

# 吡喹酮对野生型p53转染的结肠癌细胞株SW480的影响

张桂英, 徐美华, 谢兆霞, 何春梅

张桂英, 徐美华, 谢兆霞, 中南大学湘雅医院消化内科 湖南省长沙市 410078  
何春梅, 中南大学湘雅医学院 湖南省长沙市 410078  
徐美华, 女, 1967-06-05生, 湖南省桃江县人, 汉族, 1991年湖南医科大学  
本科毕业, 2002年中南大学湘雅医学院博士研究生毕业, 主要从事消化道肿  
瘤研究。

卫生部自然科学基金资助项目, No. 98-2-088

项目负责人: 张桂英, 410078, 湖南省长沙市湘雅路 141 号, 中南大学湘雅  
医院消化内科. meihuaxu2001@yahoo.com.cn

电话: 0731-4327249

收稿日期: 2002-10-08 接受日期: 2003-05-21

## Effect of indomethacin on induction of apoptosis in colonic cancer cell line SW480 transferred by wild-type p53 gene

Gui-Ying Zhang, Mei-Hua Xu, Zhao-Xia Xie, Chun-Mei He

Gui-Ying Zhang, Mei-Hua Xu, Zhao-Xia Xie, Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital, Zhongnan University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Chun-Mei He, Cancer Research Institute, Xiangya Medical College, Zhongnan University, Changsha 410078, Hunan Province, China  
Supported by the Natural Science Foundation of the Ministry of Health of China, No. 98-2-088

Correspondence to: Gui-Ying Zhang, Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital, Zhongnan University, 141 Xiangya Road, Changsha 410008, Hunan Province, China. meihuaxu2001@yahoo.com.cn

Received: 2002-10-18 Accepted: 2003-05-21

## Abstract

AIM: To investigate the anti-tumor effect of indomethacin on colon cancer.

METHODS: SW480 cells were transferred by wtp53 gene, treated with different concentrations of indomethacin. Apoptosis was analyzed by acridine orange and ethidium bromide staining, and electron microscopy. Expressions of Bcl-2, Bax and p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein were detected by Western blotting.

RESULTS: Indomethacin induced apoptosis in wtp53/SW480 cells. Typical cell morphological changes included cytoplasm and nuclear shrinkage, nuclear fragmentation and formation of apoptotic bodies. The count of apoptotic cells was dose and time-dependent, and the apoptotic cells accounted for 5.0±2.0 % in SW480 cells, 60.1±2.0 % in wtp53/SW480 cells treated with 600 μmol/L indomethacin for 72 h ( $P < 0.01$ ), with a significant difference between the two groups. The expression of Bcl-2 protein of wtp53/SW480 cells was down-regulated by indomethacin in a dose dependent manner. The expression of Bax protein did not change, and the expressions of Bcl-2 and Bax protein of SW480 cells did not change either. The expression of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein of wtp53/SW480 cells was up-regulated, reaching the maximal level at the concentration of 400 μmol/L indomethacin and returning to control level at the concen-

tration of 600 μmol/L indomethacin

CONCLUSION: Indomethacin could induce apoptosis in wtp53/SW480 cells by down-regulating the expression of Bcl-2 protein and up-regulating the expression of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein, but no change in Bax protein.

Zhang GY, Xu MH, Xie ZX, He CM. Effect of indomethacin on induction of apoptosis in colonic cancer cell line SW480 transferred by wild-type p53 gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(11):1706-1710

## 摘要

目的: 探讨吡喹酮抗结肠癌作用是否呈p53依赖性及其部分分子机制。

方法: 采用含突变型p53的SW480细胞株为研究对象, 利用基因转染技术, 将野生型p53转染SW480细胞。不同浓度的吡喹酮进行干预, 采用吖啶橙、溴化乙锭荧光染色, 荧光显微镜及透射电镜下观察wtp53/SW480细胞凋亡; Western 斑点免疫印迹检测wtp53/SW480细胞中Bcl-2、Bax及p21<sup>WAF1/CIP1</sup>蛋白表达。

