

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.04.005

## 尼美舒利通过 PPAR $\gamma$ 途径抑制结肠癌细胞增殖\*

章向成<sup>1</sup>, 陈光侠<sup>2 $\Delta$</sup> , 张红<sup>3</sup>, 何晓华<sup>2</sup>, 刘世育<sup>2</sup>, 晏燕<sup>2</sup>

(1. 南京医科大学附属淮安第一医院 ICU, 江苏淮安 223300; 2. 江苏省徐州市第一人民医院消化科 221002; 3. 南京医科大学附属淮安第一医院内分泌科, 江苏淮安 223300)

**摘要:**目的 观察过氧化物酶增殖物激活受体  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )抑制剂 GW9662 干预后,尼美舒利(N)对结肠癌细胞凋亡和增殖的影响,探讨 PPAR $\gamma$  途径在 N 抗癌机制中的作用。方法 体外培养结肠癌 SW480 细胞,设立不加药对照组、单用 PPAR $\gamma$  抑制剂 GW9662 组(GW9662 组,药物浓度 0.1、0.5、1.0、5.0  $\mu\text{mol/L}$ )、单用 N 组、GW9662+N 组共 4 组。MTT 检测各组细胞生长抑制率;流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡及细胞周期的变化。Western blot 检测各组中 PPAR $\gamma$ 、p<sup>21Waf1</sup>、p<sup>27Kip1</sup>、Bcl-2、Bax、VEGF 蛋白的表达。结果 MTT 检测结果:GW9662 组较对照组细胞增殖差异无统计学意义( $P>0.05$ );N 组呈时间依赖性抑制 SW480 细胞增殖( $P<0.01$ );在 GW9662+N 组中 GW9662 呈剂量及时间依赖性减弱 N 抑制细胞增殖的作用。FCM 检测结果:细胞凋亡率在 GW9662 组与对照组之间差异无统计学意义( $P>0.05$ );N 组与对照组比较,SW480 细胞凋亡率显著增加,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例明显增加,S 期及 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例显著减少;GW9662+N 组细胞凋亡率较 N 组明显降低( $P<0.01$ ),细胞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的比例降低,S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞的比例升高。Western blot 检测结果:N 组与对照组比较 SW480 细胞的 PPAR $\gamma$ 、p<sup>21Waf1</sup>、p<sup>27Kip1</sup>、Bax 蛋白表达率显著增加( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),Bcl-2、VEGF 的表达率则明显下调( $P<0.01$ );GW9662+N 组与 N 组比较,SW480 细胞的 PPAR $\gamma$ 、p<sup>21Waf1</sup>、p<sup>27Kip1</sup>、Bax 蛋白显著表达下调( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),而 Bcl-2、VEGF 的表达则上调( $P<0.05$ )。结论 N 在体外能有效抑制结肠癌细胞 SW480 的增殖,促进其凋亡。PPAR $\gamma$  通路在 N 影响结肠癌细胞增殖、凋亡中发挥重要作用。

**关键词:**过氧化物酶体增殖物激活受体;细胞增殖;细胞凋亡;结肠癌细胞;SW480 细胞;尼美舒利

中图分类号:R735.3

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)04-0446-04

### Proliferation inhibition induced by Nimesulide through PPAR $\gamma$ pathway in human colon cancer cell\*

Zhang Xiangcheng<sup>1</sup>, Chen Guangxia<sup>2 $\Delta$</sup> , Zhang Hong<sup>3</sup>, He Xiaohua<sup>2</sup>, Liu Shiyu<sup>2</sup>, Yan Yan<sup>2</sup>

(1. Department of ICU, the First Affiliated Huaian Hospital of Nanjing Medical University, Huaian, Jiangsu 223300, China; 2. Department of Gastroenterology, Xuzhou First People's Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221002, China; 3. Department of Endocrinology, the First Affiliated Huaian Hospital of Nanjing Medical University, Huaian, Jiangsu 223300, China)

