

암대극 추출물의 화장품 원료로서의 특성

이 대 우[†] · 김 영 진 · 김 영 실 · 엄 상 용 · 김 증 현

(주)참존 기술원 응용연구소
(2007년 11월 20일 접수, 2007년 12월 3일 채택)

Application as a Cosmeceutical Ingredient of Extract from *Euphorbia jolkini*

Dae Woo Lee[†], Young Jin Kim, Young Sil Kim, Sang Yong Eom, and Jong Heon Kim

R&D Center, Charmzone, 1720-1 Taejang 2-dong, Wonju-si, Kangwon-do 220-962, Korea

(Received November 20, 2007; Accepted December 3, 2005)

요약: 본 연구는 암대극 추출물의 화장품 원료로서의 특성을 알아보기 위하여 항산화, 미백 및 항염 효과와 관련된 다양한 실험을 실시하였다. 암대극 70% 메탄올 추출물은 MPLC를 사용하여 5개의 분획들로 분리하였다. 1번과 5번 분획에서 항산화(Mn-SOD 생성 억제), 미백(세포 내 멜라닌 생성 억제) 그리고 항염(IL-1 α , IL-6, COX-2, Total NO 생성 억제)효과를 나타내었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, 암대극 추출물은 화장품 원료로서의 개발이 기대된다.

Abstract: In this study, we evaluate anti-oxidation, whitening and anti-inflammatory efficacies of *Euphorbia jolkini* extract for application as a cosmeceutical ingredient. We separated 5 fractions from *Euphorbia jolkini* extract (70% MeOH) by MPLC. First and 5th fractions showed a suppressive effect on Mn-SOD synthesis in the normal human fibroblasts. They inhibited melanogenesis in the B16-F10 melanoma cells. Furthermore, 1st and 5th fractions reduced the amounts of IL-1 α , IL-6, COX-2 and total NO secreted from the normal human fibroblasts. These results suggest that *Euphorbia jolkini* extract may be used as an active ingredient in cosmetics.

Keywords: *Euphorbia jolkini*, whitening, anti-inflammation, IL-1 α , IL-6

1. 서 론

암대극(*Euphorbia jolkini*)은 대극과의 여러해살이풀로 갯바위 대극이라고도 하며, 제주, 전남 및 경남의 해안가에 분포한다[1]. 암대극의 잎과 줄기는 예로부터 한방에서 약대극(約·大戟)이라는 약재로 사용되었는데 주로 사지 동통과 타박상, 감기로 인한 해수, 소화 불량에 효과가 있다고 알려졌다. 한방과 민간에서 전초를 풍습, 건선, 사독, 통경, 이뇨, 발한, 부종, 창종, 치통, 부인혈맥, 당뇨, 임질 등의 치료제로 이용하였고, 독성이 있는 유독성식물로 사용에 주의를 요하고 있다[2]. 성분으로는 jolkianin[3], jolkinol A ~ D[4], jolkinolide A, B[5], C, E[6] 등이 보고되었다.

본 연구에서는 다양한 천연물을 대상으로 실시한 전 실험(스크리닝)에서 주목할만한 효과를 나타낸 시료들을

선별하였고, 그 중 하나인 암대극의 화장품 원료로서의 특성을 알아보기 위하여 항산화(Mn-SOD 생성 억제), 미백(세포 내 멜라닌 생성 억제) 및 항염(IL-1 α , IL-6, COX-2, total NO 생성 억제) 효과를 측정하는 다양한 실험을 실시하였고, 화장품 원료로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료 및 기기

본 실험에 사용한 암대극은 2005년 6월 제주도에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 시약으로는 potassium phosphate (mono-basic, di-basic), fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), trypsin-EDTA solution, hydrogen peroxide (H₂O₂), Ham's F-12 (Nutrient Mixture F-12 Ham), dimethyl sulfoxide

[†] 주 저자 (e-mail: leedw@charmzone.co.kr)

