

Troglitazone과 COX-2 억제제 병합 투여가 아교모세포종 세포의 세포자멸사에 미치는 영향

김경열 · 박민영 · 박호성 · 장규윤
문우성 · 이동근 · 강명재

전북대학교 의과대학 병리학교실 및
의과학연구소

접 수 : 2006년 8월 31일
게재승인 : 2006년 11월 10일

책임저자 : 강 명 재
우 561-180 전북 전주시 덕진구 금암동
산 2-20
전북대학교 의과대학 병리학교실
전화: 063-270-3071
Fax: 063-270-3135
E-mail: mj.kang@chonbuk.ac.kr

*이 연구는 2005년도 전북대학교 지원 연구비를 받아 이루어졌음.

Synergistic Apoptotic Effect of Combination Treatment with Troglitazone and COX-2 Inhibitor in Glioma Cells

Kyung Ryoul Kim, Min Young Park, Ho Sung Park, Kyu Yun Jang,
Woo Sung Moon, Dong Geun Lee and Myoung Jae Kang

Department of Pathology, Chonbuk National University Medical School and Institute for Medical Sciences, Jeonju, Korea

Background : The use of troglitazone (a PPAR γ ligand) and COX-2 inhibitor have been intensively studied for inhibition of tumor growth in cancer treatment, but the anti-tumor effect with a combination of these agents for cancer has not yet been studied. The aim of this study was to determine if low concentrations of troglitazone with COX-2 inhibitor in combination would cause significant cytotoxicity in glioma cells. **Methods :** The effects of co-treatment with troglitazone and COX-2 inhibitor on cell growth and apoptosis were assessed by use of trypan blue exclusion and a DNA fragmentation assay. A western blot was used to analyze the apoptotic signaling for the expression of bcl-2, bax, PARP and p21 proteins. **Results :** A low dose of troglitazone (5 μ M) and COX-2 inhibitor (5 μ M) strongly enhanced the cell growth inhibition and apoptosis in glioma cells when compared to a low dose of each drug alone. Western blotting analysis showed a decreased expression of bcl-2 and PARP proteins. In contrast, the bax protein level was increased. **Conclusions :** The combination of troglitazone and COX-2 inhibitor in a low dose elicits synergistic cytotoxicity in glioma cells. Our study also demonstrates that down regulation of bcl-2, fragmentation of PARP protein and increased expression of bax protein were accompanied by co-treatment with troglitazone and the COX-2 inhibitor.

Key Words : Troglitazone; Cyclooxygenase-2; Glioma; Apoptosis

아교모세포종은 뇌에 발생하는 악성종양으로서 원발성 뇌종양의 약 50%를 차지한다. 아교모세포종은 종양을 구성하는 세포의 형태에 따라 성상세포종, 피지교세포종, 상의세포종, 맥락층 유두종, 수모세포종 등으로 분류된다. 일반적으로 이 종양은 주변의 뇌 실질로 침윤하므로 정상적인 뇌와 경계가 명확하지 않다. 그렇기 때문에 수술로 제거하기 어렵고 화학요법이나 방사선 요법을 병행하여야 한다. 그럼에도 치료제에 낮은 반응을 보이거나 반응하지 않는 환자가 있기 때문에 기존의 화학치료제를 대체 또는 보조할 수 있는 치료제를 개발할 필요가 있다.¹

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)는 핵 호르몬 수용체의 하나로 지질 대사 및 지방세포 분화에 관여한다.^{2,3} PPAR γ 는 인체의 다양한 정상 세포와 악성종양 세포에서 발현되며,^{4,5} 최근 PPAR γ 의 내인성 및 외인성 배위자가 종

양 세포의 성장 억제, 세포자멸사 및 세포분화를 유도할 수 있다고 하여 주목을 받고 있다.^{6,7} 한편 PPAR γ 배위자 중 하나인 troglitazone은 초기 2형 당뇨병을 치료하는 물질로 개발되어 사용되어 왔으나, 최근에는 종양세포의 성장을 억제하는 효과 등이 입증되면서 항암제로 활용할 수 있는 가능성에 대한 연구가 진행 중이다.

