

Cyclooxygenase-2 Specific Inhibitor (SC-58635)가 Lipopolysaccharide로 자극한 대식세포에서 Nitric Oxide와 Prostaglandin E₂ 생산에 미치는 영향

¹경희대학교 의과대학 내과학교실, ²원광대학교 의과대학 내과학교실, ³분당제생병원 내과, ⁴가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

홍승재¹ · 양형인¹ · 윤휘중¹ · 이명수² · 강효종³
김완욱⁴ · 이상현⁴ · 조철수⁴ · 김호연⁴

Effect of Cyclooxygenase-2 Specific Inhibitor (SC-58635) on the Production of Nitric Oxide and Prostaglandin E₂ in Lipopolysaccharide-stimulated Macrophage Cells

Seung-Jae Hong¹, Hyung-In Yang¹, Hwi-Joong Yoon¹, Myoung-Soo Lee², Hyo-Jong Kang³, Wan-Uk Kim⁴, Sang-Heon Lee⁴, Chul-Soo Cho⁴ and Ho-Youn Kim⁴

¹Department of Internal Medicine, Kyung-Hee University Medical College, ²Department of Internal Medicine, Won-Kwang University Medical College, ³Department of Internal Medicine, Daejin Medical Center, ⁴Department of Internal Medicine, Catholic University Medical College

ABSTRACT

Background: Celecoxib, a COX-2 specific inhibitor, has recently been used for the treatment of rheumatoid arthritis. However, the molecular and cellular mechanisms of celecoxib against RA inflammation remain to be defined. To elucidate the action mechanism of celecoxib on inflammatory cells, we investigated the effect of celecoxib on the production of two important mediators of inflammation, nitric oxide and PGE2. **Methods:** RAW 264.7 cells stimulated with LPS were preincubated with various concentrations of celecoxib (from 10⁻⁸ to 10⁻⁵ M) and 10 μ M hydrocortisone, respectively. The production of NO and PGE2, the end products of iNOS and COX-2 genes, were estimated in culture supernatants by Greiss method and EIA, respectively. The expression of iNOS gene, COX-2 gene, NF- κ B, and I- κ B were determined by RT-PCR and western blot analysis. **Results:** Celecoxib and hydrocortisone inhibited the production of NO and PGE2 in dose dependent manner, when RAW 264.7 cells were stimulated with LPS. The expression of iNOS was also down-regulated by celecoxib and hydrocortisone. Interestingly, COX-2 gene differentially expressed according to the dose of celecoxib, a decrease with lower dose (10⁻⁸ M) but an increase with higher dose (10⁻⁵ M). NF- κ B binding activity was decreased by lower dose of celecoxib, whereas was not affected by higher dose of it. The expression of I- κ B was suppressed by higher dose of celecoxib. **Conclusion:** The celecoxib strongly suppressed the production of NO and PGE2 in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The decrease of NO seems to be linked to the inhibition of iNOS by celecoxib. The lower and higher dose of celecoxib differentially regulated the COX-2 expression and NF- κ B activity. (Immune Network 2003;3(1):69-77)

Key Words: Celecoxib, nitric oxide, COX-2, NF- κ B, PGE2

서 론

비스테로이드성 항염제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs)는 류마티스 질환에서 진통과 항염작용에 가장 기본이 되는 약물로 cyclooxygenase (COX) 생산을 억제하여 prostaglandin (PG)의 합성을 막고, L-selectin 발현을 감소시켜 중성구와 내피세포의 유착을 억제하는 기능이 있다(1). 이 COX 효소는 내재적으로 발현되어 생리적 기능을 수행하는 COX-1 효소와 염증성 자극에 의해 유도되어 PG의 합성에 관여하는 COX-2 효소의 두 가지 형태가 존재하는데(2,3), 정상적인 상태에서는 백혈구, 대식세포, 혈관내피세포 및 섬유아세포 등은 COX-2 효소의 활성이 관찰되지 않으나, lipopolysaccharide (LPS), 저산소증, 염증 유발성 사이토카인이나 성장인자 등에 의한 염증성 자극을 받게 되면 COX-2 효소의 작용이 증가한다(4). 특히 류마티스 활막 조직에서의 대식세포, 섬유아세포나 혈관내피세포들은 인터루킨-1이나 phorbol ester의 자극에 반응하여 COX-2 유전자에 대한 mRNA의 발현이나 PGE₂ 형성이 증가되어 있다(5-7). 한편 류마티스 관절염 환자의 관절강 내에도 다른 염증부위와 마찬가지로 대표적인 염증 매개물질인 nitric oxide (NO)와 PGE₂가 증가해 있는데, 이러한 NO와 PGE₂는 활막세포나 대식세포 등에서 관절강내 류마티스 관절염을 유발하는 세포들과 서로 상호작용(cross-talk)을 일으키는 것으로 알려져 있다(8,9). 그러나, NO와 PGE₂의 상호관계에 대하여는 아직도 정확한 기전이 밝혀지지 않은 상태이고, 항염증약물의 투여 시 NO와 PGE₂의 변화 및 iNOS 및 COX-2 효소발현의 변화에 대하여는 많은 연구가 필요한 상태이다.

기존에 알려진 NSAIDs는 대부분 COX-1과 COX-2 효소를 모두 억제하는 반면 최근 연구가 활발히 진행 중인 celecoxib (SC-58635)나 rofecoxib, parecoxib 등과 같은 COX-2 선택적 억제제는 COX-2 효소만을 억제할 수 있어 기존의 약물에 비해 위장관 부작용을 감소시키는 장점이 있다. 그중에 celecoxib는 제일 먼저 미국 FDA의 공

인을 받은 약물로 장기간 약물을 복용해야 하는 류마티스 질환을 가진 환자들에게 널리 쓰이고 있는 약물이다(10-12). 하지만 최근의 몇몇 임상연구를 보면 저용량에 비해서 고용량의 celecoxib치료가 우리가 원하는 진통, 항염효과의 개선을 보이지 않는다는 보고들이 있었다(13-15).

