Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences

Farhadi, et al. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2024;45(5):534-544.
doi:10.34172/mj.2024.055
https://mj.tbzmed.ac.ir

TUOMS PRESS

Original Article

MMP9 gene expression alterations in gastric cancer and their role in cell migration

Arezoo Farhadi[1], Shohre Zare Karizi[1], Mehdi Ebrahimi[1], Javad Behroozi[2, 3*]

[1]Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Life Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
[2]Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3]Cancer Epidemiology Research Center, AjA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

ARTICLE INFO

Article History:
Received: 21 Oct 2023
Accepted: 16 Dec 2023
ePublished: 8 Oct 2024

Keywords:
- Gastric cancer
- *MMP9*
- Gene expression
- Cell migration

Abstract

Background. Gastric cancer (GC) is a significant global health concern, ranking as the fifth most common malignant tumor and the fourth leading cause of cancer-related deaths worldwide. The primary treatment approach for metastatic GC is systemic chemotherapy. Matrix metalloproteinases (MMPs) are a group of zinc-dependent proteolytic enzymes that play crucial roles in various physiological processes. Among them, *MMP9* is known for its complexity and its ability to degrade the components of the extracellular matrix. This study aimed to compare the expression of the *MMP9* gene in cancerous and adjacent tissue of GC and evaluate its knockdown effects on GC cell line migration.

Methods. In the present study, 50 tumor tissues and adjacent non-tumor control tissues were collected from patients with GC. Using a real-time polymerase chain reaction, the expression levels of the *MMP9* gene were assessed in these samples. Additionally, bioinformatics methods were employed to analyze *MMP9* expression in a larger cohort of GC patients. Furthermore, a data mining study was conducted to investigate the potential impact of *MMP9* expression on the overall survival of GC patients. In addition, appropriate small interfering RNA (siRNA) was synthesized to suppress the *MMP9* oncogene and transfected into the GC cell line, and migration was investigated eventually.

Results. The results demonstrated significant upregulation of the *MMP9* gene in tumor samples compared to tumor-adjacent samples, with a notable fold change of 4.6. This consistent finding was further supported by our bioinformatics analysis. Additionally, our pan-cancer analysis of TCGA data revealed that *MMP9* is upregulated in various malignant tumors, indicating its potential relevance beyond GC. After *MMP9* siRNA transfection, the migration rate of the cancer cells was evaluated by a wound-healing assay. The GC cell migration and invasion significantly decreased after the knockdown of *MMP9* by specific siRNA.

Conclusion. In general, our study showed *MMP9* upregulation in GC and suggested that the transfection of *MMP9* gene siRNA could reduce invasion and migration.

Practical Implications. siRNAs are promising medical breakthroughs for the treatment of *MMP9*-related cancer invasion and migration. However, there is still a need to deepen our understanding of *MMP9* gene function in tumorigenesis.

How to cite this article: Farhadi A, Zare Karizi Sh, Ebrahimi M, Behroozi J. *MMP9* gene expression alterations in gastric cancer and their role in cell migration. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2024; 46(5):534-544. doi:10.34172/mj.2024.055. Persian.

*Corresponding author; Email: jvdbehroozi@gmail.com
© 2024 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 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.

Extended Abstract

Background

Gastric cancer (GC) stands as a pressing global health issue, ranking as the fifth most common malignant tumor and the fourth leading cause of cancer-related deaths worldwide. The primary treatment modality for metastatic GC remains systemic chemotherapy. The primary reason for mortality from GC is invasion and metastasis. For cancerous epithelial cells to invade, they must penetrate the stromal tissue and break down the extracellular matrix (ECM) barrier. At this stage, proteolytic enzymes play a crucial role by digesting the ECM and its components, facilitating the metastatic spread of cancer cells to other tissues. Matrix metalloproteinases (MMPs) form a vital group of zinc-dependent proteolytic enzymes that are key players in various physiological processes. Among these, *MMP9* is particularly renowned for its complexity and its capability to degrade components of the ECM. Therefore, in this study, it was attempted to compare the expression of the *MMP9* gene in cancerous and adjacent tissue of GC and to assess its knockdown effects on the invasion of GC cell lines.

Methods

A total of 50 tumor tissues and marginal non-tumor control tissues were obtained from GC patients. RNA was purified from normal and marginal samples using the RNX-Plus solution, according to the manufacturer's protocol. The RNA samples were reverse-transcribed into complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) using the BioFACT cDNA Synthesis Kit. The cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA with random hexamer and oligo (dT) as reaction primers in a final volume of 20 µL following the manufacturer's protocol. Complementary DNA was then used for quantification (with the *GAPDH* gene as a control) by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), which was performed using BioFACT qPCR Master Mix and the StepOnePlus RT-PCR system. Another bioinformatics database was utilized to further investigate changes in the gene expression of *MMP9* in healthy and cancerous samples. For this purpose, the gene expression levels of *MMP9* in 35 healthy stomach tissues and 361 cancerous stomach tissues were retrieved from the Cancer Genome Atlas (TCGA) database, and the expression of this gene was examined in different stages of cancer. Raw paired-end RNA-seq samples related to eighty primary gastric adenocarcinoma and their paired non-tumor control tissues were retrieved from the publicly available Gene Expression Omnibus database. Gene expression data of *MMP9* and the overall survival time of patients with GC were obtained from studies GSE29272, GSE15459, GSE62254, GSE14210, GSE51105, and GSE22377 from the Kaplan-Meier database. These studies, in total, encompass information on gene expression and survival time for 875 patients with GC. These patients were divided into high- and low-expression groups based on the gene expression of *MMP9*, and their survival times were measured and compared. To investigate the effect of the inhibition of the *MMP9* gene expression on cell migration, appropriate siRNA was synthesized to suppress the *MMP9* oncogene and transfected into the GC cell line, and a qualitative wound-healing assay was employed finally.

Results

In the present study, changes in the expression of the *MMP9* gene were evaluated in tumor samples and tumor-adjacent tissues from 50 patients with GC. The quantitative analysis of gene expression indicated that the level of expression in tumor samples was higher than in tumor-adjacent tissues. Specifically, the average expression level of the *MMP9* gene in tumor samples was 4.59 times higher than in tumor-adjacent tissue samples ($P<0.01$). Furthermore, the expression data of another cohort was retrieved to investigate changes in the expression of this gene in GC. The results of the analyses represented that the expression of this gene in the tumor samples of patients was higher compared to tumor-adjacent tissue samples. Moreover, it demonstrated a significant increase in expression

compared to adjacent tissues in almost all stages of GC. These observations were robustly reinforced by our bioinformatics analysis. Furthermore, our comprehensive pan-cancer analysis of TCGA data unearthed compelling evidence indicating that *MMP9* exhibits upregulation in various malignant tumors, thus underscoring its potential relevance and impact extending beyond GC. Finally, the relationship between *MMP9* gene expression and the prognosis of patients with GC was examined using survival analysis. To this end, patients were divided into two groups based on high and low expression of the gene, and their survival times underwent investigation. A significant difference in survival time was observed between patients with high and low expressions of the *MMP9* gene. Lower expression of this gene was associated with a decreased survival time for patients. Our findings confirmed that the average survival time for patients with GC who exhibit high expression of this gene was 37.9 months, whereas for patients with a low expression of this gene, it was 26.5 months. Subsequently, a wound-healing assay was performed to evaluate the migration rate of the cancer cells following *MMP9* siRNA transfection. Encouragingly, the findings elucidated a significant reduction in both migration and invasion of GC cells subsequent to the specific siRNA-mediated knockdown of *MMP9*.

