



Original Article

Evaluation of the Effect of Merkel Cell Polyomavirus *sT* Gene Expression on the Expression Level of *Matrix Metalloproteinase-1* in Squamous Cell Carcinoma of The Cervix Infected with High-Risk Human Papillomavirus Type 16: Implications for Metastasis

Tahereh Pakdel¹, Mohammad Kargar², Ali Farhadi^{3*}, Mahdokht Hossein Aghdaei⁴, Leila Kohan⁵

¹ Department of Microbiology, College of Science, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

² Department of Biology, Zand Institute of Higher Education, Shiraz, Iran

³ Department of Medical Laboratory Sciences, School of Paramedical Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

⁴ Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

⁵ Department of Biology, Arsanjan Branch, Islamic Azad University, Arsanjan, Iran

***Corresponding author:** Ali Farhadi, Department of Medical Laboratory Sciences, School of Paramedical Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran. Email: farhadi_a@sums.ac.ir

DOI: [10.66224/nkums.18.1.34](https://doi.org/10.66224/nkums.18.1.34)

How to Cite this Article:

Pakdel T, Kargar M, Farhadi A, Hossein Aghdaei M, Kohan L. Evaluation of the Effect of Merkel Cell Polyomavirus *sT* Gene Expression on the Expression Level of *Matrix Metalloproteinase-1* in Squamous Cell Carcinoma of The Cervix Infected with High-Risk Human Papillomavirus Type 16: Implications for Metastasis. J North Khorasan Univ Med Sci. 2026;18(1): 34-42 DOI: 10.66224/nkums.18.1.34

Received: 12 June 2025

Accepted: 23 November 2025

Keywords:

Apoptosis
Ca Ski
HPV16
MCPyV
MMP-1
sT Ag

Abstract

Introduction: Co-infection of high-risk human papillomaviruses (HR-HPVs) with human polyomaviruses, such as Merkel cell polyomavirus (MCPyV), may indicate a potential synergistic effect. This study focused on the role of the MCPyV *sT* protein, which shares similarities with HPV oncoproteins in disrupting cellular regulatory mechanisms. This research aimed to investigate the effect of the MCPyV *sT* oncogene on the expression level of the *matrix metalloproteinase-1* (*MMP-1*) gene, as a biomarker for metastasis, in Ca Ski cells infected with HPV-16.

Methods: The MCPyV *sT* gene was cloned into the PUC57 vector. The gene was amplified by PCR and subcloned into the PCMV6 expression vector. Colony PCR, restriction enzyme digestion, and Sanger sequencing were performed to confirm the constructed vector. The PCMV6-*sT* vector was then transfected into Ca Ski cells. Transfection efficiency was evaluated using fluorescence microscopy and flow cytometry. The expression level of *sT* mRNA was analyzed by RT-qPCR after transfection. The effect of MCPyV *sT* expression on MMP-1 expression was assessed using RT-PCR.

Results: High expression of the *sT* gene was observed in cells transfected with the PCMV6-*sT* plasmid. Transfection of PCMV6-*sT* into HPV-16-infected cells resulted in a significant increase in *MMP-1* gene expression at 48 ($P<0.05$) and 72 hours ($P<0.01$) post-transfection, compared to the control and mock groups.

Conclusion: The findings indicate that MCPyV *sT* increases MMP-1 expression, a marker strongly associated with invasion and metastasis. This highlights the importance of understanding the interactions between oncoproteins of different viruses in cancer cells.



ارزیابی اثر بیان ژن sT پولیوماو ویروس مرکل سل در میزان بیان ماتریکس متالوپروتئیناز ۱ در کارسینومای سلول‌های سنگفرشی در سرطان دهانه رحم آلوده با پاپیلوماو ویروس پرخطر انسانی تیپ ۱۶: پیامدهای متاستاز

طاهره پاکدل^۱، محمد کارگر^۲، علی فرهادی^{۳*}، مهدخت حسین عقدایی^۴، لیلا کهن^۵

^۱ دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

^۲ استاد، گروه زیست‌شناسی، مؤسسه آموزش عالی زند شیراز، شیراز، ایران

^۳ دانشیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران

^۴ استادیار، بخش تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

^۵ دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان، ارسنجان، ایران

*نویسنده مسئول: علی فرهادی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران. ایمیل:

farhadi_a@sums.ac.ir

DOI: 10.66224/nkums.18.1.34

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۲۲	چکیده
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۰۲	مقدمه: عفونت هم‌زمان ویروس‌های پاپیلوماوی انسانی پرخطر (HR-HPV) با پولیوماو ویروس‌های انسانی مانند مرکل سل ویروس (MCPyV)، می‌تواند نشان‌دهنده اثر سینرژیک احتمالی باشد. این تحقیق بر نقش پروتئین sT پولیوماو ویروس مرکل سل (MCPyV sT) متمرکز است که در ایجاد اختلال در مکانیسم‌های تنظیمی سلولی، با آنکو پروتئین‌های HPV شباهت‌هایی دارد. این مطالعه با هدف بررسی اثر آنکوژن MCPyV sT در میزان بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ (MMP-1) در سلول‌های Ca Ski آلوده با ویروس HPV-16 انجام شد.
واژگان کلیدی:	روش کار: ژن MCPyV sT ابتدا در وکتور PUC57 و پس از تکثیر با PCR، در وکتور بیانی PCMV6 کلون شد. برای تأیید از روش کلونی PCR و هضم آنزیمی و روش توالی‌یابی سنگر استفاده شد. وکتور PCMV6-sT در داخل سلول‌های Ca Ski ترانسفکت شد. کارایی ترانسفکشن از طریق میکروسکوپ فلورسنت و فلوسایتومتری بررسی شد. بیان sT mRNA و تأثیر آن در بیان MMP-1، با روش RT-qPCR بررسی شد.
مرکل سل پولیوماو ویروس آنتی ژن sT پاپیلوماو ویروس انسانی تیپ ۱۶ آپتوز سلول‌های Ca Ski MMP-1	یافته‌ها: بیان بالای ژن sT در سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید PCMV6-sT مشاهده شد. ترانسفکشن PCMV6-sT در سلول‌های آلوده به HPV-16، در مقایسه با گروه‌های کنترل و mock، به افزایش معنی‌دار بیان ژن MMP-1 در ۴۸ ساعت ($P < 0.05$) و ۷۲ ساعت ($P < 0.01$) پس از ترانسفکشن منجر شد.
	نتیجه‌گیری: sT MCPyV سبب افزایش بیان MMP-1 به‌عنوان نشانگر شاخص فرایندهای تهاجم و متاستاز می‌شود که این موضوع بر اهمیت تعامل بین آنکو پروتئین‌های ویروس‌های مختلف در سلول‌های سرطانی تأکید می‌کند.