Cyclooxygenase (COX)는 아라키돈산에서 프로스타글란딘을 생성하는 데 관여하며 COX-1과 COX-2 두 가지의 아형(isoform)이 있다. COX-1은 거의 모든 세포에서 발현되는 상주 효소(house-keeping gene)인 반면 COX-2는 정상시에는 발현되지 않다가 호르몬, 시토킨, 세포성장인자, 종양 촉진인자, 발암물질 등의 세포 자극인자에 의해 빠르게 유도되어 발현된다.^{8,9} COX-2는 인체의 다양한 암종에서 과발현되며,^{10,11} 과발현된

COX-2는 세포자멸의 감소, 세포의 과증식, 신생혈관의 발달, 림프질 전이 등과 밀접한 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있으며,¹²⁻¹⁴ COX-2 발현 억제제는 암종의 발생 뿐 아니라 종양의 성장을 억제하는 효과가 있다고 보고되고 있다.^{15,16}

아교모세포종 세포주에서 PPAR γ 배위자 또는 COX-2 억제제를 이용한 항종양 효과에 관한 연구 보고는 접할 수 있으나, 두 약물을 함께 이용한 병용치료(combination treatment) 효과에 대한 연구는 아직까지 이루어지지 않고 있다. 이에 본 연구자들은 PPAR γ 배위자 중 하나인 troglitazone과 COX-2 억제제를 기존 연구에서 이용한 것보다 낮은 농도에서 병합 처리하여 아교모세포종 세포의 성장 억제 및 세포자멸사 유도에 좀 더 효과적으로 이용할 수 있는지 알아보려고 하였다.

재료와 방법

약물 및 항체

본 실험에서는 PPAR γ 배위자인 troglitazone (Cayman, MI, USA)과 COX-2 특이억제제인 COX-2 inhibitor I Methyl [5-methylsulfonyl-1-(4-chlorobenzyl)-1H-2-indolyl] carboxylate (Calbiochem, UK)를 사용하였으며, 세포자멸사에 관여하는 단백질 발현을 확인하기 위해 bcl-2, bax, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), p21 (Santa Cruz Biotechnology, CA)과 actin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)에 대한 항체를 이용하였다.

세포배양

본 실험에서 이용한 아교모세포종 세포주는 Human T98G 세포주와 Rat 9L glioma 세포주이며, 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 분양받아 항생제(100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin)와 열처리된 10% 소태아혈청(FBS)이 함유된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 배양액으로 배양하였다. 아교모세포종 세포주는 실험 전 세포 농도 60-70%를 유지하였고, troglitazone과 COX-2 억제제는 5, 10, 20, 50 μ M 농도로 각각 24, 48시간 처리하였다. Troglitazone과 COX-2 억제제의 병합 처리는 각각 5 μ M로 처리하여 본 실험에 이용하였으며, 대조군은 0.01% DMSO가 첨가된 배양액을 사용하였다.

세포 생존율 분석

100 mm 배양용기에(5×10^5 cells/mL) 9L glioma와 T98G 세포를 넣어주고 24시간 후 새로운 배양액으로 교환하였다. Troglitazone과 COX-2 억제제를 48시간 처리한 후 trypsin/EDTA

를 이용하여 배양용기에 붙어 있던 세포를 떼어내고 전체 세포를 취득하였다. 세포의 생존율은 trypan blue exclusion 방법을 이용하여 측정하였으며, 살아 있는 세포의 수는 혈구계(hemocytometer)로 측정하였다.