그래서 저자들은 LPS로 자극한 murine RAW264.7 대식세포주를 가지고, celecoxib가 NO와 PGE₂의 생성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. RAW 264.7 대식세포주는 LPS로 자극 시 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 COX-2를 발현하여 NO와 PGE₂를 생산하는 염증 모델 세포로, 각종 약물의 면역 기능과 염증 반응 연구에 흔히 사용되는 세포이다(16-19). 구체적으로 이 RAW 264.7 대식세포주를 가지고 iNOS와 COX-2 유전자의 발현과 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현 정도를 함께 측정하여, celecoxib가 염증매개 물질인 NO의 분비와 PGE₂의 생성의 변화에 미치는 영향을 알아보았다. 또한, COX-2의 발현을 조절하는 전사인자인 NF-κB의 발현을 함께 측정하여 celecoxib가 NF-κB를 통해 COX-2 유전자에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료. 실험에 사용한 세포주는 한국세포주 은행에서 구입하였다. 세포배양에 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin은 Gibco BRL 회사의 제품을 사용하였고, PGE₂ 농도는 Amersham Pharmacia 회사의 PGE₂ EIA system kit를 이용하여 측정하였다. RNA의 분리에는 Sigma 회사의 Tri-reagent (Sigma, USA)를, reverse transcription 반응에는 Promega 회사의 first-strand cDNA synthesis kit를 사용하였다. 단백질의 size marker로는 Bio-rad사의 phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (21.5 kDa), lysozyme (14.4 kDa)을 사용하였다. Anti-COX-2, NF-κB (p65 subunit), I-κB alpha antibody는 Santa Cruz Biotechnology 회사 제품

Table I. PCR primers and sizes for analysis of RT-PCR

Target mRNA	Size	Primer sequences	
iNOS	351 (bp)	Sense	5'-TCTTTCgAAATCCCACCTgAC-3'
		Antisense	5'-CCATgATggTCACATTCTgC-3'
COX-2	251 (bp)	Sense	5'-AAgAAgAAAgtTCATTTCCTgATCCC-3'
		Antisense	5'-TgACTgTgggAggATACATCTCTCC-3'
NF-κB	306 (bp)	Sense	5'-TCgAATggACAAGACAgCAG-3'
		Antisense	5'-TCCTTgTCTTCCACCAgAgg-3'
GAPDH	189 (bp)	Sense	5'-gATATCATCTCCGCCCTTC-3'
		Antisense	5'-gATggCATggACTgTggTCA-3'

을 사용하였고, anti-iNOS antibody는 BD Transduction Laboratories 회사 제품을 사용하였다. 기타 나머지 시약은 Sigma회사 제품을 사용하였다. RT-PCR을 위한 각각의 primer는 Genbank에 등록된 염기서열을 참고하여 제작하였으며, 각 primer의 염기 서열 및 증폭된 유전자의 크기는 Table I과 같다.

실험방법.

세포배양 및 약물처리: 한국세포주은행에서 구입한 RAW 264.7 대식세포주를 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM에 37°C, 95% air, 5% CO₂의 환경 하에서 배양한 후 LPS를 1µg/ml의 농도로 16시간 처리하여 염증반응의 세포모델로 사용하였다. celecoxib가 대식세포주의 NO 및 PGE₂ 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 세포를 6 well plate에 1×10⁶개가 되도록 분주하고, LPS를 1µg/ml의 농도로 16시간 처리한 군을 염증 대조군으로 하였고, celecoxib는 LPS 처리 30분 전에 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵M의 농도로 처리하여 실험군으로 하였다. Celecoxib와 기존의 항염증제들과의 효과 비교를 위하여 hydrocortisone 10µM을 처리하여 비교하였다.

형태학적 관찰: RAW 264.7 대식세포주를 60 mm 배양 접시에 2×10⁵개로 분주하고 배양액을 첨가하여 24시간 배양한 후, 정상배지에서 배양한 대조군과 LPS (1µg/ml) 16시간 처리한 군에서 세포의 형태를 도립현미경(Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

Nitric oxide 농도 측정: NO의 생성은 nitrite (NO₂)의 농도를 측정하여 산정하였다. Nitrite의 농도는 Griess reagent (1% sulfanilamide 0.1% naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride / 2.5% H₃PO₄)를 이용하여 colorimetric assay법으로 측정하였다. 100µl의 배양액을 96 well plate에 넣고, Griess reagent 100µl와 1분간 반응시킨 후, 540 nm의 흡광도에서 microplate reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 측정하였다. 표준 도표(standard curve)는 이미 알려진 sodium nitrite의 농도를 이용하였고, 배양액만 넣은 well은 대조군으로 사용하였다. 각 실험 수치는 3차례 반복하여 평균을 구하였다.

Prostaglandin E₂ 농도 측정: 배지와 세포 내의 PGE₂ 농도는 총 세포 PGE₂를 측정하였다. RAW 264.7 대식세포주를 96 well plate에 well당 2×10⁴개씩 분주하고 180µl의 배양액을 첨가하여 키웠다. 20µl의 완충액 A (2.5% dodecyltrimethylammonium bromide)를 첨가하여 10분간 agitation한 후, 50µl를 goat anti-mouse Ig coated plate에 옮겼다. 50µl의 PGE₂ 항체를 well에 첨가하고 2~8°C에서 3시간 동안 흔들면서 반응시킨 후, 다시 50µl의 diluted conjugate를 넣고 2~8°C에서 1시간 저장하였다. 상층액을 경사하고 wash buffer로 4번 씻어내었다. 150µl의 enzyme substrate를 미리 실온에서 평형화시킨 후에, 모든 well에 첨가하고 실온에서 30분간 흔들면서 반응시

켰다. 630 nm의 흡광도에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다. 실험은 표준화와 대조군 실험을 같이 진행하였고, 3회 반복하였다. 각 결과치의 계산은 각 well의 흡광도를 측정하여 다음의 식으로 표준 도표를 얻고 이 도표에 실험치를 회귀방식으로 계산하여 농도를 구했다.

$$\% B/B_0 = \frac{(\text{standard or sample OD} - \text{NSB OD})}{(\text{zero standard OD} - \text{NSB OD})} \times 100$$

RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction): iNOS, COX-2, NF-κB (p65 subunit) 유전자의 발현 정도를 알아보기 위하여 RT-PCR을 시행하였는데, 각 실험군의 RNA는 다음의 방법으로 분리하였다.

먼저 35 mm dish에 배양한 10⁵개의 세포를 1 ml의 Tri-reagent를 첨가하여 분쇄한 후, chloroform을 1/10 volume 가하여 15초간 격렬하게 혼합하였다. 얼음에 5분간 방치한 다음 14,000 g에서 15분간 원심분리하고 상층액을 새 tube에 옮긴 후 같은 양의 원액 isopropanol을 가하여 4°C에서 15분간 방치하였다. 14,000 g에서 15분간 원심 분리한 후 pellet을 70% ethanol로 세척하고 total RNA를 추출하였다. RNA의 농도는 A₂₆₀/A₂₈₀의 흡광도로 측정하였다. 필요한 경우 DNA 제거를 위해 DNase-I 20 unit로 처리하였다.

