

丝裂霉素联合舒林酸对胃癌SGC7901细胞诱导凋亡的研究

颜永乐, 马 力

颜永乐, 马力, 兰州医学院附属二院消化内科 甘肃省兰州市 730030
颜永乐, 男, 1970-03-31 生, 甘肃省天水市人, 汉族. 1993 年兰州医学院本科毕业, 主治医师, 硕士研究生. 研究方向: 胃肠道肿瘤.
项目负责人: 马力, 730030, 甘肃省兰州市, 兰州医学院附属二院消化内科.
ylxie007@163.com
电话: 0931-8943130 传真: 0938-2610328
收稿日期: 2003-10-24 接受日期: 2003-12-08

Apoptosis induced by mitomycin with sulindac on human gastric cancer cell SGC7901

Yong-Le Xie, Li Ma

Yong-Le Xie, Li Ma, Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730030, Gansu Province, China
Correspondence to: Li Ma, Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. ylxie007@163.com
Received: 2003-10-24 Accepted: 2003-12-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of mitomycin (MMC) with sulindac on the cell viability, apoptotic induction and expression of apoptosis-related gene *Bcl-2* and cyclooxygenase-2 (COX-2) in gastric adenocarcinoma cell SGC7901.

METHODS: Human gastric cancer SGC7901 cells were divided into three groups, sulindac, MMC and sulindac with MMC. After treatment with drugs, cell viability was examined by MTT assay. Flow cytometry was used for the cell cycle distribution and apoptotic rates. The morphology of the cells was observed under light microscope and interactive laser cytometer. The expression of COX-2, *Bcl-2* was determined by the immunocytochemical method.

RESULTS: After exposure for 12 h to three kinds of drugs, gastric cancer cells SGC7901 presented some morphologic features of apoptosis, including cell shrinkage, nuclear condensation, DNA fragmentation, formation of apoptotic bodies. The effects of growth inhibition were more obvious in cotreatment group with MMC and sulindac than MMC group. The apoptotic rates in cotreated cells and MMC-treated cells at 24 h after treatment were 12.0% and 7.2%, respectively. After exposure for 24 h to MMC, upregulation of COX-2 and *Bcl-2* protein expression was noted, meanwhile, in cotreatment group, the levels of COX-2 were downregulated but the expression of *Bcl-2* gene was not changed significantly.

CONCLUSION: MMC-induced apoptosis is reduced by upregulating the expression of COX-2 and *Bcl-2* genes. MMC combined with sulindac can suppress growth of gastric cancer cells through induction of apoptosis which may be mediated by downregulation of apoptosis-related *Bcl-2* gene and COX-2 gene.

Xie YL, Ma L. Apoptosis induced by mitomycin with sulindac on human gastric cancer cell SGC7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):542-545

摘要

目的: 研究丝裂霉素与舒林酸合用对人胃腺癌SGC7901细胞的生长抑制、诱导凋亡及凋亡相关基因*bcl-2*和COX-2基因表达的影响。

方法: SGC7901 胃癌细胞被分为三个实验组, 舒林酸组、丝裂霉素组和舒林酸与丝裂霉素联合组.应用光镜、激光共焦显微镜、MTT法、流式细胞仪和免疫组化技术研究三组药物作用后, 胃癌细胞的形态学变化、生长抑制、诱导凋亡和对凋亡相关基因*Bcl-2*和COX-2表达的影响。

结果: 药物作用于细胞后, 可看到较为典型的细胞凋亡形态学变化: 细胞核固缩, 染色质凝集, 核碎裂, 染色质片段化, 凋亡小体形成等. 药物干预 24 h, 联合组和 MMC 组对胃癌 SGC7901 细胞诱导的凋亡率分别为 12.0% 和 7.20%. 对细胞的增生抑制以联合组最强, MMC 次之, 舒林酸最弱. 经 MMC 作用 24 h 后, COX-2 和 *Bcl-2* 蛋白表达增强, 而联合组出现 COX-2 蛋白表达减弱, *Bcl-2* 蛋白亦未出现明显升高。

结论: 人胃癌 SGC7901 细胞体外实验中, MMC 联合舒林酸使用, 可使增生抑制加强. MMC 可能由于上调 COX-2、*Bcl-2* 蛋白, 减弱了自身对 SGC7901 胃癌细胞的诱导凋亡, MMC 联合舒林酸可抑制 COX-2、*Bcl-2* 表达, 从而提高 MMC 的抗癌效果。