DNA 분절 분석

Troglitazone과 COX-2 억제제를 각각 또는 병합 처리한 아교모세포종 세포주의 세포 침전물에서 DNA를 추출하기 위해 세포 침전물에 DNA 분해 용액(10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl)을 넣고 4°C에서 15분간 반응시켰다. 그 후 2.5% polyethylene glycol이 함유된 1 M NaCl 용액을 넣어 15분간 실온에서 반응시키고, 16,000 \times g에서 10분간 원심 분리하였다. 그런 다음 상층액만을 얻어 RNase (0.3 g/L)를 처리한 후 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 원심분리 후 얻은 DNA 침전물은 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)을 이용하여 용해한 후 정량하였다. DNA 5 μ g을 ethidium bromide가 첨가된 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 자외선 시야에서 DNA 분절 여부를 확인하였다.

웨스턴블롯

Troglitazone (5 μ M)과 COX-2 억제제(5 μ M)를 24, 48시간 단독 또는 병합 처리한 세포에서 단백을 얻은 후 웨스턴블롯을 시행하였다. 단백질 분해억제제가 첨가된 1% NP-40 세포분해용액(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, protease cocktail)을 이용하여 전체 단백을 얻은 후 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 단백을 정량하였다. 6-12% SDS-PAGE gel에서 전기영동한 단백을 polyvinylidene difluoride (PVDF)막에 옮기고, blocking 용액(5% skim milk in 0.1% Tween 20, 25 mM Tris-HCl, 125 mM NaCl)에서 1시간 반응시킨 다음 1차 항체를 4°C에서 12시간 반응시켰다. 그런 다음 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 2차 항체와 1시간 반응시켰다. 단백질 발현 정도는 enhanced chemiluminescence solution kit (Amersham, UK)를 사용하여 LAS-3000 (Fuji, Tokyo, Japan) 이미징 분석기기에서 확인하였다.

결 과

아교모세포종 세포주에서 troglitazone과 COX-2 억제제가 세포 성장 억제에 미치는 효과

9L glioma와 T98G 세포주에 troglitazone과 COX-2 억제제

를 각각 또는 병합하여 24시간 처리한 후, trypan blue exclusion 을 이용하여 세포 생존율을 평가하였다. Troglitazone과 COX-2 억제제 단독 처리 시 농도 의존적으로 세포의 성장을 억제하였다. Troglitazone과 COX-2 억제제를 각각 5 μ M이나 10 μ M을 투여했을 때는 세포 성장 억제 효과가 미약하게 나타난 반면, 20 μ M 이상의 농도에서 세포 성장 억제 효과가 두드러지게 나타났다(Fig. 1). Troglitazone과 COX-2 억제제를 병용한 효과를 알아보기 위해 아교모세포종 세포주의 생존율에 변화가 나타나지 않은 저농도 troglitazone과 COX-2 억제제를 동시에 처리

하였다. 5 μ M의 troglitazone과 COX-2 억제제를 단독 처리한 아교모세포종 세포주는 세포 성장 억제 효과가 나타나지 않았으나, 5 μ M의 troglitazone과 COX-2 억제제를 병합 투여하였을 때는 아교모세포종 세포주의 세포 생존율이 뚜렷하게 감소했다 (Fig. 2).