역전사 반응은 분리한 RNA에 역전사 효소를 넣어 cDNA를 만든 후, 백서의 iNOS 유전자, COX-2 유전자, NF-κB 유전자의 primer를 가지고 PCR을 시행하여, 각각의 유전자의 cDNA의 일부분을 대량으로 증폭하였다. Total RNA 1µg에 oligo dT primer 또는 random hexamer를 1µl 넣어 65°C에서 10분간 반응시킨 후, AMV 역전사효소 1µl, RNasin 1µl, 10 mM dNTPs 5µl, 10 × reaction buffer 5µl, 50 mM MgCl₂ 및 탈이온수를 첨가하여 총 용량을 50µl로 하여 42°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 형성하게 하였다.

PCR은 PCR 기계(MJ Research, USA)에서 template로 희석한 cDNA 1µl, Taq DNA polymerase 2 unit (U), 2.5 mM dNTPs 1µl, sense primer 10 pM 1µl, antisense primer 10 pM 1µl, 10 × reaction buffer 3µl 및 탈이온수를 첨가하여 총 30µl의 volume으로 시행하였다. 반응은 94°C에서 5분간 1회 pre-denaturation시킨 후, 94°C에서 30초 denaturation하고, annealing 과정은 iNOS는 59°C에서, COX-2는 63°C에서, NF-κB (p65)는 58°C에서, GAPDH는 58°C에서 30초, extension으로 72°C에서 30초씩 40회 반응시키고, 72°C에서 5분간 1회 last extension을 시행한 후 1% 한천 gel에서 전기영동하였다. Standard로는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자 cDNA의 일부를 같은 방법으로 증폭하여 각 유전자의 발현 정도를 보정하였다. 각각의 band의 크기는 densitometer

(Amersham pharmacia biotec, USA)로 측정하여, GAPDH와 비교하였다.

Western blot analysis: 세포내 단백질의 분리를 위하여 단층으로 자란 배양된 세포를 PBS로 washing 후 배양접시에 세포가 붙은 상태로 상온에서 lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 15% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1µg/ml leupeptin and 1µg/ml aprotinin]를 넣어 scraper로 긁어 eppendorf tube에 모은 후, 12,000 g, 4°C, 60분 간 원심분리하여 상층액을 Western blot분석에 사용하였다. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis를 위하여 전기영동장치(Bio-Rad Mini-Gel, USA)를 조립한 후 10% separating gel을 제조하기 위하여 Solution A (30% acrylamide, 0.8% bis- acrylamide) 5 ml, Solution B [1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.4% SDS] 2.5 ml, 증류수 2.5 ml, 10% ammonium persulfate (APS) 50µl, TEMED 5µl를 혼합하여 유리판 사이에 loading한 후, isopropanol 2 ml를 부어 수평을 맞추고 gel을 굳혔다. 5% stacking gel을 만들기 위하여 Solution A 0.67 ml, Solution C [0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.4% SDS] 1 ml, 10% APS 30µl, TEMED 5µl를 혼합한 후 유리판 사이에 loading 하고 comb을 꽂아 굳혔다. Sample은 준비된 동량의 단백질에 (40µg) 5X sample buffer [60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM β-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue]를 첨가하여 100°C에서 5분 간 가열하여 간단히 원심분리한 후 실시하였다. 전기영동 완충용액으로는 25 mM Trizma base, 192 mM glycine, 0.1% SDS 용액을 pH 8.3으로 맞추어 사용하였으며, 30 mA에서 2시간 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 electrophoretic transfer 방법에 의하여 Mini Protein II Cell (Bio-Rad, USA)을 이용하여 transfer buffer (1 L당 Tris 5.8

g, methanol 200 ml, SDS 0.37 g, glycine 2.9 g)에서 250 mA로 수시간 전기영동에 의하여 nitrocellulose membrane (Hoefer, USA)에 전이시켰다. 전이 후 남은 gel은 Ponceau S (0.2% ponceau S, 3% trichloroacetic acid, 3% sulfosalicylic acid)로 염색을 하여 전이된 band와 standard protein의 위치를 확인하였다.

Transfer된 membrane은 5% skimmed milk/TBST (Biorad, USA) [20 mM Tris (pH 7.5), 500 mM NaCl, 0.05% Tween 20]에서 2시간 동안 실온에서 반응시켰다(blocking). Washing buffer로 5분간 3회 세척한 후 TBST에서 1 : 1,000으로 희석한 anti-iNOS, COX-2, NF-κB, I-κB antibody (1 : 1,000)에서 overnight 반응시켰다. Washing buffer에서 3회 씻은 다음 1 : 1,000으로 희석된 horseradish peroxidase-conjugated anti-goat IgG antibody (COX-2), horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody (iNOS), 또는 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (p65 NF-κB, i-κB alpha)로 반응시킨 후 ECL detection system (Amersham, UK)으로 반응 정도를 알아보았다.

통계 처리. 통계 자료의 평균값은 평균±표준오차로 표시하고, 유의성은 Student's t-test로 확인하였다.

결 과

RAW 264.7 대식세포주의 형태학적 변화. LPS (1µg/ml) 자극에 의한 형태학적 변화를 관찰하기 위해 정상 배양 조건에서 배양한 대식세포와 16시간 LPS 처리를 한 세포의 형태를 도립현미경으로 관찰하였다. Fig. 1에서 나타난 바와 같이 정상세포가 작고 동그란 모양을 보이는데 비하여 LPS로 처리된 세포는 활성화되어 세포의 모양이 신경세포의 모양과 비슷한 수지상 형태를 보였다.

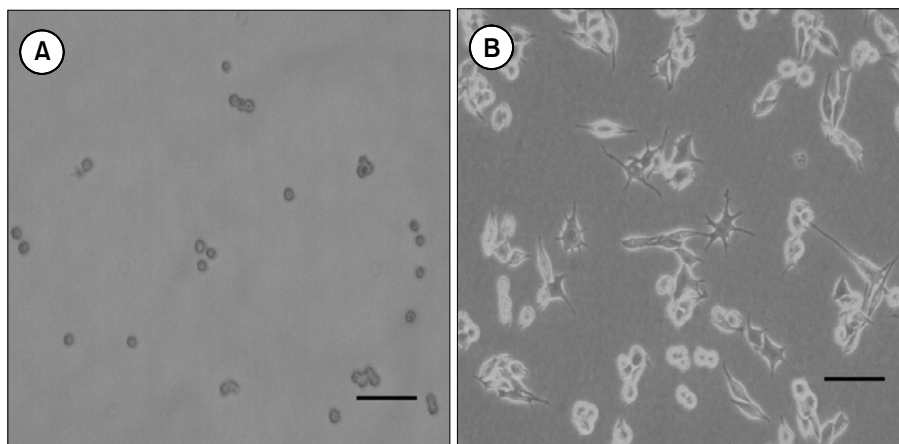


Figure 1. Morphological changes of RAW 264.7 cells in light microscopy were seen unstimulated cells (A) and stimulated cells (B) by LPS (1µg/ml) for 16 h. Scale bar, 10µm.