(DMSO), phosphate buffered saline (PBS) solution은 Sigma (USA)사의 제품을, human IL-1 α ELISA Kit, human IL-6 ELISA Kit는 Endogen (USA)사의 제품을, COX-II ELISA Kit, total NO (nitric oxide) ELISA kit, Mn-SOD ELISA kit는 Assay Designs (USA & Canada)사의 제품을, medium pressure liquid chromatography (MPLC)를 이용한 크로마토그래피에 사용한 Silicagel 60 (230 ~ 400 mesh)은 Merck (USA)사의 제품을, 용매는 덕산화학(Korea)과 Fisher (USA)사의 제품을 사용하였다. Human normal fibroblasts는 MTT (Korea)사에서, B16-F10 melanocyte는 ATCC에서 분양받아 사용하였다. 실험에 사용한 기기로는 aspirator (EYELA, Japan), evaporator (EYELA, Japan and BUCHI, Switzerland), MPLC (BUCHI, Switzerland), ELISA reader (Molecular Devices, USA)를 사용하였다.

2.2. 추출 및 분리

암대극 100 g을 3 L의 70 % 메탄올의 조건으로 실온에서 일주일 동안 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman, No.2, England)와 흡입기를 사용하여 감압여과한 후, 회전진공농축기를 이용하여 농축하였다. 농축된 추출물은 동결건조장치(freeze dryer, EYELA, Japan)를 사용하여 분말로 만들어 보관 및 실험에 사용하였다. 70 % 메탄올 추출물 4 g을 메탄올 20 mL로 용해시킨 후 주사 여과(syringe filter, Sartorius, German)를 사용하여 여과한 후, 충전제(silicagel, 230 ~ 400 mesh, Merck, USA)와 medium pressure liquid chromatography (MPLC)를 사용하여 실험을 진행하였다. 실험에 사용한 용매조건은 각 용매의 극성 순서대로 hexane, hexane과 ethylacetate 혼합용액, ethylacetate, ethylacetate와 methyl alcohol 혼합용액, methyl alcohol의 순으로 용매를 변화시켜가면서 전개하여 5개의 분획으로 분리하였다. 이들 5개의 분획들 각각에 대한 효능 평가를 실시하였다.

2.3. 항산화 효과

2.3.1. Mn-SOD 생성 억제 효과 실험

DMEM과 Ham's F-12 media를 3 : 1의 비율로 섞은 뒤 FBS를 10 % 농도로 첨가한 배양액에서 human normal fibroblasts를 배양하였다. Fibroblasts를 12-well plate에 분주한 후 24 h 동안 배양한다. 그 후 2×10^{-4} M의 H₂O₂를 대조군을 제외한 모든 well에 처리한다. 8 h 후 배양액을 교환 해주며 암대극 추출 분획을 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 상등액을 취하여 배양액 중으로 유리된 Mn-SOD를 ELISA kit로 정량한다.

2.4. 미백 효과

2.4.1. 세포 내 멜라닌 생성 억제 효과 실험

10 % FBS가 함유된 DMEM에 배양하던 B16-F10 melanoma cell을 2×10^4 cells/well의 밀도로 6 well에 분주한 후 5 % CO₂, 37 °C 조건하에서 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 10 % FBS, 0.2 mM theophylline이 함유된 DMEM에 농도별로 희석한 시료를 각각 첨가하고 나서, 세포가 약 80 % 이상 될 때까지 배양하였다. PBS로 세척하고 trypsin으로 처리하여 세포 pellet을 회수하였다. 회수된 pellet을 1.5 mL Eppendorf tube로 옮겨 5000 rpm으로 10 min 동안 원심 분리한 후 상등액을 제거하였다. 상등액이 제거된 pellet을 60 °C 항온기에서 24 h 동안 건조시킨 후 1 N NaOH를 첨가하여 세포 내의 melanin을 용해시켰다. 용해된 melanin을 PBS로 적당량 희석, ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정 후 melanin 생성 저해율(%)을 계산하였다.

2.5. 항염 효과

2.5.1. IL-1 α 생성 억제 효과 실험

DMEM 과 Ham's F-12 media를 3 : 1의 비율로 조성하고 FBS를 10 % 농도의 배양액에서 human normal fibroblasts를 배양하였다. Fibroblast를 12-well plate에 분주 한 후 24 h 동안 배양한다. 그 후 2×10^{-4} M의 H₂O₂를 N. control를 제외한 모든 well에 처리한다. 8 h 후 배양액을 교환 해주며 암대극 추출 분획을 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 이 중 배양 상등액을 취하여 배양액 중으로 유리된 IL-1 α 를 ELISA kit로 정량한다.