颜永乐, 马力. 丝裂霉素联合舒林酸对胃癌 SGC7901 细胞诱导凋亡的研究. 世界华人消化杂志 2004;12(3):542-545

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/542.asp>

0 引言

COX-2 基因表达的蛋白被认为是一种原癌蛋白(proto-oncogenic protein)^[1], 在很多肿瘤组织中表达上调, 与肿瘤的发生与发展关系密切^[2-12]. 非甾体类消炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAID), 如阿司匹林、吲哚美辛、和舒林酸(sulindac)等, 这类药物可通过抑制环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 而起到抗肿瘤增生和诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[13-22]. NSAID 中的选择性 COX-2 抑制剂赛来昔布(celecoxib)已被美国食品药品监督管理局(FDA)正式批准用于家族性腺瘤样息肉的防治^[23]. 近年,

NSAIDs抗胃癌细胞增生也屡见报道. 本实验旨在观察舒林酸和丝裂霉素(mitomycin, MMC)联合使用对体外培养胃癌 SGC7901 细胞增生的影响, 并通过检测 COX-2 和 Bcl-2 用药前后的变化, 探讨两种药物的合用是否可增强抗癌作用及可能的机制. 为临床治疗提供理论与实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株 SGC7901 (中分化腺癌)购自中科院上海细胞生物研究所; RPMI1640培养基, 胰蛋白酶(Gibco 公司); 四氮唑蓝(MTT)、碘化丙啶、舒林酸(sulindac)购自美国Sigma公司; 丝裂霉素(MMC)为日本协和株式会社产品; 山羊抗人 COX-2 多克隆抗体(Santa Cruz 公司), Bcl-2 单抗及 SP 试剂盒为福建迈新生物技术公司产品; 恒温 CO₂ 培养箱(美国 Forma 公司), 倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司), 酶联免疫检测仪(国营华东电子管厂), 激光共聚焦显微镜(德国 Leica SP2 型), 流式细胞仪(EPICSXL 型, 美国 Coulter 公司), 图像分析系统(四川联合大学).

1.2 方法 将舒林酸和 MMC 以单药和两药联合的形式分为: 舒林酸组、MMC 组和联合组. 实验时将溶解于培养液中的药物(舒林酸以 DMSO 预溶)加入培养细胞的新鲜培养液中, 使药物浓度达到: 舒林酸组, 含 1 mmol/L (其中 DMSO 浓度不超过 5 g/L); MMC 组, 含 1×10^{-3} g/L; 联合组, 含 1 mmol/L 的舒林酸和 1×10^{-3} g/L 的 MMC. 胃癌 SGC7901 细胞常规培养于含 100 mL/L 小牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素及 1×10^{-3} g/L 链霉素的 RPMI1640 培养液中, 置于 37℃, 50 mL/L CO₂ 培养箱内培养. 细胞为上皮样贴壁生长, 取对数生长期细胞用于实验. 将 SGC7901 细胞按每孔 7×10^3 个细胞接种于 96 孔板中, 24 h 后换液, 加入药物, 每组设 6 个复孔, 并设含相同浓度 DMSO 的空白对照, 继续培养 12 h, 24 h, 48 h, 每孔加入 5 g/L 的 MTT 20 μ L; 作用 4 h 后, 弃去上清液, 每孔加 DMSO 溶液 150 μ L, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 在 570 nm 波长酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A)值, 整个实验重复 3 次以上. 以时间为横轴, 吸光度(mean \pm SD)为纵轴绘制生长曲线.

1.2.1 形态学观察 加入药物后, 在倒置显微镜下观察细胞变化形态; 分别于 12 h, 24 h, 48 h 取出处理后的单层附壁细胞爬片, 常规 HE 染色后观察; 将药物处理后的细胞制成细胞悬液, 取一滴细胞悬液与 5 μ L 吡啶橙溶液混匀点滴于清洁玻片上, 10 min 后, 盖玻片封片. 激光共聚焦显微镜下观察、摄片.

1.2.2 流式细胞仪测定 收集药物处理后的胃癌细胞, PBS 洗涤后, 用 4℃乙醇固定 12 h 以上, 离心除去乙醇, 加入 10 g/L RNA 酶溶液 200 μ L, 37℃水浴 15 min, 加入碘化丙啶, 上流式细胞仪检测凋亡百分率及各细胞周期所占百分比.