Celecoxib에 의한 nitric oxide (NO)의 생성 변화. 대조군의 nitrite 농도는 $2.27 \pm 0.15 \mu\text{M}$ 이었으나, $1 \mu\text{g/ml}$ LPS를 처리한 군에서는 $7.12 \pm 0.05 \mu\text{M}$ 로 증가하여 LPS로 자극 시 NO의 분비가 통계적으로 유의하게 증가함을 알 수 있었다($P < 0.01$). Celecoxib를 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M의 농도로 전처리한 후 LPS로 처리한 군에서 nitrite의 농도는 5.68 ± 0.02 , 5.04 ± 0.12 , 4.95 ± 0.08 , $4.74 \pm 0.01 \mu\text{M}$ 로 나타나 NO의 분비가 celecoxib 처리군에서 농도의존적으로 유의하게 저하되었음을 알 수 있었다($P < 0.01$) (Fig. 2). Hydrocortisone을 처리한 군에서는 nitrite 분비가 $4.92 \pm 0.05 \mu\text{M}$ 로 나타나, celecoxib 10^{-6} 과 10^{-5} M 중간 정도의 억제작용을 나타내었다.

Prostaglandin E₂ 농도 측정. 세포 내 PGE₂를 측정된 결과 대조군은 2.10 ± 0.02 pg/well이었으나, $1 \mu\text{g/ml}$ LPS 처리시에는 4.16 ± 0.02 pg/well로 증가하였으며, 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M의 농도로 celecoxib를 전처리한 후 LPS로

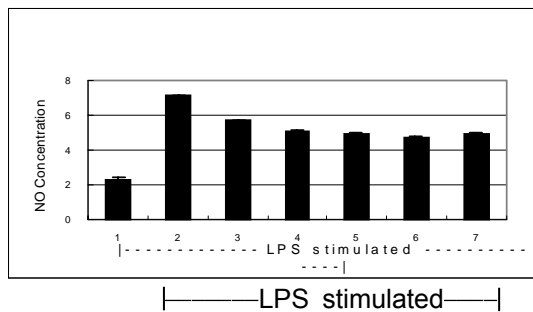


Figure 2. Effects of celecoxib on the release of nitric oxide (NO) in murine RAW 264.7 macrophage cells. Cells were stimulated with $1 \mu\text{g/ml}$ LPS for 16 h in the absence (control) or presence of celecoxib and hydrocortisone at the indicated concentrations. NO concentrations were measured by Griess reaction. 1. Control, 2. LPS only, 3. Celecoxib 10^{-8} M, 4. Celecoxib 10^{-7} M, 5. Celecoxib 10^{-6} M, 6. Celecoxib 10^{-5} M, 7. Hydrocortisone $10 \mu\text{M}$.

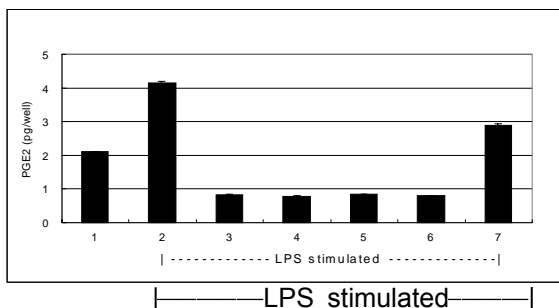


Figure 3. Production of PGE₂ in RAW 264.7 cells were assayed by EIA. 1. Control, 2. LPS only, 3. Celecoxib 10^{-8} M, 4. Celecoxib 10^{-7} M, 5. Celecoxib 10^{-6} M, 6. Celecoxib 10^{-5} M, 7. Hydrocortisone $10 \mu\text{M}$.

처리한 군에서는 0.83 ± 0.01 , 0.79 ± 0.01 , 0.85 ± 0.01 , 0.80 ± 0.01 pg/well로 감소하였고($P < 0.01$), hydrocortisone을 처리한 군에서는 2.9 ± 0.02 이었다($P < 0.01$) (Fig. 3).

RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) 결과. iNOS, COX-2 및 NF- κ B의 mRNA에 대한 RT-PCR을 시행한 결과는 Fig. 4~6과 같다. RT-PCR 결과 iNOS는 대조군에서는 잘 발현되지 않았고 LPS를 처리한 군에서 발현이 증가하였으며, celecoxib를 처리하자 발현이 농도에 따라 감소하였다. COX-2 유전자는 LPS를 처리한 군에서 발현이 증가하였고, 저농도(10^{-8} M)의 celecoxib를 처리하자 발현이 감소하였으나, 농도를 증가

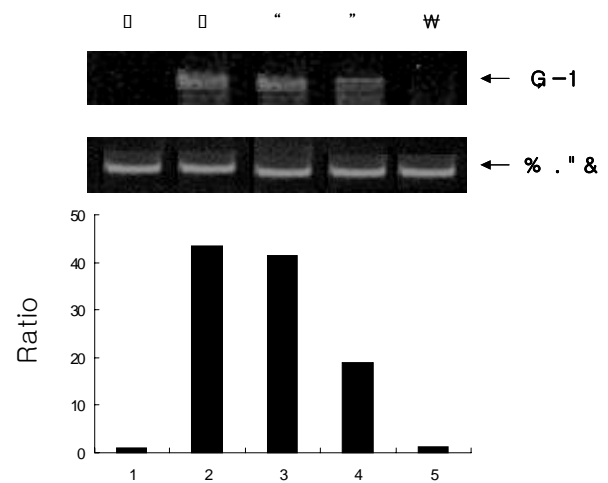


Figure 4. RT-PCR analysis of iNOS gene Expression of iNOS mRNA in RAW 264.7 macrophage cells was analyzed by RT-PCR. GAPDH mRNA was used as an internal standard. 1. Control, 2. LPS only, 3. Celecoxib 10^{-8} M, 4. Celecoxib 10^{-5} M, 5. Hydrocortisone $10 \mu\text{M}$.

