

Carrageenin으로 처치한 흰쥐 발 염증에서 Indomethacin에 의한 유도성 nitric oxide synthase의 발현증가

원혜영 · 강건욱 · 김영미* · 김낙두[†]

서울대학교 약학대학, *국립보건원 특수 질환부 대사질환과

(Received February 18, 1999)

Potentiation of Inducible Nitric Oxide Expression by Indomethacin in Carageenin-treated Rat Paw Inflammation

Hye Young Won, Keon Wook Kang, Young Mi Kim Pak* and Nak Doo Kim[†]

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*Division of Metabolic Disease, Department of Biomedical Sciences,
National Institute of Health, Seoul 122-701, Korea

Abstract—Present study was aimed to examine whether indomethacin affected the production of NO in the rat paw exudate by carrageenin. Paw edema and nitrite/nitrate levels in the paw exudate were maximal after 4 h and remained elevated up to 10 h, whereas indomethacin (10 mg/kg, po) significantly inhibited the carrageenin-induced paw edema and levels of nitrite/nitrate in the paw exudate. However, paw edema and nitrite/nitrate levels were increased thereafter for 10 h. Indomethacin also enhanced the expression of iNOS mRNA and protein 4 h after carrageenin injection. Indomethacin inhibited the level of PGE₂ in the paw exudate in a time-dependent manner. These results suggest the possibility that indomethacin may potentiate expression of iNOS and subsequently increase nitrite/nitrate level in the late phase of carrageenin-induced rat paw inflammation possibly by suppressing cyclooxygenase activity.

Keywords □ Nitric oxide, inducible nitric oxide synthase, indomethacin, prostaglandin E₂, carrageenin, paw edema.

Carrageenin에 의한 염증 유발은 조직손상이 있는 국소부위에서 홍반, 부종, 통증을 유발하며 국소부위에 축적된 부종액을 측정하여 염증 반응의 지표로 하고있다.¹⁾ 염증반응에 여러 염증매개 물질 중 nitric oxide (NO)와 prostaglandin류가 관여하는 것으로 알려져있다. 만성 육아종성 염증, carrageenin-유도성 흰쥐 흉막염, carrageenin-유도성 흰쥐 발부종 등 여러 염증에서는 이들 염증 매개물질을 생성하는 효소인 nitric oxide synthase(NOS)와 cyclooxygenase(COX)가 발현되었다.^{2,4)}

NOS에는 두 가지 isoform이 있으며 구형형인 cNOS는 내피세포 및 소뇌 뉴런에서 나타나며 그 활성을 위해 Ca²⁺/Calmodulin이 필요하다.^{5,7)} Cytokine이나 lipopolysaccharide에 의해 유도되는 이성체인 inducible nitric oxide synthase(iNOS)는 대식세포, 혈관 평활근세포, 섬유아세포 등에서 발현된다.⁸⁾ iNOS는 다량의 NO를 생성하여 중앙 세포, 외부에서 침입한 세균이나 진균등의 미생물에 대해 살멸작용을 나타내며⁹⁻¹¹⁾ 또한 패혈성 쇼크, 염증 및 면역학적 요인에 의한 질병에 관여한다.^{12,13)} carrageenin에 의해 국소에서 생성되는 NO는 혈관 투과성을 증가 시켜 부종을 형성하는데 중요한 역할을 하며, NOS억제제인 N^G-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME), N^G-Monomethyl-L-argini-

[†] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-880-7840 (팩스) 02-872-1795