مقدمه

۱۶ و ۱۸ ویروس پاپیلوماوی انسانی (HPV) مهم‌ترین علت ضایعات پیش‌سرطانی و سرطانی ناحیه دهانه رحم هستند [۱]. از میان بیش از دویست نوع سویه شناسایی‌شده، زیرسویه‌های ۱۶ و ۱۸ عامل اصلی ضایعات پیش‌سرطانی و سرطانی دهانه رحم هستند [۲]. عوامل خطر ساز شامل روابط جنسی محافظت‌نشده، ضعف ایمنی، شرکای جنسی متعدد، استفاده طولانی‌مدت از داروهای ضدبارداری، سیگار، سن، وضعیت اجتماعی - اقتصادی نامناسب، عفونت با کلامیدیا، تروکوماتیس و کمبود ریزمغذی‌ها هستند [۴]. از بین پاپیلوماو ویروس‌های

سرطان دهانه رحم چهارمین شایع در میان زنان در سراسر جهان است و حدود ۹۰ درصد مرگ‌ومیر ناشی از آن در کشورهای کمتر توسعه‌یافته یا در حال توسعه رخ می‌دهد. در سال ۲۰۲۰، بیش از شش صد هزار مورد جدید از این سرطان گزارش شد. حدود ۹۹ درصد از موارد سرطان دهانه رحم با عفونت ویروس پاپیلوماوی انسانی پرخطر (HR-HPVs: High Risk Human Papilloma Virus) نسبت داده می‌شوند [۱]. این ویروس شایع‌ترین پاتوژن مقاربتی است که از ضایعات خوش‌خیم تا سرطان مهاجم دهانه رحم نقش دارد [۲]. زیرسویه‌های

انسانی پرخطر، HPV16 به تنهایی مسئول حدود ۷۰/۸ درصد از سرطان‌های دهانه رحم است. ادغام ژنوم ویروسی در ژنوم سلول میزبان، مهم‌ترین عامل خطر در پیشرفت سرطان است [۲]. پتانسیل سرطان‌زایی HR-HPV ها به آنکوپروتئین‌های E6 و E7 آن‌ها بستگی دارد که هر دو این آنکوپروتئین‌ها تنظیم سلولی را در تعامل با پروتئین‌های متعدد سلول میزبان دستکاری می‌کنند. از جمله می‌توان به عملکرد E6 روی پروتئین سرکوبگر تومور P53 و عملکرد E7 روی پروتئین رتینوبلاستوما (pRb: Retinoblastoma) اشاره کرد [۵]. از این رو، در ایجاد سرطان دهانه رحم، HR-HPV به عنوان عامل ضروری، اما ناکافی در سرطان‌زایی دهانه رحم در نظر گرفته می‌شود [۶].

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که عفونت هم‌زمان HPV و پولیوما ویروس‌های انسانی از جمله مرکل سل پولیوما ویروس (MCPyV: Merkel Cell Polyoma Virus)، می‌تواند آثار سرطان‌زایی متقابل داشته باشد. در مطالعه‌ای در ایران، که مصطفی صالحی وزیری و همکاران انجام دادند، ۱۱۲ نمونه بافت دهانه رحم بررسی شد و عفونت هم‌زمان MCPyV و HPV در ۱۴ مورد (۱۲/۵ درصد) شناسایی شد. نتایج نشان داد MCPyV می‌تواند به تنهایی یا همراه با HPV بافت دهانه رحم را آلوده کند و ممکن است در سرطان‌زایی نقش کوفاکتوری داشته باشد [۷]. در مطالعه‌ای دیگر که کاشیف رشید و همکاران در نروژ انجام دادند، آثار متقابل آنکوپروتئین‌های LT و sT ویروس MCPyV در فعالیت رونویسی HPV-16 و HPV-18 بررسی شد. این تحقیق با استفاده از رده‌های سلولی HPV منفی شامل HaCaT، C33A و HSC-3 انجام شد. نتایج نشان داد آنکوپروتئین‌های LT و sT فعالیت رونویسی HPV-16- LCR و HPV-18-LCR را افزایش می‌دهند. همچنین، آنکوپروتئین‌های E6 و E7 ویروس HPV موجب افزایش فعالیت پروموتور اولیه و تأخیری MCPyV شدند. این داده‌ها نشان می‌دهند که عفونت هم‌زمان HR-HPV و MCPyV می‌تواند از طریق افزایش متقابل سطوح آنکوپروتئین‌ها، ظرفیت آنکوژنیک دو ویروس را تقویت کند [۸].

مرکل سل پولیوما ویروس (MCPyV) یکی از اعضای خانواده Polyomaviridae و جدیدترین ویروس سرطان‌زای انسانی است که به تازگی شناسایی شده است [۸]. ژنوم این ویروس نوعی DNA دو رشته‌ای حلقوی به طول تقریبی ۵۴۰۰ جفت باز است که شامل سه قسمت عملکردی می‌شود. در ناحیه اولیه، جایگاه ژن آنتی ژن T قرار دارد که باعث ایجاد رونوشت‌های RNA جایگزین شده می‌شود. این ناحیه چهار محصول ژنی متمایز را کد می‌کند: آنتی ژن T بزرگ (Large T)، آنتی ژن T کوچک (Small T)، آنتی ژن ۵۷kT (57 kDa Tumor Antigen) و محصولی از یک فریم جایگزین قاب خواندن LT باز به نام (Alternative Large Tumor Open) ALTO (Reading Frame) [۸]. به دلیل پیوند جایگزین، آنتی ژن‌های LT، sT و ۵۷ kT، یک توالی شامل ۷۸ اسید آمینه را در ناحیه N ترمینال خود به اشتراک می‌گذارند [۸]. مطالعات انجام شده نشان دهنده نقش مهم MCPyV در ایجاد کارسینوم سلول مرکل (MCC: Merkel Cell Carcinoma)، نوعی شکل بسیار کشنده بدخیم سرطان پوست است [۱۰].

انسانی پرخطر، HPV16 به تنهایی مسئول حدود ۷۰/۸ درصد از سرطان‌های دهانه رحم است. ادغام ژنوم ویروسی در ژنوم سلول میزبان، مهم‌ترین عامل خطر در پیشرفت سرطان است [۲]. پتانسیل سرطان‌زایی HR-HPV ها به آنکوپروتئین‌های E6 و E7 آن‌ها بستگی دارد که هر دو این آنکوپروتئین‌ها تنظیم سلولی را در تعامل با پروتئین‌های متعدد سلول میزبان دستکاری می‌کنند. از جمله می‌توان به عملکرد E6 روی پروتئین سرکوبگر تومور P53 و عملکرد E7 روی پروتئین رتینوبلاستوما (pRb: Retinoblastoma) اشاره کرد [۵]. از این رو، در ایجاد سرطان دهانه رحم، HR-HPV به عنوان عامل ضروری، اما ناکافی در سرطان‌زایی دهانه رحم در نظر گرفته می‌شود [۶].

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که عفونت هم‌زمان HPV و پولیوما ویروس‌های انسانی از جمله مرکل سل پولیوما ویروس (MCPyV: Merkel Cell Polyoma Virus)، می‌تواند آثار سرطان‌زایی متقابل داشته باشد. در مطالعه‌ای در ایران، که مصطفی صالحی وزیری و همکاران انجام دادند، ۱۱۲ نمونه بافت دهانه رحم بررسی شد و عفونت هم‌زمان MCPyV و HPV در ۱۴ مورد (۱۲/۵ درصد) شناسایی شد. نتایج نشان داد MCPyV می‌تواند به تنهایی یا همراه با HPV بافت دهانه رحم را آلوده کند و ممکن است در سرطان‌زایی نقش کوفاکتوری داشته باشد [۷]. در مطالعه‌ای دیگر که کاشیف رشید و همکاران در نروژ انجام دادند، آثار متقابل آنکوپروتئین‌های LT و sT ویروس MCPyV در فعالیت رونویسی HPV-16 و HPV-18 بررسی شد. این تحقیق با استفاده از رده‌های سلولی HPV منفی شامل HaCaT، C33A و HSC-3 انجام شد. نتایج نشان داد آنکوپروتئین‌های LT و sT فعالیت رونویسی HPV-16- LCR و HPV-18-LCR را افزایش می‌دهند. همچنین، آنکوپروتئین‌های E6 و E7 ویروس HPV موجب افزایش فعالیت پروموتور اولیه و تأخیری MCPyV شدند. این داده‌ها نشان می‌دهند که عفونت هم‌زمان HR-HPV و MCPyV می‌تواند از طریق افزایش متقابل سطوح آنکوپروتئین‌ها، ظرفیت آنکوژنیک دو ویروس را تقویت کند [۸].