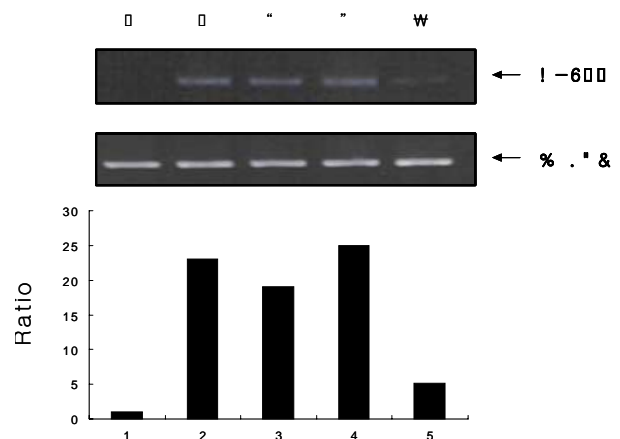


Figure 5. RT-PCR analysis of COX-2 gene Expression of COX-2 mRNA in RAW 264.7 macrophage cells was analyzed by RT-PCR. GAPDH mRNA was used as an internal standard. 1. Control, 2. LPS only, 3. Celecoxib 10^{-8} M, 4. Celecoxib 10^{-5} M, 5. Hydrocortisone $10 \mu\text{M}$.

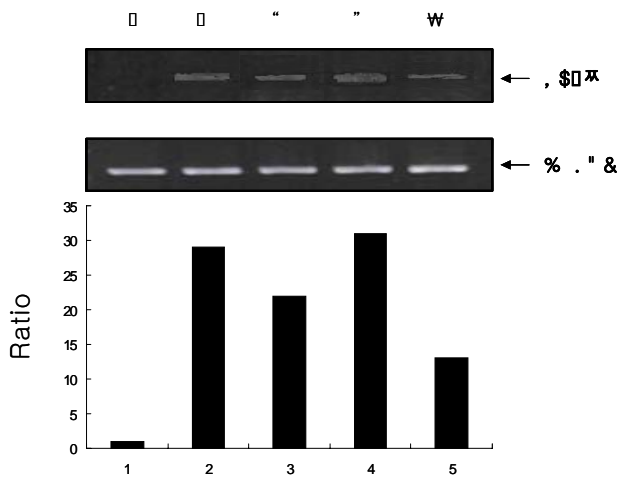


Figure 6. RT-PCR analysis of NF-κB (p65 subunit) gene expression of NF-κB mRNA in RAW 264.7 macrophage cells was analyzed by RT-PCR. GAPDH mRNA was used as an internal standard. 1. Control, 2. LPS only, 3. Celecoxib 10⁻⁸ M, 4. Celecoxib 10⁻⁵ M, 5. Hydrocortisone 10 μM.

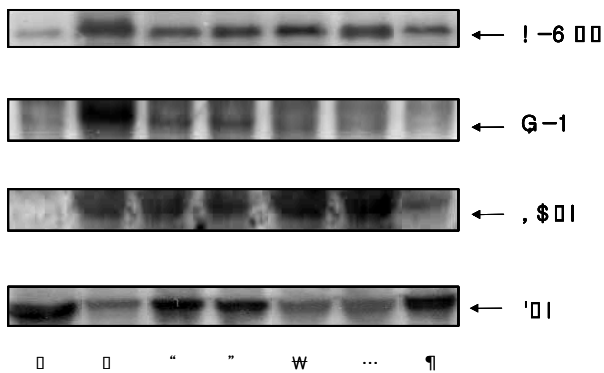


Figure 7. The expression of COX-2, iNOS, NF-κB (p65 subunit) and I-κB alpha were determined by Western blot analysis. 1. Control, 2. LPS only, 3. Celecoxib 10⁻⁸ M, 4. Celecoxib 10⁻⁷ M, 5. Celecoxib 10⁻⁶ M, 6. Celecoxib 10⁻⁵ M, 7. Hydrocortisone 10 μM.

(10⁻⁵ M) 시키자 오히려 발현이 증가하는 경향을 관찰하였다. NF-κB 역시 LPS로 자극한 군에서 발현이 나타났으며, 저농도(10⁻⁸ M) celecoxib를 처리하였을 때 약간 발현이 감소하였으나, 용량을 늘리면서 오히려 발현이 증가하는 경향을 나타내었다.

Western blot analysis 결과. COX-2, iNOS의 측정은 각 군을 16시간 처리한 후 단백질을 모아 Western blot analysis를 시행하였고, NF-κB(p65 subunit)와 I-κB alpha의 측정은 1시간 동안 약물을 처리한 후 Western blot analysis를 시행하였다(Fig. 7). Western blot analysis 결과 iNOS 단백질의 발현은 대조군에서는 나타나지 않았으나 LPS를 처리하였을 때 강하게 발현되었고, celecoxib를 처리하였을

때 농도가 높아질수록 발현이 감소하는 양상을 보였다. COX-2의 발현은 대조군에서 발현되지 않았으나 LPS를 처리하자 발현이 나타났고, celecoxib를 처리하였을 때도 발현되었으며 농도가 높아져도 지속적으로 발현이 증가하는 경향을 관찰할 수 있었다. NF-κB (p65 subunit)는 LPS 처리군에서 발현이 증가하였으며 celecoxib를 처리함에 따라 발현이 약간씩 증가하는 경향을 보였다. I-κB alpha는 대조군에서 많은 양이 발현되었으나 celecoxib로 처리한 군에서는 농도에 따라 발현이 감소하는 양상을 보였다.

고찰

1990년에 Needleman 등이 인터루킨-1에 의해 자극을 받은 단핵구에서 'inducible enzyme'인 COX-2 효소를 발견한 이래로, COX-2 효소를 차단함으로써 NSAID의 부작용을 줄이기 위한 노력이 많이 시도되어왔다(3). 인체 COX-2 유전자는 8.3 kb로 22 kb인 COX-1 유전자에 비해 작고 glucocorticoid나 인터루킨-6 등과 결합하여 COX-2 유전자 mRNA 발현이 쉽게 조절된다. 정상적인 상태에서는 활성화가 관찰되지 않으나, 저산소증, LPS, 사이토카인이나 성장인자 등에 의한 염증성 자극을 받게 되면 COX-2 효소의 작용이 증가하게 된다. 류마티스 관절염 환자들의 관절강 내에도 COX-2 효소가 증가해 있는데 이는 관절이 항원에 의해 자극을 받게 되면 주로 활막의 혈관 내피세포, 단핵구성 염증세포, 활막하 섬유아세포 등에서 COX-2 효소의 활성화와 이로 인한 PGE₂의 생성을 유도한다. 이것은 IL-1β나 TNFα와 같은 염증유발성 사이토카인, phorbol ester, 및 세포표면 수용체의 자극에 반응하여 나타나는 것으로 생각되며, 이러한 COX-2와 PGE₂의 증가가 류마티스 관절염이나 종양의 진행과 밀접하게 연관되어 있는 것으로 밝혀졌다(20-22).

