

비소세포 폐암 세포주에서 Sulindac의 성장억제와 세포고사 유도

원광대학교 의과대학 내과학교실

김학렬, 양세훈*, 정은택

=Abstract=

Growth Inhibition and Apoptosis Induction of Sulindac on Human Lung Cancer Cells

Hak Ryul Kim, M.D., Sei Hoon Yang, M.D. and Eun Taik Jeong, M.D.

Department of Internal Medicine, Wonkwang University College of Medicine, Iksan, Korea

Background : Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) are useful in chemoprevention of colorectal cancers. Continuous NSAID administration causes 40% to 50% reduction in relative risk for colorectal cancer. Sulindac possesses an antiproliferative effect and induces apoptosis and tumor regression on colon cancer and other types of cancers. We intended to analyze the effects of sulindac in three non-small cell lung cancer cell lines.

Materials and Methods : The human lung cancer cell lines, A549, NCI-H157 and NCI-H460 were used for this study. Viability was tested by MTT assay, and cell death rate was measured by lactate dehydrogenase(LDH) release. Apoptosis was estimated by flow cytometric analysis and nuclear staining. Results: Sulindac was able to decrease the viability of non-small cell lung cancer cells in a dose- and time- dependent manner. In a parallel effect of sulindac on cell death rate, LDH release was increased in sulindac-treated lung cancer cells. Sulindac significantly increased apoptosis characterized by an increase of sub-G₀/G₁ fraction and morphological change of nuclei. The rate of apoptotic cells after sulindac treatment in lung cancer cells increased in a time- and dose- dependent manner in flow cytometric analysis. Apoptotic cells were defined as nuclear shrinkage, chromatin condensation and nuclear fragmentation of cells.

[†] 본 연구는 2003년도 원광대학교 연구비 지원으로 이루어졌음.

Address for correspondence :

Sei Hoon Yang, M.D.

Department of Internal Medicine, Wonkwang University College of Medicine

344-2, Shinyong-dong, Iksan, Jeonbuk, 570-711, Korea

Phone : 0653) 850-1078 Fax : 0653) 855-2025 E-mail : yshpul@wonkwang.ac.kr

Conclusion : Sulindac decreases viability and induces the apoptosis of lung cancer cells. Further studies will be needed to elucidate the potential mechanism of sulindac-induced apoptosis in lung cancer cells. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2004, 56:514-522)

Key words : Lung cancer, Sulindac, Apoptosis.

서 론

비스테로이드성 항염증제(Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, NSAID) 중 아스피린, keto-profen, sulindac 및 celecoxib 등은 항염증 작용뿐만 아니라 인체에서의 종양 형성도 억제시키는 것으로 보고 되어 있다¹. 지속적인 NSAID의 복용은 대장암의 발생 위험도를 40-50% 감소시킬 수 있는 것으로 보고 되었으며^{2,3} 최근에 미국 FDA는 cycloo-oxygenase-2(COX-2) 억제제인 celecoxib가 가족성 선종성 용종증의 암화 예방에 효과가 있다고 공인하였다.

Sulindac은 indomethacin과 구조식이 비슷한 NSAID로서 p-methyl sulphinyl group의 전구물질로서 sulphide로 대사되어 prostaglandin 합성을 억제시킨다. 가족성 선종성 용종증의 발암 예방 효과를 가지고 있으며^{4,5}, 항암기능으로 설명되는 COX-2 억제 기능도 있으나^{3,6} 구체적인 정확한 기전은 현재 확실치 않다. 대장암 세포주의 실험에서는 sulindac에 의해 세포 성장이 억제되고 세포 고사가 촉진된다고⁷ 보고되었고, 유방암 세포주에서도 sulindac에 의해 세포 성장의 억제와 세포 고사의 촉진이 관찰되었다⁸. 폐암 세포주에 대한 sulindac의 영향에 관한 보고는 현재까지 아직 충분치 않다. 폐암 세포주에서 sulindac 유도체와 paclitaxel, cisplatin을 병용 투여 시에 항암 작용의 상승효과가 발견되었고⁹, 폐암의 동물 모델에서 sulindac과 docetaxel 병용에 의해서 폐암의 성장 및 전이가 억제되었다는 보고가 있을 뿐이다¹⁰.