병합 투여에 의한 아교모세포종 세포주의 세포자멸사

저농도의 troglitazone과 COX-2 억제제의 병합 투여에 따른

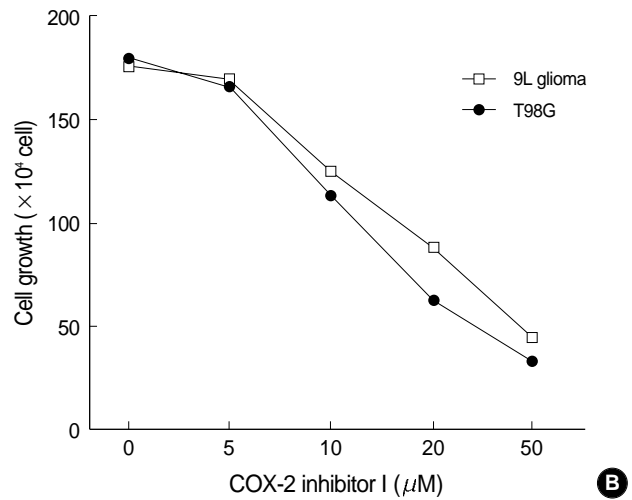
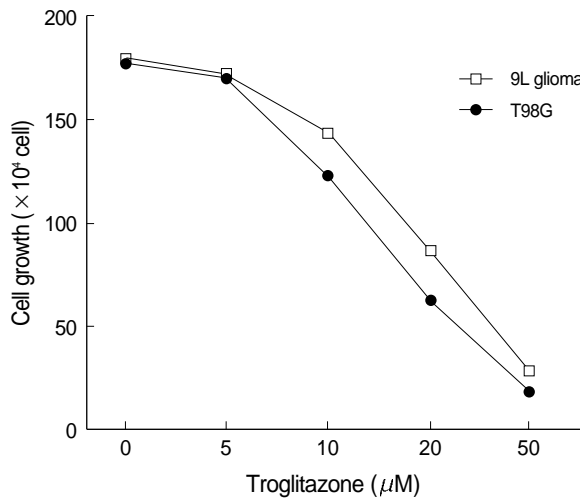


Fig. 1. Effects of troglitazone (A) and COX-2 inhibitor (B) on cell growth of glioma cells. Cells were seeded in 10 mm culture dishes (5×10^5 cells) for 24 h and then treated with different concentrations of troglitazone or COX-2 inhibitor for 48 h. Dose dependent inhibition of cell growth by troglitazone and COX-2 inhibitor is observed. Cell growth was measured using a trypan blue exclusion.

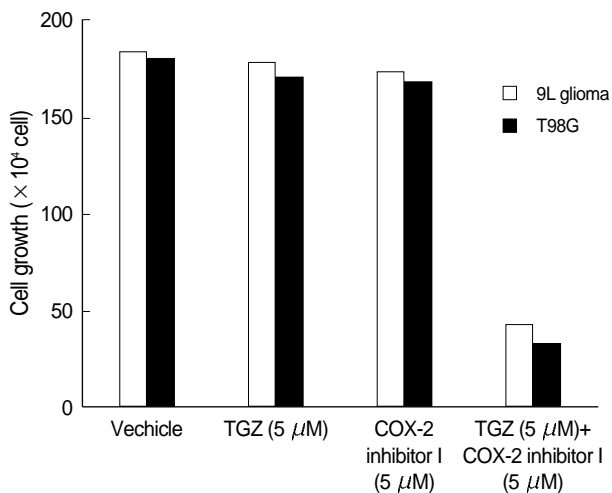


Fig. 2. Synergistic effects of troglitazone and COX-2 inhibitor on cell growth of glioma cells. Cells were seeded in 10 mm culture dishes (5×10^5 cells) for 24 h and then treated with a combination of troglitazone (5 μ M) and COX-2 inhibitor (5 μ M) or alone for 48 h. Treatment with a combination of troglitazone and COX-2 inhibitor, but not alone, effectively inhibited cell growth of glioma cells. Cell growth was measured using a trypan blue exclusion. Vehicle (control), Troglitazone (TGZ), COX-2 inhibitor I (COX-2 I).

