

혈관 반응성에 대한 Cyclooxygenase 억제제 효과와 Cyclooxygenase 발현 변화

이기영* · 박진우* · 엄은아* · 강영진 · 이광운 · 최형철
울산대학교 병원 내과*, 영남대학교 의과대학 약리학교실

Effects of Cyclooxygenase Inhibitors on Vascular Reactivity and Alterations of Cyclooxygenase Expression

Ki-Young Lee*, Jin-Woo Park*, Eun-A Eum*, Young-Jin Kang,
Kwang-Youn Lee, Hyoung-Chul Choi

Department of Internal Medicine, Ulsan University Hospital, Ulsan, Korea,
Department of Pharmacology, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea*

—Abstract—

Background: There is controversy regarding whether COX-2 specific inhibitors are associated with elevation of blood pressure. We compared the effects of aspirin, indomethacin, and celecoxib for vascular reactivity induced by phenylephrine. We also tested the effects of indomethacin and NO donor on COX-1 and COX-2 protein expression, as well as nitrite production in culture medium of vascular smooth muscle cells.

Materials and Methods: In this experiment, we used the isometric tension study for vascular reactivity. After 45 minutes of pretreatment with aspirin, indomethacin, celecoxib, and phenylephrine induced contractions were tested. COX-1 and COX-2 protein expressions were analyzed by Western blot and nitrite production by the Griess reaction.

Results: Although celecoxib pretreatment caused enhanced arterial contraction, aspirin pretreatment induced more potent arterial contraction than celecoxib in the isometric tension study of rabbit femoral artery. COX-1 protein expression was unchanged by indomethacin, SNP and NOR-3; COX-2 protein expression was increased by the addition of indomethacin, SNP, and NOR-3. Especially, NOR-3, a NO donor, significantly increased COX-2 protein

expression with unstimulated conditions as well as LPS stimulation. Induction of nitrite production was higher with NOR-3 treatment than SNP treatment with LPS stimulation.

Conclusion: These results suggest that aspirin caused more potent vascular contraction than celecoxib and indomethacin. COX-2 expression in VSMC depended on the types of NO donor and LPS stimulation.

Key Words: NSAIDs, Aspirin, Celecoxib, COX-2, Vascular reactivity

서 론

진통 및 해열 작용을 나타내는 비스테로이드성 항염증약물 (Non steroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs)은 cyclooxygenase-1 (COX-1)과 cyclooxygenase-2 (COX-2) 모두에 대하여 억제작용을 나타낸다. 그러나 NSAIDs 투여는 위염, 위궤양 등 소화기계에 대해 여러 가지 부작용을 유발하므로 그 사용에 있어 제한점이 되고 있다.^{1, 2)}

NSAIDs의 부작용을 줄이기 위해서 COX-1에는 억제작용이 없는 COX-2 선택성 억제제가 개발되어 현재 사용 중이며, COX-2 선택성 억제제는 위점막 손상을 감소시키는 것으로 보고되고 있다.^{3, 4)} 그러나 celecoxib, rofecoxib 등 COX-2 선택적 억제제는 최근 심혈관계에 대한 부작용이 다수 보고^{5, 6)} 되고 있으며, 미국 FDA (Food and Drug Administration, USA) 권고⁷⁾에 따라 rofecoxib는 사용이 금지된 실정이다.

통상적으로 투여된 NSAIDs 경우에도 심혈관계에 대한 여러 부작용이 있어 Johnson 등⁸⁾은 NSAIDs 투여 시 평균 혈압이 5 mmHg 상승 된다고 보고하였고, Brater 등⁹⁾은 NSAIDs 투여 초기에 prostaglandin에 의한 심혈관 조절작용이 억제되면 혈압이 증가한다고 보고하

였다. Hocherl 등¹⁰⁾은 rofecoxib가 용량 의존적으로 혈압을 상승시키며, 이때 혈장 prostaglandin인 PGF1a는 감소된다고 보고하였다. Solomon 등¹¹⁾은 65세 이상의 환자에서 celecoxib는 혈압에 영향을 주지 않지만 rofecoxib는 혈압을 증가시킨다고 보고하였다. 또 Muscara 등¹²⁾은 celecoxib가 혈압을 증가시키고 백혈구 이동과 부착을 유도한다고 보고하였다.