2.5.2. IL-6 생성 억제 효과 실험

DMEM 과 Ham's F-12 media를 3 : 1의 비율로 조성하고 FBS를 10 % 농도의 배양액에서 human normal fibroblasts를 배양하였다. Fibroblast를 12-well plate에 분주 한 후 24 h 동안 배양한다. 그 후 2×10^{-4} M의 H₂O₂를 N. control를 제외한 모든 well에 처리한다. 8 h 후 배양액을 교환 해주며 암대극 추출 분획을 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 이 중 배양 상등액을 취하여 배양액 중으로 유리 된 IL-6를 ELISA kit로 정량한다.

2.5.3. COX-II 생성 억제 효과 실험

DMEM 과 Ham's F-12 media를 3 : 1의 비율로 조성하고 FBS를 10 % 농도의 배양액에서 human normal fibroblasts를 배양하였다. Fibroblast를 12-well plate에 분주 한 후 24 h 동안 배양한다. 그 후 2×10^{-4} M의 H₂O₂를 N. control를 제외한 모든 well에 처리한다. 8 h

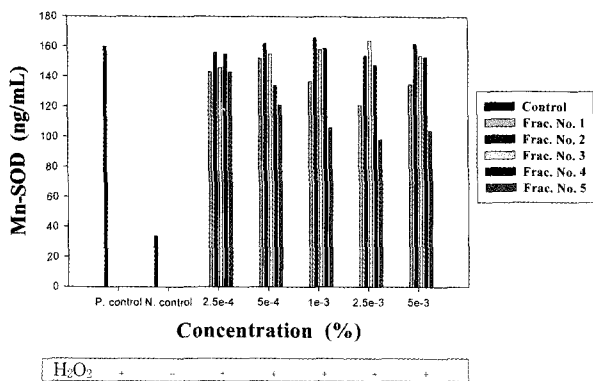


Figure 1. Effect of MPLC fractions from *Euphorbia jolkini* on H₂O₂ induced Mn-SOD in human fibroblast cell. N. control: negative control (H₂O₂ -), P. control: positive control (H₂O₂ +).

후 배양액을 교환 해주며 암대극 추출 분획을 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 이 중 배양 상등액을 취하여 배양액 중으로 유리된 COX-II를 ELISA kit로 정량한다.

2.5.4. Total NO (Nitric Oxide) 생성 억제 효과 실험

DMEM과 Ham's F-12 media를 3 : 1의 비율로 조성하고 FBS를 10 % 농도의 배양액에서 human normal fibroblasts를 배양하였다. Fibroblast를 12-well plate에 분주 한 후 24 h 동안 배양한다. 그 후 2 × 10⁻⁴ M의 H₂O₂를 N. control를 제외한 모든 well에 처리한다. 8 h 후 배양액을 교환 해주며 암대극 추출 분획을 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 이 중 배양 상등액을 취하여 배양액 중으로 유리된 total NO를 ELISA kit로 정량한다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항산화 효과

3.1.1. Mn-SOD 생성 억제 효과

라디칼들은 생체 내에서 항산화 효소인 Mn-SOD의 활성을 증가시키는데, 라디칼을 적절히 제거할 수 있는 항산화물질이 존재하면 Mn-SOD의 활성은 정상 수준으로 회복된다[7]. 산화적 스트레스에 의한 Mn-SOD 활성 증가에 암대극 추출물이 어떠한 영향을 미치는지 관찰하였다. 1번과 5번 분획은 실험한 모든 농도에서 Mn-SOD 생성을 억제하는 효과를 나타내었다. 1번 분획은 10 ~ 20 %까지, 5번 분획은 10 ~ 40 %까지 Mn-SOD 생성을 억제하는 것으로 확인되었다. 1번과 5번 분획의 Mn-SOD 생성 억제 효과는 농도 의존적인 경향을 보였다. 나머지 세 개의 분획들(2번, 3번 그리고 4번)은 효과를 나타내지 않았다(Figure 1).