.

Conclusion

In summary, the results revealed that the expression of the *MMP9* gene was upregulated in GC. This upregulation was observed not only in the advanced stages of cancer but also in the early stages. Moreover, the inhibition of this gene's expression could significantly suppress cell migration and, consequently, metastasis.

فرهادی و همکاران. مجله *پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز*. آذر و دی ۱۴۰۳؛ ۴۶(۵): ۵۳۴-۵۴۴.
doi:10.34172/mj.2024.055
https://mj.tbzmed.ac.ir

مقاله پژوهشی

تغییرات بیان ژن *MMP9* در سرطان معده و نقش آن در مهاجرت سلولی

آرزو فرهادی[۱]، شهره زارع کاریزی[۱]، مهدی ابراهیمی[۱]، جواد بهروزی[۲و۳*]

[۱]گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین، پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
[۲]گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۳]مرکز تحقیقات اپیدمیولوژی و پایش سرطان، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:
دریافت: ۱۴۰۲/۷/۲۹
پذیرش: ۱۴۰۲/۹/۲۵
انتشار برخط: ۱۴۰۳/۷/۱۷

کلیدواژه ها:
- سرطان معده
- *MMP9*
- بیان ژن
- مهاجرت سلولی

چکیده

زمینه. سرطان معده یک نگرانی مهم بهداشت جهانی است و به‌عنوان پنجمین تومور بدخیم شایع و چهارمین علت مرگ و میر مرتبط با سرطان در سراسر جهان رتبه‌بندی می‌شود. رویکرد درمانی اولیه برای سرطان معده متاستاتیک شیمی‌درمانی سیستمیک است. ماتریکس متالوپروتئینازها گروهی از آنزیم‌های پروتئولیتیک وابسته به روی هستند که نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیک مختلف دارند. در میان آن‌ها، *MMP9* به دلیل پیچیدگی و توانایی آن در تخریب اجزای ماتریکس خارج سلولی شناخته شده است. این مطالعه با هدف مقایسه بیان ژن *MMP9* در بافت سرطانی و مجاور سرطان معده و ارزیابی اثرات سرکوب بیان این ژن بر تهاجم رده سلولی سرطان معده انجام گردید.

روش‌کار. در مطالعه حاضر تعداد ۵۰ نمونه بافت تومور به همراه بافت حاشیه تومور از بیماران مبتلا به سرطان معده جمع‌آوری شد و بیان ژن *MMP9* با استفاده از ریل تایم PCR بررسی شد. همچنین با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی بیان ژن *MMP9* در یک کوهورت بزرگ از بیماران مبتلا به سرطان معده آنالیز شد. برای بررسی نقش پیش‌آگهی بیان ژن *MMP9* در بقاء کلی بیماران از یک مطالعه داده‌کاوی استفاده گردید. همچنین siRNA مربوط به این ژن به رده سلول‌های سرطانی معده وارد شده و اثرات آن بر مهاجرت سلولی بررسی شد.

یافته‌ها. نتایج مطالعه ما افزایش قابل‌توجهی در بیان ژن *MMP9* در نمونه‌های توموری نشان داد که ۴/۶ برابر نمونه‌های حاشیه تومور بود. آنالیزهای بیوانفوماتیکی بیان ژن همین یافته را تأیید نمود. بررسی بین سرطانی، افزایش بیان *MMP9* را در سرطان‌های مختلف نشان داد که مشخص‌کننده نقش این ژن فراتر از سرطان معده می‌باشد. پس از انتقال siRNA مربوط به *MMP9*، میزان مهاجرت سلول‌های سرطانی با روش ترمیم زخم مورد ارزیابی قرار گرفت. مهاجرت سلول‌های سرطانی معده پس از سرکوب *MMP9* توسط siRNA ویژه آن به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت.

نتیجه‌گیری. به‌طورکلی، مطالعه ما نشان داد که *MMP9* در سرطان معده به‌صورت افزایشی تنظیم می‌شود. همچنین مشخص گردید که انتقال siRNA ژن *MMP9* باعث کاهش مهاجرت در سلول‌های سرطانی معده می‌شود.

پیامدهای عملی. تکنیک siRNA یک پیشرفت پزشکی امیدوارکننده برای درمان متاستاز سرطان مرتبط با *MMP9* است. بااین‌حال، هنوز نیاز به تعمیق درک ما از عملکرد ژن *MMP9* در تومورزایی وجود دارد.

مقدمه

سرطان معده یک بیماری کشنده با آمار بقاء کلی (Overall survival) ضعیف در سراسر جهان است. بر اساس آمار موجود این سرطان پنجمین سرطان شایع و چهارمین علت مرگ و میر ناشی از سرطان می‌باشد.[۱] سرطان معده را می‌توان به دو زیرگروه پاتولوژیک کاملاً جدا از هم تقسیم کرد که نماهای اپیدمیولوژیک و پیش‌آگهی متفاوتی از هم دارند. در نوع منتشر سرطان معده (Diffuse type) که نوع غالب می‌باشد، تمایز بسیار اندک است و باعث محو ساختمان غددی معده می‌شود. این نوع سرطان معده در سراسر جهان شیوع مشابهی دارد و در سنین پائین تر روی می‌دهد و با پیش‌آگهی بدتری همراه است. نوع روده‌ای (Intestinal) سرطان معده باعث تشکیل ساختمان‌هایی می‌شود که

* نویسنده مسؤول؛ ایمیل: jvdbehroozi@gmail.com

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز CC BY 4.0 (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.

مشابه غدد روده‌ای است. این شکل از سرطان ارتباط بیشتری با عوامل خطرساز غذایی و محیطی دارد و بیشتر در مناطق با بروز بالای سرطان معده اتفاق می‌افتد. آدنوکارسینوم معده اصلی‌ترین نوع سرطان معده می‌باشد.[۲،۳]

پیشرفت‌هایی در فهم ما از تغییرات ژنتیکی مورد وقوع در سرطان معده ایجاد شده است که بیشتر در نوع روده‌ای است. ژنی که بیشترین توجه به آن معطوف است ژن سرکوبگر تومور *p53* است. جهش در این ژن در سرطان معده شیوع بالایی دارد.[۴] ژن دیگری که در پاتوژنز آدنوکارسینوم معده مطرح است، ژن *APC* است. جهش در این ژن با پولیپوز آدنوماتوز خانوادگی ارتباط دارد. بیماران مبتلابه پولیپوز آدنوماتوز خانوادگی حدود ده برابر بیشتر از جمعیت عمومی در معرض خطر ابتلا به سرطان معده می‌باشند و این نکته از نقش ژن *APC* در پاتوژنز برخی اشکال سرطان معده حمایت می‌کند. جهش ژن *APC* در حداکثر ۲۰ درصد از سرطان‌های معده تک‌گیر (Sporadic) و آدنوم‌های معده‌ای به وقوع می‌پیوندد. به‌ویژه در سرطان‌های روده‌ای با تمایز خوب تا حد ٦٠ درصد هم از این جهش وجود دارد. همچنین جهش در ژن *CDH1* در نوع توارثی سرطان معده به‌وفور دیده می‌شود.[۵]

