선택적 COX-2 저해를 통한 구강암세포주 KB의 침습성 변화에 관한 예비연구

이은진 · 김명진 · 명 훈

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 서울대학교 치의학 연구소 구강종양연구부

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:103-108)

CHANGE OF THE INVASIVENESS WITH SELECTIVE COX-2 INHIBITION IN AN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELL LINE, KB ; PRELIMINARY *IN VITRO STUDY*

Eun-Jin Lee, Myung-Jin Kim, Hoon Myoung

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University

Department of Oral Oncology, Institute of Dental Research Seoul National University

Cyclooxygenase-2 (Cox-2) is known as one of the critical factor in carcinomas of various organs. However, the importance of Cox-2 in oral squamous cell carcinoma has not been fully described yet.

The purpose of this study is to evaluate the anti-cancer effect of selective cox-2 inhibitor, celecoxib in an oral squamous cell carcinoma cell line, KB with respect to cytotoxicity test, *in vitro* invasion and MMP-2 expression.

In cytotoxicity test, celecoxib treated group showed definitely concentration dependent cytotoxicity. In addition, administration of celecoxib reduced the invasive potential of KB cell line significantly in invasion assay. However, there was no remarkable difference of the MMP-2 expression between the celecoxib treated group and the control group.

Considering these data, celecoxib had a potential cytotoxic agent to oral squamous cell carcinoma cells. Also, it had anti-invasive property without acting on the MMP-2 expression mechanism. Therefore, it was postulated that celecoxib had the possibility of anti-cancer agent in treatment strategies of oral squamous cell carcinoma.

Key words: Oral squamous cell carcinoma, Celecoxib, Invasion, MMP-2, Cytotoxicity test

Ⅰ. 서 론

구강암은 인종, 지역별로 차이는 있으나 인간에게 발생되는 악성 종양의 약 3-5%정도를 차지하는 것으로 통계학적으로 알려져 있어 역학적으로 매우 중요하게 다루어야 할 악성암이다[1]. 현재 구강암에 대한 주된 치료 방법은 외과적 수술과 방사선 요법인데, 인접 조직으로의 침습이 많아 전이 재발이 많은 구강암의 특성 때문에 항암 요법이 병행되기도 하는데, 심한 부작용과 더불어 타 암종에 비해 반응률이 낮고, 종양의 성장과 미세 전이를 효과적으로 억제하지 못하며 이것이 오히려 수술의 시기를 지연시키고 예후를 악화시키는 경우를 초래하게 된다. 이러한 이유로 전신적 부작용이 적으면서 효과적으로 항암 작용을 나타낼 수 있는 새로운 치료 요법 연구가 꼭 필요한 실정이나 기초적인 연구가 활발하지 않다.

1980년대 부터 aspirin, indomethacin, piroxicam, sulindac과 같은 비스테로이드성 항염증약물(NSAID)이 대장, 직장암과 그 전구 병변인 선종(adenoma)의 위험성을 줄인다는 여러 보고가 있었고, 역학적인 조사를 통하여 aspirin이나 sulindac과 같은 약물이 대장직장암의 사망률을 40-50%이상 감소시키고, 대장암을 유발시키는 유전적 질환인 FAP(familial adenomatous polyposis) 환자에 있어서 선종의 수와 크기를 의미 있게 감소시켰으며 동물 실험에서도 여러 NSAID들이 암 조직과 전구 조직에 대한 화학 예방적인 효과와 암의 진행(tumor promotion)과의 관련성

명 훈
110-744 서울 종로구 연건동 28-2
서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
Hoon Myoung
Dept. of OMFS, College of Dentistry, Seoul National University
28-2, Yeongeon-dong, Jongno-gu, Seoul, 110-744, Korea
Tel: 82-2-2072-3059 Fax: 82-2-766-4948
E-mail: myoungh@snu.ac.kr

※이 논문은 서울대학교치과병원 일반연구비 지원에 의해 이루어진 것임 (No. 4-2005-0002).