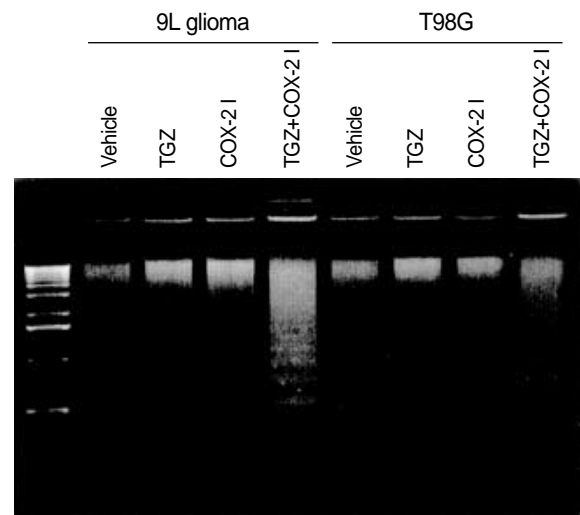


Fig. 3. Treatment with a combination of troglitazone and COX-2 inhibitor induced the DNA fragmentation in glioma cells. Cells were treated with a combination of troglitazone (5 μ M) and COX-2 inhibitor (5 μ M) or alone for 48 h. Genomic DNA from cells was extracted and separated on 1.5% agarose gel. Vehicle (control), Troglitazone (TGZ), COX-2 inhibitor I (COX-2 I).

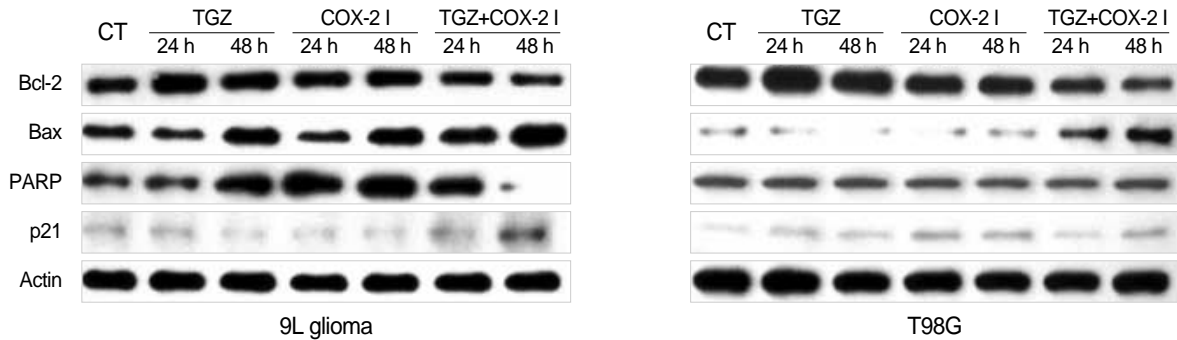


Fig. 4. Synergistic effects of troglitazone and COX-2 inhibitor on bcl-2, bax, and PARP in glioma cells. Cells were seeded in 10 mm culture dishes (5×10^5 cells) for 24 h and then treated with a combination of troglitazone ($5 \mu\text{M}$) and COX-2 inhibitor ($5 \mu\text{M}$) or alone for 24 or 48 h. Cell lysate were analyzed by western blotting. CT (control), Troglitazone (TGZ), COX-2 inhibitor I (COX-2 I).

세포 생존율 감소가 세포자멸사와 관련이 있는지를 확인하기 위해 DNA ladder를 이용하여 DNA의 분절 유무를 확인하였다. Troglitazone과 COX-2 억제제를 단독으로 처리하였을 때는 DNA 분절 현상이 보이지 않았으나, $5 \mu\text{M}$ 의 troglitazone과 COX-2 억제제를 병합 처리한 아교모세포종 세포주에서는 DNA 분절 현상이 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 3).

병합 처리한 아교모세포종 세포주의 세포자멸사 매개 단백질 확인

Troglitazone과 COX-2 억제제의 병합 투여가 세포자멸사를 유도하는 것으로 확인되어, 세포자멸사를 매개하는 bcl-2, bax, PARP과 세포주기 단백질 p21의 발현을 확인하였다. $5 \mu\text{M}$ 의 troglitazone과 COX-2 억제제를 병합 또는 단독으로 48시간 처리한 결과, 병합 처리한 아교모세포종 세포주에서만 bcl-2 단백질 발현이 감소하였고 단독 처리한 세포주는 아무런 변화가 없었다. 반면, 세포자멸 촉진에 관여하는 bax는 병합 처리한 세포주에서만 뚜렷하게 증가하였다. 또한, PARP 단백질은 단독 처리한 세포주에서는 변화가 없었으나, 병합 처리한 T98G 세포주에서는 PARP 단백질의 분절이 관찰되었고, 9L glioma 세포주에서는 PARP 발현이 현저하게 감소하였다. 한편, 세포주기 억제 단백질인 p21의 발현 변화는 없었다(Fig. 4).