ne(L-NMMA), aminoguanidine, N-iminoethyl lysine 등은 이 부종억제에 효과가 있다.¹⁴⁾

Prostaglandin류는 arachidonic acid로부터 cyclooxygenase(COX)에 의해 생성되는 강력한 염증 매개 물질이다. Arachidonic acid는 prostaglandin G₂ (PGG₂)로 변하고 곧 PGH₂로 전환된 후 cyclooxygenase 경로를 통해 대사된다.¹⁵⁾ COX에는 구성형인 COX-1과 cytokine 또는 lipopolysaccharide에 의해 유도되는 COX-2가 알려져 있다.¹⁶⁾ COX-1은 대부분의 포유 세포에 존재하며 위, 장 및 신장에서 정상적인 생리작용을 위해 필요한 세포 보호작용에 관여한다. COX-2는 내피세포, 섬유아 세포, 대식세포 등에서 발현되며, 비교적 다량의 prostaglandin류를 유리하여 염증반응을 매개한다.¹⁷⁻²⁰⁾ Indomethacin은 비스테로이드성 소염진통제로 COX의 활성을 억제함으로써 그 작용을 나타낸다.²¹⁾ prostaglandin류가 NOS 경로에 미치는 영향에 관한 연구로는 다음의 보고가 있다. 흰쥐 대식세포계 J774에서 nanomolar 농도의 prostaglandin E₂ 및 iloprost(PGI₂의 안정한 analogue)가 LPS에 의한 iNOS 발현을 억제하였다.²²⁾ 또한 PGE₂와 PGI₂는 활성화된 마우스 복강 대식세포, 흰쥐 폐포 대식세포, 인간 말초혈액 단핵세포에서 TNF- α 유리를 억제함이 보고되었다.²³⁻²⁵⁾ Cytokine이 iNOS를 유도함이 알려져 있으므로 NO를 매개로 한 prostaglandin류의 과잉생성이 지속적인 iNOS유도를 억제할 가능성이 제시되었다.²⁶⁾

Tetsuka 등은 흰쥐의 사구체 간질 세포에서 indomethacin이 NOS mRNA 및 NO 생성을 증가 시킴을 보고한 바 있다.²⁷⁾ 또한 흰쥐의 대식세포-의존성 사구체 신염에서 indomethacin은 iNOS mRNA 전사를 촉진시키고 그 결과 iNOS의 활성화도 증가함이 보고되었다.²⁸⁾ Carrageenin으로 유도한 흰쥐의 발 부종에서 COX 경로의 생성물 억제가 NOS 경로에 미치는 영향에 관해서는 보고된 바가 없으므로 본 연구에서는 carrageenin으로 유도한 흰쥐의 발 부종에 미치는 indomethacin의 효과와 NOS유도에 미치는 효과를 시험하고자 하였다.

실험방법

시약 - λ -carrageenin, indomethacin, aminoguanidine hydrochloride을 Sigma사에서 구입하였다.

Biotinylated goat anti-rabbit IgG를 Gibco BRL사에서 구입하였다. 탈지분유, anti-iNOS pAb, BCIP/NBT phosphatase substrate는 각각 Difco, Transduction laboratory, Kirkegaard & Perry사에서 구입하여 사용하였다. PGE₂ ELISA kit는 Oxford biochemical research사에서 구입하였다.

Carrageenin에 의한 발 부종 측정 - 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐(170~180 g, 대한실험동물센터)를 ether로 가볍게 마취시킨 후 왼쪽 뒷발의 발바닥 피하에 carrageenin(0.85% saline에 현탁한 1% 액 0.1 ml)을 투여하였다(Winter, 1966). 발부피는 plethysmometer(Ugo Basil, Italy)를 이용하여 carrageenin을 투여하기 직전, 투여 후 6시간까지 매시간과 10시간에 측정하였다. 부종은 각 동물에서 carrageenin을 주사후 증가한 발 부종량(ml)을 주사전과 비교한 값으로 나타내었다. Indomethacin(0.15 M phosphate buffer (pH 8.0) 액에 현탁한 액을 체중 kg당 2.5 ml(10 mg/kg 체중)을 carrageenin을 투여하기 1시간 전 1회 경구 투여 하였다. Aminoguanidine(iNOS 억제제, 300 mg/kg 체중)은 주사용 생리식염수에 용해하여 carrageenin 투여 후 3시간 후에 1회, 꼬리정맥을 통하여 투여하였다.²⁹⁾

Prostaglandin E₂(PGE₂) 및 nitrite/nitrate 측정 - 흰쥐를 후두강타 후 실험 치사하고 carrageenin을 투여한 발을 긴 털이 나기 시작한 부분에서 잘라내었다. 잘라낸 발을 250 g에서 20분간 원심분리 하여 얻은 부종액의 무게를 측정하였다.⁴⁾ 이 액을 1,000 MWCO filter로 여과하여 혈액 등을 제거한 부종액을 PGE₂ 및 nitrite/nitrate 정량에 사용하였다. 부종액 중 nitrite/nitrate량은 NO analyzer(ANTEK model 745)를 사용하여 측정하였으며 sodium nitrite로부터 얻은 standard curve로부터 농도를 환산하였다. 부종액 중 PGE₂량은 PGE₂정량용 kit(Oxford biochemical research, USA)을 사용하여 정량하였다.