مرکل سل پولیوما ویروس (MCPyV) یکی از اعضای خانواده Polyomaviridae و جدیدترین ویروس سرطان‌زای انسانی است که به تازگی شناسایی شده است [۸]. ژنوم این ویروس نوعی DNA دو رشته‌ای حلقوی به طول تقریبی ۵۴۰۰ جفت باز است که شامل سه قسمت عملکردی می‌شود. در ناحیه اولیه، جایگاه ژن آنتی ژن T قرار دارد که باعث ایجاد رونوشت‌های RNA جایگزین شده می‌شود. این ناحیه چهار محصول ژنی متمایز را کد می‌کند: آنتی ژن T بزرگ (Large T)، آنتی ژن T کوچک (Small T)، آنتی ژن ۵۷kT (57 kDa Tumor Antigen) و محصولی از یک فریم جایگزین قاب خواندن LT باز به نام (Alternative Large Tumor Open) ALTO (Reading Frame) [۸]. به دلیل پیوند جایگزین، آنتی ژن‌های LT، sT و ۵۷ kT، یک توالی شامل ۷۸ اسید آمینه را در ناحیه N ترمینال خود به اشتراک می‌گذارند [۸]. مطالعات انجام شده نشان دهنده نقش مهم MCPyV در ایجاد کارسینوم سلول مرکل (MCC: Merkel Cell Carcinoma)، نوعی شکل بسیار کشنده بدخیم سرطان پوست است [۱۰].

دو ویروس مهم دیگر از خانواده پولیوما ویروس (Simian Virus

دو ویروس مهم دیگر از خانواده پولیوما ویروس (Simian Virus SV40) و BK (Babikir Kurdi) است [۹] که ثابت شده است ویروس SV40 می‌تواند رشد تومور را عمدتاً در مدل‌های حیوانی آزمایشگاهی القا کند و ویروس BK نقش بحث‌برانگیزی در سرطان انسان دارد. برخلاف این دو ویروس ذکر شده، می‌توان به MCPyV به عنوان اولین پولیوما ویروسی اشاره کرد که به طور قطعی با ایجاد سرطان در انسان مرتبط است [۱۰]. مطالعات نشان داده‌اند که ژنوم MCPyV تقریباً در ۸۰ درصد موارد کارسینوم سلول مرکل (MCC) در ژنوم سلول سرطانی ادغام شده است [۱۰]. آنکوپروتئین‌های LT و sT ویروس MCPyV، نقش مشابهی را همانند آنکوپروتئین‌های HPV نشان می‌دهند و هر دو مانع عملکرد صحیح سرکوبگرهای رشد سلول، به ترتیب RB و p53 می‌شوند [۱۲]. این اثر مشابه نشان می‌دهد که همکاری E6، E7 و LT ممکن است ویژگی‌های HR-HPV را در زمینه تغییر شکل سلول، به ویژه در سلول‌هایی که عفونت هم‌زمان ویروسی رخ می‌دهد، افزایش دهد [۹]. بیان sT با فعال‌سازی MYCL و کمپلکس EP400 موجب بی‌ثباتی ژنومی می‌شود و بدین ترتیب، احتمال همکاری بین E6، E7 و LT در افزایش ویژگی‌های سرطان‌زایی سلول‌های آلوده به دو ویروس مطرح می‌شود [۱۲]. این یافته‌ها بر نقش احتمالی پولیوما ویروس‌های انسانی به عنوان عوامل کمکی در توسعه سرطان‌های مرتبط با HR-HPV تأکید دارند [۸].

علاوه بر فرایندهای تکثیر و آپوپتوز، تهاجم و متاستاز از مراحل کلیدی در بدخیمی تومورهای اپی‌تلیال هستند. متالوپروتئینازهای ماتریکس (MMPs: Matrix Metalloproteinases) گروهی از آنزیم‌ها (حدود ۲۵ عضو) هستند که با تجزیه ماتریکس خارج سلولی در فرایند تهاجم و متاستاز نقش دارند. از بین آن‌ها، کلاژنازهای MMP-1، MMP-2، MMP-8، MMP-13، MMP-14 و ژلاتینازهای MMP-9 و MMP-9 در پیشرفت تومور نقش برجسته‌ای دارند. مطالعه‌ای روی بافت‌های کارسینومای سلول سنگفرشی دهانه رحم نشان داد که نقش اصلی در پتانسیل تهاجم و متاستاز با افزایش بیان کلاژنازهای MMP-1 و MMP-14 و ژلاتیناز MMP-9 می‌تواند به عنوان شاخصی برای بررسی پتانسیل تهاجم و متاستاز در کارسینومای سلول سنگفرشی دهانه رحم به کار رود [۱۳]. MMP-1 به دلیل توانایی در تخریب پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه‌ای که درباره میزان بیان ژن‌های ماتریکس متالوپروتئینازها انجام شد، نشان داده شد که مجموعه‌ای از ژن‌های متالوپروتئینازها (۱۱ ژن) بیان مستمر نداشتند، در صورتی که ماتریکس متالوپروتئیناز ۱ (MMP-1) تنها ژنی بود که به طور مداوم بیش از حد بیان می‌شد [۱۴].

مطالعه‌ای دیگر گزارش کرد که سطح بیان mRNA مربوط به MMP-1 در بافت‌های سرطانی دهانه رحم در مقایسه با بافت‌های نرمال به طور قابل توجهی افزایش یافته و در موارد سرطان تهاجمی همراه با متاستاز غدد لنفاوی، بیش از موارد دیگر است [۱۵]. شایان ذکر است که متاستاز به غدد لنفاوی به عنوان یکی از قوی‌ترین مارکرهای پیش‌آگهی برای بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم در نظر گرفته می‌شود [۱۵]. همچنین، مطالعات نشان داده است که سرکوب MMP-1 توانایی تهاجم و مهاجرت در رده‌های سلولی با منشأ بافت دهانه رحم SiHa و HeLa را کاهش می‌دهد [۱۵]. بنابراین، هدف ما از این مطالعه بررسی اثر ژن sT ویروس مرکل سل پولیوما ویروس در میزان بیان ژن MMP-1 به عنوان بیومارکر متاستاز در سلول‌های دهانه

IRES-GFP وارد شد. این وکتور از شرکت OriGene آمریکا تهیه شد. سپس، پلاسمیدهای نوترکیب حاوی ژن *sT* (pCMV6-sT) در سلول‌های *E. coli* سویه *DH5α* (بانک میکروبی انستیتو پاستور ایران) تهیه شده از انستیتو پاستور ایران ترانسفورم شدند. برای تأیید ترانسفورماسیون از روش‌های کلونی PCR، هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *EcoRI* و *XhoI* و توالی‌یابی DNA با استفاده از روش Sanger sequencing (Microsynth، سوئیس) استفاده شد. پس از آن، پلاسمیدهای نوترکیب تکثیر شدند. برای این منظور، ابتدا باکتری حاوی این پلاسمید (*E. coli* DH5α) به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور شیکردار (JKA، آلمان) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰ rpm کشت داده شد که در ضمن تکثیر باکتری، پلاسمید مدنظر در باکتری همانندسازی کرده و تعداد آن افزایش یافت. برای تکثیر باکتری از ۵ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (سیناژن، ایران) با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. پس از ۱۶ ساعت، باکتری‌های کشت‌داده شده به منظور استخراج پلاسمید استفاده شدند. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید مینی‌پِرپ (یکتا تجهیز آزما، ایران) انجام شد و سپس با استفاده از کیت استخراج اسید نوکلئیک GFI (یکتا تجهیز آزما، ایران) مطابق دستورالعمل سازنده استخراج شدند [۱۷].