结果: 吡喹酮诱导野生型p53转染的wtp53/SW480细胞凋亡, 出现形态学改变: 即细胞核固缩、裂解, 核碎片及凋亡小体形成。凋亡细胞计数显示该作用呈浓度-时间依赖性, 其中600 μmol/L IN作用于wtp53/SW480细胞72 h, 其凋亡细胞百分率为60.1±2.5%; 而对照组其凋亡细胞百分率为5.0±2.0%,  $P < 0.01$ , 二者比较有显著性差异。吡喹酮作用于wtp53/SW480细胞24 h, 其Bcl-2蛋白表达水平下调, 呈浓度依赖性, 而Bax蛋白表达无改变; 未转染的SW480细胞中Bcl-2, Bax蛋白均无影响。吡喹酮作用于wtp53/SW480细胞24 h, 其p21<sup>WAF1/CIP1</sup>蛋白表达水平随着一定范围内吡喹酮浓度的增加而逐渐上调, 以400 μmol/L吡喹酮作用最强, 600 μmol/L吡喹酮作用后回到基础水平。而在未转的SW480细胞中p21<sup>WAF1/CIP1</sup>蛋白的表达无明显改变。

结论: IN通过下调Bcl-2蛋白, 上调p21<sup>WAF1/CIP1</sup>蛋白的表达来诱导wtp53/SW480细胞凋亡。

张桂英, 徐美华, 谢兆霞, 何春梅. 吡喹酮对野生型p53转染的结肠癌细胞株SW480的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(11):1706-1710

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1706.asp>

## 0 引言

转染野生型p53 (wild-type p53, wtp53)表达质粒, 可

引起 p53 缺失或突变的肿瘤细胞凋亡和/或抑制肿瘤细胞生长, 予烷化剂作用后 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白表达明显增加<sup>[1]</sup>. 然而, 有研究者将 wtp53 转染至 SW480 细胞中, 结果显示 p53 表达的修复不足以引起转染的结肠癌细胞的凋亡<sup>[2]</sup>. 研究证实, 非甾体类药物(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID)可通过非选择性抑制环氧化酶(cyclo-oxygenase, COX), 而抑制对肿瘤生长和转移有明显促进作用的 PGE<sub>2</sub> 的产生<sup>[3, 4]</sup>; 诱导凋亡是 NSAID 抗肿瘤作用的机制之一<sup>[5-12]</sup>. 为探讨非甾体类药物吲哚美辛(indomethacin, IN)诱导肿瘤细胞凋亡时凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bax 蛋白的表达是否下调或上调, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白表达上调是否存在依赖性 p53-p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 途径, 我们将 wtp53 基因转染至 SW480 细胞后给予一定浓度的吲哚美辛干预, 吡啶橙和溴化乙锭染色后, 荧光显微镜及透射电镜下观察凋亡细胞形态学改变; Western 印迹检测 IN 诱导 wtp53/SW480 细胞凋亡时 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达.

## 1 材料和方法

1.1 材料 含 mtp53 的 SW480 人结肠癌细胞株, 购自 ATCC. wtp53/PLXSN 重组体质粒为湘雅医院周晓娟老师惠赠; DMEM 培养基, FuGENE<sup>TM</sup>6 transfection reagent, G418 为湘雅医学院细胞生物室关勇军老师惠赠; Qiagen 质粒抽提纯化试剂盒、吡啶橙(AO)、溴化乙锭(EB)为 Sigma 公司产品; 兔源性多克隆抗体 Bcl-2、Bax、p21WAF1/CIP1 为 Santa Cruz 产品;  $\beta$ -action 抗体为湘雅医学院贺智敏老师惠赠; BCA 浓度测定试剂盒为 Pierce Chemical Co 产品; ECL 发光试剂盒为 NEN<sup>TM</sup> Life Science Product; Trizol 试剂为 Gibco 公司产品; 逆转录试剂盒、辣根过氧化物酶标记羊抗兔、羊抗鼠二抗, NC 膜、Taq DNA 聚合物酶、dNTPs、PCR Marker 为华美生物工程公司或 Promega 公司产品.