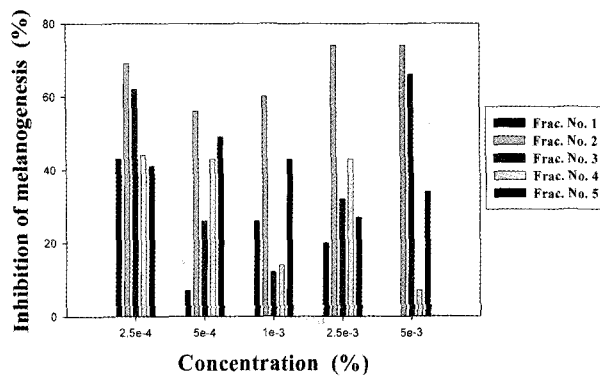


Figure 2. Inhibitory effect of MPLC fractions from *Euphorbia jolkini* on melanogenesis in B16-F10 melanoma cell.

3.2. 미백 효과

3.2.1. 세포 내 멜라닌 생성 억제 효과

5개 분획들 모두 세포 내 멜라닌 생성 억제 효과를 나타내었다. 1번 분획은 0 ~ 40 %, 2번 분획은 50 ~ 70 %, 3번 분획은 10 ~ 60 %, 4번 분획은 10 ~ 40 % 그리고 5번 분획은 30 ~ 50 %까지 멜라닌 생성을 억제하였다. 저농도인 0.00025 %의 농도에서 5개 분획들 모두 40 % 이상의 세포 내 멜라닌 생성 억제 효과를 나타내었다. 2번 분획은 농도에 관계없이 모든 농도에서 50 % 이상의 강한 효과를 나타내었다(Figure 2).

3.3. 항염 효과

3.3.1. IL-1α 생성 억제 효과

IL-1은 활성화된 대식세포로부터 생성되는 염증 매개성 사이토카인이다. IL-1은 두 개의 유전자 산물인 IL-1α와 IL-1β가 있다. IL-1α는 전염증성조절인자(pro-inflammatory mediator)로 작용하는 세포 간 신호물질(사이토카인)로, 피부가 자극성 물질에 노출되었을 때, 염증 반응의 일환으로 대식세포, 단핵세포 등의 진입을 유도하기 위하여 각질형성세포, 섬유아세포 등이 생산한다[8]. 피부 이상 반응을 유발하는 인자에는 화학물질, 세정제, 자외선 등 많은 요소들이 있으며, 피부 보호 작용을 평가하기 위하여 인위적으로 IL-1α의 생성을 유도시킨 후 암대극 추출물이 IL-1α의 생성을 억제하는지를 측정하였다. 1번과 5번 분획들이 IL-1α 생성 억제 효과를 나타내었다. 1번 분획은 10 ~ 30 %, 5번 분획은 1번 분획보다 강한 30 ~ 40 %의 억제 효과를 나타내었다. 1번과 5번 분획 모두 농도에 관계없이 모든 농도에서 유사한 효과를 나타내었다. 나머지 세 개의 분획들(2번, 3번 그리고 4번)은 효과를 나타내지 않았다(Figure 3).

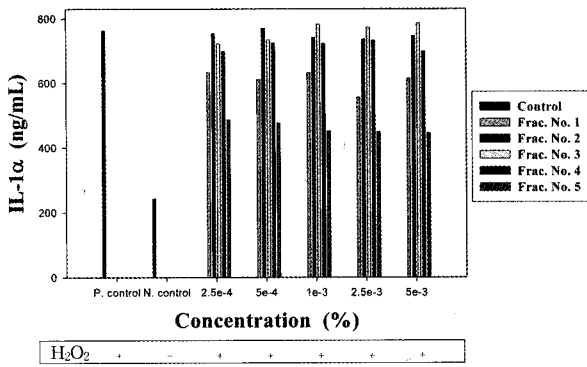


Figure 3. Effect of MPLC fractions from *Euphorbia jolkini* on H₂O₂ induced IL-1 α in human fibroblast cell. N. control: negative control (H₂O₂ -), P. control: positive control (H₂O₂ +).