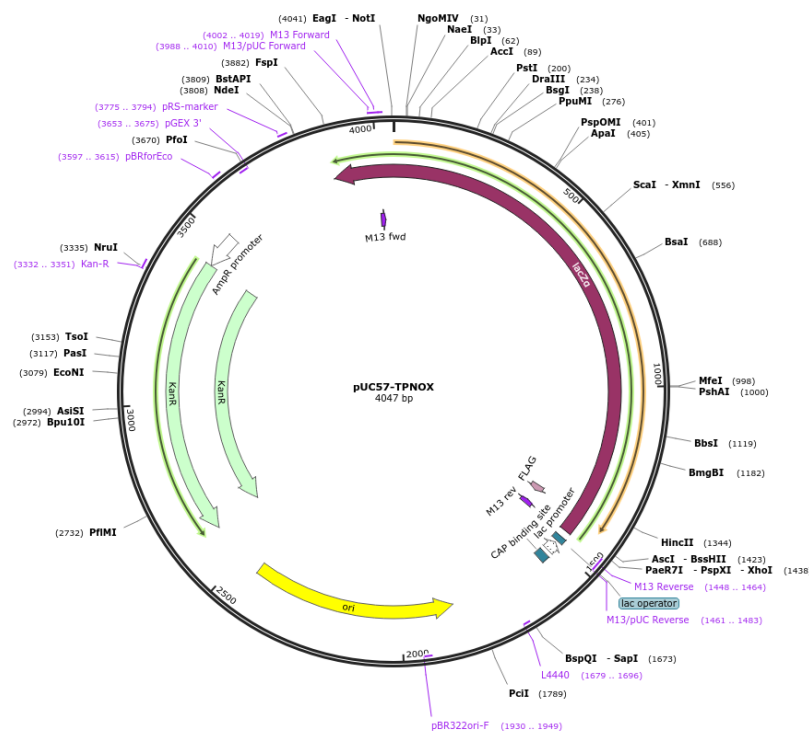
رحم انسانی (رده Ca Ski) آلوده با ویروس HPV-16 بود که در سال ۱۴۰۳ در آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد.

روش کار

کلون‌سازی ژن *sT* MCPyV در وکتور بیانی

در ابتدای کار، ژن *sT* مرکل سل ویروس با اندازه ۵۷۱ جفت باز سنتز شد و توسط شرکت BIOMATIK کانادا مطابق با توالی mRNA *sT* به دست آمده از NCBI در وکتور pUC57 کلون شد (GenBank ID: AEM01096.1). سپس، ژن *sT* از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و با استفاده از پلیمرز pfu تکثیر شد. پرایمرهای پیشرو (Forward) و پیرو (Reverse) استفاده شده با نرم‌افزار Gene Runner نسخه ۳.۰۵ طراحی شدند (Hastings Software Inc., Hastings, NY, USA; <http://www.generunner.net/>).

وکتور pUC57-TPNOX (شکل ۱) به کاررفته شامل محل‌های آنزیمی محدودکننده مناسب برای *EcoRI* در انتهای N و *XhoI* در انتهای C است [۱۶]. توالی پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر ژن *sT* در جدول ۱ آورده شده است. قطعه حاصل از تکثیر ژن *sT* با استفاده از T4 DNA Ligase به وکتور بیانی یوکاریوتی pCMV6-AC از



شکل ۱. وکتور pUC57-TPNOX [۱۶]

جدول ۱. توالی پرایمرهای ژن *sT*

نام پرایمر	توالی	طول محصول (bp)	شرکت سازنده
sT-full length-F	5'-GAATTCATGGATTAGTCCTAAATAG-3'	۲۰	ندای فن
sT-full length-R	5'-CTCAGCTAGAAAAGGTGCAGAT-3'	۲۰	ندای فن

Shellmax، ایران) جدا و پس از سانتریفیوژ، در PBS معلق شدند. شدت فلورسنت با استفاده از ابزار فلوسایتومتری FACSCalibur با ۱۰۰۰۰ سلول در هر آزمایش اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار FlowJo نسخه ۱۰.۰ انجام شد.

آنالیز PCR کمی رونویسی معکوس (RT-qPCR)

برای ارزیابی سطح بیان mRNAهای آنتی ژن *sT*، سلول‌های Ca Ski ترانسفکت شده با ۰/۷ میکروگرم در میکرولیتر از پلاسمید pCMV6-sT در بازه‌های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن جمع‌آوری شدند. استخراج RNA کل با استفاده از کیت RiboEx TM (GeneAll، کره جنوبی) انجام شد و سپس سنتز cDNA در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت پانزده دقیقه با کیت سنتز cDNA PrimeScript RT (TaKaRa، ژاپن) انجام شد. برای حذف هرگونه آلودگی پلاسمیدی بالقوه مطابق با دستورالعمل سازنده از DNase استفاده شد. این تست با استفاده از سیستم تشخیص ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) و RealQ Plus 2x Master Mix Green (Ampliqon، دانمارک) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای انجام RT-qPCR با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner (قابل دسترسی در <http://www.generunner.net>) طراحی شدند و در جدول ۲ فهرست شده‌اند. RT-PCR کمی تحت شرایط چرخه حرارتی (Thermocycling)، که در جدول ۳ شرح داده شده است، انجام شد. سپس، به منظور بررسی تأثیر بیان *sT* مرکل سل پولیوماویروس سطح بیان *MMP-1* با به کارگیری روش RT-qPCR بررسی شد. کنترل داخلی مورد استفاده در این تکنیک ژن گلیسرآلدئید-۳ فسفات دهیدروژناز (*GAPDH*) بود که با روش SYBR Green RT-qPCR (Applied Biosystems) و RealQ Plus 2x Master Mix Green (Ampliqon، دانمارک) انجام شد.

کشت سلولی و ترانسفکشن (Transfection) وکتور pCMV6-sT

سلول‌های Ca Ski (RRID:CVCL_1100) اهدایی از مرکز تحقیقات علوم و فناوری علوم آزمایشگاهی شیراز تهیه شدند. این رده سلولی حاوی ژنوم HPV-16 به صورت ادغام شده در ژنوم خود است. سلول‌های تهیه شده در محیط رشد کامل حاوی RPMI-1640 (BIOIDEA، ایران) ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS) (BIOIDEA، ایران) و ۱ درصد پنی سیلین - استرپتومایسین (Shellmax، ایران) کشت و در انکوباتور (ASTEK، ژاپن) با ۵ درصد CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت رشد، وکتور pCMV6-sT و پلاسمیدهای کنترل Mock در سلول‌های رده Ca Ski ترانسفکت (Transfect) شدند. برای این منظور، ابتدا تعداد پانصد هزار سلول Ca Ski در پلیت کشت سلولی شش چاهکی قرار داده شد. پس از رسیدن به تراکم ۶۰ تا ۷۰ درصد، ترانسفکشن با پلاسمیدهای pCMV6-sT با استفاده از Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific، آمریکا) انجام شد. مطابق با پروتکل سازنده پس از ترانسفکشن، سلول‌ها با PBS (Shellmax، ایران) شسته و سپس به مدت چهار ساعت در محیط تازه کشت داده شدند [۱۷].