이 여러 연구를 통해 제시되었다[2-5]. 비록 현재까지 NSAID의 종양 억제 작용의 기전이 아직 명확히 밝혀지진 않았으나 그간의 연구에 의하면 발암물질 활성화의 억제, 세포 증식의 억제, 세포사 (apoptosis)의 활성화, 면역 감시 기능의 강화 역할 등으로 설명하고 있으며 이중 비스테로이드성 소염제의 cyclooxygenase (Cox)억제 작용은 발암물질 활성화의 억제, 세포 증식의 억제와 관여되어 있는 것으로 알려져 있는데, Cox의 발암물질의 직접적인 활성화, MDA (malondialdehyde)의 생성, peroxy radical의 형성에 의한 procarcinogen의 활성화를 통한 발암 과정 유도에 대해 NSAID는 이를 억제함으로써 암 예방 및 암세포에 대한 성장 억제를 통해 항암 효과를 나타내는 것으로 추측된다[6]. 특히 Cox-2는 cytokine, growth factor 등과 같은 자극에 의해 유도되어 prostaglandin을 생성시키는 효소로서, 세포 성장, 및 분화에 밀접하게 관련하는 것으로 보이는데, 연구에 의하면 정상 세포에 12-O-tetradecanoylphorbol-13 acetate (TPA)와 같은 tumor promoter를 처리하였을 때 Cox-2가 유도되었다[5]. 최근에는 Cox-2 gene이 knock out된 쥐에서 skin과 intestine의 tumor promotion이 감소되었고, cox-2 over expressed transgenic mouse에서는 hyperplasia, dysplasia, 그리고 transformation과 같은 tumor promotion 과 관련된 현상들이 증가됨이 관찰되었다[6,7]. 이와 같은 연구 결과는 tumor promotion과 cox-2 간의 강한 상관관계가 있음을 시사한다. 그러나 구강암 영역에서의 cox-2 관련 연구는 미미하여, 아직 연구된 바가 적고, 구강암에서의 cox-2 발현도에 대한 보고조차 적은 실정이며, 암 예방 효과 외에 직접적 항암 효과에 대한 연구는 미진하다. 본 연구진은 천연물이나 식품, 그리고 기존에 안전성이 어느 정도 입증된 약품 중 항암 효과를 나타내는 것으로 알려진 여러 가지 후보 물질을 대상으로 구강암에 대한 항암 효과를 연구해 왔는데, 본 연구에서는 non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) 중 cox-2 에 대한 선택적 억제제인 celecoxib에 대한 세포 수준의 항암 효과를 1차적으로 보고하고자 한다. 본 연구의 목적은 구강암 세포주 에서의 선택적 celecoxib의 항암 효과를 침습도 (invasion) 및 세포 증식 억제 효과 (cytotoxicity)에 집중하여 평가하고 구강암의 치료 방법으로서의 가능성에 대해 알아보고자 하는 것이다.

Ⅱ. 연구 방법

1. 세포주 및 세포 배양

사용한 세포주는 구강편평세포암종 세포주인 KB (squamous cell carcinoma)였으며, 섬유 육종 세포주인 HT1080 (fibrosarcoma)를 웨스턴 블롯과 세포 침습능의 양성 대조군으로 이용하였다. 음성 대조군으로는 실험군에 사용된 celecoxib과 동량의 PBS를 투여한 각각의 세포주로 정하였다. 세포주는 세포 배양용 플라스크(80cm^2, Nunc, Denmark)를 사용하여 10% FBS, 1% 항생제(Gibco, USA)가 포함된 MEM(Minimum Essential Medium) 4ml로 37℃, 5% CO_2, 95% 상대습도 하에서 배양하였다.

2. 세포 증식능 검사 (MTT assay)

96 well plate에 5×10^4 cells/well 세포를 넣은 후 70-80% confluence에 이르렀을 때 celecoxib를 -2.5μM~12.5μM/12h로 적용하고 농도에 따른 항암 감수성을 측정하였다. 우선 PBS (pH 7.2)로 2회 세척한 후 잔여액은 피펫으로 제거하고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyltetrazolium bromide(MTT, Sigma Chemical Co., US)를 PBS에 2mg/ml이 되도록 녹인 후 각 well에 50μl씩 첨가하고 37℃, 5% CO_2 ,95% 상대 습도 하 배양기에서 4시간 동안 배양 후 MTT용액을 버리고 DMSO액을 넣어 용액을 균일하게 혼합 후 ELISA READER에서 파장 540nm로 흡광도를 측정하였다.