**Abstract:** Objective To study PPAR $\gamma$  inhibitor(GW9662), on colon cancer SW480 cell proliferation and apoptosis intervened by Nimesulide(N) in vitro, in order to investigate the role of PPAR $\gamma$  pathway in colon cancer cell proliferation inhibition and apoptosis promotion induced by Nimesulide. Methods Cells were divided into 4 groups, namely: the control group, GW9662 group (GW9662 0.1, 0.5, 1.0, 5.0  $\mu\text{mol/L}$ ), N group, GW9662+N group. MTT assay and FCM were used to determine proliferation, apoptosis and cell cycle of SW480 cells. And the expression of PPAR $\gamma$ , p<sup>21Waf1</sup>, p<sup>27Kip1</sup>, Bcl-2, Bax, VEGF proteins were measured by Western-blot. Results N inhibited SW480 cells proliferation in a time-dependent manner ( $P<0.01$ ). During a special range, GW9662 attenuated effect of nimesulide inhibiting SW480 cells proliferation in a dose-and time-dependent manner. The results of FCM showed; the apoptosis rates of SW480 cells had no statistical change between GW9662 group and control group( $P>0.05$ ). Cell apoptosis rate of group N increased significantly, compared with control group( $P<0.01$ ). The apoptosis rates of SW480 cells incubated with Nimesulide and GW9662 dropped significantly compared with Nimesulide alone( $P<0.01$ ). Above results showed that GW9662 could attenuate the effect of nimesulide on cell apoptosis and cell cycle. The results of Western-blot: Compared with the control group, the expression of PPAR $\gamma$ , p<sup>21Waf1</sup>, p<sup>27Kip1</sup>, Bax protein were up-regulated significantly in nimesulide group( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), but Bcl-2 and VEGF were down-regulated significantly( $P<0.01$ ). Compared with the nimesulide group, the expression of PPAR $\gamma$ , p<sup>21Waf1</sup>, p<sup>27Kip1</sup> and Bax protein were down-regulated obviously in GW9662+N group( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Correspondingly, Bcl-2 and VEGF were up-regulated obviously( $P<0.05$ ). Conclusion N could effectively inhibit SW480 cell proliferation and induce its apoptosis. PPAR $\gamma$  pathway may play an important role in proliferation inhibition and apoptosis induced by Nimesulide in colon cancer cell.

**Key words:** peroxisome proliferator-activated receptors; cell proliferation; cell apoptosis; colon cancer cells; SW480 cell; nimesulide

结肠癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一,流行病学研究显示,长期服用阿司匹林可明显降低结直肠癌发病的危险性<sup>[1]</sup>。2000 年,美国食品与药品管理局(U. S. food and drug adminis-

tration, FDA)已批准将选择性环氧酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)抑制剂罗非昔布用于 FAP 的治疗<sup>[2]</sup>。多数学者认为非甾体抗炎药(NSAIDs)主要通过抑制 COX 途径发挥抗肿瘤

\* 基金项目:徐州市科技计划项目(社会发展-XF11C074)。作者简介:章向成(1979-),主治医师/讲师,硕士,主要从事消化系统肿瘤的研究。 $\Delta$  通讯作者, E-mail: gx\_chen2010@163.com。

作用,本课题组前期试验证明,无论是选择性还是非选择性 COX-2 抑制剂均可呈时间和剂量依赖性抑制结肠癌细胞增殖<sup>[3]</sup>。过氧化物酶增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors,PPARs)是一类由配体激活的核转录因子,PPAR $\gamma$ 在多种肿瘤细胞中表达,如结肠癌、胃癌、前列腺癌等<sup>[4-6]</sup>,国外最近有学者发现 PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B 等非 COX 途径在 NSAIDs 的抗肿瘤机制中也具有重要作用<sup>[4]</sup>。NSAIDs 可通过激活 PPAR $\gamma$  在结肠癌早期调节炎症因子,从而促进肿瘤细胞凋亡<sup>[7]</sup>。本研究旨在探讨 PPAR $\gamma$  在尼美舒利(nimesulide,N)影响结肠癌细胞凋亡及增殖中发挥的作用及其机制,以期为临床提供结肠癌防治的新策略。