이에 저자들은 폐암에 대한 sulindac의 영향을

확인하기 위해서 각각 다른 3가지의 비소세포 폐암 세포주(선암, 편평상피암, 대세포암)에 sulindac을 농도별로 처리한 후 세포의 생존율과 세포 고사에 대한 현상을 시간대별로 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 세포주 및 세포배양

A549(선암), NCI-H157(편평상피암), NCI-H460(대세포암)은 사람 폐암 조직에서 얻은 세포주로서 한국 세포주 은행에서 분양 받아 계대배양 하면서 실험을 실시하였다. Sulindac, Dimethylsulfoxide(DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT), Hoechst 33342, propidium iodide(PD)는 Sigma사(USA) 제품을 사용하였다. 세포배양은 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배양액으로 사용하였으며, 24시간 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 sulindac을 농도별 또는 시간대별로 처리한 뒤 세포 생존율 및 세포고사 현상을 관찰하였다.

2. 세포 생존율 측정

실험세포군은 세포수 5×10^4 /mL 정도로서 세포 배양판에 1mL씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포 배양기 안에서 안정시킨 후, sulindac을 농도별 처리 후에 시간에 맞추어, MTT 용액(5mg/mL in PBS)을 배양액 최종부피의 1/10이 되게 첨가하였다. 4

시간 후 살아 있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan의 검출은 MTT가 들어있는 배양액을 모두 버리고 DMSO를 500 μ l을 넣고 충분히 녹인 후 96 well plate에 100 μ l을 넣고 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., USA)를 이용하여 595nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

세포의 사멸정도를 반영하는 유산 탈수소 효소(lactate dehydrogenase, LDH) 유리측정은 Sigma ultraviolet kit(NO. 340)을 사용하여 Beckman-68 spectrophotometer로 측정하였다.

3. 세포고사 분석

세포고사 현상을 확인하기 위해서 PI로 DNA를 염색한 후 FACS Vantage (Becton-Dickinson FACS Caliber, USA) 유식세포 분석기를 이용하여 형광의 세기를 측정하였다. A549, NCI-H157, NCI-H460 폐암세포주를 6cm 배양판에 5×10^4 /mL개의 세포가 되도록 분주한 후 sulindac을 농도별로 처리한 후 24시간과 48시간동안 배양하였다. Cell scraper를 사용하여 분리한 세포를 배양액과 함께 모은 후 1200rpm에서 5분간 원심분리 하여 세포를 침전시키고 PBS 1ml을 넣어 다시 부유시킨 후 1200rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 침전된 세포에 70% ethanol 2ml을 첨가하여 4°C에서 4시간 동안 고정시킨 후 phosphate-citrate buffer(0.2M Na₂HPO₄, 0.1M citrate)와 실온에서 30분 반응시켰다. 그리고 RNase(0.1mg/ml)을 첨가하여 RNA를 제거한 후 37°C에서 30분간 반응시킨 후 세포에 PI(50 μ g/ml)을 넣고 37°C 암실에서 반응시켰다. FACS Vantage 유식세포 분석기를 이용하여 형광의 세기를 측정하였으며, 그 정보의 분석은 CELLQUEST software (Becton-Dickinson, Co., USA)를 이용하였다.

세포핵의 형태학적 변화를 알아보기 위하여 Hoechst 33342 염색을 시행하였다. Sulindac을 처리한 세포는 3.7% 포름알데히드 용액에서 10분 고

정시킨 후 생리식염수 PBS (pH 7.4)로 2회 세척하고 Hoechst 33342 (10mM)염색제를 PBS로 희석하여 최종농도 1 μ l/ml로 37°C 1시간 염색한 후 다시 생리식염수에서 세척하여 형광현미경(Leica, Germany)으로 확인하였다. 관찰된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과로서 이들의 평균을 산출하여 표시하였다.