3. 세포침습능 평가 (*in vitro* invasion assay)

Matrigel® matrix가 도포된 9 mm 세포 배양 삽입판(cell culture inserts: pore size, 8 μm; Becton Dickinson, USA)을 24-well plate (Costar, USA)에 장착하고, well 당 5×10^{3}개의 세포를 삽입판의 상층에 산정하여, 비혈장(serum free) DMEM에서 2.5 μM의 농도로 12시간 동안 부란하였다. 대조군은 celecoxib첨가 없이 같은 배지에서 배양하였다. 인간 섬유세포육종 세포주 HT1080의 부란 배지 0.5 ml를 삽입판의 하층에 채워 화학주성제 (chemoattractant)로 사용하였다. 24 시간 부란 후, 상층에 남아있는 세포를 면봉으로 제거하고, 하층으로 통과한 세포의 수를 측정하기 위하여 5 % glutaraldehyde로 고정하고 hematoxylin으로 염색하여, 삽입판의 Matrigel® matrix와 각각의 8 μm 미세 소공을 통과한 세포의 총 수를 광학 현미경(×100)으로 관찰하였다.

4. Matrix metalloproteinase-2 발현 변화

2.5 μM의 농도로 12시간 동안 Celecoxib를 처리한 세포 배양 플라스크의 세포 증식도가 70%에 이른 시기에 단백 분해효소 및 인산효소 억제제를 함유한 RIPA buffer를 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질을 Bradford방법으로 정량 후 동량의 단백질을 SDS-PAGE 젤에서 전기 영동하였다. 젤에 영동된 단백질을 nitrocellulose 막에 흡착 후 5% BSA에서 3시간 동안 부란하고, MMP-2 일차 항체 용액에서 밤새 부란하였다. Tween 20을 함유한 TBS (Tris-buffered saline) 에서 2회 세척 후, TBS로 10분씩 2회 추가 세척하였다. Anti-mouse alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies 용액에서 2시간 동안 2차 항체 처리 후 다시 2회 TBS 세척하였다. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT, Promega, USA)를 이용하여 발색하였으며, 발현된 밴드를 BioRad scanning densitometer를 이용하여 정량하고 상대 분석하였다. HT1080 세포주를 양성 대조군으로, 정상 치은 섬유아세포를 음성 대조군으로 하였다. 단백질 발현도는 relative units (RU)로 표현하였으며, 100 RU를 음성 대조군 대비 양성 대조군 발현도로 임의로 정하였다.

Ⅲ. 결　　과

1. 세포주 증식능에 미치는 영향 (MTT assay)

흡광도를 % cytotoxicity로 환산하여 약물 농도에 대해 그래프로 나타낸 결과 celecoxib를 농도별로 투여한 KB 세포주 실험군에서는 celecoxib의 농도 10.0~12.5μM구간에서 증식능의 유의한 농도 의존성 감소를 보였다. 인간 골육종 세포주인 HT1080 역시 같은 농도구간에서 농도 의존성의 증식증의 감소 성향을 나타냈으나, 통계적 유의성은 없었다. 정상 세포군인 치은 점막세포 일차배양군의 경우, celecoxib의 농도에 따른 증식능의 변화는 유의하게 나타나지 않았으며, 매우 불규칙한 증식능 변화를 보였다. KB 실험군과 HT1080실험군간의 세포주간 증식능의 차이는 통계적 유의성을 보이지 않았으나 12.5μM 농도에서 KB 실험군과 정상세포군간 증식능의 유의한 차이가 나타났다(Fig. 1).