이와는 상반되게 celecoxib와 rofecoxib는 혈압의 상승을 유도하지 않는다는 보고^{4, 13, 14)}와 COX-2 선택성 억제제를 만성적으로 투여하여도 혈압이나 신기능에는 변화가 없다는 보고¹⁵⁾가 있지만, 추후 계속된 FDA 권고⁷⁾에서는 이와 상반되는 의견을 제시하였다.

그리고 각종 평활근의 이완작용을 유발하는 NO 공여제 (NO donor)가 최근 평활근의 염증 및 수축반응에 영향을 줄 수 있는 cyclooxygenase 발현에 영향을 미친다고 알려졌으며, Bullarbo 등¹⁶⁾은 임신말기의 자궁경부에서 isosorbide mononitrate가 COX-2 발현을 증가시킨다고 보고하였다. 그러나 산성 pH 유도 COX-2 발현은 NO에 의해 감소된다는 보고¹⁷⁾가 있어 조직이나 상태에 따라 COX-2 발현 양상이 다를 수 있다.

이에 본 연구에서는 현재 COX-2 선택성 억제제로 많이 사용되고 있는 celecoxib가 혈관

반응성에 미치는 영향을 aspirin, cyclooxygenase에 대해 비선택성으로 알려진 indomethacin과 비교 조사하였다. 이와 함께 indomethacin과 혈관에 대하여 이완작용을 나타내는 NO 공여제를 이용하여 NSAIDs 및 COX-2 억제제가 억제작용을 나타내는 COX-1, COX-2 단백질 발현에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

이 연구는 cyclooxygenase 선택적 억제제가 혈관 반응성에 직접적으로 미치는 영향을 조사하고, cyclooxygenase 발현에 대한 indomethacin과 sodium nitroprusside (SNP), NOR-3의 작용을 비교분석하고자 하였다.

재료 및 방법

적출근편 실험조

토끼의 대퇴동맥을 적출하여 4°C의 Tyrode 완충 용액 내에서 주위 조직을 제거한 후 나선형으로 혈관을 잘라 폭 2 mm 길이 15 mm 수평 근절편으로 제작하였다. 대퇴동맥 절편은 양끝을 견사로 결찰하여 한쪽 끝을 1 ml의 Tyrode 영양액이 함유되어 있는 적출근편 실험조 (isolated muscle bath)의 기저부에 고정하고 다른 한 쪽 끝을 등척성 장력 측정기 (Force displacement transducer, FT-03, Grass)에 고정하여, 폴리그래프 (Polygraph, Grass)에 그 수축력을 기록하였다.

실험조 내에 영양액의 온도는 37°C로 유지시키고, 95% 산소와 5% 이산화탄소의 혼합 기체를 공급하여 pH를 7.4로 유지하였다. 실험에 사용한 정상 Tyrode 영양액은 NaCl 117, KCl 4.8, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, Glucose 5.7 (mM)을 함유하고 있는 완충용액이다.

상기의 영양액 내에서 최초 2 g의 수동 장력을 가한 후 60분 동안 영양액을 관류시켰다가, 관류를 멈춘 후 최소한 60분 이상 근절편을 안정시켜 그 장력이 일정하게 유지된 상태에서 celcoxib 10⁻⁶ M, indomethacin 10⁻⁶ M, aspirin 10⁻⁶ M을 각각 45분 간 전처치하고 phenylephrine (10⁻⁸ - 10⁻⁴ M)을 첨가하여 그 수축반응의 차이를 연구하였다.