결 과

1. Sulindac 처리 후 폐암세포주의 생존율 변화

NCI-H460, A549, NCI-H157 폐암세포주에서 sulindac의 농도와 시간대별 변화에 의한 생존율의 변화를 알아보기 위하여 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2mM의 농도로 처리한 후 24, 48, 72시간에 따른 생존율을 sulindac을 투여하지 않은 세포군을 대조군으로 하여 MTT 분석을 하였다. Sulindac을 투여하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 하였을 때, 각각의 세포 생존율 비교는 Table 1과 같다. NCI-H460, A549, NCI-H157 세포 모두에서 생존율이 농도와 시간에 의존적으로 감소하였고 특히 NCI-H157세포가 A549, NCI-H460 보다 생존율이 현저히 감소였다.

2. Sulindac 처리 후 폐암세포주의 유산 탈수소 효소(LDH) 유리의 변화

NCI-H460, A549, NCI-H157 폐암세포주에서 sulindac 농도와 시간의 변화에 따른 LDH 유리의 변화를 알아보기 위하여 0.25, 0.5, 1, 2mM의 농도로 처리하였으며, sulindac을 투여하지 않은 대조군을 100%로 하여 비교한 결과는 Table 2와 같다. NCI-H460, A549, NCI-H157 세포 모두에서 LDH 유리는 농도와 시간에 의존적으로 증가하였다. 이상의 세가지 폐암세포주에서 세포사멸은 농도와

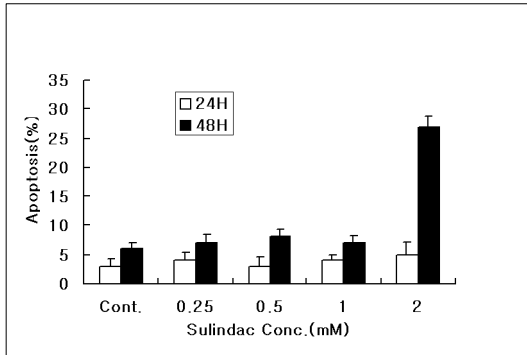


Fig. 1. Increased apoptosis(sub-G₀/G₁ fraction, flow cytometric) in NCI-H460 cells after sulindac treatment at 24, 48hours.

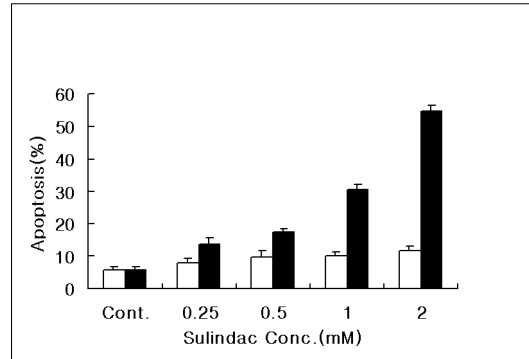


Fig. 3. Increased apoptosis(sub-G₀/G₁ fraction, flow cytometric) in NCI-H157 cells after sulindac treatment at 24, 48hours.

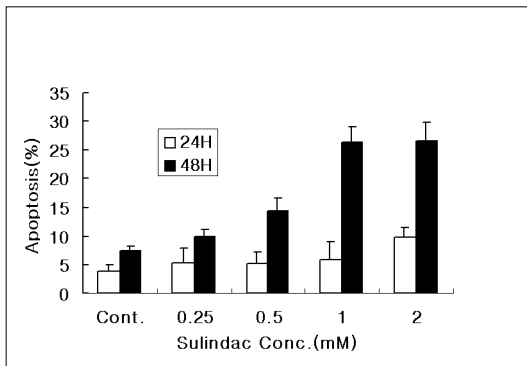


Fig. 2. Increased apoptosis(sub-G₀/G₁ fraction, flow cytometric) in A549 cells after sulindac treatment at 24, 48hours.