한편 COX-2 유전자의 상등발현에는 NF-κB와 AP-1과 같은 여러 전사인자들이 작용하며(23), 특히 NO에 의한 자극이 COX-2를 증가시킨다는 보고들이 있다. 예를 들면 NO가 murine RAW 264.7 대식세포주, 활막세포 또는 혈관내피세포 등에서는 직접적으로 COX-2 활성도를 자극해서 PGE₂의 생성을 증가시킨다는 보고가 있는가 하면(18,24-26), 다른 보고에서는 배양된 대식세포주에서 NO가 PGE₂의 생산을 감소시킨다고 보고하였다(27).

또 배서의 복강 내 대식세포에서 NO가 COX-2 mRNA 발현과 활성화를 억제한다는 보고가 있는가 하면(28), 골관절염 환자의 연골세포를 이용한 실험에서는 자발적 혹은 유도성 NO 생성의 저해가 PGE₂의 생성을 현저하게 증가시켰다는 보고가 있다(29,30). 한편 NO가 COX-2 mRNA 발현에는 별로 영향을 주지는 않고 cytosolic COX-2 단백질의 발현을 직접적으로 억제해서 PGE₂의 합성을 억제한다는 보고도 있다(15). 이러한 상반된 보

고들은 NO와 PGE₂ 생성에 영향을 주는 미세환경에서의 다른 매개물질들의 영향에 의한 것으로 생각된다(15). 또한 다양한 세포들에서 NOS와 COX-2 유전자는 조직 세포 특이적인 발현과 조절을 보일 것으로 생각되는데, Janabi 등의 인간 뇌세포 연구에 의하면 microglial cell은 NO가 PGF_{2α} 생성을 증가시키지만, 정상세포는 이런 현상이 나타나지 않았다고 보고하였다(30). 이는 NO가 COX-2-dependent PGE₂ 생성에 양면성을 가지고 있음을 알 수 있으며, 사용한 조직과 세포별로 차이가 날 수 있음을 의미한다.

Celecoxib는 1,5-diaryl pyrazole 복합체로 이루어져 있으며, COX-2에 대한 선택성이 약 375배 정도 되는 COX-2 선택적 억제제로(31), 지금까지 류마티스 또는 골관절염을 가진 환자들에서 celecoxib의 효과와 그 부작용을 알아보기 위해서 행해진 임상연구를 볼 때 celecoxib의 용량에 따라 그 효과에 차이가 큰 것을 알 수 있었다(13-15). 즉, 저용량(200 mg/day)에서 나타나던 진통, 항염효과가 용량을 증가시켜도 진통, 항염효과에 더 이상의 호전이 없었고 고용량(400 또는 800 mg/day)을 투여시 오히려 저용량 투여한 군에 비해 환자의 반응도가 떨어지는 것으로 나타났다(32).

이와 같은 celecoxib의 항염효과의 차이를 알아보기 위해서 저자들은 면역반응과 염증 반응연구에 널리 사용되는 RAW 264.7 대식세포주를 가지고, 대표적인 염증 매개 물질인 PGE₂와 NO를 측정하였다. 결과에서 보듯이 celecoxib는 염증매개 물질인 NO를 농도의존적으로 뚜렷하게 억제하였다. 또한 NO 분비의 감소와 iNOS mRNA와 단백질의 발현의 억제가 일치하여, celecoxib가 농도의존적으로 iNOS 유전자의 발현을 억제시켜서, NO의 생성을 억제한 것을 알 수 있었다. 이는 기존의 NSAIDs의 효과와 동일한 것으로, celecoxib가 iNOS의 전사를 억제하여 NO에 의해 유발되는 혈관확장, 세포독성, 혈관 투과성 증가현상들을 억제할 수 있음을 의미한다. 하지만 이에 대하여 다른 결과를 보인 보고가 있는데, Niederberger E 등에 의하면 IL-1β로 자극한 백서의 mesangial cell을 가지고 NO와 iNOS의 발현을 관찰했을 때, celecoxib를 처리했어도 NO의 분비가 감소하지 않았고, celecoxib의 용량을 높이자 오히려 NO의 분비가 증가하는 경향을 보였다(33). 또한 iNOS mRNA와 단백질의 발현도 celecoxib에 의해 영향을 받지 않았다. 이는 신장 조직에 대한 조직 특이적인 반응이거나, 저자들과는 달리 비염증세포를 가지고 한 실험의 결과로 생각된다.

PGE₂ 생성에 미치는 celecoxib의 효과 역시 농도에 따라 PGE₂의 생성을 감소시켜서 celecoxib의 항염효과를 확인할 수 있었다. 그러나, 염증부위에서 PG를 합성하는데 필수적인 COX-2 유전자의 발현에 대해서는 다른 결과가 나왔다. 저농도의(10⁻⁸ M) celecoxib를 처리하자

COX-2 유전자의 발현이 감소하였지만 농도를 증가(10⁻⁵ M)시켰을 때 COX-2 유전자의 발현이 증가되는 경향을 관찰할 수 있었는데, 이러한 결과는 백서의 mesangial cells을 가지고 한 실험에서도 동일하게 보고되었다(33). 이 사실은 농도에 따라 celecoxib가 COX-2를 억제하는 기능에 차이를 보이는 것을 의미하는 것으로, 약물학적으로 celecoxib의 초기 최고 한계 효과(early ceiling effect)를 말해주는 것이다. 즉, celecoxib가 저농도와 고농도에서 COX-2 유전자에 미치는 영향이 다를 것이라는 것을 시사해 준다. 또한 이런 결과는 임상적으로 celecoxib를 투여했을 때 저용량에 비해 고용량에서 오히려 환자들의 치료효과가 떨어지는 경향을 부분적으로 설명할 수 있다.

그래서 저자들은 COX-2 유전자의 전사에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 NF-κB를 측정하여 이 전사인자의 발현에 celecoxib가 미치는 영향을 조사하였다.