علاوه بر جهش‌های ژنی، تغییرات مولکولی دیگری نیز در پاتوژنز سرطان نقش دارند. ازجمله این تغییرات از دست رفتن تنظیم بیان ژن‌های مهم می‌باشد.[۶] گسترش سرطان معده پیچیده و چندمرحله‌ای است که شامل تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی در ژن‌های مولد سرطان، ژن‌های سرکوب‌گر تومور، ژن‌های اصلاح‌کننده DNA، تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی و مولکول‌های سیگنالی است.[۷] اصلی‌ترین دلیل مرگ و میر ناشی از سرطان معده تهاجم و متاستاز می‌باشد. برای تهاجم سلول‌های سرطانی اپیتلیال باید به داخل بافت پایه نفوذ کنند و سد ماتریکس خارج سلولی را از بین ببرند. در این مرحله آنزیم‌های پروتئاز دارای نقش بسیار مهمی هستند که با هضم ماتریکس خارج سلولی و ترکیبات آن باعث تسهیل متاستاز دادن سلول‌های سرطانی به بافت‌های دیگر می‌شوند.[۸] تاکنون به‌خوبی روشن شده است که سلول‌های توموری نسبت به سلول‌های سالم میزان پروتئاز بیش‌تری تولید می‌کنند و ارتباط مثبت بین میزان تهاجم سلول‌ها و سطح پروتئاز آن‌ها هم در مدل‌های تومور آزمایشگاهی و هم در تومورهای بالینی انسانی ثابت شده است.[۹] نقش کلی پروتئازها و به‌خصوص ماتریکس متالوپروتئینازها در متاستاز و تهاجم سلول‌های توموری کاملاً اثبات شده و مشخص‌شده که این آنزیم‌ها با تسهیل کردن شکستن اتصالات پیوندی و هضم ترکیبات ماتریکس خارج سلولی به این فرآیند کمک می‌کنند.[۱۰] ماتریکس متالوپروتئینازها، خانواده‌ای از آنزیم‌های پروتئولیك هستند که در هضم بسیاری از ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و بافت غشاء پایه ایفای نقش می‌کنند و از این لحاظ در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی دارای اهمیت هستند.[۱۲،۱۳] از بین این گروه *MMP9* تنها عضو این خانواده است که به خاطر دارا بودن ساختار ۳ تایی فیبرونکتین قادر به اتصال و هضم کلاژن به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب غشاء پایه است و از این نظر تغییرات بیانی این ژن می‌تواند در سرطانی شدن سلول‌ها و تغییر رفتار آن‌ها دارای عملکردهای مهمی باشد.[۱۳]

در سال‌های اخیر افزایش فهم مولکولی از پاتوژنز سرطان منجر به ارایه راهکارهای درمانی جدیدی برای مواجهه با انواع سرطان شده است. یکی از دیدگاه‌های نسبتاً جدید متوقف کردن ژن‌های درگیر در متاستاز برای مهار سرطان می‌باشد و این نوع تحقیقات در مطالعات بالینی و تجربی در حال انجام می‌باشد.[۱۴،۱۵] بر این اساس هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی تغییرات و نقش بیان ژن *MMP9* در سرطان معده و اثر مهار آن بر میزان مهاجرت سلول‌های سرطانی می‌باشد.

روش‌کار

مطالعه حاضر با مصوبه اخلاق به شناسه IR.AJAUMS.REC.1400.272 و با استفاده از ۵۰ نمونه بافت توموری و بافت حاشیه توموری انجام گردید. نمونه‌های موردمطالعه از بیمارانی به‌دست‌آمده بودند که در انستیتو کانسر تحت عمل جراحی سرطان معده قرار گرفته بودند و از آن‌ها رضایت‌نامه آگاهانه اخذشده بود. معیار ورود نمونه به مطالعه، آدنوکارسینوم‌های معده از نوع منتشره بودند که قبل از جراحی تحت شیمی‌درمانی قرار نگرفته باشند. در صورتی بیمار قبل از عمل، داروی شیمی‌درمانی استفاده کرده بود یا با نظر پاتولوژیست سرطان از نوع آدنوکارسینوم منتشره نبود، نمونه از مطالعه حذف گردید. نمونه‌ها با استفاده از تانک ازت به آزمایشگاه منتقل شده و تا انجام آزمایشات در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

RNA تام طبق پروتکل محلول RNX-plus شرکت سیناژن و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید.[۱۶] نمونه‌های RNA استخراج‌شده ازلحاظ کمیت توسط نانودراپ موردبررسی قرار گرفتند. قبل از انجام استخراج، نمونه‌های بافتی با استفاده از نیتروژن مایع و هاون به‌صورت پودر درآمد. RNA استخراج‌شده با استفاده از ژل الکتروفورز و دستگاه نانودراپ تحت کنترل کیفی و کمی قرار گرفت و تا مرحله سنتز cDNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. همچنین از کیت DNase شرکت تاکارا

برای حذف مولکول‌های DNA استفاده گردید. در ادامه با استفاده از کیت بایوفکت و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده سنتز cDNA انجام شد. برای این منظور ۱۰۰۰ نانوگرم از RNA استخراج‌شده با Master Mix، Random Hexamer و الیگو dT مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با دستگاه ترمال سایکلر انکوبه گردید. در نهایت مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد تیمار شد و محصول حاصل در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

بررسی تغییرات بیان ژن *MMP9* با استفاده از روش Real-Time PCR و به‌وسیله ترموسایکلر StepOnePlus شرکت Applied Biosystems (آمریکا) انجام شد. برای این منظور حجم کل ۲۰ میکرولیتر شامل مستر میکس (۱۰ میکرولیتر)، آب دیونیزه عاری از نوکلئاز (۶ میکرولیتر)، پرایمر رفت (۱ میکرولیتر)، پرایمر برگشت (۱ میکرولیتر) و cDNA (۲ میکرولیتر) بود. در مرحله اول دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه انجام گردید. در ادامه ۴۰ چرخه تکثیر، شامل دناتوراسیون در دمای ۹۰ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و اتصال و طویل سازی در دمای ۶۰ درجه به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. در نهایت بررسی منحنی ذوب در دمای ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. کمی‌سازی نسبی بیان ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام گردید. در این تحقیق بر اساس مطالعات قبلی از ژن *GAPDH* به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. طراحی پرایمر با توجه به توالی ژن‌های انسانی و با استفاده از ابزار Primer BLAST و سایت NCBI انجام گردید.[۱۷] توالی مربوط به پرایمرهای مورداستفاده درجدول ۱ آورده شده است.