시간에 의존적으로 일어남을 확인하였고, 특히 NCI-H157와 A549에서 NCI-H460 보다 더 증가하였음을 확인하였다.

3. Sulindac에 의한 세포 고사의 유식세포 분석

NCI-H460, A549, NCI-H157 폐암세포주에 sulindac을 0.25, 0.5, 1, 2mM의 농도로 처리한 후 24시간과 48시간 후에 세포고사가 일어난 세포들의 낮은 분자량을 가진 DNA의 파편들이 DNA histogram에서 G₁ peak 전의 sub-G₀/G₁ fraction의 소

견으로 나타나고 있다. 세포고사 측정은 sulindac을 농도, 시간대별로 투여한 결과는 sulindac을 투여하지 않은 대조군과 비교하였다. NCI-H460 세포는 24시간에서 대조군 3%, 0.25mM 4%, 0.5mM 3%, 1mM 4%, 2mM 5%였고, 48시간에서는 대조군 6% 0.25mM 7%, 0.5mM 8%, 1mM 7%, 2mM 27%였다(Fig. 1). A549 세포는 24시간에서 대조군 4%, 0.25mM 5%, 0.5mM 5%, 1mM 6%, 2mM 10%였고, 48시간에서는 대조군 7%, 0.25mM 10%, 0.5mM 14%, 1mM 26%, 2mM 27%였다(Fig. 2). NCI-H157 세포는 24시간에서 대조군 6%, 0.25mM 8%, 0.5mM 10%, 1mM 10%, 2mM 12%였고, 48시간에서는 대조군 6%, 0.25mM 14%, 0.5mM 17%, 1mM 30%, 2mM 55%였다(Fig. 3). 3가지 폐암세포주 모두 대조군에 비하여 sulindac 처리 후 세포고사가 농도별 시간대별로 증가하였으며, NCI-H460 세포보다 A549와 NCI-H157가 농도 의존적으로 더 증가하였다.