Celecoxib를 처리하였을 때 저농도(10⁻⁸ M)에서는 NF-κB의 발현의 감소를 뚜렷이 관찰할 수 있었지만, 고농도(10⁻⁵ M)에서는 NF-κB의 발현의 감소가 관찰되지 않았다. 또한 I-κB 단백질의 발현은 농도를 증가시키자 점차 감소되는 경향을 관찰하였다. 따라서 celecoxib가 고농도에서 전사인자인 NF-κB의 발현을 증가시키고, 증가된 NF-κB가 COX-2 유전자의 발현을 증가시킨 것으로 생각할 수 있다. 다시 말하면, celecoxib가 NF-κB의 DNA 결합능력을 항진시키고, NF-κB를 세포질에서 핵 내로 전사를 유도하여, COX-2 유전자와 같은 NF-κB의 종성 유전자의 전사를 증가시켜 나타나는 기전으로 생각된다(23,33). 그러나, 고농도에서도 PGE₂ 생성이 감소하는 것을 볼 때, celecoxib의 COX-2 효소 활성도를 저해시키는(enzymatic inhibition of COX-2 activity) 기능은 남아있기 때문에 임상적으로 볼 때 항염효과를 완전히 상실하거나 오히려 염증이 더 심해지기보다는, 저농도의 항염치료에 비해 더 이상의 호전이 없는 상태가 되는 것으로 판단된다.

Celecoxib가 NF-κB를 항진시킬 수 있다는 사실은 다른 NF-κB 의존성 사이토카인에도 영향을 주어 기존의 염증상태를 악화시킬 수 있음을 의미한다. 특히 TNF-α와 같이 류마티스 관절염의 활막세포의 염증반응에 핵심적인 역할을 하는 물질의 발현은 PGE₂ 합성과는 별개로 다른 염증매개물질과 matrix metalloproteinases (MMP)의 발현을 증가시켜 연골과 뼈의 파괴를 촉진시킬 수 있다(33-35).

한편, NF-κB의 활성화가 고농도의 celecoxib의 효과에 관련이 있다는 다른 증거는 가족성 대장 용종증 환자들에게 사용되는 celecoxib의 항암효과에서 찾아 볼 수 있다. 즉 하루 800 mg의 고용량의 celecoxib만이 대장 용종의 수를 의미있게 감소시켰는데, 이 용량은 대장암세

포가 세포자사를 일으키도록 유도하기 위한 NF- κ B 활성화의 양으로, 이 NF- κ B 활성화가 celecoxib의 화학요법의 효율성에 필수적이기 때문이다(36-38). 이런 NF- κ B 활성화가 celecoxib와 같은 COX-2 선택적 억제제에 한해 발생하는지 여부는 아직 밝혀지지 않았다. celecoxib의 결과와는 반대로 acetylsalicylic acid와 flurbiprofen과 같은 비선택적인 NSAIDs는 오히려 NF- κ B 활성화를 억제하는 것으로 알려져 있는데, 이러한 상반된 결과는 COX 효소의 비선택적인 억제나 또는 기존의 NSAIDs의 산성화에 의한 것으로 추정된다(23,39-41). 염증성 대식세포뿐만 아니라, 비염증 세포인 신장세포에서도 동일한 결과를 얻었는데, 백서의 mesangial 세포를 가지고 한 실험에서도 고농도의 celecoxib를 사용할 때 TNF- α , COX-2와 같은 NF- κ B 의존성 염증 유발 인자들이 증가하는 것을 볼 수 있었다(33). 흔히 임상에서 celecoxib를 사용 시 혈압이 상승하거나, 말초부종이 발생하여 환자의 약물순응도를 떨어뜨리는 경우가 있는데(42), 이는 주로 신장에서 PG 생성을 억제함으로 신장의 혈류량이 감소하고, 염분저류가 발생하여 생기는 것으로 생각되지만, 다른 한편으로는 이러한 염증인자의 증가도 영향이 있을 것으로 생각된다. 더욱이 비교적 약물에 반응이 빠른 대식세포나 mesangial cell을 가지고 실험한 경우에 이런 가능성이 높을 것으로 생각된다.

결론적으로 celecoxib는 NO와 PGE₂와 같은 염증매개 물질을 억제하여 항염 효과를 보이지만, 약물 농도에 따라 COX-2 유전자의 발현에 다르게 반응할 수 있으며, 이 결과는 임상에서 celecoxib를 투여 시 약 용량을 증가시켜도 환자의 치료 반응이 호전되지 않는 이유를 부분적으로 설명할 수 있다.

감사의 글

실험과정에서 도움을 주신 경희의대 약리학교실과 고령의학연구소 연구원들께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Ernesto SS, Michael HW: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: Ruddy S, Harris ED, Sledge CB eds.: Kelly's Textbook of Rheumatology, p799-822, Philadelphia, W. B. Saunders, 2001
- Dewitt DL, Meade EA, Smith WL: PGH synthase isoenzyme selectivity: The potential for safer nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am J Med* 95 (suppl 2A):40S-44S, 1993
- Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P: The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 265; 1637-1640, 1990
- Pairet M, Engelhardt G: Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fund Clin Pharmacol* 10;1-15, 1996
- Bombardieri S, Cattani P, Ciabattini G, Di Munno O, Pasero G, Patrono C, Pinca E, Pugliese F: The synovial prostaglandin system in chronic inflammatory arthritis: differential effects of steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Br J Pharmacol* 73;893-901, 1981
- Daives P, Bailey PJ, Goldenberg MM, Ford-Hutchinson AW: The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annu Rev Immunol* 2;335-57, 1984
- Crofford LJ: COX-2 in synovial tissues. *Osteoarthritis cartilage* 7;406-8, 1999
- Sakurai HH, Kohsaka MF, Liu H, Higashiyama Y, Hirata K, Kanno I, Saito N: Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest* 96;2357-2363, 1995
- Patel R, Attur MG, Dave MN, Abramson SB, Amin AR: Regulation of cytosolic COX-2 and prostaglandin E₂ production by nitric oxide in the activated murine macrophages. *J Immunol* 162;4191-1497, 1999
- Lipsky PE, Isakson PC: Outcome of specific COX-2 inhibition in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 24;9-14, 1997
- Goldengerg MM: Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Ther* 21;1497-513, 1999
- Bensen WG, Fiechtner JJ, McMillen JI, Zhao WW, Yu SS, Woods EM, Hubbard RC, Isakson PC, Verburg KM, Geis GS: Treatment of osteoarthritis with celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor: a randomized controlled trial. *Mayo Clin Proc* 74;1095-105, 1999
- Simon LS, Lanza FL, Lipsky PE, Hubbard RC, Talwalker S, Schwartz BD, Isakson PC, Geis GS: Preliminary study of the safety and efficacy of SC-58635, a novel cyclooxygenase 2 inhibitor: efficacy and safety in two placebo-controlled trials in osteoarthritis and rheumatoid arthritis, and studies of gastrointestinal and platelet effects. *Arthritis Rheum* 41; 1591-602, 1998
- Simon LS, Weaver AL, Graham DY, Kivitz AJ, Lipsky PE, Hubbard RC, Isakson PC, Verburg KM, Yu SS, Geis GS: Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *JAMA* 282;1921-1928, 1999
- Zhao SZ, McMillen JI, Markenson JA, Dedhiya SD, Zhao WW, Osterhaus JT, Yu SS: Evaluation of the functional status aspects of health-related quality of life of patients with osteoarthritis treated with celecoxib. *Pharmacotherapy* 19; 1269-1278, 1999
- Attur MG, Patel R, Thakker G, Vyas P, Levartovsky D, Patel P, Naqvi S, Raza R, Patel K, Abramson D, Bruno G, Abramson SB, Amin AR: Differential anti-inflammatory effects of immunosuppressive drugs: cyclosporin, rapamycin and FK-506 on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, cyclooxygenase-2 and PGE₂ production. *Inflamm Res* 49; 20-26, 2000
- Patel R, Attur MG, Dave MN, Kumar S, Lee JC, Abramson SB, Amin AR: Regulation of nitric oxide and prostaglandin E₂ production by CSAIDS (SB203580) in murine macrophages and bovine chondrocytes stimulated with LPS. *Inflamm Res* 48;337-343, 1999
- Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P: Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90;7240-7245, 1993
- Sherry B, Yarlett N, Strupp A, Cerami A: Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 89;3511-3515, 1992
- Crofford LJ, Wilder RL, Ristimaki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, Hla T: Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. *J Clin Invest* 93;1095-1101, 1994
- Angel J, Berenbaum F, Denmat C, Nevalainen T, Masliah J, Fournier C: Interleukin-1-induced prostaglandin E₂ bio-