2. 세포 침습능 (*in vitro* invasion assay)

구강암 세포주인 KB 세포주에서 인공 기저막에 대한 세포 수준의 침습성의 평가 상 celecoxib에 의한 통계적으로 유의한 감소가 나타났다. Celecoxib 투여군에서 침습 세포가 95.3 ±8.7개임에 비하여, 대조군에서는 침습 세포가 343.7 ±27.4개로 나타났다(Fig. 2). HT1080에서는 침습도의 차이가 없었으며, 음성대조군에서는 세포침습능을 보이지 않았다.

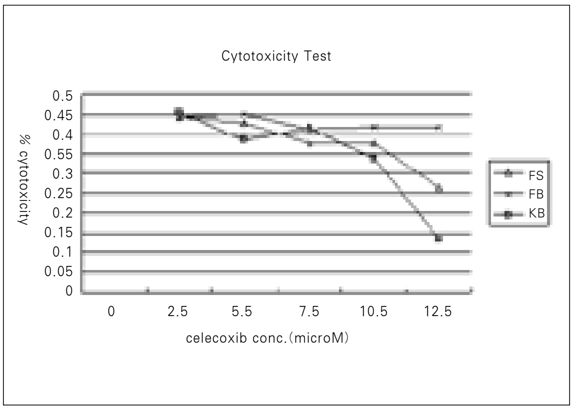

Fig. 1. MTT assay.
Celecoxib treated KB experimental group showed significant concentration dependent growth inhibition. (concentration range. 2.5~12.5 μM)
FS. human fibrosarcoma cell line, HT1080, FB. human fibroblast primary cultured cell.

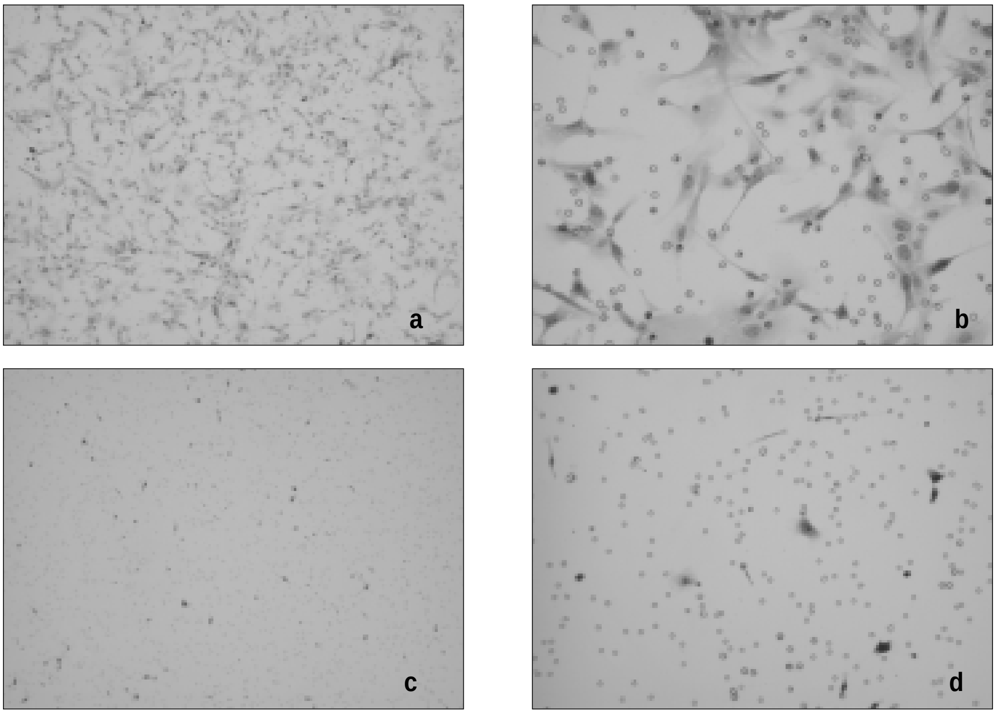

Fig. 2. *In vitro* invasion assay.
Celecoxib decreased invasion through the artificial cellular membrane (pore size 8 μm) in experimental cell group.
a. and b.: Control group (fibroblast)　　c. and d.: Experimental group (KB)