4. Sulindac 처리 후 폐암 세포의 핵산 염색

세포고사의 형태학적 특징 중의 하나인 세포핵의 변화를 관찰하기 위해 1mM의 sulindac을 NCI-

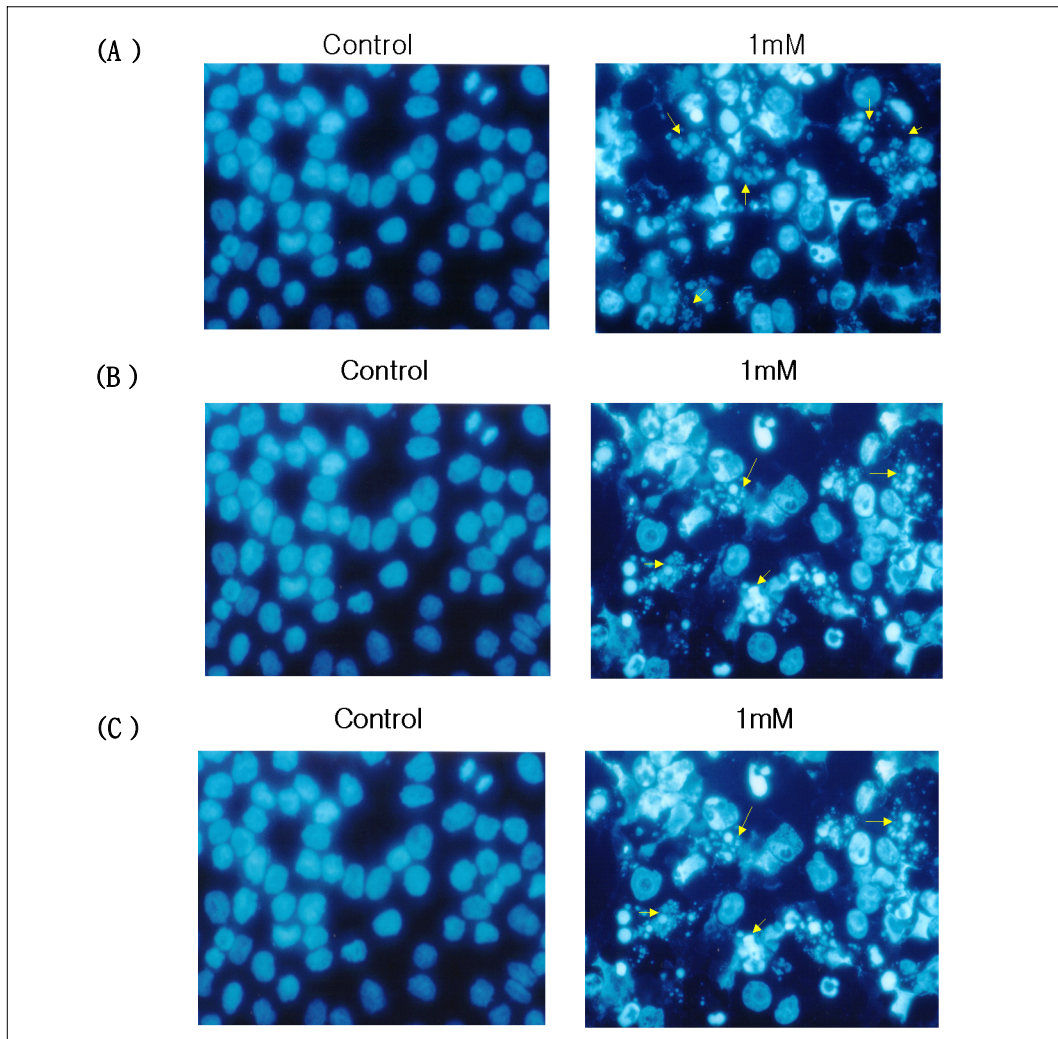


Fig. 4. Nuclear fragmentation induced by sulindac in (A) NCI-H460, (B) A549, (C) NCI-H157 cells (Fluorescence microscopy, Hoechst 33342 stain, x100)

H460, A549, NCI-H157 세포에 처리하고 48시간 후 DNA에 특이적으로 결합하는 형광 염색액인 Hoechst 33342를 사용하여 DNA를 염색하고 형광 현미경으로 관찰시 대조군은 타원형의 온전한 형태로 균질한 형광염색을 나타낸 반면, 1mM의 sulindac 처리군은 48시간 후 핵들의 chromatin이 응축되면서 작아지고 여러 조각으로 분절된 형광과편(apoptotic bodies)을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

고 찰

NSAID가 세포의 성장을 억제시킬 수 있다는 가능성은 1977년에 간세포의 배양 과정에서 처음으로 제시되었다¹¹. 1980년에 indomethacin을 장기 복용 중인 환자에서 desmoid 종양이 소실되는 것이 보고 되었으며¹², 1983년에는 대장 용종 환자에게 NSAID를 투여시켰더니 역시 대장 용종이 소실되

Table 1. Viability of lung cancer cells after sulindac treatment

Sulindac conc.		NCI-H460	A549	NCI-H157
24hr	Control	100 %	100 %	100 %
	0.1(mM)	97	99	95
	0.25	93	100	88
	0.5	67	99	67
	1	60	84	61
	2	54	76	55
48hr	Control	100 %	100 %	100 %
	0.1(mM)	90	93	88
	0.25	90	86	80
	0.5	75	69	52
	1	46	54	51
	2	40	50	44
72hr	Control	100 %	100 %	100 %
	0.1(mM)	94	89	93
	0.25	87	91	73
	0.5	58	55	38
	1	33	44	30
	2	21	28	16