- synthesis in human synovial cells involves the activation of cytosolic phospholipase A₂ and cyclooxygenase-2. *Eur J Biochem* 226;125-31, 1994
22. Chinery R, Beauchamp RD, Shyr Y, Kirkland SC, Coffey RJ, Morrow JD: Antioxidants reduce cyclooxygenase-2 expression, prostaglandin production, and proliferation in colorectal cancer cells. *Cancer Res* 58;2323-2327, 1998
 23. Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G: Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors *FASEB J* 15;2057-2072, 2001
 24. Hajjar DP, Lander HM, Frieda S, Pearce A: Nitric oxide enhances prostaglandin-H-synthase-1 activity by a heme-independent mechanism: evidence implication nitrosothiols. *J Am Chem Soc* 117;3340-3348, 1995
 25. Salvemini D, Currie MG, Mollace V: Nitric oxide-mediated cyclooxygenase activation: a key event in the antiplatelet effects of nitrovasodilators. *J Clin Inv* 97;2562-2567, 1996
 26. Honda S, Migita K, Hirrai K, Ueki Y, Yamasaki S, Urayama S, Kawabe Y, Fukuda T, Eguchi K: Induction of COX-2 expression by nitric oxide in rheumatoid synovial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 268;928-931, 2000
 27. Habib A, Bernard C, Lebreton M, Creminon C, Esposito B, Tedgui A, Maclof J: Regulation of the expression of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in rat peritoneal macrophages. *J Immunol* 158;3845-3850, 1997
 28. Amin AR, Cesare PD, Vyas P, Attur MG, Tzeng E, Billiar TR, Stuchin SA, Abramson SB: The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J Exp Med* 182;2097-2102, 1995
 29. Amin AR, Attur MG, Patel RN, Thakker GD, Marshall PJ, Rediske J, Abramson SB: Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. *J Clin Inv* 99;1231-1237, 1997
 30. Janabi N, Chabrier S, Tardieu M: Endogenous nitric oxide activates prostaglandin F_{2a} production in human microglial cells but not in astrocytes. *J Immunol* 157;2129-35, 1996
 31. Penning TD, Talley JJ, Bertenshaw SR: Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *J Med Chem* 40;1347-1365, 1997
 32. Fort J: Celecoxib, a COX-2 -specific inhibitor: the clinical data. *Am J Orthop* 28;13-18, 1999
 33. Niederberger E, Tegeder I, Vetter G, Schmidt A, Schmidt H, Brautigam L, Euchenhofer C, Grosch S, Geisslinger G: Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses by activation of NF- κ B. *FASEB J* 15;1622-1624, 2001
 34. Sakurada S, Kato T, Okamoto T: Induction of cytokine and ICAM-1 by proinflammatory cytokines in primary rheumatoid synovial fibroblasts and inhibition by N-acetyl-L-cysteine and aspirin. *Int Immunol* 8;1483-1493, 1996
 35. Hanemaaijer R, Sorsa T, Kontinen YT, Ding Y, Sutinen M, Visser H, vanHinsbergh VW, Helaakoski T, Kainulainen T, Ronka H, Salo T: Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor- α and doxycycline. *J Biol Chem* 272;31504-31509, 1997
 36. Cusack JC Jr, Liu R, Baldwin AS Jr: Inducible chemoresistance to 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]-carbonyloxycamptothecin (CPT-11) in colorectal cancer cells and a xenograft model is overcome by inhibition of nuclear factor- κ B activation. *Cancer Res* 60;2323-2330, 2000
 37. Han SY, Choung SY, Paik IS, Kang HJ, Choi YH, Kim SJ, Lee MO: Activation of NF- κ B determines the sensitivity of human colon cancer cells to TNF α -induced apoptosis. *Bio Pharm Bull* 23;420-426, 2000
 38. Matroule JY, Hellin AC, Morliere P, Fabiano AS, Santus R, Merville MP, Piette J: Role of nuclear factor- κ B in colon cancer cell apoptosis mediated by aminopyropheophorbide photosensitization. *Photochem Photobiol* 70;540-548, 1999
 39. Kopp E, Ghosh S: Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 265;956-959, 1994
 40. Tegeder I, Niederberger E, Israr E, Guhring H, Brune K, Euchenhofer C, Grosch S, Geisslinger G: Inhibition of NF- κ B and AP-1 activation by R- and S-flurbiprofen. *FASEB J* 15;2-4, 2001
 41. Weber C, Erl W, Pietsch A, Weber PC: Aspirin inhibits nuclear factor- κ B mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells. *Circulation* 91;1914-1917, 1995
 42. Stubanus M, Riegger GA, Kammerl MC, Fischeder M, Kramer BK: Renal side-effects of cyclo-oxygenase-type-2 inhibitor use. *Lancet* 26;355(9205);753, 2000