1 材料与方 法

1.1 材料 人结肠癌细胞系 SW480 购自上海细胞生物研究所。碘化丙啶(PI)购自晶美生物有限公司。胰蛋白酶、小牛血清、RPMI 1640 细胞培养液购自美国 Gibco 公司;N、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)、GW9662 购自美国 Sigma 公司,青霉素、链霉素购自华北制药厂,RNA 酶购自厦门泰晶生物有限公司;DAB 试剂盒、Power vision 染色试剂盒购自北京中山金桥生物技术有限公司;兔抗 PPAR $\gamma$  单克隆抗体、鼠抗 p<sup>21Waf1</sup>、p<sup>27Kip1</sup>、Bcl-2、Bax、VEGF 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 生物技术公司;二抗购自北京中山金桥生物工程有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 复苏后细胞转入细胞培养瓶中,加入约 5 mL 细胞培养液,在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下含有双抗(青霉素 100 U/mL;链霉素 100 U/mL)的 RPMI-1640 培养基(含 0.002  $\mu$ mol/L 的 L-谷氨酰胺 40  $\mu$ L,10% 小牛血清)培养,常规进行细胞传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 实验分组 实验共分 4 组:(1)不加药对照组;(2)GW9662 组(终浓度分别为 0.1、0.5、1.0、5.0  $\mu$ mol/L);(3)N 组;(4)GW9662+N 组。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖情况 取对数生长期 SW480 细胞,以  $1 \times 10^5$ /mL 的细胞密度接种于 96 孔板中,0.2 mL/孔,常规培养。24 h 后加入 GW9662(终浓度分别为 0.1、0.5、1.0、5.0  $\mu$ mol/L)干预,干预 0.5 h 后再分别加入 N(终浓度为 200  $\mu$ mol/L),按实验分组,每组每个浓度每个时间点设 12 个复孔,分别培养至 24、48、72 h 后,每孔加入 MTT 液 20  $\mu$ L,37℃ 孵育 4 h 后弃上清液,每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L,轻轻震荡 10 min 使其充分溶解后,在 490 nm 波长酶标仪上测定各孔光吸收值(OD)来评估细胞增殖情况。细胞生长抑制率=(1-给药组 OD 值/空白组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.2.4 流式细胞术(FCM)检测细胞周期及凋亡情况 将对

数生长期 SW480 细胞以每孔  $2 \times 10^5$ /mL 的细胞密度接种于 24 孔板,1 mL/孔,常规培养,24 h 后加入 GW9662(终浓度为 0.5  $\mu$ mol/L)干预,干预 0.5 h 后加入 N(终浓度为 200  $\mu$ mol/L)。按实验分组每组设 6 个复孔,进行下面步骤:(1)0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞,用 RPMI-1640 培养液洗涤 3 遍;(2)加入 70% 冷乙醇 4℃ 固定过夜;(3)PBS 洗涤 3 次,每次洗涤后,800 r/min,离心 2~3 min,去上清液。最后加入 PI 染液,4℃ 避光染色 30 min。采用 Beckon/Dickinson FACSCalibur 型流式细胞仪,在 488 nm 波长处进行检测,记录激发波长 488 nm 处的红色荧光。

1.2.5 Western blot 检测各组细胞 PPAR $\gamma$ 、p<sup>21Waf1</sup>、p<sup>27Kip1</sup>、Bcl-2、Bax 和 VEGF 蛋白的表达 将 SW480 细胞稀释为  $1 \times 10^5$ /mL,按每瓶 10 mL 接种于 50 mL 培养瓶,培养 24 h 细胞附壁后,倒掉培养液,加入 GW9662(终浓度分别为 0.1、0.5  $\mu$ mol/L)干预,干预 0.5 h 后再加入 N(终浓度为 200  $\mu$ mol/L),按实验分组,每组 3 个平行样本,继续培养 24 h 后取出,0.25% 胰酶消化、离心收集细胞,PBS 洗涤 3 次。细胞超声粉碎机粉碎细胞后收集上清液作为细胞总蛋白,并用考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。取一定量的蛋白质样品与  $2 \times$  十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液(100 mmol/L Tris 碱、200 mmol/L DTT、4% SDS、0.2% 溴酚蓝、20% 甘油)混合,按每泳道 30  $\mu$ g 加载于 SDS-PAGE 凝胶电泳样品孔中,100 V 电泳至溴酚蓝达分离胶,加大电压至 200 V,直至溴酚蓝达凝胶底部。半干电转移至硝酸纤维膜上,3% 牛血清清蛋白封闭,分别加入 1:500 稀释的兔抗 PPAR $\gamma$  单克隆抗体、1:400 稀释的鼠抗 p<sup>21Waf1</sup>、p<sup>27Kip1</sup>、Bcl-2、Bax、VEGF 单克隆抗体,4℃ 孵育过夜,加入二抗,室温孵育 2 h,NBT/BCIP 显色观察结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理和 Excel 软件制图。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组内比较采用 *t* 检验,组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度 GW9662 干预后,N 对 SW480 细胞增殖影响的变化 MTT 法结果显示,单用不同浓度的 GW9662(0.1、0.5、1.0、5.0  $\mu$ mol/L)作用于 SW480 细胞 24、48、72 h 较对照组无明显变化,见图 1。N(200  $\mu$ mol/L)较对照组呈时间依赖性抑制 SW480 细胞的生长( $P < 0.01$ )。在一定剂量范围内,不同浓度 GW9662 干预后,N 作用于 SW480 细胞 24、48、72 h,其抑制 SW480 细胞增殖的作用被 GW9662 呈时间剂量依赖性减弱。当 GW9662 浓度为 0~0.5  $\mu$ mol/L,24 h 时,对 N 的抑制作用达高峰,48 h 后开始下降,而到 72 h 时对 N 的抑制作用明显下降,见表 1、图 2。