는 것이 보고 되었다¹³. NSAID와 항암 기능과의 관계는 주로 대장 용종 및 대장암에서 연구가 이루어져 왔다. 가족성 선종성 용종증 환자에게 NSAID의 일종인 sulindac을 치료 목적으로 투여하여 효과를 보았으며⁵, 더욱 발전하여 가족성 선종성 용종증 환자들에게 celecoxib을 투여하여 대장암으로의 진행을 예방시켜 화학 예방 요법제로서의 가능성을 제시하였다³. 이러한 NSAID의 항암 효과에 대한 연구들이 있으나 현재까지 그 기전은 확실하지 않다. DuBois⁶ 등은 대장암 동물 실험 모델에서 대장암 세포의 COX-2가 증가되어 있음을 발견하고, NSAID의 COX-2 억제 기능이 대장암의 항암 기능과 관계있음을 시사하였으나, Elder¹⁴ 등은 인체 대장암 세포에서 NSAID의 항암 기능이 COX-2 와는 관계없다고 보고하기도 하였다.

Sulindac은 indomethacin과 유사한 NSAID의 일종으로서, 간에서 sulphide로 대사되어 기능을 나타낸다. 간에서 대사된 sulphide는 세포 성장 억제 효과가 있으며⁷, sulindac 대사 물질인 sulphide는

유방암 세포주에서 세포 성장 억제와 세포 고사 촉진 기능이 있음이 보고 되었고⁸, 전립선암 세포주 실험에서도 같은 효과가 보고 되었다¹⁵. Keller¹⁶ 등은 1999년 가족성 선종성 용종증 환자들에게 sulindac을 투여하여 좋은 치료 결과를 얻었다고 보고하였다.

폐암에 대한 sulindac의 작용을 연구한 보고는 현재까지 매우 드물다. Chan¹⁰ 등은 athymic nude rat에 폐암 세포주를 주입시켜 폐암을 발생시킨 후 sulindac과 docetaxel을 농도별로 각각 단독 또는 병합 투여한 후 21일 후에 희생시킨 후 절제한 폐암 조직에서의 세포 성장 정도(유식세포 분석법에 의한 S 및 G₂-M phase 비율)와 세포 고사(TUNEL assay)를 각각 측정하여 비교 분석하였다. 대조군에 비하여 sulindac 투여군은 유의한 영향이 없었으나, docetaxel과 sulindac 병용 투여군은 docetaxel 단독 투여군에 비하여 유의하게 S-phase가 감소하였으며, 세포 고사의 비율도 증가하였고, 특히 sulindac의 투여 농도가 높을수록 세포 고사의

Table 2. LDH release of lung cancer cells after sulindac treatment

Sulindac conc.		NCI-H460	A549	NCI-H157
24hr	Control	100 %	100 %	100 %
	0.25(mM)	112	114	112
	0.5	116	132	129
	1	151	364	324
	2	206	456	541
48hr	Control	100 %	100 %	100 %
	0.25(mM)	129	192	258
	0.5	134	252	265
	1	195	434	439
	2	226	549	548

비율도 함께 증가하였다. 그리고 폐내에서의 종양의 크기, 폐외 전이 및 평균 생존일도 docetaxel 단독 투여군보다 docetaxel과 sulindac 병용 투여군에서 유의하게 양호한 것으로 보고 되었다.

Soriano⁹ 등은 폐암 세포주 실험에 있어서 대조군과 sulindac 투여군의 S-phase는 각각 24%, 4.2%였으며, 세포 고사 비율은 각각 5%, 19%로서 폐암 세포의 성장 억제와 고사 촉진에 유의하게 sulindac에 의해 유발되었음을 보고하였다. 그리고 sulindac의 농도 증가에 따라 성장 억제, 세포 고사가 증가됨을 확인하였으며, paclitaxel 또는 cisplatin과 sulindac을 병용 투여한 결과 역시 암 세포가 더욱 감소 하였음을 보고하였다.