혈관평활근 세포의 배양

Sprague-Dawley 종의 흰쥐를 희생시켜 대동맥을 적출하고 4°C의 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 내에서 주위의 결체 조직을 제거하였다. 대동맥 조직을 배양접시에 잘게 썰어 골고루 넣고 50% fetal bovine serum (FBS)과 항생제 (penicillin 100 U/ml, amphotericin 2.5 µg/ml, streptomycin 100 µg/ml)를 포함한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배지를 5 ml 첨가하였다. 세포 배양기 (5% CO₂/95% O₂)에서 하루밤이 지난 후 10% FBS와 항생제를 포함하는 DMEM 배지를 3-4 ml 보충하였다. 5~7일정도 배양하면 조직 절편으로부터 혈관평활근 세포가 자라 나오기 시작하며 세포는 3~4일에 한 번 계대 배양하였다.

Western blot

혈관평활근 세포가 가득 찬 배양접시를 인산완충용액으로 2회 세척한 후 세포를 긁어 모아 2,500 g에서 5분간 침전시켰다. PRO-PREP (Intron Biotechnology, Korea) 70 µl를 넣고 -20°C에서 10-20분간 세포를 파괴하여 4°C에서 12,000 g로 원심분리 후 상층액을 분리하여 단백질을 정량하였다. 시료 완충용액 95 µl와 β-mercaptethanol 5 µl를 섞은 뒤 동량의 시료

와 혼합한다. 그 후 5분 동안 가열하고 200 V에서 45분 동안 전기영동 후 100 V에서 1시간 동안 NC membrane으로 전이한다.

탈지분유 1 g이 든 PBS 20 ml로 1시간 동안 blocking하고 다시 1시간 동안 1차 항체를 붙인다. 0.05% PBST (Phosphate Buffered Saline Tween-20)로 10분 동안 3번 씻은 후 2차 항체를 붙인 뒤 다시 10분 동안 3번 씻는다. 그 후 NC membrane을 electrochemiluminescence법 (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz, USA)을 이용하여 1분간 반응시킨 후 엑스선 필름에 감광시켰다.

배양액내 nitrite 생성의 측정

세포가 증식하고 있는 배양액을 채취한 후 1,200 g에서 5분간 원심분리 하여 세포 부유물을 제거한 후 Griess reagent (0.1% NEDD와 2% phosphoric acid에 1% sulfanilamide를 녹인 용액을 동량 혼합)와 배양액을 동량 혼합하여 상온에서 10분간 반응시키고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험 약물 및 성적 처리

세포배양에 사용된 HBSS, DMEM 등은 Sigma 제품을 이용하였고, fetal bovine serum, antibiotics-antimycotics, trypsin-EDTA 등은 GibcoBRL 제품을 이용하였다. Western blot에 사용된 COX-1, COX-2 일차항체는 Santa Cruz 제품을, GAPDH 일차항체는 abcam 제품을 이용하였다. 기타 시약은 사용 목적에 맞게 1급 시약을 이용하였다. 실험 성적은 Student's t-test를 시행하여 분석하였고, 이때 p value가 0.05 미만인 것을 유의한 것으로 판정하였다.

성 적

Phenylephrine 유도 혈관 수축반응에 대한 indomethacin, aspirin, celecoxib의 영향

적출근편 실험조에 대퇴동맥 절편을 현수한 후 phenylephrine에 대한 누적 농도반응을 조사한 결과는 phenylephrine 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M 을 투여하였을 때 각각 0 g, 0.2 ± 0.11 g, 0.7 ± 0.13 g, 1.2 ± 0.1 g, 1.5 ± 0.07 g 수축반응을 나타내었다.

Indomethacin 10^{-6} M을 45분 동안 전처치 한 후 시행한 phenylephrine에 대한 농도반응 결과는 phenylephrine 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M 을 투여하였을 때 각각 0.1 ± 0.02 g, 0.3 ± 0.05 g, 1.0 ± 0.10 g, 1.6 ± 0.06 g, 1.8 ± 0.02 g 수축하였다.