به‌منظور بررسی بیشتر تغییرات بیان ژن *MMP9* در نمونه‌های سالم و سرطانی از یک پایگاه داده بیوانفورماتیکی دیگر استفاده شد. برای این کار میزان بیان ژن *MMP9* در ۳۵ بافت سالم معده و ۳۶۱ بافت سرطانی معده از پایگاه داده (The Cancer Genome Atlas, TCGA) بازیابی گردید و میزان بیان این ژن در مراحل مختلف سرطان مورد بررسی قرار گرفت. همچنین دیتای خام توالی یابی ترانسکریپتوم مربوط به ۸۰ جفت بافت تومور و حاشیه تومور معده از پایگاه GEO دانلود و میزان بیان ژن *MMP9* در این نمونه‌ها مقایسه گردید.

با توجه به گذشت مدت‌زمان محدود از نمونه‌گیری‌های بالینی، امکان انجام آنالیزهای بقاء بر روی این بیماران وجود نداشت. به همین منظور اطلاعات میزان بیان ژن *MMP9* و مدت‌زمان بقاء بیماران مبتلابه سرطان معده مربوط به مطالعه‌های GSE29272، GSE15459، GSE62254، GSE14210، GSE51105 و GSE22377 از پایگاه داده کاپلان-مایر دریافت گردید.[۱۸] و بر اساس این اطلاعات منحنی‌های مختلف مدت‌زمان بقاء برای بیماران رسم شد. این مطالعات درمجموع شامل اطلاعات بیان ژن و مدت‌زمان بقاء ۸۷۵ بیمار مبتلابه سرطان معده می‌باشند. این بیماران بر اساس بیان ژن *MMP9* در دو گروه بیان بالا و بیان پایین تقسیم‌بندی شده (بهترین cut-off کاپلان-مایر) و مدت‌زمان بقاء آن‌ها سنجیده و مقایسه شد.

به‌منظور بررسی تغییرات بیان ژن *MMP9* در سرطان‌های مختلف، داده‌های مربوط به اطلس ژنوم سرطان (TCGA) بازیابی گردید. سرطان‌هایی که تعداد نمونه آن‌ها در هرکدام از گروه‌های سالم و سرطانی کمتر از ۱۰ نمونه بود از آنالیز کنار گذاشته شد. در نهایت تغییرات بیان ژن *MMP9* در کارسینوم اوروتلیال مثانه (BLCA)، کارسینوم تهاجمی پستان (BRCA)، آدنوکارسینوم کولون (COAD)، کارسینوم مری (ESCA)، کارسینوم سلول سنگ‌فرشی سر و گردن (HNSC)، کارسینوم سلول کروموفوب کلیه (KICH)، کارسینوم سلول رنال کلیه (KIRC)، کارسینوم سلول پاپیلاری کلیه (KIRP)، کارسینوم هپاتوسلولار کبد (LIHC)، آدنوکارسینوم ریه (LUAD)، کارسینوم سلول سنگ‌فرشی ریه (LUSC)، آدنوکارسینوم پروستات (PRAD)، آدنوکارسینوم رکتال (READ)، کارسینوم تیروئید (THCA)، آدنوکارسینوم معده (STAD) و کارسینوم اندومتریال رحم (UCEC) بررسی شد.

در این مطالعه از رده سلولی AGS (رده سلولی سرطان معده) استفاده شد. به‌محض دریافت کیت siRNA، ویال آن در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. سپس طبق پروتکل شرکت سازنده، siRNA که به‌صورت لیوفیلیزه بود توسط siRNA dilution buffer حل شده و در حجم‌های کم به‌طور مساوی فریز گردید و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. همچنین siRNA غیرهمولوگ با ژن‌های انسانی به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. جهت فرآیند ترانسفکت siRNA به سلول‌های سرطانی معده، ابتدا سلول‌ها به مقدار مناسب کشت شدند. سپس سلول‌ها با دستورالعمل الکتروپوریشن با غلظت ۶۰ پیکومول از siRNA ژن *MMP9* ترانسفکت شدند. برای این منظور تعداد ۱ میلیون سلول شمارش شده و پس از سانتریفوژ، رسوب سلولی با محلول الکتروپوریشن به‌خوبی مخلوط شده و سپس سلول‌ها به روی یخ منتقل‌شده و مقدار ۱ پیکومول پلازمید به سلول‌ها اضافه گردید. در ادامه با استفاده از دستگاه الکتروپوریشن ولتاژ ۱۴۰ ولت به‌صورت اکسپوننشیال به سلول‌ها اعمال گردید. سپس با توجه به نوع تست، سلول‌ها به یک پلیت موردنظر حاوی ۱۰ درصد FBS منتقل‌شده و کشت داده شد. جهت بررسی اثر مهاری siRNA بر

روی مهاجرت سلول‌های سرطانی ترانسفکت شده نسبت به سلول‌های کنترل از تست کیفی ترمیم زخم (Wound healing) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا سلول‌های سرطانی ترانسفکت شده و سپس در یک پلیت ۱۲ خانه کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، در قسمت میانی سلول‌های کشت‌شده کف پلیت، با استفاده از سر سمپلر زرد، خراش ایجاد شد و سلول‌های کنده‌شده به‌وسیله شستشو با PBS دور ریخته شد. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در شرایط استاندارد، مهاجرت سلول‌های سرطانی ترانسفکت شده و ترانسفکت نشده با استفاده از یک میکروسکوپ معکوس موردبررسی قرار گرفت.

جهت بررسی آماری داده‌ها از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ استفاده شد. برای تعیین معنی‌دار بودن تغییرات بیان ژن از آزمون آماری T زوجی شده برای نمونه‌های توموری و حاشیه توموری به‌دست‌آمده از یک بیمار و از آزمون آماری T مستقل برای نمونه‌های توموری و سالم بیماران مختلف استفاده گردید.

برای بررسی ارتباط میزان بیان ژن *MMP9* با ویژگی‌های دموگرافیک و پاتولوژیکی بیماران از آزمون Chi–Square استفاده شد. همچنین برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت مدت‌زمان بقاء در بیماران با بیان بالا و پایین ژن *MMP9* از منحنی کاپلان-مایر و آزمون Mantel–Cox استفاده گردید. جهت بررسی ارتباط بیان بین ژن *MMP9* با ژن‌های دیگر از ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید. در تمامی موارد P<۰/۰۵ به‌عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر تغییرات بیان ژن *MMP9* در نمونه‌های توموری و بافت حاشیه تومور ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان معده مورد بررسی قرار گرفت. میانگین سنی این بیماران ٦٣ سال و شامل ۳۲ مرد و ۱۸ زن بود. بررسی تغییرات کمی بیان این ژن نشان داد، میزان بیان آن در نمونه‌های تومور بالاتر از بافت حاشیه تومور می‌باشد. به‌طوری‌که میانگین میزان بیان ژن *MMP9* در نمونه‌های توموری ٤/٥٩ برابر نمونه‌های حاشیه توموری بود (شکل ۱-A). از طرفی آنالیز آماری این نتایج نشان داد که این میزان افزایش در بیان این ژن از نظر آماری معنی‌دار (P<۰/۰۱) می‌باشد (شکل ۱-B). همچنین برای بررسی تغییرات بیان این ژن در سرطان معده، داده بیانی یک کوهورت دیگر بازیابی گردید.