1.2 方法 wtp53/PLXSN 质粒转染 SW480 细胞按(Clin Cancer Res 1996;2:1639)略加改进. 用脂质体将 wtp53/PLXSN 质粒转染至 SW480 细胞, 转染 48 h 后加 G418 800 mg/L, 以后保持 200 mg/L G418 筛选. 细胞克隆化, 随意挑选 G418 抗性克隆 wtp53/SW480 细胞, 200 mg/L G418 浓度维持扩大培养. 空白载体 PLXSN 转染 SW480 细胞作为对照. RT-PCR 检测 wtp53/SW480 细胞外源性 wtp53 基因的表达 按 Trizol 试剂盒操作说明抽取两组 wtp53/SW480 细胞、SW480 细胞、空白载体转染的 SW480 的总 RNA. cDNA 合成: 于 0.5 mL Eppendorf 内依次加入 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ L, 10  $\times$  RT buffer 2  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L, Rnasin 40 U, AMV 200 U, Oligo (dT)<sub>15</sub> 1  $\mu$ L, 反应终体积为 20  $\mu$ L, 离心后于 42  $^{\circ}$ C 反应 60 min, 95  $^{\circ}$ C 5 min. PCR 反应: 50  $\mu$ L 反应体系中含 cDNA 模板 5  $\mu$ L, 10  $\times$  PCR buffer 5  $\mu$ L, 正向引物和反向引物各 50 pmol, 10 mmol dNTP 2  $\mu$ L, Taq 酶 2U. 循环条件为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 94  $^{\circ}$ C 50 s, 53  $^{\circ}$ C

30 s, 72  $^{\circ}$ C 40 s, 共 30 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min.

1.3 实验干预 取指数生长期 wtp53/SW480 细胞, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$ /L, 接种于含 150 mL/L FCS 的 DMEM 培养液的 6 孔培养板中, 设置空白对照组、实验对照组(DMSO)、实验组: 分别加入 IN 使其终浓度为 100, 200, 400, 600  $\mu$ mol/L, 培养 24 h, 48 h, 72 h 后, 进行相关检测.

1.3.1 wtp53/SW480 细胞荧光染色 各孔细胞用胰蛋白酶消化, 取细胞悬液 5  $\mu$ L (含细胞数  $1 \times 10^6$ /L) 于载玻片上, 加荧光染色液(含 200 mg/L AO+EB) 5  $\mu$ L 染色 1 min, 荧光显微镜下观察并摄影. 计算 200 个细胞及凋亡细胞百分率, 每次实验重复 3 次.

1.3.2 透射电镜检测 将细胞轻轻刮下来, 离心(500 r/min 5 min), 戊二醛固定 2 h 以上; 0.1 mol/L PBS 清洗细胞团后, 用 20 g/L 锇酸固定 1 h; 0.1 mol/L PBS 清洗细胞团, 然后丙酮梯度脱水; 环氧树脂和丙酮 1:1, 37  $^{\circ}$ C 下浸泡 24 h; 纯环氧树脂包埋, 60  $^{\circ}$ C 烤箱, 24 h; LKB-III 型超薄切片机电切片, 厚度 500-600 nm; 铅铀双重染色后 H-600 透射电镜下观察.

1.3.3 Western 斑点印迹法 PBS 漂洗提取上述各组细胞, 调整细胞数为  $1 \times 10^6$ , 5 000 r/min 4  $^{\circ}$ C 离心 10 min 收集细胞, 加入裂解液抽提蛋白, BCA 方法测定蛋白质浓度. 每样品取 80  $\mu$ g 总蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离 2-3 h 后, 100V 电转移至 NC 膜, PBS-T 溶解的 50 g/L 脱脂牛奶中封闭 4-6 h, 分别将兔源性多克隆抗体 Bcl-2 (1:500), Bax (1:500), P21WAF1/CIP1 (1:500) 一抗稀释于 50 g/L 脱脂牛奶中, 与膜温育 1 h, PBS-T 洗膜 4  $\times$  15 min, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(1:50)与膜温育 1 h, PBS-T 洗膜 4  $\times$  15 min; ECL 检测试剂与膜作用 3 min 后暗室中曝光, X 线片显影、定影.

取出以上滤膜, 放入 PBS-T 中漂洗 30 min. 鼠抗人单克隆抗体  $\beta$ -action 1:10 000 稀释于 50 g/L 脱脂牛奶中, 与 NC 膜温育 1 h, 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗体(1:50)与膜温育 1 h, ECL 检测试剂与膜作用 3 min 后暗室中曝光, X 线片显影、定影.

统计学处理 凋亡细胞百分率均数以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异用 t 检验, 采用 SPSS 10.0 处理.