Aspirin 10^{-6} M을 45분 동안 전처치 한 후 시행한 phenylephrine에 대한 농도반응 결과는 phenylephrine 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M을 투여하였을 때 각각 0 g, 0.2 ± 0.03 g, 0.8 ± 0.04 g, 1.7 ± 0.06 g, 2.0 ± 0.09 g 수축하였다.

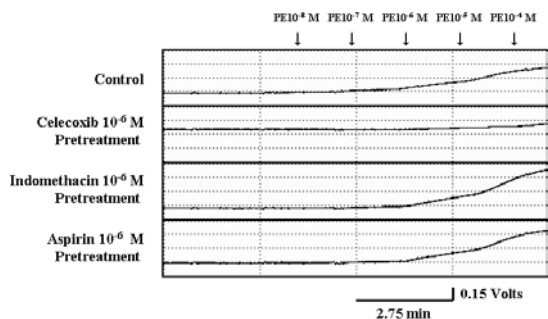


Fig. 1. Typical presentation of phenylephrine induced contraction in data acquisition system. The traces in each line show the consecutive responses in the same preparation. PE; Phenylephrine.

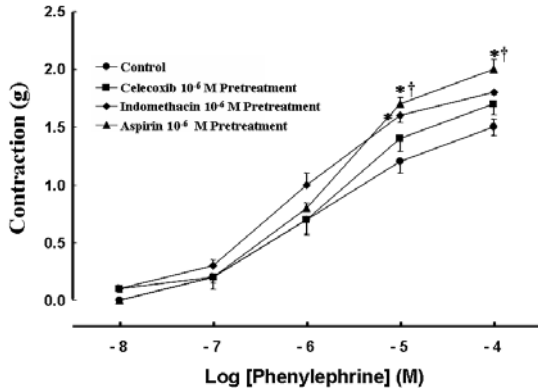


Fig. 2. Concentration-response curves of phenylephrine on the isolated rabbit femoral artery spiral strips with intact endothelium. Values are expressed as Mean±SEM (n=5). *p<0.05; significantly different from control. † p<0.05; significantly different from celecoxib 10⁻⁶ M pretreatment.

Celecoxib 10⁻⁶ M을 45분 동안 전처리 한 후 시행한 phenylephrine에 대한 농도반응 결과는 phenylephrine 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M 을 투여하였을 때 각각 0.1±0.03 g, 0.2±0.05 g, 0.7±0.14 g, 1.4±0.11 g, 1.7±0.09 g 수축하였다(Fig. 1, 2).

COX-1, COX-2 단백질 발현에 미치는 indomethacin과 NO 공여제의 영향

전체 실험군에서 COX-1 단백질의 발현에는 차이가 없었다. COX-2 단백질은 대조군과 비교하여 indomethacin 10 μM 또는 indomethacin 10 μM을 전처리한 실험군에서 전체적으로 발현이 증가되어 나타났다. 특히 indomethacin 10 μM을 전처리한 후 NOR-3 100 μM을 투여한 군에서 COX-2 단백질 발현이 현저히 증가되었다. GAPDH는 각 실험군에서 일정하게 발현되었다(Fig. 3).

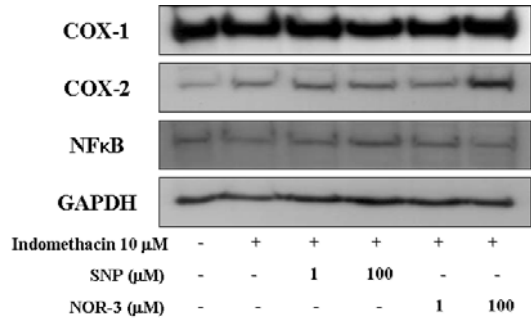


Fig. 3. Effects of indomethacin and NO donors on COX-1, COX-2 and NFκB protein expression. Western blot analysis of COX-1, COX-2, NFκB protein, and house keeping gene, GAPDH. SNP; Sodium nitroprusside.