고찰

Troglitazone은 thiazolidinediones (TZD) 계열의 PPAR γ 작용제의 하나로 초기 2형 당뇨 치료 약물로 이용되었다. TZD 계열의 다양한 PPAR γ 작용제는 인체의 다양한 암 세포주에서 세포 증식을 억제하는 작용이 있는 것으로 알려져 있으며, troglitazone은 아교모세포종 세포의 세포자멸사를 유도하여 세포 증식을 억제한다.¹⁷ Cyclooxygenase-2 (COX-2)는 다양한 암의 발생에 관여하는 중요한 효소로 주로 세포의 증식, 혈관신생, 면

역감시, 세포자멸사에 관여하는 것으로 알려져 있는데, 최근에는 여러 연구자들이 인체의 다양한 암종에서 과발현된 COX-2의 발현을 억제함으로써 암의 발생과 성장을 차단할 수 있는 표적 유전자로 제시하였다.^{15,16} Troglitazone 또는 COX-2 억제제는 아교모세포종 세포주의 종류나 약물 처리농도 및 시간에 따라 암세포 증식을 억제하는 효과에 다소 차이가 있다. Kato 등¹⁷은 troglitazone이 $20 \mu\text{M}$ 이상의 농도에서 신경아교종 세포주와 신경모세포종 세포주의 세포 성장을 억제하고 세포자멸사를 유도한다고 보고하였으며, Morosetti 등¹⁸과 Strakova 등¹⁹도 PPAR γ 배위자인 PGJ2, Rosiglitazone 및 Ciglitazon이 아교모세포종의 세포 성장을 억제한다고 보고하였다. 한편 Joki 등²⁰의 연구 결과에 따르면, COX-2 특이억제제는 $80 \mu\text{M}$ 이상의 농도에서 세포 증식을 억제하고 세포자멸사를 증가시켜 아교모세포종 세포주의 성장을 억제하였다. 본 연구에서도 단독으로 처리한 troglitazone과 COX-2 억제제는 $20 \mu\text{M}$ 이상의 농도에서 아교모세포종 세포주의 세포 생존율을 현저하게 감소시켰다. 이러한 결과로 미루어 보아, PPAR γ 배위자 혹은 COX-2 억제제는 적어도 $20 \mu\text{M}$ 이상의 농도에서 처리하였을 때 세포 성장을 억제하는 기전이 나타나는 것으로 보인다. 세포주에 따라 PPAR γ 배위자 또는 COX-2 억제제의 세포 성장 억제 효과가 다르게 나타나는 이유는 아직 정확히 밝혀지지 않았다. 그러나 종양세포주에 따라 PPAR γ 또는 COX-2 발현 정도 및 약물 반응성에 차이가 있는 것으로 생각된다. 특히 PPAR γ ligand는 종양세포주의 종류에 따라 PPAR γ 를 경유하는 기전과 경유하지 않는 다른 기전으로 세포 성장을 억제하는 효과가 다르게 보고되어 있다.

본 연구는 troglitazone과 COX-2 억제제를 단독 투여했을 때 아교모세포종 세포주에 아무런 영향이 나타나지 않는 저농도 troglitazone과 COX-2 억제제를 동시에 투여하여 아교모세포종 세포주의 성장을 억제하는 효과가 있는지와 세포자멸과 관련된 단백질 발현을 확인하고자 하였다. $5 \mu\text{M}$ troglitazone과 COX-2 억제제를 단독 처리했을 때는 아교모세포종 세포주의 세포 생존율에 아무런 영향을 미치지 못했으나, 두 약물을 병합 처리하였을 때는 세포 생존율이 현저하게 감소했다. 또 troglitazone과