表 1 GW9662、N 对 SW480 细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

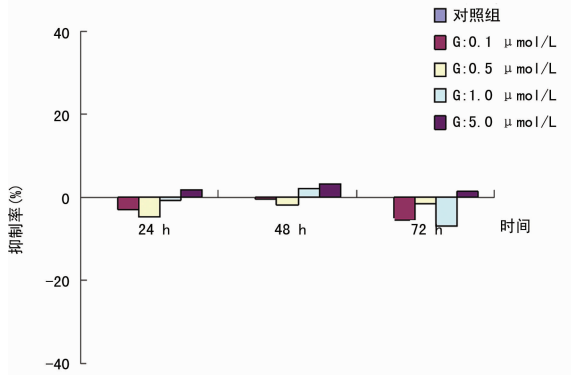
组别	细胞增殖抑制率(%)		
	24 h	48 h	72 h
对照组	0	0	0
GW9662 组			
G:0.1 $\mu$ mol/L	-2.94 $\pm$ 0.32	-0.43 $\pm$ 0.06	-5.46 $\pm$ 0.68
G:0.5 $\mu$ mol/L	-4.78 $\pm$ 0.52	-1.86 $\pm$ 0.22	-1.47 $\pm$ 0.17
G:1.0 $\mu$ mol/L	-0.84 $\pm$ 0.08	2.15 $\pm$ 0.24	7.08 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>
G:5.0 $\mu$ mol/L	1.83 $\pm$ 0.23	3.15 $\pm$ 0.38	1.33 $\pm$ 0.15
N 组			
N:200 $\mu$ mol/L	31.01 $\pm$ 3.24 <sup>b</sup>	49.51 $\pm$ 5.54 <sup>b</sup>	60.62 $\pm$ 7.83 <sup>b</sup>

续表 1 GW9662、N 对 SW480 细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	细胞增殖抑制率(%)		
	24 h	48 h	72 h
GW9662+N 组			
G:0.1 $\mu\text{mol/L}$ +N:200 $\mu\text{mol/L}$	19.99 $\pm$ 2.32 <sup>c</sup>	25.77 $\pm$ 2.91 <sup>c</sup>	44.68 $\pm$ 5.23 <sup>c</sup>
G:0.5 $\mu\text{mol/L}$ +N:200 $\mu\text{mol/L}$	8.02 $\pm$ 0.90 <sup>c</sup>	8.87 $\pm$ 1.10 <sup>c</sup>	31.28 $\pm$ 4.25
G:1.0 $\mu\text{mol/L}$ +N:200 $\mu\text{mol/L}$	23.98 $\pm$ 2.57	44.45 $\pm$ 6.92 <sup>c</sup>	58.97 $\pm$ 6.95
G:5.0 $\mu\text{mol/L}$ +N:200 $\mu\text{mol/L}$	33.80 $\pm$ 3.64	60.69 $\pm$ 7.54	61.42 $\pm$ 7.32

G:GW9662; <sup>a</sup>: $P<0.05$ , <sup>b</sup>: $P<0.01$ , 与对照组比较; <sup>c</sup>: $P<0.01$ , 与 N 组比较。