LPS 유도 COX-1, COX-2 단백질 발현에 미치는 NO 공여제의 영향

LPS 10 μg/ml 처치로 유도된 혈관평활근 세포의 COX-1, COX-2 단백질 발현에 대한 SNP와 NOR-3의 영향은 아래와 같다. 전체 실험군에서 COX-1 단백질의 발현에는 변화가 없었다. COX-2 단백질은 대조군에서는 발현이 적었지만 LPS 10 μg/ml을 처치한 실험군에서는 발현이 증가되었으며, SNP, NOR-3 1 μM

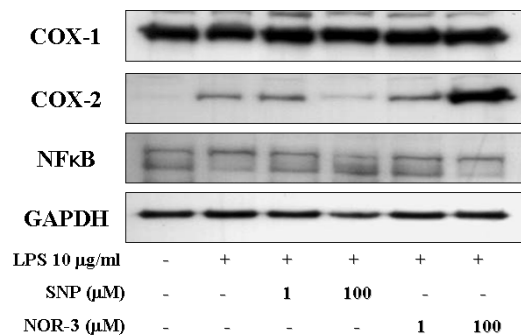


Fig. 4. Effects of NO donors on lipopolysaccharide induced COX-1, COX-2 and NFκB protein expression. Western blot analysis of COX-1, COX-2, NFκB protein, and house keeping gene, GAPDH. LPS; Lipopolysaccharide, SNP; Sodium nitroprusside.

을 전처리한 실험군에서는 LPS 단독 처치군과 비교하여 큰 변화가 없었다.

COX-2 단백질은 SNP 100 μM 을 전처리 후 LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ 처치한 군에서는 감소되었으며, NOR-3 100 μM 을 전처리 후 LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ 처치한 군에서 현저하게 증가되었다. GAPDH 는 각 실험군에서 일정하게 발현되었다(Fig. 4).

LPS 처치에 의한 NO 생성에 미치는 NO 공여제의 영향

LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ 처치로 유도된 혈관평활근 세포의 NO 생성에 대한 SNP와 NOR-3의 영향은 아래와 같다. LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ 단독 처치 시에 나타난 nitrite 변화량을 100%로 산정하였을 때 SNP 1 μM 과 NOR-3 1 μM 을 전처리 후 LPS를 처치한 군은 LPS 단독 처치군과 비교하여 유의성 있는 변화가 없었다. 그러나 SNP 100 μM 과 NOR-3 100 μM 을 전처리 후 LPS를 처치한 군은 LPS 단독 처치군과 비교하여 각각 222 \pm 18%, 509 \pm 21%로 nitrite 생성

이 유의성 있게 증가되었다(Fig. 5).

고 찰

진통과 해열작용을 가진 NSAIDs는 세계적으로 가장 많이 투여되는 약물에 속한다.¹⁸⁾ 그러나 소화기계에 대한 부작용이 NSAIDs의 사용에 있어 제한점이 되고 있으며, 이로 인해 COX-2 선택성 억제제가 대체되고 있는 상황이다.¹⁹⁾

COX-2 선택적 억제제는 소화기계에 대한 부작용은 현저히 줄었지만 최근 심혈관계에 대한 부작용이 많이 보고되고 있으며, 이 종류의 약물 중 rofecoxib는 FDA에 의해 사용이 금지⁷⁾되고 있고, Celecoxib의 경우 미국 FDA (Food and Drug Administration, USA)에서 사용을 금지하지는 않았지만 심혈관계에 대한 부작용의 가능성을 제시한 상태이다.