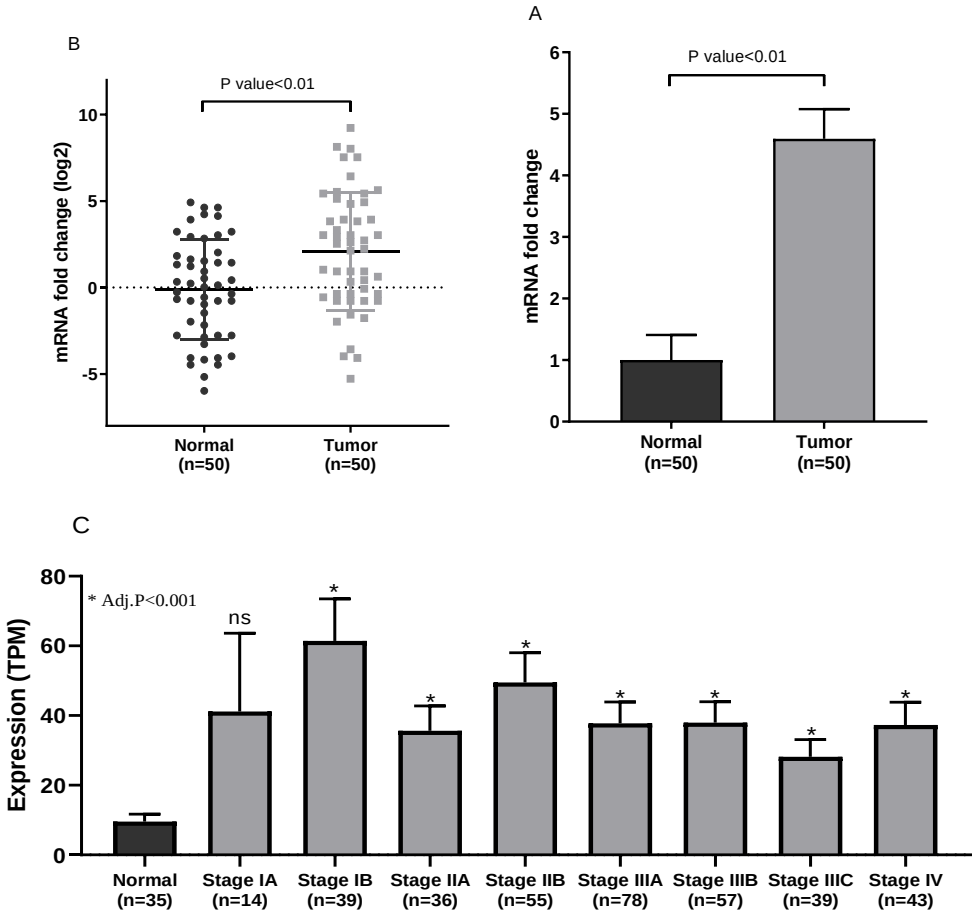
نتایج آنالیزها نشان دادند که بیان این ژن در نمونه‌های توموری بیماران نسبت به نمونه‌های حاشیه تومور بالاتر بوده و در تمامی مراحل بیماری سرطان معده (به غیر از مرحله ۱-A) نسبت به بافت مجاور تومور افزایش معنی‌داری دارد (شکل ۱-C).

به‌منظور ارایه دید کلی‌تر از نقش این ژن در سرطان‌های مختلف، بیان این ژن در چندین سرطان بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، نتایج ما نشان داد در تمامی موارد بررسی‌شده شامل؛ کارسینوم اوروتلیال مثانه، کارسینوم تهاجمی پستان، آدنوکارسینوم کولون، کارسینوم مری، کارسینوم سلول اسکواموس سر و گردن، کارسینوم سلول کروموفوب کلیه، کارسینوم سلول رنال کلیه، کارسینوم سلول پاپیلاری کلیه، کارسینوم هپاتوسلولار کبد، آدنوکارسینوم ریه، کارسینوم سلول اسکواموس ریه، آدنوکارسینوم پروستات، آدنوکارسینوم رکتال، کارسینوم تیروئید، آدنوکارسینوم معده و کارسینوم اندومتریال رحم، ژن *MMP9* به‌صورت افزایشی تنظیم می‌گردد. در نهایت با استفاده از آنالیز محنی بقاء، ارتباط میان بیان ژن *MMP9* و پیش‌آگهی بیماران مبتلا به سرطان معده بررسی گردید. بدین منظور بیماران در دو گروه بیان بالا و بیان پایین ژن تقسیم‌بندی شدند و مدت‌زمان بقاء آن‌ها بررسی گردید. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، اختلاف معنی‌داری در مدت‌زمان بقاء بین بیمارانی که بیان بالای ژن *MMP9* داشته‌اند با آن‌هایی که بیان پایین‌تر این ژن را داشته‌اند مشاهده می‌شود. بیان پایین‌تر این ژن همراه با کاهش مدت‌زمان بقاء بیماران بود به‌طوری‌که مطالعه ما نشان داد که میانگین مدت‌زمان بقاء برای بیماران مبتلابه سرطان معده که بیان بالای این ژن را دارند برابر با ۳۷/۹ ماه و در طرف مقابل برای بیمارانی که بیان پایین این ژن را دارند برابر با ۲٦/٥ ماه می‌باشد.

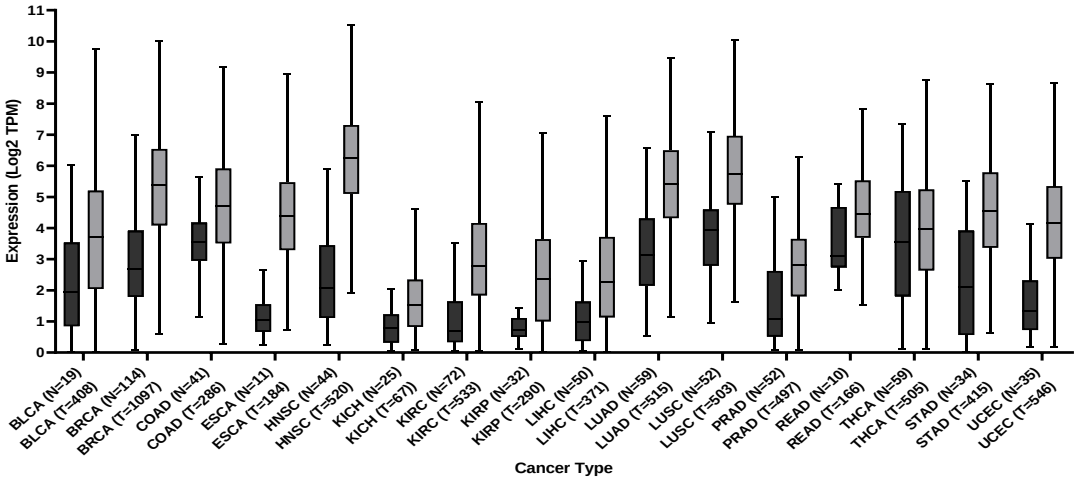
نتایج به‌دست‌آمده از آزمون ترمیم زخم نشان داد که مهاجرت سلول‌های سرطانی ترانسفکت شده به‌صورت چشمگیری کاهش می‌یابد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، پس از ۷۲ ساعت، سلول‌های سرطانی ترانسفکت نشده (کنترل) خراش ایجاد شده را ترمیم کردند. درحالی‌که پس از این مدت، سلول‌های سرطانی ترانسفکت شده با کاهش مهاجرت همراه شده و خراش ایجاد شده ترمیم نشده بود.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