1.2.3 COX-2, Bcl-2 蛋白检测 细胞接种于盖玻片上, 分别处理, 作用 24 h 后取出玻片, PBS 洗后, 950 mL/L

乙醇固定 30 min, 采用常规 SP 法, 细胞爬片依次用 5 mL/L H₂O₂ 甲醇 30 min, 羊血清室温封闭 10 min, 滴加一抗后, 置 4℃冰箱过夜, 再滴加生物素化二抗 37℃孵育 12 min, 滴加链亲和素-过氧化酶溶液 37℃15 min, DAB 显色、脱水、透明、封片. 实验中设置阳性对照, 阴性对照(以 PBS 代替一抗).

统计学处理 应用 SPSS 8.0 统计分析软件进行 t 检验和方差检验.

2 结果

2.1 SGC7901 细胞生长和凋亡 联合用药对细胞增生抑制强于丝裂霉素, 而舒林酸作用最弱(图 1). 未用药的 SGC7901 细胞生长良好, 表现为梭形或多角形, 并可融合形成集落. 加药后, 出现伪足回缩, 细胞变圆、变小、部分细胞脱落漂浮于培养液中. 通过 HE 染色, 可看到较为典型的细胞凋亡形态学变化: 细胞体积缩小, 核固缩深染, 部分裂解形成凋亡小体. 活细胞对荧光染料有拒染性, 故染色较浅, 激光共聚焦显微镜下观察, 可见正常细胞核形态饱满, 表现为弥散均匀的黄绿色荧光, 凋亡细胞则出现细胞核体积缩小, 荧光染色增强, 染色质呈致密浓染的块状或颗粒状荧光以及细胞膜出泡、凋亡小体形成. 上述表现以联合药物组最明显, 且凋亡细胞数量随着药物作用时间的延长而增加(图 2).

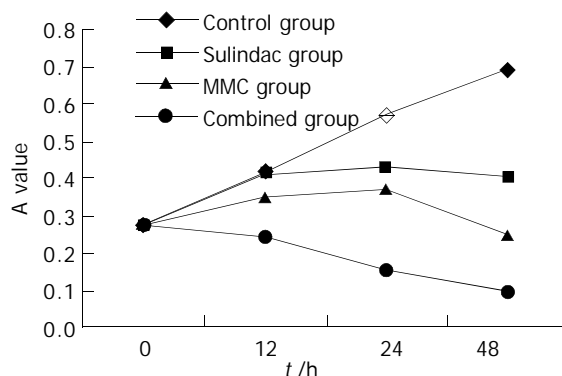


图 1 药物对 SGC7901 细胞生长抑制作用.

表 1 药物对 SGC7901 细胞凋亡及细胞周期的影响(% , mean \pm SD)

Group	Apoptosis	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	0.43 \pm 0.38	47.43 \pm 2.81	45.50 \pm 1.25	7.06 \pm 4.06
Sulindac	3.80 \pm 0.53 ^a	49.67 \pm 3.29	44.70 \pm 5.82	4.97 \pm 6.52
MMC	7.20 \pm 1.31 ^a	56.67 \pm 3.92 ^a	40.40 \pm 11.53	6.60 \pm 2.99
Combined	11.97 \pm 2.59 ^b	68.40 \pm 5.53 ^b	29.23 \pm 5.87	2.37 \pm 0.45

^aP < 0.05, vs Control; ^bP < 0.01, vs MMC.

2.2 细胞周期的分布 药物作用 24 h 后, 流式细胞仪检测凋亡率和细胞周期分布, 可见细胞凋亡率明显增加, 且联合组细胞凋亡率明显高于丝裂霉素及其他组(P < 0.01); 对细胞周期分布的影响, 即使 G₀/G₁ 期细胞比例增高,

使S期细胞比例降低(表1).