3.3.2. IL-6 생성 억제 효과

IL-6는 감염과 조직 손상에 따른 생체의 주요한 반응 매개물질로서, 23 ~ 30 kD의 다양한 크기를 갖는 인산화 당단백 폴리펩타이드이다. IL-6 유전자 발현은 TNF- α , IL-1, IFN과 같은 다양한 염증반응성 매개물질에 의해 자극된다. 일반적으로 IL-6은 섬유세포, 단핵세포, 대식세포, 내피세포, 각질세포, 자궁 내막 간질세포에서 생성되어 급성 염증 반응을 촉진하거나 억제시키는 것으로 알려져 있다[9,10]. 1번과 5번 분획들이 IL-6 생성 억제 효과를 나타내었다. 1번 분획은 5 ~ 20 %, 5번 분획은 1번 분획보다 강한 10 ~ 25 %의 억제 효과를 나타내었다. 1번과 5번 분획 모두 강한 효과를 나타내지는 않았으나, 농도가 증가할수록 효과도 증가하는 농도 의존적인 모습을 나타내었다. 나머지 세 개의 분획들(2번, 3번 그리고 4번)은 효과를 나타내지 않았다(Figure 4).

3.3.3. COX-II 생성 억제 효과

Prooxidant나 proinflammatory stimuli에 의한 NF- κ B의 활성화는 COX-2의 발현 증가를 유도하고 이것은 다시 prostaglandin 합성을 증가시켜 염증반응을 매개한다 [11,12]. 1번과 5번 분획들이 COX-II 생성 억제 효과를 나타내었다. 1번 분획은 5 ~ 15 %, 5번 분획은 1번 분획보다 강한 10 ~ 20 %의 억제 효과를 나타내었다. 1번과 5번 분획 모두 강한 효과를 나타내지는 않았으나, 농도가 증가할수록 효과도 증가하는 농도 의존적인 모습을 나타내었다. 나머지 세 개의 분획들(2번, 3번 그리고 4번)은 효과를 나타내지 않았다(Figure 5).

3.3.4. Total NO (Nitric Oxide) 생성 억제 효과

Nitric oxide (NO)는 무기 저분자 라디칼로서 신경전달 기능, 혈액응고 및 혈압 조절 기능, 암세포에 대항하는 면

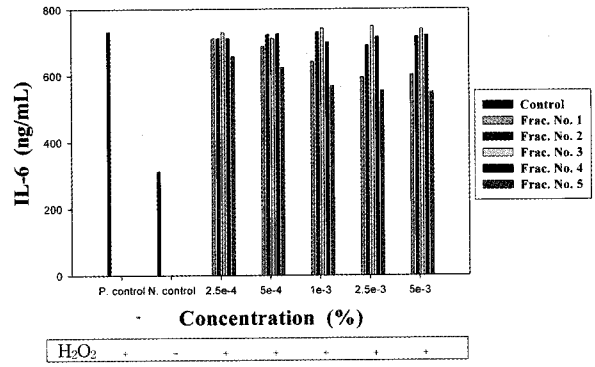


Figure 4. Effect of MPLC fractions from *Euphorbia jolkini* on H₂O₂ induced IL-6 in human fibroblast cell. N. control: negative control (H₂O₂ -), P. control: positive control (H₂O₂ +).

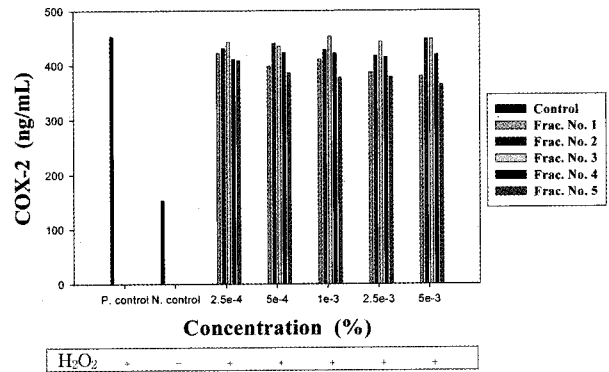


Figure 5. Effect of MPLC fractions from *Euphorbia jolkini* on H₂O₂ induced COX-II in human fibroblast cell. N. control: negative control (H₂O₂ -), P. control: positive control (H₂O₂ +).