## 2 结果

wtp53/PLXSN 质粒转染 SW480 细胞系, 转染 48 h 后 800 mg/L G418 筛选. 经筛选 8-10 d 后可见抗 G418 克隆出现, 随机挑选 G418 抗性克隆 wtp53/SW480 扩大培养后作进一步鉴定. Trizol 一步法提取 wtp53/SW480 细胞的总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 并作模板进行 PCR 扩增, PCR 引物为: p53 基因的正向引物 Pf: AGA, ATG, CCA, GAG, GCT, GCT, C, 反向引物 Pr: CTC, GGA, TAA, GAT, GCT, GAG, GA, 扩增片段大小为 397 bp; GAPDH 上游引物 Pf: CCT, CAG, TTG, CCT, AAA, CCA, GCA, 下游引物 Pr: CCA, CTA, AAA, CCT, CCC,

TAG, AGC, 扩增片段大小为 240 bp. PCR 产物用 10 g/L 凝胶电泳(含 0.5 mg/L EB)检测, 并选用 GAPDH 作为内对照.

2.1 细胞凋亡形态学 荧光显微镜及透射电镜下观察, 未经 IN 处理的 wtp53/SW480 细胞, 染色后细胞形态显示肿瘤细胞核大, 染色质疏松细致, 外形较规则, 呈圆形或椭圆形. 大于或等 200 μmol/L IN 作用于 wtp53/SW480 细胞 72 h 后引起凋亡典型的形态学改变, 主要包括细胞体积缩小, 细胞核固缩、偏向一边、裂解、核碎裂、呈桔红色等, 细胞器及细胞膜完整, 密度增高. 染色质浓集成块、靠边, 凋亡小体形成. 凋亡细胞计数结果显示未经 IN 作用的 wtp53/SW480 细胞凋亡不明显; 随着一定范围内 IN 浓度的增加及作用时间的延长, wtp53/SW480 细胞凋亡百分率而逐渐增加(表 1).

表 1 IN 促 wtp53/SW480 细胞凋亡 (% ,  $\bar{x} \pm s$ , n=3)

IN (μmol/L)	24 h	48 h	72 h
对照组	1.3 ± 0.6	1.7 ± 0.6	5.0 ± 2.0
DMSO 组	1.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	2.3 ± 0.6 <sup>b</sup>	5.5 ± 1.0 <sup>b</sup>
100	6.0 ± 2.0	10.2 ± 0.6	24.5 ± 1.7
200	7.8 ± 0.6	13.7 ± 2.5	39.3 ± 2.5
400	10.3 ± 0.6	20.8 ± 1.0	46.0 ± 2.0 <sup>b</sup>
600	14.2 ± 1.2	28.0 ± 2.0	60.1 ± 2.5 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>P <0.01, vs 对照组比较.

2. 2 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白表达 不同浓度的 IN 作用于 wtp53/SW480 细胞 24 h 后, Western 印迹检测发现 wtp53/SW480 细胞中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白表达水平在一定范围内随着 IN 作用浓度的增加而逐渐上调, 且于 400 μmol/L IN 达到最高表达水平, 600 μmol/L IN 作用后则下降至基础水平. 而在未转染的 SW480 细胞中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白表达水平无变化(图 1).

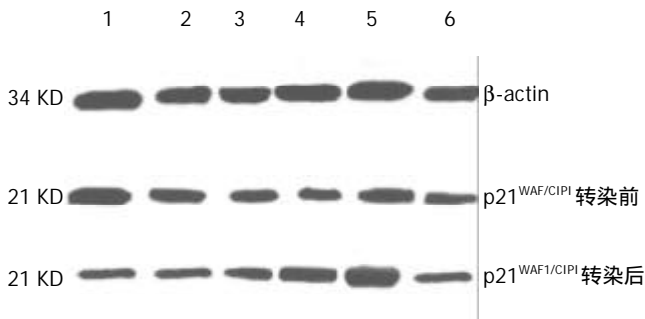


图 1 IN 影响 SW480 细胞转染前后 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白表达. 1: control; 2: DMSO; 3: 100 μmol/L IN; 4: 200 μmol/L IN; 5: 400 μmol/L IN; 6: 600 μmol/L IN.

2.3 Bcl-2、Bax 蛋白表达 wtp53/SW480 细胞中 Bcl-2 蛋白表达随着一定范围内 IN 的浓度增加而逐渐减弱, Bax 蛋白的表达无明显改变. SW480 细胞中 Bcl-2 蛋白、Bax 蛋白均无变化(图 2、3). 为确定 Bcl-2、Bax 蛋白表达在细胞中的相对含量, 我们测定了 Bcl-2、Bax 蛋白

的光密度值, 结果发现随着一定范围内 IN 浓度增加, Bcl-2/Bax 比率呈逐渐下降趋势(图 4).