سنجش کمی و کیفی کارایی ترانسفکشن

بررسی کارایی ترانسفکشن در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از طریق میکروسکوپ فلورسانس (Microscope Fluorescent) (Olympus Tokyo, Japan) با فیلتر (Green Fluorescent Protein) GFP و همچنین روش فلوسایتومتری انجام شد. ارزیابی کارایی ترانسفکشن شامل شمارش تعداد سلول‌های سبز و غیرسبز بود. از هر نقطه زمانی، چهار تصویر به دست آمد که هر کدام شامل ۱۰۰ سلول برای ارزیابی فردی بود. برای تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری، سلول‌ها در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن با PBS شسته شدند. سپس، با استفاده از محلول تریپسین-EDTA

جدول ۲. توالی الیگونوکلوئیدهای پرایمرهای مورد استفاده در روش ریل تایم PCR معکوس

ژن	توالی (5' to 3')	PCR اندازه محصول (bp)	دمای اتصال (°C)
sT-Forward	GGCCTCCAAGGAGTAAGACC	۲۳۶	۵۱
sT-Reverse	CTACAATGCTGGCGAGACA		
MMP-1-Forward	TGAAAAAGCGGAGAAATAGTG	۱۵۳	۵۵
MMP-1-Reverse	GAGGACAAACTGAGCCACAT		
GAPDH-Forward	GGCCTCCAAGGAGTAAGACC	۱۴۱	۵۸
GAPDH-Reverse	AGGGGTCTACATGGCAACTG		

جدول ۳. برنامه دستگاه Real Time PCR

نام مرحله	دما (°C)	زمان	تعداد سیکل
دنا تورا سیون اولیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۱۵ دقیقه	۱ سیکل
دنا تورا سیون	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۲۰ ثانیه	
اتصال	دمای مورد نیاز هر پرایمر	۲۵ ثانیه	۴۰ سیکل
گسترش	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۳۰ ثانیه	

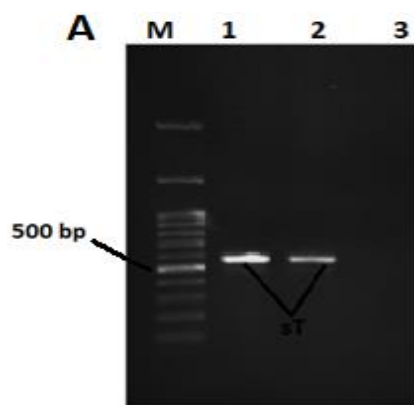
برای آزمایشگاه‌های تشخیص مولکولی و کشت سلولی مطابق با انستیتو پاستور (ایران) انجام شد [۱۸].

تحلیل آماری

برای همه تحلیل‌ها از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸.۰ (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) استفاده شد. برای

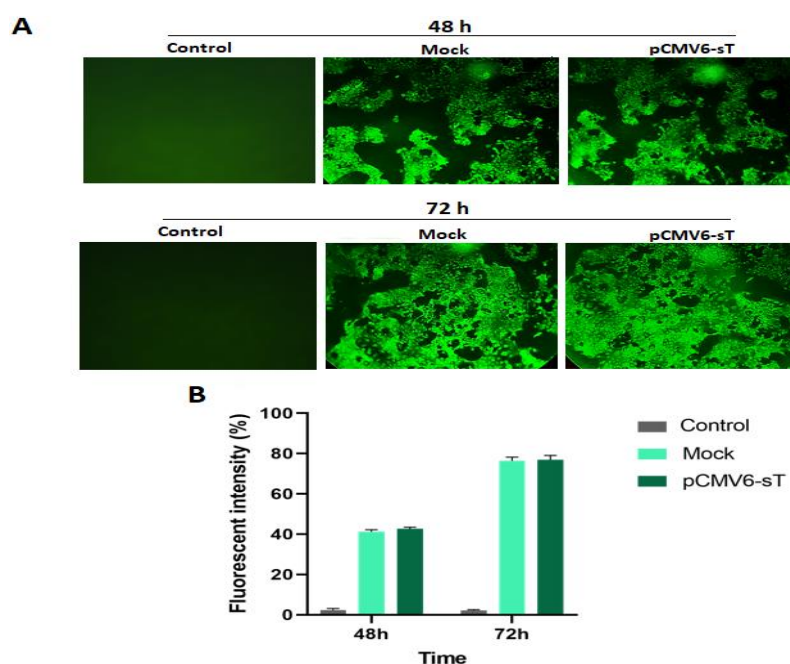
تغییرات برابری نسبی ژن‌های هدف با استفاده از روش Pfaffl محاسبه شد [۱۷-۱]. شرایط دمایی دستگاه ترموسایکلر مطابق با دماهای ذکر شده برای بررسی بیان ژن *MMP-1* بودند. برای ارزیابی کارایی پرایمر، منحنی‌های استاندارد برای هر مجموعه پرایمر ایجاد شد. تمام مراحل روش‌های آزمایشگاهی طرح شامل انجام تست‌های آزمایشگاهی و دفع پسماند، مطابق با تمام استانداردهای تعیین شده

استفاده از الکتروفورز ژل آگارز انجام شد. یک باند با اندازه ۵۷۱ جفت باز مشاهده شد که نشان‌دهنده ادغام موفقیت‌آمیز ژن *sT* در پلاسمید است (شکل ۲A). سپس، پلاسمید نو ترکیب pCMV6-sT تحت هضم آنزیمی با آنزیم‌های *EcoRI* و *XhoI* قرار گرفت که به مشاهده دو باند با اندازه‌های تقریبی ۵۷۱ جفت‌باز، مربوط به ژن *sT* و ۷۰۰۰ جفت‌باز، مربوط به پلاسمید pCMV6-AC-IRES-GFP منجر شد (شکل ۲B). در ادامه، برای تأیید صحت فرایند کلونینگ و به‌منظور اعتبارسنجی بیشتر، توالی‌یابی Sanger انجام شد که یکپارچگی و صحت فرایند شبیه‌سازی را تأیید کرد.



شکل ۲. صحنه‌گذاری الحاق ژن *sT* در پلاسمید pCMV6-AC-IRES-GFP: (A) ژن *sT* در وکتور pCMV6-AC-IRES-GFP و مشاهده باند مربوط به ژن *sT* روی ژل آگارز. چاهک M: مارکر DNA ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت‌باز، چاهک ۱ و ۲: ژن *sT* چاهک ۳: کنترل منفی؛ (B) هضم آنزیمی دوگانه پلازمید نو ترکیب pCMV6-sT و مشاهده باندهای مربوطه. چاهک M: مارکر DNA ۱۰۰ تا ۲۵۰۰ جفت‌باز، چاهک ۱ و ۲: باند با اندازه‌های تقریبی ۵۷۱ جفت‌باز، مربوط به ژن *sT* و ۷۰۰۰ جفت‌باز، مربوط به پلاسمید pCMV6-AC-IRES-GFP.

pCMV6-sT در ۴۸ و ۷۲ ساعت ترانسفکشن شدند؛ همان‌طور که در شکل ۳A نشان داده شده است. همچنین، آنالیز فلوسایتمتری انجام‌شده در ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن، میانگین ترانسفکشن را برای pCMV6-sT و mock به ترتیب ۸۰/۶ و ۷۵/۹ درصد نشان داد که در شکل ۳B نشان داده شده است.



شکل ۳. اندازه‌گیری شدت فلورسنت برای گروه pCMV6-sT، ترانسفکشن شده با ماک و کنترل (بدون تیمار) با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس و فلوسایتمتری؛ (A) نتایج حاصل از میکروسکوپ فلورسانس نشان داد که درصد سلول‌های ترانسفکشن شده با pCMV6-sT و pCMV6 از ۳۵ درصد در ۴۸ ساعت و ۷۵ درصد در ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن سلول‌های Ca Ski فراتر رفت؛ (B) تجزیه و تحلیل نتایج آزمایش فلوسایتمتری نشان داد که میانگین بازده ترانسفکشن سلول‌های ترانسفکشن شده با pCMV6-sT پس از ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت به ترتیب ۸۰/۶ و ۳۸/۷ درصد بود.

ارزیابی تفاوت‌های آماری بین دو گروه از آزمون *t* Student استفاده شد، درحالی‌که برای مقایسه‌های بیش از دو گروه، از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است و معنی‌داری با P-value کمتر از ۰/۰۵ تعیین شد.

