detection and isolation. *Methods In Molecular Biology Somatic Stem Cells* 2012; **32**: 513-529. doi: 10.1007/978-1-61779-815-3-32
24. Liu J, Ma L, Xu J, Liu C, Zhang J, Liu J, et al. Spheroid body-forming cells in the human gastric cancer cell line mkn-45 possess cancer stem cell properties. *International Journal of Oncology* 2013; **42**: 453-459.
25. Bonelli P. Changes in the gene expression profile of gastric cancer cells in response to ibuprofen: a gene pathway analysis. *Pharmacogenomics* 2011; **11**: 412-428. doi:10.1038/tpj.2010.55
26. Katia Sampieri R. Cancer stem cells and metastasis. *Seminars In Cancer Biology* 2012; **22**: 187-193. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.03.002