Western blot 분석에 의한 iNOS 단백질 측정 - Carrageenin을 투여하여 부종이 유발된 발을 calcaneus level에서 잘라내어 그 무게를 측정 후 발을 적당한 크기로 분쇄하고 발 무게의 2.5배의 lysis buffer를 가하고 Ultra-Torax T25(Janke & Kunzel)를 이용하여 균질화하였다. 균질액을 12,000 g에서 1시간 원심분리 한 후(4°C) 상등액을 취하여 분석 전까지 -70°C에 보관하였다. 단백질의 정량은 Bradford 방법에 준하였다.³⁰⁾

단백질 농도는 bovine serum albumin으로 작성한 표준곡선으로부터 환산하여 사용하였다.

Western blot 및 면역화학적 분석 - Laemmli 방법에 따라 상등액을 Bio-Rad Mini Protean II장치를 이용하여 SDS-PAGE분석을 시행하였다.³¹⁾ 단백질을 7.5% SDS-PAGE로 분리하고 전기 영동으로 nitrocellulose지에 전이하였다. Rabbit anti-macrophage iNOS antibody(1:1000)로 immunoblot하였다. Alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G를 이차 항체로 사용하고 5-bromo-4chloro-3-indolyl-phosphate/nitroblue tetrazolium(BCIP/NBT)로 발색하였다.

iNOS mRNA 측정 : Reverse-transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) - Carrageenin을 투여한 흰쥐의 발 조직으로부터 총 RNA를 guanidine-isothiocyanate 방법으로 얻었다.³²⁾ Random 6 mer와 M-MLV 역전사효소(Promega, Madison, WI)를 이용하여 2 µg의 총 RNA로부터 상보적인 DNA를 합성하였다. iNOS의 primer는 5'-ATGTCCGAAGCAA ACAAACATCAC-3'와 5'-TAATGTCCAGGAAGTAGGTG-3'이었으며 PCR 후 449 bp의 생성물을 얻었다. GAPDH의 primer는 5'-ACCTCAACTACA TGGTCTAC-3'와 5'-TTGTCAATTGAGACAAATGCC-3'이었으며 PCR 후 801 bp의 생성물을 얻었다. cDNA(1 µg)을 94°C에서 30초, 54°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 PCR 9700 thermo cycler(Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT)를 이용하여 40회 증폭하였다. RT-PCR후 반응혼합물 8 µg을 1.2% agarose gel에 loading하고 ethidium bromide로 염색하였다.

통계 분석 - 실험결과는 mean±S.E.M.으로 표시하였으며 각 군간의 평균치는 unpaired Student's t-test로 비교하였다.

실험결과

Carrageenin 으로 유도한 부종 - Carrageenin을 투여 시 모든 개체에서 부종이 유의성 있게 증가하였다. 부종은 carrageenin 투여후 3시간까지 급격히 증가하였으며(1.34±0.08 ml), 3시간이후 6시간까지 약간 감소되었으나 부종이 유지되었다(Fig. 1). 10시간에는 3시간에서의 부종에 비해서는 감소하였으나 carrageenin 투여 전에 비해서는 유의성있는 부종의 증가