**2.2 不同浓度 GW9662 干预后, N 对 SW480 细胞凋亡及细胞周期影响的变化** FCM 分析结果显示, 与对照组比较, GW9662 组无明显变化, N 组 SW480 细胞凋亡率明显增加,  $G_0/G_1$  期细胞比例增加, S 期和  $G_2/M$  期细胞比例减少, 细胞阻滞在  $G_0/G_1$  期; GW9662+N 作用于 SW480 细胞 24 h 后细胞凋亡率较 N 组明显降低, 见表 2、图 3, 并且改变了细胞周期的分布: SW480 细胞在  $G_0/G_1$  期受阻滞的比例降低, S 期和  $G_2/M$  期比例升高, 见表 2。GW9662+N 组与 N 组或对照组比较, 差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。

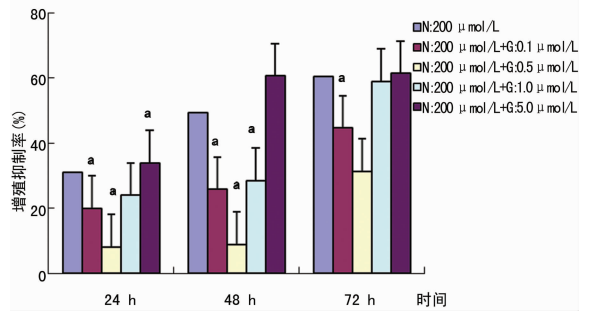


G:GW9662。

图 1 GW9662 对 SW480 细胞增殖的影响

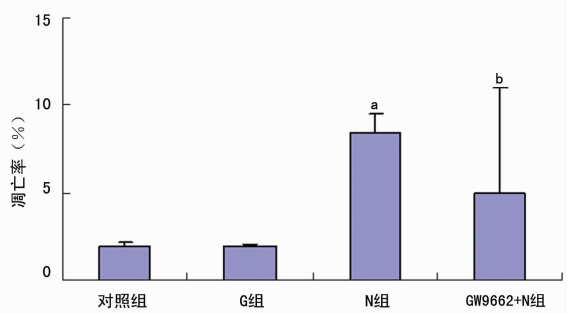
**2.3 GW9662 及 N 对 SW480 细胞 PPAR $\gamma$  和 p<sup>21Waf1</sup>、p<sup>27Kip1</sup>、Bcl-2、Bax、VEGF 表达的影响** Western blot 检测结果显示, N 组较对照组细胞的 PPAR $\gamma$  表达增强, 同时 p<sup>21Waf1</sup>、p<sup>27Kip1</sup>、Bax 表达亦增强, 而 Bcl-2、VEGF 的表达下调; GW9662+N 组与 N

组比较, 细胞的 PPAR $\gamma$  表达减低, 同时 p<sup>21Waf1</sup>、p<sup>27Kip1</sup>、Bax 表达亦减低, 而 Bcl-2、VEGF 的表达增强, 差异有统计学意义( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 见表 3。



G:GW9662; N:N; <sup>a</sup>: $P<0.01$ , 与 N 组比较。

图 2 GW9662、N 对 SW480 细胞增殖的影响



<sup>a</sup>: $P<0.01$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>: $P<0.01$ , 与 N 组比较。

图 3 GW9662、N 对细胞凋亡率的影响

表 2 GW9662、N 对结肠癌 SW480 细胞凋亡及细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s, \%, n=6$ )

组别	凋亡率	细胞周期		
		$G_0/G_1$	$G_2/M$	S
对照组	1.91 $\pm$ 0.20	52.61 $\pm$ 6.32	20.14 $\pm$ 2.24	27.25 $\pm$ 2.84
GW9662 组(G:0.5 $\mu\text{mol/L}$ )	1.89 $\pm$ 0.21	52.36 $\pm$ 5.69	20.59 $\pm$ 2.13	27.05 $\pm$ 2.90
N 组(N:200 $\mu\text{mol/L}$ )	8.43 $\pm$ 1.03 <sup>a</sup>	70.57 $\pm$ 8.44 <sup>a</sup>	10.09 $\pm$ 1.24 <sup>a</sup>	19.34 $\pm$ 2.35 <sup>a</sup>
GW9662+N 组(G:0.5 $\mu\text{mol/L}$ +N:200 $\mu\text{mol/L}$ )	4.96 $\pm$ 0.64 <sup>b</sup>	53.21 $\pm$ 6.11 <sup>b</sup>	20.35 $\pm$ 2.45 <sup>b</sup>	26.44 $\pm$ 3.23 <sup>b</sup>