지금까지의 celecoxib에 대한 연구는 celecoxib가 심혈관계에 대해 부작용을 유발할 수 있다는 보고^{11, 13, 14)}와 적어도 celecoxib는 심혈관계에 대해서 안전한 약물이라는 보고¹²⁾가 양분되어 나타나고 있다. 이상의 보고들은 인구통계학적 조사로서 COX-2 선택적 억제제의 혈관에 대한 직접적인 연구들은 많지 않은 실정이다.

이에 본 연구에서는 celecoxib의 혈관 반응성에 대한 조사를 시행하여 이를 COX-1과 COX-2에 강한 비가역적 억제 작용을 유발하는 aspirin과 COX-1, COX-2에 대한 선택성이 낮지만 강한 항염증작용 (antiinflammatory effect)을 나타내는 indomethacin의 혈관 반응성에 대한 효과와 비교분석하였다.

Phenylephrine 유발 수축반응에서 celecoxib,

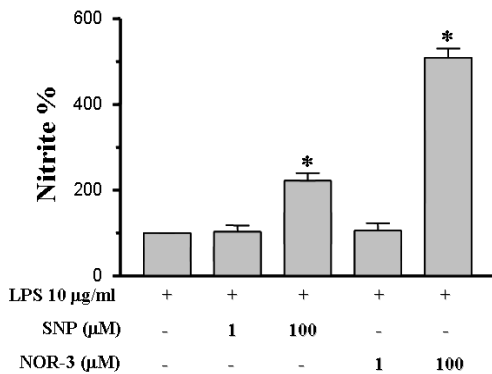


Fig. 5. Effects of NO donors on lipopolysaccharide induced nitrite production. Values represent Mean \pm S.E.M. (n=3 for each group) *p<0.05; significantly different from LPS 10 $\mu\text{g/ml}$. LPS; Lipopolysaccharide, SNP; Sodium nitroprusside.

aspirin, indometacin 전처치 시 수축반응이 증가되어 나타났다. 이때 저농도 phenylephrine (10^{-8} M - 10^{-6} M)에 대한 혈관 반응성은 각 약물에서 차이가 적었지만, 고농도 phenylephrine (10^{-5} M - 10^{-4} M)에 대해서는 수축력에 대한 변화가 크게 나타났다. 이 중 cyclooxygenase를 강하고 비가역적으로 억제하는 aspirin이 phenylephrine 유발 수축을 유의성 있게 증가시켰으며, indomethacin은 phenylephrine 유발 수축을 증가시켰지만 대조군과 비교해 유의성 있는 차이는 없었다. 또한 aspirin은 celecoxib와 비교해서도 유의성 있는 수축력의 증가를 유발했다.

이는 cyclooxygenase에 대해 비가역적으로 강한 억제를 나타내는 aspirin이 오히려 더 강한 효과를 나타내고 있으므로, 최근 항응고작용으로 심혈관질환의 보조요법제로 많이 투여²⁰⁾되는 aspirin의 혈관 반응성에 대한 연구는 더 필요할 것으로 생각된다.

그리고 혈관평활근 세포에서 COX-1, COX-2 단백질 발현에 대한 indomethacin과 혈관 이완 작용을 나타내는 NO 공여제의 영향을 조사하였다.

그 결과 COX-1 단백질은 약물처리에 따라 그 발현이 변화하지 않았다. 이는 혈관평활근 세포에서도 발현이 일정하게 유지되면서 혈관 반응성에 영향을 미치는 prostanoids를 생성할 수 있다. 그러나 혈관평활근 세포의 COX-2 단백질은 대조 실험군에서 발현이 아주 약하게 나타났고, indomethacin은 COX-2 단백질 발현에 대해 약한 상승작용을 나타내었다. 또한 SNP, NOR-3 등 NO 공여제는 혈관평활근 세포의 COX-2 발현을 증가시켰는데, 이는 배양 cTAL 세포에서 NO가 p38을 활성화

화하여 COX-2 발현을 증가시킨다는 Cheng 등²¹⁾의 보고와 유사한 결과를 나타내었다.