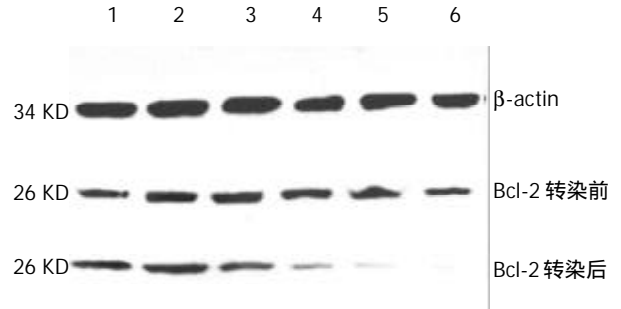


图 2 IN 影响 SW480 细胞转染前后 Bcl-2 蛋白表达. 1: control; 2: DMSO; 3: 100 μmol/L IN; 4: 200 μmol/L IN; 5: 400 μmol/L IN; 6: 600 μmol/L IN.

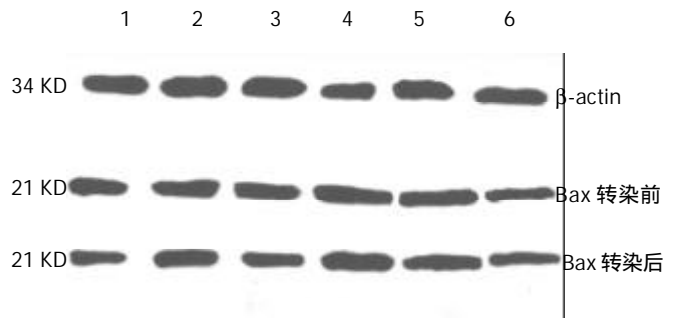


图 3 IN 影响 SW480 细胞转染前后 Bax 蛋白表达. 1: control; 2: DMSO; 3: 100 μmol/L IN; 4: 200 μmol/L IN; 5: 400 μmol/L IN; 6: 600 μmol/L IN.

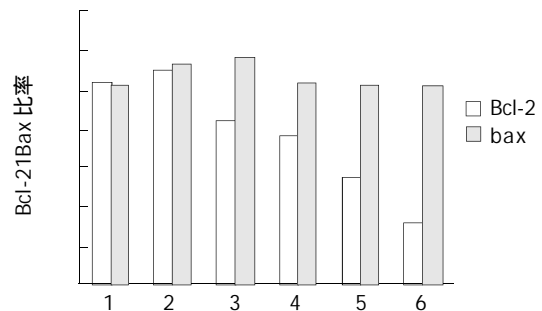


图 4 IN 影响 wtp53/SW480 细胞中 Bcl-2/Bax 比率. 1: control; 2: DMSO; 3: 100 μmol/L IN; 4: 200 μmol/L IN; 5: 400 μmol/L IN; 6: 600 μmol/L IN.

### 3 讨论

结肠癌中存在高频率的 p53 突变表达, 突变型 p53 既不使细胞生长停滞, 亦不能诱导细胞凋亡, 故结肠肿瘤对常规化疗药物呈现抵抗, 对 DNA 损伤剂的辅助治疗也不很敏感. p53 基因是基因研究中最广泛深入的肿瘤基因之一, 野生型 p53 基因转染结合放射、化疗治疗可明显诱导凋亡, 并减少化疗或放疗的剂量, 减少副作用<sup>[13, 14]</sup>. 有作者认为对于存在 p53 突变或缺失的肿瘤, 放、化疗敏感性降低, 甚至不敏感, 可通过基因转染增强其对放、化疗的敏感性<sup>[15-20]</sup>.