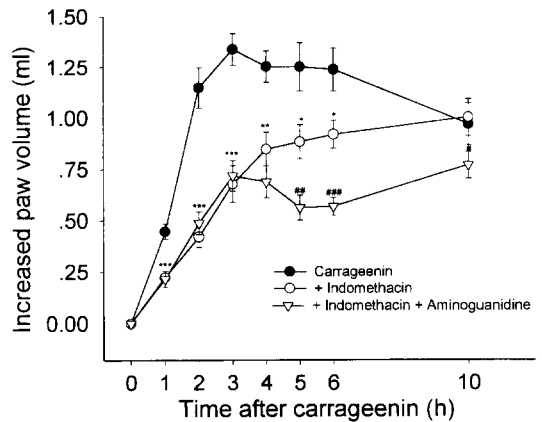


Fig. 1— Effect of indomethacin (10 mg/kg, p.o., ○) and indomethacin+aminoguanidine (300 mg/kg, i.v., ▽) on time-dependent increase (0 to 10 h) in rat paw volume following carrageenin administration (●). The results are expressed as means±SEM, n=10~20. ***** Significantly different from carrageenin-treated groups. **** Significantly different from indomethacin-treated groups (P<0.05, P<0.01, P<0.001).

(0.97±0.1 ml)가 유지되었다(Fig. 1). Indomethacin(10 mg/kg)을 carrageenin 투여 1시간 전에 경구로 투여하였을 때, 부종은 carrageenin만 투여한 군에 비하여 6시간 까지 유의성 있게 억제되었다(Fig. 1). 그러나 carrageenin만을 투여한 흰쥐와는 달리 부종은 계속 증가하였으며 10시간 후에는 carrageenin만을 투여한 흰쥐와 유사한 부종을 나타내었다(Fig. 1). Indomethacin을 전처리하고 carrageenin을 투여한 후 3시간에 aminoguanidine을 투여하였을때 carrageenin 투여 후 5, 6 및 10 시간에 발부종은 indomethacin투여군에 비하여 유의성있게 억제되었다(p<0.05)(Fig. 1).

PGE₂정량 - Carrageenin투여군의 4, 6, 10 시간의 부종액에서 PGE₂는 626.9±99.7, 685.8±59.3, 524.8±77.4 pg/paw 이었다. Indomethacin 전처리시 4, 6, 10시간의 부종액에서 PGE₂는 각각 57.8±20.1, 132.9±39.8, 156.8±42.8 pg/paw로 유의성 있게 억제되었다(각각 P<0.001, P<0.01, P<0.001)(Fig. 2).

부종액 중의 Nitrite/nitrate 정량 - Carrageenin 투여 후 부종액 중의 nitrite/nitrate는 4시간에 최고에 달하였고 이후 점진적으로 감소하였다. Indomethacin 전처리군에서는 carrageenin 단독 처치군에 비하여 4시간에 nitrite/nitrate가 유의성 있게 감소되었으나 4시간

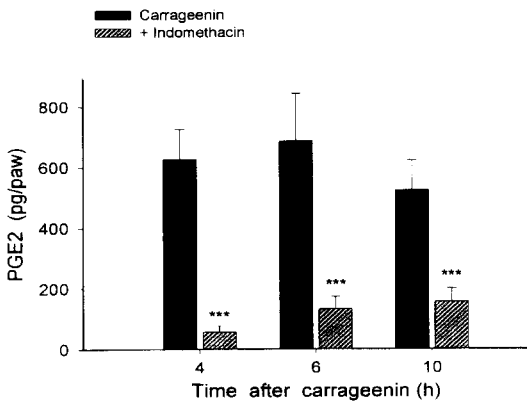


Fig. 2—Effect of indomethacin (10 mg/kg, p.o.) on prostaglandin E2 production in rat paw exudate following carrageenin administration. Data are expressed as means±SEM., n=7~8. *** Significantly different from carrageenin-treated groups (P<0.001).

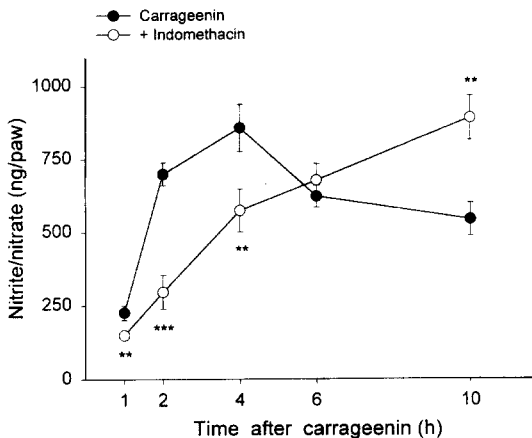


Fig. 3—Effect of indomethacin (10 mg/kg, p.o., ●) on nitrite/nitrate levels in rat paw exudate following carrageenin administration. (○). The results are expressed as means±SEM., n=10~20. ***** Significantly different from carrageenin-treated groups (P<0.01, P<0.001).