یافته‌ها

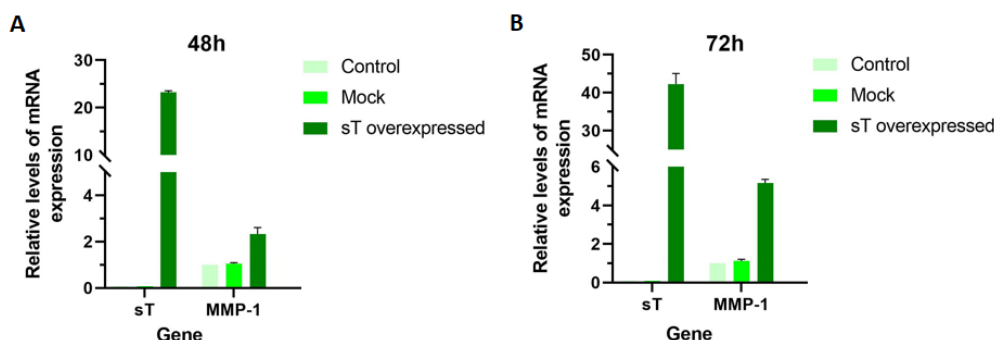
صحنه‌گذاری الحاق ژن *sT* در پلاسمید pCMV6-AC-IRES-GFP

به‌منظور تأیید ادغام ژن *sT* در پلاسمید pCMV6-AC-IRES-GFP، آزمایش PCR انجام شد. تجزیه و تحلیل محصولات PCR با

اعتبارسنجی انتقال pCMV6-sT-GFP در سلول‌های Ca Ski

ارزیابی کارایی ترانسفکشن معمولاً شامل استفاده از رنگ فلورسنت در ترکیب با میکروسکوپ فلورسانس است. پس از آن، تصاویر سلولی با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که بیش از ۷۵ درصد سلول‌ها با پلاسمید ساختگی یا

شکل ۲ نشان داده شده است. همچنین، ارزیابی بیان *MMP-1* در رده سلولی Ca Ski در بازه‌های زمانی ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت در مقایسه با mock و کنترل با استفاده از روش RT-qPCR بررسی شد. نتایج در شکل ۴ نشان می‌دهد ترانسفکشن PCMV6-sT به افزایش بیان ژن *MMP-1* در ۴۸ ساعت به میزان دو برابر ($P < 0.05$) و ۷۲ ساعت به میزان پنج برابر ($P < 0.01$)، در مقایسه با گروه‌های کنترل و mock در سلول‌های Ca Ski آلوده با HPV-16 منجر شد.



شکل ۴. سطح بیان mRNA، ژن‌های sT و *MMP-1* با RT-qPCR در ۴۸ ساعت (A) و ۷۲ ساعت (B) پس از ترانسفکشن تعیین شد. افزایش بیان ژن sT در سلول‌های Ca Ski ترانسفکته شده با پلاسمید pCMV6-sT در مقایسه با پلاسمید ماک و کنترل مشاهده شد ($P \leq 0.0001$). ترانسفکشن PCMV6-sT به افزایش بیان ژن *MMP-1* در ۴۸ ساعت ($P < 0.05$) و ۷۲ ساعت ($P < 0.01$) در مقایسه با گروه‌های کنترل و mock در سلول‌های Ca Ski آلوده با HPV-16 منجر شد.

است که با ضایعه داخلی اپیتلیال شروع می‌شود و سپس به سمت نوپلازی می‌رود و بعد از ده سال یا بیشتر سرطانی می‌شود [۱۹]. تهاجم و متاستاز از دلایل اصلی شکست درمان و مرگ بیماران است. بنابراین، مطالعه در زمینه مکانیسم و نقش متاستاز از اهداف اصلی محققان است [۱۵]. نقش کلیدی در فرایند متاستاز با متالوپروتئینازهای ماتریکس وابسته به روی (MMPs) ایفا می‌شود که به طور اختصاصی تمام اجزای اصلی بافت همبند را هیدرولیز می‌کنند [۲۰]. اعضای خانواده پروتئازهای وابسته به روی عوامل مهمی هستند که در تخریب ماتریکس خارج سلولی و پروتئولیز و در نتیجه گسترش متاستاز نقش دارند [۱۴]. از بین اعضای این خانواده، *MMP-1* به دلیل توانایی آن در بیشترین تخریب انواع پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مورد توجه ویژه قرار گرفته است و به عنوان کلاژناز بینابینی، بیان غیرطبیعی آن با پیشرفت سرطان در انسان، مرتبط گزارش شده است. سطح بالای بیان *MMP-1* در بسیاری از تومورها ارتباط نزدیکی با پیش‌آگهی ضعیف سرطان دارد [۱۵]. این آنزیم در یک مسیر آبشاری مهم به تخریب بافت نرم، هم از نظر فیزیولوژی و هم از نظر آسیب‌شناسی، منجر می‌شود. کاهش ماتریکس خارج سلولی بخشی از یک مرحله مهم در تهاجم و متاستاز نوپلاسم است که این موضوع نتیجه فعال شدن MMPs است و جزء پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی را تجزیه می‌کند و به دنبال آن، فرایندهای فیزیولوژی دیگر، مانند آنژیوژنز، آپوپتوز و تولید بافت نرم جدید، ایجاد می‌شوند؛ تمام این موارد باعث پیشرفت سرطان می‌شوند [۱۹].

یکی از عملکردهای مهم P53 تنظیم بیان *MMP-1* است، از تنظیم خارج شدن *MMP-1* متاستاز تومور را افزایش می‌دهد که به دلیل نقش *MMP-1* در تخریب ماتریکس خارج سلولی است. مطالعات نشان داده‌اند که *MMP-1* یکی از پروتئین‌هایی است که در

ارزیابی بیان sT MCPyV و *MMP-1* در سلول‌های Ca Ski

تجزیه و تحلیل نتایج RT-qPCR بیان قابل توجه mRNA MCPyV sT را در سلول‌های Ca Ski در بازه زمانی ۴۸ ساعت به میزان ۲۳ برابر و ۷۲ ساعت به میزان ۴۲ برابر پس از ترانسفکشن را تأیید کرد، درحالی‌که هیچ مورد مثبت قابل تشخیصی در سلول‌های تیمارنشده یا ترانسفکته شده با mock مشاهده نشد. این یافته‌ها در

بحث

امروزه، بیماری‌های غیرواگیر سهم بیشتری از میزان مرگ‌ومیرهای گزارش شده در دنیا را به خود اختصاص می‌دهند. در این میان، سرطان عامل اصلی مرگ‌ومیر قلمداد می‌شود که در سال ۲۰۲۰ به ۱۹/۳ میلیون مورد مرگ منجر شده است و از این تعداد، ۱۰/۱ میلیون مورد در مردان و ۹/۲ میلیون مورد در زنان گزارش شده است [۵]. از بین سرطان‌های گزارش شده در بین زنان، سرطان دهانه رحم یکی از شایع‌ترین موارد سرطان در زنان در سراسر جهان است و به عنوان چهارمین عامل مرگ در زنان در نظر گرفته می‌شود [۱]. همان‌طور که اشاره شد، یکی از عوامل اصلی خطر در این سرطان، عفونت پایدار با تایپ‌های پرخطر پاپیلومی انسانی است و در بین تایپ‌های پرخطر این ویروس، نقش HPV-16 در سرطان دهانه رحم به اثبات رسیده است [۶].

سرطان زای HPV به دلیل فعالیت انکوژن‌های E6 و E7 است. E6 با سرکوبگر تومور p53 و E7 با pRb مرتبط هستند [۱۹]. این ژن‌های سرکوبگر تومور برای قطع چرخه سلول و تکثیر آن کار می‌کنند. E6 به پروتئین‌های مرتبط سلولی Associated proteins وصل می‌شود و کمپلکس E6-AP ژن سرکوبگر تومور P53 را تخریب می‌کند؛ در نتیجه، P53 عملکرد خود را از دست می‌دهد. این آسیب نقاط کنترل چرخه سلول و آپوپتوز را کاهش می‌دهد و در نتیجه، رشد سلول از کنترل خارج می‌شود. درحالی‌که E7 به ژن سرکوبگر تومور *pRb* متصل می‌شود که باعث کاهش فاکتور بیانی E2F می‌شود و بدون فاکتور بیانی E2F چرخه سلول از کنترل خارج می‌شود. آنکوپروتئین E6 علاوه بر نقشی که در تخریب ژن سرکوبگر تومور P53 دارد، می‌تواند به سبب تأثیر منفی در P53، در متاستاز نیز اثرگذار باشد [۱۹] که در ادامه به آن اشاره خواهد شد.