G:GW9662; <sup>a</sup>: $P<0.01$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>: $P<0.01$ , 与 N 组比较。

表 3 GW9662、N 对 PPAR $\gamma$ 、p<sup>21Waf1</sup>、p<sup>27Kip1</sup>、Bcl-2、Bax、VEGF 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	PPAR $\gamma$	Bcl-2	Bax	p <sup>21Waf1</sup>	p <sup>27Kip1</sup>	VEGF
对照组	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
N 组						
N:200 $\mu\text{mol/L}$	1.64 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	0.38 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	3.78 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	2.66 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	7.46 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>	0.42 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>

续表 3 GW9662、N 对 PPAR $\gamma$ 、p<sup>21Waf1</sup>、p<sup>27Kip1</sup>、Bcl-2、Bax、VEGF 表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

组别	PPAR $\gamma$	Bcl-2	Bax	p <sup>21Waf1</sup>	p <sup>27Kip1</sup>	VEGF
GW9662+N 组						
N:200 $\mu$ mol/L+G:0.1 $\mu$ mol/L	1.28 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>	0.84 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	2.08 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	1.80 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	5.80 $\pm$ 0.62 <sup>c</sup>	0.79 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
N:200 $\mu$ mol/L+G:0.5 $\mu$ mol/L	1.20 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	0.89 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	1.98 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	1.64 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	5.37 $\pm$ 0.57	0.81 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>

G:GW9662; <sup>a</sup>: $P<0.01$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>: $P<0.01$ , <sup>c</sup>: $P<0.05$ , 与 N 组比较。

### 3 讨 论

本研究 MTT 法检测细胞增殖情况,结果显示,当 GW9662 浓度超过 0.5 mol/L 时,对 N 的对抗的作用不再增强,反而使细胞增殖抑制率明显增加,可能与 PPAR $\gamma$  受体已饱和及 GW9662 本身对细胞的毒性作用有关。NSAIDs 可改变结肠癌细胞周期分布,并促进细胞凋亡<sup>[8]</sup>。本研究进一步行 FCM 检测发现,N 作用后可增加细胞的凋亡率,并使 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例升高,S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例降低。而加入 GW9662 干预后,N 的促细胞凋亡减弱,且 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例有所降低,S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例有所升高。说明 N 促使结肠癌细胞凋亡、改变细胞周期的作用能被 PPAR $\gamma$  抑制剂 GW9662 对抗,提示 PPAR $\gamma$  通路在 NSAIDs 影响细胞周期中很可能具有重要作用。国外 Schwab 等<sup>[9]</sup>研究亦表明美沙拉嗪可通过 PPAR $\gamma$  通路抑制结肠癌细胞增殖并使结肠癌细胞阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。

p<sup>21Waf1</sup>、p<sup>27Kip1</sup> 属于细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitors,CKIs)的 CIP/KIP 家族,是细胞周期调控的重要物质基础。p<sup>21Waf1</sup>、p<sup>27Kip1</sup> 在细胞周期调控细胞 G<sub>1</sub> 期向 S 期转变。本研究结果证实 N 可明显上调结肠癌细胞株 p<sup>21Waf1</sup>、p<sup>27Kip1</sup> 的表达,而且这种作用在 GW9662+N 组明显减弱,从而证明 N 通过激活 PPAR $\gamma$  通路,进而引起 p<sup>21Waf1</sup>、p<sup>27Kip1</sup> 在细胞内的活化,改变结肠癌细胞的细胞周期,促进其凋亡。Bax 通过与自身组成同源二聚体或与 Bcl-2、Bcl-XL 组成异源二聚体抑制 Bcl-2 或 Bcl-XL 的活性而发挥促细胞凋亡的作用。大量资料表明,在多种肿瘤组织中都存在 Bcl-2 和/或 Bax 蛋白表达失常,而一些抗癌药物往往能够调节 Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达<sup>[10-11]</sup>。PPAR $\gamma$  被激活后可以通过下调 Bcl-2 家族蛋白发挥促凋亡作用。本研究对 Bcl-2、Bax 表达进行了 Western blot 检测,结果表明 N 对 Bcl-2 表达下调及 Bax 的上调作用可被 GW9662 所对抗。因此作者推断 PPAR $\gamma$  通路为 N 诱导结肠癌细胞凋亡的途径之一。