SW480 细胞无自发性凋亡发生, 对非甾体类药物苏林达二硫化物反应呈现一定的凋亡抵抗<sup>[2]</sup>. 我们将 wtp53 基因转染至 SW480 细胞, 通过 RT-PCR 证实转染成功后, 不同浓度的 IN 作用于 wtp53/SW480 细胞, 出

现细胞体积缩小, 细胞核体积缩小、固缩, 染色质浓集成块, 靠边, 凋亡小体形成, 从形态学上证实细胞发生了凋亡, 细胞形态及研究结果与 Dai et al<sup>[21]</sup>的报道相一致. 未经 IN 处理的 wtp53/SW480 细胞, 72 h 后凋亡细胞的百分率仅为  $5.0 \pm 2.0\%$ ; 经 IN 处理的 wtp53/SW480 细胞, 随 IN 在一定范围内剂量的增加其凋亡细胞百分率明显增加, 600  $\mu\text{mol/L}$  IN 作用于 wtp53/SW480 细胞 72 h, 其凋亡细胞的百分率为  $60.1 \pm 2.5\%$ . 荧光染色及电镜超微结构的变化从形态学上证实 IN 诱导 wtp53/SW480 细胞凋亡. 我们的实验表明 IN 诱导 SW480 细胞凋亡存在 p53 依赖且呈剂量依赖.

肿瘤生长由细胞增生、生长停滞及细胞凋亡来调节, 随着人们对细胞凋亡的研究深入, 在细胞凋亡调控机制方面, Bcl-2 基因家族是迄今研究最为深入广泛的凋亡调控基因之一. 实验证明, Bcl-2 家族的凋亡调控效应并不要求新的蛋白翻译, 他的作用主要位于蛋白水平. 其家族中包括阻碍细胞死亡和促细胞死亡两组成员, 一般位于细胞质和细胞膜, 许多 BCL-2 相关蛋白包含一个 C-末端<sup>[22]</sup>. Bcl-2 蛋白表达产物定位于线粒体膜、核膜和内质网<sup>[23-25]</sup>, 其主要生理功能是阻抑凋亡; Bax 蛋白为一胞质内蛋白, 与 Bcl-2 蛋白有高度同源性, 为 Bcl-2 抗凋亡效应的拮抗剂. 大多数 Bcl-2 家族蛋白既能自身形成同二聚体, 也能和家族中其他蛋白形成异二聚体<sup>[26-28]</sup>. Bax 和 Bcl-2 蛋白形成异二聚体抑制细胞凋亡, 和 Bax 形成同二聚体有促凋亡作用, 但有研究表明 Bcl-2/Bax 比例可能是决定细胞对凋亡刺激信号的敏感性的重要因素之一, Bcl-2/Bax 比例比 Bcl-2/单独作用更为重要<sup>[29,30]</sup>. 我们知道在大多数结直肠肿瘤中 Bcl-2 高表达, Bcl-2 蛋白在 p53 阳性肿瘤的表达明显高于 p53 阴性肿瘤. Bcl-2 蛋白在抑制 p53 介导的细胞死亡过程中起作用, 抑制 Bcl-2 有助于抗肿瘤治疗, 在 Bcl-2 基因的 5' 端非编码区存在一个 p53 负反应元件, 他与 p53 蛋白结合形成一个杂合性启动子, 使 p53 转录抑制作用得以发挥, 下调 Bcl-2 蛋白表达, 呈典型的 p53 依赖途径. Bax 基因启动子亦存在 p53 结合的序列, Bax 的表达受 p53 基因的上调, 表明 Bax 基因亦可能是 p53 诱导凋亡途径中的一个下游分子, 提示 p53 直接作用于 Bax 基因促进其转录, 研究表明有 p53 介导的凋亡 50% 需要 Bax 基因的参与<sup>[31]</sup>. 因此, 许多研究表明肿瘤细胞的生长停滞和凋亡调控中 p53、p21<sup>WAF1/CIP1</sup>、Bcl-2 和 Bax 起重要作用<sup>[14]</sup>.

为了进一步研究非甾体类消炎药 IN 抑制肿瘤细胞增生和诱导凋亡的作用机制, 本研究采用 Western blotting 方法检测了 wtp53 转染 SW480 细胞前后 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达水平. 结果显示, IN 作用于 wtp53/SW480 细胞, 其 Bcl-2 蛋白的表达随一定范围内 IN 浓度的增加而逐渐减弱, Bax 蛋白表达水平无变化, 而在 SW480 细胞中其 Bcl-2 蛋白及 Bax 蛋白水平均无影响, 提示 IN 诱导结肠癌细胞凋亡的过程中依赖 p53 的存在.