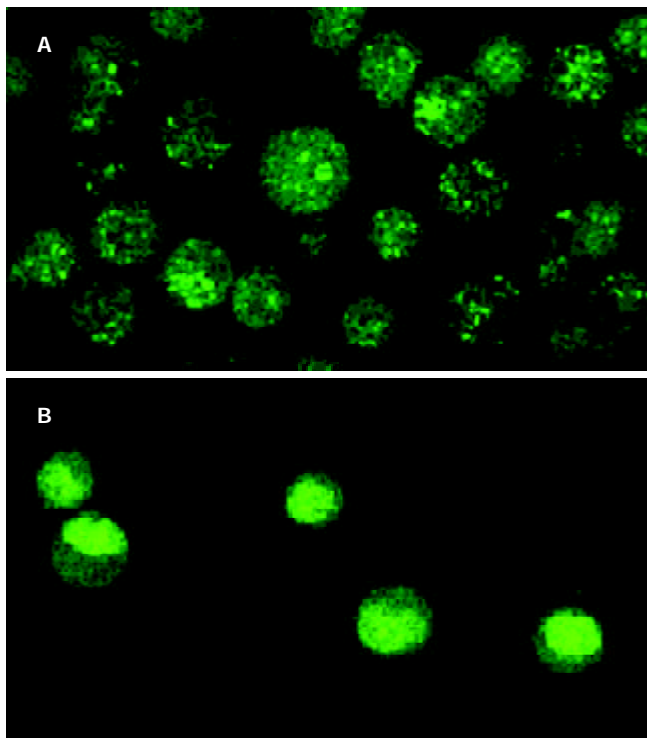


图2 SGC7901细胞经吖啶橙染色 × 400. A: 未经药物处理, 细胞核形态饱满, 呈均匀的黄绿色荧光; B: 药物作用后 SGC7901, 细胞核固缩, 荧光染色增强, 染色质呈致密浓染的块状.

2.3 COX-2, Bcl-2 蛋白的表达 对照组 COX-2, Bcl-2 蛋白均呈阳性表达. COX-2 蛋白表达物质呈棕黄色颗粒状, 主要弥散分布于整个胞质或沿核膜周边呈线状分布, 强阳性时可反应于胞核; Bcl-2 蛋白主要定位于胞膜、胞核及核膜. 采用图像分析系统检测免疫组化染色后细胞平均灰度值, 用此间接反映 COX-2 和 Bcl-2 蛋白表达量. 舒林酸干预 24 h 后, COX-2、Bcl-2 表达减弱, 而 MMC 则使两种蛋白表达增强, 合用后, COX-2 表达减弱, Bcl-2 与对照组比较无变化, 但较 MMC 组表达减弱(表 2).

表2 药物干预 24 h 对 SGC7901 细胞 COX-2 及 Bcl-2 蛋白表达的影响 (mean±SD, n = 3, A)

Group	COX-2	Bcl-2
Control	0.4 980 ± 0.0 330	0.3 652 ± 0.057
Sulindac	0.3 967 ± 0.0 306 ^a	0.2 617 ± 0.0 333 ^b
MMC	0.5 633 ± 0.0 208	0.4 500 ± 0.0 436 ^b
Combined	0.4 000 ± 0.0 265 ^{ac}	0.3 660 ± 0.0 397 ^c

^aP <0.01, ^bP <0.05, vs control; ^cP <0.05, vs MMC.

3 讨论

化疗耐药是肿瘤治疗中的难题, 研究耐药机制和寻求克服途径成为当今肿瘤治疗的重点^[24-26]. 肿瘤细胞对化疗药物的耐药缘于多种机制, Bcl-2 基因的异常表达可

能与之有关^[27]. 研究通过抑制 Bcl-2 的表达以增强化疗药物的敏感性, 如利用反义寡核苷酸封闭细胞凋亡抑制基因 Bcl-2 的表达, 可使细胞对顺铂、5- 氟尿嘧啶的敏感性增强^[28]. COX-2 在许多肿瘤细胞中高表达, 如胃癌 SGC7901 细胞^[29]. 有证据表明 COX-2 基因表达增强导致 Bcl-2 蛋白表达增加并引起细胞凋亡抑制^[30], COX-2 是 Bcl-2 的上游调节者, 通过作用于 Bcl-2 家族而影响肿瘤细胞凋亡的发生发展^[31]. 最近研究者发现舒林酸在体外对人胃腺癌细胞株 MKN45 和 MKN28 有良好的增生抑制作用, 并能诱导 2 株细胞发生凋亡, 舒林酸诱导胃癌细胞凋亡与其抑制 COX-2 继而抑制 Bcl-2 蛋白有关^[13]. 我们用 MTT 法证实 MMC 与舒林酸合用对 SGC7901 细胞的增生抑制强于 MMC 或舒林酸的单独干预; 流式细胞仪检测显示合用组较单药组更高的凋亡率; 药物干预 24 h, MMC 使 COX-2, Bcl-2 蛋白表达增多, 而合用后, COX-2, Bcl-2 蛋白均较 MMC 组减少. 提示 MMC 可能通过增加 COX-2, Bcl-2 的表达减弱了自身了对胃癌细胞的凋亡诱导效应, 舒林酸抑制 COX-2 蛋白, 下调 Bcl-2 的表达, 从而增强了 MMC 的诱导凋亡. 国外学者报道^[32], MMC 作用于 MKN74 胃癌细胞后 COX-2, Bcl-2 上调, 而 MMC 与 COX-2 选择剂 NS-398 共同处理胃癌细胞后, 两种蛋白表达降低, 细胞凋亡有显著提高. 本实验中虽然未见到合用后 Bcl-2 较空白组减弱, 但较 MMC 作用后表达亦明显降低, 同时也可看到舒林酸对 COX-2 和 Bcl-2 蛋白的表达抑制作用.