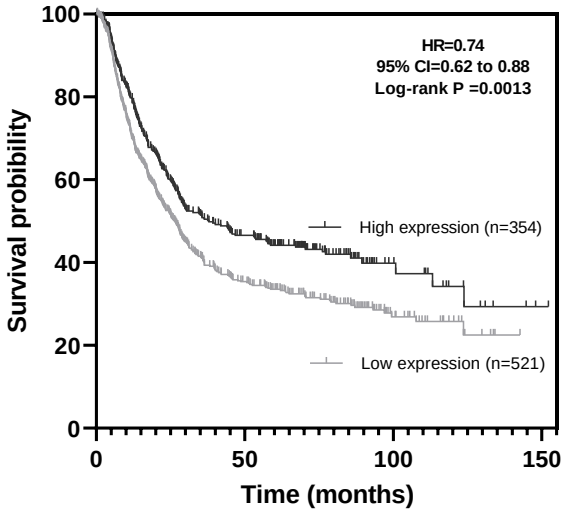
ژن	پرایمر	توالی
GAPDH	رو به جلو	ACACCCACTCCTCCACCTTTG
	رو به عقب	TCCACCACCCTGTTGCTGTAG
MMP9	رو به جلو	GGCGCTCATGTACCCTATGT
	رو به عقب	TTCAGGGCGAGGACCATAGA



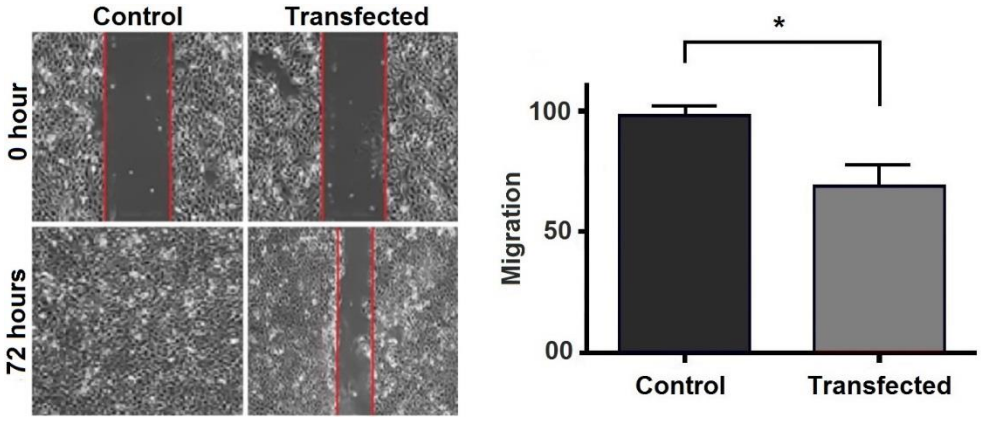
شکل ۱. تغییرات بیان ژن *MMP9* در نمونه‌های بالینی بیماران مبتلا به سرطان معده. (A) میزان بیان این ژن در نمونه‌های تومور ٤/٦ برابر نمونه‌های حاشیه تومور می‌باشد، (B) آنالیز آماری نشان می‌دهد این میزان از افزایش بیان معنی‌دار می‌باشد. بیان این ژن به‌غیراز مرحله IA در تمامی مراحل سرطان معده نسبت به بافت حاشیه تومور افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد (C).



شکل ۲. تغییرات بیان ژن *MMP9* در سرطان‌های مختلف نسبت به بافت‌های سالم. میزان بیان این ژن در تمامی موارد بررسی‌شده شامل؛ کارسینوم اوروتلیال مثانه، کارسینوم تهاجمی پستان، آدنوکارسینوم کولون، کارسینوم مری، کارسینوم سلول اسکواموس سر و گردن، کارسینوم سلول کروموفوب کلیه، کارسینوم سلول رنال کلیه، کارسینوم سلول پاپیلاری کلیه، کارسینوم هپاتوسلولار کبد، آدنوکارسینوم ریه، کارسینوم سلول اسکواموس ریه، آدنوکارسینوم پروستات، آدنوکارسینوم رکتال، کارسینوم تیروئید، آدنوکارسینوم معده و کارسینوم اندومتریال رحم به‌صورت افزایشی تنظیم می‌گردد.



شکل ۲. احتمال بقاء بیماران مبتلابه سرطان معده در دو گروه بیان بالا و پایین ژن *MMP9*. احتمال بقاء کلی بیماران با بیان بالای ژن *MMP9* نسبت به بیماران با بیان پایین این ژن، به‌طور معنی‌داری بیشتر می‌باشد. میانگین مدت‌زمان بقاء برای بیماران مبتلابه سرطان معده که بیان بالای این ژن را دارند برابر با ۳۷/۹ ماه و در طرف مقابل برای بیمارانی که بیان پایین این ژن را دارند برابر با ۲۶/۵ ماه می‌باشد.



شکل ۳. میزان مهاجرت سلول‌های سرطانی ترانسفکت شده. مهاجرت سلول‌های سرطانی ترانسفکت شده با siRNA مربوط به ژن *MMP9* به‌طور معنی‌داری نسبت به سلول‌های ترانسفکت نشده کاهش می‌یابد.

بحث

چندین فرآیند مهم سرطان‌زایی، که شامل تهاجم، متاستاز و رگ‌زایی می‌شوند، ارتباط نزدیکی با ماتریکس خارج سلولی دارند. ازآنجایی‌که ژن *MMP9* نقش مهمی در این ماتریکس دارد، می‌تواند تأثیر عمده‌ای در شکل‌گیری یا پیشرفت تومور داشته باشد.[۱۹] بررسی تغییرات بیان این ژن در سرطان معده می‌تواند دید کامل‌تری در مورد این سرطان ارائه نماید.

نتایج مطالعه ما نشان داد میزان بیان ژن *MMP9* در نمونه‌های توموری بیماران نسبت به بافت سالم مجاور افزایش معنی‌دار دارد. همچنین آنالیز بیوانفورماتیکی نیز نشان داد که بیان ژن *MMP9* در آزمایشات توالی‌یابی کلی ترانسکریپتوم افزایش دارد. احتمالاً افزایش بیان این ژن از طریق مکانیسم‌های تنظیم اپی-ژنتیکی، نسخه‌برداری و یا پس از نسخه‌برداری صورت می‌گیرید.[۲۰] درهرحال برای مشخص شدن این موضوع نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد. هم‌راستا با نتایج حاضر، Joseph و همکاران نشان دادند میزان بیان ژن *MMP9* در بیماران مبتلابه سرطان سینه به طرز معنی‌داری نسبت به گروه سالم بالاتر می‌باشد.[۲۱]

همچنین صادقی و همکاران نشان داند که غلظت پلاسمایی *MMP9* فعال در افراد مبتلابه سرطان پستان در مقایسه با گروه کنترل سالم اختلاف بسیار معنی‌داری دارد.[۲۲] در یک مطالعه دیگر