이후에는 nitrite/nitrate량은 지속적으로 증가하여 10 시간에는 888.9±76.3 ng/paw로 carrageenin 단독 투여시 보다 현저히 증가되었다(P< 0.001)(Fig. 3). Carrageenin투여군에 aminoguanidine을 투여 하였을 때 10시간에서 nitrite/nitrate량이 유의성 있게 감소되지 않았으나 indomethacin치리에 의해서 증가된 nitrite/nitrate(888.9±76.3 ng/paw)는 aminoguanidine에 의해서 유의성있게 억제(321.6±27.7 ng/paw) 되었다(P<0.001).

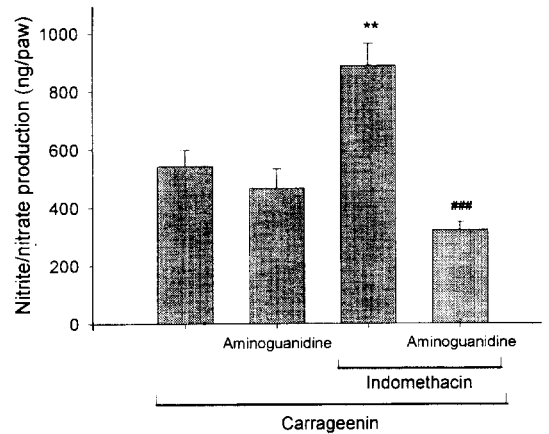


Fig. 4—Effects of indomethacin (10 mg/kg, p.o.) and aminoguanidine (300 mg/kg, i.v.) on nitrite/nitrate levels in rat paw exudate 10 h after carrageenin administration. The results are expressed as means±SEM, n=7~8. ** Significantly different from carrageenin-treated rats (P<0.01). *** Significantly different from indomethacin-treated rats (P<0.001).

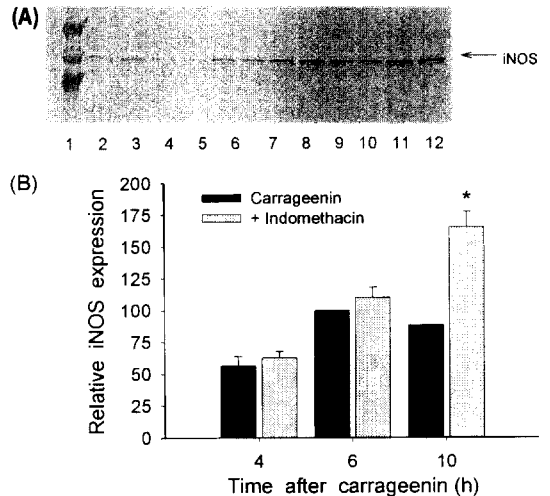


Fig. 5—Immunoblot analysis of iNOS protein in rat paw tissues. (A) Effect of indomethacin (10 mg/kg) on the expression of iNOS protein in paw tissues obtained from rats treated with 0.1 ml of 1% carrageenin. (lane 1-2, carrageenin at 4 h; lane 3-4, carrageenin+indomethacin at 4 h; lane 5-6, carrageenin at 6 h; lane 7-8, carrageenin+indomethacin at 6 h; lane 9-10, carrageenin at 10 h; lane 11-12, carrageenin+indomethacin at 10 h). (B) Cumulative data obtained from 3 different experiments. The level of iNOS protein was quantified by densitometry. Each bar represents mean±S.E.M. * Significantly different from carrageenin-treated rats (P<0.05).