测定 Bcl-2, Bax 蛋白的光密度值, 结果发现随着一定范围内 IN 浓度增加, Bcl-2/Bax 比率呈逐渐下降趋势, 结果表明 Bcl-2/Bax 比率下降可能是 IN 诱导 wtp53/SW480 细胞凋亡的机制之一. 本研究同时发现: IN 作用于 wtp53/SW480 细胞, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白表达明显增强, 且随 IN 在一定范围内的浓度增加而逐渐递增, 而在 SW480 细胞中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白表达水平无变化, p53 转染 SW480 细胞导致 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 表达水平增高, 二者相互作用, 提示 IN 诱导 wtp53/SW480 细胞凋亡过程可能存在着 p53 介导 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 途径. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白是细胞周期素依赖激酶抑制剂 (cycle-dependent kinase inhibitor, CDK) 的主要家族成员之一, 具有与 p53 结合的特异核苷酸序列, 其表达由抑瘤基因 p53 调节<sup>[32-34]</sup>. 后者为基因转录调节剂, 能促使 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 活化<sup>[35,36]</sup>. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 表达水平的增高可降低细胞周期素依赖激酶 (cycle-dependent kinases, CDKs) 活性, 导致细胞周期停滞在 G<sub>1</sub> 期, 最终导致细胞凋亡. 本结果提示: IN 通过下调 Bcl-2 蛋白表达, 上调 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白的表达来诱导 wtp53/SW480 细胞凋亡, 存在 p53-p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 依赖途径.

#### 4 参考文献

- Shao J, Fujiwara T, Kadowaki Y, Fukazawa T, Waku T, Itoshima T, Yamatsuji T, Nishizaki M, Roth JA, Tanaka N. Overexpression of the wild-type p53 gene inhibits NF-kappaB activity and synergizes with aspirin to induce apoptosis in human colon cancer cells. *Oncogene* 2000;19:726-736
- Richter M, Weiss M, Weinberger I, Furstenberger G, Marian B. Growth inhibition and induction of apoptosis in colorectal tumor cells by cyclooxygenase inhibitors. *Carcinogenesis* 2001;22:17-25
- Eli Y, Przeddecki F, Levin G, Kariv N, Raz A. Comparative effects of indomethacin on cell proliferation and cell cycle progression in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* 2001;61:565-571
- Ricchi P, Zarrilli R, Di Palma A, Acquaviva AM. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer: from prevention to therapy. *Br J Cancer* 2003;88:803-807
- Lonroth C, Andersson M, Lundholm K. Indomethacin and telomerase activity in tumor growth retardation. *Int J Oncol* 2001;18:929-937
- Thurnher D, Bakroeva M, Formanek M, Knerer B, Kornfehl J. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit telomerase activity in head and neck squamous carcinoma cell lines. *Head Neck* 2001;23:1049-1055
- Ogino M, Hisatomi H, Murata M. Indomethacin suppresses the growth of colon 26, Meth-A and FM3A tumors in mice by reducing the prostaglandin E2 content and telomerase activity in tumor tissues. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:758-764
- Chan TA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cancer chemoprevention. *Lancet Oncol* 2002;3:166-174
- Kim TI, Jin SH, Kim WH, Kang EH, Choi KY, Kim HJ, Shin SK, Kang JK. Prolonged activation of mitogen-activated protein kinases during NSAID-induced apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Int J Colorectal Dis* 2001;16:167-173
- Oliver L, Cordel S, Barbieux I, LeCabelle MT, Meflah K, Gregoire M, Vallette FM. Resistance to apoptosis is increased during metastatic dissemination of colon cancer. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:175-180
- Kralj M, Kapitanovic S, Kovacevic D, Lukac J, Spaventi S, Pavelic K. Effect of the nonsteroidal anti-inflammatory drug indomethacin on proliferation and apoptosis of colon carci-