پراتیپا و همکاران به بررسی بیان پروتئین MMP9 در بافت توموری معده و مقایسه آن با بافته حاشیه‌ای پرداختند، نتایج مطالعه این گروه نشان داد بیان این پروتئین در نمونه‌های توموری در مقایسه با نمونه‌های حاشیه تومور افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند.[۲۳] در یک مطالعه دیگر چن و همکاران بیان ژن MMP9 را در نمونه‌های تومور معده و بافت سالم مجاور بررسی و مقایسه نمودند، نتایج این گروه نیز نشان داد بیان این ژن در نمونه‌های توموری در هر دو سطح پروتئین و mRNA نسبت به نمونه‌های حاشیه تومور افزایش می‌یابد.[۲۴]

در کنار این مطالعات، نتیجه پژوهش کالاوسکا و همکاران نشان داد بیان این ژن در سلول‌های تومور سرطان سینه نسبت به سلول‌های استرومایی افزایش چشمگیری دارد.[۲۵] مطالعه دیگری در رابطه با بیان ژن *MMP9* در سرطان ریه انجام گردید و نتیجه نشان داد میزان بیان این ژن در بافت تومور نسبت به بافت سالم مجاور تومور افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند.[۲۶] مطالعه حاضر نیز هم‌راستا با مطالعات قبلی افزایش بیان این ژن را در سرطان معده نشان داد. مطالعات نشان داده‌اند که تغییرات اپی‌ژنتیکی مانند متیلاسیون DNA و اصلاح هیستون‌ها اصلی‌ترین عوامل تنظیم‌کننده بیان ژن‌ها می‌باشند.[۲۷]

کلاسن و همکاران به‌منظور بررسی نقش هرکدام از این فرایندها در تغییر بیان ژن *MMP9* از عامل دمتیلاسیون در رده‌های سلولی سرطانی و نرمال استفاده کردند. نتایج این گروه نشان داد که بیان ژن *MMP9* در سلول‌های سرطانی و نرمال در اثر تیمار با عامل دمتیلاسیون (۵-آزا ۲-دئوکسی سیتیدین) افزایش می‌یابد. توالی یابی پروموتور این ژن وجود یک جزیره CpG را در ناحیه پروموتر را تأیید کرده است.[۲۸] با توجه به این موارد به نظر می‌رسد در سلول‌های سرطانی کاهش متیلاسیون ناحیه پروموتر عامل اصلی افزایش بیان ژن *MMP9* باشد.

از طرفی بررسی الگوی بیان این ژن در مراحل مختلف سرطان معده نشان داد تغییرات بیان در مرحله یک سرطان معده دیده نمی‌شود. ازاین‌رو شاید بتوان نتیجه‌گیری کرد در سرطان معده افزایش بیان این ژن بیش از اینکه علت سرطان باشد، معلول سرطان‌زایی هست، درهرحال برای مشخص شدن این موضوع نیاز به مطالعات تکمیلی وجود دارد. به‌منظور بررسی میزان بیان این ژن در سرطان‌های مختلف یک مطالعه بین سرطانی (pan-cancer) نیز انجام گردید. مشخص شد بیان این ژن در همه سرطان‌های موردبررسی تنظیم افزایشی دارد.

این یافته به همراه نتایج دیگر پیشنهادکننده نقش مهم این ژن پیشرفت سلول به سمت سرطانی شدن می‌باشد. با توجه به اینکه تنظیم افزایشی در همه سرطان‌ها مشاهده شده است، مهار بیان این ژن با استفاده از تکنولوژی‌هایی مثل siRNA می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی در متوقف نمودن پیشرفت سرطان مطرح باشد. تاکنون تعداد زیادی از مطالعات بر روی اثرات هدف قرارگیری ژن‌های سرطانی توسط siRNA در چندین نوع از سرطان‌های انسانی گزارش شده است، اما مطالعات بسیار محدودی در مورد سرکوب بیان ژن *MMP9* در سلول‌های سرطان معده انجام شده است.[۲۹] در مطالعه حاضر تأثیر سرکوب ژن *MMP9* با استفاده از siRNA بر روی مهاجرت و تهاجم، سلولی سلول‌های سرطانی معده (AGS) موردبررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد سرکوب بیان این ژن میزان مهاجرت سلولی را به‌طور چشمگیری کاهش می‌دهد. مطالعه ایزدبسکا و همکاران نشان داد که سرکوب بیان ژن *MMP9* در رده سلولی سرطان سینه باعث افزایش اثر سیکلوفسفامید شده و تهاجم و مهاجرت سلول‌های سرطانی را مهار می‌کند.[۳۰] همچنین فن و همکاران در مطالعه‌ای اثر مهار بیان ژن *MMP9* با استفاده از siRNA در رده سلولی سرطان ریه بررسی کردند. نتیجه مطالعه آن‌ها نشان داد کاهش بیان این ژن باعث کاهش میزان مهاجرت در سلول‌های سرطانی می‌شود.[۳۱] این یافته‌ها با توجه به نقش ژن *MMP9* در ایجاد پتانسیل تهاجم و مهاجرت در سلول‌های سرطانی، مورد انتظار می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد بیان ژن *MMP9* در سرطان معده به‌صورت افزایشی تنظیم می‌شود. این افزایش بیان نه تنها در مراحل انتهایی سرطان، بلکه در مراحل ابتدایی نیز دیده می‌شود. همچنین مهار بیان این ژن می‌تواند به‌طور چشمگیری مهاجرت سلولی و در نتیجه متاستاز را مهار نماید.

قدردانی

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ارتش جهت حمایت مالی از این تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد.

مشارکت پدیدآورندان

جواد بهروزی، آرزو فرهادی و شهره زارع کاریزی تهیه نمونه‌ها و طراحی آزمایش‌ها را بر عهده داشتند. آرزو فرهادی و جواد بهروزی اجرای آزمایش‌ها را بر عهده داشتند. مهدی ابراهیمی، آرزو فرهادی و شهره زارع کاریزی در طراحی و اجرای آزمایش‌ها و

تحلیل نتایج مشارکت داشتند. تمامی نویسندگان در نگارش مقاله مشارکت داشته و نسخه نهایی را خوانده و تأیید کرده‌اند.

منابع مالی

این تحقیق با کمک مالی دانشگاه علوم پزشکی ارتش انجام گردید

دسترسی پذیری داده‌ها

داده‌های ایجاد شده در پژوهش حاضر، در صورت درخواست معقول از پدیدآورندگان ارایه می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

انجام این مطالعه در کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارتش به شناسه IR.AJAUMS.REC.1400.272 به تأیید رسیده است.

تعارض منافع

نویسندگان اظهار می‌کنند که هیچ تعارض منافعی از تألیف یا انتشار این مقاله ندارند.