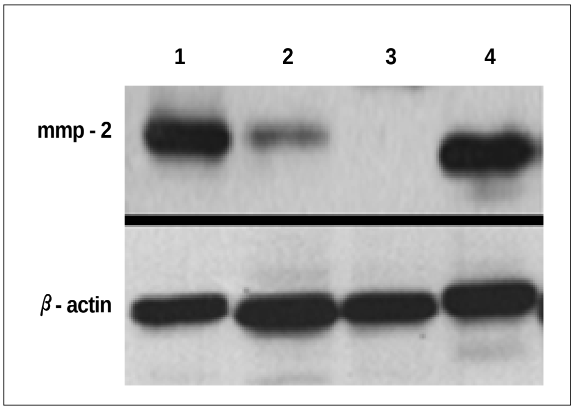

Fig. 3. Expression of matrix metalloproteinase -2. Western blotting results represented that no difference was detected between pre-drug treated group and post-drug treated group in KB cell line.
Lane1. KB control group
Lane2. KB experimental group
Lane3. negative control - Human Fibroblast cell
Lane4. positive control - Human Fibrosarcoma cell (HT-1080)

3. MMP-2의 발현 변화 (western blotting)

세포 침습능의 변화를 일으킨 유력한 단백분해효소의 발현도 변화인자로 평가하고자 한 MMP-2의 발현은 대조군과 실험군 간 차이가 나타나지 않았다(Fig. 3).실험의 house keeping gene으로 발현도를 평가한 β-actin은 모두 발현을 확인하였고, 양성대조군인 HT1080은 MMP-2발현을 확인하였고, 과 음성대조군의 경우, 발현을 확인할 수 없었다.

Ⅳ. 고　　찰

NSAIDs의 항암 및 암예방 효과 연구에 대한 관심은 1981년 쥐를 이용한 동물 실험에서 indomethacin이 대장 직장암의 발생을 억제하였다는 연구 결과가 Cancer Research에 보고된 후부터라고 할 수 있는데, 현재 NSAIDs에 관련된 항암 작용은 주로 암 예방 작용에 그 논점이 맞춰져 있다[6,8]. AOM (azoxymethane)으로 대장암이 유발된 실험 쥐에 ibuprofen, indomethacin, piroxicam, aspirin, sulindac등 여러 NSAIDs를 사용하여 종양 발생이 억제됨이 관찰되었고, 대장암 발생 유전자 조작을 하여 대장암 발생고 감수성 Apcmin mouse (APC gene knock-out multiple intestinal neoplasia mouse)에서 NSAID인 aspirin, piroxicam, sulindac이 암 형성을 억제함이 보고되었다[2]. 임상 역학 연구로서는 NSAID가 대장, 직장암의 발생 위험을 감소시킨다고 보고된 이후로 sulindac의 사용 후 수개월 내에 극적으로 FAP(familial adenomatous polyposis) 환자에 있어서 선종의 수와 크기를 의미 있게 감소시켰다는 보고와 매일 두 차례 150mg 경구 투여로 9개월 후에 용종의 수의 44%, 용종의 평균 직경의 35%가 감소되는 것이 보고되었으며, aspirin의 경우에도 비록 대장암 예방에 필요한 용량과 투여 기간은 정해지지 않았으나 최소한 9년 정도의 NSAID의 투여 시 대장 직장암의 위험성이 감소된다고 보고되었다[7,9]. NSAIDs의 암종 억제 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았지만 arachidonic acid 대사 과정 중 cox에 의해 eicosanoid 생산이 감소되고 이를 통해 강력한 세포간 신호 전달 물질인 prostaglandin (PGs)을 감소시켜 항암 작용을 나타낸다는 가설이 유력하다[5]. PGs은 세포의 부착과 증식, 그리고 전이을 조절하는 여러 신호전달체계 (signal transduction pathways) 에 영향을 끼치고 tumorigenesis에서의 apoptosis를 방해한다는 점에서 이러한 가설은 매우 유력할 것으로 보인다.