- noma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:173-179
- 12 Loftin CD, Trivedi DB, Langenbach R. Cyclooxygenase-1-selective inhibition prolongs gestation in mice without adverse effects on the ductus arteriosus. *J Clin Invest* 2002;110:549-557
- 13 Sasaki Y, Morimoto I, Ishida S, Yamashita T, Imai K. Adenovirus-mediated transfer of the p53 family genes, p73 and p51/p63 induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cell lines: potential application to gene therapy of colorectal cancer. *Gene Ther* 2001;8:1401-1408
- 14 Bukholm IK, Nesland JM. Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), Bcl-2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas. *Virchows Arch* 2000;436:224-228
- 15 Sasaki Y, Morimoto I, Ishida S, Yamashita T, Imai K. Adenovirus-mediated transfer of the p53 family genes, p73 and p51/p63 induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cell lines: potential application to gene therapy of colorectal cancer. *Gene Ther* 2001;8:1401-1408
- 16 Takahashi A, Ohnishi K, Ota I, Asakawa I, Tamamoto T, Furusawa Y, Matsumoto H, Ohnishi T. p53-dependent thermal enhancement of cellular sensitivity in human squamous cell carcinomas in relation to LET. *Int J Radiat Biol* 2001;77:1043-1051
- 17 Gao N, Hu YD, Cao XY. The exogenous wild-type p14ARF gene induces growth arrest and promotes radiosensitivity in human lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:359-367
- 18 Riva CM. Restoration of wild-type p53 activity enhances the sensitivity of pleural metastasis to cisplatin through an apoptotic mechanism. *Anticancer Res* 2000;20:4463-4471
- 19 Bampoe J, Glen J, Hubbard SL, Sahlia B, Shannon P, Rutka J, Bernstein M. Adenoviral vector-mediated gene transfer: timing of wild-type p53 gene expression in vivo and effect of tumor transduction on survival in a rat glioma brachytherapy model. *J Neurooncol* 2000;49:27-39
- 20 Badie C, Bourhis J, Sobczak-Thépot J, Haddada H, Chiron M, Janicot M, Janot F, Tursz T, Vassal G. p53-dependent G2 arrest associated with a decrease in cyclins A2 and B1 levels in a human carcinoma cell line. *Br J Cancer* 2000;82:642-650
- 21 Dai J, Weinberg RS, Waxman S, Jing Y. Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. *Blood* 1999;93:268-277
- 22 Moriishi K, Huang DC, Cory S, Adams JM. Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9683-9688
- 23 Ahmed N, Laverick L, Sammons J. Effect of all-trans retinoic acid on chemotherapy induced apoptosis and down-regulation of Bcl-2 in human myeloid leukaemia CD34 positive cells. *Leuk Res* 1999;23:741-749
- 24 Zwata M, Harada K, Kono N, Kaneko S, Kobayashi K, Nakanuma Y. Expression of Bcl-2 familial proteins is reduced in small bile duct lesions of primary biliary cirrhosis. *Hum Pathol* 2000;31:179-184
- 25 Chou HK, Chen SL, Hsu CT, Chao YC, Tsao YP. Bcl-2 accelerates retinoic acid-induced growth arrest and recovery in human gastric cancer cells. *Biochem J* 2000;348(Pt 2):473-479
- 26 O'Reilly MA, Staversky RJ, Huyck HL. Bcl-2 family gene expression during severe hyperoxia induced lung injury. *Lab Invest* 2000;80:1845-1854
- 27 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Men RP. Expression and significance of proapoptotic gene Bax in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 1999;5:15-17
- 28 Hoetelmans R, van Slooten HJ, Keijzer R, Erkeland S, van de Velde CJ, Dierendonck JH. Bcl-2 and Bax proteins are present in interphase nuclei of mammalian cells. *Cell Death Differ* 2000;7:384-392
- 29 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Liu FX, He GY. Clinical significance of Fas antigen expression in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 1999;5:90-91
- 30 Zhang G, Tu C, Zhang G, Zhong G. Indomethacin induces apoptosis and inhibits proliferation in chronic myeloid leukemia cells. *Leuk Res* 2000;24:385-392
- 31 Deng Y, Wu X. Peg3/Pw1 promotes p53-mediated apoptosis by inducing Bax translocation from cytosol to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12050-12055
- 32 Javelaud D, Besancon F. Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14ARF and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio. *J Biol Chem* 2002;277:37949-37954
- 33 Mahyar-Roemer M, Roemer K. p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. *Oncogene* 2001;20:3387-3398
- 34 Kobayashi N, Takada Y, Hachiya M, Ando K, Nakajima N, Akashi MI. TNF-alpha induced p21(WAF1) but not Bax in colon cancer cells WiDr with mutated p53: important role of protein stabilization. *Cytokine* 2000;12:1745-1754
- 35 Loging WT, Reisman D. Elevated expression of ribosomal protein genes L37, RPP-1, and S2 in the presence of mutant p53. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:1011-1016
- 36 Horikoshi N, Cong J, Kley N, Shenk T. Isolation of differentially expressed cDNAs from p53-dependent apoptotic cells: activation of the human homologue of the Drosophila peroxidase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:864-869