COX-2 억제제를 단독 처리하였을 때 보이지 않던 DNA 분절 현상이 두 약물을 병합 투여했을 때는 나타난다. 따라서 troglitazone과 COX-2 억제제를 병합처리했을 때 나타나는 세포 성장 억제 효과 중 일부는 세포자멸사 유도작용에 의한 것으로 판단된다. 최근 troglitazone 혹은 COX-2 억제제와 함께 다른 항종양제제를 동시 투여하여 종양의 성장을 억제하는 과정에 대한 연구가 시도되고 있다. Kohno 등²¹은 troglitazone과 COX-2 억제제인 nimesulide를 병합 투여하면 생쥐의 대장암 형성을 억제할 수 있다고 보고하였다. 한편 Yao 등²²은 troglitazone과 lovastatin을 병합 투여함으로써 다양한 암 세포주의 세포 성장을 효과적으로 억제할 수 있었다. 또 COX-2 억제제를 5-fluorouracil 또는 세포 신호전달 물질 억제제와 병용 투여하여 암세포의 성장을 억제할 수 있다는 보고도 있다.^{23,24} 특히, 최근 항종양 약물로 주목받고 있는 troglitazone의 경우 간세포 독성의 예가 보고되고 있다는 점을 고려할 때,²⁵ 본 연구에서와 같이 저농도의 troglitazone을 저농도의 다른 약물과 동시 투여함으로써 종양 억제 효과를 충분히 볼 수 있다면 안전하면서도 효과적인 종양 치료법을 개발하는 데 도움이 될 수 있을 것으로 보인다.

Bcl-2 단백질은 인체에서 239 아미노산으로 이루어진 25 kDa 크기의 단백질로 열 및 방사선, 여러 가지 화학제제나 스테로이드 등으로 유발되는 세포자멸사를 억제하는 작용을 하며, 특히 세포자멸사 진행 과정을 조절하는 인자로 알려져 있다.²⁶ 이와는 반대로 bcl-2 계열 단백질인 bax는 세포자멸 과정에서 pro-apoptotic 단백을 활성화시켜 세포자멸사를 촉진한다.²⁷ 또 세포자멸사의 공통적인 경로에서 단백질분해효소의 활성이 잘 알려져 있는데, 특히 시스테인계 단백질분해효소인 caspase는 세포자멸사를 결정짓는 효소로, 활성화되면 poly (ADP)-ribose polymerase (PARP) 및 lamin 등의 여러 표적 단백을 조절하는 데 관여한다. 특히 PARP 단백질은 DNA 복제와 복구, 그리고 유전체의 안정화와 재결합에 관여하며, 활성화된 caspase의 기질로 알려져 있다. 따라서 PARP 단백질의 감소와 분절은 DNA 복구의 실패로 말미암아 세포자멸사가 진행되고 있음을 시사한다.²⁸ 기존의 다양한 암 세포주를 이용한 연구 결과에서도 troglitazone과 COX-2 억제제는 세포자멸사 과정을 매개하는 단백질 bcl-2 및 bax, caspase 등의 발현에 영향을 미쳐 세포 성장 억제를 유도하는 것으로 보고되어 있다.^{29,30} 본 실험 결과 단독으로 처리한 저농도의 troglitazone과 COX-2 억제제는 bcl-2, bax 및 PARP 단백질의 발현에 영향을 미치지 않았으나, 두 약물을 병합 투여했을 때는 bcl-2 감소 및 bax 증가, PARP 분절 등의 세포자멸사 유도를 통해 아교모세포종 세포주의 성장을 억제하는 사실을 확인하였다.

저농도 troglitazone과 COX-2 억제제를 병합 투여하면 아교모세포종 세포주의 성장을 뚜렷하게 억제하는 것으로 보아, 본 연구는 두 약물의 병용 치료가 새로운 암 세포 성장 억제 치료로 이용될 수 있는 가능성을 제시하였다고 할 수 있다.