LPS를 이용하여 혈관염증을 유발시킨 경우 혈관평활근 세포의 COX-2 단백질 발현은 증가되었고, 이 상태에서 저농도의 SNP, NOR-3 (1 μ M) 전처치는 COX-2 단백질 발현에 영향이 적었다. 그러나 SNP 100 μ M 전처치는 COX-2 단백질 발현을 감소시켰으며, NOR-3 100 μ M은 COX-2 단백질 발현을 현저히 증가시켰다. 고농도 SNP에 의한 COX-2 단백질 발현 감소는 Chun 등²²⁾의 보고와 다른 결과를 나타내었고 이는 세포 독작용에 의한 것으로 사료 된다.

혈관평활근 세포에서 LPS와 NO 공여제에 의한 배양액내 nitrite 변화는 같은 농도라도 SNP 보다는 NOR-3에 의해 현저히 증가되었다. NOR-3는 COX-2 단백질 발현과 상관성을 나타내었지만, SNP의 경우 COX-2 단백질 발현과 달라 여기에 대해서는 좀 더 연구가 필요하다.

이상의 결과에서 혈관수축물질에 의한 수축 반응에서 aspirin은 indomethacin, celecoxib 보다 강한 상승작용을 유발하였고, 혈관평활근 세포의 COX-2 발현은 NO 공여제의 종류, LPS에 의한 혈관염증 유무에 따라 그 발현에 차이가 있는 것을 알 수 있다.

요 약

진통과 해열작용을 가진 NSAIDs는 소화기계에 대한 부작용 때문에 COX-2 선택성 억제제로 대체되고 있다. 그러나 COX-2 선택적 억제제는 심혈관계에 대한 부작용이 보고되고 있어 혈관 평활근에 대한 직접적인 연구가 필요

하다.

이에 본 연구에서는 혈관 반응성에 미치는 celecoxib와 aspirin, indomethacin의 영향을 비교 분석하였다. 또한 COX-1, COX-2 단백질 발현에 대한 indomethacin과 NO 공여제의 영향을 조사하였다.

Phenylephrine 유발 수축반응에서 전처치 된 celecoxib, indomethacin, aspirin 순서로 혈관 반응성을 증가시켜, cyclooxygenase를 억제하면 혈관 수축성물질에 대한 반응성이 커질 수 있음을 나타낸다. 이중 cyclooxygenase에 대해 비가역적으로 강한 억제를 나타내는 aspirin이 제일 강한 효과를 나타내어 여기에 대한 연구는 더 필요할 것으로 생각된다.

혈관평활근 세포의 COX-2 단백질 발현은 indomethacin과 SNP, NOR-3 처치에 의해 증가되었으며, LPS를 이용하여 혈관염증을 유발시키는 경우 혈관평활근 세포의 COX-2 단백질 발현이 증가되었고, 이 상태에서 SNP 100 μ M 전처치로 COX-2 단백질 발현을 감소되었으며, NOR-3 100 μ M은 COX-2 단백질 발현을 증가시켰다. LPS 유도 nitrite 생성에서 NOR-3는 SNP 보다 더 많은 nitrite를 생성시켰다.

이는 혈관의 수축반응에서 aspirin은 강한 상승작용을 유발하고, 혈관평활근 세포의 COX-2 발현은 NO 공여제, 혈관염증 유무에 따라 차이가 있는 것을 나타낸다.

감사의 글

This study was supported by the Korea Science and Engineering Foundation (KOSEF) through the Aging-associated Vascular Disease Research Center at Yeungnam University

(R13-2005-005-01003-0, 2005).