Cox는 두 개의 유전자가 클로닝 되었는데 그 중 Cox-2는 염증과 통증과 관계가 있는 것으로 항암작용은 Cox-2를 억제하여 발생하는 것으로 알려져 있다[7]. 연구에 의하면, 사람의 대장, 직장암 조직에서 Cox-2 mRNA 가 정상 조직에서는 증가하지는 않았지만 대장암 조직의 86%에서 증가되고 선종에서도 Cox-2 mRNA의 증가가 관찰되었다[2]. 또한 유전자 전이에 의해 Cox-2 발현이 증가된 rat 장 세포들이 butyrate 유도 세포 괴사에 훨씬 더 잘 저항하였으며 부가적인 불특정 Cox inhibitor인 sulindac sulfide에 의한 세포 괴사를 볼 수 있었다는 보고도 있었다[10]. 이러한 여러 연구를 통해 colon tumor promotion에서의 cox-2 대사물, 특히 PGE2의 역할은 중요한 것으로 판단된다. 결과적으로 이러한 일련의 연구를 통해 cox inhibitor의 대장, 직장암에서의 응용 가능성은 높은 것으로 알려졌으며, 이러한 보고에 고무된 타 영역의 암종 치료에 있어서 예를 들면, 유방암, 폐암과 같은 암종에 대한 cox-2 inhibitor를 이용한 예방 및 치료법으로서의 응용이 시도되고 있다[8,9,11-14]. 이는 구강암 영역에서도 NSAIDs의 항암, 화학 예방적 요법으로서의 가능성을 시사하지만, 현재 구강암 영역에서의 연구는 매우 미진한 상태였으며 최근의 연구를 통해서야 Cox-2 발현이 구강을 포함하여 두경부 편평세포 암종에서 증가되는 양상을 보였으며, 이와 같은 현상이 4NQO 에 의해 유도된 설치류 구강암 모델에서도 암 예방 효과를 보인 것으로 보고되었다[1,10]. 암 예방 효과 외에도 구강암 세포주 수준에서 NSAIDs가 세포사(apoptosis)를 유도하였다는 것이 보고된 바 있어 본 연구를 진행하는 계기가 되었다[4,10]. 우선적으로 시행한 세포사 효과를 MTT 방법을 이용하여 측정한 결과, celecoxib를 농도 별로 투여한 KB 세포주 실험군 에서는 celecoxib의 농도 10.0~12.5μM구간에서 증식능의 유의한 농도 의존성 감소를 보였다. 이는 명확한 celecoxib의 항암 효과를 입증하는 결과로 보였으나 악성도가 비교적 높은 인간 골육종 세포주인 HT1080의 경우, 농도 의존성의 증식능 감소 성향만을 보였을 뿐 각 농도군간의 통계적 유의성은 없었고 정상 세포군인 치은 점막세포 일차배양군의 경우, celecoxib의 농도에 따른 증식능의 변화는 유의하게 나타나지 않았으며, 매우 불규칙한 증식능 변화를 보여 전체적으로는 KB 세포주에 선택적으로 작용한다는 고무적인 결과를 보였으나 유효농도를 결정하기 위해서는 보다 심도 있는 연구가 더 진행되어

야 할 것이다.

본 연구에서는 cox-2 억제제로서 celecoxib를 사용하였는데, aspirin 이나 indomethacin과 같은 Cox-1 억제제는 위장 궤양과 같은 부작용이 있어 장기 복용의 가능성이 떨어지기 때문이다. Celecoxib와 같은 선택적 Cox-2 억제제는 항암작용에 직접적으로 관여하는 Cox-2만 방해하면서 Cox-1의 효과는 그대로 유지하는 이점이 있다고 생각되는데, 이미 설치류 대장암 모델에서 celecoxib가 소장과 대장에서 별다른 변화 없이 40%에서 49% 로 비정상적인 소낭선 병변 부의 암발생 과정을 방해하는 것이 발견되었으며, celecoxib가 대장암의 유병률을 낮추고 그 효과가 aspirin, ibuprofen, sulindac, piroxicam 과 관련된 이전의 연구들에서 보고된 것보다 훨씬 더 효과적이라고 보고되었다[3]. 또한 1500 ppm의 celecoxib를 장기적으로 복용하는 것은 체중 감소와 같은 독성을 지닌 부작용을 전혀 발생시키지 않았다고 보고되었으며, 내시경 연구에서 celecoxib 복용군과 위약군에서 위장관의 점막 손상 차이가 거의 보이지 않았다는 연구 결과는 celecoxib의 실제 임상적 적용 가능성 면에서 주목할 만한 일이다[5,10,11]. 또한 *in vitro* 에서 정상 세포의 성장에는 영향을 미치지 않고 celecoxib가 transformed enterocytes의 성장을 방해한다는 것도 보고되어 celecoxib는 매우 강력하면서도 독성이 적은 항암물질이라고 할 수 있다[4].