VEGF 是一种功能强大且能产生多种生物学效应的细胞因子,肿瘤 VEGF 的表达与肿瘤侵袭转移有关<sup>[12]</sup>。本研究通过 Western blot 检测 VEGF 表达,观察 PPAR $\gamma$  通路是否参与了 N 下调 VEGF 表达,从而抑制肿瘤转移的过程。研究结果表明 PPAR $\gamma$  通路参与 N 抑制 VEGF 释放的过程。

综上所述,GW9662 可部分对抗 N 对结肠癌 SW480 细胞的作用,由于 GW9662 是特异性 PPAR $\gamma$  抑制剂,所以作者推测 N 通过 PPAR $\gamma$  途径发挥抗肿瘤作用,其具体机制与以下因素有关:(1)增加 p<sup>21Waf1</sup>、p<sup>27Kip1</sup> 表达,阻止细胞周期进程;(2)降低 Bcl-2 的表达,增加 Bax 的表达,促进肿瘤细胞的凋亡;(3)抑制 VEGF 表达,从而抑制肿瘤血管生成。

### 参考文献:

[1] Smalley W, Ray WA, Daugherty J, et al. Use of non steroidal anti-inflammatory drugs and incidence of colorectal cancer: a population-based study[J]. Arch Intern Med, 1999, 159(2):

161-166.  
 [2] Fujimura T, Ohta T, Oyama K, et al. Role of cyclooxygenase-2 in the carcinogenesis of gastrointestinal tract cancer: a review and report of personal experience[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(9): 1336-1345.  
 [3] 陈光侠, 费素娟. 两种 NSAIDs 抑制结肠癌细胞增殖的机制[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2005, 25(12): 923-927.  
 [4] Vaish V, Tanwar L, Sanyal SN. The role of NF- $\kappa$ B and PPAR $\gamma$  in experimentally induced colorectal cancer and chemoprevention by cyclooxygenase-2 inhibitors [J]. Tumour Biol, 2010, 31(5): 427-436.  
 [5] Yu J, Leung WK, Chen J, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor delta in human gastric cancer and its response to specific COX-2 inhibitor[J]. Cancer Lett, 2005, 223(1): 11-17.  
 [6] Matsuyama M, Yoshimura R. The target of arachidonic acid pathway is a new anticancer strategy for human prostate cancer[J]. Biologics, 2008, 2(4): 725-732.  
 [7] Koelink PJ, Mieremet-Ooms MA, Cerver WE. 5-aminosalicylic acid interferes in the cell cycle of colorectal cancer-cells and induces cell death modes [J]. Inflamm Bowel Dis, 2010, 16(3): 379-389.  
 [8] Vaish V, Rana C, Piplani H, et al. Sulindac and celecoxib regulate cell cycle progression by p53/p21 up regulation to induce apoptosis during initial stages of experimental colorectal cancer[J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 68(2): 301-319.  
 [9] Schwab M, Reynders V, Loitsch S, et al. PPAR $\gamma$  is involved in mesalazine-mediated induction of apoptosis and inhibition of cell growth in colon cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(7): 1407-1414.  
 [10] Zhang L, Liu WZ, Lu H, et al. Synergistic inhibitory effect of nimesulide in combination with 5-fluorouracil on gastric cancer cells and its possible mechanisms[J]. Chin J Dig, 2005, 25(9): 530-533.  
 [11] Cheng AC, Huan TC, Lai CS, et al. Induction of apoptosis by luteolin through cleavage of Bcl-2 family in human leukemia HL-60 cells [J]. Eur J Pharmacol, 2005, 509(1): 1-10.  
 [12] Eldesoky A, Shouma A, Mosaad Y, et al. Clinical relevance of serum vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in patients with colorectal cancer[J]. Saudi J Gastroenterol, 2011, 17(3): 170-173.