细胞凋亡是一种主动的受基因调控的细胞自杀过程. 许多人体基因如 Bcl-2, P53, C-myc 及相关基因 Bcl-2, bax, bad 等参与凋亡的调控, 其中 Bcl-2 基因尤为重要, 他被看作是细胞凋亡调控的最后共同通路之一^[33]. Bcl-2 能抑制许多抗肿瘤药物的诱导细胞凋亡作用, 降低其细胞毒性^[34]. 应用药物如 COX-2 抑制剂或反义基因治疗^[2, 35]与传统化疗药物协调使用, 可提高化疗效果, 减少药物剂量和药物副作用. 本实验观察到的结果提示舒林酸可能通过调节凋亡抑制基因 Bcl-2, 从而使 MMC 产生化疗增效, 但 COX-2 与凋亡相关基因 bax, Bcl-2 之间的信号传递过程仍未完全清楚, 而且 NSAID 抗肿瘤作用机制中除了 COX-2 途径外, 还有 COX-2 非依赖途径^[36-39], 包括对细胞周期的影响, 影响 NF-κB 的活性和 P53 的表达, RAS 信号传递途径的调节等. 因此, NSAIDs 抗胃癌机制中 COX-2 依赖和非依赖性途径可能均有参与, 但确切的作用机制及何种途径为主目前仍未明了. 我们的研究提示舒林酸和 MMC 在体外对胃癌 SGC7901 细胞的增生有一定的协同作用, 但在不同的细胞株及临床应用的有效性, 尚难确定, 须进行更为广泛、深入的研究.

4 参考文献

1 Oshima M, Murai N, Kargman S, Arguello M, Luk P, Kwong E, Taketo MM, Evans JF. Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apcdelta716 mouse by rofecoxib, a specific

- cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* 2001;61:1733-1740
- 2 Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:796-800
- 3 Davies G, Martin LA, Sacks N, Dowsett M. Cyclooxygenase-2 (COX-2), aromatase and breast cancer: a possible role for COX-2 inhibitors in breast cancer chemoprevention. *Ann Oncol* 2002;13:669-678
- 4 Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, Oshima H, Takaku K, Chiba T, Narumiya S, Taketo MM. Cyclooxygenase 2 and prostaglandin E (2) receptor EP (2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Res* 2002;62:506-511
- 5 Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Sakamoto K, Bostwick DG, Mukhtar H. Lipoxygenase-5 is overexpressed in prostate adenocarcinoma. *Cancer* 2001;91:737-743
- 6 Weddle DL, Tithoff P, Williams M, Schuller HM. Beta-adrenergic growth regulation of human cancer cell lines derived from pancreatic ductal carcinomas. *Carcinogenesis* 2001;22:473-479
- 7 Ristimäki A, Nieminen O, Saukkonen K, Hotakainen K, Nordling S, Haglund C. Expression of cyclooxygenase-2 in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am J Pathol* 2001;158:849-853
- 8 Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:429-434
- 9 Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric adenomas and adenocarcinomas. *J Surg Oncol* 2001;76:26-30
- 10 Kokawa A, Kondo H, Gotoda T, Ono H, Saito D, Nakadaira S, Kosuge T, Yoshida S. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors. *Cancer* 2001;91:333-338
- 11 Fantappiè O, Masini E, Sardi I, Raimondi L, Bani D, Solazzo M, Vannacci A, Mazzanti R. The MDR phenotype is associated with the expression of COX-2 and iNOS in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Hepatology* 2002;35:843-852
- 12 Kakiuchi Y, Tsuji S, Tsujii M, Murata H, Kawai N, Yasumaru M, Kimura A, Komori M, Irie T, Miyoshi E, Sasaki Y, Hayashi N, Kawano S, Hori M. Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. *Cancer Res* 2002;62:1567-1572
- 13 Sun B, Wu YL, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhang YP, Zhong J. Effects of Sulindac on growth inhibition and apoptosis induction in human gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:997-1002
- 14 Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93:705-716
- 15 Daniel TO, Liu H, Morrow JD, Crews BC, Marnett LJ. Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res* 1999;59:4574-4577
- 16 Tian G, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Yue H, Li JY, Mei Q. Effect of Nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:483-487
- 17 Lynch PM. COX-2 inhibition in clinical cancer prevention. *Oncology* 2001;15(3 Suppl 5):21-26
- 18 Li JY, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Huang JA. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the proliferation and cyclooxygenase activity of gastric cancer cell line SGC7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:262-265
- 19 Buttar NS, Wang KK, Leontovich O, Westcott JY, Pacifico RJ, Anderson MA, Krishnadath KK, Lutzke LS, Burgart LJ. Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma by COX-2 inhibitors in an animal model of Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002;122:1101-1112
- 20 Mann M, Sheng H, Shao J, Williams CS, Pisacane PI, Sliwkowski MX, DuBois RN. Targeting cyclooxygenase 2 and HER-2/neu pathways inhibits colorectal carcinoma growth. *Gastroenterology* 2001;120:1713-1719
- 21 Wight NJ, Gottesdiener K, Garlick NM, Atherton CT, Novak S, Gertz BJ, Calder NA, Cote J, Wong P, Dallob A, Hawkey CJ. Rofecoxib, a COX-2 inhibitor, does not inhibit human gastric mucosal prostaglandin production. *Gastroenterology* 2001;120:867-873
- 22 Zhang Z, DuBois RN. Par-4, a proapoptotic gene, is regulated by NSAIDs in human colon carcinoma cells. *Gastroenterology* 2000;118:1012-1017
- 23 赵丽琴. Celecoxib 用于治疗息肉在美国批准上市. 国外医学药学分册 2000;27:319-320
- 24 姚学清, 林锋. 肿瘤多药耐药和进展期大肠癌耐药细胞株建立研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:1433-1435
- 25 Wang SD, Zhang ZS, Zhang XQ, Zhou DY. The function of CPP32 in apoptosis of multidrug-resistance gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1152-1156
- 26 马强, 张振书, 王群英. 大肠癌多药耐药性的逆转. 世界华人消化杂志 2001;9:822-825
- 27 Reed JC. Promise and problems of Bcl-2 antisense therapy. *J Nat Can Inst* 1997;89:988-990
- 28 王佐佑, 肖冰, 时永金, 赵燕秋, 樊代明. 转染 Bcl-2 反义核酸对胃癌细胞药物敏感性的影响. 世界华人消化杂志 1999;7:796-797
- 29 Ristimäki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1997;57:1276-1280
- 30 Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cells* 1995;83:493-501
- 31 Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* 1998;58:4245-4249
- 32 Hsueh CT, Chiu CF, Kelsen DP, Schwartz GK. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 enhances mitomycin-C-induced apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;45:389-396
- 33 Chen CJ, Sun YX, Zhou HG, Pan BR, Zheng SG, Hong XZ, Liu JH, Feng WY. Bcl-2 and p53 expressions in colorectal adenoma and carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:683-685
- 34 Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993;81:151-157
- 35 Wu GS, Wu XY, Zou SQ, Qiu FZ. Effects of cyclooxygenase-2 antisense vector on proliferation of human cholangiocarcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:733-736
- 36 Yamamoto H, Itoh F, Fukushima H, Hinoda Y, Imai K. Overexpression of cyclooxygenase-2 protein is less frequent in gastric cancers with microsatellite instability. *Int J Cancer* 1999;84:400-403
- 37 Yamamoto Y, Yin MJ, Lin KM, Gaynor RB. Sulindac inhibits activation of the NF-kappa B pathway. *J Biol Chem* 1999;274:27307-27314
- 38 Gilhooly EM, Rose DP. The association between a mutated ras gene and cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer cell lines. *Int J Oncol* 1999;15:267-270
- 39 Majima M, Hayashi I, Muramatsu M, Katada J, Yamashina S, Katori M. Cyclo-oxygenase-2 enhances basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants. *Br J Pharmacol* 2000;130:641-649