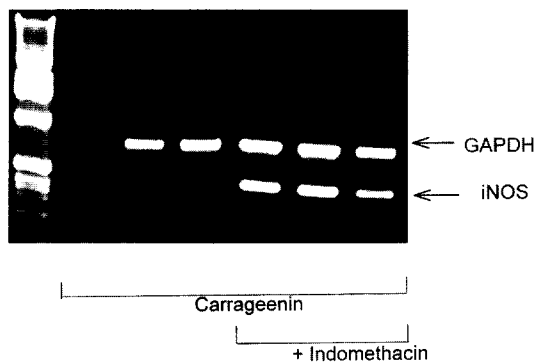


Fig. 6—RT-PCR analysis of iNOS mRNA in rat paw tissues. Effect of indomethacin on the expression of iNOS mRNA rat paw tissue at 4 h after carrageenin injection. RNA was subjected to RT-PCR analysis using specific primers for mouse macrophage iNOS and GAPDH, $n=3$.

iNOS 발현에 대한 indomethacin의 효과 - Carrageenin으로 부종이 유발된 흰쥐의 발 조직에서 iNOS 단백질은 4시간부터 발현되기 시작하여 6시간에 최고의 발현을 나타내었으며 10시간에는 다소 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5A & B). Carrageenin 투여전 indomethacin을 전처리한 군에서는 10시간에 $187.3 \pm 14.2\%$ 로 발현이 증가되었다(Fig. 5A & B). Carrageenin 투여 후 4시간에 발 조직 중의 iNOS mRNA는 경미하였으나 indomethacin을 전투여한 군에서 현저히 증가하였다(Fig. 6).

고 찰

Indomethacin은 대표적인 비스테로이드성 소염 진통제로서 COX의 활성을 억제하여 항염증작용을 나타낸다고 알려졌다. 본 연구에서도 indomethacin을 carrageenin 투여 1시간 전에 경구로 투여하였을 때 10시간까지 부종액 중의 PGE₂ 생성이 지속적으로 현저히 억제되었다. 그러나 염증 후기인 10시간에 indomethacin을 처리한 발부종은 carrageenin만 투여시의 부종과 유사하여 indomethacin이 PGE₂의 생성을 억제하나 발부종을 억제하지 않음을 관찰하였다.

Carrageenin 투여 초기인 4시간에 부종액 중의 nitrite/nitrate 양은 증가하였으나 이후 감소하였다. Indomethacin을 전처리한 군에서 nitrite/nitrate는 4시간까지 carrageenin투여군에 비하여 유의성 있게 억제되었으나 이후 지속적으로 증가하였으며 염증후기

인 10시간에는 carrageenin만 투여한 군과 비교할 때 유의성 있게 증가하였다. Indomethacin을 처리한 후 3시간째에 iNOS 억제제인 aminoguanidine을 투여하였을 때 indomethacin만 투여한 군에 비하여 10시간에 indomethacin투여로 증가된 nitrite/nitrate생성을 유의성 있게 억제하였으며 발 부종도 indomethacin 전처리 군에 비하여 유의성 있게 억제되었다.^{33,34)} 이는 indomethacin 전처리로 증가된 후기의 nitrite/nitrate는 유도형인 iNOS의 발현에 의한 것으로 추정되었다. 실제로, carrageenin 투여 이후 4시간째부터 발현되기 시작한 iNOS 단백질은 6 시간째에 최고의 발현을 보였고 이후 10시간째에는 다소 감소하여 nitrite/nitrate 생성과 평행적으로 iNOS 단백질이 발현되었으며 indomethacin을 전처리한 군에서는 6시간 이후 carrageenin만 투여한 군에 비하여 iNOS 단백질 발현이 증가하였으며 10시간에는 iNOS 단백질 발현이 유의성 있게 증가된 채 유지 되었다.⁴⁾ Carrageenin 투여 후 4시간의 발 조직에서 iNOS mRNA를 RT-PCR방법으로 시험한 결과 indomethacin의 전처리로 iNOS mRNA양이 현저히 증가되었음을 확인하였다. 이상의 결과로 보아 시간이 갈수록 indomethacin의 발 부종 억제 효과가 감소하는 것은 iNOS mRNA 및 단백 발현의 증가와 그로 인한 NO 생성 증가가 관여하였을 가능성을 시사한다.