References

1. Yang W-J, Zhao H-P, Yu Y, Wang J-H, Guo L, Liu J-Y, et al. Updates on global epidemiology, risk and prognostic factors of gastric cancer. World Journal of Gastroenterology. 2023;29(16):2452. doi: 10.3748/wjg.v29.i16.2452
2. Fakhri MBA, Kakaei F, Halimi M, Manoochehri J, Fouladi DF. Diagnostic accuracy of peritoneal fluid lavage cytology in detection of peritoneal seeding in patients with gastric adenocarcinoma. Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2017;39(4):7-13.
3. Behroozi J, Shahbazi S, Bakhtiarizadeh MR, Mahmoodzadeh H. ADAR expression and copy number variation in patients with advanced gastric cancer. BMC gastroenterology. 2020;20(1):1-9. doi: 10.21203/rs.2.21962/v2
4. Busuttil RA, Zapparoli GV, Haupt S, Fennell C, Wong SQ, Pang J-MB, et al. Role of p53 in the progression of gastric cancer. Oncotarget. 2014;5(23):12016. doi: 10.18632/oncotarget.2434
5. Hansford S, Kaurah P, Li-Chang H, Woo M, Senz J, Pinheiro H, et al. Hereditary diffuse gastric cancer syndrome: CDH1 mutations and beyond. JAMA oncology. 2015;1(1):23-32. doi: 10.1001/jamaoncol.2014.168
6. Ehtesham N, Habibi Kavashkohie MR, Mazhari SA, Azhdari S, Ranjbar H, Mosallaei M, et al. DNA methylation alterations in systemic lupus erythematosus: A systematic review of case-control studies. Lupus. 2023;32(3):363-79. doi: 10.1177/09612033221148099
7. Behroozi J, Shahbazi S, Bakhtiarizadeh MR, Mahmoodzadeh H. Genome-wide characterization of RNA editing sites in primary gastric Adenocarcinoma through RNA-Seq data analysis. International Journal of Genomics. 2020;2020. doi: 10.21203/rs.3.rs-23058/v1
8. Crowe DL, Tsang KJ, Shemirani B. Jun N-terminal kinase 1 mediates transcriptional induction of matrix metal loproteinase 9 expression. Neoplasia. 2001;3(1):27-32. doi: 10.1038/sj.neo.7900135
9. Gruss C, Herlyn M. Role of cadherins and matrixins in melanoma. Current opinion in oncology. 2001;13(2):117-23. doi: 10.1097/00001622-200103000-00006
10. Laronha H, Caldeira J. Structure and function of human matrix metalloproteinases. Cells. 2020;9(5):1076. doi: 10.3390/cells9051076
11. Ehtesham N, Mosallaei M, Zaboli Mahdiabadi M, Kenarangi T, Farhadi A, Heidari MF, et al. Significant hypomethylation of MMP9 gene promoter in patients with systemic lupus erythematosus. Lupus. 2023:1056-65. doi: 10.1177/09612033231185618
12. Quintero-Fabián S, Arreola R, Becerril-Villanueva E, Torres-Romero JC, Arana-Argáez V, Lara-Riegos J, et al. Role of matrix metalloproteinases in angiogenesis and cancer. Frontiers in oncology. 2019;9:1370. doi: 10.3389/fonc.2019.01370
13. Mondal S, Adhikari N, Banerjee S, Amin SA, Jha T. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. European journal of medicinal chemistry. 2020;194:112260. doi: doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112642
14. Morris LG, Chan TA. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. Cancer. 2015;121(9):1357-68. doi: 10.1002/cncr.29140
15. Liu Y, Wu W, Yiyao W, Han S-S, Yuan Y, Huang J, et al. Recent development of gene therapy for pancreatic cancer using the non-viral nanovectors. Biomaterials Science. 2021. doi: 10.1039/d1bm90082j
16. Haghighi ZS, Farhadi A, Taheri SR, Hazrati E, Heidari R, Heidari MF, et al. Evaluation of the TXNIP gene expression in gastric adenocarcinoma and its relationship with overall survival of patients. Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2023;45(2):117-29. doi: 10.34172/mj.2023.019

17. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC bioinformatics. 2012;13:1-11. doi: 10.1186/1471-2105-13-134
18. Győrffy B. Discovery and ranking of the most robust prognostic biomarkers in serous ovarian cancer. Geroscience. 2023:1-10. doi: 10.1007/s11357-023-00742-4
19. Augoff K, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R, Stach K. MMP9: a tough target for targeted therapy for cancer. Cancers. 2022;14(7):1847. doi: 10.3390/cancers14071847
20. Schibler U. The daily timing of gene expression and physiology in mammals. Dialogues in clinical neuroscience. 2022. doi: 10.31887/dcns.2007.9.3/uschibler
21. Joseph C, Alsaleem M, Orah N, Narasimha PL, Miligy IM, Kurozumi S, et al. Elevated MMP9 expression in breast cancer is a predictor of shorter patient survival. Breast cancer research and treatment. 2020;182(2):267-82. doi: 1 10.1007/s10549-020-05670-x
22. Sadeghi M, Hemmati S. Increasing in activity and plasma concentration of matrix metalloproteinase-9 in metastatic breast cancer patientsand its relation with this gene promoter T allele. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2009;19(71):44-51.
23. Prathipaa R, Priyathersini N, Thanka J, PRATHIPAA R, Priyathersini N, THANKA J. Expression of Matrix Metalloproteinase-9 in Gastric Cancer. Cureus. 2021;13(9). doi: 10.7759/cureus.18195
24. Chen SZ, Yao HQ, Zhu SZ, Li QY, Guo GH, Yu J. Expression levels of matrix metalloproteinase-9 in human gastric carcinoma. Oncology letters. 2015;9(2):915-9. doi: 10.3892/ol.2014.2768
25. Kalavska K, Cierna Z, Karaba M, Minarik G, Benca J, Sedlackova T, et al. Prognostic role of matrix metalloproteinase 9 in early breast cancer. Oncology letters. 2021;21(2):1-. doi: 10.3892/ol.2020.12339
26. El-Badrawy MK, Yousef AM, Shaalan D, Elsamanoudy AZ. Matrix metalloproteinase-9 expression in lung cancer patients and its relation to serum mmp-9 activity, pathologic type, and prognosis. Journal of bronchology & interventional pulmonology. 2014;21(4):327-34. doi: 10.1097/lbr.0000000000000094
27. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications. Nature Reviews Cancer. 2011;11(10):726-34. doi: 10.1038/nrc3130
28. Klassen LM, Chequin A, Manica GC, Biembengut IV, Toledo MB, Baura VA, et al. MMP9 gene expression regulation by intragenic epigenetic modifications in breast cancer. Gene. 2018;642:461-6. doi: 10.1016/j.gene.2017.11.054
29. Li N, Luo H-C, Yang C, Deng J-J, Ren M, Xie X-Y, et al. Cationic star-shaped polymer as an siRNA carrier for reducing MMP-9 expression in skin fibroblast cells and promoting wound healing in diabetic rats. International journal of nanomedicine. 2014:3377-87. doi: 10.2147/ijn.s66368
30. Izdebska M, Zielińska W, Krajewski A, Hałas-Wiśniewska M, Mikołajczyk K, Gagat M, et al. Downregulation of MMP-9 enhances the anti-migratory effect of cyclophosphamide in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(23):12783. doi: 10.3390/ijms222312783
31. Fan Z, Duan X, Cai H, Wang L, Li M, Qu J, et al. Curcumin inhibits the invasion of lung cancer cells by modulating the PKCα/Nox-2/ROS/ATF-2/MMP-9 signaling pathway. Oncology Reports. 2015;34(2):691-8. doi: 10.3892/or.2015.4044