با توجه به اینکه سرطان دهانه رحم بیماری بسیار پیش‌رونده‌ای

است؛ ژن‌هایی که با افزایش سطح *MMP-1* در ارتباط هستند و مهاجرت و تهاجم سلول‌های توموری را تسهیل می‌کنند [۲۵]. در همین زمینه، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عفونت هم‌زمان HPV-16 و پلیومایروس سلول مرکل می‌تواند میزان بیان *MMP-1* و در نتیجه، شانس متاستاز و تهاجم را در رده سلولی Ca Ski افزایش دهد. این مطالعه نشان داد که بیان MCPyV-sT در سلول‌های Ca Ski ترانسفکت شده با پلاسמיד pCMV6-sT به افزایش قابل توجه بیان ژن *MMP-1* در سطح رونویسی به میزان دو برابر در بازه زمانی ۴۸ ساعت ($P < 0.05$) پس از ترانسفکشن و میزان قابل توجه پنج‌برابری، طی ۷۲ ساعت ($P < 0.01$) پس از ترانسفکشن در مقایسه با گروه‌های کنترل و ماک منجر شد که می‌تواند این فرضیه را تقویت کند که عفونت هم‌زمان با HPV-16 و یک عامل ویروسی دیگر همچون مرکل سل ویروس می‌تواند در متاستاز و تهاجم سرطان دهانه رحم نقش کلیدی داشته باشد. این یافته می‌تواند در مسیرهای تشخیص و درمان و میزان طول عمر بیماران راهگشا باشد. اگرچه انکوژن‌های MCPyV در القای بیان *MMP-1* نقش کلیدی دارند، پیچیدگی میکرو محیط توموری و تعامل میان مسیرهای سیگنالینگ مختلف نیز می‌تواند بر سطح بیان *MMP-1* اثرگذار باشد. این موضوع نشان می‌دهد که عوامل دیگری نیز ممکن است این ارتباط را در زمینه‌های مختلف توموری تنظیم کنند.

نتیجه‌گیری

هدف قراردادن بیان *MMP-1* القا شده با MCPyV می‌تواند پیامدهای درمانی امیدبخشی برای درمان سرطان‌های مرتبط، به‌ویژه کارسینومای سلول مرکل (MCC) داشته باشد. چنین رویکردی می‌تواند اثربخشی درمان‌های موجود را افزایش دهد و مسیرهای نوینی برای ایمنی درمانی فراهم کند. هرچند ایمونوتراپی‌ها، از جمله داروی pembrolizumab، در برخی بیماران اثربخشی نشان داده‌اند، پاسخ‌ها اغلب محدود هستند [۲۶]. هدف قراردادن *MMP-1* می‌تواند با تعدیل میکرو محیط تومور، این پاسخ‌ها را بهبود بخشد. با این حال، با توجه به پیچیدگی زیست‌شناسی تومور و احتمال بروز مکانیسم‌های مقاومت، دستیابی به نتایج مطلوب نیازمند یک رویکرد چندوجهی و ادغام روش‌های درمانی گوناگون خواهد بود.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز و ارسنجان، که ما را در تصویب و اجرای این طرح با کد پژوهشی ۱۵۱۶۲۷۰۹۸۴۹/۱۶۳۴۴۸۱۲۵۷۱۶۶۵۲۰۶۰۷۰ یاری کردند، کمال تشکر را داریم.

ملاحظات اخلاقی

کد اخلاق این پژوهش IR.IAU.A.REC.1403.031 است. همچنین، با توجه به اینکه در این مطالعه از هیچ نمونه انسانی برای این طرح استفاده نشد، به اخذ فرم رضایت‌نامه از بیمار نیاز نبود.

تضاد منافع

در این مقاله هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

انواع سرطان‌ها بیش از حد بیان می‌شود. از نظر فیزیولوژیکی، بیان *MMP-1* در تمام بافت‌های انسانی خیلی کم یا حتی صفر است. *MMP-1* تنها در شرایط فعال یا ترمیمی افزایش می‌یابد. سلول‌های سرطانی پس از فعال شدن انکوژن و غیرفعال‌سازی سرکوبگرهای سرطان می‌توانند *MMP-1* را سنتز کنند. *MMP* نقش مهمی در رشد تومور دارد. به‌طور خاص، *MMP* مولکولی به نام Eph را روی سطح سلول هضم می‌کند و این مولکول باعث چسبندگی سلول به دیگر سلول‌های ماتریکس خارج سلولی می‌شود. بنابراین، حذف این مولکول با *MMP* باعث افزایش نفوذ سلول‌های سرطانی در سیستم هماتوژن و لنفاوی و سپس متاستاز می‌شود [۱۹]. بنابراین، با توجه به مطالب ذکر شده و نقش انکوژن E6 در سرکوب P53 و در نتیجه افزایش بیان *MMP-1*، باید به این نکته توجه کرد عواملی که بتوانند باعث افزایش بیان انکوژن‌های HPV شوند، می‌توانند به‌طور مستقیم در سطح بیان *MMP-1* نیز تأثیرگذار باشند که خود از عوامل مهم تأثیرگذار در میزان متاستاز در سرطان دهانه رحم است [۱۴].

کما اینکه در مطالعه‌ای برای تأیید نقش *MMP-1* در سرطان دهانه رحم، با استفاده از روش CRISPR/Cas9 ویرایش ژنوم برای از بین بردن *MMP-1* در رده‌های سلولی سرطان دهانه رحم SiHa و HeLa انجام شد و نتایج نشان داد که توانایی‌های تکثیر سلولی، مهاجرت و تهاجم به‌طور قابل توجهی با خاموش‌سازی *MMP-1* کاهش یافت [۱۴]. برخی مطالعات به بیان بیش از حد *MMP-1* در سرطان دهانه رحم اشاره کرده‌اند [۱۹-۲۱]. مطالعات نشان داده‌اند که افزایش سطح *MMP-1* با پیش‌آگهی ضعیف سرطان دهانه رحم مرتبط است [۲۲]. در مطالعه‌ای که بیان *MMP*‌های مختلف و مهارکننده‌های بافتی *MMP*‌ها در ضایعات پیش‌سرطانی و سرطانی دهانه رحم، که شامل ۸ مورد (LSIL (Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions)، ۲۳ مورد (High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions) و ۳۱ مورد (HSIL (Squamous Cell Carcinoma) بود، بررسی شد، *MMP-1* در ۵۵ درصد (۱۷ از ۳۱) موارد SCC و در ۳۹ درصد از مواردی که HSIL داشتند، شناسایی شد [۱۵]. در مطالعه‌ای، مقایسه بیان *MMP*‌ها روی رده‌های سلولی SCC، که براساس انواع ویروس پاپیلومای انسانی (HPV16 و HPV18) متفاوت بودند، انجام شد. در این تحقیق، فعالیت کلاژنولیتیک با سطح سلول‌های C33A (گروه کنترل) قابل مقایسه بود. این فعالیت در سلول‌های Ca Ski و HeLa به ترتیب ۲/۳ و ۳/۳ برابر بیشتر از سلول‌های C33A بود [۸].

بیان انکوژن‌های پلیومایروس سلول مرکل MCPyV، به‌ویژه sT، در افزایش بیان *MMP-1* در تومورهای بدخیم، از جمله کارسینومای سلول مرکل نقش قابل توجهی دارد. این ارتباط عمدتاً از طریق فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ انجام می‌شود که ویژگی‌های تومورزایی و تهاجمی را در سلول‌های سرطانی تقویت می‌کنند. براساس شواهد موجود، MCPyV-sT قادر به فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ NF- κ B است که برای رشد تومور و ترشح سایتوکاین‌های تومورزا ضروری است [۱]. فعال‌سازی این مسیر با sT می‌تواند به افزایش رونویسی از ژن *MMP-1* منجر شود و قابلیت تهاجمی سلول‌های توموری را افزایش دهد [۲۳-۲۴]. همچنین، MCPyV-sT در بیان ژن‌های مرتبط با انتقال اپی‌تلایل به مزانشیمی (EMT) نیز اثرگذار

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده سازی این مقاله مشارکت داشتند.