그 외에도 Cox-2의 종양 억제 기전으로 발암물질 활성화의 억제, 세포 증식의 억제, apoptosis의 유발, 면역 감시 기능의 강화 등이 제시되고 있어 본 연구에서는 celecoxib의 항침습 작용에 대한 평가를 시행하였다. *In vitro* invasion assay를 통해 celecoxib의 항침습 작용을 평가한 결과, 구강암 세포주인 KB 세포주에서 인공 기저막에 대한 세포 수준의 침습성의 평가 상 celecoxib에 의한 통계적으로 유의한 감소가 나타났다. 양성 대조군이었던 HT1080에서는 같은 농도의 약물 투여 전, 후 침습도의 차이가 없었는데, 이는 세포에 따라 celecoxib의 침습능 억제 유효 농도의 차이가 존재하거나 육종세포와 암종세포의 침습에 있어 생물학적 기전이 다를 수 있기 때문일 것으로 판단된다. 또한 세포 침습능의 변화를 일으킨 인자로 유력하게 보았던 MMP-2의 단백질 발현정도는 대조군과 실험군 간 차이가 나타나지 않아 celecoxib에 의한 항침습능이 MMP-2 pathway를 이용하지 않을 가능성이 높음을 시사하였다. 그러나 이의 검증을 위해서는 zymogram이나 northern blot을 이용한 민감도를 높인 평가 기법을 통해 확인하는 것이 필요하리라 생각된다. 최근 연구들은 celecoxib가 세포주기를 멈추게 함으로써 암세포 성장을 방해한다는 가설 및 두경부 암세포주에서 celecoxib에 의해 p27이 많이 발현되었다고 하여 celecoxib가 세포주기 정지를 유도한다는 것이 제시되었는데[15], 이러한 결과와 본 연구 결과를 토대로 선택적 Cox-2 inhibitor인 celecoxib가 암발현 시기를 늦추는 화학적 암예방 물질로서의 기능과 이미 암의 형질을 가진 경우에라도 암세포 사멸과 암종 세포의 침습능을 약화시키는 적극적 항암물질로서의 가능성을 가지고 있다고 판단한다. 한편, 부분적이지만 celecoxib에 의한 항혈관생성 작용이 보고되고 있는데, 동물 모델에서 celecoxib는 효과적인 종양 혈관생성 억제 효과를 보였으며, Rat corneal 모델에서 Cox-2는 모세혈관의 수와 길이를 80% 정도까지 감소를 일으켰다고 보고되어[16,17] 항신생혈관인자로서의 항암 능력을 측정 연구하는 것도 향후 celecoxib 관련 암 연구의 주요 주제가 될 수 있으리라 판단된다.