본 연구결과는 carrageenin으로 유도된 염증모델에서 indomethacin 처리가 PGE₂의 생성을 억제하여 iNOS 발현 증가와 NO 생성 증가를 유도하였을 것으로 추정된다. Prostaglandin류가 NOS 경로에 미치는 영향에 관한 연구로 흰쥐 대식세포계 J774에서 prostaglandin E₂ 및 iloprost(PGI₂)의 안정한 analogue)가 LPS에 의한 iNOS발현을 억제하였다는 보고가 있으며²²⁾ 또한 indomethacin은 monocyte에서 PGE₂억제를 통하여 IL-1 β 합성을 증가 시켰다는 보고가 있다.³⁵⁾ 대식세포에서 IL-1 β 생성은 외부에서 PGE₂나 PGI₂를 가할 때 억제되고 COX경로를 차단하면 증강된다.³⁶⁾ PGE₂는 배양 사구체간질 세포에서 cytokine 자극으로 인한 iNOS 발현을 down regulation하였다.²⁷⁾ 따라서 prostaglandin류의 억제는 positive feedback으로 작용하여 지속적인 iNOS유도를 증가할 가능성이 있다.³⁶⁾ 이상의 결과 indomethacin은 carrageenin으로 유도한 흰쥐 발 부종 모델에서 초기에는 PGE₂를 억제하여 부종을 억제하나 후기에는 iNOS mRNA 전사 및 단백질 유도를 증가시키고

그로 인해 NO 생성을 증가시켜 indomethacin의 부중 억제 효과 감소에 기여하였을 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 서울 대학교 신의약품 개발 연구 센터의 연구 지원금으로 수행되었으며 이에 감사를 표합니다.

문헌

- 1) Vinegar, R., Schreiber, W., Hugo, R. : Biphasic development of carrageenin edema in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **166**, 96 (1969).
- 2) Vane, J. R., Dunn, C. J., Appleton, I., Tomlinson, A., Bishop-Bailey, D., Croxtall J. and Willoughby, D. A. : Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **91**, 2046 (1994).
- 3) Tomlinson, A., Appleton, I., Moore, A. R., Willis, D., Mitchell, J. A., and Willoughby, D. : Cyclooxygenase and nitric oxide synthase isoforms in rat carrageenin-induced pleurisy. *Br. J. Pharmacol.*, **113**, 693 (1994).
- 4) Salvemini, D., Misko, R. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G., Needleman, P. : Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **90**, 7240 (1993).
- 5) Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, E. A. : Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109 (1991).
- 6) Bredt, D. S. and Snyder, S. H. : Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **87**, 682 (1990).
- 7) Pollock, J. S., Forstermann, U., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Schmidt, H. W., Nakane, M., Murad, F. : Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **88**, 10480 (1991).
- 8) Stuehr, D. J. and Marletta, M. A. : Mammalian nitrate biosynthesis: macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **82**, 7738 (1985).
- 9) Lancaster, J. R., Jr. and Hibbs, J. B., Jr. : EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **87**, 1223 (1990).
- 10) Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. and Freeman. C. A. : Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **87**, 1620 (1990).
- 11) Wink, D. A., Kasprzak, K. S., Maragos, C. M., Elespuru, R. K., Nisra, M., Dunams, R. M., Cebula, R. A., Koch, W. H., Andrews, A. W., Allen, J. S. and Keefer, L. K. : DNA deamination ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science*, **254**, 1001 (1991).
- 12) Kilbourn, R. G., Jubran, A., Gross, S. S., Griffith, O. W., Levi, R., Adams, J., and Lodato, R. F. : Reversal of endotoxin-mediated shock by N^G-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**, 1132 (1990).
- 13) Mulligan, M. S., Hevel, J. M., Marletta, M. A., and Ward, P. ATissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **88**, 6338 (1991).
- 14) Ialenti, A., Ianaro, A., Moncada, S., Di Rosa, M. : Modulation of acute inflammation by endogenous nitrite oxide. *Eur. J. Pharmacol.*, **211**, 177 (1992).
- 15) Vane, J. R. And Botting, R. : Inflammation and the mechanisms of action of anti-inflammatory drugs. *FASEB J.*, **1**, 89 (1987).
- 16) Xie, W., Robertson, D. L. and Simmons, D. L. : Mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase: a new target for nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Drug. Dev. Res.*, **25**, 249 (1992).
- 17) Raz, A., Wyche, A., Needleman, P. : Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin 1. *J. Biol. Chem.*, **263**, 3022 (1989).
- 18) O'Sullivan, G. M., Chilton, F. H., Huggins, E. M., Jr., McCall, C. E. : LPS priming of alveolar macrophages for enhanced synthesis of eicosanoids involves induction of a novel PGH synthase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 14544 (1992).