역 기능 등의 역할이 알려져 있으며, nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 합성된다. NOS는 정상적인 상황에서 생리적인 역할을 담당하는 constitutive NOS (cNOS)와 병리학적인 상황에서 유도되는 inducible NOS (iNOS)의 두 가지 형태로 크게 분류된다[13,14]. iNOS는 원충, 세균이나 암세포를 사멸시키기 위한 숙주의 방어기전으로 다량의 NO를 만들어내지만 정상 농도의 수천 배에 달하는 NO는 오히려 자가 면역질환이나 만성염증의 원인이 되기도 한다[15]. 과량의 NO는 cyclooxygenase (COX)의 활성을 촉진시켜[16], prostaglandin 등의 생합성을 유도하여 염증반응을 심화시키고 [17], 패혈증 환자에게서 septic shock를 일으키는 것으로 보고되었다[18]. 또한 NO는 superoxide 음이온(O₂⁻)와 쉽게 반응하여 매우 반응성이 높고 독성이 강한 산화제인 peroxynitrite (ONOO⁻)를 생성한다[19]. 1번과 5번 분획들

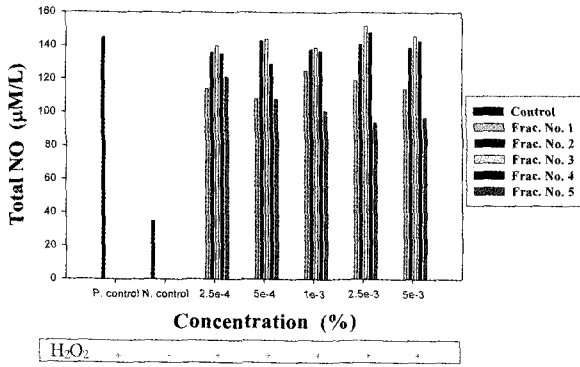


Figure 6. Effect of MPLC fractions from *Euphorbia jolkini* on H₂O₂ induced Total-NO in human fibroblast cell. N. control: negative control (H₂O₂ -), P. control: positive control (H₂O₂ +).

이 total NO (nitric oxide) 생성 억제 효과를 나타내었다. 1번 분획은 10 ~ 25 %, 5번 분획은 1번 분획보다 강한 15 ~ 35 %의 억제 효과를 나타내었다. 1번 분획은 농도에 관계없이 10 ~ 25 %의 효과를 나타내었으나, 5번 분획은 농도가 증가할수록 효과도 증가하는 농도 의존적인 모습을 나타내었다. 나머지 세 개의 분획들(2번, 3번 그리고 4번)은 효과를 나타내지 않았다(Figure 6).

4. 결 론

본 연구에서는 암대극 추출물의 화장품 원료로서의 특성을 알아보기 위하여 항산화, 미백 및 항염 효과에 대한 평가를 진행하였다.

암대극을 70 % 메탄올로 추출하여 농축한 후, 크로마토그래피 방법 중 하나인 MPLC를 이용하여 5개의 분획들로 분리하였다. 각각의 분획들을 대상으로 항산화(Mn-SOD 생성 억제), 미백(세포 내 멜라닌 생성 억제) 및 항염(IL-1 α , IL-6, COX-II 그리고 total NO 생성 억제) 효과에 대한 실험을 실시하였다.

효능 실험 결과를 간단히 요약하면, 1번과 5번 분획이 항산화(Mn-SOD 생성 억제), 미백(세포 내 멜라닌 생성 억제) 그리고 항염(IL-1 α , IL-6, COX-II, total NO 생성 억제) 효과를 모두 나타내었다. 5번 분획이 1번 분획과 비교하여 모든 실험(항산화, 미백 그리고 항염)에서 강한 효과를 나타내었다. 2번 분획은 미백(세포 내 멜라닌 생성 억제) 효과 실험에서 가장 강한 효과를 나타내었으나, 항산화 및 항염 실험에서는 전혀 효과를 나타내지 않았다. 나머지 2개 분획(2번과 4번)들은 미백(세포 내 멜라닌 생성 억제) 효과 실험에서 약한 효과를 나타내었고, 항산화 및 항염 실험에서는 전혀 효과를 나타내지 않았다.