저자들의 실험 방법은 Soriano⁹ 등의 방법과 유사하나 sulindac의 투여 농도 및 배양 후 확인 시기 등이 달라 서로 대조 비교하기는 어렵다. 그러나 전반적으로 폐암 세포주에 있어서 sulindac이 세포 생존 억제와 세포 고사 촉진을 일으킨다는 점은 매우 일치하였다. 특히 저자들의 경우에는 sulindac 투여에 의해 비소세포폐암 세포주의 생존 억제, 고사 촉진이 농도와 시간에 의존적으로 이루어짐을 확인하였으며(Table 1, Fig. 1,2,3), 세포 사멸 확인 방법의 하나인 LDH 유리 역시 sulindac에 의해서 농도별, 시간대별로 의존적으로 증가되

어짐을 확인할 수 있었다(Table 2).

대장암 세포에서 증가된 COX-2는 prostaglandin E₂를 증가시키고, prostaglandin E₂는 Bcl-2를 증가시켜 세포 고사를 억제시키는 것으로 알려져 있으며³, 위암 세포주에 sulindac을 처리한 결과 COX-2와 Bcl-2의 발현이 감소하여 결과적으로 성장 억제와 세포 고사가 이루어진다고 보고 되었다¹⁷. 그러나 Lim¹⁵ 등은 전립선암 세포주에서 sulindac에 의한 세포 성장 억제와 세포 고사 촉진은 COX-2와는 무관하다고 보고하였으며, 대장암에 관한 다른 실험들에 의해서도 COX-2와는 무관하며¹⁴, prostaglandin과도 무관하다고 보고 되었다¹⁸.

Sulindac의 암세포 성장 억제와 세포 고사 촉진에 관한 기전 연구는 여러 방면으로 진행되었다. Piazza¹⁹ 등은 p53에 의한 세포 고사, G₁-arrest와는 관계가 없다고 하였고, Liu²⁰ 등은 caspase-3의 활성화에 의한다고 하였으며, Skopinska²¹ 등은 sulindac이 신생혈관생성을 억제시킨다고 하였으며, Thompson²² 등은 cyclic GMP phosphodiesterase 억제에 의해 sulindac이 세포 고사를 촉진한다고 보고하였다. 이렇듯 아직까지 어떻게 sulindac이 암세포 성장 억제와 세포 고사를 일으키는지에 대한 확실한 설명은 미흡한 편으로 이에 대한 연구가 지속되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

연구 배경 :

비스테로이드성 항염증제는 대장암의 화학 예방에 이용되고 있다. 지속적으로 비스테로이드성 항염증제를 복용한 결과 대장암 발생의 위험이 40-50% 감소하였다. Sulindac은 비스테로이드성 항염증제의 일종으로 대장암의 예방 효과가 있으며 암세포의 성장 억제와 세포 고사를 유도시킨다. 이에 저자들은 3가지 비소세포 폐암 세포주에서 sulindac의 영향을 알아보고자 하였다.

방 법 :

A549(선암), NCI-H157(편평상피암), NCI-H460(대세포암) 세포주에 sulindac을 농도별로 투여하여, MTT assay로서 암세포의 생존율을, 유식세포 분석법과 핵산 염색으로 세포 고사의 비율을, 유산 탈수소효소유리로서 세포 사멸의 정도를 시간대별로 측정하였다.

결 과 :

Sulindac에 의해 농도와 시간에 의존적으로 비소세포 폐암 세포주에서 암세포의 생존율이 감소하였고, 유산 탈수소 효소 유리는 증가하였으며, 세포 고사 역시 농도, 시간에 의존적으로 증가하였다.

결 론 :

Sulindac은 비소세포 폐암 세포주에서 농도, 시간에 의존적으로 암세포의 생존율 감소와 세포 고사 증가를 유도하였다.