- 19) Masferrer, J. L., Zweifel, B. S., Manning, P., Hauser, S., Leahy, K., Smith, W., Isakson, P., Siebert, K. : Selective inhibition of inducible COX II in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **91**, 3228 (1994).
- 20) Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., Isakson, P. : Pharmacological and biochemical demonstration of COX II in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **91**, 12013 (1994).
- 21) Vane, J. R. : Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature*, **231**, 232 (1971).
- 22) Morotta, P., Sautebin, L., and Di Rosa, M. : Modulation of induction of nitric oxide synthase by eicosanoids in the murine macrophage cell line J774. *Br. J. Pharmacol.*, **107**, 640 (1992).
- 23) Marcinkiewicz, J. : In vitro cytokine release by activated murine peritoneal macrophages: role of prostaglandins in the differential regulation of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 and interleukin 6. *Cytokine*, **3**, 327 (1991).
- 24) Mohr, C., Davis, G. S., Graebner, C., Hemenway, D. R., and Gemsa, D. : Enhanced release of prostaglandin E2 from macrophage of rats with silicosis. *Am. J. Respi. Cell. Mol. Biol.*, **6**, 390 (1992).
- 25) Haynes, K. R., Whitehouse, M. W., and Vernon-Roberts, B. : The prostaglandin E1 analogue, misoprostol, regulates inflammatory cytokines and immune functions in vitro the natural prostaglandin E1, E2, and E3. *Immunology*, **76**, 251 (1992).
- 26) Sautebin, L., Ialenti, A., Ianaro, A., and Di Rosa, M. : Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **114**, 323 (1995).
- 27) Tetsuka, T., Daphna-Iken, D., Srivastava, S. K., Baier, L. D., DuMaine, J., and Morrison, A. R. : Cross-talk between cyclooxygenase and nitric oxide pathways: Prostaglandin E2 negatively modulates induction of nitric oxide synthase by interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **91**, 12168 (1994).
- 28) Lianos, E. A., and Liu, J. : Changes in inducible nitric oxide synthase expression in experimental glomerulonephritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **215**, 405 (1997).
- 29) Winter, C. A., Nuss, G. W. : Treatment of Adjuvant Arthritis in Rats with Anti-inflammatory Drugs. *Arthritis and Rheumatism*, **9**, 394 (1966).
- 30) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1974).
- 31) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680 (1970).
- 32) Pak, Y. K., Kanuck, M. P., Berrios, K., Briggs, M. R., Cooper, A. D., and Ellsworth, J. L. : Activation of LDL receptor gene expression in HepG2 cells by hepatocyte growth factor. *J. Lip. Res.*, **37**, 985 (1996).
- 33) Griffiths, M. J. D., Messent, M., MacAllister, R. J., Evans, T. W. : Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br. J. Pharmacol.*, **110**, 963 (1993).
- 34) Misko, T. P., Moore, W. M., Kasten, R. P., Nickols, G. A., Corbett, J. A., Tilton, R. G., McDaniel, M. L., Williamson, J. R., and Currie, M. G. : Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur. J. Pharmacol.*, **233**, 119 (1993).
- 35) Knudsen, P. J., Dinarello, C. A., Strom, T. B. : Posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. *J. Immunol.*, **137**, 3189 (1988).
- 36) Kunkel, S. L., Chensue, S. W., Phan, S. H. : Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production. *J. Immunol.*, **136**, 186 (1986).