위의 결과를 토대로 암대극 추출물로부터 분리한 5개

의 분획들 중에서 2개 분획(1번과 5번)은 항산화(Mn-SOD 생성 억제), 미백(세포 내 멜라닌 생성 억제) 그리고 항염(IL-1 α , IL-6, COX-II 그리고 total NO 생성 억제) 효과 모두에서 우수한 효과를 나타내는 것을 확인하였고, 이 중 5번 분획이 1번 분획과 비교하여 더욱 강한 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. 1번과 5번 분획들로부터 활성 성분 분리 및 성분 물질 구조 확인 등에 대한 보다 다양한 추가 실험 및 연구가 필요하다고 사료된다.

이번 연구로 암대극 추출물이 항산화, 미백 그리고 항염 효과를 가진 기능성 화장품 원료로 개발이 가능할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. K. H. Bae, Medicinal plants in Korea, Kyohaksa, Seoul (2000).
2. T. J. Kim, Resource plants in Korea, Seoul National Univ., Seoul (1996).
3. T. Jia, K. Koike, T. Nikaido, T. Ohmoto, and M. Ni. Triterpenoid saponins from *Ardisia crenata* and their inhibitory activity on cAMP phosphodiesterase, *Chem. Pharm. Bull.*, **42**(11), 2309 (1994).
4. K. Koike, Z. Jia, S. Ohura, S. Mochida, and T. Nikaido. Minor triterpenoid saponins from *Ardisia crenata*, *Chem. Pharm. Bull.*, **47**(3), 434 (1999).
5. Z. Jia, K. Koike, T. Ohmoto, and M. Ni. Triterpenoid saponins from *Ardisia crenata*, *Phytochemistry*, **37**(5), 1389 (1994).
6. W. Maotian, G. Xiongtai, H. Xiuwen, and H. Shanghai. A new triterpenoid saponin from *Ardisia crenata*, *Planta Med.*, **58**, 205 (1992).
7. O. R. Koch, G. Pani, S. Borrello, R. Colavitti, A. Cravero, S. Farre, and T. Galeotti, Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury, *Molecular Aspects of Medicine*, **25**, 191 (2004).
8. J. S. Oh, G. Y. Im, J. Teong, H. C. Lee, and S. S. Chung, Effect of steroid hormone on the expression of cytokine genes in the peritoneal macrophages of mouse, *J. Korean Cancer Assoc.*, **26**, 607 (1994).
9. R. Romero, C. Avila, U. Santhanam, and P. B. Sehagal, Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor-associated with infractional, *J. Clin. Invest.*, **85**, 1392 (1990).
10. T. Kishimoto, The biology of interleukin 6, *Blood*, **74**, 1 (1989).

11. Y. J. Surh, Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review, *Food Chem. Toxicol.*, **40**(8), 1091 (2002).
12. Y. J. Surh, K. S. Chun, H. H. Cha, S. S. Han, Y. S. Keum, K. K. Park, and S. S. Lee, Molecular mechanism underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation, *Mutat. Re.*, **480**, 243 (2001).
13. L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, and G. Chaudhuri, Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 9265 (1987).
14. J. A. Angus and T. M. Cocks, Endothelium-derived relaxing factor, *Pharmacol. The.*, **41**, 303 (1989).
15. J. Pfeilschifter, W. Eberhardt, R. Hummel, D. Kunz, H. Muhl, D. Nitsch, C. Pluss, and G. Walker, Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase potential for a novel class of anti-inflammatory agents, *Cell Biol. Int.*, **20**, 51 (1996).
16. D. Salvemini, T. P. Misko, J. L. Masferrer, K. Seibert, M. G. Currie, and P. Needleman, Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 7240 (1993).
17. N. McCartcy-Francis, J. B. Allen, D. E. Mizel, J. E. Albina, Q. W. Xie, C. F. Nathan, and S. M. Wahl, Suppression of arthritis by and inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.*, **178**, 749 (1993).
18. T. A. Wolfe and J. F. Dasta, Use of nitric oxide synthase inhibitors as a novel treatment for septic shock. *Ann. Pharmacother.*, **29**, 36 (1995).
19. R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush, and B. A. Freeman, Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4244 (1991).