참고문헌

- Kornblith PK, Welch WC, Bradley MK. The future of therapy for glioblastoma. *Surg Neurol* 1993; 39: 538-43.
- Lemberger T, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; 12: 335-63.
- Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 2001; 276: 37731-4.
- Koeffler HP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1-9.
- Fajas L, Debril MB, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: from adipogenesis to carcinogenesis. *J Mol Endocrinol* 2001; 27: 1-9.
- Theocharisa S, Margeli A, Kouraklis G. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma ligands as potent antineoplastic agents. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003; 3: 239-51.
- Murphy GJ, Holder JC. PPAR-gamma agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21: 469-74.
- Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem* 1986; 55: 69-102.
- Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1299: 125-40.
- Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *Jama* 1999; 282: 1254-7.
- Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, *et al.* Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 632-5.
- van der Woude CJ, Kleibeuker JH, Jansen PL, Moshage H. Chronic inflammation, apoptosis and (pre-)malignant lesions in the gastrointestinal tract. *Apoptosis* 2004; 9: 123-30.
- O'Byrne KJ, Dalglish AG, Browning MJ, Steward WP, Harris AL. The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. *Eur J Cancer* 2000; 36: 151-69.
- Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000; 105: 1589-94.
- Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1529-36.
- Sheng H, Shao J, Kirkland SC, *et al.* Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1997; 99: 2254-9.

17. Kato M, Nagaya T, Fujieda M, Saito K, Yoshida J, Seo H. Expression of PPARgamma and its ligand-dependent growth inhibition in human brain tumor cell lines. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 660-6.
18. Morosetti R, Servidei T, Mirabella M, *et al.* The PPARgamma ligands PGJ2 and rosiglitazone show a differential ability to inhibit proliferation and to induce apoptosis and differentiation of human glioblastoma cell lines. *Int J Oncol* 2004; 25: 493-502.
19. Strakova N, Ehrmann J, Dzubak P, Bouchal J, Kolar Z. The synthetic ligand of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ciglitazone affects human glioblastoma cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 309: 1239-47.
20. Joki T, Heese O, Nikas DC, *et al.* Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *Cancer Res* 2000; 60: 4926-31.
21. Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Tanaka T. Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by a COX-2 inhibitor and PPAR ligands. *BMC cancer* 2005; 5: 46
22. Yao CJ, Lai GM, Chan CF, Cheng AL, Yang YY, Chuang SE. Dramatic synergistic anticancer effect of clinically achievable doses of lovastatin and troglitazone. *Int J Cancer* 2006; 118: 773-9.
23. Mizutani Y, Kamoi K, Ukimura O, Kawauchi A, Miki T. Synergistic cytotoxicity and apoptosis of JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, and 5-fluorouracil against bladder cancer. *J Urol* 2002; 168: 2650-4.
24. Gao J, Niwa K, Takemura M, *et al.* Significant anti-proliferation of human endometrial cancer cells by combined treatment with a selective COX-2 inhibitor NS398 and specific MEK inhibitor U0126. *Int J Oncol* 2005; 26: 737-44.
25. Smith MT. Mechanisms of troglitazone hepatotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2003; 16: 679-87.
26. Weller M, Malipiero U, Aguzzi A, Reed JC, Fontana A. Protooncogene bcl-2 gene transfer abrogates Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of human malignant glioma cells and confers resistance to chemotherapeutic drugs and therapeutic irradiation. *J Clin Invest* 1995; 95: 2633-43.
27. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 395-419.
28. de Murcia JM, Neidergang C, Trucco C, *et al.* Requirement of poly (ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 7303-7.
29. Li MY, Deng H, Zhao JM, Dai D, Tan XY. PPARgamma pathway activation results in apoptosis and COX-2 inhibition in HepG2 cells. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1220-6.
30. Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Lagioia M, Gendler SJ, Mukherjee P. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis in breast cancer cells in an in vivo model of spontaneous metastatic breast cancer. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 632-42.