참고문헌

1. Park SW, Lee SG, Song SH, Heo DS, Park BJ, Lee DW, Kim KH, Sung MW: The effect of nitric oxide on cyclooxygenase-2 (COX-2) overexpression in head and neck cancer cell lines. Int J Cancer 2003;107:729-738.
2. Swamy MV, Cooma I, Patlolla JM, Simi B, Reddy BS, Rao CV: Modulation of cyclooxygenase-2 activities by the combined action of celecoxib and decosahexaenoic acid: novel strategies for colon cancer prevention and treatment. Mol Cancer Ther 2004;3:215-221.
3. Wei M, Morimura K, Wanibuchi H, Shen J, Doi K, Mitsuhashi M, Moku M, Salim EI, Fukushima S: Chemopreventive effect of JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. Cancer Lett 2003;202:11-16.
4. Wu J, Xia HH, Tu SP, Fan DM, Lin MC, Kung HF, Lam SK, Wong BC: 15-Lipoxygenase-1 mediates cyclooxygenase-2 inhibitor-induced apoptosis in gastric cancer. Carcinogenesis 2003;24:243-247.
5. Kawamori T, Uchiya N, Kitamura T, Ohuchida S, Yamamoto H, Maruyama T, Sugimura T, Wakabayashi K: Evaluation of a selective prostaglandin E receptor EP1 antagonist for potential properties in colon carcinogenesis. Anticancer Res 2001;21:3865-3869.
6. Kismet K, Akay MT, Abbasoglu O, Ercan A: Celecoxib: a potent cyclooxygenase-2 inhibitor in cancer prevention. Cancer Detect Prev 2004;28:127-142.
7. Kitamura T, Itoh M, Noda T, Matsuura M, Wakabayashi K: Combined effects of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selective inhibitors on intestinal tumorigenesis in adenomatous polyposis coli gene knockout mice. Int J Cancer 2004;109:576-580
8. Badawi AF, Eldeen MB, Liu Y, Ross EA, Badr MZ: Inhibition of rat mammary gland carcinogenesis by simultaneous targeting of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. Cancer Res 2004;64:1181-1189.
9. Abou-Issa HM, Alshafie GA, Seibert K, Koki AT, Masferrer JL, Harris RE: Dose-response effects of the COX-2 inhibitor, celecoxib, on the chemoprevention of mammary carcinogenesis. Anticancer Res 2001;21:3425-3432.
10. Yoshida K, Tanaka T, Kohno H, Sakata K, Kawamori T, Mori H, Wakabayashi K: A COX-2 inhibitor, nimesulide, inhibits chemically-induced rat tongue carcinogenesis through suppression of cell proliferation activity and COX-2 and iNOS expression. Histol Histopathol 2003;18:39-48.
11. Furukawa F, Nishikawa A, Lee IS, Kanki K, Umemura T, Okazaki K, Kawamori T, Wakabayashi K, Hirose M: A cyclooxygenase-2 inhibitor, nimesulide, inhibits postinitiation phase of N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced pancreatic carcinogenesis in hamsters. Int J Cancer 2003;104:269-273
12. Carlton PS, Gopalakrishnan R, Gupta A, Liston BW, Habib S, Morse MA, Stoner GD: Piroxicam is an ineffective inhibitor of N-nitrosomethylbenzylamine-induced tumorigenesis in the rat esophagus. Cancer Res 2002;62:4376-4382.
13. Badawi AF, Badr MZ: Chemoprevention of breast cancer by targeting cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (Review). Int J Oncol 2002;20:1109-1122. Review.
14. Buttar NS, Wang KK, Leontovich O, Westcott JY, Pacifico RJ, Anderson MA, Krishnadath KK, Lutzke LS, Burgart LJ:

Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma by COX-2 inhibitors in an animal model of Barrett's esophagus. Gastroenterology 2002;122:1101-1112.
15. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Yamaji T, Loda M, Fuchs CS: Loss of nuclear p27 (CDKN1B/KIP1) in colorectal cancer is correlated with microsatellite instability and CIMP. Mod Pathol 2007; 20:15-22.
16. Soo R, Wu J, Aggarwal A, Tao Q, Hsieh W, Putti T, Tan K, Soon W, Lai Y, Mow B, Hsu S, Loh K, Tan L, Tan P, Goh BC: Celecoxib reduces microvessel density in patients treated with nasopharyngeal carcinoma and induces changes in gene expression. Ann Oncol 2006;17:1625-1630.
17. Gately S, Kerbel R: Therapeutic potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in the management of tumor angiogenesis. Prog Exp Tumor Res 2003;37:179-192. Review.