참고 문헌

1. Laine L. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1996;6(3):489-504.
2. Wolfe MM, Lichtenstein DR, Singh G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* 1999;340(24):1888-99.
3. Lazzaroni M, Bianchi Porro G. Gastrointestinal side-effects of traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs and new formulations. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20(Suppl 2):48-58.
4. Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, et al. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. *Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study*. *JAMA* 2000;284(10):1247-55.
5. Borer JS, Simon LS. Cardiovascular and gastrointestinal effects of COX-2 inhibitors and NSAIDs: achieving a balance. *Arthritis Res Ther* 2005;7(Suppl 4):S14-2.
6. Abramson SB, Weaver AL. Current state of therapy for pain and inflammation. *Arthritis Res Ther* 2005;7(Suppl 4):S1-6.
7. Arthritis Advisory Committee-FDA Briefing Information, NDA 21-042/S007, Vioxx (Rofecoxib). FDA Medical Officer's Cardiovascular Review. Accessed March 4, 2003.
8. Johnson AG, Nguyen TV, Day RO. Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect blood pressure? A meta-analysis. *Ann Intern Med* 1994;121(4):289-300.
9. Brater DC, Harris C, Redfern JS, Gertz BJ.

- Renal effects of COX-2-selective inhibitors. *Am J Nephrol* 2001;21(1):1-15.
10. Hocherl K, Endemann D, Kammerl MC, Grobecker HF, Kurtz A. Cyclo-oxygenase-2 inhibition increases blood pressure in rats. *Br J Pharmacol* 2002;136(8):1117-26.
 11. Solomon DH, Schneeweiss S, Levin R, Avorn J. Relationship between COX-2 specific inhibitors and hypertension. *Hypertension* 2004;44(2):140-5.
 12. Muscara MN, Vergnolle N, Lovren F, Triggle CR, Elliott SN, Asfaha S, et al. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition with celecoxib elevates blood pressure and promotes leukocyte adherence. *Br J Pharmacol* 2000;129(7):1423-30.
 13. Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, et al. VIGOR Study Group: Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2000;343(21):1520-8.
 14. Langman MJ, Eichler HG, Mavros P, Watson DJ, Kong SX. Initiation of antihypertensive therapy among new users of cyclooxygenase-2-selective and nonselective NSAIDs. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004;42(5):260-6.
 15. Richter CM, Godes M, Wagner C, Maser-Gluth C, Herzfeld S, Dorn M, et al. Chronic cyclooxygenase-2 inhibition does not alter blood pressure and kidney function in renovascular hypertensive rats. *J Hypertens* 2004;22(1):191-8.
 16. Bullarbo M, Norstrom A, Andersch B, Ekerhovd E. Isosorbide mononitrate induces increased cervical expression of cyclooxygenase-2, but not of cyclooxygenase-1, at term. *Eur J Obst Gynecol* 2006;In press.
 17. Cha SH, Park JE, Kwak JO, Kim HW, Kim JB, Cha YN. Attenuation of extracellular acidic pH-induced cyclooxygenase-2 expression by nitric oxide. *Mol Cells* 2005;19(2):232-8.
 18. Talley NJ, Evans JM, Fleming KC, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Melton LJ 3rd. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and dyspepsia in the elderly. *Dig Dis Sci* 1995;40(6):1345-50.
 19. Fries JF, Murtagh KN, Bennett M, Zatarain E, Lingala B, Bruce B. The rise and decline of nonsteroidal antiinflammatory drug-associated gastropathy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50(8):2433-40.
 20. Hering D, Piper C, Horstkotte D. Drug insight: an overview of current anticoagulation therapy after heart valve replacement. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005;2(8):415-22.
 21. Cheng HF, Zhang MZ, Harris RC. Nitric oxide stimulates cyclooxygenase-2 in cultured cTAL cells through a p38-dependent pathway. *Am J Renal Physiol* 2006;290:F1391-7.
 22. Chun KS, Cha HH, Shin JW, Na HK, Park KK, Chung WY, et al. Nitric oxide induces expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through activation of NF-kappaB. *Carcinogenesis* 2004;25(3):445-54.