참 고 문 헌

1. Rao KV, Detrisac CJ, Steele VE, Hawk ET, Kelloff GJ, McCormick DL. Differential activity of aspirin, ketoprofen and sulindac as cancer chemopreventive agents in the mouse urinary bladder. *Carcinogenesis* 1996;17:1435-8.
2. Smalley WE, DuBois RN. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol* 1997;39:1-20.
3. Shiff SJ, Rigas B. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer: evolving concepts of their chemopreventive actions. *Gastroenterology* 1997;113:1992-8.
4. Giardiello FM, Spannhake EW, DuBois RN, Hyland LM, Robinson CR, Hubbard WC, et al. Prostaglandin levels in human colorectal mucosa: effects of sulindac in patients with familial adenomatous polyposis. *Dig Dis Sci* 1998;43:311-6.
5. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hyland LM, Celano P, et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993;328:1313-6.
6. DuBois RN, Radhika A, Reddy BS, Entingh AJ. Increased cyclo-oxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. *Gastroenterology* 1996;110:1259-62.
7. Piazza GA, Rahm AL, Krutzsch M, Sperl G, Paranka NS, Gross PH, et al. Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 1995;55:3110-6.
8. Han EK, Arber N, Yamamoto H, Lim JT, Delohery T, Pamukcu R, et al. Effects of sulindac and its metabolites on growth and apoptosis in human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 1998;48:195-203.
9. Soriano AF, Helfrich B, Chan DC, Heasley LE, Bunn PA Jr, Chou TC. Synergistic ef-

- fects of new chemopreventive agents and conventional cytotoxic agents against human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1999;59: 6178-84.
10. Chan DC, Earle KA, Zhao TL, Helfrich B, Zeng C, Baron A, et al. Exisulind in combination with docetaxel inhibits growth and metastasis of human lung cancer and prolongs survival in athymic nude rats with orthotopic lung tumors. *Clin Cancer Res* 2002;8:904-12.
11. Hial V, De Mello MC, Horakova Z, Beaven MA. Antiproliferative activity of anti-inflammatory drugs in two mammalian cell culture lines. *J Pharmacol Exp Ther* 1977;202:446-54.
12. Waddell WR, Gerner RE. Indomethacin and ascorbate inhibit desmoid tumors. *J Surg Oncol* 1980;15:85-90.
13. Waddell WR, Loughry R. Sulindac for polyposis of the colon. *J Surg Oncol* 1983; 24:83-7.
14. Elder DJ, Halton DE, Hague A, Paraskeva C. Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: Independence from COX-2 protein expression. *Clin Cancer Res* 1997;3: 1679-83.
15. Lim JT, Piazza GA, Han EK, Delohery TM, Li H, Finn TS, et al. Sulindac derivatives inhibit growth and induce apoptosis in human prostate cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 1999;58:1097-107.
16. Keller JJ, Offerhaus GJ, Polak M, Goodman SN, Zahurak ML, Hyland LM, et al. Rectal epithelial apoptosis in familial adenomatous polyposis patients treated with sulindac. *Gut* 1999;45:822-8.
17. Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, et al. Growth inhibition and apoptosis induction of sulindac on human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol*, 2001;7:796-800.
18. Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Staiano-Coico L, et al. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol* 1996;52:237-45.
19. Piazza GA, Rahm AK, Finn TS, Fryer BH, Li H, Stoumen AL, et al. Apoptosis primarily accounts for the growth-inhibitory properties of sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest, and p53 induction. *Cancer Res* 1997;57:2452-9.
20. Liu JJ, Wang JY, Hertervig E, Nilsson A, Duan RD. Sulindac induces apoptosis, inhibits proliferation and activates caspase-3 in Hep G2 cells. *Anticancer Res* 2002;22:263-6.
21. Skopinska-Rozewska E, Piazza GA, Sommer E, Pamukcu R, Barcz E, Filewska M, et al. Inhibition of angiogenesis by sulindac and its sulfone metabolite(FGN-1): a potential mechanism for their antineoplastic properties. *Int J Tissue React* 1998;20:85-9.
22. Thompson WJ, Pamulku R, Liu L, Li H, Ahnen D, Speri G, et al. Exisulind induced apoptosis in cultured colonic tumor cells involves inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1999; 40:4-9.