حمایت مالی

این پژوهش حمایت مالی نداشته است.

References

1. Wardak S. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. *Med Dosw Mikrobiol.* 2016;68(1):73-84. [PMID: 28146625]
2. Serrano B, de Sanjosé S, Tous S, Quiros B, Muñoz N, Bosch X, et al. Human papillomavirus genotype attribution for HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 and 58 in female anogenital lesions. *Eur J Cancer.* 2015;51(13):1732-1741. [DOI: 10.1016/j.ejca.2015.06.001] [PMID: 26121913]
3. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007;370(9590):890-907. [DOI: 10.1016/s0140-6736(07)61416-0] [PMID: 17826171]
4. Dos Santos GR, Cunha AP, da Silva Batista Z, da Silva MA, de Figueiredo FV, Dos Santos FR, et al. HPV 18 variants in women with cervical cancer in Northeast Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2023;27(1):102734. [DOI: 10.1016/j.bjid.2022.102734]
5. Sravani AB, Ghatge V, Lewis S. Human papillomavirus infection, cervical cancer and the less explored role of trace elements. *Biol Trace Elem Res.* 2023;201(3):1026-1050. [DOI: 10.1007/s12011-022-03226-2] [PMID: 35467267]
6. Nogueira MO, Hošek T, Calçada EO, Castiglia F, Massimi P, Banks L, et al. Monitoring HPV-16 E7 phosphorylation events. *Virology.* 2017;503:70-75. [DOI: 10.1016/j.virol.2016.12.030] [PMID: 28126639]
7. Salehi-Vaziri M, Sadeghi F, Alamsi-Hashiani A, Haeri H, Monavari SH, Keyvani H. Merkel cell polyomavirus and human papillomavirus infections in cervical disease in Iranian women. *Arch Virol.* 2015;160(5):1181-1187. [DOI: 10.1007/s00705-015-2368-4] [PMID: 25721299]
8. Rasheed K, Sveinbjörnsson B, Moens U. Reciprocal transactivation of Merkel cell polyomavirus and high-risk human papillomavirus promoter activities and increased expression of their oncoproteins. *Virol J.* 2021;18(1):139. [DOI: 10.1186/s12985-021-01613-0] [PMID: 34217322]
9. Vilchez RA, Butel JS. Emergent human pathogen simian virus 40 and its role in cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(3):495-508. [DOI: 10.1128/cmr.17.3.495-508.2004] [PMID: 15258090]
10. Liu W, You J. Molecular mechanisms of Merkel cell polyomavirus transformation and replication. *Annu Rev Virol.* 2020;7(1):289-307. [DOI: 10.1146/annurev-virology-011720-121757] [PMID: 32603631]
11. Abend JR, Jiang M, Imperiale MJ. BK virus and human cancer: innocent until proven guilty. *Semin Cancer Biol.* 2009;19(4):252-260. [DOI: 10.1016/j.semcancer.2009.02.004] [PMID: 19505653]
12. Park DE, Cheng J, Berrios C, Montero J, Cortés-Cros M, Ferretti S, et al. Dual inhibition of MDM2 and MDM4 in virus-positive Merkel cell carcinoma enhances the p53 response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(3):1027-1032. [DOI: 10.1073/pnas.1818798116] [PMID: 30598450]
13. Volkova LV, Pashov AI, Omelchuk NN. Cervical carcinoma: oncobiology and biomarkers. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22):12571. [DOI: 10.3390/ijms222212571] [PMID: 34830452]
14. Tian R, Li X, Gao YE, Li Y, Yang P, Wang K. Identification and validation of the role of matrix metalloproteinase-1 in cervical cancer. *Int J Oncol.* 2018;52(4):1198-1208. [DOI: 10.3892/ijo.2018.4267] [PMID: 29436615]
15. Sun NX, Qian ZH, Chen YE, Yan MA, Wen LI. Role of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)/protease-activated receptor-1 (PAR-1) signaling pathway in cervical cancer invasion. *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol.* 2014;3(1):18-25. [DOI: 10.7669/j.issn.1001-7844.2014.01.0018]
16. Cracan V, Titov DV, Shen H, Grabarek Z, Mootha VK. A genetically encoded tool for manipulation of NADP+/NADPH in living cells. *Nat Chem Biol.* 2017;13(10):1088-1095. [DOI: 10.1038/nchembio.2454]
17. Pakdel F, Hosseini SM, Soleimani N, Farhadi A. Small T oncoprotein of Merkel cell polyomavirus attenuates cisplatin-induced apoptosis and enhances E1, E6/E7, MMP-1, and Ki-67 expression in HeLa cervical cancer cells. *Adv Pharm Bull.* 2025;15(1):194-205. [DOI: 10.34172/apb.43882] [PMID: 40636306]
18. Pasteur Institute of Iran. Pasteur Institute of Iran [Internet]. Available from: [Link]
19. (Accessed 17 Sep 2025). Kurnia I, Rauf S, Hatta M, Arifuddin S, Hidayat YM, Natzir R, et al. Molecular pathomechanisms of cervical cancer (MMP1). *Ann Med Surg (Lond).* 2022;77:103415. [DOI: 10.1016/j.amsu.2022.103415]
20. Vieira GV, Somera dos Santos F, Lepique AP, da Fonseca CK, Innocentini LM, Braz-Silva PH, et al. Proteases and HPV-induced carcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2022;14(13):3038. [DOI: 10.3390/cancers14133038] [PMID: 35804810]
21. Zhang YX, Zhao YL. Pathogenic network analysis predicts candidate genes for cervical cancer. *Comput Math Methods Med.* 2016;2016:3186051. [DOI: 10.1155/2016/3186051] [PMID: 27034707]
22. Rajkumar T, Sabitha K, Vijayalakshmi N, Shirley S, Bose MV, Gopal G, et al. Identification and validation of genes involved in cervical tumorigenesis. *BMC Cancer.* 2011;11:80. [DOI: 10.1186/1471-2407-11-80] [PMID: 21338529]
23. Ryzhakova OS, Solovyeva NI. Matrix metalloproteinases (MMP)-1, -2, -9 and endogenous regulators of their activity in cervical carcinoma cell lines transformed by the E7 oncogene HPV16 and HPV18. *Biochem (Mosc) Suppl Ser B Biomed Chem.* 2012;6(3):247-253. [DOI: 10.1134/S1990750812030122]
24. Zhao J, Jia Y, Shen S, Kim J, Wang X, Lee E, et al. Merkel cell polyomavirus small T antigen activates noncanonical NF-κB signaling to promote tumorigenesis. *Mol Cancer Res.* 2020;18(11):1623-1637. [DOI: 10.1158/1541-7786.mcr-20-0587] [PMID: 32753470]
25. Nwogu N, Ortiz LE, Whitehouse A, Kwun HJ. Merkel cell polyomavirus small tumor antigen activates matrix metalloproteinase-9 gene expression for cell migration and invasion. *J Virol.* 2020;94(19):e00786-20. [DOI: 10.1128/jvi.00786-20] [PMID: 32669331]
26. Gupta R, Simonette RA, Doan HQ, Rady PL, Tyring SK. Targeting the expression of T antigens with selinexor (KPT-330) shows promise for Merkel cell polyomavirus-positive Merkel cell carcinoma treatment. *Br J Dermatol.* 2021;184(6):1185-1187. [DOI: 10.1111/bjd.19801] [PMID: 33403670]